LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

6 JUL 1994

MONITORING OF MENDELIAN GENETICS IN RICE BY DNA MARKERS

PARICHART TERNCHUCHEEP

อภินันทนาการ
จาก

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER DEGREE OF SCIENCE
(BICHEMISTRY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1993

Copyright by Mahidol University

27061

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรวจสอบการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบเมนเดลในข้าวด้วยตัวติดตามดีเอ็นเอ

ผู้วิจัย ปาริชาต เทอญชูชีพ

บัณฑิต วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์

บุรชัย สนธยานนท์, Ph.D.

ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา ๑๘ เมษายน พ.ศ. ๒๕๓๓

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์สารพันธุกรรมดีเอ็นเอ ซึ่งรวมถึง การวิเคราะห์ RFLP และการวิเคราะห์ RAPD เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้เริ่มมีการนำมาใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองใช้การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี RFLP เพื่อติดตามการกระจายตัวของลักษณะความหอม และลักษณะความไวแสงในสารพันธุกรรมของข้าวไทย โดยเริ่มจาก การนำสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ๑๐๕ และพันธุ์IR36 มาย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้เอ็นไซม์๕ ชนิดคือ BamHI EcoRI EcoRV HindIII และ XbaI แยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าในตัวกลางที่เป็นวุ้น ตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นไนลอน แล้วจึงนำมาไฮบริไดซ์กับตัวติดตามดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี (^{32}P) ตัวตรวจสอบทางพันธุกรรมที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของข้าวรุ่นพ่อแม่ทั้งสองได้ จึงถูกคัดเลือกมาเพื่อทดสอบการกระจายตัว ว่าเป็นไปในลักษณะเดียวกันกับลักษณะความหอมหรือลักษณะความไวแสงหรือไม่โดยใช้ดีเอ็นเอของข้าวในประชากรรุ่นลูก F_3

จากการใช้ตัวติดตามดีเอ็นเอทั้งหมด ๓๑ ตัวติดตาม ปรากฏว่ามีตัวติดตามดีเอ็นเอที่สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ๑๐๕

Copyright© by Mahidol University

และIR36 อยู่ทั้งหมด ๗ ตัวติดตาม ในบรรดา ๗ ตัวติดตามดีเอ็นเอที่สามารถบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้นั้น พบว่ามีตัวติดตามดีเอ็นเอ RG28 และ RG445รวมอยู่ด้วย โดยตัวติดตามดีเอ็นเอ RG28ซึ่งมีรายงานว่าเชื่อมโยงอยู่กับตำแหน่งควบคุมความหอม (*fgr*) ในสารพันธุกรรมของข้าวนั้นสามารถบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวขาวดอกมะลิ๑๐๕ และIR36ได้ โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ EcoRV ในขณะที่ตัวติดตามดีเอ็นเอ RG445 ซึ่งมีรายงานว่าอยู่ใกล้กับตำแหน่งควบคุมความไวแสง (*Se-1*)ในสารพันธุกรรมของข้าวนั้น สามารถบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ XbaI หรือ EcoRI การตรวจสอบความสัมพันธ์ของการกระจายตัวระหว่างตัวติดตามดีเอ็นเอ RG28 และลักษณะความหอมโดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้าวในประชากรรุ่น F_2 ที่มีลักษณะความหอมมากหรือไม่มีความหอมจำนวน ๒๔ ตัวอย่าง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าตัวติดตามดีเอ็นเอ RG28 มีการกระจายตัวที่สัมพันธ์ไปในทำนองเดียวกันกับลักษณะความหอมในข้าวไทย อย่างไรก็ตามสำหรับการตรวจสอบความสัมพันธ์ของการกระจายตัวระหว่างตัวติดตามดีเอ็นเอ RG445 และลักษณะความไวแสงเมื่อใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ XbaI ปรากฏว่าไม่สามารถแสดงความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอจากข้าวในประชากรรุ่น F_2 ที่มีลักษณะความไวแสงหรือไม่ไวแสงได้ นอกจากนี้ ในการทดลองนี้ได้ทดลองปรับปฏิกิริยาที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารพันธุกรรมดีเอ็นเอชนิด RAPD และได้ทดลองใช้ปฏิกิริยาดังกล่าว เพื่อทดสอบความสามารถทางปฏิกิริยาของ RAPD primerที่มีอยู่จำนวน ๑๕๓ primersด้วยสารพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ๑๐๕ ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า ๔๖% ของ RAPD primers ที่ทดสอบสามารถทำให้เกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้รับการเพิ่มจำนวนที่สามารถแยกจากกันได้ดีได้

Copyright by Mahidol University

Thesis title Monitoring of Mendelian genetics in rice by DNA markers

Name Parichart Ternchucheep

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Supervisory Committee

Burachai Sonthayanon, Ph. D.

Prapon Wilairat, Ph. D.

Date of Graduation 18 April B.E. 2537 (1994)

ABSTRACT

Technology of DNA analysis, including restriction fragment length polymorphism (RFLP) and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), were explored for use in rice improvement. We also tried to used RFLP assay for detecting genetic loci for fragrance and photoperiod sensitivity in Thai rice genomic DNA. Genomic DNA of KDML105 and IR36 was singly digested by 5 restriction enzymes; BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII, and XbaI, fractionated on agarose gel electrophoresis, blotted and later hybridized to RFLP probes. Polymorphic RFLP found were then tested for co-segregation with our two traits of interest by representative genomic DNAs of F_3 plants.

From 31 DNA probes examined, 7 of them showed RFLPs between KDML105 and IR36 genomic DNA. Among the polymorphic RFLP probes, RG28, which was reportedly linked to *fgr* locus on

Copyright by Mahidol University

the rice chromosome 8, revealed DNA variation in our two parental DNA digested by EcoRV, and RG445, which was mapped near Se-1 locus on the rice chromosome 6, also displayed polymorphism with two parental DNA digested by XbaI or EcoRI. With 25 representative aromatic/non-aromatic F_3 plants, 89% of F_3 genomic DNA from aromatic plants had the same DNA pattern as aromatic KDML105 DNA and all of non-aromatic F_3 genomic DNA possessed a restrction fragment of IR36 DNA. This indicated association between the locus of RG28 and fragrance trait in Thai rice. However, RG445/ XbaI combination could not verify polymorphism between photoperiod sensitive and photoperiod insensitive characters among 14 F_3 DNA samples equally selected from both photoperiod sensitive and photoperiod insensitive F_2 lines. Additionally, RAPD assay was also explored by investigation for reaction conditions. About 153 RAPD primers was examined with KDML105 DNA. After standardization of RAPD reaction, an optimized RAPD condition for rice found was 20 ng DNA template, 0.2 μM primer, 100 nM of each dNTP, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.001% gelatin and 2.0 units *Taq* DNA polymerase and a PCR programe of 45 cycles of 94°C DNA denaturation for 1 min, 36 °C primer-DNA annealation for 1 min, and 72°C primer extension for 2 min. By the condition, 46% of 153 random RAPD primers examined could produce discrete amplified fragments with KDML105 genomic DNA.

Copyright by Mahidol University