

การวิเคราะห์การตอบสนองของโปรตีนต่อความเค็มในรากข้าว ด้วยเทคนิคช็อตกันโปรตีโอมิกส์

Shotgun Proteomics Analysis of Salinity Stress-Responsive Proteins in Rice Root

นวลมาศ เกษรจันทร์^{1,2} นฤมล เผื่อนกรบ³ จันทิมา จเรสิทธิกุลชัย³ ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์⁴
วิชัย โหมสิตรัตน์^{1,2,5} และ สิทธิรักษ์ รอยตระกูล^{3*}
Nuanmat Kesonchan^{1,2}, Narumon Phaonakrop³, Janthima Jaresitthikunchai³,
Chatchawan Jantasuriyarat⁴, Wichai Kositratana^{1,2,5} and Sittiruk Roytrakul^{3*}

Abstract

Saline soil is one of the major problems that limit rice production in Thailand. Root is the first organ that perceives salinity. To determine the salt-tolerant in rice, the molecular responses in roots of salt-sensitive (IR29) and salt-tolerant (Pokkali) rice were therefore investigated using a shotgun proteomic approach. Rice seedlings were grown for 4 weeks before treatment with 513 mMNaCl and roots were collected after salt exposure for 1, 3, 5, 9, 24, 72, 120 and 168 hours. Total protein from roots was separated by SDS-PAGE, and the trypsin-digested bands were analyzed with LC-MS/MS. Among 307 differentially expressed proteins found to respond to salinity stress in roots, four proteins were found only in IR29 including DNA ligase IV, cell wall protein-like, putative STH1protein and Zn-finger in Ran binding protein and others. While eight proteins were observed only in Pokkali including D-mannose binding lectin family protein, typical P-type R2R3 Myb protein, PAS domain containing protein, transposon protein mutator sub-class, mutator-like transposase, putative calcium-binding protein annexin 6, photosystem II protein D2 and proteasome activator subunit 4-like. These results will lead to better understanding on salt stress response that is the important knowledge for further improvement of salt tolerance in rice.

Keywords: *Oryza sativa* L., GeLC-MS, salt stress response, root

¹ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

¹Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, KhamphangSaen Campus, NakhonPathom 73140, Thailand

²ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

²Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/ PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

³สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

³Genome Institute, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), KlongLuang, Pathumthani 12120, Thailand

⁴ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ 10900

⁴Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

⁵ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

⁵Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at KamphaengSaen, Kasetsart University, KamphaengSaen campus, NakhonPathom 73140, Thailand

รับเรื่อง : กรกฎาคม 2557

*Corresponding author: sittiruk@biotec.or.th

บทคัดย่อ

ดินเค็มเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตข้าวในประเทศไทย โดยรากเป็นอวัยวะแรกที่เผชิญกับความเค็ม เพื่อความเข้าใจกลไกการทนเค็มในข้าวจึงทำการศึกษากการตอบสนองต่อความเค็มที่ระดับโมเลกุลของรากข้าวทนเค็มพันธุ์ Pokkali และรากข้าวไม่ทนเค็มพันธุ์ IR29 ด้วยเทคนิคข้อกั้นโปรตีนโอมิกส์ โดยเฉพาะเลี้ยงต้นข้าวจนมีอายุ 4 สัปดาห์ แล้วเติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 513 มิลลิโมลาร์ เก็บตัวอย่างรากข้าว ที่เวลา 1 3 5 9 24 72 120 และ 168 ชั่วโมงหลังเติมเกลือ จากนั้นนำโปรตีนไปแยกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS PAGE ย่อยโปรตีนในแต่ละก่อนเจลด้วยเอนไซม์ทริปซินแล้ววิเคราะห์เปปไทด์ด้วย LC-MS/MS พบโปรตีนในรากข้าวจำนวน 307 ชนิดที่มีการแสดงออกตอบสนองต่อความเค็ม โดยมีโปรตีนที่พบเฉพาะในรากข้าว IR29 จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ DNA ligase IV, cell wall protein-like, putative STH1protein และ Zn-finger in Ran binding protein and others โปรตีนที่พบเฉพาะในรากข้าว Pokkaliจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ D-mannose binding lectin family protein, typical P-type R2R3Myb protein, PAS domain containing protein, transposon protein mutator sub-class, mutator-like transposase, putative calcium-binding protein annexin6, photosystem II protein D2 และ proteasome activator subunit 4-like การค้นพบโปรตีนทั้ง 12 ชนิด น่าจะเป็นองค์ความรู้สำคัญสำหรับทำความเข้าใจกลไกการตอบสนองต่อความเค็มเพื่อนำไปใช้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนเค็มต่อไป

คำนำ

ความเค็ม เป็นปัญหาสำคัญของภาคการเกษตร โดยเฉพาะการปลูกข้าว ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญในประเทศไทย โดยในปีพ.ศ. 2555 ประเทศไทยมีผลผลิตข้าวรวม 38.242 ล้านตัน มีปริมาณการส่งออกข้าว 6.93 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่าการส่งออก 145,982.0 ล้านบาทและมีปริมาณการส่งออกข้าวหอมมะลิ คิดเป็นร้อยละ 39.4 (2.17 ล้านตัน) (Rice Department, 2013) แต่ข้าวเป็นพืชที่อ่อนแอต่อความเค็ม ความเค็มจะส่งผลให้ เมล็ดข้าวฝ่อลีบ ใบไหม้ และมีผลผลิตต่อไร่ต่ำ พืชมีกลไกตอบสนองต่อความเค็มที่ซับซ้อนหลายรูปแบบ เช่น การรักษาสมดุลของไอออน การกำจัดอนุมูลอิสระ และการรักษาสมดุลแรงดันออสโมติก(Zhu, 2001)ผ่านกระบวนการสะสมสารต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน โพลีออล ไกลซีนเบตาอิน เป็นต้น (Yokoi *et al.*, 2002) เนื่องจากรากเป็นอวัยวะส่วนแรกของพืชที่ได้รับผลกระทบจากความเค็ม (Yan *et al.*, 2005) จึงมีการใช้เทคนิคโปรตีนโอมิกส์ มาศึกษาความสำคัญของโปรตีนบริเวณรากพืช และพบว่าโปรตีนมากกว่า 905 ชนิดที่มีบทบาทสำคัญในกลไกการทนเค็ม(Zhao *et al.*, 2013)ตามรายงานของ Zhou *et al.* (2011) พบว่าโดยการใช้เทคนิค

โปรตีนโอมิกส์ ตรวจพบการเปลี่ยนแปลงเชิงปริมาณของโปรตีนจำนวน 54 ชนิดในรากข้าวอินดิกาสายพันธุ์ cv. 93-11 เมื่อได้รับความเครียดจากความเค็ม โดยโปรตีนดังกล่าวมีบทบาทในเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต เมตาบอลิซึมของนิวคลีโอไทด์ ปฏิกริยารีดอกซ์ภายในเซลล์ การส่งสัญญาณภายในเซลล์ การฟื้นฟูหรือป้องกันเซลล์ นอกจากนี้ Yan *et al.* (2005) ได้ศึกษากการตอบสนองต่อความเครียดจากความเค็มของรากข้าวพันธุ์ Nipponbare ด้วยเทคนิค 2-DE analysis และ Mass Spectrometry พบโปรตีนทั้งหมด 1,100 จุดซึ่งมีโปรตีน 34 จุดเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้น และโปรตีน 20 จุดเปลี่ยนแปลงลดลง แต่มีโปรตีนเพียง 10 จุดเท่านั้นที่สามารถระบุชนิดได้ โดยโปรตีนที่มีหน้าที่ตอบสนองต่อความเครียดจากความเค็ม 4 ชนิด ได้แก่ Peroxidase, Putative nascent polypeptide associated complex alpha chain (α -NAC), Putative splicing factor-like protein และ Putative actin-binding protein (ABP) และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมจำนวน 6 ชนิด คือ Triose phosphate isomerase, Enolase, UGPase, COX6b-1, Glutamine synthetase root isozyme และ SAMS2

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้คือศึกษาการตอบสนองต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ของรากข้าวทนเค็ม

พันธุ์ Pokkali และรากข้าวไม่ทนเค็มพันธุ์ IR 29 ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับกลไกการทนเค็ม ในรากข้าว ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนเค็มในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

เตรียมตัวอย่างข้าวสำหรับการทำวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้เมล็ดข้าวพันธุ์ทนเค็ม คือ Pokkali และ ข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็ม คือ IR29 นำเมล็ดข้าวมาแช่ใน Clorox® 5 % นาน 16 ชั่วโมง ตามด้วย Clorox® 20 % นาน 15 นาที แล้วเพาะเมล็ดข้าวบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ย้ายต้นข้าวลงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม Benzyl adenine ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อเพิ่มจำนวนต้นให้เพียงพอ จากนั้นย้ายข้าวต้นเดี่ยวลงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อให้ข้าวมีการปรับตัว และลดผลตกค้างของสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อสังเกตว่าข้าวต้นเดี่ยวไม่มีการแตกกอเพิ่ม จึงย้ายมาเพาะลงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตอีกครั้ง และปล่อยให้ข้าวยึดต้นเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วย้ายต้นข้าวลงบน Vermiculite ที่เติมอาหารเหลว ¼ MS ปราศจากน้ำตาล เพาะเลี้ยงในสภาพโรงเรือน คลุมถุงพลาสติกหลวมๆ นาน 2 สัปดาห์ เพื่อให้ต้นข้าวมีการปรับตัว แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นสุดท้าย 513 มิลลิโมลาร์ ลงในตัวอย่างแบ่งเป็นชุดควบคุมกับชุดทดลอง เก็บตัวอย่างรากข้าว ที่เวลา 0 1 3 5 9 12 24 72 120 และ 168 ชั่วโมง หลังเติมเกลือ

ศึกษาการแสดงออกของยีนที่ระดับโปรตีนด้วยเทคนิคซีอ็อกทกันโปรตีโอมิกส์

นำตัวอย่างรากข้าวหนัก 200 มิลลิกรัม มาบดในไนโตรเจนเหลว สกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 0.5 % Sodium dodecylsulfate (SDS) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร นำไปแช่เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เก็บส่วน

ใสมาวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951) วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 750 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) หลังจากนั้นแยกโปรตีนตามขนาดด้วย SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) นำโปรตีนปริมาณ 10 ไมโครกรัม ผสมกับสีย้อมที่ประกอบด้วย Dithiothreitol 1.925 กรัม SDS 10 % Glycerol 40 % สี Bromophenol Blue 1.0 % และ Tris buffer ความเข้มข้น 3 โมลาร์ pH 6.8 แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ผ่านกระแสไฟฟ้า 50 และ 70 โวลต์ เป็นเวลา 3 - 4 ชั่วโมงสำหรับแยกโปรตีนตัวอย่าง เปรียบเทียบขนาดของโปรตีนในตัวอย่างกับแถบโปรตีนมาตรฐาน Low Molecular Weight SDS Calibration Kit (GE Healthcare, UK) ตรวจสอบแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นโดยการย้อมด้วย Silver nitrate ตามวิธีของ Blum *et al.* (1987) และบันทึกภาพเจล

วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนในข้าวพันธุ์ทนเค็มและไม่ทนเค็ม

ตัดแถบโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยวิธี SDS-PAGE โดยแยกตามขนาดของโปรตีนออกเป็น 9 ช่วง ตัดเจลแต่ละช่วงเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1.0 ลูกบาศก์มิลลิเมตร แล้วนำโปรตีนที่อยู่ในเจลมาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินตามเทคนิค In-gel digestion ของ Jaresitthikunchai *et al.* (2009) จากนั้นทำการวิเคราะห์เปปไทด์ด้วย LC-MS ชนิด Ultimate 3000 LC system (Dionex, USA) เชื่อมต่อกับ ESI-Ion Trap MS รุ่น HCT-Ultra PTM Discovery System (BrukerDaltonik, Bremen, Germany) โดยใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 250 เฟมโตโมลเป็นตัวอย่างเปรียบเทียบ และวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยโปรแกรม DeCyder MS 2.0 Differential Analysis Software (DeCyder MS, GE Healthcare) หลังจากนั้นระบุชนิดของโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรม MASCOT (Matrix Science, London, UK) โดยใช้ฐานข้อมูล NCBI nr จากนั้นวิเคราะห์ผลปริมาณโปรตีนที่มีการแสดงออกเกี่ยวข้องกับกลไกการทนเค็มของข้าว ด้วย MultiExperiment Viewer (Mev) software version 4.6.1 (Howe *et al.*, 2010) และค้นหา

หน้าที่ของโปรตีน จากฐานข้อมูล NCBI UniPro และ RiceChip

ผลและวิจารณ์

จากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน ที่มีการตอบสนองต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นสุดท้าย 513 มิลลิโมลาร์ในรากข้าวพันธุ์ IR29 และ Pokkali ด้วยเทคนิค GeLC-MS พบว่า ในรากข้าวทั้งสองพันธุ์มีโปรตีนทั้งสิ้น 307 ชนิดที่มีการแสดงออกตอบสนองต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ (ภาพที่ 1) โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกทางชีววิทยาที่สำคัญภายในเซลล์หลายกลไก เช่น เป็นองค์ประกอบของเซลล์ 1 เปอร์เซ็นต์, การพัฒนาของเซลล์ 4 เปอร์เซ็นต์, การตอบสนองต่อความเครียด 14 เปอร์เซ็นต์, การส่งสัญญาณ 7 เปอร์เซ็นต์, การถอดรหัส 17 เปอร์เซ็นต์, การแปลรหัส 3 เปอร์เซ็นต์, การขนส่งชีวโมเลกุล 7 เปอร์เซ็นต์, การสังเคราะห์แสง 2 เปอร์เซ็นต์, การตายของเซลล์แบบอะพอโทซิส 1 เปอร์เซ็นต์, กระบวนการเมตาบอลิซึม 32 เปอร์เซ็นต์ และเป็นโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่อีก 12 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2A) โปรตีนทั้งหมดสะสมอยู่ในหลากหลายออร์แกเนลล์ ได้แก่ ในคลอโรพลาสต์ 4 เปอร์เซ็นต์, ไซโตพลาสซึม 14 เปอร์เซ็นต์, กอลจิคอมเพล็กซ์ 3 เปอร์เซ็นต์, ผนังเซลล์หรือออร์แกเนลล์ 11 เปอร์เซ็นต์, ไมโทคอนเดรีย 3 เปอร์เซ็นต์, นิวเคลียส 20 เปอร์เซ็นต์, เพอรอกซิโซม 2 เปอร์เซ็นต์, พลาสติดี 3 เปอร์เซ็นต์, โปรตีเอส 1 เปอร์เซ็นต์, ไรโบโซม 1 เปอร์เซ็นต์, แวกคิวโอล 1 เปอร์เซ็นต์, และไม่ทราบออร์แกเนลล์อีก 37 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2B)

หลังการวิเคราะห์ด้วย MultiExperiment Viewer (Mev) software พบว่า โปรตีนที่น่าสนใจและพบเฉพาะในรากข้าว IR29 ได้แก่ DNA ligase IV, putative STH1 protein, Zn-finger in Ran binding protein and others และ cell wall protein-like และยังมีโปรตีนอีก 8 ชนิดที่พบเฉพาะในรากข้าว Pokkali ได้แก่ D-mannose binding lectin family protein, typical P-type R2R3Myb protein proteasome activator subunit 4-like, transposon protein mutator sub-class mutator-like transposase,

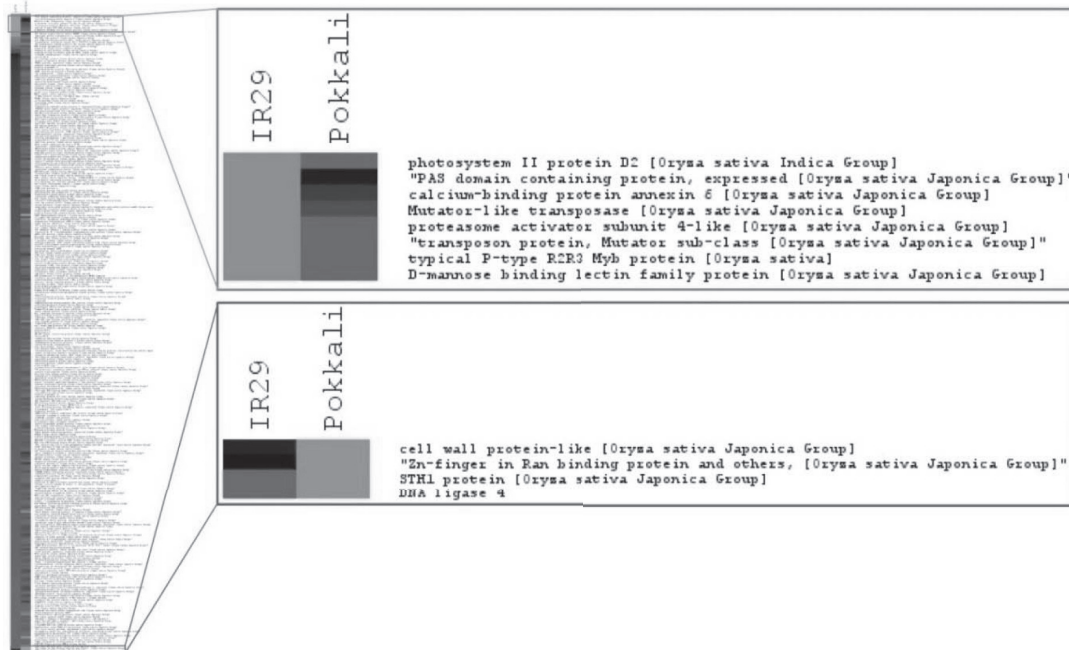
putative calcium-binding protein annexin6, PAS domain containing protein และ photosystem II protein D2 ซึ่งแสดงผลดังภาพที่ 1 ตารางที่ 1 และตารางที่ 2

กลุ่มโปรตีนที่มีการตอบสนองต่อความเค็มเฉพาะในรากข้าวไม่ทนเค็มพันธุ์ IR29

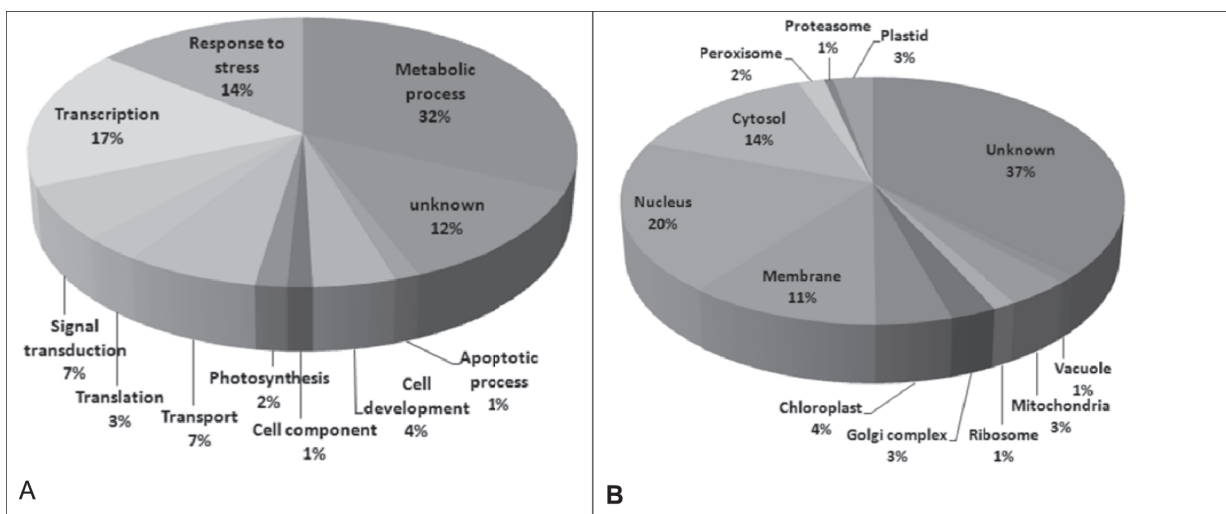
หลังจากได้รับสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 513mM โปรตีน cell wall protein-like ที่สะสมบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Tanaka *et al.*, 2008) ของรากข้าวพันธุ์ IR29 มีปริมาณลดลง นอกจากนี้โปรตีน Putative STH1 protein ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (Tanaka *et al.*, 2008) ก็มีปริมาณลดลงเช่นกัน ส่งผลให้การนำสัญญาณอันเกิดจากความเค็มที่รากได้รับ เดินทางไปยังโปรตีนเป้าหมายหรือออร์แกเนลล์เป้าหมายได้ช้าลงหรืออาจไม่มีการส่งสัญญาณโดยสิ้นเชิง ทำให้โปรตีน DNA ligase IV ซึ่งทำหน้าที่เชื่อมต่อ phosphodiester backbone ของ DNA ในขบวนการ DNA replication, DNA recombination และ DNA repair ทำงานหลังจากที่ได้รับความเค็มไปแล้วนาน 168 ชั่วโมง (ดังตารางที่ 1) ซึ่งช้ามากเมื่อเปรียบเทียบกับรากข้าวกลุ่มควบคุมที่ไม่เติมเกลือ ทำให้ไม่ทันช่วงที่ต่อการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ถูกทำลายเนื่องจากความเค็ม จึงเกิดความผิดปกติของเซลล์ข้าวสะสมมากขึ้น จนในที่สุดเซลล์ตายอย่างรวดเร็ว เหตุการณ์นี้อาจเป็นสาเหตุให้ข้าว IR29 ไม่ต้านทานต่อความเค็ม (ภาพที่ 3) และยังมีรายงานว่า DNA ligase IV มีบทบาทสำคัญในกลไกควบคุมกระบวนการ T-DNA integration ใน *Arabidopsis thaliana* เมื่อขาด DNA ligase IV จะทำให้พืชอ่อนแอต่อไวรัส และมีการออกของเมล็ดช้าลง (Friesner and Britt, 2003)

นอกจากนี้ปริมาณของโปรตีน Zn-finger in Ran binding protein and others ในรากข้าวพันธุ์ IR29 ก็ลดลงเช่นกันเมื่อสัมผัสเกลือโซเดียมคลอไรด์ โปรตีนชนิดนี้ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการดัดแปรสภาพโปรตีน ภายในไมโทคอนเดรีย (Kim *et al.*, 2010) ความเค็มทำให้ปริมาณโปรตีนชนิดนี้ลดลง ส่งผลให้โปรตีนภายในไมโทคอนเดรียที่พึ่งพากระบวนการดัดแปรสภาพก็ลดลงเช่นกัน กระบวนการก่อกระบวนการสร้างพลังงานภายในไมโทคอนเดรีย ที่ใช้โปรตีนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เซลล์รากข้าวอาจขาดพลังงาน

สำหรับทั้งเพื่อการดำรงชีพและเพื่อต่อสู้กับความเค็ม ข้าว ตอบสนองต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ของรากข้าวพันธุ์ IR29 พันธุ์ IR29 จึงอ่อนแอต่อความเค็มภาพรวมของกลไกการ ถูกสรุปและแสดงไว้ในภาพที่ 3



ภาพที่ 1 แผนภาพ Heatmap จากการวิเคราะห์โปรตีน 307 ชนิด ที่มีการตอบสนองต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 513 มิลลิโมลาร์ ในรากข้าวไม่ทนเค็มพันธุ์ IR29 และข้าวทนเค็มพันธุ์ Pokkali โดยใช้เทคนิคข้อทักันโปรตีนโอมิกส์ พบว่าโปรตีนที่น่าสนใจ และพบเฉพาะในรากข้าว IR29 ได้แก่ DNA ligase IV, putative STH1 protein, Zn-finger in Ran binding protein and others และ cell wall protein-like. และโปรตีนอีก 8 ชนิด ที่พบเฉพาะในรากข้าว Pokkali ได้แก่ D-mannose binding lectin family protein, typical P-type R2R3 Myb protein, partial, transposon protein, putative, mutator sub-class, proteasome activator subunit 4-like, mutator-like transposase, putative calcium-binding protein annexin 6, PAS domain containing protein และ photosystem II protein D2



ภาพที่ 2 แผนภูมิวงกลมจากการวิเคราะห์หน้าที่ และตำแหน่งการกระจายตัวอยู่ในเซลล์ของโปรตีน 307 ชนิด ที่พบในรากข้าวไม่ทนเค็มพันธุ์ IR29 และข้าวทนเค็มพันธุ์ Pokkali ที่ตอบสนองต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 513 มิลลิโมลาร์ โดยข้อมูลหน้าที่ของโปรตีน (A) และตำแหน่งของการกระจายตัวอยู่ในเซลล์ (B) ถูกจัดจำแนกไว้ในฐานข้อมูล NCBI, UniProt และ RiceChip

กลุ่มโปรตีนที่มีการตอบสนองต่อความเค็มเฉพาะในรากข้าวทนเค็มพันธุ์ Pokkali

ในรากข้าวพันธุ์ Pokkali ภายหลังจากเติมเกลือพบว่า มีโปรตีนเพียงชนิดเดียวที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนคือ โปรตีน D-mannose binding lectin family ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ protein modification process และ recognition of pollen มีคุณสมบัติของ transferase activity, transferring phosphorus-containing groups มีรายงานว่า โปรตีน Mannose-binding rice lectin (MRL) มีความใกล้เคียงกับโปรตีน Salt ที่ถูกกระตุ้นด้วยความเครียดจากความเค็ม และภาวะแล้งในพืช (Hirano *et al.*, 2000; Shinjo *et al.*, 2011)

หลังจากเติมเกลือ ยังพบการลดลงของโปรตีน putative calcium-binding protein annexin 6 ซึ่ง Wang *et al.* (2008) เสนอว่า โปรตีน putative calcium-binding protein annexin 6 นี้เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียด ไม่นานมานี้ Jami *et al.* (2012) พบว่า Annexin gene family ในข้าวเป็น Ca^{2+} -dependent phospholipid-binding proteins มีหลายหน้าที่ เช่น ควบคุมการงอกของเมล็ด และตอบสนองต่อสภาวะเครียดจากความเค็ม ความแล้ง ความร้อน และความเย็นถ้าปริมาณโปรตีนชนิดนี้ลดลงหลังจากรากข้าวพันธุ์ Pokkali สัมผัสเกลือแสดงว่า การส่งสัญญาณไปกระตุ้นโปรตีนที่อยู่ในออร์กาเนลล์อื่น ผ่านกลไกสมดุลของแคลเซียมก็ลดลงเช่นกัน อาจไปลดปริมาณการสังเคราะห์ ยับยั้งหรือลดการทำงานของโปรตีน Proteasome activator subunit 4-like ทำให้อัตราการทำลายสายโปรตีนที่ไม่ต้องการลดลง (Tanaka *et al.*, 2008) โปรตีนที่ไม่ถูกทำลายจะสะสมภายในเซลล์จนทำให้แรงดันออสโมติกภายในเซลล์สูงเพียงพอที่จะลดการสูญเสียน้ำออกนอกเซลล์ของรากข้าวพันธุ์ Pokkali นอกจากนี้ยังมีผลต่อ photosystem II protein D2 ทำให้การผลิตพลังงานผ่าน Photosynthetic electron transport ของ photosystem II (Tang *et al.*, 2004) ลดลง

อย่างไรก็ตาม เกลือโซเดียมคลอไรด์ไปมีผลลดปริมาณการแสดงออกของ typical P-type R2R3 Myb protein ที่ทำหน้าที่เป็น transcription factor มีบทบาทในการพัฒนาการของพืช และการตอบสนองต่อการถูกกระตุ้นด้วย abiotic stress โดยต้นข้าวที่มีการตัดต่อยีน MYB ให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น จะมีความทนทานต่อสภาวะความเครียดจากความเค็ม ความเย็น และการขาดน้ำได้มากขึ้น และเมื่อปลูกในสภาวะที่มีเกลือ จะมีการสะสมของ soluble sugar และ proline ในปริมาณสูงกว่าในต้นข้าวที่ไม่ได้รับการตัดต่อยีน (Yang *et al.*, 2012)

ยังพบว่ามีโปรตีนสะสมในนิวเคลียสอีก 3 ชนิดที่มีปริมาณลดลงเมื่อข้าวได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ ได้แก่ mutator-like transposase ที่ทำหน้าที่เป็น nucleic acid binding (Tanaka *et al.*, 2008) transposon protein mutator sub-class (Wang *et al.*, 2008) และ PAS domain containing protein ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการถอดรหัส (The Rice Chromosomes 11 and 12 Sequencing Consortia 2005) ซึ่งการลดลงของโปรตีนทั้ง 3 ชนิดนี้ ในรากข้าวพันธุ์ Pokkali จะทำให้การสังเคราะห์ อาร์เอ็นเอและโปรตีนในเซลล์ลดลง จึงเป็นการลดการใช้พลังงานในระหว่างที่รากข้าวได้รับความเครียด จากความเค็ม แสดงว่า โปรตีนทั้ง 3 ชนิดนี้อาจไม่มีความสำคัญต่อกลไกการทนเค็มในรากข้าวทนเค็มพันธุ์ Pokkali เซลล์รากข้าวอาจใช้กลไกอื่น เพื่อเอาตัวรอดในสภาวะเครียดจากความเค็ม เช่น การรักษาสมดุลของไอออน การกำจัดอนุมูลอิสระ และการรักษาสมดุลแรงดันออสโมติก (Zhu, 2001) ผ่านกระบวนการสะสมสารต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน โพลีอล ไกลซีน เบตาอิน เป็นต้น (Yokoi *et al.*, 2002) หรือเก็บไอออนไว้ในแวคิวโอลหรือขับออกนอกเซลล์ เป็นต้น ภาพรวมของกลไกการตอบสนองต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ของรากข้าวพันธุ์ Pokkali ถูกสรุปและแสดงไว้ในภาพที่ 4

ตารางที่ 1 แสดงโปรตีนที่พบว่ามีการแสดงออกแตกต่างกัน ซึ่งพบเฉพาะในรากข้าว IR29 ภายหลังการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 513 มิลลิโมลาร์ ที่เวลาต่างๆ วิเคราะห์โดยใช้เทคนิคข้อหกันโปรตีนโอมิกส์

Protein name	Accession number	Peptide sequence	Localization	Function
DNA ligase IV (↑ at 168 h)	gi 75140457	TAACKR	nucleus	DNA metabolic process (Fenget <i>et al.</i> , 2002)
Putative STH1 protein (↓ at 0 and 24 h)	gi 52076407	DMAAPTDDD LNCLQSEDT VIPVADAK	cytosol	Signal transduction (Tanaka <i>et al.</i> , 2008)
Zn-finger in Ran binding protein and others (↓ at 0 h)	gi 62733554	FTAGR	mitochondria	Protein modification process (Kim <i>et al.</i> , 2010)
Cell wall protein-like (↓ at 120 h)	gi 51091673	APVGR	plasma membrane	Transmembrane regions (Tanaka <i>et al.</i> , 2008)

หมายเหตุ: ↑ หมายถึง โปรตีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ที่เวลาต่างๆ ภายหลังการเติมเกลือ

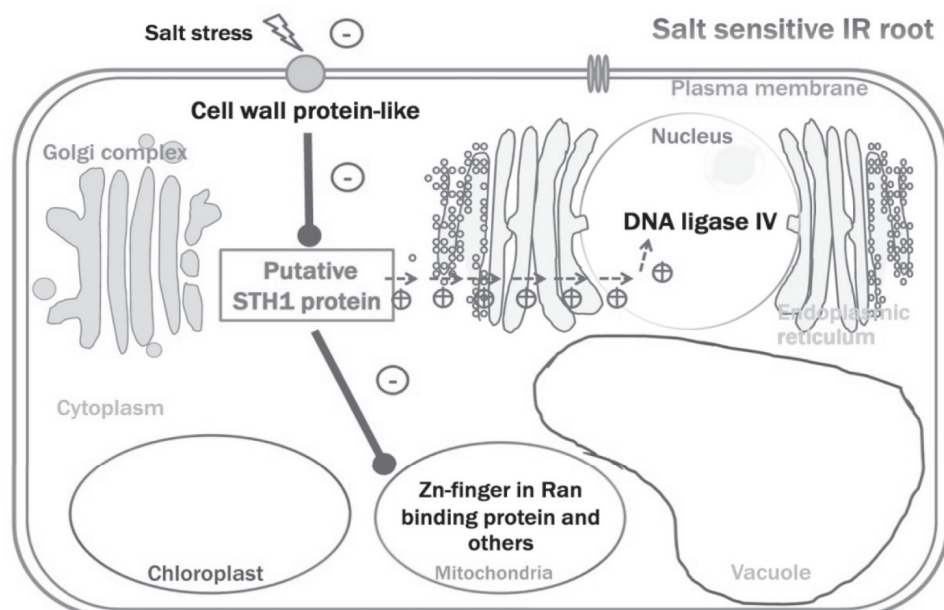
↓ หมายถึง โปรตีนมีการแสดงออกลดลง ที่เวลาต่างๆ ภายหลังการเติมเกลือ

ตารางที่ 2 แสดงโปรตีนที่พบว่ามีการแสดงออกแตกต่างกัน ซึ่งพบเฉพาะในรากข้าว Pokkali ภายหลังการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 513 มิลลิโมลาร์ ที่เวลาต่างๆ วิเคราะห์โดยใช้เทคนิคข้อหกันโปรตีนโอมิกส์

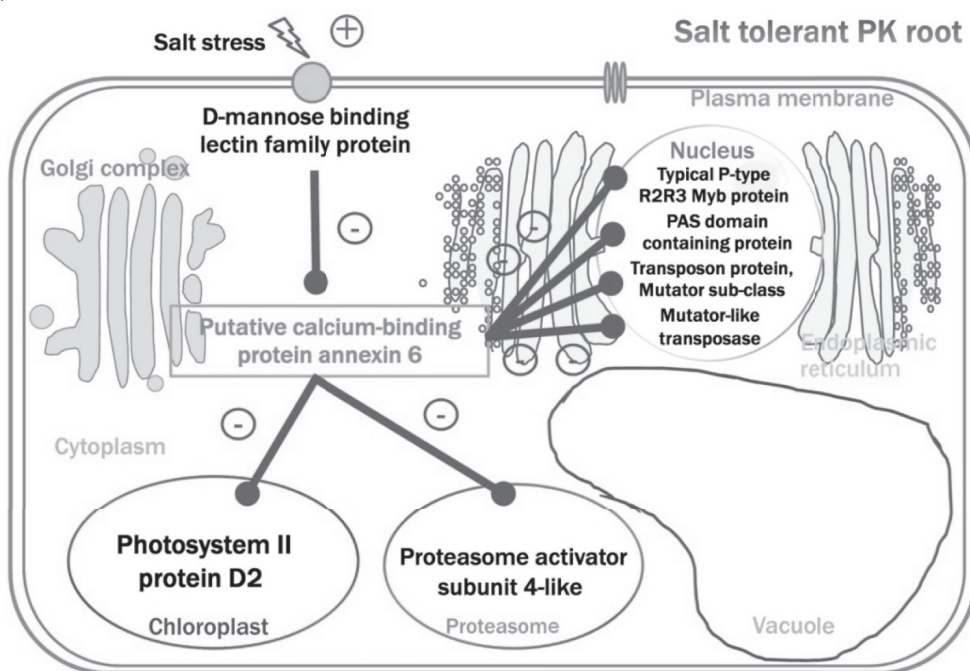
Protein name	Accession number	Peptide sequence	Localization	Function
D-mannose binding lectin family protein (↑ at 72 h)	gi 77553596	AAATK	plasma membrane	Protein modification process (Wang <i>et al.</i> , 2008)
Typical P-type R2R3 Myb protein, partial (↓ at 1, 5, 120 and 168 h)	gi 19072768	GEADR	nucleus	Transcription factor, (Jiang <i>et al.</i> , 2004)
Transposon protein, putative, Mutator sub-class (↓ at 9 and 24 h)	gi 77552060	GKEVLR	nucleus	Transcription (Wang <i>et al.</i> , 2008)
Proteasome activator subunit 4-like (↓ at 0, 5 and 72 h)	gi 53792862	EHAAGVLASLMK	Proteasome	Protein degradation (Tanaka <i>et al.</i> , 2008)
Mutator-like transposase (↓ at 24 and 120 h)	gi 13129433	VFSCR	nucleus	Nucleic acid binding (Tanaka <i>et al.</i> , 2008)
Putative calcium-binding protein annexin 6 (↓ at 120 h)	gi 55297623	TYHVLTK	cytoplasm	Response to stress (Wang <i>et al.</i> , 2008)
PAS domain containing protein, expressed (↓ at 9 h)	gi 77552550	VHMAIDIAR	nucleus	Transcription (The Rice Chromosomes 11 and 12 Sequencing Consortia, 2005)
Photosystem II protein D2 (↓ at 9 h)	gi 42795476	AAEDPEFETFYTK	chloroplast	Photosynthesis (Tang <i>et al.</i> , 2004)

หมายเหตุ: ↑ หมายถึง โปรตีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ที่เวลาต่างๆ ภายหลังการเติมเกลือ

↓ หมายถึง โปรตีนมีการแสดงออกลดลง ที่เวลาต่างๆ ภายหลังการเติมเกลือ



ภาพที่ 3 แผนภาพการแสดงออกของโปรตีน 4 ชนิด ในรากข้าวไม่ทนเค็มพันธุ์ IR29 ภายหลังการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 513 มิลลิโมลาร์ โปรตีน DNA ligase IV มีการเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆที่บริเวณนิวเคลียส และโปรตีนอีก 3 ชนิด มีปริมาณลดลง ได้แก่ cell wall protein-like ที่บริเวณผนังเซลล์ putative STH1 protein ที่บริเวณไซโตพลาสซึม และ Zn-finger in Ran binding protein and others ที่บริเวณไมโทคอนเดรียซึ่งอาจส่งผลกระทบทำให้ข้าว IR29 ไม่ทนเค็ม



ภาพที่ 4 แผนภาพการแสดงออกของโปรตีน 8 ชนิด ที่พบในรากข้าวทนเค็มพันธุ์ Pokkali ภายหลังการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 513 มิลลิโมลาร์ โปรตีน D-mannose binding lectin family protein ที่บริเวณผนังเซลล์มีการเพิ่มขึ้น และโปรตีนอีก 7 ชนิด มีการลดลง คือ โปรตีนที่บริเวณนิวเคลียส 4 ชนิด ได้แก่ typical P-type R2R3 Myb protein, PAS domain containing protein, transposon protein mutator sub-class และ mutator-like transposase โปรตีนที่บริเวณไซโตพลาสซึม ได้แก่ putative calcium-binding protein annexin 6 โปรตีนที่บริเวณคลอโรพลาสต์ ได้แก่ photosystem II protein D2 โปรตีนที่บริเวณ โปรตีเอสโซม ได้แก่ proteasome activator subunit 4-like ซึ่งอาจมีผลกระทบทำให้ข้าว Pokkali ทนเค็ม

สรุป

หลังจากได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ 513 มิลลิโมลาร์ พบว่า มีโปรตีนจำนวนทั้งสิ้น 307 ชนิดที่มีปริมาณเปลี่ยนแปลงในรากข้าวไม่ทนเค็มพันธุ์ IR29 และข้าวทนเค็มพันธุ์ Pokkali เป็นโปรตีนที่พบเฉพาะในรากข้าว IR29 4 ชนิด และพบเฉพาะในรากข้าว Pokkali 8 ชนิด ซึ่งการตอบสนองต่อความเค็มของโปรตีน DNA ligase IV ในรากข้าว IR29 ช้าเกินไปอาจส่งผลให้ข้าวพันธุ์นี้ไม่ทนเค็ม และการเพิ่มขึ้นของโปรตีน D-mannose binding lectin family protein ในรากข้าว Pokkali หลังการเติมเกลืออาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ข้าวพันธุ์นี้ทนเค็ม ผลการศึกษาค้นคว้านี้ อาจใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษากลไกการทนเค็มในข้าวพันธุ์อื่นๆ เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความสามารถทนเค็มเพิ่มมากขึ้นในอนาคต

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

- Blum, H., H. Beier and H. J. Gross. 1987. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99.
- Feng, Q., Yujun Zhang, P. Hao, S. Wang, G. Fu, Y. Huang, Y. Li, J. Zhu, Y. Liu, X. Hu, P. Jia¹, Yu Zhang, Q. Zhao, K. Ying, S. Yu, Y. Tang, Q. Weng, L. Zhang, Ying Lu, J. Mu, Yiqi Lu, L. S. Zhang, Z. Yu, D. Fan, X. Liu, T. Lu, C. Li, Y. Wu, T. Sun, H. Lei, T. Li, H. Hu, J. Guan, M. Wu, R. Zhang, B. Zhou, Z. Chen, L. Chen, Z. Jin, R. Wang, H. Yin, Z. Cai, S. Ren, G. Lv, W. Gu, G. Zhu, Y. Tu, J. Jia, Yi Zhang, J. Chen, H. Kang, X. Chen, C. Shao, Y. Sun, Q. Hu, X. Zhang, W. Zhang, L. Wang, C. Ding, H. Sheng, J. Gu, S. Chen, L. Ni, F. Zhu, W. Chen, L. Lan, Y. Lai, Z. Cheng, M. Gu, J. Jiang, J. Li, G. Hong, Y. Xue and B. Han. 2002. Sequence and analysis of rice chromosome 4. *Nature* 420: 316 - 320.
- Friesner, J. and A. B. Britt. 2003. Ku80- and DNA ligase IV-deficient plants are sensitive to ionizing radiation and defective in T-DNA integration. *Plant J.* 34(4): 427 - 40.
- Hirano, K., T. Teraoka, H. Yamanaka, A. Harashima, A. Kunisaki, H. Takahashi and D. Hosokawa. 2000. Novel mannose-binding rice lectin composed of some isolectins and its relation to a stress-inducible salt gene. *Plant Cell Physiol.* 41(3): 258 - 267.
- Howe, E., K. Holton, S. Nair, D. Schlauch, R. Sinha, J. Quackenbush. 2010. MeV: MultiExperiment Viewer. In *Biomedical Informatics for Cancer Research*. p. 267 - 277.
- Jami, S. K., G. B. Clark, B. T. Ayele, P. Ashe and P. B. Kirti. 2012. Genome-wide comparative analysis of annexin superfamily in plants. *PLoS ONE* 7(11): e47801.
- Jaresitthikunchai, J., N. Phaonakrop, S. Kittisenachai and S. Roytrakul. 2009. Rapid in-gel digestion protocol for protein identification by peptide mass fingerprint, pp. 29. *In* Proceeding of the 2nd Biochemistry and Molecular Biology Conference: Biochemistry and Molecular Biology for Regional Sustainable Development. KhonKaen, Thailand.

- Jiang, C., J. Gu, X. Gu, S. Chopra and T. Peterson. 2004. Ordered origin of the typical two and three-repeat *Myb* genes. *Gene* 326:13- 22
- Kim, J. Y., W. Y. Kim, K. J. Kwak, S. H. Oh, Y. S. Han and H. Kang. 2010. Zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein in *Oryza sativa* has an RNA chaperone activity under cold stress conditions. *Plant Cell Environ.* 33: 759 - 768.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 - 685.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265 - 275.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473 - 497.
- Rice Department, Ministry of Agriculture and Cooperatives. 2013. *In* report. The world rice production and marketing year 2012/2013 (at February 2013). Bangkok, Thailand. 16p. (in Thai) Available Source: [http://www.ricethailand.go.th/home/images/rice_situation/2556/ Feb13.pdf](http://www.ricethailand.go.th/home/images/rice_situation/2556/Feb13.pdf)
- Shinjo, A., Y. Araki, K. Hirano, T. Arie, M. Ugaki and T. Teraoka. 2011. Transgenic rice plants that over-express the mannose-binding rice lectin have enhanced resistance to rice blast. *J Gen. Plant Pathol.* 77(2): 85-92.
- Tanaka, T., B. A. Antonio, S. Kikuchi, T. Matsumoto, Y. Nagamura, H. Numa, H. Sakai, J. Wu, T. Itoh, T. Sasaki, R. Aono, Y. Fujii, T. Habara, E. Harada, M. Kanno, Y. Kawahara, H. Kawashima, H. Kubooka, A. Matsuya, H. Nakaoka, N. Saichi, R. Sanbonmatsu, Y. Sato, Y. Shinso, M. Suzuki, J. Takeda, M. Tanino, F. Todokoro, K. Yamaguchi, N. Yamamoto, C. Yamasaki, T. Imanishi, T. Okido, M. Tada, K. Ikeo, Y. Tateno, T. Gojobori, Y. Lin, F. Wei, Y. Hsing, Q. Zhao, B. Han, M. R. Kramer, R. W. McCombie, D. Lonsdale, C. C. O'Donovan, E. J. Whitfield, R. Apweiler, K. O. Koyanagi, J. P. Khurana, S. Raghuvanshi, N. K. Singh, A. K. Tyagi, G. Haberer, M. Fujisawa, S. Hosokawa, Y. Ito, H. Ikawa, M. Shibata, M. Yamamoto, R. M. Bruskewich, D. R. Hoen, T.E. Bureau, N. Namiki, H. Ohyanagi, Y. Sakai, S. Nobushima, K. Sakata, R. A. Barrero, Y. Sato, A. Souvorov, B. Smith-White, T. Tatusova, S. An, G. An, S. Oota, G. Fuks, J. Messing, K. R. Christie, D. Lieberherr, H. Kim, A. Zuccolo, R. A. Wing, K. Nobuta, P. J. Green, C. Lu, B. C. Meyers, C. Chaparro, B. Piegu, O. Panaud and M. Echeverria. 2008. The Rice Annotation Project Database (RAP-DB). *Nucleic Acids Res.* 36: D1028–D1033.
- Tang, J., H. Xia, M. Cao, X. Zhang, W. Zeng, S. Hu, W. Tong, J. Wang, J. Wang, J. Yu, H. Yang and L. Zhu. 2004. A comparison of rice chloroplast genomes. *Plant Physiol.* 135(1): 412-20.
- The Rice Chromosomes 11 and 12 Sequencing Consortia. 2005. The sequence of rice chromosomes 11 and 12, rich in disease resistance genes and recent gene duplications. *BMC Bio.* 3: 20.
- Wang, J., R. Li, W. Fan, Q. Huang, J. Zhang, Y. Zhou, Y. Hu, S. Zi, J. Li, P. Ni, H. Zheng, Y. Zhang, M. Zhao, Q. Hao, J. McDermott, R. Samudrala, K. Kristiansen and G.K.-S Wong. 2008. Improved gene annotation of the rice

- (*Oryza sativa*) genomes. Submitted (DEC-2008) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- Yan, S., Z. Tang, W. Su and W. Sun. 2005. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics* 5: 235 - 244.
- Yang, A., X. Dai and W. Zhang. 2012. A R2R3-type MYB gene, *OsMYB2*, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice. *J. Exp. Bot* 63(7): 2541 - 2556.
- Yokoi, S., F. J. Quintero, B. Cubero, M. T. Ruiz, R. A. Bressan, P. M. Hasegawa and J. M. Pardo. 2002. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na^+/H^+ antiporters in the salt stress response. *Plant J.* 30: 529 - 539.
- Zhao, Q., H. Zhang, T. Wang, S. Chen and S. Dai. 2013. Proteomics-based investigation of salt-responsive mechanisms in plant roots. *J. Proteomics* 82: 230 - 253.
- Zhou, L., S. A. Bokhari, C. Dong and J. Liu. 2011. Comparative proteomics analysis of the root apoplasts of rice seedlings in response to hydrogen peroxide. *PLoS ONE* 6(2): e16723.
- Zhu, J. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6: 66 - 71.