

แผนที่กายภาพพันธุกรรมที่ควบคุมขนาดของรากและการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถชอนไชของรากข้าวบนโครโมโซมที่ 4

A Physical Map Encompassing a Major Root QTL and Candidate Gene for Root Penetration Ability on Rice Chromosome 4

วราพงษ์ ชมาฤกษ์¹⁾
Varapong Chamarek¹⁾

Abstract

A major quantitative trait loci (QTL) associated with basal root thickness (BRT) on chromosome 4 was used as the target for physical mapping. Two parental rice lines contrasting in their root characteristics, CT9993-5-10-1-M (CT) and IR62266-42-6-2 (IR), were used in this study. The objectives of this study were to fine map the major BRT QTL on chromosome 4 in rice and to isolate candidate genes related to root penetration index (RPI) trait which located in this region. The BAC library available for screening in this study was constructed from a rice cultivar Nipponbare (japonica) with average insert sizes of 130 to 150 kb and with a 10X genome equivalent. The RFLP markers located near the target BRT QTL on rice chromosome 4 were used for screening BAC filters. All candidate BAC clones identified by colony hybridization were confirmed by Southern hybridization and by searching the database available at the Clemson University Genomics Institute (CUGI) website. After confirming and comparing clones with the CUGI database, 24 BAC clones were identified. Three BAC islands were established at the positions where the markers RG939, RZ905 and S15892 were located. Additional BAC clones selected from the CUGI database were added to the BAC islands in order to assemble the physical map encompassing the BRT QTL region. Results from sequence analysis indicated that the physical distance between RG939 and RZ905 was approximately 1.12 mb. The BAC clones in the BRT QTL region were digested with the restriction enzyme *Hind* III and were used for Southern hybridization. The Differential Display (DD) technique was employed in order to isolate genes responsible for root growth in rice. The DD fragments CR17G1, CR19C1, CR23A1, CR39C2, CR39C7, and CR56A1 were used as probes to hybridize with these BAC clones. It was found that the DD fragment CR19C1 hybridized with the BAC clones 87D24 and 17B10, whereas the DD fragment CR23A1 hybridized with the BAC clone 17B10. The BAC clone 87D24 was located at the same position as the BAC clone AL606647sd1, which has a known nucleotide sequence. The clone 17B10, which hybridized with both the DD fragment CR19C1 and CR23A1, was located at the same position as the BAC clone AL606628sd1. In order to predict the functions of genes involved in root growth, the DD fragments CR19C1 and CR23A1 were submitted to the BLAST search against the *Arabidopsis* database at the TAIR website. It was interesting to find that the DD fragment CR19C1 has some degree of similarity to the locus AT1G72960 on chromosome 1 of the *Arabidopsis* genome. This locus was similar to *RHD3*, a putative

1) ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ตู้ ปณ.65 อ.เมือง จ.อุบลราชธานี 34000 โทรศัพท์ 045 344103-4
Ubon Ratchathani Rice Research Center, P.O. Box 65, Mueang, Ubon Ratchathani 34000, Thailand
Tel. 66 45 344103-4 Fax 66 45 344090

gene conferring root hair defects in *Arabidopsis thaliana*. The DD fragment CR23A1 was similar to the locus AT1G76490 on chromosome 1 of *Arabidopsis thaliana*. This locus was a putative gene coding for 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR), the enzyme involved in cell division in many species. These findings give us some ideas about the functions of candidate genes involved in root growth mechanisms in rice.

Keywords : *Oryza sativa* (japonica), physical map, quantitative trait loci (QTL), basal root thickness (BRT), root penetration index (RPI), differential display (DD) technique, chromosome 4

บทคัดย่อ

ได้จัดทำแผนที่ทางกายภาพของลักษณะทางพันธุกรรมเชิงปริมาณ (quantitative trait loci, QTL) ที่ควบคุมขนาดของรากข้าวที่อยู่นบนโครโมโซมที่ 4 พันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษามี 2 สายพันธุ์คือ CT9993-5-10-1-M (CT) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ข้าวไร่ที่มีลักษณะรากดีเด่น และ IR62266-42-6-2 (IR) เป็นสายพันธุ์ที่มีลักษณะรากด้อยกว่า งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจัดทำแผนที่อย่างละเอียดของ QTL ที่ควบคุมลักษณะขนาดของรากข้าว (basal root thickness, BRT) และค้นหาที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการชอนไชหยั่งรากลงในดิน (root penetration index, RPI) ที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 4 ของข้าว ในการจัดทำแผนที่ทางกายภาพของข้าวใช้ BAC library ที่เตรียมจากพันธุ์ข้าวจากปอนิก้าพันธุ์นิปอนนาระ ซึ่งครอบคลุมประมาณ 10 เท่าของจีโนมข้าว โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายชนิด RFLPs ที่วางตำแหน่งอยู่ใกล้กับ BRT QTL บนโครโมโซมที่ 4 ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของ BAC library ที่แถมลงบนแผ่นเมมเบรน BAC clones ที่จับคู่กับโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้วิเคราะห์ โดยยืนยันอีกครั้งด้วยเทคนิค Southern hybridization และตรวจสอบกับฐานข้อมูลในเว็บไซต์ของ Clemson University Genomics Institute (CUGI) ซึ่งสามารถจำแนก BAC clones ที่จับคู่กับโมเลกุลเครื่องหมาย RG939, RZ905 และ S15892 ได้รวม 24 โคลน นำมาจัดทำเป็น BAC islands ได้สามตำแหน่ง ส่วน BAC clones อื่นๆ นำมาจากฐานข้อมูลเพื่อเชื่อมต่อกันให้ได้แผนที่ทางกายภาพบริเวณดังกล่าวจากการวิเคราะห์ข้อมูลของลำดับเบส พบว่า ระยะทางทางกายภาพระหว่างโมเลกุลเครื่องหมาย RG939 และ RZ905 ประมาณ 1.12 ล้านเบส จากนั้นนำ BAC clones ที่อยู่ระหว่างโมเลกุลเครื่องหมายทั้งสองไปย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดเฉพาะเจาะจง *Hind* III และนำไปจับคู่กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่กวาดจากยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของรากข้าว ที่ได้จากเทคนิค Differential Display (DD) จำนวน 6 ชิ้นคือ CR17G1, CR19C1, CR23A1, CR39C2, CR39C7 และ CR56A1 พบว่า CR19C1 สามารถจับคู่กับ BAC clone 87D24 และ 17B10 ส่วน CR23A1 สามารถจับคู่กับ 17B10 เมื่อตรวจสอบกับฐานข้อมูลพบว่าโคลน 87D24 อยู่ในตำแหน่งเดียวกับโคลน AL606647sd1 และโคลน 17B10 อยู่ในตำแหน่งเดียวกับโคลน AL606628sd1 ซึ่งเป็นโคลนที่ทราบลำดับเบสแล้ว นำข้อมูลลำดับเบสของโคลนทั้งสองไปสืบค้นในฐานข้อมูลของ *Arabidopsis* ที่เว็บไซต์ The Arabidopsis information resource (TAIR) พบว่า ชิ้นส่วน DD fragment CR19C1 มีโครงสร้างลำดับเบสคล้ายคลึงกับตำแหน่ง AT1G72960 บนโครโมโซมที่ 1 ของ *Arabidopsis* ซึ่งคล้ายคลึงกับยีน *RDH3* ที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของรากฝอยใน *Arabidopsis* สำหรับชิ้นส่วน DD fragment CR23A1 มีโครงสร้างลำดับเบสคล้ายคลึงกับตำแหน่ง AT1G76490 บนโครโมโซมที่ 1 ของ *Arabidopsis* ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์เอ็นไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR) ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแบ่งเซลล์ในพืชหลายๆ ชนิด ผลการวิจัยนี้ทำให้เกิดความเข้าใจในที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตของรากข้าวมากขึ้น

คำสำคัญ : ข้าวจากปอนิก้า แผนที่ทางกายภาพ ลักษณะทางพันธุกรรมเชิงปริมาณ ขนาดของรากข้าว การชอนไชของรากข้าว เทคนิค DD (Differential Display) โครโมโซมที่ 4

คำนำ

การจัดทำแผนที่พันธุกรรม (genome mapping) ของพืช มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิต ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาการของสิ่งมีชีวิต การทำแผนที่พันธุกรรมจะเป็นประโยชน์ในการค้นหาและจำแนกยีนต่าง ๆ โดยอาศัยข้อมูลจากผลการแสดงออกของยีนที่มีต่อลักษณะทางกายภาพที่ปรากฏออกมา (phenotype) โดยไม่จำเป็นต้องทราบถึงหน้าที่ของยีนนั้น ๆ เมื่อสามารถค้นหาโมเลกุลเครื่องหมายจำนวนเพิ่มมากขึ้น จะทำให้การค้นหาตำแหน่งของยีน หรือกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะทางกายภาพที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมีความแม่นยำยิ่งขึ้น

Nguyen และคณะ (1997) ได้เสนอว่าลักษณะทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้องกับความทนทานแล้งของพืชที่สำคัญมี 4 อย่างคือ คุณลักษณะของราก (root characteristics) การปรับแรงดันออสโมติก (osmotic adjustment) การคายน้ำทางผิว (cuticular transpiration) และประสิทธิภาพการใช้น้ำ (water use efficiency) เมื่อไม่นานมานี้นักวิจัยเริ่มให้ความสนใจศึกษาลักษณะรากพืชที่เกี่ยวข้องกับความทนแล้ง มีการตั้งสมมุติฐานว่า การที่มีระบบรากที่มีขนาดใหญ่เพื่อการลำเลียงน้ำที่ดี จะช่วยให้พืชสามารถดูดน้ำจากดินชั้นล่าง ๆ ได้เมื่อประสบกับสภาวะแห้งแล้ง การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้มีความทนแล้ง จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องค้นหาลักษณะทางพันธุกรรมเชิงปริมาณ (QTL) ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทนแล้ง รวมทั้งค้นหาโมเลกุลเครื่องหมายที่จะนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนแล้งต่อไป วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ การจัดทำแผนที่กายภาพ (physical map) ของ QTL ที่ควบคุมขนาดของรากข้าว และการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเจริญเติบโตของรากข้าว ที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 4 ของข้าว

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การจัดทำแผนที่กายภาพของข้าวตรงตำแหน่ง BRT QTL บนโครโมโซมที่ 4

ลักษณะทางพันธุกรรมเชิงปริมาณ (QTL) ที่ควบคุม

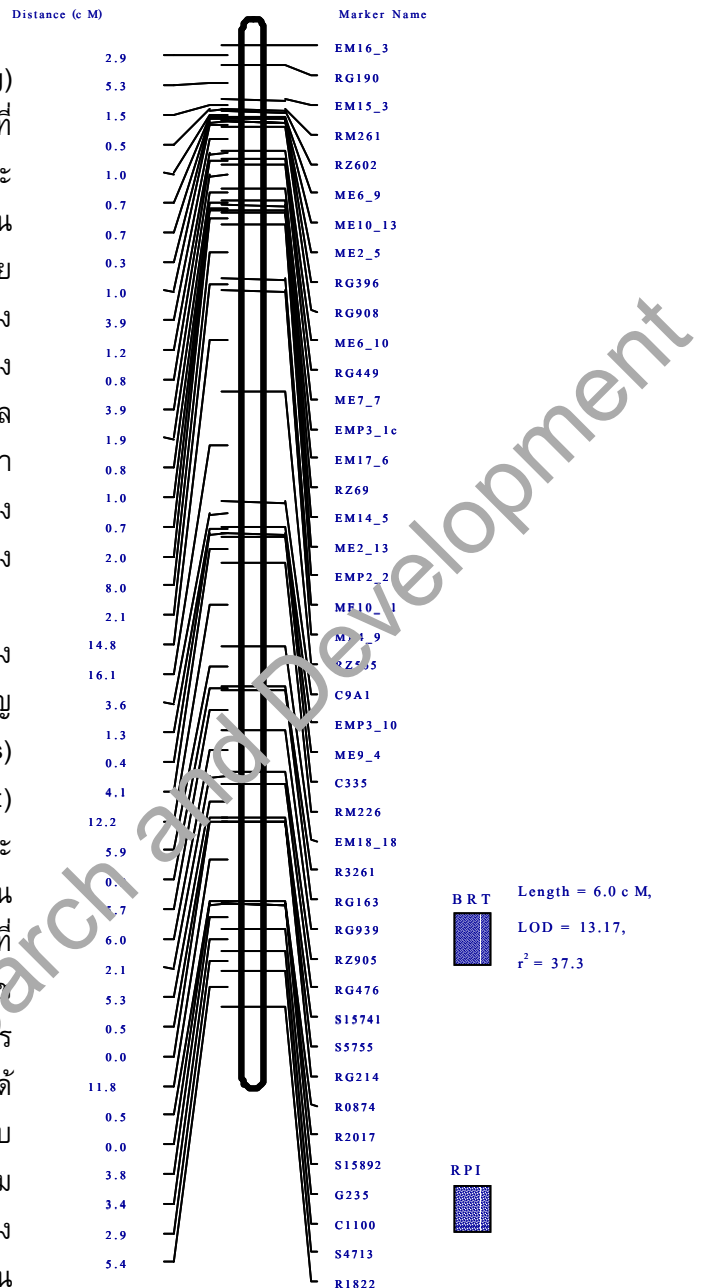


Fig. 1 A genetic linkage map of rice chromosome 4, showing the target QTL (BRT) for a marker-assisted backcross breeding program (BRT = Basal Root Thickness, RPI = Root Penetration Index)

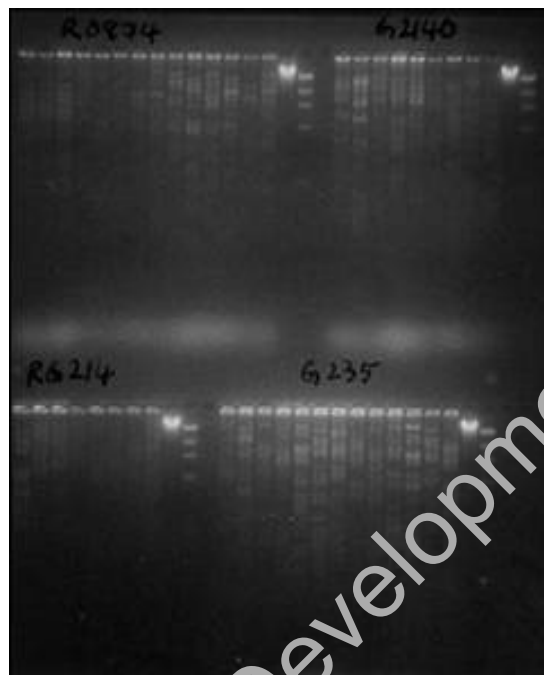
ขนาดของรากข้าว (BRT) ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 4 ของข้าว ซึ่งอยู่ตรงตำแหน่งระหว่างโมเลกุลเครื่องหมาย RG939 และ RZ905 โดยมีระยะทางทางพันธุกรรม (genetic distance) เท่ากับ 6.0 cM (Fig. 1) ได้นำมาจัดทำแผนที่กายภาพ แผ่นเมมเบรน BAC filters ที่ใช้ในการจัดทำแผนที่กายภาพของข้าวซึ่งจัดจำหน่ายโดย Clemson



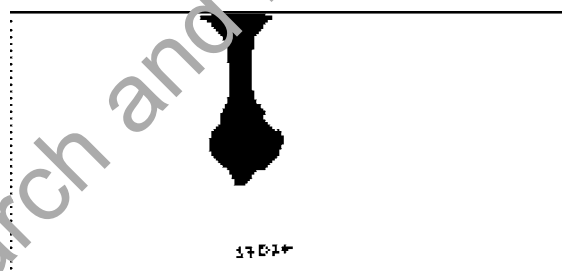
Fig. 2 BAC filter screening using CUGI BAC filters prepared from a rice cultivar Nipponbare. Each BAC clone was spotted onto the filter in 2 replicates.

University Genomics Institute (CUGI) ได้จาก BAC library ที่เตรียมจากพันธุ์ข้าว Japonica นีปปอนbare ซึ่งครอบคลุมประมาณ 10 เท่าของจีโนมข้าว โดยแต่ละโคลนจะมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 130 - 150 กิโลเบส โมเลกุลเครื่องหมายชนิด RFLPs ที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้ชิดกับ BRT QTL จำนวน 8 ตำแหน่ง ได้นำมาใช้วิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมคือ RG939, RZ905, R2017, R0874, C1100, S13536, S15982 และ RG214 โมเลกุลเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งจะติดกันด้วยสารกัมมันตรังสี ตามวิธีการที่อธิบายโดย Feinberg และ Vogelstein (1984) จากนั้นนำไปรับเข้าสู่กับแผ่นเมมเบรนในสารละลายตามกรรมวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการของบริษัท Amersham

หลังจากการจับเข้าคู่กันแล้วจะล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย แล้วนำไปแนบบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์เพื่อตรวจสอบผล (Fig. 2) โคลนที่จับเข้าคู่กับโมเลกุลเครื่องหมายก็ใช้วิเคราะห์ และยืนยันอีกครั้งด้วยการนำโคลนเหล่านั้นไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ชนิด *Hind* III แล้วนำไปแยกขนาดด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis จากนั้นดีเอ็นเอจะถูกตรึงลงบนแผ่นเมมเบรนแล้วนำไปจับเข้าคู่กับโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อยืนยันอีกครั้ง (Fig. 3) โคลนที่ยืนยันและตรวจสอบกับฐานข้อมูลของ CUGI Homepage (2002) แล้วนำไปจัดทำแผนที่กายภาพของข้าวตรง ตำแหน่ง BRT



(A)



(B)

Fig. 3 (A) Selected BAC clones covering the BRT QTL region on chromosome 4 were digested with the restriction enzyme *Hind* III. (B) Autoradiogram of BAC clones in the QTL region for BRT on chromosome 4 indicates the DD fragment CR19C1 hybridized with the BAC clones 87D24.

QTL ต่อไป

2. การค้นหาพื้นที่สัมพันธ์กับดัชนีการชอนไชของรากข้าว

การค้นหาพื้นที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการชอนไชหยั่งรากลงในดิน (root penetration index, RPI) ที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 4 ของข้าวด้วยเทคนิค Differential Display (DD) ที่อธิบายโดย Liang และ Pardee (1997) ใช้พันธุ์ข้าว 2 สายพันธุ์คือ CT9993-5-10-1-M (CT) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ข้าวไร่ที่มีลักษณะรากดีเด่น ส่วน



(A)



(B)

Fig. 4 Plant materials used for candidate gene analysis. (A) Parental lines CT9993-5-10-1-M and IR62266-42-6-2 grown in modified pots using wax layers for root penetration ability screening. (B) Young root tips immediately emerged from the wax layer collected for isolation of total RNA used in differential display reverse transcription (DDRT) analysis.

สายพันธุ์ IR62266-42-6-2 (IR) มีลักษณะรากด้อยกว่าทำการปลูกข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในกระถางที่ดัดแปลงให้มีแผ่นซีฟ้างอยู่ฐานกระถาง เพื่อเลียนแบบสภาพชั้นดินตามวิธีการที่อธิบายโดย Yu และคณะ (1995) (Fig. 4) และเก็บตัวอย่างปลายรากปกติและปลายรากที่ชอนไชทะลุผ่านแผ่นซีฟ้างมาสกัด RNA เพื่อค้นหาเอ็นที่แสดงหน้าที่ในการชอนไชผ่านชั้นซีฟ้าง การทำ DD ใช้ชุดตรวจสอบและกรรมวิธีของบริษัท GenHunter Corporation ชิ้นส่วนของยีน (DD fragments) ที่แสดงหน้าที่แตกต่างกันระหว่างรากปกติและรากที่ชอนไชผ่านชั้นซีฟ้าง (Fig. 5) ได้ตั้งชื่อตามชื่อของพันธุ์ข้าวคือ CR (CT9993 root) และ IR (IR62266 root) และถ่ายฝากเข้าสู่เวกเตอร์แล้วนำไปตรวจหาด้วยเบสและค้นหาหน้าที่จากฐานข้อมูล NCBI (2001) ด้วยโปรแกรม BLAST search นอกจากนี้ DD fragments ที่มีลำดับเบสคล้ายกับโครโมโซมที่ 4 ของข้าวจากฐานข้อมูลก็จะนำไปจับเข้าคู่กับ BAC clones ที่จำแนกได้จากขั้นตอนข้างต้น เพื่อค้นหาตำแหน่งทางกายภาพของ DD fragments ดังกล่าว

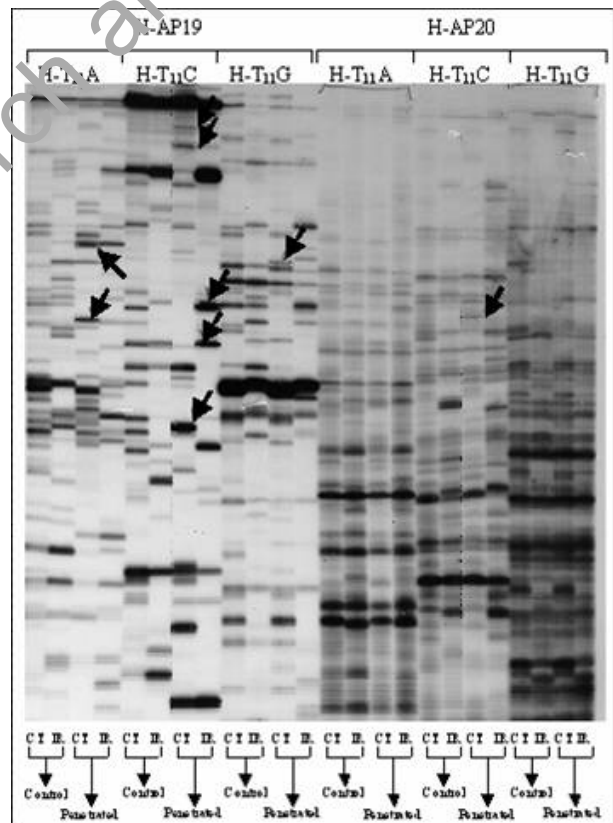


Fig. 5 Examples of primer combinations showed differential expressions of some fragments. PCR products from DDRT run on 6% denaturing polyacrylamide gel. Arrows indicated+ fragments of interest.

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การจัดทำแผนที่กายภาพของข้าวตรงตำแหน่ง BRT QTL บนโครโมโซมที่ 4

หลังจากยืนยัน และตรวจสอบความถูกต้องกับฐานข้อมูล CUGI แล้วนำ BAC clones ที่จำแนกด้วยโมเลกุลเครื่องหมายทั้ง 8 ตำแหน่งที่อยู่ใกล้กับ BRT QTL บนโครโมโซมที่ 4 จำนวน 24 โคลน มาจัดทำแผนที่กายภาพได้ 3 กลุ่ม ที่ตำแหน่งของโมเลกุลเครื่องหมาย RG939, RZ905 และ S15892 จากนั้นได้นำโคลนอื่นๆ จากฐานข้อมูลที่อยู่ในบริเวณดังกล่าวมาเติมให้เต็ม จนได้แผนที่กายภาพระหว่างโมเลกุลเครื่องหมาย RG939 และ RZ905 ซึ่งมี BAC clones ประมาณ 12 โคลน ที่เหลื่อมซ้อนกันอยู่ (Fig. 6) เมื่อคำนวณระยะทางทางกายภาพ (physical distance) โดยประมาณ จะได้เท่ากับ 1.12 เมกะเบส คำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางทางกายภาพกับระยะทางทางพันธุกรรม ของ BRT QTL มีค่าเท่ากับ 186.7 กิโลเบส/1 cM ซึ่ง Feng และคณะ (2002) ได้คำนวณไว้ว่าความถี่ของยีนบนโครโมโซมที่ 4 ของข้าว ประมาณ 7,441 เบส/1 ยีน แสดงว่า BRT QTL น่าจะมี ยีนอยู่ประมาณ 150 ยีน ดังนั้น การค้นหายีนที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะรากของข้าวอาจต้องใช้เวลาในการ วิจัยรายละเอียดมากกว่านี้

2. การค้นหายีนที่สัมพันธ์กับดัชนีการชอนไชของรากข้าว

จากการนำตัวอย่าง RNAs จากปลายรากที่เจริญตามปกติกับปลายรากที่สามารถชอนไชทะลุผ่านชั้นขี้ผึ้ง มาสังเคราะห์เป็น cDNAs ด้วยไพรเมอร์จำนวน 120 คู่ พบว่า มีไพรเมอร์ 34 คู่ ที่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DD fragments) ในระดับที่แตกต่างกันระหว่างรากปกติกับรากที่ทะลุผ่านชั้นขี้ผึ้ง (Fig. 5) โดยสามารถจำแนกชิ้นส่วน DD fragments ที่มีระดับแตกต่างกันได้ทั้งหมด 104 ชิ้น ในจำนวนนี้มี DD fragments 65 ชิ้นที่แสดงออกเฉพาะในรากที่ชอนไชทะลุผ่านชั้นขี้ผึ้ง ส่วนอีก 39 ชิ้นแสดงออกทั้งในรากปกติและรากที่ทะลุผ่านชั้นขี้ผึ้ง แต่จะแสดงออกในระดับที่เพิ่มขึ้น ชิ้นส่วน DD fragments จะถูกเพิ่มปริมาณและถ่ายแยกสู่แบคทีเรีย ตรวจสอบยืนยันขนาดเพื่อความถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำ DD fragments จำนวน 52 ชิ้นที่ตรวจสอบยืนยันแล้วไปวิเคราะห์หาลำดับเบสและตรวจสอบหน้าที่กับฐานข้อมูลต่างๆ ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่า มี DD fragments จำนวน 13 ชิ้นที่มีหน้าที่เหมือนกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอในฐานข้อมูล อีก 36 ชิ้นมีลำดับเบสเหมือนหรือใกล้เคียงกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอในฐานข้อมูลแต่ยังไม่ทราบหน้าที่ ส่วนอีก 3 ชิ้นเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสไม่เหมือนในฐาน

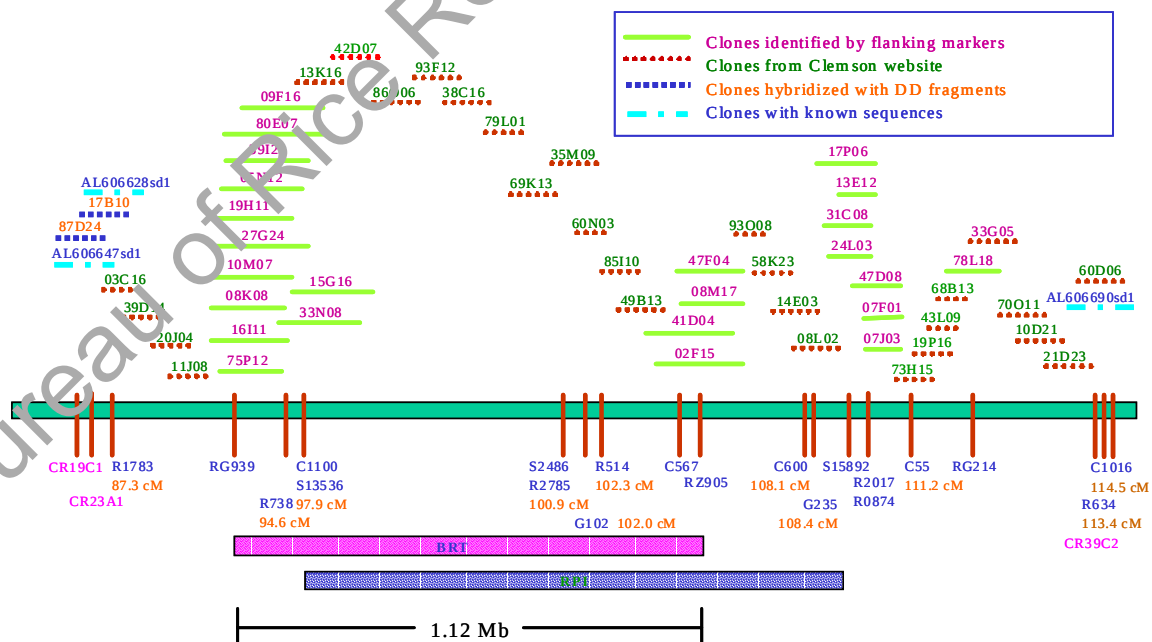


Fig. 6 A BAC contig encompassing the target root QTLs on chromosome 4

ข้อมูล

นอกจากนี้ ยังพบว่า มี DD fragments จำนวน 6 ชิ้น ที่มีลำดับเบสเหมือนกับ BAC clones บนโครโมโซมที่ 4 ของข้าว คือ CR17G1, CR19C1, CR23A1, CR39C2, CR39C7 และ CR56A1 ซึ่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอเหล่านี้ยังไม่มีข้อมูลว่าเกี่ยวข้องกับยีนที่ทำหน้าที่อะไร นำชิ้นส่วน DD fragments เหล่านี้ไปจับเข้ากับ BAC clones ที่อยู่ในตำแหน่งของ BRT QTL บนโครโมโซมที่ 4 พบว่า CR19C1 สามารถจับคู่กับ BAC clone 87D24 และ 17B10 ส่วน CR23A1 สามารถจับคู่กับ 17B10 เมื่อตรวจสอบกับฐานข้อมูลพบว่าโคลน 87D24 อยู่ในตำแหน่งเดียวกับโคลน AL606647sd1 และโคลน 17B10 อยู่ในตำแหน่งเดียวกับโคลน AL606628sd1 ซึ่งเป็นโคลนที่ทราบลำดับเบสแล้ว เมื่อนำข้อมูลลำดับเบสของ AL606647sd1 และ AL606628sd1 ไปทำนายหายีนที่มีอยู่ด้วยโปรแกรม Rice HMM Homepage (2002) พบว่า ลำดับเบสที่มีโครงสร้างของยีนจำนวน 32 และ 35 ยีน ตามลำดับ

เพื่อค้นหาข้อมูลเกี่ยวกับหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของรากข้าวที่มีอยู่ใน CR19C1 และ CR23A1 ได้นำลำดับเบสของ DD fragments ทั้งสองไปสืบค้นในฐานข้อมูลของ *Arabidopsis* ที่เว็บไซต์ TAIR Homepage (2002) พบว่า ชิ้นส่วน DD fragment CR19C1 มีโครงสร้างลำดับเบสคล้ายคลึงกับตำแหน่ง AT1G72960 บนโครโมโซมที่ 1 ของ *Arabidopsis* ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *RDH3* ที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของรากฝอยใน *Arabidopsis* (Schiefelbein and Somerville, 1990)

สำหรับชิ้นส่วน DD fragment CR23A1 มีโครงสร้างลำดับเบสคล้ายคลึงกับตำแหน่ง AT1G76490 บนโครโมโซมที่ 1 ของ *Arabidopsis* ซึ่งเป็นตำแหน่งของยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแบ่งเซลล์ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Kato-Emori *et al.*, 2001)

ผลการวิจัยนี้ ช่วยให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของรากข้าว ซึ่งมีความสำคัญต่อการพัฒนาพันธุ์ข้าวให้ทนแล้งต่อไปในอนาคต

สรุปผลการทดลอง

การใช้เทคนิค 2 ประการในการค้นหายีนหรือกลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของรากข้าว เทคนิคแรกคือ Differential Display เพื่อค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการชอนไชของรากข้าวผ่านชั้นดินดาน โดยเปรียบเทียบยีนที่แสดงหน้าที่ในระดับต่างกัน ระหว่างรากที่เจริญเติบโตตามปกติกับรากที่เจริญเติบโตผ่านชั้นขี้ผึ้งที่จำลองสภาพชั้นดินดาน พบว่า มี 2 ยีนที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเจริญเติบโตของรากใน *Arabidopsis* ส่วนอีกเทคนิคหนึ่งได้แก่ map-based cloning strategy ที่จัดทำแผนที่กายภาพตรงตำแหน่งของ QTL ที่สัมพันธ์กับขนาดของรากข้าวซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 4 สามารถกำหนดหาระยะทางทางกายภาพของ QTL ได้เท่ากับ 1.12 เมกะเบส และประเมินได้ว่าบริเวณดังกล่าว จะมียีนอยู่ประมาณ 150 ยีน ข้อมูลที่ได้นี้เป็นประโยชน์ต่อการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของรากข้าว เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ทนแล้งต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมูลนิธิรีดักทีฟเฟลเลอร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- CUGI Homepage. 2002. Clemson University Genomics Institute Website. Available source: <http://www.genome.clemson.edu/projects/rice/fpc/integration/>, August 10, 2002.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein. 1984. Addendum: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 137 : 266-267.
- Feng, Q., Y. Zhang, P. Hao, S. Wang, G. Fu, Y. Huang, Y. Li, J. Zhu, Y. Liu, X. Hu, P. Jia, Y. Zhang, Q. Zhao, K. Ying, S. Yu, Y. Tang, Q. Weng, L. Zhang, Y. Lu, J. Mu, Y. 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. Lu, W. Gu, G. Zhu, Y. Tu, J. Jia, Y. 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.
- Kato-Emori, S., K. Higashi, K. Hosoya, T. Kobayashi and H. Ezura. 2001. Cloning and characterization of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in melon (*Cucumis melo* L. *reticulatus*). *Mol. Gen. Genet.* 265(1) : 135-142.
- Liang, P. and A.B. Pardee. 1997. Differential display methods and protocol. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 85. Humana Press.
- NCBI. 2002. National Center for Biotechnology Information. Available source : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, August 16, 2002.
- Nguyen, H.T., R.C. Babu and A. Blum. 1997. Breeding for drought resistance in rice: physiology and molecular genetic considerations. *Crop Sci.* 37 : 1426-1434.
- Rice HMM Homepage. 2002. Gene prediction program for rice. Available source: <http://rgp.dna.affrc.go.jp/RiceHMM/>, August 16, 2002.
- Schiefelbein, J.W. and C. Somerville. 1990. Genetic control of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2(3) : 235-243.
- TAIR Homepage. 2002. The Arabidopsis information resource. Available source: <http://www.arabidopsis.org/>, March 15, 2003.
- Yu, L.X., J.D. Ray, J.C. O'Toole and H.T. Nguyen. 1995. Use of wax-petrolatum layers for screening rice root penetration. *Crop Sci.* 35 : 684-687.