การโคลนและคุณลักษณะของยีน *Ankyrin-Repeat Domain Zinc Finger Protein* ในยางพารา (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.Juss.) Muell. Arg.)

อาดีหละ เจะเมาะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยทักษิณ
2554

บทคัดย่อ

ชื่อวิทยานิพนธ์ : การโคลนและคุณลักษณะของยีน *Ankyrin-Repeat Domain Zinc Finger Protein* ในยางพารา (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg.)

ชื่อ-สกุลผู้ทำวิทยานิพนธ์ : นางสาวอาดีหละ เจะเมาะ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : อาจารย์ ดร.เปลื้อง สุวรรณมณี และ อาจารย์ ดร.อรุณรัศมิ์ วณิชชานนท์

ปริญญาและสาขา : ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ปีที่สำเร็จการศึกษา : 2554

การโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Ankyrin-Repeat Domain Zinc Finger Protein* ในยางพารา (*HbKR1*) โดยใช้เทคนิค Rapid Amplification cDNA Ends (RACE) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbKR1* มีขนาด 2,596 คู่เบส ประกอบด้วยบริเวณที่แปลรหัส (Open Reading Frame) ขนาด 2,106 คู่เบส เป็นกรดอะมิโน 701 Residues มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 72.52 kDa และมีค่า Isoelectric Point (pI) เท่ากับ 5.60 ส่วนบริเวณที่ไม่แปลรหัสด้านปลาย-5′ ขนาด 204 คู่เบสและด้านปลาย-3′ ขนาด 286 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ HbKR1 กับ KR1 ของพืชชนิดอื่นๆ พบว่า Homology กับลำดับกรดอะมิโน KR1 ของ *Ricinus communis*, *Capsicum annuum*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* และ *Medicago truncatula* เท่ากับ 81.2%, 56.6%, 54.5%, 43.3% และ 39.4% ตามลำดับ การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HbKR1* ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 อายุ 3 เดือน โดยใช้เทคนิค Semiquantitative RT-PCR (sqRT-PCR) พบว่า ยีน *HbKR1* มีการแสดงในทุกเนื้อเยื่อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีการแสดงออกมากที่สุดในเนื้อเยื่อใบที่เจริญเต็มที่ (Mature Leaves) และมีการแสดงออกน้อยที่สุดในเนื้อเยื่อราก การศึกษาผลของการขาดน้ำและความเค็มในต้นยางติดตาสายพันธุ์ RRIM600 ที่มีอายุ 3 เดือน พบว่า การขาดน้ำและความเค็มมีผลให้การแสดงออกของยีน *HbKR1* เพิ่มขึ้นทั้งในเนื้อเยื่อใบและลำต้น เมื่อระยะเวลาในการขาดน้ำและความเค็มเพิ่มขึ้นการแสดงออกของยีน *HbKR1* จะเพิ่มขึ้นด้วย โดยการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในเนื้อเยื่อใบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ตั้งแต่เริ่มงดให้น้ำเป็นเวลา 1 วัน ส่วนในเนื้อเยื่อลำต้นการแสดงออกของยีน *HbKR1* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ตั้งแต่เริ่มงดให้น้ำเป็นเวลา 4 วัน สำหรับต้นยางพาราที่ได้รับโซเดียม- คลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ทั้งในเนื้อเยื่อใบและลำต้นมีการแสดงออกของยีน *HbKR1* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ ($p<0.05$) ตั้งแต่ได้รับโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 30 นาที นอกจากนี้การกรีด ยางยังมีผลให้การแสดงออกของยีน *HbKR1* ในน้ำยางพาราเพิ่มขึ้นทั้งระบบการกรีดปกติ (วันเว้น 2 วัน) และการกรีดถี่ (กรีดทุกวัน) โดยยางพาราที่ถูกกรีดถี่มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นมากกว่าต้นยางที่กรีดปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงว่าการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในยางพารามีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการตอบสนองต่อภาวะความเครียดทั้งที่เกิดจากการขาดน้ำ ความเค็ม และการถูกกรีด

Abstract

Thesis Title: Molecular Cloning and Characterization of *Ankyrin-Repeat Domain Zinc Finger Protein* Gene from *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg.

Student's Name: Adilah Jehmoh

Advisory Committee: Dr. Pluang Suwanmanee and

Dr. Arunrut Vanichanon

Degree and Program: Master of Science in Biology

Academic Year: 2011

The complimentary DNA (cDNA) of *Ankyrin-repeat domain zinc finger protein* gene from *Hevea brasiliensis* (*HbKR1*) was cloned by Rapid Amplification cDNA Ends (RACE) technique. The full-length *HbKR1* consists of 2,596 bp including an open reading frame of 2,106 bp which encodes a protein of 701 amino acids with a predicted molecular mass of 72.52 kDa and an isoelectric point of 5.60. The 204 bp of 5′ non-coding region and 286 bp of 3′ non-coding region were observed. The deduced amino acid sequence of HbKR1 was shown 81.2%, 56.6%, 54.5%, 43.3% and 39.4% homology to amino acid sequence of KR1 from other plants such as *Ricinus communis*, *Capsicum annuum*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* and *Medicago truncatula*, respectively. Semiquantitative RT-PCR (sqRT-PCR) was used to analyses an expression pattern of *HbKR1* gene from three-month old of RRIM600 *Hevea* seedlings. The mRNA level of *HbKR1* in different tissues of *Hevea* seedlings was significant difference, which highest expression in mature leaves and lowest expression in roots. The *HbKR1* transcript levels in leaves and stems of three-month old of grafted RRIM600 *Hevea* clone was increased in response to a water deficit and salinity. When grafted *Hevea* trees were subjected by water deficit, the *HbKR1* mRNA in leaves was increased at 1 day after subjection. The mRNA level of *HbKR1* in stems was increased at 4 day after subjection. When grafted *Hevea* trees were treated by 0.5 M sodium chloride, the mRNA level in leaves was increased at 30 min after subjection and similar result was obtained in stems. The expression analysis of *HbKR1* in *Hevea* trees was significantly higher in latex of frequency

tapping (one tapping per day) than that of normal tapping (one tapping per two days). These results suggested that *HbKR1* may play a role in response to drought, salinity and tapping in *Hevea* tress.

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาช่วยเหลือ แนะนำ ให้คำปรึ กษาอย่างดียิ่ง จาก อาจารย์ ดร.เปลื้อง สุวรรณมณี ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัย ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร.อรุณรัศมิ์ วณิชชานนท์ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร.นวลพรรณ ศิรินุพงศ์ ประธานกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ แนวคิด วิธีการ คำแนะนำ และตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ยิ่ง

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร .สมภพ อินทสุวรรณ ที่กรุณาตรวจสอบ รูปแบบและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่ให้เงินสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์แบบบางส่วน และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยทักษิณและสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่มอบทุน อุดหนุนวิทยานิพนธ์ ระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปีการศึกษา 2553 ทำให้การวิจัยสามารถดำเนินไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณวันเพ็ญ นันทานุวัฒน์ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางใ น การทดลอง และขอบคุณนิสิตปริญญาโทสาขาวิชาชีววิทยาทุกชั้นปีที่คอยให้กำลังใจและคอยช่วยเหลือมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ บิดา มารดา ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ตลอดจนผู้มีพระคุณและคณาจารย์ผู้ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยจนสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จ

อาดีหละ เจะเมาะ

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	ภูมิหลัง	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
	ของเขตของการวิจัย	2
	สถานที่และระยะเวลาการทำวิจัย	3
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
	ความเป็นมาของยางพารา	4
	อนุกรมวิธานของยางพารา	5
	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของยางพารา	5
	น้ำยาง	7
	สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการปลูกยางพารา	8
	กลไกการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในพืช	9
	Ankyrin Repeat Protein (ANK).....	15
	Zinc Finger Protein (ZFP)..... .	17
	Ankyrin-Repeat Domain Zinc Finger Protein (KR1) ในพืช..... .	19
	การโคลนยีนโดยเทคนิค Rapid Amplification cDNA Ends (RACE).....	20
3	วิธีดำเนินการวิจัย	21
	วัสดุและสารเคมี	21
	การเตรียม Total RNA.....	23
	ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ Total RNA.....	24
	การโคลนยีน *HbKR1* ในยางพาราโดยเทคนิค RACE.....	25
	การทำ TA Cloning.....	31
	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbKR1*.....	34
	การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HbKR1*.....	34

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	วิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HbKR1* ทางสถิติ.....	37
4	ผลการวิจัย	38
	การโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbKR1* ในยางพาราโดยเทคนิค RACE.....	38
	การเตรียม Total RNA จากน้ำยางพารา.....	38
	การเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน *HbKR1* ในน้ำยางพาราด้วยเทคนิค PCR.....	39
	การทำ TA Cloning และการคัดเลือกโคโลนี.....	39
	การเตรียมพลาสมิด	41
	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbKR1*.....	42
	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ HbKR1 กับพืชชนิดอื่นๆ....	45
	การแสดงออกของยีน *HbKR1* ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของกล้ายางพาราสายพันธุ์ RRIM600.....	48
	ผลของการขาดน้ำต่อการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในเนื้อเยื่อใบและลำต้นของกล้ายางพาราสายพันธุ์ RRIM600.....	50
	ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในเนื้อเยื่อใบและลำต้นของกล้ายางพาราสายพันธุ์ RRIM600.....	55
	ผลของการกรีดต่อการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในน้ำยางพาราสายพันธุ์ RRIC110.....	60
5	อภิปรายผล สรุปผลและข้อเสนอแนะ	63
	อภิปรายผลการศึกษา	63
	สรุปผลการทดลอง	68
	ข้อเสนอแนะ	70
บรรณานุกรม		71
ภาคผนวก		77
ประวัติย่อผู้วิจัย		88

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Family ของ ANK ที่สำคัญที่พบในสัตว์ พืช และแบคทีเรีย	16
2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้านปลาย-5′ และด้านปลาย-3′	22
3	เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	23

สารบัญภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	ส่วนของใบยางพารา และดอก	7
2	Electron Micrograph ของท่อน้ำยางที่ตัดตามยาว ซึ่งประกอบด้วย Rubber Particle (RP), Lutoid (L), Frey-Wyssling Particle (FW) และ Latex Vessel Wall (LVW)	8
3	กลไกการตอบสนองต่อ Stress ผ่าน Early Genes และ Delayed Genes..	10
4	Stress Signaling Pathways เป็นกลไกการตอบสนองต่อ ภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่มีชีวิตในพืช	12
5	กระบวนการเกิด Programmed Cell Death ในพืช.....	14
6	รูปแบบการตอบสนองต่อ Biotic Stresses ในพืช.....	14
7	โครงสร้างแบบ L-Form และตำแหน่งของกรดอะมิโน TPLH ในโครงสร้างของโปรตีน Human Ankyrin R.....	15
8	โครงสร้างของ Zinc Finger Protein (ZFP).....	17
9	การเพิ่มปริมาณของสาย 3' RACE cDNA	21
10	การเพิ่มปริมาณของสาย 5' RACE cDNA	21
11	ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน *HbKR1* ด้านปลาย-5′ และปลาย-3′.....	29
12	Agarose Gel Electrophoresis ของ Total RNA จากน้ำยางพาราสายพันธุ์ RRIM600.....	38
13	Agarose Gel Electrophoresis ของ First-Strand cDNA ที่ได้จากเทคนิค RACE.....	39
14	การเกิดโคโลนีสีขาวและสีฟ้าของเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดทั้งที่มีดีเอ็นเอสายผสมและไม่มีดีเอ็นเอสายผสม	40

สารบัญภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	Agarose Gel Electrophoresis ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณพลาสมิดเพื่อตรวจสอบแถบเป้าหมาย.....	41
16	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *HbKR1* ซึ่งประกอบด้วยเบส ATG เป็นรหัสเริ่มต้น (Start Codon) มีเบส TAA เป็นรหัสหยุด (Stop Codon) และมีตำแหน่ง ARE (ATTTA), Polyadenylation Site (AATAA) และ Poly A Tail..... .	44
17	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *HbKR1* ในยางพารากับพืชชนิดอื่นๆ ในฐานข้อมูล NCBI.....	47
18	Agarose Gel Electrophoresis ของ Total RNA ในเนื้อเยื่อใบอ่อน (Young Leaves: YL) ใบเจริญพันธุ์ (Mature Leaves: ML) ใบชราภาพ (Senescence Leaves: SL) ก้านใบ (Petioles: P) ราก (Roots: R) และน้ำยาง (Latex: La) ของต้นกล้ายางพาราสายพันธุ์ RRIM600.....	48
19	(ก) Agarose Gel Electrophoresis ของ RT-PCR Product ของยีน *HbKR1* และยีน 18S rRNA ในเนื้อเยื่อใบอ่อน ใบเจริญเต็มที่ ใบชราภาพ ก้านใบ ราก และน้ำยาง ของต้นกล้า ยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 (ข) ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในเนื้อเยื่อต่างๆ	49
20	Agarose Gel Electrophoresis ของ Total RNA จากเนื้อเยื่อต่างๆ ของกล้ายางพาราติดตาสายพันธุ์ RRIM600 ที่ขาดน้ำ (ก) เนื้อเยื่อใบ (ข) เนื้อเยื่อลำต้น.....	50
21	(ก) Agarose Gel Electrophoresis ของยีน *HbKR1* และยีน 18S rRNA ในเนื้อเยื่อใบที่ขาดน้ำที่ช่วงเวลาต่างๆ ได้แก่ ได้รับน้ำทุกวันเป็นเวลา 10 วัน (Control: C) งดให้น้ำ 1 วัน (1) งดให้น้ำ 2 วัน (2) งดให้น้ำ 4 วัน (4) งดให้น้ำ 6 วัน (6) งดให้น้ำ 8 วัน (8) งดให้น้ำ 10 วัน (10) (ข) ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในช่วงเวลาต่างๆ.....	52

สารบัญภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	(ก) Agarose Gel Electrophoresis ของยีน *HbKR1* และยีน 18S rRNA ในเนื้อเยื่อลำต้นที่ขาดน้ำที่ช่วงเวลาต่างๆ ได้แก่ ได้รับน้ำทุกวันเป็นเวลา 10 วัน (Control: C) งดให้น้ำ 1 วัน (1) งดให้น้ำ 2 วัน (2) งดให้น้ำ 4 วัน (4) งดให้น้ำ 6 วัน (6) งดให้น้ำ 8 วัน (8) งดให้น้ำ 10 วัน (10) (ข) ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในช่วงเวลาต่างๆ.....	54
23	Agarose Gel Electrophoresis ของ Total RNA จากกล้ายางพาราที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ก) เนื้อเยื่อใบ (ข) เนื้อเยื่อลำต้น.....	55
24	(ก) Agarose Gel Electrophoresis ของยีน *HbKR1* และยีน 18S rRNA ในเนื้อเยื่อใบที่ ได้รับโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ช่วงเวลาต่างๆ ได้แก่ 0, 0.5, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง (ข) ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในช่วงเวลาต่างๆ..... .	57
25	(ก) Agarose Gel Electrophoresis ของยีน *HbKR1* และยีน 18S rRNA ในเนื้อเยื่อลำต้นที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ช่วงเวลาต่างๆ ได้แก่ 0, 0.5, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง (ข) ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในช่วงเวลาต่างๆ..... .	59
26	Agarose Gel Electrophoresis ของ Total RNA จากน้ำยางพาราสายพันธุ์ RRIC110 ที่กรีดถี่ (1) และกรีดปกติ (2).....	60
27	ผลของการกรีดถี่และกรีดปกติต่อการแสดงออกของยีน *HbKR1* (ก) Agarose Gel Electrophoresis ของ RT-PCR Product ของยีน *HbKR1* และ 18S rRNA (ข) ค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีน *HbKR1* ในน้ำยางของกล้ายางพาราสายพันธุ์ RRIC110.....	62
28	สรุปกลไกการตอบสนองของยีน *HbKR1* ต่อการขาดน้ำ ความเค็มและการกรีด.....	69