

รายงานวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัย จากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2556

โครงการ การค้นหายีนที่ควบคุมโดยโปรตีนคัลมอดูลินในการตอบสนองต่อสภาวะ
ความเครียดจากสิ่งแวดล้อมของข้าว *Oryza sativa* L.
Identification of genes regulated by calmodulin protein in
response to environmental stress of rice *Oryza sativa* L.

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. อีรพงษ์ บัวบูชา

อาจารย์ ดร. ศุภอรรถ ศิริกันทรมาศ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นุชนาถ วุฒิประดิษฐกุล

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

24 มกราคม 2557

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ผู้รับทุนขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2556 ขอขอบคุณนายสุรชาติ ตั้งประณมกร และนางสาวจุฑามาศ อนันทยานนท์ นิสิตในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล ที่เป็นผู้ดำเนินการทดลอง ตลอดจนอาจารย์และนิสิตภาควิชาชีวเคมีสำหรับคำแนะนำ การอภิปราย และความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดโครงการวิจัย

ธีรพงษ์ บัวบุชา

ศุภอรรจ ศิริกันทรมาศ

นุชนาถ วุฒิประดิษฐกุล

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: GRB_BSS_59_56_23_07

ชื่อโครงการ: การค้นหายีนที่ควบคุมโดยโปรตีนคัลมอดูลินในการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดจากสิ่งแวดล้อมของข้าว *Oryza sativa* L.

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

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

ระยะเวลาดำเนินการ: 1 ตุลาคม 2555 – 30 กันยายน 2556

ความเครียดจากภาวะแวดล้อม เช่น ความเค็ม ความแล้ง ความเย็น หรือโรคพืช ล้วนส่งผลอย่างมากต่อผลผลิตทางการเกษตร นักวิจัยมีความพยายามมานานแล้วที่จะปรับปรุงความทนทานของพืชต่อภาวะคุกคามเหล่านี้ การที่จะประสบความสำเร็จได้ต้องอาศัยความรู้เกี่ยวกับกลไกการตอบสนองของพืชต่อภาวะดังกล่าวในระดับโมเลกุล ในการทนทานต่อความเครียด พืชใช้สัญญาณแคลเซียม (Ca^{2+}) ในการถ่ายทอดสัญญาณเริ่มต้นของการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย และทำให้เกิดการตอบสนองอย่างเหมาะสม งานวิจัยนี้เรามีเป้าหมายที่จะระบุยีนที่ถูกควบคุมด้วย *OsCaM1* ซึ่งเป็นโปรตีนคัลมอดูลินรับสัญญาณแคลเซียมที่สำคัญในข้าว *Oryza sativa* L. 'KDML 105' โดยเริ่มจากการคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกร่วม (co-express) กับยีน *OsCam1-1* (LOC_Os03g20370) จำนวนห้ายีน จากนั้นตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในข้าวทรานส์เจนิคที่แสดงออกยีน *OsCam1-1* เกินปกติจำนวนสามสายพันธุ์โดยวิธี real-time RT-PCR เมื่อเปรียบเทียบกับข้าว wild-type และข้าวทรานส์เจนิคควบคุมที่ถูกทรานสฟอร์มด้วยเวกเตอร์เปล่า พบว่ามีสองยีน (LOC_Os03g16690 และ LOC_Os11g38800) ในข้าวทรานส์เจนิคที่แสดงออกยีน *OsCam1-1* เกินปกติที่มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้เมื่อเราใช้เทคนิค cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism (cDNA-AFLP) ในการระบุยีนที่แสดงออกแตกต่างกันจากการเปรียบเทียบรูปแบบทรานส์คริปโทมของข้าว wild-type และข้าวทรานส์เจนิคที่แสดงออกยีน *OsCam1-1* เกินปกติ เราพบ transcript-derived fragment (TDF) ที่มีการแสดงออกในข้าวทรานส์เจนิคที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับข้าว wild-type จำนวน 100 ชิ้น ขณะนี้จาก TDF เหล่านี้เราสามารถระบุยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นได้ 10 ยีน และยีนที่มีการแสดงออกลดลงได้ 24 ยีน การระบุยีนจาก TDF เหล่านี้จะนำไปสู่การศึกษากลไกการทำงานของยีน *OsCam1-1* ในข้าวว่าเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อมอย่างไรต่อไป

คำสำคัญ คัลมอดูลิน; *OsCam1-1*; ข้าว; cDNA-AFLP

Abstract

Project Code: GRB_BSS_59_56_23_07
 Project Title: Identification of genes regulated by calmodulin protein in response to environmental stress of rice *Oryza sativa* L.
 Investigator: Teerapong Buaboocha, Ph.D.
 Supaart Sirikantaramas, Ph.D.
 Nuchanat Wuttiapraditkul, Ph.D.
 Department of Biochemistry, Faculty of Science
 Chulalongkorn University
 Email Address: Teerapong.B@Chula.ac.th
 Project Period: 1 ตุลาคม 2555 – 30 กันยายน 2556

Environmental stresses such as salinity, drought, heat, or pathogen greatly affect agricultural productivity. Researchers have long been attempting to improve plant tolerance to these adverse conditions. To be successful, knowledge of the mechanisms involved in environmental stress responses of plants in the molecular level is needed. To tolerate stress in plants, Ca²⁺ signals have been implicated in transducing the initial signals from various environmental changes to elicit appropriate responses. Here, we aimed to identify genes that are regulated by OsCaM1, which is a primary Ca²⁺ sensor calmodulin from *Oryza sativa* L. 'KDML 105'. First, five candidate genes that co-expressed with *OsCam1-1* (LOC_Os03g20370) were selected. Their expression levels were examined in the three transgenic rice lines overexpressing *OsCam1-1* by real-time RT-PCR. Compared with the wild-type and the transgenic control rice line, which was transformed with the vector alone, expression of two genes (LOC_Os03g16690 and LOC_Os11g38800) was slightly altered in the overexpressing lines. We further used cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism (cDNA-AFLP) to generate transcriptomic profiles of the wild-type rice and the transgenic rice overexpressing *OsCam1-1* and identified differentially expressed genes. We found 100 transcript-derived fragments (TDFs) differentially expressed in the transgenic rice compared to that in the wild type. So far, 10 up-regulated genes and 24 down-regulated genes were identified from these TDFs. The identification of genes corresponding to these TDFs will enable us to characterize the mechanisms of *OsCam1-1* *in vivo* and how these modulated genes might involve in the environmental stress response.

Keywords: calmodulin; *OsCam1-1*; rice; cDNA-AFLP

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
บทนำ (Introduction)	1
วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Method)	7
ผลการทดลอง (Results)	11
อภิปรายผลการทดลอง (Discussion)	20
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	22
บรรณานุกรม (Bibliography)	23
ประวัติคณะผู้วิจัย	26

เลขหมู่

เลขทะเบียน 017958

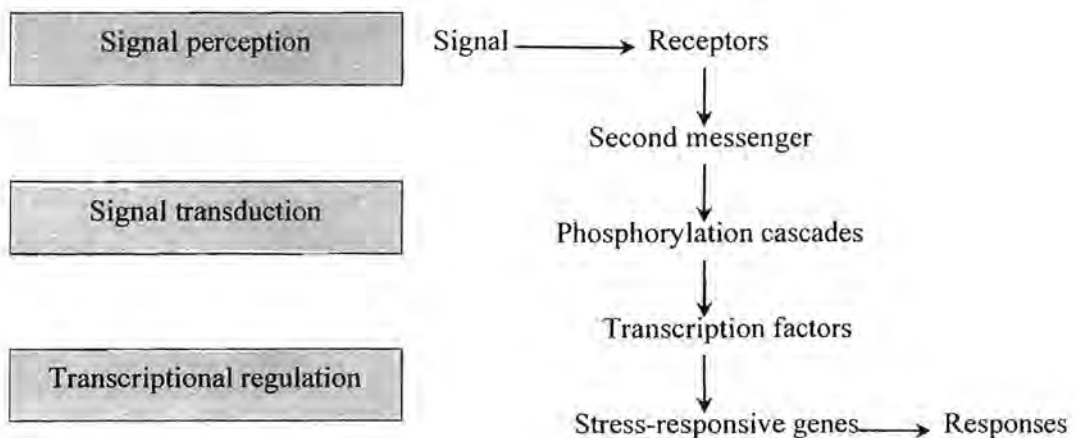
วัน, เดือน, ปี ๓๓.๑.๖๑

บทนำ (Introduction)

การเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อม เช่น ความเค็มของดิน ความแล้ง ความร้อน ความเย็น แสง คีตรูพืชและโรคพืช ส่งผลให้ระดับผลผลิตทางเกษตรลดลงกว่าที่ควรจะเป็น มนุษย์มีความพยายามที่จะปรับปรุงความต้านทานต่อภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเพื่อช่วยลดความเสียหายในเชิงการผลิตอย่างต่อเนื่อง แต่ความพยายามนี้จะประสบความสำเร็จอย่างแท้จริงจะต้องอาศัยความรู้ที่ได้จากการศึกษาในระดับลึกเกี่ยวกับกลไกการตอบสนองของพืชต่อภาวะดังกล่าว การศึกษาในระดับโมเลกุลจะช่วยทำให้เกิดความเข้าใจกลไกการตอบสนองของพืช และนำไปสู่การพัฒนาสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

คนไทยกินข้าวเป็นอาหารหลัก รวมทั้งข้าวยังเป็นสินค้าส่งออกอันดับต้นๆ ของประเทศมาเป็นเวลานานอย่างต่อเนื่อง ปัจจุบันภาวะแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วและรุนแรงมากขึ้น ส่งผลกระทบในทางลบต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของข้าว ผลผลิตภัณฑทางการเกษตรโดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าวเป็นรากฐานทางเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อมและสภาพภูมิอากาศที่มีผลกระทบต่อผลผลิตทางการเกษตรจึงส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศ การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานต่อภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จึงเป็นการเตรียมพร้อมที่จะรับมือกับการเปลี่ยนแปลงและความแปรปรวนของภาวะแวดล้อมและสภาพภูมิอากาศที่กำลังเกิดขึ้น

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



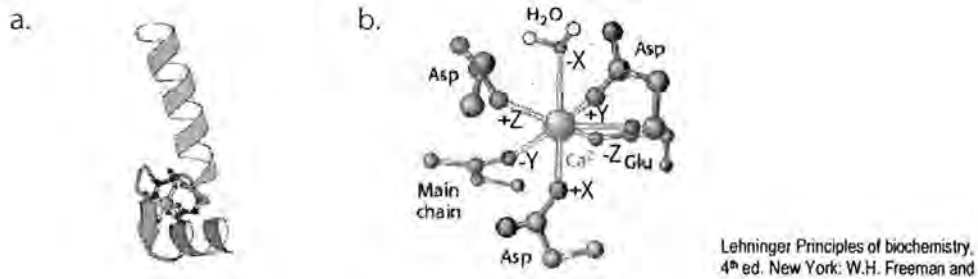
รูปที่ 1 ตัวอย่างกระบวนการรับรู้และส่งผ่านสัญญาณของพืช

จากการศึกษา gene expression profile ในระยะแรกของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ไม่ทนเค็ม (Kawasaki et al., 2001) พบว่าในภาวะความเค็มพืชทั้งสองชนิดมีการตอบสนองด้วยรูปแบบการแสดงออกของยีนที่คล้ายคลึงกันแต่เวลาที่เกิดการแสดงออกแตกต่างกันโดยในสายพันธุ์ที่ไม่ทนเค็มจะมีความล่าช้าของการตอบสนอง ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของกระบวนการรับรู้และส่งผ่านสัญญาณสิ่งแวดล้อมเช่นความเค็ม และอาจเป็นตัวกำหนดว่าพืชนั้นๆ จะมีความสามารถในการทนเค็มได้มากน้อยเพียงใด อย่างไรก็ตามในการปรับปรุงความสามารถในการทนเค็มโดยใช้วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล เช่น การสร้างพืชทรานส์เจนิก มีการใช้ยีนที่สร้างโปรตีน effector ซึ่งทำหน้าที่ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเค็ม และนำเข้าสู่พืชที่สนใจ แต่การเพิ่มการทำงานของ effector ที่เกี่ยวข้องเพียงตัวใดตัวหนึ่งจะไม่น่าจะส่งผลในระดับสรีรวิทยาของพืช นั่นคือ พืชทรานส์เจนิกอาจมีปริมาณ effector ชนิดนั้นๆ เพิ่มขึ้น รวมทั้งมีความสามารถในการรับ effector นี้เกี่ยวข้องเพิ่มมากขึ้น แต่พืชดังกล่าวก็มักจะไม่สามารถแสดงความสามารถโดยรวมในการทนความเค็มหรือแสดงในระดับที่ต่ำมาก ดังนั้นเมื่อประกอบกับข้อสังเกตข้างต้นจาก gene expression profile จึงอาจเป็นไปได้ที่การปรับปรุงความสามารถในการทนการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อมจะประสบความสำเร็จมากขึ้นถ้าเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานขององค์ประกอบในกระบวนการรับรู้และส่งผ่านสัญญาณสิ่งแวดล้อม รวมทั้งกลไกควบคุมการแสดงออกของยีน (transcriptional regulation) ซึ่งกระบวนการเหล่านี้จะส่งผลถึงโปรตีน effector จำนวนมากในขณะเดียวกัน ดังนั้น ความรู้ความเข้าใจพื้นฐานเกี่ยวกับระบบการรับส่งสัญญาณในระดับต่างๆ ตั้งแต่ระดับของ signal perception และ signal transduction จนถึงระดับ transcriptional regulation จะมีส่วนทำให้การปรับปรุงความสามารถของพืชในการทนการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อมได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

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

ในการส่งสัญญาณโดยผ่าน Ca^{2+} จะมีการรับสัญญาณการเพิ่มความเข้มข้นของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ที่เรียกว่า Ca^{2+} -modulated proteins โดย Ca^{2+} -modulated protein ส่วนใหญ่มีบริเวณจับแคลเซียมที่ประกอบด้วย motif ชนิด helix-loop-helix ที่เรียกว่า EF-hand (Kretsinger & Nockolds, 1973) ดังแสดงในรูปที่ 2 โดยแต่ละ loop ซึ่งรวมถึงส่วนปลายของ helix แห่งที่สองให้ ligand เจ็ดตำแหน่งที่สามารถจับกับ Ca^{2+} ด้วยรูปร่างแบบ pentagonal bipyramid โดย ligand ที่อยู่ภายในบริเวณนี้ถูกกำหนดให้เรียกว่า

+X*+Y*+Z*-Y*-X**⁻Z (* แทนเรซิดิวส์ที่แทรกอยู่) ligand สำหรับการจับกับ Ca²⁺ นี้ สามตำแหน่งได้จาก carboxylate oxygen จากเรซิดิวส์ตำแหน่งที่ 1 (+X), 3 (+Y) และ 5 (+Z) หนึ่งตำแหน่งได้จาก carbonyl oxygen จากเรซิดิวส์ตำแหน่งที่ 7(-Y) และสองตำแหน่งได้จาก carboxylate oxygen ในเรซิดิวส์ตำแหน่งที่ 12(-Z) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น glutamate ที่มีความอนุรักษ์สูง ส่วน ligand ที่เจ็ดจะได้รับจาก carboxylate บนโซ่ข้างของเรซิดิวส์ตำแหน่ง 9 (-X) หรือจากโมเลกุลของน้ำ

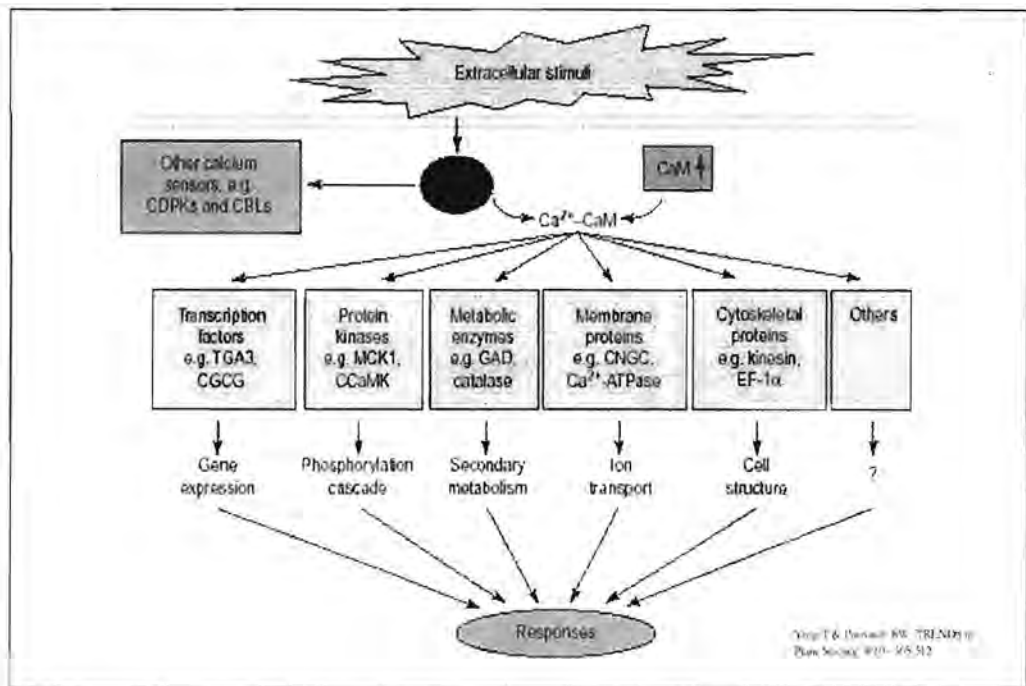


รูปที่ 2 EF-hand (a) แสดงโครงสร้าง helix-loop-helix ที่จับกับ Ca²⁺ ที่พบในโปรตีนรับสัญญาณแคลเซียมจำนวนมาก (b) Ligands ทั้งเจ็ดตำแหน่งที่จับกับ Ca²⁺ ด้วยรูปร่างแบบ pentagonal bipyramid

โปรตีนที่มี EF-hand มีความหลากหลายสูงทั้งโครงสร้าง องค์ประกอบ การจับกับ Ca²⁺ และการเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนเป้าหมาย (target protein) โปรตีนเหล่านี้มี 3 กลุ่มที่สำคัญ ได้แก่ calmodulin (CaM) (Zielinski, 1998), Ca²⁺-dependent protein kinases (CDPKs) (Harmon et al, 2000) และ calcineurin-B-like (CBL) protein (Luan et al, 2002) CaM เป็นโปรตีนที่มีการศึกษามากที่สุดในโปรตีนทั้งสามกลุ่ม อย่างไรก็ตามการศึกษากลไกระดับโมเลกุลในรายละเอียดยังมีอยู่น้อยมาก เมื่อมีสัญญาณการเพิ่มความเข้มข้นของ Ca²⁺ เกิดขึ้นภายในเซลล์ CaM ทำงานโดยเข้าจับกับ Ca²⁺ เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ทำให้สามารถเข้าจับกับโปรตีนเป้าหมายชนิดต่างๆ เป็นการส่งผ่านสัญญาณเป็นลำดับต่อไป ซึ่งแตกต่างจาก CDPK ที่เป็นทั้ง sensor และ effector คือเมื่อได้รับสัญญาณ binding กับ Ca²⁺ จะกระตุ้นให้ kinase activity ของ CDPK ทำงานในการส่งสัญญาณเป็นลำดับเพื่อปรับเปลี่ยนกระบวนการภายในเซลล์ให้ตอบสนองต่อสัญญาณ เช่น ภาวะความเค็ม ภาวะแล้ง ได้อย่างเหมาะสมต่อไป สำหรับ CBL ซึ่งเป็นกลุ่ม calcium sensor ชนิดใหม่ที่ค้นพบภายหลังใน Arabidopsis ทำงานคล้ายคลึงกับ CaM คือจะทำงานโดยการจับกับโปรตีนเป้าหมายเพื่อเป็นการส่งสัญญาณ โดยคาดว่าจะเป็นตัวส่งผ่านสัญญาณที่สำคัญสำหรับ stress หลายชนิดเช่นเดียวกัน

CaM เป็นโปรตีนขนาดเล็ก (148 เรซิดิวส์) ที่ประกอบด้วย EF-hand สองคู่เชื่อมต่อกันด้วย α -helix ที่เรียกว่า central helix ทำให้มีโครงรูปคล้ายดัมเบล (Chattopadhyaya et al., 1992) โดยโดเมนทางด้าน N-terminal และ C-terminal ซึ่งประกอบด้วย EF-hand ด้านละหนึ่งคู่สามารถจับกับ Ca²⁺ ในลักษณะ cooperative โมเลกุล CaM ที่มีโครงรูปเปลี่ยนแปลงไปเมื่อจับกับ Ca²⁺ จะเข้าจับกับโปรตีนเป้าหมายโดย

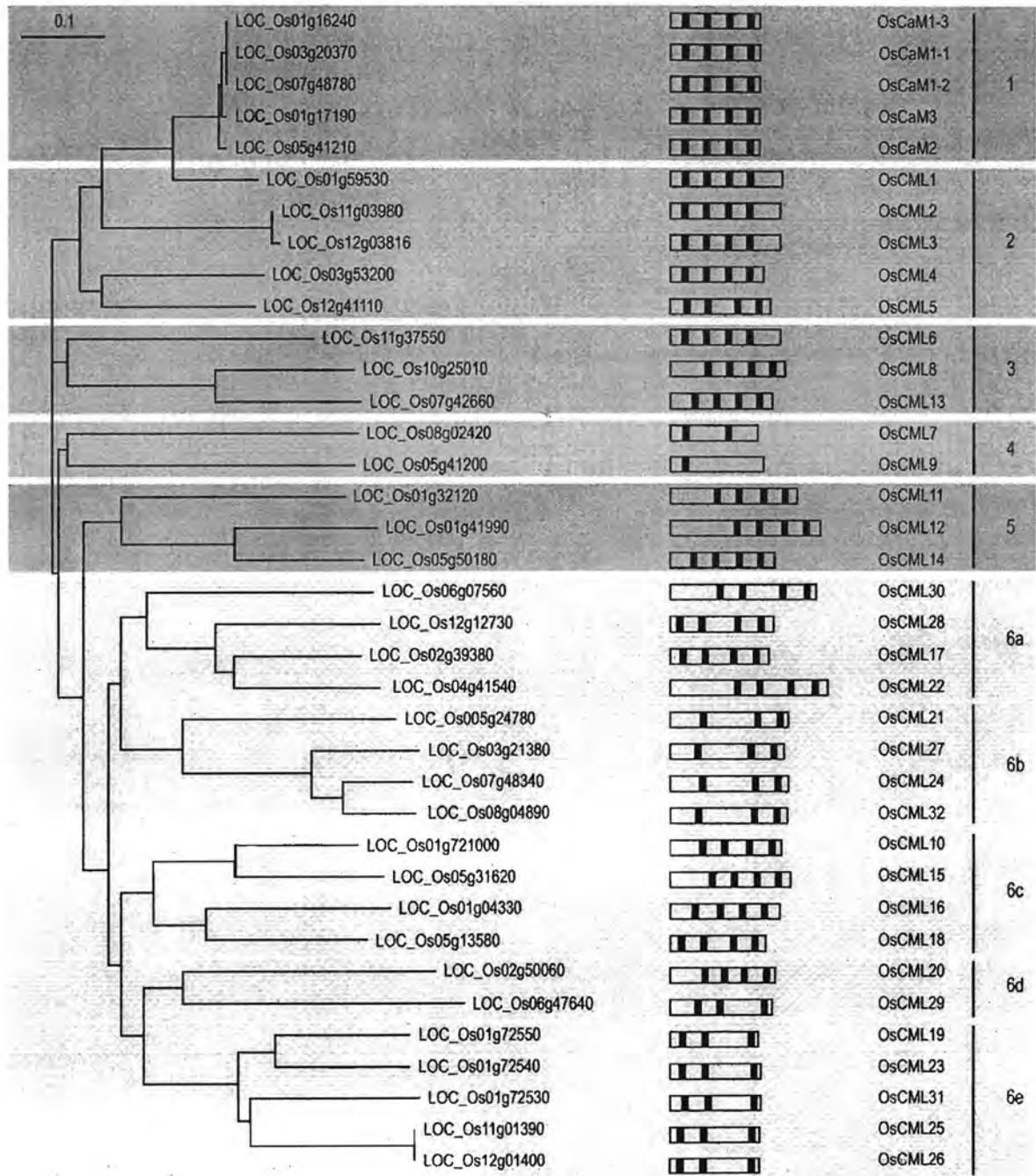
อาศัยพื้นผิวบนโมเลกุลที่มีสมบัติ hydrophobic จากโดเมนทั้งสองภายในโมเลกุล บริเวณพื้นผิวนี้เกิดจากกรดอะมิโน methionine และ phenylalanine ที่กระจายอยู่ภายใน primary structure ของ CaM (O'Neil & DeGrado, 1990) เมื่อ EF-hand จับ Ca^{2+} บริเวณพื้นผิว hydrophobic ประกอบกับ central helix ที่มีความยืดหยุ่นสูงจะช่วยให้ CaM เกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนเป้าหมายได้หลากหลายชนิด โปรตีนเป้าหมายของพืชที่รู้จักในปัจจุบันมีหน้าที่ที่แตกต่างกันไป เช่น metabolic enzyme, kinases และ phosphatase, transport protein, cytoskeletal protein และ transcription factor ดังตัวอย่างในรูปที่ 3 อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการค้นพบโปรตีนเป้าหมายของ CaM ในข้าวเลย



รูปที่ 3 แสดงแผนภาพการทำงานในการสื่อสารสัญญาณจากสิ่งแวดล้อมภายนอกของ Ca^{2+} /calmodulin

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

โนกับ CaM ตั้งแต่ 30% ถึง 85% โปรตีน OsCaM และ OsCML เกือบทั้งหมดยังไม่มีการศึกษาหน้าที่และกลไกการทำงาน แต่คาดว่าจะมีความสำคัญในการทำหน้าที่เป็นโปรตีนส่งสัญญาณแคลเซียมซึ่งเป็นตัวกลางที่สำคัญในการตอบสนองต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อมของพืช



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

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

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

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อค้นหาและระบุหน้าที่ของยีนที่ควบคุมโดยโปรตีนคัลมอดูลินในการตอบสนองต่อภาวะความเครียดจากสิ่งแวดล้อมของข้าว *Oryza sativa* L.

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Method)

1. การคัดเลือก candidate genes ที่จะนำมาศึกษาต่อไป

1.1 ใช้ยีน *OsCam1-1* (LOC_Os03g20370) เป็น bait เพื่อหายีนอื่น ๆ ที่มีการแสดงออกร่วมโดยใช้ฐานข้อมูลการแสดงออกร่วมของข้าว (<http://www.ricearray.org/coexpression/coexpression.shtml>) ทำการคัดเลือกยีนที่อยู่ในกลุ่มที่มีความเกี่ยวข้องกับภาวะเครียดหรือ transcription factor ที่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ที่มีค่า correlation coefficient มากกว่า 0.7 ซึ่งบ่งบอกว่ายีนเหล่านี้มีค่าสัมประสิทธิ์การแสดงออกร่วมค่อนข้างสูง

1.2 ตรวจสอบระดับการแสดงออกของ candidate genes ในข้าวทรานส์เจนิกที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติ

1.2.1 การออกแบบไพรเมอร์

ดึงข้อมูลลำดับเบสของยีนที่ได้จากข้อ 1.1 จำนวนห้ายีนจากฐานข้อมูล Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) (Ouyang et al, 2007) และข้อมูลลำดับเบสจากข้าว subspecies indica ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Rozen & Skaletky, 2000) สำหรับใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนทั้งห้าด้วยวิธี real-time RT-PCR ได้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่มีข้อมูลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ใน real-time PCR

Locus	Sequence	Annealing temp (°C)	Product size (bp)
LOC_Os03g16690	Forward: GCGAGCTGGAAGTGTATGAA	59	126
	Reverse: TACTGTACTGCCACGGGTTG		
LOC_Os02g55430	Forward: GGTGTCTTGGTTGGGAAAAA	59	165
	Reverse: TGAACTCACGCTCACCAAAC		
LOC_Os11g38800	Forward: CTTCGAGCTGCTGGATTCT	59	168
	Reverse: GTCTGGAGCGATGGTGAAC		
LOC_Os01g64650	Forward: GCAGGCAAAGAAAACAAACC	59	139
	Reverse: TTACTTTGGCACGATTCACG		
LOC_Os05g04520	Forward: CCTCCTAAAGCTGTCGCAA	60	153
	Reverse: TTATGACCCGGCATTCTCTC		

1.2.2 การปลูกข้าวและการให้ภาวะความเครียดจากความเค็ม

เพาะเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 (Khao Dok Ma Li 105; KDML105) wild type และข้าวทรานส์เจนิกที่ได้รับยีน *OsCam1-1* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35SCaMV ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ (L1, L2 และ L7) และข้าวทรานส์เจนิกควบคุมที่ได้รับการทรานส์ฟอร์มด้วยเวกเตอร์ pCAMBIA1301 เปล่าจำนวน 1 สายพันธุ์ โดยล้างเมล็ดใน sodium hypochlorite 2% ที่ผสมกับ tween 20 เล็กน้อย นำไปเพาะจนมีอายุ 7 วัน ย้ายปลูกลงในสารละลายธาตุอาหาร ควบคุมระดับของสารละลายธาตุอาหารโดยเติมน้ำให้สารละลายอยู่ในระดับเดียวกันกับตอนเริ่มต้นการทดลองทุกวัน สลับกับการเปลี่ยนสารละลายใหม่ทุกๆ 3 วัน เมื่อข้าวมีอายุครบ 3 สัปดาห์ให้ภาวะความเครียดจากความเค็มโดยการเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารที่มี 150 mM NaCl รวมทั้งเตรียมชุดควบคุมโดยการย้ายต้นข้าวสู่สารละลายธาตุอาหารปกติ เก็บตัวอย่างใบจากต้นข้าวที่เวลา 0, 2 และ 4 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Block Design

1.2.3 การสกัดอาร์เอ็นเอและการสร้างซีดีเอ็นเอ

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

1.2.4 การทำ real-time RT-PCR

ทำ real-time RT-PCR (เครื่องรุ่น Bio-Rad CFX96 system, USA) ด้วย EvaGreen[®] Super Mix (Bio-Rad, USA) ในปฏิกิริยาปริมาตร 10 μ l โดยใช้ cDNA 1 μ l เป็น template และใช้ forward primer และ reverse primer ดังตารางที่ 1 โดยใช้อุณหภูมิ denaturation ที่ 95 °C annealing ที่อุณหภูมิที่ตั้งแสดงในตารางที่ 1 และ extension ที่ 72 °C และใช้ยีน *elongation factor 1-alpha (EF1 α)* (AK105030) เป็น internal control ทำการทดลองสามซ้ำและวิเคราะห์ผลด้วย Pfaffl method (Pfaffl, 2001) โดยคำนวณหาสัดส่วนระดับการแสดงออกของยีนจากสมการ

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{T \text{ target}}} (\text{control-sample})}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta C_{T \text{ Ref}}} (\text{control-sample})}$$

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

หมายเหตุ * แผนที่ปรับแล้วตามรายงานความก้าวหน้า 6 เดือน

ในปีที่ 1 คณะผู้วิจัยได้ปรับแผนการดำเนินโครงการข้อ 2 อย่างไรก็ตามเมื่อสืบค้นฐานข้อมูล RiceFOX ในขณะนี้ยังไม่พบว่ามี Arabidopsis ที่มีการแสดงออกของยีน LOC_Os03g16690 ที่เราต้องการ แต่พบ Arabidopsis ที่มีการแสดงออกของยีน LOC_Os11g38800 ซึ่งเป็น co-expressed gene อีกหนึ่งยีนที่เราพบว่ามีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปในข้าวทรานส์เจนิคที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติ ผู้วิจัยจึงได้สั่งซื้อ Arabidopsis ดังกล่าวจาก RiceFOX เพื่อนำมาศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้ของยีน LOC_Os11g38800 เห็นไม่ชัดเจนนัก จากการพิจารณาอย่างรอบคอบของคณะผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่าควรคัดเลือก candidate genes เพิ่มเติมด้วยวิธีที่ชัดเจนกว่าการใช้ข้อมูลการแสดงออกร่วมของข้าว เพื่อให้มั่นใจว่าจะได้ยีนที่มีหน้าที่ที่ควบคุมด้วยยีน *OsCam1-1* อย่างแท้จริง ผู้วิจัยจึงเลือกเทคนิคที่สามารถระบุยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างข้าว wildtype กับข้าวทรานส์เจนิคที่มีการแสดงออกเกินปกติของยีน *OsCam1-1* ได้อย่างชัดเจน นั่นคือเทคนิค cDNA-AFLP ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. การปลูกพืชและการสกัด mRNA
 - 1.1 ปลูกข้าว wild type และข้าวทรานส์เจนิคที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติด้วยวิธีไฮโดรโปนิกส์ในสารละลายธาตุอาหาร Yoshida (Yoshida et al, 1976) เป็นเวลา 14 วัน ภายใต้ช่วงแสง 16/8 ชม. อุณหภูมิ 25°C ความเข้มแสง 6,000 lux และความชื้น 80% เก็บใบและรากแยกกันที่อุณหภูมิ -80°C

- 1.2 บดเนื้อเยื่อใบหรือราก (100 g) ให้ละเอียดใน liquid nitrogen และสกัด mRNA ด้วย Magnetic mRNA Isolation Kit (New England Biolabx) ตามวิธีการที่แนะนำโดยผู้ผลิต
2. การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* ด้วยวิธี semiquantitative RT-PCR
 - 2.1 สังเคราะห์ first-strand cDNA ด้วย iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) ตามวิธีการที่แนะนำโดยผู้ผลิต
 - 2.2 ทำ PCR ในเครื่อง thermal cycler โดยใช้ forward และ reverse primer เป็น *OsCam1-1-F*: 5'-CACCATGGCGGACCAGCTCACC-3' และ *OsCam1-1-R*: 5'-TCACTTGGCCATCATGACCTTG-3' ตามลำดับ และใช้ภาวะดังนี้ initial denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยรอบของ PCR จำนวน 26 รอบที่ประกอบด้วยอุณหภูมิ 94°C 30 วินาที 58°C 30 วินาที และ 72°C 45 วินาที และ final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที สำหรับยีน *EF1 α* ซึ่งใช้เป็น internal control ใช้ forward และ reverse primer เป็น *EF1 α -F*: 5'-AGATCAACGAGCCC AAGAG-3' และ *EF1 α -R*: 5'-GCAAAACGACCAAGAGGAG-3' ตามลำดับ และใช้ภาวะดังนี้ initial denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยรอบของ PCR จำนวน 28 รอบที่ประกอบด้วยอุณหภูมิ 94°C 30 วินาที 60°C 30 วินาที และ 72°C 45 วินาที และ final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที
3. การหาพื้นที่แสดงออกแตกต่างกันด้วยวิธี cDNA-AFLP
 - 3.1 สังเคราะห์ first strand cDNA จาก mRNA 500 ng โดยใช้ RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo scientific) จากนั้นสังเคราะห์เป็น double-stranded cDNA โดยใช้ NEBNext® (New England Biolabs) ตามวิธีการที่แนะนำโดยผู้ผลิต
 - 3.2 ทำ cDNA-AFLP โดยปรับเล็กน้อยจากวิธีของ Bachem et al (1998) เริ่มจากนำ double-stranded cDNA ปริมาณ 500 ng มาย่อยด้วย *EcoRI* และ *MseI* (New England Biolabs) ปริมาณ 10 U จากนั้นเชื่อมต่อ adaptor (*Eco-F*: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3', *Eco-R*: 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3', *Mse-F*: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3', *Mse-R*: 5'-TACTCAGGACTCAT-3') โดยใช้ T4 DNA ligase (New England Biolabs) และเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ adaptor ดังนี้ *Eco*: 5'-GACTGCGTACCAATTC-3', และ *Mse*: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3' จากนั้นทำให้ PCR product ที่ได้เจือจาง 50 เท่าเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการทำ selective amplification โดยใช้ selective primer combination (PC) ของ *Eco-NN*: 5'-GACTGCGTACCAATTCNN-3', and *Mse-NN*: 5'-GATGAGTCCTGAGTAANN-3' แยก AFLP product ที่ได้ด้วย 4.5% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) และการย้อมด้วยวิธี silver staining (Bassam et al, 1991)
 - 3.3 ตัดแถบ DNA ที่สนใจจาก rehydrated gel และเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอน selective amplification จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปโคลนเข้า pJET1.2/blunt cloning vector (Thermo Scientific) และหาลำดับเบสที่ Macrogen Inc., Korea โดยใช้ vector-specific primer นำลำดับเบสที่ได้ไปสืบค้นในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

1. การคัดเลือก candidate genes ที่จะนำมาศึกษาต่อไป

1.1 การหาเอ็นที่แสดงออกพร้อมกับยีน *OsCam1-1*

จากการหาเอ็นที่มีการแสดงออกพร้อมกับยีน *OsCam1-1* (LOC_Os03g20370) โดยใช้ฐานข้อมูลการแสดงออกของข้าว (<http://www.ricearray.org/corexpression/coexpression.shtml>) (Cao et al, 2012) พบยีนจำนวนมากที่มีค่า correlation coefficient มากกว่า 0.7 ดังตารางที่ 2 ซึ่งยีนเหล่านี้จะถูกคัดเลือกโดยพิจารณาจากข้อมูลอื่นๆ ประกอบ เพื่อใช้เป็น candidate genes สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

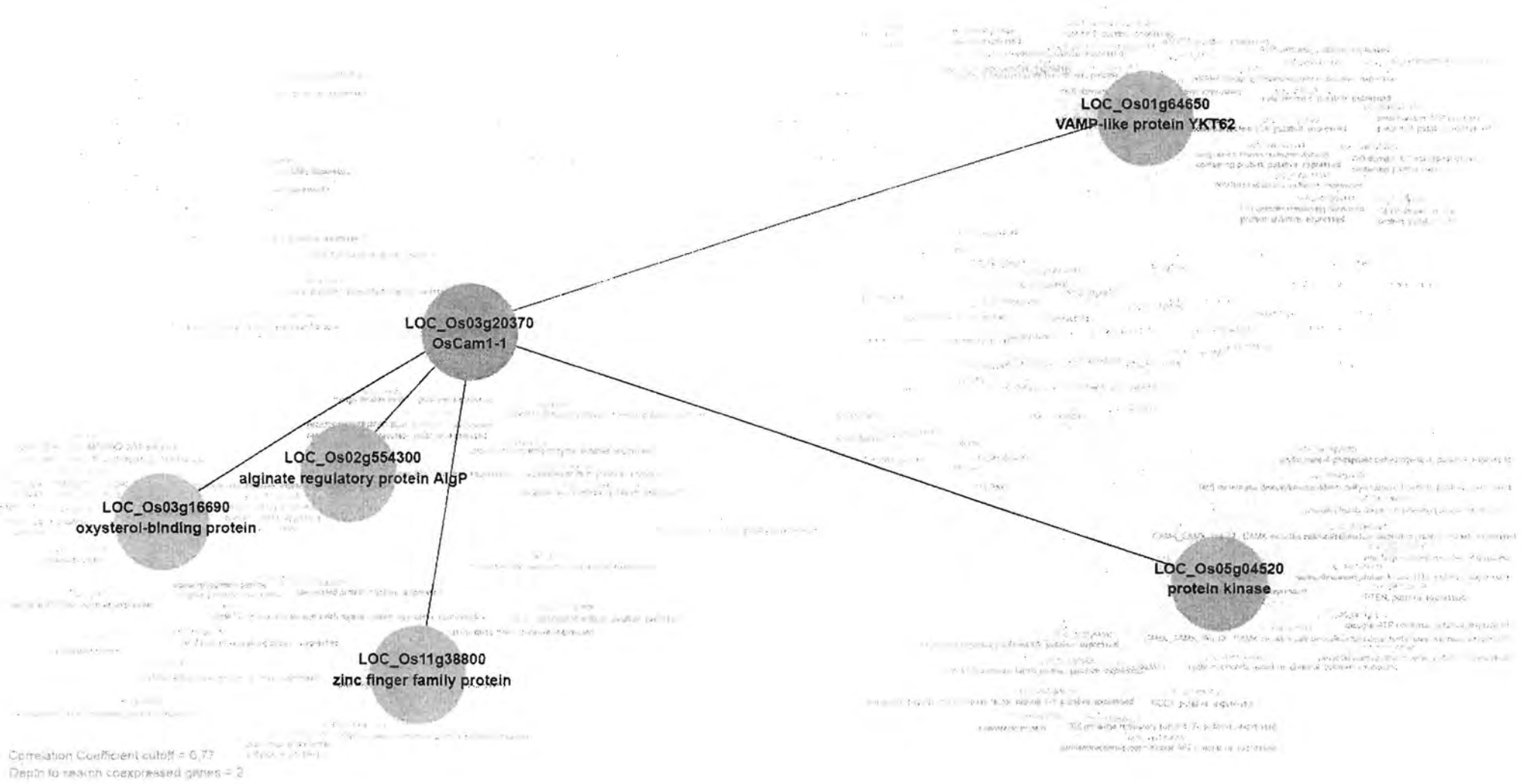
ตารางที่ 2 ยีนที่มีการแสดงออกพร้อม (co-express) กับยีน *OsCam1-1*

Gene ID	PCC	RGAP Ver 6 Annotation
LOC_Os03g16690	0.8161	oxysterol-binding protein, putative, exp.....
LOC_Os02g55430	0.7930	alginate regulatory protein AlgP, putati.....
LOC_Os11g38800	0.7844	zinc finger family protein, putative, ex.....
LOC_Os05g04520	0.7795	protein kinase, putative, expressed
LOC_Os01g64650	0.7754	VAMP-like protein YKT62, putative, expre.....
LOC_Os07g48780	0.7742	<i>OsCam1-2</i> - Calmodulin, expressed
LOC_Os06g49460	0.7684	Rer1 protein, putative, expressed
LOC_Os01g06460	0.7682	uncharacterized Cys-rich domain containi.....
LOC_Os03g07530	0.7638	<i>OsFBK12</i> - F-box domain and kelch repeat
LOC_Os02g48980	0.7569	GPI-anchored protein, putative, expresse.....
LOC_Os03g13380	0.7564	transmembrane 9 superfamily member, puta.....
LOC_Os01g17190	0.7513	<i>OsCam3</i> - Calmodulin, expressed
LOC_Os11g24560	0.7512	protein transport protein, putative, exp.....
LOC_Os07g31370	0.7478	ras-related protein, putative, expressed
LOC_Os02g46962	0.7471	VHS and GAT domain containing protein, e.....
LOC_Os05g41480	0.7450	domain of unknown function, DUF250 domai.....
LOC_Os02g45180	0.7445	ORM1, putative, expressed
LOC_Os06g49430	0.7443	CGMC_MAPKCMGC_2.11 - CGMC includes CDA,
LOC_Os04g53620	0.7435	ubiquitin family protein, putative, expr.....
LOC_Os03g50290	0.7430	14-3-3 protein, putative, expressed
LOC_Os05g34770	0.7401	cytochrome c, putative, expressed
LOC_Os05g44050	0.7396	ras-related protein, putative, expressed

Gene ID	PCC	RGAP Ver 6 Annotation
<u>LOC_Os02g04100</u>	0.7391	peptidase, T1 family, putative, expresse.....
<u>LOC_Os01g72080</u>	0.7363	calmodulin-like protein 1, putative, exp.....
<u>LOC_Os08g33370</u>	0.7359	14-3-3 protein, putative, expressed
<u>LOC_Os09g32800</u>	0.7346	peptidase, T1 family, putative, expresse.....
<u>LOC_Os08g37444</u>	0.7312	signal recognition particle receptor, pu.....
<u>LOC_Os07g09680</u>	0.7305	ras-related protein, putative, expressed
<u>LOC_Os02g46510</u>	0.7287	adaptor complexes medium subunit family
<u>LOC_Os05g35710</u>	0.7281	coiled-coil domain-containing protein 47.....
<u>LOC_Os03g13750</u>	0.7276	erwinia induced protein 2, putative, exp.....
<u>LOC_Os04g56646</u>	0.7275	MEE34, putative, expressed
<u>LOC_Os02g54160</u>	0.7263	AP2 domain containing protein, expressed
<u>LOC_Os02g48720</u>	0.7258	mitochondrial carrier protein, putative,.....
<u>LOC_Os06g05880</u>	0.7244	profilin domain containing protein, expr.....
<u>LOC_Os02g37420</u>	0.7241	ras-related protein, putative, expressed
<u>LOC_Os08g18110</u>	0.7239	alpha-soluble NSF attachment protein, pu.....
<u>LOC_Os02g48290</u>	0.7228	thioredoxin reductase 2, putative, expre.....
<u>LOC_Os06g44374</u>	0.7217	protein transport protein SEC61 subunit
<u>LOC_Os05g48240</u>	0.7214	dynamamin family protein, putative, expres.....
<u>LOC_Os01g32660</u>	0.7195	STE_MEK_ste7_MAP2K.2 - STE kinases inclu.....
<u>LOC_Os03g23950</u>	0.7185	adapitin protein, putative, expressed
<u>LOC_Os05g38630</u>	0.7184	ras-related protein, putative, expressed
<u>LOC_Os04g02830</u>	0.7173	expressed protein
<u>LOC_Os10g31950</u>	0.7154	3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal pre.....
<u>LOC_Os07g46670</u>	0.7148	early response to dehydration 15, putati.....
<u>LOC_Os02g48610</u>	0.7147	mitochondrial import inner membrane tran.....
<u>LOC_Os02g56560</u>	0.7146	CK1_CaseinKinase_1.6 - CK1 includes the
<u>LOC_Os03g40920</u>	0.7143	expressed protein
<u>LOC_Os07g38970</u>	0.7141	succinyl-CoA ligase subunit alpha-2, mit.....
<u>LOC_Os03g40270</u>	0.7137	alpha-1,4-glucan-protein synthase, putat.....
<u>LOC_Os01g43410</u>	0.7135	CAMK_CAMK_like.9 - CAMK includes calcium.....
<u>LOC_Os06g06030</u>	0.7135	peptidase, T1 family, putative, expresse.....
<u>LOC_Os09g33986</u>	0.7130	peptidase, T1 family, putative, expresse.....

Gene ID	PCC	RGAP Ver 6 Annotation
<u>LOC_Os01g60410</u>	0.7127	ubiquitin-conjugating enzyme, putative,
<u>LOC_Os03g08280</u>	0.7091	peptidase, T1 family, putative, expresse.....
<u>LOC_Os02g55440</u>	0.7090	transmembrane 9 superfamily member, puta.....
<u>LOC_Os05g04850</u>	0.7078	RNA recognition motif containing protein.....
<u>LOC_Os04g58880</u>	0.7070	exo70 exocyst complex subunit, putative,.....
<u>LOC_Os12g07670</u>	0.7067	transmembrane 9 superfamily member, puta.....
<u>LOC_Os01g48280</u>	0.7066	ubiquitin-conjugating enzyme, putative,
<u>LOC_Os07g39280</u>	0.7063	transporter-related, putative, expressed

จากการสร้างเครือข่ายการแสดงออกร่วม (coexpression network) ของยีน *OsCam1-1* ได้ผล
 ดังรูปที่ 5 โดยแสดงเน้นเฉพาะยีนที่มีค่า correlation coefficient สูงสุด 5 อันดับแรกซึ่งได้รับ
 คัดเลือกเพื่อศึกษาการระดับการแสดงออกในข้าวทรานส์เจนิกที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1*
 เกินปกติ เปรียบเทียบกับข้าว wild-type



รูปที่ 5 เครือข่ายการแสดงออกพร้อม (coexpression network) ของยีน *OsCam1-1*

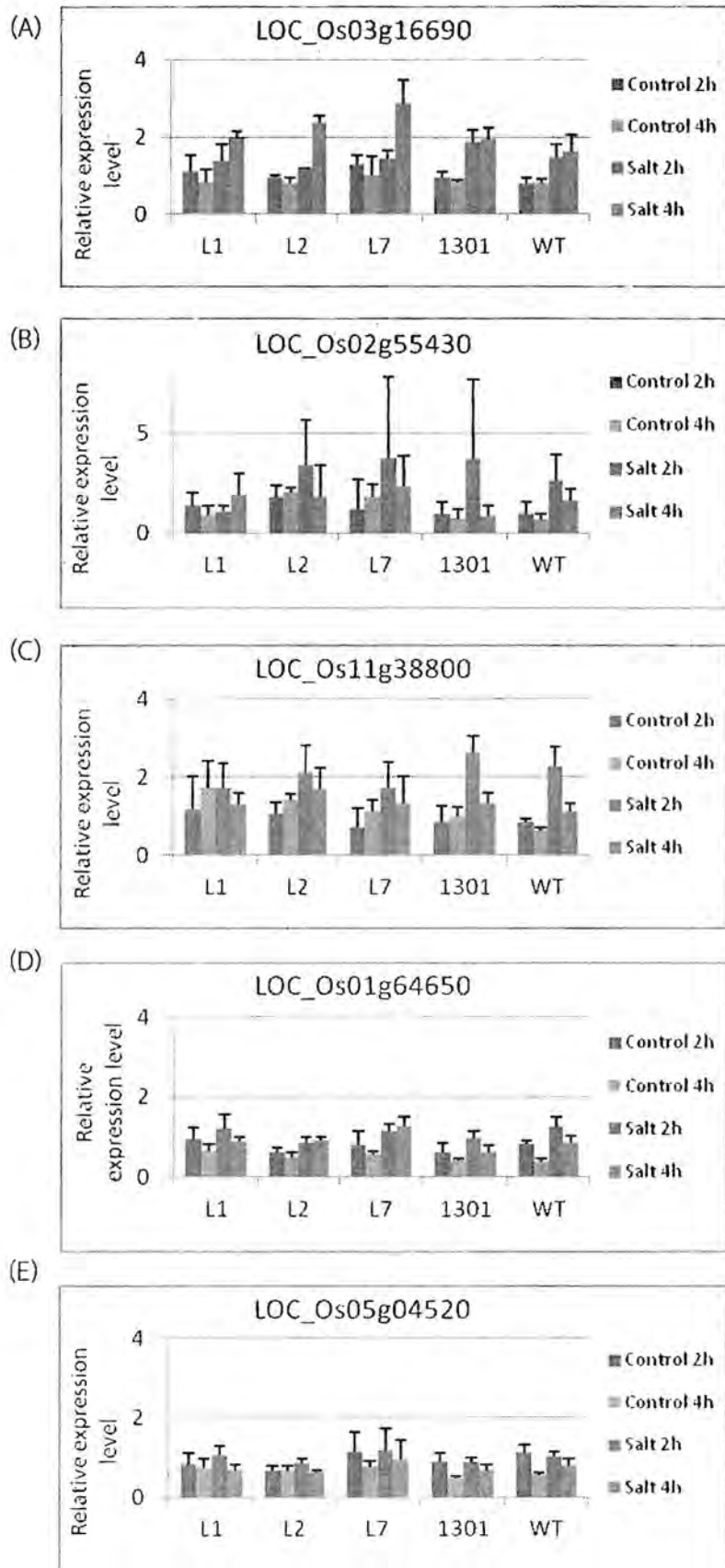
ข้อมูลของยีนที่มีค่า correlation coefficient สูงสุด 5 อันดับแรกสรุปได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ข้อมูลของยีนที่มีการแสดงออกพร้อมกับยีน *OsCam1-1* ที่มีค่า correlation coefficient สูงสุด 5 อันดับแรก

Locus	Putative Function	CDS length	Protein length
LOC_Os03g16690	oxysterol-binding protein, putative, expressed	1,392	463
LOC_Os02g55430	alginate regulatory protein AlgP, putative, expressed	657	218
LOC_Os11g38800	zinc finger family protein, putative, expressed	837	278
LOC_Os01g64650	VAMP-like protein YKT62, putative, expressed	651	216
LOC_Os05g04520	protein kinase, putative, expressed	1,086	361

1.2 การตรวจสอบระดับการแสดงออกของ candidate genes ในข้าวทรานส์เจนิคที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติ

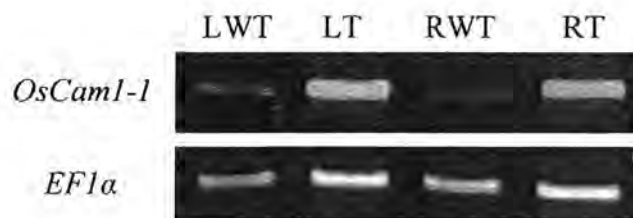
หลังจากสกัดอาร์เอ็นเอจากข้าวทรานส์เจนิคที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติ ข้าว wild-type และข้าวทรานส์เจนิคควบคุมอายุ 3 สัปดาห์ที่ได้รับความเครียดจากความเค็ม (150 mM NaCl) เป็นเวลา 2 และ 4 ชั่วโมง และนำมาตรวจสอบระดับการแสดงออกของ candidate genes ทั้งห้าด้วยวิธี real-time RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ดังตารางที่ 1 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 ระดับการแสดงออกของยีนที่มีการแสดงออกร่วมกับยีน *OsCam1-1* ในข้าวชาวดอกมะลิทรานส์เจนิคที่แสดงออกยีน *OsCam1-1* เกินปกติสามสายพันธุ์ (L1, L2 และ L7) ข้าวทรานส์เจนิคควบคุมที่ได้รับการทรานสฟอร์มด้วยเวกเตอร์ pCAMBIA1301 เท่านั้น (1301) และข้าวชาวดอกมะลิ wild type (WT) ที่ได้รับความเครียดจากความเค็ม (150 mM NaCl) เป็นเวลา 2 และ 4 ชั่วโมง

1.3 การแสดงออกของยีน *OsCam1-1* ในใบและในรากของข้าวทรานส์เจนิคส์

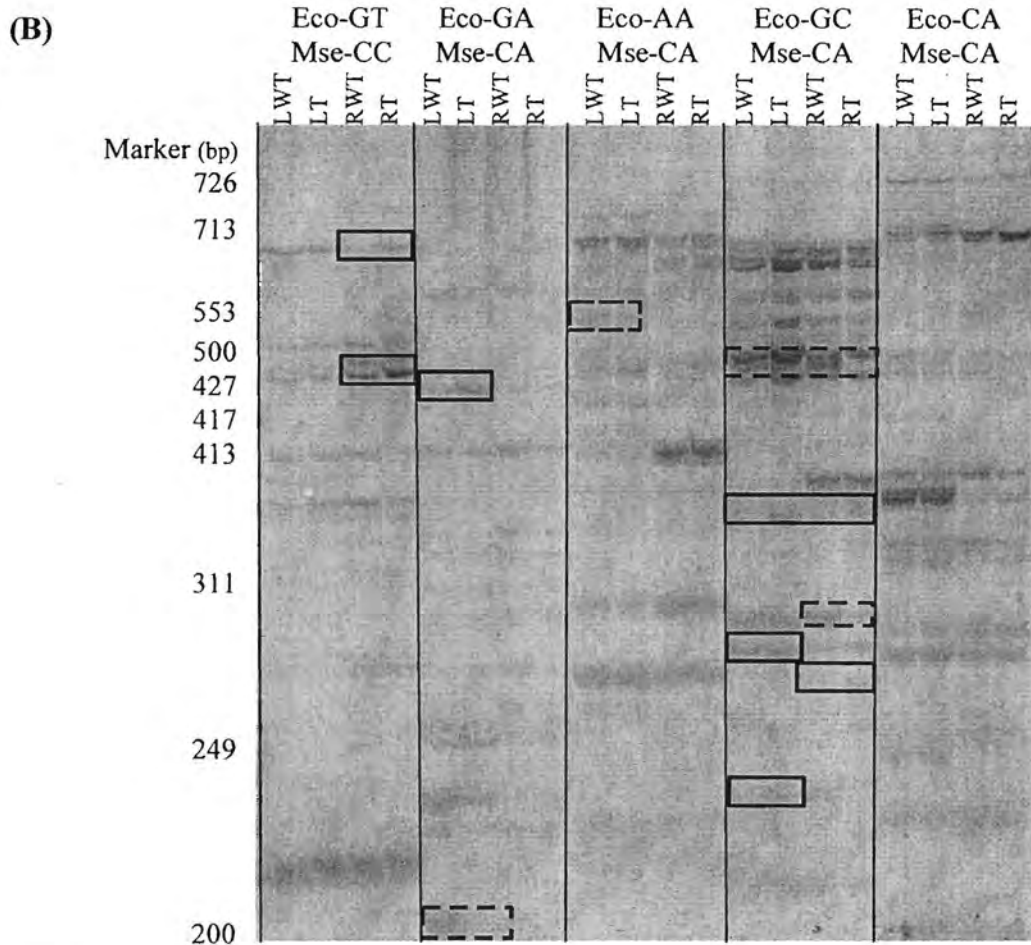
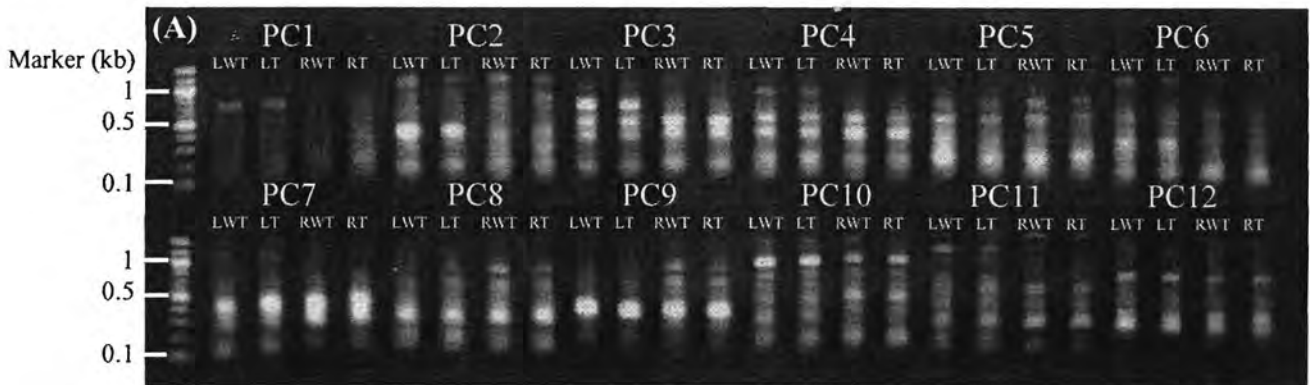
จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* ในใบและในรากของข้าวทรานส์เจนิคส์ที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้โดยวิธี semiquantitative RT-PCR เมื่อนำ PCR product ที่เพิ่มปริมาณโดยอาศัยไพรเมอร์ที่ระบุในวิธีดำเนินการวิจัยมาแยกด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 7 ซึ่งพบว่าข้าวทรานส์เจนิคส์นี้มีทรานส์คริปของยีน *OsCam1-1* สูงกว่าในข้าว wild-type อย่างมาก เป็นการยืนยันว่ายีน *OsCam1-1* ที่ทรานสฟอร์มเข้าไปในข้าวทรานส์เจนิคส์ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35SCaMV มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเกินปกติจริงทั้งในใบและในราก



รูปที่ 7 การแสดงออกของยีน *OsCam1-1* ในใบและในรากของข้าวทรานส์เจนิค (LT และ RT) เปรียบเทียบกับข้าว wild-type (LWT และ RWT) โดยใช้ยีน *EF1α* เป็น internal control

1.4 การระบุยีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงโดยวิธี cDNA-AFLP

หลังจาก double-stranded cDNA ที่นำมาเชื่อมต่อกับ adaptor จากนั้นเพิ่มปริมาณดังวิธีการข้างต้น เมื่อนำ PCR product ที่ได้มาแยกในเบื่องตัน ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่า ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 8 ซึ่งแสดง transcript profile ของข้าวที่ได้จาก PC ต่างๆ จำนวน 12 แบบ โดย transcript-derived fragments (TDFs) ที่ได้ส่วนใหญ่กระจายอยู่ระหว่าง 100-1,000 คู่เบส (รูปที่ 8A) เมื่อแยก PCR product บน denaturing PAGE ซึ่งให้ความละเอียดสูงกว่า สามารถแยก TDF ออกจากกันเพื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกระหว่างข้าวทรานส์เจนิคกับข้าว wild-type ได้ ดังตัวอย่างที่ได้จากไพรเมอร์จำนวน 5 แบบได้แก่ Eco-GT/Mse-CC, Eco-GA/Mse-CA, Eco-AAV/Mse-CA, Eco-GC/Mse-CA และ Eco-CA/Mse-CA (รูปที่ 8B) จากการใช้ PC ทั้งหมด 33 แบบ เราพบ TDF จำนวน 100 ชิ้นที่มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกัน โดย TDF จำนวน 45 ชิ้นแสดงออกเพิ่มขึ้น (23 ในใบ และ 22 ในราก) และจำนวน 49 ชิ้นแสดงออกลดลง (24 ในใบ และ 25 ในราก) นอกจากนี้ยังพบ TDF 2 ชิ้นที่แสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งในใบและในราก 3 ชิ้นที่แสดงออกลดลงทั้งในใบและในราก และอีก 1 ชิ้นที่แสดงออกลดลงในใบแต่เพิ่มขึ้นในราก



รูปที่ 8 (A) รูปแบบของ cDNA-AFLP transcript บนเจลอะกาโรสแสดงกลุ่ม TDF ที่จำเพาะจากการเพิ่มปริมาณด้วย PC ต่างๆ (B) amplification product ที่แยกด้วย Denaturing PAGE จาก PC จำนวน 5 แบบที่แตกต่างกันเปรียบเทียบระหว่าง PDF จากข้าวทรานส์เจนิคและข้าว wild-type (LWT: ใบข้าว Wildp-type; LT: ใบข้าวทรานส์เจนิค; RWT: รากข้าว Wildp-type; RT: รากข้าวทรานส์เจนิค) กล่องเส้นทึบแสดง TDF บางชิ้นที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น และกล่องเส้นประแสดง TDF บางชิ้นที่มีระดับการแสดงออกลดลง

1.5 การระบุยีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงในข้าวทรานส์เจนิก

หลังจากโคลน PCR product ที่เพิ่มปริมาณได้จากชิ้น TDF ที่ได้เข้าสู่ pJET1.2/blunt cloning vector และหาลำดับเบสที่ Macrogen Inc., Korea โดยใช้ vector-specific primer แล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปสืบค้นในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST เราสามารถระบุชนิดของยีนที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงในข้าวทรานส์เจนิกจำนวน 34 ยีน ตารางที่ 4 แสดงตัวอย่างของยีนที่ระบุชนิดได้จากการสืบค้นฐานข้อมูล

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลของยีนของ TDF ที่ระบุได้จากการหาลำดับเบสและการสืบค้นฐานข้อมูล

ลำดับที่	รหัส	การแสดงออก	ชื่อโลคัส	annotation
1	1RU2	up-regulated in root	LOC_Os04g49194.1	naringenin 2-oxoglutarate 3-dioxygenase, putative, expressed
2	2LU1	up-regulated in leaf	LOC_Os12g07740.1	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma, putative, expressed
3	2LU2	up-regulated in leaf	LOC_Os11g05130	PHD-finger family protein, expressed
4	2LD1	down-regulated in leaf	Os03g0197700	zinc finger, C2H2-type domain containing protein
5	4LRD1	down-regulated in leaf and root	LOC_Os07g33300.1	none
6	16RD1	down-regulated in root	CT832277.1 (c-DNA clone NCBI)	
7	18LD1	down-regulated in leaf	LOC_Os03g05390.1	citrate transporter protein, putative, expressed
8	18LD2	down-regulated in leaf	AB126351.1 (complete CDS NCBI)	vacuolar proton pyrophosphatase
9	18RD1	down-regulated in root	HM050426.1 (complete CDS NCBI)	trehalose-6-phosphate synthase 3
10	18RD3	down-regulated in root	LOC_Os03g52660.1	ATP synthase F1, delta subunit family protein, putative, expressed

อภิปรายผลการทดลอง (Discussion)

จากการวิเคราะห์หายีนที่มีการแสดงออกร่วมกับยีน *OsCam1-1* (LOC_Os03g20370) จากฐานข้อมูลการแสดงออกร่วมของข้าว (<http://www.ricearray.org/coreexpression/coexpression.shtml>) พบยีนจำนวนมากที่มีค่า correlation coefficient มากกว่า 0.7 จึงได้คัดเลือกยีนที่มีค่า correlation coefficient สูงสุด 5 อันดับแรก ได้แก่ LOC_Os03g16690 oxysterol-binding protein, putative, expressed; LOC_Os02g55430 alginate regulatory protein AlgP, putative, expressed; LOC_Os11g38800 zinc finger family protein, putative, expressed; LOC_Os01g64650 VAMP-like protein YKT62, putative, expressed; และ LOC_Os05g04520 protein kinase, putative, expressed มาตรวจสอบระดับการแสดงออกโดยวิธี real-time RT-PCR ในข้าวทรานส์เจนิกที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติ พบว่ายีน LOC_Os01g64650 (รูปที่ 6D) และ LOC_Os05g04520 (รูปที่ 6E) มีระดับการแสดงออกไม่เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับความเครียดจากความเค็ม (150 mM NaCl) และไม่แสดงความแตกต่างระหว่างข้าวทรานส์เจนิกที่แสดงออกยีน *OsCam1-1* เกินปกติกับข้าวทรานส์เจนิกควบคุมและข้าว wild-type ขณะที่ยีน LOC_Os02g55430 (รูปที่ 6B) ได้ผลการทดลองที่มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูงทำให้ไม่สามารถบอกถึงการเปลี่ยนแปลงหรือความแตกต่างของระดับการแสดงออกได้อย่างชัดเจน

สำหรับยีน LOC_Os03g16690 (รูปที่ 6A) พบว่าข้าวทรานส์เจนิกควบคุมและข้าว wild-type มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นประมาณสองเท่าเมื่อได้รับความเครียดจากความเค็มที่เวลา 2 และ 4 ชั่วโมง ขณะที่ข้าวทรานส์เจนิกที่แสดงออกยีน *OsCam1-1* เกินปกติพบว่าการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนในภาวะที่ได้รับความเครียดจากความเค็มที่เวลา 2 ชั่วโมงอยู่ในระดับที่ต่ำกว่า ขณะที่การเพิ่มระดับการแสดงออกที่เวลา 4 ชั่วโมงมีแนวโน้มที่สูงกว่า หรือพูดอีกอย่างหนึ่งก็คือการแสดงออกของยีน LOC_Os03g16690 ในข้าวทรานส์เจนิกที่แสดงออกยีน *OsCam1-1* เกินปกติเมื่อได้รับความเครียดจากความเค็มมีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นช้ากว่า แต่เมื่อเวลาผ่านไปจะมีระดับการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าข้าวทรานส์เจนิกควบคุมและข้าว wild-type

สำหรับยีน LOC_Os11g38800 (รูปที่ 6C) พบว่าข้าวทรานส์เจนิกควบคุมและข้าว wild-type มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นประมาณสองเท่าเมื่อได้รับความเครียดจากความเค็มที่เวลา 2 ชั่วโมง ขณะที่ข้าวทรานส์เจนิกที่แสดงออกยีน *OsCam1-1* เกินปกติแสดงแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกของยีนที่ต่ำกว่าข้าวทรานส์เจนิกควบคุมและข้าว wild-type เมื่อพิจารณาช่วงเวลาทั้งหมดจะเห็นว่าในข้าวทรานส์เจนิกที่แสดงออกยีน *OsCam1-1* เกินปกติเมื่อได้รับความเครียดจากความเค็มมีการแสดงออกของยีน LOC_Os11g38800 อยู่ในระดับที่ค่อนข้างคงที่ ขณะที่ข้าวทรานส์เจนิกควบคุมและข้าว wild-type มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นที่เวลา 2 ชั่วโมงอย่างชัดเจน

จากผลการทดลองข้าวต้นผู้วิจัยจึงสนใจยีน LOC_Os03g16690 และ LOC_Os11g38800 ที่มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปในข้าวที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติ ยีน LOC_Os03g16690 เป็นยีนสร้างโปรตีนที่เรียกว่า oxysterol-binding protein ที่มีสมบัติในการจับกับสารในกลุ่มสเตอรอล (sterol)

ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการสร้างผนังเซลล์ การสังเคราะห์ฮอร์โมนพวก สเตียรอยด์ และการรักษาองค์ประกอบและความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ขณะที่ยีน LOC_Os11g38800 เป็นยีนสร้าง zinc finger family protein ซึ่งทำหน้าที่เป็น transcription factor จึงเป็นที่น่าสนใจว่ายีนเหล่านี้ในข้าวจะมีหน้าที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดจากความเค็มที่อาศัยสัญญาณแคลเซียมอย่างไร

อย่างไรก็ตามเมื่อสืบค้นฐานข้อมูล RiceFOX ในขณะนี้ยังไม่พบว่ามี Arabidopsis ที่มีการแสดงออกของยีน LOC_Os03g16690 ที่เราต้องการ แต่พบ Arabidopsis ที่มีการแสดงออกของยีน LOC_Os11g38800 ซึ่งเป็น co-expressed gene อีกหนึ่งยีนที่เราพบว่ามีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปในข้าวทรานส์เจนิคที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติ ผู้วิจัยจึงได้สั่งซื้อ Arabidopsis ดังกล่าวจาก RiceFOX เพื่อนำมาศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้ของยีน LOC_Os11g38800 เห็นไม่ชัดเจนนัก จากการพิจารณาอย่างรอบคอบของคณะผู้วิจัยจึงมีความเห็นร่วมกันว่าควรคัดเลือก candidate genes เพิ่มเติมด้วยวิธีที่ชัดเจนกว่าการใช้ข้อมูลการแสดงออกร่วมของข้าวเพียงอย่างเดียว เพื่อให้มั่นใจว่าจะได้ยีนที่มีหน้าที่ที่ควบคุมด้วยยีน *OsCam1-1* อย่างแท้จริง ผู้วิจัยจึงเลือกเทคนิคที่จะสามารถระบุยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างข้าว wild-type กับข้าวทรานส์เจนิคที่มีการแสดงออกเกินปกติของยีน *OsCam1-1* ได้อย่างชัดเจน นั่นคือเทคนิค cDNA-AFLP

จากผลของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค cDNA-AFLP พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณ TDF ที่แตกต่างกันไปได้ด้วย PC แบบต่างๆ (รูปที่ 8) แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ในระดับทั้ง genome สามารถทำได้เมื่อใช้ PC ที่แตกต่างกันหลายๆ แบบ จากผลการทดลองพบรูปแบบของทรานส์คริปต์ที่แตกต่างกันระหว่างใบและรากของข้าวทรานส์เจนิค แสดงให้เห็นว่า TDF จำนวนมากนี้ถูกควบคุมแตกต่างกันในอวัยวะดังกล่าว โดยจากการใช้ PC ทั้งหมด 33 แบบได้ TDF จำนวนทั้งหมด 100 ชิ้น และเมื่อนำ TDF เหล่านี้มาโคลนและหาลำดับเบสสามารถระบุยีนได้ทั้งหมด 34 ยีน ดังตัวอย่างแสดงในตารางที่ 4 ดังนั้นด้วยจำนวน PC 33 แบบที่ใช้จากจำนวน PC ทั้งหมดที่เป็นไปได้ 256 แบบ จึงอาจกล่าวได้ว่าจำนวนยีนที่ได้รับผลกระทบจากยีน *OsCam1-1* น่าจะมีเป็นจำนวนมาก จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่ายีน *OsCam1-1* มีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการตอบสนองต่อความเครียดที่ไม่มีชีวิตหลายชนิดได้แก่ ความร้อน การเกิดบาดแผล ความเครียดออกซิเดติก และความเครียดจากความเค็ม จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ายีน *OsCam1-1* น่าจะสร้างโปรตีนรับสัญญาณแคลเซียมที่มีหน้าที่สำคัญในการตอบสนองต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อมในข้าว

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการใช้ข้อมูลการแสดงออกร่วมกับยีน *OsCam1-1* จากฐานข้อมูล และการตรวจสอบระดับการแสดงออกของ candidate genes ด้วยเทคนิค real-time RT-PCR ในข้าวทรานส์เจนิกที่มีการแสดงออกของยีน *OsCam1-1* เกินปกติ พบยีน LOC_Os03g16690 และ LOC_Os11g38800 มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไป และเป็น candidate genes ที่อาจนำไปศึกษาต่อ เมื่อสืบค้นฐานข้อมูล RiceFOX พบ Arabidopsis ที่มีการแสดงออกของยีน LOC_Os11g38800 เกินปกติ ผู้วิจัยจึงได้สั่งซื้อ Arabidopsis ดังกล่าวจาก RiceFOX เพื่อนำมาศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้ของยีน LOC_Os11g38800 เห็นไม่ชัดเจนนัก จากการพิจารณาอย่างรอบคอบของคณะผู้วิจัยจึงมีความเห็นร่วมกันว่าควรคัดเลือก candidate genes เพิ่มเติมเพื่อให้มั่นใจว่าจะได้ยีนที่มีหน้าที่ที่ควบคุมด้วยยีน *OsCam1-1* อย่างแท้จริง ผู้วิจัยจึงเลือกเทคนิค cDNA-AFLP ที่จะสามารถระบุยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างข้าว wild-type กับข้าวทรานส์เจนิกที่มีการแสดงออกเกินปกติของยีน *OsCam1-1* ได้อย่างชัดเจน ผลปรากฏว่าพบยีนจำนวนมากที่มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปจากการโคลนและหาลำดับเบสสามารถระบุชนิดของยีนได้ทั้งหมด 34 ยีน ขั้นตอนต่อไปผู้วิจัยจะยืนยันระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในข้าวทรานส์เจนิกด้วยวิธี real-time RT-PCR และคัดเลือกยีนที่มีระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนและมีหน้าที่ที่น่าสนใจมาเพื่อศึกษาหน้าที่ต่อไป

บรรณานุกรม (Bibliography)

- Bachem CWB, Oomen RUFJ, Visser RGF. Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol. *Plant Mol Biol Rep* 1998, 16: 157-173.
- Bassam, BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1991, 196: 80-83.
- Boonburapong B, Buaboocha T. Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins. *BMC Plant Biol* 2007, 7: 4.
- Chattopadhyaya R, Meador WE, Means AR, Quijcho FA. Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol* 1992, 228: 1177-1192.
- Cao P, Jung KH, Choi D, Hwang D, Zhu J, Ronald PC. The Rice Oligonucleotide Array Database: an atlas of rice gene expression. *Rice* 2012, 5:17.
- Duval FD, Renard M, Jaquinod M, Biou V, Montrichard F, Macherel D. Differential expression and functional analysis of three calmodulin isoforms in germinating pea (*Pisum sativum* L.) seeds. *Plant J* 2002, 32: 481-493.
- Fu F-F, Xue, H-W. Coexpression analysis identifies rice starch regulator1, a rice AP2/EREBP family transcription factor, as a novel rice starch biosynthesis regulator. *Plant Physiol* 2010, 154: 927-938.
- Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D, Bohnert H. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* 2001, 13: 889-905.
- Knight, H. Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int Rev Cytol* 2000, 195: 269-325.
- Kretsinger RH, Nockolds CE. Carp muscle calcium-binding protein. *J Biol Chem* 1973, 248: 3313-3326.
- Harmon AC, Gribskov M, Harper JF. CDPKs: a kinase for every Ca²⁺ signal? *Trends Plant Sci* 2000, 5: 154-159.
- Horan K, Jang C, Bailey-Serres J, Mittler R, Shelton C, Harper JF, Zhu J-K, Cushman JC, Gollery M, Girke T. Annotating genes of known and unknown function by large-scale coexpression analysis. *Plant Physiol* 2008, 147: 41-57.
- Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, Yalovsky S, Gruissem W. Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific response coupling in plants. *Plant Cell* 2002, (suppl.): S389-S400.

- Lee SH, Kim JC, Lee MS, Heo WD, Seo HY, Yoon HW, Hong JC, Lee SY, Bahk JD, Hwang I, Cho MJ. Identification of a novel divergent calmodulin isoform from soybean which has differential ability to activate calmodulin-dependent enzymes. *J Biol Chem* 1995, 270: 21806-21812.
- Lee T-H, Kim Y-K, Pham TTM, Song SI, Kim J-K, Kang KY, An G, Jung KH, Galbraith DW, Kim M, Yoon U-H, Nahm BH. RiceArrayNet : A database for correlating gene expression from transcriptome profiling, and its application to the analysis of coexpressed genes in rice. *Plant Physiol* 2009, 151: 16-33.
- McAinsh MR, Pittman JK. Shaping the calcium signature. *New Phytol* 2009, 181: 275-294.
- O'Neil KT, DeGrado WF. How calmodulin binds its targets: Sequence independent recognition of amphiphilic α -helices? *Trends Biochem Sci* 1990, 15: 59-64.
- Ouyang S, Zhu W, Hamilton J, Lin H, Campbell M, Childs K, Thibaud-Nissen F, Malek RL, Lee Y, Zheng L, Orvis J, Haas B, Wortman J, Buell CR. The TIGR Rice Genome Annotation Resource: improvements and new features. *Nucleic Acids Res* 2007, 35(Database Issue): D846-851.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. (2001) *Nucleic Acids Res*, 29:.
- Phean-o-pas S, Punteeranurak P, Buaboocha T. Calcium signaling-mediated and differential induction of calmodulin gene expression by stress in *Oryza sativa* L. *J Biochem Mol Biol* 2005, 38: 432-439.
- Rodriguez-Concepcion M, Yalovsky S, Zik M, Fromm H, Gruissem W. The prenylation status of a novel plant calmodulin directs plasma membrane or nuclear localization of the protein. *EMBO J* 1999, 18: 1996-2007.
- Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. (2000) Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- Sakurai T, Kondou Y, Akiyama K, Kurotani A, Higuchi M, Ichikawa T, Kuroda H, Kusano M, Mori M, Saitou T, Sakakibara H, Sugano S, Suzuki M, Takahashi H, Takahashi S, Takatsuji H, Yokotani N, Yoshizumi T, Saito K, Shinozaki K, Oda K, Hirochika H, Matsui M. RiceFOX: A database of Arabidopsis mutant lines overexpressing rice full-length cDNA that contains a wide range of trait information to facilitate analysis of gene function. *Plant Cell Physiol* 2011, 52: 265-273.

- Sanders D, Brownlee C, and Harper JF. Communicating with calcium. *Plant Cell* 1999, 11: 691-706.
- Takezawa D, Liu ZH, An G, Poovaiah BW. Calmodulin gene family in potato: developmental and touch-induced expression of the mRNA encoding a novel isoform. *Plant Mol Biol* 1995, 27: 693-703.
- Yamakawa H, Mitsuhara I, Ito N, Seo S, Kamada H, Ohashi Y. Transcriptionally and post-transcriptionally regulated response of 13 calmodulin genes to tobacco mosaic virus-induced cell death and wounding in tobacco plant. *Eur J Biochem* 2001, 268: 3916-3929
- Yonekura-sakakibara K, Tohge T, Matsuda F, Nakabayashi R, Takayama H, Niida R, Watanabe-Takahashi A, Inoue E, Saito K . Comprehensive flavonol profiling and transcriptome coexpression analysis leading to decoding gene-metabolite correlations in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2008, 20: 2160-2176.
- Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez CA. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice, (3rd ed.) Laguna, PHILIPPINES: P.O. BOX. 1976, 933.
- Zielinski RE. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1998, 49: 697-725.

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) นายธีรพงษ์ บัวบุชา
ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Teerapong Buaboocha
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3259900146177
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ดร.
4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ ๑๐๓๓๐
โทรศัพท์ 02-218-5425, 02-218-5416
โทรสาร 02-218-5418
อีเมล Teerapong.B@Chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

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

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
ชีววิทยาโมเลกุลของพืช
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

- 7.1.1 Mechanisms of calcium signaling and salt stress tolerance in rice using transcriptomics analysis and molecular approaches
แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
- 7.1.2 Genome-wide association study of in-land salt resistant traits in Thai rice (*Oryza sativa* L.)
แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
- 7.1.3 Functional characterization of *OsCML* genes from *Oryza sativa* L.
แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

- 7.1.4 RNA-induced gene silencing under control of *OsCam1-1* promoter
แหล่งทุน Asahi Glass Foundation
- 7.1.5 Effect of transgenic expression in rice of a calmodulin on salt stress response
แหล่งทุน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 7.1.6 Identification of calmodulin-binding proteins involved in salt stress response from rice *Oryza sativa* L. cv. KDML105
แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
- 7.1.7 Production of recombinant rice calmodulin in *Escherichia coli*
แหล่งทุน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 7.1.8 Expression of genes encoding Ca²⁺-binding calcineurin B-like proteins under osmotic stress
แหล่งทุน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 7.1.9 Cloning of a betaine transporter gene and functional studies of its product from *Aphanothece halophytica*
แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
- 7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว
- 7.2.1 Sripinyowanich S, Chamnanmanoontham N, Udomchalothorn T, Maneeprasopsuk S, Santawee P, Buaboocha T, Qu L-J, Gu H, Chadchawan S. Overexpression of a partial fragment of the salt-responsive gene OsNUC1 enhances salt adaptation in transgenic *Arabidopsis thaliana* and rice (*Oryza sativa* L.) during salt stress. *Plant Science*, 213: 67-78
แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และทุนมหาวิทยาลัยวิจัย
- 7.2.2 Sripinyowanich S, Klomsakul P, Boonburapong B, Bangyeekhun T, Asami T, Gu H, Buaboocha T, Chadchawan S. Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): the role of *OsP5CS1* and *OsP5CR* gene expression during salt stress. *Environ Exp Bot* 2013, 86: 94-105
แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

- 7.2.3 Chinpongpanich A, Limruengroj K, Phean-o-pas S, Limpaseni T, Buaboocha T. Expression analysis of calmodulin and calmodulin-like genes from rice, *Oryza sativa* L. *BMC Research Notes* 2012, 5:625
แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และทุนมหาวิทยาลัยวิจัย
- 7.2.4 Saeng-ngam S, Takpirom W, Buaboocha T, Chadchawan S. The role of the *OsCam1-1* salt stress in ABA accumulation and salt tolerance in rice. *J Plant Biol* 2012, 55: 198-208
แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และทุนมหาวิทยาลัยวิจัย
- 7.2.5 Chinpongpanich A, Thairath, S, Wutipraditkul N, Buaboocha T. Biophysical characterization of calmodulin and calmodulin-like proteins from rice, *Oryza sativa* L. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2011, 43: 867-876
แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และทุนมหาวิทยาลัยวิจัย
- 7.2.6 Wutipraditkul N, Boonkomrat S, Buaboocha T. Expression and characterization of catalases from rice, *Oryza sativa*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2011, 75(10): 1900-1906
แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
- 7.2.7 Phean-o-pas S, Limpaseni T, Buaboocha T. Structure and Expression Analysis of the *OsCam1-1* Calmodulin Gene from *Oryza sativa* L. *BMB Reports* 2008, 41(11): 771-777
แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
- 7.2.8 Boonburapong B, Buaboocha T. Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins. *BMC Plant Biology* 2007, 7:4
แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
- 7.2.9 Laloknam S, Tanaka K, Buaboocha T, Waditee R, Incharoensakdi A, Hibino T, Tanaka Y, Takabe T. A Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains betaine transporter that is active at alkaline pH under high salinity conditions. *Appl Environ Microb* 2006, 72(9): 6018-6026
แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

- 7.2.10 Waditee R, Buaboocha T, Kato M, Hibino T, Suzuki S, Nakamura T, Takabe T. Carboxyl terminal hydrophilic tail of a NhaP type Na^+/H^+ antiporter from cyanobacteria is involved in the apparent affinity for Na^+ and pH sensitivity. *Arch Biochem Biophys* 2006, 450(1): 113-121

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ

- | | | |
|-------|-----------------|---|
| 7.3.1 | โครงการ | Genome-wide association study of in-land salt resistant traits in Thai rice (<i>Oryza sativa</i> L.) |
| | ระยะเวลาโครงการ | 3 ปี ตั้งแต่ พฤษภาคม 2555 ถึง กรกฎาคม 2558 |
| | แหล่งทุน | สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) |
| | สถานะผู้สมัคร | หัวหน้าโครงการ |
| | สถานภาพงานวิจัย | ดำเนินการได้ร้อยละ 40 |
| 7.3.2 | โครงการ | Mechanisms of calcium signaling and salt stress tolerance in rice using transcriptomics analysis and molecular approaches |
| | ระยะเวลาโครงการ | 3 ปี ตั้งแต่ กันยายน 2556 ถึง กันยายน 2559 |
| | แหล่งทุน | สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย |
| | สถานะผู้สมัคร | หัวหน้าโครงการ |
| | สถานภาพงานวิจัย | ดำเนินการได้ร้อยละ 10 |
-

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) นาย ศุภอรรถ ศิริกันทรมาศ
ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Supaart Sirikantaramas
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน
3 1021 01028 86 1
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
อาจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ ๓ 10330
โทรศัพท์ 02-218-5425, 02-218-5416
โทรสาร 02-218-5418
อีเมล supaart.s@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

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

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
ชีววิทยาโมเลกุลทางพืช พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย
 - 7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย
 - 7.1.1 การสำรวจชนิดและปริมาณสารพฤษเคมีกลุ่มกลูโคซิโนเลตในผักตระกูลกะหล่ำ
 - 7.1.2 ผลของโคโตซานต่อการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังและเพลี้ยแป้งสีชมพู

7.1.3 การโคลน การแสดงออกและฤทธิ์ชีวภาพของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ต้านจุลชีพจากข้าว

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

7.2.1 การสำรวจชนิดและปริมาณสารพฤษเคมีกลุ่มกลูโคซิโนเลตในผักตระกูลกะหล่ำ

7.2.2 ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังและเปลี่ยนแปลงสีชมพู

7.2.3 การโคลน การแสดงออกและฤทธิ์ชีวภาพของรีคอมบิแนนท์เปปไทด์ต้านจุลชีพจากข้าว

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ

7.3.1 โครงการ การตอบสนองของเมตาโบไลต์ในข้าวไทยต่อภาวะเครียดจากความเค็มและเครียดออกซิเดชัน

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี ตั้งแต่ 1 พฤษภาคม 2555 ถึง 30 เมษายน 2557

แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร

สถานะผู้สมัคร หัวหน้าโครงการ

สถานภาพงานวิจัย ดำเนินการได้ร้อยละ 50

7.4 ผลงานตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ

7.4.1 งานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

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

Sirikantaramas, S., Yamazaki, Y., Saito, K. (2013) How plants avoid the toxicity of self-produced defense bioactive compounds. *Natural Products: Discourse, Diversity and Design* (Book Chapter, Accepted)

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

Sirikantaramas, S., Yamazaki, Y., Saito, K. (2009) A survival strategy: the coevolution of the camptothecin biosynthetic pathway and self-resistance mechanism. *Phytochemistry* 70, 1894-1898. (IF = 3.2)

Lehmann, M., Schwarzländer, M., Obata, T., Sirikantaramas, S., Burow, M., Olsen, C.E., Tohge, T., Fricker, M.D., Møller, B.L., Fernie, A.R., Sweetlove, L.J., and Laxa, M. (2009) The metabolic response of *Arabidopsis* roots to oxidative stress is distinct

from that of heterotrophic cells in culture and highlights a complex relationship between the levels of transcripts, metabolites, and flux. *Mol. Plant.* 2, 390-406. (IF = 4.3)

Sirikantaramas, S., Yamazaki, M., and Saito, K. (2008) Mechanisms of resistance to self-produced toxic secondary metabolites in plants. *Phytochem. Rev.*7, 467-477. (IF will be released in 2011)

Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Shoyama, Y., and Morimoto, S. (2008) Phytocannabinoids in *Cannabis sativa*: Recent studies on biosynthetic enzymes. In: Lambert, D.M. (Ed.), *Cannabinoids in Nature and Medicine*. Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich.

Sirikantaramas, S., Yamazaki, M., and Saito, K. (2008) Mutation in topoisomerase I as a self-resistance mechanism coevolved with the production of the anticancer alkaloid camptothecin in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*105, 6782-6786. (IF = 9.8)

Sirikantaramas, S., Asano, T., Sudo, H., Yamazaki, M., and Saito, K. (2007) Transport of camptothecin in hairy roots of *Ophiorrhiza pumila*. *Phytochemistry* 68, 2881-2886. (IF = 3.2)

Taura, F., Dono, E., Sirikantaramas, S., Yoshimura, K., Shoyama, Y., and Morimoto, S. (2007) Production of tetrahydrocannabinolic-acid by the biosynthetic enzyme secreted from transgenic *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361, 675-680. (IF = 2.6)

Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Yoshikai, K., Shoyama, Y., and Morimoto, S. (2007) Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*. *FEBS Lett.* 581, 2929-2934. (IF = 3.5)

Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Shoyama, Y., and Morimoto, S. (2007) Phytocannabinoids in *Cannabis sativa*: Recent studies on biosynthetic enzymes. *Chem. Biodivers.* 4, 1649-1663. (IF = 1.9)

Sirikantaramas, S., Taura, F., Morimoto, S., and Shoyama, Y. (2007) Recent advances in *Cannabis sativa* research: biosynthetic studies and potential in biotechnology. *Curr. Pharm. Biotech.* 8, 237-243. (IF = 3.4)

Sirikantaramas, S., Asano, T., Sudo, H., Yamazaki, M., and Saito, K. (2007)

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

7.4.2 งานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

ศุภอรจรจ ศิริกันทรมาศ (2012) UDP-ไกลโคซิลทรานสเฟอร์เรส แพลมิตีที่ 1: ความหลากหลายของหน้าที่ในพืช วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. ฉบับที่ 28 ปีที่ 2 ธันวาคม 2555.

7.4.3 งานตีพิมพ์ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

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

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

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

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

Piriyakananon, K., Karnpakdee, K., Nomai, S., Olsen, C.E., Boonrueng, C., Tangpranomkorn, S., Sirikantaramas, S. (2012) Metabolite changes in chitosan-sprayed white radish sprouts. November 28-30, The Fourth International Conference on Natural Products for Health and Beauty, Chiang Mai, Thailand.

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

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) น.ส นุชนาถ วุฒิประดิษฐกุล
ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Nuchanat Wutipraditkul
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน
3 1002 01669 76 9
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ ๑๐๓๓๐
โทรศัพท์ 02-218-5425, 02-218-5416
โทรสาร 02-218-5418
อีเมล nuchanat.w@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

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

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
ชีววิทยาโมเลกุลทางพืช พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย
 - 7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย
 - 7.1.1 การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของแคทาเลสจากข้าว *Oryza sativa* L.
 - 7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว
 - 7.2.1 การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของแคทาเลสจากข้าว *Oryza sativa* L.
 - 7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ

7.3.1 การยับยั้ง xanthine oxidase ในมะรุม *Moringa oleifera* ภายใต้ภาวะเครียด (หัวหน้าโครงการ)

7.4 ผลงานตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ

7.4.1 งานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

Wutipraditkul N, Boonkomrat S, Buaboocha T. Expression and characterization of catalases from rice, *Oryza sativa*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2011, 75(10): 1900-1906.

Chinpongpanich A, Thairath, S, Wutipraditkul N, Buaboocha T. Biophysical characterization of calmodulin and calmodulin-like proteins from rice, *Oryza sativa* L. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2011, 43: 867-876.

นุชนาถ วุฒิประดิษฐกุล “ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและระบบต้านการเกิดออกซิเดชันในพืช”. *วารสารวิทยาศาสตร์ มช.* 39(2): (2554).

Krungkra S. R., Wutipraditkul N., Krungkrai J. 2008. Dihydroorotase of human malarial parasite *Plasmodium falciparum* differs from host enzyme. *Biochem Biophys Res Comm.* 366: 821-826.

Wutipraditkul N, Waditee R, Incharoensakdi A, Hibino T, Tanaka Y, Nakamura T, Shikata M, Takabe T, Takabe T. 2005. Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains Nap A- type Na⁺/H⁺ antiporter with novel ion specificity that are involved in salt tolerance at alkaline pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4176-4184

7.4.2 การประชุมวิชาการ

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