- 4 OCT 2001

STUDY ON DIFFERENTIAL EXPRESSION OF TRANSGENE AND DNA METHYLATION IN TRANSGENIC HAIRY ROOTS OF HORSERADISH (*AMORACIA RUSTICANA*)

TARINEE TUNGSUCHAT

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIRMENTS FOR

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

2001

ISBN 974-04-0413-8

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
T189S
2001
C.2

4136659 SCBT/M : MAJOR : BIOTECHNOLOGY ; M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)
KEY WORDS : DNA METHYLATION/ GENE SILENCING/ HAIRY ROOTS/ HORSERADISH/ TRANSGENE

TARINEE TUNGSUCHAT : STUDY ON DIFFERENTIAL EXPRESSION OF TRANSGENE AND DNA METHYLATION IN TRANSGENIC HAIRY ROOTS OF HORSERADISH (*AMORACIA RUSTICANA*).
THESIS ADVISORS : JARUNYA NARANGAJAVANA, D.Agr.Sc. SAOVANEE DHARMSTITI, Ph.D. KANYARATT SUPAIBULWATANA, Ph.D. 195p. ISBN 974-04-0413-8

The recent development of gene transfer methods for most transgenic plants has revealed that transgenes can undergo silencing after integration into the genome. However, transgene silencing does not necessarily occur in primary transformants but can develop during the propagation of transgenic material or in future generations.

This work aimed to study the role and regulation of DNA methylation in differential transgene expression in transgenic hairy roots of horseradish (*Amoracia runticana*). Transgenic hairy roots were established by *Agrobacterium*-mediated transformation and were divided into three regions. The presence of two transgenes, neomycin phosphotransferase (*npt II*) and phytochrome A (*phyA*) genes, were examined by PCR and Southern hybridization. The differential expression of *nptII* gene driven by nopaline synthase (NOS) promoter were found to be decreased from the distal end to the proximal end of transgenic hairy roots, and from the first passage to the next passage as well, while the *phyA* gene driven by 35S CaMV promoter actively expressed in every region and passage. The regulation of *npt II* gene expression was found to be at transcriptional level. Differential expression and silencing of *npt II* gene accompanied by the presence of methylated cytosine in NOS promoter regions were studied. DNA methylation status in NOS promoter regions of silent lines were determined by using genomic sequencing method. The decreasing of *npt II* gene expression correlated with the presence of cytosine methylation in NOS promoter were demonstrated. The results indicated the variation in DNA methylation involved in differential expression of transgene in various subcultured zones and passages of transgenic hairy roots. The silent transgenic hairy roots were able to reactivate by treatment with hypomethylating agents (5-azacytidine and N^6-Benzyladenine) and auxin (2,4-dichlorophenoxy acetic acid).

The investigation on regulation of transgene expression in relation to DNA methylation may provide an important basic knowledge to improve the management of transgenic hairy root system for efficient production of the valuable to mankind substances and may have significant applications.

Copyright by Mahidol University

4136659 SCBT/M: สาขาวิชา: เทคโนโลยีชีวภาพ; วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ธาริณี ทังสุขาต : การศึกษาการแสดงออกที่แตกต่างกันของยีน และดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นในรากลอยของพืชที่ผ่านกระบวนการย้ายยีน (STUDY ON DIFFERENTIAL EXPRESSION OF TRANSGENE AND DNA METHYLATION IN TRANSGENIC HAIRY ROOTS OF HORSERADISH, *Armoracia rusticana*) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จรัญญา ณรงคะชวนะ D.Agr.Sc., เสาวนีย์ ธรรมสถิติ Ph.D., กัณยารัตน์ สุไพบูลย์วัฒน Ph.D. 195 หน้า ISBN 974-04-0413-8

ในปัจจุบันพบว่า ปัญหาสำคัญในกระบวนการย้ายยีนเข้าสู่พืชเพื่อสร้าง transgenic plant คือความไม่เสถียร และการไม่แสดงออกของยีน หลังจากยีนนั้นได้แทรกเข้าสู่ genome ของพืช อย่างไรก็ตามการไม่แสดงออกของยีนที่ผ่านกระบวนการย้ายยีนนั้นไม่จำเป็นต้องเกิดขึ้นในรุ่นแรกของพืชหลังจากที่ทำการย้ายยีนแต่อาจจะพัฒนาเกิดการไม่แสดงออกของยีนได้ในระหว่างการเพิ่มจำนวนพืช หรือในพืชรุ่นต่อๆ ไป

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาถึงบทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นต่อการแสดงออกที่แตกต่างกันของยีนในรากลอยของต้น horseradish ที่ผ่านกระบวนการย้ายยีน การย้ายยีน และการชักนำให้เกิดรากลอยได้ใช้วิธีอาศัยเชื้อ *Agrobacterium* ซึ่งได้ทำการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนทั้ง 2 ยีนที่ทำการย้าย คือ ยีน neomycin phosphotransferase (*nptII*) และยีน phytochrome A (*phyA*) โดยวิธี PCR และ Southern hybridization เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *nptII* ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของ NOS promoter พบว่ามีการแสดงออกของยีน *nptII* ลดลงจากส่วนต้นของรากลอย ไปยังส่วนปลายของรากลอย และมีการแสดงออกโดยเฉลี่ยลดลงในรุ่นต่อๆ มา เมื่อมีการขยายเพิ่มจำนวนรากลอย ในขณะที่ยีน *phyA* ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของ 35S CaMV promoter มีการแสดงออกตลอดในทุกๆ ส่วนและทุกๆ รุ่นของรากลอย การแสดงออกในระดับ transcription ที่แตกต่างกันของยีน *nptII* นี้พบว่าเกี่ยวข้องกับระดับของ methyl cytosine ในส่วนของ NOS promoter ซึ่งการตรวจสอบระดับ ดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นในส่วนของ NOS promoter นี้ใช้วิธี genomic sequencing ผลการตรวจสอบบ่งชี้ถึงความหลากหลายในระดับของ ดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นที่เกี่ยวข้องกับระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันของยีนที่ทำการย้ายในส่วนต่างๆ และในแต่ละรุ่นของรากลอย ยีนที่ไม่แสดงออกในรากลอยสามารถกระตุ้นให้กลับมาแสดงออกได้อีกโดยใช้ hypomethylating agent คือ 5-azacytidine หรือ N^6-benzyladenine และการใช้ 2,4-dichlorophenoxy acetic acid

ความรู้ที่ได้จากการศึกษาบทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นในการควบคุมการแสดงออกของยีนในรากลอยที่ใช้เป็น model นี้ จะนำไปสู่การพัฒนาประสิทธิภาพของการผลิตรากลอย การเพิ่มจำนวนในรุ่นต่อไป รวมไปถึงแนวทางการแก้ไขการไม่แสดงออกของยีน ทั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการจัดการใช้รากลอยเพื่อผลิตสารสำคัญที่ต้องการต่อไป

Copyright by Mahidol University