การค้นหาความแตกต่างในระดับจีโนมของข้าวเจ้าหอมนิลและข้าวเจ้าหอมนิลพันธุ์กลายที่ทนทานต่อสภาวะอุณหภูมิสูงโดยใช้เทคนิค single feature polymorphism (SFP)

Identification of Genomes Differential Between Jao Hom Nin Wild Type and Mutant Line that Tolerate to High Temperature by Using Single Feature Polymorphism (SFP)

กุหลาบ สีสุขกลาง[1], **สุไลมาน เจ๊ะอาบู**[1] , **วินิตชาญ รื่นใจชน**[2], **อภิชาติ วรรณวิจิตร**[1,3], **พูนพิภพ เกษมทรัพย์**[4] **และ ชเนษฎ์ ม้าลำพอง**[1]*

Kularb Srisookklang[1], Sulaiman Che-abu[1], Vinitchan Ruanjaichon[2], Apichart Vanavichit[1,3], Poonpipope Kasemsap[4] and Chanate Malumpong[1]*

[1]ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน; [2]หน่วยค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ; [3]ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140; [4]ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[1]Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphengsaen; [2]Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC); [3]Rice Science Center, Kasetsart University, Kamphengsaen Campus, Nakhon Pathom 73140; [4]Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

**Corresponding author: agrcnm@ku.ac.th*

บทคัดย่อ

เทคนิคการค้นหาความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้งจีโนมโดย single feature polymorphism (SFP) ได้ถูกนำมาใช้ค้นหาความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวเจ้าหอมนิล (JHN-wild type) และข้าวเจ้าหอมนิลพันธุ์กลายที่ทนทานต่ออุณหภูมิสูงที่ระดับ 40 - 45 องศาเซลเซียส คือ สายพันธุ์ M9962 (M_6) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเทคนิค SFP สามารถคาดหมายความแตกต่างจีโนไทป์ได้อย่างแม่นยำ พบว่ามียีนที่คาดว่ามีความแตกต่างกันจำนวนทั้งหมด 1,300 ยีน (1,330 โพรบ) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $P<0.01$ และมีค่า false discovery rate (FDR) เท่ากับ 33 เปอร์เซ็นต์ ความแตกต่างของยีนที่พบกระจายตัวอยู่ทุกโครโมโซม โดยพบความแตกต่างมากที่สุดในโครโมโซมที่ 4 (17.8%) เมื่อถูกนำมาวิเคราะห์ในฐานข้อมูล RiceChip (http://www.ricechip.org/) พบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับยีนในกลุ่มของ Heat Shock Protein (Hsp) จำนวน 8 ยีน ได้แก่ LOC_Os06g06490 (Os.11376.1.S1_at), LOC_Os10g07210 (Os.18511.1.S1_at), LOC_Os08g38300 (OsAffx.29587.1.S1_s_at), LOC_Os06g13060 (OsAffx.4821.1.S1_at), LOC_Os06g11440 (Os.7473.1.S1_at), LOC_Os10g07200 (Os.14575.1.S1_a_at), LOC_Os12g38180 (Os.38164.1.S2_at) และ LOC_Os01g32870 (OsAffx.11289.1.S1_x_at) ซึ่งคาดว่าเกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะทนต่ออุณหภูมิสูงในข้าวพันธุ์กลาย ดังนั้นเทคนิคดังกล่าวจึงเป็นทางเลือกใหม่ที่สามารถค้นหาความแตกต่างของจีโนมระหว่างพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว

ABSTRACT

Techniques to find the different genes and genomes by single feature polymorphism (SFP) has been used to find the difference genomes between Jao Hom Nin wild type (JHN-wild type) and Jao Hom Nin mutant line M9962 (M_6) that tolerance to high temperatures at 40-45 degree celsius. The results showed that this technique can find different SFP in the genotype precisely. The polymorphism have been identified in 1,300 different genes (1,330 probes), throughout every chromosome with the level of confidence at $P < 0.01$ and a false discovery rate (FDR) of 33 percentage; however, the most significant difference are found in chromosome 4 (17.8%). When these loci were further analyzed in RiceChip database (http://www.ricechip.org/), it was expected that 8 genes in Heat Shock Protein (Hsps) family, including LOC_Os06g06490 (Os.11376.1.S1_at), LOC_Os10g07210 (Os.18511.1.S1_at), LOC_Os08g38300 (OsAffx.29587.1.S1_s_at), LOC_Os06g13060 (OsAffx.4821.1.S1_at), LOC_Os06g11440 (Os.7473.1.S1_at), LOC_Os10g07200 (Os.14575.1.S1_a_at), LOC_Os12g38180 (Os.38164.1.S2_at) and LOC_Os01g32870 (OsAffx.11289.1.S1_x_at), are involved in the control of the rice mutant tolerance to high temperatures Thus, SFP technique can be used to discover polymorphism between the genomes effectively.

คำสำคัญ: single feature polymorphism (SFP), ทนทานต่ออุณหภูมิสูง, heat shock protein (Hsp)

Keywords: single feature polymorphism (SFP), heat tolerant, heat shock protein (Hsp)

บทนำ

ภาวะโลกร้อนส่งผลทำให้ผลผลิตของข้าวลดลง (Liu *et al*., 2010) ซึ่งมีผลจากดอกข้าวเป็นหมันเนื่องจากความมีชีวิตของละอองเกสรและความงอกของละอองเกสรลดลง อับละอองเกสรไม่แตก จึงส่งผลให้การติดเมล็ดบนรวงลดลง (Prasad *et al*., 2006) ดังนั้นจึงได้คัดเลือกข้าวเจ้า หอมนิลที่ผ่านการฉายรังสี fast neutron จากโครงการ TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) ของศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน พบว่า สายพันธุ์ M9962 ชั่วที่ 5 (M_5) มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดได้ดีในอุณหภูมิสูงที่40 - 45 องศาเซลเซียส ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาความแตกต่างในระดับจีโนมของสายพันธุ์ดังกล่าวกับพันธุ์ wild type โดยใช้เทคนิค Single Feature Polymorphisms (SFPs) โดยอาศัยหลักการ homology กล่าวคือ ลำดับเบสที่คล้ายกับลำดับเบสของ probe/feature บน array ย่อมให้ hybridization signal ได้ดีกว่าลำดับเบสที่เหมือนน้อยกว่า (Kumar *et al*, 2007) ซึ่งยีนในกลุ่มของ Heat Shock Protein (HSPs) และ โปรตีน Histone เป็นยีนคาดหมายที่เกี่ยวข้องกับความทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูง หน้าที่หลักของ HSPs คือ ทำหน้าที่เป็น chaperones ที่มีหน้าที่ซ่อมแซมโปรตีนที่เสียหายและรักษาสภาวะคงที่ของโปรตีนเมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม (Mehta *et al*. 2005: 1) ส่วนโปรตีน Histone มีความเกี่ยวข้องกับการม้วนตัวของดีเอ็นเอ (DNA) และการแสดงออกของยีน (gene) (โชติกา: 2554)

อุปกรณ์และวิธีการ

ปลูกข้าวสายพันธุ์ M9962 ชั่วที่ 6 (M_6) และ ข้าวเจ้าหอมนิล (wild type) จำนวนสายพันธุ์ละ 10 ต้น เมื่อข้าวอายุได้ 60 วัน ทำการเก็บตัวอย่างใบส่วนบนของข้าว 3 ต้น จากแต่ละสายพันธุ์ เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ และบันทึกข้อมูลที่สำคัญได้แก่ ความยาวรวง ความมีชีวิตของละอองเกสร การงอกของละอองเกสร สัณฐานของอับละอองเกสร เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด จำนวนเมล็ดดีต่อรวง และน้ำหนัก 100 เมล็ด

สกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี CTAB นำ DNA มาติดฉลาก (biotin-dCTP) ด้วย bio-prime labeling kit (invitrogen) โพรบที่ได้จากการติดฉลากมีขนาดประมาณ 80-100 คู่เบส และมีความเข้มข้นอยู่ที่ประมาณ 30 - 35 ไมโครกรัม นำโพรบมาทำปฏิกิริยา hybridization ตามขั้นตอนมาตรฐานของคู่มือ RNA protocol ของ affymetrix เปลี่ยนค่า hybridization intensity ที่ตำแหน่ง probe/feature ประมาณ 630,000 ตำแหน่งให้เป็นค่า log2 โดยโปรแกรม GCOS1.3 (Affymetrix) จากนั้นจึงวิเคราะห์คุณภาพของข้อมูลโดย density plot และ pair-wise scatter plot ใช้แพกเกจ SIGGENE (www.bioconductor.org) และ SAM procedure ใน R language software เพื่อตรวจหา SFP และวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองและวิจารณ์

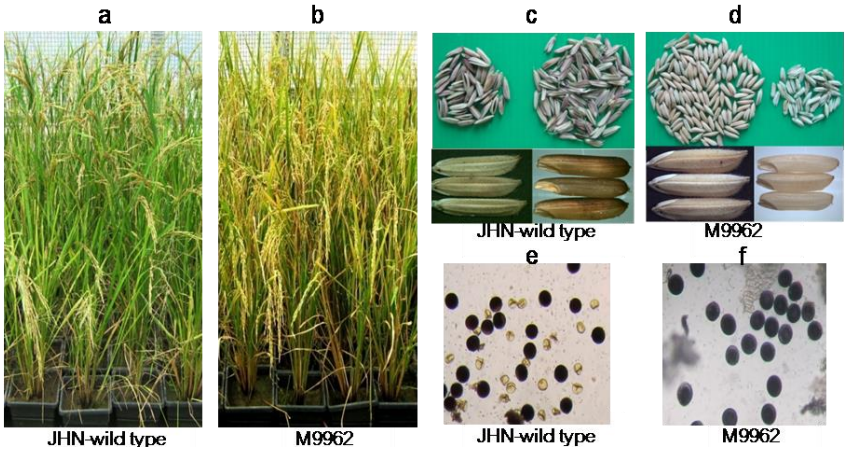
1. **ลักษณะทางเกษตรของข้าวพันธุ์กลาย M9962**

จากการทดลองพบว่า ข้าวสายพันธุ์ M9962 เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวเจ้าหอมนิลมีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด 79.87 เปอร์เซ็นต์ และ 34.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (LSD<0.01) ซึ่งเป็นผลมาจากความมีชีวิตของละอองเกสรที่สูงกว่าพันธุ์ JHN - wild type 80 เปอร์เซ็นต์ และ 51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 1e และ f) ส่วนลักษณะทางเกษตรอื่น ๆ พบว่า สายพันธุ์ M9962 มีจำนวนดอกย่อยต่อรวงเฉลี่ย 128 ดอก ในขณะที่พันธุ์ JHN - wild type มีจำนวนดอกย่อยต่อรวงเฉลี่ยท่ากับ 117 ดอก (LSD<0.01) สายพันธุ์ M9962 มีน้ำหนัก 100 เมล็ดเฉลี่ย 1.93 กรัม ส่วนพันธุ์ JHN - wild type มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.21 กรัม (LSD<0.01)

2. **ความแตกต่างทางจีโนมของข้าวพันธุ์กลาย**

ผลการทดลองพบว่าความแม่นยำของ SFP ในการค้นหาความแตกต่างบน genomic sequence ระหว่าง ข้าวเจ้าหอมนิลกับ M9962 ที่ระดับความเชื่อมั่น delta 1.8 ซึ่งคาดหมาย SFP ได้จำนวน 1,330 SFP ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $P<0.01$ และมีค่า false discovery rate (FDR) เท่ากับ 33 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ 1,330 SFP ที่เลือกมาทดสอบนี้ครอบคลุม SFP ที่ เปอร์เซ็นต์ FDR ต่ำลงมาตั้งแต่ 32.7 – 16.7 เปอร์เซ็นต์ ที่ delta 2.3 – 5.1

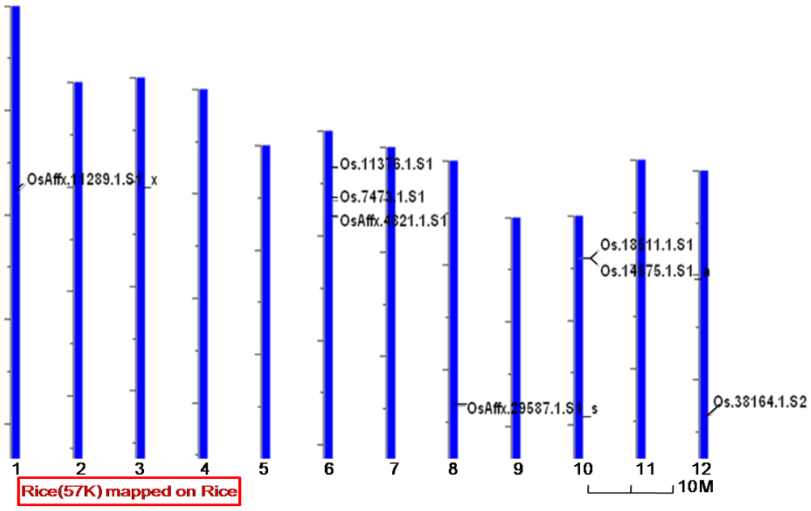
ด้วย เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล TIGR Os1 version 5 สำหรับการกระจายตัวของ SFP ทั้งจีโนมข้าว พบว่าโครโมโซมคู่ที่ 4 มีจำนวน SFP มากที่สุด คือ 232 ของจำนวน SFP ทั้งหมด ส่วนโครโมโซมคู่ที่ 9 มีจำนวน SFP น้อยที่สุด คือ 36 ของจำนวน SFP ทั้งหมด นอกจากนี้ยังว่า มี 8 SFP ที่มีความเกี่ยวข้องกับยีนในกลุ่ม HSPs ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยกลุ่มยีน HSPs ที่พบเป็นกลุ่ม HSPs70 และ HSPs20 นอกจากนี้ยังพบโปรตีน Histone ชนิด H2B ณ ตำแหน่ง OsAffx.29587.1.S1_s_at และยังพบ chaperone protein ณ ตำแหน่ง Os.7473.1.S1_at ด้วย จากรูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของ 8 SFP ที่มีการกระจายตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 1, 6, 8, 10 และ 12 โดย บนโครโมโซมที่ 6 พบ 3 ตำแหน่ง โครโมโซมที่ 10 พบ 2 ตำแหน่ง และโครโมโซมที่ 1, 8, และ 12 พบ 1 ตำแหน่ง



รูปที่ 1 แสดงลักษณะทรงต้น (a และ b) การติดเมล็ดและลักษณะเมล็ด (c และ d) และความมีชีวิตของละอองเกสร (e และ f) ระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับข้าวพันธุ์กลาย M9962

ตารางที่ 1 แสดง probe set ที่ถูกคาดหมาย SFP ในจีโนมข้าวที่คาดว่ามี Hsp family จำนวน 8 ยีน จากทั้งหมด 1,330 ยีน

Probeset	Accession	Reference_Description	E-value
Os.11376.1.S1_at	AK063418	HEAT/U-box domain-containing protein	3.00E-21
Os.18511.1.S1_at	AK107162	Heat shock protein Hsp20 domain containing protein contains InterPro-domain (s)	0
OsAffx.29587.1.S1_s_at	.	Histone H2B.2	0
OsAffx.4821.1.S1_at	.	heat shock protein , putative, expressed	0
Os.7473.1.S1_at	CF313824	Putative chaperone protein	1.00E-122
Os.14575.1.S1_a_at	AK064267	hsp20/alpha crystallin family protein, putative, expressed	1.00E-157
Os.38164.1.S2_at	AK099797	HSC70-1, HSP70-1, AT-HSC70-1, HSC70 | heat shock cognate protein 70-1	1.00E-135
OsAffx.11289.1.S1_x_at	.	heat shock protein, putative, expressed	1.00E-110



รูปที่ 2 แสดง probe set ที่คาดหมาย SFP ในจีโนมข้าวที่มี Hsp family จำนวน 8 ยีน ที่อยู่บนโครโมโซมตำแหน่งต่างๆ

สรุปผลการทดลอง

จากการ เปรียบเทียบระหว่างข้าวเจ้าหอมนิล และข้าวพันธุ์กลาย M9962 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดที่ต่างกันอย่างชัดเจน และพบ SFP 1,330 ตำแหน่ง ที่มีความแตกต่างกัน โดยมี 8 SFP ที่มีความเกี่ยวข้องกับ ยีนกลุ่ม HSPs family ซึ่งจะได้ทดสอบการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค microarray และเทคนิค real time PCR รวมทั้งการค้นคว้าหายีนกลุ่มอื่นที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรวงและดอก เพื่อค้นยีนหลัก (major genes) ที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการทนทานต่ออุณหภูมิสูงในระยะเจริญพันธุ์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

โชติกา หยกทองวัฒนา. 2554. เอพิเจเนติก-การควบคุมเหนือลำดับดีเอ็นเอ. Thai Journal of Genetics. 4(2) : 71-84 น.

Kumar, R., Qiu, J., Joshi, T., Valliyodan, B., D. Xu and H.T. Nguyen. 2007. Single feature polymorphism discovery in rice. PLoS ONE. 2: e284 doi:10.1371/journal.pone. 0000284

Liu, A.L., Zou J., Zhang X.W., Zhou X.Y., Wang W.F., Xing X.Y., Chen L.Y. and Chen X.B. 2010. expression profiles of class a rice heat shock transcription factor genes under abiotic stresses. Plant Biology. 53:142–149.

Mehta, T.A., Greenman J., Ettelaie C., Venkatasubramaniam A., Chetter I.C. and McCollum P.T. 2005. Heat shock protein in vascular disease. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. 1, 1-8.

Prasad P.V.V., Boote K.J., Allen L.H., Sheehy J.E. and Thomas J.M.G. 2006. Species, ecotype and cultivar differences in spikelet fertility and harvest index of rice in reponse to high temperature stress. Field Crops Research. 95: 398-411.