Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University
Volume 3 Number 5 September– October2016 (ISSN 2408 – 1248)

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับรีโทรทรานสโพซอนและการสังเคราะห์ด้วยแสงในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ภายใต้ภาวะเครียดจากการขาดน้ำ*

Expressions of retrotransposon and photosynthetic-related genes in *Oryza sativa* L. cv. 'KDML105' under water stress

ศรัณยพร มากทรัพย์ (Sarunyaporn Maksup)**

บทคัดย่อ

การขาดน้ำเป็นปัจจัยสำคัญที่สร้างความเสียหายให้กับระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง การเติบโต และผลผลิตของข้าว จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าโปรตีนรีโทรทรานสโพซอนอาจเกี่ยวข้องกับการปรับตัวเพื่อทนต่อสภาวะเครียดดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง และยีนรีโทรทรานสโพซอนของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. cv. 'KDML105') ภายใต้สภาวะขาดน้ำ ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR จากการทดลองปลูกข้าวอายุ 3 สัปดาห์ ในสภาพขาดน้ำเป็นระยะเวลา 0 6 12 24 48 และ 96 ชั่วโมง พบว่าการขาดน้ำส่งผลให้น้ำหนักสดของต้น และปริมาณรงควัตถุในการสังเคราะห์แสงมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในชั่วโมงที่ 48 และ 96 นอกจากนี้พบว่าระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนที่ทำหน้าที่ในระบบแสง I และ II (*PsaE OEC*1 และ *PsbP*) มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับการลดลงของปริมาณรงควัตถุ ส่วนยีนรีโทรทรานสโพซอน (*TE423*) พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) หลังการขาดน้ำเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าการขาดน้ำส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสงทั้งสองของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ส่งผลให้มีอัตราการสังเคราะห์แสงและการเจริญเติบโตลดลง อย่างไรก็ตามข้าวอาจสามารถปรับตัวทนต่อการขาดน้ำด้วยกลไกอื่นซึ่งถูกควบคุมโดยรีโทรทรานสโพซอนได้

คำสำคัญ: ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง รีโทรทรานสโพซอน การขาดน้ำ

* การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง และยีนรีโทรทรานสโพซอนของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ภายใต้สภาวะขาดน้ำ เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคต

** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ พระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม 73000 (Department of Biology, Silpakorn University, Nakornpathom 73000); E-mail: srypms@yahoo.com

Abstract

Water stress is a detrimental factor to photosynthetic apparatuses, growth and yield of rice. From previous studies, retrotransposons may function in adaptation for the stress tolerance. Thus, the aim of this study was to analyze the expression levels of photosynthetic and retrotransposon-related genes in KDML105 rice (*Oryza sativa* L. cv. 'KDML105') under water stress by quantitative real-time PCR. Three-week old seedlings grown under water stress for 0, 6, 12, 24, 48 and 96h were used for analysis. The results showed that growth and photosynthetic pigment contents were significantly reduced at 48 and 96 hours ($p < 0.05$). Down-regulation of genes in photosystem I and II (*PsaE*, *OEC1* and *PsbP*) were observed according to the degradation of the pigments. Up-regulation of retrotransposon gene (*TE423*) was significantly observed after water stress for 12 h ($p < 0.05$). The results suggest that water stress affects the photosynthetic efficiency of both photosystems of KDML105 rice which lead to the reduction of photosynthesis and growth. However, it might tolerate to water stress through other mechanisms by the regulation of retrotransposons.

Keywords: KDML105 rice, photosynthetic genes, retrotransposon, water stress

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นธัญพืชอาหารที่สำคัญมากของโลก โดยมีการปลูกและบริโภคข้าวมากที่สุดในภูมิภาคแถบเอเชีย โดยปริมาณความต้องการบริโภคข้าวของประชากรโลกมีเพิ่มขึ้นทุกปี แต่ปัจจุบันเนื่องจากปัญหาโลกร้อน และภูมิอากาศโลกเกิดการเปลี่ยนแปลง (climate change) ส่งผลกระทบให้เกิดสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของข้าว จึงทำให้ผลผลิตข้าวลดลง จากรายงานพบว่าการขาดน้ำ (water stress) ส่งผลให้ผลผลิตข้าวลดลงได้มากกว่า 50% (Pandey et al., 2004; Jongdee et al., 2006) ในจำนวนนั้นรวมถึงการลดลงของผลผลิตข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ('KDML105') ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์ส่งออกสำคัญของประเทศไทย ดังนั้นการศึกษากลไกการตอบสนองของข้าวพันธุ์ 'KDML105' ภายใต้สภาวะเครียดจากการขาดน้ำ จึงเป็นประโยชน์ต่อการใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ทนต่อการขาดน้ำได้

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าความเครียดจากการขาดน้ำทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างในการสังเคราะห์แสง รวมทั้งส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อโปรตีนซึ่งทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบของระบบแสง I และระบบแสง II ซึ่งมีหน้าที่รวบรวมพลังงานแสง และทำให้เกิดกระบวนการส่งต่ออิเล็คตรอนในปฏิกิริยาใช้แสง ทำให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงสุทธิลดลง และส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลผลิตลดลงในที่สุด (Yamane et al., 2003; Pieters and El Souki, 2005) นอกจากนี้มีการศึกษาการตอบสนองของข้าว 'KDML105' ต่อการขาดน้ำทั้งในระดับสรีรวิทยา และการแสดงออกของโปรตีนโดยวิธีโปรตีโอมิกส์ โดยเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ทนแล้ง คือพันธุ์น้ำสะกุย (NSG19) และข้าวพันธุ์ไม่ทนแล้ง คือพันธุ์ IR20 ผลปรากฏว่าข้าวพันธุ์ 'KDML105' มีความสามารถทนแล้งใกล้เคียงกับพันธุ์ NSG19 แต่มีรูปแบบการแสดงออกของ

Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University
Volume 3 Number 5 September– October2016 (ISSN 2408 – 1248)

โปรตีนที่เป็นเอกลักษณ์ต่างจากข้าวอีกสองพันธุ์ โดยพบว่าในจำนวนนั้น 28% เป็นโปรตีนในกลุ่มทรานสโพซอน (transposons) หรือรีโทรทรานสโพซอน (retrotransposons) ซึ่งมีการสะสมปริมาณสูงขึ้นหลังการขาดน้ำ (Maksup et al., 2014) โดยโปรตีนกลุ่มนี้คาดว่าน่าจะมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในข้าว (Zhao and Zhou, 2012)

อย่างไรก็ตามบทบาทและกลไกการทำงานของโปรตีนกลุ่มดังกล่าวในการทนแล้งของข้าวพันธุ์ ‘KDML105’ ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง และรีโทรทรานสโพซอนในข้าว ‘KDML105’ ภายใต้สภาวะเครียดจากการขาดน้ำด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR (qPCR) และวัดปัจจัยบ่งชี้การเจริญเติบโต และปริมาณรงควัตถุในการสังเคราะห์แสง เพื่อประโยชน์ในการศึกษากลไกการทนแล้ง และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ข้าว ‘KDML105’ ให้ทนต่อการขาดน้ำต่อไป

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมต้นกล้าข้าวและการทำให้ขาดน้ำ

คัดเลือกเมล็ดที่มีลักษณะสมบูรณ์ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. ssp. *indica* cv. ‘KDML105’) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวลพบุรี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ต.โคกตูม อ.เมือง จ. ลพบุรี จากนั้นเพาะเมล็ดและย้ายต้นกล้าลงปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ จนกระทั่งต้นกล้าข้าวมีอายุ 3 สัปดาห์ เลือกต้นที่มีขนาดใกล้เคียงกัน และย้ายลงปลูกในสารละลายอาหารสูตร Yoshida ที่เติมสาร polyethylene glycol 6000 ความเข้มข้น 22% (w/v) เพื่อจำลองสภาพการขาดน้ำที่ค่าความเครียดจากแรงดันออสโมติก (osmotic stress) ประมาณ -0.5 MPa เป็นระยะเวลา 0 6 12 24 48 และ 96 ชั่วโมง แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ จากนั้นทำการวัดค่าน้ำหนักสดใบ น้ำหนักสดราก ความยาวราก ปริมาณรงควัตถุในการสังเคราะห์ด้วยแสง และวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

2. การวัดปริมาณรงควัตถุในการสังเคราะห์แสง

ชั่งตัวอย่างใบหนัก 100 มิลลิกรัม เพื่อนำไปบดในไนโตรเจนเหลวจนเป็นผง จากนั้นเติมสารละลายอะซิโตน 95.5% (v/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 662 644 และ 470 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณรงควัตถุแต่ละชนิดดังสมการ (Chaum et al., 2006)

$$\text{คลอโรฟิลล์ a } (Chl_a) = 9.784D_{662} - 0.99D_{644}$$

$$\text{คลอโรฟิลล์ b } (Chl_b) = 21.42D_{644} - 4.65D_{662}$$

$$\text{คลอโรฟิลล์รวม} = \text{คลอโรฟิลล์ a} + \text{คลอโรฟิลล์ b}$$

$$\text{แคโรทีนอยด์} = \frac{1000D_{470} - 1.90Chl_a - 63.14Chl_b}{214}$$

เมื่อ D_i = การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น i นาโนเมตร

3. การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน

ออกแบบและทดสอบไพรเมอร์ (primers) ของยีนที่เกี่ยวข้องกับรีโทรทรานสโพซอนในข้าวพันธุ์ ‘KDML105’ คือ Retrotransposon (*TE423*) และยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการสังเคราะห์แสงในระบบแสง I และระบบแสง II ได้แก่ Oxygen-evolving complex protein 1 (*OEC1*) putative photosystem I reaction center subunit IV (*PsaE*) และ 23 kDa polypeptide of photosystem II (*PsbP*) ดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นชั่งใบข้าวน้ำหนัก 50 มิลลิกรัม เพื่อนำมาสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด โดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอของบริษัท Jena Bioscience GmbH ประเทศเยอรมนี ตามวิธีการที่ระบุในคู่มือของบริษัท วิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technology) และเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส ก่อนนำไปใช้ในการสังเคราะห์ cDNA ด้วยชุดสังเคราะห์ ImProm-II™ Reverse Transcription System

วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนโดยวิธี qPCR ด้วยระบบ iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System (BIORAD, USA) ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์มาจากต้นกล้าข้าว 3 ต้น ในการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน (3 biological replicates) และวิเคราะห์ qPCR ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ (2 technical replicates) โดยในปฏิกิริยา PCR มีการตั้งค่าดังนี้ อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 95°C เป็นเวลา 2.30 นาที อุณหภูมิ 95°C สำหรับขั้นตอน Denaturation จำนวน 40 รอบ เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 60°C สำหรับขั้นตอน Annealing เป็นเวลา 30 วินาที และตามด้วยการวิเคราะห์ melting curve โดยในการวิเคราะห์มีการใช้ยีน *EP* (LOC_Os02g09890) ซึ่งเป็นยีนที่มีระดับการแสดงออกคงที่ในข้าว ‘KDML105’ ตามรายงานของ Maksup และคณะ (2013) เป็นยีนอ้างอิง (reference gene) (Maksup et al., 2013) และวิเคราะห์ค่า Relative quantification โดยใช้วิธีการคำนวณแบบ 2(-Delta Delta C(T)) (Livak and Schmittgen, 2001)

ตารางที่ 1 ตารางแสดงข้อมูลของไพรเมอร์ (primers) ของยีนที่ใช้ในงานวิจัย

Gene description	Acc. No. NCBInr/ Gene identifier	Forward primer (5´→3´)	Reward primer (5´→3´)
Retrotransposon (*TE423*)	gi|77548423	GCAGCAGGCAAGGATGTCTC	CCTCGGAGTGAGAGGACTC
oxygen-evolving complex protein 1 (*OEC1*)	gi|739292	CATCACGTTGAGCGTCACC	CCCCTTGGATCTTGACATCC
Putative photosystem I reaction center subunit IV (*PsaE*)	gi|34394725	GGGAGTCCTACTGGTACAAC	GGCGTAGTTGTTGGTCGAC
23 kDa polypeptide of	gi|1398999	GTGCTGACGAGGACGGC	TGGCGCCCTTGAACCAC

photosystem II (*PsbP*)		GGACG	CTCTTGTC
Expressed protein (*EP*)	LOC_Os05g08980	TGAGCAAAATGGTGGAAAGC	CAGTTGCAACCCCTGTATGA

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ด้วยสถิติ One-way ANOVA และ Post Hoc Tests ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Tests (DMRT) ของซอฟแวร์ SPSS

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

1. การขาดน้ำส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวพันธุ์ 'KDML105'

การขาดน้ำส่งผลให้น้ำหนักสดทั้งต้น และน้ำหนักสดของรากลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงชัดเจนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป (ตารางที่ 2) น้ำหนักที่ลดลงเกิดจากการที่ต้นกล้าสามารถดูดน้ำเข้าสู่ภายในต้นลดลง และมีการปิดของปากใบเพื่อลดการสูญเสียน้ำ จึงมีการสังเคราะห์แสงลดลง ส่งผลให้การเจริญเติบโตของต้นกล้าลดลงด้วย สอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานว่าเมื่อข้าวขาดน้ำจะมีปริมาณน้ำสัมพัทธ์ภายในใบลดลง โดยสัมพันธ์กับการลดลงของปริมาณรงควัตถุในการสังเคราะห์ด้วยแสง และการลดลงของค่าบ่งชี้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ด้วยแสง เช่น ค่า maximum quantum efficiency of PSII photochemistry (Fv/Fm) และค่า stomatal conductance รวมถึงการลดลงของค่าอัตราการหายใจ และค่าประสิทธิภาพการใช้น้ำ ซึ่งเป็นสาเหตุให้ค่าการสังเคราะห์แสงสุทธิลดลง (Cha-um et al., 2012) ส่วนน้ำหนักสดของยอด อัตราส่วนน้ำหนักยอดต่อราก และความยาวของรากมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติเนื่องจากระยะเวลาทำการทดลองสั้นเพียง 96 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามค่าปัจจัยการเจริญดังกล่าว มีแนวโน้มลดลงหลังการขาดน้ำ

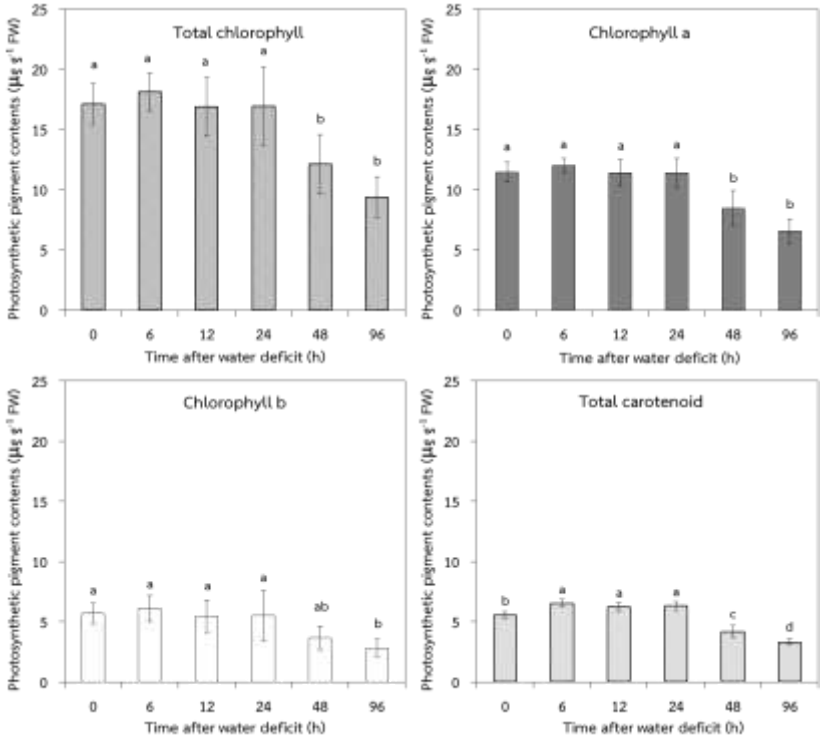
ตารางที่ 2 ตารางแสดงผลของการขาดน้ำต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวพันธุ์ 'KDML105'

ระยะเวลาที่ได้รับความเครียด (ชม.)	น้ำหนักสดทั้งต้น (กรัม)	น้ำหนักสดของราก (กรัม)	น้ำหนักสดของยอด (กรัม) ns	อัตราส่วนน้ำหนักยอดต่อราก ns	ความยาวของราก (ซม.) ns
0	0.308±0.015 ab	0.132±0.024 a	0.176±0.034	1.391±0.509	12.125±1.323
6	0.321±0.037 a	0.135±0.018 a	0.186±0.021	1.385±0.061	11.458±0.191
12	0.229±0.031 c	0.083±0.012 c	0.146±0.020	1.762±0.129	9.917±0.402
24	0.279±0.041 abc	0.119±0.021 ab	0.160±0.020	1.355±0.080	10.583±1.092
48	0.265±0.013 bc	0.097±0.012 bc	0.169±0.022	1.780±0.450	11.108±1.051
96	0.258±0.008 bc	0.123±0.003 ab	0.134±0.009	1.092±0.097	11.375±0.901

หมายเหตุ: ข้อมูลในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของตัวอย่าง 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้สถิติ DMRT, ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$

2. การขาดน้ำส่งผลให้ปริมาณของรงควัตถุในการสังเคราะห์แสงลดลง

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อขาดน้ำปริมาณรงควัตถุในการสังเคราะห์แสงทุกชนิดของข้าวพันธุ์ ‘KDML105’ มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในชั่วโมงที่ 48 และ 96 ตามลำดับ (รูปที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าปริมาณของคลอโรฟิลล์ a คลอโรฟิลล์ b และค่า Fv/Fm ของข้าวพันธุ์ ‘KDML105’ มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากการขาดน้ำเป็นเวลา 48 และ 96 ชั่วโมง (Maksup et al., 2014) แสดงว่าการขาดน้ำอาจส่งผลต่อการสังเคราะห์รงควัตถุ หรืออาจเกิดจากเยื่อหุ้มคลอโรพลาสต์เกิดความเสียหาย (Yamane et al., 2003) นอกจากนี้พบว่าการขาดน้ำส่งผลกระทบต่อระบบแสง II ของต้นข้าว โดยทำให้ค่าที่บ่งชี้ประสิทธิภาพในการทำงานของระบบแสง II และปริมาณโปรตีน D1 ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมปฏิกิริยาการถ่ายทอดอิเล็คตรอนของระบบแสง II มีค่าลดลง (Pieters and El Souki, 2005; Zhou et al., 2007) จากรายงาน แสดงให้เห็นว่าระบบการสังเคราะห์แสงของข้าวเป็นระบบหลักที่เกิดความเสียหายเนื่องจากการขาดน้ำ ทั้งนี้การศึกษาในระดับสรีรวิทยาเพียงอย่างเดียว อาจไม่สามารถอธิบายได้ว่าการขาดน้ำส่งผลอย่างไรต่อการลดลงของประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของข้าว ดังนั้นการศึกษาในระดับการแสดงออกของโปรตีนและยีนอาจช่วยให้เข้าใจกลไกดังกล่าวมากขึ้น



Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University
Volume 3 Number 5 September– October2016 (ISSN 2408 – 1248)

รูปที่ 1 ปริมาณรงควัตถุในการสังเคราะห์ด้วยแสงหลังการขาดน้ำเป็นเวลา 0, 6, 12, 24, 48 และ 96 ชั่วโมง ข้อมูลในกราฟแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรภาษาอังกฤษเปรียบเทียบในรงควัตถุชนิดเดียวกัน แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ โดยวิธี DMRT

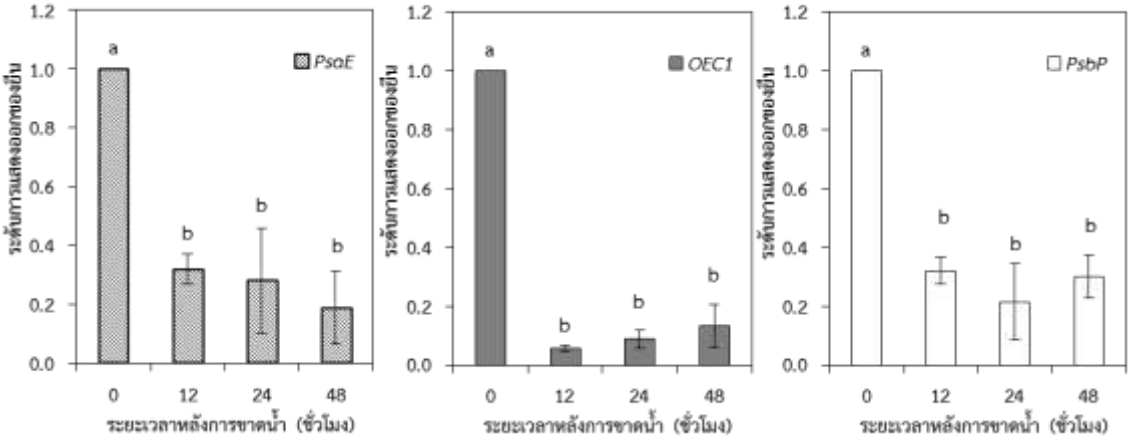
3. การขาดน้ำส่งผลให้ระดับการแสดงออกของยีนในระบบแสง I และระบบแสง II ลดลง

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนในระบบแสง จำนวน 3 ยีน พบว่า ยีน *PsaE* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนในระบบแสง I (Nelson and Ben-Shem, 2002) และยีน *OEC1* และ *PsbP* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนในระบบแสง II มีระดับการแสดงออกลดลงหลังจากการขาดน้ำเป็นเวลา 12 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$ (รูปที่ 2) แสดงให้เห็นว่าการขาดน้ำส่งผลต่อการทำหน้าที่ของระบบแสงทั้งสองชนิด

ยีน *PsaE* เป็นยีนที่กำหนดรหัสเป็นโปรตีน putative photosystem I reaction center subunit IV (PSAE) มีขนาดประมาณ 11 kDa พืชและสาหร่ายส่วนใหญ่มีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของระบบแสง I มากถึง 13 ซับยูนิท (subunits) ซึ่ง PSAE เป็นซับยูนิทหนึ่งของระบบแสง I ซึ่งจะพบอยู่ในบริเวณใกล้กับ สโตรมาของคลอโรพลาสต์ โดยหน้าที่ของ PSAE ยังไม่ชัดเจน แต่จากการศึกษาในข้าวบาร์เล่ย์ พบว่า PSAE ทำหน้าที่จับกับโมเลกุลของ ferredoxin NADP oxidoreductase (FNR) ซึ่งมีหน้าที่ไปทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันของ NADP เป็น NADPH เพื่อใช้ในปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ของวัฏจักรคัลวิล และเกิดการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตต่อไป (Ozakca, 2013; Obokata et al., 1993) นอกจากนี้มีรายงานว่า PSAE มีความจำเป็นต่อปฏิกิริยาการถ่ายทอดอิเล็คตรอนแบบเป็นวัฏจักร (cyclic electron flow) ของระบบแสง I (Yu et al., 1993) และทำหน้าที่ป้องกันความเสียหายของระบบแสงจากอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นอีกด้วย (Jeanjean et al., 2008) ดังนั้นการขาดน้ำของเซลล์อาจส่งผลให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน *PsaE* ทำให้มีการสังเคราะห์โปรตีน PSAE ลดลง จึงทำให้การถ่ายทอดอิเล็คตรอนของระบบแสง I มีประสิทธิภาพลดลง มีการสังเคราะห์ NADPH ได้น้อยลง จึงสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตลดลง อีกทั้งอาจมีการผลิตพลังงาน ATP จากการถ่ายทอดอิเล็คตรอนแบบเป็นวัฏจักรลดลง ระบบแสงเกิดเสียหายจากอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น จนในที่สุดจะส่งผลให้ค่าการสังเคราะห์แสงสุทธิลดลง และพืชมีการเจริญเติบโตลดลง

ยีน *OEC1* เป็นยีนที่กำหนดรหัสเป็นโปรตีน Oxygen-evolving complex protein 1 (OEC1) หรือ PsbO หรือบางครั้งถูกเรียกว่า manganese-stabilizing protein โปรตีน OEC1 ทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบหนึ่งของ oxygen evolving complex (OEC) ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่ดึงอิเล็คตรอนออกจากโมเลกุลของน้ำและได้ออกซิเจน (O_2) ออกมาในขณะที่เกิดการสังเคราะห์แสง เรียกว่าการเกิด O_2 evolution (Gururani et al., 2012) จากผลการวิจัยพบว่า ยีน *OEC1* มีระดับการแสดงออกที่เวลา 12 ชั่วโมง ลดลงประมาณ 10 เท่าของชุดควบคุม (รูปที่ 2) ซึ่งไม่สอดคล้องกับระดับการแสดงออกของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในใบของข้าวโพดที่ปลูกในสภาพขาดน้ำ (Riccardi et al., 2004) แสดงว่าการขาดน้ำอาจส่งผลต่อการทำงานโปรตีน OEC1 ในข้าวซึ่งเป็นพืช C3 มากกว่าข้าวโพดซึ่งเป็นพืช C4 ที่สามารถทนแล้งได้ดีกว่า ส่วนยีน *PsbP* เป็นยีนที่ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน 23 kDa polypeptide of photosystem II (PsbP) ซึ่งเป็นโปรตีนซับยูนิทหนึ่งในระบบแสง II และทำหน้าที่ใน

การเกิด O_2 evolution เช่นเดียวกัน (Hua et al., 1992; Ifuku et al., 2008) จากผลการวิจัยพบว่ายีน *PsbP* มีระดับการแสดงออกที่เวลา 12 ชั่วโมง ลดลงประมาณ 3.3 เท่า ของชุดควบคุม (รูปที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่พบว่า โปรตีน PsbP จากบริเวณกาบใบของข้าวมีการแสดงออกลดลงเมื่อได้รับความเครียดจากการขาดน้ำและอุณหภูมิต่ำ (Abbasi and Komatsu, 2004) และสอดคล้องกับงานวิจัยโปรตีโอมิกส์ของข้าวโพดที่พบว่าใบของข้าวโพดที่ขาดน้ำจะมีระดับการแสดงออกของโปรตีน PsbP ลดลง (Benešová et al., 2012) แสดงให้เห็นว่าการขาดน้ำอาจส่งผลให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน *OEC1* และ *PsbP* ส่งผลให้กระบวนการเกิด O_2 evolution ลดลง ดังนั้นประสิทธิภาพในการส่งและถ่ายทอดอิเล็คตรอนในระบบแสง II จึงลดลง สอดคล้องกับการลดลงของค่า Fv/Fm ของข้าวพันธุ์ ‘KDML105’ ซึ่งมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากการขาดน้ำเป็นเวลา 48 และ 96 ชั่วโมง (Maksup et al., 2014)



รูปที่ 2 ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงในระบบแสง I (*PsaE*) และระบบแสง II (*OEC1* และ *PsbP*) ของข้าวพันธุ์ ‘KDML105’ ที่ปลูกในสภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ตัวภาษาอังกฤษที่ต่างกันเปรียบเทียบในยีนชนิดเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$ โดยวิธี DMRT

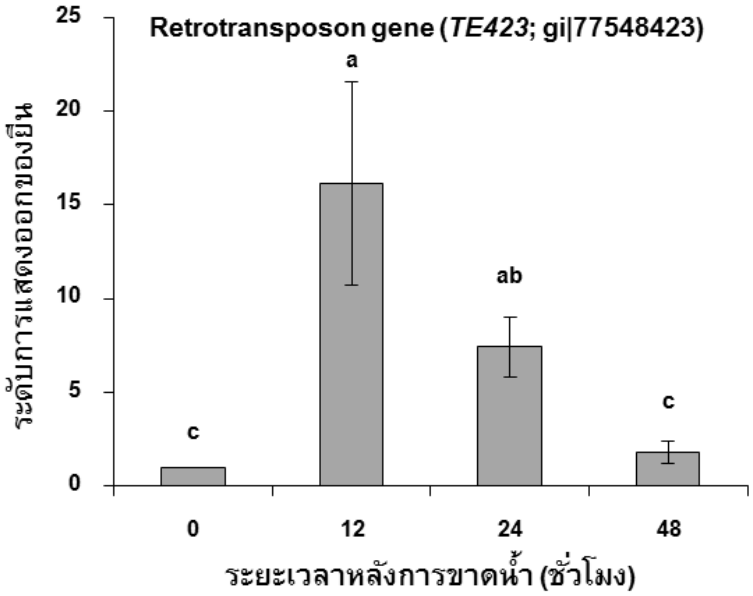
4. การขาดน้ำส่งผลให้ระดับการแสดงออกของยีนรีโทรทรานสโพซอนสูงขึ้น

จากผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีน *TE423* สูงขึ้นหลังการขาดน้ำเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วจึงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูปที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีน TE423 จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีโปรตีโอมิกส์ (Maksup et al., 2014) แสดงให้เห็นว่ายีน *TE423* น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อกลไกการขาดน้ำของข้าว ‘KDML105’

รีโทรทรานสโพซอน (retrotransposons) เป็น transposable elements (TEs) แบบหนึ่งซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถถูกแปลรหัสเป็น RNA คล้ายกับยีนทั่วไป ก่อนที่จะถูกเอนไซม์ reverse transcriptase เปลี่ยนเป็น DNA สายคู่ แล้วสอดแทรกเข้าไปในจีโนมที่ตำแหน่งใหม่ได้ บางครั้งจึงถูกเรียกว่า jumping gene การเพิ่มจำนวนของ retrotransposons อาจทำให้เกิดการแทรกตัวของชิ้น DNA ในจีโนมมากขึ้น จึงอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของจีโนม (genome restructuring) หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับสารพันธุกรรม (sequence reorganization) การเพิ่มขนาดของจีโนม และการแตกหักหรือเคลื่อนที่ของ

Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University
Volume 3 Number 5 September– October2016 (ISSN 2408 – 1248)

โครโมโซม ซึ่งสามารถส่งผลในเชิงวิวัฒนาการ และอาจช่วยให้เกิดการปรับตัวอย่างรวดเร็วต่อการเกิดสภาพแวดล้อมที่รุนแรงได้ (Sabot et al., 2004) TEs พบมากในพืชตระกูลหญ้า (family Poaceae) รวมถึงพบมากในข้าวด้วย อย่างไรก็ตามหน้าที่ของ TEs ในข้าวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการแสดงออกของโปรตีน TEs หลายชนิดเพิ่มสูงขึ้นเฉพาะในข้าวพันธุ์ ‘KDML105’ ในขณะที่เปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในข้าวพันธุ์ NSG19 และ IR20 โดยโปรตีน retrotransposon ได้แก่ gi|77548423 และ gi|108862435 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นถึง 3.0 และ 4.5 เท่า ตามลำดับ หลังการขาดน้ำเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Maksup et al., 2014)



รูปที่ 3 ระดับการแสดงออกของยีนรีโทรทรานสโพซอน (*TE423*) ของข้าวพันธุ์ ‘KDML105’ ที่ปลูกในสภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ตัวภาษาอังกฤษที่ต่างกันเปรียบเทียบในยีนชนิดเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$ โดยวิธี DMRT

นอกจากมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงและวิวัฒนาการของจีโนมพืชซึ่งอาจช่วยในการปรับตัวของพืชให้สามารถดำรงชีวิตได้ในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ (Sabot et al., 2004) TEs ยังมีบทบาทสำคัญต่อพันธุศาสตร์ด้านกระบวนการเหนือพันธุกรรมของข้าว (rice epigenetic) อีกด้วย (Zhao and Zhou, 2012) จากรายงานพบว่า TEs เป็นเป้าหมายหลักของการเกิด DNA methylation โดยสามารถจัดกลุ่ม (families) ของ TEs บนจีโนมของข้าว ได้จากลักษณะหรือตำแหน่งการเกิด methylation (Takata et al., 2007) โดยทั่วไปการเกิด DNA methylation จะมีหน้าที่กดการแสดงออกของ TEs แต่ในกรณีที่มีความเครียดจากสิ่งแวดล้อม เช่น การขาดน้ำ ความเค็ม หรืออุณหภูมิต่ำ พบว่าจะเกิด DNA demethylation เพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลให้เกิดการแสดงออกของ TEs เพิ่มขึ้น (Zhao and Zhou, 2012) จากงานวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า รีโทรทรานสโพซอนมีบทบาทสำคัญในการทนแล้งของข้าว ‘KDML105’

สรุปผล

ภายใต้สภาวะเครียดจากการขาดน้ำ (-0.5 MPa) ต้นกล้าอายุ 3 สัปดาห์ของข้าวพันธุ์ 'KDML105' มีการตอบสนองต่อการขาดน้ำ โดยการมีน้ำหนักสดและปริมาณรงควัตถุ ได้แก่ คลอโรฟิลล์รวม คลอโรฟิลล์ a คลอโรฟิลล์ b และแคโรทีนอยด์ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับการลดการแสดงออกของยีนในระบบแสง I (*PsaE*) และยีนในระบบแสง II (*OEC1* และ *PsbP*) โดยการลดการแสดงออกของยีน *PsaE* อาจส่งผลให้มีปริมาณของ ATP และ NADPH ซึ่งเป็นพลังงานและโมเลกุลสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสงลดลง ในขณะเดียวกันการลดการแสดงออกของยีน *OEC1* และ *PsbP* อาจส่งผลต่อกระบวนการเกิด O_2 evolution ทำให้มีจำนวนอิเล็คตรอนเข้าสู่กระบวนการถ่ายทอดอิเล็คตรอนของระบบแสงลดลง จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงลดลง นอกจากนี้พบว่ายีนรีโทรทรานสโพซอน (*TE423*) มีการแสดงออกสูงขึ้นหลังการขาดน้ำ สอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่มีรายงานก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นว่า *TE423* อาจช่วยในการปรับตัวเพื่อทนต่อสภาพขาดน้ำของข้าว 'KDML105' อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้แม้จะทราบว่า *TE423* มีบทบาทในกลไกการตอบสนองต่อการขาดน้ำของข้าว 'KDML105' แต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า *TE423* มีหน้าที่อะไร ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับหน้าที่ของยีนนี้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ภาษาต่างประเทศ

Abbasi, F.M. and Komatsu, S. (2004) "A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath." *Proteomics,* 4: 2072-2081.

Benešová, M. Holá, D., Fischer, L., Jedelský, P.L., Hnilička, F., and et al. (2012) "The physiology and proteomics of drought tolerance in maize: Early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration?" *PLoS ONE*, 7(6): e38017, doi: 10.1371/journal.pone.0038017.

Cha-um, S., Supaibulwatana, K., and Kirdmanee, C. (2006) "Water relation, photosynthetic ability and growth of Thai Jasmine rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica* cv. KDML105) to salt stress by application of exogenous glycinebetaine and choline." *J Agron Crop Sci*, 192: 25-36.

Cha-um, S., Yooyongwech, S., and Supaibulwatana, K. (2012) "Water-deficit tolerant classification in mutant lines of indica rice." *Sci agric*, 69:135-141.

Gururani, M.A., Upadhyaya, C.P., Strasser, R.J., Woong, Y.J., and Park, S.W. (2012) "Physiological and biochemical responses of transgenic potato plants with altered expression of PSII manganese stabilizing protein." *Plant Physiol Biochem*, 58: 182-194.

Hua, S. Dube, S.K., Barnett, N.M., and Kung, S.D. (1992) "Photosystem II 23 kDa polypeptide of oxygen-evolving complex is encoded by a multigene family in tobacco." *Plant Mol Biol*, 18: 997-999.

Ifuku, K., Ishihara, S., Shimamoto, R., Ido, K., and Sato, F. (2008) "Structure, function, and evolution of the PsbP protein family in higher plants." *Photosynth Res*, 98: 427-437.

Jeanjean, R., Latifi, A., Matthijs, H.C.P., and Havaux, M. (2008) "The PsaE subunit of photosystem i prevents light-induced formation of reduced oxygen species in the *Cyanobacterium synechocystis* sp. PCC 6803." *BBA – Bioenergetics*, 1777: 308-316.

Jongdee, B., Pantuwan, G., Fukai, S., and Fischer, K. (2006) "Improving drought tolerance in rainfed lowland rice: An example from Thailand." *Agric Water Manage*, 80: 225-240.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2(-delta delta c(t)) method." *Methods*, 25: 402-408.

Maksup, S., Roytrakul, S., and Supaibulwatana, K. (2014) "Physiological and comparative proteomic analyses of Thai jasmine rice and two check cultivars in response to drought stress." *J Plant Interact*, 9: 43-45.

Maksup, S., Supaibulwatana, K., and Selvaraj, G. (2013) "High-quality reference genes for quantifying the transcriptional responses of *Oryza sativa* L. (ssp. *indica* and *japonica*) to abiotic stress conditions." *Chin Sci Bull*, 58: 1-12.

Nelson, N. and Ben-Shem, A. (2002) "Photosystem I reaction center: Past and future." *Photosynth Res*, 73: 193–206.

Obokata, J., Mikami, K., Hayashida, N., Nakamura, M., and Sugiura, M. (1993) "Molecular heterogeneity of photosystem I (*psaD, psaE, psaF, psaH,* and *psaL*) are all present in isoforms in *Nicotiana* spp." *Plant Physiol*, 102: 1259-1267.

Ozakca, D.U. (2013) "Effect of abiotic stress on photosystem i-related gene transcription in photosynthetic organisms." Online journal: *InTech.* DOI: 10.5772/55350

Pandey, R., Agarwal, R.M., Jeevaratnam, K., and Sharma, G.L. (2004) "Osmotic stress-induced alterations in rice (*Oryza sativa* L.) and recovery on stress release." *Plant Growth Reg*, 42: 79-87.

Pieters, A.J. and El Souki, S. (2005) "Effects of drought during grain filling on PSII activity in rice." *J Plant Physiol.* 162: 903-911.

Riccardi, F., Gazeau, P., Jacquemot, M.P., Vincent, D., and Zivy, M. (2004) "Deciphering genetic variations of proteome responses to water deficit in maize leaves." *Plant Physiol Biochem*, 42: 1003-1011.

Sabot, F., Simon, D., and Bernard, M. (2004) "Plant transposable elements, with an emphasis on grass species." *Euphytica*, 139:227-247.

Takata, M., Kiyohara, A., Takasu, A., Kishima, Y., Ohtsubo, H., and Sano, Y. (2007) "Rice transposable elements are characterized by various methylation environments in the genome." *BMC Genomics*, 8: 469-477.

Yamane, K., Kawasaki, M., Taniguchi, M., and Miyake, H. (2003) "Differential effect of NaCl and polyethylene glycol on the ultrastructure of chloroplasts in rice seedlings." *J Plant Physiol*, 160: 573-575.

Yu, L., Zhao, J., Muhlenhoff, U., Bryant, D.A., and Golbeck, J.H. (1993) "PsaE is required for *in vivo* cyclic electron flow around photosystem I in the *Cyanobacterium synechococcus* sp. PCC 7002." *Plant Physiol*, 103: 171-180.

Zhao, Y. and Zhou, D-X. (2012) "Epigenomic modification and epigenetic regulation in rice." *J Genet Genomics*, 39: 307-315.

Zhou, Y., Lam, H.M. and Zhang, J. (2007) "Inhibition of photosynthesis and energy dissipation induced by water and high light stresses in rice." *J Exp Bot*, 58: 1207–1217.