การวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์เบื้องต้นในช่อดอกอ่อนของข้าวสายพันธุ์ที่เป็นหมันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

Preliminary Proteomics Analysis in Young Panicle of Thermo-Sensitive Genic Male Sterile Rice Lines

ศรีประไพร ชาขอนแก่น และกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

สิทธิรักษ์ รอยตระกูล, อัจฉรา แพมมณี และอมรทิพย์ เมืองพรหม*

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Sriprapai Chakhonkaen and Kittipat Ukoskit

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

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

Sittiruk Roytrakul, Atchara Paemanee and Amorntip Muangprom*

BIOTEC, National Science and Technology Development Agency,

Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

การใช้ระบบความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ที่ควบคุมโดยอุณหภูมิทำให้การสร้างข้าวลูกผสมทำได้โดยสะดวก ข้าวลูกผสมนั้นสามารถให้ผลผลิตที่สูงกว่าข้าวสายพันธุ์แท้ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ 15-20 % ในการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ในช่อดอกข้าวที่มีเกสรตัวผู้เป็นหมันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (TGMS) ใช้ตัวอย่างข้าว TGMS ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์มีพื้นฐานทางพันธุกรรมและถูกควบคุมด้วยยีน *tgms* ที่ต่างกัน โดยได้ศึกษาโปรตีนในช่อดอกอ่อนในสภาวะเป็นหมัน (ไม่ติดเมล็ด) เปรียบเทียบกับสภาวะไม่เป็นหมัน (ติดเมล็ด) ได้สกัดโปรตีนทั้งหมดจากช่อดอกอ่อน แยกโปรตีนโดย GeLC-MS/MS พบโปรตีนทั้งหมด 803 โปรตีน และคัดเลือกโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่เป็นหมันกับสภาวะไม่เป็นหมันโดยคัดเลือกเฉพาะโปรตีนที่ข้าว TGMS ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีการแสดงออกไปในทำนองเดียวกัน พบว่ามี 11 โปรตีน ที่มีการแสดงออกลดลง และมี 18 โปรตีน ที่มีการแสดงออก

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

เพิ่มขึ้น ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพ (biological processes) หลาย ๆ กระบวนการ เช่น defense/stress responses, lipid metabolism, transcription, carbohydrate metabolism, degradation และ signal transduction องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้อาจจะนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านปรับปรุงพันธุ์เพื่อใช้ในการผลิตข้าวลูกผสมแบบสองทางและปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิได้ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : โปรตีโอมิกส์, การเป็นหมันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ, เทคนิค GeLC-MS/MS, ข้าวลูกผสม, ข้าว

Abstract

Thermo-sensitive genic male sterility (TGMS) facilitates hybrid production. Hybrid rice has 15 to 20 percent yield advantage over the best inbred varieties. In this study, a proteomic approach was used to investigate proteins involved in TGMS using 3 TGMS rice lines. The three TGMS rice lines have different genetic backgrounds, and are controlled by different *tgms* genes. Total young panicle proteins under sterile (high temperature) and fertile (low temperature) conditions were extracted and separated using GeLC-MS/MS. A total of 803 proteins were detected. Using at least 30 % difference in levels of expression at fertile and sterile conditions, 11 and 18 proteins were concordantly shown in all the three TGMS lines to be down-regulated and up-regulated, respectively. These proteins are involved in several biological processes such as defense/stress responses, lipid metabolism, transcription, carbohydrate metabolism, degradation and signal transduction. The information obtained from this study could be useful in rice breeding programs for hybrid production and for resistant lines to overcome temperature changes in the future.

Key words: proteomics, TGMS, GeLC-MS/MS, hybrid rice, *Oryza sativa*

1. บทนำ

ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้คือสภาวะที่ไม่มีหรือเกสรตัวผู้มีลักษณะผิดปกติจึงทำให้ไม่สามารถเกิดการปฏิสนธิได้ตามปกติเพื่อที่จะสร้างเมล็ด ซึ่งการเป็นหมันของเกสรตัวผู้อาจเกิดจากอิทธิพลทางพันธุกรรม (genetic) และไม่ใช่พันธุกรรม (non-genetic) การเป็นหมันของเกสรตัวผู้เนื่องจากอิทธิพลที่ไม่ใช่พันธุกรรม ได้แก่ การชักนำการเป็นหมันของเกสรตัวผู้โดยใช้สารเคมี ส่งผลขัดขวางการพัฒนาของละอองเรณูไม่ให้มีการเจริญเติบโต [1] ส่วนการเป็นหมันของเกสรตัวผู้เนื่องจากอิทธิพลทางพันธุกรรม ได้แก่ การเป็นหมันอันเนื่องมาจากอิทธิพลทางพันธุกรรมของยีนในไซโตพลาซึมและยีนในนิวเคลียส (cytoplasmic genic male sterility) และการเป็นหมันของเกสรตัวผู้ที่เกิดจากการแสดงออกของ

ยีนในนิวเคลียสซึ่งถูกควบคุมโดยปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (environment-sensitive genic male sterility) [2] การเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในข้าวที่เกิดจากการกลายพันธุ์ สามารถจัดกลุ่มหลัก ๆ ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ การเป็นหมันของเกสรตัวผู้เนื่องจากอิทธิพลทางพันธุกรรมของยีนในไซโตพลาซึม (CMS) การเป็นหมันของเกสรตัวผู้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของช่วงแสง (PGMS) การเป็นหมันของเกสรตัวผู้เนื่องจากการเปลี่ยนของอุณหภูมิ (TGMS) และการเป็นหมันของเกสรตัวผู้เนื่องจากสาเหตุอื่น ๆ [3]

ข้าวเป็นพืชที่สำคัญและเป็นอาหารหลักในการดำรงชีวิตของประชากรโลก รวมทั้งยังเป็นต้นแบบของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเพราะมีจีโนมขนาดเล็ก [4] ในปัจจุบันนี้ได้นำข้าวสายพันธุ์ TGMS มาพัฒนาเพื่อใช้ในการผลิตข้าวลูกผสม เกสรตัวผู้ของข้าวสายพันธุ์ TGMS จะเป็นหมันที่อุณหภูมิสูง และไม่เป็นหมันที่อุณหภูมิต่ำ เหมาะกับสภาพภูมิอากาศในเขตร้อน จึงทำให้การสร้างข้าวลูกผสมทำได้โดยง่าย และสามารถใช้พ่อพันธุ์ได้หลากหลาย นอกจากนี้ยังได้มีการพิสูจน์มาเป็นเวลาหลายปีว่า ข้าวลูกผสมที่ดีนั้นให้ผลผลิตที่สูงกว่าข้าวสายพันธุ์แท้ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ 15- 20 % [2] ปัจจุบันนี้ได้มีการค้นพบยีน *tgms* ต่าง ๆในข้าว ได้แก่ *tms1* จาก 5460S อยู่ที่โครโมโซมที่ 8 [5] *tms2* จาก Norin-PL12 อยู่ที่โครโมโซมที่ 7 [6] *tms3* จาก IR32364 อยู่ที่โครโมโซมที่ 6 [7] *tms4* จาก TGMS-VN1อยู่ที่โครโมโซมที่ 2 [8] *tms5* จาก AnnongS-1อยู่ที่โครโมโซมที่ 2 [9] และ *tms6* จาก 0A15-1 อยู่ที่โครโมโซมที่ 5 [10] ยีน *tgms* ทั้งหมดที่ควบคุมลักษณะของ TGMS มีลักษณะเป็นยีนด้อยตำแหน่งเดียว (single recessive gene) [11] แต่อย่างไรก็ตามกลไกทางอณูชีววิทยาเกี่ยวกับการเป็นหมันของเกสรตัวผู้นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

โปรตีโอมิกส์คือการศึกษาหน้าที่และสมบัติของโปรตีนรวมไปถึงศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีนต่าง ๆ ที่มีอยู่ในเซลล์ขณะนั้น [4] การวิเคราะห์โปรตีโอมเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพเพื่อตรวจสอบและศึกษาสมบัติของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับข้อมูลในลำดับเบสของจีโนม สำหรับในข้าวได้มีโครงการศึกษาข้อมูลลำดับเบสของจีโนมได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้สามารถทำนายโปรตีนได้เกือบทั้งหมด [12] ซึ่งในทศวรรษที่ผ่านมามีความก้าวหน้าในการศึกษาโปรตีโอมในข้าวเพิ่มมากขึ้น เช่น Lee และคณะ [13] ได้ศึกษาโปรตีโอมิกส์ โดยศึกษาโปรตีนที่ตอบสนองต่อความร้อนในใบข้าว พบ 48 โปรตีน ที่มีการแสดงออกในการตอบสนองต่อความร้อนในใบข้าวแตกต่างกัน ซึ่งแบ่งกลุ่มชนิดของโปรตีนออกเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่ม heat shock proteins (HSP) กลุ่ม energy and metabolisms กลุ่ม redox homeostasis กลุ่ม regulatory และ other proteins และกลุ่มสุดท้ายคือกลุ่ม unknown protein กลุ่มโปรตีนที่พบมากที่สุดคือกลุ่ม HSP มีมากกว่า 37 % ซึ่งเคยมีรายงานกล่าวไว้ว่า กลุ่ม HSP มีบทบาทที่สำคัญในการป้องกันความเครียดที่เกิดจากความร้อน และ Balbuena และคณะ [14] ได้วิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ในดอกทานตะวันที่ปรับตัวเข้ากับอากาศเย็น โดยได้ศึกษาดอกทานตะวัน 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ Hopi ที่อ่อนแอต่อความเย็น และสายพันธุ์ PI 543006 และ BSD-2-691 ที่ทนต่อความเย็น พบว่าหลังจากที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค tandem mass spectrometry พบโปรตีนทั้งหมด 718, 675, และ 769 โปรตีน ในดอกทานตะวันสายพันธุ์ Hopi, PI 543006 และ BSD-2-691 ตามลำดับ และมีการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกันที่ความเชื่อมั่น 95 % มีโปรตีน 43, 72 และ 168 โปรตีน ในพันธุ์ Hopi, PI 543006

และ BSD-2-691 ตามลำดับ โดยหน้าที่ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัวเข้ากับอากาศเย็นในดอกทานตะวันส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม metabolism, protein synthesis, energy และ defense processes

การศึกษาครั้งนี้มีเป้าหมาย เพื่อศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเป็นหมันของข้าว TGMS ซึ่งในขณะนี้ยังไม่มีข้อมูลที่ทราบกันแน่ชัดเกี่ยวกับกลไกการทำงานของโปรตีนและการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเป็นหมันในระบบ TGMS งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในช่อดอกอ่อนข้าวในสภาวะเป็นหมันและไม่เป็นหมันด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ การทดลองครั้งนี้ใช้ข้าว TGMS ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ โดยแต่ละสายพันธุ์จะมีพื้นฐานทางพันธุกรรมและถูกควบคุมด้วยยีน *tgms* ที่ต่างกัน

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างข้าวที่ใช้ในการศึกษา

ปลูกข้าวสายพันธุ์ TGMS จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ H19 (*tms2*), IR683015 ข้าวที่ถูกควบคุมด้วยยีน *tms3* (B2) และ IR75589 ข้าวมียีน *tgms* ที่ได้มาจากข้าวสายพันธุ์ ID24 (B8) หลังจากนั้นประมาณ 1-2 เดือน ก่อนระยะข้าวจะออกดอก นำข้าวทั้งหมดเข้าตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 28-30 องศาเซลเซียส (สภาวะเป็นหมัน) และที่อุณหภูมิ 24-26 องศาเซลเซียส (สภาวะที่ไม่เป็นหมัน) จากนั้นประมาณ 2-3 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างช่อดอกอ่อนข้าวในไนโตรเจนเหลวก่อนที่จะนำไปเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีน

2.2 การสกัดโปรตีน

เก็บตัวอย่างช่อดอกอ่อนของข้าว TGMS ทั้ง 3 สายพันธุ์ ทั้งในสภาวะเป็นหมันและไม่เป็นหมัน นำตัวอย่างช่อดอกอ่อนข้าวแต่ละตัวอย่างมาสกัดโปรตีนด้วยวิธี TCA-acetone precipitation [15] วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (1951) [16] แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์โปรตีนต่อไป

2.3 การแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีสด้วยเทคนิค 1D-PAGE

สารละลายโปรตีนที่สกัดได้ทั้งในสภาวะเป็นหมันและไม่เป็นหมันนำมาแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีสด้วยเทคนิค 1D-PAGE โดยวิธีของ Laemmli (1970) [17] โดยมีสารละลายโปรตีนปริมาณ 15 ไมโครกรัม ผสมกับ 5x running buffer [0.5 M dithioerytreitol (DTT), 10 % SDS, 0.4 M Tris HCl pH 6.8, 50 % glycerol, 0.1 mg/ml bromophenol blue] ผสมให้เข้ากันดี และนำตัวอย่างโปรตีนไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างโปรตีนไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 xg เป็นเวลา 10 นาที ต่อมานำตัวอย่างโปรตีน วิเคราะห์ในเจล 12 % SDS-polyacrylamide gel ที่เตรียมไว้โดยจ่ายกระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วย silver stain [18] ซึ่งจะเปรียบเทียบขนาดของโปรตีนตัวอย่างกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (PAGE Ruler™ Prestain Protein Ladder, Fermentas) จากนั้นก็ตัดแบ่งเจลโปรตีนออกเป็นช่วง ๆ ซึ่งจะเปรียบเทียบตามช่วงขนาดของโปรตีนมาตรฐานโดยจะตัดเจลออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ตามที่ช่วงกำหนดไว้ แล้วแบ่งใส่ microtiter plate เพื่อจะนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินต่อไป

2.4 การย่อยโปรตีนภายในเจล

การย่อยโปรตีนภายในเจล (in-gel digestion) ทำโดยตัดชิ้นเจลเป็นชิ้นเล็ก ๆ ลงใน microtiter plate จากนั้นทำการล้างสีย้อม silver stain ออกจากเจล โดยการเติม 5 % H_2O_2 ลงในแต่ละหลุม

ของตัวอย่าง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดสารละลาย H_2O_2 ทิ้งไป แล้วเติมสาร acetonitrile (ACN) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย 10 mM dithioerytreitol (DTT)(10 mM DTT ใน 10 mM ammonium bicarbonate) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดูดสารละลาย DTT ทิ้ง ขั้นตอนต่อมาก็จะเป็นการเติมสารละลาย 100 mM iodoacetamide (IAA) (100 mM IAA ใน 10 mM ammonium bicarbonate) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลาย IAA ทิ้ง แล้วเติมสาร ACN ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ต่อมาเติมเอนไซม์ทริปซินปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย100 mM ammonium bicarbonate ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน โปรตีนที่ถูกย่อยจะถูกสกัดออกมาจากเจล โดยการเติมสารละลาย 100 mM ammonium bicarbonate ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ดูดสารละลายในแต่ละตัวอย่างออกมาเพื่อใส่ microtiter plate ใหม่ แล้วเติมสารละลาย 50 % ACN/0.1 % FA (formic acid) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ใน microtiter plate ที่มีชิ้นเจล นำไปเขย่าเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นก็ดูดสารละลายโปรตีนไปรวมกับสารละลายโปรตีนใน microtiter plate ใหม่ก่อนหน้านี้ หลังจากเสร็จในขั้นตอนนี้นำสารละลายโปรตีนทั้งหมดไประเหยแห้งด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ตะกอนโปรตีนจะถูกละลายด้วย 0.1 % FA ปริมาตร 10 ไมโครลิตร [19] เพื่อไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GeLC-MS/MS ต่อไป

2.5 เทคนิค LC-MS/MS และการตรวจพิสูจน์ชนิดของโปรตีน

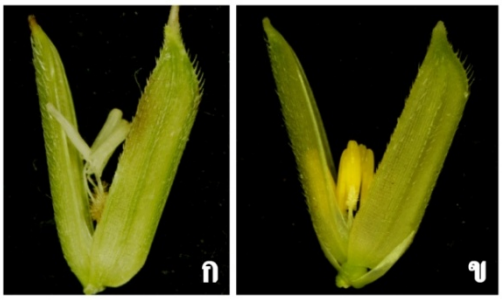
การตรวจพิสูจน์ชนิดโปรตีนและดูการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค GeLC-MS/MS แบบ ESI-QUAD-TOF เทคนิคนี้จะประมวลผลในรูปแบบระบบคอมพิวเตอร์ควบคุม โดยแสดงค่าของแมสสเปกตรัมในรูปแบบของกราฟ ที่มีแกนตั้งเป็นค่า relative intensity และแกนในแนวนอนเป็นค่ามวลต่อประจุ (m/z) [20] ผลของแมสสเปกตรัมที่มีข้อมูลเชิงปริมาณจาก LC-MS/MS นำไปวิเคราะห์โปรตีนโดยโปรแกรม Decyder MS [21] จากนั้นนำข้อมูล MS-MS แต่ละตัวอย่างที่ได้จากการวิเคราะห์โปรตีนด้วยโปรแกรม Decyder MS นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนของ Genbank โดยใช้ฐานข้อมูล Mascot search ซึ่งในการสืบค้นข้อมูลตั้งค่าดังนี้ *Oryza sativa*, Trypsin (ยินยอมให้เอนไซม์มีการย่อยผิดตำแหน่งเพียง 1 ตำแหน่ง) carbamidomethyl (C) (fixed modification) และ oxidation (M) (variable modification) และหาหน้าที่ในกระบวนการทางชีววิทยา ด้วยวิธี Gene Ontology จากฐานข้อมูล Uni-Prot (http://www.uniprot.org) และ Gramene (http://www.gramene.org)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดจากช่อดอกอ่อนของข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ทั้งในสภาวะเป็นหมันและไม่เป็นหมันด้วยเทคนิค GeLC-MS/MS

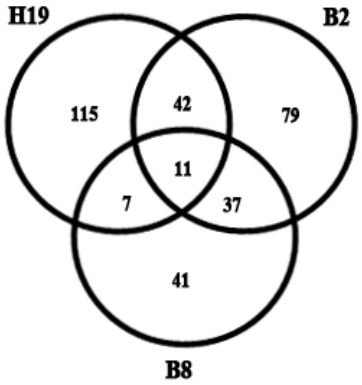
การศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในช่อดอกข้าว TGMS ที่เป็นหมันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ โดยได้สังเกตลักษณะการเป็นหมันของข้าวสายพันธุ์ TGMS ซึ่ง

สามารถดูด้วยตาเปล่าโดยสังเกตดูที่อับละอองเรณูของข้าว โดยทั่วไปลักษณะของข้าวสายพันธุ์ TGMS ที่ไม่เป็นหมัน (ติดเมล็ด) จะมีลักษณะอับละอองเรณูเป็นสีเหลือง มีขนาดใหญ่ ในขณะที่ข้าวเป็นหมัน (ไม่ติดเมล็ด) จะมีอับละอองเรณูที่มีลักษณะขนาดเล็กแฟบ สีขาวซีด เมื่อเปรียบเทียบกับอับละอองเรณูที่ไม่เป็นหมัน (รูปที่ 1)

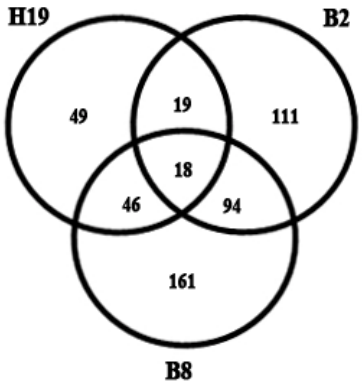


รูปที่ 1 เปรียบเทียบ (ก) อับละอองเรณูที่เป็นหมันของข้าวสายพันธุ์ TGMS กับ (ข) อับละอองเรณูของข้าวปกติ

จากนั้นศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในข้าวสายพันธุ์ TGMS ในสภาวะที่เป็นหมันเปรียบเทียบกับสภาวะไม่เป็นหมันด้วยเทคนิค GeLC-MS/MS โดยเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพ สามารถตรวจสอบโปรตีนที่มีอยู่ในเซลล์ปริมาณน้อย และตรวจสอบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่หรือขนาดเล็กได้ รวมทั้งสามารถตรวจสอบโปรตีนที่มีค่า pI ต่ำกว่าหรือสูงกว่าที่กำหนดในเจลของเทคนิค 2D-PAGE [22] พบโปรตีนทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้จากช่อดอกอ่อนของข้าว TGMS ทั้ง 3 สายพันธุ์ จำนวน 803 โปรตีน และคัดเลือกโปรตีนมีที่การแสดงออกแตกต่างกันมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะเป็นหมัน (ไม่ติดเมล็ด) เปรียบเทียบกับสภาวะไม่เป็นหมัน (ติดเมล็ด) พบว่ามี 11 โปรตีน มีการแสดงออกของโปรตีนลดลงในข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ และมี 18 โปรตีน ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ (รูปที่ 2) เมื่อศึกษาหน้าที่ของโปรตีนในระดับยีนโดยใช้ฐานข้อมูลข้าว Gramene (http://www.gramene.org) พบว่าสำหรับโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลง มี 8 ยีน ทราบหน้าที่และมี 3 ยีนไม่ทราบหน้าที่ (ตารางที่ 1) ส่วนโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นมี 14 ยีน ทราบหน้าที่และมี 4 ยีน ไม่ทราบหน้าที่ (ตารางที่ 2)



การแสดงออกลดลง (down-regulated)



การแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulated)

รูปที่ 2 แผนภาพเวนน์แสดงจำนวนโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงและเพิ่มขึ้นในข้าว TGMS ในสภาวะเป็นหมัน (ไม่ติดเมล็ด) เปรียบเทียบกับสภาวะไม่เป็นหมัน (ติดเมล็ด)

ตารางที่ 1 กลุ่มโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลง (down-regulated) ในข้าว TGMS ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสภาวะเป็นหมันเปรียบเทียบกับสภาวะไม่เป็นหมัน

Accession No.	Peptide sequence	Description gene
gi|125557802	GGGDGSSR	UDP-glucoronosyl and UDP-glucosyl transferase domain containing protein, expressed
gi|115479777	AGPTS	Phosphofructokinase, putative, expressed
gi|115471859	AMGGTK	MYB family transcription factor, putative, expressed
gi|115462045	KMSASIKGRQPR	WD domain, G-beta repeat domain containing protein, expressed
gi|18307514	NVINAAADMGVR	Dehydrogenase, putative, expressed
gi|24796819	IVASMDGLR	ATP-dependent RNA helicase, putative, expressed
gi|38567839	AQSLFQIPSAHR	SNF2 family N-terminal domain containing protein, expressed
gi|218197039	GSGPPAASAVAGKAR	Translation initiation factor SUI1, putative, expressed
gi|218184074	MQIAGHITRSK	Expressed protein
gi|218195282	GAQVK	Hypothetical protein
gi|50508246	RRPAWKTR	Conserved hypothetical protein

กลุ่มโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงในข้าว TGMS ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสภาวะที่เป็นหมันเปรียบเทียบกับสภาวะไม่เป็นหมัน จำนวน 11 โปรตีน เมื่อศึกษาหน้าที่ในระดับยีนพบว่าอาจจะมียีนเกี่ยวข้องกับระบบความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ เช่น MYB พบว่ามีการแสดงออกลดลงในช่อดอกอ่อนของข้าว TGMS ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสภาวะเป็นหมัน ยีนกลุ่มนี้เป็น family protein ที่เป็นกลุ่มยีนขนาดใหญ่แสดงออกในกลุ่มสิ่งมีชีวิตพวกยูแคริโอต ส่วนใหญ่จะทำหน้าที่เป็น transcription factors ซึ่ง MYB จะมีจำนวนซ้ำของ domain แตกต่างกันในการจับกับ DNA สำหรับกลุ่ม MYB protein จากรายงานที่ผ่านมา พบว่าในพืชทำหน้าที่ที่สำคัญในกระบวนการควบคุมการพัฒนากระบวนการ metabolism และกระบวนการตอบสนองต่อสภาวะเครียดที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิต ซึ่งหน้าที่ของโปรตีน MYB ได้ศึกษากับพืชหลากหลายชนิด เช่น *Arabidopsis* ข้าวโพด ข้าว petunia (*Petunia hybrida*) และ snapdragon (*Antirrhinum majus*) [23] และรายงานของ Steiner-Lange และคณะ [24] ได้ศึกษาการถูกทำลายของ AtMYB26 ใน *Arabidopsis* ส่งผลทำให้เกิดการเป็นหมันของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในช่วงการแตกของอับเรณู ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ที่ในสภาวะเป็นหมันพบว่า MYB มีการแสดงออกลดลง จากข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า MYB อาจจะมีความ สำคัญต่อการพัฒนาการเจริญของละอองเรณูของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่

WD domain หรือ WD repeat มีรายงานว่าทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ในเซลล์ เช่น signal transduction, cytoskeleton assembly, vesicular

ตารางที่ 2 กลุ่มโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulated) ในข้าว TGMS ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสภาวะเป็นหมันเปรียบเทียบกับสภาวะไม่เป็นหมัน

Accession No.	Peptide sequence	Description gene
gi|22655764	AAVPSGASTGVYEALELR	Enolase, putative, expressed
gi|115442127	APDLSNVISK	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein 3, putative, expressed
gi|158512874	EDKPAPPPEGR	OsAPx1 - Cytosolic Ascorbate Peroxidase encoding gene 1-8, expressed
gi|46390459	IAQEEIFGPVQSILK	Aldehyde dehydrogenase, putative, expressed
gi|20805198	MKQLVHIK	Disease resistance protein RPS2, putative
gi|108707931	VGAVDGEPR	Stress responsive protein, putative, expressed
gi|115467420	RRSWVSPQQAMDR	Hydrolase, NUDIX family, domain containing protein, expressed
gi|115465163	IGVQIIKNALK	T-complex protein, putative, expressed
gi|47848463	QPQVMATASVK	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-4 specific ATX1, putative, expressed
gi|115475161	ARLTGELSR	Bromodomain containing protein, expressed
gi|5803249	MATTVTR	Early nodulin 93 ENOD93 protein, putative, expressed
gi|125524617	MKTGIVGR	ABC transporter family protein, putative, expressed
gi|38344277	LRMVT	Nucleolar complex protein, putative, expressed
gi|222640474	HFPAASLGSGR	OsFBX290 - F-box domain containing protein, expressed
gi|19881593	YTCRLAVGGEAR	Hypothetical protein
gi|218196693	APMESQEMVRVAASAK	Transposon protein, putative, unclassified
gi|50252474	VARMPPR	Expressed protein
gi|125542202	LPLKLHRR	Hypothetical protein

trafficking, cell cycle control, apoptosis, ribosomal RNA biogenesis, chromatin modification และ transcription regulation [25] และมีรายงานการศึกษาใน *Arabidopsis* พบว่า WD domain เป็นส่วนที่สำคัญในการควบคุมพัฒนาการระยะต่าง ๆ ของพืชอย่างจำเพาะ เช่น การเจริญของดอก การควบคุมของกระบวนการ anthocyanin biosynthesis การพัฒนาละอองเรณู การพัฒนาโครงสร้างเนื้อเยื่อของดอก

กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gametogenesis) และกระบวนการสร้างคัพภะ (embryogenesis) [26] จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า WD domain มีการแสดงออกลดลงในช่อดอกอ่อนของข้าว TGMS ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสภาวะเป็นหมันแสดงให้เห็นว่าอาจจะมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนาละอองเรณูและการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในข้าวเช่นเดียวกันกับใน *Arabidopsis*

SNF2 ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ chromatin remodeling จากรายงานการแสดงออกของยีนในส่วนต่าง ๆ ของข้าว พบว่ามีการแสดงออกในตัวใบ (leaf blade) กาบใบ (leaf sheath) ราก (root) ลำต้น (stem) ช่อดอก (inflorescence หรือ panicle) อับเรณู (anther) เกสรตัวเมีย (pistill) กลีบดอกใหญ่ (lemma) กลีบดอกเล็ก (palea) รังไข่ (ovary) คัพภะ (embryo) เอนโดสเปิร์ม (endosperm) โดยมีการแสดงออกของยีนมากที่สุดในช่อดอก [27] นอกจากนั้นมีรายงานว่า SNF2 มีความสำคัญเกี่ยวกับกระบวนการพัฒนา (development) และกระบวนการ differentiation จากรายงานของ Farrona และคณะ รายงานว่า *SNF2* เป็น homolog กับยีน *AtBRM* ใน *Arabidropsis* ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการออกดอกของพืชและการพัฒนาของลำต้น และ *Arabidropsis* ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *AtBRM* จะทำให้ลักษณะของดอก *Arabidropsis* มีขนาดกลีบดอกและขนาดของเกสรตัวผู้ลดลง รวมทั้งอับเรณูไม่เจริญเติบโต จึงทำให้การติดของเมล็ดลดลง [28] จากข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าน่าจะมีความสำคัญกับการสร้างละอองเรณู สอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า SNF2 มีการแสดง ออกลดลงในช่อดอกอ่อนของข้าว TGMS ทั้ง 3 สายพันธุ์ในสภาวะเป็นหมัน โดยเมื่อศึกษาหน้าที่ของโปรตีนในระดับยีนสามารถแบ่งตามหน้าที่กระบวนการทางชีววิทยา (biological processes) ได้แก่ carbohydrate metabolism, defense/stress responses, degradation, lipid metabolism, replication, translation และ transcription

สำหรับกลุ่มของโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในข้าว TGMS ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสภาวะที่เป็นหมันเปรียบเทียบกับสภาวะไม่เป็นหมัน จำนวน 18 โปรตีน เมื่อศึกษาหน้าที่ของโปรตีนในระดับยีนพบว่ายีนเหล่านี้อาจจะมีความเกี่ยวข้องกับความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในข้าว เช่น enolase มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในช่อดอกข้าว TGMS ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสภาวะเป็นหมัน โดยทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ glycolysis [29] และมีรายงานการศึกษาของ Wen และคณะ [30] ได้ศึกษาวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ในอับเรณูของข้าว Honglian เป็นข้าวสายพันธุ์ cytoplasmic male sterility (CMS) พบโปรตีน enolase มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในข้าว Honglian ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่ข้าว TGMS ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีการแสดงออกของยีน enolase เพิ่มขึ้นในสภาวะที่เป็นหมันเช่นกัน โดย enolase เป็นเอนไซม์ในกระบวนการ glycolysis ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลง 2-phosphoglycerate เป็น phosphoenol pyruvate (PEP) และเมื่อเอนไซม์ชนิดนี้ได้รับภาวะที่ไม่เหมาะสม จะทำให้เกิดความเสียหายที่ซับซ้อนในการสร้างพลังงานที่ไมโทคอนเดรีย ทำให้เซลล์ไม่มีประสิทธิภาพ โดยรายงานของ Wen พบว่า ความผิดปกติของ PDH complex อาจจะสกัดกั้นกระบวนการ aerobic glycolysis ในละอองเรณู ทั้งนี้เพื่อรักษาพลังงานระดับสูงในอับละอองเรณูอาจจะใช้ ethanolic fermentation เพิ่มมากขึ้นเพื่อสำหรับการผลิต ATP ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulation) ของเอนไซม์ enolase

aldehyde dehydrogenase (ALDH) พบกระจายทั่วไปในจีโนมของพืช โดยทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมสรีระของพืชต่อการตอบสนองต่อสภาวะเครียด [31] โดยในปี 1996 ได้พบยีน ALDH (*Rf2*) เป็นครั้งแรกในข้าวโพดโดยยีนนี้กำหนดการสังเคราะห์ mitochondrial class-2 ALDH [32] ซึ่งนี้ช่วยส่งเสริมกระบวนการพัฒนาของเกสรตัวผู้ และอาจจะมีส่วนร่วมในการการพัฒนาของอับเรณู [33, 34] จากรายงานการแสดงออกของ aldehyde dehydrogenase ที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่าน่าจะมีความสำคัญในการพัฒนาการเจริญเติบโตของดอกในข้าว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่ aldehyde dehydrogenase มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในช่อดอกอ่อนของข้าว TGMS ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสภาวะเป็นหมัน

histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-4 specific ATX1 จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในช่อดอกอ่อนของข้าว TGMS ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสภาวะเป็นหมัน โดยมีการกำหนดการสังเคราะห์โปรตีน Trithorax 1 (ATX-1) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ signal transduction โปรตีน Trithorax 1 ที่พบในแมลงหวี่ (*Drosophila*) ทำหน้าที่ควบคุมการพัฒนาของแมลงหวี่ โดยควบคุมการแสดงออกยีนในกลุ่ม homeotic สำหรับใน *Arabidopsis* โปรตีน Trithorax 1 (ATX-1) เป็นโปรตีนที่ควบคุมการพัฒนาอวัยวะของดอกทั้งหมด จะแสดงออกตั้งแต่การเริ่มสร้างช่อดอก โดยหน้าที่ของ ATX-1 เป็นตัว activator ของกลุ่มยีน homeotic ให้มีการตอบสนองซึ่งเหมือนกับ Trithorax 1 ในสัตว์ [35] จากข้อมูลรายงานการศึกษาและการแสดงออกพบว่าน่าจะมีความสำคัญเกี่ยวกับการควบคุมการพัฒนาของละอองเรณูในดอกตั้งแต่การเริ่มสร้างดอกจนพัฒนาเป็นดอกสมบูรณ์โดยพบการแสดงออกของยีนนี้ในละอองเรณูทั้งในข้าวและ *Arabidopsis*

สำหรับ ABC transporter family protein เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีขนาดใหญ่พบในยีสต์ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และพืช ABC transporter ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งแลกเปลี่ยนสารทางชีวโมเลกุลระหว่างเมมเบรนทั้งด้านในและด้านนอก เช่น น้ำตาล ไขมัน โพลีแซ็คคาไรด์ สเตอร์รอย และ glutathione conjugates [36] และได้มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับยีน *NtWBC1* ในยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) เป็นยีนในกลุ่มของ ABC transporter มีการแสดงออกเฉพาะในอวัยวะสืบพันธุ์ แสดงให้เห็นว่ายีนนี้มีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการสืบพันธุ์ของพืช [37] รวมทั้งรายงานการศึกษายีน ATP-Binding Cassette Transport G26 หรือ ABCG26 จัดอยู่ในกลุ่มของ ABC transporter ซึ่งพบอยู่ใน *Arabidropsis* ที่จำเป็นสำหรับการสร้าง pollen exine และพัฒนาละอองเรณู รวมทั้ง ABCG26 ยังทำหน้าที่ลำเลียงขนส่ง sporopollenin precursors ไปยังส่วนของเนื้อเยื่อ tapetum ภายใน locule เพื่อเกิดกระบวนการ polymerization ในการพัฒนาการสร้างผนังเซลล์ของ microspore [38] จากรายงานการศึกษาการแสดงออกของ ABC transporter ที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการพัฒนาของช่อดอกซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่า ABC transporter มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในช่อดอกของข้าว TGMS ที่เป็นหมัน

โดยเมื่อศึกษาหน้าที่ของโปรตีนในระดับยีนสามารถแบ่งตามหน้าที่ทางกระบวนการทางชีววิทยา (biological processes) ได้แก่ กระบวนการ carbohydrate metabolism กระบวนการ protein folding กระบวนการ defense/stress responses กระบวนการ signal transduction กระบวนการ transcription และกระบวนการ transport จากการ ศึกษาครั้งนี้พบว่ามี

กลุ่มโปรตีนที่มีการแสดงออกในทำนองเดียวกันในข้าว TGMS ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสภาวะเป็นหมันเปรียบเทียบกับสภาวะไม่เป็นหมัน ชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกควบคุมการเป็นหมัน โดยในสภาวะเป็นหมัน โปรตีนในกลุ่มที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหรือลดลง อาจทำหน้าที่เป็น negative regulators หรือ positive regulators ตามลำดับ ในกระบวนการสร้างละอองเรณู ซึ่งได้มีรายงานสนับสนุนว่าโปรตีนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ การพัฒนาของอับเรณู การสร้างละอองเรณู และการสร้างช่อดอก แต่ก็อาจจะเป็นได้ว่าโปรตีนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อโดยอาจยืนยันการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในที่ร้อนและที่เย็น โดยเปรียบเทียบในข้าว TGMS กับข้าวปกติ

4. สรุป

งานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาโปรตีนในช่อดอกอ่อนข้าวที่เกี่ยวข้องกับการเป็นหมันของข้าว TGMS ในสภาวะเป็นหมันและไม่เป็นหมันด้วยเทคนิค GeLC-MS/MS การทดลองใช้ข้าว TGMS จำนวน 3 สายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์จะมีพื้นฐานทางพันธุกรรมและถูกควบคุมด้วยยีน *tgms* ที่ต่างกัน พบโปรตีนทั้งหมด 803 โปรตีน และมีโปรตีนที่มีการเสดงออกไปในทิศทางเดียวกันในข้าว TGMS ทั้ง 3 สายพันธุ์ จำนวน 29 โปรตีน ซึ่งแบ่งเป็นการแสดงออกแบบ down-regulate จำนวน 11 โปรตีน และการแสดงออกแบบ up-regulate จำนวน 18 โปรตีน สามารถแบ่งตามหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพ (biological processes) หลาย ๆ กระบวนการ เช่น defense/stress responses, lipid metabolism, transcription, carbohydrate metabolism, degradation และ signal transduction จากการศึกษาครั้งนี้ข้อมูลที่ได้อาจจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านปรับปรุงพันธุ์และนำไปผลิตข้าวลูกผสมแบบสองทางและปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิได้ต่อไปในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ โครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ (ศช.) ที่ได้กรุณาสนับสนุนทุนการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Katja, K. and, Gils, M., 2011, Pollination control technologies for hybrid breeding, Mol. Breed. 27: 417-437.

[2] Virmani, S.S., Sun, Z.X., Mou, T., Jauhar, Ali, M.A. and Mao, C.X., 2003, Two-Line Hybrid Rice Breeding Manual, Los Baños (Philippines), International Rice Research Institute, p. 88.

[3] Kurata, N., Miyoshi, K.I., Nonomura, K.I., Yamazaki, Y. and Ito, Y., 2005, Rice mutants and genes related to organ development morphogenesis and physiological traits, Plant Cell Physiol. 46: 48-62.

[4] Komatsu, S., Konishi, H, Shen, S. and Yang, G., 2003, Rice proteomics: A step toward functional analysis of the rice genome, Mol. Cell Proteomics 2: 2-10.

[5] Wang, B., Xu, W.W., Wang, J.Z., Wu, W., Zheng, H.G., Yang, Z.Y., Ray, J.D. and Nguyen, H.T., 1995, Tagging and mapping the thermosensitive genic male-sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.) with molecular markers, Theor. Appl. Genet. 91:1111-1114.

[6] Yamaguchi, Y., Ikeda, R., Hirasawa, H., Minami, M. and Ujihara, A., 1997, Linkage analysis of the thermosensitive genic male sterility gene *tms2* in rice (*Oryza sativa* L.), Breed. Sci. 47:371-377.

[7] Subudhi, P.K., Borkakati, R.K., Virmani, S.S. and Huang, N., 1997, Molecular mapping of a thermosensitive genetic male sterility gene in rice using bulked segregant analysis, Genome 40:188-194.

[8] Dong, N.V., Subudhi, P.K., Luong, P.N., Quang, V.D., Quy, T.D., Zheng, H,G., Wang, B. and Nguyen, H.T., 2000, Molecular mapping of a rice gene conditioning thermosensitive genic male sterility using AFLP, RFLP and SSR technigues, Theor. Appl. Genet. 100: 727-734.

[9] Wang, Y.G., Xing, Q.H., Deng, Q.Y., Liang, F.S., Yuan, L.P., Weng, M.L. and Wang, B., 2003, Fine mapping of the rice thermo-sensitive genic male sterile gene *tms5*, Theor. Appl. Genet. 107: 917-921.

[10] Wang, C.H., Zhang, P., Ma, Z.R., Zhang, M.Y., Sun, G.C. and Ling, D.H., 2004, Development of a genetic marker linked to a new thermo-sensitive male sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.), Euphytica 140: 217-222.

[11] Borkakati, R.P. and Virmani, S.S., 1996, Genetics of thermosensitive genic male sterility in rice, Euphytica 88: 1-7.

[12] สมปอง ธรรมศิริรักษ์, 2545, Proteomics ศาสตร์ของการจากยีนแปลความหมายสู่โปรตีน, ว. วิทยาศาสตร์ มข. 30: 160-168.

[13] Lee, G.D., Ahsa, N., Lee, S.H., Kang, K.Y., Dong, J.B., Lee, I.J. and Lee, B.H., 2007, A proteomic approach in analyzing heat responsive proteins in rice leaves, Proteomics 7: 3369-3383.

[14] Balbuena, S.T., Joaquín, J.S., Enrique, M.F., Rafael, G. and Jay, J.T., 2011, Proteome analysis of cold acclimation in sunflower, Proteome Res. 10: 2330-2346.

[15] Imin, N., Kerim, T., Weinma, J.J. and Rolfe, B.G., 2008, Low temperature treatment at the young microspore stage induces protein changes in rice anthers, Mol. Cell. Proteomics 7: 274-292.

[16] Lowry, O.H, Rosbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193: 265.

[17] Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227: 680-685.

[18] Blum, H, Beier, H. and Gross, H.J., 1987, Improved silver staining of plant protein, RNA

and DNA in polyacrylamide gels, Electrophoresis 8: 93-99.

[19] Jaresitthikunchai, J., Phaonakrop, N., Kittisenachai, S. and Roytrakul, S., 2009, Rapid in-gel digestion protocol for protein identification by peptide mass fingerprint, Proceeding of The 2nd Biochemistry and Molecular Biology Conference: Biochemistry and Molecular Biology for Regional Sustainable Development, Khon Kaen, p.29.

[20] Kocher, T, Superti-Furga, G., 2007, Mass spectrometry based functional proteomics: From molecular machines to protein networks, Nat. Methods 4: 807-815.

[21] Jonsson, A.P., Pettersen, H., 2005, Automated identification and quantitation of protein and peptides in mammalian samples using LC-MS/MS, Discovery Matters, Issue 1.

[22] Haleem, J.I. and Timothy, D.V., 2008, Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): Advances and perspectives, BioTechniques 44: 697-700.

[23] Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C. and Lepiniec, L., 2010, MYB transcription factors in *Arabidopsis*, Trends Plant Sci. 15: 1360-1385.

[24] Steiner-Lange, S., Unte, S.U., Eckstein, L., Yang, C., Wilson, A.Z., Schmelzer, E., Dekke, K. and Saedle, H., 2003, Disruption of *Arabidopsis thaliana* MYB26 results in male sterility due to non-dehiscent anthers, Plant J. 34: 519-528.

[25] van Nocker, V.S. and Ludwig, P., 2003, The WD-repeat protein superfamily in *Arabidopsis*: Conservation and divergence in structure and function, BMC Genomics 4: 50.

[26] Li, J.H., Liu, Y.N., Shi, Q.D., Liu, J. and Yang, C.W., 2010, YAO is a nucleolar WD40-repeat protein critical for embryogenesis and gametogenesis in *Arabidopsis*, BMC Plant Biol. 10: 169.

[27] Sato, U., Antonio, B., Namiki, N., Motoyama, R., Sugimoto, K., Takehisa, H., Minami, H., Kamatsuki, K., Kusaba, M., Hirochika, H. and Nagamura, Y., 2010, Field transcriptome revealed critical developmental and physiological transitions involved in the expression of growth potential in *japonica* rice, BMC Plant Biol. 11: 10.

[28] Farrona, S., Hurtado, L., Bowman, L.J. and Reyes, C.J., 2004, The *Arabidopsis thaliana* SNF2 homolog AtBRM controls shoot development and flowering, Development 131: 4965-4975.

[29] Straeten, V.D.D., Rodrigues-Pousada, A.R., Goodman, M.H. and Montagua, V.M., 1991, Plant enolase: Gene structure, expression, and evolution, Plant Cell 3: 719-735.

[30] Wen, L., Liu, G., Li, S.Q., Wan, C.X., Tao, J., Xu, K.Y., Zhang, Z.J. and Zhu, Y.G., 2007, Proteomic analysis of anthers from Honglian cytoplasmic male sterility line rice and its corresponding maintainer and hybrid, Bot. Stud. 48: 293-309.

[31] Stiti, N., Missihoun, D.T., Kotchoni, S., HubertKirch, H. and Bartels, D., 2011, Aldehydedehy drogenases in *Arabidopsis thaliana*: Biochemical requirements, metabolic pathways, and functional analysis, Frontiers in Plant Science.

[32] Cui, X., Wise, R.P. and Schnable, P.S., 1996, The *rf2* nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize, Science 272: 1334-1336.

[33] Liu, F., Cui, X., Horner, T.H., Weiner, H. and Schnable, S.P., 2001, Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize, Plant Cell 13: 1063-1078.

[34] Liu, F. and Schnable, P.S., 2002, Functional specialization of maize mitochondrial aldehyde dehydrogenases, Plant Physiol. 130: 1657-1674.

[35] Alvarez, R.V., Pien, S., Sadder, M., Witmer, X., Grossniklaus, U. and Avramova, Z., 2003, ATX-1, an *Arabidopsis* homolog of trithorax, activates flower homeotic genes, Curr. Biol. 13: 627-637.

[36] Theodoulou, F.L., 2000, Plant ABC transporters. Biochimica et Biophysica Acta 1465: 79-103.

[37] Otsu, T.C., Silva, D.I., Molfetta, B.D.J., Silva, R.D.L., Almeida-Engler, D.J., Engler, G., Torraca, C.P., Goldman, H.G. and Goldman S.M.H., 2004, NtWBC1, an ABC transporter gene specifically expressed in tobacco reproductive organs, J. Exp. Bot. 55: 1643-1654.

[38] Quilichini, D.T., Friedmann, C.M., Samuels, L.A. and Douglas, J.C., 2010, ATP-binding cassette transporter G26 is required for male fertility and pollen exine formation in *Arabidopsis*, Plant Physiol. 154: 678-690.