

การแสดงออกของยีน Heat-shock Protein ในสภาพอุณหภูมิสูงของข้าวเจ้าหอมนิลพันธุ์กลาย

Heat-Shock Protein Genes Expression under High Temperature Condition in Jao Hom Nin Rice Mutant Lines

วารุณี เดชพิทยานันท์¹, สุลัยมาน เชะอาบู¹, จรรัตน์ มงคลศิริวัฒนา², พูนพิภพ เกษมทรัพย์⁴, อภิชาติ วรรณวิจิตร^{1,3} และ ชเนษฎ์ ม้าลำพอง^{1*}

Warunee Depittayanant¹, Sulaiman Che-abu¹, Chareerat Mongkolsirawatana², Poonpipope Kasemsap⁴, Apichat Vanavichit^{1,3} and Chanate Malumpong^{1*}

¹ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน; ²สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์; ³ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140; ⁴ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

¹Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaengsaen; ²Department of Genetic, Faculty Liberal Art and Science; ³Rice Science Center, Kasetsart University, Kamphaengsaen campus, Nakhon Pathom 73140;

⁴Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

*Corresponding author: agrcnm@ku.ac.th

บทคัดย่อ

อุณหภูมิสูงในช่วงระยะเจริญพันธุ์ของข้าวมีความสำคัญต่อการกำหนดผลผลิต (grain yield) เนื่องจากการผสมเกสรไม่ติด ในการวิจัยนี้จึงได้ใช้พันธุ์ข้าวเจ้าหอมนิลพันธุ์กลายเบอร์ 7988 และ 7766 ที่ทดสอบแล้วว่าไม่เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดที่ดีและไม่ดีในสภาพอุณหภูมิสูง ตามลำดับ โดยใช้พันธุ์หอมนิล wild type เป็นพันธุ์ควบคุม ปลูกทดสอบภายในโรงเรือนที่ควบคุมอุณหภูมิอยู่ในช่วง 40-45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมงต่อวัน ตั้งแต่ระยะตั้งท้องจนถึงเก็บเกี่ยว ทำการประเมินความมีชีวิตและการออกของละอองเกสร เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด และการแสดงออกของยีน Heat-shock protein (HSPs) ได้แก่ยีน *OsHsfA7*, *OsHsfA9*, *OsHsfA2e* และ *OsHsfA4d* ในใบธงและดอกอ่อน ผลการทดลองพบว่า การออกของละอองเกสรและเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดของข้าวภายในสภาพอุณหภูมิปกติมีค่าสูงกว่าในสภาพอุณหภูมิสูง แต่ความมีชีวิตของละอองเกสรในทั้งสองสภาวะไม่แตกต่างกัน และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน พบ 3 ยีน คือ *OsHsfA7*, *OsHsfA2e* และ *OsHsfA4d* ที่มีการแสดงออกในสภาพอุณหภูมิสูงที่สูงกว่าในสภาพอุณหภูมิปกติทั้งในใบธง และดอกอ่อนโดยเฉพาะยีน *OsHsfA4d* มีการแสดงออกที่แตกต่างอย่างชัดเจนในใบธง จึงสรุปได้ว่าเมื่อข้าวได้รับสภาพเครียดจากอุณหภูมิสูงจะมีผลให้ยีน HSPs แสดงออกได้มากขึ้น

ABSTRACT

High temperature in the reproductive stages is an important factor to determine grain yields because the florets are sterile. In this research, Jao Hom Nin mutant lines No. 7988 and 7766 that showed high and low seed set, respectively and wild type were used to observe in greenhouse at 40-45 °C for 6 hours/day from booting stage until harvesting. The pollen viability, pollen germination, seed set and Heat-shock genes expression including, *OsHsfA7*, *OsHsfA9*, *OsHsfA2e* and *OsHsfA4d* in flag leaf and young flower were evaluated. The result showed that pollen germination and seed set under normal condition were higher than under high temperature condition, but pollen viability not different. To evaluate HSPs genes expression, *OsHsfA7*, *OsHsfA2e* and *OsHsfA4d* showed high expression both of tissues in high temperature condition. Thus, HSPs genes will express at high level when rice plant is treated with high temperature stress.

คำสำคัญ: ข้าว, การแสดงออกของยีน, อุณหภูมิสูง, โปรตีน Heat shock

Key words: rice, gene expression, high temperature, heat shock proteins

บทนำ

อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสขึ้นไป เป็นช่วงวิกฤติของข้าวในระยะเจริญพันธุ์มีผลต่อข้าวในระยะตั้งท้อง ระยะออกรวง ระยะผสมเกสร และระยะการพัฒนาเมล็ด ส่งผลต่อการผสมเกสรไม่ติด และทำให้ผลผลิตลดลง (Jagadish *et al.*, 2010) และจากการศึกษาในระดับพันธุศาสตร์โมเลกุลพบว่า Heat shock protein (HSPs) เป็นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องต่อการตอบสนองของพืชในสภาพเครียดต่างๆ โดยมีหน้าที่หลักในการรักษาสภาวะคงที่ของโปรตีนเมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม สามารถแบ่ง HSPs ตามน้ำหนักโมเลกุลได้ 5 กลุ่ม ได้แก่ HSP100s, HSP90s, HSP70s, HSP60s และ sHSPs (small HSPs <40 kDa) (Sung *et al.*, 2001) และหากจำแนก Heat stress transcription factor (Hsfs) ในพืชตามลักษณะโครงสร้างที่จำเพาะแบบ heptad hydrophobic repeat (HR - A/B) สามารถจำแนกออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ A, B และ C (Ai-Ling *et al.*, 2010) Guan *et al.* (2004) ได้วิเคราะห์การแสดงออกของยีน HSPs โดยวิธี microarray พบว่ายีนในกลุ่ม small Heat shock protein (sHSPs) พบระดับการแสดงออกที่สูงเมื่อข้าวได้รับอุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ในเวลาเพียง 5 นาที ในขณะที่ Hu *et al.* (2009) พบ 9 ยีนในกลุ่ม HSP70 และ 1 ยีนในกลุ่ม Hsp90 มีการตอบสนองอย่างมากเมื่อได้รับอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการแสดงออกของยีน heat shock protein ที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ข้าวที่ทนทานต่ออุณหภูมิสูง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การปลูกและเก็บข้อมูลทางการเกษตร

ปลูกข้าวหอมนิลพันธุ์กลายชั่วที่ 6 (M_6) เบอร์ 7988 (ทนต่ออุณหภูมิสูง) และ 7766 (ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง) ที่ผ่านการคัดเลือกที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส ในช่วงที่ 5 (M_5) ร่วมกับพันธุ์หอมนิล wild type โดยวางแผนการทดลองแบบ split plot in CRD 3 ซ้ำ โดยให้ปัจจัยหลัก คือ สภาพอุณหภูมิสูงในโรงเรือน และอุณหภูมิปกติในแปลงทดลอง ส่วนข้าว 3 สายพันธุ์ เป็นปัจจัยรอง เมื่อข้าวเข้าสู่ระยะตั้งท้อง (R_2) ย้ายข้าวครึ่งหนึ่งเข้าสู่โรงเรือนที่มีการควบคุมอุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส เมื่อถึงระยะดอกเริ่มบาน (R_4) เก็บละอองเกสรเพื่อทดสอบความมีชีวิต และการงอกของละอองเกสร และเมื่อถึงระยะสุกแก่ทางสรีระวิทยา จึงวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด

2. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน HSPs

ทำการเก็บใบธงและดอกข้าวที่ระยะ R_2 เพื่อสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี Trizol (Invitrogen) ตรวจสอบคุณภาพ total RNA ด้วย Agarose gel electrophoresis วัดปริมาณความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่อง nanodrop ออกแบบไพรเมอร์ของยีน *OsHsfA7*, *OsHsfA9*, *OsHsfA2e* และ *OsHsfA4d* โดยใช้ยีน *OsUbpq* เป็นยีนควบคุม หลังจากนั้นปรับความเข้มข้นของ RNA ให้ได้ 100 ng/ μ l และสังเคราะห์เป็น cDNA ด้วยชุด RT-PCR cDNA synthesis Kit (BIO RAD) หลังจากนั้นวัดความเข้มข้นของ cDNA ที่สังเคราะห์ได้อีกครั้ง เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ 100 ng/ μ l ใช้ cDNA 1 μ l สำหรับวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค Real-Time PCR ด้วยชุดทดลอง KAPA SYBR FAST qPCR Kit (KAPA) โดยเครื่อง Bio RAD

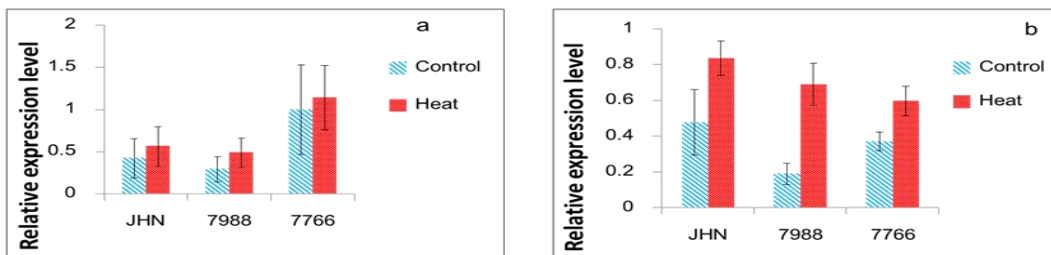
ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองพบว่าสายพันธุ์ข้าวหอมนิล (M_6) ที่ปลูกในสภาพอุณหภูมิปกติให้เปอร์เซ็นต์ความงอกของละอองเกสร และเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดสูงกว่าภายในโรงเรือนควบคุมอุณหภูมิ แต่เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเกสรไม่มีความแตกต่างกันทั้งในระหว่างสายพันธุ์ และในระหว่างสภาพอุณหภูมิ (ตารางที่ 1) เมื่อพิจารณาสายพันธุ์กลายที่อยู่ในสภาพอุณหภูมิสูงพบว่า สายพันธุ์ 7988 ยังคงให้เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดได้ดี เหมือนกับรุ่น M_5 คือ 58.20 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สายพันธุ์ 7766 ยังคงมีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดที่ต่ำเช่นเดิม คือ 18.36 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดเป็นผลเนื่องมาจากความสามารถในการงอกของละอองเกสรเมื่อพิจารณาในสภาพอุณหภูมิปกติ พบว่าพันธุ์ wild type และสายพันธุ์ 7988 มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดที่ไม่

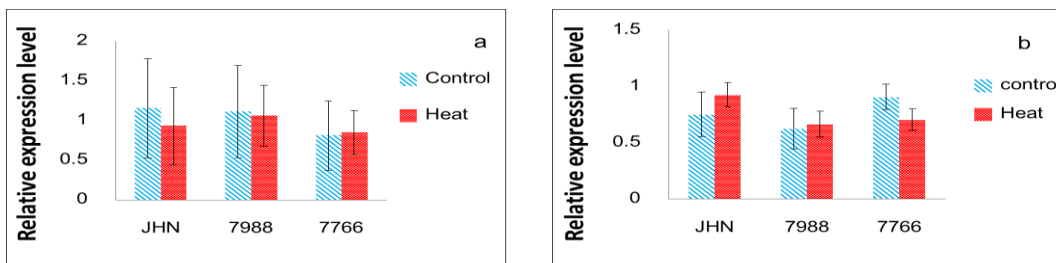
แตกต่างกัน ในขณะที่สายพันธุ์ 7766 ยังคงมีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดที่ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบการแสดงผลของยีน *OsHsfA7*, *OsHsfA9*, *OsHsfA2e* และ *OsHsfA4d* (รูปที่1-4) ในใบธงและดอกกระยะ R₄ ระหว่างสภาพอุณหภูมิ พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นยีน HSPs ทั้ง 3 ยีน คือ *OsHsfA7*, *OsHsfA2e* และ *OsHsfA4d* มีการแสดงออกในระดับที่สูงกว่าข้าวที่อยู่ในสภาพอุณหภูมิปกติ ยกเว้นยีน *OsHsfA9* ที่มีการแสดงออกในสภาพอุณหภูมิที่ไม่แตกต่างกันนัก ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Ai-Ling *et al.* (2010) ที่พบว่าการแสดงออกของยีน *OsHsfA9* ไม่ตอบสนองต่อสภาพอุณหภูมิสูง อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองไม่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ที่ทนทานและไม่ทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูงได้จากการแสดงออกของทั้ง 3 ยีนดังกล่าว ดังนั้นการคัดเลือกพันธุ์ข้าวให้ทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูงควรพิจารณาจากพีนไทป์เป็นหลัก และต้องมีการศึกษายีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาดอก และการสร้างเมล็ดข้าวด้วย เพื่อให้ทราบถึงยีนที่มีอิทธิพลต่อการทนทานต่ออุณหภูมิสูงต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด ความมีชีวิตของละอองเกสร และความงอกของละอองเกสร

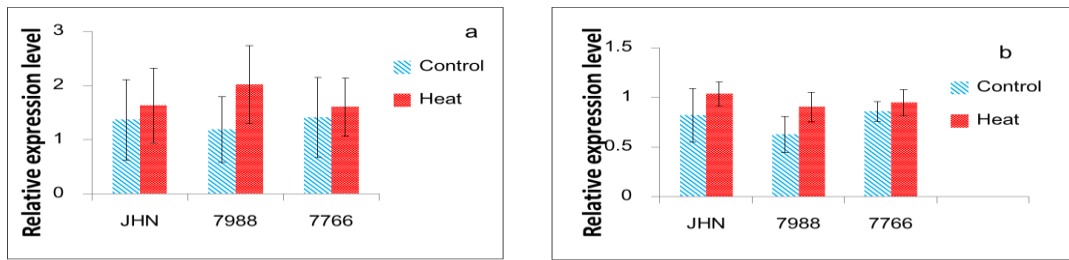
สายพันธุ์	เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด		ความมีชีวิตของละอองเกสร		ความงอกของละอองเกสร	
	แปลงทดลอง	โรงเรือน	แปลงทดลอง	โรงเรือน	แปลงทดลอง	โรงเรือน
เจ้าหอมนิล	76.9 a	43.21 c	96.41 ab	93.11 ab	76.96 a	53.79 b
M 7988	70.69 a	58.20 b	98.01 a	94.42 ab	82.28 a	76.72 a
M 7766	68.52 b	18.36 c	88.42 b	92.97 ab	70.9 a	43.93 b
LSD (0.05)	13.11		8.25		14.65	
TxV						



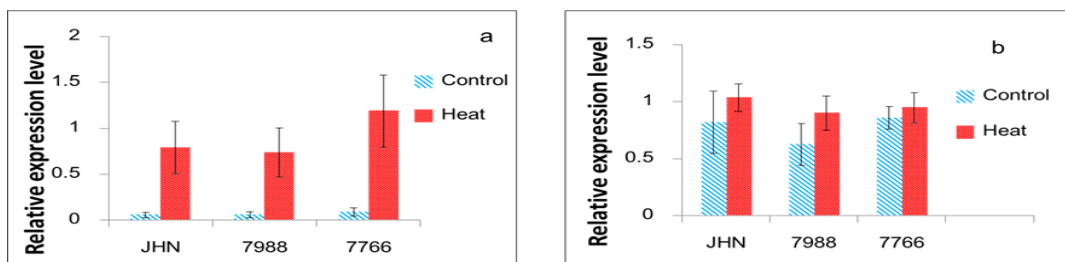
รูปที่ 1 (a) การแสดงออกของยีน *OsHsfA7* ที่ใบ (b) การแสดงออกของยีน *OsHsfA7* ที่ดอก



รูปที่ 2 (a) การแสดงออกของยีน *OsHsfA9* ที่ใบ (b) การแสดงออกของยีน *OsHsfA9* ที่ดอก



รูปที่ 3 (a) การแสดงออกของยีน *OsHsfA2e* ที่ใบ (b) การแสดงออกของยีน *OsHsfA2e* ที่ดอก



รูปที่ 4 (a) การแสดงออกของยีน *OsHsfA4d* ที่ใบ (b) การแสดงออกของยีน *OsHsfA4d* ที่ดอก

สรุปผลการทดลอง

สายพันธุ์ข้าวหอมนิลพันธุ์กลาย 7988 (M_0) ยังคงมีความสามารถในการติดเมล็ดที่อุณหภูมิสูงในระดับที่ดีกว่าพันธุ์ wild type ในสภาพอุณหภูมิสูงและเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน HSPs 3 ยีน คือ *OsHsfA7*, *OsHsfA2e* และ *OsHsfA4d* พบว่าข้าวที่ปลูกในสภาพอุณหภูมิสูงมีการแสดงออกที่สูงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวในสภาพอุณหภูมิปกติ อย่างไรก็ตามยีนดังกล่าวไม่แสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่ทนทาน และไม่ทนทานต่ออุณหภูมิสูงได้

เอกสารอ้างอิง

- Guan J.C., Jinn T.L., Yeh C.H., Feng S.P. Chen Y.M. and Lin C.Y. 2004. Characterization of the genomic structures and selection profiles of nine class I small heat shock protein genes clustered on two chromosomes in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology*. 56: 795-809.
- Hu W., Hu G. and Han B. 2009. Genome-wide survey and expression profiling of heat shock proteins and heat shock factors revealed overlapped and stress specific response under abiotic stresses in rice. *Plant Science*. 176: 583-590.
- Jagadish S.V.K., Mathurajan R., Oane R., Wheeler T.R., Heuer S., Bennett J. and Craufurd P.Q. 2010. Physiological and proteomic approaches to address heat tolerance during anthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*. 61: 143-156.
- Ling, AL., J., Zou, XW., Zhang, XY., Zhou, WF., Wang, XY., Xiong, LY., Chen, XB., Chen. 2010. Expression profiles of class a rice heat shock transcription factor genes under abiotic stresses. *Plant Biology*. 53: 142-149.
- Sung D.Y., Vierling E. and Guy C.L. 2001. Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis Hsp70 gene family. *Plant Physiology* 126: 789-800.