

Functional Genomics กับการพัฒนาพันธุ์พืช ภายใต้การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศโลก

รศ. ดร. อภิชาติ วรรณวิจิตร

Rice Gene Discovery/Rice Science Center

ภาวะโลกร้อน (global warming) และการเปลี่ยนแปลง ของสภาพภูมิอากาศ (climate change)



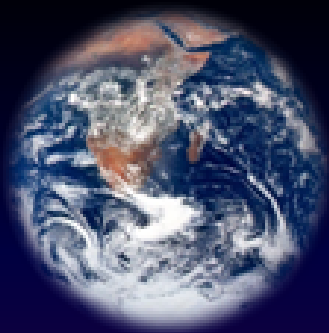
การคาดการณ์ผลกระทบต่อการเกษตรไทย

เกิดสภาวะน้ำกร่อยท่วมขังที่ลุ่มภาคกลางและ
ทุกภาคชายฝั่ง ไม่สามารถปลูกพืชได้

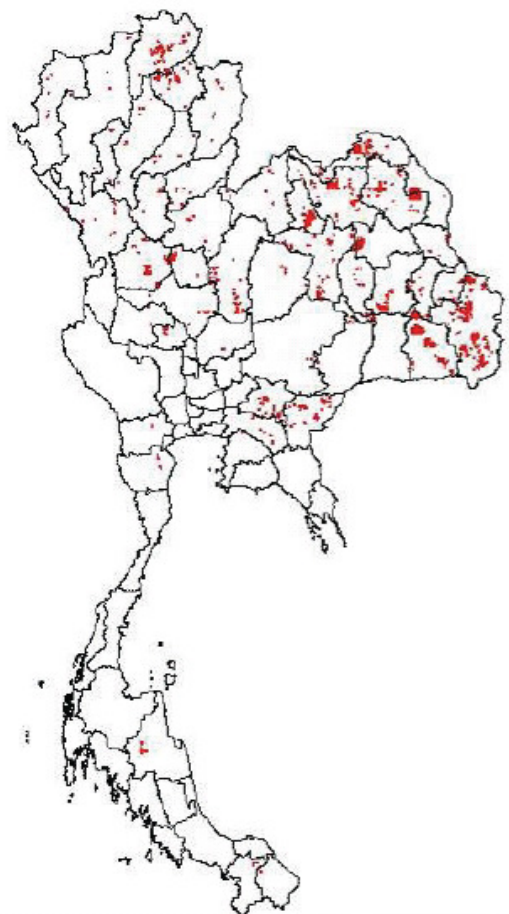
กระทบความสมบูรณ์พันธุ์และผลิดทางการ
เกษตรอย่างกว้างขวาง

เกิดการระบาดของแมลงศัตรูพืชอย่างรุนแรง
จากอุทกภัยและ สมดุลย์ธรรมชาติเสื่อมโทรม

เกิดน้ำท่วมและ แห้งแล้งอย่างฉับพลัน



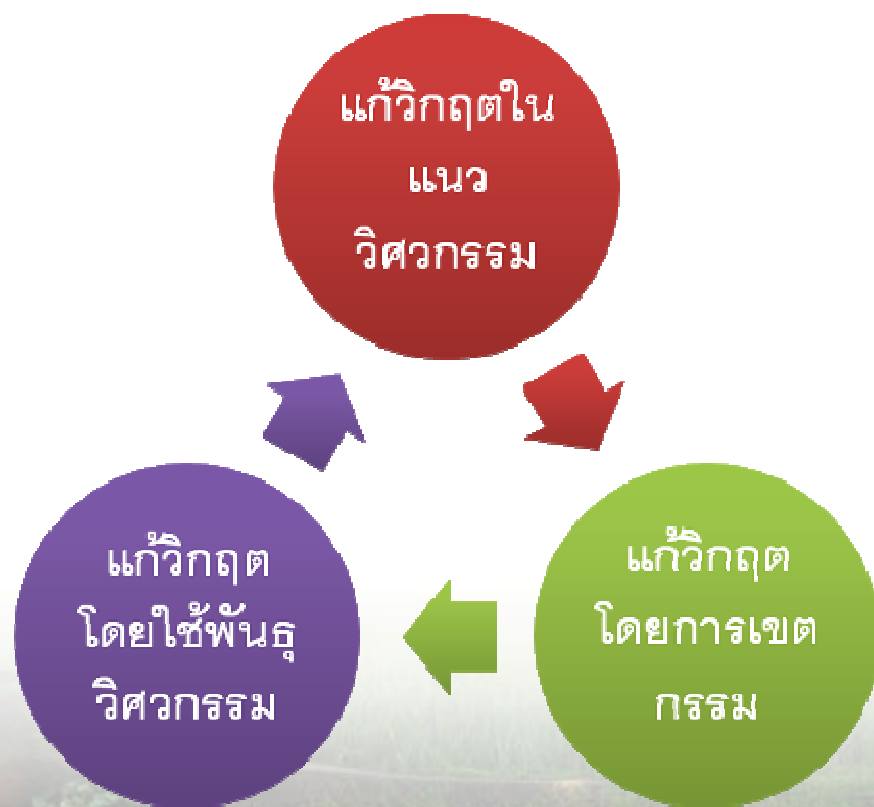
พื้นที่นํ้าฝนของไทยจะลดลง 30% ในปี 2623



Class 6

- yield < 70% of mean
- area 4%
- duration 20 years
- from 2030-39 & 2090-99

วิทยาศาสตร์กับการแก้วิกฤตโลกร้อน



ข้าวในโลกลอนาคตเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

ทศวรรษที่ 10

เพิ่มความต้านทานแมลง-โรค แบบเนวกว้าง

ทนแล้งและน้ำท่วมฉับพลัน

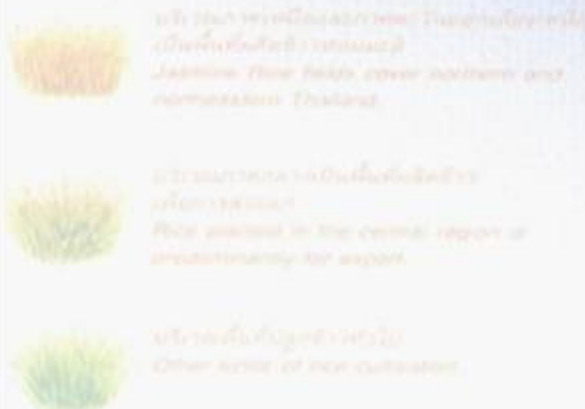
สะสมแป้งได้ดีที่อุณหภูมิสูง

ผสมเกสรติดที่อุณหภูมิสูงสุดไม่เกิน 38 °C



เกิดการระบาดของแมลงศัตรูพืชอย่างรุนแรง จากอุณหภูมิและ สมดุลย์ธรรมชาติเสื่อมโทรม

- แมลงศัตรูข้าวที่คาดว่าจะระบาดอย่างรุนแรงต่อเนื่องคือ เพลี้ย
- เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล, เพลี้ยกระโดดหลังขาว, เพลี้ยจักจั่นสีเขียว, เพลี้ยแป้ง
- ปัจจุบันมีเพียงพันธุ์ข้าวที่ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลปานกลางเท่านั้น
- ยังไม่รายงานพันธุ์ต้านทานเพลี้ยจักจั่นสีเขียว



เกิดน้ำท่วมและ แห้งแล้งอย่างฉับพลัน

ในเขตพื้นที่อาศัยน้ำฝน
ซึ่งมีอยู่ประมาณ 70 %
ของพื้นที่การเกษตร

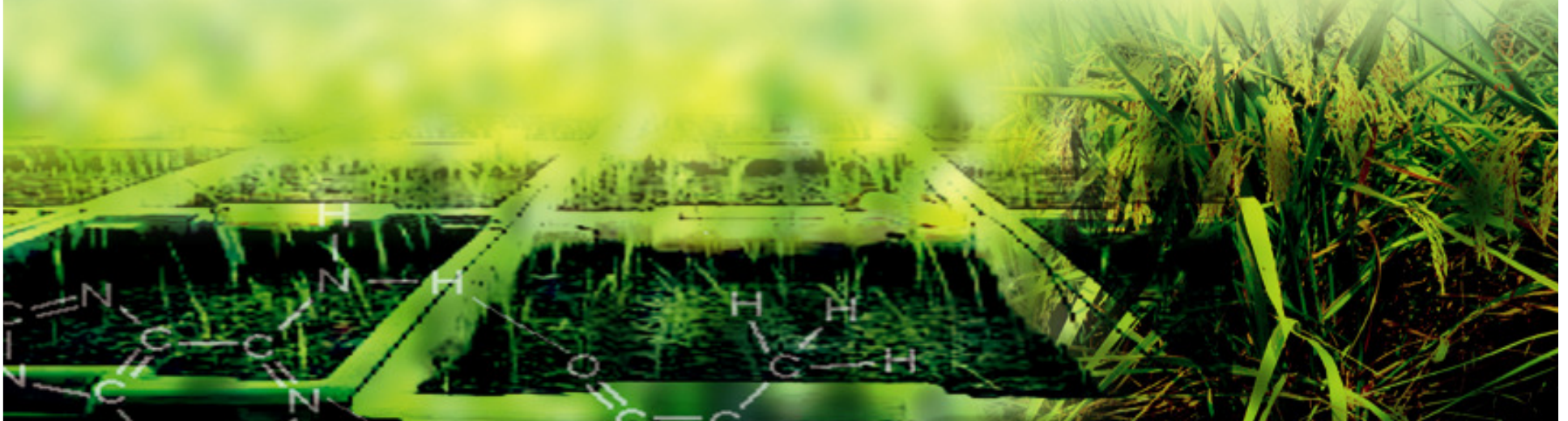
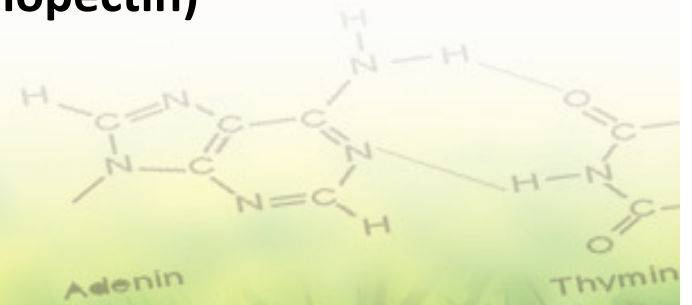
ปัจจุบัน มีข้าว หอม
มะลิ ๘๐ หน่น้ำท่วม
ฉับพลันแต่ไม่ทนแล้ง

ยังไม่มีสายพันธุ์ข้าวทน
แล้ง อย่างแท้จริงใน
ปัจจุบัน



ภาวะโลกร้อนที่มีผลกระทบต่อการผลิตข้าว

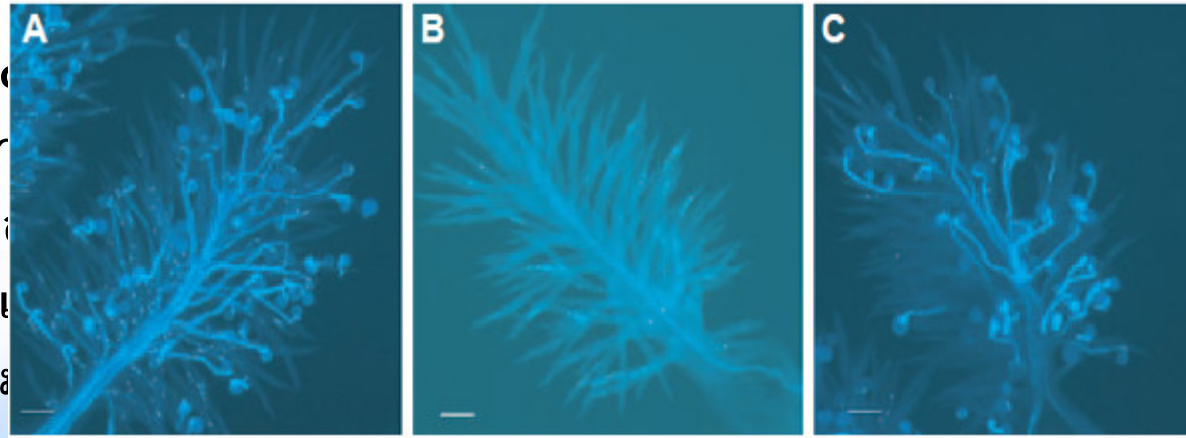
- สภาวะเครียดในสภาพอุณหภูมิสูงต่อระยะการสร้างเมล็ด (grain filling) ส่งผลต่อการให้ผลผลิตและคุณภาพของข้าวที่ลดลงเช่นเดียวกัน
 - คุณภาพโดยรวมต่อลักษณะปรากฏของเมล็ด
 - คุณภาพการสีข้าวและการหุงต้มเนื่องจากการเกิดท้องไข
 - การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอไมโลเพคติน (amylopectin)
 - อุณหภูมิแป้งสุกที่สูงขึ้น
 - ความคงตัวของแป้งสุกที่เป็นแป้งแข็งมากขึ้น



กระทบความสมบูรณ์พันธุ์และผลิตทางการเกษตรอย่างกว้างขวาง

- อุณหภูมิกลางวัน/กลางคืนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของข้าวอยู่ที่ประมาณ 28/22 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิสูงมีผลต่อการสังเคราะห์แสง

• ช่วงระยะการสืบพันธุ์ (reproductive) สภาพอุณหภูมิสูง (≥ 35 องศาเซลเซียส) (heading) และระยะผสมเกสรที่ผิดปกติ ความมีชีวิตและปริมาณเมล็ดไม่แตก และส่งผลให้การติดเมล็ดลดลง



- การปลูกข้าวในเขตชลประทานในช่วงฤดูร้อนในปัจจุบัน (มีนาคม–เมษายน) ได้ประสบกับสภาวะเครียดที่เกิดจากอุณหภูมิสูง
- ปัจจุบันไม่มีรายงานข้าวทนร้อนอย่างชัดเจนในโลก

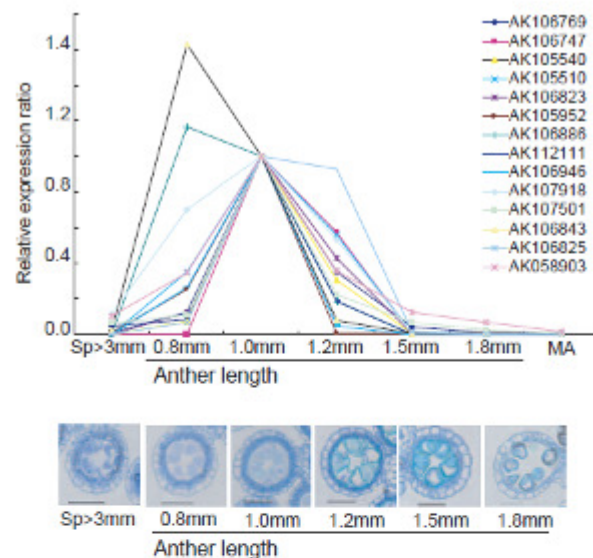


Fig. 6 The expression of the high temperature-responsive genes during anther development. The upper graph shows the relative expression ratio of each gene during anther development in a whole young spikelet that is under 3 mm long (Sp > 3 mm), in an immature anther (anther length = 0.8, 1.0, 1.2, 1.5, 1.8 mm) and in a mature anther (MA). The relative expression ratio of each gene was obtained by dividing the expression level in each sample by the expression level in the 1.0 mm anther. Transverse sections of the corresponding stages of anther development are shown in the lower part. Bars = 50 μ m.

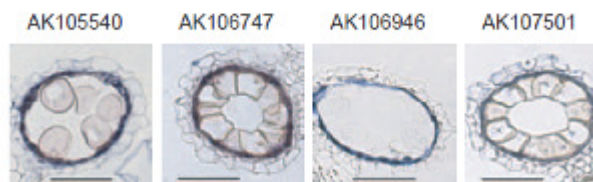


Fig. 7 In situ hybridization analysis of selected genes down-regulated by high temperature. Digoxigenin-labeled antisense RNA probes of four selected genes (AK105540, AK106747, AK106946 and AK107501) were hybridized to cross-sections of rice anthers at the microspore stage. Bars = 50 μ m.

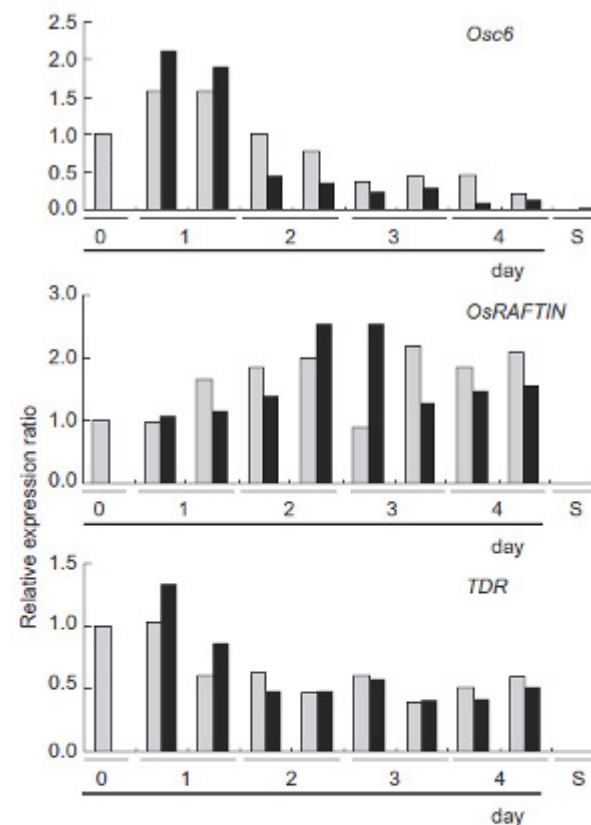


Fig. 8 The effects of high temperatures on the expression levels of the known tapetum-specific genes. The relative expression levels of *Osc6*, *TDR* and *OsRAFTIN* were analyzed by real-time RT-PCR. Untreated samples are represented by gray bars and high temperature-treated samples are represented by black bars. An expression analysis was performed in the anthers just before high temperature treatment (day 0) and after 1, 2, 3 and 4 d with and without high temperature treatment (day 1 to day 4) and in untreated seedlings and seedlings treated for 4 d (S). Real-time RT-PCR analyses from day 1 to day 4 were performed using RNA from two independent experiments. The relative expression ratio was obtained by dividing the expression level in each sample by the expression level at day 0.

การพัฒนาพันธุ์ข้าวทนต่ออุณหภูมิสูงวิกฤติในช่วงระยะพัฒนาดอกและเมล็ด

Phase 1: การคัดกรองพันธุ์/สายพันธุ์ข้าว

- พัฒนาอุโมงค์โลกร้อนเพื่อให้สามารถควบคุมอุณหภูมิอากาศต่อการคัดเลือก
- คัดเลือกพันธุ์/สายพันธุ์ข้าวจากพันธุ์ข้าวไม่ไวแสง ข้าวพันธุ์กลายและอื่นๆ
- ประเมินผลโดยใช้เกณฑ์ทางสัณฐาน เซลล์พันธุศาสตร์ สรีรวิทยา และคุณภาพเมล็ด
- พัฒนา Gene-specific markers

Phase 2: การแสดงออกยีนข้าวในสภาพอุณหภูมิสูงระยะการสืบพันธุ์

- เก็บตัวอย่างพืช สกัด RNA สร้าง cDNA สายเดี่ยว
- DNA hybridization บน microarray slide
- วิเคราะห์การแสดงออกของยีน HSPs และ Waxy และยีนอื่น ๆ
- Expression Profiling เพื่อหายีนที่แสดงออกอย่างจำเพาะ
- Single Feature Polymorphism เพื่อค้นหา SNP ที่แตกต่างกันระหว่างข้าวพันธุ์กรรม, ข้าวกลายพันธุ์ที่ทนร้อน/ไม่ทนร้อน
- Candidate gene selection
- Data mining จาก Public domain
- QTL mapping approach

Phase 3: การปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนต่ออุณหภูมิสูง

- ผสมพันธุ์ข้าวทนทานต่ออุณหภูมิสูงกับข้าวขาวดอกมะลิ 105, ข้าวนาชลประทาน
- การรวมยีนทนร้อนกับความต้านทาน น้ำท่วม แล้ง ดินเค็ม โรคแมลง

ขบวนการสะสมแป้งมีความไวต่ออุณหภูมิสูง

- การสะสมแป้งใน endosperm เป็นขบวนการที่ซับซ้อน ซึ่งประกอบด้วยการทำงานของยีนกว่า 10 ชนิดในขบวนการผลิตและตกแต่งโมเลกุลแป้ง

- แป้งข้าวแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ใหญ่ ๆ คือ amylose (AS) และ amylopectin (AP) ข้าวแต่ละพันธุ์มีองค์ประกอบของ AS กับ AP ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน

- ปริมาณ AS เป็นตัวกำหนดคุณสมบัติของแป้งข้าวและพืชทุกชนิดที่สำคัญที่สุด ประกอบกับความไวต่ออุณหภูมิสูงด้วยแล้ว ขบวนการสะสม AS ควรนำมาพิจารณาในการปรับปรุงข้าวทนร้อนด้วย

ยีนที่ควบคุมการสร้าง AS คือ waxy (Granule-bound Starch Synthase, GBSS)

Waxy B → (Intron splice site; IS) AGTTATA → AS < 24%

Waxy A → (Intron splice site; IS) AGGTATA → AS > 24%

ข้าวที่เป็น Waxy A คือมี AS สูงกว่า 24% สามารถรักษาระดับ %AS เอาไว้ได้ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น



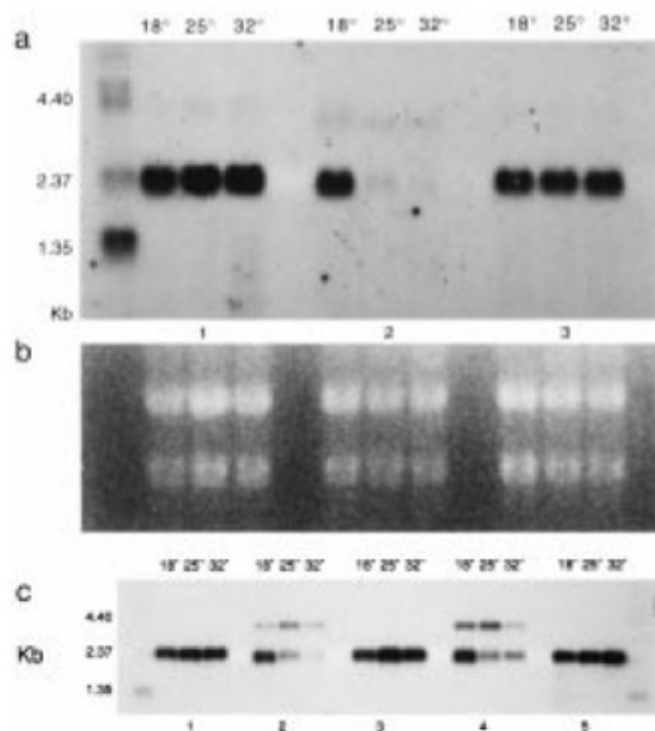


Figure 1. RNA gel blots of samples maintained at 18, 25 and 32 °C during endosperm development. a. Total RNA from: 1, Lemont (intermediate amylose); 2, Panda (low amylose); 3, Rexmont (high amylose). b. Ethidium bromide staining of total RNA gels shown in panel a prior to blotting. c. Poly(A)⁺ RNA from: 1, Lemont; 2, Panda; 3, Rexmont; 4, Toro-2; 5, L202. The 2.3 kb band represents fully processed GBSS mRNA; the 3.4 kb band represents GBSS transcripts containing the leader intron.

Table 1. Amylose content of the varieties tested when grain was allowed to develop at different temperatures. Also shown is whether the 5' leader intron splice site is AGGTATA or AGTTATA, market class when grown under typical field conditions, and number of microsatellite CT repeats in 5'-untranslated region.

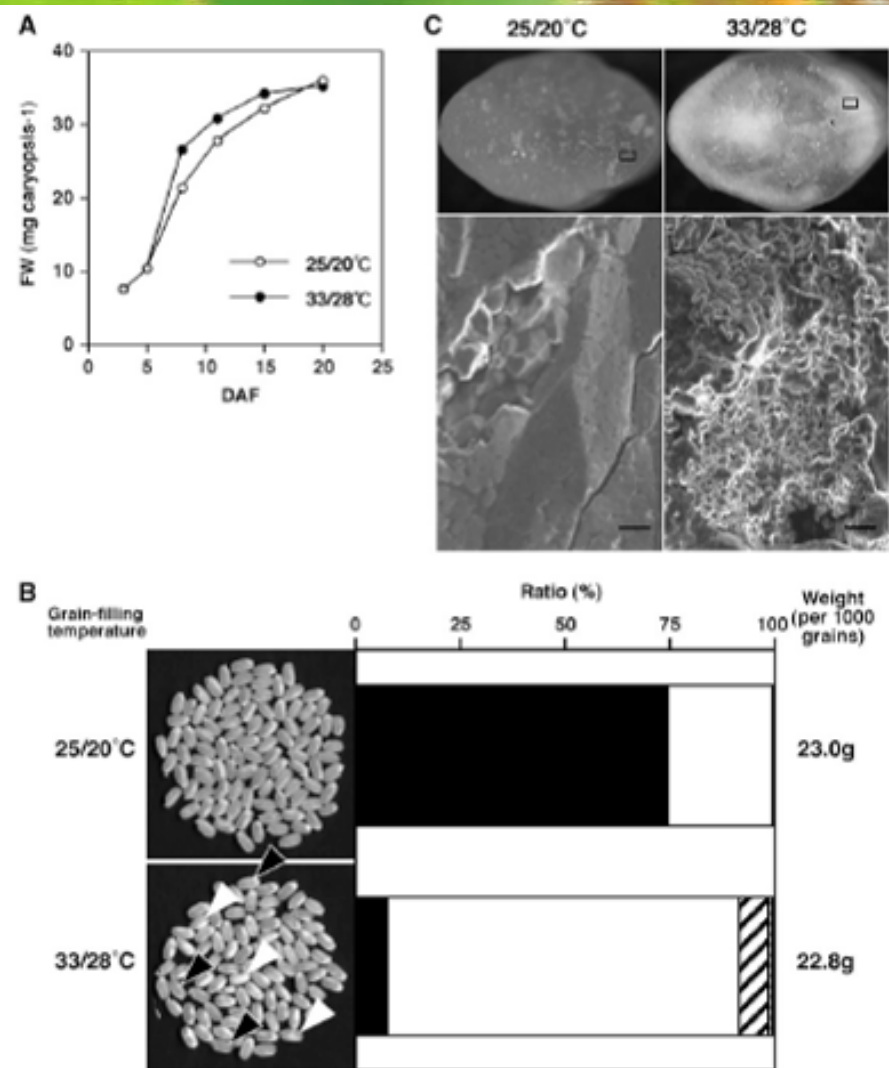
Variety	Market class	CT repeats	G/T	Temperature (°C)	Amylose (%)
Lemont	intermediate	20	G	18	22.2
				25	22.5
				32	19.0
Panda	low	18	T	18	20.9
				25	17.4
				32	12.9
Rexmont	high	11	G	18	22.8
				25	24.5
				32	24.6
Toro-2	low	18	T	18	20.8
				25	16.6
				32	11.9
L202	high	20	G	18	24.1
				25	25.3
				32	25.3
Nato	low	17	T	18	19.6
				25	13.5
				32	10.1

Larkin and Park (1999)

Table II. Amylose content of rice grains of various cultivars ripened under high (33°C/28°C) and normal (25°C/20°C) temperature

Cultivar	Amylose Content		Reduction Ratio ^b
	25°C/20°C	33°C/28°C	
	%		%
'Nipponbare'	18.8 ± 0.39 ^a	17.1 ± 0.61 ***	91.0
'Koshiibuki'	17.8 ± 0.49	15.1 ± 0.98 ***	84.6
'Tentakaku'	19.7 ± 0.60	15.5 ± 0.80 ***	78.7
'Sasanishiki'	18.4 ± 0.95	16.5 ± 1.13 **	89.6
'Hatsuboshi'	19.8 ± 1.11	15.0 ± 0.48 ***	75.9

^aValues are means ± SD of five replicates. ^bThe ratio of amylose content of 33°C/28°C-treated rice to that of 25°C/20°C-treated rice. ** and ***, Significant at 0.5% and 0.1% level, respectively, as determined by Student's *t* test.



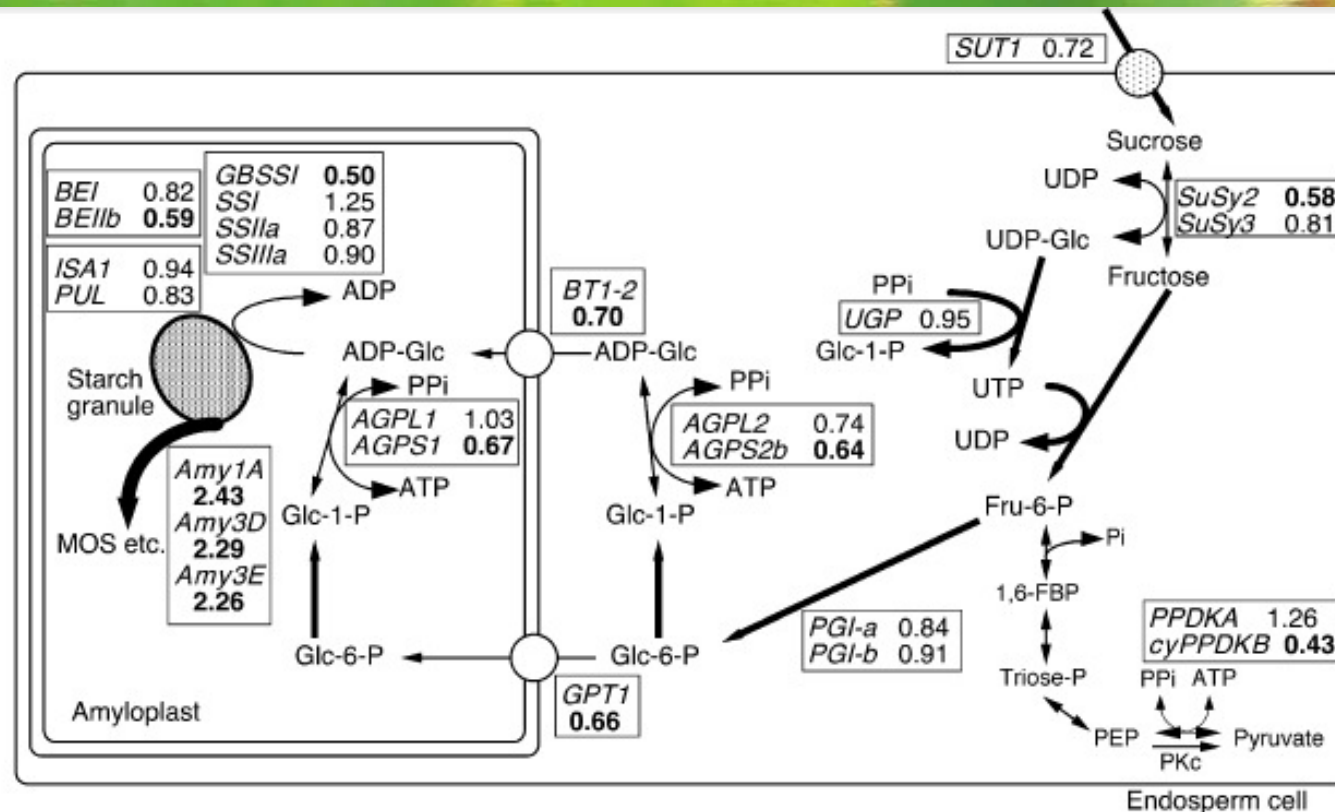


Figure 8. Ratio of cumulative expression level during 8 to 30 DAF of starch metabolism-related genes. The cumulative expression levels during 8 to 30 DAF were determined by semiquantitative RT-PCR and densitometry for grain filling under 25°C/20°C and 33°C/28°C, as described in the legend of Figure 2, and the ratio of cumulative transcript level for 33°C/28°C to 25°C/20°C is shown for the respective genes encoding enzymes/translocators on the starch-metabolizing pathway. The genes induced >1.5-fold and the corresponding reaction step are indicated in bold and with a thick arrow, while the genes repressed to <0.70-fold and the corresponding steps are indicated in bold and with thin arrows. The products of *AGPL1* and *AGPS1* genes have been estimated to be localized in amyloplasts, while those of *AGPL2* and *AGPS2b* in the cytosol (Akihiro et al., 2005; Ohdan et al., 2005). The pathways described in the text are solely depicted. MOS, Maltooligosaccharide; PKc, cytosolic pyruvate kinase.

ข้าวในโลกลอนาคดเมืออุณหภูมิสูงขึ้น

ทศวรรษที่ 20

ปรับปรุงการ
สังเคราะห์แสงโดยการ

ลด photo inhibition, เพิ่ม CO_2
compensation point

ผสมเกสรติดที่อุณหภูมิสูงสุด
ไม่เกิน 42°C

using the sun to
end hunger



จุดอ่อนของระบบการสังเคราะห์แสงในพืช C_3

เกิด **Photo-inhibition** ได้ง่ายเมื่อ quantum แสงสูง

เกิด **Photo respiration** จากการสังเคราะห์แสงแบบ C_3

ประสิทธิภาพการใช้น้ำต่ำ

Photoinhibition

ปัญหา:

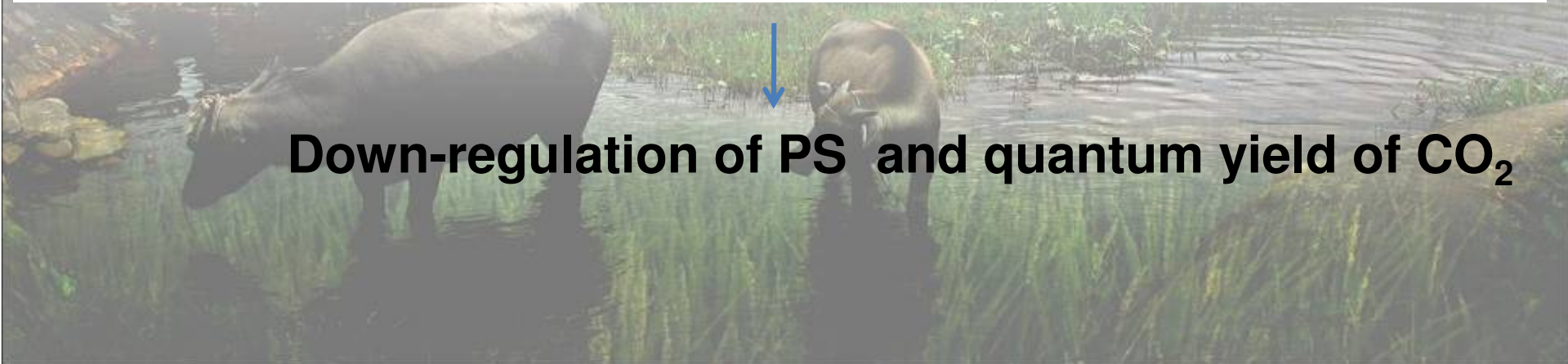
เมื่อการดูดแสงมากกว่าความสามารถในการนำไปสังเคราะห์

PHOTOSYNTHETICA 39 (2): 167-175, 2001

Cultivar differences in photosynthetic tolerance to photooxidation and shading in rice (*Oryza sativa* L.)

JIAO Demao* and LI Xia

Institute of Agrobiological Genetics and Physiology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China



Down-regulation of PS and quantum yield of CO₂

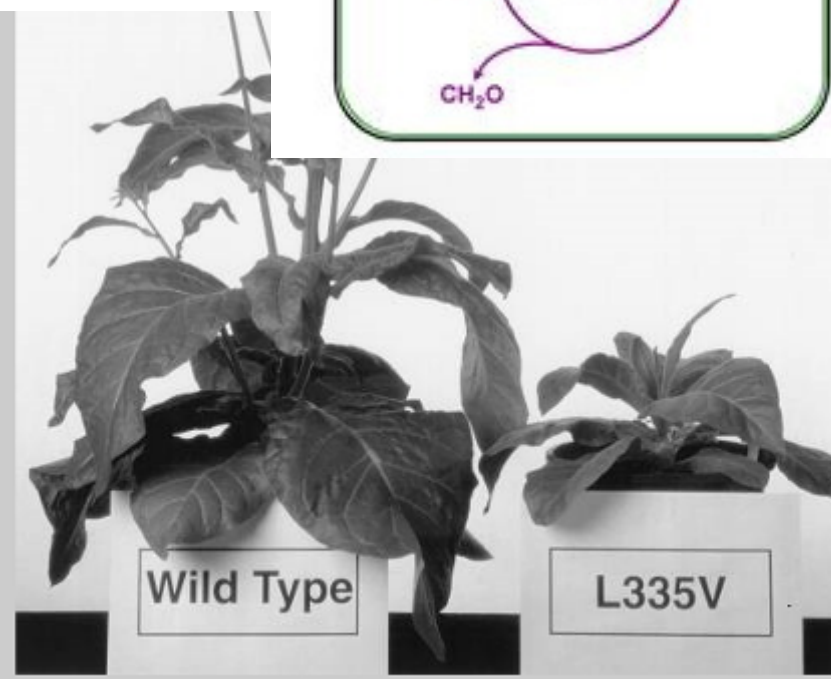
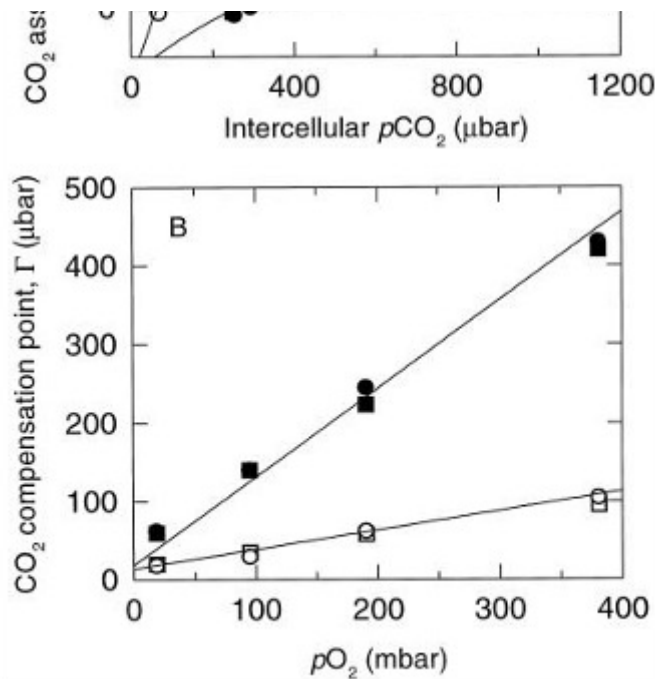
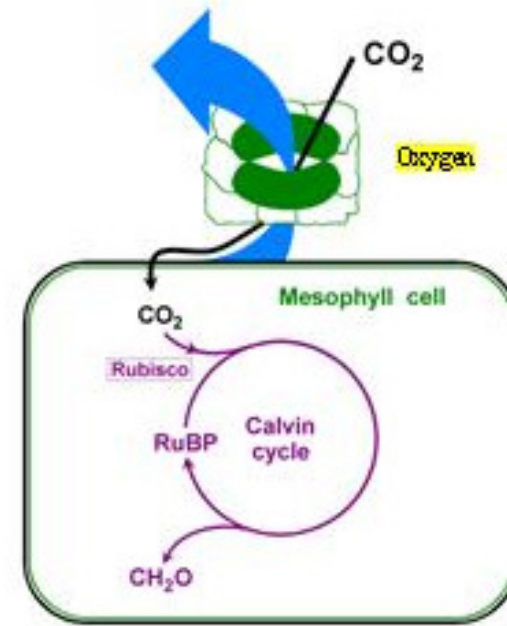
Minimized Photorespiration

Directed Mutation of the Rubisco Large Subunit Influences Photorespiration and

Spencer M. Whitney, Susanne von Caemmerer, Graham S. H.

Molecular Plant Physiology, Research School of Biological Sciences
P.O. Box 475, Canberra, Australian Capital Territory

C3 Photosynthesis: Rubisco



ข้าวในโลกอนาคตเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

ทศวรรษที่ 30

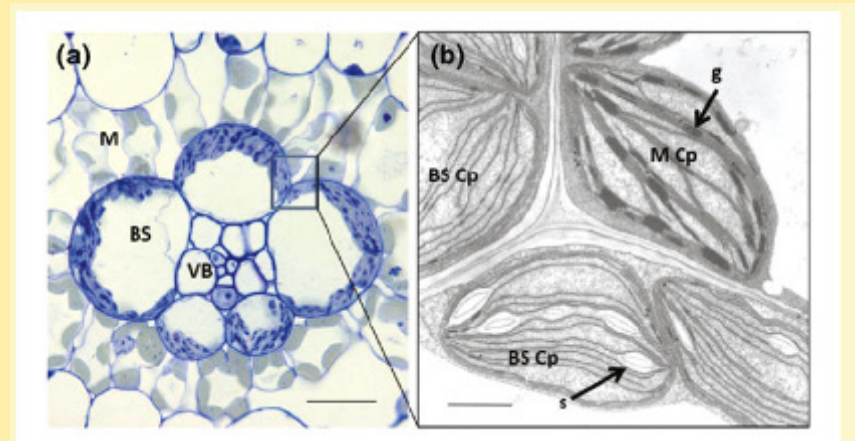
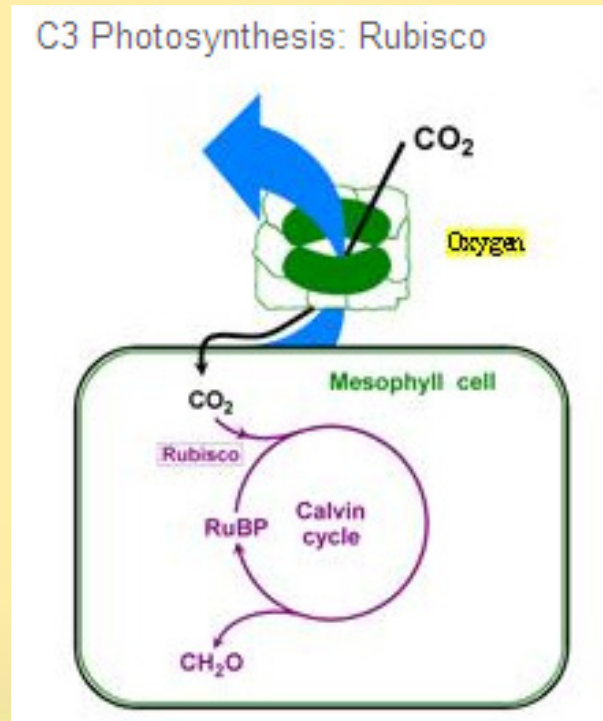
เปลี่ยนข้าวเป็น C_4 ปลุกแบบข้าวไร่บนพื้นราบ

ขึ้นน้ำเร็ว ลึกกว่า 5 เมตร และทนน้ำกร่อย

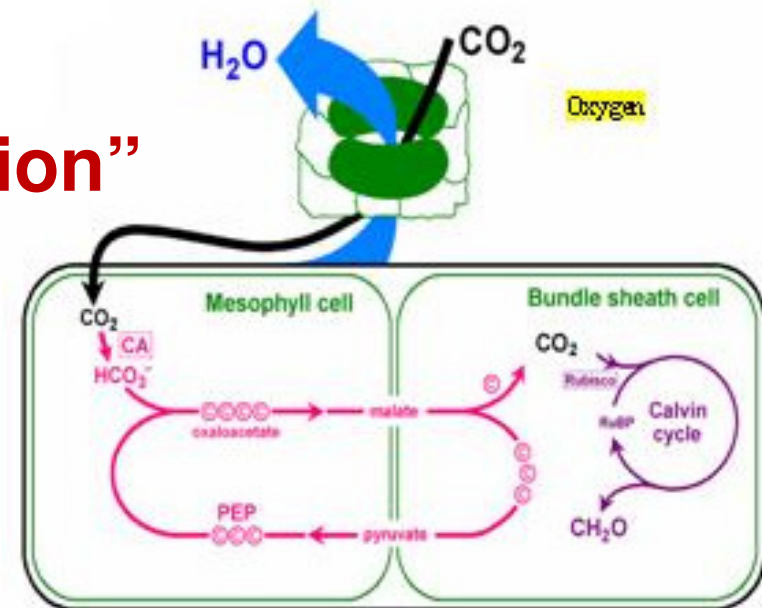
ผสมเกสรติดที่อุณหภูมิสูงสุด กว่า 42°C



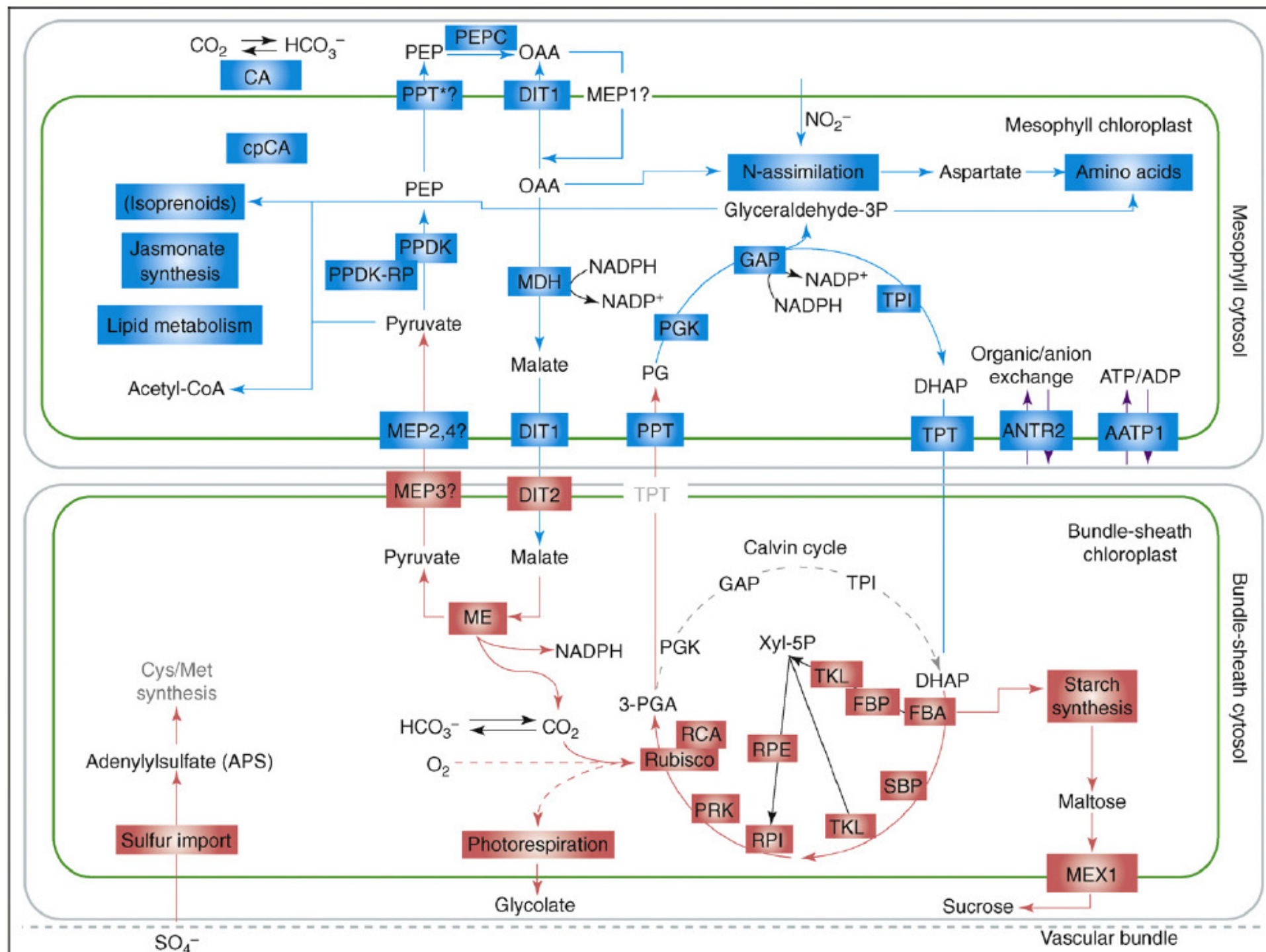
The C₄ Kranz Anatomy



C₄ Photosynthesis: PEP Carboxylase then Rubisco



“Cell-type specific expression”



Problem confronting C4 rice project

Lack of natural variation

Lack of understanding about cell- type specific expression

Lack of understanding about gene function

Limited success in chloroplast transformation

Current Topics in C4 Rice

Mutant Screening

- Screening Sorghum mutants for traits converting from C4 to C3,
- Screening rice mutants for traits converting from C3 to C4
- Screening wild rice for C4-ness traits.
- Identification of genes involved in the C4 photosynthesis pathway using a T-DNA-tagged gene activation/knock rice mutant libraries.

Cell-specific transcriptome

- Identifying transcription factors regulating genes associated with C4 photosynthesis.
- Developing a cell-specific comparative systems approach to C4 photosynthesis and leaf development
- Transcriptome analysis of C4 leaf development in maize
- Light-induced changes in the transcriptomes of mesophyll cells and bundle sheath cells in maize
- Epigenetics and transcription - diurnal and circadian regulation of C4 genes in maize
- Developmental pattern of Rubisco LSU peptide and transcript localization in two Kranz versus two single-celled C4 Chenopods
- Utilization deep sequencing methods to define the maize leaf transcriptome
- Transcriptome analysis of C3, C3-C4 and C4 Flaveria species
- Suppressing Rubisco in rice mesophyll cells and elevating the expression in bundle sheath cells.
- Developing cell-specific promoters (mesophyll or bundle sheath specific) for gene transformation.

Current Topics in C4 Rice

Molecular evolution

- The molecular evolution of carbonic anhydrase in C4 plants
- Designing C4 photosynthesis in a C3 mesophyll cell: biochemistry, diffusion and anatomy
- C4 epigenetics
- Identifying small RNAs (miRNA, siRNA) regulating genes involved in leaf anatomy (kranz anatomy) and photosynthesis.

Molecular physiology

- Measurements of intracellular refixation of respiratory CO₂ in *Oryza sativa*
- Efficiency of the CO₂-concentrating mechanism in single-cell C4 photosynthesis
- Resource use efficiency in C3, C3-C4 and C4 Panicum Grasses
- Analysis of cyclic electron transport activity in C3, C3-C4 intermediate and C4 *Flaveria*
- Reconstruction of the genetic regulatory network of photosynthesis in *Arabidopsis*
- Physiological impacts of the C4-like pathway introduced into the mesophyll cell of rice leaves

Chloroplast Transformation and Genetic Engineering

- A novel PEPC targeted to the chloroplast of rice
- *Setaria viridis* and *Brachypodium distachyon*: model systems for the genetic engineering of C4 photosynthesis traits
- Engineering C4 cycle metabolism into a C3 leaf: what do we need to change?
- Transforming C4 genes, i.e. PEPC, ME, MDH, CA, Rubisco, from C4 plants (i.e. maize) into rice.

Single-cell analysis

- Toward generation of single cell C4 *Arabidopsis* and rice plants

เกิดสภาวะน้ำกร่อยท่วมขัง ที่ลุ่มภาคกลางและทุกภาค ชายฝั่ง ไม่สามารถปลูกพืชได้



เกิดสภาวะน้ำกร่อยท่วมขัง ที่ลุ่มภาคกลางและทุกภาค ชายฝั่ง ไม่สามารถปลูกพืชได้

- ความเค็มของน้ำทะเลประมาณ 600-700 mM
- ความสามารถในการทนเค็มของข้าวทนเค็มที่ดีที่สุดคือ 150 mM ตั้งแต่อายุ 2 สัปดาห์ขึ้นไปเป็นเวลา 20 วัน
- ความสามารถในการขึ้นน้ำของข้าวขึ้นน้ำ ที่ดีที่สุด คือ 1-5 เมตร แต่ไม่ทนเค็ม ผลผลิตต่ำ คุณภาพหุงต้ม ไม่เป็นที่นิยม



การวางรากฐานเทคโนโลยีฐานด้านจีโนมิกส์ ระยะ 5 ปี

Platform Technology

5-year goal

- 1) Gene function discovery
1 gene in 1 year***
- 2) Breeding program
1 variety in 2 years***

Gene Discovery (Future technologies)

Phenomics

- Robust
- Precise
- High throughput

Material Development

- Backcross
- Recombinant Inbred line
- Chromosome segment substitution line
- Isogenic line
- New mutagenized pop
- Germplasm

Genomics

- Association mapping
- QTL SSR, SNP-based
- Real time SNP array
 - Multicolor labeling
- Next generation sequencing (SOLEXA GAI)
- Updated SFP genotyping
- New TILLING
- Automate liquid handling
- non gel-based genotyping

Transcriptomics

- Real time multiple gene expression
- Next generation sequencing tech
- Wide coverage microarray
- Micro RNA

Metabolomics Proteomics

Transformation

- RNAi
- *Arabidopsis* model

Gene Discovery

Breeding

R
i
c
e

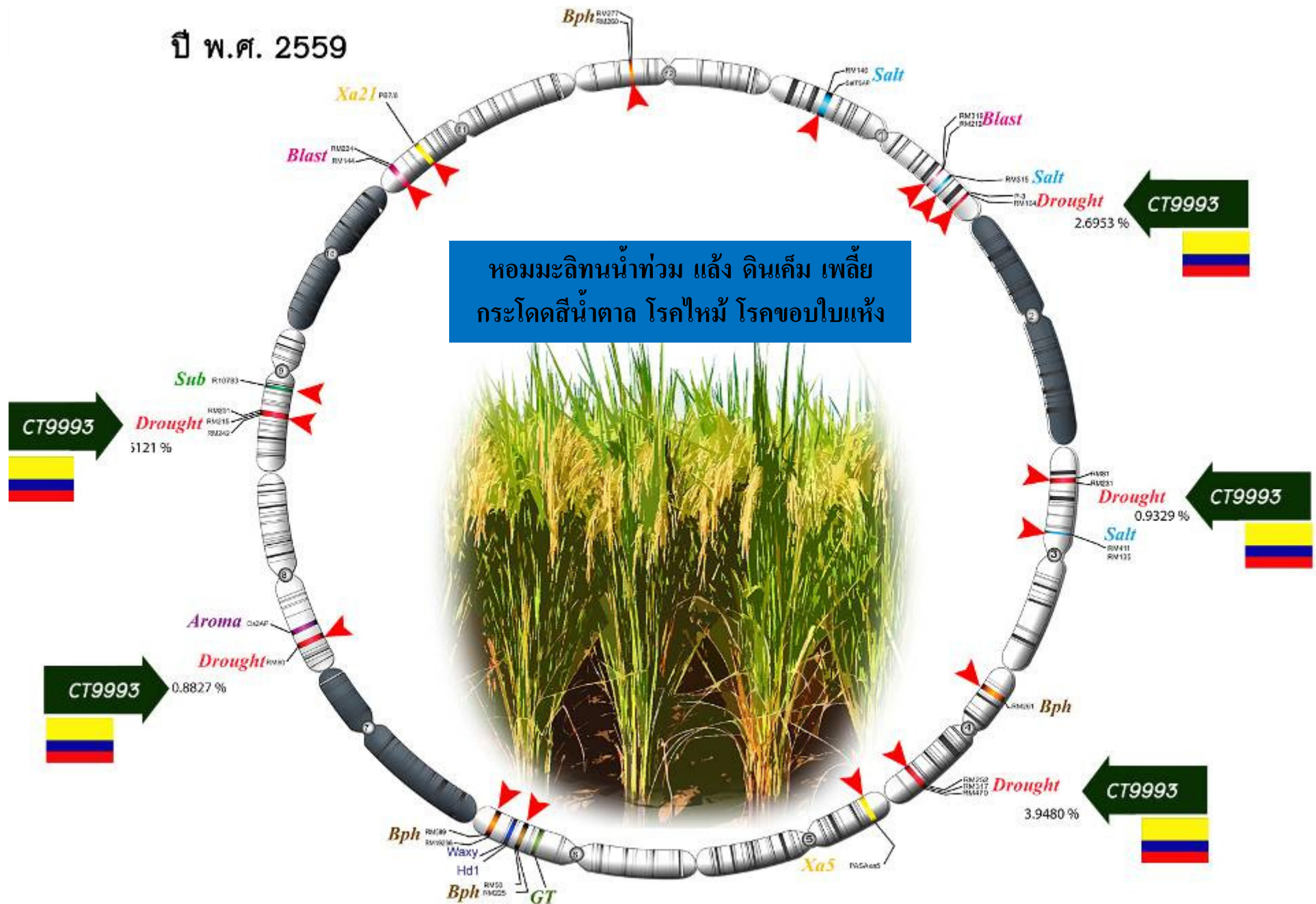
G
e
n
e

T
h
r
e
s
h
e
r

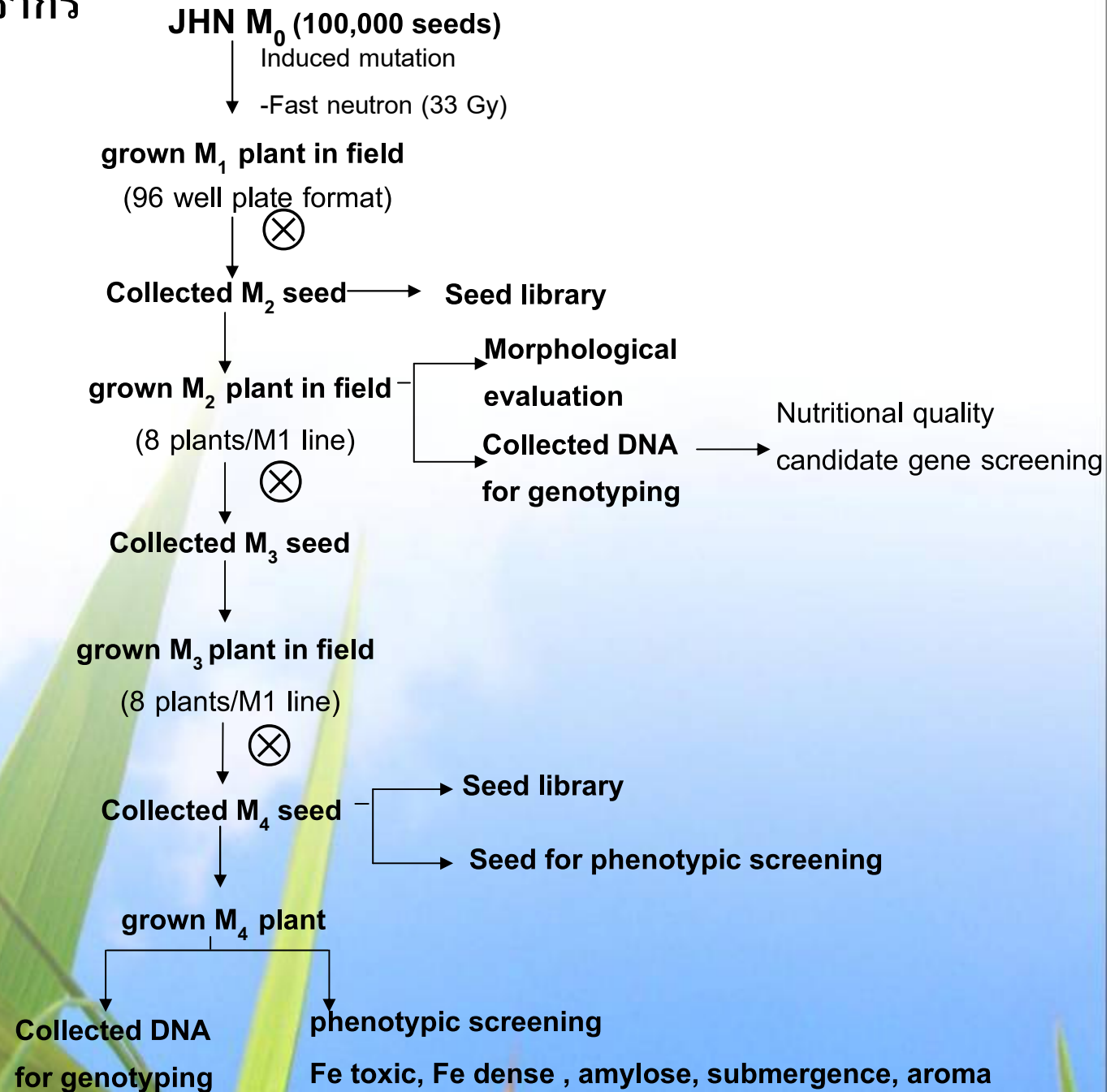
V
3



ปี พ.ศ. 2559



แผนผังการพัฒนาประชากร ข้าวกลายพันธุ์



Identification of M4 mutant population (24,000 lines for 2007-2009)

2. Forward genetic approaches

High throughput phenotypic screening

- Submergence
- Drought
- Salinity
- Iron stress
- Blast pathogen

Mutated gene mapping (SFP and AFLP)

Tolerant/ Susceptible lines
20 lines/ trait

1. Reverse genetic approaches

In silico prediction of gene function

- Identification of gene encoding ERF family
- Identification of gene associated with QTLs for biotic and abiotic stress

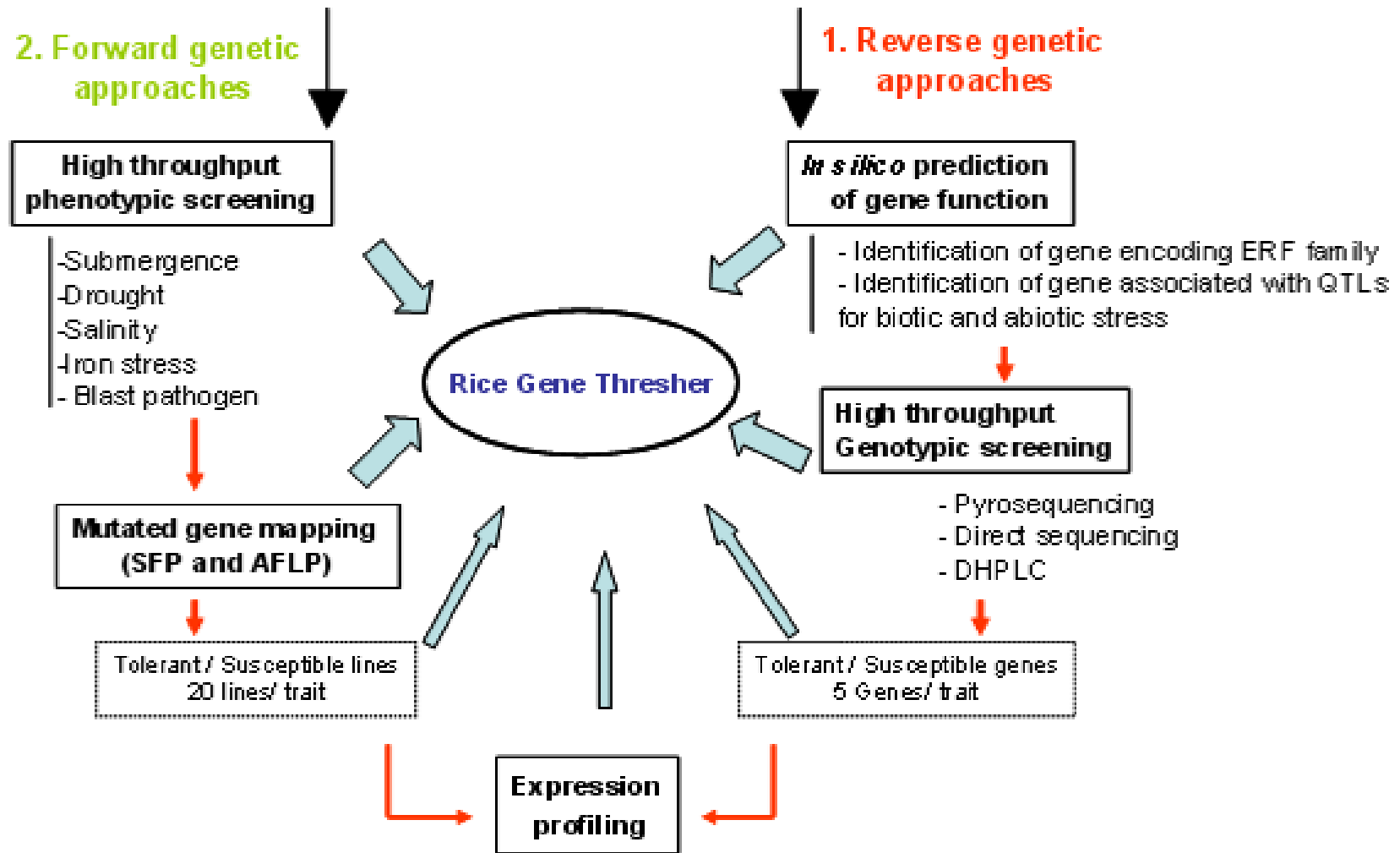
High throughput Genotypic screening

- Pyrosequencing
- Direct sequencing
- DHPLC

Tolerant/ Susceptible genes
5 Genes/ trait

Rice Gene Thresher

Expression profiling



Submergence tolerance: Sub1 locus (*Sub1A,B,C*)

Phenotypic screening

Total of plant screening : 21,072

mutant line :247

- Submergence Tolerance: 6
- Submergence supper Susceptible: 241



Before submergence



After submergence for 14 days



7 day Recovery after de-submerged

Sub1 genotypic screening

		<u>Elongation type</u>	<u>Survival</u>
JHN-WT		Middle 1.8 cm/d	No
MUT4		Rapid 2.4 cm/d	Yes
FR13A		Suppression 1.5 cm/d	Yes
KDML105		Rapid 2.6 cm/d	No



Mut4 WT

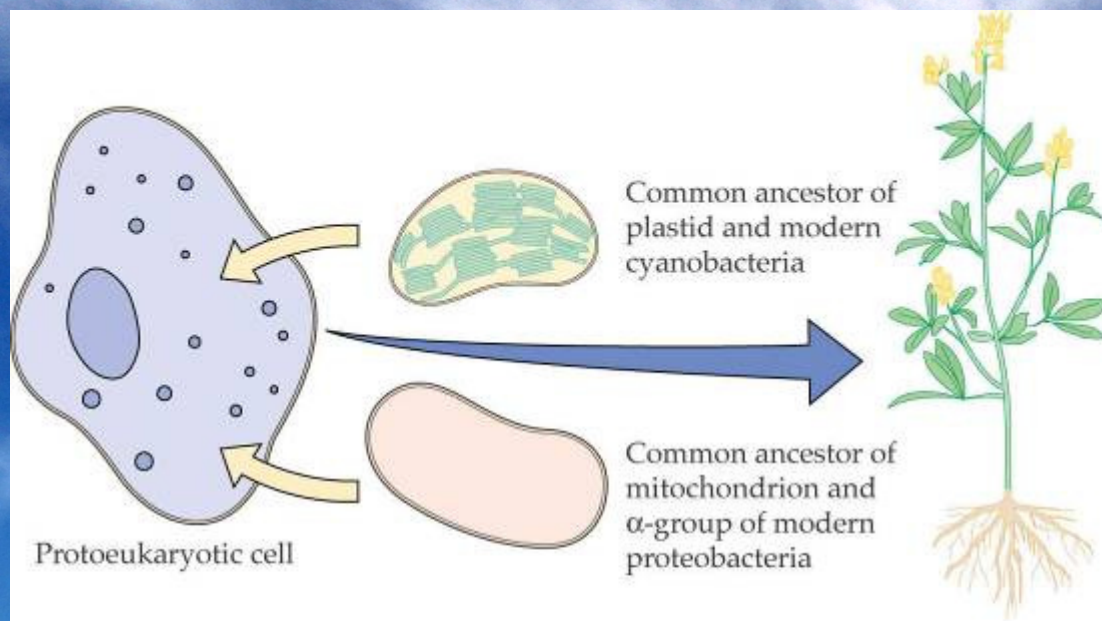
Functional Genomics for Chloroplast



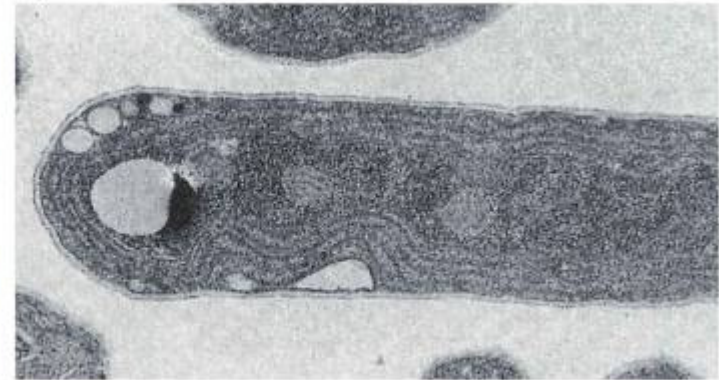
Plastome x Nucleome

Single cell photosynthetic model

Plastid Transformation



Synechococcus lividus



Rickettsiella popilliae



Endosymbiotic Theory



C.reinhardtii: Unicellular Model

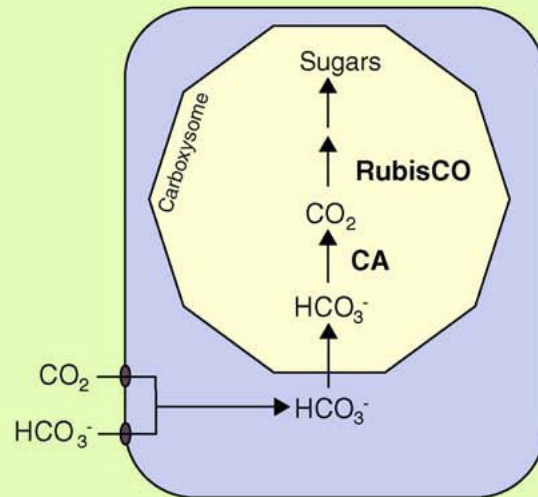
Fast-growing photosynthetic single-cell organism

Heterotrophic/Photosynthetic

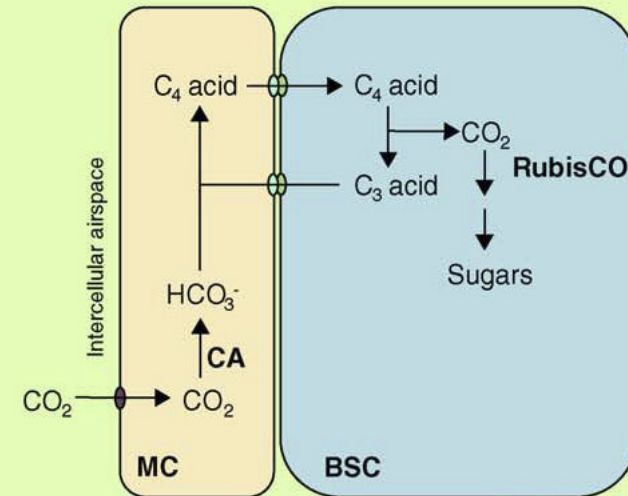
Haploid genome ideal for reverse genetics

Complete genome sequence

Cyanobacterial CCM



C₄-metabolism



Plastid transformation

high-level
transgene
expression

multi-gene
engineering

transgene
containment

lack of gene
silencing and
position effects

Plastid transformation technology to monocotyledonous cereal crops promise improvement of agronomic traits, and the efficient production of pharmaceutical or nutritional enhancement.

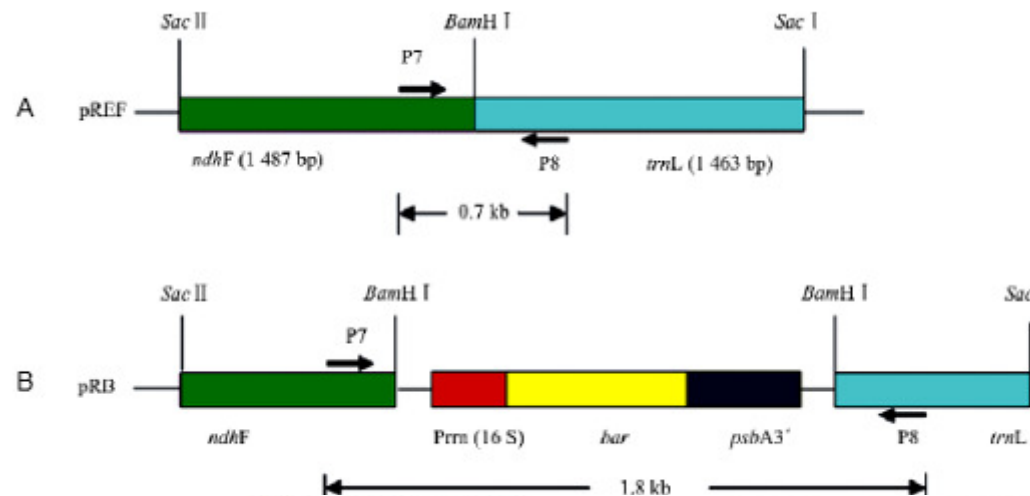
Establishment of a Gene Expression System in Rice Chloroplast and
Obtainment of PPT-Resistant Rice PlantsLI Yi-nü^{1*}, SUN Bing-yao^{2*}, SU Ning³, MENG Xiang-xun², ZHANG Zhi-fang¹ and SHEN Gui-fang¹Chloroplast transformation: *bar aene*

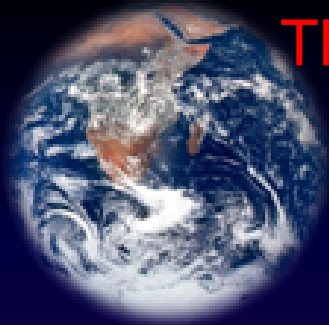
Fig. 1 Construction of chloroplast transformation vector and localization of foreign gene *bar* in the vector. A, plasmid pREF, showing the two homologous fragments, *ndhF* and *trnL*, in the wild-type rice chloroplast genome; B, plasmid pRB, showing the integration of the *bar* gene expression cassette between *ndhF* and *trnL* fragments of pREF. Gene *bar* is expressed under the control of 16S rRNA gene promoter *Prn* (16S) and *psbA* terminator sequence (*psbA* 3'). The sites of primers (P7 and P8) for PCR assay of transplastomic plants are also shown in the maps.



Fig. 5 Herbicide sensitivity assay by smearing leaves of transplastomic rice plants with PPT solution. Left, *bar*-containing transplastomic rice plants; right, non-transplastomic wild-type rice plants.

Fig. 6 Genetic analysis for resistance to PPT of F_1 progeny from reciprocal crosses between transplastomic rice lines and wild-type rice lines. Seeds were placed on PPT-supplemented medium. A, transplastomic line (σ) \times wild-type line (δ); B, transplastomic line (δ) \times wild-type line (σ).



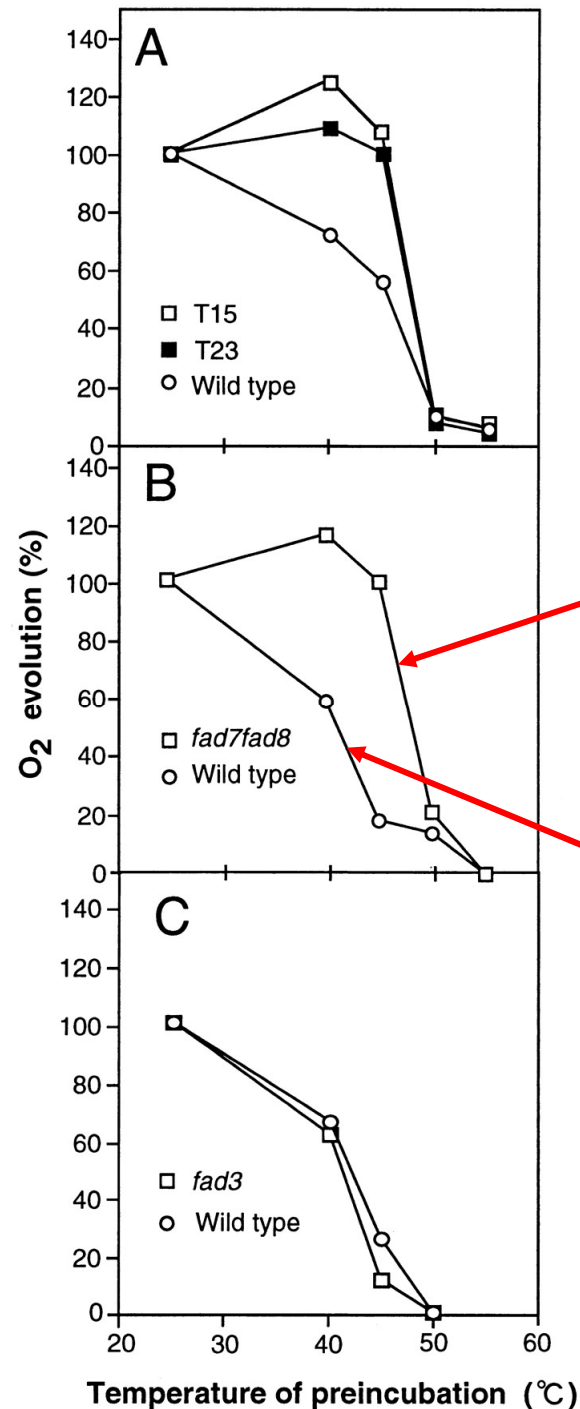


Three trials:

Importance of
fundamental
research:

Raising the
maximum
temperature of
photosynthesis

(tobacco with gene
from *Arabidopsis
thaliana*)



GMOs maintains
higher photosynthetic
rate

Wild strain



Thank You