บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MU4880036

ชื่อโครงการ : การประยุกต์ใช้ลำไอออนพลังงานต่ำในการปรับปรุงคุณภาพพันธุ์ข้าวหอมมะลิ105 (*Oryza sativa* indica KDML 105) และผักกาดหอห่อ (*Lactuna sativa*)

ชื่อนักวิจัย : รองศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย
ภาควิชาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
เชียงใหม่ 50200

E-mail Address : soanu.1@gmail.com

ระยะเวลา : 3 ปี (2549-2551)

วัตถุประสงค์ : เพื่อหาลักษณะเฉพาะ บ่งบอก และวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในข้าวหอมมะลิพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำด้วยลำไอออนพลังงานต่ำ
เพื่อประยุกต์เทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำในการชักนำการกลายพันธุ์พืชต่างชนิด ได้แก่ ผักสลัด แตงกวา และพริก รวมทั้งแบคทีเรียด้วย

วิธีการทดลอง : ระดมยิงเมล็ดของข้าวหอมมะลิ 105 (*Oryza sativa indica* KDML 105) ด้วยไนโตรเจนไอออนที่ fluences ในช่วง 2-10 x10^{16} ions/cm^2 ที่พลังงาน 60 keV สุดท้ายได้ข้าวหอมมะลิพันธุ์กลาย 3 สายพันธุ์ได้แก่ TKOS, PKOS และ BKOS ซึ่งมีลักษณะภายนอกที่แตกต่างจากพ่อแม่อย่างเด่นชัด สำหรับ BKOS ถูกเลือกเพื่อมาหาลักษณะเฉพาะ รวมทั้งค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (anthocyanin biosynthesis) ในข้าวสายพันธุ์นี้ รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติการกำจัดสารอนุมูลอิสระ (antioxidant property) ต่อมาได้เลือกใช้เทคนิค HAT RAPD เพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์กลายและพ่อแม่, หลังจากนั้นได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง SCAR และ microsatellite เพื่อช่วยในการบ่งบอกสายพันธุ์ BKOS.

ลำดับต่อมาได้ประยุกต์ไนโตรเจนไอออนในการระดมยิงเมล็ดของพืชอื่นๆ ได้แก่ ผักสลัด แตงกวา และพริกเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ให้ได้ลักษณะดีโดยเงื่อนไขที่ใช้คือ สำหรับผักสลัดใช้พลังงาน 50 keV ที่ไอออนปริมาณ 6x10^{16} และ 1x10^{17} ions/cm^2 สำหรับแตงและพริกต่างใช้พลังงานที่ 60 keV แต่ใช้ปริมาณไอออนในการระดมยิงต่างกันคือสำหรับแตง ใช้ปริมาณ 2, 6, 8x10^{17} ions/cm^2 และที่ปริมาณ 6x10^{16} และ 1x10^{17} ions/cm^2 ใช้สำหรับพริก บันทึกเปอร์เซ็นการงอก การรอด รวมทั้งลักษณะภายนอกต่างๆที่เปลี่ยนแปลงป

ท้ายที่สุดประสบความสำเร็จในการประยุกต์เทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำในการค้นหายีนที่ต้องการในแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* อีกด้วย

ผลการทดลอง : ในการทดลองนี้มี 2 ส่วน ส่วนแรกการประยุกต์นำเทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 และในที่สุดได้ข้าวพันธุ์กลาย จำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ TKOS, PKOS and BKOS โดยที่ทั้ง TKOS และ PKOS มีคุณสมบัติที่ไวแสง นอกจากนั้น TKOS มีลักษณะสูงกว่าขาวดอกมะลิ 105 ในขณะที่ PKOS มีลักษณะที่เตี้ยกว่า (semi-dwarf) ส่วนสายพันธุ์ BKOS มีลักษณะทั้งไม่ไวแสง ต้นเตี้ย และมีการสะสมของรงควัตถุ anthocyanin ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของต้น เช่น ราก ใบ ต้น เปลือกและเยื่อหุ้มเมล็ด ในรายงานที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากข้าว BKOS สามารถที่จะกำจัดสารอนุมูลอิสระมาตรฐานเช่น DDPH ได้ดี ดังนั้นจึงสนใจที่จะศึกษายีน F3H F3 5 H, DRF และ ASN ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ anthocyanin ผลการศึกษาพบว่า การแสดงออก (transcripts) ของทุกยีนในข้าว BKOS มีมากกว่าของยีนในข้าว KDML 105 ด้วยเหตุนี้ชุดของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ anthocyanin *ได้แก่ MYB, MYC, WD 40, F3H F'3H, DFR ANS UFGT* และ *5 GT* จึงถูกโคลนจากข้าว BKOS โดยพบว่า *MYB, MYC* และ *WD 40* ซึ่งเป็น regulatory genes จะมีความเหมือนกับยีนในข้าวญี่ปุ่นด้วยเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 86, 89 และ 100% ตามลำดับ ในขณะที่ *F3H, F'3H , DFR ,ANS, UFGT* และ *5 GT* ซึ่งเป็น structural genes มีความเหมือนกับยีนในกลุ่มเดียวกันกับพืชชนิดอื่นๆ ที่ความเหมือน 92, 81,75, 89, 92, 86% ตามลำดับ สำหรับกลไกหน้าที่ของยีนเหล่านี้อยู่ระหว่างการศึกษาต่อไป

ในการบอกความแตกต่างระหว่างข้าวสายพันธุ์กลายทั้งหมด เทคนิค HAT RAPD marker ถูกเลือกเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ จากการใช้ 19 ไพรเมอร์ พบไพรเมอร์ OPI 11 ที่ให้แถบดีเอนเอขนาด 1.4 กิโลเบส ที่พบเฉพาะในข้าว BKOS และข้าวสายพันธุ์ญี่ปุ่น ต่อมาได้ออกแบบคู่ไพรเมอร์ (BF1 และBR1)โดยอาศัยลำดับเบสภายในแถบดีเอนเอขนาด 1.4 กิโลเบส เพื่อบ่งบอกจำเพาะสำหรับสายพันธุ์ BKOS หลังการเพิ่มขยายปริมาณดีเอนเอ พบแถบดีเอนเอขนาด 300 คู่เบส ในข้าว BKOS และข้าวญี่ปุ่น โดยที่ความเข้มที่พบใน BKOS มากกว่าในข้าวญี่ปุ่นประมาณ 5 เท่า แต่หลังจากใช้ไพรเมอร์ microsatellite (OSR28F และ OSR28R) จะบอกความแตกต่างระหว่างข้าว BKOS และข้าวญี่ปุ่นได้ ดังนั้นด้วย 2วิธีจะสามารถบ่งบอกข้าว BKOS ได้ ซึ่งจะใช้เพื่อการรับรองพันธุ์ข้าวนี้

หลังจากได้โคลนยีนทั้ง *rab 5* และ *rab 7* จากข้าวขาวดอกมะลิ 105 และพบว่าเป็นยีนที่มีการแสดงออกสูงสุดในเนื้อเยื่อราก ดังได้รายงานไว้ในคราวที่แล้ว ต่อมาจากการทดลองครั้งนี้พบอีกว่ายีนทั้งคู่ยังมีแสดงออกสูงในระยะเสื่อมสลายของใบข้าว ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจะเป็นการทดสอบหน้าที่ของยีนคู่นี้ในใบอ่อนแต่จะอาศัยปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อยสลายของเนื้อเยื่อ ได้แก่ ABA, salt stress รวมทั้งการใช้เชื้อก่อโรค (pathogen) เพื่อการชักนำทดสอบ

ในส่วนที่ 2 ของงาน ได้ประยุกต์ลำไอออนพลังงานต่ำเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชผักอื่นๆ ได้แก่ ผักกาดหอมหรือผักสลัด 5 สายพันธุ์, แตงกวา และพริก เงื่อนในการะดมยิงเมล็ดผักสลัดได้แก่ 50 keV ที่ไอออนปริมาณ $6x10^{16}$ และ $1x10^{17}$ ions/cm^2 สำหรับแตงและพริกต่างใช้พลังงานที่ 60 keV แต่ใช้ปริมาณไอออนในการระดมยิงต่างกันคือสำหรับแตง ใช้ปริมาณ 2, 6, $8x10^{17}$ ions/cm^2 โดยที่การยิงพริกใช้ปริมาณ $6x10^{16}$ และ $1x10^{17}$ ions/cm^2

ในการระดมยิงเมล็ดผักสลัดในครั้งนี้เป็นครั้งที่ 4 เนื่องจากที่ผ่านยังไม่พบลักษณะดีที่ต้องการ ผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกที่ปริมาณไอออนที่สูง จะน้อยกว่าที่ปริมาณต่ำ และชุดควบคุม แต่จำนวนต้นที่มีลักษณะผิดปรกพบมากกว่า (2.77%) ในขณะพบในชุดที่ใช้ไอออนปริมาณต่ำกว่า (0.77%) โดยลักษณะที่พบมีทั้ง การเจริญผิดปรกติ (ต้นเล็ก), ใบสีขาว, ทรงพุ่มผิดรูป อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยความสูงของทุดการทดลองไม่แตกต่างกัน

สำหรับแตง เงื่อนไขที่ใช้ในการระดมยิงไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของทุกกลุ่ม และค่าเฉลี่ยของความสูงก็ไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงต่อลักษณะภายนอกอย่างเด่นชัด ได้แก่การเปลี่ยนเพศ (เปลี่ยนจากเกสรเพศตัวเมียกลายเป็นเพศผู้) รวมทั้งขนาดของผลแตงจะสั้นกลมกว่า แต่รสชาติไม่แตกต่าง จากชุดควบคุม

สำหรับพริก ในเงื่อนไขที่ใช้ครั้งนี้ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอก, ความสูง และทรงพุ่มของต้นพริกในทุกการทดลอง สำหรับต้นพริกที่เกิดการเปลี่ยนแปลงจะพบในกลุ่ม $6x10^{16}$ ions/cm^2 เช่น ต้นเตี้ย รวมทั้งพบต้น(ในรุ่น M1)ที่เกิดโรคอันเนื่องจากเชื้อราก่อโรค *Colletotrichum* น้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ ดังนั้นจะปลูกในรุน M2 และ M3 เพื่อที่จะทดสอบคุณสมบัติในการต้านทานโรคดังกล่าวต่อไป

ท้ายที่สุดได้ประความสำเร็จในการใช้เทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำในการโคลนยีนจาก *Bacillus licheniformis* เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค *Collectotrichum spp* ที่เป็นสาเหตุของโรค anthracnose ในปทุมมาได้ สำหรับยุทธวิธีและการดำเนินการนำเสนอในที่นี้ด้วย

สรุปผล : ไนโตรเจนไอออนสามารถที่จะใช้ในการชักนำการกลายพันธุ์ (ภายใต้พลังงานและปริมาณไอออนที่เหมาะสม) ได้ในข้าว ผักสลัด แตงกวา รวมทั้งในแบคทีเรียได้ โดยพบว่าลักษณะภายนอกจะแตกต่างจากพ่อแม่อย่างเด่น รวมทั้งลักษณะกลายพันธุ์ยังถ่ายทอดสู่รุ่นลูกได้ เช่นข้าว

ข้อเสนอแนะ : เนื่องจากเทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำสามารถใช้ชักนำการกลายพันธุ์ทั้งในพืชและแบคทีเรีย รวมไปถึงใช้ในการค้นหายีนที่ต้อการได้ ดังนั้นเทคนิคนี้น่านำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชในอนาคต แต่อย่างไรก็ตามหากจะมีการนำไปใช้จริงควรที่จะต้องมีการวิจัยเพื่อให้ทราบถึงกลไกอันตรกิริยาระหว่างไอออนและวัตถุทางชีวภาพเสียก่อน

คำสำคัญ : jasmine rice *(Oryza sativa indica* KDML 105), low -energy ion beam, mutantion anthocyanin genes, HAT RAPD markers, lettuce, *Lactuna sativa,* cucumber*, Cucumis sativus*, chili*, Capsicum annuum,*, *Bacillus lichenisformis*

ABSTRACT

Project Code : RMU4880036

Project Title : Application of Low Energy Ion Beam for quality improvement in *Oryza sativa indica* KDML 105) and *Lactuna sativa*

Investigator : Assoc. Prof. Dr. Somboon Anuntalabhochai
Biology Department Science Faculty
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

E-mail Address : soanu.1@gmail.com

Project Period : 3 years (2006.-2008)

Objectives : To characterize, identify and analyze gene express in a jasmine rice mutant induced mutation by low energy ion beam

To apply the low energy ion beam to induce mutation in various plant crops including lettuce, cucumber and chili as well as in bacteria spp.

Methodology : Seeds of jasmine rice (*Oryza sativa indica* KDML 105) were bombarded with nitrogen ions at fluences of 2-10 x10^{16} ions/cm2 and energy 60 keV . Three mutants named TKOS, PKOS and BKOS, which had different characteristic, were obtained. The BKOS was chosen for further characterization and analysis such as cloning genes involving in anthocyanin biosynthesis pathway and their expression, antioxidant property. Then HAT RAPD was used to determine genetic modification in the mutants, subsequently, SCAR and microsatellite marker were applied to identify the BKOS.

Consequently, nitrogen ions were applied to bombard seeds of other plant crops including lettuce, cucumber and chili in order to induce mutation. The bombarding conditions were respectively. After bombardment the seed were germinated and subsequently cultivated into soil. Percentage of germination and survival were recorded as well as for phenotypic changes.

Finally, low-energy ion-beam technique was also applied successfully to induce mutation in bacterial, *Bacillus licheniformis,* for cloning gene of interest.

Result **:** Low energy ion beam was applied to induced mutation to jasmine rice (*Oryza sativa indica* KDML 105). Finally, three mutants named TKOS, PKOS and BKOS were obtained. Both TKOS and PKOS exhibited photoperiod insensitive. However, TKOS was taller than KDML 105 while PKOS was shorter or semi-dwarf. BKOS was also photoperiod insensitive and short in stature and anthocyanin was found to accumulate in various tissue such as root, leaves, stem, seed coat and pericarp. In previous report, BKOS's extract showed high antioxidant activity to reduce DDPH, than the others. Consequently, genes involving in anthocyanin biosynthesis, F3H F3 5 H, DRF and ASN were investigated. The intensity of their transcript in BKOS was higher than the KDML 105.Therefore, a set of genes involving in anthocyanin biosynthesis was cloned and sequenced from BKOS. They were MYB, MYC, WD 40, F3H F'3H, DFR ANS UFGT and 5 GT. The MYC, MYB and WD 40 were regulatory gene and showed high homology to japonica rice at 86, 89 และ 100% respectively. While the F3H F'3H, DFR ANS UFGT and 5 GT were structural genes and showed high homology to several plant species at 92, 81,75, 89, 92, 86% respectively. Their functional mechanisms were under further investigation.

HAT RAPD marker was chosen to distinguish among rice varieties, of 19 primers one of arbitrary primer named OPI 11 provided an additional band at 1.4 kp only in BKOS and japonica varieties. Subsequently, a of primer named BF1 and BR1 was designed based on a internal sequence of the 1.4 kp and used to specific identify for BKOS. An expecting band at 300 bp was amplify only in BKOS and japonica varieties, however, an intensity of this band was 5 fold higher than to japonica's. Using microsatellite marker named OSR28F and OSR28R revealed genetic different between BKOS and japonica rice. With both techniques could be used for BKOS identification purpose in order to protect the rights of BKOS.

Rab 5 and *rab 7* genes were cloned from KDML 105 and documented in previous report. Both genes showed highest expression in root. Moreover, in this experiment revealed that these

genes also expressed high in senescent rice-leaves. Therefore , several inductions involving senescent factors including ABA, salt stress and pathogenic factors are under investigation for their responsibility to leaf senescence in jasmine rice.

In the 2nd section, ion beam was applied for crop improvement in different vegetable crops including 5 varieties of lettuce (*Lactuna sativa*), *Cucumis sativus* and *Capsicum annuum*. For *Lactuna sativa*, the condition for bombardment was at 50 keV and with $6x10^{16}$ และ $1x10^{17}$ ions/cm^2. Both *Cucumis sativus* and *Capsicum annuum* were bombarded at 60 keV but the fluences of 2, 6, $8x10^{17}$ ions/cm^2 for the before and $6x10^{16}$ และ $1x10^{17}$ ions/cm^2 for the later.

This was the 4th attempt of the bombardment to the lettuce since required characters were not found in previous bombardments. In this experiment a percentage of germination at higher fluences was slightly greater to lower fluences and control. However, number of modified phenotypes were 2.77% and 0.77% for the higher and lower fluences respectively. Those phenotypes were abnormal in growth, plant profile and albino leaves.

In *Cucumis sativus*, both percentage of germination and plant height were not different significantly in all experimental groups. The significantly modified phenotypes induced by nitrogen ions were detected. These were sex reversal (from female to male reproductive organ) and fruit size was round and smaller than control's. However, its taste was not different.

Effect of nitrogen ion to *Capsicum annuum*, percentage of germination, plant's height and profile were not different significantly in all experimental groups. All modified phenotypes were found in only the $6x10^{16}$ ions/cm^2 groups for instance short in stature. Moreover, in this group (in M1 generation) a percentage of symptom caused by *Colletotrichum* fungus was lower than in the others. In order to test this property (the pathogen resistance) M2 and M3 generations are further investigation.

Finally, low-energy ion beam was also successfully applied to clone a particular gene from *Bacillus licheniformis* for growth

suppression of *Collectotrichum spp* causing anthracnose in curcuma.. Strategy and methodology of the application was demonstrated and discussed.

Conclusion **:** Nitrogen ions with and appropriate conditions (certain range of energy and fluences) were able to induce mutation in plant varieties such as rice, lettuce, cucumber, and chili, as well in bacterial species. And phenotypes of those mutants exhibited significantly different from wild types. Moreover, these characters was able to heritage into next generation.

Recommendation : Since low energy ion beam can be used for induction mutation in both plant and bacterial species, and also used for gene cloning. In near future, this technique could be applied for crop improvement. However, a fundamental questions for mechanism of interaction between ions and biological material are needed to be elucidated.

Keywords **:** jasmine rice *(Oryza sativa indica* KDML 105), low -energy ion beam, mutantion anthocyanin genes, HAT RAPD markers, lettuce, *Lactuna sativa,* cucumber*, Cucumis sativus*, chili*, Capsicum annuum,*, *Bacillus lichenisformis*