

โปรตีนโอมิกส์เชิงเปรียบเทียบของโปรตีนของรากข้าว *Oryza sativa* L. ภายใต้ภาวะแล้ง

นายนวนินทร์ สงวนหมู่

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

COMPARATIVE PROTEOMICS OF RICE *Oryza sativa* L. ROOT PROTEINS UNDER
DROUGHT STRESS CONDITION

Mr. Nawamin Sa-nguanmoo

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Botany
Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2013
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

โปรตีนโอมิกส์เชิงเปรียบเทียบของโปรตีนของรากข้าว

Oryza sativa L. ภายใต้ภาวะแล้ง

โดย

นายณวัฒน์ สงวนหมู

สาขาวิชา

พฤกษศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ ทารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ เสรีภาพ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุษณีย์ พิษกรรม)

นามินทร์ สงวนหมู่ : โปรตีโอมิกส์เชิงเปรียบเทียบของโปรตีนของรากข้าว *Oryza sativa* L. ภายใต้ภาวะแล้ง. (COMPARATIVE PROTEOMICS OF RICE *Oryza sativa* L. ROOT PROTEINS UNDER DROUGHT STRESS CONDITION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล, 146 หน้า.

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาโปรตีโอมิกส์เชิงเปรียบเทียบของรากข้าวที่อยู่ภายใต้ภาวะแล้งในข้าวสองสายพันธุ์ที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน คือข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และข้าวสายพันธุ์กลายทนแล้ง เหลืองประทิว 123-TC171 (LPT123-TC171) เมื่อทำการศึกษาแบบรูปของโปรตีนที่ได้จากรากของต้นกล้าข้าวอายุหนึ่งเดือนได้รับภาวะแล้งจากการเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่มีการเติม polyethylene glycol 6000 (PEG6000) ความเข้มข้น 10 % เป็นระยะเวลา 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง พบว่า แบบรูปการแสดงออกของโปรตีนที่ได้จากการศึกษาด้วย GeLC-MS/MS พบโปรตีนจำนวน 597 ชนิด มี 122 ชนิดในข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญภายใต้ภาวะแล้งเมื่อเทียบกับภาวะปกติ การวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มเพื่อเปรียบเทียบเชิงปริมาณโปรตีนในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ พบว่ามีโปรตีน 96 ชนิด ที่มีแบบรูปการแสดงออกแตกต่างกัน ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ เมแทบอลิซึม การส่งสัญญาณ กระบวนการถอดรหัสและสังเคราะห์โปรตีน โปรตีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับโครงร่างภายในเซลล์ การลำเลียงสารผ่านเข้า-ออกจากเซลล์ *OsNFXL1* ถูกเลือกมาศึกษาในระดับทรานสคริปชัน เนื่องจากมีความคล้ายคลึงกับยีนที่พบใน *Arabidopsis* ที่มีการศึกษาแล้วว่าเป็นยีนที่มีการตอบสนองต่อภาวะแล้ง และในฐานข้อมูล rice micro-array พบว่ายีนดังกล่าวตอบสนองต่อภาวะแล้งและเค็ม ผลการศึกษา quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction ของยีน *OsNFXL1* พบว่ามีการแสดงออกสอดคล้องกับโปรตีนในข้าวพันธุ์ LPT123 และ LPT123-TC171 และได้อภิปรายถึงหน้าที่ของยีนนี้ที่เป็นไปได้ในกระบวนการทนแล้ง

ภาควิชา..... พฤษภาคม..... ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา..... พฤษภาคม..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา..... 2556..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5372545223 : MAJOR BOTANY

KEYWORDS : RICE / DROUGHT / ROOT / PROTEOMICS

NAWAMIN SA-NGUANMOO : COMPARATIVE PROTEOMICS OF RICE *Oryza sativa* L.
ROOT PROTEINS UNDER DROUGHT STRESS CONDITION. ADVISOR : ASSOC. PROF.
SUPACHITRA CHADCHAWAN, Ph.D., CO-ADVISOR : SITTIRUK ROYTRAKUL, Ph.D.,
146 pp.

Comparative root proteomics under drought stress of two rice lines with the similar genetics background, Leung Pratew123 (LPT123) rice and its mutated drought resistant line, LPT123-TC171 was performed. One month-old rice seedlings were treated with 10% polyethylene glycol (PEG6000) for 0, 2, 6, 24 hours. The proteomes were analyzed by using GeLC-MS/MS to display the different protein expression patterns when plants were grown in drought or non-drought condition. Among 597 proteins identified, 122 proteins of LPT123 or LPT123-TC171 rice show significant difference in protein expression under drought stress- and normal-grown conditions. With the analysis of variance to determine the significance of each protein quantity from LPT123 and LPT123-TC171 grown in normal or drought stress condition, 96 proteins were detected and they could be classified to be involved in metabolic pathway, signal transduction, transcriptional regulator and ribosomal proteins and translation, cytoskeleton synthesis, cellular transport. *OsNFXL1* was selected for the investigation at the transcriptional level as its orthologs in Arabidopsis were previously shown as drought responsive genes and rice micro-array database demonstrated that it had salt and drought responsive characters. The quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction for *OsNFXL1* gene expression showed the consistency with protein profiles in both LPT123 and LPT123-TC171. The possible functions of *OsNFXL1* gene expression in drought tolerance were discussed.

Department : ..Botany..... Student's Signature.....
Field of Study : ..Botany..... Advisor's Signature.....
Academic Year : 2013..... Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้อุปการะ ให้อุปการะ ตลอดจนวิธีคิดในการแก้ปัญหา

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ และอนุเคราะห์เครื่องมือในการทำวิจัยโปรตีนโอมิกส์ ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ เสรีภาพ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุษณีย์ พิษกรรม ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ทีมโปรตีนโอมิกส์ ซึ่งประกอบด้วย ดร.วาสนี พงษ์ประยูร คุณณัฐวดี จินตโกวิท คุณนนทลี ชำนาญบุญธรรม และ คุณไมพร ไมโกคา ที่ทำให้งานวิจัยสำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณนฤมล ผ่านกรบ คุณจันทิมา จเรสิทธิกุลชัย นักวิทยาศาสตร์ที่ห้องปฏิบัติการวิจัยโปรตีนโอมิกส์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้ความรู้ และคำแนะนำในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ดร.ธิดิยา พูลเพ็ชร์ ดร.ศิริพร ศรีภิญโญวณิชย์ คุณธานินทร์ จันทระโชติ และคุณเอกภรณ์ สันธวานนท์ สำหรับคำแนะนำ เทคนิค ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณฐปนา บางยี่ขัน และทุกท่านในหน่วยปฏิบัติการวิจัยสิ่งแวดล้อมและสรีรวิทยาของพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการ คำแนะนำ และกำลังใจในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณแม่ภรณ์การ์ และคุณพี่ ดร.ภัทรธิดา สงวนหมู่ ที่เป็นกำลังใจสำคัญ ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร.....	3
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	11
3.1 อุปกรณ์การศึกษา.....	11
3.2 วิธีการทดลอง.....	18
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	26
4.1 การศึกษาเปรียบเทียบแบบรูปโปรตีนทั้งหมดในรากข้าว.....	26
4.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนบางชนิดที่ตอบสนองต่อความแล้ง ในระดับ transcription.....	44
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง.....	52
5.1 การศึกษาเปรียบเทียบแบบรูปโปรตีนทั้งหมดในรากข้าว.....	52
5.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนบางชนิดที่ตอบสนองต่อความแล้ง ในระดับ transcription.....	58
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	63
รายการอ้างอิง.....	64
ภาคผนวก.....	78
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	146

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 โพรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในรากข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 ณ เวลาที่ 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง.....	35
4.2 โพรตีนชนิดเดียวกันในข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 ภายใต้ภาวะแล้ง จำนวน 8 โพรตีนแต่มีการเปลี่ยนแปลงภายใต้ภาวะแล้งแตกต่างกัน.....	41
4.3 ตรวจสอบการแสดงออกของ LOC_Os06g14190 ในภาวะแล้งและเค็ม.....	44
4.1 แสดงเครือข่ายของ LOC_Os06g14190 และ หน้าที่ที่พบใน Pathway ที่ทำนายโดย KEGG.....	48
5.1 ส่วนจดจำบน <i>OSNFXL1</i> promoter.....	59
ข-1 แบบรูปโปรตีนเมื่อเริ่มการทดลอง (ชั่วโมงที่ 0) มีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 44 ชนิด.....	96
ข-2 แบบรูปโปรตีนเมื่อชั่วโมงที่ 2 มีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 40 ชนิด.....	100
ข-3 แบบรูปโปรตีนเมื่อชั่วโมงที่ 6 มีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 38 ชนิด.....	103
ข-4 แบบรูปโปรตีนเมื่อชั่วโมงที่ 24 มีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 42 ชนิด.....	106
ข-5 รากข้าว LPT123 มี 51 โพรตีนที่ Up-regulated เนื่องจากภาวะแล้งเมื่อเทียบกับ ภาวะปกติโดยใช้ T-Test ข้อมูล 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง.....	109
ข-6 รากข้าว LPT123 มี 17 โพรตีนที่ Dn-regulated เนื่องจากภาวะแล้งเมื่อเทียบกับ ภาวะปกติโดยใช้ T-Test ข้อมูล 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง.....	115
ข-7 รากข้าว LPT123-TC171 มี 37 โพรตีนที่ Up-regulated เนื่องจากภาวะแล้งเมื่อเทียบกับ ภาวะปกติโดยใช้ T-Test ข้อมูล 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง.....	117
ข-8 รากข้าว LPT123-TC171 มี 25 โพรตีนที่ Dn-regulated เนื่องจากภาวะแล้งเมื่อเทียบกับ ภาวะปกติโดยใช้ T-Test ข้อมูล 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง.....	121
ค-1 แสดง cis-element บริเวณเหนือยีน LOC_Os06g14190 ไป 2Kb.....	134
ค-2 <i>in silico</i> gene expression analysis of LOC_Os06g14190 ใน GSE6901.....	136
ค-3 <i>in silico</i> gene expression analysis of LOC_Os06g14190 ใน GSE24048.....	137
ค-4 <i>in silico</i> gene expression analysis of LOC_Os06g14190 ใน E-MEXP-2401.....	138
ค-5 <i>in silico</i> gene expression analysis of LOC_Os06g14190 ใน GSE26280.....	139
ค-6 <i>in silico</i> gene expression analysis of LOC_Os06g14190 ใน GSE16108.....	140

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ค-7 ปริมาณโปรตีน <i>OsNFXL1</i> ใน LPT123 LPT123-TC171 ภายใต้ภาวะปกติ และภาวะแล้ง.....	141
ค-8 ระดับการแสดงออกของยีน <i>OsNFXL1</i> ใน LPT123 ภาวะปกติและภาวะแล้ง.....	141
ค-9 ระดับการแสดงออกของยีน <i>OsNFXL1</i> ใน LPT123-TC171 ภาวะปกติและภาวะแล้ง...	141
ค-10 คะแนนลำดับความคล้ายคลึงของโปรตีน NF-X1 zinc finger เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง Human Arabidopsis และ Rice โดย ClustalW2.....	145

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
3.1 แสดงวิธีการจัดการข้อมูลโปรตีน และแสดงวิธีคัดกรองข้อมูลสร้างแผนภาพเวน.....	22
3.2 แสดงวิธีการหาโปรตีนที่ถูกชักนำเนื่องจากภาวะแล้งระหว่างสายพันธุ์.....	23
4.1 Venn diagram แสดงจำนวนชนิดของโปรตีนที่พบในรากข้าว LPT123 ที่ปลูกในภาวะปกติ รากข้าว LPT123 ที่ปลูกในภาวะแล้ง รากข้าว LPT123-TC171 ที่ปลูกในภาวะปกติ รากข้าว LPT123-TC171 ที่ปลูกในภาวะแล้ง.....	30
4.2 Heat map แสดงระดับปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันในข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 ชั่วโมงที่ 0.....	31
4.3 Heat map แสดงระดับปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันในข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 ชั่วโมงที่ 2.....	32
4.4 Heat map แสดงระดับปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันในข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 ชั่วโมงที่ 6.....	33
4.5 Heat map แสดงระดับปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันในข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 ชั่วโมงที่ 24.....	34
4.6 Heat map แสดงระดับปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันในข้าว LPT123 ภาวะแล้ง และ ภาวะปกติ.....	37
4.7 แผนภาพความร้อน แสดงระดับปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันในข้าว LPT123-TC171 ภาวะปกติ และ ภาวะแล้ง.....	39
4.8 สัดส่วนหน้าที่ของโปรตีนที่พบว่ามีปริมาณแตกต่างกันใน LPT123 ภาวะปกติ และ เมื่อได้รับภาวะแล้ง.....	40
4.9 สัดส่วนหน้าที่ของโปรตีนที่พบว่ามีปริมาณแตกต่างกันใน LPT123-TC171 ภาวะปกติ และเมื่อได้รับภาวะแล้ง.....	40
4.10 Venn diagram แสดงจำนวนชนิดของโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างเนื่องจากภาวะแล้งที่พบในรากข้าว LPT123 และ LPT123-TC171.....	41
4.11 แผนภาพความร้อน cluster analysis แสดงระดับปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันในข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 ภาวะแล้ง.....	43
4.12 แผนภาพความร้อนแสดงการแสดงออกของ <i>OsNFXL1</i> ในชุดการทดลองภาวะแล้ง (GSE6901, GSE24048, E-MEXP-2401, GSE26280) และในชุดการทดลองภาวะเค็ม GSE16108.....	45
4.13 แผนภาพความร้อนแสดงระดับปริมาณโปรตีนของ <i>OsNFXL1</i>	45
4.14 แสดงเครือข่ายที่อยู่ภายใต้การแสดงออกของ <i>OsNFXL1</i>	47
4.15 ขนาดของแถบ DNA ที่ได้จากการตรวจสอบเบื้องต้นว่ายีนเป้าหมายมีการแสดงออก.....	49

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.16 ระดับการแสดงออกของยีน <i>OsNFXL1</i> ในข้าว LPT123 ภาวะปกติ และ ภาวะแล้งที่ระยะเวลา 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง.....	50
4.17 ระดับการแสดงออกของยีน <i>OsNFXL1</i> ในข้าว LPT123-TC171 ภาวะปกติ และ ภาวะแล้งที่ระยะเวลา 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง.....	51
ค-1 โครงสร้างยีน และหน้าที่ของโปรตีน <i>OSNFXL1</i>	125
ค-2 ลำดับพอลิเปปไทด์ ของโปรตีน <i>OSNFXL1</i>	126
ค-3 แสดงการออกแบบ primer.....	127
ค-4 ตรวจสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ต่อยีน <i>OsNFXL1</i>	132
ค-5 ลำดับเบสของ <i>OsNFXL1</i> promoter.....	133
ค-6 Protein Alignment: The NF-X1 zinc finger from Human, Arabidopsis, Rice โดย ClustalW2.....	142
ค-7 Phylogenetic Tree เมื่อเปรียบเทียบโปรตีน NF-X1 zinc finger ระหว่าง Human Arabidopsis และ Rice โดย ClustalW2.....	145

บทที่ 1

บทนำ

ภาวะขาดน้ำ หรือภาวะแล้งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลผลิตของพืชลดลง ดังนั้นนักวิจัยด้านพืชจึงมีความสนใจเกี่ยวกับกลไกในการต้านทานต่อภาวะแล้งของพืช (Bohnert and Jensen, 1996; Jongdee et al., 2006; Serraj et al., 2009) โดยมีเป้าหมายในการพัฒนาพันธุ์พืชที่มีความสามารถในการต้านทานภาวะแล้งสูงขึ้น

เมื่อเกิดภาวะขาดน้ำ รากเป็นบริเวณแรกที่รับรู้และถ่ายทอดสัญญาณ (Schachtman and Goodger, 2008) รากพืชจึงมีบทบาทสำคัญเนื่องจากเป็นโครงสร้างที่ใช้ในการนำน้ำและธาตุอาหารเข้าสู่ต้นพืช รวมถึงเป็นแหล่งสะสมอาหารในพืชบางชนิด เป็นส่วนที่มีการสังเคราะห์ฮอร์โมนและเป็นแหล่งยึดเกาะของจุลินทรีย์ ภาวะเครียดมีผลทำให้สมดุลต่าง ๆ ของพืชเปลี่ยนแปลงไปจากสภาพปกติ โดยทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อายุ และระยะเวลาที่พืชเผชิญกับภาวะเครียด (Hodge et al., 2009)

ภาวะเค็มและภาวะแล้งต่างเป็นสาเหตุทำให้ค่า water potential ของน้ำในดินลดลง ดังนั้นจึงเชื่อว่ากลไกการปรับตัวของพืชต่อภาวะเค็มและภาวะแล้งมีความคล้ายคลึงกันคือ การรักษาภาวะธำรงดุล (homeostasis) การขจัดสารพิษที่เกิดจากภาวะเครียด (detoxification) และการควบคุมการเจริญเติบโต (Zhu, 2002) แนวคิดนี้ได้รับการสนับสนุนเมื่อพบว่ากลุ่มยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะแล้ง สภาวะเค็ม และ Abscisic Acid (ABA) มีความคล้ายคลึงกันบางส่วน (Rabbani et al., 2003) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในข้าวสองสายพันธุ์ที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน คือ ข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว123-TC171 (LPT123-TC171) ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์กลายที่ได้จาก somaclonal variation ที่สามารถต้านทานความเค็มได้ดีขึ้น (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991; Udomchalothorn et al., 2009) มีความสามารถในการทนแล้งได้ดีขึ้นด้วย (ปารวี ธิกาศ, 2546; พงศธร กล่อมสกุล, 2547)

แนวทางหนึ่งในการศึกษากลไกการตอบสนองของพืชต่อสิ่งแวดล้อมคือแนวทางในการนำวิธีการทางโปรตีโอมิกส์มาใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนทั้งหมดที่เกิดขึ้น เมื่อพืชได้รับปัจจัยภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น ภาวะ salt stress (Shunping et al., 2005) heat stress (Lee et al., 2007) osmotic stress (Zang and Komatsu, 2007) การศึกษาทางโปรตีโอมิกส์มีหลายรูปแบบซึ่งมีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกัน เทคนิค 2D-PAGE มีข้อดี คือ สามารถแยก isoforms รูปแบบต่างๆของโปรตีนที่เกิด post translational modifications ได้ (Claverol et al., 2003) แต่มีข้อจำกัดของเทคนิคตรงที่จะไม่ปรากฏโปรตีนที่ low abundant โปรตีนที่มีความเป็นกรด-เบสสูง โปรตีนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic) (Hurkman and Tanaka, 1986; Abdallah et al., 2012)

ในขณะที่เทคนิค GeLC-MS/MS มีข้อดีตรงที่สามารถตรวจพบโปรตีนที่มีปริมาณน้อย และมีโอกาสตรวจเจอโปรตีนที่ไม่มีรายงานมาก่อนได้มากกว่า เช่น เมมเบรนโปรตีน (Gilmore and Washburn, 2010) จะเลือกใช้เทคนิค GeLC-MS/MS มาศึกษาโปรตีนที่มีบทบาทในการตอบสนองต่อภาวะแล้งในระยะแรก ซึ่งคาดว่าน่าจะมีบทบาทเป็น receptor, Ca^{2+} sensors และ/หรือ transcription factor ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบในปริมาณน้อย (Smaczniak et al., 2012)

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีเป้าหมายเพื่อเปรียบเทียบแบบรูปการแสดงออกโปรตีนทั้งหมดในรากข้าวเมื่อได้รับภาวะแล้ง ระหว่างข้าวสองสายพันธุ์ที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน คือ ข้าวพันธุ์ LPT123 และ ข้าวสายพันธุ์ LPT123-TC171 เพื่อหาโปรตีนที่มีบทบาทเกี่ยวกับความสามารถในการทนแล้งของข้าวโดยใช้เทคนิค GeLC-MS/MS ซึ่งคาดว่าด้วยวิธีดังกล่าวจะสามารถตรวจพบโปรตีนที่มีปริมาณน้อย เช่น โปรตีนที่มีบทบาทในการเป็น receptor หรือ transcription factor ได้

วัตถุประสงค์ของการศึกษาทดลอง

1. ศึกษาเปรียบเทียบแบบรูปโปรตีนทั้งหมดในรากข้าวเมื่อเปรียบเทียบระหว่างภาวะปกติและภาวะแล้งในรากข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 ด้วยเทคนิค GeLC-MS/MS
2. ศึกษาการแสดงออกของยีนที่ทำการคัดเลือกไว้จากโปรตีนในระดับ transcription

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลโปรตีนและการระบุตำแหน่งของยีนในข้าวที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างรากข้าวสายพันธุ์ที่ปรับตัวได้ดีในภาวะแล้ง (LPT123-TC171) และสายพันธุ์ดั้งเดิม (LPT123) จะเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีลักษณะต้านทานต่อภาวะแล้งได้ดีขึ้น

แผนการดำเนินการวิจัย

1. เตรียมพืชทดลองเพื่อการวิเคราะห์ทาง proteomics
2. เตรียมตัวอย่างโปรตีนและวิเคราะห์ทาง proteomics
3. ระบุชนิดและแบบรูปของโปรตีนในรากที่เปลี่ยนแปลงในภาวะแล้ง
4. ตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำการคัดเลือกไว้จากโปรตีน

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. ความสำคัญของข้าว

ข้าวเป็นอาหารหลักของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ การปลูกข้าวและสินค้าข้าวมีความสำคัญมากต่อเศรษฐกิจไทย ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกข้าวไปขายต่างประเทศติดใน 1 และ 2 อันดับแรกของโลกต่อเนื่องมาหลายทศวรรษ โดยที่ผลผลิตเฉลี่ยของข้าวไทยอยู่ที่ 19.7 ล้านตันข้าวสารต่อปี มากกว่าการบริโภคในประเทศซึ่งมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 9.8 ล้านตันต่อปี มูลค่าการส่งออกข้าวตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550-2554 เฉลี่ยอยู่ที่ปีละ 171,366 ล้านบาท หรือคิดเป็นร้อยละ 33 ของการส่งออกสินค้าเกษตรทั้งหมด (เสาวณี จันทะพงษ์ และ ดวงทิพย์ ศิริกาญจนารักษ์, 2555)

เนื่องจากภูมิอากาศของโลกที่เปลี่ยนแปลงทำให้เกิดภาวะฝนทิ้งช่วง เกิดปัญหาขาดแคลนน้ำในหลายพื้นที่เพาะปลูกข้าวของประเทศไทย สร้างผลกระทบต่อผลผลิตทางการเกษตร และเป็นภัยคุกคามต่อความมั่นคงทางด้านอาหาร ธนาคารพัฒนาเอเชีย (Asian Development Bank) คาดการณ์ว่าหากสถานการณ์ภัยแล้งยังดำเนินต่อไป ประเทศไทยจะมีแนวโน้มผลผลิตข้าวลดลงอย่างรวดเร็ว และส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจอย่างชัดเจนในปี ค.ศ. 2020 (Asian Development Bank, 2009) ดังนั้นการจัดการน้ำเพื่อการเพาะปลูก และลักษณะของพันธุ์ข้าวที่ให้ผลผลิตสูงและต้านทานต่อภาวะขาดน้ำจึงมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก

2. เหลืองประทิว123 และเหลืองประทิว123-TC171

ข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 สายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกต้นที่มีความสามารถในการทนเค็มที่เกิดจาก somaclonal variation ระหว่างการเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิม และได้ทำการคัดเลือกมา 6 ชั่วรุ่น และมีความคงตัวทางด้านพันธุกรรม (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) การศึกษาทางสรีรวิทยาของ LPT123-TC171 ในรุ่นที่ 10 ภายใต้ภาวะแล้งโดยการเติม PEG 6000 ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร (20% w/v) ในสารละลายธาตุอาหาร WP no.2 (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า LPT123-TC171 มีความสูง น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นและรากสูงกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญ (ปารวี จิภาศ, 2546) และ LPT123-TC171 มีอัตราการรอดตายมากกว่า LPT123 ทั้งในภาวะแล้งและภาวะเค็ม (พงศธร กล่อมสกุล, 2547) เนื่องจาก LPT123 และ LPT123-TC171 มีความแตกต่างเฉพาะลักษณะความทนแล้งและเค็มในขณะที่ลักษณะอื่น ๆ และ genetic background มีความคล้ายคลึงกันมากจึงเหมาะสมที่

จะนำมาศึกษาในทางชีววิทยาระดับโมเลกุล โดยใช้ LPT123 ซึ่งเป็นพันธุ์ดั้งเดิมเป็นพืชชุดควบคุมในการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกทางพันธุกรรม กับ LPT123-TC171

เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาทางชีววิทยาระดับโมเลกุลระหว่างข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 มีการเปลี่ยนแปลงไปตามเครื่องมือที่ใช้ศึกษาและองค์ความรู้ที่ก้าวหน้าขึ้น ในระยะแรกเริ่มมีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค Random Amplified Polymorphic (RAPD) พบรูปแบบของแถบ DNA ที่แตกต่างกันในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งแสดงว่าข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุล (ปารวี ธิกาศ, 2546) เทคนิค differential display ได้ถูกนำมาใช้เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA โดยใช้คู่ primer ที่เป็น poly T oligonucleotide primer จำนวน 8 ชนิด และ primer สุ่มจำนวน 20 ชนิด พบแถบ cDNA แตกต่างกันจำนวน 108 แถบ ซึ่งชิ้นส่วน cDNA จำนวน 36 ชิ้นถูกโคลนและสามารถระบุชนิดได้ 27 โคลนที่มีความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูล และตรวจการแสดงออกของยีนโดยการทำ Northern blot analysis โดยใช้ 9 probe พบสัญญาณการแสดงออกของยีน 4 ชนิดที่มีรูปแบบต่างกัน ใน LPT123 และ LPT123-TC171 (สมพร มณีประสพสุข, 2547) ต่อมา Sripinyowanich (2010) ได้เลือกยีน *OsD1B18-18* มาศึกษา ซึ่งมีการแสดงออกเฉพาะข้าว LPT123 ที่ได้รับภาวะเค็ม และข้าว LPT123-TC171 ทั้งที่อยู่ในภาวะปกติและได้รับภาวะเค็ม เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีนดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับ Nucleolin1 (*OsNUC1*) และได้มีการศึกษาบทบาทหน้าที่ของยีนดังกล่าวในภาวะเครียดทางกายภาพต่างๆ และเสนอว่ายีนนี้น่าจะมีการแสดงออกแบบ circadian rhythm (นนทลี ชำนาญบุญธรรม, 2552) และเมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ใน promoter ของ *OsNUC1* พบว่า promoter จาก LPT123-TC171 มี variation เกิดขึ้นทำให้มีจำนวน dehydration/salt-related cis-regulatory elements มากกว่า LPT123 (Chantarachot, 2011)

ในการค้นหากลุ่มยีนใหม่ที่ตอบสนองต่อภาวะแล้งและภาวะเค็ม โปรตีนโอมิกส์ได้ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนระหว่าง LPT123 และ LPT123-TC171 ภายใต้ภาวะแล้งเมื่อได้รับโคโตซานโดย Pongprayoon (2011) ผลจากการศึกษาพบว่า PEG6000 ความเข้มข้น 10% (w/v) ทำให้เกิด osmotic stress ได้ทั้งใบและราก และชักนำให้มีการผลิต H_2O_2 ในข้าวทั้งสองสายพันธุ์แต่มีระดับต่ำกว่าในข้าว LPT123-TC171 เมื่อทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่ตอบสนองต่อโคโตซานในภาวะแล้ง พบการเปลี่ยนแปลงทั้งหมด 168 โปรตีนในใบ และ 92 โปรตีนในราก การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในภาวะแล้งพบว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาโบลิซึม การส่งสัญญาณ การถอดรหัส การลำเลียงสาร การต้านทานต่อโรค การเจริญเติบโตและการสลายโปรตีน ด้วยเทคนิคดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการระบุยีนใหม่ที่มีบทบาทในการต้านทานต่อภาวะแล้ง

3. ข้าวและการตอบสนองต่อภาวะขาดน้ำ

ภาวะขาดน้ำ (water deficit) เป็นภาวะเครียดทางกายภาพมีหลายสาเหตุได้แก่ ภาวะแล้ง (drought) ภาวะเค็ม (salinity) และ อุณหภูมิต่ำ (low temperature) ภาวะแล้งและภาวะเค็มเป็นสองปัจจัยหลักที่ทำให้ข้าวเกิดภาวะเครียดจาก osmotic stress (Zhu, 2002) กระบวนการถ่ายทอดสัญญาณภาวะเครียด มีลำดับดังนี้ (Mahajan and Tuteja, 2005; Gao et al., 2008)

- 3.1 Receptors
- 3.2 Second messengers
- 3.3 Ca²⁺ sensors
- 3.4 Kinases/Phosphatases
- 3.5 Transcription factors
- 3.6 Stress responsive genes
- 3.7 Physiological response

3.1 Receptors

พืชรับรู้ภาวะขาดน้ำโดย receptor ที่อยู่บน membrane ของเซลล์ ในข้าวมีการศึกษา receptor ของภาวะแล้งและเค็ม ได้แก่ G-protein coupled receptors (Yadav and Tuteja, 2011), Receptor-like kinase *OsS1K1* (Ouyang et al., 2010)

3.2 Second messengers

สัญญาณที่ได้รับมาจะถูกถ่ายทอดต่อโดย second messengers เช่น Ca²⁺, inositol phosphates, and reactive oxygen species (ROS) และถูกถ่ายทอดสัญญาณต่อไป

3.3 Ca²⁺ sensors

ระดับ Ca²⁺ ที่เพิ่มขึ้นภายใน cytosol จะถูกจับโดย calcium binding proteins (Ca²⁺ sensors) เช่น calcineurin B-like protein (CBLs) และ Calmodulin (CaM) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่มี activity ในตัวเอง เมื่อจับ Ca²⁺ แล้วจะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้สามารถกระตุ้นโปรตีนเป้าหมายเพื่อถ่ายทอดสัญญาณต่อไป (Boonburapong and Buaboocha, 2007)

3.4 Kinases/Phosphatases

โปรตีนเป้าหมายของ Ca²⁺ sensors ได้แก่ calcineurin B-like-interacting protein kinase (CIPK) (Kolukisaogl et al., 2004), calcium-dependent protein kinase (CDPKs)

(Wan et al., 2007) ถ่ายทอดสัญญาณโดยการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนโดยอาศัยการทำงานของ เอนไซม์ protein kinase เป็นลำดับขั้น Mitogen-activated protein kinases (MAPK) cascades ไปยัง Transcription factors (Ning et al., 2010)

3.5 Transcription factors (TFs)

ทรานสคริปชัน แฟกเตอร์ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกหรือไม่แสดงออกของ stress responsive genes โดยจะเข้าไปจับ cis-element ที่มีรหัสจำเพาะในบริเวณ promoter ทำให้เริ่มการผลิตโปรตีน ในฐานข้อมูล The Rice Stress-Responsive Transcription Factor Database (RiceSRTFDB) รายงานว่าข้าวมีจำนวน 1,408 TFs ที่ทำหน้าที่ในภาวะเค็ม และ/หรือ แล้ง (Priya and Jain, 2013)

3.6 Stress responsive genes

ยีนเป้าหมายที่ถูกควบคุมการแสดงออกโดย TFs ที่ทำหน้าที่ในภาวะเค็ม แล้ง เพื่อให้สร้างโปรตีนทำหน้าที่ปกป้องเซลล์ รักษาสมดุลเซลล์ และช่วยฟื้นฟูสภาพให้กลับมาเจริญเติบโตได้ในภาวะขาดน้ำ แบ่งเป็นกลุ่มได้ดังนี้ ROS scavenging system, Compatible solute และ Protective proteins

3.6.1 ระบบการทำลายรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (ROS scavenging system)

รีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (Reactive oxygen species; ROS) ประกอบไปด้วย singlet oxygen (1O_2), superoxide radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) และ hydroxyl radical (HO^\cdot) สารเหล่านี้ถูกสร้างขึ้นใน reaction centers ของ PSI และ PSII ในคลอโรพลาสต์ และสร้างมากขึ้นเมื่อเกิดภาวะขาดน้ำ พืชมีกลไกควบคุมสารอนุมูลอิสระเหล่านี้โดยเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GPX) และ catalase (Cruz de Carvalho, 2008)

3.6.2 Compatible solute

สารที่พืชสะสมแล้วมีคุณสมบัติทำให้ค่า osmotic potential ในพืชมีค่าต่ำลงมากขึ้นช่วยให้พืชต้านทานต่อภาวะแล้งและเค็ม เช่น กรดอะมิโนโพรลีน (ศุภจิตรา ชัชวาลย์ และคณะ, 2550) polyamines (Yang et al., 2007) น้ำตาล ได้แก่ raffinose, sucrose (Wu et al., 2009) และ trehalose (Garg et al., 2002)

3.6.3 Protective Proteins

โปรตีนที่มีหน้าที่ป้องกันโปรตีนชนิดอื่นเสียสภาพ เช่น Late embryogenesis abundant (LEA) จะถูกผลิตขึ้นเมื่อได้รับภาวะขาดน้ำเพื่อให้เมแทบอลิซึมดำเนินต่อไปได้ภายใต้ภาวะเครียด (Duan and Cai, 2012) heat shock protein (HSP) ทำหน้าที่ให้โปรตีนทำการม้วนพับได้อย่างถูกต้อง ชนิดของ HSP จะแตกต่างกันตามภาวะเครียดที่ได้รับ เช่น *OsHSP80.2* และ *OsHSP24.1* ถูกชักนำให้แสดงออกเพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับภาวะเครียดจาก osmotic stress (Zou et al., 2009)

3.7 Physiological response

การเปลี่ยนแปลงสรีรวิทยาของพืชในการตอบสนองต่อภาวะแล้งแบ่งได้เป็น 3 แบบ (Yue et al., 2006)

1. Drought escape เป็นความสามารถของพืชที่ทำให้พืชเจริญครบวงจรได้รวดเร็วขึ้น เมื่อพืชได้รับผลกระทบจากสภาวะขาดน้ำ
2. Drought avoidance ลดการสูญเสียน้ำโดยการลดพื้นที่ใบ พัฒนาโครงสร้างรากเพื่อให้สามารถนำน้ำในชั้นใต้ดินมาใช้ได้มากกว่าเดิม
3. Drought tolerance ปรับสมดุลแรงดันเต่งของเซลล์ (osmotic adjustment) มีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระ และมีกลไกในการปกป้องเซลล์เมมเบรน

จะเห็นได้ว่าการตอบสนองต่อภาวะเครียด โปรตีนจะเข้ามามีบทบาทอย่างมาก โดยทำหน้าที่เป็น โปรตีนควบคุม (regulatory protein) ในการส่งต่อสัญญาณตอบสนองต่อภาวะเครียดจนกระทั่งถึง โปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากภาวะเครียดโดยตรง (functional protein) การศึกษาโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปภายใต้ภาวะแล้ง จะช่วยทำให้เข้าใจกลไกการปรับตัวของพืช และนำไปใช้ในการปรับปรุงลักษณะพืชให้มีความต้านทานต่อภาวะเครียดได้ดีขึ้น

4. การศึกษาจีโนมที่ตอบสนองต่อภาวะเครียดในยุคหลังจีโนม (post-genomic era)

ข้าวนอกจากจะเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจแล้ว ยังเป็นต้นแบบสำหรับการศึกษา พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลของธัญพืช (cereal crops) เนื่องจากมีขนาดจีโนมที่เล็กกว่าข้าวโพดและข้าวฟ่าง หลังจากทีโครงการจีโนมข้าวของ *Oryza sativa* subspecies *indica* และ *japonica* เสร็จสิ้นลงในปี ค.ศ. 2002 (Yu et al., 2002; Goff et al., 2002) และได้เปิดเผยลำดับพันธุกรรมสู่สาธารณะ นักวิจัยสามารถนำลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน เข้าไปเปรียบเทียบได้จาก

ฐานข้อมูล Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu>) ทำให้ทราบตำแหน่งของยีนในจีโนม

ฐานข้อมูล RGAP7 คาดการณ์ว่าในข้าวมียีน 55,986 ตำแหน่ง (Loci) โดยให้ข้อมูลโครงสร้างยีน (intron, exon และ splicing variants) ชื่อโปรตีนและหน้าที่จากการเปรียบเทียบ orthologous genes ในฐานข้อมูลพันธุกรรมอื่นที่ถอดรหัสพันธุกรรมเสร็จสิ้นแล้ว (Kawahara et al., 2013) นักชีววิทยาสารสนเทศได้ใช้ประโยชน์จากข้อมูลดังกล่าวในการศึกษาที่ยีนที่ตอบสนองต่อภาวะแล้งและเค็ม

เมื่อนักวิทยาศาสตร์สามารถเข้าถึงข้อมูลจีโนมข้าวได้ทำให้เกิดการศึกษาองค์ความรู้เกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองและการทนต่อภาวะเครียดทั้งในระดับ genome transcriptome และ proteome ตัวอย่างการศึกษาในระดับจีโนม เช่น การศึกษา comparative genomics ของ *Arabidopsis* กับ พืชใกล้เคียงในวงศ์เดียวกันที่เป็นพืชชอบเค็ม (halophyte) คือ *Thellungiella halophila* (Taji et al., 2010) หรือการศึกษาแบบทั้งจีโนม (genome-wide) ในการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียด เช่น การค้นหา calmodulin like protein ในข้าว (Boonburapong and Buaboocha, 2007) เป็นต้น

การใช้ข้อมูลจากโครงการจีโนมในการศึกษาในระดับ transcriptome เช่น การศึกษา transcript ของข้าวสายพันธุ์ทนแล้ง Nagina 22 เพื่อระบุยีนที่มีบทบาทในการต้านทานต่อภาวะแล้ง (Gorantla et al., 2007) หรือการใช้ข้อมูลจาก micro array ในฐานข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีน calmodulin และ calmodulin-like ในข้าวพันธุ์ IR64 ในการตอบสนองต่อภาวะเครียดออกซิเดติก (Chinpongpanich et al., 2012) เป็นต้น

การใช้ข้อมูลจากโครงการจีโนมในการศึกษาในระดับ Proteome เช่น การทำนาย Protein-Protein Interactions ของโปรตีน OsABP (LOC_Os06g33520) ที่เพิ่มขึ้นในภาวะเค็ม ภาวะแล้ง และฮอร์โมน ABA เพื่อหาหน้าที่การทำงานของโปรตีน (Macovei et al., 2012) หรือใช้ศึกษา phylogenetic tree ในการจัดกลุ่มเมมเบรนโปรตีน aquaporin ที่ควบคุมการเข้าออกของน้ำ (water-balance control) ในข้าว (Nguyen et al., 2013) เป็นต้น

การศึกษายีนที่ตอบสนองต่อภาวะเครียดในยุคหลังจีโนม นักวิจัยจะเน้นไปที่การนำข้อมูล “โอมิคส์” ที่มีจำนวนมากมาจัดการข้อมูลด้วย bioinformatics tools ซึ่งการศึกษานี้จะแตกต่างจากเดิมตรงที่เป็นการศึกษากลุ่มยีนจำนวนมากพร้อมๆกัน โดยสามารถคาดเดาบทบาทหน้าที่ของยีน หรือโปรตีนที่ไม่ทราบหน้าที่มาก่อนได้จากความสัมพันธ์ที่ทราบมาแล้วในฐานข้อมูล เป็นการตรวจหา

ค้นหาเพื่อช่วยในการคัดเลือกยีนที่น่าจะมีบทบาทในการตอบสนองต่อภาวะเค็มและแล้ง ซึ่งลดค่าใช้จ่ายและประหยัดเวลาก่อนทำการทดลองจริง

5. โปรตีโอมิกส์

โปรตีโอม (Proteome) หมายถึงโปรตีนทั้งหมดที่ถูกแสดงออกมาจากข้อมูลพันธุกรรม ณ เวลาใดเวลาหนึ่งในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เทคนิคที่ใช้ศึกษาโปรตีโอม เรียกว่า โปรตีโอมิกส์ แบ่งออกเป็นศึกษาระดับการแสดงออก (expression proteomics) และระดับความสัมพันธ์ (interaction proteomics) (Blackstock and Weir, 1999) การศึกษาโปรตีนเริ่มต้นเมื่อ O'Farrell (1975) คิดค้นเทคนิคแยกโปรตีนตามประจุ (isoelectric points) และน้ำหนักโมเลกุล (molecular weights) ใน polyacrylamide gels ด้วยกระแสไฟฟ้าเรียกเทคนิคว่า two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis (2D-PAGE) และได้มีการพัฒนาเทคนิคนี้ในเชิงการค้าเพื่อให้สามารถแยกโปรตีนทำได้ง่ายขึ้น และได้ผลที่ทำได้ใหม่ได้ (Görg et al., 2009) เทคนิค 2D-PAGE ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาการตอบสนองต่อภาวะเครียดของพืชเพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนไปจากเดิม และนำโปรตีนที่ได้ไประบุชนิดและบทบาทในการตอบสนองต่อภาวะเครียด เช่น โปรตีโอมิกส์ในใบข้าวเมื่อได้รับภาวะแล้งในระยะต้นกล้าระหว่างพันธุ์ CT9993 (upland japonica) และ IR62266 (lowland indica) โดยพบโปรตีน 42 ชนิดที่เปลี่ยนแปลงไปจากภาวะแล้ง และ โปรตีน 27 ชนิดมีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ โดยสามารถระบุโปรตีนจาก mass spectrometry ได้ 16 ชนิด โดยมี 4 ชนิดยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ได้แก่ S-like RNase homologue, actin depolymerizing factor, rubisco activase และ isoflavone reductase-like protein (Salekdeh et al., 2002) ข้อจำกัดของการศึกษาโปรตีโอมโดยใช้เทคนิค 2D-PAGE คือไม่เหมาะสมสำหรับศึกษาโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากเกินไปหรือน้อยเกินไป โปรตีนที่มีความเป็นกรดหรือเบสมากเกินไป ตัวอย่างเช่น เมมเบรนโปรตีนที่มีบทบาทใน signal transduction, cell adhesion, เมตาบอไลต์ (metabolites) และเป็นองค์ประกอบถึง 30% ของโปรตีนทั้งหมดในเซลล์ แต่ไม่ปรากฏบน 2D-PAGE เนื่องจากเป็น low abundant มีความเป็นเบสมากเกินไป และไม่ละลายในสารละลายที่ใช้สำหรับทำ isoelectric focusing (Santoni et al., 2000) ความก้าวหน้าทางด้านเครื่องมือในการตรวจวัดมวลสาร (mass spectrometry) และ bioinformatics tools ทำให้งานวิจัยทางด้านโปรตีโอมิกส์ทำได้เร็วขึ้น วิเคราะห์โปรตีนจำนวนมากได้พร้อมกัน และมีความถูกต้องแม่นยำ ทำให้เกิดเทคนิค gel-based liquid chromatography-tandem mass spectrometry (GeLC-MS/MS) โดยโปรตีนจะถูกแยกในขั้นตอนแรกด้วย sodium dodecyl sulfate-PAGE (SDS-PAGE) จากนั้นชิ้นเจลจะถูกแบ่งออกเป็นส่วนย่อย ๆ ตามช่วงขนาดของโมเลกุลโปรตีนมาตรฐาน เมื่อตัดชิ้นเจลแต่ละส่วนเป็นชิ้นขนาดเล็กแล้วจึงย่อยโปรตีนในเจลด้วยเอนไซม์ที่ทราบตำแหน่งตัดจำเพาะ (in gel digestion) แล้วสกัดพอลิเปปไทด์ที่ย่อยแล้วออกจากเจล ก่อนนำไปวิเคราะห์มวลเปปไทด์

(tandem mass spectrometry: MS/MS) และใช้อัลกอริทึมในการวิเคราะห์ระบุชนิดโปรตีนจาก ข้อมูลน้ำหนักโมเลกุลที่อ่านได้ โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ด้วยเทคนิคนี้ทำให้ตรวจพบเมมเบรน โปรตีนและโปรตีนที่เป็น low abundant ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนได้ (Rezaul et al., 2005)

เทคนิค GeLC-MS/MS ได้ถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาโปรตีโอมในใบข้าวหอมมะลิ (KDML105) เทียบกับข้าวสายพันธุ์ทนแล้ง (NSG19) และข้าวสายพันธุ์ไม่ทนแล้ง (IR20) ภายใต้ภาวะแล้งจาก 20% (w/v) polyethylene glycol 6000(PEG6000) ซึ่งส่งผลกระทบต่อปริมาณน้ำสัมพันธ์ (relative water content หรือ RWC) และประสิทธิภาพการทำงานของคลอโรฟิลล์ (Fv/Fm) ที่ ลดลงในสายพันธุ์ไม่ทนแล้ง (IR20) โดยตรวจพบโปรตีน 623 ชนิด และพบว่าโปรตีน 53 ชนิดที่ ตอบสนองในภาวะแล้งแตกต่างกัน ในสายพันธุ์ทนแล้ง (NSG19) ตรวจพบโปรตีนกลุ่มที่ทำหน้าที่ ซ่อมแซมเซลล์และดีเอ็นเอมากที่สุด (Maksup et al., 2012)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโปรตีโอมในใบข้าวสายพันธุ์ Pokali ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์ทนเค็ม และ IR29 ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็ม พบโปรตีนจำนวน 206 ชนิด โดยเป็นโปรตีนที่ทราบหน้าที่แล้ว 113 ชนิด ที่เกี่ยวข้องกับ กระบวนการเผาผลาญภายในเซลล์ ออกซิเดชันรีดักชัน กระบวนการสร้างสาย อาร์เอ็นเอ โปรตีนโครงสร้าง กระบวนการสังเคราะห์แสง การป้องกันเซลล์ และโปรตีนขนส่งในสาย พันธุ์ทนเค็ม และยังพบว่า Hypothetical protein₁₇₁ (LOC_Os10g33630) มีระดับการแสดงออกที่ สูงขึ้นเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง แตกต่างจากสายพันธุ์ไม่ทนเค็ม (Wichajarn, 2009)

การศึกษาโปรตีโอมที่ผ่านมาจะศึกษาเฉพาะใบข้าว (Wichajarn 2009; Maksup et al., 2012) ในขณะที่โปรตีโอมในรากข้าวภายใต้ภาวะแล้งมีรายงานน้อยมากทั้ง ๆ ที่รากเป็นบริเวณแรกที่ได้รับสัญญาณจากภาวะขาดน้ำ และถ่ายทอดสัญญาณดังกล่าวไปยัง downstream ในขณะที่ การศึกษาโปรตีโอมในรากข้าวภายใต้ภาวะแล้งที่มีรายงานก็เป็นการศึกษาเฉพาะในสายพันธุ์ไม่ทน แล้ง (IR64) โดยศึกษาภาวะแล้งเทียบกับภาวะปกติ (Mirzaei et al., 2012) แต่ยังคงขาดการศึกษา โปรตีโอมในรากข้าวภายใต้ภาวะแล้งเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ทนแล้งและเค็มกับสายพันธุ์ไม่ทน แล้งและเค็ม ซึ่งจะนำไปสู่การค้นพบกลุ่มยีนใหม่ในราก ที่มีบทบาทในการแสดงลักษณะต้านทานต่อ ภาวะแล้งและเค็ม

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

พืชทดลอง

1. เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ LPT123
2. เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ LPT123 สายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) (Vajrabhaya และ Vajrabhaya, 1991) โดยผ่านการผสมตัวเองและคัดเลือกภายใต้ภาวะเค็มมารุ่นที่ 9
ในการทดลองนี้ ทำการศึกษาในข้าว 2 พันธุ์/สายพันธุ์ ซึ่งในวิทยานิพนธ์นี้จะใช้คำว่าสายพันธุ์ ตลอดการกล่าวถึงข้าว LPT123 และ LPT123-TC171

สถานที่ปลูกพืชทดลอง

โรงกักกันโรคและแมลง หน่วยปฏิบัติการวิจัยสิ่งแวดล้อมและสรีรวิทยาของพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์การศึกษา

1. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกข้าว
 - กระบะพลาสติก
 - ทราย
 - ขวดแก้ว
2. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างพืช
 - อลูมิเนียมฟอยล์
 - กรรไกร
 - เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO AG285, Switzerland)
 - ภาชนะใส่ไนโตรเจนเหลว
 - ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Thermo-Scientific, USA)

3. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด Protein

- โกร่งและที่ปั่น
- Spectrophotometer และ cuvette (Agilent Technology, USA)
- incubator (Gemmyco, USA)
- orbital shaker (Biosan, USA)
- vertical gel electrophoresis set (Biorad, USA)
- ultimate 3000 LC system (Dionex, USA)
- ESI ion Trap MS (HCT ultra PTM Discovery System, Bruker Daltonik)
- pre-column (Monolithic Trap Column, 200 μm i.d. x 5 cm)
- nano column (Monolithic Nano Column, 100 μm i.d. x 5 cm)

4. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด RNA

- โกร่งและที่ปั่น
- dry bath incubator (MD-01N-220, Taiwan)
- microcentrifuge (Sorvall Biofuge Pico, Germany)
- refrigerated centrifuge (Universal 32R, Hettich, Germany)
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Sanyo, Thailand)
- Spectrophotometer และ cuvette (Agilent Technology, USA)
- gel electrophoresis system (MiniRun GE-100, Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd)
- เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายภาพเจล (Gel DocTM 2000, Bio-Rad, California, USA)
- micropipette (Gilson, France)
- Vortex (Labnet, USA)

5. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)
 - เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (Peltier Thermal Cycler รุ่น PTC-100TM, USA)
 - microcentrifuge (Sorvall Biofuge Pico, Germany)
 - microcentrifuge tube (Sorvall Biofuge Pico, Germany)
 - gel electrophoresis system (MiniRun GE-100, Hangzhou Bioer Technology Co., ltd)
 - vortex mixer (Labnet, USA)
 - micropipette (Gilson, France)
 - PCR tubes (Oxygen Inc., USA)
 - pipette tips (Extrogene, USA)
 - parafilm (Whatman[®], GE healthcare, USA)
 - 96-well plate (Bio-Rad, California, USA)

6. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)
 - micropipette (Gilson, France)
 - PCR tube strips, flat cap strips (Bio-Rad, USA)
 - low tube strip, WHT (Bio-Rad, USA)
 - CFX96TM real-time system (Bio-Rad, USA)

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการปลูกข้าว
 - สารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP no.2 (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) (ภาคผนวก ก 1)
 - 10% polyethylene glycol 6000 (PEG6000)
2. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาโปรตีนอิมมูโนสตี
 - 2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดโปรตีน Peterson (ภาคผนวก ก)
 - 0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS)
 - 72% Trichloroacetic acid (TCA)
 - 0.15% Deoxycholic acid (DOC)
 - 2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วย Lowry method (ภาคผนวก ก)
 - 0.15% Deoxycholate in dH₂O
 - 72% Trichloroacetic acid in dH₂O
 - 20% Na₂CO₃
 - 0.2% CuSO₄ (pentahydrate) + 0.4% KTartrate
 - 0.8 N NaOH
 - 10% SDS
 - Folin reagent
 - Bovine serum albumin (BSA) (2 µg/µl)
 - 2.3 สารเคมีที่ใช้ในการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE (ภาคผนวก ก)
 - 40% (W/V) Acrylamide
 - 1.5 M Tris HCl pH 8.8

- 0.5 M Tris HCl pH 6.8
- 10X Sodium dodecyl sulfate (SDS)
- Distilled water
- 10% Ammonium persulfate (APS)
- N, N, N', N'-tetramethyl-ethane-1,2-diamine (TEMED)

2.4 สารเคมีที่ใช้ในการย้อมโปรตีนด้วย Coomassie Blue R250 staining (ภาคผนวก ก)

- Coomassie blue R250
- Acetic acid
- Distilled water
- Methanol
- Protein ladder 10-250 kDa (New England Biolabs, USA)

2.5 In gel digestion for liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (ภาคผนวก ก)

- 100% Acetonitrile (ACN)
- 10 mM Dithiothreitol (DTT)
- 10 mM Ammonium bicarbonate
- 10 ng Trypsin
- 0.1% Trifluoroacetic acid (TCA)
- Steriled milli Q water

3. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA

- RNA Extraction Buffer (ภาคผนวก ก)
- Phenol: chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) (v/v)

- Absolute ethanol (Liquid Distillery Organization Excise Dept, Thailand)
 - 80% Ethanol
 - Lithium chloride (LiCl_2) (Fluka)
 - Diethyl pyrocarbonate (DEPC) (Sigma-Aldrich Co., USA)
 - Hydrogen peroxide
 - 2-Mercaptoethanol (Merck, Germany)
 - Sodium chloride (NaCl) (Sigma-Aldrich Co., USA)
 - Liquid Nitrogen (Linde, Thailand)
4. สารเคมีที่ใช้ใน RNA, DNA electrophoresis
- DNA loading dye (ภาคผนวก ก)
 - Ethidium bromide (Gibco BRL, USA)
 - TBE buffer (Tris Borate EDTA) (ภาคผนวก ก)
 - DNA marker (100 bp DNA ladder, Geneaid, USA)
 - Agarose (USB Corporation, Ohio, USA)
 - Sterile water
5. สารเคมีที่ใช้ในการกำจัด DNA
- Recombinant DNase I (RNase-free) (TaKaRa TKR-R-2270A)
 - DEPC-treated water
 - phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) (v/v)
 - Sodium acetate (CH_3COONa) (Sigma-Aldrich Co., USA)
 - Absolute ethanol (Liquid Distillery Organization Excise Dept, Thailand)
 - DEPC-treated TE buffer

6. สารเคมีที่ใช้ในการสร้าง cDNA สายแรก

- iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad, USA)
5x RT supermix with iScript MMLV-RT (RNaseH+), RNase inhibitor, dNTPs, oligo (dT), random primers, buffer, MgCl₂, and stabilizers.
- Nuclease-free water

7. สารเคมีที่ใช้ในการทำ reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

- 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Roche, Switzerland)
- RBC Taq DNA polymerase (RBCBioscience, Taiwan)
- RBC 10X reaction buffer (with 15mM Mg²⁺)
- Oligonucleotide Synthesis (Bio design, Thailand)
- Nuclease-free water

8. สารเคมีที่ใช้ใน quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

- SsoFast™ EvaGreen® Super Mix (Bio-Rad, USA)
2x reaction buffer with dNTPs, Sso7d-fusion polymerase, MgCl₂, Evagreen dye and stabilizers
- Oligonucleotide Synthesis (Bio design, Thailand)
- Nuclease-free water

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาเปรียบเทียบแบบรูปโปรตีนทั้งหมดในรากข้าว

1.1 เตรียมพืชทดลองเพื่อการวิเคราะห์ทาง proteomics

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น จำนวน 4 ระยะเวลา มี 2 Treatments ต่อพันธุ์ คือ ชุดควบคุม และชุดภาวะแล้ง

- 1.1.1 นำเมล็ดข้าวสายพันธุ์ LPT123 และข้าว LPT123 สายพันธุ์กลายทนเค็ม (LPT123-TC171) แช่น้ำกรองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเพาะบนทราย รดน้ำให้ชุ่ม
- 1.1.2 เมื่อต้นกล้าข้าวมีอายุ 7 วันนับจากวันเพาะ ให้สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 สูตรดัดแปลง (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991)
- 1.1.3 เมื่อต้นกล้าข้าวอายุ 15 วัน คัดเลือกต้นกล้าที่มีขนาดใกล้เคียงกัน จำนวน 20 ต้น มีใบสองถึงสามใบ แล้วย้ายปลูกลงในขวดแก้วขนาดปริมาตร 150 มิลลิลิตรที่มีสารละลายธาตุอาหารสูตรเดิม 100 มิลลิลิตร ควบคุมระดับของสารละลายธาตุอาหารโดยเติมน้ำกรองให้สารละลายอยู่ในระดับเดียวกันกับตอนเริ่มต้นการทดลองทุกวัน เปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารทุก 7 วัน
- 1.1.4 เมื่อข้าวอายุ 31 วัน สำหรับภาวะแล้ง ย้ายต้นกล้าลงในสารละลายธาตุอาหาร WP สูตรดัดแปลงที่มี PEG6000 ความเข้มข้น 10% และในภาวะปกติ ย้ายต้นกล้าลงในสารละลายธาตุอาหาร WP สูตรดัดแปลงที่ไม่มีการเติม PEG6000 เก็บตัวอย่างรากที่ระยะเวลา 0 2 6 24 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น โดยตัดรากข้าวใส่ในอลูมิเนียมฟอยล์แช่ไนโตรเจนเหลวแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะสกัดโปรตีน

1.2 เตรียมตัวอย่างโปรตีนและวิเคราะห์ทาง proteomics

1.2.1 สกัดและแยกโปรตีนด้วย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

สกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อราก 200 มิลลิกรัม ตามวิธีของ Peterson (1983) ดังวิธีที่ระบุไว้ในภาคผนวก ก 2.1 แล้ววัดความเข้มข้นโปรตีนที่สกัดได้ด้วยวิธี Lowry method (Lowry et al., 1951) ดังวิธีที่ระบุไว้ในภาคผนวก ก 2.2 นำตัวอย่างโปรตีนมาแยกโดย 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

โดยให้แต่ละตัวอย่างมีปริมาณโปรตีนเท่าๆ กัน แล้วนำมาย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie Brilliant Blue R250 (Sambrook et al., 1989)

1.2.2 ย่อยโปรตีนและวิเคราะห์เพปไทด์ด้วย ESI-MS/MS

ตัวอย่างโปรตีนที่แยกได้บน SDS-PAGE จะถูกนำมาแยกออกตามช่วงของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ได้แก่ 10-20, 20-30, 30-50, 50-80, 80-150 และมากกว่า 150 kDa ชิ้นเจลที่มีโปรตีนในแต่ละช่วงน้ำหนักโมเลกุลนี้จะถูกนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดชิ้นละ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร แล้วทำการย่อยโปรตีนโดยวิธี in gel digestion (ภาคผนวก ก 2.3) และสกัดโปรตีนที่ย่อยแล้วออกจากเจลตามวิธีของ Jaresitthikunchai (2009) (ภาคผนวก ก 2.4) และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำโปรตีนที่ผ่านการย่อยแล้วมาวิเคราะห์ด้วย ESI-MS/MS (Ultimate 3000 LC system, Dionex; ESI-Ion Trap MS, HCT ultra PTM Discovery System, Bruker Daltonik)

1.2.3 วิเคราะห์โปรตีนในเชิงปริมาณและระบุชนิดโปรตีน

ข้อมูลที่ได้จาก LC-MS จะถูกเปลี่ยนเป็นไฟล์ mzXML ด้วยโปรแกรม CompassXport 1.3.10 (Bruker Daltonik, GmbH) จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลโปรตีนในเชิงปริมาณโดยใช้ DeCyder MS Differential Analysis software (DeCyderMS, GE Healthcare) (Johansson et al., 2006; Thorsell et al., 2007) ระบุชนิดของโปรตีนโดยใช้ MASCOT software (Matrix Science, London, UK) (Perkins et al., 1999) โดยใช้ฐานข้อมูล NCBI nr 20121015 กำหนดค่า Taxonomy: *Oryza sativa*, Fixed Modification: Carbamidomethyl (C), Variable modification: Oxidation (M), Enzyme: Trypsin, peptide tolerance: ± 1.2 Da, fragment mass tolerance: ± 0.6 Da, peptide charge: 1+ 2+ and 3+, maximum allowed missed cleavage: 1, instrument type: ESI-TRAP

1.2.4 การระบุตำแหน่งยีนที่สร้างโปรตีนและหน้าที่

นำ coding sequence (cds) ที่ MASCOT (Matrix Science Ltd., London, UK) แสดงจากการจับคู่ลำดับกรดอะมิโนของพอลิเพปไทด์จากฐานข้อมูล NCBI ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Rice Genome Annotation Project (RGAP) ของ NFS (<http://rice.plantbiology.msu.edu>) โดยใช้ Blastn และค้นหาหน้าที่ของโปรตีนโดยใช้ gene ontology (GO) browser ในฐานข้อมูลเดียวกัน

1.2.5 การคัดเลือกข้อมูลโปรตีนที่สมควรนำไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

ข้อมูลตัวอย่างโปรตีนในเชิงปริมาณที่ได้จาก DeCyder MS Differential Analysis software จะถูกนำมา normalized โดยอ้างอิงจากโปรตีนมาตรฐานที่ทราบค่าจากการ spike BSA digested solution 1 pmol/ μ l ลงในตัวอย่าง (ภาคผนวก ก 2.4) และระบุตำแหน่งยีน (Locus) ที่สร้างโปรตีนตามที่ระบุไว้ในข้อ 1.2.4 โปรตีนที่มี Locus ซ้ำกันจะถูกเลือกจากค่า MASCOT Score ที่ได้จากข้อ 1.2.3 โดยเลือกค่าที่มากที่สุด และถ้า MASCOT Score เท่ากันจะเลือกจากค่า ANOVA ที่น้อยที่สุดที่ได้จาก DeCyder MS Differential Analysis software

1.3 ระบุชนิดและแบบรูปของโปรตีนในรากที่เปลี่ยนแปลงในภาวะแล้ง

1.3.1 โปรตีนที่มีการแสดงออกในข้าวสองพันธุ์/สายพันธุ์แตกต่างกันในช่วงระยะเวลาต่างๆ (Timing)

1.3.1.1 สร้างแผนภาพของเวน (Venn diagram)

ระบุชนิดและแบบรูปของโปรตีนเพื่อแสดงความสัมพันธ์ร่วมกันหรือแตกต่างกันในรากข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 ในภาวะปกติและภาวะแล้งในแต่ละระยะเวลา 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง โดยคัดกรองข้อมูลเลือกเฉพาะโปรตีนที่มีการแสดงออก 2 ใน 3 ซ้ำ หรือไม่มีการแสดงออก 3 ซ้ำสมบูรณ์ ดังตัวอย่างต่อไปนี้

Protein	LPT123 ภาวะปกติ			LPT123 ภาวะแล้ง			LPT123-TC171 ภาวะปกติ			LPT123-TC171 ภาวะแล้ง		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
A	0	0	0	15	14	0	0	0	0	16	13	0
B	13	15	15	14	14	0	14	0	13	14	12	0
C	15	12	15	15	0	0	8	0	11	14	0	10

โปรตีนที่คัดเลือกไว้ในกราฟวิเคราะห์ต่อไป คือโปรตีน A และ B และโปรตีน C จะถูกคัดออก

สร้างแผนภาพเวเนดังนี้ ขึ้นแรก หาค่ามากสุดใน 3 ซ้ำเพื่อใช้เป็นตัวแทนค่าของโปรตีน เนื่องจากง่ายในการพิจารณาข้อมูลพร้อมกันจาก LPT123 ภาวะปกติ LPT123 ภาวะแล้ง LPT123-TC171 ภาวะปกติ และ LPT123-TC171 ภาวะแล้ง โดยพิจารณาแค่ว่ากลุ่มใดมีค่าโปรตีนเท่ากับ 0 หรือไม่เท่านั้น ชั้นที่สอง เรียงลำดับข้อมูลโปรตีนจากค่าน้อยสุดไปยังมากที่สุด ทีละกลุ่ม ค่าที่น้อยสุดเท่ากับ 0 อยู่ข้างบน จะถูกเลือกมาเก็บไว้ มีความหมายว่าในกลุ่มทดลองนั้นไม่พบโปรตีน ข้อมูลที่ถูกเลือกเก็บไว้แล้วจะไม่ถูกนำมาพิจารณาซ้ำอีก ให้เรียงลำดับข้อมูลไปเรื่อยๆ ครบ 4 กลุ่มทดลอง จนทุกช่องใน 4 กลุ่มไม่มีช่องใดมีค่าเท่ากับ 0 ซึ่งหมายความว่าโปรตีนดังกล่าวพบได้ในทุกกลุ่มทดลอง แล้วจึงนับจำนวนที่ได้ไปใส่ในแผนภาพเวเน ตรวจสอบความถูกต้องจากผลรวมแต่ละบริเวณของแผนภาพเวเนจะเท่ากับจำนวนโปรตีนเริ่มต้น

1.3.1.2 เปรียบเทียบเชิงปริมาณโปรตีนในข้าวสองพันธุ์/สายพันธุ์ ในภาวะปกติ และ ภาวะแล้งที่ช่วงระยะเวลาต่างๆ (Timing)

โปรตีนที่ผ่านการกรองแล้วในข้อ 1.3.1.1 จะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบการ แสดงออกระหว่างกลุ่มโดยใช้ ANOVA แสดงแบบรูปของโปรตีนในข้าวสองพันธุ์/สายพันธุ์ในภาวะปกติและภาวะแล้ง เป็น Heat map โดยใช้ Multiexperiment Viewer (MeV) software (Saeed et al., 2003) นำข้อมูลที่ได้จากการจัดกลุ่มทางสถิติเปรียบเทียบกับการจัดกลุ่มจากแผนภาพเวเน

1.3.2 แบบรูปโปรตีนในรากข้าว ข้าวสองพันธุ์/สายพันธุ์ เมื่ออยู่ในภาวะปกติและภาวะแล้ง

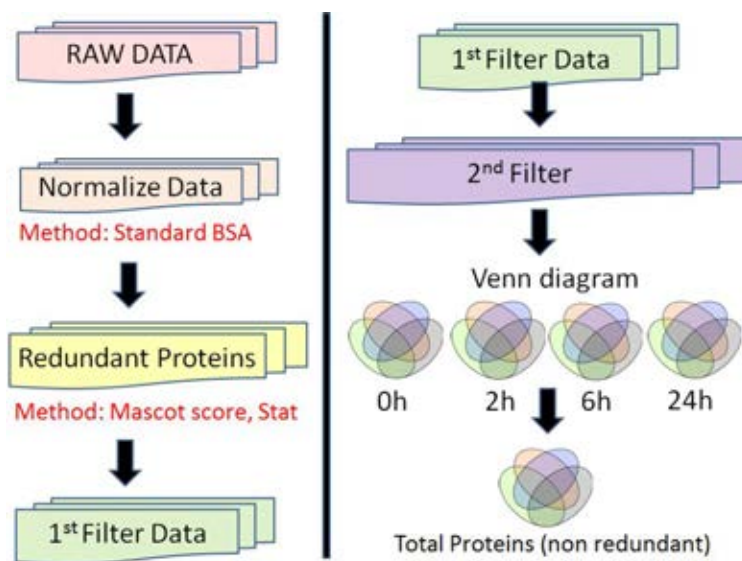
ชุดข้อมูลโปรตีนทั้งหมดในรากข้าวได้จากการนับชนิดโปรตีนที่พบจากแผนภาพของเวนในข้อ 1.3.1.1 ชั่วโมงที่ 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง โดยไม่นับซ้ำโปรตีนชนิดเดียวกัน (ภาพที่ 3.1)

1.3.2.1 เปรียบเทียบเชิงปริมาณโปรตีนระหว่างภาวะปกติและภาวะแล้งในสายพันธุ์เดียวกัน

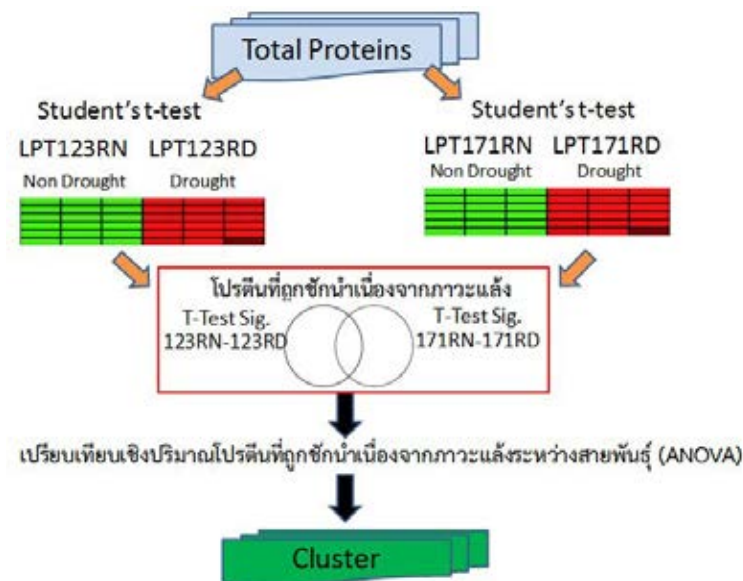
ชุดข้อมูลโปรตีนทั้งหมดในรากข้าว (Total Proteins) จะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้ Student's t-test โปรตีนที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จะถูกจัดเป็น 2 กลุ่มโดยใช้ KMC แสดงแบบรูปโปรตีนเป็น Heat map โดยใช้ Multiexperiment Viewer (MeV) software (Saeed et al., 2003)

1.3.2.2 เปรียบเทียบเชิงปริมาณโปรตีนที่ถูกชักนำเนื่องจากภาวะแล้งระหว่างสายพันธุ์

โปรตีนที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในข้อ 1.3.2.1 จากแต่ละสายพันธุ์ นำมาสร้างแผนภาพเวนแสดงโปรตีนที่ถูกชักนำด้วยภาวะแล้งใน LPT123 และ LPT123-TC171 พร้อมทั้งระบุโปรตีนที่เหลื่อมกัน (overlap) นำโปรตีนที่ถูกชักนำเนื่องจากภาวะแล้งที่ตรวจพบทั้งหมดไปวิเคราะห์เปรียบเทียบเชิงปริมาณโปรตีนระหว่างกลุ่ม โดยใช้ ANOVA มีจำนวน 4 กลุ่ม คือ LPT123 ภาวะปกติ LPT123 ภาวะแล้ง LPT123-TC171 ภาวะปกติ และ LPT123-TC171 ภาวะแล้ง โปรตีนที่แตกต่างมีนัยสำคัญจะถูกจัดเป็น 4 กลุ่มโดยใช้ KMC แสดงแบบรูปโปรตีนเป็น Heat map โดยใช้ Multiexperiment Viewer (MeV) software (Saeed et al., 2003) (ภาพที่ 3.2)



ภาพที่ 3.1 ซ้าย แสดงวิธีการจัดการข้อมูลโปรตีน และ ขวา แสดงวิธีการคัดกรองข้อมูลสร้างแผนภาพเวน



ภาพที่ 3.2 แสดงวิธีการหาโปรตีนที่ถูกชักนำด้วยภาวะแล้งระหว่างสายพันธุ์

2. ศึกษาการแสดงออกของยีนที่ทำการคัดเลือกไว้จากโปรตีนในระดับ transcription

ข้อมูลที่ได้จากโปรตีโอมิกส์จะใช้ในการคัดเลือกยีน 1 ยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญและมีหน้าที่ที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของรากในภาวะแล้งเพื่อนำมาตรวจสอบการแสดงออกในระดับ transcription ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

2.1 การคัดเลือกยีนที่คาดว่าจะมีการตอบสนองต่อความแล้งและอาจส่งผลต่อความสามารถในการทนแล้งในข้าว

2.1.1 *in silico* gene expression analysis

2.1.1.1 ศึกษาข้อมูลทาง bioinformatics ของยีนดังกล่าวจากฐานข้อมูล Rice Oligonucleotide Array Database (<http://www.ricearray.org>) (Cao et al., 2012) เพื่อทำ *in silico* gene expression analysis จากข้อมูล micro array ชุดการทดลองภาวะแล้งหรือภาวะเค็มว่าในภาวะดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนที่สนใจนั้นหรือไม่

2.1.1.2 ศึกษาข้อมูลทาง bioinformatics ของยีนที่ได้ใน 2.1.1.1 จากฐานข้อมูล UniGene EST Profile (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>) เพื่อตรวจสอบความถี่ของการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อรากโดยคำนวณจาก Gene EST/Total EST in pool มีหน่วยเป็น Transcripts per million (TPM)

2.1.2 *in silico* characterization of candidate gene promoter region

ศึกษาข้อมูลทาง bioinformatics ของยีนเป้าหมายจากฐานข้อมูล The Rice Stress-Responsive Transcription Factor Database (<http://www.nipgr.res.in/RiceSRTFDB.html>) (Priya and Jain, 2013) เพื่อตรวจสอบ cis-element ตำแหน่งเหนี่ยวยีนดังกล่าวว่าถูกควบคุมด้วย Transcription factor ที่เกี่ยวข้องภาวะแล้ง

2.1.3 *in silico* gene coexpression analysis

ศึกษาข้อมูลทาง bioinformatics ของยีนเป้าหมายจากฐานข้อมูล Rice Functionally Related gene Expression Network Database (<http://ricefrend.dna.affrc.go.jp>) (Sato et al., 2013). เพื่อหาเครือข่ายภายใต้อิทธิพลการแสดงออกของยีนดังกล่าวในอัลกอริทึมใน KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) เพื่อวิเคราะห์ pathway ที่เกี่ยวข้อง (Kanehisa and Goto, 2000) ที่เชื่อมโยงกับยีนเป้าหมายภายใต้ภาวะแล้ง

2.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

2.2.1 ออกแบบ primer เพื่อใช้ตรวจสอบเบื้องต้นว่ายีนเป้าหมายมีการแสดงออก

2.2.2 เตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชโดยการให้ภาวะแล้งและไม่ให้ภาวะแล้งแล้วเก็บเนื้อเยื่อในช่วงเวลา 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง หลังจากเริ่มการทดลอง

2.2.3 สกัด total RNA จากตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชโดยดัดแปลงจากวิธีของ ปารวี ธิกาศ (2546) ดังวิธีที่แสดงไว้ในภาคผนวก ก หลังจากนั้นตรวจสอบคุณภาพของ RNA โดยใช้ gel electrophoresis system และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย RNA ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพื่อคำนวณปริมาณ total RNA (ภาคผนวก ก)

2.2.4 นำ Total RNA ปริมาณ 20 μ g มากำจัด DNA ด้วยเอนไซม์ DNaseI (Takara, Japan) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ (ภาคผนวก ก) ตรวจสอบคุณภาพและคำนวณปริมาณ Total RNA ตามวิธีในข้อ 2.2.3

2.2.5 นำ RNA ปริมาณ 2 μ g มาสังเคราะห์ cDNA สายแรกโดยใช้ iScriptTM Reverse Transcription Supermix (Bio-RAD, USA) ตามที่ระบุในคู่มือ (ภาคผนวก ก)

- 2.2.6 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยใช้ primer ที่ออกแบบไว้ในข้อ 2.2.1 โดยการ
ทำ PCR ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ (ภาคผนวก ก)
- 2.2.7 นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากข้อ 2.2.5 มาใช้เป็นแม่แบบในการตรวจสอบการ
แสดงออกของยีน โดยใช้ primer ที่ออกแบบไว้ในข้อ 2.2.1 ด้วยเครื่อง CFX96TM
real-time system (Bio-RAD) โดยใช้เอนไซม์ SsoFastTM EvaGreen[®]
Supermix (Bio-Rad, USA) ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ (ภาคผนวก ก)
- 2.2.8 หาค่าการแสดงออกของยีนด้วยวิธี DDCT method (Pfaffl, 2001) โดย
normalize ระดับการแสดงออกของยีนที่เลือกกับระดับการแสดงออกของยีน
EF1 α ดังสมการ

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}} \text{ (control-sample)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}} \text{ (control-sample)}}}$$

โดยที่ R คือ Relative expression ratio

E_{target} คือ $10^{-1/\text{slope}}$ ของยีนจากข้อ 2.2.1

E_{ref} คือ $10^{-1/\text{slope}}$ ของยีน *EF1 α*

$\Delta\text{CP}_{\text{target}} \text{ (control-sample)}$ คือ ผลต่างของค่า CP (cross-over point) ของ
ยีนจากข้อ 2.2.1 เมื่อเปรียบเทียบกับค่า CP
ของตัวอย่าง control

$\Delta\text{CP}_{\text{ref}} \text{ (control-sample)}$ คือ ผลต่างของค่า CP (cross-over point) ของ
ยีน *EF1 α* เมื่อเปรียบเทียบกับค่า CP
ของตัวอย่าง control

- 2.2.9 เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนโดยนำข้อมูล relative expression ratio
ที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความ
แตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple-Range Test (DMRT)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การศึกษาเปรียบเทียบแบบรูปโปรตีนทั้งหมดในรากข้าว

จากการเปรียบเทียบแบบรูปโปรตีนทั้งหมดในรากข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 ทั้งที่อยู่ในภาวะปกติและในภาวะแล้งหลังจากที่เริ่มการทดลองที่เวลา 0 2 6 และ 24 ชั่วโมงได้ผลการทดลองดังนี้

1.1 แบบรูปโปรตีนเมื่อเริ่มการทดลอง (ชั่วโมงที่ 0)

ในชั่วโมงเริ่มต้นของการทดลอง จากการวิเคราะห์ข้อมูลพบโปรตีนในรากข้าวจำนวน 344 ชนิด (ภาพที่ 4.1 ข) โดยพบโปรตีนที่แสดงออกในข้าว LPT123 จำนวน 342 ชนิด และพบโปรตีนที่แสดงออกในข้าว LPT123-TC171 จำนวน 316 ชนิด ซึ่งมีโปรตีนที่พบเฉพาะใน LPT123 จำนวน 28 ชนิด (ภาพ 4.1 ข กลุ่ม B F และ M) และ พบเฉพาะใน LPT123-TC171 จำนวน 2 ชนิด (ภาพ 4.1 ข กลุ่ม A E และ N)

เมื่อนำปริมาณโปรตีนแต่ละชนิดที่พบในรากข้าว 4 ชุดการทดลอง ได้แก่ ข้าว LPT123 ในภาวะปกติ ข้าว LPT123 ในภาวะแล้ง (ซึ่งยังไม่ได้รับภาวะแล้ง) ข้าว LPT123-TC171 ในภาวะปกติ และข้าว LPT123-TC171 ในภาวะแล้ง (ซึ่งยังไม่ได้รับภาวะแล้ง) ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน มีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ 44 ชนิด ซึ่งคิดเป็น 13% (ภาคผนวก ข ตารางที่ ข-1) สามารถวิเคราะห์กลุ่มเป็น 4 กลุ่ม ดังภาพที่ 4.2 แสดงโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงที่น่าสนใจดังตารางที่ 4.1

1.2 แบบรูปโปรตีนเมื่อชั่วโมงที่ 2

จากการวิเคราะห์ข้อมูลของโปรตีนในรากข้าวหลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบโปรตีนในรากข้าวจำนวนราก 347 ชนิด (ภาพที่ 4.1 ค) โดยพบโปรตีนที่แสดงออกในข้าว LPT123 จำนวน 346 ชนิด และพบโปรตีนที่แสดงออกในข้าว LPT123-TC171 จำนวน 329 ชนิด ซึ่งมีโปรตีนที่พบเฉพาะใน LPT123 จำนวน 18 ชนิด (ภาพ 4.1 ค กลุ่ม B F และ M) และพบเฉพาะใน LPT123-TC171 จำนวน 1 ชนิด (ภาพ 4.1 ค กลุ่ม A E และ N)

หลังจากได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง รากข้าว LPT123 มีการสร้างโปรตีนที่ไม่พบในภาวะปกติ จำนวน 6 ชนิด (ภาพ 4.1 ค กลุ่ม B) ในขณะที่รากข้าว LPT123-TC171 ไม่พบการสร้างโปรตีนที่แตกต่างจากรากข้าวที่ปลูกในภาวะปกติ (ภาพ 4.1 ค กลุ่ม A)

เมื่อนำปริมาณโปรตีนแต่ละชนิดที่พบในรากข้าว 4 ชุดการทดลอง ได้แก่ ข้าว LP123 ในภาวะปกติ ข้าว LPT123 ในภาวะแล้ง (หลังได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง) ข้าว LPT123-TC171 ในภาวะปกติ และข้าว LPT123-TC171 ในภาวะแล้ง (หลังได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง) ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่ามีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ 40 ชนิด ซึ่งคิดเป็น 12% (ภาคผนวก ข ตารางที่ ข-2) สามารถวิเคราะห์กลุ่มเป็น 4 กลุ่ม ดังภาพที่ 4.3 แสดงโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงที่น่าสนใจดังตารางที่ 4.1

1.3 แบบรูปโปรตีนเมื่อชั่วโมงที่ 6

จากการวิเคราะห์ข้อมูลของโปรตีนในรากข้าวหลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบโปรตีนในรากข้าวจำนวนราก 337 ชนิด (ภาพที่ 4.1 ง) โดยพบโปรตีนที่แสดงออกในข้าว LPT123 จำนวน 336 ชนิด และพบโปรตีนที่แสดงออกในข้าว LPT123-TC171 จำนวน 319 ชนิด ซึ่งมีโปรตีนที่พบเฉพาะใน LPT123 จำนวน 18 ชนิด (ภาพ 4.1 ง กลุ่ม B F และ M) และพบเฉพาะใน LPT123-TC171 จำนวน 1 ชนิด (ภาพ 4.1 ง กลุ่ม A E และ N)

หลังจากได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง รากข้าว LPT123 มีการสร้างโปรตีนที่ไม่พบในภาวะปกติ จำนวน 7 ชนิด (ภาพ 4.1 ง กลุ่ม B) ในขณะที่รากข้าว LPT123-TC171 ไม่พบการสร้างโปรตีนที่แตกต่างจากรากข้าวที่ปลูกในภาวะปกติ (ภาพ 4.1 ง กลุ่ม A)

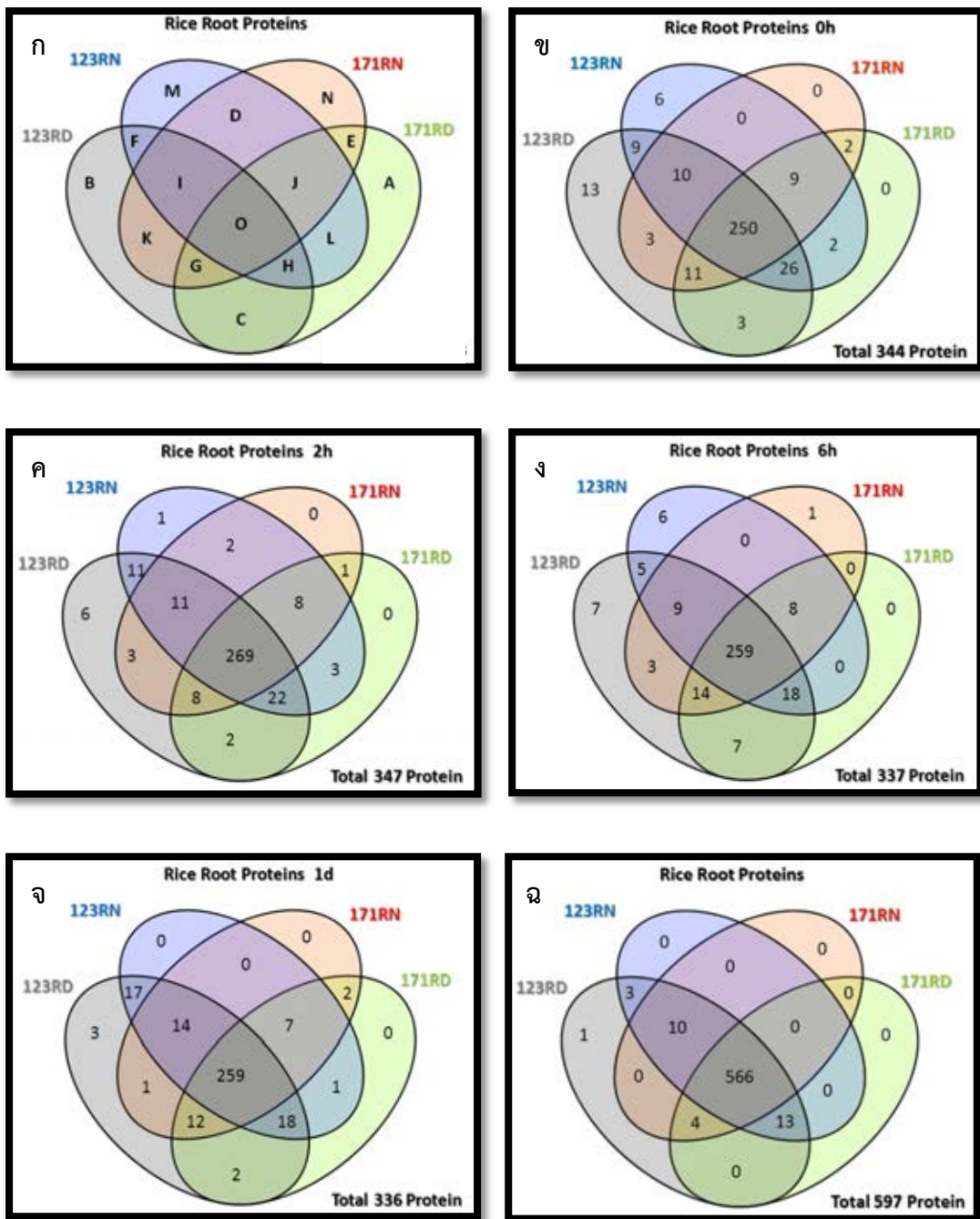
เมื่อนำปริมาณโปรตีนแต่ละชนิดที่พบในรากข้าว 4 ชุดการทดลอง ได้แก่ ข้าว LP123 ในภาวะปกติ ข้าว LPT123 ในภาวะแล้ง (หลังได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง) ข้าว LPT123-TC171 ในภาวะปกติ และข้าว LPT123-TC171 ในภาวะแล้ง (หลังได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง) ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่ามีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ 38 ชนิด ซึ่งคิดเป็น 11% (ภาคผนวก ข ตารางที่ ข-3) สามารถวิเคราะห์กลุ่มเป็น 4 กลุ่ม ดังภาพที่ 4.4 แสดงโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงที่น่าสนใจดังตารางที่ 4.1

1.4 แบบรูปโปรตีนเมื่อชั่วโมงที่ 24

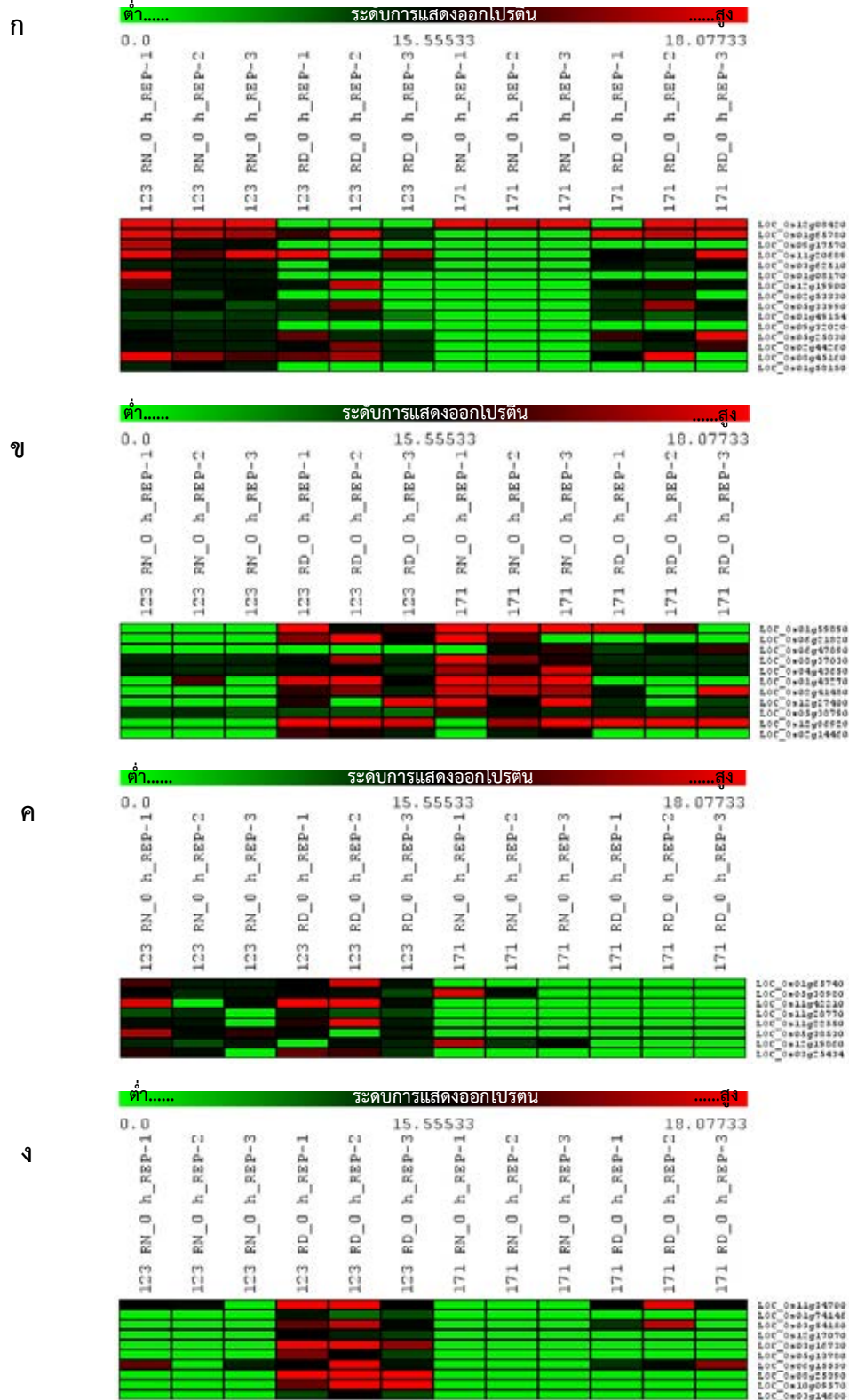
จากการวิเคราะห์ข้อมูลของโปรตีนในรากข้าวหลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบโปรตีนในรากข้าวจำนวนราก 336 ชนิด (ภาพที่ 4.1 จ) โดยพบโปรตีนที่แสดงออกในข้าว LPT123 จำนวน 334 ชนิด และพบโปรตีนที่แสดงออกในข้าว LPT123-TC171 จำนวน 316 ชนิด ซึ่งมีโปรตีนที่พบเฉพาะใน LPT123 จำนวน 20 ชนิด (ภาพ 4.1 จ กลุ่ม B F และ M) และ พบเฉพาะใน LPT123-TC171 จำนวน 2 ชนิด (ภาพ 4.1 จ กลุ่ม A E และ N)

หลังจากได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง รากข้าว LPT123 มีการสร้างโปรตีนที่ไม่พบในภาวะปกติ จำนวน 3 ชนิด (ภาพ 4.1 จ กลุ่ม B) ในขณะที่รากข้าว LPT123-TC171 ไม่พบการสร้างโปรตีนที่แตกต่างจากรากข้าวที่ปลูกในภาวะปกติ (ภาพ 4.1 จ กลุ่ม A)

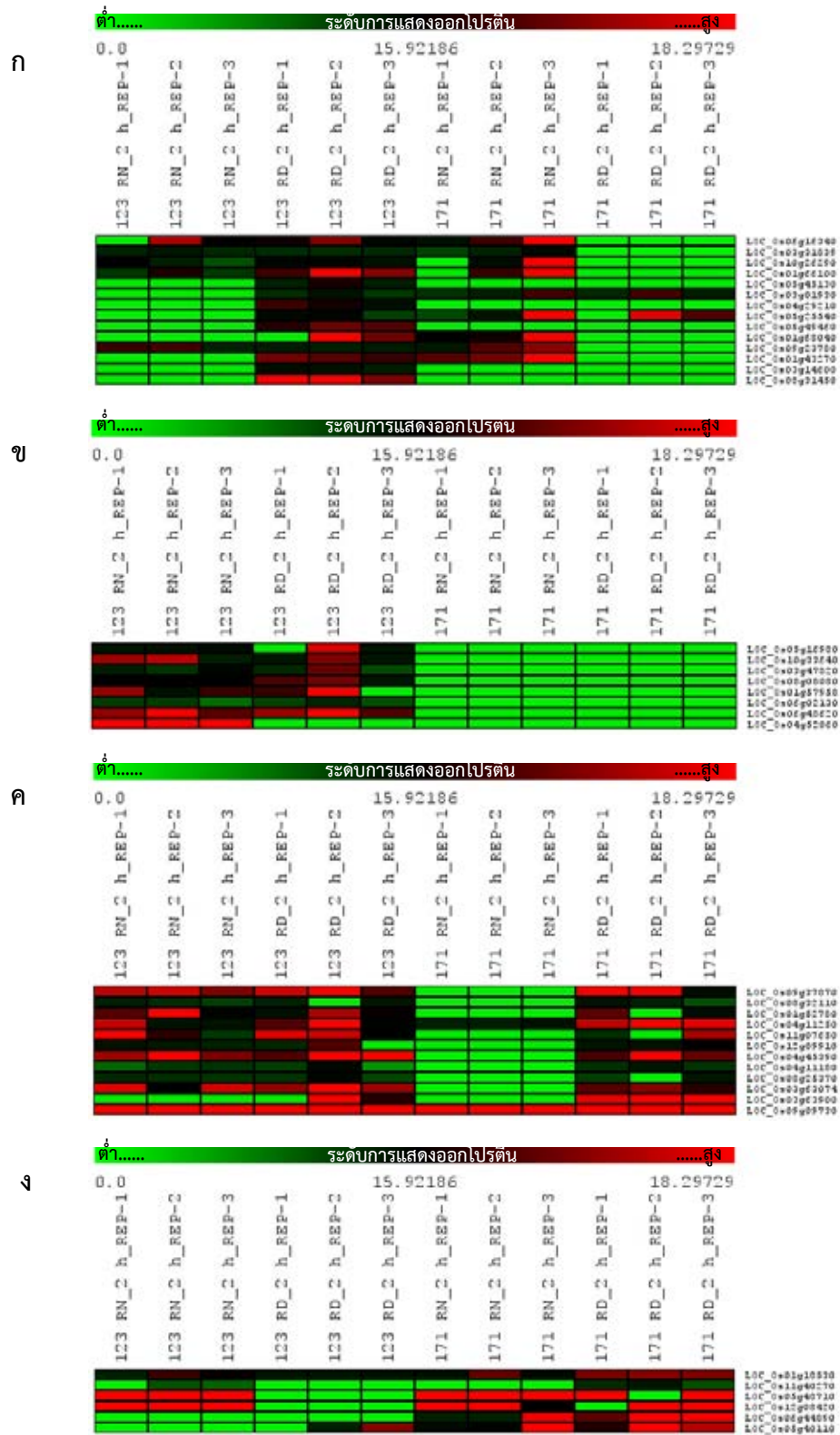
เมื่อนำปริมาณโปรตีนแต่ละชนิดที่พบในรากข้าว 4 ชุดการทดลอง ได้แก่ ข้าว LP123 ในภาวะปกติ ข้าว LPT123 ในภาวะแล้ง (หลังได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง) ข้าว LPT123-TC171 ในภาวะปกติ และข้าว LPT123-TC171 ในภาวะแล้ง (หลังได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง) ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่ามีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ 42 ชนิด ซึ่งคิดเป็น 13% (ภาคผนวก ข ตารางที่ ข-4) สามารถวิเคราะห์กลุ่มเป็น 4 กลุ่ม ดังภาพที่ 4.5 แสดงโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงที่น่าสนใจดังตารางที่ 4.1



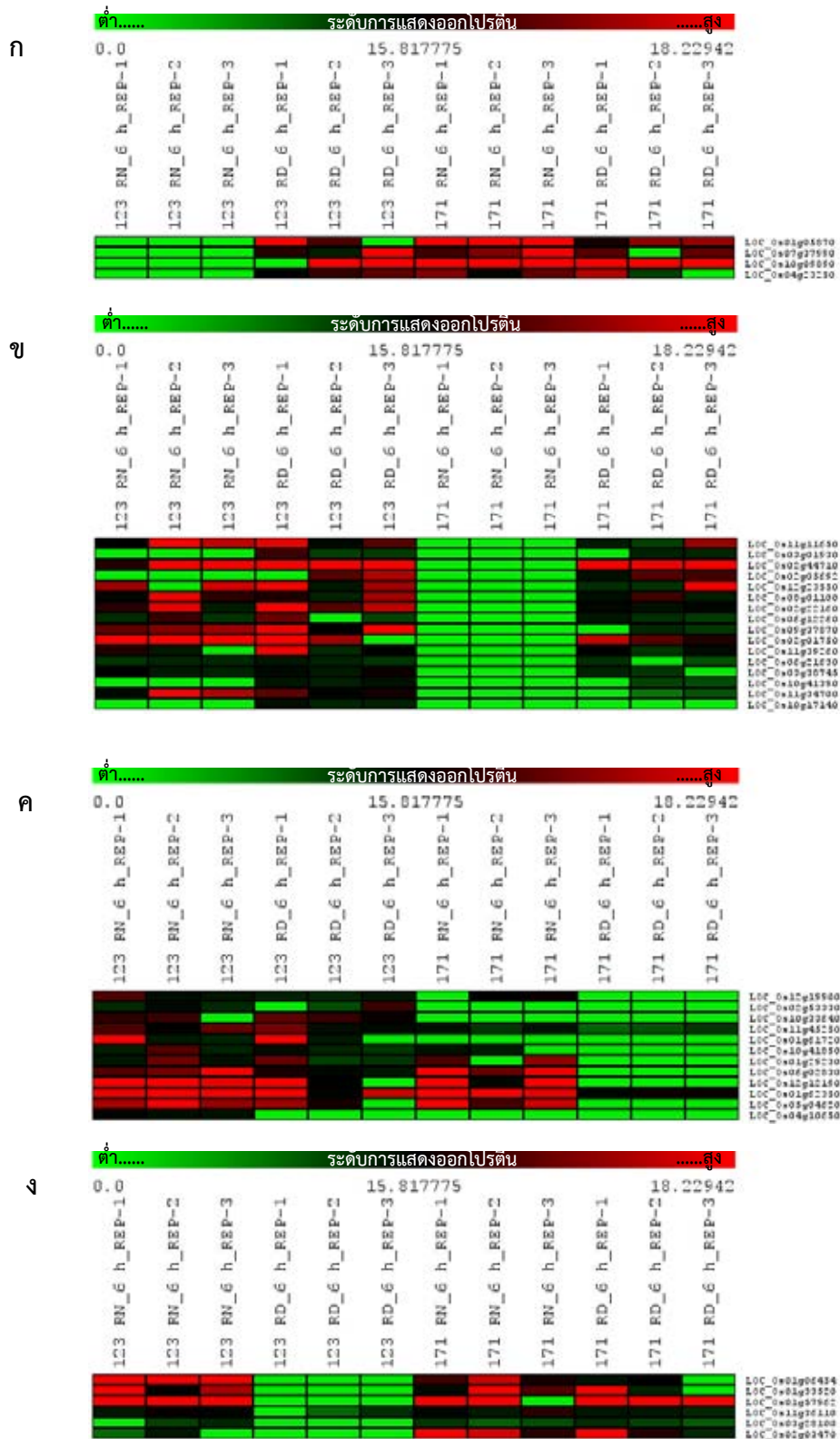
ภาพที่ 4.1 Venn diagram แสดงจำนวนชนิดของโปรตีนที่พบในรากข้าว LPT123 ที่ปลูกในภาวะปกติ (123RN) รากข้าว LPT123 ที่ปลูกในภาวะแล้ง (123RD) รากข้าว LPT123-TC171 ที่ปลูกในภาวะปกติ (171RN) รากข้าว LPT123-TC171 ที่ปลูกในภาวะแล้ง (171RD) สัญลักษณ์อักษร A – K แสดงแต่ละส่วนของ Venn Diagram ดังแสดงดังภาพ ก จำนวนชนิดของโปรตีนที่พบในแต่ละส่วนของภาพ ก แสดงในภาพ ข (ชั่วโมงที่ 0) ภาพ ค (ชั่วโมงที่ 2) ภาพ ง (ชั่วโมงที่ 6) ภาพ จ (ชั่วโมงที่ 24) และ ภาพ ฉ (โปรตีนทั้งหมดในรากข้าว)



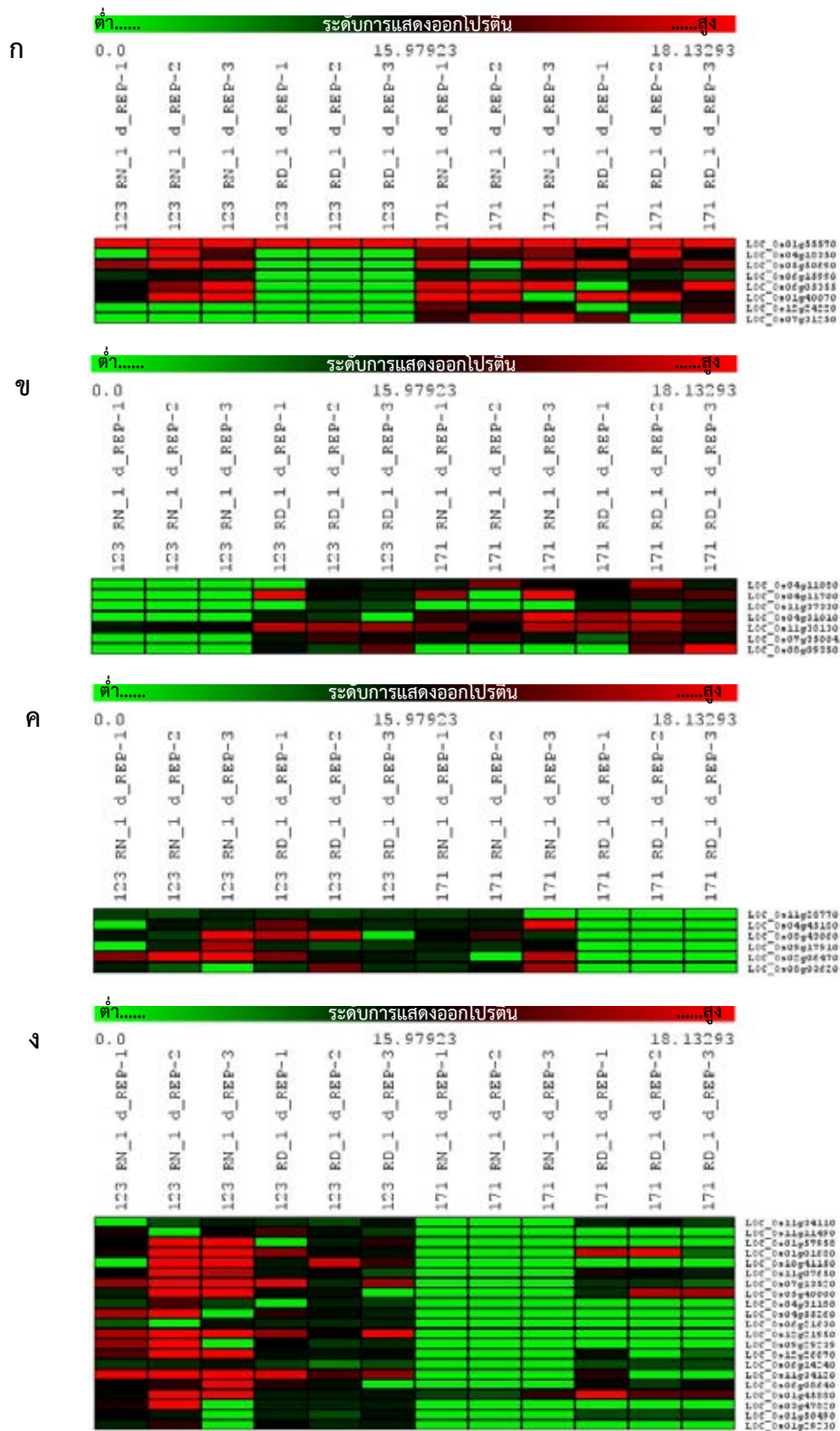
ภาพที่ 4.2 Heat map แสดงระดับปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันในข้าว LPT123 และ LPT123-TC171เมื่อเริ่มการทดลอง กลุ่ม ก จำนวน 15 ชนิด กลุ่ม ข จำนวน 11 ชนิด กลุ่ม ค จำนวน 8 ชนิดกลุ่ม ง จำนวน 10 ชนิด



ภาพที่ 4.3 Heat map แสดงระดับปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันในข้าว LPT123 และ LPT123-TC171เมื่อ ข้าวโม่งที่ 2 กลุ่ม ก จำนวน 14 ชนิด กลุ่ม ข จำนวน 8 ชนิด กลุ่ม ค จำนวน 12 ชนิด กลุ่ม ง จำนวน 6 ชนิด



ภาพที่ 4.4 Heat map แสดงระดับปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันในข้าว LPT123 และ LPT123-TC171เมื่อ ข้าวโมงที่ 6 กลุ่ม ก จำนวน 4 ชนิด กลุ่ม ข จำนวน 16 ชนิด กลุ่ม ค จำนวน 12 ชนิด กลุ่ม ง จำนวน 6 ชนิด



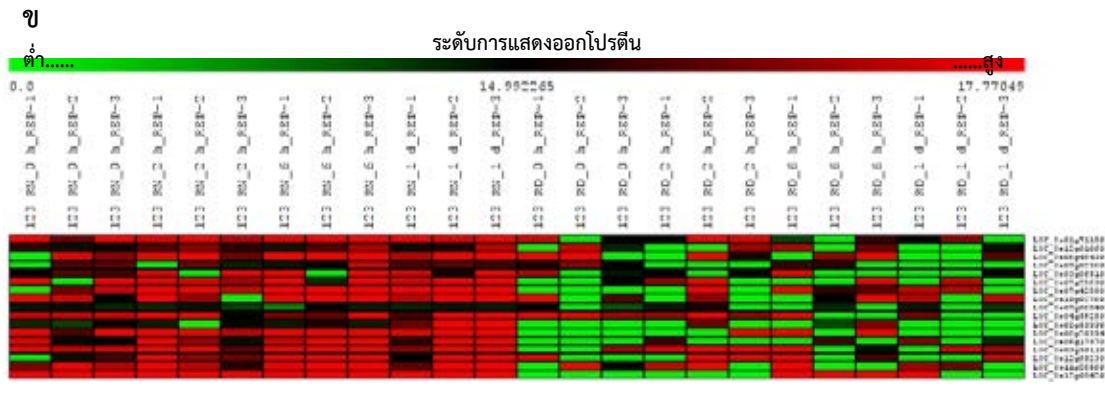
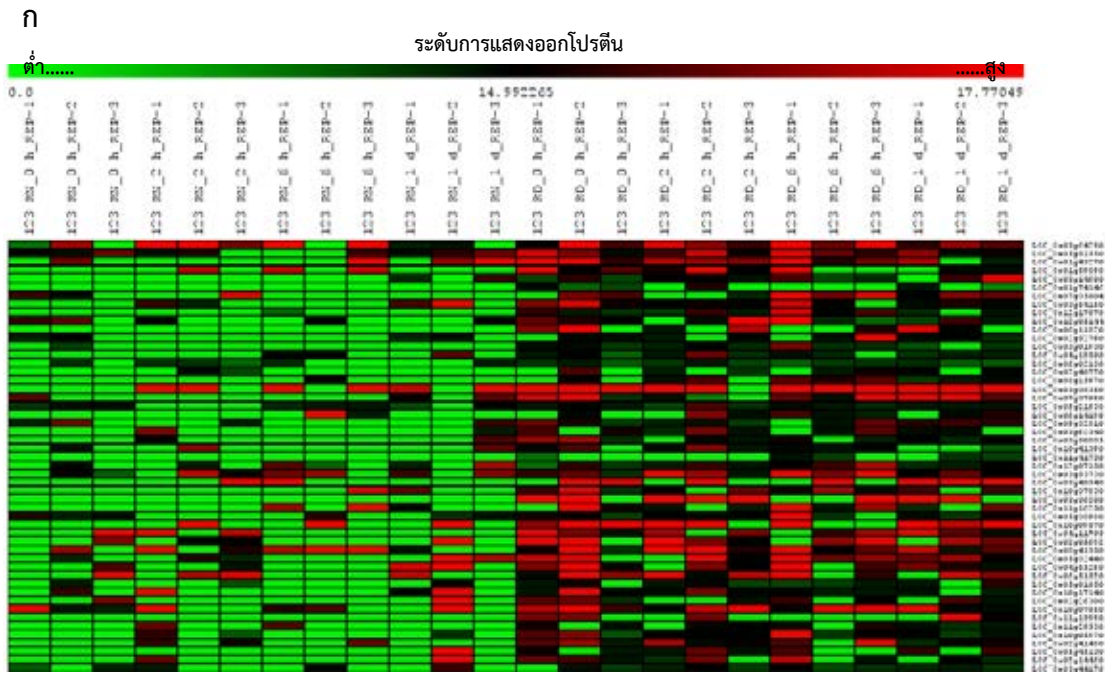
ภาพที่ 4.5 Heat map แสดงระดับปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันในข้าว LPT123 และ LPT123-TC171เมื่อ ข้าวโม่งที่ 24กลุ่ม ก จำนวน 8 ชนิด กลุ่ม ข จำนวน 7 ชนิด กลุ่ม ค จำนวน 6 ชนิด กลุ่ม ง จำนวน 21 ชนิด

ตารางที่ 4.1 โปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในรากข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 ณ เวลาที่ 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง

ตำแหน่งยีน (Locus)	หน้าที่ (Function)	การแสดงออก	
		LPT123	LPT123-TC171
ชั่วโมงที่ 0			
LOC_Os06g47890	signal transduction	มีการแสดงออกเฉพาะ LPT123-TC171	
ชั่วโมงที่ 2 ภาวะแล้งมีผลทำให้โปรตีนมีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงจากภาวะปกติ			
LOC_Os04g29210	metabolic process	สูงขึ้น	ไม่เปลี่ยนแปลง
LOC_Os05g49460	nucleic acid metabolic process	สูงขึ้น	ไม่เปลี่ยนแปลง
LOC_Os08g31450	cellular process	สูงขึ้น	ไม่เปลี่ยนแปลง
ชั่วโมงที่ 6 ภาวะแล้งมีผลทำให้โปรตีนมีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงจากภาวะปกติ			
LOC_Os10g41390	protein modification process	ภาวะแล้งสูงกว่าภาวะปกติทั้งสองพันธุ์แต่ LPT123RD แสดงออกสูงกว่า LPT123-171RD	
LOC_Os02g05692	unknown	ภาวะแล้งสูงกว่าภาวะปกติทั้งสองพันธุ์แต่ LPT123RD แสดงออกต่ำกว่า LPT123-171RD	
LOC_Os01g33520	unknown	ต่ำลง	ไม่เปลี่ยนแปลง
LOC_Os01g06454	metabolic process	ต่ำลง	ไม่เปลี่ยนแปลง
LOC_Os01g57962	photosynthesis	ต่ำลง	ไม่เปลี่ยนแปลง
LOC_Os12g12190	nucleic acid metabolic process	ไม่เปลี่ยนแปลง	ต่ำลง
LOC_Os11g45250	nucleic acid metabolic process	ไม่เปลี่ยนแปลง	ต่ำลง
LOC_Os05g04620	metabolic process	ไม่เปลี่ยนแปลง	ต่ำลง
ชั่วโมงที่ 24 ภาวะแล้งมีผลทำให้โปรตีนมีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงจากภาวะปกติ			
LOC_Os11g37330	metabolic process	ภาวะแล้งสูงกว่าภาวะปกติทั้งสองพันธุ์แต่ LPT123RD แสดงออกต่ำกว่า LPT123-171RD	
LOC_Os08g09350	nucleic acid metabolic process	ภาวะแล้งสูงกว่าภาวะปกติทั้งสองพันธุ์แต่ LPT123RD แสดงออกสูงกว่า LPT123-171RD	
LOC_Os06g15990	metabolic process	ต่ำลง	ไม่เปลี่ยนแปลง
LOC_Os05g50690	nucleic acid metabolic process	ต่ำลง	ไม่เปลี่ยนแปลง

1.5 แบบรูปโปรตีนในรากข้าว LPT123 เมื่ออยู่ในภาวะปกติและภาวะแล้ง

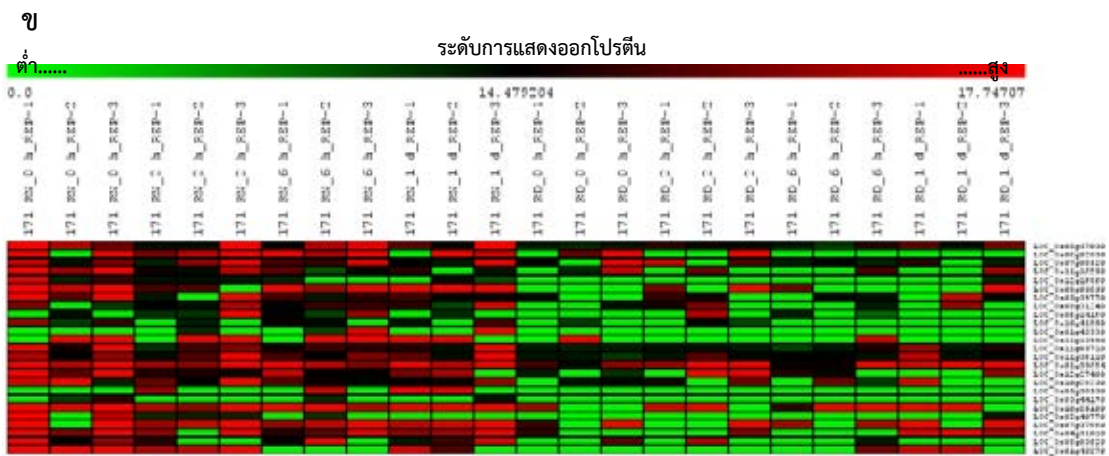
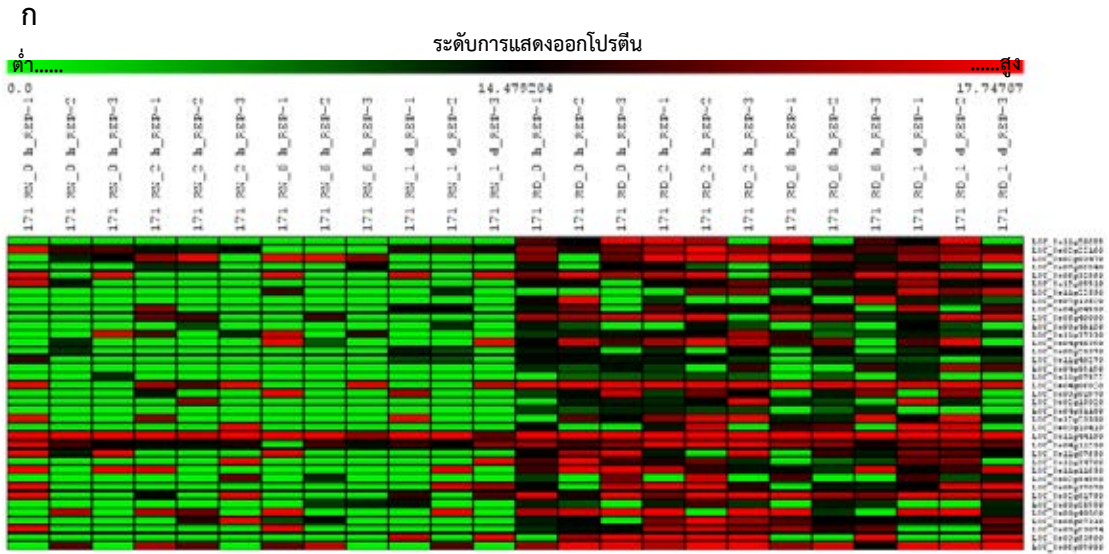
เมื่อนำข้อมูลโปรตีนทุกชนิดที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลชนิดและปริมาณของโปรตีนที่พบในทุกช่วงเวลา จะพบว่าได้โปรตีนรวมทั้งสิ้น 597 ชนิด (ภาพที่ 4.1 ฉ) จึงนำข้อมูลปริมาณโปรตีนแต่ละชนิดที่พบในช่วงเวลาต่าง ๆ ในรากข้าว LPT123 ที่ปลูกเลี้ยงในภาวะปกติ เทียบกับข้อมูลที่ได้จากรากข้าวที่ปลูกเลี้ยงในภาวะแล้ง โดยใช้ Student's t-test พบว่ามีโปรตีนในรากข้าว LPT123 ที่แสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเนื่องจากภาวะแล้งจำนวน 68 ชนิด ซึ่งคิดเป็น 11.4% โดยพบว่า ภาวะแล้งมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น 51 ชนิด (ภาพที่ 4.6 ก ภาคผนวก ข ตารางที่ ข-5) และมีผลทำให้มีปริมาณโปรตีนลดลง 17 ชนิด (ภาพที่ 4.6 ข ภาคผนวก ข ตารางที่ ข-6) และเมื่อนำชนิดของโปรตีนที่มีปริมาณการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปมาจัดกลุ่ม gene ontology (GO) ตาม biological process ในฐานข้อมูล RGAP ได้เป็น 8 กลุ่ม ได้แก่ unknown 34% transposon 16% metabolic process 16% cellular process 12% protein modification process 7% nucleic acid metabolic process 7% cellular component organization 3% signal transduction 5% (ภาพที่ 4.8)



ภาพที่ 4.6 Heat map แสดงระดับปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันในข้าว LPT123 โดยพบระดับการแสดงออกในรากข้าว LPT123 ภาวะแล้ง สูงกว่าใน LPT123 ภาวะปกติ จำนวน 51 ชนิด (ก) และ LPT123 ภาวะแล้ง มีการแสดงออกต่ำในรากข้าว LPT123 ภาวะปกติ จำนวน 17 ชนิด (ข) ตำแหน่งของยีนแสดงไว้ทางขวาของ Heat map

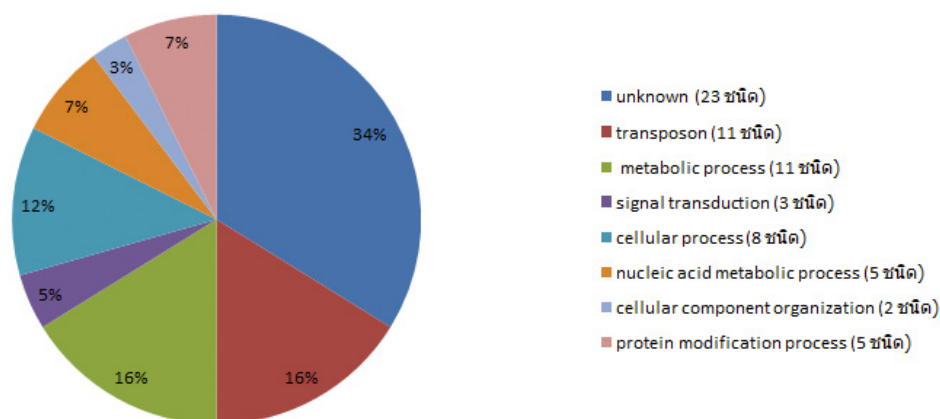
1.6 แบบรูปโปรตีนในรากข้าว LPT123-TC171 เมื่ออยู่ในภาวะปกติและภาวะแล้ง

เมื่อนำข้อมูลโปรตีนทุกชนิดที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลชนิดและปริมาณของโปรตีนที่พบในทุกช่วงเวลาในรากข้าว LPT123-TC171 ที่ปลูกเลี้ยงในภาวะปกติ เทียบกับข้อมูลที่ได้จากรากข้าวที่ปลูกเลี้ยงในภาวะแล้ง โดยใช้ Student's t-test พบว่ามีโปรตีนในรากข้าว LPT123-TC171 ที่แสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเนื่องจากภาวะแล้งจำนวน 62 ชนิด ซึ่งคิดเป็น 10.4 % โดยพบว่า ภาวะแล้งมีผลทำให้โปรตีนมีปริมาณเพิ่มขึ้น 37 ชนิด (ภาพที่ 4.7 ก ภาคผนวก ข ตารางที่ ข-7) และ มีผลทำให้มีปริมาณลดลง 25 ชนิด (ภาพที่ 4.7 ข ภาคผนวก ข ตารางที่ ข-8) และเมื่อนำชนิดของโปรตีนที่มีปริมาณการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปมาจัดกลุ่ม gene ontology (GO) ตาม biological process ในฐานข้อมูล RGAP ได้เป็น 8 กลุ่ม ได้แก่ unknown 35% transposon 19% metabolic process 23% cellular process 8% Transport 2% nucleic acid metabolic process 8% cellular component organization 3% signal transduction 2% (ภาพที่ 4.9)



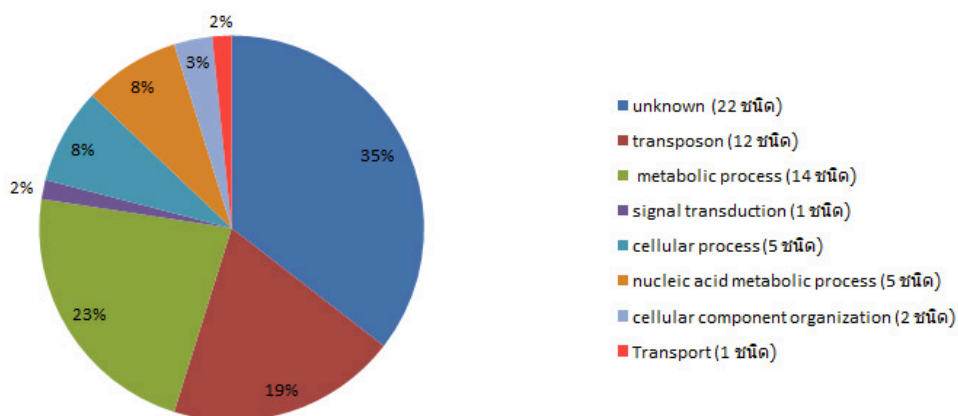
ภาพที่ 4.7 Heat map แสดงระดับปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันในข้าว LPT123-TC171 โดยพบระดับการแสดงออกในรากข้าว LPT123-TC171 ภาวะแล้ง สูงกว่าใน LPT123-TC171 ภาวะปกติ จำนวน 37 ชนิด (ก) และ LPT123-TC171 ภาวะแล้ง มีการแสดงออกต่ำในรากข้าว LPT123-TC171 ภาวะปกติ จำนวน 25 ชนิด (ข) ตำแหน่งของยีนแสดงไว้ทางขวาของ Heat map

Functional cataloging of drought responsive proteins in LPT123 (68 ชนิด)



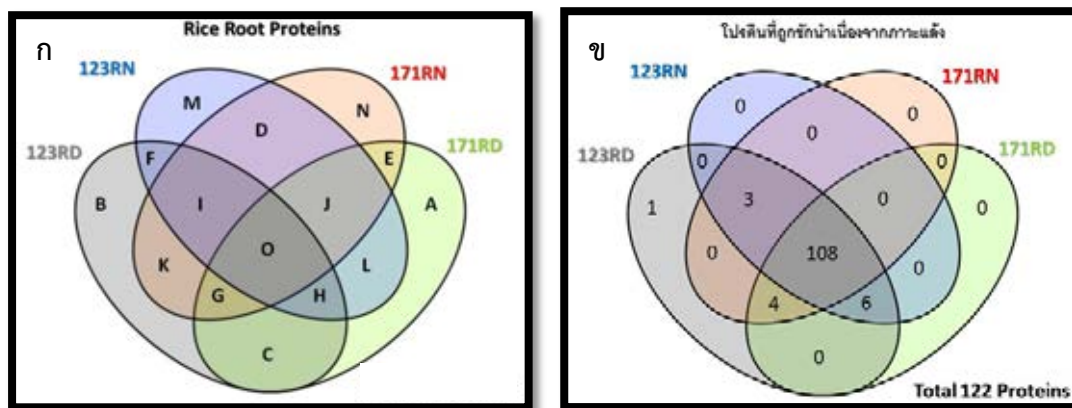
ภาพที่ 4.8 สัดส่วนหน้าที่ของโปรตีนที่พบว่ามีปริมาณแตกต่างกันในรากข้าว LPT123 ภาวะปกติ และ เมื่อได้รับภาวะแล้ง

Functional cataloging of drought responsive proteins in LPT171 (62 ชนิด)



ภาพที่ 4.9 สัดส่วนหน้าที่ของโปรตีนที่พบว่ามีปริมาณแตกต่างกันในรากข้าว LPT123-TC171 ภาวะปกติ และ เมื่อได้รับภาวะแล้ง

เมื่อพิจารณาชนิดของโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณเนื่องจากภาวะแล้งที่พบในรากข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ Student's t-test พบว่าเป็นโปรตีนเดียวกัน 8 ชนิด ในกลุ่ม G 1 ชนิด กลุ่ม I 1 ชนิด กลุ่ม O 6 ชนิด ดังภาพที่ 4.13 ตารางที่ 4.2



ภาพที่ 4.10 Venn diagram แสดงจำนวนชนิดของโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างกันเนื่องจากภาวะแล้งที่พบในรากข้าว LPT123 และ LPT123-TC171

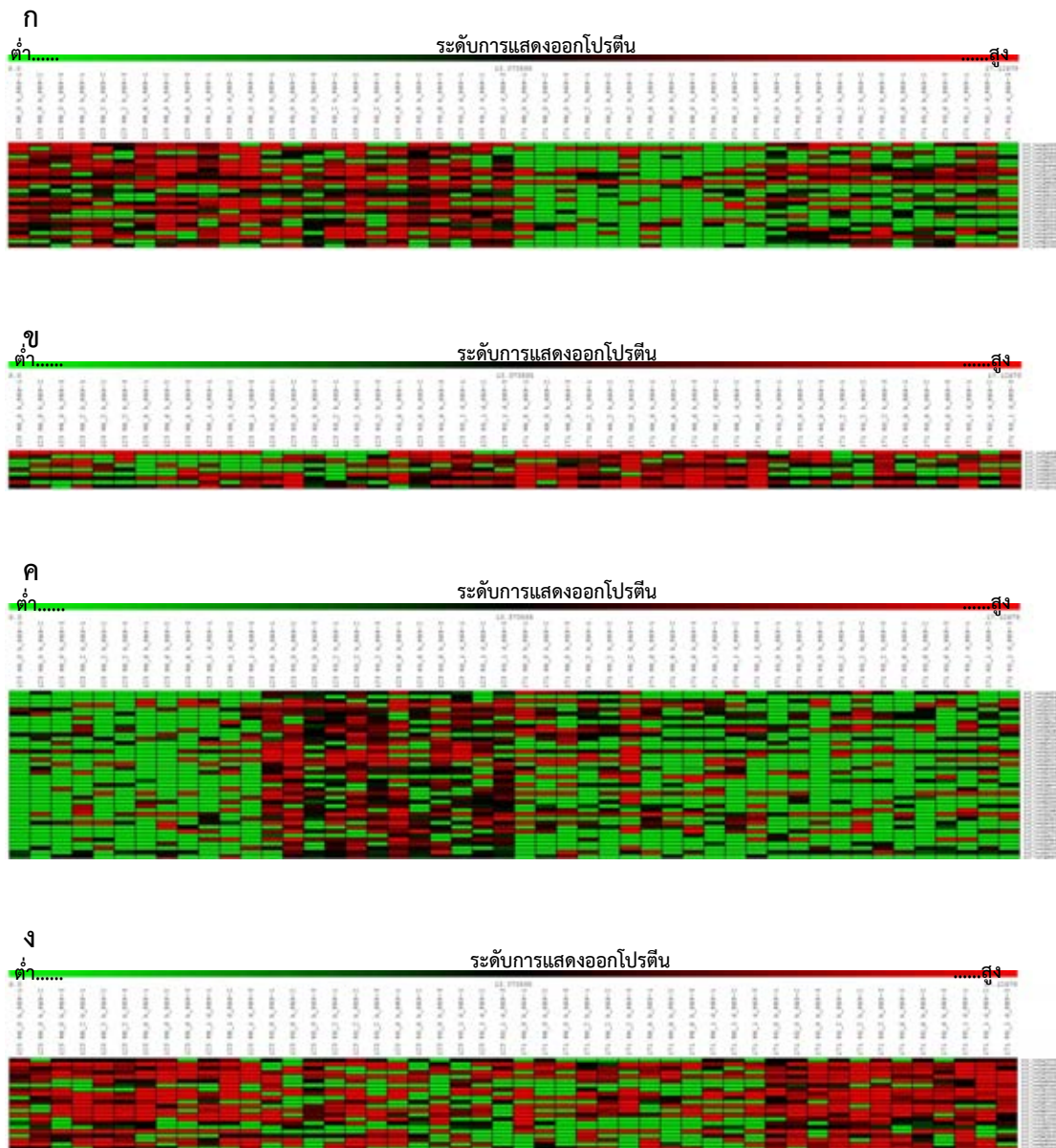
ตารางที่ 4.2 โปรตีนชนิดเดียวกันในข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 ภายใต้ภาวะแล้ง จำนวน 8 โปรตีนแต่มีการเปลี่ยนแปลงภายใต้ภาวะแล้งแตกต่างกัน

ตำแหน่งยีน	กลุ่ม	หน้าที่	LPT123RD	LPT123-TC171RD
LOC_Os11g16250	O	unknown	เพิ่มขึ้น	ลดลง
LOC_Os02g40770	O	cellular process	เพิ่มขึ้น	ลดลง
LOC_Os06g14190	O	nucleic acid metabolism	เพิ่มขึ้น	ลดลง
LOC_Os11g13990	G	cellular organization	เพิ่มขึ้น	ลดลง
LOC_Os01g43270	O	metabolic process	เพิ่มขึ้น	ลดลง
LOC_Os03g44170	I	metabolic process	เพิ่มขึ้น	ลดลง
LOC_Os07g37990	O	metabolic process	เพิ่มขึ้น	ลดลง
LOC_Os07g06840	O	metabolic process	ลดลง	เพิ่มขึ้น

จาก Venn diagram จะเห็นว่า มีโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณเนื่องจากภาวะแล้งรวมทั้งสิ้น 122 ชนิด ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนแต่ละชนิดที่เกิดขึ้นในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์เมื่อปลูกในภาวะปกติและภาวะแล้ง จะพบว่า มีโปรตีนที่มีปริมาณความ

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจำนวน 96 ชนิด ซึ่งสามารถวิเคราะห์กลุ่ม (cluster analysis) เป็น 4 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มที่มีปริมาณสูงในรากข้าว LPT123 ทั้งในภาวะปกติและภาวะแล้ง แต่มีปริมาณต่ำในข้าว LPT123-TC171 ในภาวะปกติ แต่เมื่อข้าว LPT123-TC171 ได้รับภาวะแล้งมีแนวโน้มที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งมีจำนวน 25 ชนิด (ภาพที่ 4.11 ก ภาคผนวก ข ตารางที่ ข5-ข8 cluster D1)
2. กลุ่มที่มีปริมาณสูงในรากข้าว LPT123-TC171 ในภาวะปกติ และมีปริมาณลดลงเมื่อได้รับภาวะแล้ง แต่รากข้าว LPT123 มีปริมาณต่ำกว่า LPT123-TC171 ในภาวะปกติ แต่มีปริมาณสูงขึ้นเมื่อได้รับภาวะแล้ง ซึ่งมีจำนวน 9 ชนิด (ภาพที่ 4.11 ข ภาคผนวก ข ตารางที่ ข5-ข8 cluster D2)
3. กลุ่มที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในรากข้าว LPT123 เมื่อได้รับภาวะแล้ง แต่มีการเปลี่ยนแปลงน้อยในข้าว LPT123-TC171 เมื่อได้รับภาวะแล้ง ซึ่งมีจำนวน 40 ชนิด (ภาพที่ 4.11 ค ภาคผนวก ข ตารางที่ ข5-ข8 cluster D3)
4. กลุ่มที่มีการชักนำให้มีปริมาณสูงเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในรากข้าว LPT123-TC171 เมื่อได้รับภาวะแล้ง แต่มีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากภาวะแล้งไม่ชัดเจนในข้าว LPT123 ซึ่งมีจำนวน 22 ชนิด (ภาพที่ 4.11 ง ภาคผนวก ข ตารางที่ ข5-ข8 cluster D4)



ภาพที่ 4.11 Heat map แสดงระดับปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันในข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 โดยกลุ่มที่กลุ่มที่มีปริมาณสูงในรากข้าว LPT123 ทั้งในภาวะปกติและภาวะแล้ง แต่มีปริมาณต่ำในข้าว LPT123-TC171 ในภาวะปกติ แต่เมื่อข้าว LPT123-TC171 ได้รับภาวะแล้งมีแนวโน้มที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งมีจำนวน 25 ชนิด (ก) กลุ่มที่มีปริมาณสูงในรากข้าว LPT123-TC171 ในภาวะปกติ และมีปริมาณลดลงเมื่อได้รับภาวะแล้ง แต่รากข้าว LPT123 มีปริมาณต่ำกว่า LPT123-TC171 ในภาวะปกติ แต่มีปริมาณสูงขึ้นเมื่อได้รับภาวะแล้ง ซึ่งมีจำนวน 9 ชนิด (ข) กลุ่มที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในรากข้าว LPT123 เมื่อได้รับภาวะแล้ง แต่มีการเปลี่ยนแปลงน้อยในข้าว LPT123-TC171 เมื่อได้รับภาวะแล้ง ซึ่งมีจำนวน 40 ชนิด (ค) กลุ่มที่มีการชักนำให้มีปริมาณสูงเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในรากข้าว LPT123-TC171 เมื่อได้รับภาวะแล้ง แต่มีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากภาวะแล้งไม่ชัดเจนในข้าว LPT123 ซึ่งมีจำนวน 22 ชนิด (ง)

2. การศึกษาการแสดงออกของยีนบางชนิดที่ตอบสนองต่อความแล้งในระดับ transcription

ในการศึกษาการแสดงออกในระดับ transcription ได้เลือกศึกษายีน LOC_Os06g14190 (Os06g0252300) ด้วยเหตุผลดังต่อไปนี้

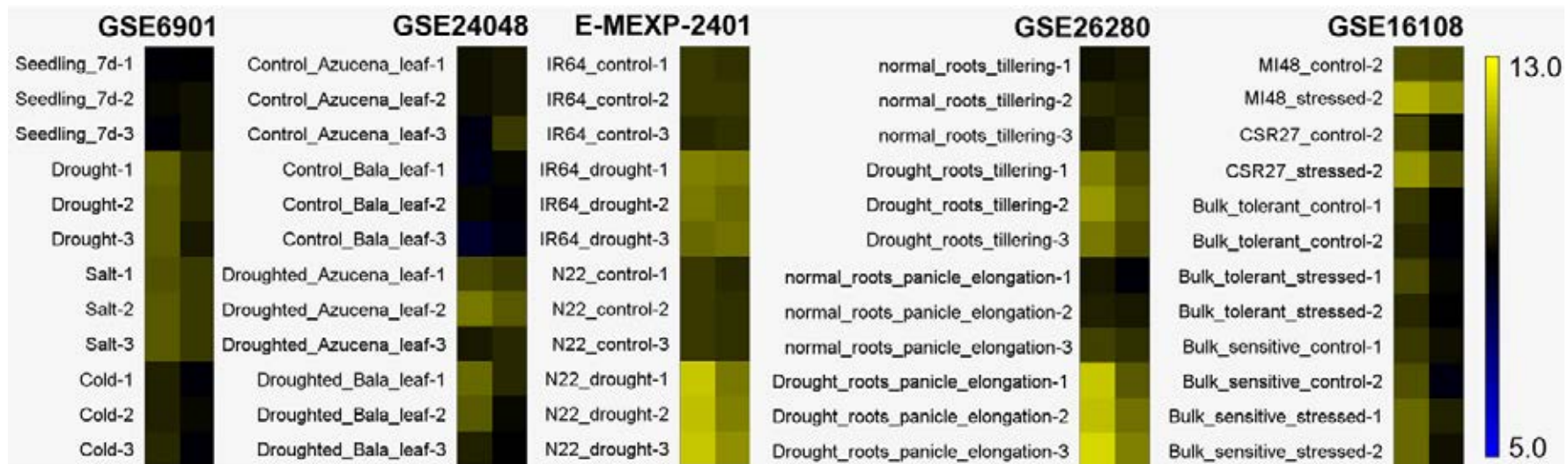
1. เป็นยีนที่พบการแสดงออกในระดับโปรตีนในข้าวทั้ง 2 พันธุ์/สายพันธุ์ที่ทำการศึกษา
2. ค่า MASCOT Score เท่ากับ 19.48 ซึ่งมีค่าสูงเป็นลำดับที่สองในในกลุ่มโปรตีนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในรากข้าว LPT123 เมื่อได้รับภาวะแล้ง แต่มีการเปลี่ยนแปลงน้อยในข้าว LPT123-TC171 เมื่อได้รับภาวะแล้ง (ภาพที่ 4.13)
3. มีความคล้ายคลึงกับ human transcription repressor NF-X1 ซึ่งมีการศึกษาแล้วในคน และ Arabidopsis คาดว่าในข้าวน่าจะมีบทบาทเป็น transcription repressor ที่ตอบสนองต่อภาวะแล้งและเค็ม ในการศึกษานี้ให้ชื่อยีนที่พบคล้ายกันในข้าวว่า *OsNFXL1*

2.1 *in silico* gene expression analysis

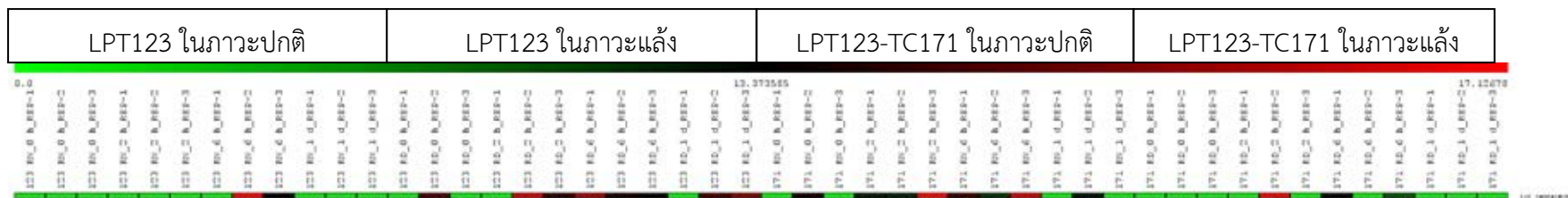
OsNFXL1 มีความถี่ของการแสดงออกมากที่สุดเนื้อเยื่อรากเท่ากับ 252 TPM (Unigene EST Profile) และยีนมีการแสดงออกสูงขึ้นในภาวะแล้ง ภาวะเค็ม ดังตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.12

ตารางที่ 4.3 ตรวจสอบการแสดงออกของ LOC_Os06g14190 ในภาวะแล้งและเค็ม

ชุดการทดลอง	ชื่อการทดลอง	ผลการศึกษา
GSE6901	Expression data for stress treatment in rice seedlings	ภาวะแล้ง แสดงออกสูงขึ้น (ภาคผนวก ค ตารางที่ ค-2)
GSE24048	Expression data from field droughted rice plants	ภาวะแล้ง แสดงออกสูงขึ้น (ภาคผนวก ค ตารางที่ ค-3)
E-MEXP-2401	Transcription profiling of <i>Oryza sativa</i> subtypes cultivar Nagina-22 (N22) and IR64 subtypes under normal and drought conditions	ภาวะแล้ง แสดงออกสูงขึ้น (ภาคผนวก ค ตารางที่ ค-4)
GSE26280	Genome-wide temporal-spatial gene expression profiling of drought responsiveness in rice	ภาวะแล้ง แสดงออกสูงขึ้น (ภาคผนวก ค ตารางที่ ค-5)
GSE16108	Transcription profiling of parental lines and bulked salt sensitive and salt tolerant RILs derived from 2 rice varieties	ภาวะเค็ม แสดงออกสูงขึ้น (ภาคผนวก ค ตารางที่ ค-6)



ภาพที่ 4.12 Heat map แสดงการแสดงออกของ *OsNFXL1* (LOC_Os06g14190) ในชุดการทดลองภาวะแล้ง (GSE6901, GSE24048, E-MEXP-2401, GSE26280) และในชุดการทดลองภาวะเค็ม GSE16108 ในข้าวพันธุ์ทนเค็ม (CSR27) และ ข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็ม (MI48) จาก ROAD (<http://www.ricearray.org>)



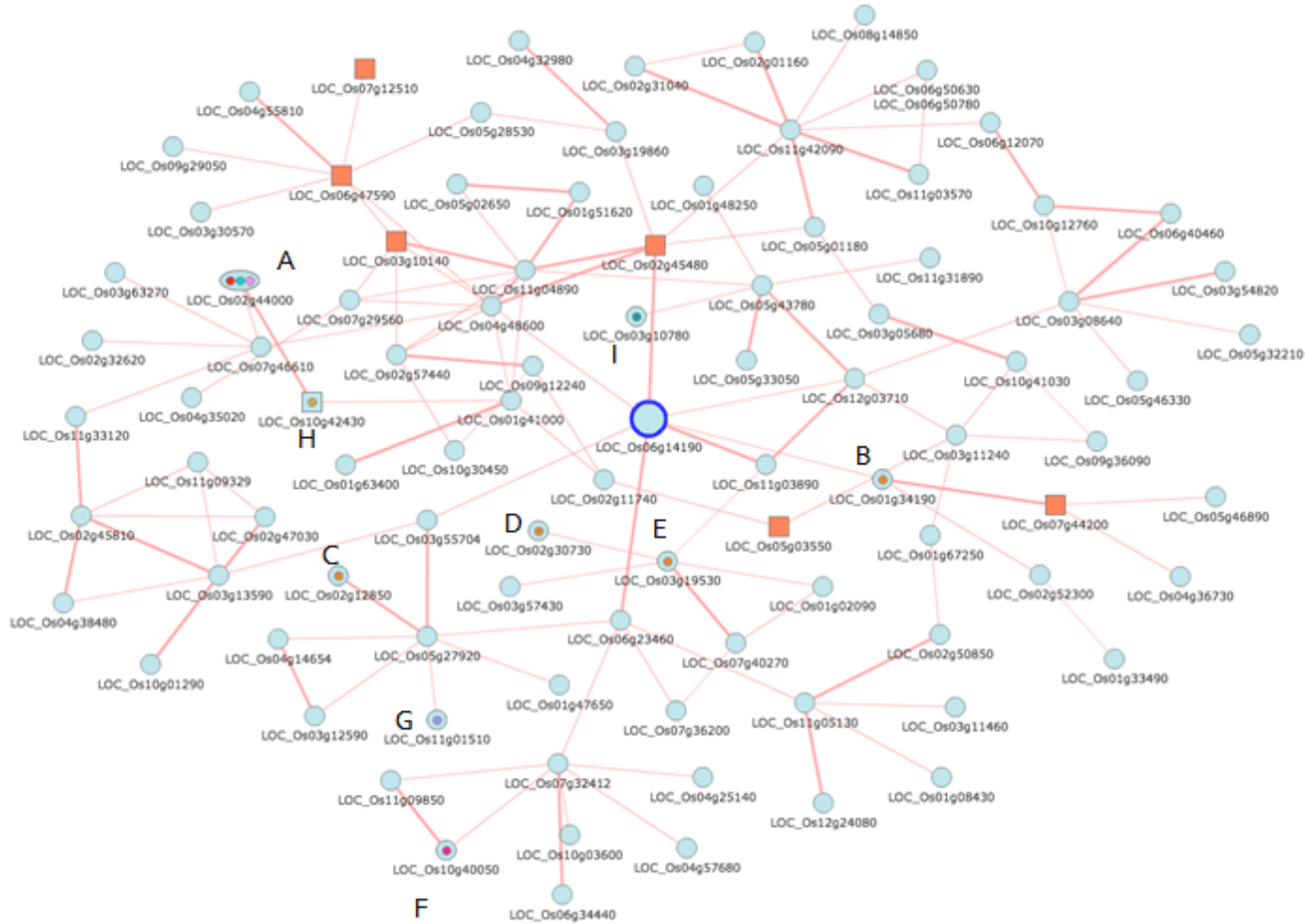
ภาพที่ 4.13 ปริมาณโปรตีนของ LOC_Os06g14190 NF-X1-type zinc finger protein, putative, expressed ในรากข้าว LPT123 ภาวะแล้งมีการแสดงออกแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.2 *in silico* characterization of *OsNFXL1* promoter region

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่เป็น putative promoter ของ LOC_Os06g14190 มาวิเคราะห์หา cis-element ด้วย RiceSRTFDB พบว่ามีหลายตำแหน่งที่เป็น cis-element ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะแล้ง (ภาคผนวก ค ภาพที่ ค-5, ตารางที่ ค-1)

2.3 *in silico* gene co-expression analysis

LOC_Os06g14190 (Os06g0252300) จากฐานข้อมูล Rice Functionally Related gene Expression Network Database (<http://ricefrend.dna.affrc.go.jp>) พบว่ามีเครือข่ายที่อยู่ภายใต้การแสดงออกเท่ากับ 94 Nodes และ 128 Edges โดยพบว่าการแสดงออกของ *OsNFXL1* นี้ เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ transcription factor อื่นอีก 6 ชนิด (ภาพที่ 4.14) และมีความเชื่อมโยงกับ pathway อื่น ๆ อีก 8 pathway อีกด้วย ดังตารางที่ 4.4



คำอธิบาย สัญลักษณ์

- *OsNFXL1*
- Transcription Factor
- Node (gene)
- Edge

ตัวอักษร A-I แทนสีใน
Node ที่มีอยู่ใน
KEGG Pathway

osa01100 = A
 osa01110 = A
 osa00330 = A
 osa03040 = B, C, D, E
 osa03018 = F
 osa04120 = G
 osa04626 = H
 osa03420 = I

ภาพที่ 4.14 แสดงเครือข่ายที่อยู่ภายใต้การแสดงออกของ LOC_Os06g14190 จากฐานข้อมูล RiceFRIEND (<http://ricefrend.dna.affrc.go.jp>)

ตารางที่ 4.4 แสดงเครือข่ายของ LOC_Os06g14190 และ หน้าที่ที่พบใน Pathway ที่ทำนายโดย KEGG

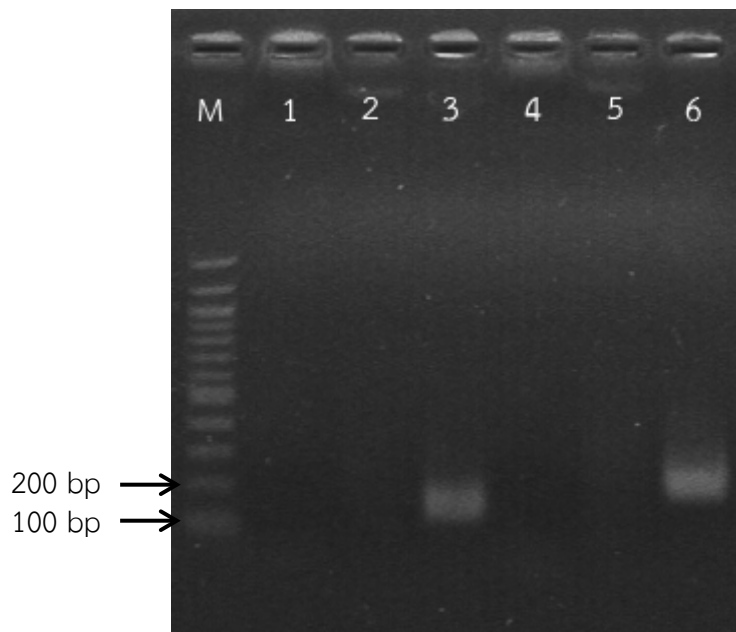
KEGG Pathway	Function	Locus	Remark
osa01100	Metabolic pathways	LOC_Os02g44000	A
osa01110	Biosynthesis of secondary metabolites	LOC_Os02g44000	A
osa00330	Arginine and proline metabolism	LOC_Os02g44000	A
osa03040	Spliceosome	LOC_Os01g34190	B
		LOC_Os02g12850	C
		LOC_Os02g30730	D
		LOC_Os03g19530	E
osa03018	RNA degradation	LOC_Os10g40050	F
osa04120	Ubiquitin mediated proteolysis	LOC_Os11g01510	G
osa04626	Plant-pathogen interaction	LOC_Os10g42430	H
osa03420	Nucleotide excision repair	LOC_Os03g10780	I

2.4 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ Os06g0252300 (gi|115467397) (ภาคผนวก ค ภาพที่ ค-3) จึงออกแบบ primer เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนดังกล่าว และใช้ primer สำหรับการตรวจวัดปริมาณการแสดงออกของ *EF1 α* ซึ่งใช้เป็น internal control ดังนี้

Primer Name	Primer Sequence 5'—3'	Product size (bp)	Annealing temp (°C)
<i>OsNFXL1</i> -F	5'-AAGTCATGGGGACATCGAAC-3'	177	54
<i>OsNFXL1</i> -R	5'-CTTCCCAATCATCCACTTCG-3'		
<i>Cis_OsNFXL1</i> -F	5'-ACACACGAAACAATCCAACG-3'	179	54
<i>Cis_OsNFXL1</i> -R	5'-TCACCACGTGTGTGTATTGG-3'		
<i>EF1α</i> -F	5'-ATGGTTGTGGAGACCTTC-3'	127	54
<i>EF1α</i> -R	5'-TCACCTTGGCACCGGTTG-3'		
Internal Control	(Chinpongpanich et al., 2012)		

เมื่อทำการตรวจเบื้องต้นสามารถใช้ primer ดังกล่าวในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA จาก cDNA ดังภาพที่ 4.15



ภาพที่ 4.15 ขนาดของแถบ DNA ที่ได้จากการตรวจสอบเบื้องต้นว่ายีนเป้าหมายมีการแสดงออก

M = 100 bp DNA ladder (Geneaid, Taiwan)

1 = Negative Control (primer *EF1 α* +H₂O)

2 = Negative no-RT-Control (primer *EF1 α* +Sample without MMLV)

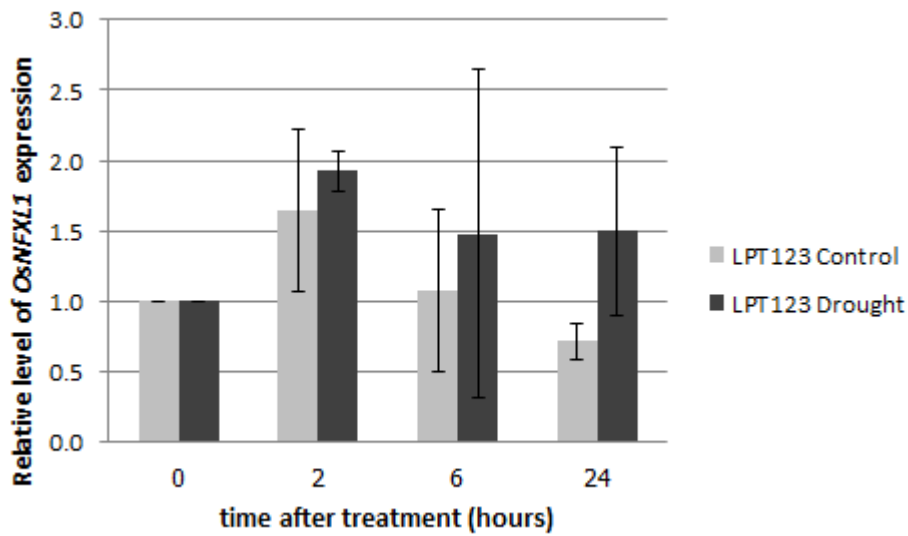
3 = internal Control (primer *EF1 α* +Sample cDNA)

4 = Negative Control (primer *OsNFXL1*+H₂O)

5 = Negative no-RT-Control (primer *OsNFXL1*+Sample without MMLV)

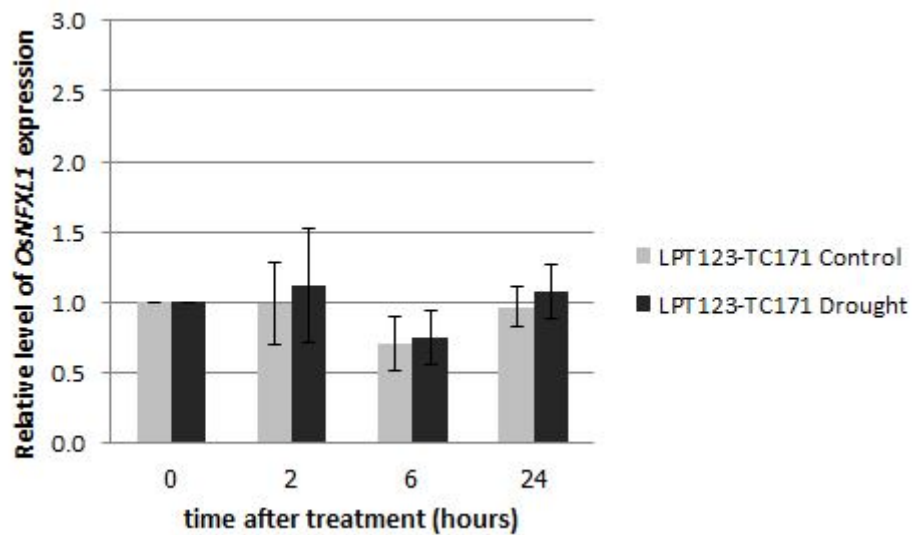
6 = *OsNFXL1* (primer *OsNFXL1*+Sample cDNA)

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *OsNFXL1* (LOC_Os06g14190) ในรากข้าวสายพันธุ์ LPT123 ภายใต้ภาวะปกติและภาวะแล้ง โดยวัดระดับการแสดงออกตั้งแต่ 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง พบว่า ในสายพันธุ์ LPT123 หลังจากได้รับภาวะแล้งมีแนวโน้มการแสดงออกที่สูงขึ้น (ภาพที่ 4.16) อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของข้าว LPT123 ในทั้งสองภาวะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาคผนวก ค ตารางที่ ค-8)



ภาพที่ 4.16 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNFXL1* ในข้าว LPT123 ภาวะปกติ และ ภาวะแล้งที่ระยะเวลา 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *OsNFXL1* ในรากข้าวสายพันธุ์ LPT123-TC171 ภายใต้ภาวะปกติและภาวะแล้ง โดยวัดระดับการแสดงออกตั้งแต่ 0 2 6 และ 24 ชั่วโมงพบว่าการแสดงออกของยีนในสายพันธุ์ LPT123-TC171 ในทั้งสองภาวะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.17) (ภาคผนวก ค ตารางที่ ค-9)



ภาพที่ 4.17 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNFXL1* ในข้าว LPT123-TC171 ภาวะปกติและภาวะแล้งที่ระยะเวลา 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

1. การศึกษาเปรียบเทียบแบบรูปโปรตีนทั้งหมดในรากข้าว

เมื่อเริ่มการทดลอง (ชั่วโมงที่ 0) จะเห็นว่าแบบรูปโปรตีนที่พบในรากข้าวที่ซ้อนทับกันมีจำนวนมาก มี 314 ชนิดจาก 344 โปรตีนคิดเป็น 91% แสดงว่าข้าวทั้งสองพันธุ์ในภาวะปกติมีความคล้ายคลึงกันสูง โปรตีนส่วนที่แตกต่างคือ A B E F M N มีเพียง 30 ชนิด

การเปรียบเทียบเชิงปริมาณของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่พบในรากข้าว LPT123 และรากข้าว LPT123-TC171 เมื่อเริ่มการทดลองทำให้สามารถระบุชนิดของโปรตีนที่ข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์มีความแตกต่างกันโดยไม่เกี่ยวข้องกับภาวะแล้ง ซึ่งพบว่ามีโปรตีนจำนวน 7 ชนิดที่มีปริมาณแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาคผนวก ข ตารางที่ ข-1 กลุ่ม E และ F) แต่มีโปรตีนที่มีการแสดงออกเฉพาะใน LPT123-TC171 จำนวน 1 ชนิด คือ

- LOC_Os06g47890 OsFBO9 มีความคล้ายคลึงกับ โปรตีน ADAGIO ทำหน้าที่ควบคุม circadian clock ใน Arabidopsis การแสดงออกของยีนนี้มีบทบาทต่อการเปิดและปิดยีนที่ขึ้นอยู่กับช่วงแสงของวัน (Johansson et al., 2011)

เมื่อได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า รากข้าว LPT123 มีการผลิตโปรตีนชนิดใหม่ 5 ชนิดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ภาคผนวก ข ตารางที่ ข-2 กลุ่ม B) โดยเป็นโปรตีนที่มีการอนุมานหน้าที่แล้ว 3 ชนิด คือ

- LOC_Os04g29210 FAD-binding and arabino-lactone oxidase เป็นเอนไซม์ (EC Number: 1.3.2.3) ที่อยู่ในกระบวนการสังเคราะห์ L-ascorbic acid ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Gallie, 2013) การเกิดการสร้างโปรตีนชนิดนี้แสดงให้เห็นว่าเกิด oxidative stress ขึ้นในรากพืช จึงกระตุ้นกระบวนการสร้าง L-ascorbic acid เพื่อทำหน้าที่ในการช่วยกำจัดอนุมูลอิสระต่อไป
- LOC_Os05g49460 CTP synthase ทำหน้าที่ใน nucleic acid metabolism เป็นเอนไซม์ (EC 6.3.4.2) ที่สังเคราะห์ pyrimidine ribonucleotide

- LOC_Os08g31450 MBTB28 ทำหน้าที่ substrate-binding adaptors จับโปรตีน เป้าหมายแล้วชักนำให้เกิด ubiquitin/proteasome ใน Arabidopsis พบว่าโปรตีนดังกล่าวจะไปจับ Transcription factor ATHB6 ซึ่งเป็น Negative regulator ของฮอร์โมน ABA (Lechner et al., 2011)

เมื่อได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่ารากข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 มีการผลิตโปรตีนชนิดใหม่ 3 ชนิดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ภาคผนวก ข ตารางที่ ข-3 กลุ่ม C) โดยเป็นโปรตีนที่มีการอนุมานหน้าที่แล้ว 2 ชนิด คือ

- LOC_Os02g05692 zinc finger, C3HC4 type domain containing protein, expressed โปรตีนตัวนี้อยู่ใน RING/U-box superfamily protein มีส่วนโดเมนที่ถูกจดจำโดยเอนไซม์ E3 ubiquitin-protein ligase (Kraft et al., 2005) การศึกษา AdZFP1 ใน *Artemisia desertorum* พบว่าเมื่อเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวทำให้ต้านทานต่อภาวะแล้งได้ดีขึ้น (Yang et al., 2008) LPT123-TC171 มีปริมาณโปรตีนสูงกว่า LPT123 อย่างมีนัยสำคัญ
- LOC_Os10g41390 protein kinase domain containing protein, expressed ทำหน้าที่ protein modification process เป็นเอนไซม์ (EC 2.7.11.1) ที่มีความคล้ายคลึงกับ cell division control protein 7 (CDC7) ควบคุมการแบ่งเซลล์ (Kim et al., 2003) LPT123 มีปริมาณโปรตีนสูงกว่า LPT123-TC171 อย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า รากข้าว LPT123 มีการลดลงของโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ จำนวน 5 ชนิด (ภาคผนวก ข ตารางที่ ข-3 กลุ่ม J) โดยเป็นโปรตีนที่มีการอนุมานหน้าที่แล้ว 3 ชนิด คือ

- LOC_Os01g33520 ulp1 protease family, C-terminal catalytic domain containing protein, expressed ทำหน้าที่ใน post translational modification ใน SUMO Pathway โดยมีบทบาทต่อการควบคุมวัฏจักรเซลล์ในยีสต์ โดยพบว่าถ้าโปรตีนไม่ทำงานจะหยุดการเจริญเติบโตของเซลล์ (Mossessova and Lima, 2000)
- LOC_Os01g06454 heat shock protein DnaJ, putative, expressed ทำหน้าที่เป็น co-chaperone ไปกระตุ้น ATP hydrolysis ซึ่งจำเป็นสำหรับ DnaK (Hsp70) (Qiu et al., 2006) ใน LPT123 ภาวะแล้งโปรตีน DnaJ หายไปจึงส่งผลต่อการกระตุ้นการทำงานของ Heat shock protein 70 ในการทำหน้าที่ปกป้องโปรตีนเสื่อมสลายเนื่องจากภาวะเครียด

- LOC_Os01g57962 photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2, putative, expressed ทำหน้าที่ในกระบวนการสร้างพลังงาน photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2 ให้โปรตีนที่เป็นหน่วยย่อย PsaB ในระบบ Photosystem I (Ozakca , 2013) การที่โปรตีน PsaB Dn-regulated ลงจึงส่งผลกระทบต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงใน LPT123 ภายใต้ภาวะแล้ง

เมื่อได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า รากข้าว LPT123-TC171 มีการลดลงของโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ จำนวน 7 ชนิด (ภาคผนวก ข ตารางที่ ข-3 กลุ่ม I 6 ชนิด และกลุ่ม O 1 ชนิด) โดยเป็นโปรตีนที่มีการอนุมานหน้าที่แล้ว 3 ชนิด คือ

- LOC_Os12g12190 polypyrimidine tract-binding protein 3 (PTB3) หน้าที่ใน post-transcriptional regulation มีบทบาทในการจับ RNA แล้วกระตุ้นให้เกิด splicing การลดลงส่งผลกระทบต่อแสดงออกของยีน (Valcarcel and Gebauer, 1997)
- LOC_Os11g45250 ribonucleases P/MRP protein subunit POP1 containing protein, expressed ทำหน้าที่ใน pre-rRNA processing pathway การลดลงของโปรตีนส่งผลกระทบต่อกระบวนการสร้าง 5.8S rRNA และส่งผลกระทบต่อสร้างเอนไซม์บางชนิดในยีสต์ (Lygerou et al., 1994)
- LOC_Os05g04620 diacylglycerol acyltransferase 3 เป็นเอนไซม์เปลี่ยน diacylglycerol (DG) ไปเป็น triacylglycerol (TG) ซึ่ง TG ถูกพบว่าจะสะสมภายใต้ภาวะเครียดหรือการแก่ (senescence) (Liu et al., 2012)

เมื่อได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ารากข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 มีการผลิตโปรตีนชนิดใหม่ 2 ชนิดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ภาคผนวก ข ตารางที่ ข-4 กลุ่ม C) โดยเป็นโปรตีนที่มีการอนุมานหน้าที่แล้ว 2 ชนิด คือ

- LOC_Os11g37330 pentatricopeptide repeat domain containing protein, putative, expressed มีบทบาทใน post-transcriptional regulation ของ mitochondrial RNA ใน MVA และ MEP pathways ในการสังเคราะห์ Isoprenoid (Kobayashi et al., 2007)
- LOC_Os08g09350 gar2, putative, expressed ให้โปรตีนที่มีความคล้าย nucleolin มีบทบาทใน rRNA processing สังเคราะห์ ribosome และสร้างท่อลำเลียง ใน Arabidopsis พบว่าต้นที่มีความผิดปกติของยีนนี้จะมีรูปแบบของท่อลำเลียงที่ผิดปกติไป มีความยาวรากสั้นลง (Petricka and Nelson, 2007)

เมื่อได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า รากข้าว LPT123 มีการลดลงของโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ จำนวน 5 ชนิด (ภาคผนวก ข ตารางที่ ข-4 กลุ่ม J) โดยเป็นโปรตีนที่มีการอนุมานหน้าที่แล้ว 2 ชนิด คือ

- LOC_Os06g15990 aldehyde dehydrogenase, putative, expressed (ALDH ; EC 1.2.1.3) มีหน้าที่ใน metabolic process รักษาระดับความเข้มข้นอัลดีไฮด์ในระดับที่ไม่เป็นพิษโดยเปลี่ยนให้เป็นกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acids) ในภาวะปกติอัลดีไฮด์เป็นโมเลกุลอยู่ระหว่างกลาง pathway ของการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต วิตามิน สเตอรอยด์ กรดอะมิโน และไขมัน (Kirch et al., 2004) การจัด Phylogenetic analysis ของ ALDH ในข้าว พบว่า กลุ่มที่ 12 18 มีบทบาทในการผลิตเอนไซม์ Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate (P5C) metabolism ในการปรับตัวต่อภาวะเครียดทางกายภาพ (Kotchoni et al., 2010)
- LOC_Os05g50690 pentatricopeptide, putative, expressed เกี่ยวข้องกับ nucleic acid metabolic process คาดว่ามีบทบาทไปจับ transcript ในไมโทคอนเดรีย และ คลอโรพลาสต์ (Lurin et al., 2004)

ภาวะแล้งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในรากข้าว LPT123 มากกว่าใน LPT123-TC171 โปรตีนในรากข้าวที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากภาวะแล้งส่วนใหญ่ยังไม่ทราบหน้าที่ ใน LPT123 มีจำนวน 34% (10 expressed protein 1 hypothetical protein และ 12 โปรตีนที่ annotate แล้วแต่ไม่สามารถหาหน้าที่ได้) และ LPT123-TC171 มีจำนวน 35% (15 expressed protein และ 7 โปรตีนที่ annotate แล้วแต่ไม่สามารถหาหน้าที่ได้)

เมื่อทำการจัดกลุ่มโปรตีนที่ถูกชักนำให้มีการเปลี่ยนแปลงด้วยภาวะแล้งตามหน้าที่ของโปรตีนเหล่านั้น จะเห็นว่าข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีกลุ่มโปรตีนจำแนกตามหน้าที่ได้คล้ายคลึงกัน ยกเว้น LOC_Os06g09050 glutamate receptor precursor ที่พบเฉพาะในข้าว LPT123-TC171 ที่ถูกจัดเป็นโปรตีนในกลุ่ม transport ซึ่งกลุ่มโปรตีนที่มีหน้าที่นี้ไม่พบในกลุ่มโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงเชิงปริมาณด้วยภาวะแล้งในรากข้าว LPT123 นอกจากนี้ ยังพบว่ากลุ่ม protein modification process ที่พบเฉพาะใน LPT123 ได้แก่ LOC_Os10g41390 protein kinase domain containing protein LOC_Os02g41480 OsWAK12 LOC_Os07g35004 TKL_IRAK_DUF26-la.4 LOC_Os10g37830 OsFBX391 LOC_Os03g62340 protein kinase family protein

โปรตีนที่พบว่าการเปลี่ยนแปลงในข้าวทั้ง 2 พันธุ์/สายพันธุ์ มี 8 ชนิด ได้แก่

- LOC_Os07g06840 gibberellin receptor GID1L2, putative, expressed เป็น receptor ของฮอร์โมน Gibberellin (GA) มีบทบาทในการควบคุมการเจริญเติบโต และตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม เช่น การงอกของเมล็ด การยืดยาวของลำต้น การขยายขนาดของใบ การพัฒนาละอองเกสร และกระตุ้นการออกดอก โดยพบว่าเมื่อ GID1L2 มีการแสดงออกมากขึ้นจะมีผลทำให้ลดการแสดงออกของ DELLA Proteins ซึ่งทำหน้าที่เป็น Negative control ของสัญญาณฮอร์โมน GA ทำให้มีการสะสม GA มากขึ้น (Ueguchi-Tanaka et al., 2007; Ariizumi et al., 2013) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากข้อมูลจะเห็นว่าโปรตีนชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มที่มีการแสดงออกสูงกว่าใน LPT123 เมื่อเปรียบเทียบกับ LPT123-TC171 เมื่อ GID1L2 สูงขึ้น จะมีผลต่อการสะสม GA ดังนั้นจึงอาจอนุมานได้ว่า LPT123 เมื่อได้รับภาวะแล้งอาจมีการสะสม GA สูงกว่า LPT123-TC171 จากการศึกษาของ Gou et al. (2010) พบว่า การมี GA ในรากต่ำจะส่งเสริมการสร้าง lateral root ซึ่ง พงศธร กล่อมสกุล (2547) ได้รายงานไว้ว่า เมื่อ LPT123-TC171 ได้รับภาวะแล้งจะมีการสร้าง lateral root ได้มากกว่า LPT123 ที่เจริญในภาวะเดียวกัน
- LOC_Os01g43270 hydroquinone glucosyltransferase, putative, expressed เป็น เอนไซม์ (EC 2.4.1.218) ที่สร้าง Uridine diphosphate (UDP) และ hydroquinone-O-beta-D-glucopyranoside (arbutin) กระบวนการสร้าง arbutin ป้องกัน thylakoid membranes เสื่อมสลายในภาวะเครียดจากภาวะแล้งและเยือกแข็งโดยมีคุณสมบัติเป็น antioxidative สำหรับ lipid membrane และยับยั้งเอนไซม์ phospholipase A2 ที่ทำหน้าที่ dehydrated liposomes (Hinch et al., 1999)
- LOC_Os03g44170 glutathione S-transferase, putative, expressed (GST) เป็น เอนไซม์ (E.C. 2.5.1.18) ที่เชื่อม tripeptide glutathione (GSH) ไปยัง electrophilic compounds ในภาวะปกติจะทำปฏิกิริยากับ secondary metabolites เช่น anthocyanins และ cinnamic acid และ ถูกกระตุ้นได้ด้วยฮอร์โมนพืช เช่น salicylic acid, ethylene, cytokinin, auxin, abscisic acid นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการกำจัด oxidative stress เมื่อได้รับภาวะเครียด (Marrs, 1996) การเพิ่มระดับการแสดงออกของ GST โดยการถ่ายยีน GsGST จาก *Glycine soja* ไปยังต้นยาสูบ พบว่าสามารถต้านทานต่อภาวะแล้งและภาวะเค็มได้ดีขึ้น (Ji et al., 2010)
- LOC_Os07g37990 glycosyltransferase sugar-binding region containing DXD motif, putative, expressed เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เติมหมู่ น้ำตาล โดยทำการย้ายจากโมเลกุลผู้ให้ไปยังโมเลกุลผู้รับอย่างเจาะจง เช่น น้ำตาล ไขมัน โปรตีน กรดนิวคลีอิก การเติม

หมุ่น้ำตาลจะทำให้คุณสมบัติทางชีวภาพของโมเลกุลเปลี่ยนไป การศึกษาในต้นยาสูบโดยเพิ่มระดับการแสดงออก Arabidopsis glycosyltransferase gene UGT85A5 ทำให้สามารถต้านทานต่อภาวะเค็มได้ดีขึ้นโดยมีการสะสมของ soluble sugars ที่มากกว่าต้นควบคุม (Sun et al., 2013)

- LOC_Os02g40770 SET domain containing protein, expressed เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ cellular process มีหน้าที่ในการเติมหมู่เมทิล (methyl group) ไปยังกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ของโปรตีนฮิสโตน (histone) H3 และ H4 เป็นการควบคุมในระดับ epigenetic ส่งผลให้ Transcription factor เข้าไปจับตำแหน่ง DNA บริเวณนั้นไม่ได้ ทำให้ยีนไม่มีการแสดงออก (Ng et al., 2007)
- LOC_Os11g13990 AAA-type ATPase family protein, putative, expressed โปรตีนที่ทำหน้าที่ cellular component organization มีส่วนโดเมนเหมือนกับ ATPase โปรตีนนี้ทำหน้าที่คล้ายเกลียว DNA ควบคุม DNA-protein complexes ทำให้ protein complexes หลุดออกจากกัน มีบทบาทใน DNA replication protein degradation และ membrane fusion ในการส่งออกโปรตีน (Ogura and Wilkinson, 2001) การศึกษาโปรตีน AAA-type โดยการเพิ่มระดับการแสดงออกของ *ZmSKD1* ยีนจากข้าวโพดโดยศึกษาในต้นยาสูบ พบว่าทำให้สามารถต้านทานต่อภาวะเค็มและภาวะแล้งได้ดีขึ้น และมีการสะสมของ reactive oxygen species น้อยกว่าต้นควบคุม (Xia et al., 2013)
- LOC_Os06g14190 NF-X1-type zinc finger protein, putative, expressed หรือในการศึกษานี้เรียกว่า *OsNFXL1* ทำหน้าที่ nucleic acid metabolic process
- LOC_Os11g16250 expressed protein เป็นโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของโปรตีนที่ศึกษาในรากข้าวในการศึกษานี้กับการศึกษาโปรตีนอิมิกส์ไนโบโดย Maksup et al (2012) พบว่าในสายพันธุ์ไม่ทนแล้ง IR20 และ LPT123 มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีนภายใต้ภาวะแล้ง คือ WD-40 repeat protein LOC_Os01g74146 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ (Yee and Goring, 2009) นอกจากนี้ยังพบว่าในสายพันธุ์ทนแล้ง NSG19 และ LPT123-TC171 มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน tetratricopeptide repeat (TPR) LOC_Os02g03470 ทำหน้าที่ซ่อมแซมเซลล์และดีเอ็นเอ (D'Andrea and Regan, 2003)

2. การศึกษาการแสดงออกของยีนบางชนิดที่ตอบสนองต่อความแล้งในระดับ transcription

2.1 *in silico* gene expression analysis

ข้อมูล Unigene EST Profile ทำให้ทราบว่ายีน *OsNFXL1* มีการแสดงออกบริเวณเนื้อเยื่อ ราก 252 TPM แคลลัส 129 TPM ช่อดอก 51 TPM ลำต้น 32 TPM ใบ 22 TPM ดอก 7 TPM โปรตีนดังกล่าวน่าจะมีบทบาทสำคัญในรากเนื่องจากการแสดงออกของยีนมากที่สุดในฐานข้อมูล

ข้อมูล Rice Oligonucleotide Array Database ชุดการทดลอง GSE6901 (Jain et al., 2007) ทำให้ทราบว่ายีน *OsNFXL1* มีการตอบสนองต่อภาวะเค็มและแล้งโดยมีการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้นจากภาวะปกติ แต่ไม่ตอบสนองต่อภาวะเย็น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาใน *Arabidopsis* พบว่ามีการแสดงออกสูงขึ้นเมื่อได้รับภาวะเค็มและแล้ง (Lisso et al., 2006) ชุดการทดลอง GSE24048 ในข้าวสองพันธุ์ คือ cv. Azucena ที่มีกลไก drought avoidance จากโครงสร้างราก และ cv. Bala ที่มีกลไก drought avoidance ที่ยังไม่ทราบ (Cairns et al., 2004) พบว่า *OsNFXL1* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ภายใต้ภาวะแล้งแตกต่างจากภาวะปกติสอดคล้องกับการศึกษาในข้าวสองสายพันธุ์ คือ IR64 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไวต่อภาวะแล้งปานกลาง กับ Nagina22 พันธุ์ต้านทานต่อภาวะแล้งในชุดการทดลอง E-MEXP-2401 (Lenka et al., 2011) ภาวะแล้ง *OsNFXL1* มีการแสดงออกสูงขึ้นต่างจากภาวะปกติ และในสายพันธุ์ Nagina22 สูงกว่า IR64 ชุดการทดลองที่กล่าวมาเป็นตัวอย่างที่ได้จากใบข้าว ในขณะที่ชุดทดลอง GSE26280 ทำการศึกษาภาวะแล้งทั้งใบและราก และแยกตามระยะการเจริญเติบโต (Wang et al., 2011) ซึ่งพบว่า *OsNFXL1* แสดงออกมากที่สุดในรากที่ระยะตั้งท้อง (Panicle-elongation) นอกจากการทดลองในภาวะแล้งในชุดทดลองภาวะเค็ม GSE16108 (Pandit et al., 2010) ในข้าวพันธุ์ทนเค็ม (CSR27 Bulk- tolerant RILs) และข้าวไม่ทนเค็ม (MI48 Bulk- sensitive RILs) พบว่า *OSNFXL1* ภาวะเค็มมีการแสดงออกสูงขึ้นจากภาวะปกติ แต่ในสายพันธุ์ไม่ทนเค็มมีระดับการแสดงออกที่สูงกว่า

2.2 *in silico* characterization of *OsNFXL1* promoter region

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ *OsNFXL1* promoter โดยใช้ RiceSRTFDB (Priya and Jain, 2013) พบว่ามีส่วนจดจำที่สามารถถูกกระตุ้นด้วย Transcription Factor ที่เกี่ยวข้องกับภาวะเครียดทางกายภาพ โดยเฉพาะภาวะแล้งสามารถถูกกระตุ้นด้วย TF ได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังตอบสนองต่อภาวะเครียดทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ก่อโรค (Pathogen) ได้ด้วย ดังตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ส่วนจดจำบน *OsNFXL1* promoter

ลำดับ	ส่วนจดจำ	ชนิดภาวะเครียด	อ้างอิง
CANNTG	MYCCONSENSUSAT	abiotic stress	Chinnusamy et al. (2003)
TGACG	ASF1MOTIFCAMV	abiotic and biotic stress xenobiotic stress	Despres et al. (2003)
TTGACC	ELRECOREPCR1	oxidative stress	Rushton et al. (1996)
TTGAC	WBOXATNPR1	pathogen-induced stress response	Yu et al. (2001)
GAAAAA	GT1GMSCAM4	pathogen-induced stress salinity stress	Park et al. (2004)
ACGT	ACGTATERD1	drought stress	Simpson et al. (2003)
CNGTTR	MYBCORE	drought stress	Luscher and Eisenman (1990)
RCCGAC	DRECRTCOREAT	drought stress salinity stress cold stress heat stress	Dubouzet et al. (2003)
YAACKG	MYB2CONSENSUSAT	stress responsive	Abe et al. (2003)
RYACGTGGYR	ABREATRD22	drought stress	Iwasaki et al. (1995)
ACGTG	ABRELATERD1	drought stress	Simpson et al. (2003)
ACGTSSSC	ABREOSRAB21	osmotic stress	Marcotte et al. (1989)

2.3 *in silico* gene co-expression analysis

ผลจากการศึกษา *OsNFXL1* จะไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ Arginine and proline metabolism, Spliceosome, RNA degradation, Ubiquitin mediated proteolysis, Plant-pathogen interaction, Nucleotide excision repair ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ *OsNFXL1* ซึ่งเป็น Transcription Factor จะมีบทบาทอย่างมากในการผลิต functional protein ในการปรับตัวต่อภาวะแล้ง ดังเช่น การสะสมโพรลีน (proline) มีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันแรงดันออสโมติก เป็นวิธีการหนึ่งที่พืชใช้ตอบสนองต่อภาวะเครียด จากภาวะแล้ง ภาวะเค็ม Oxidative stress (Szabados and Savoure, 2010) อย่างไรก็ตามการสะสมโพรลีนอาจไม่มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการทนเค็มและแล้ง เช่น การศึกษาปริมาณโพรลีนในใบข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 อายุ 22 วันภายใต้ภาวะเค็มจาก NaCl 0.5% (w/v) พบว่า LPT123 มีปริมาณโพรลีนสูงกว่าสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) อย่างมีนัยสำคัญ (ศุภจิตรา ชัชวาลย์, 2550)

2.4 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

ผลจากการศึกษาโดยเครื่องมือทาง bioinformatics ชี้ให้เห็นว่ายีน *OsNFXL1* เป็นยีนที่ตอบสนองต่อภาวะแล้ง และมีการแสดงออกในบริเวณรากเมื่อได้รับภาวะแล้งในระยะแตกกอ

ในการศึกษานี้จึงทำการวัดระดับการแสดงออกของ ยีน *OsNFXL1* โดยผลการทดลองพบว่า ใน LPT123 มีระดับการแสดงออกที่มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อได้รับภาวะแล้ง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 โดยเพิ่มขึ้นถึง 1.9 เท่า แต่ก็พบว่าชุดควบคุมก็มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น 1.6 เท่า แต่น้อยกว่าชุดที่ได้รับภาวะแล้ง อาจเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงใหม่ ทำให้เกิดภาวะเครียดจากระดับความเข้มข้นที่เปลี่ยนไป ทำให้ยีน *OsNFXL1* ในชุดควบคุมมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น ซึ่งลักษณะเช่นนี้ไม่เกิดใน LPT123-TC171 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานต่อภาวะแล้งและเค็ม โดยการแสดงออกของยีน *OsNFXL1* ทั้งในภาวะปกติและภาวะแล้งที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ใกล้เคียงกัน

การศึกษาในระดับ transcription โดย *in silico* แสดงให้เห็นว่า ยีน *OsNFXL1* มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อได้รับภาวะแล้ง แต่เมื่อวัดระดับการแสดงออกของยีนเชิงปริมาณโดย qRT-PCR พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเป็นไปได้ว่าการปลูกเลี้ยงต้นข้าว อายุที่เก็บตัวอย่าง และภาวะที่ให้ไม่เหมือนกับชุดการทดลองใน micro array (ภาคผนวก ค) แต่ในการศึกษานี้ qRT-PCR ทำให้เห็นแนวโน้มการแสดงออกของยีน *OsNFXL1* ว่ามีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นในระดับ transcription ใน LPT123 ภายใต้ภาวะแล้ง

การพบการเปลี่ยนแปลงในระดับ transcription ที่มีเพียงเล็กน้อยใน LPT123 ภายใต้ภาวะแล้งก็อาจมีผลต่อการทำงานของโปรตีนที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญก็ได้หากมีการควบคุมในระดับ post-transcriptional และ post-translational control (Mazzucotelli et al., 2008) ซึ่งพบว่า NFX1-like proteins ในข้าวมี post-translational modification คือ E3 ubiquitin ligase activity ก่อนที่โปรตีนจะไปทำงาน (Müssig et al., 2010)

ข้อมูลการแสดงออกในระดับการถอดรหัส (transcription) มีความสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้ในระดับโปรตีน กล่าวคือ เมื่อได้รับภาวะเครียด ยีน *OsNFXL1* มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นจากภาวะปกติ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และ LPT123 ภายใต้ภาวะแล้งมีการแสดงออกสูงที่สุดในทุกชุดการทดลอง นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับข้อมูลการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าปริมาณโปรตีนใน LPT123 มีมากกว่า LPT123-TC171 (ศุภจิตรา ชัชวาลย์, 2550) ซึ่งอธิบายได้ว่า ยีน *OsNFXL1* ควบคุมการแสดงออกของกลุ่มยีนภายใต้เครือข่ายที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มและแล้ง

NF-X1-zinc-finger เป็น gene family มียีน 2 ยีนในข้าว คือ LOC_Os01g06550 (Os01g0158900) และ LOC_Os06g14190 (Os06g0252300) เมื่อเปรียบเทียบลำดับโปรตีน NF-X1-zinc-finger ระหว่าง คน Arabidopsis และ ข้าว (ภาคผนวก ค ภาพที่ ค-6) พบว่า gi|115467398 (LOC_Os06g14190) ในการศึกษาี้ มีความคล้ายคลึงกับ gi|15218447 (At1g10170) ใน Arabidopsis มากที่สุด (ภาคผนวก ค ภาพที่ ค-7 ตารางที่ ค-10) การศึกษายีน At1g10170 (*AtNFXL1*) และ AT5G05660 (*AtNFXL2*) โดย Lisso และคณะ (2006) พบว่ายีน *AtNFXL1* จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตภายใต้ภาวะแล้งและภาวะเค็ม และต้น transgenic ที่เพิ่มระดับการแสดงออกของยีน (*35S;AtNFXL1*) มี H_2O_2 สูงกว่าต้นปกติอย่างมีนัยสำคัญ ลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าโดย Pongprayoon (2011) ที่พบว่าภายใต้ภาวะเครียดจาก osmotic stress LPT123 มีการชักนำให้ผลิต H_2O_2 สูงกว่า LPT123-TC171

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. ระบุชนิดและแบบรูปของโปรตีนของรากที่เปลี่ยนแปลงในภาวะแล้ง

วิเคราะห์โปรตีนโดยใช้ GeLC-MS/MS พบโปรตีนในรากข้าวสองสายพันธุ์ จำนวน 597 ชนิด โดยโปรตีน 122 ชนิดมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณอย่างมีนัยสำคัญเมื่อได้รับภาวะแล้ง ภาวะแล้งมีผลทำให้โปรตีนชนิดต่าง ๆ มีปริมาณเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งพบจำนวนชนิดของโปรตีนที่ตอบสนองต่อภาวะแล้งในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ดี มีโปรตีนเพียง 8 ชนิดเท่านั้นที่พบเหมือนกันในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ เมื่อจัดกลุ่มโปรตีนตามหน้าที่พบว่าโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงเชิงปริมาณมี 9 กลุ่มคือ เมแทบอลิซึม การส่งสัญญาณ กระบวนการถอดรหัสและสังเคราะห์โปรตีน โปรตีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับโครงสร้างภายในเซลล์ การลำเลียงสารผ่านเข้า-ออกจากเซลล์ cellular process protein modification ทรานสโพซอน และโปรตีนที่ไม่ทราบหน้าที่

2. ศึกษาการแสดงออกของยีนที่ทำการคัดเลือกได้จากโปรตีนในระดับ transcription

LOC_Os06g14190 NF-X1-type zinc finger protein, putative, expressed (*OsNFXL1*) มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อรากในภาวะปกติ ภายใต้ภาวะแล้งและภาวะเค็มชักนำให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในข้าว LPT123 แต่ไม่เปลี่ยนระดับการแสดงออกในข้าว LPT123-TC171 ซึ่งคาดว่า *OsNFXL1* มีบทบาทเป็น Transcription Factor ควบคุมการแสดงออกของกลุ่มยีนภายใต้ภาวะแล้งและเค็ม

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- นนทลี ชำนาญมธุจรกรรม. 2552. การแสดงออกในระยะแรกของยีนใหม่ที่ตอบสนองต่อความเค็มในข้าว *Oryza sativa* L. หลังจากได้รับภาวะเครียดจากความเค็มและภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปารวี ธิกาศ. 2546. เครื่องหมายทางพันธุกรรมของข้าว *Oryza sativa* L. พันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็มที่ตรวจสอบโดยวิธีอาร์เอฟดี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พงศธร กล่อมสกุล. 2547. ผลของกรดแอมไพไซคิกจากภายนอกที่มีต่อการเติบโตการสะสมโพรลีน และการแสดงออกของยีน Δ^1 -pyrroline - 5 - carboxylate synthetase ในข้าว *Oryza sativa* L. เมื่ออยู่ในภาวะแล้งและภาวะเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศุภจิตรา ชัชวาลย์, พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล, ฐปนา อัครเอกปัญญา และ มณฑกานติ วัชรากัย. 2550. Salt and Drought Tolerance Cross-talk and Proline Biosynthesis during Osmotic Stress in Rice (*Oryza sativa* L.). รายงานผลการวิจัย ศูนย์วิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สมพร มณีประสพสุข. 2547. การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในข้าว *Oryza sativa* L. พันธุ์เหลืองประทิว 123 สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ทนเค็มในภาวะเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เสาวณี จันทะพงษ์ และดวงทิพย์ ศิริกาญจนารักษ์. 2555. เจาะลึกการจัดการข้าวไทยในมิติการกระจายรายได้และประสิทธิภาพการผลิต. *FAO (Focused and Quick) 77: 1-13.*

ภาษาอังกฤษ

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2003. Arabidopsis *AtMYC2* (bHLH) and *AtMYB2* (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 63-78.
- Abdallah, C., Dumas-Gaudot, E., Renaut, J., and Sergeant, K. 2012. Gel-based and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance. *Int J Plant Genomics*: 494572.
- Ariizumi, T., Hauvermale, A. L., Nelson, S. K., Hanada, A., Yamaguchi, S., and Steber, C. M. 2013. Lifting DELLA repression of Arabidopsis seed germination by nonproteolytic gibberellin signaling. *Plant Physiology* 162: 2125-2139.
- Asian Development Bank. 2009. *The Economics of Climate Change in Southeast Asia: A Regional Review*. ADB Publishing.
- Blackstock, W. P., and Weir, M. P. 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* 17: 121-127.
- Bohnert, H. J., and Jensen, R. G. 1996. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnology* 14: 89-97.
- Boonburapong, B., and Buaboocha, T. 2007. Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins. *BMC Plant Biol* 7: 1-17.
- Cairns, J. E., Audebert, A., Townend, J., Price, A. H., and Mullins, C. E. 2004. Effect of soil mechanical impedance on root growth of two rice varieties under field drought stress. *Plant Soil* 267: 309-318.
- Cao, P., Jung, K.-H., Choi, D., Hwang, D., Zhu, J., and Ronald, P. 2012. The Rice Oligonucleotide Array Database: an atlas of rice gene expression. *Rice* 5: 1-9.
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B. H., Hong, X., Agarwal, M., and Zhu, J. K. 2003. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes Dev* 17: 1043-1054.

- Chinpongpanich, A., Limruengroj, K., Phean, O. P. S., Limpaseni, T., and Buaboocha, T. 2012. Expression analysis of calmodulin and calmodulin-like genes from rice, *Oryza sativa* L. BMC Res Notes 5: 625.
- Claverol, S., Bulet-Schiltz, O., Gairin, J. E., and Monsarrat, B. 2003. Characterization of protein variants and post-translational modifications: ESI-MSn analyses of intact proteins eluted from polyacrylamide gels. Mol Cell Proteomics 2: 483-493.
- Cruz de Carvalho, M. H. 2008. Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. Plant Signal Behav 3: 156-165.
- D'Andrea, L. D., and Regan, L. 2003. TPR proteins: the versatile helix. Trends Biochem Sci 28: 655-662.
- Despres, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D., and Fobert, P. R. 2003. The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. Plant Cell 15: 2181-2191.
- Duan, J., and Cai, W. 2012. *OsLEA3-2* An Abiotic Stress Induced Gene of Rice Plays a Key Role in Salt and Drought Tolerance. PLoS One 7: e45117.
- Dubouzet, J. G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2003. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. Plant J 33: 751-763.
- Gallie, D. R. 2013. The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. J Exp Bot 64: 433-443.
- Gao, J.-P., Chao, D.-Y., and Lin, H.-X. 2008. Toward understanding molecular mechanisms of abiotic stress responses in rice. Rice 1: 36-51.

- Garg, A. K., Kim, J.-K., Owens, T. G., Ranwala, A. P., Choi, Y. D., Kochian, L. V., and Wu, R. J. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. Proc Nat Acad of Sci USA 99: 15898-15903.
- Gilmore, J. M. and M. P. Washburn 2010. Advances in shotgun proteomics and the analysis of membrane proteomes. J Proteomics 73: 2078-2091.
- Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T. H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Briggs, S. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). Science 296: 92-100.
- Gorantla, M., Babu, P., Reddy Lachagari, V., Reddy, A., Wusirika, R., Bennetzen, J. L., and Reddy, A. R. 2007. Identification of stress-responsive genes in an indica rice (*Oryza sativa* L.) using ESTs generated from drought-stressed seedlings. Exp Bot 58: 253-265.
- Görg, A., Drews, O., Lück, C., Weiland, F., and Weiss, W. 2009. 2-DE with IPGs. Electrophoresis 30: S122-S132.
- Gou, Jiqing, Strauss, Steven H., Tsai, Chung Jui, Fang, Kai, Chen, Yiru, Jiang, Xiangning, and Busov, Victor B. 2010. Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with auxin and other hormones. Plant Cell 22: 623-639.
- Hincha, Dirk K., Oliver, Ann E., and Crowe, John H. 1999. Lipid composition determines the effects of arbutin on the stability of membranes. Biophys 77: 2024-2034.
- Hodge, A., Berta, G., Doussan, C., Merchan, F., and Crespi, M. 2009. Plant root growth, architecture and function. Plant Soil 321: 153-187
- Hurkman, W. J. and C. K. Tanaka 1986. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. Plant Physiol 81: 802-806.

- Iwasaki, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. 1995. Identification of a cis-regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. Mol Gen Genet 247: 391-398.
- Jain, M., Nijhawan, A., Arora, R., Agarwal, P., Ray, S., Sharma, P., Khurana, J. P. 2007. F-box proteins in rice. Genome-wide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed development, and regulation by light and abiotic stress. Plant Physiol 143: 1467-1483.
- Jaresitthikunchai, J., Phaonakrop, N., Kittisenachai, S., and Roytrakul, S. 2009. Rapid in-gel digestion protocol for protein identification by peptide mass fingerprint. In the 2nd biochemistry and molecular biology conference: Biochemistry and Molecular Biology for Regional Sustainable Development. Khon Kaen: Thailand.
- Ji, W., Zhu, Y., Li, Y., Yang, L., Zhao, X., Cai, H., and Bai, X. 2010. Over-expression of a glutathione S-transferase gene, GsGST, from wild soybean (*Glycine soja*) enhances drought and salt tolerance in transgenic tobacco. Biotechnol Lett 32: 1173-1179.
- Johansson, C., Samskog, J., Sundstrom, L., Wadensten, H., Bjorkesten, L., and Flensburg, J. 2006. Differential expression analysis of Escherichia coli proteins using a novel software for relative quantitation of LC-MS/MS data. Proteomics 6: 4475-4485.
- Johansson, M., McWatters, H. G., Bako, L., Takata, N., Gyula, P., Hall, A., Eriksson, M. E. 2011. Partners in time: EARLY BIRD associates with ZEITLUPE and regulates the speed of the Arabidopsis clock. Plant Physiol 155: 2108-2122.
- Jongdee, B., Pantuwan, G., Fukai, S., and Fischer, K. 2006. Improving drought tolerance in rainfed lowland rice: An example from Thailand. Agric Water Manag 80: 225-240.

- Kanehisa, M., and Goto, S. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res 28: 27-30.
- Kawahara, Y., de la Bastide, M., Hamilton, J., Kanamori, H., McCombie, W., Ouyang, S., Matsumoto, T. 2013. Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. Rice 6: 1-10.
- Kirch, H. H., Bartels, D., Wei, Y., Schnable, P. S., and Wood, A. J. 2004. The ALDH gene superfamily of Arabidopsis. Trends Plant Sci 9: 371-377.
- Kim, Jung Min, Yamada, Masayuki, and Masai, Hisao. 2003. Functions of mammalian Cdc7 kinase in initiation/monitoring of DNA replication and development. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 532: 29-40.
- Kobayashi, K., Suzuki, M., Tang, J., Nagata, N., Ohyama, K., Seki, H., Muranaka, T. 2007. Lovastatin insensitive 1, a Novel pentatricopeptide repeat protein, is a potential regulatory factor of isoprenoid biosynthesis in Arabidopsis. Plant Cell Physiol 48: 322-331.
- Kolukisaoglu, Ü., Weinkl, S., Blazevic, D., Batistic, O., and Kudla, J. 2004. Calcium sensors and their interacting protein kinases: Genomics of the arabidopsis and rice CBL-CIPK signaling networks. Plant Physiology 134: 43-58.
- Kotchoni, Simeon O., Jimenez-Lopez, Jose C., Gao, Dongying, Edwards, Vincent, Gachomo, Emma W., Margam, Venu M., and Seufferheld, Manfredo J. 2010. Modeling-dependent protein characterization of the rice aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily reveals distinct functional and structural features. PLoS One 5: e11516.
- Kraft, E., Stone, S. L., Ma, L., Su, N., Gao, Y., Lau, O. S., Callis, J. 2005. Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of Arabidopsis. Plant Physiol 139: 1597-1611.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

- Lechner, E., Leonhardt, N., Eisler, H., Parmentier, Y., Alioua, M., Jacquet, H., Genschik, P. 2011. MATH/BTB CRL3 receptors target the homeodomain-leucine zipper ATHB6 to modulate abscisic acid signaling. Dev Cell 21: 1116-1128.
- Lee, D. G., Ahsan, N., Lee, S. H., Kang, K. Y., Bahk, J. D., Lee, I. J., and Lee, B. H. 2007. A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. Proteomics 7: 3369-3383.
- Lenka, S. K., Katiyar, A., Chinnusamy, V., and Bansal, K. C. 2011. Comparative analysis of drought-responsive transcriptome in Indica rice genotypes with contrasting drought tolerance. Plant Biotechnol J 9: 315-327.
- Lisso, J., Altmann, T., and Mussig, C. 2006. The *AtNFXL1* gene encodes a NF-X1 type zinc finger protein required for growth under salt stress. FEBS Lett 580: 4851-4856.
- Liu, Q., Siloto, R. M., Lehner, R., Stone, S. J., and Weselake, R. J. 2012. Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: molecular biology, biochemistry and biotechnology. Prog Lipid Res 51: 350-377.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275.
- Lurin, C., Andres, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyere, C., Small, I. 2004. Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. Plant Cell 16: 2089-2103.
- Luscher, B., and Eisenman, R. N. 1990. New light on Myc and Myb. Part II. Myb. Genes Dev 4: 2235-2241.
- Lygerou, Z., Mitchell, P., Petfalski, E., Seraphin, B., and Tollervey, D. 1994. The POP1 gene encodes a protein component common to the RNase MRP and RNase P ribonucleoproteins. Genes Dev 8: 1423-1433.

- Macovei, A., Vaid, N., Tula, S., and Tuteja, N. 2012. A new DEAD-box helicase ATP-binding protein (*OsABP*) from rice is responsive to abiotic stress. *Plant Signal Behav* 7: 1138-1143.
- Mahajan, S., and Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys* 444: 139-158.
- Marcotte, W. R., Jr., Russell, S. H., and Quatrano, R. S. 1989. Abscisic acid-responsive sequences from the em gene of wheat. *Plant Cell* 1: 969-976.
- Marrs, K. A. 1996. The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 127-158.
- Maksup, S., Roytrakul, S., and Supaibulwatana, K. 2012. Physiological and comparative proteomic analyses of Thai jasmine rice and two check cultivars in response to drought stress. *Plant Interact*: 1-13.
- Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A. M., Crosatti, C., Guerra, D., Stanca, A. M., and Cattivelli, L. 2008. Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. *Plant Science* 174: 420-431.
- Mirzaei, M., Soltani, N., Sarhadi, E., Pascovici, D., Keighley, T., Salekdeh, G. H., Atwell, B. J. 2012. Shotgun proteomic analysis of long-distance drought signaling in rice roots. *J Proteome Res* 11: 348-358.
- Mossesso, E., and Lima, C. D. 2000. Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol Cell* 5: 865-876.
- Müssig, C., Schröder, F., Usadel, B., and Lisso, J. 2010. Structure and putative function of NFX1-like proteins in plants. *Plant Biology* 12: 381-394.
- Ng, D. W., Wang, T., Chandrasekharan, M. B., Aramayo, R., Kertbundit, S., and Hall, T. C. 2007. Plant SET domain-containing proteins: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1769: 316-329.

- Nguyen, M., Moon, S., and Jung, K.-H. 2013. Genome-wide expression analysis of rice aquaporin genes and development of a functional gene network mediated by aquaporin expression in roots. Planta: 1-13.
- Ning, J., Li, X., Hicks, L. M., and Xiong, L. 2010. A Raf-like MAPKKK gene DSM1 mediates drought resistance through reactive oxygen species scavenging in Rice. Plant Physiol 152: 876-890.
- O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 250: 4007-4021.
- Ogura, T., and Wilkinson, A. J. 2001. AAA+ superfamily ATPases: common structure diverse function. Genes Cells 6: 575-597.
- Ouyang, S. Q., Liu, Y. F., Liu, P., Lei, G., He, S. J., Ma, B., Chen, S. Y. 2010. Receptor-like kinase *OsSIK1* improves drought and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa*) plants. Plant J 62: 316-329.
- Ozakca, Dilek Unal. 2013. Effect of abiotic stress on photosystem I-related gene transcription in photosynthetic organisms. In Dubinsky Z. (ed.), Photosynthesis, pp.161-184. InTECH.
- Pandit, A., Rai, V., Bal, S., Sinha, S., Kumar, V., Chauhan, M., Singh, N. K. 2010. Combining QTL mapping and transcriptome profiling of bulked RILs for identification of functional polymorphism for salt tolerance genes in rice (*Oryza sativa* L.). Molec Genet Genomics 284: 121-136.
- Park, H. C., Kim, M. L., Kang, Y. H., Jeon, J. M., Yoo, J. H., Kim, M. C., Cho, M. J. 2004. Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. Plant Physiol 135: 2150-2161.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR Nucleic Acids Res 29.

- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., and Cottrell, J. S. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis 20: 3551-3567.
- Peterson, G. L. 1983. Determination of total protein. Methods Enzymol 91: 95-119.
- Petricka, J. J., and Nelson, T. M. 2007. Arabidopsis nucleolin affects plant development and patterning. Plant Physiol 144: 173-186.
- Priya, P., and Jain, M. 2013. RiceSRTFDB: a database of rice transcription factors containing comprehensive expression, cis-regulatory element and mutant information to facilitate gene function analysis. Database (Oxford) 2013: bat027.
- Qiu, X. B., Shao, Y. M., Miao, S., and Wang, L. 2006. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. Cell Mol Life Sci 63: 2560-2570.
- Rabbani, M. A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M. A., Katsura, K., Ito, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2003. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. Plant Physiol 133: 1755-1767.
- Rattanawadee Wichajarn. 2009. Expression of genes and proteins involving salt-tolerance mechanism in rice *Oryza sativa* L. analyzed by cDNA-AFLP and proteomics. Master's Thesis, Program in Biotechnology. Faculty of Science, Chulalongkorn University.
- Rezaul, K., Wu, L., Mayya, V., Hwang, S. I., and Han, D. 2005. A systematic characterization of mitochondrial proteome from human T leukemia cells. Mol Cell Proteomics 4: 169-181.
- Rushton, P. J., Torres, J. T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., and Somssich, I. E. 1996. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. EMBO J 15: 5690-5700.

- Saeed, A. I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Quackenbush, J. 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. Biotechniques 34: 374-378.
- Salekdeh, G. H., Siopongco, J., Wade, L. J., Ghareyazie, B., and Bennett, J. 2002. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. Proteomics 2: 1131-1145.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, USA : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santoni, V., Molloy, M., and Rabilloud, T. 2000. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? Electrophoresis 21: 1054-1070.
- Sato, Y., Namiki, N., Takehisa, H., Kamatsuki, K., Minami, H., Ikawa, H., Nagamura, Y. 2013. RiceFRIEND: a platform for retrieving coexpressed gene networks in rice. Nucleic Acids Res 41: D1214-D1221.
- Schachtman, D. P., and Goodger, J. Q. 2008. Chemical root to shoot signaling under drought. Trends Plant Sci 13: 281-287.
- Serraj, R., Kumar, A., McNally, K. L., Slamet-Loedin, I., Bruskiewich, R., Mauleon, R., Hijmans, R. J. 2009. Improvement of drought resistance in rice. Advances Agronomy 103: 41-99.
- Shunping Yan, Z. T., Weiai Su and Weining Sun. 2005. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. Proteomics 5: 235-244.
- Simpson, S. D., Nakashima, K., Narusaka, Y., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2003. Two different novel cis-acting elements of erd1, a clpA homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. Plant J 33: 259-270.

- Smaczniak, C., Li, N., Boeren, S., America, T., van Dongen, W., Goerdayal, S. S., Kaufmann, K. 2012. Proteomics-based identification of low-abundance signaling and regulatory protein complexes in native plant tissues. Nat Protoc 7: 2144-2158.
- Siriporn Sripinyowanich. 2010. Characterization of the novel salt stress responsive gene in Rice *Oryza Sativa* L. Doctoral Dissertation. Program in Biological Sciences, Faculty of Science, Chulalongkorn University.
- Sun, Yan-Guo, Wang, Bo, Jin, Shang-Hui, Qu, Xiao-Xia, Li, Yan-Jie, and Hou, Bing-Kai. 2013. Ectopic expression of Arabidopsis glycosyltransferase *UGT85A5* enhances salt stress tolerance in tobacco. PLoS One 8: e59924.
- Szabados, L., and Savoure, A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. Trends Plant Sci 15: 89-97.
- Taji, T., Komatsu, K., Katori, T., Kawasaki, Y., Sakata, Y., Tanaka, S., Shinozaki, K. 2010. Comparative genomic analysis of 1047 completely sequenced cDNAs from an Arabidopsis-related model halophyte, *Thellungiella halophila*. BMC Plant Biol 10: 261.
- Thanin Chantarachot. 2011. Relationship between *OsCam1-1* and *OsNUC1* gene expression in salt-stress response in rice *Oryza sativa* L. Master's Thesis, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University.
- Thorsell, A., Portelius, E., Blennow, K., and Westman-Brinkmalm, A. 2007. Evaluation of sample fractionation using micro-scale liquid-phase isoelectric focusing on mass spectrometric identification and quantitation of proteins in a SILAC experiment. Rapid Commun Mass Spectrom 21: 771-778.
- Udomchalothorn, T., Maneeprasobsuk, S., Bangyeekhun, E., Boon-Long, P., and Chadchawan, S. 2009. The role of the bifunctional enzyme, fructose-6-phosphate-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase, in carbon partitioning during salt stress and salt tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.). Plant Sci 176: 334-341.

- Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Motoyuki, A., and Matsuoka, M. 2007. Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 58: 183-198.
- Vajrabhaya, M., and Vajrabhaya, T. 1991. Somaclonal variation of salt tolerance in rice. *Agric Biotechnol* 14: 368-382.
- Valcarcel, J., and Gebauer, F. 1997. Post-transcriptional regulation: the dawn of PTB. *Curr Biol* 7: R705-708.
- Wan, B., Lin, Y., and Mou, T. 2007. Expression of rice Ca(2+)-dependent protein kinases (CDPKs) genes under different environmental stresses. *FEBS Lett* 581: 1179-1189.
- Wang, D., Pan, Y., Zhao, X., Zhu, L., Fu, B., and Li, Z. 2011. Genome-wide temporal-spatial gene expression profiling of drought responsiveness in rice. *BMC Genomics* 12: 149.
- Wasinee Pongprayoon. 2011. *Drought resistance and protein changes induced by chitosan in rice *Oryza sativa* L.* Doctoral Dissertation, Program in Biological Sciences, Faculty of Science, Chulalongkorn University.
- Wu, X., Kishitani, S., Ito, Y., and Toriyama, K. 2009. Accumulation of raffinose in rice seedlings overexpressing *OsWRKY11* in relation to desiccation tolerance. *Plant Biotechnology* 26: 431-434.
- Xia, Z., Wei, Y., Sun, K., Wu, J., Wang, Y., and Wu, K. 2013. The Maize AAA-type protein SKD1 confers enhanced salt and drought stress tolerance in transgenic tobacco by interacting with Lyst-interacting protein 5. *PLoS One* 8: e69787.
- Yadav, D. K., and Tuteja, N. 2011. Rice G-protein coupled receptor (GPCR): in silico analysis and transcription regulation under abiotic stress. *Plant Signal Behav* 6: 1079-1086.
- Yang, J., Zhang, J., Liu, K., Wang, Z., and Liu, L. 2007. Involvement of polyamines in the drought resistance of rice. *J Exp Bot* 58: 1545-1555.

- Yang, X., Sun, C., Hu, Y., and Lin, Z. 2008. Molecular cloning and characterization of a gene encoding RING zinc finger ankyrin protein from drought-tolerant *Artemisia desertorum*. J Biosci 33: 103-112.
- Yee D, Goring DR. 2009. The diversity of plant U-box E3 ubiquitin ligases: from upstream activators to downstream target substrates. J Exp Bot 60: 1109–21.
- Yu, D., Chen, C., and Chen, Z. 2001. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. Plant Cell 13: 1527-1540.
- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G. K., Li, S., Liu, B., Yang, H. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). Science 296: 79-92.
- Yue, B., Xue, W., Xiong, L., Yu, X., Luo, L., Cui, K., Zhang, Q. 2006. Genetic basis of drought resistance at reproductive stage in rice: separation of drought tolerance from drought avoidance. Genetics 172: 1213-1228.
- Zang, X., and Komatsu, S. 2007. A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. Phytochemistry 68: 426-437.
- Zhu, J. K. 2002. Sal and drought stress signal transduction in plants. Annu Rev Plant Biol 53: 247-273.
- Zou, J., Liu, A., Chen, X., Zhou, X., Gao, G., Wang, W., and Zhang, X. 2009. Expression analysis of nine rice heat shock protein genes under abiotic stresses and ABA treatment. Plant Physiol 166: 851-861.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 1991

(Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991)

ชื่อสารเคมี	ปริมาณสาร (mg/l)
Macroelements	
Potassium nitrate (KNO ₃)	580
Calcium sulfate (CaSO ₄)	500
Magnesium sulfate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	450
Triple super phosphate	250
Ammonium sulfate (NH ₄) ₂ SO ₄	100
Microelements	
di-sodium ethylene diamine tetraacetate (Na ₂ EDTA) ^a	160
Ferrous sulfate (FeSO ₄ ·7H ₂ O) ^a	120
Manganese sulfate (MnSO ₄ ·H ₂ O)	15
Boric acid (H ₃ BO ₃)	15
Zinc sulfate (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	1.5
Potassium iodide (KI)	1.0
Sodium molybdate (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	0.1
Copper sulfate (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0.05
Cobalt chloride (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	0.05

^a การเตรียม FeSO₄ stock ความเข้มข้น 30 g/L (1L)

1. ชั่ง Na₂EDTA 40 กรัม และ FeSO₄·7H₂O 30 กรัม
2. แยกละลายในน้ำกลั่น 500 ml ทีละตัวที่อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส
3. ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน แล้วพ่นฟองอากาศ 3 ชั่วโมงจนสารละลายใส

2. โปรตีนโอมิกส์

ชื่อสารเคมี	ส่วนประกอบ
Deoxycholate-trichloroacetic acid (DOC-TCA)	0.15% (w/v) deoxycholate 950 μ l 72% (w/v) trichloroacetic acid 100 μ l
Lowry protein assay	
Reagent A	(0.2%CuSO ₄ + 0.4% Tartaric acid) 5 ml 20% Na ₂ CO ₃ 5 ml 0.8 N NaOH 10 ml 5% SDS 20 ml
Reagent B	Folin-Ciocalteu phenol 1 ml Distilled water 5 ml
SDS-PAGE	
Separating gel (10 ml)	40% Acrylamide 3125 μ l 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 2500 μ l 10%SDS 125 μ l dH ₂ O 4200 μ l 10% APS 50 μ l TEMED 6 μ l
Stacking gel (3 ml)	40% Acrylamide 300 μ l 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 742 μ l 10% SDS 30 μ l dH ₂ O 1900 μ l 10% APS 23 μ l TEMED 3.5 μ l

ชื่อสารเคมี	ส่วนประกอบ
^a Coomassie Blue R250 staining	coomassie blue R250 0.1 g acetic acid 1 ml distilled water add to 100 ml
^b Destaining solution for Coomassie Blue R250 staining	MeOH 40 ml acetic acid 10 ml distilled water add to 100 ml

^a Mixed very well and stir for 1 hour before use, for fresh preparing solution stain for 5 min ; storing gel in 0.1% (v/v) acetic acid

^b แชนจ์ background ใส

2.1 วิธีการสกัดโปรตีนตัดแปลงจากวิธีของ Peterson (1983)

1. บดตัวอย่างเนื้อเยื่อราก 0.2 กรัม ในโกร่งกับไนโตรเจนเหลวตัดใส่หลอด microcentrifuge
2. เติม 0.1% (w/v) SDS ปริมาตร 300 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- 3.ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
4. ปิเปตสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่
5. นำตัวอย่างโปรตีนที่ปิเปตได้ในข้อ 4 มาปริมาตร 50 μ l เติม 0.15% (w/v) deoxycholate (DOC) ปริมาตร 950 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที
6. เติม 72% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 100 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ -20°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หรือ -80°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
7. ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายชั้นบนทิ้ง ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5 นาที
8. ละลายตะกอนใน 0.15% DOC ปริมาตร 50 μ l

2.2 การวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วย Lowry method (Lowry et al., 1951)

สารละลาย BSA standard

ชั่ง BSA (fraction V. SIGMA) 2 มิลลิกรัม ละลายใน steriled water 1 ml (หรือในตัวทำละลายเดียวกันกับ sample)

Sample preparation

ถ้าคาดว่าตัวอย่างมีความเข้มข้นมาก ให้ทำการเตรียมตัวอย่างเป็น 1,3,5 และ 10 เท่า

Protein determination

1. BSA standard

- 1.1 ดูด steriled water ใส่ใน 96-well plate หลุมละ 5 μ l จำนวน 4 หลุมสำหรับใช้เป็น blank
 - 1.2 ดูดสารละลาย BSA ใส่ใน 96-well plate หลุมละ 1 μ l จำนวน 4 หลุมแล้วเติม steriled water หลุมละ 4 μ l จะได้เป็น BSA ความเข้มข้น 2 μ g/ μ l
 - 1.3 ดูดสารละลาย BSA ใส่ใน 96-well plate หลุมละ 2 μ l จำนวน 4 หลุมแล้วเติม steriled water หลุมละ 3 μ l จะได้เป็น BSA ความเข้มข้น 4 μ g/ μ l
 - 1.4 ดูดสารละลาย BSA ใส่ใน 96-well plate หลุมละ 3 μ l จำนวน 4 หลุมแล้วเติม steriled water หลุมละ 2 μ l จะได้เป็น BSA ความเข้มข้น 6 μ g/ μ l
 - 1.5 ดูดสารละลาย BSA ใส่ใน 96-well plate หลุมละ 4 μ l จำนวน 4 หลุมแล้วเติม steriled water หลุมละ 1 μ l จะได้เป็น BSA ความเข้มข้น 8 μ g/ μ l
 - 1.6 ดูดสารละลาย BSA ใส่ใน 96-well plate หลุมละ 5 μ l จำนวน 4 หลุมจะได้เป็น BSA ความเข้มข้น 10 μ g/ μ l
- หมายเหตุ กรณีที่ sample ละลายในตัวทำละลายอื่นที่ไม่ใช่น้ำให้ใช้ตัวทำละลายนั้นแทน steriled water ในข้อ 1.1-1.5

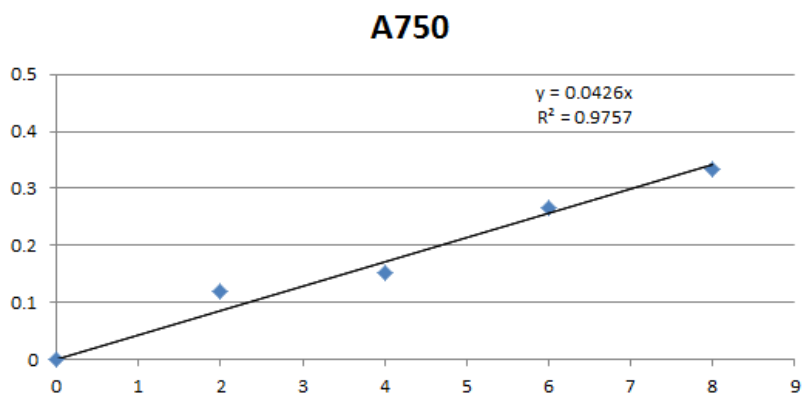
2. ดูด sample ใส่ใน 96-well plate ตัวอย่างละ 5 μ l จำนวน 4 หลุม
3. เติม reagent A 200 μ l ในข้อ 1.1-1.6 และข้อ 2 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
4. เติม reagent B 50 μ l ในข้อ 1.1-1.6 และข้อ 2 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 750 nm (จะต้องวัดค่า OD ภายใน 1 ชั่วโมงหลังครบเวลาของข้อ 4 และค่า OD ที่ได้ต้องมีค่าไม่เกิน 1)

การคำนวณ

1. สร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน

1.1 จากค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้ในแต่ละความเข้มข้นให้ตัดค่าที่อ่านได้สูงสุด หรือต่ำที่สุดทิ้งไป แล้วนำค่าที่เหลืออีก 3 ค่ามาหาค่าเฉลี่ย แล้วลบด้วยค่าเฉลี่ยของ blank จะได้เป็นค่าเฉลี่ยของ sample ที่จะใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของ sample

1.2 สร้างกราฟระหว่าง ค่าเฉลี่ยของ OD750 กับความเข้มข้นของ BSA



	0 μg	2 μg	4 μg	6 μg	8 μg
A750	0	0.11921	0.15189	0.26538	0.3339

2. คำนวณหาความเข้มข้นของ sample

$$\text{ความเข้มข้น } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\{[(\text{ค่าเฉลี่ย OD 750 ของ Sample})/m] \times \text{dilution factor}\}}{\text{Testing Volume}}$$

$$\text{ความเข้มข้น } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = 2 \text{ mg/ml BSA in } 0.15\% \text{ DOC}$$

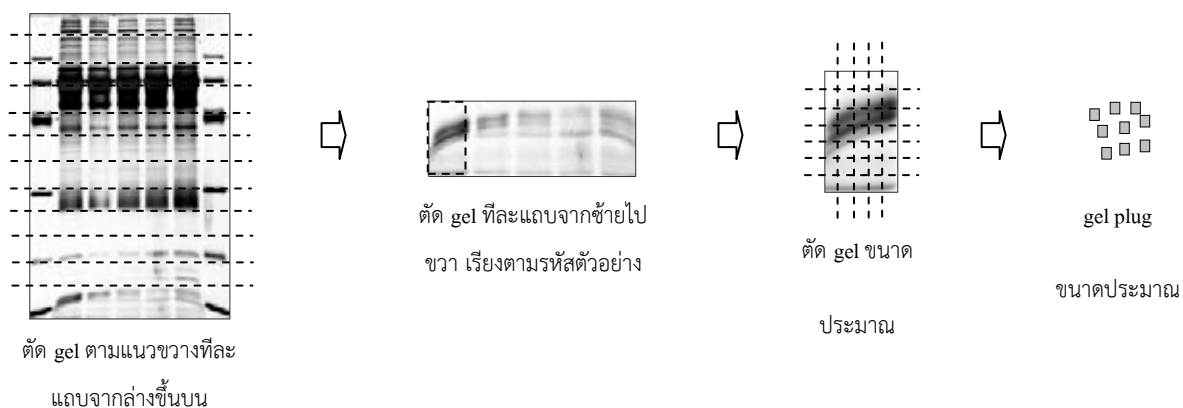
2.3 In Gel digestion Protocol (Jaresitthikunchai et. al., 2009)

Reference Sample preparation:

- เตรียม gel plug ของ BSA (fraction V, SIGMA) ขนาดประมาณ $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$ เพื่อใช้เป็น
 - (1) reference sample สำหรับควบคุม condition ในการย่อย
 - (2) ใช้ spike ลงใน sample สำหรับใช้เป็น internal standard ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยโปรแกรม Decyder MS

วิธีการตัด gel (SDS PAGE):

ล้างแผ่น gel ด้วยน้ำกลั่น แล้วตัด gel ตามขั้นตอน ดังรูป



ขั้นตอนการย่อย sample

- นำ gel plug ขนาดประมาณ 1 mm^3 ใส่ใน 96 well plate gel ที่ย้อมด้วย coomassie blue ใส่ หลุมละ 5 ก้อน
- เติมน้ำกลั่น sterile ปริมาตร 200 μl เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
- ดูดน้ำกลั่น sterile ทิ้งไป แล้วเติม 100% acetonitrile ปริมาตร 200 μl เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
- ดูด acetonitrile ทิ้งไป ทำซ้ำข้อ 3 อีก 1 รอบ แล้วดูด acetonitrile ทิ้งไป ปล่อยให้ gel plug แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที
- เติม 10 mM Dithiothreitol / 10 mM ammonium bicarbonate ปริมาตร 50 μl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อสลายพันธะ disulfide

6. ดูด 10 mM Dithiothreitol / 10 mM ammonium bicarbonate ที่ทิ้งไป
7. เติม 100 mM Iodoacetamide / 10 mM ammonium bicarbonate ปริมาตร 50 μ l ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เป็นการเติมหมู่ alkyl เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดพันธะ disulfide อีก (เรียกว่าปฏิกิริยา carbamidomethyl)
8. ดูด 100 mM Iodoacetamide / 10 mM ammonium bicarbonate ที่ทิ้งไป
9. เติม 100% acetonitrile ปริมาตร 200 μ l เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีแล้วดูด acetonitrile ที่ทิ้งไป (ทำซ้ำอีก 2 รอบ) ถ้า gel ยังไม่หดตัวให้ทำซ้ำอีก 1 รอบ
10. เติม 10 ng Trypsin in 50% acetonitrile / 10 mM ammonium bicarbonate หลุมละ 40 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ก่อนเติม 30% acetonitrile ปริมาตร 30 μ l แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือ overnight
11. ดูดของเหลวแต่ละตัวอย่างใส่ใน plate ใหม่ (1 ตัวอย่างต่อหลุม) ถ้าในหลุมแห้งจนไม่สามารถดูดของเหลวได้ให้เติม 30% acetonitrile ปริมาตร 30 μ l เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ก่อนดูดใส่ plate ใหม่
12. สกัด peptide ที่เหลือใน gel plug (ข้อ 11) ด้วย 50% acetonitrile / 0.1% FA ปริมาตร 30 μ l เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวใส่ในหลุมที่มีรหัสตัวอย่างเดียวกันลงใน plate ข้อ 9 (ทำซ้ำ 2 รอบ)
13. ทำแห้งตัวอย่างด้วยเครื่อง hot air oven ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง หรือ 1 คืน
14. เก็บรักษาตัวอย่างที่ -80 °C รอนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง mass spectrometry

2.4 ขั้นตอนการเตรียม peptide solution เพื่อวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง LC-MS/MS

1. ตัวอย่างที่ย่อยได้ 1 รหัสตัวอย่าง ถ้ามีหลายหลุมให้เติม 0.1% FA ปริมาตร 10 μl ลงในหลุมสุดท้าย และทำการ pipette เพื่อชะตัวอย่างที่แห้งอยู่ในหลุมสุดท้ายเรื่อยมาจนถึงหลุมแรก แล้วพักตัวอย่างที่ pipette ได้ในรอบที่ 1 ไว้ในหลุมแรก (ถ้า 1 รหัสตัวอย่าง มีเพียงหลุมเดียวให้เติม 0.1% FA ปริมาตร 20 μl แล้วทำการ pipette เพื่อชะตัวอย่าง)
2. ทำซ้ำข้อ 1 อีกครั้ง เพื่อชะ peptide ที่เหลือค้างอยู่ในแต่ละหลุมมา pool รวมกันในหลุมแรกจะได้ปริมาตรรวมทั้งหมดประมาณ 20 μl
3. ดูดของเหลวทั้งหมดจากหลุมแรกใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml แล้วนำไป centrifuge 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดเศษ gel หรือตะกอนโปรตีน
4. ดูดของเหลวปริมาตร 16 μl ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ใหม่
5. ดูดของเหลวจากข้อ 4 ปริมาตร 8 μl ใส่ใน insert tube ตรวจสอบให้แน่ใจก่อนว่าไม่มีฟองอากาศ และปรับให้ insert tube ตั้งตรงก่อนปิดฝา vial

วิธีการ spike BSA digested solution 1 pmol/ μl ลงในตัวอย่าง:

1. ดูด peptide solution ปริมาตร 16 μl ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
2. เติม BSA digested ความเข้มข้น 1 pmol/ μl ปริมาตร 4 μl ผสมให้เข้ากัน
3. ดูด mixed solution ปริมาตร 10 μl ใส่ใน insert tube ตรวจสอบให้แน่ใจก่อนว่าไม่มีฟองอากาศ และปรับให้ insert tube ตั้งตรงก่อนปิดฝา vial (ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่อง LC-MS/MS จะ inject sample 5 μl เพราะฉะนั้น final concentration ของ BSA digested solution เป็น 500 fmol/ μl)

วิธีการเตรียมสารเคมี (Jaresitthikunchai et. al., 2009)

- 20 mM Ammonium bicarbonate (FW 79.06) ปริมาตร 50 ml

เติม 20 mM Ammonium bicarbonate ปริมาตร 25 ml ใน steriled milli Q water ปริมาตร เป็น 25 ml

- 10 mM Dithiothreitol / 10 mM ammonium bicarbonate ปริมาตร 5 ml (fresh prepare, for sample 96 well)

ชั่งสาร Dithiothreitol (FW 154.25) 7.7125 mg ละลายใน 10 mM Ammonium bicarbonate ปรับปริมาตรเป็น 5 ml

- 100 mM Iodoacetamide / 10 mM ammonium bicarbonate ปริมาตร 5 ml (fresh prepare, for sample 96 well)

ชั่งสาร Iodoacetamide (FW 184) 92.0 mg ละลายใน 10 mM Ammonium bicarbonate ปรับ ปริมาตรเป็น 5 ml

- 50% acetonitrile / 10 mM ammonium bicarbonate

เติม 100% Acetonitrile ลงใน 20 mM ammonium bicarbonate อัตราส่วน 1:1

- 10 ng Trypsin in 50% acetonitrile / 10 mM ammonium bicarbonate

เติม 50% acetonitrile / 10 mM ammonium bicarbonate ปริมาตร 2 ml ลงใน 20 µg Trypsin จะได้ 10 ng Trypsin in 50% acetonitrile / 10 mM ammonium bicarbonate ระบุ ชื่อผู้เตรียม, ความเข้มข้น และวันที่ที่เตรียม

- 30% acetonitrile ปริมาตร 5 ml (used 1.92 ml for sample 96 well)

เติม 100% Acetonitrile ปริมาตร 1.5 ml ใน steriled milli Q water ปริมาตรเป็น 3.5 ml

- 0.1% FA ปริมาตร 50 ml

เติม FA conc. (trifluoroacetic acid) ปริมาตร 50 µl ใน steriled milli Q water ปริมาตรเป็น 49.95 ml

- 50% acetonitrile / 0.1% FA ปริมาตร 10 ml (used 8.64 ml for sample 96 well)

เติม 100% Acetonitrile ปริมาตร 5 ml ใน 0.1% FA ปริมาตร 5 ml

3. การศึกษาการแสดงออกของยีน

ชื่อสารเคมี	ส่วนประกอบ
TE	10mM Tris pH 8.0 1mM EDTA
5X TBE	54 g Tris-base 27.5 g Boric acid 20ml 0.5 M EDTA pH 8.0
DNA loading dye and RNA loading dye for agarose gel	30% (v/v) glycerol in water 0.25% (w/v) bromophenol blue 0.25% (w/v) xylene cyanol
RNA extraction buffer	100 mM Tris pH 9.0 100 mM NaCl 20 mM EDTA 1% (w/v) lauryl sarcosinate 0.1% (v/v) β -mercaptoethanol 0.1% (v/v) DEPC (diethyl pyrocarbonate)

วิธีการสกัด RNA ตัดแปลงจากวิธี Hot phenol (ปารวี ธิกาศ, 2546)

1. บดตัวอย่างรากข้าวแช่แข็งจำนวน 5 ต้น กับไนโตรเจนเหลว ในโกร่งบดที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 180 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมงเพื่อทำลาย RNase แล้ว จากนั้นตัดตัวอย่างพืชที่บดละเอียดเป็นผงแบ่งใส่หลอด microcentrifuge ที่ทำให้เย็นจัดด้วยไนโตรเจนเหลว (ตักใส่จนถึงขีด 500 µl ต่อหลอดและตัวอย่างที่บดแล้วควรตักใส่อย่างน้อย 2 หลอด เพื่อนำมา pool RNA ภายหลัง)
2. เติม RNA extraction buffer และ phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) (v/v) อย่างละ 500 µl ซึ่งอุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C ผสมให้เข้ากันและแช่ลงในน้ำแข็งทันที
3. ปั่นเหวี่ยงที่ 13,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 13 นาที
4. เปิดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่ (ประมาณ 450 µl) นำมาสกัดซ้ำด้วย phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) (v/v) ปริมาตรเท่ากับสารละลายในหลอด
5. ปั่นเหวี่ยงที่ 13,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 13 นาที
6. เปิดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่ (ประมาณ 400 µl) เติม absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลายในหลอด พลิกกลับไปมา จากนั้นนำไปตกตะกอนที่ -20 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
7. ปั่นเหวี่ยงที่ 13,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 13 นาที
8. เติสารละลายส่วนใสทิ้ง เปิดสารละลายที่ค้างออกให้หมด แล้วล้าง pellet ด้วย 80% ethanol ปริมาตร 150 µl ด้วยการเอียงหลอดไปมาให้สารละลายสัมผัสกับ pellet (หาก pellet หลุดระหว่างล้างให้นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง) เปิด 80% ethanol ออกให้หมด และนำไป air dry ที่อุณหภูมิห้อง ให้ ethanol ระเหยจนหมด (ประมาณ 15 นาที)
9. ละลาย pellet ใน DEPC-treated TE buffer 160 µl จากนั้นเติม 10 M LiCl₂ 40 µl นำไปตกตะกอนที่ -20 °C เป็นเวลาประมาณ 18 ชั่วโมง
10. ปั่นเหวี่ยงที่ 13,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 13 นาที จากนั้นเปิดสารละลายชั้นบนทิ้ง แล้วล้าง pellet ด้วย 80% ethanol ปริมาตร 150 µl เปิด 80% ethanol ออกให้หมด และนำไป air dry ที่อุณหภูมิห้อง ให้ ethanol ระเหยจนหมด (ประมาณ 15 นาที)
11. สำหรับการสกัดในรากข้าวให้ ละลาย pellet ด้วย DEPC-treated TE buffer 10 µl

วิธีการกำจัด DNA ด้วยเอนไซม์ Recombinant DNase I (RNase-free) ของ TaKaRa

1. สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยากำจัด DNA ประกอบด้วย

Total RNA (20 µg)	*variable µl
10X Dnase I Buffer	5 µl
Recombinant Dnase I (RNase-free)	2 µl (10 units)
DEPC-treated water	variable µl
Total Volume	50 µl

บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2. นำสารละลายในข้อ 1 มาเติม DEPC-treated water 100 µl จากนั้นเติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) (v/v) 150 µl เขย่าให้เข้ากัน

3. ปั่นเหวี่ยงที่ 13,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 13 นาที

4. ปิเปตสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่ (ประมาณ 120 µl) เติม 3M NaOAc (pH 5.2) ปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของสารละลายในหลอด (ประมาณ 12 µl) และเติม absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลายในหลอด (ประมาณ 400 µl) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปตกตะกอนที่ -80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5. ปั่นเหวี่ยงที่ 13,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 13 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายชั้นบนทิ้ง แล้วล้าง pellet ด้วย 80% ethanol ปริมาตร 150 µl ปิเปต 80% ethanol ออกให้หมด และนำไป air dry ที่อุณหภูมิห้องให้ ethanol ระเหยจนหมด (ประมาณ 15 นาที)

6. ละลาย pellet ด้วย DEPC-treated TE buffer 10 µl

*variable µl คำนวณปริมาณจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ตามสมการ (Sambrook et al., 1989)

$$\text{ปริมาณ RNA (ng/µl)} = A_{260} \times 40 \times \text{dilution factor} \quad \dots\dots (1)$$

$$\text{ปริมาณ RNA (µg/µl)} = (1) \text{ ng} / 1000 \quad \dots\dots (2)$$

$$\text{*variable µl} = 20 \text{ µg} / (2) \text{ µg}$$

วิธีการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

1. สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการทำ PCR ประกอบด้วย

ชื่อสาร	ปริมาตร	Final Conc.
RBC 10X reaction buffer (with 15mM Mg ²⁺)	2 µl	1x
10 mM dNTP mix	0.2 µl	0.1 µM
Forward Primer (10 µM)	0.8 µl	0.4 µM (400nM)
Reverse Primer (10 µM)	0.8 µl	0.4 µM (400nM)
RBC Taq DNA polymerase (5U/µl)	0.25 µl	1.25 Units
Template cDNA (1-4 µl)	Variable µl	--
Nuclease-free water	Variable µl	--
Total volume	20 µl	

2. นำสารละลายไปป้อนโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA ตั้งค่าดังนี้

Cycling Step	Number of Cycle	Temperature	Duration
Denaturation	1	94 °C	2 minute
Denaturation	39	94 °C	15 second
Annealing		55 °C	30 second
Extension		72 °C	45 second
Final Extension	1	72 °C	7 minute
keep		4 °C	Forever

จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปแยกด้วย Agarose gel electrophoresis ต่อไป

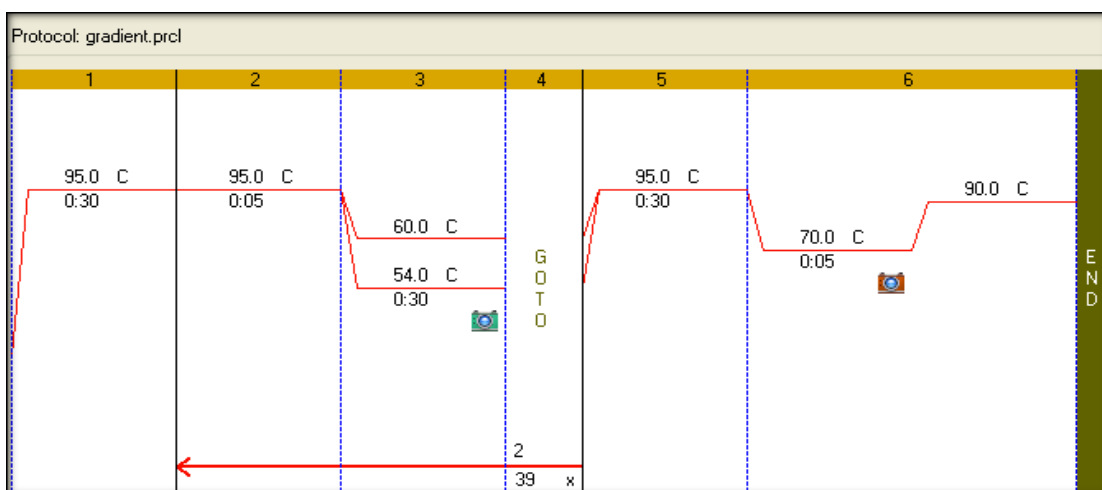
วิธีการทำ real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

1. สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการทำ qPCR ประกอบด้วย

ชื่อสาร	ปริมาตร	Final Conc.
SsoFast EvaGreen supermix	5 μ l	1x
Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ l	400 nM
Reverse Primer	0.4 μ l	400 nM
Template cDNA (1-4 μ l)	Variable μ l	--
Nuclease-free water	Variable μ l	--
Total Volume	10 μl	

2. นำสารละลายไปบ่มโดยใช้เครื่อง CFX96TM real-time system (Bio-Rad, USA) ตั้งค่าดังนี้

Gradient qPCR เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของคู่ primer ตั้งแต่ 54-60 °C



Run Protocol qPCR อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง

Cycling Step	Number of Cycle	Temperature	Duration
Enzyme Activation	1	95 °C	30 second
Denaturation	39	95 °C	5 second
Annealing/Extension		54 °C	30 second
Melt Curve (0.5°C inc)	1	70 – 90 °C	5 second

ภาคผนวก ข

ตารางที่ ข-1 แบบรูปโปรตีนเมื่อเริ่มการทดลอง (ชั่วโมงที่ 0) มีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 44 ชนิด

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	function	Venn	Cluster
736.8168281	SSLITMA	gi 77553191	LOC_Os12g08420	retrotransposon protein, putative, unclassified	transposon	J	ก
955.6469018	NITDPRLK	gi 115441423	LOC_Os01g65780	glycosyl transferase, putative, expressed	metabolic process	H	ก
1633.04794	SVDVGFISVHKTTTR	gi 50252862	LOC_Os09g17570	expressed protein	unknown	M	ก
1017.85848	NLEDILMR	gi 62734004	LOC_Os11g20689	exosome complex exonuclease, putative, expressed	nucleic acid metabolic	H	ก
813.4887107	ILIENGR	gi 50428654	LOC_Os03g62510	amine oxidase, flavin- containing domain	metabolic process	H	ก
1778.022164	SEASYMDAR GEAHALR	gi 297719681	LOC_Os01g08170	expressed protein	unknown	M	ก
851.5960414	SYADNQR	gi 77554995	LOC_Os12g19900	retrotransposon protein	transposon	H	ก
1535.526944	DDISGMQLSGNKVR	gi 115448975	LOC_Os02g53330	1-aminocyclopropane-1- carboxylate deaminase	cellular process	L	ก
1878.897937	KMGGPNHAG	gi 50878479	LOC_Os05g33990	retrotransposon protein	transposon	H	ก
655.9133796	VDALLQ	gi 115439233	LOC_Os01g49154	expressed protein	unknown	H	ก

ตารางที่ ข-1 (ต่อ) แบบรูปโปรตีนเมื่อเริ่มการทดลอง (ชั่วโมงที่ 0) มีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 44 ชนิด

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	function	Venn	Cluster
1165.071519	APPVKVDELAK	gi 218202383	LOC_Os09g32020	ubiquitin fusion degradation protein	cellular process	M	ก
744.2081804	GASNQNR	gi 222631123	LOC_Os05g25830	expressed protein	unknown	H	ก
786.7943289	MQSPAVR	gi 49388501	LOC_Os02g44260	zinc-binding protein	unknown	H	ก
473.9277266	VDGGK	gi 42409084	LOC_Os08g45160	TENA/THI-4 family protein	unknown	H	ก
1217.100048	SGAHMTEVTIR	gi 115440445	LOC_Os01g58150	expressed protein	unknown	M	ก
627.2342956	EIVR	gi 115440653	LOC_Os01g59890	pentatricopeptide, putative, expressed	nucleic acid metabolic	G	ข
950.1222111	LFVRMER	gi 222635480	LOC_Os06g21820	jasmonate O- methyltransferase	cellular process	K	ข
1637.851942	RHPLVDAMVSEIR	gi 115469678	LOC_Os06g47890	OsFBO9	signal transduction	E	ข
952.6329584	ADPELPRR	gi 125561886	LOC_Os08g37030	gibberellin receptor GID1L2	metabolic process	O	ข
929.1139186	FEMEMAR	gi 115459428	LOC_Os04g43650	L-allo-threonine aldolase	metabolic process	O	ข
529.6236065	GVVTR	gi 115438637	LOC_Os01g43270	hydroquinone glucosyltransferase	metabolic process	I	ข

ตารางที่ ข-1 (ต่อ) แบบรูปโปรตีนเมื่อเริ่มการทดลอง (ชั่วโมงที่ 0) มีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 44 ชนิด

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	function	Venn	Cluster
885.5514311	DNGAVVAIK	gij 125582933	LOC_Os02g41480	OsWAK12	protein modification	G	ข
1480.813012	SWCGWKTTLNK	gij 77555601	LOC_Os12g27400	transposon protein	transposon	G	ข
861.2657226	KILQFSK	gij 297724189	LOC_Os05g38790	IQ calmodulin-binding motif domain	unknown	O	ข
508.2949752	AFGSK	gij 77553104	LOC_Os12g06920	NBS-LRR disease resistance protein	cell death	G	ข
864.1294775	AAASSTTTR	gij 115445245	LOC_Os02g14460	peroxidase precursor, putative, expressed	metabolic process	K	ข
804.6285661	MEIQR	gij 21952800	LOC_Os01g65740	plant-specific domain TIGR01615	unknown	F	ค
896.2791971	CIGMADSK	gij 49328080	LOC_Os05g38980	respiratory burst oxidase	metabolic process	I	ค
714.7059599	ALDAVAR	gij 77552221	LOC_Os11g42210	expressed protein	unknown	F	ค
930.0565492	KERPASDK	gij 108864375	LOC_Os11g28770	retrotransposon protein	transposon	F	ค
767.0894553	ASHIDPK	gij 62734517	LOC_Os11g22550	retrotransposon protein	transposon	F	ค
758.7303174	LAADDKK	gij 115464309	LOC_Os05g38530	DnaK family protein, putative	metabolic process	F	ค
730.3475365	SLVAEGR	gij 77554991	LOC_Os12g19860	expressed protein	unknown	I	ค

ตารางที่ ข-1 (ต่อ) แบบรูปโปรตีนเมื่อเริ่มการทดลอง (ชั่วโมงที่ 0) มีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 44 ชนิด

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	function	Venn	Cluster
851.9668261	IGMMGRR	gi 108708377	LOC_Os03g25434	expressed protein	unknown	F	ค
552.5464181	MTASK	gi 77551369	LOC_Os11g34700	ZOS11-04 - C2H2 zinc finger	cellular process	H	ง
900.3997788	NMGGHQTR	gi 115442527	LOC_Os01g74146	WD repeat-containing protein	signal transduction	B	ง
1322.631166	AEAMRLDMEK	gi 28144877	LOC_Os03g54150	expressed protein	unknown	C	ง
1821.855572	SFYAFGLGSASY INGIR	gi 115488116	LOC_Os12g17070	radical SAM enzyme,	cellular process	B	ง
1032.756941	GEGHVLEHR	gi 115452205	LOC_Os03g16730	expressed protein	unknown	B	ง
1972.532543	MESPLPPSVA SSEANLDGR	gi 222630668	LOC_Os05g13780	C-5 cytosine-specific DNA methylase	component organization	B	ง
697.5319079	DPVVAAK	gi 53793176	LOC_Os06g15550	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase , family 1	unknown	H	ง
829.842208	EGQVELR	gi 38423990	LOC_Os08g25390	bifunctional aspartokinase/homoserine	metabolic process	B	ง
454.4267413	GPPGK	gi 22711562	LOC_Os10g09570	OsWAK107	signal transduction	B	ง
1039.706641	LMIFFLQK	gi 108707190	LOC_Os03g14600	transposon protein	transposon	B	ง

ตารางที่ ข-2 แบบรูปโปรตีนเมื่อชั่วโมงที่ 2 มีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 40 ชนิด

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	function	Venn	Cluster
753.3345851	HSDGLAR	gij 23589946	LOC_Os06g16340	expressed protein	unknown	I	ก
913.6227025	MGFDFAVK	gij 41469524	LOC_Os03g31839	transposon protein	transposon	I	ก
872.8197191	QRATVGGGK	gij 115481916	LOC_Os10g26290	transferase family protein	metabolic process	I	ก
583.27204	EPKIP	gij 199601446	LOC_Os01g66100	gibberellin 20 oxidase 2, putative, expressed	signal transduction	I	ก
1485.803222	GGGGGQQR GGNTGNGGR	gij 52353388	LOC_Os05g45130	retrotransposon protein putative, unclassified	transposon	B	ก
1009.570647	MVMFLARK	gij 24431601	LOC_Os03g01930	retrotransposon protein	transposon	G	ก
735.1721397	MGLLMR	gij 297602545	LOC_Os04g29210	FAD-binding and arabino-lactone oxidase	metabolic process	B	ก
721.7511174	DTMDPK	gij 115463171	LOC_Os05g25540	STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY 6 precursor	protein modification	G	ก
520.512628	GGTMR	gij 50251509	LOC_Os05g49460	CTP synthase	nucleic acid metabolic	B	ก
699.1172077	HAVMAR	gij 75272453	LOC_Os01g68040	CorA-like magnesium	transport	K	ก
989.030278	IMQLCVAR	gij 297609431	LOC_Os09g23780	expressed protein	unknown	I	ก
529.6236065	GVVTR	gij 115438637	LOC_Os01g43270	hydroquinone glucosyltransferase	metabolic process	K	ก

ตารางที่ ข-2 (ต่อ) แบบรูปโปรตีนเมื่อชั่วโมงที่ 2 มีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 40 ชนิด

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	function	Venn	Cluster
1039.706641	LMIFFLQK	gi 108707190	LOC_Os03g14600	transposon protein	transposon	B	ก
812.8159625	FIYTDR	gi 37572950	LOC_Os08g31450	MBTB28	cellular process	B	ก
1792.089002	DVRILFGTCNDI LEK	gi 50300552	LOC_Os05g16980	terpene synthase 8	metabolic process	F	ข
1583.409644	MSVDDFDLLTM IGK	gi 13129502	LOC_Os10g33640	AGC_AGC_other _NDRh_TRCd	protein modification	F	ข
1659.522418	VCNPSVGQWN MINK	gi 31712081	LOC_Os03g47820	PINHEAD, putative, expressed	embryo development	F	ข
809.23347	DKLPPLK	gi 38636811	LOC_Os08g08080	BUD13, putative, expressed	unknown	F	ข
672.6908735	QIEAGR	gi 11466827	LOC_Os01g57958	chloroplast 50S ribosomal protein L16	translation	F	ข
1003.861679	DPAIQATYK	gi 115465972	LOC_Os06g02130	G-protein alpha subunit, putative, expressed	nucleic acid metabolic	F	ข
613.4013587	AKAPTK	gi 53791878	LOC_Os06g48620	4-amino-4-deoxychorismate synthase	embryo development	F	ข
841.5560395	AKIAEIAK	gi 38345790	LOC_Os04g52060	transposable element	transposon	M	ข
719.1826626	MDAAADK	gi 218202588	LOC_Os09g37870	expressed protein	unknown	H	ค
997.8223155	AIMGGSYER	gi 37573056	LOC_Os08g32110	expressed protein	unknown	H	ค

ตารางที่ ข-2 (ต่อ) แบบรูปโปรตีนเมื่อชั่วโมงที่ 2 มีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 40 ชนิด

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	function	Venn	Cluster
778.1704666	DMAVNSK	gij125527579	LOC_Os01g52780	HVA22, putative, expressed	unknown	H	ค
508.9839311	GGTMK	gij38346030	LOC_Os04g11250	expressed protein	unknown	O	ค
649.5242151	TAATSAK	gij62734199	LOC_Os11g07650	retrotransposon protein	transposon	H	ค
818.1852313	GDVKICK	gij77553892	LOC_Os12g09910	retrotransposon protein	transposon	H	ค
578.1469529	SSGDGR	gij21740446	LOC_Os04g45390	retrotransposon protein	transposon	H	ค
894.821052	ALRGPPER	gij38605744	LOC_Os04g11180	retrotransposon protein	transposon	H	ค
900.2329739	GSAAAEPGR	gij38423988	LOC_Os08g25370	retrotransposon protein	transposon	H	ค
709.7347568	SGKQYK	gij28269395	LOC_Os03g63074	Ser/Thr protein	cellular	H	ค
				phosphatase family protein	process		
547.2824858	IITTT	gij115456689	LOC_Os03g63900	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 2	metabolic process	C	ค
700.5172784	EPLSEK	gij48717023	LOC_Os09g09730	retrotransposon protein	transposon	O	ค
763.9029786	GMLAGAGGN	gij125569999	LOC_Os01g18530	expressed protein	unknown	O	ง
450.1914639	SAMGA	gij77551952	LOC_Os11g40270	expressed protein	unknown	L	ง
678.123025	SASLMR	gij51854265	LOC_Os05g48710	expressed protein	unknown	J	ง
736.8168281	SSLITMA	gij77553191	LOC_Os12g08420	retrotransposon protein	transposon	J	ง
703.0185623	IALQLF	gij40253250	LOC_Os06g44890	villin protein , putative, expressed	transport	E	ง
819.6165166	AEMLTQK	gij46576009	LOC_Os05g40110	retrotransposon protein	transposon	G	ง

ตารางที่ ข-3 แบบรูปโปรตีนเมื่อชั่วโมงที่ 6 มีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 38 ชนิด

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	function	Venn	Cluster
625.9848396	MHAIR	gij 115434570	LOC_Os01g05870	receptor kinase, putative, expressed	signal transduction	G	ก
849.2264147	QGMGVTEK	gij 27817893	LOC_Os07g37990	glycosyltransferase sugar- binding region	metabolic process	G	ก
881.8689217	APGRQLSR	gij 21671925	LOC_Os10g09890	hypothetical protein	unknown	G	ก
771.5422201	GIEPATGK	gij 70663871	LOC_Os04g23250	transposon protein	transposon	G	ก
830.1382846	QLKELVT	gij 62733749	LOC_Os11g11650	expressed protein	unknown	H	ข
1009.570647	MVMFLARK	gij 24431601	LOC_Os03g01930	retrotransposon protein	transposon	C	ข
1028.325788	EDVGGAVRVK	gij 115447799	LOC_Os02g44710	expressed protein	unknown	H	ข
593.3712051	FGDEK	gij 115444247	LOC_Os02g05692	zinc finger, C3HC4 type	unknown	C	ข
721.4373199	HPLAER	gij 77555124	LOC_Os12g23550	expressed protein	unknown	H	ข
810.2208521	AEHPDNK	gij 115474323	LOC_Os08g01100	HMG1/2, putative, expressed	nucleic acid metabolic	H	ข
508.9155433	VMGFG	gij 115445863	LOC_Os02g22160	DNA binding protein	unknown	H	ข
938.1035956	VPLDIEPR	gij 115467214	LOC_Os06g12260	N-rich protein	unknown	H	ข
719.1826626	MDAAADK	gij 218202588	LOC_Os09g37870	expressed protein	unknown	H	ข
844.9848812	EVADGEAR	gij 50251993	LOC_Os02g01750	expressed protein	unknown	H	ข
1082.130446	DPGRPDAGNGK	gij 77551877	LOC_Os11g39260	NBS-LRR disease resistance	unknown	H	ข

ตารางที่ ข-3 (ต่อ) แบบรูปโปรตีนเมื่อชั่วโมงที่ 6 มีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 38 ชนิด

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	function	Venn	Cluster
506.4160306	ANSSK	gij 54290903	LOC_Os06g21630	hypothetical protein	unknown	H	ข
837.1283048	LQIVIR	gij 218193217	LOC_Os03g38745	serine/arginine repetitive matrix protein 1	unknown	H	ข
1758.169469	GYLIDFNLA NDLHQQ	gij 78709014	LOC_Os10g41390	protein kinase domain containing protein	protein modification	C	ข
552.5464181	MTASK	gij 77551369	LOC_Os11g34700	ZOS11-04 - C2H2 zinc finger protein	cellular process	H	ข
848.0718685	IRTMPSK	gij 19881559	LOC_Os10g17140	retrotransposon protein	transposon	B	ข
851.5960414	SYADNQR	gij 77554995	LOC_Os12g19900	retrotransposon protein	transposon	I	ค
1535.526944	DDISGMQLSGN KVR	gij 115448975	LOC_Os02g53330	1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase	cellular process	F	ค
1583.409644	MSVDDFDLLT MIGK	gij 13129502	LOC_Os10g33640	AGC_AGC_other_NDRh_TR Cd	protein modification	F	ค
513.5009658	TPGLK	gij 77552547	LOC_Os11g45250	ribonucleases P/MRP protein	nucleic acid metabolic	O	ค
1142.882019	LKSLVDGNAVK	gij 115440873	LOC_Os01g61720	IQ calmodulin-binding motif domain	unknown	F	ค
934.8753857	AVFLGLCR	gij 78709030	LOC_Os10g41850	expressed protein	unknown	I	ค
736.8598277	IWGMSK	gij 297719995	LOC_Os01g29230	expressed protein	unknown	I	ค

ตารางที่ ข-3 (ต่อ) แบบรูปโปรตีนเมื่อชั่วโมงที่ 6 มีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 38 ชนิด

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	function	Venn	Cluster
901.3646534	SAPDRIDK	gi 115466064	LOC_Os06g02830	expressed protein	unknown	I	ค
626.6071512	YMANK	gi 77553984	LOC_Os12g12190	expressed protein	unknown	I	ค
682.92998	KLGTHK	gi 115440961	LOC_Os01g62350	60S ribosomal protein L36-2	nucleic acid metabolic	O	ค
748.8028954	AAKMAMK	gi 115461971	LOC_Os05g04620	expressed protein	unknown	I	ค
564.8968926	LYAAE	gi 115457182	LOC_Os04g10650	CDT1A - Putative DNA replication initiation protein	protein modification	M	ค
751.1713781	TKGGGSVF	gi 115434628	LOC_Os01g06454	heat shock protein DnaJ	metabolic process	J	ง
1605.218478	AQTTDMVD VQLQLK	gi 56202058	LOC_Os01g33520	ulp1 protease family	post translational modification	J	ง
1718.72713	FPRFSQGLAQ DPTTR	gi 11466786	LOC_Os01g57962	photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2	photosynthesis	J	ง
964.0910911	STYVGIGLR	gi 77551524	LOC_Os11g36110	retrotransposon protein	transposon	O	ง
737.6067336	LPLSPGR	gi 30017516	LOC_Os03g28100	expressed protein	unknown	J	ง
836.7434142	QFPGSMR	gi 115443955	LOC_Os02g03470	tetratricopeptide repeat	unknown	J	ง

ตารางที่ ข-4 แบบรูปโปรตีนเมื่อชั่วโมงที่ 24 มีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 42 ชนิด

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	function	Venn	Cluster
565.4184989	FVSGR	gi 297597647	LOC_Os01g55570	expressed protein	unknown	O	ก
561.2119106	MGPTR	gi 32487673	LOC_Os04g18350	retrotransposon protein	transposon	J	ก
808.6563616	LLDMMR	gi 297724361	LOC_Os05g50690	pentatricopeptide	nucleic acid metabolic	J	ก
718.0601737	GSSLLSR	gi 115467518	LOC_Os06g15990	aldehyde dehydrogenase	metabolic process	J	ก
852.9880871	HAEAGRGR	gi 55296374	LOC_Os06g05355	expressed protein	unknown	J	ก
855.5878777	LATGEPLR	gi 21902022	LOC_Os01g40070	expressed protein	unknown	J	ก
961.5162061	CLDPSTNR	gi 77554862	LOC_Os12g24220	retrotransposon protein	transposon	E	ก
706.8403386	SDVAMGK	gi 218199652	LOC_Os07g31250	OsWAK69	protein modification	E	ก
457.1115761	AAVAK	gi 27817932	LOC_Os04g11080	retrotransposon protein	transposon	G	ข
571.9175832	NTIPK	gi 38346531	LOC_Os04g11700	retrotransposon protein	transposon	G	ข
750.1078008	CRCAGK	gi 77551591	LOC_Os11g37330	pentatricopeptide repeat domain	metabolic process	C	ข
734.4564456	ASQESSK	gi 52076163	LOC_Os04g31010	expressed protein	unknown	G	ข
742.6934149	SIAVTPR	gi 115486115	LOC_Os11g38130	OsFBDF57	unknown	O	ข
617.7074951	EMNPK	gi 115472533	LOC_Os07g35004	TKL_IRAK_DUF26-la.4	protein modification	G	ข

ตารางที่ ข-4 (ต่อ) แบบรูปโปรตีนเมื่อชั่วโมงที่ 24 มีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 42 ชนิด

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	function	Venn	Cluster
488.5789619	GKASK	gi 115475163	LOC_Os08g09350	gar2, putative, expressed	nucleic acid metabolic	C	ข
930.0565492	KERPASDK	gi 108864375	LOC_Os11g28770	retrotransposon protein	transposon	I	ค
904.8292315	INLEDFR	gi 115459630	LOC_Os04g45180	EF hand family protein	signal transduction	I	ค
471.3623476	TGAPK	gi 115477613	LOC_Os08g43060	expressed protein	unknown	I	ค
1051.577007	GCSLPIIHR	gi 50252384	LOC_Os09g17910	expressed protein	unknown	I	ค
593.3740213	SSMVR	gi 115444367	LOC_Os02g06470	OsFBX38	unknown	I	ค
470.8753252	GAAPR	gi 29467532	LOC_Os08g03620	tetratricopeptide repeat	unknown	I	ค
528.0635111	LIGIGG	gi 115485801	LOC_Os11g34110	heparan-alpha- glucosaminide N- acetyltransferase	unknown	H	ง
668.3536994	IPDGLR	gi 297728139	LOC_Os11g11490	TKL_IRAK_CR4L.7	protein modification	F	ง
672.6908735	QIEAGR	gi 11466827	LOC_Os01g57958	chloroplast 50S ribosomal	translation	F	ง
509.5935889	GASMK	gi 115434038	LOC_Os01g01680	expressed protein	unknown	H	ง
657.3159242	AAVEIR	gi 13569998	LOC_Os10g41150	aminotransferase	cellular process	F	ง
649.5242151	TAATSAK	gi 62734199	LOC_Os11g07650	retrotransposon protein	transposon	H	ง

ตารางที่ ข-4 (ต่อ) แบบรูปโปรตีนเมื่อชั่วโมงที่ 24 มีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 42 ชนิด

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	function	Venn	Cluster
545.7328122	GNPMK	gij115471319	LOC_Os07g13520	expressed protein	unknown	H	๓
854.3621672	AAAAQGLPR	gij46576002	LOC_Os05g40000	expressed protein	unknown	H	๓
1220.503495	AIMYREVVPK	gij38346631	LOC_Os04g31180	retrotransposon protein	transposon	F	๓
586.682009	VDVQK	gij115460932	LOC_Os04g55260	thiamine-repressible mitochondrial transport	unknown	F	๓
506.4160306	ANSSK	gij54290903	LOC_Os06g21630	hypothetical protein	unknown	F	๓
558.2599643	AREGK	gij42407691	LOC_Os12g21950	expressed protein	unknown	F	๓
808.6517909	MDVEATK	gij115479663	LOC_Os09g29239	purine permease	transport	F	๓
550.4324072	IFSTS	gij77555303	LOC_Os12g26670	hypothetical protein	unknown	H	๓
1070.476768	TRPIAVSSKL	gij115467402	LOC_Os06g14240	hsp20/alpha crystallin family protein	metabolic process	H	๓
630.1008255	GGRTLK	gij77551355	LOC_Os11g34120	exportin 1, putative	unknown	H	๓
769.7548436	QQVGALR	gij115466808	LOC_Os06g08640	transferase family protein	metabolic process	H	๓
773.3231807	TVADVLR	gij218188752	LOC_Os01g45880	retrotransposon protein	transposon	O	๓
1659.522418	VCNPSVGQ WNMINK	gij31712081	LOC_Os03g47820	PINHEAD, putative, expressed	embryo development	F	๓
950.5717324	MEKEGGDGK	gij125527394	LOC_Os01g50490	cytochrome P450, putative, expressed	metabolic process	H	๓
736.8598277	IWGMSK	gij297719995	LOC_Os01g29230	expressed protein	unknown	F	๓

ตารางที่ ข-5 รากข้าว LPT123 มี 51 โปรตีนที่ Up-regulated เนื่องจากภาวะแล้งเมื่อเทียบกับภาวะปกติ โดยใช้ T-Test ข้อมูล 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	Function	Venn	Cluster
774.9865061	LMINNR	gij 31193918	LOC_Os03g64290	myosin, putative, expressed	cellular process	O	Non sig
791.468935	MILLMR	gij 115465805	LOC_Os05g51550	DNA binding protein, putative, expressed	unknown	O	D3
529.6236065	GVVTR	gij 115438637	LOC_Os01g43270	hydroquinone glucosyltransferase, putative, expressed	metabolic process	Q	D3
627.2342956	EIVR	gij 115440653	LOC_Os01g59890	pentatricopeptide, putative, expressed	nucleic acid metabolic	O	D3
1039.706641	LMIFFLQK	gij 108707190	LOC_Os03g14600	transposon protein	transposon	O	D3
900.3997788	NMGGHQTR	gij 115442527	LOC_Os01g74146	WD repeat-containing protein	signal transduction	B	D3
617.7074951	EMNPK	gij 115472533	LOC_Os07g35004	TKL_IRAK_DUF26-la.4 - DUF26 kinases	protein modification	O	D2
1322.631166	AEAMRLLDMEK	gij 28144877	LOC_Os03g54150	expressed protein	unknown	O	D3
1821.855572	SFYAFGLGSAS YINGIR	gij 115488116	LOC_Os12g17070	radical SAM enzyme, putative, expressed	cellular process	O	D3
1210.903177	VDYSKSTAAR	gij 108862200	LOC_Os12g05144	hypothetical protein	unknown	O	Non sig

ตารางที่ ข-5 รากข้าว LPT123 มี 51 โปรตีนที่ Up-regulated เนื่องจากภาวะแล้งเมื่อเทียบกับภาวะปกติ โดยใช้ T-Test ข้อมูล 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	Function	Venn	Cluster
632.4092941	GRSGTR	gi 37573055	LOC_Os06g11820	expressed protein	unknown	G	D3
810.7654501	VEEMFR	gi 46805744	LOC_Os02g52790	PB1 domain containing protein, expressed	unknown	O	Non sig
1009.570647	MVMFLARK	gi 24431601	LOC_Os03g01930	retrotransposon protein	transposon	O	D3
758.2179202	FMGPYK	gi 116308901	LOC_Os04g18500	retrotransposon protein	transposon	O	D3
1003.861679	DPAIQATYK	gi 115465972	LOC_Os06g02130	G-protein alpha subunit, putative, expressed	nucleic acid metabolic	O	D1
1457.512088	EKTGDMG LSMAPPK	gi 218191189	LOC_Os02g40770	SET domain containing protein, expressed	cellular process	Q	D3
476.4805007	DGSSL	gi 37573171	LOC_Os08g15970	expressed protein	unknown	O	D3
895.7229806	GHERQDR	gi 108709496	LOC_Os03g38350	expressed protein	unknown	O	D3
849.2264147	QGMGVTEK	gi 27817893	LOC_Os07g37990	glycosyltransferase sugar-binding region containing DXD motif	metabolic process	Q	D2
506.4160306	ANSSK	gi 54290903	LOC_Os06g21630	hypothetical protein	unknown	O	D1

ตารางที่ ข-5 รากข้าว LPT123 มี 51 โปรตีนที่ Up-regulated เนื่องจากภาวะแล้งเมื่อเทียบกับภาวะปกติ โดยใช้ T-Test ข้อมูล 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	Function	Venn	Cluster
755.9921508	AATALRR	gi 29367531	LOC_Os06g14190	NF-X1-type zinc finger protein	nucleic acid metabolic	Q	D3
848.6668003	SVEGSQNK	gi 297609769	LOC_Os09g32810	ribulose-phosphate 3-epimerase	metabolic process	O	D3
521.7318057	SSGGSK	gi 28376688	LOC_Os03g62340	protein kinase family protein	protein modification	O	D3
765.4607719	VVAPPER	gi 115454971	LOC_Os03g50885	actin, putative, expressed	cellular organization	O	D3
1758.169469	GYLIDFNLAN DLHQK	gi 78709014	LOC_Os10g41390	protein kinase domain containing protein	protein modification	O	D3
801.026067	TKDGLLR	gi 77552108	LOC_Os11g41730	transposon protein	transposon	G	D3
1677.784834	HYKKPEVF YDLLK	gi 77553129	LOC_Os12g07150	amidase family protein, putative, expressed	metabolic process	O	D3
798.7301259	GVGSVPGAR	gi 115455337	LOC_Os03g53730	flavoprotein wrbA, putative, expressed	metabolic process	O	Non sig
813.5602232	IYVYTR	gi 115454045	LOC_Os03g40540	cytochrome P450, putative, expressed	metabolic process	O	Non sig

ตารางที่ ข-5 รากข้าว LPT123 มี 51 โปรตีนที่ Up-regulated เนื่องจากภาวะแล้งเมื่อเทียบกับภาวะปกติ โดยใช้ T-Test ข้อมูล 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	Function	Venn	Cluster
841.7823322	WRPAGKK	gi 22122920	LOC_Os10g37830	OsFBX391 - F-box domain	protein modification	O	D3
878.7486258	DVYDLQK	gi 21693907	LOC_Os03g36200	retrotransposon protein	transposon	G	D3
656.8395888	SHTWK	gi 62733988	LOC_Os11g16250	expressed protein	unknown	Q	D3
896.2791971	CIGMADSK	gi 49328080	LOC_Os05g38980	respiratory burst oxidase, putative, expressed	metabolic process	O	D3
454.4267413	GPPGK	gi 22711562	LOC_Os10g09570	OsWAK107 - OsWAK receptor-like protein OsWAK-RLP	signal transduction	O	Non sig
571.9175832	NTIPK	gi 38346531	LOC_Os04g11700	retrotransposon protein, putative, unclassified	transposon	O	D2
593.3712051	FGDEK	gi 115444247	LOC_Os02g05692	zinc finger, C3HC4 type domain	unknown	O	Non sig
519.238614	AATEK	gi 42761402	LOC_Os08g41350	FAD-binding domain-containing protein, putative, expressed	metabolic process	O	D3
877.0306834	FSSVFHR	gi 115463683	LOC_Os05g32440	expressed protein	cellular process	O	Non sig

ตารางที่ ข-5 รากข้าว LPT123 มี 51 โปรตีนที่ Up-regulated เนื่องจากภาวะแล้งเมื่อเทียบกับภาวะปกติ โดยใช้ T-Test ข้อมูล 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	Function	Venn	Cluster
586.682009	VDVQK	gi 115460932	LOC_Os04g55260	thiamine-repressible mitochondrial transport protein THI74	unknown	○	D3
793.6750805	AIHILAR	gi 54291576	LOC_Os06g51520	lysine ketoglutarate reductase trans-splicing related 1	unknown	○	D3
1271.58764	MVLQRGGG PQGR	gi 297723601	LOC_Os05g01050	DNA-binding protein- related	unknown	○	D3
848.0718685	IRTMPK	gi 19881559	LOC_Os10g17140	retrotransposon protein	transposon	○	D3
490.8098964	TSGVK	gi 115446021	LOC_Os02g26300	expressed protein	unknown	○	D3
716.8779834	GGREGR	gi 15341588	LOC_Os10g07050	expressed protein	unknown	○	Non sig
634.0467303	NSTVSK	gi 62733734	LOC_Os11g13990	AAA-type ATPase family protein, putative, expressed	cellular organization	Ⓞ	D3
1404.32361	IVPDIASLHD VVK	gi 77550985	LOC_Os11g29530	retrotransposon protein	transposon	○	D3

ตารางที่ ข-5 รากข้าว LPT123 มี 51 โปรตีนที่ Up-regulated เนื่องจากภาวะแล้งเมื่อเทียบกับภาวะปกติ โดยใช้ T-Test ข้อมูล 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	Function	Venn	Cluster
470.0424037	AGAPR	gi 18676394	LOC_Os10g05970	POEI12 - Pollen Ole e I allergen and extensin family protein precursor, expressed	unknown	O	D3
885.5514311	DNGAWAIK	gi 125582933	LOC_Os02g41480	OsWAK12 - OsWAK receptor-like cytoplasmic kinase OsWAK-RLCK, expressed	protein modification	O	D3
1485.803222	GGGGGQQRG GNTGNGGR	gi 52353388	LOC_Os05g45130	retrotransposon protein, putative, unclassified, expressed	transposon	H	D3
864.1294775	AAASSTTR	gi 115445245	LOC_Os02g14460	peroxidase precursor, putative, expressed	metabolic process	O	D3
845.4976997	GELVAAMR	gi 115454307	LOC_Os03g44170	glutathione S-transferase, putative, expressed	metabolic process	I	D3

ตารางที่ ข-6 รากข้าว LPT123 มี 17 โปรตีนที่ Down-regulated เนื่องจากภาวะแล้งเมื่อเทียบกับภาวะปกติ โดยใช้ T-Test ข้อมูล 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	Function	Venn	Cluster
600.6924326	GRSIIG	gi 20160775	LOC_Os01g71180	pentatricopeptide repeat protein PPR1106-17	unknown	○	D4
622.8531193	IDYGR	gi 77552768	LOC_Os12g01060	RNase P subunit p30, putative, expressed	nucleic acid metabolic	○	D4
657.1283427	GSPLQR	gi 6689924	LOC_Os06g49430	CGMC_MAPKCMGC_2.11	signal transduction	○	Non sig
886.4399409	DMNMSFK	gi 115470309	LOC_Os07g02360	expressed protein	unknown	○	Non sig
755.8172852	LQLGGNR	gi 108706311	LOC_Os03g06510	KIP1, putative, expressed	unknown	○	Non sig
627.123935	VPEER	gi 27260999	LOC_Os07g29630	SNF7 domain containing protein, putative, expressed	cellular process	○	D4
691.5471874	KVGGGFK	gi 115473399	LOC_Os07g42800	heat shock protein DnaJ, putative, expressed	cellular process	○	Non sig
687.2987335	ALPATSK	gi 115480924	LOC_Os10g02760	hydroxyproline-rich glycoprotein	unknown	○	Non sig

ตารางที่ ข-6 (ต่อ) รากข้าว LPT123 มี 17 โปรตีนที่ Down-regulated เนื่องจากภาวะแล้งเมื่อเทียบกับภาวะปกติ โดยใช้ T-Test ข้อมูล 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	Function	Venn	Cluster
1000.145613	FGAAGLDPVR	gi 115470699	LOC_Os07g06840	gibberellin receptor GID1L2	metabolic process	Q	D1
630.8973136	IAAAER	gi 38345512	LOC_Os04g59280	retrotransposon protein	transposon	O	Non sig
1535.526944	DDISGMQLS GNKVR	gi 115448975	LOC_Os02g53330	1-aminocyclopropane-1- carboxylate deaminase	cellular process	O	D1
1082.365789	GIMNMLFDK	gi 115467750	LOC_Os06g20354	PPR repeat domain containing protein	cellular process	O	D4
1633.04794	SVDVGFISV HKTTR	gi 50252862	LOC_Os09g17570	expressed protein	unknown	H	D1
536.5300663	GMSAR	gi 62733555	LOC_Os03g50110	transcription regulator, putative, expressed	nucleic acid metabolic	O	D4
504.0816146	KLASS	gi 115487334	LOC_Os12g05230	ATP-dependent RNA helicase	unknown	O	D4
647.8989186	ATSAGSR	gi 62733138	LOC_Os11g26560	expressed protein	unknown	O	D4
736.8168281	SSLITMA	gi 77553191	LOC_Os12g08420	retrotransposon protein, putative, unclassified	transposon	O	D2

ตารางที่ ข-7 รากข้าว LPT123-TC171 มี 37 โปรตีนที่ Up-regulated เนื่องจากภาวะแล้งเมื่อเทียบกับภาวะปกติ โดยใช้ T-Test ข้อมูล 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	Function	Venn	Cluster
1017.85848	NLEDILMR	gi 62734004	LOC_Os11g20689	exosome complex exonuclease, putative	nucleic acid metabolic	H	D1
508.9155433	VMGFG	gi 115445863	LOC_Os02g22160	DNA binding protein, putative, expressed	unknown	O	D1
836.7434142	QFPGSMR	gi 115443955	LOC_Os02g03470	tetratricopeptide repeat containing protein	unknown	O	D4
1000.145613	FGAAGLDPVR	gi 115470699	LOC_Os07g06840	gibberellin receptor GID1L2	metabolic process	Q	D1
664.1616166	CTPCK	gi 115468286	LOC_Os06g32860	nucleic acid metabolic	nucleic acid metabolic	O	D1
818.1852313	GDVKICK	gi 77553892	LOC_Os12g09910	retrotransposon protein	transposon	O	D4
767.0894553	ASHIDPK	gi 62734517	LOC_Os11g22550	retrotransposon protein	transposon	O	D1
545.7328122	GNPMK	gi 115471319	LOC_Os07g13520	expressed protein	unknown	H	D1
498.5311737	GGVDR	gi 38347559	LOC_Os04g04950	copper methylamine oxidase precursor	metabolic process	O	D4
854.3621672	AAAAQGLPR	gi 46576002	LOC_Os05g40000	expressed protein	unknown	O	D4

ตารางที่ ข-7 (ต่อ) รากข้าว LPT123-TC171 มี 37 โปรตีนที่ Up-regulated เนื่องจากภาวะแล้งเมื่อเทียบกับภาวะปกติ โดยใช้ T-Test ข้อมูล 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	Function	Venn	Cluster
940.5844563	LEDLPLSR	gi 297722407	LOC_Os03g45120	ribosome inactivating protein	unknown	O	D1
750.1078008	CRCAGK	gi 77551591	LOC_Os11g37330	pentatricopeptide repeat domain	metabolic process	O	D3
578.1469529	SSGDGR	gi 21740446	LOC_Os04g45390	retrotransposon protein	transposon	O	D4
900.2329739	GSAAAEPGR	gi 38423988	LOC_Os08g25370	retrotransposon protein	transposon	O	D4
450.1914639	SAMGA	gi 77551952	LOC_Os11g40270	expressed protein	unknown	O	D4
822.0115966	VPRPGGNK	gi 115461478	LOC_Os04g59190	peroxidase precursor, putative, expressed	metabolic process	H	D4
1289.256441	DVSGKYF ADCK	gi 62734078	LOC_Os11g07922	short chain dehydrogenase/reductase protein	metabolic process	O	Non sig
560.02602	IADLE	gi 38346252	LOC_Os04g06020	transposon protein	transposon	O	D4

ตารางที่ ข-7 (ต่อ) รากข้าว LPT123-TC171 มี 37 โปรตีนที่ Up-regulated เนื่องจากภาวะแล้งเมื่อเทียบกับภาวะปกติ โดยใช้ T-Test ข้อมูล 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	Function	Venn	Cluster
973.8341453	NEASKDGPASA	gi 24431597	LOC_Os03g01970	THO complex subunit 1, putative, expressed	nucleic acid metabolic	O	Non sig
711.4071844	RPSTPR	gi 47848560	LOC_Os02g18020	retrotransposon protein	transposon	O	D1
1220.503495	AIMYREVVPK	gi 38346631	LOC_Os04g31180	retrotransposon protein	transposon	H	D1
721.4373199	HPLAER	gi 77555124	LOC_Os12g23550	expressed protein	unknown	O	D4
724.506078	MDAMDK	gi 115451391	LOC_Os03g10410	expressed protein	unknown	O	D1
1127.481191	FEIGMTFAGR	gi 77552468	LOC_Os11g44180	transposon protein	transposon	O	D1
508.9839311	GGTMK	gi 38346030	LOC_Os04g11250	expressed protein	unknown	O	Non sig
649.5242151	TAATSAK	gi 62734199	LOC_Os11g07650	retrotransposon protein	transposon	O	D1
552.5464181	MTASK	gi 77551369	LOC_Os11g34700	ZOS11-04 - C2H2 zinc finger protein, expressed	cellular process	O	D1
830.1382846	QLKELVT	gi 62733749	LOC_Os11g11650	expressed protein	unknown	O	D1
1605.77161	RVLEDDMF PSTPGK	gi 115449159	LOC_Os02g54890	UDP-glucuronate 4-epimerase	metabolic process	O	D1
719.1826626	MDAAADK	gi 218202588	LOC_Os09g37870	expressed protein	unknown	O	D1

ตารางที่ ข-7 (ต่อ) รากข้าว LPT123-TC171 มี 37 โปรตีนที่ Up-regulated เนื่องจากภาวะแล้งเมื่อเทียบกับภาวะปกติ โดยใช้ T-Test ข้อมูล 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	Function	Venn	Cluster
844.9848812	EVADGEAR	gi 50251993	LOC_Os02g01750	expressed protein	unknown	○	D4
1370.441484	MSSSVGGG GGQQFR	gi 115453245	LOC_Os03g25980	polypyrimidine tract- binding protein	nucleic acid metabolic	○	Non sig
626.695823	SVLPGR	gi 45680427	LOC_Os05g45860	glucan endo-1,3-beta- glucosidase precursor	metabolic process	○	D4
1195.277095	AETAKSYLSAR	gi 53981929	LOC_Os05g07310	transposon protein	transposon	○	D4
709.7347568	SGKQYK	gi 28269395	LOC_Os03g63074	Ser/Thr protein phosphatase family protein, expressed	cellular process	○	D1
547.2824858	IITTT	gi 115456689	LOC_Os03g63900	1-aminocyclopropane-1- carboxylate oxidase 2	metabolic process	○	Non sig
651.571783	GFSEGR	gi 51091102	LOC_Os06g09050	glutamate receptor precursor, putative, expressed	transport	○	D4

ตารางที่ ข-8 รากข้าว LPT123-TC171 มี 25 โปรตีนที่ Down-regulated เนื่องจากภาวะแล้งเมื่อเทียบกับภาวะปกติ โดยใช้ T-Test ข้อมูล 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	Function	Venn	Cluster
952.6329584	ADPELPRR	gi 125561886	LOC_Os08g37030	gibberellin receptor GID1L2	metabolic process	O	D2
901.3646534	SAPDRIDK	gi 115466064	LOC_Os06g02830	expressed protein	unknown	O	D1
866.6800137	DTVVFMR	gi 25553609	LOC_Os07g08520	auxin response factor, putative, expressed	signal transduction	O	Non sig
656.8395888	SHTWK	gi 62733988	LOC_Os11g16250	expressed protein	unknown	Q	D3
730.3475365	SLVAEGR	gi 77554991	LOC_Os12g19860	expressed protein	Unknown	O	D3
665.6032516	SSGGTTR	gi 125560037	LOC_Os08g03630	acyl-activating enzyme 14, putative, expressed	cellular process	O	D2
831.5233939	AEEISRK	gi 218196970	LOC_Os05g39770	aminotransferase, putative, expressed	metabolic process	O	Non sig
755.3538803	AEAGDHR	gi 125603349	LOC_Os08g31240	FACT complex subunit SPT16	cellular organization	O	Non sig
755.9921508	AATALRR	gi 29367531	LOC_Os06g14190	NF-X1-type zinc finger protein	nucleic acid metabolic	Q	D3
934.8753857	AVFLGLCR	gi 78709030	LOC_Os10g41850	expressed protein	unknown	O	D1


ตารางที่ ข-8 (ต่อ) รากข้าว LPT123-TC171 มี 25 โปรตีนที่ Down-regulated เนื่องจากภาวะแล้งเมื่อเทียบกับภาวะปกติ โดยใช้ T-Test ข้อมูล 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง

Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	Function	Venn	Cluster
623.3529406	GCGSSR	gi 51091963	LOC_Os01g43330	extra-large G-protein-related	unknown	I	D1
634.0467303	NSTVSK	gi 62733734	LOC_Os11g13990	AAA-type ATPase family protein	cellular organization	G	D3
964.5966768	GGQSSTM AAR	gi 62701648	LOC_Os11g05710	expressed protein	unknown	O	Non sig
964.0910911	STYVGIGLR	gi 77551524	LOC_Os11g36110	retrotransposon protein	transposon	O	D2
650.2286481	GNWMK	gi 115437084	LOC_Os01g33684	disease resistance RPP13-like protein 1	unknown	O	D4
1480.813012	SWCGWK TTLNTK	gi 77555601	LOC_Os12g27400	transposon protein	transposon	O	Non sig
625.513468	GNPPSR	gi 31432206	LOC_Os10g29230	MBTB49	cellular process	O	D2
758.7303174	LAADDKK	gi 115464309	LOC_Os05g38530	DnaK family protein, putative, expressed	metabolic process	I	D1

ตารางที่ ข-8 (ต่อ) รากข้าว LPT123-TC171 มี 25 โปรตีนที่ Down-regulated เนื่องจากภาวะแล้งเมื่อเทียบกับภาวะปกติ โดยใช้ T-Test ข้อมูล 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง


Mass	Peptide	Protein	Locus	Detail	Function	Venn	Cluster
845.4976997	GELVAAMR	gi 115454307	LOC_Os03g44170	glutathione S-transferase, putative, expressed	metabolic process	I	D3
619.8694441	AHHTR	gi 78708517	LOC_Os10g25100	expressed protein	unknown	O	Non sig
1457.512088	EKTGDMG LSMAPPK	gi 218191189	LOC_Os02g40770	SET domain containing protein, expressed	cellular process	Q	D3
849.2264147	QGMGVTEK	gi 27817893	LOC_Os07g37990	glycosyltransferase sugar-binding region containing DXD motif	metabolic process	Q	D2
734.4564456	ASQESSK	gi 52076163	LOC_Os04g31010	expressed protein	unknown	O	D2
470.8753252	GAAPR	gi 29467532	LOC_Os08g03620	tetratricopeptide repeat	unknown	O	D3
529.6236065	GVVTR	gi 115438637	LOC_Os01g43270	hydroquinone glucosyltransferase, putative, expressed	metabolic process	Q	D3

ภาคผนวก ค



Rice Genome Annotation Project

Funded by the NSF



Home
Downloads

Rice Gene Annotation
Analyses/Tools
Genome Browser

Oryza sativa ssp japonica cv. Nipponbare
LOC_Os06g14190
MSU Osa1 Release 7 Annotation

[Download Sequence](#) | [Show LOC_Os06g14190 in Rice Genome Browser](#)

Gene Identification

Gene Product Name: NF-X1-type zinc finger protein, putative, expressed
Locus Name: [LOC_Os06g14190.1](#)


Gene Ontology Classification

GO accession	Type	Name	Code	With
GO:0003700	molecular_function	sequence-specific DNA binding transcription factor activity	IEA	TAIR:AT1G10170
GO:0009628	biological_process	response to abiotic stimulus	IEA	TAIR:AT1G10170
GO:0005488	molecular_function	binding	IEA	TAIR:AT1G10170
GO:0009987	biological_process	cellular process	IEA	TAIR:AT1G10170
GO:0008152	biological_process	metabolic process	IEA	TAIR:AT1G10170
GO:0008150	biological_process	biological_process	IEA	TAIR:AT1G10170
GO:0009607	biological_process	response to biotic stimulus	IEA	TAIR:AT1G10170
GO:0006950	biological_process	response to stress	IEA	TAIR:AT1G10170
GO:0006139	biological_process	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	IEA	TAIR:AT1G10170
GO:0009058	biological_process	biosynthetic process	IEA	TAIR:AT1G10170
GO:0005634	cellular_component	nucleus	IEA	TAIR:AT1G10170

Gene Attributes

Chromosome: Chr6
CDS Coordinates (5'-3'): 7924037 - 7920479
Nucleotide length: 2886
Predicted protein length: 962
Predicted molecular weight: 103886
Predicted pI: 7.9232

Gene Structure



ภาพที่ ค-1 โครงสร้างยีน และหน้าที่ของโปรตีน NF-X1-type zinc finger protein, putative, expressed (LOC_Os06g14190) ในฐานข้อมูล rice genome annotation project (<http://rice.plantbiology.msu.edu>) (Ouyang et al., 2007)

Protein: NF-X1-type zinc finger

>LOC_Os06g14190

MICYDMVRRSAPVWSCGSCFSIFHLPCIRKWARSPASAADASDPDSSWRCPGCQSVHAVP
 ARELAYTCFCGRRREPPNDLFLTPHSCGEPCKPLEKADPAVKADDAAATRCPHVCVLQC
 HPGPCPPCKAFAPDRLCPCGKQTIIVRRCADRTTPVTCGQRCDRLLPCRRHRCEKVCHTGP
 CGDCNVLISARFCGKKTETLLCGEMELKGNLSEKDGVFSCSEACSHMLSCGNHACQDIC
 HPGPCGECELMPGKVTACHCGKTRLLEKRASCLDPIPTCDKVCDDKLLPCGVHRCKVTCHE
 GDCPPCVVVEQRCRCGSSGQMVVECYKVLVEEFRCNKPCGRKKNCGRHRCECCPLSKP
 LARLEGGNWDPHLCQIPCGKKLRGQHGCQLLCHSGHCPPCLETIFNDLTCACGRTSIPP
 PLPCGTPTPSCPHQCLVPQPCGHPATHQCHFQDCPPCVVPMRECIQGHVVLRNIPCGSK
 DIRCNQPCGKNRQCGMHACNRSCHPSPCDPPPANGDASSSTGGRASCGQVCGAPRECKH
 TCTAPCHPSSPCDLRCEFPMTIACSCGRITATVPCSAGGTANGDNMFEVSI IQKLPMLP
 QPVESDGRRVPLGQRKLSCEDECAKMERKRVLAFAFDITPPNLDALHFGENSNASDLLSD
 LFRREPKWVMAIEERCKFLVLGKTRGNSSGNLKVHVVFCHMTKDKRDAIRVIADRWKLSVQ
 AAGWEPKRFITIHPTPKSKAPARILGSKPGVFVAASHPPFDPLVMDPRLVVAMLDLPRD
 ADVSALVLRFGGECVWLNNDKNAVAVFNDPARAATALRRLDYGSAYQGAAVFLPSSAQ
 PGNVWVAGQKDGVAATKSSANPWKKATASEPDPSSGDWTGVLGQAPGSVWRRGGDTVAQV
 MGTSNRWNALESDAATSSRPVEESKPAPRTDAVSSAGPSTAPPVSKMQPEVEVDDWEEACE*

ภาพที่ ค-2 ลำดับพอลิเปปไทด์ AATALRR ที่ระบุชนิดของโปรตีนโดยใช้ MASCOT software (Matrix Science, London, UK) (Perkins et al., 1999) โดยมีค่าคะแนนเท่ากับ 19.48 ตรงกับ gi|52077107; gi|29367531; gi|115467398; gi|125596724; gi|218197906 ในฐานข้อมูล NCBI nr 20121015 และตรงกับ NF-X1-type zinc finger (LOC_Os06g14190) ในฐานข้อมูล RGAP 7

ภาพที่ ค-3 การเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ CDS (Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW)
 ที่ให้โปรตีน NF-X1-type zinc finger บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือ ตำแหน่งที่ใช้ในการออกแบบ primer

```

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 |          GGCCCGCCCGCAGGAGAGGCCTTCCGCTGCGCCGCCCGCCCGCCGCGCA 50
gi | 115467397 | ref | NM_001063833.    GGCCCGCCCGCAGGAGAGGCCTTCCGCTGCGCCGCCCGCCCGCCGCGCA 50
LOC_Os06g14190.1                          -----

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 |          GCAGCAGCAGCGGCAGCAGCATGCGGGCGCCCGCTCCGACCCGTGCCGCGG 100
gi | 115467397 | ref | NM_001063833.    GCAGCAGCAGCGGCAGCAGCATGCGGGCGCCCGCTCCGACCCGTGCCGCGG 100
LOC_Os06g14190.1                          -----

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 |          CGCCTGCGCCTGCGCGTGTGGCGGGCAGCAAGGCGGGCGCCGGGGGAAAT 150
gi | 115467397 | ref | NM_001063833.    CGCCTGCGCCTGCGCGTGTGGCGGGCAGCAAGGCGGGCGCCGGGGGAGAT 150
LOC_Os06g14190.1                          -----

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 |          KGGGCSGTTCCGCAGCTGGTGCAGGAGATCCAGGACAAGCTGGCGAGGGG 200
gi | 115467397 | ref | NM_001063833.    GGGGCGGTGCCGAGCTGGTGCAGGAGATCCAGGACAAGCTGGCGAGGGG 200
LOC_Os06g14190.1                          -----

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 |          GGGCGTGGAGTGCATGATCTGCTACGACATGGTGGCGGGTCCGGCGCCG 250
gi | 115467397 | ref | NM_001063833.    GGGCGTGGAGTGCATGATCTGCTACGACATGGTGGCGGGTCCGGCGCCG 250
LOC_Os06g14190.1                          -----
                                           *-----*
                                           *ATGATCTGCTACGACATGGTGGCGGGTCCGGCGCCG*
                                           *-----*

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 |          TGTGGTCTGCGGCAGCTGCTTCTCCATCTTCCACCTCCCTGCATCCGC 300
gi | 115467397 | ref | NM_001063833.    TGTGGTCTGCGGCAGCTGCTTCTCCATCTTCCACCTCCCTGCATCCGC 300
LOC_Os06g14190.1                          -----
                                           *-----*
                                           *TGTGGTCTGCGGCAGCTGCTTCTCCATCTTCCACCTCCCTGCATCCGC*
                                           *-----*

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 |          AAGTGGGCGCGTCCCCGGCGTCCGCGCCGACGCGTCCGACCCGGACTC 350
gi | 115467397 | ref | NM_001063833.    AAGTGGGCGCGTCCCCGGCGTCCGCGCCGACGCGTCCGACCCGGACTC 350
LOC_Os06g14190.1                          -----
                                           *-----*
                                           *AAGTGGGCGCGTCCCCGGCGTCCGCGCCGACGCGTCCGACCCGGACTC*
                                           *-----*

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 |          CTCCTGGCGCTGCCCGGGTGCCAGTCCGTGCACGCCGTCCCGCGCGCG 400
gi | 115467397 | ref | NM_001063833.    CTCCTGGCGCTGCCCGGGTGCCAGTCCGTGCACGCCGTCCCGCGCGCG 400
LOC_Os06g14190.1                          -----
                                           *-----*
                                           *CTCCTGGCGCTGCCCGGGTGCCAGTCCGTGCACGCCGTCCCGCGCGCG*
                                           *-----*

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 |          AGCTCGCCTACACCTGCTTCTGCGGGCGCCGCGGAGCCACCCAAACGAT 450
gi | 115467397 | ref | NM_001063833.    AGCTCGCCTACACCTGCTTCTGCGGGCGCCGCGGAGCCACCCAAACGAT 450
LOC_Os06g14190.1                          -----
                                           *-----*
                                           *AGCTCGCCTACACCTGCTTCTGCGGGCGCCGCGGAGCCACCCAAACGAT*
                                           *-----*

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 |          CTCTTCCTCARGCCGCACTCCTGCGGGCAGCCCTGCTCCAAGCCCTCGA 500
gi | 115467397 | ref | NM_001063833.    CTCTTCCTCARGCCGCACTCCTGCGGGCAGCCCTGCTCCAAGCCCTCGA 500
LOC_Os06g14190.1                          -----
                                           *-----*
                                           *CTCTTCCTCARGCCGCACTCCTGCGGGCAGCCCTGCTCCAAGCCCTCGA*
                                           *-----*

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 |          GAAGGCTGACCTGCGGTGAAGGCCGACGACGCTGCAGCCACCAGGTGCC 550
gi | 115467397 | ref | NM_001063833.    GAAGGCTGACCTGCGGTGAAGGCCGACGACGCTGCAGCCACCAGGTGCC 550
LOC_Os06g14190.1                          -----
                                           *-----*
                                           *GAAGGCTGACCTGCGGTGAAGGCCGACGACGCTGCAGCCACCAGGTGCC*
                                           *-----*

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 |          CCCATGTGTGCGTCCCTGCAGTGCCACCCAGGGCCCTGCCCGCCTTGCAA 600
gi | 115467397 | ref | NM_001063833.    CCCATGTGTGCGTCCCTGCAGTGCCACCCAGGGCCCTGCCCGCCTTGCAA 600
LOC_Os06g14190.1                          -----
                                           *-----*
                                           *CCCATGTGTGCGTCCCTGCAGTGCCACCCAGGGCCCTGCCCGCCTTGCAA*
                                           *-----*

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 |          GCGTTCGCGCCGGACCGGCTGTGCCCATGCGGCAAGCAGACCATTGTGCG 650
gi | 115467397 | ref | NM_001063833.    GCGTTCGCGCCGGACCGGCTGTGCCCATGCGGCAAGCAGACCATTGTGCG 650
LOC_Os06g14190.1                          -----
                                           *-----*
                                           *GCGTTCGCGCCGGACCGGCTGTGCCCATGCGGCAAGCAGACCATTGTGCG*
                                           *-----*

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 |          GCGGTGTGCGGACCGGACAACGCCTGTGACGTGCGGGCAGCGGTGTGATC 700
gi | 115467397 | ref | NM_001063833.    GCGGTGTGCGGACCGGACAACGCCTGTGACGTGCGGGCAGCGGTGTGATC 700
LOC_Os06g14190.1                          -----
                                           *-----*
                                           *GCGGTGTGCGGACCGGACAACGCCTGTGACGTGCGGGCAGCGGTGTGATC*
                                           *-----*

```

```

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | GGCTGCTCCCCTGCCGGAGGCACCGCTGCGAGAAGGTCTGCCACACTGGA 750
gi | 115467397 | ref | NM_001063833. GGCTGCTCCCCTGCCGGAGGCACCGCTGCGAGAAGGTCTGCCACACTGGA 750
LOC_Os06g14190.1 ***** 537

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | CCATGCGGGGACTGTAATGTTCTCATTCTGCCCGGTGTTTCTGTGGGAA 800
gi | 115467397 | ref | NM_001063833. CCATGCGGGGACTGTAATGTTCTCATTCTGCCCGGTGTTTCTGTGGGAA 800
LOC_Os06g14190.1 ***** 587

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | GAAGACAGAGACATTGCTGTGTGGAGAGATGGAAC T GAAAGGGAATTTAT 850
gi | 115467397 | ref | NM_001063833. GAAGACAGAGACATTGCTGTGTGGAGAGATGGAAC T GAAAGGGAATTTAT 850
LOC_Os06g14190.1 ***** 637

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | CTGAGAAGGATGGAGTGTTCATGCAGTGAGGCCCTGCAGCCATATGCTG 900
gi | 115467397 | ref | NM_001063833. CTGAGAAGGATGGAGTGTTCATGCAGTGAGGCCCTGCAGCCATATGCTG 900
LOC_Os06g14190.1 ***** 687

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | TCGTGCGGAAATCATGCCTGCCAAGACATTTGCCACCCAGGGCCATGCCG 950
gi | 115467397 | ref | NM_001063833. TCGTGCGGAAATCATGCCTGCCAAGACATTTGCCACCCAGGGCCATGCCG 950
LOC_Os06g14190.1 ***** 737

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | GGAGTGCGAAC T TATGCCAGGGAAGGTCACAGCATGCCATTGTGGGAAGA 1000
gi | 115467397 | ref | NM_001063833. GGAGTGCGAAC T TATGCCAGGGAAGGTCACAGCATGCCATTGTGGGAAGA 1000
LOC_Os06g14190.1 ***** 787

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | CAAGGCTGCTGGAGAAGAGAGCAAGCTGCTTGGACCCGATCCCAACCTGT 1050
gi | 115467397 | ref | NM_001063833. CAAGGCTGCTGGAGAAGAGAGCAAGCTGCTTGGACCCGATCCCAACCTGT 1050
LOC_Os06g14190.1 ***** 837

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | GACAAGGTGTGCGACAAGAAGCTGCCTTGTGGTGTGCATAGGTGCAAGGT 1100
gi | 115467397 | ref | NM_001063833. GACAAGGTGTGCGACAAGAAGCTGCCTTGTGGTGTGCATAGGTGCAAGGT 1100
LOC_Os06g14190.1 ***** 887

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | CACATGCCATGAGGGAGACTGCCACCTTGTGTGGTTCGTGTGGAACAGA 1150
gi | 115467397 | ref | NM_001063833. CACATGCCATGAGGGAGACTGCCACCTTGTGTGGTTCGTGTGGAACAGA 1150
LOC_Os06g14190.1 ***** 937

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | GGTGCCGCTGTGGTTCATCAGGCCAGATGGTGGAGTGCTACAAGGTCTTG 1200
gi | 115467397 | ref | NM_001063833. GGTGCCGCTGTGGTTCATCAGGCCAGATGGTGGAGTGCTACAAGGTCTTG 1200
LOC_Os06g14190.1 ***** 987

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | GAGGAAGAAATCCGTTGCAACAAGCCTTGTGGGCGAAAGAAAAACTGTGG 1250
gi | 115467397 | ref | NM_001063833. GAGGAAGAAATCCGTTGCAACAAGCCTTGTGGGCGAAAGAAAAACTGTGG 1250
LOC_Os06g14190.1 ***** 1037

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | GAGGCACAGGTGTAGTGAGTGCTGTTGCCACTTTCAAAGCCGCTCGCTC 1300
gi | 115467397 | ref | NM_001063833. GAGGCACAGGTGTAGTGAGTGCTGTTGCCACTTTCAAAGCCGCTCGCTC 1300
LOC_Os06g14190.1 ***** 1087

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | GGCTTGAAGGGGTAATGGGATCCCCATCTCTGCCAGATACCGTGTGGC 1350
gi | 115467397 | ref | NM_001063833. GGCTTGAAGGGGTAATGGGATCCCCATCTCTGCCAGATACCGTGTGGC 1350
LOC_Os06g14190.1 ***** 1137

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | AAGAAGCTCCGGTGTGGACAGCATGGATGCCAGCTTCTCTGCCATAGTGG 1400
gi | 115467397 | ref | NM_001063833. AAGAAGCTCCGGTGTGGACAGCATGGATGCCAGCTTCTCTGCCATAGTGG 1400
LOC_Os06g14190.1 ***** 1187

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | TCACTGCCCGCCCTGCCTTGAGACCATATTCATGATCTGACTTGTGCCT 1450
gi | 115467397 | ref | NM_001063833. TCACTGCCCGCCCTGCCTTGAGACCATATTCATGATCTGACTTGTGCCT 1450
LOC_Os06g14190.1 ***** 1237

```

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | GTGGTAGGACATCCATCCCTCCACCGCTTCCTTGCGGCACACCAACTCCA 1500
 gi | 115467397 | ref | NM_001063833. GTGGTAGGACATCCATCCCTCCACCGCTTCCTTGCGGCACACCAACTCCA 1500
 LOC_Os06g14190.1 GTGGTAGGACATCCATCCCTCCACCGCTTCCTTGCGGCACACCAACTCCA 1287

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | TCATGCCACACCAATGCTTAGTTCCCCAGCCATGTGGACATCCGGCGAC 1550
 gi | 115467397 | ref | NM_001063833. TCATGCCACACCAATGCTTAGTTCCCCAGCCATGTGGACATCCGGCGAC 1550
 LOC_Os06g14190.1 TCATGCCACACCAATGCTTAGTTCCCCAGCCATGTGGACATCCGGCGAC 1337

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | GCATCAATGCCATTTTGGGGACTGCCCTCCTTGTGTGTTCCAGTAATGC 1600
 gi | 115467397 | ref | NM_001063833. GCATCAATGCCATTTTGGGGACTGCCCTCCTTGTGTGTTCCAGTAATGC 1600
 LOC_Os06g14190.1 GCATCAATGCCATTTTGGGGACTGCCCTCCTTGTGTGTTCCAGTAATGC 1387

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | GAGAATGCATTGGTGGACATGTGGTGTGCTGAGGAACATCCCTTGTGGTTCT 1650
 gi | 115467397 | ref | NM_001063833. GAGAATGCATTGGTGGACATGTGGTGTGCTGAGGAACATCCCTTGTGGTTCT 1650
 LOC_Os06g14190.1 GAGAATGCATTGGTGGACATGTGGTGTGCTGAGGAACATCCCTTGTGGTTCT 1437

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | AAGGATATCAGATGCAACCAACCTTGTGAAAGAACCGGCAATGTGGAAT 1700
 gi | 115467397 | ref | NM_001063833. AAGGATATCAGATGCAACCAACCTTGTGAAAGAACCGGCAATGTGGAAT 1700
 LOC_Os06g14190.1 AAGGATATCAGATGCAACCAACCTTGTGAAAGAACCGGCAATGTGGAAT 1487

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | GCACGCTTGCAACAGGTCTTGCCATCCTTCCCCTTGTGATCCA----- 1743
 gi | 115467397 | ref | NM_001063833. GCACGCTTGCAACAGGTCTTGCCATCCTTCCCCTTGTGATCCA----- 1743
 LOC_Os06g14190.1 GCACGCTTGCAACAGGTCTTGCCATCCTTCCCCTTGTGATCCA----- 1537

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | -----TGTGGACAG 1752
 gi | 115467397 | ref | NM_001063833. -----TGTGGACAG 1752
 LOC_Os06g14190.1 CAAATGGAGATGCTAGCTCAAGTACTGGTGGTAGAGCTTCATGTGGACAG 1587

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | GTATGTGGTGCCCAAGGMCSSAAGGTGGAKYTAMGACATTTG-ACAGCT 1801
 gi | 115467397 | ref | NM_001063833. GTATGTGGTGCCCAAGGAGGGAATGT----AAGCACACTTGCACAGCT 1797
 LOC_Os06g14190.1 GTATGTGGTGCCCAAGGAGGGAATGT----AAGCACACTTGCACAGCT 1632
 ***** . * * * : * * * * *

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | CCATGCCACCCAT-ATTACCTTGCCAGATTTGAGATGTGAATTCCTTAT 1850
 gi | 115467397 | ref | NM_001063833. CCATGCCACCCATCATCACCTTGCCAGATTTGAGATGTGAATTCCTTAT 1847
 LOC_Os06g14190.1 CCATGCCACCCATCATCACCTTGCCAGATTTGAGATGTGAATTCCTTAT 1682
 ***** * * * * *

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | GACCATTGCCTGCTCTTGTGGCCGTATCACTGCAACTGTGCCATGCAGTG 1900
 gi | 115467397 | ref | NM_001063833. GACCATTGCCTGCTCTTGTGGCCGTATCACTGCAACTGTGCCATGCAGTG 1897
 LOC_Os06g14190.1 GACCATTGCCTGCTCTTGTGGCCGTATCACTGCAACTGTGCCATGCAGTG 1732

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | CTGGGGGAACCGCCAATGGCGATAAATATGTTTGAAGTATCCATCATAACAG 1950
 gi | 115467397 | ref | NM_001063833. CTGGGGGAACCGCCAATGGCGATAAATATGTTTGAAGTATCCATCATAACAG 1947
 LOC_Os06g14190.1 CTGGGGGAACCGCCAATGGCGATAAATATGTTTGAAGTATCCATCATAACAG 1782

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | AAGCTGCCAATGCCACTCCAGCCGGTGAATCTGATGGGAGGAGGGTACC 2000
 gi | 115467397 | ref | NM_001063833. AAGCTGCCAATGCCACTCCAGCCGGTGAATCTGATGGGAGGAGGGTACC 1997
 LOC_Os06g14190.1 AAGCTGCCAATGCCACTCCAGCCGGTGAATCTGATGGGAGGAGGGTACC 1832

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | ACTTGGGCAGAGGAAGCTCTCTTGTGATGAGGACTGTGCCAAGATGGAGA 2050
 gi | 115467397 | ref | NM_001063833. ACTTGGGCAGAGGAAGCTCTCTTGTGATGAGGACTGTGCCAAGATGGAGA 2047
 LOC_Os06g14190.1 ACTTGGGCAGAGGAAGCTCTCTTGTGATGAGGACTGTGCCAAGATGGAGA 1882

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | GGAAGAGGGTCTTGTGTAAGCATTGACATCACTCCACCAATTTGGAT 2100
 gi | 115467397 | ref | NM_001063833. GGAAGAGGGTCTTGTGTAAGCATTGACATCACTCCACCAATTTGGAT 2097
 LOC_Os06g14190.1 GGAAGAGGGTCTTGTGTAAGCATTGACATCACTCCACCAATTTGGAT 1932

gi | 29367530 | gb | AY224502.1 | GCATTGCATTTTGGTGAGAACTCAAATGCATCGGATTTGCTTCTGACCT 2150
 gi | 115467397 | ref | NM_001063833. GCATTGCATTTTGGTGAGAACTCAAATGCATCGGATTTGCTTCTGACCT 2147
 LOC_Os06g14190.1 GCATTGCATTTTGGTGAGAACTCAAATGCATCGGATTTGCTTCTGACCT 1982

gi 29367530 gb AY224502.1	TTTCCGCGGTGAGCCAAAATGGGTGATGGCCATAGAGGAGAGGTGCAAGT	2200
gi 115467397 ref NM_001063833.	TTTCCGCGGTGAGCCAAAATGGGTGATGGCCATAGAGGAGAGGTGCAAGT	2197
LOC_Os06g14190.1	TTTCCGCGGTGAGCCAAAATGGGTGATGGCCATAGAGGAGAGGTGCAAGT	2032

gi 29367530 gb AY224502.1	TCCTTGTAAGTGGGAAGACAAGAGGCAATTCTTCAGGCAACCTCAAGGTC	2250
gi 115467397 ref NM_001063833.	TCCTTGTAAGTGGGAAGACAAGAGGCAATTCTTCAGGCAACCTCAAGGTC	2247
LOC_Os06g14190.1	TCCTTGTAAGTGGGAAGACAAGAGGCAATTCTTCAGGCAACCTCAAGGTC	2082

gi 29367530 gb AY224502.1	CATGCTCTTGTGCACATGACAAAGGATAAGAGAGATGCTATCAGGGTCAT	2300
gi 115467397 ref NM_001063833.	CATGCTCTTGTGCACATGACAAAGGATAAGAGAGATGCTATCAGGGTCAT	2297
LOC_Os06g14190.1	CATGCTCTTGTGCACATGACAAAGGATAAGAGAGATGCTATCAGGGTCAT	2132

gi 29367530 gb AY224502.1	TGCCGACAGGTGGAAGCTTTCTGTTGAGGCTGCTGGTTGGGAACCCAAAC	2350
gi 115467397 ref NM_001063833.	TGCCGACAGGTGGAAGCTTTCTGTTGAGGCTGCTGGTTGGGAACCCAAAC	2347
LOC_Os06g14190.1	TGCCGACAGGTGGAAGCTTTCTGTTGAGGCTGCTGGTTGGGAACCCAAAC	2182

gi 29367530 gb AY224502.1	GTTTCATTACTATCCATCCACACCGAAGTCAAAGGCGCCTGCTCGCATC	2400
gi 115467397 ref NM_001063833.	GTTTCATTACTATCCATCCACACCGAAGTCAAAGGCGCCTGCTCGCATC	2397
LOC_Os06g14190.1	GTTTCATTACTATCCATCCACACCGAAGTCAAAGGCGCCTGCTCGCATC	2332

gi 29367530 gb AY224502.1	CTGGGTTCCAAGCCAGGTGATTTGTTGCTGCTTCCATCCTTTCTTTGA	2450
gi 115467397 ref NM_001063833.	CTGGGTTCCAAGCCAGGTGATTTGTTGCTGCTTCCATCCTTTCTTTGA	2447
LOC_Os06g14190.1	CTGGGTTCCAAGCCAGGTGATTTGTTGCTGCTTCCATCCTTTCTTTGA	2282

gi 29367530 gb AY224502.1	TCCCTTGTTGGACATGGACCAAGGCTTGTGTTGCAATGCTGGACCTGC	2500
gi 115467397 ref NM_001063833.	TCCCTTGTTGGACATGGACCAAGGCTTGTGTTGCAATGCTGGACCTGC	2497
LOC_Os06g14190.1	TCCCTTGTTGGACATGGACCAAGGCTTGTGTTGCAATGCTGGACCTGC	2332

gi 29367530 gb AY224502.1	CCCGGGATGCTGATGTTAGCGCTCTGGTTTTAAGGTTTGGCGGGAGTGT	2550
gi 115467397 ref NM_001063833.	CCCGGGATGCTGATGTTAGCGCTCTGGTTTTAAGGTTTGGCGGGAGTGT	2547
LOC_Os06g14190.1	CCCGGGATGCTGATGTTAGCGCTCTGGTTTTAAGGTTTGGCGGGAGTGT	2382

gi 29367530 gb AY224502.1	GAATTGGTTTGCTGAAATGACAAGAATGCTGTGGCTGTCTTCAATGATCC	2600
gi 115467397 ref NM_001063833.	GAATTGGTTTGCTGAAATGACAAGAATGCTGTGGCTGTCTTCAATGATCC	2597
LOC_Os06g14190.1	GAATTGGTTTGCTGAAATGACAAGAATGCTGTGGCTGTCTTCAATGATCC	2432

gi 29367530 gb AY224502.1	AGCTAGAGCAGCGACAGCTCTGAGCGGCTGGATTATGGTTCTGCTTACC	2650
gi 115467397 ref NM_001063833.	AGCTAGAGCAGCGACAGCTCTGAGCGGCTGGATTATGGTTCTGCTTACC	2647
LOC_Os06g14190.1	AGCTAGAGCAGCGACAGCTCTGAGCGGCTGGATTATGGTTCTGCTTACC	2482

gi 29367530 gb AY224502.1	AGGGTGCTGCTGTGTTTTTGCCAAGCAGCAGCGCTCAGCCAGGCAATGTC	2700
gi 115467397 ref NM_001063833.	AGGGTGCTGCTGTGTTTTTGCCAAGCAGCAGCGCTCAGCCAGGCAATGTC	2697
LOC_Os06g14190.1	AGGGTGCTGCTGTGTTTTTGCCAAGCAGCAGCGCTCAGCCAGGCAATGTC	2532

gi 29367530 gb AY224502.1	TGGGTTGCAGGGCAGAAAGATGGAGTGGCGGCTACCAAGAGCAGTGCCAA	2750
gi 115467397 ref NM_001063833.	TGGGTTGCAGGGCAGAAAGATGGAGTGGCGGCTACCAAGAGCAGTGCCAA	2747
LOC_Os06g14190.1	TGGGTTGCAGGGCAGAAAGATGGAGTGGCGGCTACCAAGAGCAGTGCCAA	2582

gi 29367530 gb AY224502.1	TCCATGGAAGAAGGCCACTGCCTCTGAGCCTGATCCATCCTCAGGAGACT	2800
gi 115467397 ref NM_001063833.	TCCATGGAAGAAGGCCACTGCCTCTGAGCCTGATCCATCCTCAGGAGACT	2797
LOC_Os06g14190.1	TCCATGGAAGAAGGCCACTGCCTCTGAGCCTGATCCATCCTCAGGAGACT	2632

gi 29367530 gb AY224502.1	GGACAGGTGTGCTTGGTCAAGCTCCAGGATCAGTATGGAGGCGTGGCGGT	2850
gi 115467397 ref NM_001063833.	GGACAGGTGTGCTTGGTCAAGCTCCAGGATCAGTATGGAGGCGTGGCGGT	2847
LOC_Os06g14190.1	GGACAGGTGTGCTTGGTCAAGCTCCAGGATCAGTATGGAGGCGTGGCGGT	2682

gi 29367530 gb AY224502.1	GACACTGTCGCCCAAGTCATGGGGACATCGAACCGCTGGAACGCCCTGGA	2900
gi 115467397 ref NM_001063833.	GACACTGTCGCCCAAGTCATGGGGACATCGAACCGCTGGAACGCCCTGGA	2897
LOC_Os06g14190.1	GACACTGTCGCCCAAGTCATGGGGACATCGAACCGCTGGAACGCCCTGGA	2732

```

gi |29367530|gb|AY224502.1|          GTCCGATGCGGCCACAAGCTCCAGGCCAGTCGAGGAGAGTAAGCCTGCTC 2950
gi |115467397|ref|NM_001063833.    GTCCGATGCGGCCACAAGCTCCAGGCCAGTCGAGGAGAGTAAGCCTGCTC 2947
LOC_Os06g14190.1                    GTCCGATGCGGCCACAAGCTCCAGGCCAGTCGAGGAGAGTAAGCCTGCTC 2782
*****

gi |29367530|gb|AY224502.1|          CTGCACCGATGCTGTATCCAGCGCAGGGCCAAGTACTGCGCCACCGGTT 3000
gi |115467397|ref|NM_001063833.    CTGCACCGATGCTGTATCCAGCGCAGGGCCAAGTACTGCGCCACCGGTT 2997
LOC_Os06g14190.1                    CTGCACCGATGCTGTATCCAGCGCAGGGCCAAGTACTGCGCCACCGGTT 2832
*****

gi |29367530|gb|AY224502.1|          AGTAAGATGCAGCCTGAAGTCGAAGTGGATGATTGGGAAGAAGCTTGTGA 3050
gi |115467397|ref|NM_001063833.    AGTAAGATGCAGCCTGAAGTCGAAGTGGATGATTGGGAAGAAGCTTGTGA 3047
LOC_Os06g14190.1                    AGTAAGATGCAGCCTGAAGTCGAAGTGGATGATTGGGAAGAAGCTTGTGA 2882
*****

gi |29367530|gb|AY224502.1|          AT-- 3052
gi |115467397|ref|NM_001063833.    AT-- 3049
LOC_Os06g14190.1                    ATGA 2886
**

```

ภาพที่ ค-4 ตรวจสอบความจำเพาะของคู่ไพรมอร์ต่อยีน NF-X1-type zinc finger โดยใช้
NCBI/Primer-BLAST database: Nucleotide collection (Ye et al., 2012)

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self	Self 3'
Forward primer	AAGTCATGGGGACATCGAAC	20	57.60	50.00	4.00	0.00
Reverse primer	CTTCCCAATCATCCACTTCG	20	56.21	50.00	3.00	2.00

Products on target templates

>NM_001063833.1 *Oryza sativa* Japonica Group Os06g0252300 (Os06g0252300) mRNA, partial cds

product length = 177

Forward primer 1 AAGTCATGGGGACATCGAAC 20
Template 2861

Reverse primer 1 CTTCCCAATCATCCACTTCG 20
Template 3037

>AY224502.1 *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) isolate 31150 TF-like protein mRNA, partial cds

product length = 177

Forward primer 1 AAGTCATGGGGACATCGAAC 20
Template 2864

Reverse primer 1 CTTCCCAATCATCCACTTCG 20
Template 3040

>AP005518.3 *Oryza sativa* Japonica Group genomic DNA, chromosome 6, PAC clone:P0046H10

product length = 177

Forward primer 1 AAGTCATGGGGACATCGAAC 20
Template 39464

Reverse primer 1 CTTCCCAATCATCCACTTCG 20
Template 39288

>AK066448.1 *Oryza sativa* Japonica Group cDNA clone:J013060014, full insert sequence

product length = 177

Forward primer 1 AAGTCATGGGGACATCGAAC 20
Template 2354

Reverse primer 1 CTTCCCAATCATCCACTTCG 20
Template 2530

ภาพที่ ค-5 ลำดับเบสของ *OsNFXL1* promoter ที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณที่ออกแบบ primer

>gi|52077103:42373-44371 *Oryza sativa* Japonica Group genomic DNA,
chromosome 6, PAC clone:P0046H10

```

1      GGAAGACAAAATCAGGCATGCCCAATTTGCCGAAGGCTGATCCACAGAGTAAGGAGGCTGGTGGAGCCC
71     TTAGGTTTCGTCTTGTGGTGAGTAGATGATCTTGAGTCAGCAGAGAGAAGAGTTGCAATGCTGCACTGATG
141    AATTGTTGCCTTGCCGCCCATATGCTGCCTGTCTAGGCCTGAAGGATGCTTTGGACTAAGCATGGAATGT
211    CGATCACCTACCAGACGATTTGACCGGATGAGGAAGCTAGTATTGAAGATGGACTCAATTAATTTACGCC
281    GGCTATTGAATCTTTTGTTCCTTTTTCTTGTGTATGTTAGGTAAAGACTTTCAGTAGTTCGTA CTGC
351    TTTCTTTCTCTGATCCACTGTACGTTTTCACACACTTGGAGACTGATGCATGATAATAGTAGTTCGTATCG
421    CATTTCATGCCGTGCACTCTAGCCATACGTTTGGCTGGACCAAAGCTCGTGGTTGCAGGCTTGCGCCAGA
491    ATTATTATCTCTCCAAGGTCTCACTCTCCGTGGCGGCCAAGTTTCCCTCCATGTGTTGACCATCATGGG
561    AACCAACTTGTGTGTCCACGTTAGGGCCCAAGCTTTCAGATTTTCAACAGTGACTCCGAGTATGATCAG
631    CATATGGTAGTTGGTATTAAGGTTCTGTCTAGTTCCAAATAAAATTTTTACATTGTACATTGAATTTT
701    AGACACATACATATAGTATTAAATATAGAAAAACAATTACACAGTTCACCAGGAAATTGCGAGACGAAT
771    CTTTTAAGCATAATTGTGCCATGATTTGACAATGTGGTGCTACAATAAACATTTACTAATGACAGATTAA
841    TTATGCTTAATAAAATTCATCTCGCGGTTTCTGGTGGAATCTGTAATTTGTTTTGTTATFAGACTATGTT
911    TAATACTTCAAATATTTATCCGTATATCTGATGTGACATGCAAGGGTGAATTTTTTGCCAACTAAACAA
981    GGCTAAATCACGAAATTTGTTTTGGTAGTAATAGTAGTACCATTCAATTTCTATGAGATTCGTTTAAA
1051   ACCCATGAAATTTCTGCGCTTCAAATTTTCAATAATAGTATGATAAAAGGGAAAAAACTGTTGAGTT
1121   GTCCTTTCTTSCCGACATATAATACACGGTAAACACACGAAACAATCCAACGGCCTATGCTTATACGAGCT
1191   GTTATCAGCAATTTAAAAATAGTTTACACATAAAATTTTATTGTGATTTTCTAAAAAATACGATAAA
1261   AGACCATAAAATAAACCTAAATTTAACTTTAAATTTGACTTATAAACAACAATACACACAGCGGGTG
1331   CAGATATTAACCTCGTGAATCAACAGGCAGCCACACGAAGCTTACGTACACTTCTTGGTCTCGAGC
1401   CGAGCAACCTCCAGAAAACAACGGACACCGACCCGACCCCAACCCCAACCAACAGACCCGACCCAG
1471   CCGCAATCAAATCCAGCCGAACCGCTCCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT
1541   TTTCCCCACCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCACAAACCAATCGCCGATTGCGGTCGTCTCCAAGGCTCT
1611   CCTCCCCCTCAAATACCCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT
1681   CCCCCACCGCATCTCCCCGAAACGGAGGACTCGGGAACCCCTAGGTTTACTCCCCCGCCGCCCTATGTCC
1751   TCCTCCGATCGCCGCCGCGCGGCAACCGGCGGCGGCGGAGGCCCGTCGCGGTGCTTCTTCCCAGC
1821   CCGTATGGGACCCCGCTTACCGCCCTGATATTTCCCAACCGCCCGCGCCGCGCCCGCCCGCACCCGA
1891   TCGCATCGGCCGATCCTGCCCTCCCCAATCCGGCCTCGGAGGATCGACCGCAGCAGCAGCAACGTC
1961   CGCGCCGAGGAATCATGGGGTGGCGCCAGCGCCG

```


ตารางที่ ค-1 แสดง cis-element บริเวณ Upstream LOC_Os06g14190 ไป 2Kb

site	Sequence*	Site Name	Stress Response	Reference
160	CANNTG	MYCCONSENSUSAT	abiotic stress	Chinnusamy et al. (2003)
224	TGACG	ASF1MOTIFCAMV	Abiotic and biotic stress xenobiotic stress	Despres et al. (2003)
231	TTGACC	ELRECOREPCR1	oxidative stress	Rushton et al. (1996)
231	TTGAC	WBOXATNPR1	Pathogen-induced stress response	Yu et al. (2001)
373	ACGT	ACGTATERD1	drought stress	Simpson et al. (2003)
383	CANNTG	MYCCONSENSUSAT	abiotic stress	Chinnusamy et al. (2003)
447	ACGT	ACGTATERD1	drought stress	Simpson et al. (2003)
542	CATGTG	MYCATERD1	drought stress	Simpson et al. (2003)
542	CANNTG	MYCCONSENSUSAT	abiotic stress	Chinnusamy et al. (2003)
548	TTGACC	ELRECOREPCR1	oxidative stress	Rushton et al. (1996)
548	TTGAC	WBOXATNPR1	Pathogen-induced stress response	Yu et al. (2001)
580	ACGT	ACGTATERD1	drought stress	Simpson et al. (2003)
632	CANNTG	MYCCONSENSUSAT	abiotic stress	Chinnusamy et al. (2003)
729	GAAAAA	GT1GMSCAM4	Pathogen-induced stress salinity stress	Park et al. (2004)
797	TTGAC	WBOXATNPR1	Pathogen-induced stress response	Yu et al. (2001)
1104	GAAAAA	GT1GMSCAM4	Pathogen-induced stress salinity stress	Park et al. (2004)

*R=A/G, Y=C/T, K=G/T, S=C/G, W=A/T, B=C/G/T, H=A/C/T, V=A/C/G, N=A/C/G/T

ตารางที่ ค-1 (ต่อ) แสดง cis-element บริเวณ Upstream LOC_Os06g14190 ไป 2Kb

site	Sequence*	Site Name	Stress Response	Reference
1112	CNGTTR	MYBCORE	drought stress	Luscher and Eisenman (1990)
1132	RCCGAC	DRECRTCOREAT	drought stress salinity stress cold stress heat stress	Dubouzet et al. (2003)
1168	YAACKG	MYB2CONSENSUSAT	stress responsive	Abe et al. (2003)
1298	TTGAC	WBOXATNPR1	Pathogen-induced stress response	Yu et al. (2001)
1321	RYACGTGGYR	ABREATRD22	drought stress	Iwasaki et al. (1995)
1322	CANNTG	MYCCONSENSUSAT	abiotic stress	Chinnusamy et al. (2003)
1323	ACGT	ACGTATERD1	drought stress	Simpson et al. (2003)
1329	TGACG	ASF1MOTIFCAMV	Abiotic and biotic stress xenobiotic stress	Despres et al. (2003)
1331	ACGT	ACGTATERD1	drought stress	Simpson et al. (2003)
1379	ACGT	ACGTATERD1	drought stress	Simpson et al. (2003)
1419	YAACKG	MYB2CONSENSUSAT	stress responsive	Abe et al. (2003)
1462	RCCGAC	DRECRTCOREAT	drought stress salinity stress cold stress heat stress	Dubouzet et al. (2003)
1775	YAACKG	MYB2CONSENSUSAT	stress responsive	Abe et al. (2003)
1955	ACGTSSSC	ABREOSRAB21	osmotic stress	Marcotte et al. (1989)
1955	ACGT	ACGTATERD1	drought stress	Simpson et al. (2003)

*R=A/G, Y=C/T, K=G/T, S=C/G, W=A/T, B=C/G/T, H=A/C/T, V=A/C/G, N=A/C/G/T

in silico gene expression analysis of LOC_Os06g14190 from
Rice Oligonucleotide Array Database (<http://www.ricearray.org>)

Experiment ID	GSE6901
Overall design	Seven-day-old light-grown rice seedlings grown under controlled conditions and those subjected to various abiotic stress conditions were used for RNA extraction and hybridization on Affymetrix microarrays. Three biological replicates of each sample were used for microarray analysis. For salt treatment (SS), the rice seedlings were transferred to a beaker containing 200 mM NaCl solution for 3 h. For desiccation (DS), rice seedlings were dried for 3 h between folds of tissue paper at 28;±1 degree C, in a culture room. For cold treatment (CS), the seedlings were kept at 4;±1 degree C for 3 h. The seedlings kept in water for 3 h, at 28;±1 degree C, served as control (Seedling).

ตารางที่ ค-2

Probe ID	Average gene expression analysis of LOC_Os06g14190			
	Seedling 7d	Drought	Salt	Cold
Os.17665.1.S1_x_at	9.214	9.586	9.9376	9.0465
Os.17665.2.S1_at	9.023	10.498	10.3907	9.5989

in silico gene expression analysis of LOC_Os06g14190 from
Rice Oligonucleotide Array Database (<http://www.ricearray.org>)

Experiment ID GSE24048

Overall design Two rice cultivars, Bala and Azucena, were grown in 1.2 m² plots under flooded conditions in Wuhan, China being sown on 2nd June 2007. Starting at 59 days after sowing, drought was imposed by withholding water, while a set of control plots had continued flooding conditions. At 2 pm on the 83rd day after sowing (after 24 days of drought) the second youngest fully expanded leaf was taken off three plants in two plots per block, the leaves had the top and bottom 4 cm removed and the central portion of the leaf was placed in a bag and then into liquid N₂. For the controls there was only one plot of the genotypes per block. There was one bag for each block and three replicate blocks. A total of 6 droughted leaf samples (3 Bala and 3 Azucena) and six control leaf samples (3 Bala and 3 Azucena) were collected for RNA extraction and hybridization on Affymetrix microarrays.

ตารางที่ ค-3

Probe ID	Average gene expression analysis of LOC_Os06g14190			
	Control Azucena leaf	Control Bala leaf	Droughted Azucena leaf	Droughted Bala leaf
Os.17665.1.S1_x_at	9.5677	8.9917	10.0401	9.3238
Os.17665.2.S1_at	9.1596	8.7251	10.1441	10.2677

in silico gene expression analysis of LOC_Os06g14190 from
Rice Oligonucleotide Array Database (<http://www.ricearray.org>)

Experiment ID E-MEXP-2401

Overall design High quality RNA was extracted from the whole seedlings (Combined root and leaf samples) using TRI Reagent (Ambion, Inc. USA) and pooled from 12 independent stressed and non-stressed plant samples separately, and treated with DNase-I (QIAGEN GmbH, Germany). Subsequently, RNA cleanup was carried out using RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany) and 5 ug of total RNA from each sample in triplicates were reverse-transcribed to double stranded cDNA using the GeneChip One-Cycle cDNA Synthesis Kit. The biotin-labelled cRNA was made using the GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix, CA, USA). Twenty microgram of cRNA samples was fragmented and out of which which 7.5 ug cRNA were hybridized for 16 hours at 45C to the Affymetrix GeneChip Rice Genome Array (Santa Clara, CA, USA). After washing and staining with R-phycoerythrin streptavidin in a Fluidics Station, using the Genechip Fluidics Station 450, the arrays were scanned by the Genechip 3000 Scanner. The chip images were scanned and extracted using default settings and the CEL files were produced with the Affymetrix GeneChip Operating Software (GCOS 1.2). The resulting .CEL files were imported into the GeneSpring GX 10 (Agilent Technologies Inc, Santa Clara CA) and normalized with the PLIER16 algorithm. The resulting expression values were log2-transformed. Average log signal intensity values of three technical replicates for each sample were used for advance analysis.

ตารางที่ ค-4

Probe ID	Average gene expression analysis of LOC_Os06g14190			
	IR64_control	IR64_drought	N22_control	N22_drought
Os.17665.1.S1_x_at	9.8195	10.8324	9.7724	11.0908
Os.17665.2.S1_at	9.8386	10.9089	9.9129	12.1381

in silico gene expression analysis of LOC_Os06g14190 from
Rice Oligonucleotide Array Database (<http://www.ricearray.org>)

Experiment ID GSE26280

Overall design In this study, the gene expression patterns across six tissues including leaves and roots at tillering stage and panicle elongation stage, leaves and young panicle at booting stage (TL: leaves at tillering stage; TR: roots at tillering stage; PL: leaves at panicle elongation stage; PR: roots at panicle elongation stage; BP: young panicle at booting stage; BL: leaves at booting stage) were characterized by using the Affymetrix rice microarray platform based on a drought tolerant rice line derived from IR64.

ตารางที่ ค-5

Probe ID	Average gene expression analysis of LOC_Os06g14190			
	normal roots tillering	Drought roots tillering	Normal roots panicle elongation	Drought roots panicle elongation
Os.17665.1.S1_x_at	9.5301	10.2855	9.4028	10.791
Os.17665.2.S1_at	9.4725	11.0951	9.6978	12.2441

in silico gene expression analysis of LOC_Os06g14190 from
Rice Oligonucleotide Array Database (<http://www.ricearray.org>)

Experiment ID GSE16108

Overall design RNA from CSR27, MI48, tolerant bulk and susceptible bulk grown under control and salt stress conditions were analysed in two different biological replications (A and B) making total sixteen samples

ตารางที่ ค-6

Probe ID	Average gene expression analysis of LOC_Os06g14190			
	CSR27 Bulk Tolerant control	CSR27 Bulk tolerant stressed	MI48 Bulk sensitive control	MI48 Bulk sensitive stressed
Os.17665.1.S1_x_at	9.0123	9.1326	9.1217	9.4273
Os.17665.2.S1_at	9.7915	9.9351	10.1633	10.6761

ตารางที่ ค-7 ปริมาณโปรตีน *OsNFXL1* ใน LPT123 และ LPT123-TC171 ภายใต้ภาวะปกติ และภาวะแล้ง

Probe ID	Average Protein expression			
	LPT123RN	LPT123RD	LPT123-TC171RN	LPT123-TC171RD
LOC_Os06g14190	3.4105842 ± 5.699876	10.15934 ± 6.820844	9.460679 ± 6.7056675	3.9602778 ± 5.6282187

ตารางที่ ค-8 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNFXL1* ใน LPT123 ภาวะปกติ และ ภาวะแล้งที่ระยะเวลา 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง (mean ± standard error)

ชุดทดลอง	0h	2h	6h	24h
LPT123RN	1.0000±0.000 ^a	1.6467±0.574 ^a	1.0767±0.583 ^a	0.7147±0.127 ^a
LPT123RD	1.0000±0.000 ^a	1.9270±0.139 ^a	1.4770±1.166 ^a	1.4990±0.595 ^a

*ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ANOVA (p<0.05)

ตารางที่ ค-9 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNFXL1* ใน LPT123-TC171 ภาวะปกติ และ ภาวะแล้งที่ระยะเวลา 0 2 6 และ 24 ชั่วโมง (mean ± standard error)

ชุดทดลอง	0h	2h	6h	24h
LPT123-TC171RN	1.0000±0.000 ^a	0.9957±0.290 ^a	0.7097±0.191 ^a	0.9677±0.140 ^a
LPT123-TC171RD	1.0000±0.000 ^a	1.1193±0.405 ^a	0.7490±0.188 ^a	1.0770±0.196 ^a

*ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ANOVA (p<0.05)

ภาพที่ ค-6 Protein Alignment: The NF-X1 zinc finger from Human, Arabidopsis, Rice
โดย ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

```

gi |115434644|ref|NP_001042080.  -----
gi |145357676|ref|NP_196185.3|  -----
gi |520261712|ref|NP_001265552.  -----MEASWRQVAGGR 12
gi |115467398|ref|NP_001057298.  -----
gi |15218447|ref|NP_172488.1|    MSFQVRRDRSDDRSHRFNHQQTWIPRNSSTSSVVVNEPLLPPNTRNSE 50

gi |115434644|ref|NP_001042080.  -----MPFSYAAAASGSASSSRKPVVAAAAARRP 30
gi |145357676|ref|NP_196185.3|  -----MAGTATTEFR-----WKS 13
gi |520261712|ref|NP_001265552.  GRSRGRATAAPSGNGVHLRGAGGGREKGSVAVPSGTPGGVATTAAGS 62
gi |115467398|ref|NP_001057298.  -----GPP-----QERPSAAPP 14
gi |15218447|ref|NP_172488.1|    LDAGSASRPVYLQRQHNASGPPSYNHQRSSNIGPPPPNQHRRYNAPDNQ 100

gi |115434644|ref|NP_001042080.  APSPAAAAAPSPSPNSA----- 49
gi |145357676|ref|NP_196185.3|  PPQP-----PSQEQPIS----- 25
gi |520261712|ref|NP_001265552.  RHPAGSQALQTTAASELMSQ-----KKFE 87
gi |115467398|ref|NP_001057298.  -----PPQQQRQQAAP----- 27
gi |15218447|ref|NP_172488.1|    HQRSDNIGPPPQRNNASGTLQHRVSRTRPYNQGRVAKENNVL 150

gi |115434644|ref|NP_001042080.  -----VSDSDPSSYSSSGEETDLTASDPAAASVISSYLSVAG 86
gi |145357676|ref|NP_196185.3|  -----DSDSDSGSDSENHQHRHNDLSNSIFEAYLDCHSSSSP 62
gi |520261712|ref|NP_001265552.  EIKKANQAARKLVEEQFSSSSEGEDEFEGKQKILANTFITYTQTDC 137
gi |115467398|ref|NP_001057298.  -----APTR-----AAAPAP-----ARVAATKAAAG 48
gi |15218447|ref|NP_172488.1|    RSDNIGPPPPQRNNASGTLQHRVSRTRPYNQGRVAKENNVL 200
      . . .

gi |115434644|ref|NP_001042080.  DGADLSKVGIFLSSAARRRSPCLICFDPIRPSDPVWSSCASCFALLHLH 136
gi |145357676|ref|NP_196185.3|  SSIDLAKIQSFLASSSSG-AVSLCLICLERIKRDTPTWSTSSCFVHFLF 111
gi |520261712|ref|NP_001265552.  DTRELERITKQYVNEAFQAGAMTCLICIASVKRNQAVWSSCSG-CFCIFHMP 186
gi |115467398|ref|NP_001057298.  GDGAVPQLVQEIQDKLARGAVECMICYDMVRRSAPVWSSCSG-CFSIFHLP 97
gi |15218447|ref|NP_172488.1|    TDPNLPQLVQELQEKLVKSSIECMICYDKVGRSANIWSCSS-CYSIFHIN 249
      : : : : : * : : : * : : : :
      : : : : : * : : : * : : : :

gi |115434644|ref|NP_001042080.  CIQSWAHQ-----SSAAPSPTWGCCKRFPYPKSTPTSY 172
gi |145357676|ref|NP_196185.3|  CIQSWARQCLDLQAARAVTRPSSNPTEPEAVWNCPCRSSYQSKIPRRY 161
gi |520261712|ref|NP_001265552.  CIQKWKADS-----QFLVSSVTDDDFGKDCWPCKCRFEYKRSPTPSY 232
gi |115467398|ref|NP_001057298.  CIRKWARSP-----ASAADASDPD--SSWRCPGCQSVHAVPARELAY 137
gi |15218447|ref|NP_172488.1|  CIKRWARAP-----TSVDLLAEKNQGDNRCPGCQSVQLTSSKEISY 291
      ** : ** : * * * * : * * * :

gi |115434644|ref|NP_001042080.  LCFCKTVDP-APDPWILPHSCGDVCGRRINADRDS-----GCEHN 212
gi |145357676|ref|NP_196185.3|  LCYCGKEEDPPADNPWILPHSCGEVCRPLSN-----CGHC 198
gi |520261712|ref|NP_001265552.  YCYCGKVEDP-PLDPWLPHSCGQVCEFEKPP-----CGHK 268
gi |115467398|ref|NP_001057298.  TFCGRRREP-PNDLFLTPHSCGEPCKPLEKADPAVKADDAARCPHV 186
gi |15218447|ref|NP_172488.1|  RCFCKRRDP-PSDPYLTPHSCGEPCKPLEKEFAP--AETTEEDLCPHV 338
      * : * : * : : : * * * * : * : :

gi |115434644|ref|NP_001042080.  CLLLCHPGPCPPCPAIVPNAMFCGSHRETRRCS--HQRYSCSGKCNKRL 260
gi |145357676|ref|NP_196185.3|  CLLLCHPGPCASCPKLVK-AKFCGGVEDVRRCG--HKQFSCGDVCEVRL 245
gi |520261712|ref|NP_001265552.  CLLLCHPGPCPPCKMVTTCYCKKAKPIPRRCS--AKEWSCQLPCGQKL 316
gi |115467398|ref|NP_001057298.  CVLQCHPGPCPPCKAFAPDRLCPCGKQTVVRRCADRTTPVTGQRCRDL 236
gi |15218447|ref|NP_172488.1|  CVLQCHPGPCPPCKAFAPDRSCPCGKQVTRCSEKRDVLCGQRCRDL 388
      * : * * * * * * : * : * * * * * * : *

gi |115434644|ref|NP_001042080.  GCGIHRCPVDCHDGPCCPAVRGKHKCEGETMEERLCSER----- 301
gi |145357676|ref|NP_196185.3|  DCNIHNCREICHGECPPCRERAVYKCSGKVKEEKDCCER----- 286
gi |520261712|ref|NP_001265552.  LCGQKCNPCHAGSCQPCPRVSRQKVCCKKVAERSCASP----- 357
gi |115467398|ref|NP_001057298.  PCRRHRCEKVCHTGPGDCNVLISARCFGKKTETLLCGEMELKGNLSEK 286
gi |15218447|ref|NP_172488.1|  SCGRHQCEBRTCHVGPDCPCQVLVNATCFCKKVVETVICGDMNVKGLKAE 438
      * * * * * * * * * * * * * * : * * * *

gi |115434644|ref|NP_001042080.  --VFQCKRECGMQLCQCKHSCERGCAGCKGGCPLQGRRT--CPCGK--- 344
gi |145357676|ref|NP_196185.3|  --VFRCEASENMLNCGKHVCERGCHAGBCGLCPYQKRS--CPCGK--- 329
gi |520261712|ref|NP_001265552.  --LWHCDQVCGKTLPCGNHTCEQVCHVGCAGECPRSGKRF--CPCQK--- 400
gi |115467398|ref|NP_001057298.  DGVFSCSEACSHMLSCGNHACQDIHPGPGCELMGPKVTACHCGKTL 336
gi |15218447|ref|NP_172488.1|  DGVYSCSFCNCGKPLGCGNHFCSEVCHPGPGCDLLPSRVKTCYCGNTRL 488
      : : * * * * * * * * * * * * * * : * * * :

```



```

gi | 115434644 | ref | NP_001042080. | -QSGRDPKQIPKNOYAVGLLACGEDCVKVKKAADSEHLHRKIQEIKTP-A 828
gi | 145357676 | ref | NP_196185.3 | -ATGSDPKVVPKNQFVGLLPDSDNCKSKLQVAESVLTQRNVKEIEEKEE 801
gi | 520261712 | ref | NP_001265552. | -SIECDTTCCKEMKRKAS-----EIKEAEAKAALEEEKRRQQAE 857
gi | 115467398 | ref | NP_001057298. | VAVFNDPARAATALRRLDYGSAYQGAAVFLPSSSAQPGNVWVAGQKDGVA 909
gi | 15218447 | ref | NP_172488.1 | LAVFHDHARAATAMRRLLEHGSVYHGAVVVQSGGQSPSLNNVWGKLPGSSA 1083
*
..:

gi | 115434644 | ref | NP_001042080. | VEVENVPKRRKRNRGQESVSSKFOEIKAVALKFLLV-----IFLCII 872
gi | 145357676 | ref | NP_196185.3 | PSGKNASKRRKRGRGQDIQETTRLQKLAVTTKRILMV-----VMLVAM 845
gi | 520261712 | ref | NP_001265552. | EAFENRLKGRKKNRKRD--EVAVELSLWQKHKYLLIS-----VCGVVV 899
gi | 115467398 | ref | NP_001057298. | ATKSSANPWKKATASEPDPSSGDWTGVLGQAPGSVWR---RGGDTVAQVM 956
gi | 15218447 | ref | NP_172488.1 | WVDVKGNPWRRAVIQESDSDSWGAE DSPIGGSS TDAQASALR SAKSNSPIV 1133
.. : : : : :

gi | 115434644 | ref | NP_001042080. | VVAGLYLLWKGVYRLSDWMNDMEEQRARQRHLKPGRL----- 909
gi | 145357676 | ref | NP_196185.3 | LAAVSYGYKGLLWLSWDMNEVEEQKSRYP--RI----- 880
gi | 520261712 | ref | NP_001265552. | VVFAWYITHDVN----- 911
gi | 115467398 | ref | NP_001057298. | GTSNRWNALESDAATSSRPVEESKPAPRTDAVSSAGPSTAPPVSKMQPEV 1006
gi | 15218447 | ref | NP_172488.1 | TSVNRVSLLEPKASTS----TLEPIAQIESSSSKTTGKQPVEGSG-EE 1178
:

gi | 115434644 | ref | NP_001042080. | -----
gi | 145357676 | ref | NP_196185.3 | -----
gi | 520261712 | ref | NP_001265552. | -----
gi | 115467398 | ref | NP_001057298. | EVDDWEEACE 1016
gi | 15218447 | ref | NP_172488.1 | VVDDWEKVCE 1188

```

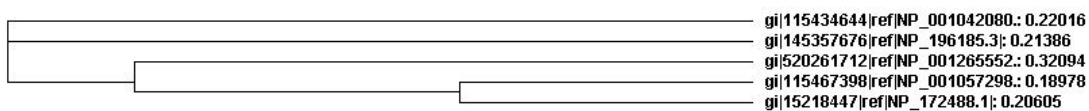
คำอธิบายภาพ บริเวณที่ระบายนี้อาจเป็นส่วนที่ conserve กับ human nuclear transcriptional repressor NF-X1 มีรูปแบบเป็น C-X(1-6)-H-X-C-X3-C(H/C)-X(3-4)-(H/C)-X(1-10)-C

Protein	Definition	Organism	Name
gi 115434644	Os01g0158900	<i>Oryza sativa</i>	OsNFXL2
gi 145357676	NF-X1-type zinc finger protein NFXL2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtNFXL2
gi 520261712	NF-X1-type zinc finger protein NFXL1	<i>Homo sapiens</i>	NFXL1
gi 115467398	Os06g0252300	<i>Oryza sativa</i>	OsNFXL1
gi 15218447	NF-X1-type zinc finger protein NFXL1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtNFXL1

ตารางที่ ค-10 คะแนนลำดับความคล้ายคลึงของโปรตีน NF-X1 zinc finger เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง Human, Arabidopsis และ Rice โดย ClustalW2

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	gi 520261712	911	2	gi 115434644	909	34.76
1	gi 520261712	911	3	gi 115467398	1016	23.71
1	gi 520261712	911	4	gi 15218447	1188	22.28
1	gi 520261712	911	5	gi 145357676	880	35.23
2	gi 115434644	909	3	gi 115467398	1016	23.21
2	gi 115434644	909	4	gi 15218447	1188	23.65
2	gi 115434644	909	5	gi 145357676	880	54.89
3	gi 115467398	1016	4	gi 15218447	1188	58.86
3	gi 115467398	1016	5	gi 145357676	880	24.77
4	gi 15218447	1188	5	gi 145357676	880	25.34

ภาพที่ ค-7 Phylogenetic Tree เมื่อเปรียบเทียบโปรตีน NF-X1 zinc finger ระหว่าง Human, Arabidopsis และ Rice โดย ClustalW2



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย นวมินทร์ สงวนหมู่ เกิดวันที่ 5 พฤษภาคม พ.ศ. 2528 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์ปริญญาบัณฑิต สาขา พันธุศาสตร์ ภาควิชา พฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต หลักสูตร พฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553

ทุนวิจัย

โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (รหัสโครงการ FW656B)

ผลงานที่ตีพิมพ์

Sa-nguanmoo, N., Pongprayoon, W., Chintakovid, N., Roytrakul, S. and Chadchawan, S. 2012. Comparative Proteomics of Rice (*Oryza sativa* L.) Root Proteins under Drought Stress Condition. Thai Journal of Botany 4 (Special Issue): 125-134.