

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ผู้รับทุนขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2557 ขอขอบคุณนายไตรเลิศ ชัยเชิดสกุล นิสิตในหลักสูตรวิทยาศาสตร์ดุष्ฎิบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี และนายวรวัฒน์ ยืนยง นิสิตในหลักสูตรวิทยาศาสตรดุष्ฎิบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล ที่เป็นผู้ดำเนินการทดลอง ตลอดจนอาจารย์และนิสิตภาควิชาชีวเคมี สำหรับคำแนะนำ การอภิปราย และความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดโครงการวิจัย

ธีรพงษ์ บัวบูชา

ศุภอรรถ ศิริกันทรมาศ

นุชนาถ วุฒิประดิษฐกุล

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: GRB_BSS_65_57_53_06

ชื่อโครงการ: การค้นหายีนที่ควบคุมโดยโปรตีนคัลมอดูลินในการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดจากสิ่งแวดล้อมของข้าว *Oryza sativa* L.

ชื่อนักวิจัย: รองศาสตราจารย์ ดร. อีรพงษ์ บัวบูชา
 อาจารย์ ดร. ศุภอรจร ศิริกันทรมาศ
 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นุชนาถ วุฒิประดิษฐกุล
 ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Email Address: Teerapong.B@Chula.ac.th

ระยะเวลาดำเนินการ: 1 ตุลาคม 2556 – 30 กันยายน 2557

การวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์เชิงเปรียบเทียบของข้าว (*Oryza sativa* L.) ทรานส์เจนิคสายพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่มีการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติซึ่งแสดงลักษณะทนเค็ม สามารถระบุโปรตีนที่แสดงออกแตกต่างกับข้าว wild-type จำนวน 77 ชนิด ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกทรานสคริปของยีน *LOC_Os02g11820* ที่สร้าง GTPase-activating protein ซึ่งเป็นหนึ่งในโปรตีนที่แสดงออกแตกต่างกันด้วยวิธี real-time RT-PCR พบว่าข้าวทรานส์เจนิคมีระดับทรานสคริปสูงกว่าข้าว wild-type การวิเคราะห์การแสดงออกร่วมชี้ให้เห็นว่ายีน *LOC_Os02g11820* มีการแสดงออกร่วมเชิงบวกกับยีนสร้างเอนไซม์ peroxidase หลายยีน และมีการแสดงออกร่วมเชิงลบกับยีนสร้างเอนไซม์ glutathione transferase หลายยีน ภายใต้ความเครียดจากความเค็ม (150 mM NaCl) พบว่าแอกติวิตีของ guaiacol peroxidase ในข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติถูกกระตุ้นให้มีระดับสูงกว่าข้าว wild-type และข้าวทรานส์เจนิคควบคุม แต่ข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติมีการชักนำแอกติวิตีของ glutathione transferase ที่ต่ำกว่าและช้ากว่า ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกเกินปกติของยีน *OsCam1-1* อาจส่งผลต่อระบบเอนไซม์ต้านออกซิเดชันของข้าวทรานส์เจนิคภายใต้ภาวะความเครียดจากความเค็ม

คำสำคัญ โปรตีโอมิกส์; คัลมอดูลิน; เพอร์ออกซิเดส; กลูตาไทโอนทรานสเฟอเรส; ความเครียดจากความเค็ม

Abstract

Project Code: GRB_BSS_65_57_53_06
Project Title: Identification of genes regulated by calmodulin protein in response to environmental stress of rice *Oryza sativa* L.
Investigator: Teerapong Buaboocha, Ph.D.
Supaart Sirikantaramas, Ph.D.
Nuchanat Wuttiapraditkul, Ph.D.
Department of Biochemistry, Faculty of Science
Chulalongkorn University
Email Address: Teerapong.B@Chula.ac.th
Project Period: 1 ตุลาคม 2555 – 30 กันยายน 2556

Comparative proteomic analysis of the salt tolerant transgenic rice *Oryza sativa* L. ‘KDML105’ overexpressing a calmodulin gene (*OsCam1-1*) identified 77 differentially expressed proteins compared to the wild-type. Real-time RT-PCR verified that the transcript expression level of *LOC_Os02g11820*, which encodes a GTPase-activating protein, one of the differentially expressed proteins, was expressed at a higher level in the transgenic rice. Co-expression analysis revealed that *LOC_Os02g11820* was positively coexpressed with several genes encoding peroxidases and negatively coexpressed with several genes encoding glutathione transferases. Under salt stress (150 mM NaCl), activity of guaiacol peroxidase in the *OsCam1-1* overexpressing rice was induced to higher levels when compared with those in the wild-type and the control transgenic rice. On the contrary, the *OsCam1-1* overexpressing rice exhibited lower and delayed induction of glutathione transferase activity. These results suggest that the *OsCam1-1* overexpression possibly affects the antioxidative enzymatic system of the transgenic rice grown under salt stress.

Key words: proteomics; calmodulin; peroxidase; glutathione transferase; salt stress

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

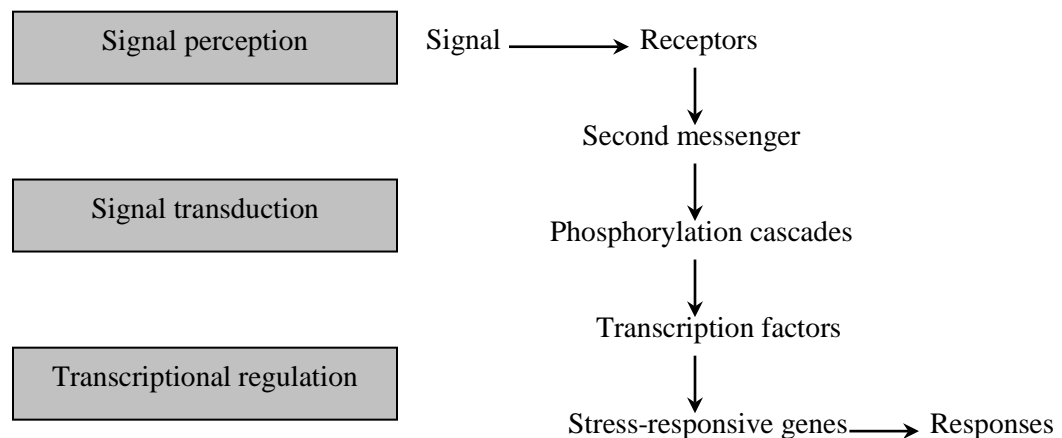
| | |
|---|-----|
| กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) | i |
| บทคัดย่อ | ii |
| Abstract | iii |
| บทนำ (Introduction) | 1 |
| วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Methods) | 7 |
| ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง (Results and Discussion) | 14 |
| สรุปผลการทดลอง (Conclusion) | 20 |
| บรรณานุกรม (Bibliography) | 21 |
| Supplementary data | 24 |
| ประวัติคณะผู้วิจัย | 27 |

บทนำ (Introduction)

การเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อม เช่น ความเค็มของดิน ความแล้ง ความร้อน ความเย็น แผลงศัตรูพืช และโรคพืช ส่งผลให้ระดับผลผลิตทางเกษตรลดลงกว่าที่ควรจะเป็น มนุษย์มีความพยายามที่จะปรับปรุงความต้านทานต่อภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเพื่อช่วยลดความเสียหายในเชิงการผลิตอย่างต่อเนื่อง แต่ความพยายามนี้จะประสบความสำเร็จอย่างแท้จริงจะต้องอาศัยความรู้ที่ได้จากการศึกษาในระดับลึกเกี่ยวกับกลไกการตอบสนองของพืชต่อภาวะดังกล่าว การศึกษาในระดับโมเลกุลจะช่วยให้เกิดความเข้าใจกลไกการตอบสนองของพืช และนำไปสู่การพัฒนาสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

คนไทยกินข้าวเป็นอาหารหลัก รวมทั้งข้าวยังเป็นสินค้าส่งออกอันดับต้นๆ ของประเทศมาเป็นเวลานานอย่างต่อเนื่อง ปัจจุบันภาวะแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วและรุนแรงมากขึ้น ส่งผลกระทบในทางลบต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของข้าว ผลผลิตทางการเกษตรโดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าวเป็นรากฐานทางเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อมและสภาพภูมิอากาศที่มีผลกระทบต่อผลผลิตทางการเกษตรจึงส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศ การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานต่อภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จึงเป็นการเตรียมพร้อมที่จะรับมือกับการเปลี่ยนแปลงและความแปรปรวนของภาวะแวดล้อมและสภาพภูมิอากาศที่กำลังเกิดขึ้น

กลไกการตอบสนองของพืชต่อภาวะแวดล้อมมีความซับซ้อนเป็นการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการต่างๆ ภายในของเซลล์ที่ได้รับผลกระทบจำนวนมาก โดยเริ่มจากการรับรู้สัญญาณ (signal perception) จากสิ่งแวดล้อม แล้วแปลงสัญญาณเหล่านั้นให้เป็นสัญญาณภายในเซลล์ โดยมีตัวส่งผ่านสัญญาณลำดับที่สอง (second messenger) เช่น แคลเซียม เกิดขึ้น จากนั้นเกิดการส่งผ่านสัญญาณภายในเซลล์ (signal transduction) ไปควบคุมการทำงานของโปรตีนทำงานเฉพาะที่เรียกรวมว่า effector หรือไปควบคุมการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนเหล่านี้ เพื่อตอบสนองในระดับเซลล์ต่อภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่เป็นสัญญาณเริ่มต้นอย่างเหมาะสม ดังตัวอย่างในรูปที่ 1



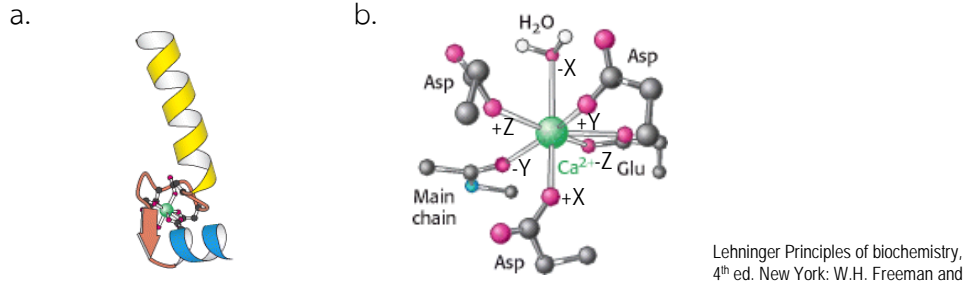
รูปที่ 1 ตัวอย่างกระบวนการรับรู้และส่งผ่านสัญญาณของพืช

จากการศึกษา gene expression profile ในระยะแรกของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ไม่ทนเค็ม (Kawasaki et al., 2001) พบว่าในภาวะความเค็มพืชทั้งสองชนิดมีการตอบสนองด้วยรูปแบบการ

แสดงออกของยีนที่คล้ายคลึงกันแต่เวลาที่เกิดการแสดงออกแตกต่างกันโดยในสายพันธุ์ที่ไม่ทนเค็มจะมีความล่าช้าของการตอบสนอง ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของกระบวนการรับรู้และส่งผ่านสัญญาณสิ่งแวดล้อม เช่นความเค็ม และอาจเป็นตัวกำหนดว่าพืชนั้นๆ จะมีความสามารถในการทนเค็มได้มากน้อยเพียงใด อย่างไรก็ตามในการปรับปรุงความสามารถในการทนเค็มโดยใช้วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล เช่น การสร้างพืชทรานส์เจนิก มีการใช้ยีนที่สร้างโปรตีน effector ซึ่งทำหน้าที่ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเค็ม และนำเข้าสู่พืชที่สนใจ แต่การเพิ่มการทำงานของ effector ที่เกี่ยวข้องเพียงตัวใดตัวหนึ่งจะไม่ค่อยส่งผลในระดับสรีรวิทยาของพืช นั่นคือ พืชทรานส์เจนิกอาจมีปริมาณ effector ชนิดนั้นๆ เพิ่มขึ้น รวมทั้งมีความสามารถในการรับส่งสัญญาณที่ effector นี้เกี่ยวข้องเพิ่มมากขึ้น แต่พืชดังกล่าวก็มักจะไม่แสดงความสามารถโดยรวมในการทนความเค็มหรือแสดงในระดับที่ต่ำมาก ดังนั้นเมื่อประกอบกับข้อสังเกตข้างต้นจาก gene expression profile จึงอาจเป็นไปได้ที่การปรับปรุงความสามารถในการทนการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อมจะประสบความสำเร็จมากขึ้นถ้าเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานขององค์ประกอบในกระบวนการรับรู้และส่งผ่านสัญญาณสิ่งแวดล้อม รวมทั้งกลไกควบคุมการแสดงออกของยีน (transcriptional regulation) ซึ่งกระบวนการเหล่านี้จะส่งผลถึงโปรตีน effector จำนวนมากในขณะเดียวกัน ดังนั้น ความรู้ความเข้าใจพื้นฐานเกี่ยวกับระบบการรับส่งสัญญาณในระดับต่างๆ ตั้งแต่ระดับของ signal perception และ signal transduction จนถึงระดับ transcriptional regulation จะมีส่วนทำให้การปรับปรุงความสามารถของพืชในการทนการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อมได้อย่างถูกต้องทิศทาง และมีประสิทธิภาพมากขึ้น

พืชใช้ไอออนของแคลเซียม (Ca^{2+}) ในการถ่ายทอดสัญญาณการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อมต่างๆ จำนวนมาก สัญญาณแคลเซียมนี้จะไปปรับเปลี่ยนกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ให้ตอบสนองต่อภาวะแวดล้อมเหล่านั้นอย่างเหมาะสม สัญญาณแคลเซียมเกิดขึ้นได้เมื่อความเข้มข้นของ Ca^{2+} ภายใน cytosol ของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากการทำงานร่วมกันระหว่าง Ca^{2+} -ATPase และ Ca^{2+} -channel (Knight, 2000; Sanders et al, 1999) การเพิ่มของ Ca^{2+} จะเกิดขึ้นเพียงชั่วคราว (transient) โดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Ca^{2+} นี้จะมีความหลากหลายทั้งในแง่ของบริเวณที่เกิดภายในเซลล์ และระยะเวลาและรูปแบบของการเพิ่ม เช่น อาจเพิ่มสูงต่อเนื่อง หรือเพิ่มขึ้นลงเป็นจังหวะ เป็นต้น (McAinsh et al, 2009) ดังนั้นเซลล์จึงมีกลไกในแยกแยะสัญญาณ Ca^{2+} ที่แตกต่างกันและไปควบคุมกระบวนการภายในเซลล์ที่จะตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นที่จำเพาะกับสัญญาณ Ca^{2+} เริ่มต้นอย่างเหมาะสม

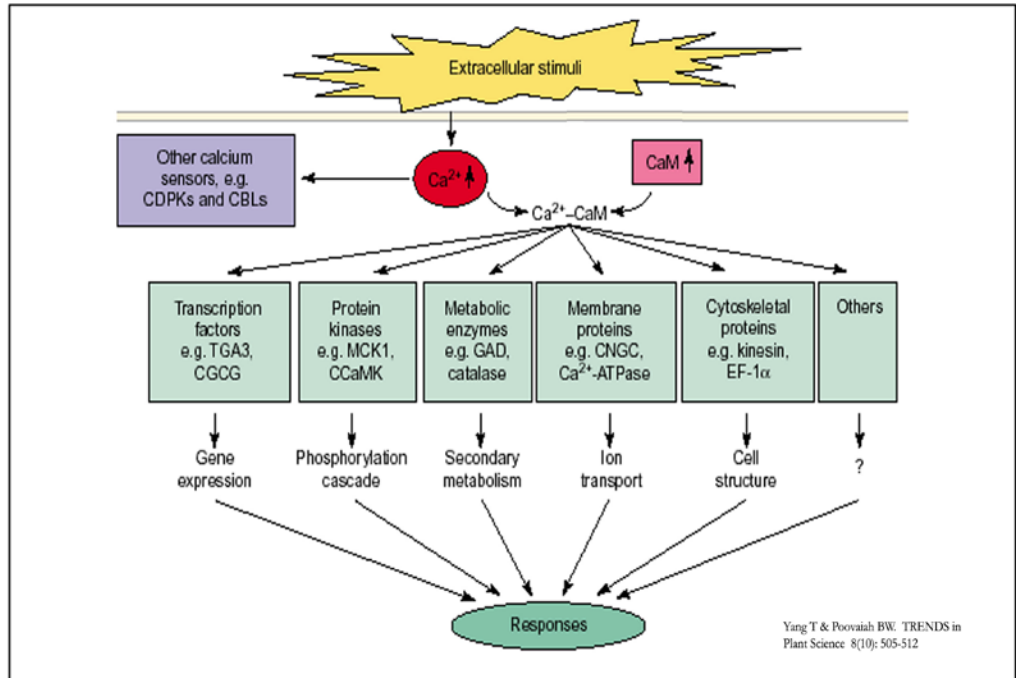
ในการส่งสัญญาณโดยผ่าน Ca^{2+} จะมีการรับสัญญาณการเพิ่มความเข้มข้นของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ที่เรียกว่า Ca^{2+} -modulated proteins โดย Ca^{2+} -modulated protein ส่วนใหญ่มีบริเวณจับแคลเซียมที่ประกอบด้วยโมติฟชนิด helix-loop-helix ที่เรียกว่า EF-hand (Kretsinger & Nockolds, 1973) ดังแสดงในรูปที่ 2 โดยแต่ละ loop ซึ่งรวมถึงส่วนปลายของ helix แห่งที่สองให้ ligand เจ็ดตำแหน่งที่สามารถจับกับ Ca^{2+} ด้วยรูปร่างแบบ pentagonal bipyramid โดย ligand ที่อยู่ภายในบริเวณนี้ถูกกำหนดให้เรียกว่า $+X^*+Y^*+Z^*-Y^*-X^{**}-Z$ (* แทนเรซิดิวส์ที่แทรกอยู่) ligand สำหรับการจับกับ Ca^{2+} นี้ สามตำแหน่งได้จาก carboxylate oxygen จากเรซิดิวส์ตำแหน่งที่ 1 (+X), 3 (+Y) และ 5 (+Z) หนึ่งตำแหน่งได้จาก carbonyl oxygen จากเรซิดิวส์ตำแหน่งที่ 7(-Y) และสองตำแหน่งได้จาก carboxylate oxygen ในเรซิดิวส์ตำแหน่งที่ 12(-Z) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น glutamate ที่มีความอนุรักษ์สูง ส่วน ligand ที่เจ็ดจะได้รับจาก carboxylate บนโซ่ข้างของเรซิดิวส์ตำแหน่ง 9 (-X) หรือจากโมเลกุลของน้ำ



รูปที่ 2 EF-hand (a) แสดงโครงสร้าง helix-loop-helix ที่จับกับ Ca^{2+} ที่พบในโปรตีนรับสัญญาณแคลเซียมจำนวนมาก (b) Ligands ทั้งเจ็ดตำแหน่งที่จับกับ Ca^{2+} ด้วยรูปร่างแบบ pentagonal bipyramid

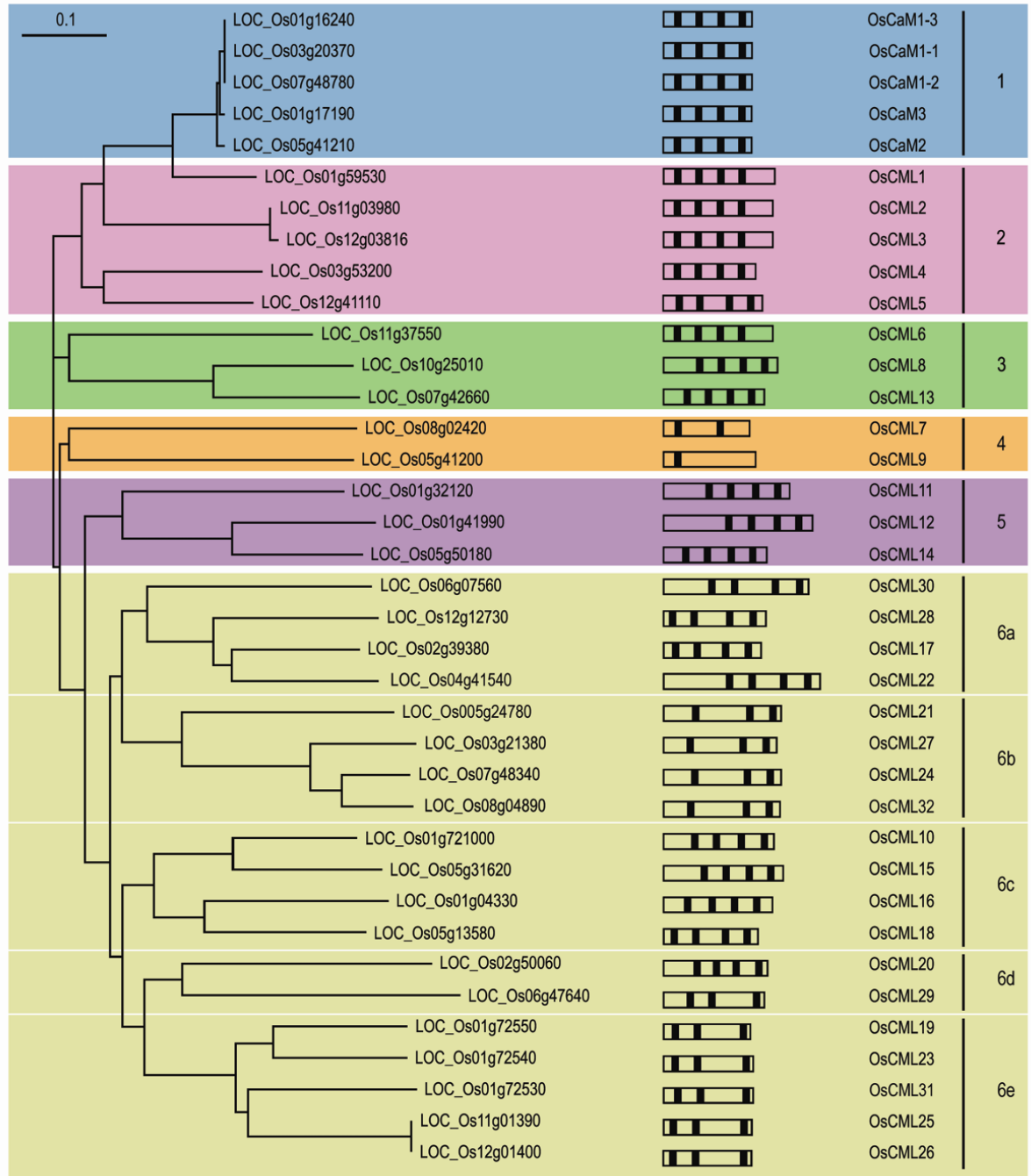
โปรตีนที่มี EF-hand มีความหลากหลายสูงทั้งโครงสร้าง องค์ประกอบ การจับกับ Ca^{2+} และการเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนเป้าหมาย (target protein) โปรตีนเหล่านี้มี 3 กลุ่มที่สำคัญ ได้แก่ calmodulin (CaM) (Zielinski, 1998), Ca^{2+} -dependent protein kinases (CDPKs) (Harmon et al, 2000) และ calcineurin-B-like (CBL) protein (Luan et al, 2002) CaM เป็นโปรตีนที่มีการศึกษามากที่สุดในโปรตีนทั้งสามกลุ่ม อย่างไรก็ตาม การศึกษากลไโรระดับโมเลกุลในรายละเอียดยังมีอยู่น้อยมาก เมื่อมีสัญญาณการเพิ่มความเข้มข้นของ Ca^{2+} เกิดขึ้นภายในเซลล์ CaM ทำงานโดยเข้าจับกับ Ca^{2+} เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ทำให้สามารถเข้าจับกับโปรตีนเป้าหมายชนิดต่างๆ เป็นการส่งผ่านสัญญาณเป็นลำดับต่อไป ซึ่งแตกต่างจาก CDPK ที่เป็นทั้ง sensor และ effector คือเมื่อได้รับสัญญาณ binding กับ Ca^{2+} จะกระตุ้นให้ kinase activity ของ CDPK ทำงานในการส่งสัญญาณเป็นลำดับเพื่อปรับเปลี่ยนกระบวนการภายในเซลล์ให้ตอบสนองต่อสัญญาณ เช่น ภาวะความเค็ม ภาวะแล้ง ได้อย่างเหมาะสมต่อไป สำหรับ CBL ซึ่งเป็นกลุ่ม calcium sensor ชนิดใหม่ที่ค้นพบภายหลังใน Arabidopsis ทำงานคล้ายคลึงกับ CaM คือจะทำงานโดยการจับกับโปรตีนเป้าหมายเพื่อเป็นการส่งสัญญาณ โดยคาดว่าน่าจะเป็นตัวส่งผ่านสัญญาณที่สำคัญสำหรับ stress หลายชนิดเช่นเดียวกัน

CaM เป็นโปรตีนขนาดเล็ก (148 เรซิดิวส์) ที่ประกอบด้วย EF-hand สองคู่เชื่อมต่อกันด้วย α -helix ที่เรียกว่า central helix ทำให้มีโครงสร้างคล้ายดัมเบล (Chattopadhyaya et al., 1992) โดยโดเมนทางด้าน N-terminal และ C-terminal ซึ่งประกอบด้วย EF-hand ด้านละหนึ่งคู่สามารถจับกับ Ca^{2+} ในลักษณะ cooperative โมเลกุล CaM ที่มีโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไปเมื่อจับกับ Ca^{2+} จะเข้าจับกับโปรตีนเป้าหมายโดยอาศัยพื้นผิวบนโมเลกุลที่มีสมบัติ hydrophobic จากโดเมนทั้งสองภายในโมเลกุล บริเวณพื้นผิวนี้อาจเกิดจากกรดอะมิโน methionine และ phenylalanine ที่กระจายอยู่ภายใน primary structure ของ CaM (O'Neil & DeGrado, 1990) เมื่อ EF-hand จับ Ca^{2+} บริเวณพื้นผิว hydrophobic ประกอบกับ central helix ที่มีความยืดหยุ่นสูงจะช่วยให้ CaM เกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนเป้าหมายได้หลากหลายชนิด โปรตีนเป้าหมายของพืชที่รู้จักในปัจจุบันมีหน้าที่ที่แตกต่างกันไป เช่น metabolic enzyme, kinases และ phosphatase, transport protein, cytoskeletal protein และ transcription factor ดังตัวอย่างในรูปที่ 3 อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการค้นพบโปรตีนเป้าหมายของ CaM ในข้าวเลย



รูปที่ 3 แสดงแผนภาพการทำงานในการสื่อสารสัญญาณจากสิ่งแวดล้อมภายนอกของ Ca^{2+} /calmodulin

พืชมีลักษณะพิเศษซึ่งแตกต่างจากสัตว์และยีสต์ตรงที่พืชแต่ละสปีชีส์จะมีโปรตีน CaM หลายชนิด ซึ่งมีรายงานการค้นพบในพืชหลายสปีชีส์ เช่น มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) (Takezawa et al, 1995) ถั่วเหลือง (*Glycine Max*) (Lee et al, 1995) พืชเนย (*Petunia hybrida*) (Rodriguez-Concepcion et al, 1999) ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) (Yamakawa et al, 2001) และถั่ว (*Pisum sativum*) (Duval et al., 2002) จากการสืบค้นฐานข้อมูลของจีโนมข้าวพบว่ามียีนสร้างโปรตีน CaM และ โปรตีนคล้าย CaM หรือที่เรียกว่า CaM-like (CML) กว่า 37 ยีน (Boonburapong & Buaboocha, 2007) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าสามารถจัดกลุ่มโปรตีนเหล่านี้เป็น 6 กลุ่ม ดังรูปที่ 4 กลุ่มแรกเป็นโปรตีน CaM ที่มีความอนุรักษ์สูง ส่วนโปรตีนในอีก 5 กลุ่มเป็นโปรตีน CML ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 145 ถึง 250 เรซิดิวส์ มีจำนวนโมติฟจับกับแคลเซียมที่เรียกว่า EF hand ตั้งแต่ 1 ถึง 4 บริเวณ และมีความคล้ายของลำดับกรดอะมิโนกับ CaM ตั้งแต่ 30% ถึง 85% โปรตีน OsCaM และ OsCML เกือบทั้งหมดยังไม่มีการศึกษาหน้าที่และกลไกการทำงาน แต่คาดว่าน่าจะมี ความสำคัญในการทำหน้าที่เป็นโปรตีนส่งสัญญาณแคลเซียมซึ่งเป็นตัวกลางที่สำคัญในการตอบสนองต่อ ความเครียดจากสิ่งแวดล้อมของพืช



รูปที่ 4 Neighbor-joining tree ของโปรตีน OsCaM และ OsCML โดยใช้ชื่อ TIGR gene identifier number และทางด้านขวาแสดงการแบ่งโปรตีนเป็น 6 กลุ่มจาก 1-6 พร้อมกับแผนภาพแสดง ORF ของโปรตีนแต่ละชนิด โดยระบุตำแหน่งจับ Ca^{2+} ด้วยกล่องทึบสีดำ

ถึงแม้ว่าเราทราบแล้วว่าสัญญาณแคลเซียมและ Ca^{2+}/CaM มีหน้าที่สำคัญในการถ่ายทอดสัญญาณความเครียดจากสิ่งแวดล้อมเพื่อการตอบสนองอย่างเหมาะสม แต่องค์ประกอบของเซลล์ที่ทำหน้าที่รับช่วงต่อจาก Ca^{2+}/CaM ยังไม่ทราบแน่ชัด ก่อนหน้านี้เราพบว่ายีน *OsCam1-1* มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อข้าวได้รับความเครียดจากความเค็ม ความแล้ง และการเกิดบาดแผล (Phean-o-pas et al, 2005) และเมื่อสร้างข้าวทรานส์เจนิกที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติ พบว่าข้าวทรานส์เจนิกที่ได้มีแนวโน้มทนทานต่อภาวะความเครียดจากความเค็มสูงกว่าข้าวปกติ โดยพบว่าข้าวทรานส์เจนิกมีการแสดงออกของยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ ABA สองยีนสูงขึ้น คือ ยีน *9-cis epoxycarotenoid deoxygenase (NCED)* และยีน *ABA aldehyde oxidase (AAO)* และส่งผลให้ ABA ในพืชทรานส์เจนิกมีระดับสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับพืชปกติ จากผลการทดลองเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าโปรตีน OsCaM1 น่าจะมีบทบาทสำคัญในกลไกการรับรู้และถ่ายทอดสัญญาณแคลเซียมของภาวะความเครียดจากความเค็ม

โปรตีนที่ต้องทำงานเกี่ยวข้องกันหรือมีปฏิสัมพันธ์กันจะต้องถูกแสดงออกในช่วงระยะเวลาเดียวกันภายใต้ภาวะหนึ่ง ๆ เช่นเดียวกันกับการแสดงออกของยีน ดังนั้นการศึกษาหน้าที่ของยีนจึงสามารถทำได้โดยการวิเคราะห์การแสดงออกร่วม (gene coexpression analysis) โดยอาศัยฐานข้อมูล DNA microarray หากยีนที่ยังไม่ได้ถูกระบุหน้าที่แต่มีการแสดงออกร่วมกับยีนอื่นๆ ที่ทำหน้าที่หนึ่ง ๆ ดังนั้นยีนนั้นก็อาจจะทำหน้าที่ในกระบวนการที่เกี่ยวข้องกันได้ โดยเทคนิคนี้ประสบความสำเร็จในการนำมาระบุหน้าที่ของยีนใน *Arabidopsis* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารกลุ่มฟลาโวนอยด์และอื่น ๆ อีกมากมาย (Yonekura-Sakakibara et al, 2008; Horan et al, 2008) เมื่อไม่นานมานี้ฐานข้อมูลการแสดงออกของยีนร่วมของข้าวได้ถูกสร้างขึ้น (Lee et al, 2009) การวิเคราะห์การแสดงออกร่วมได้ถูกนำมาใช้ในการค้นพบ transcription factor ที่ควบคุมการสร้างแป้งในข้าว (Fu & Xue, 2010) ดังนั้นโครงการนี้ต้องการนำเทคนิคนี้มาศึกษาหน้าที่ของยีนต่าง ๆ ที่มีการแสดงออกร่วมหรือมีปฏิสัมพันธ์กับ CaM1 ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อม

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อค้นหาและระบุหน้าที่ของยีนที่ควบคุมโดยโปรตีนคัลมอดูลินในการตอบสนองต่อภาวะความเครียดจากสิ่งแวดล้อมของข้าว *Oryza sativa* L.

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Method)

1. การคัดเลือก candidate genes มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงในข้าวที่มียีน *OsCam1-1* แสดงออกเกินปกติ ด้วยวิธี cDNA-AFLP
 - 1.1 การปลูกพืชและการสกัด mRNA
 - 1.1.1 ปลูกข้าว wild type และข้าวทรานส์เจนิคที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติ ด้วยวิธีไฮโดรโปนิคส์ในสารละลายธาตุอาหาร Yoshida et al. (1976) เป็นเวลา 14 วัน ภายใต้ช่วงแสง 16/8 ชม. อุณหภูมิ 25°C ความเข้มแสง 6,000 lux และความชื้น 80% เก็บใบและราก แยกกันที่อุณหภูมิ -80°C
 - 1.1.2 บดเนื้อเยื่อใบหรือราก (100 g) ให้ละเอียดใน liquid nitrogen และสกัด mRNA ด้วย Magnetic mRNA Isolation Kit (New England Biolabx) ตามวิธีการที่แนะนำโดยผู้ผลิต
 - 1.2 การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* ด้วยวิธี semiquantitative RT-PCR
 - 1.2.1 สังเคราะห์ first-strand cDNA ด้วย iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) ตามวิธีการที่แนะนำโดยผู้ผลิต
 - 1.2.2 ทำ PCR ในเครื่อง thermal cycler โดยใช้ forward และ reverse primer เป็น *OsCam1-1-F*: 5'-CACCATGGCGGACCAGCTCACC-3' และ *OsCam1-1-R*: 5'-TCACTTGGCCATCATGACCTTG-3' ตามลำดับ และใช้ภาวะดังนี้ initial denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยรอบของ PCR จำนวน 26 รอบที่ประกอบด้วยอุณหภูมิ 94°C 30 วินาที 58°C 30 วินาที และ 72°C 45 วินาที และ final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที สำหรับยีน *EF1α* ซึ่งใช้เป็น internal control ใช้ forward และ reverse primer เป็น *EF1α-F*: 5'-AGATCAACGAGCCC AAGAG-3' และ *EF1α-R*: 5'-GCAAAACGACCAAGAGGAG-3' ตามลำดับ และใช้ภาวะดังนี้ initial denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยรอบของ PCR จำนวน 28 รอบที่ประกอบด้วยอุณหภูมิ 94°C 30 วินาที 60°C 30 วินาที และ 72°C 45 วินาที และ final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที
- 1.3 การหาพื้นที่แสดงออกแตกต่างกันด้วยวิธี cDNA-AFLP
 - 1.3.1 สังเคราะห์ first strand cDNA จาก mRNA 500 ng โดยใช้ RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo scientific) จากนั้นสังเคราะห์เป็น double-stranded cDNA โดยใช้ NEBNext® (New England Biolabs) ตามวิธีการที่แนะนำโดยผู้ผลิต
 - 1.3.2 ทำ cDNA-AFLP โดยปรับเล็กน้อยจากวิธีของ Bachem et al (1998) เริ่มจากนำ double-stranded cDNA ปริมาณ 500 ng มาย่อยด้วย *EcoRI* และ *MseI* (New England Biolabs) ปริมาณ 10 U จากนั้นเชื่อมต่อดำ adaptor (*Eco-F*: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3', *Eco-R*: 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3', *Mse-F*: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3', *Mse-R*: 5'-TACTCAGGACTCAT-3') โดยใช้ T4 DNA ligase (New England Biolabs) และเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ adaptor ดังนี้ *Eco*: 5'-GACTGCGTACCAATTC-3', และ *Mse*: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3' จากนั้นทำให้ PCR product ที่ได้เจือจาง 50 เท่าเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการทำ selective amplification โดยใช้ selective primer combination (PC) ของ *Eco-NN*: 5'-GACTGCGTACCAATTCNN-3', and *Mse-NN*: 5'-

GATGAGTCCTGAGTAANN-3' แยก AFLP product ที่ได้ด้วย 4.5% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) และการย้อมด้วยวิธี silver staining (Bassam et al, 1991)

1.3.3 ตัดแถบ DNA ที่สนใจจาก rehydrated gel และเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอน selective amplification จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปโคลนเข้า pJET1.2/blunt cloning vector (Thermo Scientific) และหาลำดับเบสที่ Macrogen Inc., Korea โดยใช้ vector-specific primer นำลำดับเบสที่ได้ไปสืบค้นในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST

1.4 ตรวจสอบระดับการแสดงออกของ candidate genes ในข้าวทรานส์เจนิกที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติ

1.4.1 การออกแบบไพรเมอร์

ดึงข้อมูลลำดับเบสของยีนทั้งห้าจากฐานข้อมูล Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) และข้อมูลลำดับเบสจากข้าว subspecies indica ที่มีในฐานข้อมูล Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Rozen & Skaletsky, 2000) สำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนทั้งแปดด้วยวิธี real-time RT-PCR ได้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลออลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้

| Primer name | Sequence (5'-3') | Amplicon size (bp) | Annealing temp. (°C) |
|-------------|-----------------------|--------------------|----------------------|
| TDF3-F | GCAGCATTCTCAGAGGAG | 181 | 52 |
| TDF3-R | GTTCCAACACCAATAAGACC | | |
| TDF4-F | CGAGGTAGCATGTGACAG | 201 | 52 |
| TDF4-R | GCTCTCAGGTAACAAGTG | | |
| TDF10-F | TGAACCCCATTTTCAGCAC | 117 | 54 |
| TDF10-R | TCCTTCCTGGCATCATCG | | |
| TDF18-F | CGGTTCTAGCTCAAGTCC | 110 | 53.5 |
| TDF18-R | TTGCCCTGTCATCCTG | | |
| TDF23-F | GTCTGGAGAAGGTGTCATAC | 139 | 52 |
| TDF23-R | CCCTTAGCACTGTCAATTCG | | |
| TDF24-F | TCCCAAAGGTTCCGATCC | 138 | 54 |
| TDF24-R | AAGAAGGGGGCGAAAACG | | |
| TDF34-F | AAACAGCAGCTCATGGACAG | 111 | 58 |
| TDF34-R | ACCAACTCCTTGAAGCGAAC | | |
| TDF39-F | TGGAGCACAGACATGAACAC | 109 | 58 |
| TDF39-R | TCTTCAGCTTCGATCCCAACC | | |

| Primer name | Sequence (5'-3') | Amplicon size (bp) | Annealing temp. (°C) |
|-------------------|-----------------------|--------------------|----------------------|
| TDF44-F | ATGGGAGGTTTTGAGATGGC | 145 | 58 |
| TDF44-R | AACAACATTCCGTGCCTGAC | | |
| TDF53-F | TGGGATGAAGATGGTGTGTGG | 78 | 58 |
| TDF53-R | ATTTTGAACCCGTCAGCAG | | |
| OsEF1 α -F | ATGGTTGTGGAGACCTTC | 127 | 59 |
| OsEF1 α -R | TCACCTTGGCACCGTTG | | |

1.4.2 การปลูกข้าว

เพาะเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 (Khao Dok Ma Li 105; KDML105) wild type ข้าวทรานส์เจนิคส์ที่ได้รับยีน *OsCam1-1* จำนวน 2 สายพันธุ์ และข้าวทรานส์เจนิคส์ควบคุมที่ได้รับ การทรานส์ฟอร์มด้วยเวกเตอร์ pCAMBIA1301 เท่านั้นจำนวน 1 สายพันธุ์ โดยล้างเมล็ดใน sodium hypochlorite 2% ที่ผสมกับ tween 20 เล็กน้อย นำไปเพาะจนมีอายุ 7 วัน ย้ายปลูก ลงในสารละลายธาตุอาหาร ควบคุมระดับของสารละลายธาตุอาหารโดยเติมน้ำให้สารละลายอยู่ใน ระดับเดียวกันกับตอนเริ่มต้นการทดลองทุกวัน สลับกับการเปลี่ยนสารละลายใหม่ทุกๆ 3 วัน จน ข้าวมีอายุครบ 3 สัปดาห์ ทำการทดลองทั้งหมดสามซ้ำโดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Block Design

1.4.3 การสกัดอาร์เอ็นเอและการสร้างซีดีเอ็นเอ

บดใบข้าวในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด จากนั้นเติม TRI REAGENT® (Molecular Research Center, USA) และคลอโรฟอร์ม เติม isopropanol เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ ล้าง ตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย ethanol 75% และละลายอาร์เอ็นเอใน DEPC-treated water หาความ เข้มข้นและตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และการแยกอาร์เอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นกำจัดดีเอ็นเอออกจาก total RNA ด้วยเอนไซม์ DNase I (Fermentas, USA) และสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอสายแรกโดยการทำ ปฏิกริยา reverse transcription (RT) ด้วย reverse transcriptase โดยใช้ iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, USA)

1.4.4 การทำ real-time RT-PCR

ทำ real time PCR (เครื่องรุ่น Bio-Rad CFX96 system, USA) ด้วย EvaGreen® Super Mix (Bio-Rad, USA) ในปฏิกริยาปริมาตร 10 μ l โดยใช้ cDNA 2 μ l เป็น template และใช้ forward primer และ reverse primer ดังตารางที่ 1 โดยใช้อุณหภูมิ denaturation ที่ 95°C เป็นเวลา 5 วินาที และอุณหภูมิ annealing ของแต่ละยีนดังตารางที่ 1 เป็นเวลา 10 วินาที โดยใช้ ยีน elongation factor 1-alpha (EF1 α) (GQ848074) เป็น internal control ทำการทดลอง สามซ้ำและวิเคราะห์ผลด้วยวิธี $\Delta\Delta$ Ct (Livak & Schmittegen, 2001).

2. การศึกษาหน้าที่ของยีนที่คัดเลือกมา
 - 2.1 สืบค้นฐานข้อมูล RiceFOX (<http://ricefox.psc.riken.jp/>) (Sakurai et al, 2011) เพื่อหา Arabidopsis ที่มีการแสดงออกของยีนต่างๆ จากข้าวโดยใช้ full-length cDNA ที่สนใจและดำเนินการสั่งซื้อเพื่อนำมาใช้ศึกษาต่อไป
 - 2.2 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของส่วนต่าง ๆ ของ Arabidopsis แปรพันธุ์กรรมข้างต้นเทียบกับต้นสายพันธุ์ปกติ (wide-type) และการศึกษาการเจริญเติบโตภายใต้ภาวะเครียดเมื่อเทียบกับต้นสายพันธุ์ปกติ
 - 2.3 การศึกษาโปรไฟล์เมตาโบไลต์โดยใช้เครื่องมือ liquid chromatography และ gas chromatography-mass spectrometry ในส่วนต่าง ๆ ของข้าวเช่น ใบ ดอก และราก เป็นต้น เพื่อให้ได้ข้อมูลทั้ง primary metabolite และ secondary metabolite การระบุเมตาโบไลต์ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปในต้นดัดแปรพันธุ์กรรม สามารถนำมาเชื่อมโยงเข้ากับข้อมูลวิถีการสังเคราะห์ของสารต่าง ๆ เพื่อที่จะหาหน้าที่ของยีนที่ต้องการศึกษาได้
3. รวบรวมข้อมูลทั้งหมดเพื่อระบุหน้าที่ของยีนดังกล่าว

หมายเหตุ

อย่างไรก็ตามหลังจากที่ได้ดำเนินการตามข้อ 1.1-1.4 แล้วพบว่าไม่สามารถยืนยันการแสดงออกของยีนทั้ง 10 ยีนที่คัดเลือกมาได้จากผลการวิเคราะห์ cDNA-AFLP ซึ่งอาจเนื่องมาจากผลการทดลองที่ได้เป็น false positive ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้หาวิธีการใหม่ในการคัดเลือกยีนที่อาจควบคุมโดยยีน *OsCam1-1* ในข้าวทรานส์เจนิค โดยได้ทดลองวิเคราะห์โปรตีนของข้าวดังกล่าวเปรียบเทียบกับข้าว wild-type ดังนั้นจึงได้ปรับเปลี่ยนวิธีการดำเนินการวิจัยทั้งหมดเป็นดังนี้

1. การคัดเลือก candidate genes มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงในข้าวที่มียีน *OsCam1-1* แสดงออกเกินปกติ ด้วยการวิเคราะห์โปรตีน
 - 1.1 การปลูกพืช การสกัดและการแยกโปรตีน
 - 1.1.1 ปลูกข้าว wild type และข้าวทรานส์เจนิคที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติ ด้วยวิธีไฮโดรโปนิคส์ในสารละลายธาตุอาหาร MS (Murashige & Skoog, 1962) เป็นเวลา 14 วัน ภายใต้ช่วงแสง 16/8 ชม. อุณหภูมิ 25°C ความเข้มแสง $60 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ photon flux และความชื้น $60 \pm 5\%$ เก็บเนื้อเยื่อรากที่อุณหภูมิ -80°C
 - 1.1.2 บดเนื้อเยื่อรากให้ละเอียดใน liquid nitrogen เติมสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) (10% TCA ในอะซิโตนที่มี 0.07% 2-mercaptoethanol) 1 ml ในเนื้อเยื่อที่บดละเอียด 10 mg ปั่นเหวี่ยงแยกส่วนตะกอนมาล้างและบ่มในอะซิโตนที่มี 0.07% 2-mercaptoethanol
 - 1.1.3 แยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) หลังจากนั้นตัดแถบโปรตีนเป็นแปดส่วนตามน้ำหนักโมเลกุล ย่อยด้วยทริปซินตามวิธีของ Jaresittikunchai et al. (2009) โดยล้างในน้ำและ dehydrate ใน 100% acetonitrile จากนั้นเติม 10 mM dithiothreitol ใน 10 mM ammonium bicarbonate และบ่มนาน 1 ชั่วโมง และ alkylate ด้วย 100 mM iodoacetamide ใน 10 mM ammonium bicarbonate นาน 1 ชั่วโมงในที่มืด นำขึ้นเจลมา dehydrate สองครั้งด้วย 100% acetonitrile นาน 5 นาที เติมสารละลายทริปซิน (10 ng/ μl)

trypsin in 50% acetonitrile/10 mM ammonium bicarbonate) 10 μ l และ 30% acetonitrile ปริมาตร 20 μ l จากนั้นสกัดเพปไทด์ด้วย 50% acetonitrile ใน 0.1% formic acid ปริมาตร 30 μ l และละลายใน 0.1% formic acid

- 1.2 การวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS และการหาปริมาณและระบุชนิดของโปรตีน
 - 1.2.1 แยกเพปไทด์ที่ย่อยได้ใน Nanoscale LC-MS for SYNAPT™ HDMS system ที่ใช้ Symmetry C₁₈ 5 μ m, 180- μ m x 20-mm Trap column และ BEH130 C₁₈ 1.7 μ m, 100- μ m x 100-mm analytical reversed phase column
 - 1.2.2 หาปริมาณเพปไทด์ด้วยโปรแกรม DeCyder MS Differential Analysis โดยเปรียบเทียบเพปไทด์ใน signal intensity map ด้วย PepMatch module และสืบค้นฐานข้อมูล NCBI เพื่อระบุชนิดของโปรตีน
- 1.3 การวิเคราะห์ข้อมูลโปรตีนที่ได้ด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศ
 - 1.3.1 วิเคราะห์โปรตีนที่มีระดับการแสดงออกสูงขึ้นในข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติด้วย Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING) (<http://string-db.org>) (Szklarczyk et al., 2014)
 - 1.3.2 คัดเลือกยีนที่มี association ระหว่างกันและมี association กับ calmodulin มาหาระดับการแสดงออกของทรานสคริปต์ในข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติเปรียบเทียบกับข้าว wild-type
2. การตรวจสอบระดับการแสดงออกของ candidate genes ในข้าวทรานส์เจนิคที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติด้วยวิธี real-time RT-PCR
 - 2.1 การออกแบบไพรเมอร์

ดึงข้อมูลลำดับเบสของยีนที่คัดเลือกได้จากฐานข้อมูล Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) และข้อมูลลำดับเบสจากข้าว subspecies indica ที่มีในฐานข้อมูล Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) สำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธี real-time RT-PCR ได้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ข้อมูลออลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้

| Gene name | Forward (5'→3') | Reverse (5'→3') | T _a |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|----------------|
| <i>LOC_Os01g11110</i> | GGCTGATGATGCAGACGATA | CCACACCCTTGTTGTTGTTG | 53.5 |
| <i>LOC_Os02g11820</i> | AACAAGGAGGTTTGGGTTCC | TCCGATGATGCACAAGAACT | 62.0 |
| <i>LOC_Os10g04180</i> | AGGATAAGCAAACCGCTCAA | GCAAAGACCGAGGTTCTGAG | 62.0 |
| <i>OsEF1α</i> | ATGGTTGTGGAGACCTTC | TCACCTTGGCACCGGTTG | 57.9 |

2.2 การปลูกข้าว

เพาะเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 (Khao Dok Ma Li 105; KDML105) wild type และข้าวทรานส์เจนิคส์ที่ได้รับยีน *OsCam1-1* จำนวน 3 สายพันธุ์ จนมีอายุ 7 วัน ย้ายปลูกลงในสารละลายธาตุอาหารควบคุมระดับของสารละลายธาตุอาหารโดยเติมน้ำให้สารละลายอยู่ในระดับเดียวกันกับตอนเริ่มต้นการทดลองทุกวัน สลับกับการเปลี่ยนสารละลายใหม่ทุกๆ 3 วัน จนข้าวมีอายุครบ 3 สัปดาห์ ทำการทดลองทั้งหมดสามซ้ำโดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Block Design

2.3 การสกัดอาร์เอ็นเอและการสร้างซีดีเอ็นเอ

บดใบข้าวในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด จากนั้นเติม TRI REAGENT® (Molecular Research Center, USA) และคลอโรฟอร์ม เติม isopropanol เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย ethanol 75% และละลายอาร์เอ็นเอใน DEPC-treated water ทดความเข้มข้นและตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรและการแยกอาร์เอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นกำจัดดีเอ็นเอออกจาก total RNA ด้วยเอนไซม์ DNase I (Fermentas, USA) และสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอสายแรกโดยการทำปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ด้วย reverse transcriptase โดยใช้ iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, USA)

2.4 การทำ real-time RT-PCR

ทำ real time PCR (เครื่องรุ่น Bio-Rad CFX96 system, USA) ด้วย EvaGreen® Super Mix (Bio-Rad, USA) ในปฏิกิริยาปริมาตร 10 μ l โดยใช้ cDNA 2 μ l เป็น template และใช้ forward primer และ reverse primer ดังตารางที่ 2 โดยใช้อุณหภูมิ denaturation ที่ 95°C เป็นเวลา 5 วินาที และอุณหภูมิ annealing ของแต่ละยีนดังตารางที่ 2 เป็นเวลา 10 วินาที โดยใช้ยีน elongation factor 1-alpha (EF1 α) (GQ848074) เป็น internal control ทำการทดลองสามซ้ำและวิเคราะห์ผลด้วยวิธี $\Delta\Delta$ Ct (Livak & Schmittegen, 2001)

3. การศึกษาหน้าที่ของยีนที่คัดเลือกมา

3.1 ใช้ยีนที่ยืนยันการมีระดับการแสดงออกสูงขึ้นไปเป็น bait เพื่อหาอื่น ๆ ที่มีการแสดงออกร่วมโดยใช้ฐานข้อมูลการแสดงออกร่วมของข้าว (Rice Oligonucleotide Array Database) (<http://www.ricearray.org>) โดยใช้ข้อมูลของ “Abiotic Stress” ภายใต้อัตรา PCC cutoff = 0.5 (Cao et al., 2012)

3.2 ศึกษาเอนไซม์ในระบบ antioxidant enzyme ในข้าวที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติเปรียบเทียบกับข้าว wild-type และข้าวทรานส์เจนิคควบคุม

3.2.1 การสกัดเอนไซม์

ปลูกข้าวตามวิธีการในข้อ 1.1.1 ย้ายลงสารละลายธาตุอาหารใหม่ 1 วันก่อนการให้ความเค็มด้วยการเติมเกลือให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 150 mM เก็บตัวอย่างยอดและรากเป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และนำมาสกัดเอนไซม์ด้วยวิธีของ Corley & Wolosiuk (1985)

3.2.2 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์

Guaiacol peroxidase (GPX)

วัดแอกติวิตีของ guaiacol peroxidase ตามวิธีการของ Nakano & Asada (1981) โดยใช้

สารละลายสับสเตรตที่มี 0.17 mM H₂O₂ และ 2.36 mM guaiacol ใน 50 mM sodium phosphate buffer, pH 5.0

Ascorbate peroxidase (APX)

วัดแอกติวิตีของ guaiacol peroxidase ตามวิธีการของ Nakano & Asada (1981) โดยใช้สารละลายสับสเตรตที่มี 0.8 mM EDTA, 0.17 mM H₂O₂ และ 0.5 mM ascorbic acid ใน 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0

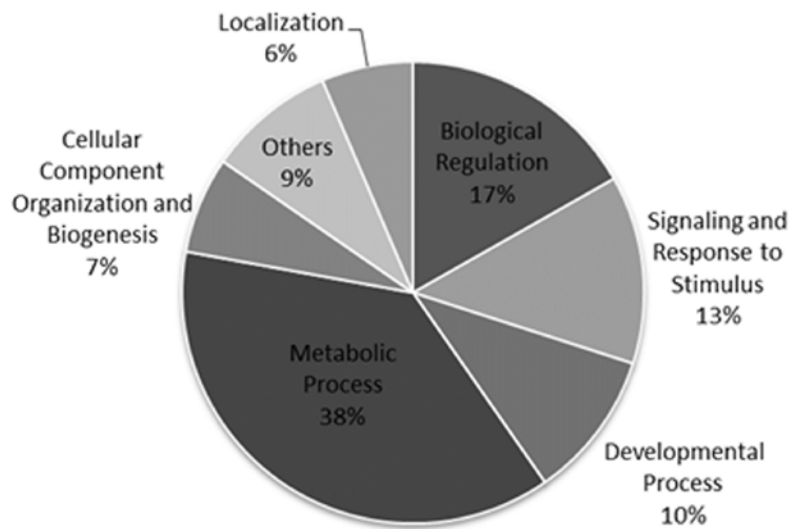
Glutathione transferase (GST)

วัดแอกติวิตีของ guaiacol peroxidase ตามวิธีการของ Mannervik & Guthenberg (1981) โดยใช้สารละลายสับสเตรตที่มี 1 mM glutathione (GSH) และ 1 mM 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) ใน 95% ethanol ที่เตรียมใน 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง (Results and Discussion)

1. การคัดเลือก candidate genes มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงในข้าวที่มียีน *OsCam1-1* แสดงออกเกินปกติ ด้วยการวิเคราะห์โปรตีโอม

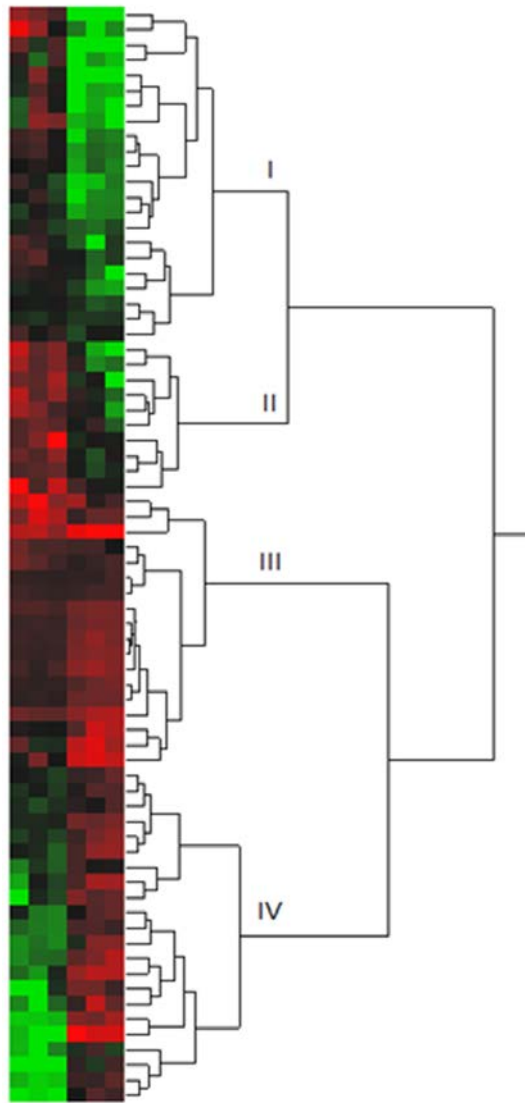
จากการเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนในรากของข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่มีการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติกับข้าว wild-type พบว่ามีโปรตีนทั้งหมด 77 ชนิดที่มีการแสดงออกแตกต่างกันที่ $p < 0.05$ รายการของโปรตีนและข้อมูลสำคัญแสดงใน supplementary data 1 (หน้า 24) ในการสืบค้นด้วยโปรแกรม Mascot พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ทราบหน้าที่หรือมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของลำดับกรดอะมิโนสูงเมื่อเทียบกับโปรตีนในฐานข้อมูล NCBI จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Gene Ontology (GO) enrichment พบว่าโปรตีนเหล่านี้มี GO term สำหรับ biological function แบ่งได้เป็น 7 กลุ่ม ได้แก่ กระบวนการเมแทบอลิซึม (38%) การควบคุมทางชีวภาพ (17%) การสื่อสารสัญญาณและตอบสนองต่อสิ่งเร้า (13%) กระบวนการพัฒนาการ (10%) การสร้างและการจัดเรียงองค์ประกอบของเซลล์ (7%) การเคลื่อนย้ายและกำหนดตำแหน่งภายในเซลล์ (6%) และอื่นๆ (9%) ดังแสดงในรูปที่ 5 ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกเกินปกติของยีน *OsCam1-1* นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของข้าวทรานส์เจนิคทั้งที่ปลูกในภาวะปกติ



รูปที่ 1 กระบวนการภายในเซลล์ของโปรตีนที่แสดงออกแตกต่างกันจากการวิเคราะห์โปรตีโอมระหว่างข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติและข้าว wild-type จากการวิเคราะห์ GO term ประเภท biological process ที่มีร่วมกันของโปรตีนเหล่านี้สามารถแบ่งได้เป็น 7 กลุ่มโดยนำเสนอในรูปแบบของกราฟวงกลมพร้อมด้วยเปอร์เซ็นต์ของแต่ละกลุ่ม

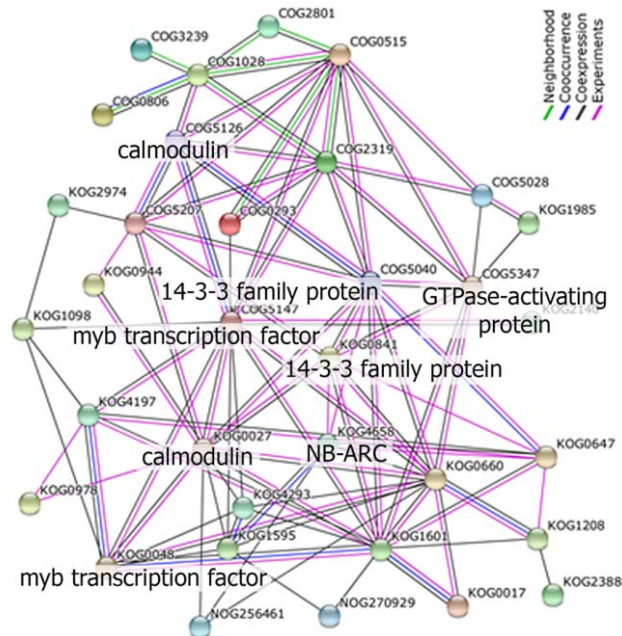
การทำ hierarchical clustering โปรตีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงในข้าวที่มียีน *OsCam1-1* แสดงออกเกินปกติเหล่านี้ได้ผลดังรูปที่ 6 ซึ่งอาจสามารถแบ่งกลุ่มของโปรตีนเหล่านี้เป็น 4 กลุ่ม (I-IV) สามคอลัมน์แรกแสดงระดับการแสดงออกของโปรตีนในข้าว wild-type และสามคอลัมน์หลังแสดงระดับการ

แสดงออกของโปรตีนในข้าวที่มียีน *OsCam1-1* แสดงออกเกินปกติ ระดับการแสดงออกต่ำหรือสูงแสดงด้วยสีเขียวหรือแดงตามลำดับ และความเข้มของสีเพิ่มขึ้นตามระดับที่เพิ่มขึ้นในแต่ละด้าน โปรตีนที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นในข้าวที่มียีน *OsCam1-1* แสดงออกเกินปกติรวมอยู่ในกลุ่ม III และ IV มีจำนวนทั้งหมด 37 ยีน ซึ่งมีค่อนข้างน้อยแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกเกินปกติของยีน *OsCam1-1* ไม่ส่งผลกระทบต่อรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนภายในพืชทรานส์เจนิกมากนัก โปรตีนเหล่านี้อาจมีความสำคัญที่ทำให้พืชทรานส์เจนิกนี้มีความสามารถในการทนเค็มเพิ่มมากขึ้น



รูปที่ 6 การวิเคราะห์ clustering ของโปรตีนที่แสดงออกแตกต่างกันระหว่างข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติและข้าว wild-type คอลัมน์แรกแสดงระดับการแสดงออกของโปรตีนในข้าว wild-type และสามคอลัมน์หลังแสดงระดับการแสดงออกของโปรตีนในข้าวที่มียีน *OsCam1-1* แสดงออกเกินปกติ ระดับการแสดงออกต่ำหรือสูงแสดงด้วยสีเขียวหรือแดงตามลำดับ และความเข้มของสีเพิ่มขึ้นตามระดับที่เพิ่มขึ้นในแต่ละด้าน

เมื่อนำโปรตีนเหล่านี้มาวิเคราะห์ด้วย Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING) ได้ผลดังรูปที่ 7 ความสัมพันธ์เหล่านี้มีทั้งโดยตรง (เชิงกายภาพ) และโดยอ้อม (เชิงหน้าที่) ซึ่งสร้างจากข้อมูลจีโนม การแสดงออกร่วม และการทดลองระดับ high-throughput จากผลการวิเคราะห์พบว่า เครือข่าย STRING ที่ได้ประกอบด้วยโปรตีนกลุ่ม transcription factor เช่น myb และ GATA zinc finger domain containing protein โปรตีนสื่อสัญญาณ เช่น 14-3-3 และ MAP kinase และโปรตีนเกี่ยวกับการลำเลียงเวสิเคิล เช่น GTPase-activating protein



รูปที่ 7 เครือข่าย STRING ของโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นในข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกล็นปกติเมื่อเทียบกับข้าว wild-type การเชื่อมต่อระหว่างคลัสเตอร์ของกลุ่มโปรตีนออลอทอแสดงด้วยเส้นสีต่างๆ โดยอาศัยข้อมูลจาก neighborhood (เขียว) co-occurrence (ฟ้า) coexpression (ดำ) และการทดลอง (ชมพู) คลัสเตอร์ของโปรตีนออลอทอที่น่าสนใจแสดงเน้นด้วยชื่อโปรตีนนั้น

2. การตรวจสอบระดับการแสดงออกของ candidate genes ในข้าวทรานส์เจนิกที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกล็นปกติด้วยวิธี real-time RT-PCR

จากผลการวิเคราะห์โปรตีโอมและการวิเคราะห์การเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนด้วย STRING ผู้วิจัยเลือกยีนของข้าวมาสามยีน ได้แก่ *LOC_Os01g11110*, *LOC_Os02g11820* และ *LOC_Os10g04180* ซึ่งสร้างโปรตีน 14-3-3, GTPase-activating protein และ NB-ARC domain containing protein ตามลำดับตารางที่ 3 แสดงระดับของโปรตีนเหล่านี้ที่ได้จากผลการวิเคราะห์โปรตีโอม เพื่อหาว่าระดับของโปรตีนเหล่านี้ส่งผลมาจากระดับการแสดงออกของทรานส์คริปหรือไม่ เราจึงเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของทรานส์คริปในข้าว wild-type และข้าวที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกล็นปกติจำนวน 3 สายพันธุ์ (L1, L2, และ L7) ทั้งในยอดและในรากด้วยวิธี real-time RT-PCR

ตารางที่ 3 ระดับการแสดงออกของโปรตีนจากข้อมูลการวิเคราะห์โปรตีโอม

| Locus | WT | | | | OsCam1-1 | | | |
|-----------------------|------|------|------|-----------|----------|------|------|-----------|
| | Rep1 | Rep2 | Rep3 | Average | Rep1 | Rep2 | Rep3 | Average |
| <i>LOC_Os01g11110</i> | 7.00 | 7.28 | 7.14 | 7.14±0.14 | 8.28 | 7.99 | 7.98 | 8.08±0.17 |
| <i>LOC_Os02g11820</i> | 5.20 | 4.04 | 5.19 | 4.81±0.67 | 6.54 | 5.87 | 7.25 | 6.56±0.69 |
| <i>LOC_Os10g04180</i> | 2.41 | 4.81 | 3.47 | 3.56±1.20 | 7.36 | 5.89 | 5.85 | 6.37±0.86 |

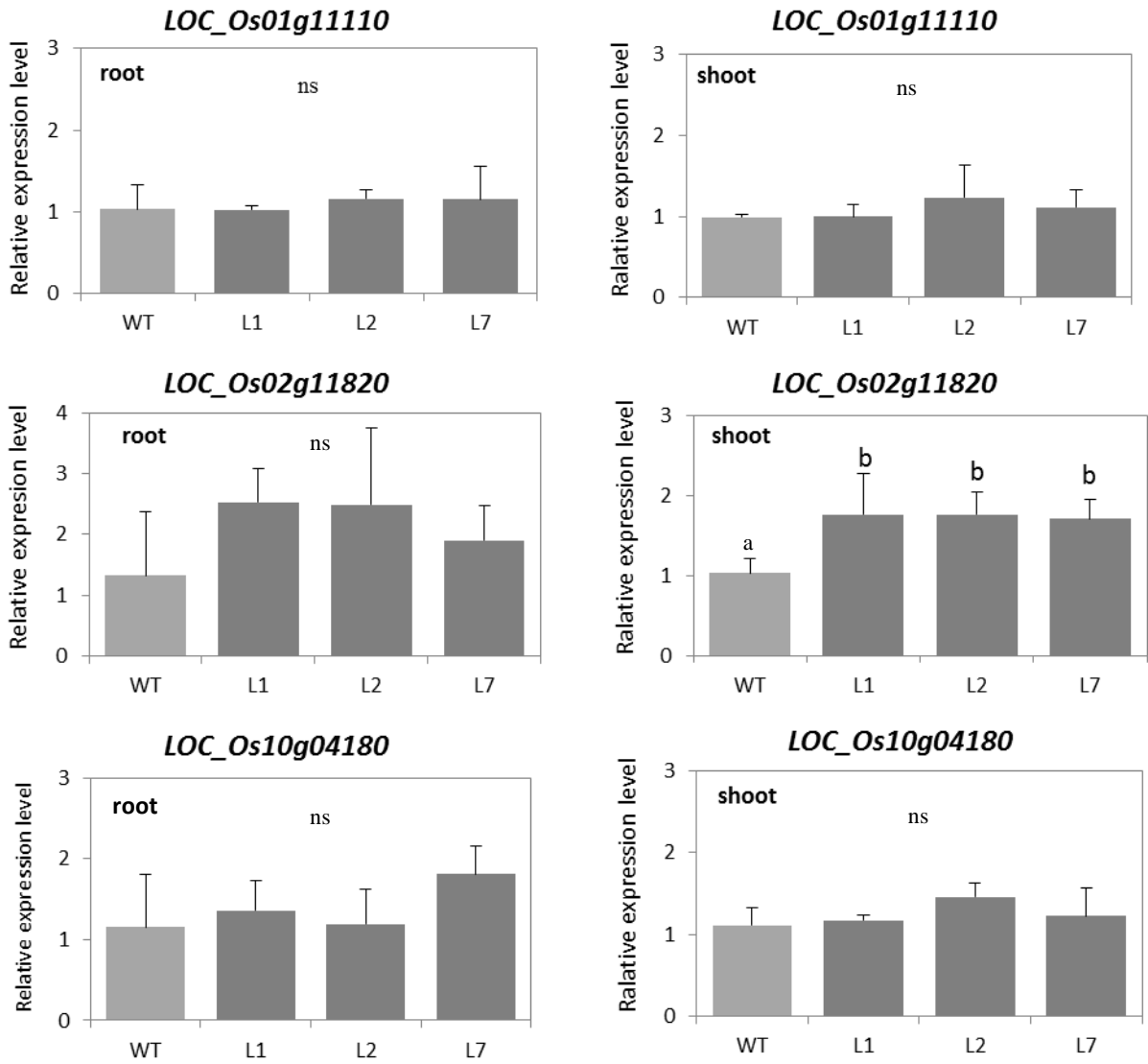
รูปที่ 8 แสดงระดับการแสดงออกของทรานส์คริปต์ในข้าวทั้งสี่ตัวอย่างพบว่ายีน *LOC_Os01g11110* และ *LOC_Os10g04180* ไม่มีความแตกต่างกันในข้าวที่ศึกษาทั้งหมด ผลการแสดงออกระดับทรานส์คริปต์ที่แตกต่างจากการแสดงออกของโปรตีนอาจแสดงให้เห็นถึงการควบคุมระดับการแปลรหัส หรืออาจมาจากความแตกต่างของช่วงเวลาในการแสดงออกของยีนและโปรตีน สำหรับยีน *LOC_Os02g11820* พบว่ามีค่าระดับการแสดงออกในยอดของข้าวที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติทุกสายพันธุ์สูงกว่าข้าว wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ระดับการแสดงออกในรากของข้าวที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติก็สูงกว่าข้าว wild-type ทุกสายพันธุ์แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$

3. การศึกษาหน้าที่ของยีนที่คัดเลือกมา

จากการนำยีน *LOC_Os02g11820* ซึ่งได้รับการยืนยันว่ามีระดับการแสดงออกของทรานส์คริปต์สูงขึ้นในข้าวที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติเมื่อเปรียบเทียบกับข้าว wild-type มาวิเคราะห์การแสดงออกร่วมพบว่ายีน *LOC_Os02g11820* มีการแสดงออกร่วมเชิงบวกกับยีนสร้างเอนไซม์ peroxidase จำนวนมาก และมีการแสดงออกร่วมเชิงลบกับยีนสร้างเอนไซม์ glutathione transferase จำนวนมาก ดังแสดงในตารางที่ 4

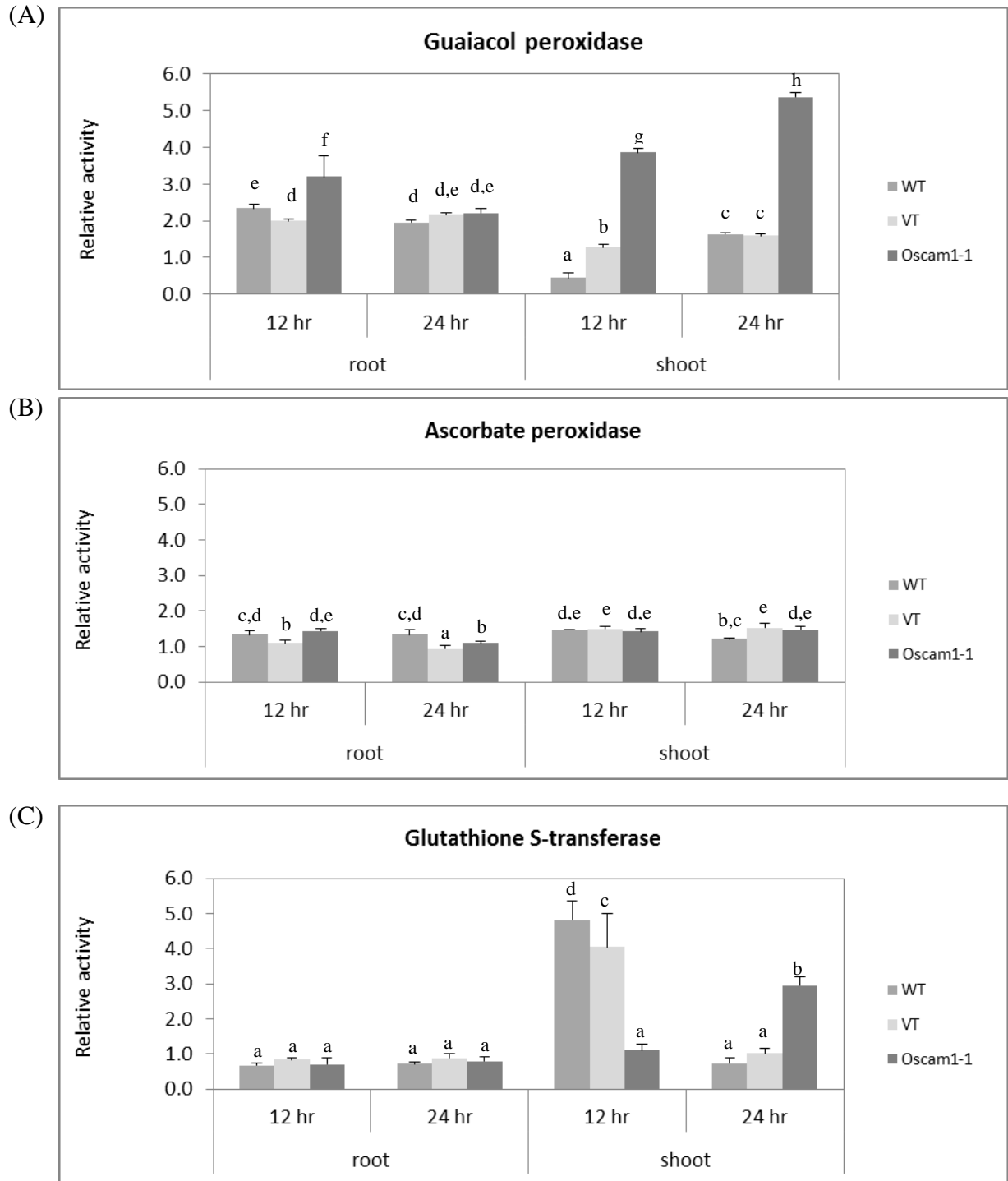
ตารางที่ 4 จำนวนยีนสร้างเอนไซม์ในระบบต้านออกซิเดชันที่แสดงออกร่วมกับยีน *LOC_Os02g11820*

| Type of coexpression | Number of genes | | | | |
|------------------------|----------------------|------------|----------|-----------------------|-------------------------|
| | Superoxide dismutase | Peroxidase | Catalase | Glutathione reductase | Glutathione transferase |
| positively coexpressed | 0 | 15 | 0 | 0 | 2 |
| negatively coexpressed | 2 | 7 | 2 | 1 | 14 |



รูปที่ 8 ระดับการแสดงออกทรานส์คริปต์ของยีนที่เลือกซึ่งมีการแสดงออกสูงขึ้นในข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติ การแสดงออกในข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติสามสายพันธุ์ (L1, L2, และ L7) เปรียบเทียบกับข้าว wild-type (WT) แสดงด้วยค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยที่มีตัวพิมพ์เล็กกำกับต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

เพื่อวิเคราะห์ว่าเอนไซม์เหล่านี้เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนเค็มของข้าวที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติหรือไม่ ผู้วิจัยวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase และ glutathione transferase ในข้าวทรานส์เจนิกสายพันธุ์ที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* สูงที่สุดเปรียบเทียบกับข้าว wild-type และข้าวทรานส์เจนิกควบคุมที่ได้รับการถ่ายยีน *gus* และยีนต้านยาปฏิชีวนะของ pCAMBIA1301 ที่ใช้ในการทรานส์ฟอร์มข้าวที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติ รูปที่ 9 แสดงแอกติวิตีของเอนไซม์ภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็ม (150 mM NaCl) เทียบกับแอกติวิตีในภาวะปกติที่เวลา 12 หรือ 24 ชั่วโมงหลังการได้รับความเครียดจากความเค็ม



รูปที่ 9 แอกติวิตีในข้าว wild-type (WT) ข้าวทรานส์เจนิกควบคุม (VT) และข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *Oscan1-1* เกล็ดของเอนไซม์ A) guaiacol peroxidase B) ascorbate peroxidase และ C) glutathione transferase ที่ 12 และ 24 ชั่วโมงหลังได้รับความเครียดจากความเค็ม โดยแสดงเป็นค่าสัมพันธ์กับแอกติวิตีภายใต้ภาวะปกติ และแสดงด้วยค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเฉลี่ยที่มีตัวพิมพ์เล็กกำกับต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

โดยรวมพบว่าความเครียดจากความเค็มทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์ guaiacol peroxidase เพิ่มขึ้นในราก (รูปที่ 9A) ประมาณ 2 เท่าในข้าวทุกสายพันธุ์หลังได้รับความเครียดจากความเค็ม 12 และ 24 ชั่วโมง ยกเว้นข้าวที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติที่ได้รับ ความเครียดจากความเค็ม 12 ชั่วโมง พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่า การชักนำแอกติวิตีของ guaiacol peroxidase ยังพบได้ในยอดของข้าวทุกสายพันธุ์โดยพบการเพิ่มขึ้นประมาณ 1.5 เท่าในข้าว wild-type และข้าวทรานส์เจนิคควบคุม ขณะที่ข้าวที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติมีการเพิ่มแอกติวิตีประมาณ 4 และ 5 เท่า หลังจากได้รับความเครียดจากความเค็มเป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ เพื่อศึกษาว่าเอนไซม์ ascorbate peroxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการกำจัดเพอร์ออกไซด์ เช่น ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ โดยใช้ ascorbate เป็นสับสเตรตมีส่วนเกี่ยวข้องหรือไม่ จึงวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ ascorbate peroxidase โดยรวมพบว่า การชักนำแอกติวิตีให้เพิ่มขึ้นเล็กน้อยประมาณ 1.5 เท่าเมื่อได้รับความเครียดจากความเค็ม แต่ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างข้าวที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติ กับข้าว wild-type และข้าวทรานส์เจนิคควบคุม (รูปที่ 9B) อย่างไรก็ตามแอกติวิตีที่เพิ่มขึ้นของ guaiacol peroxidase ก็แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติอาจส่งผลให้ความสามารถในการกำจัด H_2O_2 ด้วยเอนไซม์ peroxidase ของข้าวทรานส์เจนิคเพิ่มสูงขึ้น

สำหรับเอนไซม์ glutathione transferase พบว่าความเครียดจากความเค็มไม่ได้ชักนำแอกติวิตีในราก แต่ในยอดพบว่าการเพิ่มขึ้นของแอกติวิตีประมาณ 4-5 เท่าที่เวลา 12 ชั่วโมงในข้าว wild-type และข้าวทรานส์เจนิคควบคุม แต่ไม่พบการชักนำในข้าวที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติ (รูปที่ 9C) อย่างไรก็ตามที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับความเครียดจากความเค็ม พบว่าข้าวที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติ มีแอกติวิตีของ glutathione transferase เพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่า ขณะที่แอกติวิตีในข้าว wild-type และข้าวทรานส์เจนิคควบคุมลดลงและกลับสู่ภาวะปกติ การชักนำของแอกติวิตีของ glutathione transferase ในยอดของข้าวที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติที่ช้าและน้อยลงอาจแสดงให้เห็นว่าบริเวณยอดของข้าวที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติได้รับผลกระทบจากความเค็มน้อยกว่าในข้าว wild-type และข้าวทรานส์เจนิคควบคุม แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติอาจช่วยลดความรุนแรงและความเสียหายในบริเวณยอดของข้าวได้

สรุปผลการทดลอง (Conclusion)

คัลมอดุลินเป็นโปรตีนจับสัญญาณแคลเซียมที่มีหน้าที่ตอบสนองต่อความเครียดจากความเค็มซึ่งจากการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นถึงกลไกการทนทานต่อความเครียดจากความเค็มผ่านการควบคุมภาวะอ็อกซิเดชัน redox ที่ควบคุมด้วยโปรตีน OsCaM1 ในข้าว

บรรณานุกรม (Bibliography)

- Bachem CWB, Oomen RJFJ, Visser RGF. Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol. *Plant Mol Biol Rep* 1998, 16: 157-173.
- Bassam, BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1991, 196: 80-83.
- Boonburapong B, Buaboocha T. Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins. *BMC Plant Biol* 2007, 7: 4.
- Chattopadhyaya R, Meador WE, Means AR, Quijcho FA. Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol* 1992, 228: 1177-1192.
- Cao P, Jung KH, Choi D, Hwang D, Zhu J, Ronald PC. The Rice Oligonucleotide Array Database: an atlas of rice gene expression. *Rice* 2012, 5:17.
- Corley E, Wolosiuk RA. The effect of organic solvents on the activation and the activity of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *J Biol Chem* 1985, 260: 3978-3983.
- Duval FD, Renard M, Jaquinod M, Biou V, Montrichard F, Macherel D. Differential expression and functional analysis of three calmodulin isoforms in germinating pea (*Pisum sativum* L.) seeds. *Plant J* 2002, 32: 481-493.
- Fu F-F, Xue, H-W. Coexpression analysis identifies rice starch regulator1, a rice AP2/EREBP family transcription factor, as a novel rice starch biosynthesis regulator. *Plant Physiol* 2010, 154: 927-938.
- Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D, Bohnert H. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* 2001, 13: 889-905.
- Knight, H. Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int Rev Cytol* 2000, 195: 269-325.
- Kretsinger RH, Nockolds CE. Carp muscle calcium-binding protein. *J Biol Chem* 1973, 248: 3313-3326.
- Harmon AC, Gribskov M, Harper JF. CDPKs: a kinase for every Ca²⁺ signal? *Trends Plant Sci* 2000, 5: 154-159.
- Horan K, Jang C, Bailey-Serres J, Mittler R, Shelton C, Harper JF, Zhu J-K, Cushman JC, Gollery M, Girke T. Annotating genes of known and unknown function by large-scale coexpression analysis. *Plant Physiol* 2008, 147: 41-57.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227: 680-685.
- Lee SH, Kim JC, Lee MS, Heo WD, Seo HY, Yoon HW, Hong JC, Lee SY, Bahk JD, Hwang I, Cho MJ. Identification of a novel divergent calmodulin isoform from soybean which has differential ability to activate calmodulin-dependent enzymes. *J Biol Chem* 1995, 270: 21806-21812.

- Lee T-H, Kim Y-K, Pham TTM, Song SI, Kim J-K, Kang KY, An G, Jung KH, Galbraith DW, Kim M, Yoon U-H, Nahm BH. RiceArrayNet : A database for correlating gene expression from transcriptome profiling, and its application to the analysis of coexpressed genes in rice. *Plant Physiol* 2009, 151: 16-33.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, Yalovsky S, Gruissem W. Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific response coupling in plants. *Plant Cell* 2002, (suppl.): S389-S400.
- Mannervik B, Guthenberg C. Glutathione Transferase (Human Placenta). *Methods Enzymol* 1981, 77: 231-235.
- McAinsh MR, Pittman JK. Shaping the calcium signature. *New Phytol* 2009, 181: 275-294.
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plant* 1962, 15: 473-497.
- Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 1981, 22: 867-880.
- O'Neil KT, DeGrado WF. How calmodulin binds its targets: Sequence independent recognition of amphiphilic α -helices? *Trends Biochem Sci* 1990, 15: 59-64.
- Phean-o-pas S, Punteeranurak P, Buaboocha T. Calcium signaling-mediated and differential induction of calmodulin gene expression by stress in *Oryza sativa* L. *J Biochem Mol Biol* 2005, 38: 432-439.
- Rodriguez-Concepcion M, Yalovsky S, Zik M, Fromm H, Gruissem W. The prenylation status of a novel plant calmodulin directs plasma membrane or nuclear localization of the protein. *EMBO J* 1999, 18: 1996-2007.
- Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. (2000) Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- Sakurai T, Kondou Y, Akiyama K, Kurotani A, Higuchi M, Ichikawa T, Kuroda H, Kusano M, Mori M, Saitou T, Sakakibara H, Sugano S, Suzuki M, Takahashi H, Takahashi S, Takatsuji H, Yokotani N, Yoshizumi T, Saito K, Shinozaki K, Oda K, Hirochika H, Matsui M. RiceFOX: A database of Arabidopsis mutant lines overexpressing rice full-length cDNA that contains a wide range of trait information to facilitate analysis of gene function. *Plant Cell Physiol* 2011, 52: 265-273.
- Sanders D, Brownlee C, and Harper JF. Communicating with calcium. *Plant Cell* 1999, 11: 691-706.

- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 2014, 43(Issue D1): D447-D452.
- Takezawa D, Liu ZH, An G, Poovaiah BW. Calmodulin gene family in potato: developmental and touch-induced expression of the mRNA encoding a novel isoform. *Plant Mol Biol* 1995, 27: 693-703.
- Yamakawa H, Mitsuhara I, Ito N, Seo S, Kamada H, Ohashi Y. Transcriptionally and post-transcriptionally regulated response of 13 calmodulin genes to tobacco mosaic virus-induced cell death and wounding in tobacco plant. *Eur J Biochem* 2001, 268: 3916-3929
- Yonekura-sakakibara K, Tohge T, Matsuda F, Nakabayashi R, Takayama H, Niida R, Watanabe-Takahashi A, Inoue E, Saito K . Comprehensive flavonol profiling and transcriptome coexpression analysis leading to decoding gene-metabolite correlations in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2008, 20: 2160-2176.
- Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez CA. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice, (3rd ed.) Laguna, PHILIPPINES: P.O. BOX 1976, 933.
- Zielinski RE. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1998, 49: 697-725.

Supplementary data

Supplementary data 1

| Loci | log ₂ (fold Change) | WT | | | OsCam1-1 | | | Annotation |
|----------------|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--|
| | | Rep 1 | Rep 2 | Rep 3 | Rep 1 | Rep 2 | Rep 3 | |
| LOC_Os01g05580 | 0.075497 | 10.246150 | 10.457860 | 10.081440 | 10.933130 | 10.666960 | 10.839280 | Exo70 exocyst complex subunit family, putative, expressed |
| LOC_Os01g08200 | 0.090463 | 8.725262 | 8.427695 | 8.782862 | 8.997649 | 9.216665 | 9.399866 | ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14, putative, expressed |
| LOC_Os01g09246 | 0.520584 | 5.594941 | 9.078105 | 6.388246 | 10.402010 | 10.088160 | 9.723001 | glycine-rich protein, putative, expressed |
| LOC_Os01g11110 | 0.179139 | 6.997586 | 7.280780 | 7.143671 | 8.280625 | 7.994436 | 7.979141 | 14-3-3 protein, putative, expressed |
| LOC_Os01g11820 | 1.614196 | 2.083277 | 3.098795 | 3.244135 | 8.002377 | 8.321351 | 9.472336 | expressed protein |
| LOC_Os01g47620 | 0.599944 | 5.216968 | 5.365803 | 5.670567 | 8.569188 | 7.811136 | 8.254174 | expressed protein |
| LOC_Os01g48980 | -2.052714 | 5.792688 | 7.412260 | 4.463500 | 0.165956 | 2.024559 | 2.068114 | GPI transamidase component family protein, putative, expressed |
| LOC_Os01g50200 | -1.530143 | 8.164181 | 7.346499 | 5.644688 | 3.169232 | 0.000000 | 4.155668 | UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase domain containing protein, expressed |
| LOC_Os01g50430 | -0.549202 | 7.797666 | 6.409255 | 7.445094 | 3.757807 | 5.867537 | 5.171599 | expressed protein |
| LOC_Os01g51040 | -0.102260 | 7.212591 | 7.157702 | 7.275921 | 6.696054 | 6.507936 | 6.961028 | transmembrane protein 16K, putative, expressed |
| LOC_Os01g51940 | -2.161856 | 10.671220 | 8.473271 | 9.890343 | 5.171066 | 1.219429 | 0.097877 | expressed protein |
| LOC_Os01g72420 | -1.394514 | 7.289946 | 6.936572 | 6.751265 | 5.208153 | 2.771224 | 0.000000 | C2 domain containing protein, putative, expressed |
| LOC_Os01g72930 | 2.155529 | 2.133609 | 0.000000 | 3.298515 | 6.832311 | 9.644224 | 7.725309 | pentatricopeptide, putative, expressed |
| LOC_Os02g11820 | 0.447210 | 5.199080 | 4.038747 | 5.186422 | 6.541553 | 5.871819 | 7.252667 | GTPase-activating protein, putative, expressed |
| LOC_Os02g20420 | -2.274121 | 7.422737 | 5.700186 | 3.976248 | 0.424646 | 0.835902 | 2.274510 | retrotransposon protein, putative, LINE subclass, expressed |
| LOC_Os02g29030 | -2.641217 | 11.346190 | 9.755862 | 6.125633 | 2.387895 | 0.161630 | 1.814883 | retrotransposon protein, putative, unclassified, expressed |
| LOC_Os02g31074 | n/a | 8.716331 | 4.810421 | 8.449798 | 0.000000 | 0.000000 | 0.000000 | expressed protein |
| LOC_Os02g39820 | 3.533897 | 0.565778 | 0.623204 | 1.064030 | 8.897394 | 8.080151 | 9.118358 | PPR repeat domain containing protein, putative, expressed |
| LOC_Os02g42560 | n/a | 0.000000 | 0.000000 | 0.000000 | 6.702387 | 4.211552 | 6.894724 | expressed protein |
| LOC_Os02g46500 | -0.315177 | 8.891872 | 8.365264 | 7.896873 | 6.485898 | 6.674709 | 7.056985 | U-box, putative, expressed |
| LOC_Os02g57310 | 0.441343 | 4.815230 | 5.927997 | 4.700879 | 6.208123 | 7.484943 | 7.277982 | pib, putative, expressed |
| LOC_Os03g03850 | 1.447104 | 3.036628 | 1.777981 | 5.564342 | 9.347197 | 9.497802 | 9.454268 | GATA zinc finger domain containing protein, expressed |
| LOC_Os03g16800 | -0.852430 | 7.938923 | 8.246845 | 9.144074 | 5.498613 | 3.801368 | 4.728975 | clathrin assembly protein, putative, expressed |
| LOC_Os03g18470 | -0.349541 | 8.763048 | 7.936093 | 8.370251 | 7.229037 | 7.040730 | 5.405540 | expressed protein |
| LOC_Os03g46850 | -0.736782 | 8.000492 | 8.797308 | 8.760571 | 5.472877 | 6.808251 | 3.055843 | expressed protein |

| | | | | | | | | |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|---|
| LOC_Os03g58910 | n/a | 9.714427 | 8.878179 | 8.165621 | 0.000000 | 0.000000 | 0.000000 | expressed protein |
| LOC_Os03g59350 | -1.543939 | 4.338211 | 6.546330 | 5.348366 | 1.222727 | 2.152606 | 2.191707 | anthocyanin 3-O-beta-glucosyltransferase, putative, expressed |
| LOC_Os03g59730 | -0.654609 | 6.265669 | 5.865758 | 6.545905 | 4.886355 | 3.324106 | 3.654270 | No apical meristem protein, putative, expressed |
| LOC_Os04g04020 | 0.630654 | 8.500091 | 5.084552 | 5.300370 | 10.117690 | 10.122870 | 8.998469 | protein transport protein Sec24-like, putative, expressed |
| LOC_Os04g06320 | -2.152807 | 8.166271 | 9.087221 | 7.917314 | 3.773518 | | 0.000000 | retrotransposon, putative, centromere-specific, expressed |
| LOC_Os04g07784 | -1.375276 | 5.174799 | 5.879472 | 6.815286 | 4.085803 | 1.626674 | 1.175859 | transposon protein, putative, unclassified, expressed |
| LOC_Os04g31620 | -0.454373 | 8.956835 | 11.083780 | 10.937190 | 6.891960 | 7.878837 | 7.837646 | retrotransposon protein, putative, unclassified, expressed |
| LOC_Os04g44924 | 0.206963 | 7.332692 | 7.319315 | 7.661456 | 8.761209 | 8.532180 | 8.462050 | short-chain dehydrogenase/reductase, putative, expressed |
| LOC_Os04g46450 | -0.756071 | 11.729950 | 7.976326 | 11.460240 | 7.391129 | 5.970288 | 5.092487 | zinc finger, C3HC4 type domain containing protein, expressed |
| LOC_Os05g07230 | 0.170715 | 7.501927 | 7.375391 | 7.774612 | 8.548177 | 8.755270 | 8.193933 | expressed protein |
| LOC_Os05g28780 | 3.197739 | 1.122984 | 0.445053 | 0.752469 | 6.991055 | 6.692052 | 7.607985 | GCRP10 - Glycine and cysteine rich family protein precursor, expressed |
| LOC_Os05g49130 | 0.751220 | 4.391567 | 5.419621 | 4.419680 | 7.048064 | 8.211172 | 8.694379 | 16S rRNA processing protein RimM containing protein, expressed |
| LOC_Os05g49230 | -0.281565 | 5.224623 | 4.888661 | 5.820986 | 4.397322 | 4.387034 | 4.324735 | ribosomal RNA large subunit methyltransferase J, putative, expressed |
| LOC_Os05g49520 | -1.586323 | | 10.975530 | 9.697913 | 4.057286 | | 2.827368 | CTP synthase, putative, expressed |
| LOC_Os06g03210 | 1.329571 | 0.000000 | 5.379900 | 4.225647 | 8.874299 | 7.458745 | 7.808381 | expressed protein |
| LOC_Os06g09910 | -0.931275 | 8.022182 | 9.222861 | 12.757560 | 4.833505 | 5.836784 | 5.062920 | phosphopantothenoylcysteine decarboxylase, putative, expressed |
| LOC_Os06g12510 | 0.517583 | 6.628105 | 5.999399 | 6.206304 | 7.768407 | 9.793121 | 9.400100 | pentatricopeptide, putative, expressed |
| LOC_Os06g13020 | -2.160897 | 7.434230 | 8.044192 | 6.533834 | 0.254771 | 2.622388 | 2.045160 | DNA polymerase lambda, putative, expressed |
| LOC_Os06g26340 | 2.186145 | 0.000000 | 0.000000 | 5.120895 | 8.571237 | 8.076879 | 6.656453 | CGMC_MAPKCMGC_2.10 - CGMC includes CDA, MAPK, GSK3, and CLKC kinases, expressed |
| LOC_Os06g50200 | 0.132700 | 7.189142 | 7.098462 | 7.418045 | 7.644165 | 7.930403 | 8.222273 | retrotransposon protein, putative, unclassified, expressed |
| LOC_Os07g03170 | 0.049684 | 7.951106 | 8.087129 | 8.082973 | 8.462852 | 8.303908 | 8.199609 | expressed protein |
| LOC_Os07g06900 | 2.223506 | 0.991685 | 0.000000 | 2.354070 | 4.698596 | 7.123765 | 3.803217 | OsFBLD3 - F-box, LRR and FBD domain containing protein, expressed |
| LOC_Os07g19460 | -1.009685 | 10.365990 | 8.283803 | 10.289920 | 6.755724 | 4.848195 | 2.769128 | mitochondrial carrier protein, putative, expressed |

| | | | | | | | | |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|--|
| LOC_Os07g23430 | 0.194867 | 7.669888 | 7.136794 | 8.287170 | 9.060369 | 8.923233 | 8.450054 | fatty acid desaturase, putative, expressed |
| LOC_Os07g41014 | -0.502838 | 10.466560 | 11.748440 | 10.004620 | 9.556615 | 6.227372 | 6.953944 | glycosyl hydrolases family 17 protein, expressed |
| LOC_Os07g44590 | -1.628506 | 7.153158 | 7.783792 | 6.528839 | 1.616559 | 2.938520 | 2.387450 | peroxidase precursor, putative, expressed |
| LOC_Os08g07960 | 1.401499 | 3.236947 | 2.586328 | 2.291961 | 7.444779 | 7.343051 | 6.650669 | mitotic checkpoint protein, putative, expressed |
| LOC_Os08g25340 | -2.955759 | 6.976073 | 3.049035 | 8.318443 | 0.000000 | 1.653114 | 0.711233 | hypothetical protein |
| LOC_Os08g29400 | -3.085433 | 3.613841 | 9.542770 | 9.592256 | 1.047585 | 1.632521 | 0.000000 | OsFBX290 - F-box domain containing protein, expressed |
| LOC_Os08g34960 | 0.125070 | 7.361547 | 7.560425 | 7.664742 | 8.249484 | 8.241459 | 8.141235 | MYB family transcription factor, putative, expressed |
| LOC_Os10g04180 | 0.837477 | 2.409984 | 4.809939 | 3.468912 | 7.357952 | 5.891959 | 5.850209 | NB-ARC domain containing protein, expressed |
| LOC_Os10g16750 | 0.686361 | 5.273195 | | 3.724561 | 6.994231 | 7.548696 | 7.176119 | retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass, expressed |
| LOC_Os10g26110 | -0.819133 | 5.347087 | 7.074353 | 4.448031 | 3.316800 | 2.614684 | 3.629836 | decarboxylase, putative, expressed |
| LOC_Os10g31990 | -0.814154 | 7.651996 | 8.331620 | 6.046736 | 5.482468 | 2.951922 | 4.095195 | retrotransposon protein, putative, unclassified, expressed |
| LOC_Os10g32640 | -3.002331 | 4.974646 | 8.100182 | 6.748298 | 0.000000 | 1.403417 | 1.070474 | retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass, expressed |
| LOC_Os10g32800 | 0.278729 | 6.500049 | 7.505505 | 7.047132 | | 8.617567 | 8.408801 | expressed protein |
| LOC_Os11g01350 | 0.789199 | 5.661950 | 5.321030 | 3.439990 | 7.371725 | 8.682875 | 8.869942 | ligA, putative, expressed |
| LOC_Os11g09010 | 5.760712 | 0.000000 | 0.369296 | 0.000000 | 5.792411 | 7.471759 | 6.758495 | lipase, putative, expressed |
| LOC_Os11g11650 | 1.600714 | 1.986554 | 2.938471 | 2.246817 | 4.782124 | 8.481379 | 8.488225 | expressed protein |
| LOC_Os11g16480 | 0.208247 | 7.617188 | 7.369029 | 7.882308 | | 8.860648 | 8.752439 | hypothetical protein |
| LOC_Os11g17700 | -1.566951 | 6.098849 | 6.773212 | 6.151091 | 1.282891 | 3.186812 | 1.951010 | retrotransposon protein, putative, unclassified, expressed |
| LOC_Os11g25610 | -1.079525 | 9.945001 | 9.204145 | 8.090783 | 6.327171 | 5.227631 | 1.334711 | ZOS11-02 - C2H2 zinc finger protein, expressed |
| LOC_Os11g26060 | n/a | 5.235859 | 9.245164 | 5.706386 | 0.000000 | 0.000000 | 0.000000 | retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass |
| LOC_Os11g31590 | -1.435785 | 8.787151 | 8.410645 | 10.769330 | 4.393542 | 5.944385 | 0.000000 | armadillo, putative, expressed |
| LOC_Os11g31840 | -3.874955 | 3.443372 | 8.851912 | 5.998122 | 0.000000 | 1.246858 | 0.000000 | retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass, expressed |
| LOC_Os11g34090 | 0.981203 | 5.521683 | 2.713128 | 2.334788 | 5.618723 | 7.418229 | 7.828604 | plant protein of unknown function domain containing protein, expressed |
| LOC_Os11g36930 | -0.868340 | 8.632730 | 8.066569 | 10.186820 | 5.402623 | 3.537139 | 5.787826 | ZOS11-05 - C2H2 zinc finger protein, expressed |
| LOC_Os12g03580 | -0.100475 | 7.563481 | 7.339407 | 7.482572 | 6.902019 | 7.039245 | 6.938228 | expressed protein |
| LOC_Os12g07030 | 1.143840 | 1.345194 | 5.892118 | 4.376731 | 7.484604 | 9.089227 | 9.089536 | expressed protein |
| LOC_Os12g09520 | 0.392825 | 6.268230 | 5.627902 | 4.538896 | 6.865704 | 6.896255 | 7.816608 | hypothetical protein |
| LOC_Os12g15420 | 4.898761 | 1.051974 | 0.000000 | 0.000000 | 11.430630 | 9.885195 | 10.066060 | nucampholin, putative, expressed |
| LOC_Os12g32610 | -1.309453 | 9.899296 | 8.294217 | 9.751497 | 6.732040 | 1.934282 | 2.608759 | expressed protein |

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) นายธีรพงษ์ บัวบุชา
ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Teerapong Buaboocha
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3259900146177
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ดร.
4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ ๑ 10330
โทรศัพท์ 02-218-5425, 02-218-5416
โทรสาร 02-218-5418
อีเมล Teerapong.B@Chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

| ปริญญา | วุฒิการศึกษา | มหาวิทยาลัย | ปีที่จบ |
|-----------|--|--|---------|
| ปริญญาตรี | วท.บ. (พฤกษศาสตร์) เกียรตินิยมอันดับ 1 | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย | 2538 |
| ปริญญาเอก | Ph.D. (Plant Biology) | University of Illinois, Urbana-Champaign | 2544 |

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการชีววิทยาโมเลกุลของพืช

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

- 7.1.1 Mechanisms of calcium signaling and salt stress tolerance in rice using transcriptomics analysis and molecular approaches

แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

- 7.1.2 Genome-wide association study of in-land salt resistant traits in Thai rice (*Oryza sativa* L.)

แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

- 7.1.3 Functional characterization of *OsCML* genes from *Oryza sativa* L.

แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

- 7.1.4 RNA-induced gene silencing under control of *OsCam1-1* promoter

แหล่งทุน Asahi Glass Foundation

- 7.1.5 Effect of transgenic expression in rice of a calmodulin on salt stress response

แหล่งทุน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- 7.1.6 Identification of calmodulin-binding proteins involved in salt stress response from rice *Oryza sativa* L. cv. KDML105
แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
- 7.1.7 Production of recombinant rice calmodulin in *Escherichia coli*
แหล่งทุน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 7.1.8 Expression of genes encoding Ca²⁺-binding calcineurin B-like proteins under osmotic stress
แหล่งทุน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 7.1.9 Cloning of a betaine transporter gene and functional studies of its product from *Aphanothece halophytica*
แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
- 7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว
- 7.2.1 Udomchalothorn T, Plaimas K, Comai L, Buaboocha T, Chadchawan S. Molecular karyotyping and exome Analysis of salt-Tolerant rice mutant from somaclonal variation. *Plant Genome* 2014, 7:3
แหล่งทุน กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช
- 7.2.2 Seang-Ngam S, Limruengroj K, Pichyangkura R, Chadchawan S, Buaboocha T. Chitosan potentially induces drought resistance in rice *Oryza sativa* L. via calmodulin. *J Chitin Chitosan Sci*, 2014, 117-122
แหล่งทุน ทุนมหาวิทยาลัยวิจัย
- 7.2.3 Sripinyowanich S, Chamnanmanoontham N, Udomchalothorn T, Maneeprasopsuk S, Santawee P, Buaboocha T, Qu L-J, Gu H, Chadchawan S. Overexpression of a partial fragment of the salt-responsive gene OsNUC1 enhances salt adaptation in transgenic *Arabidopsis thaliana* and rice (*Oryza sativa* L.) during salt stress. *Plant Science*, 213: 67-78
แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และทุนมหาวิทยาลัยวิจัย
- 7.2.4 Sripinyowanich S, Klomsakul P, Boonburapong B, Bangyeekhun T, Asami T, Gu H, Buaboocha T, Chadchawan S. Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): the role of *OsP5CS1* and *OsP5CR* gene expression during salt stress. *Environ Exp Bot* 2013, 86: 94-105
แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
- 7.2.5 Chinpongpanich A, Limruengroj K, Phean-o-pas S, Limpaseni T, Buaboocha T. Expression analysis of calmodulin and calmodulin-like genes from rice, *Oryza sativa* L. *BMC Research Notes* 2012, 5:625

- แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และทุนมหาวิทยาลัยวิจัย
- 7.2.6 Saeng-ngam S, Takpirom W, Buaboocha T, Chadchawan S. The role of the *OsCam1-1* salt stress in ABA accumulation and salt tolerance in rice. *J Plant Biol* 2012, 55: 198-208
- แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และทุนมหาวิทยาลัยวิจัย
- 7.2.7 Chinpongpanich A, Thairath, S, Wutipraditkul N, **Buaboocha T**. Biophysical characterization of calmodulin and calmodulin-like proteins from rice, *Oryza sativa* L. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2011, 43: 867-876
- แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และทุนมหาวิทยาลัยวิจัย
- 7.2.8 Wutipraditkul N, Boonkomrat S, **Buaboocha T**. Expression and characterization of catalases from rice, *Oryza sativa*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2011, 75(10): 1900-1906
- แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
- 7.2.9 Phean-o-pas S, Limpaseni T, **Buaboocha T**. Structure and Expression Analysis of the *OsCam1-1* Calmodulin Gene from *Oryza sativa* L. *BMB Reports* 2008, 41(11): 771-777
- แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
- 7.2.10 Boonburapong B, **Buaboocha T**. Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins. *BMC Plant Biology* 2007, 7:4
- แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
- 7.2.11 Laloknam S, Tanaka K, **Buaboocha T**, Waditee R, Incharoensakdi A, Hibino T, Tanaka Y, Takabe T. A Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains betaine transporter that is active at alkaline pH under high salinity conditions. *Appl Environ Microb* 2006, 72(9): 6018-6026
- แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
- 7.2.12 Waditee R, **Buaboocha T**, Kato M, Hibino T, Suzuki S, Nakamura T, Takabe T. Carboxyl terminal hydrophilic tail of a NhaP type Na^+/H^+ antiporter from cyanobacteria is involved in the apparent affinity for Na^+ and pH sensitivity. *Arch Biochem Biophys* 2006, 450(1): 113-121
- 7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ
- 7.3.1 โครงการ Genome-wide association study of in-land salt resistant traits in Thai rice (*Oryza sativa* L.)
- ระยะเวลาโครงการ 3 ปี ตั้งแต่ พฤษภาคม 2555 ถึง กรกฎาคม 2558

| | |
|-----------------|---|
| แหล่งทุน | สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) |
| สถานะผู้สมัคร | หัวหน้าโครงการ |
| สถานภาพงานวิจัย | ดำเนินการได้ร้อยละ 70 |
| 7.3.2 โครงการ | Mechanisms of calcium signaling and salt stress tolerance in rice using transcriptomics analysis and molecular approaches |
| ระยะเวลาโครงการ | 3 ปี ตั้งแต่ กันยายน 2556 ถึง กันยายน 2559 |
| แหล่งทุน | สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย |
| สถานะผู้สมัคร | หัวหน้าโครงการ |
| สถานภาพงานวิจัย | ดำเนินการได้ร้อยละ 40 |

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) นาย ศุภอรรถ ศิริกันทรมาศ
ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Supaart Sirikantaramas
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน
3 1021 01028 86 1
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.
4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ ๑ 10330
โทรศัพท์ 02-218-5425, 02-218-5416
โทรสาร 02-218-5418
อีเมล supaart.s@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

| ปริญญา | วุฒิการศึกษา | มหาวิทยาลัย | ปีที่จบ |
|---------------|---------------------------|--------------------------------------|-----------|
| ปริญญาตรี | วท. บ.(ชีวเคมี) | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย | 1997 |
| ปริญญาโท | M. Sc.(Biology) | Kyushu University, Japan | 2002 |
| ปริญญาเอก | Ph. D. (Pharmacognosy) | Kyushu University, Japan | 2005 |
| หลังปริญญาเอก | | Chiba University, Japan | 2005-2008 |
| หลังปริญญาเอก | | University of Copenhagen, Denmark | 2008-2010 |

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
ชีววิทยาโมเลกุลทางพืช พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย
 - 7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย
 - 7.1.1 การสำรวจชนิดและปริมาณสารพิษเคมีกลุ่มกลูโคซิโนเลตในผักตระกูลกะหล่ำ
 - 7.1.2 ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังและเปลี่ยนแปลงสีชมพู
 - 7.1.3 การโคลนการแสดงออกและฤทธิ์ชีวภาพของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ต้านจุลชีพจากข้าว
 - 7.1.4 การตอบสนองของเมตาโบไลต์ในข้าวไทยต่อภาวะเครียดจากความเค็ม
 - 7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว
 - 7.2.1 การสำรวจชนิดและปริมาณสารพิษเคมีกลุ่มกลูโคซิโนเลตในผักตระกูลกะหล่ำ

- 7.2.2 ผลของโคโตซานต่อการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังและเปลี้ยแป้งสีชมพู
- 7.2.3 การโคลนการแสดงออกและฤทธิ์ชีวภาพของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ต้านจุลชีพจากข้าว
- 7.2.4 การตอบสนองของเมตาโบไลต์ในข้าวไทยต่อภาวะเครียดจากความเค็ม

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ

7.3.1 โครงการวิทยาศาสตร์เชิงโอมิกส์ในพืชสมุนไพรไทย

ระยะเวลาโครงการ 1 ปีตั้งแต่ 1 มิถุนายน 2557 ถึง 31 พฤษภาคม 2558

แหล่งทุน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถานะผู้สมัคร หัวหน้าโครงการ

สถานภาพงานวิจัย ดำเนินการได้ร้อยละ 50

7.3.2 โครงการการเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในต้นงอกทานตะวันสายพันธุ์ไทย

ระยะเวลาโครงการ 1 ปีตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2557 ถึง 31 กรกฎาคม 2558

แหล่งทุน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถานะผู้สมัคร หัวหน้าโครงการ

สถานภาพงานวิจัย ดำเนินการได้ร้อยละ 50

7.4 ผลงานตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ

7.4.1 งานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

Sirikantaramas, S., Meeprasert, A., Rungrotmongkol, T., Fuji, H., Hoshino, T., Sudo, H., Yamazaki, M., Saito, K. (2015). Structural insight of DNA topoisomerase I from camptothecin-producing plants reveals by molecular dynamics simulations. *Phytochemistry. In press.* (IF = 3.2)

Sirikantaramas, S., Yamazaki, Y., Saito, K. (2014) How plants avoid the toxicity of self-produced defense bioactive compounds. In A. Osbourn, R.J. Goss & G.T. Carter (Eds.), *Natural Products: Discourse, Diversity and Design* (pp. 69-82). Wiley Blackwell.

Sirikantaramas, S., Yamazaki, Y., Saito, K. (2013) Camptothecin: biosynthesis, biotechnological productions, and resistance mechanism in producing plants. *Adv. Bot. Res.* 68, 139-161.

Yamazaki, M., Asano, T., Yamazaki, Y., Sirikantaramas, S., Sudo, H., Saito, K. (2010) Biosynthetic system of camptothecin: An anticancer plant product. *Pure Appl. Chem.* 82, 213-218. (IF = 2.1)

Sirikantaramas, S., Yamazaki, Y., Saito, K. (2009) A survival strategy: the coevolution of

- the camptothecin biosynthetic pathway and self-resistance mechanism. *Phytochemistry* 70, 1894-1898. (IF = 3.2)
- Lehmann, M., Schwarzländer, M., Obata, T., Sirikantaramas, S., Burow, M., Olsen, C.E., Tohge, T., Fricker, M.D., Møller, B.L., Fernie, A.R., Sweetlove, L.J., and Laxa, M. (2009) The metabolic response of *Arabidopsis* roots to oxidative stress is distinct from that of heterotrophic cells in culture and highlights a complex relationship between the levels of transcripts, metabolites, and flux. *Mol. Plant.* 2, 390-406. (IF = 4.3)
- Sirikantaramas, S., Yamazaki, M., and Saito, K. (2008) Mechanisms of resistance to self-produced toxic secondary metabolites in plants. *Phytochem. Rev.* 7, 467-477. (IF will be released in 2011)
- Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Shoyama, Y., and Morimoto, S. (2008) Phytocannabinoids in *Cannabis sativa*: Recent studies on biosynthetic enzymes. In: Lambert, D.M. (Ed.), *Cannabinoids in Nature and Medicine*. Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich.
- Sirikantaramas, S., Yamazaki, M., and Saito, K. (2008) Mutation in topoisomerase I as a self-resistance mechanism coevolved with the production of the anticancer alkaloid camptothecin in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 6782-6786. (IF = 9.8)
- Sirikantaramas, S., Asano, T., Sudo, H., Yamazaki, M., and Saito, K. (2007) Transport of camptothecin in hairy roots of *Ophiorrhizapumila*. *Phytochemistry* 68, 2881-2886. (IF = 3.2)
- Taura, F., Dono, E., Sirikantaramas, S., Yoshimura, K., Shoyama, Y., and Morimoto, S. (2007) Production of tetrahydrocannabinolic-acid by the biosynthetic enzyme secreted from transgenic *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361, 675-680. (IF = 2.6)
- Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Yoshikai, K., Shoyama, Y., and Morimoto, S. (2007) Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*. *FEBS Lett.* 581, 2929-2934. (IF = 3.5)
- Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Shoyama, Y., and Morimoto, S. (2007) Phytocannabinoids in *Cannabis sativa*: Recent studies on biosynthetic enzymes. *Chem. Biodivers.* 4, 1649-1663. (IF = 1.9)
- Sirikantaramas, S., Taura, F., Morimoto, S., and Shoyama, Y. (2007) Recent advances in *Cannabis sativa* research: biosynthetic studies and potential in biotechnology. *Curr. Pharm. Biotech.* 8, 237-243. (IF = 3.4)
- Sirikantaramas, S., Asano, T., Sudo, H., Yamazaki, M., and Saito, K. (2007)

Camptothecin: Therapeutic potential and biotechnology. *Curr. Pharm. Biotech.* 8, 196-202. (IF = 3.4)

7.4.2 งานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

ศุภอรรถ ศิริกันทรมาศ (2012) UDP-ไกลโคซิลทรานสเฟอรัสแพลมิลี่ที่ 1: ความหลากหลายของหน้าที่ในพืช วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. ฉบับที่ 28 ปีที่ 2 ธันวาคม 2555.

7.4.3 งานตีพิมพ์ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

Tangpranomkorn, S., Kusano, M., Nakabayashi, R., Rakpenthai, A., Buaboocha, T., Saito, K., **Sirikantaramas, S.** (2014) Metabolic changes in stress-tolerant transgenic rice overexpressing calmodulin. June 23-26, 10th Annual Conference of the Metabolomics Society, Tsuruoka, Japan.

Rakpenthai, A., Burow, M., Olsen, C.E., Karnpakdee, K., **Sirikantaramas, S.** (2014). Enhanced bioactive compounds in white radish sprout using chitosan. May 6-8, 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty, Phuket, Thailand.

Boonrueng, C., and **Sirikantaramas, S.** (2013) Molecular cloning and expression analysis of adenylate kinase of cassava cv. KU50. October 16-19, The 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, Bangkok, Thailand.

Boonpa, K., and **Sirikantaramas, S.** (2013) Cloning and heterologous expression of GASR3 from rice. October 16-19, The 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, Bangkok, Thailand.

Tangpranomkorn, S., and **Sirikantaramas, S.** (2013) Identification of differentially expressed genes in rice *Oryza sativa* L. 'KDML 105' overexpressing OsCam1-1. October 16-19, The 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, Bangkok, Thailand.

Tantong, T., Boonpa, K., Rakpenthai, A., **Sirikantaramas, S.** (2012) Using gene coexpression analysis to identify promising rice antimicrobial peptides. November 28-30, The Fourth International Conference on Natural Products for Health and Beauty, Chiang Mai, Thailand.

- Piriyakananon, K., Karnpakdee, K., Nomai, S., Olsen, C.E., Boonrueng, C., Tangpranomkorn, S., **Sirikantaramas, S.** (2012) Metabolite changes in chitosan-sprayed white radish sprouts. November 28-30, The Fourth International Conference on Natural Products for Health and Beauty, Chiang Mai, Thailand.
- Sirikantaramas, S.**, Olsen, C.E., Møller, B.L. (2010) Characterization of up-regulated glycosyltransferases during menadione-induced oxidative stress in Arabidopsis seedlings. June 6-10, 21st International Conference on Arabidopsis Research, Yokohama, Japan.
- Sirikantaramas, S.**, Lehmann, M., Schwarzländer, M., Obata, T., Burow, M., Olsen, C.E., Tohge, T., Fricker, M.D., Møller, B.L., Fernie, A.R., Sweetlove, L.J., and Laxa, M. (2009). The metabolic and transcriptomic response of Arabidopsis roots to oxidative stress. July 5-8, Metabomeeting, Norwich, UK.
- Sirikantaramas, S.** (2009) Pharmaceutical and agricultural potentials of genetically engineered plants. May 22-23, The Annual Meeting of the **Association of Thai Professionals in Europe, Paris, France.**
- Sirikantaramas, S.**, Lehmann, M., Schwarzländer, M., Obata, T., Burow, M., Olsen, C.E., Tohge, T., Fricker, M.D., Møller, B.L., Fernie, A.R., Sweetlove, L.J., and Laxa, M. (2009). The metabolic response of Arabidopsis roots to oxidative stress. January 29-30, Plant Biotech Denmark Annual Meeting, Copenhagen, Denmark.
- Sirikantaramas S.**, Yamazaki, M., and Saito K. (2007). Adaptive evolution of DNA topoisomerase I in camptothecin-producing plants. July 21-25, Phytochemistry Society of North America Annual Meeting, St. Louis, USA.
- Sirikantaramas S.**, Yamazaki, M., and Saito K. (2007). Self-resistance mechanism of camptothecin-producing plants: possible co-evolution of DNA topoisomerase I with camptothecin biosynthetic pathway. April 11-15, 50 Years of the Phytochemical Society of Europe, Cambridge, United Kingdom.
- Sirikantaramas S.**, Sudo H., Asano T., Saito, K., and Yamazaki, M. (2006). The study on camptothecin transporter in *Ophiorrhiza pumila*. July 23-28, IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products, Kyoto, Japan.
-

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) น.ส นุชนาถ วุฒิประดิษฐกุล
ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Nuchanat Wutipraditkul
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน
3 1002 01669 76 9
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ ๑ 10330
โทรศัพท์ 02-218-5439, 02-218-5416
โทรสาร 02-218-5418
อีเมล nuchanat.w@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

| ปริญญา | วุฒิการศึกษา | มหาวิทยาลัย | ปีที่จบ |
|-----------|-------------------------------|--------------------------|---------|
| ปริญญาตรี | วท. บ. (รังสีเทคนิค) | มหิดล | 1992 |
| ปริญญาโท | M. Sc. (Biochemistry) | จุฬาลงกรณ์ | 1999 |
| ปริญญาเอก | Ph. D. (Agricultural Science) | Nagoya University, Japan | 2005 |

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
ชีววิทยาโมเลกุลทางพืช พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย
 - 7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย
 - 7.1.1 การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของแคทาเลสจากข้าว *Oryza sativa* L.
 - 7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว
 - 7.2.1 การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของแคทาเลสจากข้าว *Oryza sativa* L.
 - 7.2.2 การยับยั้ง xanthine oxidase ในมะรุม *Moringa oleifera* ภายใต้ภาวะเครียด (หัวหน้าโครงการ)
 - 7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ
 - 7.3.1 ศึกษากระบวนการต้านออกซิเดชันในข้าว *Oryza sativa* L. ทรานสคริปต์ที่มียีน OsCaM1-1 แสดงออกเกินปกติภายใต้ภาวะความเค็ม
 - 7.4 ผลงานตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ
 - 7.4.1 งานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

- Wutipraditkul N, Boonkomrat S, Buaboocha T. Expression and characterization of catalases from rice, *Oryza sativa*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry** 2011, 75(10): 1900-1906.
- Chinpongpanich A, Thairath, S, Wutipraditkul N, Buaboocha T. Biophysical characterization of calmodulin and calmodulin-like proteins from rice, *Oryza sativa* L. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica** 2011, 43: 867-876.
- นุชนาถ วุฒิประดิษฐกุล “ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและระบบต้านการเกิดออกซิเดชันในพืช” . **วารสารวิทยาศาสตร์ มข** .39(2): (2554).
- Krungskra S. R., Wutipraditkul N., Krungkrai J. 2008. Dihydroorotase of human malarial parasite *Plasmodium falciparum* differs from host enzyme. **Biochem Biophys Res Comm.** 366: 821-826.
- Wutipraditkul N, Waditee R, Incharoensakdi A, Hibino T, Tanaka Y, Nakamura T, Shikata M, Takabe T, Takabe T. 2005. Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains Nap A- type Na⁺/H⁺ antiporter with novel ion specificity that are involved in salt tolerance at alkaline pH. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 4176-4184.
- Kaewneramit T.and Wutipraditkul N. 2014. Effect of salinity stress on growth and photosynthetic pigments in transgenic ‘KDML 105’ rice overexpressing OsCaM1-1 gene. *Veridian E-Journal Science and Technology Silpakorn University.* 11-18.

7.4.2 การประชุมวิชาการ

- Cloning and expression of OsCatA gene from rice (*Oryza sativa*). "Protein research from basic approaches to modern technologies" The 5th Annual Symposium of protein Society of Thailand at Chulabhorn research institute-conference center. Proceeding (23-25 June 2010).
-