

Thesis Title	Molecular Characterization and Identification of Thai Jasmine Rice (<i>Oryza sativa</i> L. cv. KDML105) Mutants, Induced by Low-Energy Ion Beam
Author	Miss Nuananong Semsang
Degree	Doctor of Philosophy (Biology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Somboon Anuntalabhochai	Advisor
Prof. Dr. Mondhon Sanguansermsri	Co-advisor
Dr. Rattaporn Chundet	Co-advisor

ABSTRACT

Ion beam bombardment of biological organisms has been applied to plant mutation breeding. In order to explore relevant mechanisms, the study employed low-energy ion beams bombardment of naked plasmid DNA to examine whether and how ions with very low energy and low fluence can induce mutation. Argon (Ar) and nitrogen (N) ions at 5 keV and 2.5 keV, respectively, were used to bombard naked plasmid DNA, pGFP, at ion fluence of 3, 6, 9 x 10¹³ ions cm⁻². The results provided evidences that the very low-energy and low-fluence ion bombardment indeed altered the DNA structure from supercoil to circular and linear forms through single and double strand breaks. Mutation induction was confirmed by transformation of the bombarded DNA into

Escherichia coli cells and subsequent expression of the marker gene. The indirect effects of low-energy ion beam on antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation levels were also studied. Local rice seeds were bombarded with Ar- or N-ion beams at 29 – 60 keV and ion fluences of 1×10^{16} ions cm^{-2} . Then activities of 6 antioxidant enzymes and lipid peroxidation level were determined in the bombarded rice seeds after germination. The results showed most of the enzyme activities and lipid peroxidation levels in both the Ar- and N-bombarded samples were higher than those in the natural control. N-ion bombardment could induce higher levels of antioxidant enzyme activities in the rice samples than the Ar-ion bombardment. Additional effects due to the vacuum condition were also found that could affect activities of some antioxidant enzymes and lipid peroxidation level.

Four rice varieties obtained from low-energy ion beam induced mutation in Thai jasmine rice (KDML 105) were characterized in gene expression involved in their phenotypic variations. The differentially expressed transcripts of mutants were analyzed in comparison with the KDML 105 using cDNA-RAPD technique. Two genes were identified; *OsSPY* and *14-3-3*, which their functions possibly associated with stem height variations of rice mutants. Expression analysis of *OsSPY*, *14-3-3*, *RSG*, *KO*, and *SLR1* was confirmed in rice internode tissues during the reproductive stage by semi-quantitative RT-PCR technique. The results indicated that the changes of *OsSPY* and *14-3-3* expression could affect internode elongation and cause the phenotypic changes of semi-dwarf and spindly rice mutants, respectively. The study of a gene controlling the anthocyanin biosynthesis in purple rice mutant (BKOS6) was also carried out. The

Bkmyc gene encoding a bHLH transcription factor for anthocyanin biosynthesis in plant was identified. It was found that a full-length cDNA of *Bkmyc* is similar to *O. sativa* *Pl^w-OSB2* which was previously identified in T65-Plw pigmented rice. The expression analysis revealed that *Bkmyc* expressed in all purple tissues of BKOS6. A new evidence of *OSB2* expression in root tissue of *indica* rice was found and firstly reported.

Moreover, the study of improved antioxidant properties of BKOS6 rice was carried out. The total phenolic content and antioxidant activities of cooked and uncooked rice extracts were compared among KDML105, BKOS6 and other 2 rice mutants created by a low-energy ion beam. The BKOS6 extracts showed the highest total phenolic content among all tested rice extracts. The determinations of antioxidant activities, using three standard methods, showed BKOS6 extract had 2–2.5-fold increased levels over standard KDML105 extract for each method. Interestingly, there was no significantly difference between the antioxidant activities of the cooked and uncooked BKOS6 rice extracts. Due to many remarkable improved characteristics of BKOS6 variety, a specific SCAR marker was generated for its varietal identification. In this study, the BKOS6 specific SCAR marker was successfully developed and used to identify BKOS6 variety. It can be used to distinguish BKOS6 from other rice varieties/cultivars except Hom-nin rice and also to detect F1 hybrids of BKOS6.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การหาลักษณะเฉพาะและการบ่งบอกระดับโมเลกุลของข้าวหอมมะลิ
กลายพันธุ์ที่ถูกชักนำโดยลำไออนพลังงานต่ำ

ผู้เขียน

นางสาวนวลอนงค์ เสมสังข์

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ศาสตราจารย์ (พิเศษ) ดร. มลฑล สงวนเสริมศรี

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อาจารย์ ดร. รัฐพร จันทรเดช

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การระดมยิงเซลล์สิ่งมีชีวิตด้วยลำไออนได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อวัตถุประสงค์ในการเพิ่มความรู้ความเข้าใจในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยลำไออน จึงได้ทำการศึกษาการระดมยิงดีเอ็นเอด้วยลำไออนพลังงานต่ำ เพื่อทดสอบความสามารถและกลไกในการชักนำการกลายพันธุ์โดยลำไออนที่มีพลังงานต่ำและปริมาณน้อย ไออนของอาร์กอนและไนโตรเจนที่มีพลังงาน 5 และ 2.5 กิโลโวลต์ตามลำดับ ที่ความหนาแน่นของไออนเท่ากับ 1×10^{13} ไออนต่อตารางเซนติเมตร ได้ถูกนำมาใช้ในการระดมยิงพลาสมิดดีเอ็นเอ pGFP ผลจากการระดมยิงพบว่า ไออนทั้งสองที่มีพลังงานและความหนาแน่นดังกล่าวสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดีเอ็นเอจากลักษณะที่ขดเป็นเกลียวให้กลายเป็นวงกลมและเส้นตรง อันเนื่องมาจาก การขาดของดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวและเส้นคู่ ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์เมื่อทำการทดลองยืนยัน โดยการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอดังกล่าวเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* แล้วทำการตรวจสอบการ

แสดงออกของยีนเครื่องหมายที่อยู่ภายในพลาสมิดนั้น นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลกระทบทางอ้อมของลำไออนพลังงานต่ำที่มีต่อปริมาณของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและการเกิดออกซิเดชันของไขมันในเซลล์พืช เมล็ดข้าวที่ถูกกระดมยิงด้วยลำไออนของไนโตรเจนและอาร์กอนที่มีพลังงาน 29 และ 60 กิโลโวลต์และความหนาแน่นของไออนเท่ากับ 1×10^{16} ไออนต่อตารางเซนติเมตร ได้ถูกนำมาวัดปริมาณของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและการเกิดออกซิเดชันของไขมันภายหลังการเพาะให้งอกเป็นเวลา 2 วัน ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและการเกิดออกซิเดชันของไขมันในตัวอย่างที่ถูกกระดมยิงด้วยลำไออนของทั้งอาร์กอนและไนโตรเจนเพิ่มสูงขึ้นกว่าในตัวอย่างควบคุมที่ไม่ผ่านการกระดมยิง การกระดมยิงด้วยลำไออนของไนโตรเจนจะส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระบางชนิดได้มากกว่าการกระดมยิงด้วยลำไออนของอาร์กอน นอกจากนี้ยังพบว่าสภาวะสูญญากาศที่ใช้ในขณะกระดมยิงไออนมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระบางตัวและการเกิดออกซิเดชันของไขมันอีกด้วย

ข้าวกลายพันธุ์ 4 สายพันธุ์ที่ได้จากการชักนำการกลายพันธุ์ในข้าวหอมมะลิ 105 ได้ถูกศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่แปรผันไปจากข้าวข้าวหอมมะลิ 105 สายพันธุ์เดิม โดยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบยีนที่มีการแสดงออกในข้าวกลายพันธุ์เปรียบเทียบกับข้าวหอมมะลิโดยเทคนิค cDNA-RAPD ทำให้พบยีน *OsSPY* และ *14-3-3* ที่น่าจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความสูงที่เปลี่ยนแปลงไปในข้าวกลายพันธุ์ การแสดงออกของยีน *OsSPY*, *14-3-3*, *RSG*, *KO*, และ *SLR1* ได้ถูกตรวจสอบในเนื้อเยื่อข้อปล้องของต้นข้าวในระยะต่างๆ โดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ผลการศึกษาชี้ให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *OsSPY* และ *14-3-3* ที่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของการยึดตัวของข้อปล้องอันเป็นสาเหตุทำให้เกิดลักษณะต้นเตี้ยและต้นสูงในข้าวกลายพันธุ์ตามลำดับ และยังได้มีการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสะสมรงควัตถุแอนโทไซยานินในข้าวมะลิม่วงกลายพันธุ์ BKOS6 พบยีนที่ให้อชื่อว่า *Bkmyc* ที่เข้ารหัสให้โปรตีน bHLH ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมกระบวนการสร้างเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืช ซึ่งพบว่าลำดับเบสของยีน *Bkmyc* มีความคล้ายคลึงกับยีน *OSB2* ที่พบในข้าวสายพันธุ์ T65-Plw ที่มีการสะสมรงควัตถุสีม่วงเช่นกัน การศึกษาการแสดงออกของยีน *Bkmyc* พบว่ามีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อที่มีสีม่วงและยังพบการแสดงออกในเนื้อเยื่อรากซึ่งนับว่าเป็นการรายงานครั้งแรกของยีนนี้ที่พบการแสดงออกในรากของข้าวในกลุ่มสายพันธุ์ *indica*

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของข้าวกลายพันธุ์ BKOS6 โดยทำการวัดปริมาณของสารประกอบฟีนอลและคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากข้าวสาร

และข้าวสุกของข้าวหอมมะลิเปรียบเทียบกับข้าว BKOS6 และข้าวกลายพันธุ์อีก 2 สายพันธุ์ที่ได้จากการชักนำโดยเทคนิคลำไออน พบว่าสารสกัดจากข้าว BKOS6 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากข้าวสายพันธุ์อื่นๆ ที่นำมาทดสอบ การวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการมาตรฐาน 3 วิธี พบว่าในแต่ละวิธี สารสกัดจากข้าว BKOS6 มีความสามารถในการอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นสูงกว่าสารสกัดจากข้าวหอมมะลิถึง 2-2.5 เท่า และเป็นที่น่าสนใจเมื่อพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าว BKOS6 ที่ผ่านและไม่ผ่านการหุงให้สุก ด้วยคุณสมบัติที่ดีขึ้นในข้าวกลายพันธุ์ BKOS6 ที่ได้กล่าวมาข้างต้น จึงได้มีการสร้างเครื่องหมายทางโมเลกุลที่มีความจำเพาะต่อข้าวสายพันธุ์ BKOS6 ขึ้นโดยพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCAR ที่สร้างขึ้น สามารถใช้ในการบ่งบอกสายพันธุ์ของข้าว BKOS6 ได้ และสามารถใช้ในการระบุความแตกต่างของข้าวกลายพันธุ์ BKOS6 กับข้าวสายพันธุ์อื่นๆ ได้ ยกเว้นข้าวหอมชนิดซึ่งต้องอาศัยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล microsatellite เข้ามาร่วมด้วย และยังพบว่าสามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุล SCAR ดังกล่าวในการระบุข้าวลูกผสมรุ่นที่ 1 ของข้าว BKOS6 ได้อีกด้วย