จุฑามาศ ตรงชื่น : การโคลนและถ่ายยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดสายสั้น (*Le-scADH*s) ในมะเขือเทศ (CLONING AND TRANSFORMATION OF TOMATO SHORT-CHAIN ALCOHOL DEHYDROGENASES (*Le-scADHs*)) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา ตันตสวัสดิ์, 129 หน้า.

แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase; ADH) เป็นเอนไซม์ที่มีส่วนร่วมในกระบวนการสังเคราะห์กลิ่นในผลไม้ โดยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลับระหว่างสารอัลดีไฮด์ และแอลกอฮอล์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) โคลนยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดสายสั้นในมะเขือเทศ จำนวน 2 ยีน คือ ยีน *Le-scADH1* และยีน *Le-scADH2* เพื่อนำมาศึกษาการแสดงออกของยีนทั้งสองในเซลล์ยีสต์ และเซลล์แบคทีเรีย 2) โคลน และถ่ายยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* เข้าสู่มะเขือเทศ เพื่อสร้างมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ในการทดลองที่ 1 ทำการเพิ่มปริมาณยีนทั้งสองด้วยวิธีพีซีอาร์ แล้วนำยีนมาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์จำเพาะ (pYES และ pET) ถ่ายเข้าสู่เซลล์ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) และแบคทีเรีย (*Escherichia coli*) ทดสอบการผลิตโปรตีนผสมในยีสต์ที่ระยะเวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงโดยวิธี Western analysis พบว่าระยะเวลาที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* สูงสุดในเซลล์ยีสต์คือ 24 ชั่วโมง แต่ในแบคทีเรียไม่พบโปรตีนจากทั้งสองยีน และจากค่า Michaelis constant (K_m) และ maximum velocity (V_{max}) พบว่าเอนไซม์ทั้งสองสามารถเร่งปฏิกิริยาในเซลล์ยีสต์ได้ดี โดยเอนไซม์ Le-scADH1 มีประสิทธิภาพสูงในปฏิกิริยา dehydrogenation เปลี่ยนสารอัลดีไฮด์เป็นสารแอลกอฮอล์ แต่ไม่พบปฏิกิริยา reduction เกิดขึ้น ส่วนเอนไซม์ Le-scADH2 มีประสิทธิภาพในปฏิกิริยา reduction เปลี่ยนสารแอลกอฮอล์เป็นสารอัลดีไฮด์สูงกว่าปฏิกิริยา dehydrogenation โดยมีค่า K_m ต่ำกว่า 60 เท่า สำหรับการทดลองที่ 2 ทำการเพิ่มปริมาณยีนทั้งสองด้วยวิธีพีซีอาร์ แล้วนำยีนมาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์จำเพาะ (pSRO2) ในรูปแบบวิธี RNA interference (RNAi) และถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศโดยวิธี *Agrobacterium*-mediated transformation พบว่า สามารถชักนำชิ้นส่วนมะเขือเทศให้เกิดยอดได้ดี แต่ความสามารถในการเกิดรากต่ำ อย่างไรก็ตาม มีชิ้นส่วนมะเขือเทศที่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ และเมื่อสังเกตลักษณะทางฟีโนไทป์ของรุ่นลูกต่อมา พบว่า ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตปกติเหมือนกับต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม มีเพียงส่วนน้อย (25%) ที่มีการเจริญเติบโตผิดปกติ คือ มีลักษณะต้นแคระแกร็น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการลดระดับการแสดงออกของยีน *scADH* ในช่วงการพัฒนาของมะเขือเทศ ในอนาคตจะมีการประเมินลักษณะต่างๆ ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมเหล่านี้ในรุ่นลูก T2 ด้วยวิธีวิเคราะห์ฟีโนไทป์ RT-PCR และวิธีการทางชีวเคมี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

JUTHAMAS TRONGCHUEN : CLONING AND TRANSFORMATION OF TOMATO SHORT-CHAIN ALCOHOL DEHYDROGENASES (*Le-scADHs*). THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PIYADA TANTASAWAT, Ph.D., 129 PP.

ALCOHOL DEHYDROGENASES/TOMATO/*Solanum lycopersicum* Mill./AROMA FORMATION/YEAST EXPRESSION

Alcohol dehydrogenase (ADH) is an enzyme that participates in the biosynthetic pathway of aroma volatiles in fruits by reversible conversion of aldehydes into their corresponding alcohols. The objectives of this study were 1) to clone and evaluate expression of tomato short-chain alcohol dehydrogenase genes (*Le-scADH1*, *Le-scADH2*) in yeast and bacteria, 2) to clone and transform tomato short-chain alcohol dehydrogenase genes in tomatoes in order to down-regulate *Le-scADH1* and *Le-scADH2* in tomato plants. In the first experiment, both *Le-scADH1* and *Le-scADH2* coding sequences were amplified by PCR and cloned into the specific vectors (pYES and pET), using the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and bacteria (*Escherichia coli*) expression systems. Recombinant protein production in yeast was evaluated at different induction times (0, 12, 24 and 48 hours) by Western analysis. The highest expression levels of both genes were achieved at 24 hours. But no protein encoded by these two genes was observed in bacteria. Values obtained for Michaelis constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) indicated that the two encoded proteins were enzymatically active upon expression in yeast. Le-scADH1 was highly efficient in the dehydrogenation reaction (conversion of aldehydes to alcohols) but had no reduction activities.

In contrast, Le-scADH2 was much more active as reductases with K_m 60 times lower for the conversion of alcohols to aldehydes than for the dehydrogenation of aldehydes to alcohols. In the second experiment, both *Le-scADH1* and *Le-scADH2* were amplified by PCR and cloned into the specific vector (pSRO2), using RNA interference (RNAi) technology. Tomato transformation was performed using the *Agrobacterium*-mediated method. The results showed that most explants were able to form many shoots but could not develop roots. However, some explants could develop into whole plants with intact shoots and roots. When observing phenotypes of the T1 progenies, it was found that most plants displayed similar growth as nontransformed plants while twenty five percents had their growth rates severely affected, suggesting a possible impact of *scADHs* down-regulation in plant development. The T2 progenies of these transgenic plants will be further characterized by phenotypic analysis, RT-PCR, and biochemical method.

School of Crop Production Technology Student's Signature_____

Academic Year 2010 Advisor's Signature_____