

Thesis Title	Molecular Characterization of cDNAs Encoding Small GTP-Binding Proteins from Rice (<i>Oryza sativa</i> L.) During Leaf Senescence		
Author	Miss Sugunya Pitakrattananukool		
Degree	Doctor of Philosophy (Biology)		
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Somboon Anuntalabhochai	Advisor	
	Prof. Dr. Mondhon Sanguansermisri	Co-advisor	
	Assoc. Prof. Dr. Tippawan Singtripop	Co-advisor	
	Dr. Ruttaporn Chundet	Co-advisor	

ABSTRACT

Leaf senescence is an important process to rice plant growth and crop productivity. During senescence, macromolecules were degraded and nutrients were mobilized from mature leaves to younger leaves and to developing seeds. The molecular studies of the senescence process revealed that numerous genes were increased expression level or were completely switched off. Many senescence-related genes related to natural senescence or induced-senescence processes have been isolated from multiple plant species. However, the complete understanding about number and role of senescence-related genes is still unclear. This study was designed to gain insight into the role of small GTP-binding Rab family proteins genes in rice by studying the expression profiles of *OsRabs* in different rice tissues and its functional analysis was also performed.

The first set of studies on the role of *Rab* genes in jasmine rice, the cDNA fragments encoding small GTP-binding Rab family proteins were isolated and its expressions were analyzed. The degenerate primer were designed from highly

conserved domain of phosphate/Mg²⁺ binding domain; DTAGQE(RKS) which retained at N-terminal of Rab sequences and a specific reverse primer; oligo(dA)₁₈. Two partial of *Rab* cDNAs; *OsRab5* and *OsRab7* were amplified by PCR using senescing leaves cDNA as template. The full length of these cDNAs was identified using Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE). The full length 1,111 and 1,010 nucleotide of *OsRab5* and *OsRab7* respectively were successfully obtained. *OsRab5* contained 178 nucleotide of the 5' untranslated region (UTR), an open reading frame (ORF) of 612 nucleotide, and included 321 nucleotide of the 3' UTR, exclusive of the poly-A. The polypeptide of 203 amino acids had a calculated molecular mass of 22 kDa. *OsRab7* contained 65 and 317 nucleotide of 5' UTR and 3' UTR, respectively. A 628 nucleotide of open reading frame corresponded to a translation product of 206 amino acids with a calculated molecular mass of 23 kDa. From the multiple alignment results revealed that the deduced amino acid sequences of *OsRab5* was highly homologous to those genes isolated from other plants particular from japonica rice (98%) and the deduced amino acid sequences of *OsRab7* was highly homologous to *Rab7* from japonica rice (97%). The expression pattern analysis showed that the *OsRab5* and *OsRab7* expression levels were monitored in all rice tissues via Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Moreover, the expression of *OsRab5* and *OsRab7* were upregulated in rice leaves under induced-senescence conditions; abscisic acid (ABA), ethylene, sodium chloride (NaCl), dark treatment and wounding. These results indicate that *OsRab5* and *OsRab7* are involved in the leaf senescence process.

According to the deduced amino acid sequences of *OsRab5* and *OsRab7* isolated from jasmine rice showed high similar to *Rab5* and *Rab7* from japonica rice, the second set of studies were demonstrated in homologous plant system. In japonica rice, the sequences of forty-six genes encoding the Rab family proteins were retrieved from the Rice Annotation Project (RAP) database. The multiple alignment of these sequences revealed that Rab specific conserved regions and a double cysteine C-terminal motif are retained in most of the *OsRab* sequences. To determine differential expression pattern, the *OsRab* expression levels were monitored in all rice tissues. Furthermore, the different expression patterns in the leaf tissues treated with plant growth regulators and dark-induced or natural senescence were also presented. Two

of the *OsRab* genes, *OsRab7A1* and *OsRab7B3*, closely associated with senescence in the expression pattern were chosen for functional analysis in stable transgenic rice. The results found that T₁ transgenic seedling overexpressing *OsRab7B3* showed rapid leaf senescence under dark induced-senescence condition whereas wild type and T₁ transgenic seedling overexpressing *OsRab7A1* cannot. Therefore, only the *OsRab7B3OX* transgenic rice was chosen for further functional analysis. Consequence, the T₁ plants were grown in a greenhouse and the change in leaf color from green to yellow occurred earlier in the transgenic plants than in the wild type at the ripening stage. The further studies in T₂ transgenic rice were performed. The results found that the chlorophyll content levels in transgenic detached leaf overexpressing *OsRab7B3* showed a dramatic decrease under the dark condition. The expression of the genes involved in plant senescence (*PaO*, *ATG4a* and *ATG8a*) was also upregulated in a similar manner as *OsRab7B3*. In addition, the promoter analysis was performed by fused *sGFP* which produced green fluorescent protein (GFP) to *OsRab7B3* promoter to construct promoter analysis vector. The results obtained the expression of *sGFP* under the control of the *OsRab7B3* promoter increased in leaf tissues within 12 hours when ABA, NaCl was applied and kept under the darkness within 3 days. Hence it is suggested that *OsRab7B3* act as a stress-inducible gene that plays an important role in the leaf senescence process in rice.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การหาลักษณะเฉพาะระดับโมเลกุลของซีดีเอ็นเอที่เข้ารหัส
สมอลล์จีทีพีบายดิงโปรตีนจากข้าว (*Oryza sativa* L.) ใน
ระหว่างที่เกิดการเสื่อมสภาพของใบ

ผู้เขียน

นางสาวสุกัญญา พิทักษ์รัตนานุกูล

ปริญญา

วิทยาศาสตร์ดุสิตบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโกชัย

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ศ. (พิเศษ) ดร. มณฑล สงวนเสริมศรี

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

รศ.ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไกรภพ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ดร. รัฐพร จันทรเดช

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การเสื่อมสภาพของใบเป็นกระบวนการที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตและการสร้างผลผลิตของ
ต้นข้าว ในระหว่างที่เกิดการเสื่อมสภาพสารโมเลกุลใหญ่ถูกย่อยสลายและสารอาหารที่ได้จากการ
ย่อยสลายจะถูกส่งไปยังส่วนอื่น ๆ ของต้น อาทิเช่น จากใบแก่ไปยังใบอ่อนหรือไปยังเมล็ดที่กำลัง
พัฒนา ในการศึกษาทางอณูชีววิทยาของกระบวนการเสื่อมสภาพ พบว่ายีนจำนวนมากถูกกระตุ้นให้
มีการแสดงออกมากขึ้นหรือถูกยับยั้งไม่ให้แสดงออก ทั้งนี้มีการศึกษาโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการ
เสื่อมสภาพตามธรรมชาติหรือการเสื่อมสภาพที่เกิดจากการชักนำจากพืชหลายชนิด อย่างไรก็ตาม
องค์ความรู้ในเรื่องของจำนวนและบทบาทหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพยังไม่มี
กระจ่างชัด การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงมุ่งเน้นให้มีความเข้าใจมากขึ้นในส่วนของบทบาทหน้าที่ของยีนที่
สังเคราะห์สมอลล์จีทีพีบายดิงโปรตีนในกลุ่ม Rab family ในข้าวโดยศึกษารูปแบบของการ
แสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของข้าวและวิเคราะห์ถึงบทบาทหน้าที่ของยีน

การศึกษาชุดที่ 1 ศึกษาบทบาทหน้าที่ของยีน *Rab* ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยโคลนชิ้นส่วน

ซีดีเอ็นเอที่เข้ารหัสสมอลจีทีพีบายดิงโปรตีนและศึกษาการแสดงออกของยีนที่โคลนได้ การเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนซีดีเอ็นเออาศัย degenerate primer ของยีน *Rab* ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของยีนตรงส่วนที่เข้าจับของหมู่ฟอสเฟตหรือแมกนีเซียมไอออน; DTAGQE(RKS) ซึ่งพบในบริเวณ N-terminal ของโปรตีน *Rab* ควบคู่กับไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ poly A; oligo(dA)₁₈ ได้ผลลัพธ์เป็นชิ้นส่วนซีดีเอ็นเอจำนวน 2 ชิ้นส่วน โดยใช้ซีดีเอ็นเอของใบข้าวที่มีการเสื่อมสภาพเป็นแม่พิมพ์ได้แก่ ชิ้นส่วนของยีน *OsRab5* และ *OsRab7* จากนั้นหาลำดับเบสเต็มเส้นของซีดีเอ็นเอทั้งสองด้วยวิธี Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) พบว่า ลำดับเบสเต็มเส้นของซีดีเอ็นเอ *OsRab5* และ *OsRab7* มีขนาด 1,111 นิวคลีโอไทด์ และ 1,010 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ ทั้งนี้ซีดีเอ็นเอของ *OsRab5* ประกอบด้วยส่วนปลาย 5' ที่ไม่ถูกแปลงเป็นกรดอะมิโนขนาด 178 นิวคลีโอไทด์ มีช่วงเปิดของยีนสำหรับการสร้างโปรตีนขนาด 612 นิวคลีโอไทด์ และส่วนปลาย 3' ที่ไม่ถูกแปลงเป็นกรดอะมิโนขนาด 321 นิวคลีโอไทด์ สายโพลีเปปไทด์มีขนาด 203 กรดอะมิโน ซึ่งคำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 22 กิโลดาลตัน สำหรับซีดีเอ็นเอของ *OsRab7* ประกอบด้วยส่วนปลาย 5' และ ปลาย 3' ที่ไม่ถูกแปลงเป็นกรดอะมิโนขนาด 65 และ 317 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับช่วงเปิดของยีนสำหรับการสร้างโปรตีนมีขนาด 628 นิวคลีโอไทด์ สามารถแปลรหัสได้เป็นกรดอะมิโนที่มีความยาว 206 กรดอะมิโน คำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 23 กิโลดาลตัน จากการเปรียบเทียบในระดับกรดอะมิโนแสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนของ *OsRab5* มีความเหมือนกับกรดอะมิโนของ *Rab5* จากพืชชนิดอื่นเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะที่พบในข้าวเจ้าโปนิคา ซึ่งมีค่าความเหมือนถึง 98% และลำดับกรดอะมิโนของ *OsRab7* มีค่าความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ *Rab7* จากข้าวเจ้าโปนิคาสูงถึง 97% จากการวิเคราะห์รูปแบบของการแสดงออกของยีนโดยอาศัยเทคนิค RT-PCR พบว่า *OsRab5* และ *OsRab7* แสดงออกในเนื้อเยื่อข้าวทุกส่วนที่นำมาศึกษา นอกจากนี้พบว่าในใบข้าวที่อยู่ภายใต้สภาวะที่มีการชักนำให้เกิดกระบวนการเสื่อมสภาพ อาทิเช่น การบ่มในสารละลายที่มี abscisic acid (ABA), ethylene, sodium chloride (NaCl) หรือเก็บในที่มืด หรือการทำให้เกิดบาดแผล สามารถกระตุ้นให้ยีนทั้งสองมีการแสดงออกมากขึ้น จากผลการทดลองนี้สามารถบ่งชี้ได้ว่า *OsRab5* และ *OsRab7* เกี่ยวข้องกับกระบวนการเสื่อมสภาพของใบ

เนื่องจากลำดับกรดอะมิโนของยีน *OsRab5* และ *OsRab7* ที่โคลนได้จากข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนที่พบในโปรตีน *Rab5* และ *Rab7* จากข้าวเจ้าโปนิคา จึงทำการศึกษาคูทที่ 2 ในข้าวเจ้าโปนิคาซึ่งเป็นพืชที่มีกระบวนการต่าง ๆ คล้ายคลึงกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *Rab* จำนวน 46 ยีน จากฐานข้อมูล Rice Annotation Project (RAP) มาศึกษาการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนพบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *Rab* ส่วนใหญ่มีตำแหน่งของบริเวณอนุรักษ์ที่จำเพาะต่อ

โปรตีน Rab และพบกรดอะมิโนชนิด cysteine (C) สองตำแหน่งในบริเวณ C-terminal ในการศึกษา รูปแบบการแสดงออกของยีน พบว่าการแสดงออกของยีน *OsRab* มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกันในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของข้าว นอกจากนี้ยังพบรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกันของยีน *Rab* ในใบข้าวที่บ่มในสารละลายที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชผสมอยู่ หรือเก็บภายใต้ความมืดซึ่งชักนำให้เกิดการเสื่อมสภาพของใบ หรือแม้กระทั่งในใบข้าวที่มีการเสื่อมสภาพของใบตามธรรมชาติ ในการศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกยีน *OsRab7A1* และ *OsRab7B3* มาศึกษาต่อยอดถึงบทบาทหน้าที่การทำงานของยีน เนื่องจากยีนทั้งสองมีรูปแบบการแสดงออกที่ใกล้เคียงกับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเสื่อมสภาพ โดยสร้างต้นข้าวตัดแต่งพันธุกรรมขึ้น และจากการศึกษาในข้าวตัดแต่งพันธุกรรมรุ่นที่ 1 พบว่าต้นข้าวตัดแต่งพันธุกรรมให้มียีน *OsRab7B3* แสดงออกมากเกินไป จะเกิดการเสื่อมสภาพของใบอย่างรวดเร็วเมื่อเก็บภายใต้ความมืดซึ่งเป็นเงื่อนไขที่ชักนำให้เกิดการเสื่อมสภาพ ในขณะที่ต้นข้าวปกติและต้นข้าวตัดแต่งพันธุกรรมให้มียีน *OsRab7A1* แสดงออกมากเกินไปนั้นไม่มีการแสดงลักษณะดังกล่าว จึงศึกษาต่อเฉพาะในข้าวตัดแต่งพันธุกรรมให้มียีน *OsRab7B3* แสดงออกมากเกินไป โดยปลูกข้าวตัดแต่งพันธุกรรมรุ่นที่ 1 ในเรือนเพาะชำ พบว่าในระยะที่มีการพัฒนาของเมล็ดการเปลี่ยนสีของใบข้าวจากสีเขียวกลายเป็นสีเหลืองจะเกิดขึ้นในต้นข้าวตัดแต่งพันธุกรรมจะเกิดขึ้นก่อนต้นข้าวปกติ จึงดำเนินการวิจัยต่อไปรุ่นที่ 2 พบว่าเมื่อนำใบของต้นข้าวตัดแต่งพันธุกรรมไปเก็บไว้ในที่มีความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ลดลงเป็นอย่างมากและยีนที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของพืช ได้แก่ *PaO*, *ATG4a* และ *ATG8a* ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกมากขึ้นเช่นเดียวกับยีน *OsRab7B3* นอกจากนี้ได้ศึกษาการทำงานของโปรโมเตอร์ของยีน *OsRab7B3* โดยการสร้างเวกเตอร์ซึ่งเชื่อมต่อยีน *sGFP* ที่สังเคราะห์โปรตีนเรืองแสงสีเขียวเข้ากับโปรโมเตอร์ของยีน *OsRab7B3* พบว่ายีน *sGFP* ที่ถูกควบคุมการแสดงออกโดยโปรโมเตอร์ของยีน *OsRab7B3* จะแสดงออกมากในใบข้าวที่บ่มในสารละลายที่มี ABA หรือ NaCl ผสมอยู่เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หรือเก็บในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า *OsRab7B3* เป็นยีนที่มีการแสดงออกเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสภาวะเครียดและมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเสื่อมสภาพของใบข้าว