

บทคัดย่อ

สภาวะโลกร้อน (Global Warming) หรือ สภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง (Climate Change) ส่งผลกระทบต่อพื้นที่เกษตรกรรมโดยตรงทั้งปัญหาโรคพืช แมลงศัตรูพืช และสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น สภาวะขาดน้ำ ดินเค็ม และน้ำท่วมฉับพลัน เป็นต้น โครงการวิจัยนี้วัตถุประสงค์เพื่อ 1. ค้นหายีนและโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และสร้างชุด cassette ยีน สำหรับนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และ 2. เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชและพัฒนาเทคนิคการถ่ายฝากยีนที่เกี่ยวข้องกับความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยใช้เทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่พืชและเทคนิค Ovary Drip งานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง ได้แก่ ยีน *SINA3* และ *SINAT3* จากข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง 4 พันธุ์ ได้แก่ ตากฟ้า 1 (TF1), ตากฟ้า 3 (TF3), นครสวรรค์ 3 (NS3) และ นครสวรรค์ 1 (NS1) โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณยีน *SINA3* และ *SINAT3* มีขนาดเท่ากับ 1,026 คู่เบส และ 1,050 คู่เบส ตามลำดับ สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีนได้เท่ากับ 341 และ 349 amino acids จากนั้นทำการสร้างชุด cassette ยีน โดยการเชื่อมต่อชิ้นยีน *ZmSINA3* และ *ZmSINAT3* เข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) ที่ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มินเตอร์ (NOS) ได้พลาสมิดสายผสม pCAMBIA2300 – *ZmSINA3* และ pCAMBIA2300 – *ZmSINAT3* มีขนาด 10.6 และ 10.7 กิโลเบส ตามลำดับ และได้มีการนำชุด cassette ยีน pCAMBIA2300 – *ZmSINA3* ไปถ่ายฝากยีนเข้าสู่พืชต้นแบบ (ยาสูบ) เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่ทนต่อสภาวะเครียดในยาสูบ โดยการเพาะเลี้ยงยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *SINA3* บนอาหารสูตร MS ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ สภาวะขาดน้ำ เติม PEG 6000 ความเข้มข้น 0, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และสภาวะเครียดเกลือ เติม NaCl ความเข้มข้น 0, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เปรียบเทียบกับยาสูบปกติที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 และ NaCl ระดับความเข้มข้นเดียวกันเป็นชุดควบคุม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน พบว่า ต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับต้นยาสูบชุดควบคุม ทั้งน้ำหนักสด ความสูงของต้น และจำนวนใบ แสดงว่ายีน *SINA3* ที่ถ่ายฝากเข้าสู่ยาสูบ แบบ over expression นั้น ไม่สามารถทนทานต่อสภาวะเครียดเกลือและสภาวะขาดน้ำได้ งานวิจัยการศึกษาและค้นหายีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NSW3) โดยอาศัยเทคนิค PCR พบว่า เมื่อนำ cDNA ของใบข้าวโพดขาดน้ำนาน 7 วัน และ cDNA จากใบข้าวโพดให้น้ำปกติ (control) มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ arbitrary ACP primers จำนวน 12 ไพรเมอร์ สามารถตรวจหาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันได้ (differentially expressed genes) และพบ ACP primers จำนวน 2 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเอของยีนที่แตกต่างกันชัดเจนที่สุด (up-regulated) ได้แก่ ACP2 และ ACP12 ซึ่งข้อมูลที่ได้จะนำไปสู่การศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในพืชและพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้งต่อไป สำหรับงานวิจัยการปรับปรุงและถ่ายฝากยีนทนทานสภาพแวดล้อม *OsSKIPa* สู่อั่วเหลียงโปรตีนสูงโดยเทคนิค Ovary drip นั้น เป็นการพัฒนาเทคนิคในการถ่ายยีน ซึ่งเป็นเทคนิคใหม่ที่มีประโยชน์อย่างมากเพราะสามารถลดข้อกั้ววลที่เกิดจากการใช้เวกเตอร์ เช่น ยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะและยีนที่ไม่พึงประสงค์อื่นๆ ซึ่งจะติดมากับเวกเตอร์ ในขณะที่

linear gene cassette ที่ออกแบบไว้จะมีเพียงยีนที่เราต้องการเท่านั้น งานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบ linear gene cassette ของยีน *OsSKIPa* สำหรับใช้ในการถ่ายฝากยีนเข้าสู่ถั่วเหลืองโดยวิธีการ Ovary drip ผลจากการถ่ายยีน *OsSKIPa* เข้าสู่ถั่วเหลืองพันธุ์ไทยนี้ยังไม่พบ Insert จาก linear gene cassette ในถั่วเหลืองรุ่นลูกที่ได้รับการถ่ายยีนโดยวิธีดังกล่าวซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากสภาวะแวดล้อมและอุณหภูมิของประเทศไทยที่ไม่เหมาะสมต่อวิธีการดังกล่าวและทำให้ไม่เกิดการถ่ายยีน

Abstract

Global warming or climate change is a directly affect to agricultural crops, diseases, insect pests and abiotic stress such as drought salinity and flooding, etc. This research study aimed to (1.) gene discovery and clone to abiotic stress and invent expression cassette for applying to plant variety improvement particularly against abiotic stress; and (2.) plant variety improvement and gene transfer technique improvement to abiotic stress by plant gene transfer and ovary drip techniques. In this study, two full-length cDNA sequences of corn (*Zea mays* L.) encoded to *ZmSINA3* and *ZmSINAT3* were isolated from four corn variety names TAKFA 1, TAKFA 3, NAKORNSAWAN 3 and NAKORNSAWAN 1 via RT – PCR based method. The *SINA3* and *SINAT3* gene sequence contains a fragment of 1,026 and 1,050 bp complete ORF, encoded to 341 and 349 amino acids polypeptide. A 1,026 bp and 1,050 bp fragment of *ZmSINA3* and *ZmSINAT3* gene were inserted into plant expression vector pCAMBIA2300 containing 35SCaMV promoter and NOS terminator. *NPTII* was used as a selectable marker in this selection. It were found that the total size of derived over – expression cassette (pCAMBIA2300 – *ZmSINA3* and pCAMBIA2300 – *ZmSINAT3*) were 10.6 and 10.7 kb. The *SINA3* gene was constructed into a plant expression vector and transformed into *Nicotiana tabacum*. Transgenic tobaccos were grown in MS medium. Drought was induced by adding Polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) to the culture medium at concentrations of 0, 10, 15, 20 and 25 % (w/v), while salinity was induced by adding sodium chloride (NaCl) to the medium at concentrations of 0, 1, 1.5, 2, 2.5 and 3 % (w/v). The plant growth parameters were analyzed after 30 days in culture. Differentiation fresh weight, number of leaves and shoot length of the transgenic plants were similar to those of wild-type plants. The result showed that overexpression of *SINA3* gene do not tolerant to salt and drought stresses in transgenic tobacco. The research project of genes discovery expressed in response to drought stress in the drought tolerant Maize (NSW3 variety) by PCR technique, we have used an annealing control primer (ACP) based reverse transcription polymerase chain reaction to identify drought-stress-induced differentially expressed genes in cDNA of maize leaves at 7 days after water depletion and cDNA from maize leaves to usually water (control) using 12 ACP-based RT-PCR screening method, two up-regulated ACPs were identified which were ACP2 and ACP12. The information might be helpful for better understanding of drought stress mechanism in maize to further gaining information about the plant genetic improvement for drought tolerance in plant. The research project of genetic manipulation and gene insertion of *OsSKIPa*, a multistress tolerance gene to high protein soybean using ovary drip transformation, we have the development of direct transformation become very useful and more attractive to researcher because of the concerning on using genetic maker in the vector such as antibiotic gene or other illegal inserts. With directed transformation method, linear gene cassette will be

the only insert to plant genome. This study is intended to transform drought resistance gene *OsSKIPa* to soybean via Ovary drip. The experiment was done successfully with the synthesis of linear gene cassette and development of the protocol via remove mostly styles and direct DNA drip to the soybean flower. Despite all efforts and many tries, the transformation frequencies come out 0% and no Insert found in F1 Thai soybean cultivar which may cause from high temperature and inappropriate environment & condition.