

การโคลนยีน/ส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของข้าว

Cloning of Brown Plant Hopper Resistance Genes in Rice

หทัยรัตน์ อุไรรงค์^{1/} ประสาน สืบสุข^{1/} สาธิต ทยาพัชร^{2/}

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

^{2/} ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลขั้นสูงที่เรียกว่า SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) ศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีนทั้งจีโนมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์และค้นหายีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในข้าว เพื่อนำไปสู่การโคลนยีนดังกล่าว เริ่มด้วยการนำต้นกล้าข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 90 ไปกระตุ้นยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลให้มีการแสดงออก โดยนำข้าวพันธุ์นี้ไปให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลดูดกิน 1 และ 2 วัน เปรียบเทียบกับที่ไม่ได้รับการดูดกิน สกัดแยก mRNA ของข้าวทั้ง 3 ชุด เปลี่ยน mRNA ให้เป็น cDNA แล้วตัดสาย cDNA ด้วยเอ็นไซม์ *Nla* III แบ่งตัวอย่างเป็น 2 ส่วน แต่ละส่วนเชื่อมต่อกับ Linker ที่ต่างกัน ตัดสาย DNA นี้ด้วยเอ็นไซม์ *Bsmf* I อีกครั้งจะได้ลำดับของ cDNA ส่วนที่เป็น Taq ที่เป็นส่วนของยีนสั้นๆขนาด 10-14 เบส เชื่อมต่อกับ Linker แยกส่วนของ Taq มาเชื่อมต่อกันให้ยาว 500 – 800 เบส ตามลำดับ ตัดต่อ Taq ที่เชื่อมเป็นสายยาวเข้ากับ plasmid เพื่อเพิ่มปริมาณใน *E. coli* และนำไปอ่านลำดับพันธุกรรมทั้งหมดด้วยเครื่อง ABI 3700 DNA Analyser จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SAGE 2000 เพื่อแยกลำดับและจำนวนของ Taq ผลการทดลองตรวจพบการแสดงออกของยีนในต้นข้าวที่ถูกแมลงดูดกิน 1 วัน และ 2 วัน และที่ไม่ได้ถูกดูดกิน รวมทั้งสิ้น 13,624, 16,254 และ 10,404 ชุดของยีน ตามลำดับ ในจำนวนนี้เมื่อวิเคราะห์แล้วเป็นยีนที่ไม่ซ้ำกัน (Unigene) หรือยีนต่างชนิดกันถึง 4,662 ชนิด เมื่อทำการตรวจหาชนิดของยีนในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Blast ปรากฏว่าพบทุกยีน แต่ในจำนวนนี้ทราบชื่อยีนเพียง 2,489 ยีน อีก 2,173 ยีน ยังไม่ทราบชื่อ (unknown) หนึ่ง เมื่อต้นข้าวได้รับการกระตุ้นโดยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลแล้วมียีนที่มีการแสดงมากขึ้น (up regulation) และแสดงออกลดลง (down regulation) 40 และ 16 ยีนตามลำดับ ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับเรื่องความเครียด (Stress) เป็นส่วนใหญ่ และคาดว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลรวมอยู่ด้วย จึงนำข้อมูลของยีนเหล่านี้ไปออกแบบ primer และทดสอบยีนยั้งการแสดงผลออกอีกครั้ง และใช้เป็นข้อมูลในการโคลนยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล สร้างเป็น cassette ของยีน สำหรับใช้ในการทดสอบต่อไป