

ความแตกต่างทางพันธุกรรมและโปรตีโอมของเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์กลายมะลิแดง

Differences in Genetic Characteristics and Seed Proteomes of *Oryza sativa* 'Khao Dawk Mali 105' and Its Mutant 'Mali Daeng'

ศรัณยพร มากทรัพย์¹, ศรินทิพย์ พงษ์ปากเพียร², สิทธิรักษ์ รอยตระกูล³ และ กัญยรัตน์ สุไพบุลย์วัฒน์²
Sarunyaporn Maksup¹, Sarintip Pongpakpian², Sittiruk Roytrakul³ and Kanyaratt Supaibulwatana²

¹ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

² ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

³ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University

² Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University

³ National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency

Received : 14 March 2019

Revised : 3 May 2019

Accepted : 3 July 2019

บทคัดย่อ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นหนึ่งในธัญพืชเศรษฐกิจซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญของโลก ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) เป็นพันธุ์ข้าวหอมที่ได้รับความนิยมทั้งในประเทศไทยและตลาดการค้าข้าวระหว่างประเทศ เป็นพันธุ์ข้าวหลักพันธุ์หนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อผลิตข้าวชนิดใหม่ให้มีคุณสมบัติด้านผลผลิต และคุณค่าทางอาหารสูงขึ้น ข้าวพันธุ์มะลิแดง (MD) เป็นข้าวพันธุ์กลายที่ถูกระบุว่าได้มาจากข้าวพันธุ์ KDML105 โดยมีลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ด (pericarp) เป็นสีแดง อย่างไรก็ตามยังไม่พบว่ามีรายงานวิจัยที่ยืนยันความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวทั้งสองพันธุ์นี้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวพันธุ์ KDML105 และข้าวพันธุ์ MD โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ simple sequence repeats (SSRs) และการศึกษาความแตกต่างของโปรตีโอมของเมล็ดข้าวทั้งสองพันธุ์ด้วยเทคนิค GeLC-MS/MS shotgun proteomics ผลการทดลองพบว่าข้าวพันธุ์ KDML105 และพันธุ์ MD มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกัน โดยสามารถตรวจพบความแตกต่างบนโครโมโซมแท่งที่ 4, 7 และ 10 ได้โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSRs จากไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ ได้แก่ RM241, RM11, RM481 และ RM304 นอกจากนี้พบว่าข้าวทั้งสองพันธุ์มีรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเมล็ดข้าวต่างกัน โดยในจำนวน 342 โปรตีนที่ระบุชนิดได้ พบว่ามีโปรตีน 3-ketoacyl carrier synthase III, UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase และ glycosyltransferase family 61 protein ซึ่งเกี่ยวข้องกับสังเคราะห์กรดไขมัน สารประกอบฟีนอลิกกลุ่มฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงในข้าวพันธุ์ MD ด้วย แสดงให้เห็นว่าข้าวทั้งสองพันธุ์สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSRs และข้าวพันธุ์ MD อาจจะมีคุณค่าทางอาหารสูงกว่าข้าว KDML105 จึงเหมาะต่อการส่งเสริมการปลูกเพื่อเป็นข้าวส่งออกต่อไป

คำสำคัญ : ข้าวขาวดอกมะลิ 105, ข้าวมะลิแดง, เครื่องหมายโมเลกุล, SSRs, โปรตีโอมิกส์

*Corresponding author. E-mail : kanyaratt.sup@mahidol.ac.th

Abstract

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the economic grains that are used as important sources of carbohydrates in the world. A fragrant cultivar 'Khao Dawk Mali 105' (KDML105) is the most popular rice among Thai and international traits. It is therefore, commonly implement as the main rice genetic resource for breeding program in order to improve novel properties of trait with higher productivity and better nutritional values. 'Mali Daeng' (MD) rice has been previously identified as KDML105 mutant, which was characterized by its red pericarp at seed coat. However, there was no previous report showing clear identification of the genetic differences between both cultivars. This present research is the first report that reveals the structural genetic differences between KDML105 and MD rice by using simple sequence repeats (SSRs) marker. On the other hand, the differences of proteomic patterns detected in grains using GeLC-MS/MS shotgun proteomics were clarified. The results showed that KDML105 and MD had different genetic characteristics. The differences could be found on the chromosome 4, 7 and 10 by using the SSRs molecular markers from 4 pairs of primers, namely RM241, RM11, RM481 and RM304. Moreover, different protein expression profiles were observed in rice seeds. Among the 342 identified proteins, the expression of proteins (3-ketoacyl carrier synthase III, UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase and glycosyltransferase family 61 protein) that related to biosynthesis of fatty acids, phenolic compounds (flavonoids) and antioxidant activity were increase in MD. The results suggested that both varieties had different genetic backgrounds and can be distinguished by using SSRs molecular markers and MD may have higher nutritional value than KDML105 rice and suitable for promotion of planting for rice export.

Keywords: Khao Dawk Mali 105, Mali Daeng, molecular markers, SSRs, proteomics

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจและเป็นธัญพืชที่มีคุณค่าทางอาหารสูง ประชากรของโลกมากกว่าครึ่งบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก ปัจจุบันสายพันธุ์ข้าวได้ถูกปรับปรุงให้มีความหลากหลาย เพื่อให้มีลักษณะเหมาะสมกับแต่ละพื้นที่เพาะปลูก นอกจากนี้ยังถูกปรับปรุงพันธุ์ให้มีความคุณค่าทางอาหารสูงขึ้นอีกด้วย ประเทศไทยมีการปลูกข้าวและส่งออกข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจหลัก โดยพันธุ์ข้าวที่นิยมปลูกเพื่อการส่งออกคือพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (KDML105) หรือข้าวหอมมะลิ ซึ่งเป็นข้าวเจ้าที่มีเมล็ดสีขาวและเมื่อหุงแล้วเมล็ดมีความนุ่มและมีกลิ่นหอมเหมือนดอกไม้ซึ่งเกิดจากสารระเหยชื่อ 2-acetyl-1-pyrroline และสารหอมระเหยอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น n-hexanal, 2-phenylethanol, indole, (E)-2-octenal, n-nonanol และ n-pentanol เป็นต้น (Mahatheeranont *et al.*, 2001; Riabroy *et al.*, 2013) นอกจากนี้ข้าว KDML105 ประกอบไปด้วยสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โยอาหาร สารประกอบฟีนอลิก แกมมา-โอไรซานอล (γ -Oryzanol) วิตามินอี (α -Tocopherol) แอนโทไซยานิน และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (Laokuldilok *et al.*, 2013; Maksup *et al.*, 2018) อย่างไรก็ตามมีรายงานวิจัยจำนวนมากที่ระบุว่าข้าวที่เมล็ดมีสีดำหรือแดงจะมีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่าข้าวขาว (Deng *et al.*, 2013; Pereira-Caro *et al.*, 2013; Maksup *et al.*, 2018) ดังนั้นการปรับปรุง

พันธุ์ข้าวเพื่อให้ได้ข้าวหอมมะลิซึ่งมีสีแดงจึงน่าจะเป็นพันธุ์ข้าวที่ได้รับความนิยมและมีศักยภาพในการส่งออกต่อไป จากข้อมูลของกรมวิชาการเกษตรรายงานว่าในปี พ.ศ. 2525-2526 ที่สถานีทดลองข้าวสุรินทร์มีการตรวจพบเมล็ดของข้าว KDML105 ที่เกิดการกลายพันธุ์ โดยพบว่าข้าวบางรวงมีเยื่อหุ้มเมล็ด (pericarp) เป็นสีแดงเรื่อๆ จึงมีการปลูกคัดเลือกพันธุ์เพื่อให้ได้ข้าวพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะดีเด่น จนกระทั่งปี พ.ศ. 2538 จึงคัดเลือกได้สายพันธุ์ KDML105R-PSL-E-14 ซึ่งต่อมาในปี พ.ศ. 2542 สถาบันวิจัยข้าวเสนอขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตรเป็นพันธุ์ข้าวทั่วไปโดยใช้ชื่อว่าข้าวหอมแดง (Red Hawm Rice) หรือข้าวมะลิแดง (MD) ลักษณะเด่นของข้าวพันธุ์ MD คือเป็นข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงเข้ม ข้าวสุกนุ่ม เหนียว และมีกลิ่นหอมเหมือนข้าว KDML105 ด้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในสภาพธรรมชาติได้ดี และค่อนข้างต้านทานโรคไหม้ (Rice Department, Ministry of Agriculture and Cooperatives, 2019)

แม้ว่าจะมีการรายงานว่าข้าวพันธุ์ MD เป็นข้าวพันธุ์กลายของข้าว KDML105 แต่ยังไม่พบว่ามีรายงานวิจัยที่ยืนยันความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ เทคนิคที่สามารถใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ข้าวมีหลายวิธี เช่น Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP), Sequence Tagged Sites (STS), Simple Sequence Repeats (SSR) หรือ microsatellites และ Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) เป็นต้น แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR นิยมใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าว เนื่องจากวิธีนี้มีความแม่นยำสูง ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อย สามารถใช้แยกพันธุกรรมของข้าวที่มีความใกล้เคียงกันมากได้ ทั้งยังเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วเพราะใช้เพียงการทำปฏิกิริยา PCR และ agarose gel electrophoresis (Saengprajak, 2012; Singh *et al.*, 2010) ส่วนการศึกษาด้วยโปรตีโอมิกส์ (proteomics) สามารถช่วยให้เห็นความแตกต่างของโปรตีนที่ข้าวแต่ละสายพันธุ์สังเคราะห์ได้ทั้งจีโนมในการวิเคราะห์เพียงครั้งเดียว (Tan *et al.*, 2017) จึงสามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าวได้ แม้ว่าการศึกษาโปรตีโอมิกส์ในเมล็ดข้าวส่วนใหญ่มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพัฒนาการของเมล็ดข้าวขณะที่เกิดกระบวนการงอก (He & Yang, 2013; Xu *et al.*, 2016) แต่ก็มีงานวิจัยที่พบว่าโปรตีโอมิกส์สามารถใช้บ่งบอกความสัมพันธ์ของโปรตีนกับการเพิ่มคุณค่าทางอาหารในเมล็ดข้าวได้ โดยในงานวิจัยนี้พบว่าข้าวสายพันธุ์ MD มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก แอนโทไซยานิน และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวสายพันธุ์ KDML105 เท่ากับ 2.6, 2.2 และ 9.2 เท่า ตามลำดับ (Maksup *et al.*, 2018)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวพันธุ์ KDML105 และข้าวพันธุ์กลาย MD โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ simple sequence repeats (SSRs) จากใบของต้นกล้าข้าวซึ่งง่ายต่อการสกัดดีเอ็นเอ และศึกษาความแตกต่างของโปรตีโอมของเมล็ดข้าวทั้งสองพันธุ์ด้วยเทคนิค GeLC-MS/MS shotgun proteomics เพื่อให้ได้ข้อมูลโปรตีนซึ่งสนับสนุนเรื่องความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์และอาจแสดงความสัมพันธ์กับคุณค่าทางอาหารของเมล็ด ทั้งนี้ผลงานวิจัยนี้อาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาและการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง

ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. 'KDML105') ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี และข้าวพันธุ์กลายมะลิแดง (*O. sativa* L. 'Mali Daeng') ได้รับความอนุเคราะห์จากมูลนิธิข้าวขวัญ จังหวัดสุพรรณบุรี ทำการเตรียมตัวอย่างเมล็ดข้าวแต่ละชนิดโดยนำเมล็ดที่สมบูรณ์และมีขนาดเท่าๆ กัน มาแกะเปลือกออกด้วยมือ คัดเมล็ดที่มี

คุณภาพดี ไม่มีท้องไข (chalkiness) จำนวน 100 เมล็ด แบ่งเมล็ดจำนวนครึ่งหนึ่งเพื่อนำไปเพาะเป็นต้นกล้าข้าวเพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และอีกครึ่งหนึ่งเพื่อใช้ในการศึกษาโปรตีโอมิกส์

2. การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแบบ simple sequence repeats (SSRs)

ทำการเพาะเมล็ดข้าวพันธุ์ KDML102 และข้าวพันธุ์ MD โดยการเพาะเมล็ดแต่ละพันธุ์ในภาชนะแยกกัน 3 ใบ ใบละ 15 เมล็ด เมื่อดันกล้าออกจึงเลือกเฉพาะต้นที่สมบูรณ์ย้ายปลูกลงในอาหารเหลวสูตร Yoshida จนได้ต้นกล้าข้าวที่มีจำนวนใบ 5-7 ใบ จากนั้นเก็บตัวอย่างใบจากการทดลอง 3 ซ้ำ (ซ้ำละ 7-10 ต้น โดยเก็บใบตำแหน่งที่ 1-4 จากยอดของต้นกล้าทุกต้น) เพื่อส่งวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSRs ที่ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี อาคารศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยทำการเลือกไพรเมอร์ของข้าวที่มีค่าความถี่อัลลีลสูง และพบกระจายอยู่ในทั้ง 12 โครโมโซมของข้าว จำนวน 40 คู่ (40 loci) ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยข้อมูลเพิ่มเติมและตำแหน่งจับของไพรเมอร์สามารถสืบค้นได้จากเว็บไซต์ https://archive.gramene.org/db/markers/marker_view จากนั้นทำการสกัดสารพันธุกรรม ทำปฏิกิริยา PCR ด้วย SSR marker ที่คัดเลือกมา แล้วตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยา PCR ด้วย Polyacrylamide Gel Electrophoresis ตามวิธีการของ Temnykh *et al.* (2000)

ตารางที่ 1 ชื่อและตำแหน่งจับของไพรเมอร์ที่พบบนโครโมโซม (Temnykh *et al.*, 2000; Temnykh *et al.*, 2001)

โครโมโซมแห่งที่	ชื่อไพรเมอร์ของ SSRs (Rice Microsatellites; RM)
1	RM9, RM84, RM212, RM302
2	RM6, RM110, RM207, RM213, RM279
3	RM7, RM168, RM251
4	RM241, RM261, RM280
5	RM31, RM153, RM164
6	RM111, RM190, RM253, RM276
7	RM11, RM295, RM336, RM481
8	RM38, RM149, RM310
9	RM219 RM257
10	RM228, RM258, RM304
11	RM21, RM229, RM287
12	RM12, RM20A, RM247

3. การศึกษาโปรตีโอมของเมล็ดข้าวพันธุ์ KDML105 และ MD โดยวิธี GeLC-MS/MS shotgun proteomics

3.1 การสกัดโปรตีนจากเมล็ดข้าว

นำตัวอย่างเมล็ดประมาณ 1 กรัม มาบดด้วยการเติมไนโตรเจนเหลวโดยใช้โกร่งจากนั้นเติมสารละลาย Trichloroacetic acid (TCA) (10 % สารละลาย TCA ในอะซิโตนที่มี 0.07 % 2-mercaptoethanol ต่อผงข้าวบดปริมาณ 100 มิลลิกรัม) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อตกตะกอนโปรตีน แล้วนำสารละลายตัวอย่างไปเขย่า (vortex) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที นำสารละลายตัวอย่างเก็บเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำสารละลายตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลาย TCA ทิ้งไป จากนั้นเติมสารละลายอะซิโตนปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในตัวอย่าง (อะซิโตนที่มี 0.07% 2-mercaptoethanol เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้) นำตัวอย่างไปเขย่าแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที นำเก็บเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำสารละลายตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายอะซิโตนทิ้งไป จะเกิดตะกอนชั้นที่กั้นหลอด จากนั้นล้างตะกอนด้วยอะซิโตนจนกระทั่งตะกอนใสไม่มีสี แล้วจึงนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายอะซิโตนทิ้งไป แล้วเติม lysis buffer (30 mM tris-buffer, 2 M thiourea, 7 M urea และ 4% w/v CHAPS pH 8.5) ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสให้หลอดใหม่เก็บเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry *et al.* (1951) โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน

3.2 การวิเคราะห์โปรตีโอมของเมล็ดข้าวด้วยเทคนิค GeLC MS/MS shotgun proteomics

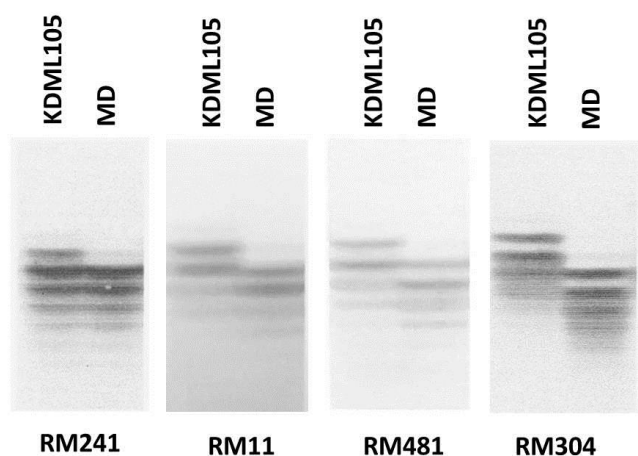
ทำการแยกขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า นำสารละลายโปรตีนจากตัวอย่าง 3 ซ้ำ (3 biological replicates) ปริมาตร 20 ไมโครกรัม มาไหลลงบน 12.5 % polyacrylamide gel เมื่อไหลโปรตีนเรียบร้อยแล้วจึงทำการเชื่อมต่อสายไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง electrophoresis power supply-EPS 601 (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) ปลั๊กกระแสไฟฟ้าแล้วเริ่ม run gel ที่กระแสไฟฟ้า 160 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 15 นาที เมื่อสิ้นสุดการ run gel แล้วนำแผ่นเจลไปย้อมสี coomassie blue จากนั้นทำการตัดเจลและย่อยโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้น (In gel digestion) และทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเปปไทด์ทั้งหมดตามวิธีการที่แสดงในงานวิจัยของ Maksup *et al.* (2018) โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ นำเจลมาตัดแบ่งเป็น 13 ชิ้น ตามขนาดของโปรตีนเมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) ขนาด 14.1-97.0 kDa นำโพลีเปปไทด์ในชิ้นเจลแต่ละชิ้นมาย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin ตามวิธีการของ Maksup *et al.* (2014) แล้วนำเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยไปฉีดเข้าเครื่อง Liquid Chromatography (Ultimate 3000 LC System, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) ที่ต่ออยู่กับเครื่อง Electrospray Ionization (ESI)-Ion Trap Mass Spectrometry (MS) (HCT Ultra PTM Discovery System, Bruker, Rheinstetten, Germany) โดยฉีดโปรตีนผ่านนาโนคอลัมน์ (Acclaim PepMap 100 C18; 3 μm , 100 \AA , inner diameter 75 μm \times 150 mm) ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 300 นาโนลิตรต่อนาที ทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (2 technical replicates) ข้อมูลจาก mass spectrum จะถูกใช้ในการคำนวณปริมาณโปรตีนสัมพัทธ์ (relative protein expression) โดยคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟและแสดงค่าเป็น log scale จากนั้นคำนวณหาค่าจำนวนเท่าของโปรตีนที่แตกต่างกันในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ (Fold change of protein expression) โดยนำค่าผลต่างของปริมาณโปรตีนสัมพัทธ์ของโปรตีนในเมล็ดข้าวทั้งสองสายพันธุ์มาคูณด้วยสอง ทำการระบุชนิดและปริมาณของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม DeCyder MS 2.0

Differential Analysis software (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany) (Johansson *et al.* 2006; Thorsell *et al.* 2007) ในขั้นตอนนี้โปรตีนที่แสดงความเหมือนกันจะถูกตัดออกไป 90% เฉพาะโปรตีนอีก 10% ที่แสดงความแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างจะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยฐานข้อมูล Mascot (Matrix Science, London, UK) (Perkins *et al.*, 1999) และทำการเปรียบเทียบโปรตีนของตัวอย่างเป็นแผนภาพวงกลมแบบ Venn diagram โดยใช้โปรแกรม jvenn (Bardou *et al.*, 2014)

ผลการวิจัย

1. ข้าวพันธุ์ KDML105 และ MD มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระบุโดยการใส่เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSRs

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSRs จากไพรเมอร์จำนวน 40 คู่ พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างได้ 4 คู่ ซึ่งคิดเป็น 10% ของไพรเมอร์ทั้งหมด หรือมีค่า polymorphic bands เท่ากับ 10% โดยไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ KDML105 และข้าวพันธุ์ MD ได้ คือ RM241 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 4, RM11 และ RM481 บนโครโมโซมแท่งที่ 7 และ RM304 บนโครโมโซมแท่งที่ 10 ดังแสดงในภาพที่ 1

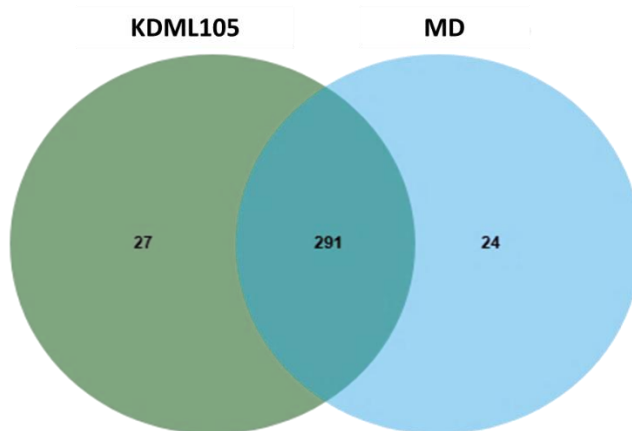


ภาพที่ 1 ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) และข้าวพันธุ์กลายพันธุ์มะลิแดง (MD) วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแบบ simple sequence repeats (SSRs)

2. โปรตีนของเมล็ดข้าวพันธุ์ KDML105 และ MD มีความแตกต่างกัน

จากผลการศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเมล็ดข้าวกล้องของข้าวพันธุ์ KDML105 และ MD โดยวิธี GeLC-MS/MS shotgun proteomics พบว่าทั้ง 2 พันธุ์มีรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนต่างกัน โดยพบว่าจากโปรตีนทั้งหมดที่วิเคราะห์และระบุชนิดได้จำนวน 342 โปรตีน (ภาพที่ 2) มีโปรตีนที่พบเหมือนกันในข้าวทั้ง 2 พันธุ์ จำนวน 291 โปรตีน แต่มีโปรตีนที่พบเฉพาะในเมล็ดข้าวพันธุ์ KDML105 จำนวน 27 โปรตีน ได้แก่ chromosome condensation regulator, RCC1 repeat protein (gil657399281), expansin-A1-like protein (gil657404458), galactose oxidase/kelch repeat protein (gil657399966), peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO1 (gil657398880), F₀F₁-type ATP synthase_ beta subunit (gil657405681), 3_4- dihydroxy- 2- butanone 4- phosphate synthase (gil657400075), Os01g0319200

(gi|113532418), SNF2 family amino-terminal protein (gi|657379707, carboxy-terminal region remorin (gi|657384763), lipase (gi|657405566), DUF3595 family protein_ partial (gi|657404648), cytochrome P450 family 709 protein (gi|657379610), DNA replication licensing factor MCM8 (gi|657379678), frigida-LIKE protein (gi|657399858), Isoflavonoid glucosyltransferase (gi|358348234), glutathione S-transferase (gi|657379669), actin cross-linking protein (gi|657374313) และ hypothetical protein อีก 10 ชนิด โดยโปรตีนส่วนใหญ่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจนในเมล็ด แต่พบว่ามีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับคุณค่าทางอาหารของเมล็ดอยู่ด้วย คือ Isoflavonoid glucosyltransferase และ glutathione S-transferase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์และการต้านอนุมูลอิสระ ตามลำดับ และพบว่ามีโปรตีนที่พบเฉพาะในเมล็ดข้าวพันธุ์ MD จำนวน 24 โปรตีน ได้แก่ B3 domain transcription factor (gi|657378011), vesicle-associated-like protein (gi|657399673), receptor serine/threonine kinase (gi|355518822), HAT family dimerization domain containing protein (gi|357521159), tRNA(his) guanylyltransferase (gi|657380415), transcription cofactor_ putative (gi|657400415), hopanoid biosynthesis associated glycosyl transferase HpnI_ partial (gi|657367809), Aspartic proteinase (gi|357511709), frigida interacting protein (gi|657397943), heat shock 70 kDa protein (gi|657377609), ABA response element-binding factor (gi|657399548), IQ calmodulin-binding motif protein (gi|657402637), vacuolar protein sorting-associated protein (gi|657404887), disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) (gi|657394121), plant/MNA5-17 protein (gi|657385186), F-box plant-like protein (gi|657404739), DNA topoisomerase I (gi|657394712), signal recognition particle protein (gi|657378995) และ hypothetical protein อีก 6 ชนิด (ภาพที่ 2) โดยโปรตีนส่วนใหญ่ที่พบในกลุ่มนี้ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจนในเมล็ดเช่นกัน แต่บางโปรตีน เช่น Aspartic proteinase เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการมีกรดอะมิโนในเมล็ดได้ นอกจากนี้พบว่ามีโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกสูงมากกว่า 4 เท่าในเมล็ดข้าวพันธุ์กลาย MD เมื่อเทียบกับข้าวพันธุ์ KDML105 จำนวน 53 โปรตีน (ตารางที่ 2) และมีโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกสูงมากกว่า 4 เท่าในเมล็ดข้าวพันธุ์ KDML105 เมื่อเทียบกับพันธุ์ MD จำนวน 111 โปรตีน (Supplementary file 1)



ภาพที่ 2 โปรตีนที่พบในเมล็ดข้าวทั้งหมดจำนวน 342 โปรตีน พบในพันธุ์ KDML105 และ MD จำนวน 318 และ 315 โปรตีน ตามลำดับ และโปรตีนที่พบในเมล็ดข้าวทั้งสองพันธุ์มีจำนวน 291 โปรตีน

ตารางที่ 2 รายชื่อโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกสูงมากกว่า 4 เท่าในเมล็ดข้าวพันธุ์กลาย MD เมื่อเทียบกับข้าวพันธุ์ KDML105 จำนวน 53 โปรตีน

No.	Name of proteins	Protein ID	ID Score	ANOVA p	MH+ (Da)	Peptide	Relative protein Expression*	
							KDML	MD
1	signal recognition particle protein	gjl657378995	14.650	0.013	1445.769	MSNEILINKEVR	nd	12.536
2	DNA topoisomerase I	gjl657394712	26.040	0.014	1602.735	DVLNALDNLVRPNR	nd	8.599
3	F-box plant-like protein	gjl657404739	18.590	0.026	1264.652	HLILKTQMHK	nd	7.805
4	hypothetical protein MTR_8g027390	gjl657372852	21.820	0.050	1655.066	KAELWNVMKRR	nd	7.404
5	D111/G-patch domain protein	gjl657394372	28.160	0.000	520.932	TGQVYR	2.048	9.330
6	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	gjl657401569	16.270	0.023	1777.406	DKEQVISRMAKAAVASK	nd	7.103
7	hypothetical protein MTR_5g029875	gjl657384438	1.470	0.014	549.607	ASKED	nd	6.794
8	plant/MNA5-17 protein	gjl657385186	16.610	0.011	1394.385	MFTEGLDKNALR	nd	6.726
9	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	gjl657372201	11.880	0.015	945.499	FTMQIYK	nd	6.550
10	vacuolar protein sorting-associated protein	gjl657404887	11.970	0.025	1677.165	DFVKKLNLSPEMTR	nd	6.178
11	hypothetical protein MTR_4g070750	gjl357473371	7.190	0.001	703.664	AIKGTSK	1.576	7.701
12	transmembrane protein, putative	gjl657397942	14.180	0.012	1643.946	GNVNEGANAEIEEGPQK	nd	6.103
13	FAR1 DNA-binding domain protein	gjl657394394	1.520	0.036	594.574	VFKSI	nd	6.086
14	ribosomal protein S14 (mitochondrion)	gjl110225714	16.480	0.029	1047.038	SSITQIKNR	0.311	6.366
15	IQ calmodulin-binding motif protein	gjl657402141	10.630	0.020	1444.720	TSKWLRNLLKGGK	nd	5.909
16	hypothetical protein MTR_020s0019	gjl358343760	2.520	0.002	568.452	AAHGGR	2.102	7.806
17	ABA response element-binding factor	gjl657399548	11.250	0.001	1468.762	MMKNRESAARSR	nd	5.685
18	heat shock 70 kDa protein	gjl657377609	12.950	0.031	842.080	MYAAITNATK	nd	5.514
19	red chlorophyll catabolite reductase	gjl106880178	8.010	0.029	1396.221	EAAAARMPSLAHR	0.222	5.679
20	frigida interacting protein	gjl657397943	20.190	0.000	679.423	MSNIELQR	nd	4.538
21	cytochrome P450 family 88 protein	gjl657401706	20.160	0.039	949.113	KGLMAREK	2.778	7.102
22	hypothetical protein MTR_8g100060	gjl357520597	7.220	0.032	536.198	MVVDG	nd	4.197
23	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein	gjl657380421	9.200	0.042	1454.180	SSYGTSRKSLKK	1.324	5.514
24	magnesium transporter MRS2-like protein	gjl657399476	23.810	0.033	1184.050	EYAILLNLSLR	4.469	8.536
25	F-box/LRR protein	gjl657402247	12.090	0.009	1594.533	SDDELFAIAKSMRPR	1.365	5.401
26	Aspartic proteinase	gjl357511709	11.410	0.015	860.206	MRIGLQK	nd	3.833
27	3-ketoacyl carrier synthase III**	gjl657400458	10.310	0.002	1888.762	MANASGLFSTPYTPNFR	5.395	9.001
28	LEM3 (ligand-effect modulator 3) family protein	gjl657398316	2.370	0.038	520.303	KSISS	3.301	6.838
29	hopanoid biosynthesis associated glycosyl transferase HpnI, partial	gjl657367809	8.220	0.000	643.349	VSPPSR	nd	3.309
30	apurinic endonuclease-redox protein	gjl657402603	9.610	0.037	625.333	VPAKGR	0.188	3.481
31	ARM repeat protein interacting WITH ABF2 protein	gjl657383681	3.950	0.024	667.782	FHAHR	0.950	4.017
32	hypothetical protein MTR_6g055290	gjl357498383	11.400	0.008	679.422	VSRRY	nd	3.024
33	haloacid dehalogenase-like hydrolase	gjl657400541	16.830	0.016	986.032	GVRAAGGGGKR	5.692	8.618
34	O-fucosyltransferase family protein	gjl657401604	16.240	0.027	721.386	TAPKPSR	2.974	5.814
35	hypothetical protein MTR_7g025990	gjl357503417	16.570	0.003	615.419	DNIPR	3.692	6.524
36	inhibitor of trypsin and hageman factor-like protein	gjl657403746	7.230	0.025	545.209	MPKIG	0.766	3.542
37	ubiquitin-conjugating enzyme	gjl657373074	16.220	0.031	1728.872	MSSPSKRREMDLMK	5.095	7.801
38	core histone H2A/H2B/H3/H4	gjl657388238	3.840	0.041	442.499	GGGPR	2.742	5.434
39	pentatricopeptide (PPR) repeat protein	gjl657380019	14.010	0.010	1105.427	RDYRLEPR	3.717	6.406
40	hypothetical protein MTR_2g031470	gjl357448667	21.710	0.012	864.978	DRISDRR	3.550	6.080
41	Myo28B1, putative	gjl657400865	1.260	0.040	484.166	GGVPR	4.070	6.565
42	transcription cofactor, putative	gjl657400415	14.980	0.034	1326.541	LKVFKMLER	nd	2.472

ตารางที่ 2 (ต่อ) รายชื่อโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกสูงมากกว่า 4 เท่าในเมล็ดข้าวพันธุ์กลาย MD เมื่อเทียบกับข้าวพันธุ์ KDML105 จำนวน 53 โปรตีน

No.	Name of proteins	Protein ID	ID Score	ANOVA p	MH+ (Da)	Peptide	Relative protein Expression*	
							KDML	MD
43	tRNA(his) guanylyltransferase	gij657380415	6.410	0.000	1136.569	YTEDGAPVER	nd	2.463
44	CRS2-associated factor 1	gij657370235	17.050	0.033	1213.002	GILNQEQPSDL	6.756	9.155
45	HAT family dimerization domain containing protein	gij357521159	11.960	0.000	1242.432	MATGMLSFKFNK	nd	2.369
46	START-2 domain protein	gij657379993	20.410	0.043	1408.503	QLIGSGFRLYQK	3.882	6.178
47	ribulose biphosphate carboxylase large chain domain protein	gij657371735	64.850	0.000	701.801	DDFIEKDR	1.841	4.096
48	DUF581 family protein	gij657394216	17.980	0.013	906.119	VMSMVSPR	4.941	7.187
49	predicted protein	gij158283729	12.910	0.007	806.645	HLAPLTR	0.419	2.660
50	PPR containing plant-like protein	gij657398931	19.020	0.031	1681.228	GLFENGFGFFLEMR	9.213	11.434
51	Os01g0959900 [Oryza sativa Japonica Group]	gij113534993	27.490	0.030	713.434	EALLSSPR	4.985	7.198
52	hypothetical protein MTR_4g033960	gij357470579	9.480	0.001	1104.398	QLATTSNLTR	5.429	7.446
53	glycosyltransferase family 61 protein**	gij657383872	13.710	0.001	757.098	VGAIKIR	0.006	1.994
	UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase***	gij657398130	21.860	0.029	945.941	NNIKDALR	9.388	9.512

* ค่า relative expression คือ log2 value และ nd หมายถึงไม่พบโปรตีน

** โปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับคุณค่าทางอาหารของเมล็ดแสดงข้อมูลเป็นตัวหนา

*** UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase มีระดับการแสดงออกต่ำกว่า 4 เท่า แต่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับคุณค่าทางอาหารของเมล็ด

วิจารณ์ผลการวิจัย

ปัจจุบันการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวมักใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers) ช่วยในการจัดจำแนก เนื่องจากพันธุ์ข้าวที่มีการปรับปรุงพันธุ์ขึ้นใหม่มักมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน และบางสายพันธุ์มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมสูงมาก จึงทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์พืช (varietal identification) จึงมีบทบาทสำคัญในการช่วยจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ให้มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น (Kate-ngam, 2003) เครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมใช้มีหลายชนิด เช่น AFLP, RAPD, RFLP, STS, SSR และ SNP เป็นต้น โดยเฉพาะเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR นิยมใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวที่มีความใกล้เคียงกัน เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วเพราะใช้เพียงการทำปฏิกิริยา PCR และ agarose gel electrophoresis สามารถตรวจพบความแตกต่างของลำดับเบสได้สูง (high polymorphisms) มีความแม่นยำ และใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อย (Saengprajak, 2012; Singh *et al.*, 2010)

จากรายงานการวิจัยพบว่ามีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ MD ด้วยเทคนิคการใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD) และไอเอสเอสอาร์ (ISSR) เพื่อจำแนกพันธุ์และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสี 10 สายพันธุ์ (Sumrith & Thanananta, 2014) และใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ InDel markers เพื่อการจำแนกชนิดย่อยอินดิกา และจาปอนิกาในเชื้อพันธุ์ข้าวไทย 96 สายพันธุ์ (Prathepha & Srisa-ard, 2014) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการวิจัยที่เปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์กลาย MD กับข้าวพันธุ์ KDML105 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวทั้งสองพันธุ์นี้ ผลจากการศึกษาพบว่าข้าวพันธุ์ KDML105 และพันธุ์กลาย MD มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกัน โดยสามารถตรวจพบความแตกต่างบนโครโมโซมแท่งที่ 4, 7 และ 10

ได้โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSRs จากไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ ได้แก่ RM241, RM11, RM481 และ RM304 ซึ่งคิดเป็น 10% ของไพรเมอร์ทั้งหมด (ภาพที่ 1) ทั้งนี้ตำแหน่งที่ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่เข้าจับบนโครโมโซมมีแสดงในรายงานของ Temnykh *et al.* (2000) และ Temnykh *et al.* (2001) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าข้าวพันธุ์กลาย MD มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปจากข้าว KDML 105 และสามารถแยกชนิดพันธุ์ของข้าวทั้งสองชนิดนี้ได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSRs

นอกจากนี้ผลการศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเมล็ดข้าวกล้องของข้าวพันธุ์ KDML105 และ MD โดยวิธี GeLC-MS/MS shotgun proteomics พบว่าทั้ง 2 พันธุ์มีรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนต่างกัน (ภาพที่ 2 และตารางที่ 2) โดยในจำนวน 342 โปรตีนที่ระบุชนิดได้ พบว่ามีโปรตีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับคุณค่าทางอาหารของเมล็ด โดยเฉพาะโปรตีน 3-ketoacyl carrier synthase III (gil657400458) โปรตีน glycosyltransferase family 61 protein (gil657383872) และโปรตีน UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase (gil657398130) พบว่ามีระดับการแสดงออกในเมล็ดข้าวพันธุ์ MD สูงกว่าข้าวพันธุ์ KDML105 เท่ากับ 7, 4 และ 0.25 เท่า ตามลำดับ โดยโปรตีน 3-ketoacyl carrier synthase III ทำหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน (Clough *et al.*, 1992) โปรตีน glycosyltransferase family 61 protein ทำหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์สาร arabinoxylan ซึ่งเป็นแหล่งสะสมกรดพีนอลิกและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Anders *et al.*, 2012; Malunga & Beta, 2015) และโปรตีน UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ (Offen *et al.*, 2006) แสดงให้เห็นว่าเมล็ดของข้าวพันธุ์ MD อาจมีปริมาณกรดไขมัน สารประกอบพีนอลิก และฟลาโวนอยด์สูงกว่าในเมล็ดของข้าวพันธุ์ KDML105 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Maksup *et al.* (2018) ซึ่งศึกษาโปรตีนโอมิกส์ของข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกของข้าวพันธุ์ KDML105 และ MD ที่พบว่ารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเมล็ดข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกของข้าวทั้งสองพันธุ์มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเมล็ดข้าวพันธุ์ MD ทั้งในลักษณะข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกมีปริมาณสารประกอบพีนอลิกรวม แอนโทไซยานิน และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเมล็ดข้าวพันธุ์ KDML105 (Maksup *et al.*, 2018) ดังนั้นเมล็ดข้าวพันธุ์ MD จึงมีประโยชน์ทางโภชนาการสูงกว่าข้าวพันธุ์ KDML105 และเหมาะต่อการส่งเสริมเป็นพันธุ์ข้าวเศรษฐกิจต่อไป

สรุปผลการวิจัย

ข้าวพันธุ์ KDML105 และพันธุ์กลาย MD มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเมล็ดข้าวที่แตกต่างกันทั้งในแง่ของชนิดโปรตีนและระดับการแสดงออกของโปรตีน ซึ่งสนับสนุนว่าข้าวทั้งสองพันธุ์มีพันธุกรรมแตกต่างกัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับทุนวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยมหิดล ประจำปีงบประมาณ 2560 และขอขอบคุณสถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี ที่สนับสนุนเทคนิคและเครื่องมือในการวิเคราะห์โปรตีนโอมิกส์

เอกสารอ้างอิง

- Anders, N., Wilkinson, M.D., Lovegrove, A., Freeman, J., Tryfona, T., Pellny, T.K., Weimar, T., Mortimer, J.C., Stott, K., Baker, J.M., Defoin-Platel, M., Shewry, P.R., Dupree, P., & Mitchell, R.A. (2012). Glycosyl transferases in family 61 mediate arabinofuranosyl transfer onto xylan in grasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(3), 989-993.
- Bardou, P., Mariette, J., Escudié, F., Djemiel, & C., Klopp, C. (2014). jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics*, 15, 293-299.
- Clough, R.C., Matthis, A.L., Barnum, S.R., & Jaworski, J.G. (1992). Purification and characterization of 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III from spinach. A condensing enzyme utilizing acetyl-coenzyme A to initiate fatty acid synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 267(29), 20992-20998.
- Deng, G.F., Xu, X.R., Zhang, Y., Li, D., Gan, R.Y., & Li, H.B. (2013). Phenolic compounds and bioactivities of pigmented rice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(3), 296-306.
- He, D., & Yang, P. (2013). Proteomics of rice seed germination. *Frontiers in Plant Science*, 4(246), 1-9.
- Johansson, C., Samskog, J., Sundstrom, L., Wadensten, H., Bjorkestén, L., & Flensburg, J. (2006). Differential expression analysis of *Escherichia coli* proteins using a novel software for relative quantitation of LC-MS/MS data. *Proteomics*, 6, 4475-4485.
- Kate-ngam S. (2003). DNA Markers in Plant Breeding. *Journal of Ubon Ratchathani University*, 5, 37-59. (in Thai)
- Laokuldilok, T., Surawang, S., & Klinhom, J. (2013). Influence of milling time on the nutritional composition and antioxidant content of Thai rice bran. *Food and Applied Bioscience Journal*, 1(3), 112-130.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Mahatheeranont, S., Keawsa-ard, S., & Dumri, K. (2001). Quantification of the rice aroma compound, 2-acetyl-1-pyrroline, in uncooked Khao Dawk Mali 105 brown rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 773-779.
- Maksup, S., Pongpakpian, S., Roytrakul, S., Cha-um, S., & Supaibulwatana, K. (2018). Comparative proteomics and protein profile related to phenolic compounds and antioxidant activity in germinated *Oryza sativa* 'KDML105' and Thai brown rice 'Mali Dang' for better nutritional value. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 566-573.
- Maksup, S., Roytrakul, S., & Supaibulwatana, K. (2014). Physiological and comparative proteomic analyses of Thai jasmine rice and two check cultivars in response to drought stress. *Journal of Plant Interactions*, 9, 43-55.

- Malunga, L.N., & Beta, T. (2015). Antioxidant capacity of arabinoxylan oligosaccharide fractions prepared from wheat aleurone using *Trichoderma viride* or *Neocallimastix patriciarum* xylanase. *Food chemistry*, 167, 311-319.
- Offen, W., Martinez-Fleites, C., Yang, M., Kiat-Lim, E., Davis, B.G., Tarling, C.A., Ford, C.M., Bowles, D.J., & Davies, G.J. (2006). Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. *The EMBO journal*, 25(6), 1396-405.
- Pereira-Caro, G., Cros, G., Yokota, T., & Crozier, A. (2013). Phytochemical profiles of black, red, brown, and white rice from the Camargue region of France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 7976-7986.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J.C., Creasy, D.M., & Cottrell, J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20, 3551-3367.
- Prathepha P. & Srisa-ard K. (2014). Application of InDel markers for subspecies indica-japonica rice classification in Thai rice germplasm. *Thai Journal of Genetics*, 7(2), 87-96. (in Thai)
- Riabroy, K., Khanthong, S., Toojinda, T., & Katengam, S. (2013). Fragrance gene and molecular basis of fragrant rice. *Thai Journal of Genetics*, 6(2), 93-114. (in Thai)
- Rice Department, Ministry of Agriculture and Cooperatives. (2016). *Rice Knowledge Bank: Red Hawn Rice*. Retrieved March 12, 2019, from <http://www.ricethailand.go.th/rkb3/title-index.php-file=content.php&id=90.htm>
- Saengprajak, J. (2012). Application of DNA markers for assessment of genetic diversity and rice improvement. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 40, 299-308. (in Thai)
- Singh, H., Deshmukh, R.K., Singh, A., Singh, A.K., Gaikwad, K., Sharma, T.R., Mohapatra, T., & Singh, N.K. (2010). Highly variable SSR markers suitable for rice genotyping using agarose gels. *Molecular Breeding*, 25, 359–364.
- Sumrith, J. & Thanananta, T. (2014). Identification and genetic relationship analysis of colored rice cultivars using HAT-RAPD and ISSR techniques. *Thai Journal of Science and Technology*, 3(2), 113-122. (in Thai)
- Tan, B.C., Lim, Y.S., & Lau, S.-E. (2017). Proteomics in commercial crops: an overview. *Journal of Proteomics*, 169, 176-188.
- Temnykh, S., Park, W.D., Ayres, N., Cartinhour, S., Hauck, N., Lipovich, L., Cho, Y.G., Ishii, T., & McCouch, S.R. (2000). Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 100(5), 697–712
- Temnykh, S., DeClerck, G., Lukashova, A., Lipovich, L., Cartinhour, S., & McCouch, S. (2001). Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Research*. 11(8), 1441-1452.

- Thorsell, A., Portelius, E., Blennow, K., & Westman, B.A. (2007). Evaluation of sample fractionation using microscale liquid-phase isoelectric focusing on mass spectrometric identification and quantitation of proteins in a SILAC experiment. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21, 771-778.
- Xu, H.-H., Liu, S.-J., Song, S.-H., Wang, R.-X., Wang, W.-Q., & Song, S.-Q. (2016). Proteomics analysis reveals distinct involvement of embryo and endosperm proteins during seed germination in dormant and non-dormant rice seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 103, 219-242.