การค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการเป็นหมันของอับละอองเรณูของข้าวที่เป็นหมันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (TGMS) โดยใช้เทคนิค cDNA-AFLP

Identification of Genes Involved in Thermo-Sensitive Genic Male Sterility (TGMS) in Rice Anther Using cDNA-AFLP

เกศินี พิศงาม และกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

อมรทิพย์ เมืองพรหม*

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Keasinee Pitngam and Kittipat Ukoskit

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Amorntip Muangprom*

BIOTEC, National Science and Technology Development Agency,

Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนในอับละอองเรณูของข้าวเป็นหมันที่ถูกควบคุมโดยอุณหภูมิ (thermo-sensitive genic male sterility, TGMS) จำนวน 2 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค cDNA-AFLP และใช้ไพรเมอร์จำนวน 30 คู่ การศึกษานี้มีเป้าหมายเพื่อค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการเป็นหมันของอับละอองเรณูของข้าวเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ คัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่ข้าว TGMS ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการแสดงออกของยีนในทำนองเดียวกันและให้ความแตกต่างระหว่างที่อุณหภูมิสูงและที่อุณหภูมิต่ำได้ จำนวน 124 แถบ ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกในสภาวะที่อุณหภูมิสูง แต่ไม่มีการแสดงออกในที่อุณหภูมิต่ำ จำนวน 44 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกในสภาวะอุณหภูมิต่ำ แต่ไม่แสดงออกที่อุณหภูมิสูง จำนวน 80 แถบ ได้คัดเลือก 64 แถบ โดยตัดเจล สกัด

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** amorntip.mua@biotec.or.th

ดีเอ็นเอ และส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ 24 ตัวอย่าง และเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Gramene ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อ่านได้ 24 ตัวอย่าง มีความเหมือนกับยีนในฐานข้อมูลข้าว 14 ยีน ความรู้ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่เป็นหมันเนื่องจากอุณหภูมิ เพื่อใช้ในการผลิตข้าวลูกผสมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ทนกับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : ข้าว, cDNA-AFLP, การเป็นหมันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

Abstract

This project studied gene expression in anther of 2 thermo-sensitive genic male sterile (TGMS) rice lines using cDNA-AFLP. Using 30 pairs of primer combinations, 124 different transcript-derived fragment (TDFs) were obtained, in which 44 TDFs were expressed under high temperature condition but were not expressed under low temperature condition, and 80 TDFs were expressed under low temperature condition but were not expressed under high temperature condition. A total of 64 TDFs were cut, purified and sent for sequencing, but only 24 readable sequences were obtained. Using Blast search in Gramene rice database, these sequences showed significant homology to 14 rice genes, The information gained from this study could be useful in rice breeding programs for TGMS lines used for hybrid production and for resistant lines to overcome temperature changes in the future.

Key words: *Oryza sativa* **,** cDNA-AFLP**,** thermo-sensitive genic male sterility (TGMS)

1. บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นอาหารหลักของประชากรไทยส่วนใหญ่ และเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญมากทั้งการบริโภคภายในประเทศและส่งออกต่างประเทศ นอกจากนี้การเจริญเติบโตของประชากรและการพัฒนาด้านเศรษฐกิจ ทำให้การผลิตข้าวของโลกต้องเพิ่มขึ้นในแต่ละปีจึงจะเพียงพอต่อความต้องการอาหารของประชากรทั้งโลก ซึ่งประเทศที่ผลิตและบริโภคข้าวส่วนใหญ่อยู่ในประเทศในทวีปเอเชีย ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ส่งออกข้าวเป็นอันดับหนึ่งของโลก สามารถนำรายได้เข้าประเทศในแต่ละปีได้อย่างมหาศาล แต่อย่างไรก็ตามผลผลิตข้าวต่อไร่ของประเทศไทยกลับอยู่ในเกณฑ์ต่ำเมื่อเทียบกับประเทศผู้ส่งออกทั้งหลาย [1]

ข้าวลูกผสมสามารถเพิ่มผลผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยปกติข้าวลูกผสมให้ผลผลิตสูงกว่าข้าวสายพันธุ์ดีโดยทั่วไปประมาณ 160-320 กิโลกรัมต่อไร่ [2] ระบบการผลิตข้าวลูกผสมที่ใช้อย่างแพร่หลายมี 2 ระบบ คือ ระบบ 3 สายพันธุ์ ซึ่งใช้พันธุ์แม่ที่มีเรณูเป็นหมันควบคุมโดยยีนในไซโทพลาสซึม (cytoplasmic male sterility, CMS) และระบบ 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์แม่ที่มีเรณูเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนใน

นิวเคลียส (genic male sterility, GMS) ซึ่งอาจเป็น thermo-sensitive genic male sterility (TGMS) หรือ photoperiod sensitive genic male sterility (PGMS) [3]

ระบบการเป็นหมันของละอองเกสรตัวผู้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (temperature sensitive genic male sterility, TGMS) นี้เหมาะสมสำหรับการพัฒนาข้าวลูกผสมในประเทศเขตร้อนและกึ่งร้อน เนื่องจาก TGMS ส่วนใหญ่จะมีเกสรตัวผู้เป็นหมันที่อุณหภูมิสูง และจะไม่เป็นหมันที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้นจึงสามารถใช้ข้าวสายพันธุ์ TGMS เป็นต้นแม่สำหรับการผลิตข้าวลูกผสมในฤดูร้อนและสามารถเพิ่มเมล็ดข้าวสายพันธุ์ TGMS ได้ในสภาพอุณหภูมิต่ำ เช่น ในฤดูหนาว นอกจากนั้นข้าวพันธุ์ดีเกือบทุกสายพันธุ์ก็สามารถใช้เป็นข้าวสายพันธุ์พ่อได้ เนื่องจากไม่จำเป็นต้องมียีนที่ชดเชยความเป็นหมัน (R-gene) ทำให้สามารถขยายฐานพันธุกรรมให้มีลักษณะต่าง ๆ ตามที่ต้องการได้ ซึ่งประโยชน์ของข้าวลูกผสมแบบสองทางนั้นสามารถให้ผลผลิตสูงกว่าข้าวสายพันธุ์แท้ที่ได้รับการปรับปรุงมากถึง 15-20 % [4] ช่วยให้เกิดความมั่นคงทางอาหารสำหรับประชากรโลก อีกทั้งมีความต้านทานต่อโรคและแมลง และทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ เช่น ความแห้งแล้ง ความเค็ม

เพื่อเป็นการสร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับกลุ่มยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับลักษณะ TGMS งานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิค complimentary DNA amplified fragment length polymorphisms (cDNA-AFLP) ในการศึกษาวิเคราะห์ระดับความแตกต่างของการแสดงออกของยีน เทคนิค cDNA-AFLP ที่เลือกใช้ในการศึกษาครั้งนี้สามารถทำได้โดยไม่ต้องมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่าง ๆ มาก่อน มีความประหยัด สะดวก รวดเร็ว และลดจำนวนตัวอย่างในการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการนำอนุภาคแม่เหล็กมาใช้ หลักการ คือ ใช้ oligo $d(T)_{25}$ ที่ติดกับอนุภาคแม่เหล็กเป็นไพรเมอร์ในขั้นตอนการสังเคราะห์ เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะได้ cDNA ที่ติดกับอนุภาคแม่เหล็ก จากนั้นนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะครั้งที่หนึ่ง โดยเลือกเอาส่วนที่ติดอนุภาคแม่เหล็กเอาไว้ แล้วนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะครั้งที่สอง ในขั้นนี้จะเอาส่วนที่ติดอนุภาคแม่เหล็กทิ้งไป แต่จะเลือกเอาที่เป็นส่วนใสเก็บไว้ ซึ่งผลทำให้ได้จุดตัดของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด อยู่คนละด้านในชิ้นดีเอ็นเอเดียวกัน ทำให้ได้เพียงหนึ่งชิ้นดีเอ็นเอจากหนึ่ง transcript และนำไปทำการเชื่อมต่อ adapter และกระบวนการของ AFLP ตามปกติ การนำอนุภาคแม่เหล็กมาใช้ช่วยลดจำนวนตัวอย่างเนื่องจากมีเพียงหนึ่งชิ้นดีเอ็นเอจากหนึ่ง transcript ซึ่งแตกต่างจากเทคนิค cDNA-AFLP ที่ใช้อยู่ทั่วไป [5] ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค cDNA-AFLP ในสิ่งมีชีวิตและพืชหลายชนิด ได้แก่ การใช้ cDNA-AFLP ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่ต่างกันในระหว่างการพัฒนาของผลแอปริคอท [6] การตอบสนองต่อความต้านทานโรคราน้ำค้างในมะเขือเทศ [7] และการวิเคราะห์หายีนต้านทานโรคราสนิมจากข้าวสาลีพันธุ์กลาย [8]

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนในอับละอองเรณูของข้าว TGMS ในสภาวะที่ข้าวไม่เป็นหมันหรือติดเมล็ดได้ (อุณหภูมิต่ำ) เปรียบเทียบกับในสภาวะที่ข้าวเป็นหมัน (อุณหภูมิสูง) เพื่อหายีนที่เกี่ยวข้องกับการเป็นหมันของข้าว TGMS 2 สายพันธุ์ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีพื้นฐานพันธุกรรมและถูกควบคุมด้วยยีน TGMS ที่แตกต่างกัน

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างละอองเกสรตัวผู้ของข้าวและการสกัด mRNA

การศึกษาครั้งนี้ใช้ข้าว TGMS 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ B2 (IR683015: *tms3*) และสายพันธุ์ B8 (IR75589: ID24) ซึ่งข้าวสายพันธุ์ B2 เป็นข้าวที่มียีน *tms3* และข้าวสายพันธุ์ B8 เป็นข้าว TGMS ที่พัฒนามาจากข้าวสายพันธุ์ ID24 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ ประเทศฟิลิปปินส์ นำตัวอย่างอับละอองเรณูของข้าว TGMS ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่เก็บจากทั้ง 2 สภาวะได้แก่ ที่อุณหภูมิต่ำ 24 ºC (ติดเมล็ดหรือไม่เป็นหมัน) และที่อุณหภูมิสูง 30 ºC (ไม่ติดเมล็ดหรือเป็นหมัน) รวม 4 ตัวอย่าง บดตัวอย่างอับละอองเรณูให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวและสกัด mRNA จากอับละอองเรณูด้วยชุดสกัด Magnetic mRNA isolation S1550S (BioLabs, MA, USA) โดยใช้อนุภาคแม่เหล็ก (manetic bead) ที่ติดอยู่กับ oligo $dT_{(25)}$ ตามวิธีการสกัดของบริษัท และตรวจสอบอาร์เอ็นเอที่ได้ด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ จากนั้นสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ชุดสำเร็จ (Fermentas) โดยผสม template RNA 11 µl (3 µg) และใช้ oligo $d(T)_{25}$ bead (0.5 µg/µl) จากชุดสกัด Magnetic mRNA isolation เป็นไพรเมอร์ 1 µl ปริมาตรรวม 12 µl วางบนน้ำแข็งแล้วนำไปบ่มที่ 70 ºC 5 นาที ทำให้เย็นบนน้ำแข็ง จากนั้นเติม 5X reaction buffer 4 µl, 10 mM dNTP mix 2 µl, Ribolock™ RNase inhibitor 1 µl และ Transcriptase 1 µl ได้ปริมาตรรวม 20 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 ºC เป็นเวลา 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาอุณหภูมิที่ 70°C เป็นเวลา 5 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วจะได้ cDNA สายเดี่ยวที่ติดกับ oligo $d(T)_{25}$ bead ซึ่งจำลองสายคู่กับสาย mRNA ต้นแบบ

2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างโดยเทคนิค cDNA-AFLP

ตัด cDNA สายคู่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Eco*RI ที่มีตำแหน่งจดจำในการตัดขนาด 6 คู่เบส และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tru*I ที่มีตำแหน่งจดจำในการตัดขนาด 4 คู่เบส และเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดย adapter ที่ต่อเข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอจะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งจับของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ ซึ่ง adapter ที่ใช้คือ *Eco*RI adapter และ *Tru*I adapter

เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ 2 ครั้ง โดยในครั้งแรก (preselective amplification) ไพรเมอร์ที่ใช้คือ *Eco*RIcore: 5′-GACTGCGTACCAATTC-3′ และ *Tru*Icore: 5′-GATGAGTCCTGAGTAA-3′ โดยมีองค์ประกอบและปริมาตรสารในการทำพีซีอาร์ดังนี้ คือ 10X PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า (50 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 50 mM KCl) 2.50 µl, 1.5 mM $MgCl_2$ 1.5 µl, 0.2 µM *Eco*RI ไพรเมอร์ และ 0.2 µM *Tru*I ไพรเมอร์ 1 µl, 0.2 mM dNTPs 2.50 µl, *Taq* DNA polymerase จำนวน 0.5 ยูนิต และ cDNA ปริมาตร 2 µl และน้ำกลั่นให้ครบ 25 µl อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาคือ 94 ºC 30 วินาที 56 ºC 60 วินาที 72 ºC 60 วินาที เป็นจำนวน 20 รอบ แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาเจือจาง 20 เท่า ด้วยน้ำกลั่น เพื่อนำมาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณพีซีอาร์ครั้งที่ 2 (selective amplification) โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 2 ตัว ที่ปลาย 3′ จาก adapter ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ไพรเมอร์จำนวน 30 คู่ (ตารางที่ 1)ไพรเมอร์ที่ใช้คือ *Eco*RI: 5′-GACTGCGTACCAATTC-NN-3′ *Tru*I: 5′-GATGAGTCCTGAGTAA-NN-3′ เมื่อ N คือนิวคลีโอไทด์ A, T, G หรือ C โดยมีองค์ประกอบและ

ปริมาตรสารในการทำปฏิกิริยาดังนี้ 10X PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า (50 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 50mM KCl) 1 µl, 50 mM $MgCl_2$ 0.4 µl, คู่ไพรเมอร์อย่างละ 1 µM 2 µl, 2 mM dNTPs 1 µl, *Taq* DNA polymerase จำนวน 0.25 ยูนิต และดีเอ็นเอปริมาตร 2 µl และน้ำกลั่นให้ครบ 10 µl ใช้โปรแกรม touch down โดยลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65 ºC) ลงรอบละ 0.7 ºC จำนวน 12 รอบ และต่อด้วย 23 รอบของ 94 ºC 30 วินาที, 65 ºC 30 วินาที, 72 ºC 60 วินาที และนำมาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในพอลิอะคริลาไมด์เจล 6 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วยซิลเวอร์ในเตรท [9]

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 2 ตัว ที่ปลาย 3′ จาก adapter สำหรับ selective amplification ของเทคนิค cDNA-AFLP ในข้าว TGMS

Forward primer	Reverse primer	Forward primer	Reverse primer
5′-GACTGCGTACCAATTCAA-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAAAA-3′	5′-GACTGCGTACCAATTCAG-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAATT-3′
5′-GACTGCGTACCAATTCAA-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAAAT-3′	5′-GACTGCGTACCAATTCAG-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAAGA-3′
5′-GACTGCGTACCAATTCAA-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAAAC-3′	5′-GACTGCGTACCAATTCAG-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAACG-3′
5′-GACTGCGTACCAATTCAA-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAAAG-3′	5′-GACTGCGTACCAATTCTC-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAAAC-3′
5′-GACTGCGTACCAATTCAA-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAATA-3′	5'- GACTGCGTACCAATTCTC-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAATT-3′
5′-GACTGCGTACCAATTCAA-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAATT-3′	5′-GACTGCGTACCAATTCTC-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAAGA-3′
5′-GACTGCGTACCAATTCAA-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAATC-3′	5′-GACTGCGTACCAATTCTC-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAACG-3′
5′-GACTGCGTACCAATTCAA-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAATG-3′	5′-GACTGCGTACCAATTCGT-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAAAC-3′
5′-GACTGCGTACCAATTCAA-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAAGA-3′	5′-GACTGCGTACCAATTCGT-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAATT-3′
5′-GACTGCGTACCAATTCAA-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAAGT-3′	5′-GACTGCGTACCAATTCGT-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAAGA-3′
5′-GACTGCGTACCAATTCAA-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAAGG-3′	5′-GACTGCGTACCAATTCGT-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAACG-3′
5′-GACTGCGTACCAATTCAA-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAAGC-3′	5′-GACTGCGTACCAATTCCA-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAAAC-3′
5′-GACTGCGTACCAATTCAA-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAACA-3′	5′-GACTGCGTACCAATTCCA-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAATT-3′
5′-GACTGCGTACCAATTCAA-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAACT-3′	5′-GACTGCGTACCAATTCCA-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAAGA-3′
5′-GACTGCGTACCAATTCAG-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAAAC-3′	5′-GACTGCGTACCAATTCCA-3′	5′-GATGAGTCCTGAGTAACG-3′

2.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

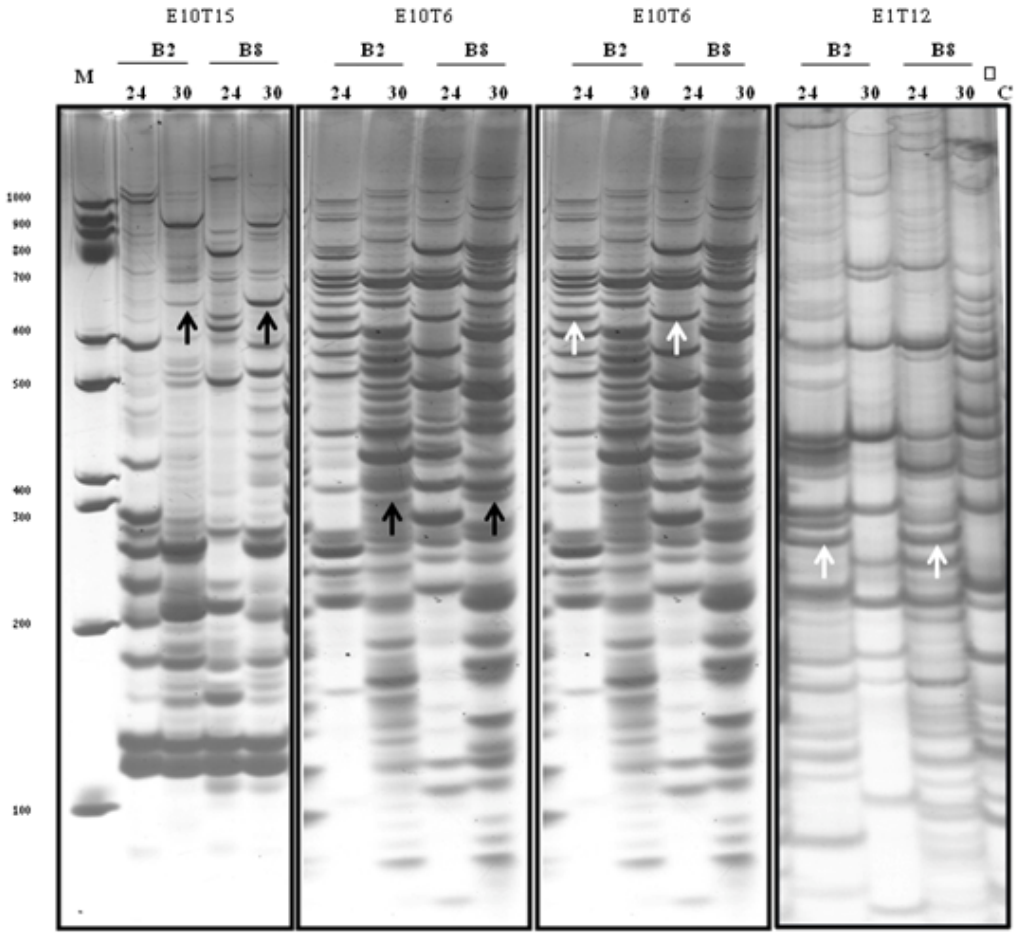
คัดเลือกและตัดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างในสภาวะอุณหภูมิสูงและอุณหภูมิต่ำ โดยคัดเลือกเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันในข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ สกัดดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ แล้วเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์และสภาวะเดิม ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของข้าว [10]

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกยีนที่แตกต่างกันโดยวิธี cDNA-AFLP ในสภาวะอุณหภูมิสูงและอุณหภูมิต่ำ

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในอับละอองเรณูของข้าวที่เป็นหมันเนื่องจากการเปลี่ยน แปลงของอุณหภูมิโดยเทคนิค cDNA-AFLP ด้วยไพรเมอร์ จำนวน 30 คู่ พบแถบดีเอ็นเอที่ให้ผลแบบเดียวกันในข้าว TGMS ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยให้ความแตกต่างระหว่างที่อุณหภูมิสูงและอุณหภูมิต่ำ จำนวน

124 แถบ โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกในสภาวะอุณหภูมิสูง แต่ไม่แสดงออกที่อุณหภูมิต่ำ จำนวน 44 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกในสภาวะอุณหภูมิต่ำ แต่ไม่แสดงออกที่อุณหภูมิสูง จำนวน 80 แถบ ตัวอย่างรูปแบบการแสดงออกยีนที่แตกต่างกันในสภาวะอุณหภูมิสูง 30 ºC และอุณหภูมิต่ำ 24 ºC แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ตัวอย่างรูปแบบการแสดงออกยีนที่แตกต่างกันโดยวิธี cDNA-AFLP (ลูกศรสีดำแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีการแสดงออกในสภาวะที่ข้าว TGMS เป็นหมันที่อุณหภูมิสูง 30 ºC แต่ไม่แสดงออกในสภาวะติดเมล็ดอุณหภูมิต่ำ 24 ºC, ลูกศรสีขาวแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีการแสดงออกในสภาวะที่ข้าว TGMS ติดเมล็ดที่อุณหภูมิต่ำ 24 ºC แต่ไม่แสดงออกในสภาวะเป็นหมันอุณหภูมิสูง 30 ºC, M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, E10T15 คือ 5′-GACTGCGTACCAATTCGT-3′/5′-GATGAGTCCTGAGTAACG-3′, E10T6 คือ 5′-GACTGCGTACCAATTCGT-3′/5′-GATGAGTCCTGAGTAATT-3′, E1T12 คือ 5′-GACTGCGT ACCAATTCAA-3′/5′-GATGAGTCCTGAGTAAGC-3′)

การศึกษาครั้งนี้พบแถบดีเอ็นเอที่สนใจค่อนข้างมาก ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาของ Gamalath และคณะ [11] และ Vannarattanarat และคณะ [12] โดย Gamalath และคณะ [11] ซึ่งใช้เทคนิค cDNA-AFLP ในการคัดเลือกความแตกต่างของ transcripts ที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรคเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในข้าว โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 423 คู่ พบมี 41 แถบดีเอ็นเอที่พบทั้งในต้นข้าวที่ต้านทานโรคและต้นข้าวที่ไม่ต้านทานโรคที่แสดงออกเหมือนกัน แต่มีเพียง 10 แถบดีเอ็นเอที่มีการแสดงออกในภาวะที่มีการติดเชื้อโดยพบเฉพาะในข้าวที่ต้านทานโรค แต่ไม่พบในข้าวที่ไม่ต้านทานโรค นอกจากนั้น Vannarattanarat และคณะ [12] ได้เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในหอยมุกน้ำจืด (*Chamberlainia hainesiana*) ระยะโกลคิเดียและระยะโตเต็มวัยด้วยเทคนิค cDNA-AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 64 คู่ พบแถบดีเอ็นเอ 14 แถบ จากไพรเมอร์ 14 คู่ ที่ให้ความแตกต่างระหว่างหอยระยะตัวอ่อนและระยะโตเต็มวัย

การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เทคนิค cDNA-AFLP เพื่อศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการเป็นหมันที่อุณหภูมิสูง หรือติดเมล็ดที่อุณหภูมิต่ำในข้าวที่เป็นหมันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ พบแถบดีเอ็นเอจำนวนมากที่แสดงออกแตกต่างในสภาวะที่ข้าว TGMS เป็นหมันและไม่เป็นหมัน ซึ่งบ่งชี้ว่าการควบคุมการเป็นหมันหรือติดเมล็ดของข้าว TGMS อาจเกิดจากการทำงานร่วมกันของยีนหลายยีน

3.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่แสดงออกแตกต่างกันในสภาวะอุณหภูมิสูงและอุณหภูมิต่ำในข้าว TGMS

การใช้ไพรเมอร์ 30 คู่ พบแถบดีเอ็นเอที่ให้ผลแตกต่างในสภาวะอุณหภูมิสูงกับสภาวะอุณหภูมิต่ำ 124 แถบ นำมาเพิ่มปริมาณซ้ำโดยใช้ไพรเมอร์คู่เดิม และส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 64 แถบ ได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ 24 แถบ เนื่องจากผลที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนไม่สามารถอ่านผลได้หรืออ่านผลได้สั้นเกินไป เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ 24 ตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในข้าว [10] พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งหมดมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลข้าวเพียง 14 ยีน (ตารางที่ 2) โดยมีขนาดความยาวของ ดีเอ็นเอตั้งแต่ 200 ถึง 600 นิวคลีโอไทด์ เนื่องจากมีบางแถบดีเอ็นเอที่มีผลลำดับนิวคลีโอไทด์มาจากยีนเดียวกัน และแถบดีเอ็นเออีก 3 แถบ คือลำดับที่ 11H, 15H และ 54C ไม่มีความเหมือนกันกับยีนในฐานข้อมูลของข้าว ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแถบดีเอ็นเอที่พบการแสดงออกยีนในสภาวะอุณหภูมิสูง แต่ไม่พบในสภาวะอุณหภูมิต่ำ และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแถบดีเอ็นเอที่พบการแสดงออกยีนในสภาวะอุณหภูมิต่ำ แต่ไม่พบในสภาวะอุณหภูมิสูง ซึ่งมีความเหมือน กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลข้าวที่อ่านได้แสดงดังตารางที่ 3

เทคนิค cDNA-AFLP เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสามารถใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้ดี โดยมีรายงานว่ายีนหลายยีนถูกค้นพบด้วยการใช้เทคนิคนี้ ตัวอย่าง เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับ fertility restoration ในข้าวโพด [13] ยีนทนแล้งในข้าวบาร์เลย์ [14] ยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดจากความเค็มใน halophyte *Spartina alterniflora* Loisel [15] ยีนที่ควบคุมความเครียดจากอุณหภูมิสูงในปมถั่ว [16] ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีหลายยีนอาจเกี่ยวข้องกับความเป็นหมันของอับละอองเรณูในดอกข้าว ดีเอ็นเอลำดับที่ 30C มีความเหมือนกับ EH domain-containing protein 1 ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการ GTP catabolic และ endocytosis มีหน้าที่เป็น GTP binding

เป็น GTPase activity 76C มีความเหมือนกับโปรตีน B3 DNA binding domain containing มีหน้าที่เป็น transcription factor ที่มี B3 domain ซึ่งเกี่ยวข้องในกระบวนการพัฒนา embryo กระบวนการ positive regulation ของการสังเคราะห์ออกซิน โดยทำหน้าที่เป็น DNA binding ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะในการกระตุ้น DNA binding transcription factor ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์และศึกษาพันธุ์ข้าวที่เป็นหมันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 2 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค cDNA-AFLP ที่มีการแสดงออกยีนแตกต่างกันในสภาวะที่เป็นหมันที่อุณหภูมิสูง 30 ºC และที่ไม่เป็นหมันที่อุณหภูมิต่ำ 24 ºC เมื่อเทียบกับยีนในฐานข้อมูลข้าว

cDNA fragment No.[a]	Length (bp)	E-vale	Rice locus	Description
4H	167	1.4e-87	LOC_Os05g04160	Pentatricopeptide containing protein
24C, 5H, 7H	318	3.7e-158	LOC_Os09g27080	Growth regulator related protein
29C, 30C	471	3.6e-272	LOC_Os04g57350	EH domain-containing protein 1, putative
31C, 32C, 57C, 58C	222	5.5e-125	LOC_Os07g27750	Expressed protein
34C	195	5.8e-104	LOC_Os07g23200	F-actin-capping protein subunit alpha
24H	104	1.9e-54	LOC_Os07g23200	NBS-LRR disease resistance protein
62C	236	2.4e-128	LOC_Os05g34260	Transposon protein, putative, AC/Ds subclass
38H	190	7.5e-73	LOC_Os08g14520	Retrotransposon protein, putative, centromere-specific
76C	274	2.8e-146	LOC_Os01g51610	B3 DNA binding domain containing
42C	215	4.2e-116	LOC_Os04g40040	Copper methylamine oxidase precursor
48C	269	2.3e-148	LOC_Os12g06890	OsNucAP3-putative nucleoporin autopeptidase homologue
58C	153	3.7e-74	LOC_Os03g21520	Expressed protein
66C, 67C	119	3.5e-61	LOC_Os01g60080	Monocopper oxidase, putative
81C	95	4.3e-42	LOC_Os06g34650	Zinc finger, C3HC4 type domain containing protein

[a]H เป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกในสภาวะที่ข้าวเป็นหมัน (อุณหภูมิสูง)

C เป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกในสภาวะที่ข้าวไม่เป็นหมัน (อุณหภูมิต่ำ)

ตารางที่ 3 ตัวอย่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ cDNA-AFLP ที่คัดเลือก

Fragments	Nucleotide sequences	Size (bp)
30C	CGGCGCTGACGGGCAAGGCCAAGGCGCAGCAGCGGCTGCTCGACACCCT CGACGAGCAGTTCGCCAAGGTTCAGAAGGAGCTGCACTTGCCGGCCGGC GACTTCCCCAGCGTGGATGAGTACAGGGAGACACTGAGCGCCTACAACT TCGACAAGTTCGAGAGGCTGAAGCCCAAGCTGGTGCAGGGCGTCGACGA CATGCTCGCCTACGACATCCCCGATCTCCTCAAGAGCTTCAGGAACCCCT ACGAATGAATGAGCAAGCAGCAGCAGTCAGAGAAGGCGTGTTCGACCAC AATACAAGCATGGATCTTTCTTGTTCACAAAAAAAGAATGTGATCCGTGA ATCGTCAATCCATCTCTTTTGTGCTCCACGAAGGCGCGATATATGGCTTTT TGTTGGCGATTTTCTTCAGTCTTCTGCAGTGATCTCTGAAGAAGGCAGTG TGACAGGAATGTGCAAAGTGAAGCCGATTGGAAAGTTTGGAACAGCGTT GGAAATCTTTCAAATGGGGATACTGTCCTGGTCTGCGCGGGCCGCTCTCA CTGTTGTCCCTGTCGTCAGGGGAAAGCACAGACTTGCCTCGTCATTACTG CGCAAATTTTGTTAGCGATATAAGACATGCTAT	678
24H	TTGATCTTGATGCTACCGATATATCTTGTCTTCCAGACTCCATCGGTTCTC TCACAAACCTGCAAATATTGAACTTGCAGAGGTGCTATGCATTGCATGAT CTTCCAATGGCAATCACCAAGCTGTGCAGTTTACTCAGGACTCATCAA	174
38H	AGAAGGAAACAACGATGCCCAGGAACCGTTATTGGAAGACGCCGATAA AATCCTCAATACCGGCCAAGAAGCTAGAGCAGTCGGCTCAGAAGAAGCC GCTGTCCGCACCAAAATCAAGGAAGGTGTGGAGGAAGAAGCCAAAGAC GCCCACTCCATCACCTCCGGAGACGGGTGGAAAATCCGCGAACCAGCAA GGAAGGAGGTACGGTCTTGCAC	290
76C	ATGGACATGGCAAACACTCTGAACGCCAACGCCAACCAATCTGCTAATC GCATGTCACTGAGGATAAGTCTGGGCATTCCTTGATTCCCAACCCAAAGT CTGGGCCTCACATGTGAGACTGACAGGGAAGTGGTATTTCATACCATGGT CAGTTTGTATGAAGCTCACAAACCCCTTCCCTGGCGCCATTGTTGTACAT CCAAATAATTGGTGTCCTTATTTTGACGCTGTATATGCTAACTGCTACAT GCAGTTTTATGTGTAAAATATTTTGTTCACAACCCAACTGGAGGTTTACT CAGGACTCATC	361

[a]H เป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกในสภาวะที่ข้าวเป็นหมัน (อุณหภูมิสูง)

C เป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงออกในสภาวะที่ข้าวไม่เป็นหมัน (อุณหภูมิต่ำ)

4. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สวทช.)

5. เอกสารอ้างอิง

[1] ประชาชาติธุรกิจออนไลน์, รายงานพิเศษ : แนวโน้มสินค้าพืชเกษตรปี 56 ปีชี้ชะตา "นโยบายรับจำนำข้าว", แหล่งที่มา : http://www.prachachat.net/news_detail.php, 19 มีนาคม 2556.

[2] บริบูรณ์ สมฤทธิ์, 2550, ข้าวลูกผสม : งานวิจัยที่ยาวนานสำหรับทางเลือกการผลิตข้าว, ว.วิชาการข้าว 1(1): 72-75.

[3] Liu, X., Li, X., Zhang, X. and Wang, S., 2010, Genetic analysis and mapping of a thermosensitive genic male sterility gene, *tms6(t)*, in rice (*Oryza sativa* L.), Genome 53:119-124.

[4] Chen, L., Zhao, Z., Liu, X., Liu, L., Jiang, L., Liu, S., Zhang, W., Wang, Y., Liu, Y. and Wan, J., 2010, Marker-assissted breeding of a photoperiod-sensitive male sterile *japonica* rice with high crosscompatibility with *indica.* Mol. Breed. 1: 247-258.

[5] Vuylsteke, M., Peleman J.D. and van Michiel, M. J.T., 2007, AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis, Nature Protocols 6: 1399-1413.

[6] Geuna, F., Banafi, R. and Bassi, D., 2005, Identification and characterization of transcripts differentially expressed during development of apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruit, Tree Genet. Genome 1: 69-78.

[7] Li, C., Bai, Y., Jacobson, E., Visser, R., Lindhout, P. and Bonnema, G., 2006, Tomato defense to the powdery mildew fungus: Differences in expression of genes in susceptible, monogenic and polygenic resistance responses are mainly in timing, Plant Mol. Biol. 62: 127-140.

[8] Yin, J., Wang, G., Xiao, J., Ma, F., Zhang, H., Sun, Y., Diao, Y., Huang, J., Guo, Q. and Liu, D., 2010, Identification of genes involved in stemrust resistance from wheat mutant D51 with the cDNA-AFLP technique, Mol. Boil. Rep. 37: 1111-1117.

[9] Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudoin, T. and Mergeai, G., 2006, Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels, Biol. Agron. Soc. Env. 10: 77-81.

[10] GRAMENE, *Oryza sativa*, Available Source: http://www.gramene.org/Oryza_sativa, February 14, 2011.

[11] Gamalath, N.S., Sharma, P.N., Mori, N. and Nakamura, C., 2009, Differential cDNA-AFLP screening of transcripts associated with brown planthopper resistance in rice (*Oryza sativa* L.), Aust. J. Crop Sci. 3: 201-206.

[12] Vannarattanarat, S., Kovitvadhi, U. and Hongtrakul, V., 2011, Comparison of gene expression in glochidia and adult freshwater

pearl mussels (*Chamberlainia hainesiana*) using cDNA-AFLP and differential display techniques, Thai J. Genet. 4: 63-70.

[13] Zhang, Z. and Zheng, Y., 2008, Identification of candidate genes associated with fertility restoration in maize S cytoplasmic male sterility, Plant Mol. Biol. 26: 60-71.

[14] Supranova, T., Krungman, T., Distelfeld, A., Fahima, T., Nevo, E. and Korol, A., 2007, Identification of novel gene (*Hsdr4*) involved in water-stress tolerance in wild barley, Plant Mol. Biol. 64: 17-34.

[15] Baisakh, N., Parami, N. and Subudhi, P., 2006, cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in a halophyte *Spartina alterniflora* Loisel, Plant Sci. 170: 1141-1149.

[16] Simões-Araújo, J.L., Rodrigues, R.L. de A., Gerhardt, L.B., Mondego, J.M., Alves-Ferreira, M., Rumjanek, N.G., Margis-Pinheiro, M., 2002, Identification of differentially expressed genes by cDNA-AFLP technique during heat stress in cowpea nodules, FEBS Lett. 515: 44-50.