

เครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีนในบริเวณที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับความทนเค็มบนโครโมโซมที่ 1 ในข้าว (*Oryza sativa* L.)

Gene co-expression network of predicted salt tolerance region on chromosome 1 in rice (*Oryza sativa* L.)

นพวิชัยพงศ์ เครือสาร¹ กิตติพร พลายมาศ² บุญธิดา โฆษิตทรัพย์¹ อัญชลี ใจดี¹ วีรพงษ์ บัวบูชา³ มีชัย เชียงหลิว⁴ วีรยุทธ ตูจินดา⁴ และศุภจิตรา ชัชวาลย์^{1*}

Nopphawitchayaphong Khruuasan¹, Kitiporn Plaimas², Boonthida Kositsup¹, Anchalee Chaidee¹, Teerapong Buaboocha³, Meechai Siangliw⁴, Theerayut Toojinda⁴ and Supachitra Chadchawan^{1*}

¹หน่วยปฏิบัติการวิจัยสิ่งแวดล้อมและสรีรวิทยาของพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์, ²ภาควิชาคณิตศาสตร์และวิทยาการคอมพิวเตอร์, ³ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

⁴หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

¹Environment and Plant Physiology Research Unit, Dept. of Botany, ²Dept. of Mathematics and Computer Science, ³Dept. of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

⁴Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University, Kamphangsaeen Campus, Nakhon Pathom 73140

*Corresponding author: s_chadchawan@hotmail.com; Supachitra.C@chula.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาลักษณะการทนเค็มโดยใช้คะแนนประเมินมาตรฐานการทนเค็ม ในกลุ่มประชากรข้าวที่เกิดจากการแทนที่บางส่วนของโครโมโซมด้วยยีนจากโครโมโซมที่ 1 ขนาดต่างๆ กันที่อยู่ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล RM212 และ RM5310 การสร้างเครือข่ายการแสดงออกของยีนในบริเวณดังกล่าว จากฐานข้อมูลไมโครอาร์เรย์พบ 9 ยีนหลัก ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดจากความเค็ม

ABSTRACT

The study of salt tolerant phenotype using modified standard evaluation system

(SES) was performed in KDML105 chromosome substitution line population generated by the substitution with segments of different sizes in chromosomes 1 between RM212 and RM5310 markers. Co-expression network construction from microarray database revealed at least 9 node genes involving in salt stress response.

คำสำคัญ: ข้าว, ภาวะเค็ม, ข้าวดอกมะลิ 105, เครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน, เอสอีเอส

Keywords: rice, salt stress, KDML105, gene co-expression network, SES

บทนำ

ภาวะเค็มเป็นปัญหาที่ก่อให้เกิดการลดลงของผลผลิตพืชทั่วโลก (Zeng *et al.*, 2003) โดยเฉพาะการเพาะปลูกข้าวในพื้นที่ดินเค็มทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (Land Development Department, 2013) ซึ่งนิยมปลูกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แต่สายพันธุ์นี้ไม่สามารถทนต่อภาวะเค็มระดับปานกลางถึงสูงได้ Siangliw *et al.* (2007) จึงมีโครงการการพัฒนาประชากรข้าวเพื่อใช้ในการศึกษาความทนแล้ง โดยการย้ายชิ้นส่วนพันธุกรรมของพันธุ์ทนแล้งบนโครโมโซมที่ 1 สู่อานพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และเรียกประชากรนี้ว่า chromosomal segment substitution lines (CSSL) (Toojinda *et al.*, 2011) ซึ่งชิ้นส่วนของโครโมโซมที่ 1 นี้มีลักษณะทนเค็มรวมอยู่ด้วย การประเมินความสามารถทนเค็ม (modified standard evaluating score; SES) (IRRI, 1997) ในประชากร CSSL ดังกล่าวซึ่งมีชิ้นพันธุกรรมของพันธุ์ทนเค็มที่แตกต่างกันบริเวณโครโมโซมที่ 1 จะทำให้สามารถระบุชิ้นพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับความทนเค็ม

การตอบสนองต่อความเค็มของพืชเกี่ยวข้องกับการทำงานของยีนเป็นจำนวนมาก (Rabbani *et al.*, 2003) วิธีการหนึ่งที่จะระบุความสัมพันธ์ของกลุ่มยีน คือการสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (gene co-expression network; GCN) (Ficklin and Feltus, 2011)

การศึกษาในครั้งนี้จะเป็นการระบุบริเวณยีนบนโครโมโซมที่ 1 ที่มีความสัมพันธ์ต่อค่า SES และสร้าง GCN โดยอาศัยข้อมูลจากฐานข้อมูลการศึกษาไมโครอะเรย์ (microarray) ของข้าวใน

ภาวะเครียดทางกายภาพ จากกลุ่มยีนที่อยู่ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล ที่แสดงความเกี่ยวข้องกับลักษณะการทนเค็มบนโครโมโซมที่ 1 เพื่อเป็นแนวทางในการค้นหายีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการทนเค็มที่อยู่ในบริเวณนี้

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาความสามารถในการทนเค็มของประชากรข้าว CSSL

เพาะข้าวสายพันธุ์ประชากร CSSL จำนวน 29 สายพันธุ์ (CSSL) ร่วมกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) และพันธุ์เปรียบเทียบที่มีลักษณะทนเค็ม (DH212 (IR68586-F2-CA-143) และ Pokkali) และไม่ทนเค็ม (IR29) ให้ภาวะเค็มตามวิธีของ Kanjoo *et al.* (2011) เก็บค่าคะแนนการประเมินมาตรฐานความทนเค็ม SES (คะแนน 1 หมายถึงทนเค็ม และคะแนน 9 หมายถึงอ่อนแอ) ตามวิธีของ Gregorio *et al.* (1997) ที่ภาวะเค็ม ณ ช่วงเวลา 0, 5, 7, 9, 11, 13, 15 และ 23 วัน ออกแบบการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวนซ้ำ 4 ซ้ำ วิเคราะห์สถิติด้วย Duncan Multiple Range Test (DMRT)

การสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (GCN)

สืบค้นข้อมูลยีนในจีโนมข้าวที่อยู่ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล RM212 และ RM5310 บนโครโมโซมที่ 1 ในฐานข้อมูล Rice Genome Annotation Project (Ouyang *et al.*, 2007) สร้าง GCN ด้วยขั้นตอนวิธีใน www.ricearray.org โดยใช้ข้อมูลไมโครอะเรย์ (Cao *et al.*, 2012)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาความสามารถในการทนเค็มของประชากรข้าว CSSL

ข้าวพันธุ์ Pokkali ซึ่งเป็นพันธุ์มาตรฐานทนเค็มมีค่า SES ต่ำที่สุด ข้าวสายพันธุ์ CSSL11 มีค่า SES ต่ำที่สุดและแตกต่างจากประชากรข้าวสายพันธุ์ CSSL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สอดคล้องกับการศึกษาของ Kanjoo *et al.* (2011) ข้าวสายพันธุ์ CSSL11 มีชิ้นส่วนยีนทนเค็มระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล RM1003 ถึง RM3362 (Figure 1) ซึ่งเป็นบริเวณเกือบทั้งหมดของ QTL ทนเค็มบนโครโมโซมที่ 1 (Toojinda *et al.*, 2011) ข้อมูลนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Thomson *et al.* (2010) ที่พบว่าโครโมโซมที่ 1 ใน

บริเวณดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับอัตราการรอดชีวิต และปริมาณคลอโรฟิลล์ของใบ จึงคาดว่าลักษณะทนเค็มเกิดจากการทำงานของยีนหลายยีนที่มีตำแหน่งยีนอยู่ระหว่าง RM1003 ถึง RM3362

การสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (GCN)

จากการศึกษาในฐานข้อมูล Rice Genome Annotation Project พบว่าระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล RM3285 และ RM3362 มีช่วงระยะห่างประมาณ 10 Mbp ประกอบด้วยยีนจำนวน 1,310 ยีน เมื่อนำไปวิเคราะห์เครือข่ายการแสดงออกร่วมของยีนในฐานข้อมูล Rice array nucleotide (Figure 2) พบโหนดยีนหลักจำนวน 9

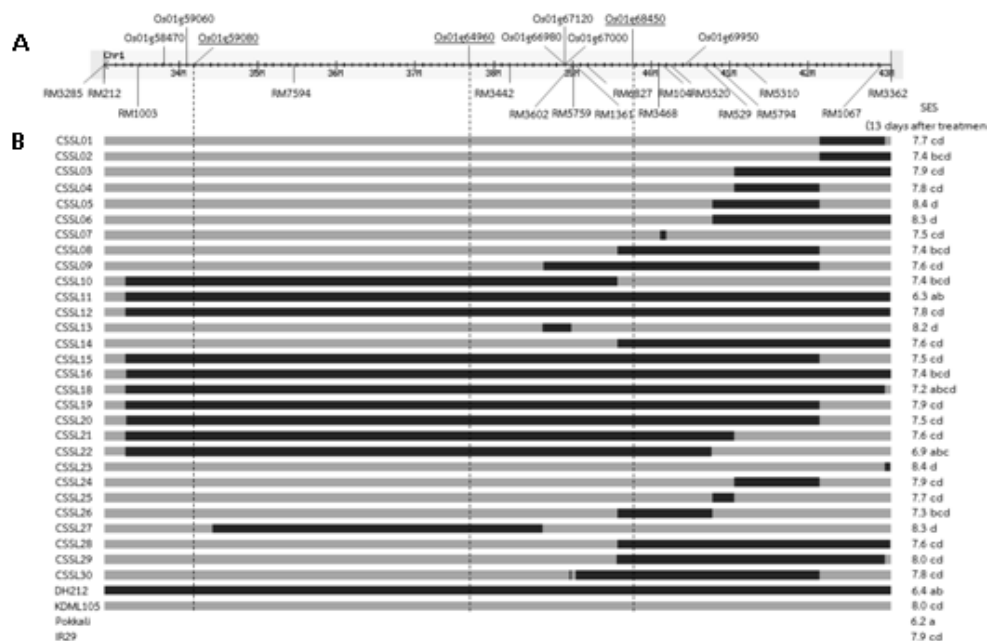


Figure 1 Physical maps of node genes (above the line) predicted from GCN based on genes between RM3285 and RM3362 markers. A list of markers in the region was shown below the lines (A). The corresponding regions of salt tolerant genes in CSSL were indicated with black boxes with SES on the right (B). Different letters next to SES value are significantly different between CSS lines at 5% level according to Duncan's multiple 5 range tests).

ยีน คือ LOC_Os01g58470, LOC_Os01g59060, LOC_Os01g59080, LOC_Os01g64960, LOC_Os01g66980, LOC_Os01g67000, LOC_Os01g67120, LOC_Os01g68450, และ LOC_Os01g69950 โดยมีโหนดยีน 2 ยีน ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง คือ LOC_Os01g64960 ซึ่งควบคุมการสร้าง chlorophyll A-B binding protein และยีน LOC_Os01g59080 ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ จากข้อมูลดังกล่าวจึงมีความเป็นไปได้ว่ายีนในบริเวณ RM1003 ถึง RM3362 นี้เกี่ยวข้องกับการรักษาประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ด้วยแสงเมื่อข้าว

ได้รับภาวะเค็ม ดังที่ได้มีการศึกษาว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็มมีกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าข้าวสายพันธุ์ไม่ทนเค็ม (Moradi *et al.*, 2007)

สรุปผลการทดลอง

ข้าวสายพันธุ์ CSSL11 ทนต่อภาวะเค็มได้ดีที่สุดซึ่งมีชิ้นส่วนระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล RM1003 ถึง RM3362 ขนาด 10 Mbp การวิเคราะห์ GCN ของยีนระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลเป้าหมายพบยีนหลักจำนวน 9 ยีน ซึ่งมี 2 ยีนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

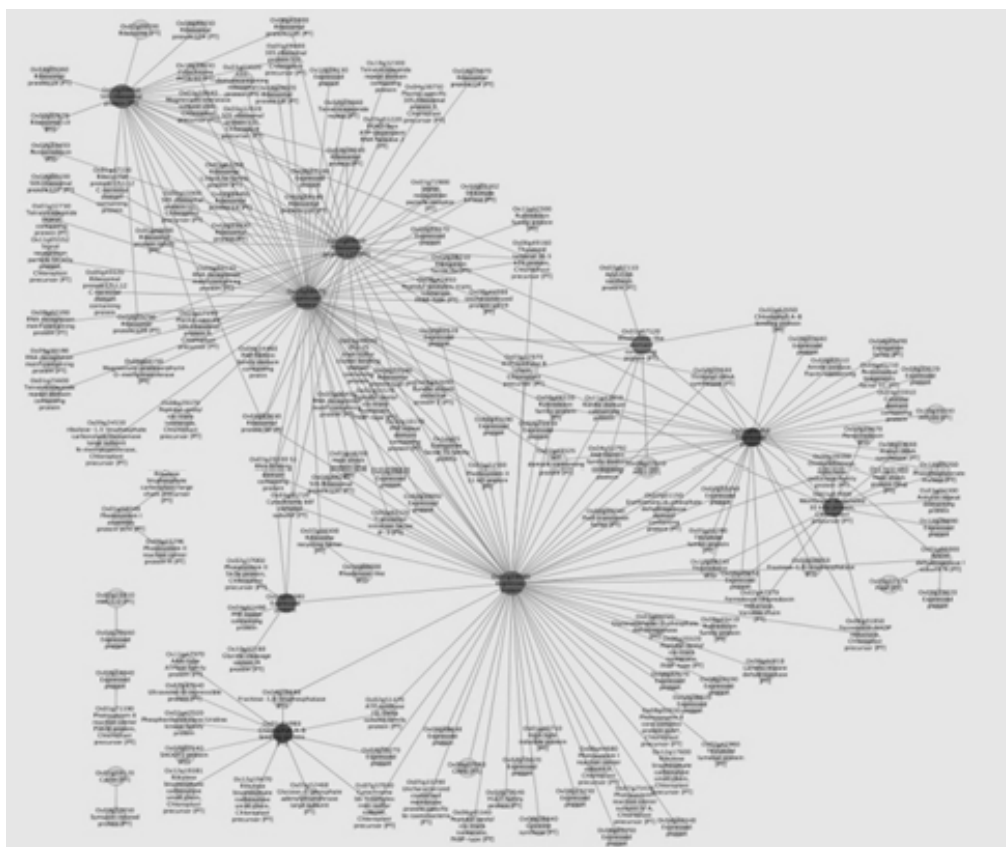


Figure 2 Gene co-expression network of genes between RM3285 and RM3362 analyzed with abiotic stress type and correlation coefficient cut off at 0.95

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางสาวพนิดา ชูติมานุกูล นางสาวฝนทิพย์ หนูทอง นายอาสาพะ พัฒนธรา และ ดร. วราลักษณ์ เกษตรนันท์ งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก สวทช. (รหัสโครงการ P-12-01235)

เอกสารอ้างอิง

- Cao P, Jung KH, Choi D, Hwang D, Zhu J and Ronald PC (2012) The Rice Oligonucleotide Array Database: an atlas of rice gene expression. *Rice* 5: 17.
- Ficklin SP and Feltus FA (2011) Coexpression network alignment and conservation of gene modules between two grass species: maize and rice. *Plant Physiol* 156: 1244–1256.
- Gregorio GB, Senadhirra D and Mendoza RD (1997) Screening rice for salinity tolerance. Manila: International Rice Research Institute.
- IRRI (1997) Screening rice for salinity tolerance. Manila: International Rice Research Institute.
- Kanjoo V, Jearakongman S, Punyawaew K, Siangliw JL, Siangliw M, Vanavichit A and Toojinda T (2011) Co-location of quantitative trait loci for drought and salinity tolerance in rice. *Thai J Genet* 4: 126–138.
- Land Development Department, Ministry of Agricultural and Cooperatives. Land resource in Thailand. Bangkok: IOP Publishing Land Development Department web. http://www.idd.go.th/EFiles_html/land%resource/ed300.htm (28 May 2013).
- Moradi F and Ismail AM (2007) Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. *Ann Bot* 99: 1161–1173.
- Ouyang S, Zhu W, Hamilton J, Lin H, Campbell M, Childs K, Thibaud-Nissen F, Malek R. L, Lee Y, Zheng L, Orvis J, Haas B, Wortman J and Buell CR (2007) The TIGR Rice Genome Annotation Resource: improvements and new features. *Nucleic Acids Res* 35: 883–887.
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki (2003) Monitoring expression profiles of rice (*Oryza sativa* L.) genes under cold, drought and high-salinity stresses, and ABA application using both cDNA microarray and RNA gel blot analyses. *Plant Physiol* 133: 1755–1767.
- Thomson MJ, de Ocampo M, Egdane J, Rahman MA, Sajise AG, Adorada DL, Tumimbang-Raiz E, Blumwald E, Seraj ZI, Singh RK, Gregorio GB and Ismail AM (2010) Characterizing the *Saltol* quantitative trait locus for salinity tolerance in rice. *Rice* 143: 148–160.
- Toojinda T, Siangliw JL, Punyawaew K and Kanjoo V (2011) Development of single QTL near isogenic lines (NILs) of KDML105 for drought tolerance. Pathum Thani: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

Zeng L, Lesch SM and Grieve CM (2003) Rice growth and yield respond to changes in

water depth and salinity stress. *Agri Water Manag* 59: 67–75.