

Thesis Title	Characterization of Thai Jasmine Rice Varieties (<i>Oryza sativa</i> L. cv. KDML 105) Induced by Low-Energy Ion Beam
Author	Mr. Boonrak Phanchaisri
Degree	Doctor of Philosophy (Biology)
Thesis Advisory Committee	
	Assoc. Prof. Dr. Somboon Anuntalabhochai Chairperson
	Prof. Emeritus Dr. Thiraphat Vilaithong Member
	Asst. Prof. Dr. LiangDeng Yu Member

ABSTRACT

In study on the appropriate conditions of low-energy ion beam for mutation induction in rice, using Thai purple rice as indicator; ion species were $N^+ + N_2^+$, accelerated by 60-100 kV; and the ion fluences were 1×10^{16} - 8×10^{16} ions/cm². Nine mutants (seedling) with green leaf blade and leaf sheath were obtained from 4,800 ion-bombarded Thai purple rice seeds. The ion-induction mutation found in the ion-bombarded rice plants was random phenomenon. There was no correlation between the ion energies, survival and mutation frequency in Thai purple rice in the bombardment conditions applied. HAT-RAPD (High Annealing Temperature-RAPD) was chosen for DNA investigation. Of 10 arbitrary primers a primer named OPK14, revealed genetic variation between the mutants and control. An additional DNA band at 600 bp was detected in 3 of the 9 mutants. Amino acid sequence analysis showed that the polypeptide belonged to members of cytochrome P450 with the highest identity of 92% to cytochrome P450 protein of *Oryza sativa japonica*.

Low-energy ion beam bombardments at accelerated energies in the range of 60-100 kV and ion fluences of $1 \times 10^{16} - 5 \times 10^{17}$ ions/cm² were chosen for mutation induction in Thai jasmine rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105). Eight mutants, designated PKOS1, PKOS2, PKOS3, TKOS4, SKOS5, BKOS6, RCS, and UKOS9, were obtained from the ion bombardment on several ten thousands of dehusked KDML 105 seeds. The ion bombardment produced broad mutational spectra of phenotypic variations in the eight mutants. The phenotypic changes found in the mutants were photoperiod insensitive, semidwarf, spindly, early flowering (early maturing), including color change in tissue and organs, and etc. One of the rice mutants, BKOS6 was intensively characterized. This mutant was obtained from KDML105 embryos bombarded with N⁺ + N₂⁺ ions accelerated at 60 kV and an ion fluence of 2×10^{16} ions/cm². Phenotypic variations of BKOS6 were semidwarf, red/purple color in leaf sheath, collar, auricles, ligule, dark brown hull and seed coat, and dark brown stripes on leaf blade. Using HAT-RAPD, two primers (OPK10, OPH15) revealed two additional DNA bands at 450 bp and 400 bp in the BKOS6 mutant. DNA sequencing showed that the 450 bp and the 400 bp fragments were 60 % and 61% identity to genes encoding flavanoid 3'hydroxylase and cytochrome P450 of *Oryza sativa japonica*, respectively.

In studies on the expression of genes involved in phenotypic variations found in the rice mutants using HAT-RAPD, OPH19 primer revealed interesting additional cDNA band at 563 bp of TKOS4. cDNA sequencing and sequence comparison showed that the 563 bp fragments (designated ATK181) was 100 % identity to amino acid sequence of 14-3-3-like protein of *Oryza sativa* subsp. *Japonica*, and 90% identity to amino acid sequence of 14-3-3 protein of *Nicotiana tabacum*. Overexpression of the 14-3-3 gene, encoded 14-3-3 protein which binds to and represses the activity of a bZip transcription factor, RSG (REPRESSION OF SHOOT GROWTH), in TKOS4, is expected to result in tall and spindly phenotype of TKOS4.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การหาลักษณะเฉพาะของข้าวหอมมะลิ

(Oryza sativa L. cv. KDML 105) ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย

ลำไอออนพลังงานต่ำ

ผู้เขียน

นายบุญรักษ์ พันธุ์ไชยศรี

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย ประธานกรรมการ

ศ. เกียรติคุณ ดร. ถิรพัฒน์ วัลย์ทอง กรรมการ

ผศ. ดร. เหลียงเต็ง ยู กรรมการ

บทคัดย่อ

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของลำไอออนพลังงานต่ำ ที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในข้าว พบสภาวะที่เหมาะสมคือการใช้ลำไอออนในโตรเจนที่ถูกรังที่พลังงาน 60-100 กิโลโวลต์ (kV) ที่ปริมาณไอออน 1×10^{16} - 8×10^{16} ไอออน/ซม² เมื่อระดมยิงข้าวเหนียวดำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดจำนวน 4,800 เมล็ดแล้วนำไปเพาะปลูก พบว่ามีต้นข้าว 9 ต้นในระยะต้นกล้ามีการเปลี่ยนสีของใบ กาบใบจากสีม่วงเป็นสีเขียวโดยพบว่าการชักนำการกลายพันธุ์ดังกล่าวเป็นแบบสุ่ม (random phenomenon) ซึ่งพบต้นข้าวที่เปลี่ยนสีที่ได้จากเมล็ดข้าวเหนียวดำที่ผ่านการระดมยิงในทุกระดับพลังงาน และปริมาณไอออนที่ใช้ ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างพลังงานไอออนกับการมีชีวิตรอดและอัตราการกลายพันธุ์ในข้าวเหนียวดำที่ผ่านการระดมยิงในการทดลอง การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (genomic variation) ได้ใช้เทคนิค HAT-RAPD (High Annealing Temperature-RAPD) พบว่า primer OPK14 สามารถตรวจพบแถบ DNA ขนาด 600 คู่เบสในต้นข้าว 3 ต้นใน 9 ต้นดังกล่าว เมื่อทำการวิเคราะห์พบว่าเป็นโปรตีน cytochrome P450 ของยีนที่อยู่ในกลุ่ม P450 family ของข้าวญี่ปุ่น (*Oryza sativa japonica*) โดยมีความเหมือน (identity) ที่ 92 เปอร์เซ็นต์

ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยการใช้ลำโพงไอออนไนโตรเจนที่ถูกเร่งด้วยพลังงานในช่วง 60-100 กิโลโวลต์ (kV) ที่ปริมาณไอออนในช่วง 1×10^{16} - 5×10^{17} ไอออน/ซม² ระดมยิงเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่แกะเปลือกจำนวนหลายหมื่นเมล็ดได้ข้าวสายพันธุ์ใหม่จำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ PKOS1 PKOS2 PKOS3 TKOS4 SKOS5 BKOS6 RCS และ UKOS9 ที่มีคุณสมบัติแตกต่างจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 พบว่าลำโพงไอออนพลังงานต่ำที่ใช้สามารถชักนำให้เกิดลักษณะการกลายพันธุ์ที่หลากหลาย (broad mutational spectra of phenotypic variations) ในต้นข้าวทั้ง 8 สายพันธุ์ เช่น ลักษณะไม่วางต่อช่วงแสง ต้นเตี้ย ต้นพอมสูงชูด ออกดอกไว (อายุการเก็บเกี่ยวสั้น) มีการเปลี่ยนแปลงของสีในบางเนื้อเยื่อและอวัยวะ เป็นต้น ได้ทำการศึกษาลักษณะเฉพาะของการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพในข้าวทั้ง 8 สายพันธุ์ โดยเฉพาะในข้าวสายพันธุ์ BKOS6 ซึ่งได้จากการระดมยิงเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 ด้วยลำโพงไอออนไนโตรเจนที่ถูกเร่งที่พลังงาน 60 กิโลโวลต์ (kV) ที่ปริมาณไอออน 2×10^{16} ไอออน/ซม² พบว่าข้าว BKOS6 เป็นข้าวต้นเตี้ยที่มี กาบใบ ใบ คอ (collar) เขี้ยวกันแมลง (auricles) เขี้ยวกันน้ำฝน (ligule) ริ้ว (stripe) บนใบ เปลือกข้าว (husk) เยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat) และเมล็ด เป็นสีม่วง การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค HAT-RAPD พบว่า primer OPK 10 และ OPH15 ตรวจพบแถบ DNA ขนาด 450 และ 400 คู่เบสในต้นข้าว BKOS6 ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์พบว่า แถบดีเอ็นเอขนาด 450 คู่เบสเป็นโปรตีนที่มีความเหมือนที่ 60 เปอร์เซ็นต์ของกรดอะมิโนกับโปรตีนชื่อ flavanoid 3'hydroxylase และ แถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบสเป็นโปรตีนที่มีความเหมือนที่ 61 เปอร์เซ็นต์ของกรดอะมิโนกับโปรตีนชื่อ cytochrome P450 ของข้าวญี่ปุ่น (*Oryza sativa japonica*)

ในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของข้าวกลายพันธุ์โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD พบว่า primer ชื่อ OPH19 ตรวจพบแถบของคอมปริเมนทารีดีเอ็นเอ (cDNA) ขนาด 563 คู่เบสในข้าว TKOS4 ได้ทำการหาลำดับของเบสของแถบ cDNA ที่พบและทำการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนกับกรดอะมิโนของยีนในฐานข้อมูลพบว่า แถบ cDNA ของข้าว TKOS4 ขนาด 563 คู่เบสที่ชื่อ ATK181 มีความเหมือน (identity) ที่ 100 เปอร์เซ็นต์กับโปรตีน 14-3-3-like protein ของข้าวญี่ปุ่น (*Oryza sativa* subsp. *Japonica*) และมีความเหมือน (identity) ที่ 90 เปอร์เซ็นต์กับโปรตีน 14-3-3 ของต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ซึ่งเป็น transcription regulator ของยีน 14-3-3 โดยพบการแสดงออกของยีน 14-3-3 ในข้าวที่อายุ 65 วันซึ่งอยู่ในระยะเจริญพันธุ์ (reproductive growth stage) ของต้นข้าว จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าโปรตีน 14-3-3 ที่ได้จากยีน 14-3-3 ทำหน้าที่เข้าจับและกีดการทำงานของโปรตีน bZip transcription factor (RSG, REPRESSION of SHOOT GROWTH) ทำให้คาดหมายว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้ข้าว TKOS4 มีลักษณะสูงและพอมชูด