- 3 JUL 2001

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF RICE DNA HYPOMETHYLATION MUTANT

SUTEEWAN THAMMAGOWIT

คลังวิทยทรัพยากร
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

2001

ISBN 974-665-598-1

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
S965i
2001

4036489 SCBT/M : MAJOR : BIOTECHNOLOGY ; M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)
KEY WORDS : DNA HYPOMETHYLATION / DNA METHYLATION / RICE MUTANT
SUTEEWAN THAMMAGOWIT : ISOLATION AND CHARACTERIZ-ATION OF RICE DNA HYPOMETHYLATION MUTANT. THESIS ADVISOR : JARUNYA NARANGAJAVANA, D.Agr.Sc. SKORN MONGKOLSUK, Ph.D. KANYARATT SUPAIBULWATANA, Ph.D. 138 p. ISBN 974-665-598-1

DNA methylation has been implicated in the control of a number of cellular processes in eukaryotes, including transcription, imprinting and a variety of epigenetic phenomena. The epigenetic phenomena in plant development can be studied by inducing alterations in DNA methylation levels and studying the effects on developmental processes. Using DNA methylation mutant to study the function of DNA modifications in eukaryotes is an attractive approach that avoids some of the limitations associated with correlative and methylation inhibitor studies.

In this work, rice (*Oryza sativa* ssp. *Indica*, cv. RD 23) DNA hypomethylation mutant of was identified by directly screening for plants that contained hypomethylated genomic DNA. The technique for hypomethylation mutant screening was established by using Southern hybridization of genomic DNA which was digested with methyl-sensitive enzyme and probed with repeat sequence. DNA samples from ethyl methanesulfonte (EMS) mutagenized M_2 populations were analyzed to look for repetitive sequence, cetromeric repeat and rDNA, that were clipped from the long arrays by *Hpa*II: methyl-sensitive enzyme. DNA hypomethylation mutants were predicted to contain hypomethylated centromeric and 5S rDNA arrays at cytosine sites susceptible to *Hpa*II digestion. The mutants were recessive in locus, designated DDM1 (for decrease in DNA methylation). Amounts of total methyl cytosine were reduced 6-14% in mutant plants in comparison with normal plants. According to this study we found that the methylated cytosine in CG dinucleotide sites was clearly reduced but not at CNG trinucleotide sites. Moreover, no evidence of adenine hypomethylation was found. Despite this reduction in DNA methylation level, M_2 mutant plants developed normally and exhibited no striking morphological phenotypes in plant vigor, height, color, flowering time and flower morphology when grown under standard conditions. However, most M_3 plants were sterile caused by defective female reproductive organs. The reduced level of methyl cytosine was inherited from M_2 to M_3 generation.

These mutants can be used to demonstrate that DNA methylation plays an important role in plant development, especially in ovary development in rice, a monocotyledonous plant.

Copyright by Mahidol University

4036489 SCBT/M : สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

สุธีวรรณ ธรรมโกวิท : การคัดเลือกและการศึกษาคุณสมบัติของต้นข้าวกลายพันธุ์ที่มีระดับของดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นลดลง (ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF RICE DNA HYPOMETHYLATION MUTANT) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จรัญญา ณรงคะชวนะ D.Agr.Sc., ศกรณ์ มงคลสุข Ph.D., กัณยารัตน์ สุไพบูลย์วัฒน Ph.D. 138 หน้า ISBN 974-665-598-1

ดีเอ็นเอเมทิลเลชั่น เป็นกระบวนการหนึ่งซึ่งควบคุมการทำงานของเซลล์ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง โดยมีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน การกำหนดเพศ และปรากฏการณ์ทาง epigenetic ต่างๆ การศึกษาบทบาทและหน้าที่ของดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นสามารถทำได้โดยศึกษาผลกระทบที่เกิดขึ้นจากเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงระดับของดีเอ็นเอเมทิลเลชั่น วิธีที่น่าสนใจคือการกลายพันธุ์ ซึ่งจะเป็นการดีกว่าการใช้สารยับยั้งการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชั่น ซึ่งอาจจะมีผลกระทบโดยทางอ้อมที่ซับซ้อนกับระบบอื่นๆในเซลล์ด้วย ในงานวิจัยนี้ได้นำข้าว Indica พันธุ์ กข 23 มาเป็นพืชต้นแบบในการทำการกลายพันธุ์ และคัดเลือกต้นข้าวกลายพันธุ์ที่มีระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นลดลงแล้วศึกษาผลกระทบที่เกิดขึ้น ได้ทำการพัฒนาวิธีคัดเลือกต้นข้าวกลายพันธุ์ดังกล่าวโดยพิจารณาจากผลการตัดย่อยดีเอ็นเอได้ดีขึ้นด้วย methyl-sensitive enzyme *Hpa*II ที่บริเวณลำดับเบสที่ซ้ำๆกันของ centromeric repeat และ rDNAบนสายดีอีนเอ เมื่อทำการกลายพันธุ์ข้าวด้วย ethyl methanesulfonate (EMS) แล้วทำการคัดเลือกต้นข้าวรุ่น M_2 พบต้นข้าวที่มีระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นลดลงเป็นลักษณะ recessive ที่ locus ที่ให้ชื่อว่า DDM1 (decrease in DNA methylation) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบระดับของ methyl cytosine กับต้นปกติพบว่าลดลงถึง 6-14% และจากการศึกษารูปแบบของเมทิลเลชั่นพบว่า ระดับของ methyl cytosine ที่ตำแหน่ง CG dinucleotide มีการลดลงอย่างชัดเจน โดยที่ไม่พบการลดลงที่ CNG trinucleotide และนอกจากนี้ยังไม่พบการลดลงของ methyl adenine จากการศึกษาลักษณะการพัฒนาของต้นข้าวกลายพันธุ์ *ddm1*รุ่น M_2 พบว่าลักษณะภายนอกโดยทั่วไปรวมทั้งระยะเวลาในการออกดอกและรูปร่างของดอกไม่แตกต่างจากต้นปกติ ยกเว้นมีการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์เพศเมียที่ไม่สมบูรณ์บ้าง การลดลงของ methyl cytosine สามารถถ่ายทอดจากรุ่น M_2 ไปรุ่น M_3 โดยต้นข้าวรุ่น M_3 ส่วนใหญ่เป็นหมันเนื่องจาก ovary ไม่มีการพัฒนาจนสมบูรณ์ ซึ่งการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นมีบทบาทสำคัญในการพัฒนา ovary ในต้นข้าว ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

Copyright by Mahidol University