

ลักษณะเชิงโมเลกุลของยีนกำหนดรหัสโปรตีน APETALA2
ที่ตอบสนองต่อช่วงแสงในข้าว (*Oryza sativa* L.)
ที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสง

Molecular Characterization of Photoperiod Responsive
Gene Encoding APETALA2 Protein in Photoperiod Sensitive
and Insensitive Rice (*Oryza sativa* L.)

เจนจิรา มาหา

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

จรีรัตน์ มงคลศิริวัฒนา*

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาเขตกำแพงแสน ถนนมาลัยแมน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

อมรทิพย์ เมืองพรหม

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอลำลูกเกด จังหวัดปทุมธานี 12120

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

Jenjira Marha

Interdepartmental multidisciplinary graduated program in bioscience, Faculty of Science,

Kasetsart University, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

Chareerat Mongkolsiriwatana*

Division of Genetics, Department of Science, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University,

Kamphaengsaen Campus, Malaiman Road, Kamphaeng Saen, Nakorn Pathom 73140

Amornthip Muangprom

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology

Development Agency, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Surin Peyachoknagul

บทคัดย่อ

การออกดอกเป็นลักษณะหนึ่งที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจ โดยยีน *APETALA2* (*AP2*) จัดเป็นยีนหลักที่มีบทบาทในการควบคุมการออกดอกที่ตอบสนองต่อช่วงแสงในข้าว การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและตรวจสอบลักษณะของยีนกำหนดรหัสโปรตีน *AP2* แล้วเปรียบเทียบระหว่างข้าวที่ไวแสงและไม่ไวต่อช่วงแสง จากการโคลนบริเวณที่กำหนดรหัสโปรตีนจากจีโนมของข้าวที่ไวต่อช่วงแสง (ข้าวดอกมะลิ 105 และเหลืองใหญ่ 148) และที่ไม่ไวต่อช่วงแสง (กข 7 และสุพรรณบุรี 1) ด้วยเทคนิค PCR แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ายีน *AP2* จากข้าวทั้ง 4 พันธุ์ มีความเหมือนกับยีน *AP2* ของพืชชนิดอื่นในฐานข้อมูล โดยเป็นบริเวณที่กำหนดรหัส 825 คู่เบส เป็นโปรตีนที่มีขนาด 274 กรดอะมิโน และพบโดเมน *AP2* อยู่ในสายพอลิเพปไทด์ เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนภายในโดเมนระหว่างข้าวทั้ง 4 พันธุ์ พบความผันแปรของลำดับกรดอะมิโนภายในโดเมน โดยความผันแปรที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 173 มีความจำเพาะต่อข้าวที่ไวต่อช่วงแสง คือ อะลานีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ไม่มีซัลฟ์และไม่วางในการเกิดปฏิกิริยา แต่ในข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสงนั้นเป็นทรียโอนีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีซัลฟ์และมีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนอื่น จึงวิเคราะห์ความผันแปรของกรดอะมิโนต่อโครงสร้างและการทำงานของโปรตีน โดยนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *AP2* จากข้าวที่ไวต่อช่วงแสง (ข้าวดอกมะลิ 105) และไม่ไวต่อช่วงแสง (กข 7) มาทำนายโครงสร้างโปรตีนสามมิติ พบว่าบริเวณที่ผันแปรนั้น (173) อยู่ในเกลียวแอลฟาที่ทำหน้าที่เป็น active site ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความผันแปรที่เกิดขึ้นทำให้โปรตีน *AP2* มีความไวในการทำปฏิกิริยากับโปรตีนอื่นที่ต่างกัน โดยข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสงมีความไวในการทำปฏิกิริยาที่สูงกว่า นอกจากนี้ยังได้นำลำดับกรดอะมิโนของสายพอลิเพปไทด์ *AP2* ของข้าวทั้ง 4 พันธุ์ มาสร้าง phylogenetic tree พบว่าข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง คือ กข 7 และสุพรรณบุรี 1 ถูกจัดไว้ในกลุ่มเดียวกัน โดยแยกออกจากกลุ่มข้าวไวต่อช่วงแสง คือ ข้าวดอกมะลิ 105 และเหลืองใหญ่ 148 อย่างชัดเจน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าโปรตีน *AP2* น่าจะมีวิวัฒนาการที่แยกออกจากกันระหว่างข้าวที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสง เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AP2* ในการตอบสนองต่อช่วงแสง โดยเปรียบเทียบระหว่างข้าวดอกมะลิ 105 และ กข 7 ในสภาวะช่วงแสงสั้น (SD) และช่วงแสงยาว (LD) ด้วยวิธี quantitative real-time PCR พบว่าการแสดงออกของยีน *AP2* นั้นมีการตอบสนองต่อช่วงแสงทั้งในข้าวที่ไวต่อช่วงแสง คือ ข้าวดอกมะลิ 105 และไม่ไวต่อช่วงแสง คือ กข 7 โดยมีแสดงออกสูงในสภาวะช่วงแสงยาว และมีการแสดงออกต่ำในสภาวะช่วงแสงสั้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน *AP2* ในระดับถอดรหัสเพื่อตอบสนองต่อช่วงแสงของข้าวทั้ง 2 ชนิด นั้นเหมือนกัน แต่โปรตีนที่ได้จากการแปลรหัสมีความไวในการทำงานต่างกัน ซึ่งเป็นรายงานฉบับแรกที่ศึกษาและเปรียบเทียบโปรตีน *AP2* ระหว่างข้าวที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสง โดยผลการวิจัยที่ได้ในครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการอธิบายการควบคุมการออกดอกในข้าวทั้งที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสงต่อไป

คำสำคัญ : ข้าว; ไวต่อช่วงแสง; ยีนตอบสนองต่อช่วงแสง; โปรตีน *APETALA2*

Abstract

Flowering transition is one of the important trait of crop plant. *APETELA2* (*AP2*) is a key gene, which plays a crucial role in the regulation of flowering transition in response to photoperiod in rice. This research aimed to isolate and to characterize gene encoding *AP2* protein by comparing between photoperiod sensitive and insensitive rice. The complete coding region was cloned from genomic DNA of both photoperiod sensitive (KDML105 and Leuang Yai 148) and insensitive (RD 7 and Supanburi 1) rice cultivars using PCR technique. Those of four nucleotide sequences were analyzed. The nucleotide sequences showed highly homologous to genes encoding *AP2* protein of other plants. This gene was consisted of 825 bp open reading frame (ORF) encoded 274 amino acids. The *AP2* domain were detected and compared among four cultivars. Variation of amino acid sequence was found in *AP2* domain, which showed the specific site to photoperiod sensitive and insensitive rice at position 173, nonpolar amino acid, alanine conversion to polar amino acid, threonine, respectively. Three dimension structure of protein was constructed to detect the effect of amino acid substitution on the structure and function. Alanine threonine substitution was found in α helix active site, indicating that *AP2* of photoperiod insensitive rice is more reactive than *AP2* of photoperiod sensitive rice. Moreover, those of four amino acid sequence were used to construct phylogenetic tree. It showed that photoperiod insensitive rice, RD7 and SP1 were grouped and separated from photoperiod sensitive rice, KDML105 and Leuang Yai 148, indicating the separated evolution of *AP2* protein between photoperiod sensitive and insensitive rice. In addition, the expression of *AP2* gene in response to photoperiod was further analyzed by comparing between KDML105 and RD7 under short day (SD) and long day (LD) using quantitative real-time PCR. The expression of *AP2* of both KDML105 and RD7 responded to photoperiod. It was high in LD and low in SD. This result showed that *AP2* transcription in response to photoperiod was not different between photoperiod sensitive and insensitive rice. However, the active function of its individual protein probably has some difference. This is the first report of *AP2* protein in comparison between photoperiod sensitive and insensitive rice, which can be used to elucidate molecular regulation of flowering transition in photoperiod sensitive and insensitive rice.

Keywords: rice; photoperiod sensitivity; photoperiod responsive gene; *APETALA 2* protein

1. บทนำ

การออกดอก (flowering transition) จัดเป็นลักษณะที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจหลายชนิดที่ต้องการผลผลิตเป็นดอก ผล หรือเมล็ด ซึ่งการกำหนดระยะ

เวลาออกดอกของพืชเศรษฐกิจได้นั้นจะนำไปสู่การผลิตพืชเศรษฐกิจทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ [1] แต่อย่างไรก็ดี การกำหนดการออกดอกในพืชเศรษฐกิจหลายชนิดยังเป็นเรื่องที่ทำนายสำหรับนักวิจัยด้านพืช เนื่องจาก

ลักษณะการออกดอกถูกควบคุมด้วยกลไกที่สลับซับซ้อน ทั้งปัจจัยภายในต้นพืช (endogenous signal) ได้แก่ อายุพืช ฮอร์โมน และปัจจัยสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น ความยาวช่วงแสง (day length) อุณหภูมิ [2] โดยกลไกการควบคุมการออกดอกนั้น ได้ศึกษากันอย่างกว้างขวางในพืชต้นแบบอะราบิโดปซิส ทำให้ทราบว่ากลไกนี้ควบคุมด้วยยีนจำนวนมาก และมีหลายวิธีที่ควบคุมการออกดอก [3] ได้แก่ (1) วิธีตอบสนองต่อความหนาวเย็น (vernalization pathway) เป็นกลไกทาง epigenetics ที่ควบคุมการออกดอกโดยการตอบสนองต่ออุณหภูมิต่ำของพืชเขตหนาว (2) วิธีการตอบสนองต่อช่วงแสง (photo-period pathway) เป็นการตอบสนองต่อช่วงแสงที่ได้รับในแต่ละวัน (3) วิธีอัตโนมัติ (autonomous pathway) ควบคุมด้วยยีนต่าง ๆ ที่ส่งเสริมการออกดอก โดยที่ไม่ตอบสนองต่อช่วงแสงหรือความหนาวเย็นของอะราบิโดปซิส (4) วิธีตอบสนองต่อฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน (gibberellin pathway) เป็นการตอบสนองต่อฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน และ (5) วิธีตอบสนองต่อคุณภาพแสง (light quality pathway) เป็นการตอบสนองต่อคุณภาพแสง เช่น ตอบสนองต่อแสงสีน้ำเงิน [4] ซึ่งยีนที่อยู่ในวิธีการควบคุมทั้ง 5 แบบ นี้มีการทำงานที่มีปฏิสัมพันธ์กัน โดยมากระตุ้นการแสดงออกของยีน *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) [5] ซึ่งกำหนดรหัสสร้างสารฟลอริเจนเพื่อไปกระตุ้นการออกดอก [6] โดยสารนี้สร้างขึ้นที่ใบแล้วถูกส่งไปยังส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด เพื่อทำงานร่วมกับโปรตีน FD ซึ่งเป็น transcription factor ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนลำดับถัดไป คือ *AP1* (*APETALA1*) และ *LFY* (*LEAFY*) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงเซลล์ในเนื้อเยื่อเจริญให้พัฒนาเป็นจุดกำเนิดดอก (floral primordia) [7] แล้วไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่สร้างส่วนประกอบต่าง ๆ ของดอก [8] ดังนั้นยีน *FT* จึงจัดเป็นยีนหลักในการกระตุ้น

การออกดอก (floral promoter) โดยที่ต้องมีกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งการออกดอก (floral repressor) ในการควบคุมและป้องกันไม่ให้พืชออกดอกก่อนเวลาที่เหมาะสม โดยการไปยับยั้งการทำงานของยีน *FT* โดยตรง หรือยับยั้งยีนอื่นในกลุ่มกระตุ้นการออกดอก [9] ซึ่งยีนหลักในกลุ่มนี้ ได้แก่ *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*) และยีน *AP2* (*APETALA 2*) โดยยีน *AP2* นี้เป็นยีนแฟมิลี พบในอะราบิโดปซิสทั้งหมด 6 ยีน ที่สามารถทำหน้าที่ทดแทนกันได้ ได้แก่ ยีนในกลุ่ม *TOE* (*TARGET OF EAT*) คือ *TOE1*, *TOE2* และ *TOE3* ยีน *SMZ* (*SCHLAFMUTZE*) ยีน *SNZ* (*SCHNARCHAPEEN*) และ *AP2* โดยมีกลไกการทำงานควบคุมยีนในวิธีการออกดอก ทั้งแบบยับยั้ง และส่งเสริม (bi-function) คือ ยับยั้งการทำงานของยีนส่งเสริมการออกดอก (flowering activator) ขณะเดียวกันก็ทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของยีนยับยั้งการออกดอก (flowering repressor) [9] โดยการแสดงออกของยีนเหล่านี้ถูกควบคุมด้วยไมโครอาร์เอ็นเอชนิด micro RNA172 (*miR172*) อีกต่อหนึ่งที่ทำให้เกิดความผันแปรของลักษณะการออกดอกในพืช [10,11] เมื่อมีการขยายผลการศึกษาในพืชชนิดอื่นจึงพบว่ายีนในวิธีเหล่านี้เหมือนกันในพืชหลายชนิด แต่การทำงานของบางยีน หรือการทำงานร่วมกันระหว่างยีนภายในวิธีการควบคุมนั้นมีความแตกต่างกันระหว่างพืชแต่ละชนิด โดยเฉพาะยีนบางยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวนั้นมีลักษณะการทำงานที่ต่างไปจากพืชใบเลี้ยงคู่ [12] การพัฒนาเทคโนโลยีกำหนดการออกดอกในพืชเศรษฐกิจควรที่จะเน้นศึกษาถึงกลไกการออกดอกที่จำเพาะต่อชนิดพืช

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีความสำคัญระดับโลก ที่ประชากรโลกมากกว่า 2 ใน 3 บริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก [12] นอกจากนี้ยังเป็นพืชต้นแบบใบเลี้ยงเดี่ยวที่ใช้ในการ

ศึกษาการควบคุมการออกดอก โดยข้าวมีกลไกการออกดอกที่ตอบสนองต่อช่วงแสง [13] จึงทำให้การผลิตข้าวมีข้อจำกัดด้านพื้นที่ และช่วงเวลาที่เหมาะสมปลูก โดยเฉพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) ซึ่งเป็นข้าวที่ได้รับความนิยมสูงในตลาดโลก แต่มีลักษณะที่ไวต่อช่วงแสงสูง จึงปลูกและเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ปีละครั้งเท่านั้น ถึงแม้ว่าจะมีรายงานถึงกลไกการควบคุมการออกดอกที่ตอบสนองต่อช่วงแสงในข้าว [14] แต่ก็ยังไม่เป็นที่แน่ชัด อีกทั้งยังพบข้าวไทยที่ไม่ไวต่อช่วงแสง ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการค้นหาคำตอบถึงยีนที่เกี่ยวข้องในการควบคุมลักษณะไวและไม่ไวต่อช่วงแสงในข้าว ซึ่ง Mongkolsirawatana [15] ได้ใช้ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นพืชต้นแบบในการศึกษา ยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการออกดอกโดยการตอบสนองต่อช่วงแสงในข้าวด้วยเทคโนโลยียีนชิป โดยพบว่ายีนกำหนดรหัสโปรตีน AP2 มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการออกดอกที่ตอบสนองต่อช่วงแสงในข้าวขาวดอกมะลิ 105 งานวิจัยในครั้งนี้จึงได้ขยายผลการศึกษา เพื่อที่จะค้นหาถึงกลไกที่เกี่ยวข้องที่ทำให้ข้าวมีลักษณะที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสง โดยการแยกยีนกำหนดรหัสโปรตีน AP2 จากจีโนมของข้าวที่ไว (ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และ เหลืองใหญ่ 148) และไม่ไวต่อช่วงแสง (กข 7 และ สุพรรณบุรี 1) มาวิเคราะห์ลักษณะเชิงโมเลกุลเปรียบเทียบระหว่างข้าวทั้ง 2 กลุ่ม เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการอธิบายกลไกควบคุมการออกดอกในข้าว รวมทั้งพืชวันสั้นชนิดอื่นต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างพืชและการสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างใบอ่อนของข้าวที่ไวต่อช่วงแสง คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105) และเหลืองใหญ่ 148 (LY148) และไม่ไวต่อช่วงแสง คือ กข 7 (RD7) และสุพรรณบุรี 1 (SP1) มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB

ประยุกต์จาก Agrawal และคณะ [16] แล้วตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260}) และ 280 นาโนเมตร (OD_{280}) แล้วหาค่า OD_{260}/OD_{280} และวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

2.2 การโคลนยีน AP2 ด้วยเทคนิค PCR

ดาวน์โหลดข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัสโปรตีน AP2 ของข้าว IR64 จากฐานข้อมูล GenBank หมายเลข KP212899.1 เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณบริเวณที่กำหนดรหัสโปรตีนด้วยเทคนิค PCR โดยในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ 50 ng/ μ L ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร, 10x buffer 2.0 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ 2.0 ไมโครลิตร, 2 mM dNTP mix 2.0 ไมโครลิตร, 5 μ M primer 4.0 ไมโครลิตร, 5U/ μ L Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA) 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นที่มีความบริสุทธิ์สูงจนได้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา PCR โดยตั้งอุณหภูมิและเวลา 3 ขั้นตอน ดังนี้ ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส 45 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ และขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นตรวจสอบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T Easy vector (Promega, USA) ถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM 109 คัดเลือกโคโลนีสีขาว นำมาสกัดแยกพลาสมิดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Presto™ mini Plasmid kit (Geneaid, Korea) แล้วส่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Macrogen

sequencing service (Korea)

2.3 การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AP2 เปรียบเทียบกับยีน AP2 ของพืชในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างข้าวทั้ง 4 พันธุ์ ด้วยโปรแกรม Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) เปลี่ยนข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AP2 เป็นลำดับกรดอะมิโน ด้วยโปรแกรม EXPASY (<http://web.expasy.org/translate>) แล้วนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AP2 มาเปรียบเทียบกับระหว่างข้าวทั้ง 4 พันธุ์ ด้วยโปรแกรม Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) แล้วนำมาสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี neighbor-joining [17] รวมทั้งวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของโปรตีน AP2 ด้วยโปรแกรม SWISS-MODEL [18]

2.4 การเตรียมตัวอย่างพืชและสกัดอาร์เอ็นเอ

นำตัวอย่างเมล็ดข้าวที่ไวต่อช่วงแสง คือ ข้าวดอกมะลิ 105 และที่ไม่ไวต่อช่วงแสง คือ กข 7 เพาะปลูกในกระถางที่มีดินเหนียวอิมตัวด้วยน้ำ เป็นระยะเวลา 50 วัน จากนั้นแบ่งข้าวออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งอยู่ในสภาวะช่วงแสงยาว (ได้รับแสง 12 ชั่วโมง/มืด 12 ชั่วโมง) และอีกกลุ่มหนึ่งอยู่ในสภาวะช่วงแสงสั้น (ได้รับแสง 10 ชั่วโมง/มืด 14 ชั่วโมง) จากนั้นเริ่มเก็บตัวอย่างใบในสุดบริเวณยอด ในวันที่ 0, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15 นำมาสกัดอาร์เอ็นเอรวมด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Trizol (Invitrogen, USA) ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260}) และ 280 นาโนเมตร (OD_{280}) แล้วหาค่า OD_{260}/OD_{280} และวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำอาร์เอ็นเอรวมของ

แต่ละวันที่ปริมาณเท่ากันรวมกัน ได้เป็นตัวแทนของอาร์เอ็นเอรวมวันสั้น และอาร์เอ็นเอรวมวันยาวของข้าวแต่ละพันธุ์ เพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR

2.5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR

นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอมาสังเคราะห์ cDNA สายแรกด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป SuperScript III™ Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) แล้วนำ cDNA สายแรกที่ได้ ตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG kit (Invitrogen, USA) โดยใช้เครื่อง Master cycler EP Gradient S (Eppendorf, Germany) และวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนแบบ relative (ΔC_T) โดยใช้ระดับการแสดงออกของยีน *Actin1* ในการปรับค่า (normalization)

3. ผลการวิจัย

3.1 การโคลนยีนกำหนดรหัสโปรตีน AP2 จากข้าวที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสง

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อช่วงแสงในข้าวข้าวดอกมะลิ 105 ในระยะการเปลี่ยนแปลงจากการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (vegetative phase) เข้าสู่ระยะออกดอก (reproductive phase) ด้วยเทคนิค GeneChip Expression Array ทำให้ทราบว่ายีนกำหนดรหัสโปรตีน AP2 (AK062882.1) นั้น มีการแสดงออกที่ลดลงถึง 3.15 เท่า รวมทั้งแสดงให้เห็นว่ายีนกำหนดโปรตีน AP2 นี้มีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการควบคุมการออกดอกที่ตอบสนองต่อช่วงแสง โดยทำหน้าที่ยับยั้งการออกดอก [15] การทดลองในครั้งนี้จึงได้ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีนกำหนด

โปรตีน AP2 ดังกล่าว จากจีโนมของข้าวที่ไวต่อช่วงแสง คือ ข้าวดอกมะลิ 105 และเหลืองใหญ่ 148 และจากจีโนมข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง คือ กข 7 และสุพรรณบุรี 1 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากข้าว IR64 ซึ่งการออกแบบไพรเมอร์ในครั้งนี้สำหรับเพิ่มปริมาณบริเวณที่กำหนดรหัสโปรตีนเท่านั้นดังตารางที่ 1 และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มปริมาณได้โคลนเข้าสู่ พลาสมิด pGEM®-T Easy (Promega, USA) แล้วนำมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอ

ไทด์ พบว่ายีนที่เพิ่มปริมาณได้จากข้าวทั้ง 4 พันธุ์ นั้นมีขนาดที่กำหนดรหัสโปรตีนเท่ากัน คือ 825 คู่เบส ซึ่งเท่ากับยีนกำหนดรหัสโปรตีน AP2 ในข้าว IR64 ในฐานข้อมูล (รูปที่ 1) และไม่มีส่วนอินทอน (intron) เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AP2 มาเปรียบเทียบกับระหว่างข้าวทั้ง 5 พันธุ์ พบว่ามีความเหมือนกันถึง 99 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีนที่เพิ่มปริมาณได้จากจีโนมข้าวแต่ละพันธุ์นั้นเป็นยีนเดียวกัน

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนกำหนดรหัสโปรตีน AP2 จากจีโนมข้าว

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	ค่า T _m (°C)	ค่า T _a (°C)
AK062882_AP2_F1	ATGACCAAGAAGGTGATACCGGCCAT	62	57
AK062882_AP2_R1	TCCGGTGCAGCGTCTAGTTTTTGA	61	57

เพื่อเป็นการยืนยันว่ายีนที่โคลนได้นี้เป็นยีนกำหนดรหัสโปรตีน AP2 จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับยีนอื่นในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLASTN พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนกำหนดรหัสโปรตีน AP2 ทั้งในข้าวอินดิกา (EU622934.1) และข้าวจาโปนิกา (XM_015755558) มากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ และมีความเหมือนกับยีนเดียวกันนี้ในพืชชนิดอื่น ได้แก่ ข้าวฟ่างหางหมา (XM_004956961) และข้าวโพด (NM_001156258) มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จึงชี้ให้เห็นว่ายีนที่โคลนได้ เป็นยีนกำหนดรหัสโปรตีน AP2 ของข้าวข้าวดอกมะลิ 105 เหลืองใหญ่, กข 7 และสุพรรณบุรี 1

3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนกำหนดรหัสโปรตีน AP2

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัสโปรตีน AP2 ระหว่างข้าว 5 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวดอกมะลิ 105 เหลืองใหญ่, กข 7 สุพรรณบุรี 1 และ IR64 พบความแตกต่างภายในลำดับนิวคลีโอไทด์

ทั้งหมด 11 ตำแหน่ง (รูปที่ 1) และเป็นที่น่าสนใจว่าความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นนั้นอยู่ภายในโดเมน AP2 ถึง 10 ตำแหน่ง และนอกบริเวณโดเมน AP2 1 ตำแหน่ง (รูปที่ 1) ซึ่งความผันแปรที่เกิดขึ้นภายในยีน AP2 อาจส่งผลต่อวิวัฒนาการการควบคุมการออกดอกระหว่างข้าวที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสง จึงแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AP2 ของข้าวที่ไว (ข้าวดอกมะลิ 105 และเหลืองใหญ่ 148) และไม่ไวต่อช่วงแสง (กข7 และสุพรรณบุรี 1) เป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่าโปรตีนที่ได้มีขนาด 274 กรดอะมิโน โดยมีโดเมน AP2 1 โดเมนในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 130-186 (รูปที่ 2) ซึ่งกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 131, 132, 134, 136, 138, 140, 144, 146, 153, 155 และ 158 ทำหน้าที่จับกับดีเอ็นเอ (รูปที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนภายในโดเมน AP2 ระหว่างข้าว 4 พันธุ์ พบตำแหน่งที่มีความผันแปร 6 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 134 โดยข้าวข้าวดอกมะลิ 105 คือ ทริปโตเฟน (tryptophan) ส่วนเหลืองใหญ่ 148, กข 7

KDML105	ATGACCAAGAAGGTGATACCGGCCATGGCGGCGGCGAGGAGGATTCTTGCAAGACCAAG	60
LY148	ATGACCAAGAAGGTGATACCGGCCATGGCGGCGGCGAGGAGGATTCTTGCAAGACCAAG	60
RD7	ATGACCAAGAAGGTGATACCGGCCATGGCGGCGGCGAGGAGGATTCTTGCAAGACCAAG	60
SP1	ATGACCAAGAAGGTGATACCGGCCATGGCGGCGGCGAGGAGGATTCTTGCAAGACCAAG	60
IR64	ATGACCAAGAAGGTGATACCGGCCATGGCGGCGGCGAGGAGGATTCTTGCAAGACCAAG	60

KDML105	CTTGATGAGCGTGGGGTAGTCATCAGGCTCCGAGCTCCGCACGCTGGATCTCGTCCGAG	120
LY148	CTTGATGAGCGTGGGGTAGTCATCAGGCTCCGAGCTCCGCACGCTGGATCTCGTCCGAG	120
RD7	CTTGATGAGCGTGGGGTAGTCATCAGGCTCCGAGCTCCGCACGCTGGATCTCGTCCGAG	120
SP1	CTTGATGAGCGTGGGGTAGTCATCAGGCTCCGAGCTCCGCACGCTGGATCTCGTCCGAG	120
IR64	CTTGATGAGCGTGGGGTAGTCATCAGGCTCCGAGCTCCGCACGCTGGATCTCGTCCGAG	120

KDML105	CAGGAGCACAGCATCATCGTCGCGGCGCTGCGGTACGTGCTGTCGGGTGCACACGCGG	180
LY148	CAGGAGCACAGCATCATCGTCGCGGCGCTGCGGTACGTGCTGTCGGGTGCACACGCGG	180
RD7	CAGGAGCACAGCATCATCGTCGCGGCGCTGCGGTACGTGCTGTCGGGTGCACACGCGG	180
SP1	CAGGAGCACAGCATCATCGTCGCGGCGCTGCGGTACGTGCTGTCGGGTGCACACGCGG	180
IR64	CAGGAGCACAGCATCATCGTCGCGGCGCTGCGGTACGTGCTGTCGGGTGCACACGCGG	180

KDML105	CCGCCGAGATCGTCACGCTGGCGTGGGGGAGGCGGTGTGCTCTGTGCGGCATCGACGGC	240
LY148	CCGCCGAGATCGTCACGCTGGCGTGGGGGAGGCGGTGTGCTCTGTGCGGCATCGACGGC	240
RD7	CCGCCGAGATCGTCACGCTGGCGTGGGGGAGGCGGTGTGCTCTGTGCGGCATCGACGGC	240
SP1	CCGCCGAGATCGTCACGCTGGCGTGGGGGAGGCGGTGTGCTCTGTGCGGCATCGACGGC	240
IR64	CCGCCGAGATCGTCACGCTGGCGTGGGGGAGGCGGTGTGCTCTGTGCGGCATCGACGGC	240

KDML105	TGTCCTGGGTGCGACTTCTTTGGGCGCAGGCGCGCGGGAACGAGGAGCGGTAATGGCG	300
LY148	TGTCCTGGGTGCGACTTCTTTGGGCGCAGGCGCGCGGGAACGAGGAGCGGTAATGGCG	300
RD7	TGTCCTGGGTGCGACTTCTTTGGGCGCAGGCGCGCGGGAACGAGGAGCGGTAATGGCG	300
SP1	TGTCCTGGGTGCGACTTCTTTGGGCGCAGGCGCGCGGGAACGAGGAGCGGTAATGGCG	300
IR64	TGTCCTGGGTGCGACTTCTTTGGGCGCAGGCGCGCGGGAACGAGGAGCGGTAATGGCG	300

KDML105	ACGGATTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCGCGCGCGGTGGCAGGAGGATCAGGCGGGAAGAGG	360
LY148	ACGGATTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCGCGCGCGGTGGCAGGAGGATCAGGCGGGAAGAGG	360
RD7	ACGGATTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCGCGCGCGGTGGCAGGAGGATCAGGCGGGAAGAGG	360
SP1	ACGGATTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCGCGCGCGGTGGCAGGAGGATCAGGCGGGAAGAGG	360
IR64	ACGGATTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCGCGCGCGGTGGCAGGAGGATCAGGCGGGAAGAGG	360

KDML105	GTTAGGCGGAGGAGGAAGAAGAACGTGTACCGTGGCGTGTGGCATCGGCCGTGGGGGAAG	420
LY148	GTTAGGCGGAGGAGGAAGAAGAACGTGTACCGTGGCGTGTGGCATCGGCCGTGGGGGAAG	420
RD7	GTTAGGCGGAGGAGGAAGAAGAACGTGTACCGTGGCGTGTGGCATCGGCCGTGGGGGAAG	420
SP1	GTTAGGCGGAGGAGGAAGAAGAACGTGTACCGTGGCGTGTGGCATCGGCCGTGGGGGAAG	420
IR64	GTTAGGCGGAGGAGGAAGAAGAACGTGTACCGTGGCGTGTGGCATCGGCCGTGGGGGAAG	420

KDML105	TGGGCGAGCGGAGATACGCGACCCGCGCGCGGTGCGTAAGTGGCTCGGACGTTCCGAC	480
LY148	TGGGCGAGCGGAGATACGCGACCCGCGCGCGGTGCGTAAGTGGCTCGGACGTTCCGAC	480
RD7	TGGGCGAGCGGAGATACGCGACCCGCGCGCGGTGCGTAAGTGGCTCGGACGTTCCGAC	480
SP1	TGGGCGAGCGGAGATACGCGACCCGCGCGCGGTGCGTAAGTGGCTCGGACGTTCCGAC	480
IR64	TGGGCGAGCGGAGATACGCGACCCGCGCGCGGTGCGTAAGTGGCTCGGACGTTCCGAC	480

KDML105	ACCGCCGAGGAGGCGCGCAGGCTGTACGACCGCGCGCCCTCGAGTTCCGCGGCGCGCG	540
LY148	ACCGCCGAGGAGGCGCGCAGGCTGTACGACCGCGCGCCCTCGAGTTCCGCGGCGCGCG	540
RD7	ACCGCCGAGGAGGCGCGCAGGCTGTACGACCGCGCGCCCTCGAGTTCCGCGGCGCGCG	540
SP1	ACCGCCGAGGAGGCGCGCAGGCTGTACGACCGCGCGCCCTCGAGTTCCGCGGCGCGCG	540
IR64	ACCGCCGAGGAGGCGCGCAGGCTGTACGACCGCGCGCCCTCGAGTTCCGCGGCGCGCG	540

KDML105	GCGAAGCTCAACTTCCCGTGCTCCGAGCCTTTGCCATGCCAGCCAAAGAAACGGCAAT	600
LY148	GCGAAGCTCAACTTCCCGTGCTCCGAGCCTTTGCCATGCCAGCCAAAGAAACGGCAAT	600
RD7	GCGAAGCTCAACTTCCCGTGCTCCGAGCCTTTGCCATGCCAGCCAAAGAAACGGCAAT	600
SP1	GCGAAGCTCAACTTCCCGTGCTCCGAGCCTTTGCCATGCCAGCCAAAGAAACGGCAAT	600
IR64	GCGAAGCTCAACTTCCCGTGCTCCGAGCCTTTGCCATGCCAGCCAAAGAAACGGCAAT	600

KDML105	GGCGGCGATGCTGTACGCGGCGGACGACAACGGCAGAGCAGATGACTCCGACTCTGTGCG	660
LY148	GGCGGCGATGCTGTACGCGGCGGACGACAACGGCAGAGCAGATGACTCCGACTCTGTGCG	660
RD7	GGCGGCGATGCTGTACGCGGCGGACGACAACGGCAGAGCAGATGACTCCGACTCTGTGCG	660
SP1	GGCGGCGATGCTGTACGCGGCGGACGACAACGGCAGAGCAGATGACTCCGACTCTGTGCG	660
IR64	GGCGGCGATGCTGTACGCGGCGGACGACAACGGCAGAGCAGATGACTCCGACTCTGTGCG	660

KDML105	CCGTGCAGCGCGGATGCCGAGGAGACGACGACGCGGTGGATTGGCAGATGGCGCGGAC	720
LY148	CCGTGCAGCGCGGATGCCGAGGAGACGACGACGCGGTGGATTGGCAGATGGCGCGGAC	720
RD7	CCGTGCAGCGCGGATGCCGAGGAGACGACGACGCGGTGGATTGGCAGATGGCGCGGAC	720
SP1	CCGTGCAGCGCGGATGCCGAGGAGACGACGACGCGGTGGATTGGCAGATGGCGCGGAC	720
IR64	CCGTGCAGCGCGGATGCCGAGGAGACGACGACGCGGTGGATTGGCAGATGGCGCGGAC	720

KDML105	GAAGCCGCGCAGCAACCAGCTCTGGGATGGCTTGCGAGACCTGATGAAGCTGGATGAAGCG	780
LY148	GAAGCCGCGCAGCAACCAGCTCTGGGATGGCTTGCGAGACCTGATGAAGCTGGATGAAGCG	780
RD7	GAAGCCGCGCAGCAACCAGCTCTGGGATGGCTTGCGAGACCTGATGAAGCTGGATGAAGCG	780
SP1	GAAGCCGCGCAGCAACCAGCTCTGGGATGGCTTGCGAGACCTGATGAAGCTGGATGAAGCG	780
IR64	GAAGCCGCGCAGCAACCAGCTCTGGGATGGCTTGCGAGACCTGATGAAGCTGGATGAAGCG	780

KDML105	GACACCTGGTTCGCCCATTTTCCGATGACGCGCTAGTTTTTGA 825	
LY148	GACACCTGGTTCGCCCATTTTCCGATGACGCGCTAGTTTTTGA 825	
RD7	GACACCTGGTTCGCCCATTTTCCGATGACGCGCTAGTTTTTGA 825	
SP1	GACACCTGGTTCGCCCATTTTCCGATGACGCGCTAGTTTTTGA 825	
IR64	GACACCTGGTTCGCCCATTTTCCGATGACGCGCTAGTTTTTGA 825	

รูปที่ 1 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่กำหนดรหัสโปรตีน AP2 ระหว่างข้าว 5 พันธุ์ ส่วนแรงแเงแสดงบริเวณโดเมน AP2 ด้วยอักษรหนาและขีดเส้นใต้ แสดงนิวคลีโอไทด์ที่เกิดความผันแปร 11 ตำแหน่ง

KDML105	MTKKVVPAMAAARQDSCKTKLDERGGSHQAPSSARWISSEQEHSIIVAALRYVVSgcTTP	60
LY148	MTKKVVPAMAAARQDSCKTKLDERGGSHQAPSSARWISSEQEHSIIVAALRYVVSgcTTP	60
RD7	MTKKVVPAMAAARQDSCKTKLDERGGSHQAPSSARWISSEQEHSIIVAALRYVVSgcTTP	60
SP1	MTKKVVPAMAAARQDSCKTKLDERGGSHQAPSSARWISSEQEHSIIVAALRYVVSgcTTP	60

KDML105	PPEIVTVACGEACALCGIDGCLGCDFFGAEAAAGNEEAVMATDYAAAAAAAVAGGSGGKR	120
LY148	PPEIVTVACGEACALCGIDGCLGCDFFGAEAAAGNEEAVMATDYAAAAAAAVAGGSGGKR	120
RD7	PPEIVTVACGEACALCGIDGCLGCDFFGAEAAAGNEEAVMATDYAAAAAAAVAGGSGGKR	120
SP1	PPEIVTVACGEACALCGIDGCLGCDFFGAEAAAGNEEAVMATDYAAAAAAAVAGGSGGKR	120

	134 149 157 168 173	
KDML105	VRRRRKKNVYRGVRRHPGWKWAEEIRDPRRAVRKWLGTFDTAEAAARVDRATLEFRGAR	180
LY148	VRRRRKKNVYRGVRRHPGWKWAEEIRDPRRAVRKWLGTFDTAEAAARVDRATLEFRGAR	180
RD7	VRRRRKKNVYRGVRRHPGWKWAEEIRDPRRAVRKWLGTFDTAEAAARVDRATLEFRGAR	180
SP1	VRRRRKKNVYRGVRRHPGWKWAEEIRDPRRAVRKWLGTFDTAEAAARVDRATLEFRGAR	180

	↑↑	
KDML105	AKLNFPCESEPLMPMSQRNGNGGDVAATTAATTAEQMPTPLSPCSADAEETTTFPVDWQMGA	240
LY148	AKLNFPCESEPLMPMSQRNGNGGDVAATTAATTAEQMPTPLSPCSADAEETTTFPVDWQMGA	240
RD7	AKLNFPCESEPLMPMSQRNGNGGDVAATTAATTAEQMPTPLSPCSADAEETTTFPVDWQMGA	240
SP1	AKLNFPCESEPLMPMSQRNGNGGDVAATTAATTAEQMPTPLSPCSADAEETTTFPVDWQMGA	240

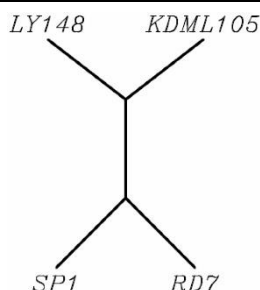
KDML105	EAGSNQLWDGLQDLMKLEADTWFPPFSGAASSF	274
LY148	EAGSNQLWDGLQDLMKLEADTWFPPFSGAASSF	274
RD7	EAGSNQLWDGLQDLMKLEADTWFPPFSGAASSF	274
SP1	EAGSNQLWDGLQDLMKLEADTWFPPFSGAASSF	274

รูปที่ 2 บริเวณโดเมนอนุรักษ AP2 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 130 ถึง 186 (สีเทา) ของข้าวทั้ง 4 พันธุ์ ชัดเส้นได้แสดงตำแหน่งที่จับกับดีเอ็นเอ ตัวอักษรเข้มแสดงความผันแปรของกรดอะมิโน และลูกศรแสดงตำแหน่งความผันแปรที่จำเพาะต่อข้าวที่ไว (KDML105 และ LY148) และไม่วิวดต่อช่วงแสง (RD7 และ SP1)

และสฟรรณบุรี 1 คือ อาร์จินิน (arginine) ตำแหน่งที่ 149 ของขาวดอกมะลิ 105 เหลืองใหญ่ 148 และ กข 7 คือ อาร์จินิน (arginine) ส่วนสฟรรณบุรี 1 คือ ฮิสทีดิน (histidine) ตำแหน่งที่ 157 ขาวดอกมะลิ 105 และเหลืองใหญ่ คือ ไกลซีน (glycine) ส่วนสฟรรณบุรี 1 และ กข 7 คือ กรดกลูตามิก (glutamic acid) ตำแหน่งที่ 168 ของขาวดอกมะลิ 105 คือ วาลีน (valine) ส่วนเหลืองใหญ่ 148, กข 7 และสฟรรณบุรี 1 คือ อะลานีน (alanine) ตำแหน่งที่ 171 ขาวดอกมะลิ 105, กข 7 และสฟรรณบุรี 1 คือ อาร์จินิน (arginine) ส่วนเหลืองใหญ่ 148 คือ ซีสเทดิน (cystidine) และ ตำแหน่งที่ 173 ของขาวดอกมะลิ 105 และเหลืองใหญ่ คือ อะลานีน ส่วน กข7 และสฟรรณบุรี 1 คือ ทรีโอนิน (threonine) (รูปที่ 2) พบความผันแปรนอกบริเวน โดเมน AP2 เพียงตำแหน่งเดียว คือ ตำแหน่งที่ 269 โดยโปรตีนของข้าวขาวดอกมะลิ 105 คือ กรดแอสพาร์ติก (aspartic acid) ในขณะที่เหลืองใหญ่ 148,

กษ 7 และสุพรรณบุรี 1 คือ ไกลซีน (glycine) (รูปที่ 2) แต่อย่างไรก็ดี เป็นที่น่าสังเกตว่าความผันแปรที่เกิดขึ้นในบริเวณโดเมน AP2 นั้น พบตำแหน่งที่มีความผันแปรจำเพาะต่อข้าวที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสง คือ ตำแหน่ง 157 และ 173 (รูปที่ 2)

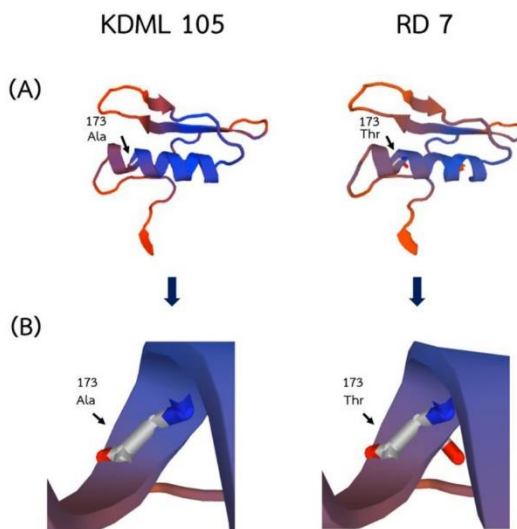
เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโปรตีน AP2 ระหว่างข้าวที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสง จึงนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AP2 ของข้าวทั้ง 2 ชนิด 4 พันธุ์ มาสร้าง phylogenetic tree พบว่าสามารถจำแนกข้าวออกเป็น 2 กลุ่ม อย่างชัดเจน โดยข้าวข้าวดอกมะลิ 105 และเหลื่องใหญ่ 148 ซึ่งเป็นข้าวที่ไวต่อช่วงแสงถูกจัดไว้ในกลุ่มเดียวกัน ส่วน กข7 และสุพรรณบุรีซึ่งเป็นข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสงถูกจัดจำแนกไว้อีกกลุ่มหนึ่ง (รูปที่ 3) จึงชี้ให้เห็นว่าโปรตีน AP2 น่าจะมีวิวัฒนาการแยกออกจากกันระหว่างข้าวที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสง



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน AP2 ระหว่างข้าว 4 พันธุ์ ที่ไวต่อช่วงแสง คือ เหลืองใหญ่ 148 (LY148) กับข้าวดอกมะลิ 105 (KDML105) และที่ไม่ไวต่อช่วงแสง คือ กข 7 (RD7) กับสุพรรณบุรี 1 (SP1)

เพื่อวิเคราะห์ความผันแปรของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นภายในโดเมน AP2 และมีความจำเพาะต่อข้าวที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสง มีผลต่อโครงสร้างและการทำงานของโปรตีน AP2 อย่างไร จึงนำลำดับกรดอะมิโนของสายพอลิเพปไทด์ AP2 ของข้าวทั้ง 2 ชนิด คือ ข้าวดอกมะลิ 105 และ กข 7 มาทำนายโครงสร้างสามมิติ (3D protein) พบว่าโครงสร้างสามมิติของโปรตีน AP2 ของข้าวทั้ง 2 พันธุ์ ประกอบด้วย แผ่นบีต้า (β sheet) 3 แผ่น ที่วางแนวสวนทิศทางกันตามด้วยเกลียวแอลฟา (α helix) (รูปที่ 4) โดยส่วนที่ทำหน้าที่จับกับดีเอ็นเอนั้นอยู่ในแผ่นบีต้า เกลียวแอลฟาทำหน้าที่ในการทำปฏิกิริยากับโปรตีนอื่น (active site) ในการควบคุมกระบวนการถอดรหัสของยีนอันดัดแปลง และเป็นที่น่าสนใจ คือ ตำแหน่งที่เกิดการกลายระหว่างข้าวทั้ง 2 ชนิด อยู่ในเกลียวแอลฟาที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 173 คือ ข้าวที่ไวต่อช่วงแสงเป็นกรดอะมิโนอะลานีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วและไม่มีความไวในการทำปฏิกิริยา ส่วนข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสงถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนทรีโอนีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีขั้วและมีหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ที่ว่องไวในการทำปฏิกิริยากับ

โปรตีนอื่น [19] จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าโปรตีน AP2 ของข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสงนั้นมีความไวในการทำปฏิกิริยากับโปรตีนอื่นได้ดีกว่าโปรตีน AP2 ของข้าวที่ไวต่อช่วงแสงนั่นเอง

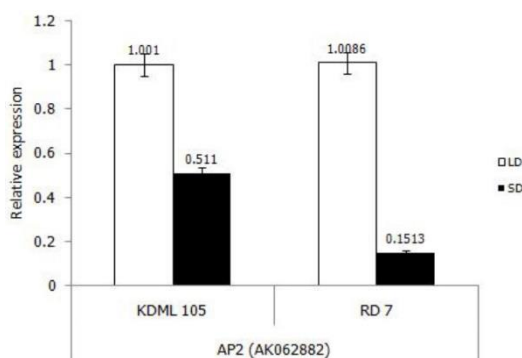


รูปที่ 4 โครงสร้างสามมิติของโปรตีน AP2/ERF ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) และ กข 7 (RD 7) (A) ลูกศรระบุตำแหน่งกรดอะมิโน 173 ที่แตกต่างกันระหว่างข้าวที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสง (B)

3.2 การแสดงออกของยีน AP2 ที่ตอบสนองต่อช่วงแสงในข้าวที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสง

เพื่อค้นหาว่าการแสดงออกของยีน AP2 ในการตอบสนองต่อช่วงแสงในข้าวที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสงนั้นเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร จึงตรวจสอบการแสดงออกของยีนนี้ ในสภาวะช่วงแสงสั้น (SD) และสภาวะช่วงแสงยาว (LD) ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 และ กข 7 ซึ่งเป็นข้าวที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสงตามลำดับ ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR พบว่าในสภาวะช่วงแสงยาวการแสดงออกของยีน AP2 มีระดับสูงในข้าวทั้ง 2 พันธุ์ แต่เมื่ออยู่ในสภาวะช่วง

แสงสั้น พบว่าการแสดงออกของยีน *AP2* ลดลงในข้าว ทั้ง 2 พันธุ์ เช่นเดียวกัน (รูปที่ 5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกที่ตอบสนองต่อช่วงแสงของยีน *AP2* เหมือนกันในข้าวทั้ง 2 ชนิด อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสังเกตว่าข้าว กข 7 ซึ่งเป็นข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสงกลับมีสัดส่วนการลดลงที่มากกว่า ที่แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ควบคุมการถอดรหัสของยีนนี้ในข้าว กข 7 มีความไวต่อแสงมากกว่าข้าวขาวดอกมะลิ 105



รูปที่ 5 การแสดงออกของยีน *AP2* ในสภาวะช่วงแสงยาว (LD) และสภาวะช่วงแสงสั้น (SD) ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) และ กข 7 (RD7)

4. วิจารณ์

โปรตีนที่ประกอบด้วยโดเมน *AP2* จัดเป็นซูปเปอร์แฟมิลีโปรตีนขนาดใหญ่ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการถอดรหัส (transcription factor) ที่พบเฉพาะในพืชเท่านั้น โดยโดเมน *AP2* มีขนาดประมาณ 60-70 นิวคลีโอไทด์ และมีลักษณะโมทีฟ (motif) ที่จำเพาะ 2 ชนิด คือ YRG และ RAYD และมีบริเวณที่สำคัญต่อหน้าที่การทำงาน (active site) ประกอบด้วย 18 กรดอะมิโน สร้างเป็นเกลียวแอลฟา (α helix) [20] และจากจำนวนโดเมน *AP2* ที่พบภายในโปรตีนเหล่านี้ทำให้แบ่งย่อยออกเป็น 3 แฟมิลี คือ *AP2*, *ERF*

(ethylene-responsive element binding factor) และ *RAV* (related to *ABI3/VP*) [21-23] โดยที่แฟมิลี *AP2* ประกอบด้วย 2 โดเมน ในขณะที่แฟมิลี *ERF* มีเพียงโดเมนเดียว ส่วนแฟมิลี *RAV* นอกจากมีโดเมน *AP2* 1 โดเมนแล้ว ยังประกอบด้วยโดเมนชนิด *B3* อีกด้วย [24] จากการทดลองในครั้งนี้ได้แยกยีนกำหนดรหัสโปรตีน *AP2* จากข้าว ซึ่งยีนที่แยกได้นี้กำหนดรหัสโปรตีนที่ประกอบด้วยโดเมน *AP2* เพียง 1 โดเมนเท่านั้น จึงจัดอยู่ในแฟมิลี *ERF* และแฟมิลี *ERF* นี้ ประกอบด้วย 2 ซับแฟมิลีย่อย คือ *ERF* และ *DREB* ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อความเครียด และกระบวนการพัฒนาในพืช โดยโปรตีน *ERF* จะจับกับ GCC-box (AGCCGCC) ที่อยู่ภายในโปรโมเตอร์ของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการตอบสนองต่อฮอร์โมน ethylene, jasmonic acid และ salicylic acid ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญในการตอบสนองต่อความเครียด และการพัฒนาในพืช [25,26] ซึ่งจากการวิเคราะห์โดเมน และ โครงสร้างโปรตีนที่ได้ในครั้งนี้ มีสมบัติเป็นโปรตีนควบคุมการถอดรหัสที่มีความจำเพาะในการจับกับ GCC box ดังนั้นจึงจัดอยู่ในซับแฟมิลี *ERF* นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโปรตีนที่มีโดเมน *AP2* เพียงโดเมนเดียวมักมีอินทรอนจำนวนน้อยหรือไม่เลย (intronless) [24] ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ จึงเป็นการยืนยันว่ายีนที่โคลนได้ คือ ยีน *AP2/ERF* ของข้าวที่ไวต่อช่วงแสง คือ ข้าวดอกมะลิ 105 และเหลืองใหญ่ 148 และจากข้าวที่ไม่ไวแสง คือ กข 7 และสุพรรณบุรี 1 โดยยีนที่โคลนได้ในครั้งนี้มีการแสดงออกที่ตอบสนองต่อช่วงแสงทั้งในข้าวที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสง โดยมีการแสดงออกสูงในสภาวะช่วงแสงยาว และลดลงในสภาวะช่วงแสงสั้นซึ่งเป็นสภาวะชักนำการออกดอก จึงชี้ให้เห็นว่ายีน *AP2/ERF* ในข้าว นอกจากมีบทบาทสำคัญในกลไกการตอบสนองต่อความเครียดเนื่องจากสิ่งแวดล้อมแล้ว ยังมีบทบาท

สำคัญในการควบคุมการออกดอกที่ตอบสนองต่อช่วงแสงในข้าวอีกด้วย ถึงแม้ว่ายังไม่มีรายงานการวิจัยที่ระบุชัดเจนถึงบทบาทสำคัญในการควบคุมการออกดอกที่ตอบสนองต่อช่วงแสงของยีน *AP2/ERF* ในข้าว แต่มีรายงานการวิจัยที่อธิบายถึงบทบาทของยีนกลุ่มนี้ในการยับยั้งการออกดอกในอะราบิดอปซิส [27,28] และข้าวโพด [29] โดยทำให้มีระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบที่ยาวนานขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับบทบาทของยีน *AP2/ERF* ในข้าวที่ส่งเสริมการแตกกอ มีการแสดงออกได้สูงในระยะเวลาเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ และลดลงเมื่อหยุดแตกกอและยืดข้อสุดท้ายพร้อมชักใบธงเพื่อเข้าสู่ระยะออกรวง [30] จึงเป็นข้อมูลที่สนับสนุนว่า ยีน *AP2/ERF* มีบทบาทสำคัญในการควบคุมให้มีการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบพร้อมทั้งยับยั้งการออกดอก และเมื่อเข้าสู่ระยะออกรวง (ออกรวง) จึงหยุดการแตกกอเนื่องจากการแสดงออกของยีนนี้ลดลง ในขณะที่เดียวกันยีนที่ทำหน้าที่ชักนำการออกดอก (floral inducer) มีการแสดงออกที่สูงขึ้น

แต่อย่างไรก็ดี การแสดงออกของยีน *AP2/ERF* มีการตอบสนองต่อช่วงแสงทั้งในข้าวที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสง โดยมีการแสดงออกสูงในสภาวะช่วงแสงยาวที่แสดงถึงส่งเสริมการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบพร้อมทั้งยับยั้งการออกดอก แต่ข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง คือ กข 7 กลับสามารถออกดอกได้ จึงชี้ให้เห็นว่าการออกดอกของข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง อาจถูกชักนำด้วยวิธีอื่นและ/หรือ การควบคุมการทำงานของโปรตีน *AP2* ระหว่างข้าวทั้ง 2 ชนิด นั้นต่างกัน ทั้งนี้เพราะพบความผันแปรที่เกิดขึ้นภายในบริเวณโดเมน *AP2* ในตำแหน่ง active site กรดอะมิโนที่ 173 โดยข้าวที่ไวต่อช่วงแสงคือ อะลานีน ส่วนข้าวชนิดที่ไม่ไวต่อช่วงแสงคือ ทรีโอนีน ซึ่งส่งผลต่อความไวในการทำปฏิกิริยาของโปรตีน *AP2* กับโปรตีนอื่นต่างกัน หรืออาจส่งผลต่อการจับกับโปรตีนควบคุมการถอดรหัสชนิดอื่นที่ทำงานร่วมกันนั้น

มีความแตกต่างกันระหว่างข้าวที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสง ซึ่งข้อมูลที่ได้ในครั้งนี้ สามารถนำไปขยายผลการศึกษาเพื่ออธิบายกลไกการควบคุมการออกดอกของข้าวที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสงต่อไปได้

5. สรุป

ลักษณะเชิงโมเลกุลของยีนกำหนดรหัสโปรตีน *AP2* นี้ มีส่วนที่กำหนดรหัสโปรตีนขนาด 825 คู่เบส เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วย 274 กรดอะมิโน ประกอบด้วยโดเมน *AP2* 1 โดเมน จัดเป็น *AP2/ERF* transcription factor เหมือนกันทั้งในข้าวที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสง แต่มีความผันแปรภายในโดเมน *AP2* โดยที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 173 ซึ่งเป็นบริเวณ active site ของเกลียวแอลฟาของโครงสร้างโปรตีน โดยมีความจำเพาะต่อชนิดข้าว คือ เป็นอะลานีน ในข้าวที่ไวต่อช่วงแสง และ ทรีโอนีนในข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง ที่ส่งผลทำให้การทำงานของโปรตีน *AP2* ต่างกันระหว่างข้าวทั้ง 2 ชนิด และความผันแปรที่เกิดขึ้นยังทำให้วิวัฒนาการของโปรตีน *AP2* นั้นแยกออกจากกันระหว่างข้าวที่ไวและไม่ไวต่อช่วงแสง แต่อย่างไรก็ดี การแสดงออกของยีน *AP2* ในระดับการถอดรหัสเพื่อตอบสนองต่อช่วงแสงในข้าวทั้ง 2 ชนิด นั้นเหมือนกัน

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการเครือข่ายเชิงกลยุทธ์เพื่อผลิตและพัฒนาอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษา ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) หลักสูตรปริญญาเอกในประเทศ

7. รายการอ้างอิง

- [1] Zuellig, M.P., Kenney, A.M. and Sweigart, A.L., 2014, Evolutionary genetics of plant adaptation: Insights from new model

- systems, Curr. Opin. Plant Biol. 18: 44-50.
- [2] Srikanth, A. and Schmid, M., 2011, Regulation of flowering time: all roads lead to Rome, Cell. Mol. Life. Sci. 68: 2013-2037.
- [3] Gul Khan, M.R., Ai, X.Y. and Zhang, J.Z., 2014, Genetic regulation of flowering time in annual and perennial plants, Wiley Interdiscip Rev. RNA 5: 347-359.
- [4] Mouradov, A., Cremer, F. and Coupland, G., 2002, Control of flowering time, Plant Cell. 14: 111-130.
- [5] Michaels, S.D., 2009, Flowering time regulation produces much fruit, Curr. Opin. Plant Biol. 12: 75-80.
- [6] Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F. and Fan, Q., 2007, FT protein movement contributes to long distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*, Science 316: 1030-1033.
- [7] Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J.M. and Soppe, W., 1998, Genetic control of flowering-time in *Arabidopsis*, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 345-370.
- [8] Lin, M.K., Belanger, H., Lee, Y.J., Varkonyi-Gasic, E., Taoka, K. and Miura, E., 2007, FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits, Plant Cell. 19: 1488-1506.
- [9] Yant, L., Mathieu, J. and Schmid, M., 2009, Just say no: Floral repressors help *Arabidopsis* bide the time, Curr. Opin. Plant. Biol. 12: 580-586.
- [10] Borovsky, Y., Vinod, K., Sharma, H. and Paran, V.I., 2015, *CaAP2* transcription factor is a candidate gene for a flowering repressor and a candidate for controlling natural variation of flowering time in *Capsicum annuum*, Theor. Appl. Genet. 128: 1073-1082.
- [11] Glazinska, P., Zienkiewicz, A., Wojciechowski, W. and Kopcewicz, J., 2009, The putative miR172 target gene *INAPETALA2-like* is involved in the photoperiodic flower induction of *Ipomoea nil*, J. Plant Physiol. 166: 1801-1813.
- [12] Samach, A. and Lotan, H., 2007, The transition to flowering in tomato, Plant Biotechnol. 24: 71-82.
- [13] Yano, M., Katayose, Y., Ashikari, M., Yamanouchi, U., Monna, L., Fuse, T., Baba, T., Yamamoto, K., Umehara, Y., Nagamura, Y. and Sasaki, T., 2000, Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*, Plant Cell. 12: 2473-2483.
- [14] Doi, K., Izawa, T., Fuse, T., Yamanouchi, U., Kubo, T., Shimatani, Z., Yano, M. and Yoshimura, A., 2004, Ehd1, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls FT-like gene expression independently of Hd1, Genes Dev. 18: 926-936.
- [15] Mongkolsirawatana, C., 2008, Expression Analysis of Photoperiod Responsive

- Genes in Rice (*Oryza sativa* L.) KDML 105, Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Bangkok, 108 p.
- [16] Agrawal, G.K., Pandey, R.N. and Agrawal, V.P., 1992, Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* leave, Biotech. Biodiv. Lett. 2: 19-24.
- [17] Saitou, N. and Nei, M., 1987, The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees, Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.
- [18] Biasini, M., Stefan, B., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T.G., Bertoni, M., Bordoli, L., Schwede, T., 2014, SWISS-MODEL: Modeling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information, Nucl. Acids Res. 42: 252-258.
- [19] Betts, J.M. and Russell, B.R., 2003, Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions, In Barnes, M.R. and Gray, I.C. (Eds.), Bioinformatics for Geneticists, John Wiley & Sons, USA.
- [21] Cao, Z.F., Li, J., Chen, F., Li, Y.Q., Zhou, H.M. and Liu, Q., 2001, Effect of two conserved amino acid residues on DREB1A function, Biochemistry 66: 623-627.
- [22] Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2002, DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold inducible gene expression, Biochem. Biophys. Res. Commun. 290: 998-1009.
- [23] Mizoi, J., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2012, AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses, Biochim. Biophys. Acta. 1819: 86-96.
- [24] Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T. and Shinshi, H., 2006, Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice, Plant Physiol. 140: 411-432.
- [25] Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H. and Ohme-Takagi, M., 2000, Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression, Plant Cell. 12: 393-404.
- [26] Mantiri, F.R., Kurdyukov, S., Chen, S.K. and Rose, R.J., 2008, The transcription factor MtSERF1 may function as a nexus between stress and development in somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*, Plant Signal. Behav. 3: 498-500.
- [27] Aukerman, M.J. and Sakai, H., 2003, Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes, Plant Cell. 15: 2730-2741.
- [28] Chen, X., 2004, A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development, Science 303: 2022-2025.

- [29] Lauter, N., Kampani, A., Carlson, S., Goebel, M. and Moose, S.P., 2005, microRNA172 down-regulates glossy15 to promote vegetative phase change in maize, Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 9412-9417.
- [30] Qi, W., Sun, F., Wang, Q., Chen, M., Huang, Y., Feng, Y.Q., Luo, X. and Yang, J., 2011, Rice ethylene-response AP2/ERF factor OsEATB restricts internode elongation by down-regulating a gibberellin biosynthetic gene, Plant Physiol. 157: 216-228.