การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรลีนในข้าว *Oryza sativa* L. พันธุ์เหลืองประทิว

นางสาวธัญญารัตน์ คงขุนเทียน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 947-17-5126-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EXPRESSION OF GENES INVOLVING IN PROLINE SYNTHESIS IN RICE *Oryza sativa* L. CULTIVAR LEUNG PRATEW

Miss Tanyarat Khongkhuntian

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Botany

Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2003
ISBN 974-17-5126-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรลีนในข้าว *Oryza sativa* L. พันธุ์เหลืองประทิว
โดย	นางสาวธัญญารัตน์ คงขุนเทียน
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ศาสตราจารย์กิตติคุณ มนทกานติ วัชราภัย

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…… ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันทน์)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

……อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ศาสตราจารย์กิตติคุณ มนทกานติ วัชราภัย)

……กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญ-หลง)

……กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์

ธัญญารัตน์ คงขุนเทียน: การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรลีนในข้าว *Oryza sativa* L. พันธุ์เหลืองประทิว (EXPRESSION OF GENES INVOLVING IN PROLINE SYNTHESIS IN RICE *Oryza sativa* L. CULTIVAR LEUNG PRATEW) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ.ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ศ.กิตติคุณ มนทกานติ วัชราภัย 103 หน้า. ISBN 974-17-5126-5

การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและปริมาณโพรลีนในข้าวสองสายพันธุ์คือ ข้าวเหลืองประทิว 123 สายพันธุ์เดิม และข้าวเหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ซึ่งได้รับการคัดเลือกจากการแปรของเซลล์ร่างกายในหลอดทดลอง ความสามารถในการทนเค็มซึ่งวัดจากการเติบโตของพืชในภาวะเค็ม พบว่ามีความแตกต่างระหว่างสองสายพันธุ์เมื่อให้ภาวะเค็มด้วย 0.5% NaCl (w/v) แก่ต้นกล้าอายุ 22 วัน ในขณะที่ต้นกล้าข้าวอายุ 15 วันของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่ได้รับภาวะเค็มมีการเติบโตไม่แตกต่างกัน เมื่อข้าวทั้งสองสายพันธุ์อยู่ในภาวะเค็มพบว่ามีการสะสมโพรลีนที่ใบในปริมาณที่สูงขึ้นกว่าต้นที่ไม่ได้รับภาวะเค็มอย่างมีนัยสำคัญ ต้นกล้าอายุ 15 วันที่ได้รับภาวะเค็มปริมาณโพรลีนในกล้าข้าวทั้งสองสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน ในทางตรงกันข้ามเมื่อให้ภาวะเค็มแก่ต้นกล้าอายุ 22 วันเป็นเวลา 2-4 สัปดาห์ สายพันธุ์ทนเค็มจะมีปริมาณโพรลีนต่ำกว่าสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าโพรลีนอาจไม่ได้มีบทบาทสำคัญต่อความสามารถในการทนเค็มของข้าวสายพันธุ์นี้ เมื่อทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน *P5CS* โดยใช้ วิธี PCR พบว่าสามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2000 เบส จากการศึกษาลำดับเบสของโคลน(P5CS_2KB_no.27) พบว่ามีบางส่วนคล้ายคลึงกับลำดับเบสของ *P5CS1* mRNA ในข้าว เมื่อใช้ชิ้นส่วนของยีน *P5CS* ที่โคลนได้เป็น probe เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* พบว่าในต้นข้าวทั้งสองสายพันธุ์เมื่อได้รับภาวะเค็มปริมาณ *P5CS* mRNAมีมากขึ้น โดยพบสัญญาณการแสดงออกของ mRNA ที่คาดว่าเป็นของ *P5CS* จำนวน 1 สัญญาณในต้นข้าวอายุ 15 วัน ในขณะที่พบสัญญาณการแสดงออกของ mRNA ที่คาดว่าเป็นของ *P5CS* จำนวน 3 สัญญาณในต้นข้าวอายุ 22 วัน อย่างไรก็ตามการศึกษาการแสดงออกของยีน *OAT* โดยใช้ probe *OAT* cDNA จาก mothbean ไม่พบสัญญาณ mRNA อาจเป็นไปได้ว่ายีน *OAT* ในข้าวและ mothbean มีความแตกต่างกันมากเกินไปหรือการแสดงออกของยีน *OAT* มีระดับต่ำจนไม่สามารถตรวจสอบได้

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....พฤกษศาสตร์.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2546.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ABSTRACT

4372285823: MAJOR BOTANY

KEY WORD: RICE/ *Oryza sativa* L. / Δ^1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene/ PROLINE

TANYARAT KHOGNKHUNTIAN: EXPRESSION OF GENES INVOLVING IN PROLINE SYNTHESIS IN RICE *Oryza sativa* L. CULTIVAR LEUNG PRATEW. THESIS ADVISOR: ASST.PROF. SUPACHITRA CHADCHAWAN, Ph.D., THESIS COADVISOR: PROF.MONTAKAN VAJRABHAYA, 103 pp. ISBN 974-17-5126-5

Growth and leaf proline content during salt-stress condition were compared between two rice lines, the salt-sensitive, original LEUNG PRATEW 123 (LPT123) and the salt-tolerant line, LEUNG PRATEW 123-TC171 selected from somaclonal variation of the original LEUNG PRATEW 123 *in vitro*. The salt-tolerant ability, determined by plant growth during the stress period, could be distinguished between the two when 22-day-old seedlings were treated with 0.5% NaCl (w/v), but the difference in growth could not be detected when 15-day-old seedlings were grown under salinity stress. When treated with salt-stress, both rice lines showed the significantly higher level of leaf proline content, compared to the non-stressed plants. The 15-day-old seedlings of both lines had similar proline content. On the contrary, when 22-day-old seedlings were grown under salt-stressed condition for 2-4 weeks, the proline content of the tolerant line was significantly lower than that of the sensitive one. These suggest that proline may not play the major role in salt tolerance in these rice lines. When a part of the *P5CS* gene was amplified by PCR, a DNA fragment of about 2000 bp was obtained. The DNA fragment (P5CS_2KB_no.27) was clone and sequenced. It was found to be similar to the *P5CS1* mRNA of rice. Then it was used as a probe to detect the expression of the *P5CS* gene. The northern blot hybridization showed that *P5CS* mRNA was up-regulated in both rice lines under salt-stress condition. One putative *P5CS* mRNA expression was detected in 15-day-old rice seedlings, while three putative *P5CS* mRNA expressions were detected in 22-day-old plants. However, when using mothbean *OAT* cDNA as a probe, there was no detectable level of mRNA. It was suggested that either the *OAT* expression, or the homology between rice and mothbean *OAT* genes, was too low.

Department.....Botany..... Student's Signature…….

Field of study.....Botany.....Advisor's Signature……..…….

Academic year……2003……Co-advisor's Signature ……..

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาและให้คำแนะนำต่างๆ ตลอดการทำวิจัย และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์กิตติคุณ มนทกานติ วัชราภัย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำและความช่วยเหลือต่างๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์นันทนา อังกินันทน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญ-หลง และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดการทำวิจัยและแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล ที่กรุณาออกแบบ primer ที่ใช้ในการวิจัย และ Professor Desh Pal S. Verma, Ohiostate university USA ที่เอื้อเฟื้อ probe (cDNA *OAT* จาก *Vigna aconitifolia*)

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ธีรพร บุศยอังกูร สถาบันวิจัยข้าวปทุมธานี สถาบันวิจัยข้าวบางเขน และสถาบันวิจัยข้าวราชบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123

ขอขอบคุณทุนทบวงมหาวิทยาลัยและทุนรัชดาภิเษกสมโภชที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ในระดับปริญญาโท-เอก และทุนพัฒนาอาจารย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตสารสนเทศ ที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษาและวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณฐปนา อัครเอกปัญญา คุณสหัช จันทนาอรพินท์ สำหรับความช่วยเหลือในการทำวิจัย คำแนะนำตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณณภัศศรณ์ ปัญญาสุข คุณศักดิ์ชัย กรรมารางกูร คุณชัชวาล วงศ์ชัย และทุกท่านในภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือตลอดงานวิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ฌ
สารบัญรูปภาพ..... ฏ
บทที่
1. บทนำ..... 1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4
ความหมายของดินเค็ม..... 4
อิทธิพลของความเค็มต่อการเจริญและผลผลิตของพืช..... 4
การปรับปรุงพันธุ์พืชทนเค็ม..... 6
กลไกการทนเค็มของพืช..... 7
กระบวนการสังเคราะห์โพรลีน..... 9
กระบวนการสลายโพรลีน.....11
การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรลีนในพืชชั้นสูง เมื่อได้รับภาวะเค็ม.....11
3. วิธีดำเนินงานวิจัย.....13
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....13
วิธีดำเนินการวิจัย.....18
4. ผลการทดลอง.....31
1. การศึกษาอัตรารอดตายของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123)และสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 ในภาวะเค็ม..... 31
2. การเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง เหลือง ประทิว 123-TC171 รุ่นที่ 6 ในภาวะเค็ม.....33

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3. ปริมาณโพรลีนในใบของข้าว LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 ในภาวะเค็ม.....48
4. การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ amplified ขึ้นด้วย primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *P5CS*.....52
5. การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ amplified ขึ้นด้วย primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *OAT*.....54
6. การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด RNA จากต้นข้าว.....62
7. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรลีนในข้าวพันธุ์เหลืองประทิวและสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง เหลืองประทิว 123-TC171 รุ่นที่ 6 ในภาวะเค็ม ด้วยวิธี Northern Blot Analysis.....64

5. อภิปรายผล 68
6. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....76

รายการอ้างอิง.....80

ภาคผนวก ก.....87

ภาคผนวก ข.....91

ภาคผนวก ค.....95

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 102

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1 อัตรารอดตายของต้นข้าวLPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0% 0.3% และ 0.5%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 32

2 น้ำหนักสดของต้นข้าวLPT123 และ LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 34

3 น้ำหนักแห้งของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 33

4 น้ำหนักสดของรากข้าวLPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 37

5 น้ำหนักแห้งของรากข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 38

6 พื้นที่ใบของต้นข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 39

7 น้ำหนักสดของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 41

8 น้ำหนักแห้งของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 42

สารบัญตาราง(ต่อ)

หน้า

ตารางที่

9 น้ำหนักสดของรากข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 44

10 น้ำหนักแห้งของรากข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 45

11 พื้นที่ใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 47

12 ปริมาณโพรลีนในใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 49

13 ปริมาณโพรลีนในใบของต้นข้าวLPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 51

14 ตารางแสดงความคล้ายคลึงลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสของ P5CS_500_no.7.....54

15 ตารางแสดงความคล้ายคลึงลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสของ P5CS_2KB_no.27.....55

16 ตารางแสดงความคล้ายคลึงลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสของ OAT_500no.1_BW1.....58

17 ตารางแสดงความคล้ายคลึงลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสของ OAT_800_w1.....59

18 ตารางแสดงความคล้ายคลึงลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสของ OAT_1.2_w4.....60

19 ตารางแสดงความคล้ายคลึงลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสของ OAT_2.5_w1.....61

สารบัญตาราง(ต่อ)

หน้า

ตารางที่

20 แสดงปริมาณRNA ที่ได้จากต้นและรากของข้าวน้ำหนัก 1 กรัมเมื่อใช้วิธีการสกัด RNA 3 วิธี…… . ..…… 63

21 อัตราส่วนของ OD_{260}/OD_{280} จากเนื้อเยื่อข้าวที่ใช้วิธีการสกัด RNA 3 วิธี..... 63

22 สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP no.2……...88

23 ส่วนประกอบสารละลายที่ใช้ในการทดลอง.....89

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่

1 ปฏิกิริยาการสร้างโพรลีนจาก glutamic acid……..…….…….…… 9
2 ปฏิกิริยาการสร้างโพรลีนจาก ornithine……..……...10
3 น้ำหนักสดของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์……..…… 34
4 น้ำหนักแห้งของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์……..…….. 35
5 น้ำหนักสดของรากข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์……..…… 37
6 น้ำหนักแห้งของรากข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171) รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์…….. 38
7 พื้นที่ใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171)รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกใน สารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 39
8 น้ำหนักสดของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์……..…… 41
9 น้ำหนักแห้งของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์……..…… 42
10 น้ำหนักสดของรากข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์……..…….. 44

สารบัญรูปภาพ(ต่อ)

หน้า

ภาพที่

11 น้ำหนักแห้งของรากข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 45

12 พื้นที่ใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกใน สารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 47

13 ปริมาณโพรลีนในใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 49

14 ปริมาณโพรลีนในใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 51

15 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนของ *P5CS* gene 52

16 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนของ *OAT* gene ที่แปรความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 3 ความเข้มข้น..... 56

17 Northern Blot Analysis ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123 – TC171) เมื่อได้รับภาวะเค็ม 0.3 % NaCl (w/v) โดยใช้โคลน P5CS_2KB_no.27 เป็น probe..... 65

18 Northern Blot Analysis ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123 – TC171) เมื่อได้รับภาวะเค็ม 0.5 % NaCl (w/v) โดยใช้โคลน P5CS_2KB_no.27 เป็น probe..... 66

19 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโพรลีน 93

20 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาขนาดของ RNA ladder.....93

21 ลักษณะต้นข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วันปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0% และ 0.3%(w/v) เป็นเวลา 3 สัปดาห์.....94

บทที่ 1

บทนำ

ดินเค็มเป็นปัญหาหนึ่งในการเพาะปลูก เนื่องจากมีปริมาณเกลือที่ละลายอยู่มากเกินไป จนเป็นอันตรายต่อการเจริญของพืช ทำให้ผลผลิตลดลงมาก ภาวะเค็มในดินไปรบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืชทั้งในระดับเซลล์และระดับต้น ทำให้กระบวนการการสังเคราะห์แสงลดลง รวมทั้งขบวนการอื่นๆ ก็อาจลดลงด้วย เช่น การตรึงไนโตรเจน ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนภาวะเค็มจึงเป็นเป้าหมายที่กำลังได้รับความสนใจในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด ถั่วเหลือง (Taiz and Zeiger,1998) ความเค็มส่งผลต่อพืชในแง่ของผลกระทบที่เกิดจาก osmotic potential ซึ่งในดินเค็มจะมีค่าต่ำกว่าภายในเซลล์พืชทำให้รากพืชไม่สามารถดูดซึมน้ำในดินได้ ทำให้เกิดภาวะเครียดเนื่องจากการขาดน้ำภายในเซลล์พืช และยังเกิดผลกระทบจากการเพิ่มขึ้นของไอออนบางชนิดภายในเซลล์ โดยเฉพาะ Na^+ และ Cl^- โดย Na^+ และ Cl^- เมื่อมีความเข้มข้นสูงขึ้นในคลอโรพลาสต์ จะมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ด้วยแสง (Taiz and Zeiger,1998) ขณะเดียวกันการสะสมของ K^+ , Ca^{2+}, NO_3^- และ P_i จะลดลง (Lutts *et al*., 1996; Cramer *et al*. 1991) พืชหลายชนิดมีการปรับค่า osmotic potential ภายในเพื่อป้องกันการสูญเสียแรงดันเต่งของเซลล์ โดยมีสองกระบวนการใหญ่ๆ คือ การเก็บไอออนต่างๆ ไว้ใน vacuole (Flowers *et al*.,1997) และการสะสมสารที่ละลายน้ำบางอย่างไว้ใน cytosol เช่น glycine betaine proline และ sorbitol เป็นต้น พืชแต่ละชนิดก็จะมีการสะสมสารชนิดต่างๆ กันไป โดยอาจจะสะสมเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดก็ได้ (Taiz and Zeiger,1998) สารที่ได้รับการศึกษาเป็นอย่างมากได้แก่ โพรลีน(proline) ซึ่งมีรายงานในพืชหลายชนิด เช่น ข้าวโพด(Rodriguez *et al*.,1997) Barley (Stewart and Boggess,1978) Arabidopsis (Strizhov *et al*.,1997) และข้าว (Lutts *et al*.,1996) การสะสมโพรลีน (proline) เป็นกระบวนการที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นกระบวนการสำคัญกระบวนการหนึ่งที่เกิดขึ้นในพืชเมื่อได้รับความเครียดที่เกิดจากภาวะเค็มและแล้ง (Strizhov *et al*.,1997)

ในพืชได้มีการเสนอกระบวนการสังเคราะห์โพรลีน 2 กระบวนการคือ การสังเคราะห์โพรลีนโดยมี glutamic acid เป็นสารตั้งต้น และการสังเคราะห์โดยมี ornithine เป็นสารตั้งต้น (Delaney and Verma, 1993) ซึ่งทั้งสองกระบวนการนั้นจะมี Key enzyme ที่ใช้แตกต่างกัน กล่าวคือ เมื่อสารตั้งต้นเป็น glutamic acid จะใช้เอนไซม์ Δ^1-pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS) ซึ่งเอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน glutamatic acid ไปเป็น glutamyl-γ-

semialdehyde และเกิดการ dehydration เปลี่ยนเป็น Δ^1-pyrroline-5-carboxylate (P5C) โดยไม่ต้องใช้เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยา (Delaney and Verma, 1993) และเมื่อสารตั้งต้นเป็น ornithine โดยทั่วไปอาศัยเอนไซม์ที่ชื่อ ornithine-δ-aminotransferase (OAT) เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน ornithine ได้ผลผลิตคือ Δ^1-pyrroline-5-carboxylate (P5C) เช่นกัน จากนั้น Δ^1-pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) จะเข้ามาทำปฏิกิริยาเปลี่ยน Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate เป็นโพรลีน (Mestichelli *et al*., 1979; Hanson and Hitz, 1982)

การศึกษาโดยใช้^{14}C-labeled precursors (Morris *et al*., 1969; Oaks et al, 1970; Boggess *et al*., 1976b), ^{13}C-glutamate (Heyser *et al*., 1989ab) และ^{15}N (Rhodes *et al*., 1986) ต่างชี้ให้เห็นว่าเมื่อได้รับ osmotic stress การสังเคราะห์โพรลีนที่ถูกชักนำจากภาวะเครียดจะใช้ glutamic acid เพื่อเปลี่ยนเป็นโพรลีนเป็นหลัก

การศึกษาด้วย Northern Blot Analysis ใน *Vigna* sp. พบว่าภาวะเค็มชักนำให้ยีน *P5CS* มีการแสดงออกในใบสูงกว่ารากมาก (Hu *et al*., 1992) ในการศึกษาในพืชชนิดอื่น เมื่อให้ภาวะแห้ง (desiccation) ภาวะเค็ม และ ABA ใน Arabidopsis พบว่ามีปริมาณการแสดงออกของ *P5CS* อย่างมากทั้งใบและราก (Yoshiba *et al*., 1995) ในภาวะเค็มและแล้ง Strizhov และคณะ (1997) พบว่าการสะสมโพรลีนอันเนื่องจากภาวะเครียดทั้งสองเกิดจากการเพิ่มปริมาณของ mRNA ของ *P5CS* gene

ในกรณีการศึกษาถึงการแสดงออกของยีน *OAT* Delauney และคณะ (1993) รายงานว่ามีการแสดงออกของยีน *OAT* ลดลงในภาวะเค็ม แต่รายงานการศึกษาของ Roosen และคณะ (1998) พบว่าเมื่อต้นพืชมีอายุน้อย การแสดงออกของยีน *OAT* จะถูกชักนำให้มีการแสดงออกมากขึ้นเช่นเดียวกับยีน *P5CS* เมื่ออยู่ในภาวะเค็ม อย่างไรก็ตามหากพืชมีอายุมากขึ้นพบว่าปริมาณ mRNA ของ *OAT* gene และประสิทธิภาพของเอนไซม์ OAT จะลดลงเมื่ออยู่ใต้ภาวะเค็มเช่นเดียวกับรายงานของ Delauney และคณะ (1993)

ในข้าวนั้นมีรายงานว่าภาวะเค็มมีผลทำให้ข้าวมีการสะสมโพรลีนมากขึ้นซึ่งเป็นลักษณะอาการที่พืชได้รับความเสียหายจากภาวะเค็มมากกว่าที่จะเป็นตัวบ่งชี้ว่าพืชนั้นต้านทานต่อความเค็ม และโดยส่วนใหญ่พบว่าข้าวพันธุ์ที่ต้านทานต่อภาวะเค็มมีการสะสมปริมาณโพรลีนที่ต่ำกว่าข้าวพันธุ์ที่ไวต่อความเค็ม (Lutts *et al*., 1996) แต่ก็มีรายงานที่ขัดแย้งว่าข้าวบางพันธุ์ที่มีลักษณะต้านทานความเค็มมีการสะสมโพรลีนมากกว่าพันธุ์ที่ไวต่อความเค็มเช่นกัน (Igarashi *et al*., 1997)

การศึกษาการสะสมโพรลีนและการแสดงออกของยีน *P5CS* ในใบข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม (เหลืองประทิว 123-TC171) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เกิดจาก somaclonal variation ระหว่างการเลี้ยง

เนื้อเยื่อ (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) ในภาวะเค็ม พบว่าสายพันธุ์ทนเค็มมีความสามารถในการสะสมโพรลีนได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิม แต่เมื่อศึกษาในระดับการแสดงออกของยีน *P5CS* ด้วย northern blot analysis พบว่าไม่สามารถตรวจสอบได้ ซึ่งผู้วิจัยได้เสนอแนะว่าเกิดเนื่องจากเทคนิคและวิธีการในการสกัด RNA ยังไม่มีประสิทธิภาพ หรือการเตรียม probe ที่ไม่มีประสิทธิภาพ (ธนะกาญจน์ มัญชุพานี, 2543) การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรลีนด้วยวิธีการใหม่ที่เหมาะสมขึ้น เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* และ *OAT* ซึ่ง Delauney และ Verma (1993) รายงานว่าเป็น key enzymes ในกระบวนการสังเคราะห์โพรลีน ตลอดจนการเชื่อมโยงระหว่างการแสดงออกของยีนทั้งสองกับการเจริญเติบโตและการตอบสนองโดยการสะสมโพรลีนในใบของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123-TC171 เมื่อได้รับภาวะเค็ม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโต การสะสมโพรลีน และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรลีนในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม เหลืองประทิว123-TC171 กับสายพันธุ์เดิม เหลืองประทิว 123 เมื่อข้าวได้รับภาวะเค็ม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

สำรวจเอกสาร

1. ความหมายของดินเค็ม

ดินเค็มหมายถึงดินที่มีเกลือที่ละลายน้ำได้อยู่ในปริมาณที่มากเกินไปจนเป็นอันตรายต่อพืช ทำให้การเจริญและผลผลิตลดลงอย่างเด่นชัด ความเค็มของดินวัดเป็นหน่วยของค่าการนำไฟฟ้า(electrical conductivity, EC) ของสารละลายดินที่แยกจากดินซึ่งอิ่มตัวด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หากมีค่าสูงกว่า 2 มิลลิโมห์ต่อเซนติเมตร(mmho/cm) หรือ 2 เดซิซีเมนต่อเมตร (d S/m) จัดว่าเป็นดินเค็ม (อรุณี ยูวะนิยม, 2531) ค่าการนำไฟฟ้านี้นอกจากจะผันแปรตามปริมาณเกลือที่ละลายอยู่แล้ว ยังขึ้นกับอุณหภูมิขณะทำการวัดด้วย ค่ามาตรฐานจะวัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยค่าการนำไฟฟ้าจะเพิ่มขึ้นประมาณ 2% ต่อ องศาเซลเซียสที่เพิ่มขึ้น เกลือส่วนใหญ่ที่พบในดินเค็มเป็นไอออนของ คลอไรด์ (Cl^-) ซัลเฟต (SO_4^{2-}) ไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) โซเดียม (Na^+) แคลเซียม(Ca^{2+}) หรือ แมกนีเซียม (Mg^{2+}) แต่ไอออนที่พบมากและมีผลต่อการเจริญและผลผลิตของพืชมากกว่าไอออนชนิดอื่นๆ คือ Na^+ และ Cl^- (Bernstein, 1964) ในประเทศไทย ดินเค็มแบ่งเป็น 3 พื้นที่ใหญ่ คือ ดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ดินเค็มในภาคกลางและ ดินเค็มชายทะเล องค์ประกอบเกลือในดินเค็มบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) คล้ายคลึงกับดินเค็มชายทะเล ต่างกันคือดินเค็มชายทะเลมีแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) และแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) มากกว่าดินเค็มทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย ส่วนชนิดของเกลือในดินเค็มภาคกลางมีหลายรูปมีหลายแห่งที่ไม่ใช่เกลือโซเดียมคลอไรด์แต่มักจะพบอยู่ในรูปของเกลือซัลเฟต คลอไรด์ ไบคาร์บอเนต หรือ คาร์บอเนตของแมกนีเซียม แคลเซียม และโซเดียม (อรุณี ยูวะนิยม, 2531)

2.อิทธิพลของความเค็มต่อการเจริญและผลผลิตของพืช

โดยทั่วไปเมื่อสารละลายที่มีค่า EC ตั้งแต่ 0-2 มิลลิโมห์ต่อเซนติเมตรนั้น ไม่มีผลต่อการเจริญของพืชทุกชนิด แต่ค่า EC ที่สูงกว่านี้จะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชชนิดต่างๆ ขึ้นกับความสามารถในการทนเค็มของพืชนั้นๆ ตัวอย่างเช่น ค่า EC ของสารละลายที่จะทำให้ถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ข้าวโพด (*Zea may*) ข้าว (*Oryza sativa L.*) มะเขือเทศ (*Lycopersicum esculentum*) ฝ้าย (*Gossypium hervaceum*) และ ชะคราม (*Suaeda maritima*) มีผลผลิตลดลงประมาณ 50% อยู่ที่ค่า EC 4 6 7 10 12 และ 30 มิลลิโมห์ต่อ

เซนติเมตร ตามลำดับ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2527) รวมทั้งพืชแต่ละชนิดจะตอบสนองต่อความเค็มในแต่ละช่วงอายุต่างกันด้วย โดยข้าวจะมีความอ่อนแอต่อความเค็ม 2 ระยะ คือ ระยะกล้าอ่อนที่มีใบ 2-5 ใบ และระยะออกดอกและผสมเกสร (Pearson *et al*., 1966) อาการที่ข้าวตอบสนองต่อภาวะเค็มที่เกิดจาก NaCl จะแสดงที่ใบแก่ก่อนโดยขอบใบและปลายใบมีอาการไหม้ ขณะที่ใบอ่อนแสดงอาการเพียงเล็กน้อย ต่อมาอาการใบไหม้จะลุกลามจนถึงเส้นกลางใบทำให้ใบข้าวแห้งตาย (Kaddah and Fakhry, 1961)

เมื่อพืชได้รับเกลือมากกว่าระดับปกติ จะตอบสนองคล้ายกับการขาดน้ำ คือ มีการเจริญลดลง พบอาการใบไหม้ ขนาดและจำนวนใบลดลง ส่งผลให้ผลผลิตของพืชลดลงด้วย ซึ่งเกิดจากสาเหตุหลัก 3 ประการคือ พืชดูดน้ำได้น้อยลงเนื่องจากเกิด osmotic stress, พืชขาดธาตุอาหารบางชนิด (nutrient deficiency stress) และ เกิดจากความเป็นพิษเนื่องจากไอออนบางชนิดที่พืชดูดสะสม (toxic effect of specific ion) (Stavarek and Rains, 1984) การตอบสนองของพืชจะมากน้อยขึ้นอยู่กับความสามารถในทนเค็มของพืชนั้นๆ

พืชดูดน้ำได้น้อยลงเนื่องจากเกิด osmotic stress นั้นเกิดจากเกลือที่สะสมในดิน ถ้ายิ่งมีปริมาณมากยิ่งมีผลทำให้ water potential ของสารละลายในดินต่ำลง ทำให้ water potential gradient ระหว่างดินและเซลล์พืชน้อยลง ความสามารถในการดึงน้ำเข้าเซลล์ของพืชลดลง เกิดภาวะ plasmolysis ซึ่งพืชจะแสดงอาการขาดน้ำโดยใบจะเหี่ยว และเมื่อขาดน้ำอย่างรุนแรงพืชจะตาย(Bernstein, 1964)

ภาวะเค็มทำให้พืชมีอาการขาดธาตุบางชนิด เมื่อ water potential ในดินต่ำ เนื่องจากเกลือที่สะสมในดิน ในกรณีพืชที่ต้านทานความเค็มได้ในระดับหนึ่ง พืชจะปรับค่าออสโมติกของรากให้ต่ำกว่าสารละลายดินได้ การปรับค่าออสโมติกของพืชอาจจะทำได้โดยการดูดเกลือเข้าไปสะสมไว้ในเซลล์หรือ organelle (Flowers *et al*., 1977; Greenway and Munns, 1980)เพื่อให้สามารถนำน้ำเข้าไปใช้ได้ เมื่อ Na^+ และ Cl^- เพิ่มขึ้นในใบและลำต้น พบว่าการสะสม K^+ , Ca^{2+}, NO_3^-และ P_i ลดลง (Lutts *et al*., 1996; Cramer *et al*. 1991) ซึ่งส่งผลให้พืชแสดงอาการขาดธาตุได้

ความเป็นพิษที่เกิดจากไอออนบางชนิด เป็นผลเนื่องจากการดูดสะสมไอออนที่เป็นพิษส่วนใหญ่เกิดจากความเป็นพิษของโซเดียมและคลอไรด์ไอออน ซึ่งทำให้เกิดอาการใบไหม้ Na^+ และ Cl^- ที่มากเกินไปจะทำลายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน ทำให้โปรตีนเสียสภาพและเร่งการเกิด senescence และ necrosis (Neumann, 1997)

3.การปรับปรุงพันธุ์พืชทนเค็ม

การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้สามารถปลูกในพื้นที่ปลูกที่ไม่เหมาะสมนั้นเริ่มมีการศึกษามานานแล้ว โดยระยะแรกจะเป็นการปรับปรุงและคัดเลือกพืชในแปลงทดลอง การคัดเลือกพืชทนเค็มนั้นกระทำสำเร็จเป็นครั้งแรกในประเทศศรีลังกา โดยได้ข้าวพันธุ์ทนเค็ม Pokkali และการคัดเลือกพันธุ์ข้าวทนเค็มอื่นๆ ในศรีลังกามีรายงานในปี 1943 ได้พันธุ์ข้าว Vala Rata 1-24 และ Bhura Rata 4-10 (Moeljopawiro and Ikehashi, 1981) ในระยะต่อมาการคัดเลือกได้มีการพัฒนาเทคนิคขึ้นโดยใช้การคัดเลือกในสารละลายธาตุอาหารที่ผสมสารที่ก่อให้เกิดภาวะเครียด ในกรณีของภาวะเค็มนิยมใช้ NaCl $MgCl_2$ และ $CaSO_4$ เติมลงไปในสารละลายธาตุอาหารในปริมาณที่ต้องการทดสอบ การคัดเลือกโดยวิธีนี้สามารถกำหนดระดับความเครียดได้อย่างแม่นยำตามปริมาณของสารที่ให้ แต่การคัดเลือกในวิธีที่กล่าวมานี้ได้ผลเฉพาะพืชที่ในประชากรมีองค์ประกอบทางพันธุกรรมหรือยีนที่มีความสามารถทนทานภาวะอันไม่เหมาะสมนั้นๆ (ชัยนาม ดิสถาพร, 2531)

ในระยะต่อมานักวิจัยหลายราย เริ่มใช้วิธีการเพิ่มการแปรผันทางพันธุกรรมในพืชให้สูงขึ้นโดยใช้วิธีต่างๆ กัน เช่น การคัดเลือกลูกผสมก่อนแล้วนำกลับมาคัดเลือกในสารละลายธาตุอาหารที่ผสมสารที่ก่อให้เกิดภาวะเครียด รายงานของทรงชัย วัฒนพายัพกุล และคณะ (2528) ระบุว่าสามารถคัดเลือกข้าวลูกผสมสายพันธุ์ SKNLR8001 3-3-1 ซึ่งทดสอบพบว่าทนเค็มได้ดี จากลูกผสม 10 สายพันธุ์ นอกจากข้าวแล้วยังมีรายงานเกี่ยวกับการสร้างลูกผสมที่มีลักษณะทนเค็มได้ดีขึ้นและสามารถถ่ายทอดลักษณะทนเค็มได้ในผักกาดก้านขาว (*Brassica napus*) เรด โคลเวอร์ (*Trifalium pratense*) อัลฟัลฟ่า (*Medicago sativa*) และ เบอร์ซัม โคลเวอร์ (*T. alexandrinum*) (Ashraf *et al*.,1987:อ้างถึงใน ทิพยวรรณ ธนไพศาล,2534) นอกจากนี้ยังใช้วิธีการชักนำให้เกิดมิวเตชัน (mutation) เพื่อเพิ่มการผันแปรทางพันธุกรรมอีกด้วย ซึ่งสามารถใช้ได้หลายวิธี เช่นการใช้รังสี สารเคมี และเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ตัวอย่างของใช้รังสี คือรายงานของ เกรียงไกร พันธุ์วรรณ์ (2528) โดยใช้รังสีแกมมาในการชักนำให้เกิดมิวเตชันใน ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 เหนียวสันป่าตอง กข.6 หอมอ้อม และหางดง กรณีของสารเคมี Woo และคณะ (1988) ใช้ ethylmethane sulfonate (EMS) แช่เมล็ดข้าวพันธุ์ Tainung67 และคัดเลือกต่อบนอาหารที่มี NaCl ซึ่งสามารถคัดเลือกต้นที่สามารถทนเค็มได้

กรณีการใช้เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น เนื่องจากสามารถใช้ประโยชน์จากการแปรผันของเซลล์ร่างกาย (somaclonal variation)ในหลอดทดลอง ซึ่งพบในเซลล์พืชที่ผ่านการชักนำให้เกิดแคลลัส (callus induction) การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (cell suspension culture) และ การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (protoplast culture) เมื่อนำมาชักนำให้เกิดเป็นต้นสมบูรณ์จะพบความแปรผันได้อย่างชัดเจน (Vajrabhaya and Vajrabhaya,1987)จึงทำให้เป็นที่นิยมกันมาก สำหรับความแปร

ผันของเซลล์ร่างกายข้าวนั้น รายงานครั้งแรกโดย Nishi และคณะ(1968) จากการเลี้ยงแคลลัส ซึ่งต่อมาก็มีรายงานเกี่ยวกับการแปรผันของเซลล์ร่างกายข้าวอีกหลากหลายลักษณะ(Ocono, 1978; Oono and Sakagushi, 1978; Yang *et al*., 1999) ลักษณะการเกิด somaclonal variation ของข้าวนั้นพบว่าช่วงเวลาที่เลี้ยงแคลลัสยิ่งยาวนาน ต้นข้าวที่ได้รับการชักนำให้เกิดจะมีระดับความไม่คงที่ของลักษณะทางพันธุกรรมสูงกว่าต้นที่ชักนำจากแคลลัสที่เลี้ยงในระยะเวลาสั้น (Muller *et al*., 1990; Yang *et al*., 1999) และความแปรผันของเซลล์ร่างกายที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้จะมีความถี่สูงกว่าในธรรมชาติ (Vajrabhaya and Vajrabhaya,1991) ลักษณะที่กลายไปนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์หรือให้คงลักษณะพันธุ์เดิมแต่เพิ่มคุณสมบัติในการต้านทานภาวะไม่เหมาะสมต่างๆได้ การเติม NaCl ลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อใช้เป็นอาหารคัดเลือกในระดับที่เซลล์ตาย (lethal level) จะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ในกรณีของข้าวที่ใช้ในการศึกษา Vajrabhaya และคณะ (1987) ได้ชักนำแคลลัสจากเอมบริโอของข้าว 8 พันธุ์คือ กข8 กข23 กข25 ขาวดอกมะลิ นางมนเอส4 เหนียวสันป่าตอง เหลืองประทิว123 และขาวตาแห้ง17 ซึ่งคัดเลือกใน NaCl 3 ระดับคือ 0.8 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยทำการคัดเลือกใน 2 ระยะคือ ระยะแคลลัส และ ระยะยอด สามารถคัดเลือกต้นที่รอดตายที่ NaCl ระดับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ 637 ต้น NaCl ระดับ 1 เปอร์เซ็นต์ 46 ต้นและ NaCl ระดับ 2 เปอร์เซ็นต์ 25 ต้น เมื่อได้ต้นข้าวจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองแล้ว ได้นำมาปลูกเพื่อเก็บเมล็ด และนำมาคัดเลือกใหม่ในรุ่นต่อไป โดยการปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่เติม NaCl 0.5% (w/v) (ค่า EC 8-10 mmho/cm) เมื่อกล้าข้าวมีอายุ 3-5 ใบเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่ออยู่ในภาวะเค็มดังกล่าว ข้าวพันธุ์ LPT123-TC171 เป็นสายพันธุ์ที่รอดตายสูงถึง 94.3 % ซึ่ง Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1991) กล่าวว่า การคัดเลือกข้าวสายพันธุ์ทนเค็มนั้น เมื่อทำการคัดเลือกในระดับเซลล์แล้ว ควรทำการคัดเลือกในระดับต้นด้วย และการคัดเลือกควรกระทำต่อเนื่องกันอย่างน้อยประมาณ 3 ชั่วรุ่น เพื่อให้แน่ใจว่า ลักษณะทนเค็มที่ได้นั้นเป็นลักษณะที่เสถียร

4.กลไกการทนเค็มของพืช

การที่พืชสามารถทนต่อภาวะเค็มจนกระทั่งครบวงจรชีวิตนั้น นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าพืชมีกลไกในการลดความเป็นพิษของภาวะเค็มในลักษณะต่างๆ กัน เช่น

- กลไกการหลีกเลี่ยง (avoidance mechanism) โดยหลีกเลี่ยงการสะสมเกลือใน cytoplasm โดยการสร้าง salt gland เพื่อขจัดเกลือ หรือการเคลื่อนย้ายไปไว้ใน vacuole (Taiz and Zeiger, 1998)

- กลไกการทนทาน(tolerance mechanism) เป็นความสามารถที่พืชยังรักษาบทบาทและหน้าที่ของระบบต่างๆ ภายในพืชแม้ในภาวะเครียด ซึ่งเชื่อว่าอาจทำโดยการปรับ water potential ภายในเซลล์ให้ต่ำลงโดยการสะสมสาร metabolite บางชนิด (Taiz and Zeiger, 1998)
- การดูดซึมและการเคลื่อนย้าย (absorption and translocation) โดยการดูดเกลือเข้ามาสะสมในรากหรือลำต้นเพื่อป้องกันไม่ให้เกลือเข้าไปสะสมที่ใบหรือยอด หรืออาจมีการดูดโซเดียมกลับออกจากท่อน้ำ(reabsorption) และ การเคลื่อนย้ายออก(retranslocation) จากพืชสู่สารละลายดิน (Yeo *et al.,* 1987)
- การอวบน้ำ (succulence) โดยการเพิ่มปริมาณน้ำภายในเซลล์ทำให้ความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์ลดลง (Greenway and Munns,1980)

เมื่อพืชเจริญอยู่ในภาวะเค็มหรือภาวะแล้ง พบว่าพืชเหล่านั้นมีการสร้างและการสะสมสารบางตัวหรือไอออนบางชนิด ทั้งนี้เชื่อว่าการสะสมสารเหล่านั้นเมื่อพืชอยู่ในภาวะเครียด จะมีประโยชน์ต่อการปรับค่า water potential ในเซลล์เพื่อให้สามารถดูดน้ำมาใช้ในการดำรงชีวิตได้(Taiz and Zeiger, 1998) พืชแต่ละชนิดจะมีการปรับตัวแตกต่างกันไป ทำให้ความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดนั้นแตกต่างกัน สารที่พืชสะสมส่วนใหญ่นั้นเป็นสารจำพวก polyol หรือ nitrogen dipole และสาร metabolite ต่างๆ ซึ่งสารเหล่านี้ได้แก่สารจำพวกน้ำตาล เช่น sorbitol (Ahmad *et al*., 1979) mannitol (Tarczynski *et al.,* 1993) กรดอะมิโนต่างๆ เช่น proline (Greenway and Munns, 1980; Lutts *et al*., 1996; Iyer and Caplan, 1998; Lutts *et al*., 1999) , glycine betaine (Sakamoto and Murata,2002) , putrescine (Chen and Kao,1993) และ ion ต่างๆ เช่น Na^+, Cl^-, K^+,NO_3^- และ Mg^{2+} (Lutts *et al*., 1996; Cheeseman, 1988; Rodriguez *et al*., 1997) เป็นต้น

การสะสมโพรลีนเป็นกระบวนการที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นกระบวนการสำคัญกระบวนการหนึ่งที่เกิดขึ้นในพืชเมื่อได้รับความเครียดที่เกิดจากภาวะเค็มและแล้ง (Strizhov *et al*.,1997)

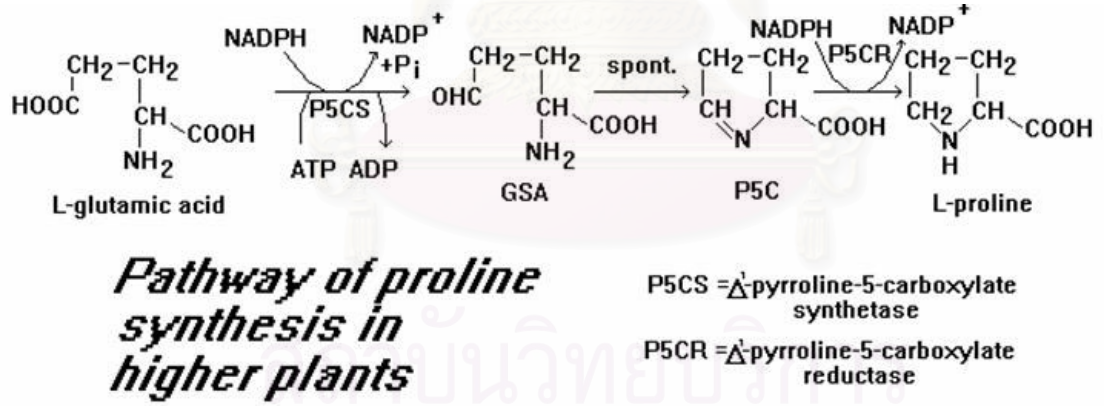
Salt stress มีผลต่อ osmotic adjustment ของพืช ปริมาณ ion และปริมาณ proline (Lutts *et al*.,1996) โดย Lutts และคณะ(1996) รายงานว่าเมื่อปลูกกล้าข้าวพันธุ์ I Kong Pao (IKP) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวไม่ทนเค็ม เปรียบเทียบกับพันธุ์ทนเค็ม คือ Nona Bokra ในสารละลายธาตุอาหารที่มี NaCl ความเข้มข้น 50 และ 100 mM เมื่อวัดปริมาณโพรลีนเมื่อได้รับภาวะเค็มที่ 3 วัน และ 10 วันพบว่าพันธุ์ ไม่ทนเค็มมีปริมาณโพรลีนสูงกว่าพันธุ์ทนเค็มอย่างมีนัยสำคัญ

สำหรับข้าวเจ้าพบว่ามีการสะสมโพรลีนสูงเมื่อได้รับภาวะเครียดรุนแรงหลังงอกแล้ว 37-52 วัน และการสะสมโพรลีนจะพบในใบมากกว่ากาบใบ ใบอ่อนมีการสะสมมากที่สุด ในขณะที่ไม่พบการสะสมในราก (Lutts et al., 1999) ในข้าวบาร์เลยนั้นพบว่าเมื่อข้าวบาร์เลย์ขาดน้ำจนมี

อาการเหี่ยวจะมีการสร้างโพรลีนจาก glutamate เพิ่มจากปกติ 40 เท่า ในขณะที่กระบวนการ proline oxidation และกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนถูกยับยั้ง ปริมาณคาร์โบไฮเดรตเป็นอีกปัจจัยหนึ่งในควบคุมการสร้างโพรลีน โดยเมื่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตในใบต่ำ พืชจะสร้าง glutamine aspartate และ organic acid อื่นๆ แทน (Stewart and Larher, 1980)

กระบวนการสังเคราะห์โพรลีน

โพรลีนนั้นเป็นที่รู้กันว่าเป็นสาร osmoprotectant ตัวหนึ่งที่มีความสำคัญในพืช เพื่อป้องกันการเกิด hyperosmotic stress ซึ่งเป็นผลมาจากภาวะแล้งและภาวะเค็ม (Delaney and Verma, 1993) นอกจากนี้ยังเชื่อกันว่าเป็นสารที่ช่วยในการสร้างเสถียรภาพให้แก่โครงสร้างของเซลล์และช่วยกำจัดอันตรายจากอนุมูลอิสระอีกด้วย (Smirnoff and Cumbes, 1989) การสังเคราะห์, การสะสม และการสลายโพรลีนจะเป็นขั้นตอนที่เกิดขึ้นมากน้อยตามแต่สภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนไป เชื่อกันว่าการสังเคราะห์โพรลีนของพืชที่ถูกกระตุ้นโดยภาวะเครียดนั้นจะสังเคราะห์จาก glutamate โดยมีเอนไซม์ Δ^1-pyrroline-5-carboxylate synthatase (P5CS) เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยา

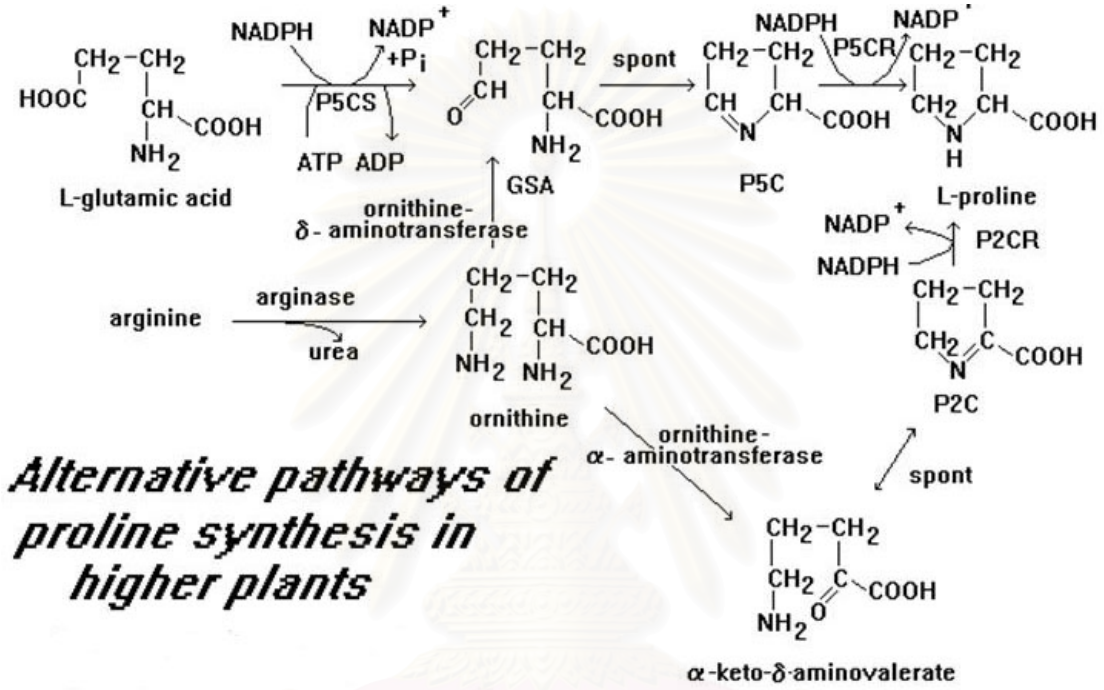


ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาการสร้างโพรลีนจาก gutamic acid (Delauney and Verma, 1993)

ปฏิกิริยาดังภาพที่ 1 เอนไซม์ที่ควบคุมปฏิกิริยา คือ Δ^1-pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา 2 ขั้นแรกของการสังเคราะห์โพรลีนคือเปลี่ยน glutamic acid เป็น glutamyl-γ-semialdehyde(GSA) และเป็นการควบคุมแบบ rate-limiting step โดยผลผลิตคือ โพรลีน จะหยุดยั้งการทำงานของ P5CS โดยพบว่าโพรลีนความเข้มข้น 6 mM สามารถยับยั้งปฏิกิริยาลงได้ครึ่งหนึ่ง (Hu *et al*, 1992) จากนั้นจึงเกิดกระบวนการ dehydration ต่อไปโดยไม่ใช้เอนไซม์ได้ Δ^1-pyrroline-5-carboxylate (P5C) ซึ่ง P5Cจะเข้าสู่

กระบวนการ reduction โดยใช้เอนไซม์ Δ^1-pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) จากปฏิกิริยานี้จะได้ L-proline (Delauney and Verma,1993; Mestichelli *et al*,1979)

นอกจากกระบวนการสังเคราะห์โพรลีนที่สร้างจาก glutamatic acid แล้ว โพรลีนยังสามารถสังเคราะห์จากOrinithine ได้เช่นกันโดยใช้เอนไซม์ ornithine-δ-aminotransferase ผลของปฏิกิริยาได้ GSA ซึ่งเปลี่ยนเป็น P5C โดย P5CR (Delauney and Verma,1993; Mestichelli *et al*,1979) ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาการสร้างโพรลีนจาก ornithine (Delauney and Verma, 1993)

ปฏิกิริยาดังภาพที่ 2 จะเห็นได้ว่า โพรลีนยังสามารถสร้างจาก ornithine ได้อีกทางหนึ่ง คือ ใช้เอนไซม์ ornithine-α-aminotransferase ซึ่งได้ผลจากปฏิกิริยาเป็น α-keto-aminovalerate ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็น pyrroline-2-carboxylate (P2C) ได้โดยไม่ต้องใช้เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยา และ P2C เปลี่ยนเป็น L-proline ได้โดยใช้เอนไซม์ pyrroline-2-carboxylate reductase (P2CR) (Delauney and Verma,1993; Mestichelli *et al*, 1979) การศึกษาของ Mestichelli และคณะ(1979) เสนอแนะว่า กระบวนการนี้เป็นกระบวนการหลักในการเปลี่ยนแปลง ornithine ไปเป็น proline ในพืชบางชนิด เช่น Jimsonweed *(Datura stramonium*) ยาสูบ (Mestichelli *et al*., 1979) เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงของ Jerusalem artichoke *(Helianthus tuberosus*) (Duran and Wurtz, 1965: อ้างถึงใน Mestichelli *et al*., 1979) narrow-leaved lupine *(Lupinus* angu*stifolius*)(Hasse *et al*, 1967: อ้างถึงใน Mestichelli *et al*., 1979) ถั่วเขียว *(Phaseolus aureus*) (Hasse *et al*, 1967: อ้างถึงใน Mestichelli *et al*., 1979) เนื้อเยื่อ

ถั่วที่เพาะเลี้ยง(*P. vulgaris*) (Wickremasinghe *et al*, 1965: อ้างถึงใน Mestichelli *et al*., 1979) และถั่วลันเตา(*Pisum sativum*)(Meister *et al*, 1957: อ้างถึงใน Mestichelli *et al*., 1979)

กระบวนการสลายโพรลีน

การสลายตัวของโพรลีนเกิดจากกระบวนการ proline oxidation โดยมีเอนไซม์ proline dehydrogenase ผลที่ได้จากปฏิกิริยานี้คือ Δ^1-pyrroline-5-carboxylate(P5C) จากนั้นเอนไซม์ Δ^1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase จะทำปฏิกิริยากับ P5C ได้ glutamate (Handson and Hitz, 1982) ในภาวะปกติจะมีสมดุลระหว่างการสังเคราะห์และการสลายของโพรลีน แต่เมื่อเกิดภาวะ osmotic stress จะทำให้ proline oxidation จะถูกยับยั้ง (Boggess *et al*., 1976a)

การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรลีนในพืชชั้นสูงเมื่อได้รับภาวะเค็ม

การศึกษาใน *Arabidopsis thaliana* L.พบว่าการสะสมโพรลีนเนื่องจากความเค็มและแล้งนั้นเกิดขึ้นเนื่องจากการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของปริมาณ mRNA ของ Δ^1*-pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS)* gene (Strizhov *et al*., 1997) และการศึกษาด้วย Northern Blot Analysis ใน *Vigna* sp. เมื่อให้ NaCl 200 mM พบว่าภาวะเค็มชักนำให้ยีน *P5CS* มีการแสดงออกที่ใบอย่างมาก (Hu *et al*, 1992) ในการศึกษาใน Arabidopsis เมื่อให้ภาวะแห้ง (desiccation) ภาวะเค็ม และ ABA พบว่าทั้งต้นและรากมีปริมาณการแสดงออกของ *P5CS* อย่างมาก(Yoshiba *et al*, 1995). Savoure และคณะ (1997) ซึ่งทำการทดลองใน *Arabidopsis thaliana* L. ได้เสนอแนะว่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรลีนจะขึ้นอยู่กับ signal transduction อย่างน้อย 2 กระบวนการ ซึ่งกระบวนการหนึ่งจะถูกชักนำโดย ABA ที่ให้จากภายนอกโดยไม่มีภาวะเครียด ซึ่ง ABAเป็นฮอร์โมนพืชที่พบว่ามีบทบาทสำคัญในการตอบสนองของพืชในภาวะเครียดต่างๆ ส่วนอีกกระบวนการหนึ่งจะถูกชักนำโดย cold stress และ osmotic stress ที่ไม่เกี่ยวข้องกับ ABA จากภายนอก โดยการทดลองได้ทำการติดตามการแสดงออกของยีน *At-P5S* (*Arabidopsis thaliana* Δ^1*-pyrroline-5-carboxylate synthase*) และ *At-P5R* (*Arabidopsis thaliana* Δ^1*-pyrroline-5-carboxylate reductase*) ใน *Arabidopsis thaliana* wild type กับ ABA-insensitive mutant ที่มีการสร้าง ABA ไม่ต่างจาก wild type และ

ABA-deficient mutant (<5%ของ wild type) เมื่อให้ABA และภาวะเครียด พบว่าทั้งหมดต่างมีปริมาณ mRNA level ของทั้งสองยีนเพิ่มขึ้นจากภาวะปกติ

Lee และ Hwang (2003) รายงานความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการแสดงออกของยีน *P5CS* กับปริมาณโพรลีนที่มีใน Zoysiagrass (*Zoysia* sp.) และชี้ให้เห็นว่าใน Zoysiagrass นั้น การแสดงออกของยีน *P5CS* เป็นส่วนสำคัญที่สามารถบ่งชี้ปริมาณโพรลีนที่สร้างได้ นอกจากนี้ การทำ overexpression ของยีน *P5CS* จาก mothbean ในยาสูบ แครอท และข้าวตัดต่อพันธุกรรมมีผลทำให้ความสามารถในการทนเค็มสูงขึ้น (Kishor *et al*.,1995, Han and Hwang, 2003, Zhu *et al*.,1998) และใน Arabidopsis มีการทดลองลดการเกิด proline degradation โดยการทำ antisense ของ *proline dehydrogenase* gene ซึ่งก็พบว่าทำให้ความสามารถในการทนเค็มสูงขึ้นเช่นกัน (Nanjo *et al*., 1999a)

ในอีกทางหนึ่ง โพรลีนสามารถสังเคราะห์จาก ornithine ได้เช่นกัน โดยทั่วไปพืชจะใช้เอนไซม์ Ornithine-δ-aminotransferase(OAT) ในกรณีการศึกษาถึงการแสดงออกของยีน *OAT* Delauney และคณะ (1993) รายงานว่ามีการแสดงออกของยีน *OAT* ลดลงในภาวะเค็ม อย่างไรก็ตาม การศึกษาของ Roosen และคณะ (1998) ใน Arabidopsis รายงานว่าการแสดงออกของยีน *OAT* จะถูกชักนำให้มีการแสดงออกมากขึ้นเช่นเดียวกับยีน *P5CS* เมื่อต้นพืชมีอายุน้อย หากพืชมีอายุมากขึ้นพบว่าปริมาณ mRNA และ ประสิทธิภาพของเอนไซม์ จะลดลงเมื่ออยู่ใต้ภาวะเค็ม

นอกจากนี้มีรายงานว่า เมื่อมี overexpression ของยีน *OAT* จาก Arabidopsis ในข้าวตัดต่อพันธุกรรม เมื่อให้ภาวะเค็มหรือภาวะแล้งจะมีการสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้นประมาณ 5-15 เท่าจากชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการตัดต่อพันธุกรรม และพบว่าข้าวตัดต่อพันธุกรรมนี้มีอัตราการงอกของเมล็ดข้าวมากขึ้น และแม้การเจริญเติบโตของต้นข้าวตัดต่อพันธุกรรมนี้จะลดลงเมื่อได้รับภาวะเค็มด้วย NaCl แต่เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการตัดต่อพันธุกรรมที่ได้รับภาวะเค็มเช่นกัน พบว่ามีการเจริญเติบโตและผลผลิตมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ และให้ผลเช่นเดียวกันในภาวะเค็มที่เกิดจาก KCl และ $MgSO_4$(Wu *et al*.,2003)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

พืชทดลอง

1. เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) ใช้เป็นชุดควบคุม
2. เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 6 ซึ่งได้จากการเกิด somaclonal variation ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ในหลอดทดลองคัด เลือกพันธุ์และผ่านการผสมตัวเองและคัดเลือกภายใต้ภาวะเค็มมา 5 ชั่วรุ่น

สถานที่ปลูกพืชทดลอง

โรงเรือนมุงหลังคาพลาสติกใส ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์การศึกษา

1. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ปลูก
   - กระบะพลาสติกสี่เหลี่ยมสีดำ ขนาดความจุ 5 ลิตร
   - โฟมและฟองน้ำ
   - เครื่องวัดการนำไฟฟ้า (Digital elctroconductivity meter)
2. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของพืช
   - ตู้อบตัวอย่างพืช (Hot air oven)
   - เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
   - ไม้บรรทัด
   - เครื่องวัดพื้นที่ใบ(LI-300A Portable Area Meter,Li-COR, USA)
3. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดและวัดปริมาณโพรลีน
   - ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง(Deep Freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
   - โกร่งบด
   - กระดาษกรองเบอร์ 1
   - หลอดทดลองขนาด 30 ml

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ปิเปตแก้ว
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath)
- เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)
- เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

4. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด DNA และการทำ PCR
   - เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (Programmable Thermal Controller รุ่น PTC 100^{TM}, MJ Research, Inc.)
   - ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง(Deep Freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
   - ไมโครปิเปต
   - โกร่งบด
   - หลอด microcentrifuge
   - เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน(microcentrifuge)
   - ชุดแยกกรดนิวคลิอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ (Horizontal gel electrophoresis)
   - เครื่องกำเนิดแสง UV (UV transluminator)
   - กล้องถ่ายภาพโพลารอยด์
5. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการโคลนชิ้นส่วน DNA ที่ได้รับการเพิ่มจำนวนจากการทำ PCR (Polymerase Chain Reaction)
   - ไมโครปิเปต
   - อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath)
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน(microcentrifuge)
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)
   - หลอด microcentrifuge
   - เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
   - ชุดแยกกรดนิวคลิอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ (Horizontal gel electrophoresis)
   - เครื่องกำเนิดแสง UV (UV transluminator)
   - กล้องถ่ายภาพโพลารอยด์

- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)
- ตู้อบ(Oven)
- เครื่องเขย่าผสมสาร(vortex mixer)

6. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด RNA
   - ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง(Deep Freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
   - ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
   - โกร่งบด
   - ไมโครปิเปต
   - อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath)
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน(microcentrifuge)
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)
   - หลอด microcentrifuge
   - เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
   - เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)
   - เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
7. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Northern Blot Hybridization
   - ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง(Deep Freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
   - ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
   - ไมโครไปเปต
   - โกร่งบด
   - อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath)
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน(microcentrifuge)
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ(Refrigerated centrifuge)
   - หลอด microcentrifuge
   - เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
   - ชุดแยกกรดนิวคลิอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ (Horizontal gel electrophoresis)
   - เครื่องกำเนิดแสง UV (UV transluminator)
   - กล้องถ่ายภาพโพลารอยด์

- ตู้ควบคุมอุณหภูมิสำหรับทำ Hybridization (Hybridization oven)
- แผ่นเมมเบรน (Hybond N^+, Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, UK)
- X-ray flim

<u>สารเคมี</u>

1. สารเคมีที่ใช้ในการปลูกข้าว
   - สารเคมีสำหรับสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP no.2 (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) (ภาคผนวก ก)
   - NaCl (Merck, Germany)
2. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด และวัดปริมาณโพรลีน (Bate et al.,1973)
   - 3% sulfosalicylic acid
   - glacial acetic acid
   - ninhydrin
   - 6 M phosphoric acid
   - toluene
3. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA
   - DNA extraction buffer(CTAB) (ภาคผนวก ก)
   - ไนโตรเจนเหลวสำหรับบดตัวอย่าง
   - Chloroform
   - Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (25:24:1)(v/v/v)
   - RNase
   - Sodium acetate
   - Isopropanol
   - Ethyl alcohol
   - TE Buffer(ภาคผนวก ก)
4. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA
   - RNA Extraction Buffer(Hot phenol)
   - RNA Extraction Buffer (Logemann *et al.*, 1987)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Trizol reagent® (GibcoBRL® California, USA)
- Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (25:24:1)
- acetic acid
- 3 M sodium acetate (pH 5.2)
- Ethyl alcohol
- Isopropanol
- 10 M $LiCl_2$
- TE Buffer (ภาคผนวก ก)

4.สารเคมีที่ใช้ในการทำ Northern Blot Hybridization

- Agarose
- RNA Ladder(New England Biolabs, USA)
- 10x MOPS (ภาคผนวก ก)
- Loading Dye for RNA (ภาคผนวก ก)
- Ethidium bromide
- 37% formaldehyde
- formamide
- 20x SSC (ภาคผนวก ก)
- ECL Labeling and Detection Kit (Amersham Pharmacia Biotech UK limited, UK)
- Primary wash buffer (ภาคผนวก ก)
- สารเคมีที่ใช้ในการล้างฟิล์ม(developer and fixer)(Kodak (Australia) PTY.LYD., Australia)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาอัตราการรอดตายของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง (LPT123- TC171) รุ่นที่ 6 ในภาวะเค็ม

1.1 การศึกษาอัตราการรอดตายของข้าว LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 - TC 171 เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วัน

1.1.1 เพาะเมล็ดข้าวทั้งสองสายพันธุ์ โดยนำเมล็ดข้าวแช่น้ำ 1 คืน จากนั้นนำไปเพาะโดยเรียงเมล็ดเป็นแถวบนกระดาษทิชชูที่ทำให้ชื้นด้วยน้ำ เพาะในที่มืดเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นจึงย้ายมาวางในที่มีแสงอีก 3 วัน โดยให้ความชื้นสม่ำเสมอ

1.1.2 เมื่อต้นกล้าอายุ 7 วันนับจากวันเพาะ คัดเลือกต้นกล้าขนาดใกล้เคียงกัน ย้ายต้นกล้าลงปลูกในกระบะสี่เหลี่ยมสีดำ ขนาดความจุ 5 ลิตร ที่มีสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ย้ายเข้าไปวางในโรงเรือนมุงหลังคาพลาสติกใส เพื่อรับแสงตามธรรมชาติ จนกระทั่งต้นกล้ามีอายุได้ 15 วันนับจากวันเพาะ เปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารทุก 3 วัน

1.1.3 ย้ายต้นกล้าอายุ 15 วันของทั้งสองสายพันธุ์ลงปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่เติม 0% NaCl (w/v) สายพันธุ์ละ 50 ต้น 0.3% NaCl (w/v) สายพันธุ์ละ 200 ต้นและ 0.5% NaCl (w/v) สายพันธุ์ละ 200ต้น เพาะเลี้ยงในโรงเรือนจนกระทั่งครบ 4 สัปดาห์ เปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารทุก 3 วัน

1.1.4 เก็บข้อมูลจำนวนต้นที่รอดตายในแต่ละสัปดาห์ บันทึกผล

1.2 การศึกษาอัตราการรอดตายของ LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123- TC171 เมื่อกล้าข้าวอายุ 22 วัน

1.2.1 เพาะเมล็ดข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ตามวิธีที่ระบุในข้อ 1.1 และเพาะเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหาร WP no.2 จนกล้าข้าวมีอายุ 22 วัน ทำการเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารทุก 3 วัน

1.2.2 ย้ายต้นกล้าอายุ 22 วันของทั้งสองสายพันธุ์ลงปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP no.2 ที่เติม 0% NaCl (w/v) สายพันธุ์ละ 50

ต้น 0.5% NaCl สายพันธุ์ละ 200 ต้น ตามภาวะเค็มที่ใช้เลี้ยงคัดเลือกต้นข้าวสายพันธุ์ LPT123-TC171 ทั้ง 6 ชั่วรุ่น (ทิพยวรรณ ธนไพศาล, 2534) เพาะเลี้ยงในโรงเรือน

1.2.3 เก็บข้อมูลจำนวนต้นที่รอดตายในแต่ละสัปดาห์ บันทึกผล

2. การศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง เหลืองประทิว 123-TC171 รุ่นที่ 6 ในภาวะเค็ม

2.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของข้าว LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123- TC171 เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วัน

2.1.1 วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) จำนวน 5 ซ้ำ เพื่อการศึกษาการเจริญเติบโตของข้าว LPT123 และ LPT123-TC 171 รุ่นที่ 6 ในสารละลายธาตุอาหารที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 0.3%(w/v)

2.1.2 เพาะและย้ายปลูกเมล็ดข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ตามวิธีการที่ระบุในข้อ 1.1 โดยแยกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือชุดทดลองที่เพาะเลี้ยงกล้าข้าวอายุ 15 วัน ในสารละลาย WP no.2 ที่มี NaCl ความเข้มข้น 0.3 % และในสารละลาย WP no.2 ที่ไม่มี NaCl ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยมีการเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารทุก 3 วันตลอดระยะเวลาทดลอง

2.1.3 เก็บผลการเจริญเติบโตทุกสัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยแยกส่วนเพื่อวัดน้ำหนักสดของต้นและราก วัดพื้นที่แผ่นใบ (lamina blade) ที่มีสีเขียว จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้งของต้นและราก

2.1.4 นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

2.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของข้าว LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123- TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อกล้าข้าวอายุ 22 วัน

2.2.1 วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) จำนวน 5 ซ้ำ เพื่อการศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ LPT123 และ LPT123- TC171ในสารละลายธาตุอาหารที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 0.5% (w/v)

2.2.2 เพาะและย้ายปลูกเมล็ดข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ตามวิธีการที่ระบุในข้อ 1.1 โดยแยกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือชุดทดลองที่เพาะเลี้ยงกล้าข้าวอายุ 22 วัน ในสารละลาย WP no.2 ที่มี NaCl ความเข้มข้น 0.5 % และในสารละลาย WP no.2 ที่ไม่มี NaCl ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยมีการเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารทุก 3 วันตลอดระยะเวลาทดลอง

2.2.3 เก็บผลการเจริญเติบโตทุกสัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เช่นเดียวกับที่ระบุไว้ในข้อ 2.1.3

2.2.4 นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3. การศึกษาปริมาณโพรลีนในใบของข้าว LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123- TC171 ในภาวะเค็ม

3.1 การศึกษาปริมาณโพรลีนในใบของข้าว LPT123 และ LPT123- TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วัน

3.1.1 วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) จำนวน 5 ซ้ำ เพื่อการศึกษาปริมาณโพรลีนในใบข้าวทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วัน เจริญเติบโตในในสารละลายธาตุอาหารที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 0.3% (w/v)

3.1.2 เพาะเมล็ดข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ย้ายปลูก รวมถึงให้ภาวะเค็มเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 2.1.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.3 เก็บตัวอย่างใบจำนวน 5 ซ้ำทุกสัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำมาสกัดและวัดปริมาณโพรลีนตามวิธีของ Bates และคณะ (1973) โดยมีวิธีการดังนี้

1) บดใบข้าวหนัก 0.03 กรัมด้วยโกร่งบดให้ละเอียด เติม 3% sulfosalicylic acid(w/v) 3 ml ลงในโกร่งบด
2) นำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วดูดสารละลายที่ได้จำนวน 0.5 ml ใส่ในหลอดทดลองขนาด 30 ml
3) เติม 0.5 ml glacial acetic acid และ 0.5 ml acid ninhydrin(ภาคผนวก ก) ที่เตรียมเสร็จใหม่ๆ แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 100 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4) หยุดปฏิกิริยาทันทีโดยการนำหลอดทดลองแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที
5) เติม toluene 2 ml ผสมสารให้เข้ากันโดยใช้ vortex นาน 15-20 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 1-2 นาที
6) ดูดสารละลายที่มีสีชมพูในชั้นของ toluene 2 ml มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ toluene เป็น blank เทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของโพรลีนที่รู้ความเข้มข้นแน่นอน

3.1.4 นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3.2 การศึกษาปริมาณโพรลีนในใบของข้าว LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อกล้าข้าวอายุ 22 วัน

3.2.1วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) จำนวน 5 ซ้ำ เพื่อการศึกษาปริมาณโพรลีนในใบข้าวทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อกล้าข้าวอายุ 22 วัน เจริญเติบโตในในสารละลายธาตุอาหารที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 0.5%(w/v)

3.2.2 เพาะเมล็ดข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ย้ายปลูก รวมถึงให้ภาวะเค็มเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 2.2.2

3.2.3 เก็บตัวอย่างใบทุกสัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำมาสกัดและวัดปริมาณโพรลีนตามวิธีของ Bates และคณะ (1973) ดังวิธีที่ระบุในข้อ 3.1.3

3.2.4 นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

4. การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ amplified ขึ้นด้วย primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *P5CS*

4.1 การเพิ่มชิ้นส่วนของ *P5CS* gene โดยใช้วิธี PCR

4.1.1 สกัด DNA จากใบของต้นกล้าข้าวพันธุ์ LPT123-TC171อายุ 3 สัปดาห์ ตามวิธีในข้อ 4.1.1

4.1.2 นำ DNA ที่ได้มาใช้เป็น template ในการเพิ่มชิ้นส่วนของ *P5CS* gene โดยมีรายละเอียดดังนี้

ปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 μl ประกอบด้วย

DNA template 20 ng

1x Reaction Buffer

1.5 mM $MgCl_2$

0.1 μM primer P5CSa (5'-gcatcaggwcgkgactcaa-3') (ออกแบบโดย ผศ.ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

0.1 μM primer P5CSs (5'-ctsatggctctctacgata-3') (ออกแบบโดย ผศ.ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

200 μM dNTPs

0.5 Unit *Taq* Polymerase

ทำการศึกษาเปรียบเทียบภาวะของปฏิกิริยา PCR (ดัดแปลงจาก Cascardo *et al*., 2001) 2 ปฏิกิริยาที่แปร Annealing temperature ดังนี้

	ปฏิกิริยาที่ 1	ปฏิกิริยาที่ 2	
Denaturing temperature (°C) / time (min.)	94 °C/1 min.	94 °C/1 min.	41 รอบ
Annealing temperature (°C)/ time (min.)	40 °C/1 min.	43 °C/1 min.	
Polymerization temperature (°C) / time (min.)	72 °C/ 3 min.	72 °C/ 3 min.	
Extension temperature (°C) / time (min.)	72 °C/ 10 min.	72 °C/ 10 min.	

4.1.3 นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาแยกเพื่อตรวจสอบโดยเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าในตัวกลางที่เป็น agarose gel ความเข้มข้น 0.8% (w/v) ในสารละลาย TBE ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 120 โวลต์ (6.5โวลต์ต่อเซนติเมตร) จากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย Ethidium Bromide ความเข้มข้น 0.5 μg/ml นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 15 นาที นำไปส่องด้วยเครื่อง UV transluminator และบันทึกภาพด้วยกล้องโพลารอยด์

4.2 การ โคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR

4.2.1 แยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันในปฏิกิริยา PCR จาก agarose gel โดยใช้ Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit (MOBIO Laboratories, Inc. USA) ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือ

4.2.2 ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่แยกได้เทียบกับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบปริมาณที่สกัดแยกได้

4.2.3 ทำการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แยกได้โดยใช้ QIAGEN® PCR Cloning Kit (QIAGEN) ซึ่งมี pDrive เป็นดีเอ็นเอพาหะ (ภาคผนวก ค) ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือ

4.2.4 ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลน กับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR เพื่อยืนยันขนาดชิ้นส่วนโคลนที่ได้ว่าใกล้เคียงกับชิ้นส่วน PCR ที่ต้องการโคลน

4.2.5 ทำ frozen stock (ตามวิธีการที่ระบุในภาคผนวก ข) เพื่อเก็บรักษาโคลนที่ได้ไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

4.3 นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่โคลนได้ไปตรวจหาลำดับเบสโดยใช้บริการของ Bio Service Unit (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สวทช.)และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้ในฐานข้อมูลลำดับเบส (Genbank)

5. การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ amplified ขึ้นด้วย primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *OAT*

5.1 การเพิ่มชิ้นส่วนของ *OAT* gene โดยใช้วิธี PCR

5.1.1 สกัด DNA จากใบของต้นกล้าข้าวพันธุ์ LPT123-TC171 อายุ 3 สัปดาห์ ตามวิธีในข้อ 4.1.1

5.1.2 นำ DNA ที่ได้มาใช้เป็น template ในการเพิ่มชิ้นส่วนของ *OAT* gene โดยมีรายละเอียดดังนี้

ปฏิกิริยามี 3 ชุดการทดลอง คือ

ชุดการทดลองที่ 1 ปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 μl ประกอบด้วย

DNA template 20 ng

1x Reaction Buffer

1.5 mM $MgCl_2$

0.1 μM primer OATa(5'-atttkgtgcagagagttc -3') (ออกแบบโดย ผศ.ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

0.1 μM primer OATs(5'-aytcjgcagtwaatca-3') (ออกแบบโดย ผศ.ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

200 μM dNTPs

0.5 Unit *Taq* Polymerase

ชุดการทดลองที่ 2 ปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 μl ประกอบด้วย

DNA template 20 ng

1x Reaction Buffer

2.0 mM $MgCl_2$

0.1 μM primer OATa

0.1 μM primer OATs

200 μM dNTPs

0.5 Unit *Taq* Polymerase

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชุดการทดลองที่ 3 ปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 μl ประกอบด้วย

DNA template 20 ng

1x Reaction Buffer

2.5 mM $MgCl_2$

0.1 μM primer OATa

0.1 μM primer OATs

200 μM dNTPs

0.5 Unit *Taq* Polymerase

ภาวะของปฏิกิริยา PCR (ดัดแปลงจาก Cascardo *et al*.,2001)

Denaturing temperature (^{o}C)/ time (min.)	94 ^{o}C/1 min.	41 รอบ
Annealing temperature (^{o}C)/ time (min.)	43 ^{o}C/1 min.	
Polymerization temperature (^{o}C)/ time (min.)	72 ^{o}C/ 3 min.	
Extension temperature (^{o}C)/ time (min.)	72 ^{o}C/ 10 min.	

5.1.3 ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาดังวิธีในข้อ 4.1.3

5.2 การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำPCRโดยใช้ primer OATa/OATs ใช้วิธีการเช่นเดียวกับในข้อ 4.2

5.3 นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่โคลนได้ไปตรวจหาลำดับเบสโดยใช้บริการของ BSU และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้ในฐานข้อมูลลำดับเบส (Genbank)

6. การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด RNA จากใบข้าว

6.1เพาะเมล็ดและย้ายปลูกต้นกล้าข้าวพันธุ์เหลืองประทิวตามวิธีการในข้อ 1.1

6.2 เมื่อต้นกล้าข้าวอายุได้ 3 สัปดาห์เก็บตัวอย่างใบข้าวตัวอย่างละ 0.5 กรัม จำนวน 4ซ้ำต่อ 1 วิธีการสกัด RNA โดยใช้ไนโตรเจนเหลว และแช่แข็งไว้ในตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง(Deep Freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเช่นเดียวกันเมื่อกล้าข้าวอายุครบ 4 สัปดาห์และ 5 สัปดาห์ ตามลำดับ

6.3 เปรียบเทียบจากวิธีการสกัด RNA 3 วิธีคือ

6.3.1 วิธี Hot Phenol (Anonymous, 1993)

1) บดตัวอย่างข้าว 0.2 กรัมด้วยไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียดในโกร่งที่ผ่านการทำลาย RNase มาแล้ว ตักตัวอย่างพืชในหลอด microcentrifuge ที่ทำให้เย็นจัดด้วยไนโตรเจนเหลว
2) เท RNA Extraction buffer และ Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (25:24:1) อย่างละ 800 µl ซึ่งอุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C นำไป vortex และแช่ในน้ำแข็ง

RNA Extraction Buffer

100 mM Tris pH 9.0

100 mM NaCl

20mM EDTA

1% lauryl sarcosinate

0.1%(v/v) 2-mercaptoethanol

0.1% DEPC(diethyl pyrrocarobonate)

3) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที
4) แยกส่วน supernatant และนำมาสกัดซ้ำด้วย Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (25:24:1) อีกครั้งหนึ่งโดยใช้ปริมาตรเท่าสารละลายในหลอด ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่
5) เติม 95% ethanol ปริมาตร 2 เท่า เก็บที่ -20 °C เป็นเวลา 30 นาที
6) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที
7) ล้าง pellet ด้วย 80% ethanol นำไป air dry ที่อุณหภูมิห้อง
8) ละลาย pellet ด้วย DEPC-treated TE buffer 100 µl
9) เติม DEPC-treated TE buffer 60 µl และ 10 M $LiCl_2$ 40 µl(ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 M $LiCl_2$) เก็บไว้ที่ -20 °C 16 ชั่วโมง

10) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที

11) ละลาย pellet ด้วย DEPC-treated TE buffer 20 µl

12) นำสารละลาย RNA มาวัดค่า $OD_{260/280}$ เพื่อคำนวณหาปริมาณ RNA และคุณภาพของ RNA ที่ได้ บันทึกผล

6.3.2 วิธีสกัด RNA จากเนื้อเยื่อที่มีแป้งมาก (Logemann *et al.*, 1987)

1) บดเนื้อเยื่อข้าว 0.1 กรัมด้วยไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด
2) เติม 0.6 ml RNA extraction buffer แช่น้ำแข็ง 10 นาที

RNA Extraction Buffer

8 M guanidine-HCl

20 mM ETDA

20 mM MES (4-morpholineethansulfonic acid),

50 mM mercaptoethanol pH7.0

0.1% DEPC(diethyl pyrrocarobonate)

3) ปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาทีที่ 4 °C 10 นาที เก็บชั้น supernatant
4) นำ supernatant ที่ได้กรองผ่าน miracloth(ขั้นตอนนี้ไม่จำเป็นหากเป็นเนื้อเยื่อที่มีแป้งน้อย)
5) เติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 0.2-1.0 เท่าของชั้น supernatant ที่ได้
6) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที 45 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
7) ดูด supernatant ใส่หลอดใหม่ เติม ethanol 95% ที่แช่เย็นปริมาตร 0.7 เท่าของ supernatant ที่ได้ และเติม 1 M acetic acid ปริมาตร 0.2 เท่าของ supernatant ที่ได้ ผสมให้เข้ากัน
8) นำไปเก็บที่ -20 °C ข้ามคืนหรือเก็บที่ -70 °C 1 ชั่วโมง
9) ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
10) ล้าง pellet ด้วย 3 M sodium acetate pH 5.2 ที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงซ้ำที่10,000 รอบต่อนาที 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
11) ล้าง pellet ที่ได้ด้วย 70% ethanol

12) ทำให้ pellet แห้งเพื่อกำจัด ethanol แล้วละลายด้วย DEPC-treated H_2O 50 µl

13) นำสารละลาย RNA มาวัดค่า $OD_{260/280}$ เพื่อคำนวณหาปริมาณ RNA และคุณภาพของ RNA ที่ได้ บันทึกผล

6.3.3 วิธีการตามคู่มือของ Trizol Reagent (GibcoBRL® California, USA)

1) บดเนื้อเยื่อข้าว 0.1 กรัมด้วยไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด เติม Trizol Reagent 1ml
2) incubate ที่ 15-30 °C 5 นาที เติม chloroform 0.2 ml vortex 15 วินาที จากนั้น incubate ที่ 15-30 °C 2-3 นาที
3) ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาทีที่ 2-8 °C 15 นาที
4) ดูด supernatant ใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol 0.5 ml incubate ที่ 15-30 °C 10 นาที
5) ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาทีที่ 2-8 °C 10 นาที
6) ล้าง pellet ด้วย 75%ethanol vortex ให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 7500 รอบต่อนาทีที่ 2-8 °C 5 นาที
7) นำ pellet ไป air dry 5-10 นาที
8) ละลาย DEPC-Treated water 50 µl
9) นำสารละลาย RNA มาวัดค่า $OD_{260/280}$ เพื่อคำนวณหาปริมาณ RNA และคุณภาพของ RNA ที่ได้ บันทึกผล

7. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรลีนในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว และสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง เหลืองประทิว 123-TC171 รุ่นที่ 6 ในภาวะเค็ม ด้วยวิธี Northern Blot Analysis

7.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* ในข้าว LPT123 และ LPT123- TC171 ด้วยวิธี Northern Blot Analysis

7.1.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วัน

7.1.1.1 เพาะเมล็ดและย้ายปลูกข้าวทั้งสองสายพันธุ์ และให้ภาวะเค็มตามวิธีการในข้อ 2.1.2

7.1.1.2 เก็บตัวอย่างใบข้าวที่อยู่ในภาวะเค็ม 1 และ 2 สัปดาห์โดยใช้ไนโตรเจนเหลวและแช่แข็งไว้ในตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง(Deep Freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

7.1.1.3 สกัด RNA จากใบข้าว โดยวิธี hot phenol

7.1.1.4 นำ RNA ที่ได้ โดยใช้ปริมาณ RNA สุทธิ 20 μg มาวิเคราะห์การแสดงออกของยีน โดยวิธี Northern Blot Analysis ตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) โดยแยกแถบ RNA ให้เคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าในตัวกลางที่เป็น formaldehyde gel ความเข้มข้น 1% (v/v) ใน RNA Running Buffer (1X MOPS) ใช้ความต่างศักย์ 120 โวลต์(4โวลต์ต่อเซนติเมตร) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ P5CS_2KB_no.27 เป็น probe และติดฉลากโดย ECL Labeling and Detection Kit (Amersham Pharmacia Biotech UK limited, UK) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำ hybridization คือ 42 °C หรือ 40 °C ล้างด้วย primary wash buffer ที่อุณหภูมิเดียวกับการ hybridization เป็นเวลา 15 นาที 2 ครั้ง และ ล้าง secondary wash buffer 5นาที ที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้ง ตรวจสอบผลการ hybridization ตามวิธีการที่ระบุในคู่มือ

7.1.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* เมื่อกล้าข้าวอายุ 22 วัน

7.1.2.1 เพาะเมล็ดและย้ายปลูกข้าวทั้งสองสายพันธุ์ และให้ภาวะเค็มตามวิธีการในข้อ 2.2.2

7.1.2.2 เก็บตัวอย่างใบข้าวที่อยู่ในภาวะเค็ม 1 และ 2 สัปดาห์โดยใช้ไนโตรเจนเหลวและแช่แข็งไว้ในตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง(Deep Freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

7.1.2.3 สกัด RNA จากใบข้าว โดยวิธี hot phenol

7.1.2.4 นำ RNA ที่ได้ โดยใช้ปริมาณ RNA สุทธิ 20 μg มาวิเคราะห์การแสดงออกของยีน โดยวิธี Northern Blot Analysis ดังวิธีที่ระบุในข้อ 8.1.1.4

7.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน *OAT* ในข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 ด้วยวิธี Northern Blot Analysis

7.2.1 ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 6.1.1 โดยเปลี่ยน probe ที่ใช้เป็น cDNA จาก *OAT* gene ของ mothbean (*Vigna aconitifolia*)

7.2.2 ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 6.1.2 โดยเปลี่ยน probe ที่ใช้เป็น cDNA จาก *OAT* gene ของ mothbean (*Vigna aconitifolia*)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การศึกษาอัตราการรอดตายของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง LPT123- TC171 รุ่นที่ 6 ในภาวะเค็ม

1.1 การศึกษาอัตราการรอดตายของข้าว LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 - TC 171 เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วัน

ข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่เพาะในภาวะปกติไม่พบการตายตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง ภาวะเค็มมีผลทำให้ข้าวทั้งสองสายพันธุ์ตาย โดยลักษณะความเสียหายจากภาวะเค็มที่สังเกตเห็นคือใบแก่จะมีอาการแห้งตายจากปลายใบ และลุกลามจนใบทั้งหมดแห้งตาย ต้นข้าวที่ได้รับภาวะเค็มมีขนาดต้นเล็กกว่าและ lamina blade จะแคบกว่าต้นที่ปลูกภาวะปกติ ในภาวะเค็มสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123- TC171 มีอัตราการรอดตายสูงกว่าสายพันธุ์เดิม ดังตารางที่ 1 การให้ภาวะเค็มที่ 0.5%NaCl (w/v) แก่ต้นกล้าข้าวอายุ 15 วันพบว่าต้นข้าวทั้งสองสายพันธุ์ไม่สามารถรอดชีวิตจนสิ้นสุดการทดลอง ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงเลือกให้ภาวะเค็มที่ 0.3%NaCl (w/v) แก่ต้นกล้าข้าวอายุ 15 วัน

1.2 การศึกษาอัตราการรอดตายของ LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 เมื่อกล้าข้าวอายุ 22 วัน

ข้าวทั้งสองสายพันธุ์เมื่อเจริญในภาวะปกติไม่พบการตายตลอดการทดลอง อัตรารอดตายของข้าว LPT123 เมื่อให้ภาวะเค็มที่ 0.5 %NaCl (w/v) มีค่าต่ำกว่าอัตราการรอดตายของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT 123-TC171 ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อัตรารอดตายของต้น LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0% 0.3%และ 0.5%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

อายุของต้นข้าวที่ทดลอง	สายพันธุ์และภาวะปลูก	อัตรารอดตาย(%)			
		สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
15 วัน	LPT123 NaCl 0%(w/v)	100	100	100	100
	LPT123 NaCl 0.3%(w/v)	85	60	17	8
	LPT123 NaCl 0.5%(w/v)	51	27	3	0
	LPT123-TC171 NaCl 0%(w/v	100	100	100	100
	LPT123-TC171 NaCl 0.3%(w/v)	96	87	54	30
	LPT123-TC171 NaCl 0.5%(w/v)	67	35	8	0
22 วัน	LPT123 NaCl 0%(w/v)	100	100	100	100
	LPT123 NaCl 0.5%(w/v)	79	64	24	15
	LPT123-TC171 NaCl 0%(w/v	100	100	100	100
	LPT123-TC171 NaCl 0.5%(w/v)	95	86	51	46

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง เหลืองประทิว 123-TC171 รุ่นที่ 6 ในภาวะเค็ม

2.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของข้าว LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วัน

ศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวสายพันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 โดยย้ายปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 15 วันลงปลูกในกระบะสี่เหลี่ยมสีดำ ขนาดความจุ 5 ลิตร ด้วยสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3 %(w/v) เมื่อให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า

2.1.1 น้ำหนักสดของต้น

เมื่อวัดน้ำหนักสดต้นของข้าวสายพันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 - TC171 ที่ปลูกในภาวะปกติ น้ำหนักสดต้นในสัปดาห์ที่1 และ 2 ของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มสูงกว่าสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อให้ภาวะเค็ม พบว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็มมีน้ำหนักสดต้นมากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 1 3 และ 4 อย่างไรก็ตามข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่ได้รับภาวะเค็มมีน้ำหนักสดต้นน้อยกว่าข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่ปลูกในภาวะปกติตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 จนสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 2, ภาพที่ 3)

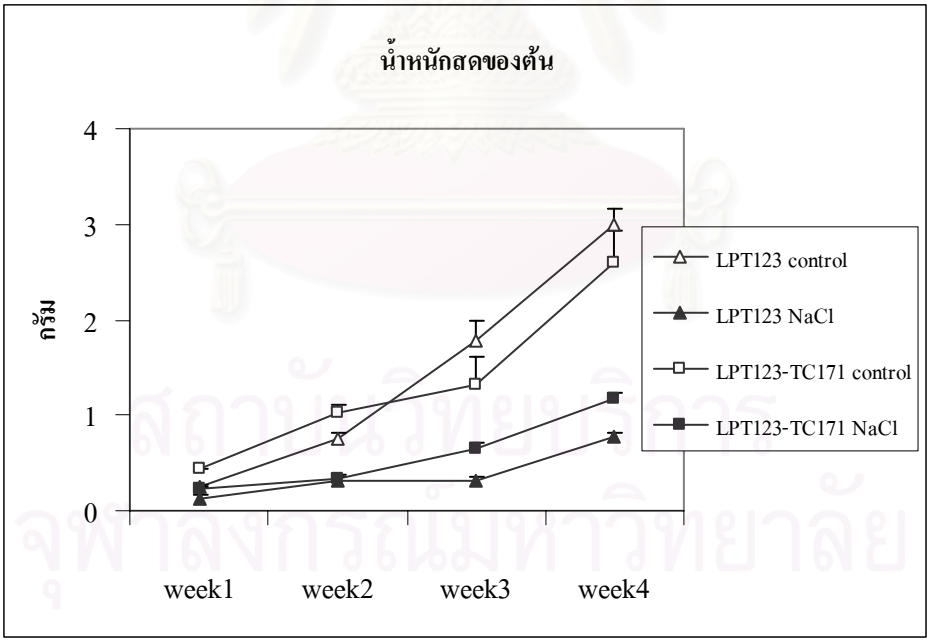
2.1.2 น้ำหนักแห้งของต้น

น้ำหนักแห้งต้นของข้าวสายพันธุ์เดิม LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 เมื่อปลูกในภาวะปกติ พบว่าน้ำหนักแห้งของต้นข้าวสายพันธุ์ทนเค็มมากกว่าพันธุ์ปกติอย่างมีนัยสำคัญในสองสัปดาห์แรกที่ทำการทดลอง หลังจากนั้นในสัปดาห์ที่ 4 พบว่าน้ำหนักแห้งของต้นข้าวสายพันธุ์ปกติมากกว่าพันธุ์ทนเค็มอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อข้าวทั้งสองสายพันธุ์ได้รับภาวะเค็มมีเพียงสัปดาห์ที่ 3 ที่ข้าวพันธุ์ทนเค็มมีน้ำหนักแห้งมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ดีน้ำหนักแห้งต้นของข้าวทั้งสองสายพันธุ์เมื่อได้รับภาวะเค็มต่ำกว่าน้ำหนักแห้งของต้นข้าวที่ปลูกในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 จนสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 3, ภาพที่ 4)

ตารางที่ 2 น้ำหนักสดของต้นข้าวLPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วันปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3 %(w/v)

สายพันธุ์และภาวะปลูก	น้ำหนักสดของต้น (กรัม)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
LPT123 NaCl 0%(w/v)	0.2428(±0.0293)^{b}	0.7588(±0.0521)^{b}	1.7720(±0.2119)^{c}	2.9861(±0.1772)^{c}
LPT123 NaCl 0.3%(w/v)	0.1316(±0.0123)^{a}	0.3209(±0.0385)^{a}	0.3096(±0.0512)^{a}	0.7673(±0.0398)^{a}
LPT123-TC171 NaCl 0%(w/v)	0.4354(±0.0321)^{c}	1.0307(±0.0719)^{c}	1.3287(±0.2888)^{c}	2.6058(±0.3162)^{c}
LPT123-TC171 NaCl 0.3%(w/v)	0.2588(±0.0125)^{b}	0.3359(±0.0354)^{a}	0.6440(±0.0714)^{b}	1.1728(±0.0667)^{b}

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันหลังตัวเลขในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P< 0.05)

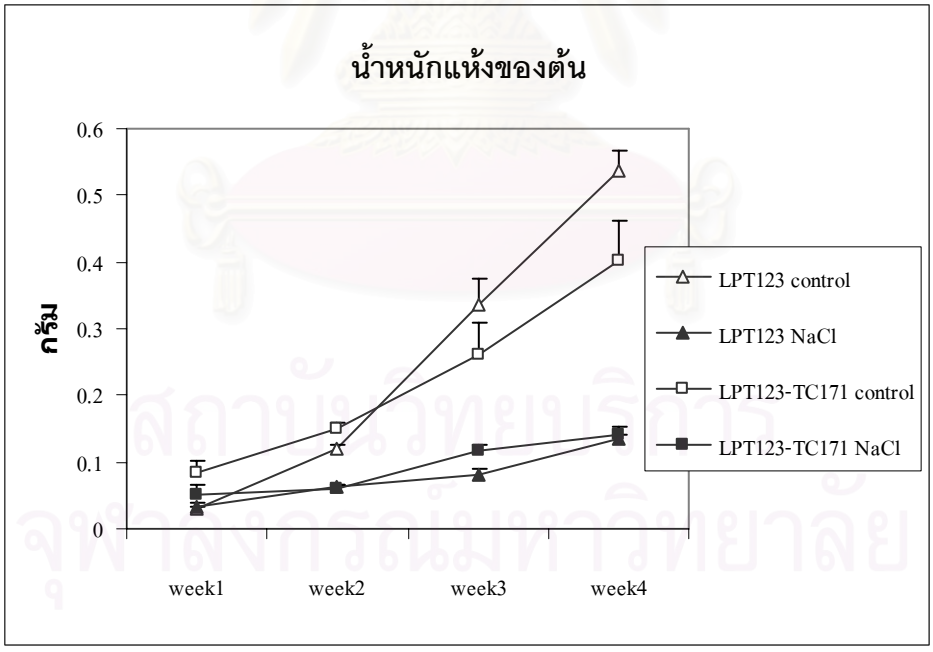


ภาพที่ 3 น้ำหนักสดของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วันปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3%(w/v)

ตารางที่ 3 น้ำหนักแห้งของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วันปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3 %(w/v)

สายพันธุ์และภาวะปลูก	น้ำหนักแห้งของต้น (กรัม)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
LPT123 NaCl 0%(w/v)	0.0287(±0.0037)^{a}	0.1187(±0.0083)^{b}	0.3354(±0.0384)^{c}	0.5384(±0.0296)^{c}
LPT123 NaCl 0.3%(w/v)	0.0316(±0.0084)^{a}	0.0622(±0.0051)^{a}	0.0798(±0.0112)^{a}	0.1339(±0.0074)^{a}
LPT123-TC171 NaCl 0%(w/v)	0.0825(±0.0207)^{b}	0.1498(±0.0099)^{c}	0.2615(±0.0474)^{c}	0.4016(±0.0594)^{b}
LPT123-TC171 NaCl 0.3%(w/v)	0.0514(±0.0142)^{ab}	0.0610(±0.0057)^{a}	0.1234(±0.0071)^{b}	0.1421(±0.0122)^{a}

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันหลังตัวเลขในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P< 0.05)



ภาพที่ 4 น้ำหนักแห้งของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วันปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3%(w/v)

2.1.3 น้ำหนักสดของราก

น้ำหนักสดของรากในข้าว LPT123 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิม กับสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 เมื่อปลูกในภาวะปกติ นับตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ของการทดลองน้ำหนักสดรากของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดรากของข้าวทั้งสองสายพันธุ์เมื่อได้รับภาวะเค็มเมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 2 ของการทดลองเป็นต้นไป น้ำหนักสดรากของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในภาวะเค็มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดรากของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ระหว่างภาวะปกติและภาวะเค็ม พบว่าข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในภาวะเค็มมีน้ำหนักสดรากน้อยกว่าน้ำหนักสดรากของสายพันธุ์ทนเค็มที่ปลูกในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญนับแต่สัปดาห์ที่ 2 จนสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 4, ภาพที่ 5)

2.1.4 น้ำหนักแห้งของราก

ข้าวพันธุ์ LPT123 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิมและข้าว LPT123 – TC171 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ทนเค็ม เมื่อปลูกในภาวะปกติจะมีน้ำหนักแห้งของรากที่ไม่แตกต่างกันทางสถิตินับตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 เมื่อได้รับภาวะเค็ม น้ำหนักแห้งรากของข้าวสายพันธุ์เดิมน้อยกว่าสายพันธุ์ทนเค็มอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 1 และ 3 น้ำหนักแห้งรากของข้าวทั้งสองสายพันธุ์เมื่อได้รับภาวะเค็มน้อยกว่าข้าวทั้งสองสายพันธุ์เมื่อปลูกในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 (ตารางที่ 5, ภาพที่ 6)

2.1.5 พื้นที่ใบ

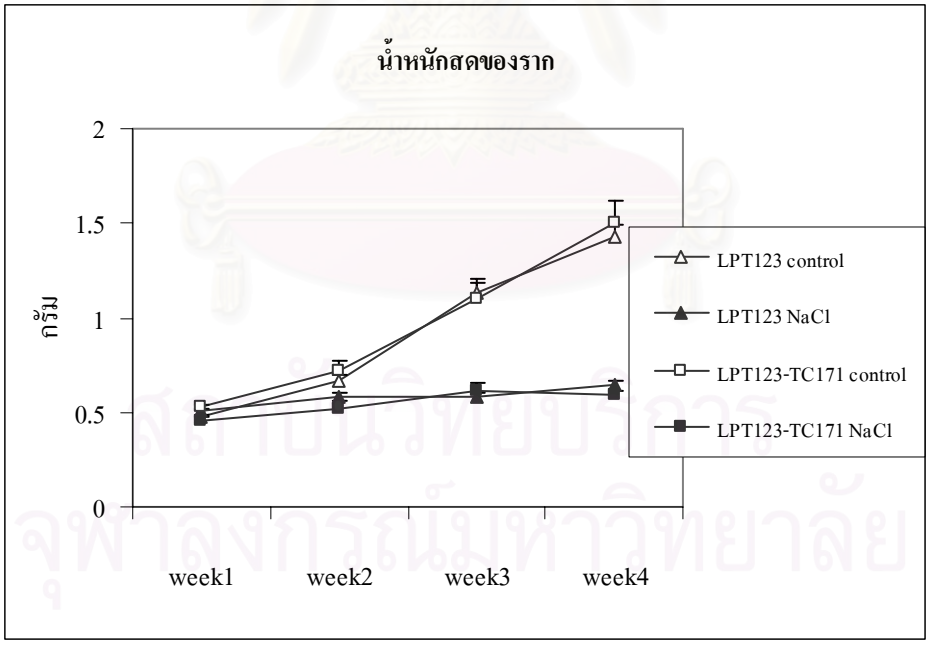
พื้นที่ใบของข้าว LPT123 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิม และข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 - TC171 เมื่อปลูกในภาวะปกตินั้นในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 พื้นที่ใบของพันธุ์ทนเค็มมากกว่าพื้นที่ใบของพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญ และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิตินับตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 จนสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่เมื่อปลูกในภาวะเค็มพื้นที่ใบของข้าวพันธุ์ทนเค็มมากกว่าพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญเมื่อสัปดาห์ที่ 1 และ 3 ของการทดลอง นับตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง ต้นข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่ได้รับภาวะเค็มมีพื้นที่ใบน้อยกว่าในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 6, ภาพที่ 7)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 น้ำหนักสดของรากข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วันปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3%(w/v)

สายพันธุ์และภาวะปลูก	น้ำหนักสดของราก (กรัม)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
LPT123 NaCl 0%(w/v)	0.4748(±0.0082)[a]	0.6684(±0.0297)[b]	1.1303(±0.0811)[b]	1.4249(±0.0667)[b]
LPT123 NaCl 0.3%(w/v)	0.5078(±0.0077)[b]	0.5833(±0.0182)[a]	0.5817(±0.0261)[a]	0.6418(±0.0201)[a]
LPT123-TC171 NaCl 0%(w/v)	0.5312(±0.0092)[c]	0.7207(±0.0480)[b]	1.0986(±0.0858)[b]	1.5020(±0.1206)[b]
LPT123-TC171 NaCl 0.3%(w/v)	0.4518(±0.0236)[a]	0.5137(±0.0435)[a]	0.6172(±0.0439)[a]	0.5901(±0.0205)[a]

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันหลังตัวเลขในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P< 0.05)

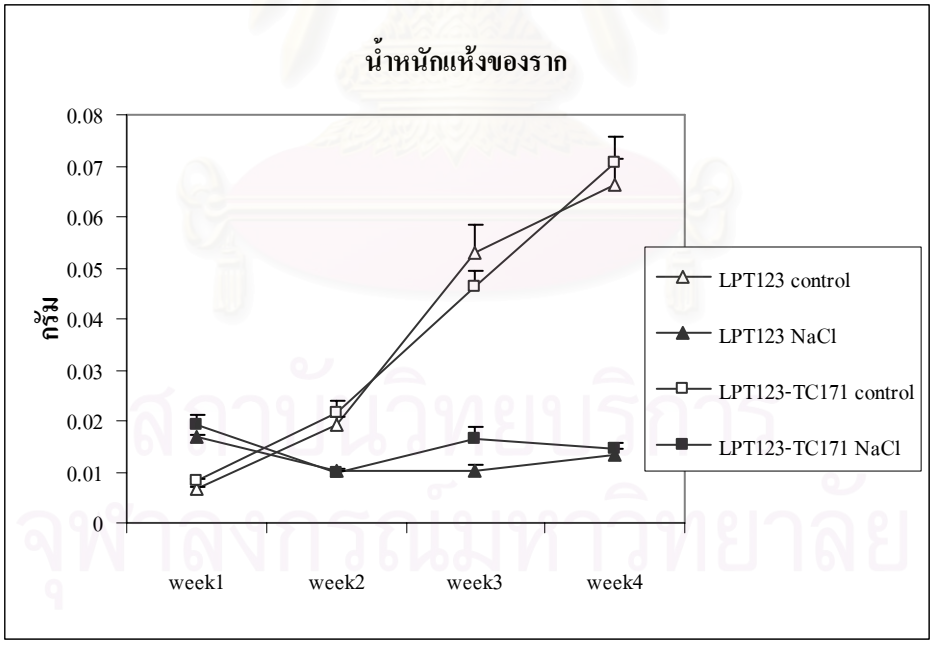


ภาพที่ 5 น้ำหนักสดของรากข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วันปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3%(w/v)

ตารางที่ 5 น้ำหนักแห้งของรากข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วันปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3% (w/v)

สายพันธุ์และภาวะปลูก	น้ำหนักแห้งของราก (กรัม)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
LPT123 NaCl 0%(w/v)	0.0065(±0.0005)^{a}	0.0192(±0.0015)^{b}	0.0529(±0.0056)^{c}	0.0662(±0.0050)^{b}
LPT123 NaCl 0.3%(w/v)	0.0167(±0.0003)^{c}	0.0102(±0.0002)^{a}	0.0103(±0.0009)^{a}	0.0134(±0.0011)^{a}
LPT123-TC171 NaCl 0%(w/v)	0.0083(±0.0004)^{b}	0.0215(±0.0022)^{b}	0.0461(±0.0030)^{c}	0.0706(±0.0050)^{b}
LPT123-TC171 NaCl 0.3%(w/v)	0.0192(±0.0018)^{d}	0.0096(±0.0007)^{a}	0.0164(±0.0022)^{b}	0.0144(±0.0010)^{a}

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันหลังตัวเลขในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P< 0.05)

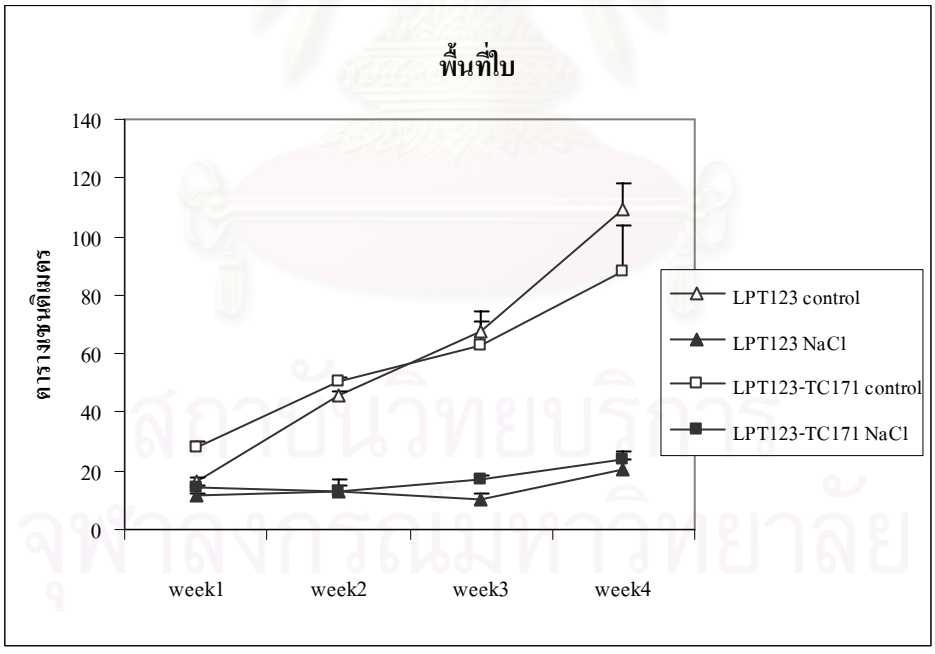


ภาพที่ 6 น้ำหนักแห้งของรากข้าวพันธุ์ LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วันปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3% (w/v)

ตารางที่ 6 พื้นที่ใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วัน ปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3%(w/v)

สายพันธุ์และภาวะปลูก	พื้นที่ใบ (ตารางเซนติเมตร)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
LPT123 NaCl 0%(w/v)	16.06(±1.88)^{c}	45.76(±1.58)^{b}	67.78(±6.33)^{c}	109.11(±8.94)^{b}
LPT123 NaCl 0.3%(w/v)	11.83(±0.75)^{a}	12.74(±2.43)^{a}	10.18(±2.04)^{a}	20.33(±3.63)^{a}
LPT123-TC171 NaCl 0%(w/v)	27.85(±2.27)^{d}	50.20(±1.75)^{c}	62.87(±8.06)^{c}	88.31(±15.54)^{b}
LPT123-TC171 NaCl 0.3%(w/v)	14.04(±0.71)^{b}	13.02(±4.17)^{a}	17.25(±1.32)^{b}	23.88(±2.46)^{a}

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันหลังตัวเลขในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P< 0.05)



ภาพที่ 7 พื้นที่ใบของต้นข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วันปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3%(w/v)

2.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของข้าว LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อกล้าข้าวอายุ 22 วัน

ศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวสายพันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 โดยย้ายปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันลงปลูกในกระบะสี่เหลี่ยมสีดำ ขนาดความจุ 5 ลิตร ด้วยสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v) เมื่อให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า

2.2.1 น้ำหนักสดของต้น

น้ำหนักสดต้นของข้าวสายพันธุ์ LPT 123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 – TC171 ในภาวะปกติ พบว่าน้ำหนักสดของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มมากกว่าน้ำหนักสดต้นของข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญตลอดการทดลอง และเมื่อให้ภาวะเค็มแก่ทั้งสองสายพันธุ์ น้ำหนักสดต้นของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มมากกว่าสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญตลอดการทดลองเช่นกัน และเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดต้นของข้าวที่ปลูกในภาวะปกติและภาวะเค็มพบว่าน้ำหนักสดของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในภาวะปกติมากกว่าน้ำหนักสดของข้าวทั้งสองสายพันธุ์เมื่อได้รับภาวะเค็มในสัปดาห์ที่ 1 ถึง 3 แต่เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 4 พบว่าน้ำหนักสดของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มมีค่าไม่แตกต่างกับน้ำหนักสดของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่ปลูกในภาวะปกติ(ตารางที่ 7, ภาพที่ 8)

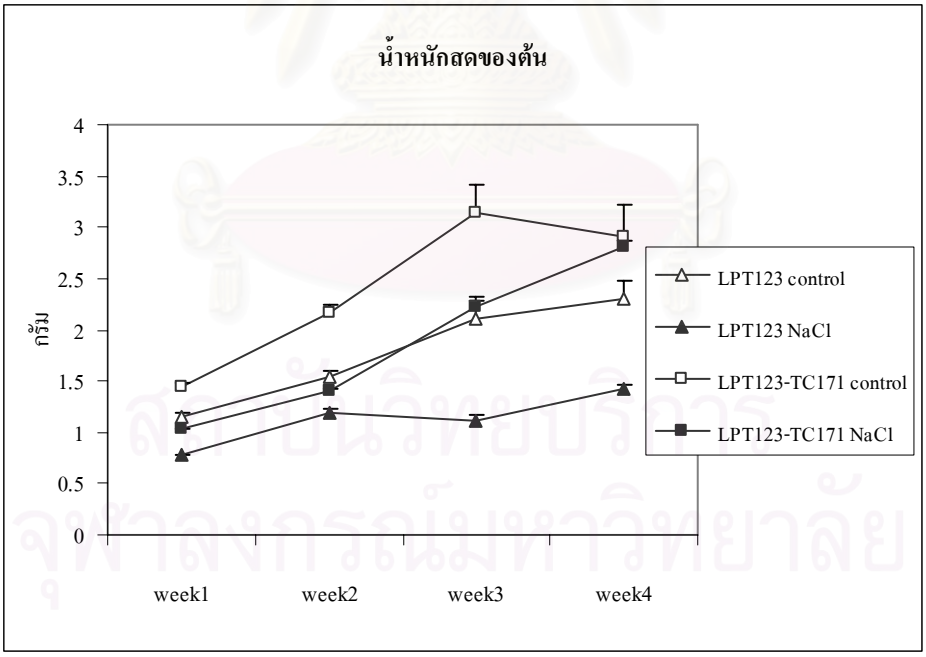
2.2.2 น้ำหนักแห้งของต้น

น้ำหนักแห้งต้นในข้าว LPT123 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิม กับสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 เมื่อปลูกในภาวะปกติ พบว่าน้ำหนักแห้งต้นของพันธุ์ทนเค็มมากกว่าพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญยกเว้นในสัปดาห์ที่ 2 ที่ไม่แตกต่างกัน เมื่อให้ภาวะเค็ม ข้าวสายพันธุ์ทนเค็มมีน้ำหนักแห้งต้นมากกว่าน้ำหนักแห้งต้นของข้าวสายพันธุ์เดิมในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างภาวะเค็มและภาวะปกติพบว่าข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในภาวะปกติมีน้ำหนักแห้งต้นที่มากกว่าข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในภาวะเค็มตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 จนสิ้นสุดการทดลอง ในสัปดาห์ที่ 4 พบว่าน้ำหนักแห้งต้นของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มในภาวะเค็มและน้ำหนักแห้งต้นของสายพันธุ์เดิมในภาวะปกติใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 8, ภาพที่ 9)

ตารางที่ 7 น้ำหนักสดของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v)

สายพันธุ์และภาวะปลูก	น้ำหนักสดของต้น (กรัม)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
LPT123 NaCl 0%(w/v)	1.1545(±0.0293)^{c}	1.5425(±0.0521)^{c}	2.1051(±0.2119)^{b}	2.2930(±0.1772)^{b}
LPT123 NaCl 0.5%(w/v)	0.7725(±0.0123)^{a}	1.1880(±0.0385)^{a}	1.1197(±0.0512)^{a}	1.4189(±0.0398)^{a}
LPT123-TC171 NaCl 0%(w/v)	1.4434(±0.0321)^{d}	2.1626(±0.0719)^{d}	3.1352(±0.2888)^{c}	2.9094(±0.3162)^{c}
LPT123-TC171 NaCl 0.5%(w/v)	1.0267(±0.0125)^{b}	1.3961(±0.0354)^{b}	2.2183(±0.0714)^{b}	2.8074(±0.0667)^{c}

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันหลังตัวเลขในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P< 0.05)

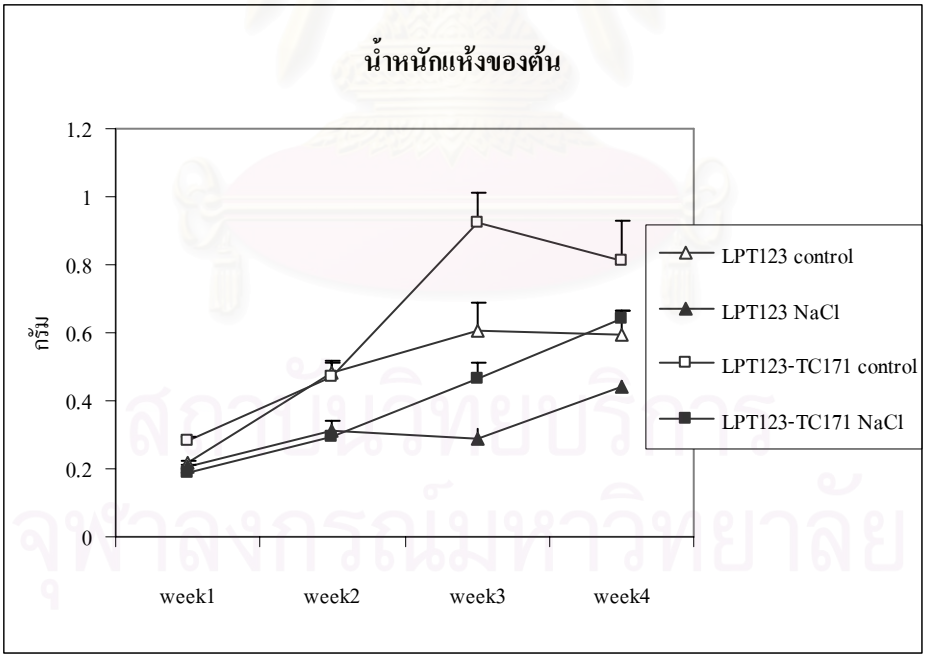


ภาพที่ 8 น้ำหนักสดของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v)

ตารางที่ 8 น้ำหนักแห้งของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v)

สายพันธุ์และภาวะปลูก	น้ำหนักแห้งของต้น (กรัม)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
LPT123 NaCl 0%(w/v)	0.2164(±0.0082)^{a}	0.4818(±0.0297)^{b}	0.6049(±0.0811)^{c}	0.5957(±0.0667)^{b}
LPT123 NaCl 0.5%(w/v)	0.2081(±0.0077)^{a}	0.3127(±0.0182)^{a}	0.2893(±0.0261)^{a}	0.4392(±0.0201)^{a}
LPT123-TC171 NaCl 0%(w/v)	0.2827(±0.0092)^{b}	0.4694(±0.0480)^{b}	0.9242(±0.0858)^{d}	0.8103(±0.1206)^{c}
LPT123-TC171 NaCl 0.5%(w/v)	0.1898(±0.0236)^{a}	0.2954(±0.0435)^{a}	0.4649(±0.0439)^{b}	0.6415(±0.0205)^{b}

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันหลังตัวเลขในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P< 0.05)



ภาพที่ 9 น้ำหนักแห้งของต้น LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v)

2.2.3 น้ำหนักสดของราก

น้ำหนักสดรากของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 – TC171 เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์เดิม LPT123 ในภาวะปกติ พบว่าสัปดาห์ที่ 2 และ สัปดาห์ที่ 4 น้ำหนักสดรากของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มในภาวะปกติมากกว่าน้ำหนักสดรากของข้าวสายพันธุ์เดิมในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เมื่อให้ภาวะเค็มแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ข้าวสายพันธุ์ทนเค็มจะมากกว่าสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 เป็นต้นไป เมื่อเปรียบเทียบข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในภาวะปกติและภาวะเค็ม พบว่าน้ำหนักสดรากในสัปดาห์ที่ 3 ข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในภาวะปกติมีน้ำหนักสดรากมากกว่าข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในภาวะเค็ม และสัปดาห์สุดท้ายของการทดลองพบ ว่าน้ำหนักสดรากของข้าวพันธุ์ทนเค็มในภาวะปกติและภาวะเค็มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 9, ภาพที่ 10)

2.2.4 น้ำหนักแห้งของราก

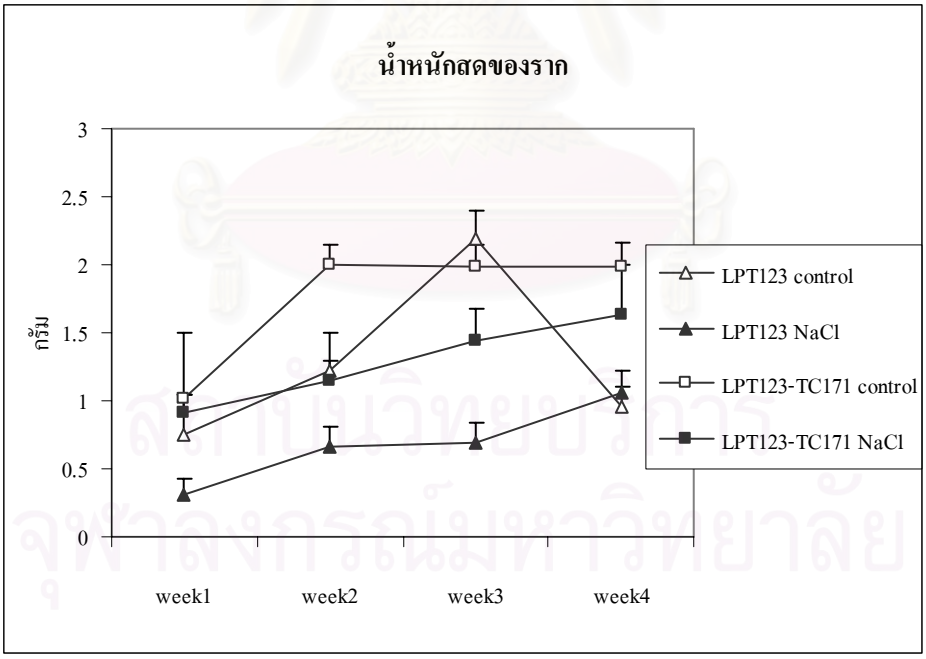
เมื่อวัดน้ำหนักแห้งรากของข้าวสายพันธุ์เดิม LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 – TC171 ในภาวะปกติ พบว่ามีเพียงสัปดาห์ที่ 2 ที่ต้นข้าวสายพันธุ์ทนเค็มมีน้ำหนักแห้งของรากมากกว่าพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เมื่อให้ภาวะเค็มพบว่า น้ำหนักแห้งรากของข้าวสายพันธุ์เดิมน้อยกว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็มอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างภาวะปกติและภาวะเค็ม พบว่าข้าวสายพันธุ์เดิมที่ปลูกในภาวะเค็มมีน้ำหนักแห้งรากน้อยกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมที่ปลูกในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญหลังจากปลูกในภาวะเค็มเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่ปลูกในภาวะเค็มและภาวะปกติมีน้ำหนักแห้งของรากไม่แตกต่างกันทางสถิติตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง (ตารางที่ 10, ภาพที่ 11)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 น้ำหนักสดของรากข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v)

สายพันธุ์และภาวะปลูก	น้ำหนักสดของราก (กรัม)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
LPT123 NaCl 0%(w/v)	0.7427(±0.3730)^{a}	1.2140(±0.2808)^{b}	2.1982(±0.1953)^{c}	0.9541(±0.1506)^{a}
LPT123 NaCl 0.5%(w/v)	0.3036(±0.1190)^{a}	0.6582(±0.1538)^{a}	0.6841(±0.1489)^{a}	1.0598(±0.1550)^{a}
LPT123-TC171 NaCl 0%(w/v)	1.012(±0.4890)^{a}	1.9944(±0.1505)^{c}	1.9920(±0.1519)^{c}	1.9786(±0.1862)^{b}
LPT123-TC171 NaCl 0.5%(w/v)	0.9165(±0.1318)^{a}	1.1511(±0.1364)^{b}	1.4438(±0.2261)^{b}	1.6288(±0.3678)^{b}

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันหลังตัวเลขในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P< 0.05)

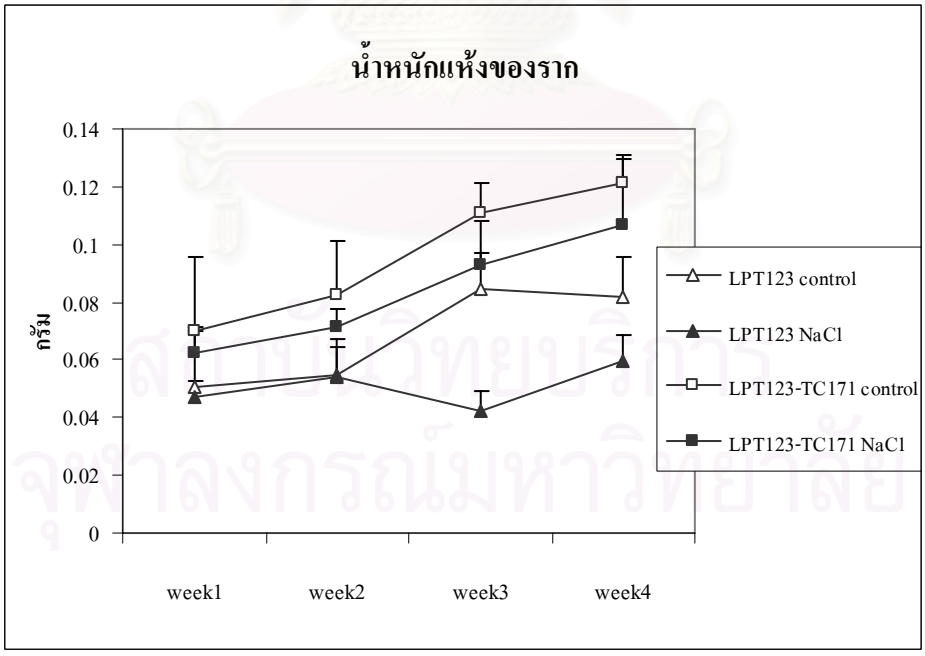


ภาพที่ 10 น้ำหนักสดของรากข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5% (w/v)

ตารางที่ 10 น้ำหนักแห้งของรากข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v)

สายพันธุ์และภาวะปลูก	น้ำหนักแห้งของราก (กรัม)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
LPT123 NaCl 0%(w/v)	0.0505(±0.0194)^{a}	0.0544(±0.0126)^{a}	0.0847(±0.0124)^{b}	0.0814(±0.0140)^{ab}
LPT123 NaCl 0.5%(w/v)	0.0470(±0.0059)^{a}	0.0537(±0.0104)^{a}	0.0419(±0.0074)^{a}	0.0597(±0.0091)^{a}
LPT123-TC171 NaCl 0%(w/v)	0.0699(±0.0256)^{a}	0.0825(±0.0186)^{b}	0.1109(±0.0101)^{b}	0.1214(±0.0094)^{b}
LPT123-TC171 NaCl 0.5%(w/v)	0.0623(±0.0093)^{a}	0.0715(±0.0060)^{ab}	0.0931(±0.0147)^{b}	0.1070(±0.0225)^{b}

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันหลังตัวเลขในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P< 0.05)



ภาพที่ 11 น้ำหนักแห้งของรากข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5% (w/v)

2.2.5 **พื้นที่ใบ**

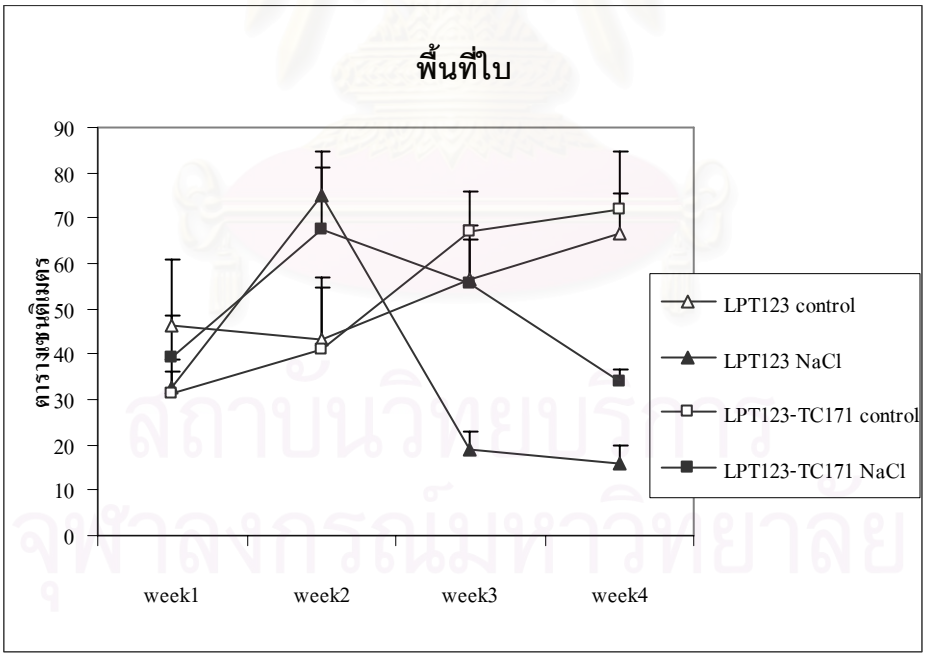
ข้าว LPT123 ซึ่งเป็นข้าวสายพันธุ์เดิมและ สายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 – TC171 ในภาวะปกติมีพื้นที่ใบไม่แตกต่างกันทางสถิติตลอดการทดลอง ในขณะที่เมื่อให้ภาวะเค็มแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์นั้น ในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 ของการทดลองพบว่าพื้นที่ใบของข้าวสายพันธุ์เดิมน้อยกว่าพื้นที่ใบของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างภาวะปกติและภาวะเค็มของทั้งสองสายพันธุ์พบว่า สัปดาห์ที่ 1 ไม่มีความแตกต่างของพื้นที่ใบใดๆทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 2 พบว่าเฉพาะในสายพันธุ์เดิมในภาวะปกติมีพื้นที่ใบสูงกว่าสายพันธุ์เดิมในภาวะเค็ม ในสัปดาห์ที่ 3 พบว่าพื้นที่ใบของข้าวสายพันธุ์เดิมที่ได้รับภาวะเค็มจะน้อยกว่าพื้นที่ใบของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญ แต่พื้นที่ใบของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่ได้รับภาวะเค็มไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในภาวะปกติ สัปดาห์สุดท้ายของการทดลองพบว่า ข้าวทั้งสองสายพันธุ์เมื่อได้รับภาวะเค็มจะมีพื้นที่ใบน้อยกว่าข้าวทั้งสองสายพันธุ์เมื่อปลูกในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 11, ภาพที่ 12)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 พื้นที่ใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5% (w/v)

สายพันธุ์และภาวะปลูก	พื้นที่ใบ (ตารางเซนติเมตร)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
LPT123 NaCl 0%(w/v)	46.26(±14.73)[a]	43.20(±11.46)[a]	56.60(±8.51)[b]	66.72(±8.66)[c]
LPT123 NaCl 0.5%(w/v)	32.52(±6.51)[a]	75.11(±5.98)[b]	18.87(±4.12)[a]	16.28(±3.85)[a]
LPT123-TC171 NaCl 0%(w/v)	31.23(±5.09)[a]	41.06(±15.77)[a]	66.97(±8.92)[b]	72.23(±12.59)[c]
LPT123-TC171 NaCl 0.5%(w/v)	39.24(±9.36)[a]	67.34(±17.38)[ab]	55.43(±12.78)[b]	34.05(±2.68)[b]

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันหลังตัวเลขในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P< 0.05)



ภาพที่ 12 พื้นที่ใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v)

3. การศึกษาปริมาณโพรลีนในใบของข้าว LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123- TC171 ในภาวะเค็ม

3.1 การศึกษาปริมาณโพรลีนในใบของข้าว LPT123 และ LPT123- TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วัน

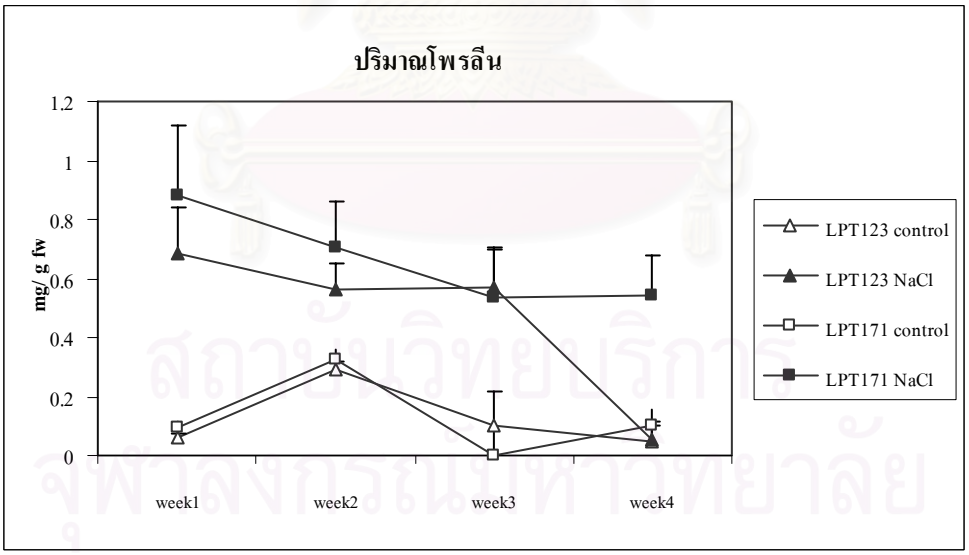
วัดปริมาณโพรลีนของข้าว LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่ย้ายต้นกล้าข้าวอายุ 15 วันปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3%(w/v) เมื่อให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณโพรลีนของข้าวทั้งสองสายพันธุ์เมื่อได้รับภาวะปกติไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติตลอดการทดลอง และ ปริมาณโพรลีนระหว่างข้าวสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ทนเค็มเมื่อได้รับภาวะเค็มไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใน 3 สัปดาห์แรกของการทดลอง ในสัปดาห์ที่ 4 พบว่าปริมาณโพรลีนในข้าวสายพันธุ์ทนเค็มเมื่อได้รับภาวะเค็มมากกว่าปริมาณโพรลีนในข้าวสายพันธุ์เดิมเมื่อได้รับภาวะเค็มอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในภาวะปกติและภาวะเค็มพบว่าปริมาณโพรลีนของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มเมื่อได้รับภาวะเค็มมากกว่าปริมาณโพรลีนของข้าวสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ทนเค็มที่ปลูกในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญตลอดช่วงการทดลอง และปริมาณโพรลีนของข้าวสายพันธุ์เดิมที่ได้รับภาวะเค็มมากกว่าปริมาณโพรลีนของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญใน 3 สัปดาห์แรกของการทดลอง (ตารางที่ 12, ภาพที่ 13)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 ปริมาณโพรลีนในใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 15 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0% และ 0.3%(w/v)

สายพันธุ์และภาวะปลูก	ปริมาณโพรลีน (มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักสด)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
LPT123 NaCl 0%(w/v)	0.0640(±0.0121)[a]	0.2887(±0.0289)[a]	0.1009(±0.1127)[a]	0.0502(±0.0674)[a]
LPT123 NaCl 0.3%(w/v)	0.6826(±0.1591)[b]	0.5618(±0.0918)[b]	0.5716(±0.1241)[b]	0.0552(±0.0484)[a]
LPT123-TC171 NaCl 0%(w/v)	0.0943(±0.0231)[a]	0.3242(±0.0328)[a]	0.0013(±0.0939)[a]	0.1003(±0.0540)[a]
LPT123-TC171 NaCl 0.3%(w/v)	0.8823(±0.2339)[b]	0.7072(±0.1519)[b]	0.5372(±0.1647)[b]	0.5420(±0.1349)[b]

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันหลังตัวเลขในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P< 0.05)



ภาพที่ 13 ปริมาณโพรลีนในใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 15 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.3% (w/v)

3.2 การศึกษาปริมาณโพรลีนในใบของข้าว LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อกล้าข้าวอายุ 22 วัน

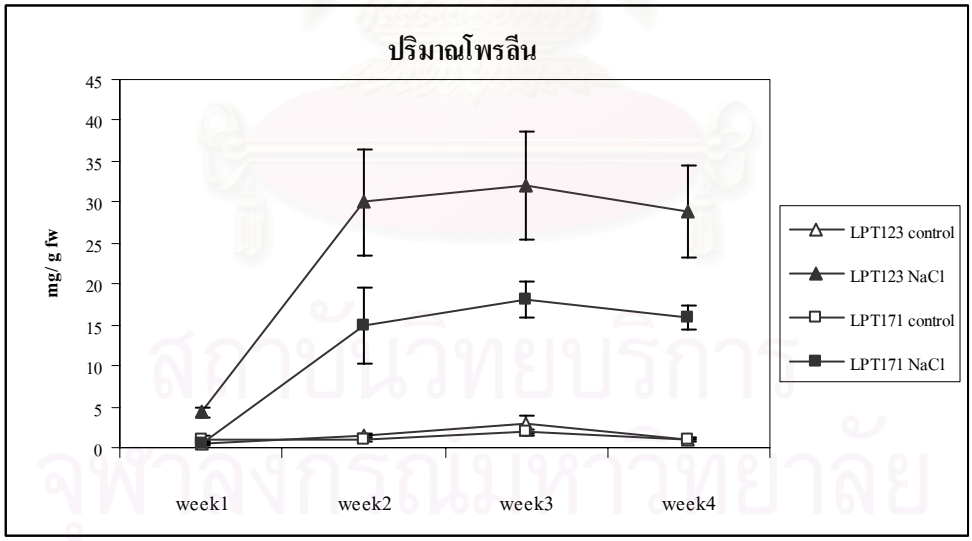
วัดปริมาณโพรลีนของข้าว LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่ย้ายปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v) เมื่อให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณโพรลีนของข้าวทั้งสองสายพันธุ์เมื่อได้รับภาวะปกติไม่มีความแตกต่างกันทางสถิตินับแต่สัปดาห์ที่ 2 ตลอดการทดลอง แต่เมื่อได้รับภาวะเค็ม ปริมาณโพรลีนของข้าวสายพันธุ์เดิมมากกว่าปริมาณโพรลีนของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มเมื่อได้รับภาวะเค็มตลอดการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโพรลีนในข้าวสายพันธุ์ทั้งสองสายพันธุ์เมื่อได้รับภาวะเค็มกับปริมาณโพรลีนในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในภาวะปกติ พบว่าปริมาณโพรลีนของข้าวสายพันธุ์เดิมที่ได้รับภาวะเค็มมากกว่าปริมาณโพรลีนของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญตลอดการทดลองการทดลอง และปริมาณโพรลีนของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มเมื่อได้รับภาวะเค็มมากกว่าปริมาณโพรลีนของข้าวทั้งสองสายพันธ์เมื่อปลูกในภาวะปกติ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง(ตารางที่ 13, ภาพที่ 14)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 ปริมาณโพรลีนในใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v)

สายพันธุ์และภาวะปลูก	ปริมาณโพรลีน (มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักสด)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
LPT123 NaCl 0%(w/v)	0.4387(±0.0791)[a]	1.5219(±0.1266)[a]	2.8531(±1.0403)[a]	1.0807(±0.1729)[a]
LPT123 NaCl 0.5%(w/v)	4.3323(±0.5852)[c]	30.001(±6.4078)[c]	31.951(±6.6116)[c]	28.7941(±5.6451)[c]
LPT123-TC171 NaCl 0%(w/v)	1.0800(±0.4377)[b]	0.9584(±0.2986)[a]	1.9102(±0.3965)[a]	0.87439(±0.2466)[a]
LPT123-TC171 NaCl 0.%(w/v)	0.5748(±0.0954)[ab]	14.935(±4.6875)[b]	18.101(±2.1383)[b]	15.8858(±1.4984)[b]

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันหลังตัวเลขในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P< 0.05)

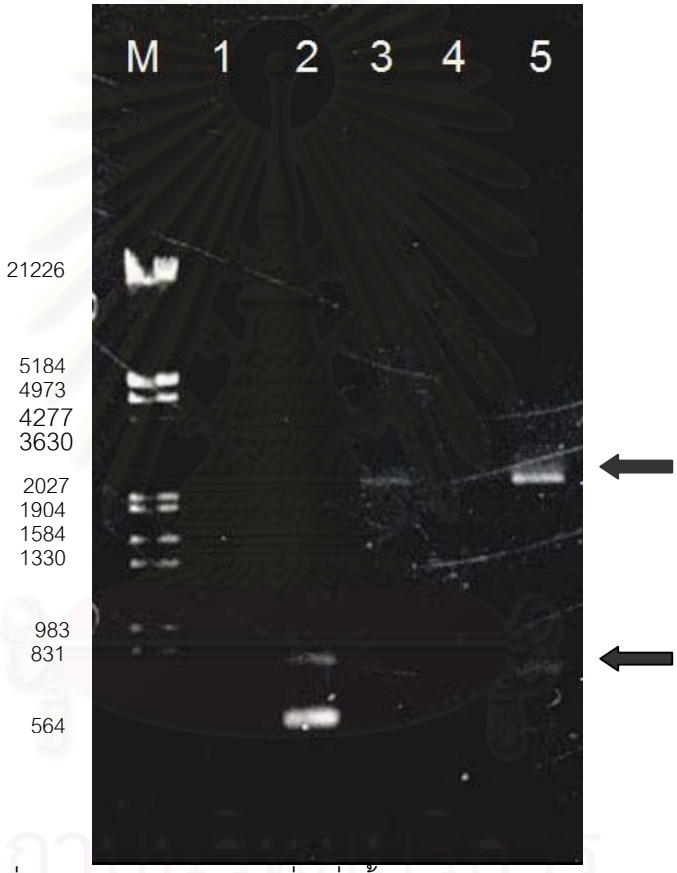


ภาพที่ 14 ปริมาณโพรลีนในใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4. การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ amplified ขึ้นด้วย primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *P5CS*

4.1 การเพิ่มชิ้นส่วนของ *P5CS* gene โดยใช้วิธี PCR

เมื่อทำปฏิกิริยา PCR ใน 2 ภาวะ Annealing temperature 40 °C และ 43 °C แล้วทำการตรวจสอบด้วยเครื่องมือแยกกรดนิวคลีอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ ผลจากทั้งสองปฏิกิริยา PCR ที่ใช้พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ ขนาดประมาณ 500 คู่เบสและ 2000 คู่เบส โดยทั้งสองภาวะที่ทำการศึกษาสามารถให้ DNA จำนวน 2แถบที่ไม่แตกต่างกัน แต่ที่ภาวะที่ใช้ annealing temperature 43 °C ให้แถบDNA ที่มีความเข้มมากกว่า (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนของ *P5CS* gene

โดย M = Marker (Lamda DNA digested with *Eco*RI and *Hin*DIII)

1 = ปฏิกิริยา PCR ที่ไม่ใส่ DNA template (Blank) Annealing temperature 40 °C

2 = ปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ primer Actin1/Actin2 (positive control) Annealing temperature 43 °C

3 = ปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ primer P5CSa/P5CSs Annealing temperature 40 °C

4 = ปฏิกิริยา PCR ที่ไม่ใส่ DNA template (Blank) Annealing temperature 43 °C

5 = ปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ primer P5CSa/P5CSs Annealing temperature 43 °C

4.2 การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำPCRโดยใช้ primer P5CSa/P5CSs

P5CS_500 ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 – TC171 ชิ้นส่วน DNAขนาดประมาณ 500 คู่เบส เมื่อทำการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยใช้ QIAGEN® PCR Cloning Kit (QIAGEN) ซึ่งมี pDrive เป็นดีเอ็นเอ พบว่าโคโลนีสีขาว (positive clone) หมายเลข 1-15 มี insert fragment ขนาดเท่ากับ fragment ที่ได้คัดแยกมาจากปฏิกิริยา PCR ทำการสุ่มเลือกโคลนP5CS_500_no.1 มาตรวจสอบลำดับเบสต่อไป

P5CS_2KBได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 – TC171 ขนาดประมาณ 2000 คู่เบส ทำการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีเดียวกัน พบว่าโคโลนีสีขาว(positive clone) หมายเลข 3-4, หมายเลข 26-27 และหมายเลข 29 มี insert fragment ขนาดเท่ากับ fragment ที่ได้คัดแยกมาจากปฏิกิริยา PCR ทำการสุ่มเลือกโคลน P5CS_2KB_5_no.27 มาตรวจสอบลำดับเบสต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การตรวจหาลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่โคลนและเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้ในฐานข้อมูลลำดับเบส (Genbank)

P5CS_500_no.7 มีขนาด 580 คู่เบส (ลำดับเบสแสดงในภาคผนวก ค) เมื่อทำการตรวจสอบหาชิ้นส่วน DNA ที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกันด้วย program BLASTN 2.2.8 (Altschu *et al*.,1997) แล้วพบว่าคล้ายคลึงกับลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสดังนี้

ตารางที่ 14 ตารางแสดงความคล้ายคลึงลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสของ P5CS_500_no.7

ลำดับเบสที่คล้ายคลึง	Accession number	ตำแหน่งของลำดับเบสในฐานข้อมูลที่คล้ายคลึงกับ P5CS_500_no.7	ตำแหน่งเบสของโคลนที่คล้ายคลึงกับลำดับเบสในฐานข้อมูล	Nucleotide sequence identity (%)
Oryza sativa (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 1	AP003229	19734-20285	8-563	98%
Rice cDNA from immature leaf including apical meristem (under short day condition) *Oryza sativa* (japonica cultivar-group)(EST)	AU183276	367-423	501-558	94%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

P5CS_2KB_no.27 (ลำดับเบสแสดงในภาคผนวก ค) เมื่อตรวจสอบด้วย program BLASTN แล้วพบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสดังนี้

ตารางที่ 15 ตารางแสดงความคล้ายคลึงลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสของP5CS_2KB_no.27

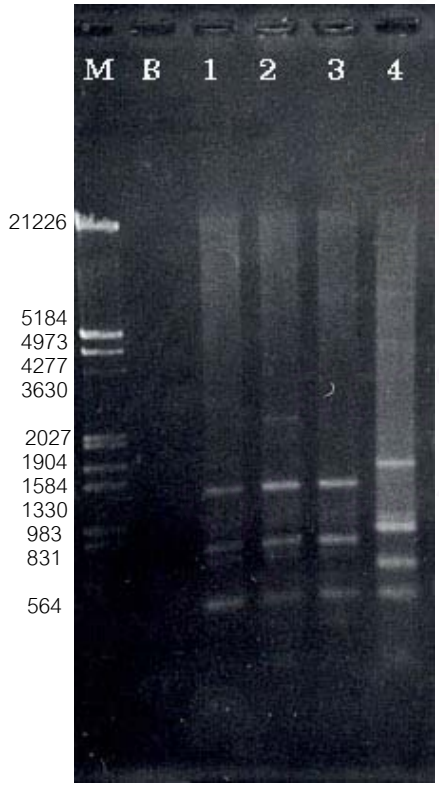
ลำดับเบสที่คล้ายคลึง	Accession number	ตำแหน่งของลำดับเบสในฐานข้อมูลที่คล้ายคลึงกับ P5CS_2KB_no.27	ตำแหน่งเบสของโคลนที่คล้ายคลึงกับลำดับเบสในฐานข้อมูล	Nucleotide sequence identity (%)
Oryza sativa mRNA for delta-pyrroline-5-carboxylate synthase 1	D49714	ช่วงที่ 1 1193-1025 ช่วงที่ 2 1273-1192 ช่วงที่3 1351-1270 ช่วงที่ 4 1028-916	ช่วงที่ 1 411-580 ช่วงที่ 2 218-299 ช่วงที่3 13-95 ช่วงที่ 4 716-826	98% 100% 96% 86%
Oryza sativa (japonica cultivar-group) cDNA clone:J033099M14, full insert sequence	AK102633	ช่วงที่ 1 1213-1045 ช่วงที่ 2 1293-1212 ช่วงที่ 3 1371-1290 ช่วงที่ 4 1048-940	ช่วงที่ 1 411-580 ช่วงที่ 2 218-299 ช่วงที่ 3 13-95 ช่วงที่ 4 716-822	98% 100% 96% 87%
Oryza sativa (japonica cultivar-group) putative delta 1 pyrroline-5-carboxylate synthetase (P0005H10.17), mRNA	NM190603	1310-1250	13-73	91%

5. การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ amplified ขึ้นด้วย primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *OAT*

5.1 การเพิ่มชิ้นส่วนของ *OAT* gene โดยใช้วิธี PCR

เมื่อทำปฏิกิริยา PCR ใน 3 ภาวะคือ $MgCl_2$ 1.5, 2.0 และ 2.5 mM และทำการตรวจสอบด้วยเครื่องมือแยกกรดนิวคลีอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ พบว่าชุดการทดลองที่ 1(lane ที่ 1 ในภาพที่ 16) และ 3(lane ที่ 3 ในภาพที่ 16) พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 3 แถบ ขนาดประมาณ 500 คู่เบส ขนาดประมาณ 800 คู่เบส และขนาดประมาณ 1200 คู่เบสตามลำดับ (ภาพที่ 16) ชุดการทดลองที่ 2 พบแถบดีเอ็นเอ 4 แถบ โดยมี 3 แถบเหมือนกับชุดการทดลองที่ 1 และ 3 แต่พบแถบดีเอ็นเออีก 1แถบที่ขนาดประมาณ 2500 คู่เบส (lane ที่ 2 ภาพที่ 16) ซึ่งได้เลือกแถบดีเอ็นเอที่ได้จากชุดการทดลองที่ 2 เพื่อทำการโคลนต่อไป

ภาพที่ 16 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนของ *OAT* gene ที่แปรความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 3 ความเข้มข้น



โดย M = Marker (Lamda DNA digested with *Eco*RI and *Hin*DIII)
B = ปฏิกิริยา PCR ไม่ใส่ primer (Blank)
1= ปฏิกิริยา PCR 1.5 μM $MgCl_2$ ใช้ primer OATa/OATs Annealing temperature 37 °C
2= ปฏิกิริยา PCR 2.0 μM $MgCl_2$ ใช้ primer OATa/OATs Annealing temperature 37 °C
3= ปฏิกิริยา PCR 2.5 μM $MgCl_2$ ใช้ primer OATa/OATs Annealing temperature 37 °C
4 = ปฏิกิริยา PCR 1.5 μM $MgCl_2$ใช้ primer Actin1/Actin2 (positive control) Annealing temperature 37 °C

5.2 การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำPCRโดยใช้ primer OATa/OATs

ชิ้นส่วน DNA OAT_500 ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 – TC171 ขนาดประมาณ 500 คู่เบส ทำการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยใช้ QIAGEN® PCR Cloning Kit (QIAGEN) ซึ่งมี pDrive เป็นดีเอ็นเอพาหะ โคโลนีหมายเลข 1 มี insert fragment ขนาดเท่ากับ fragment ที่ได้คัดแยกมาจากปฏิกิริยา PCR จึงนำโคลน OAT_500no.1_BW1มาตรวจสอบลำดับเบสต่อไป

ชิ้นส่วน DNA OAT_800 ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 – TC171 ขนาดประมาณ 800 คู่เบส ทำการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีเดียวกัน พบว่า plasmid จากโคโลนีสีขาวหมายเลข 1 มี insert fragment ขนาดเท่ากับ fragment ที่ได้คัดแยกมาจากปฏิกิริยา PCR จึงนำโคลน OAT_800_w1 มาตรวจสอบลำดับเบสต่อไป

ชิ้นส่วน DNA OAT_1.2 ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 – TC171 ขนาดประมาณ 1200 คู่เบส ทำการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีเดียวกัน โคโลนีสีขาวหมายเลข 4 มี insert fragment ขนาดเท่ากับ fragment ที่ได้คัดแยกมาจากปฏิกิริยา PCR จึงนำโคลน OAT_1.2_w4 มาตรวจสอบลำดับเบสต่อไป

ชิ้นส่วน DNA OAT_2.5 ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 – TC171 ขนาดประมาณ 1200 คู่เบส ทำการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีเดียวกัน โคโลนีสีขาวหมายเลข 1 เมื่อตัดด้วย *Eco*RI มี insert fragment ขนาดเท่ากับ fragment ที่ได้คัดแยกมาจากปฏิกิริยา PCR จึงนำโคลน OAT_2.5_w1มาตรวจสอบลำดับเบสต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.3 การตรวจหาลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่โคลนและเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้ในฐานข้อมูลลำดับเบส (Genbank)

OAT_500no.1_BW1 ขนาด 308 คู่เบส (ลำดับเบสแสดงในภาคผนวก ค) เมื่อตรวจสอบด้วย program BLASTN พบว่าคล้ายคลึงกับลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสดังนี้

ตารางที่ 16 ตารางแสดงความคล้ายคลึงลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสของ OAT_500no.1_BW1

ลำดับเบสที่คล้ายคลึง	Accession number	ตำแหน่งของลำดับเบสในฐานข้อมูลที่คล้ายคลึงกับ OAT_500no.1_BW1	ตำแหน่งเบสของโคลนที่คล้ายคลึงกับลำดับเบสในฐานข้อมูล	Nucleotide sequence identity (%)
Oryza sativa (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 7	AP005199	569-283	13-301	99%
Oryza sativa (japonica cultivar-group) cDNA clone:J013025M10, full insert sequence	AK065493	ช่วงที่ 1 434-299 ช่วงที่ 2 302-247	ช่วงที่ 1 30-149 ช่วงที่ 2 246-301	100% 100%
OML02926 *Oryza minuta* HybriZAP-2.1 XR library *Oryza minuta* cDNA 5' (EST)	CB212646	ช่วงที่ 1 532-396 ช่วงที่ 2 398-344	ช่วงที่ 1 29-165 ช่วงที่ 2 247-301	97% 100%

OAT_800_w1 ขนาด 609 คู่เบส (ลำดับเบสแสดงในภาคผนวก ค) เมื่อตรวจสอบด้วย program BLASTN พบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสดังนี้

ตารางที่ 17 ตารางแสดงความคล้ายคลึงลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสของ OAT_800_w1

ลำดับเบสที่คล้ายคลึง	Accession number	ตำแหน่งของลำดับเบสในฐานข้อมูลที่คล้ายคลึงกับ OAT_800_w1	ตำแหน่งเบสของโคลนที่คล้ายคลึงกับลำดับเบสในฐานข้อมูล	Nucleotide sequence identity (%)
Oryza sativa (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 2	AP004136	61076-61670	5-599	99%
NRS2_0_I08 Drought stress (root) *Oryza sativa* (indica cultivar-group) cDNA clone NRS2_0_I08 3'(EST)	BI305367	131-97	307-341	91%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OAT_1.2_w4 (ลำดับเบสแสดงในภาคผนวก ค) เมื่อตรวจสอบด้วย program BLASTN พบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสดังนี้

ตารางที่ 18 ตารางแสดงความคล้ายคลึงลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสของ OAT_1.2_w4

ลำดับเบสที่คล้ายคลึง	Accession number	ตำแหน่งของลำดับเบสในฐานข้อมูลที่คล้ายคลึงกับ OAT_1.2_w4	ตำแหน่งเบสของโคลนที่คล้ายคลึงกับลำดับเบสในฐานข้อมูล	Nucleotide sequence identity (%)
Oryza sativa (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 1	AP003225	123454-124149	6-701	96%
Oryza sativa (japonica cultivar-group) cDNA clone:J033072F06, full insert sequence	AK121694	331-152	173-353	97%
AF53-Rpf_09_O01_T7_015.ab1 IRRI Drought Stress Panicle Library *Oryza sativa* (indica cultivar-group) cDNA clone C0003409 5' similar to Hypothetical 16.5 kDa protein in PAS8-EGT2 intergenic region (EST)	CB096844	352-173	173-353	99%
OD104E10 OD *Oryza sativa* cDNA 5' similar to dnaj domain-containing protein (EST)	BE040093	173-1	172-345	88%

OAT_2.5_w1 (ลำดับเบสแสดงในภาคผนวก ค) เมื่อตรวจสอบด้วย program BLASTN พบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสดังนี้

ตารางที่ 19 ตารางแสดงความคล้ายคลึงลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสของ OAT_2.5_w1

ลำดับเบสที่คล้ายคลึง	Accession number	ตำแหน่งของลำดับเบสในฐานข้อมูลที่คล้ายคลึงกับ OAT_2.5_w1	ตำแหน่งเบสของโคลนที่คล้ายคลึงกับลำดับเบสในฐานข้อมูล	Nucleotide sequence identity (%)
Oryza sativa (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 2	AP005776	44499-44016	11-494	99%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด RNA จากต้นข้าว

การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด RNA จากต้นข้าวโดยการทดลองสกัด RNA ของใบข้าวและรากข้าวด้วยวิธีการ hot phenol(Anonymous, 1993) วิธีสกัด RNA จากเนื้อเยื่อที่มีแป้งมาก(Logemann *et al.*, 1987) และการใช้ Trizol Reagent (GibcoBRL® California, USA) เมื่อนำมาวัด OD_{260} เพื่อวัดปริมาณ RNA พบว่า ในชิ้นส่วนพืชที่อายุเท่ากันและใช้น้ำหนักชิ้นส่วนที่นำมาสกัด RNA ปริมาณที่เท่ากันการใช้ Trizol reagent ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้สกัด RNA ที่ใช้ในการค้าจะได้ปริมาณ RNA มากที่สุดและปริมาณ RNA ที่ได้จากใบจะมากกว่าราก ในขณะที่การสกัดด้วยวิธีการของ Logemann และคณะ (1987) และ Hot phenol จะได้ปริมาณ RNA น้อยกว่าการใช้ Trizol Reagent อย่างมากในทุกอายุของต้นข้าว และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 2 วิธีนี้การสกัด ปริมาณ RNA ที่ได้โดยส่วนใหญ่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นในต้นข้าวอายุ 4 สัปดาห์การสกัด RNA ด้วยวิธี Hot phenol ให้ผลดีกว่าการสกัดด้วยวิธีการของ Logemann และคณะ(1987) แต่ในช่วงอายุต้นข้าว 3 และ 5 สัปดาห์การสกัด RNA จากใบข้าวไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่120)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 20 แสดงปริมาณRNA ที่ได้จากใบและรากของข้าวน้ำหนัก 1 กรัมเมื่อใช้วิธีการสกัด RNA 3 วิธี โดย วิธีที่ 1 = วิธี Hot Phenol (Anonymous, 1993)

วิธีที่ 2 = วิธีสกัด RNA จากเนื้อเยื่อที่มีแป้งมาก (Logemann *et al*., 1987)

วิธีที่ 3 = วิธีการตามคู่มือของ Trizol Reagent (GibcoBRL® California, USA)

ชิ้นส่วนของต้นข้าวที่ทำการสกัด	ปริมาณ RNA(ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม)		
	วิธีที่ 1	วิธีที่ 2	วิธีที่ 3
ใบข้าวอายุ 3 สัปดาห์	84.1770(±12.2775)^{Ba}	39.1540(±13.3520)^{Ab}	559.3250(±28.7832)^{Dc}
รากข้าวอายุ 3 สัปดาห์	20.9359(±12.3824)^{Aa}	164.3312(±55.2286)^{Bb}	319.8950(±12.7918)^{Cc}
ใบข้าวอายุ 4 สัปดาห์	45.5162(±12.0571)^{Aa}	128.5007(±55.1893)^{Ba}	399.9760(±88.9091)^{Cb}
รากข้าวอายุ 4 สัปดาห์	38.0968(±19.9896)^{Aa}	221.9950(±60.8299)^{Cb}	254.5650(±20.3399)^{Bb}
ใบข้าวอายุ 5 สัปดาห์	112.8580(±45.8048)^{Ca}	62.9842(±24.7572)^{Aa}	504.3700(±40.0612)^{Db}
รากข้าวอายุ 5 สัปดาห์	86.2136(±15.4797)^{Ba}	70.3446(±24.3282)^{Aa}	168.7225(±62.0708)^{Aa}

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันหลังตัวเลขในแนวตั้งและแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P< 0.05$)

เมื่อศึกษาอัตราส่วนของ OD_{260}/OD_{280} ซึ่งอัตราส่วนของ OD_{260}/OD_{280} เมื่อ RNAปนเปื้อนสารประกอบอื่นๆ น้อยคือ 1.8-2.0 (Sambrook *et al*., 1993) ผลพบว่าวิธี Hot phenol และ Trizol Reagent ให้ RNA ที่มีอัตราส่วน OD_{260}/OD_{280} ใกล้เคียง 1.8-2.0 มากกว่าวิธีสกัด RNA จากเนื้อเยื่อที่มีแป้งมาก (ตารางที่ 21)

ตารางที่ 21 อัตราส่วนของ OD_{260}/OD_{280} ของ RNA จากเนื้อเยื่อข้าวที่ใช้วิธีการสกัด RNA 3 วิธี

วิธีสกัด RNA	อัตราส่วนของ OD_{260}/OD_{280}
วิธี Hot Phenol	1.6-2.2
วิธีสกัด RNA จากเนื้อเยื่อที่มีแป้งมาก	2.2-2.5
วิธีการตามคู่มือของ Trizol Reagent	1.6-2.2

8. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรลีนในข้าวพันธุ์เหลืองประทิวและสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation **ในหลอดทดลองเหลืองประทิว** 123-TC171 **รุ่นที่** 6 **ในภาวะเค็ม ด้วยวิธี** Northern Blot Analysis

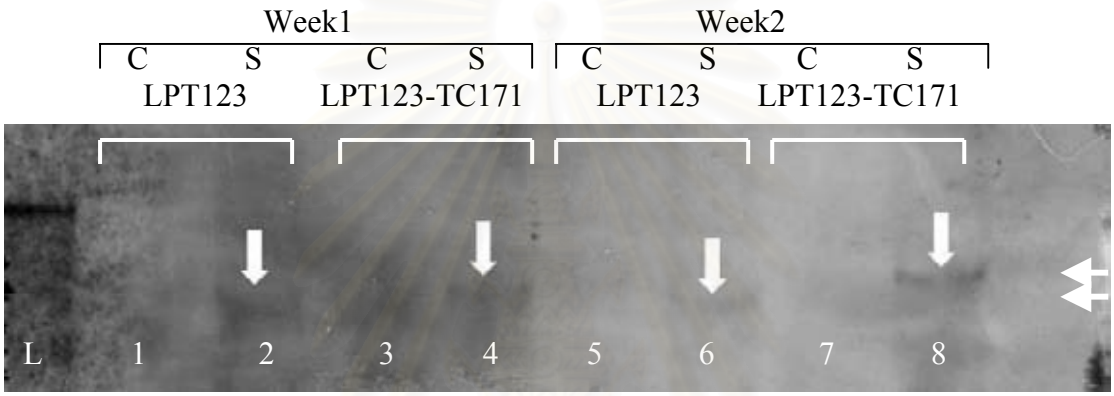
8.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* **ในข้าว** LPT123 **และ** LPT123- TC171 **ด้วยวิธี** Northern Blot Analysis

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* ในข้าวพันธุ์เหลืองประทิวและสายพันธุ์ทนเค็มเหลืองประทิว 123-TC171 รุ่นที่ 6 ในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 ของการทดลอง ด้วยวิธี Northern Blot Analysis โดยใช้โคลน P5CS_2KB_no.27 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสบางส่วนของ *Oryza sativa P5CS1* mRNA (Accession number D49714) เป็น probe ผลปรากฏดังนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8.1.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วัน

ศึกษาเปรียบเทียบกับข้าวทั้งสองสายพันธุ์อายุเท่ากันที่ปลูกในภาวะปกติซึ่งผลของ Northern Blot Analysis โดยใช้อุณหภูมิ hybridization 42 °C ไม่พบสัญญาณ mRNA จึงทำการลดอุณหภูมิ hybridization เป็น 40 °C ผลพบสัญญาณ mRNA ขนาดประมาณ 1.4 kb จำนวน 1 แถบปรากฏในต้นสายพันธุ์เดิมที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 0.3% (w/v) ทั้งสองสัปดาห์ ดังรูปที่ 19 ในต้นสายพันธุ์ทนเค็มที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 0.3% (w/v) ทั้งสองสัปดาห์ พบสัญญาณ mRNA ขนาดประมาณ 1.5 kb (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 Northern Blot Analysis ของข้าวLPT123 และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 – TC171 เมื่อได้รับภาวะเค็ม 0.3 % NaCl (w/v) โดยใช้โคลน P5CS_2KB_no.27 เป็น probe

โดย L = RNA ladder

1 = LPT123 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารภาวะปกติ เป็นเวลา 1 สัปดาห์

2 = LPT123 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่เติม 0.3% NaCl (w/v) เป็นเวลา 1 สัปดาห์

3 = LPT123-TC171 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารภาวะปกติ เป็นเวลา 1 สัปดาห์

4 = LPT123-TC171 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่เติม 0.3% NaCl (w/v) เป็นเวลา 1สัปดาห์

5 = LPT123 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารภาวะปกติ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

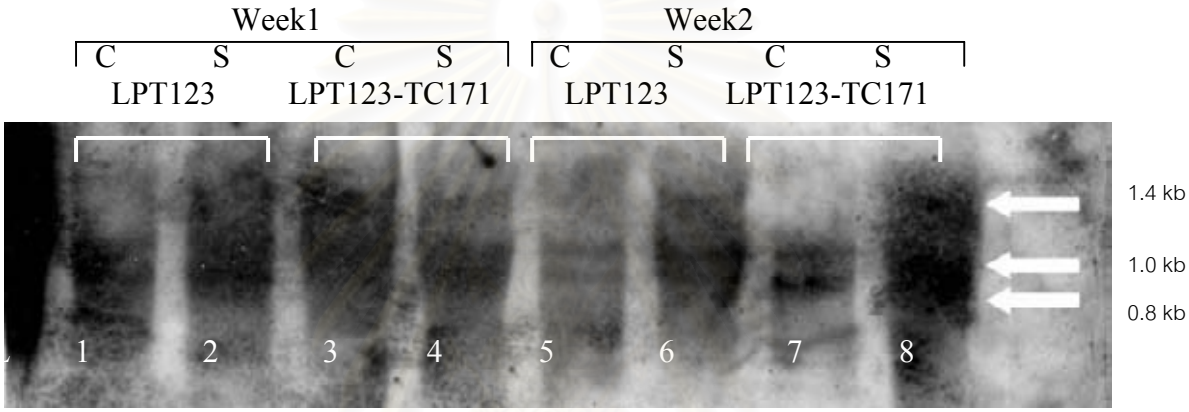
6 = LPT123 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่เติม 0.3% NaCl (w/v) เป็นเวลา 2 สัปดาห์

7 = LPT123-TC171 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารภาวะปกติ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

8 = LPT123-TC171 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่เติม 0.3% NaCl (w/v) เป็นเวลา 2สัปดาห์

8.1.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* เมื่อกล้าข้าวอายุ 22 วัน

ศึกษาเปรียบเทียบกับข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่ปลูกในภาวะปกติกับในภาวะเค็มเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ซึ่งผลของ Northern Blot Analysis โดยใช้อุณหภูมิ hybridization 42 °C พบสัญญาณ mRNA จำนวน 3 แถบ ขนาดประมาณ 1.4 kb 1.0 kb และ 0.8 kb โดย band ขนาดประมาณ 1.0 kb และ 0.8 kb ปรากฏในทั้งสองสายพันธุ์ทั้งสองภาวะ แต่ band ขนาดประมาณ 1.4 kb จะปรากฏในทั้งสองสายพันธุ์ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 0.5% (w/v) ทั้งสองสัปดาห์ และสายพันธุ์ทนเค็มในภาวะปกติสัปดาห์แรก ดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 Northern Blot Analysis ของข้าวพันธุ์ LPT123 และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 – TC171เมื่อได้รับภาวะเค็ม 0.5 % NaCl (w/v) โดยใช้โคลน P5CS_2KB_no.27 เป็น probe

โดย L = RNA ladder

1 = LPT123 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารภาวะปกติ เป็นเวลา 1 สัปดาห์

2 = LPT123 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่เติม 0.5% NaCl (w/v) เป็นเวลา 1 สัปดาห์

3 = LPT123-TC171 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารภาวะปกติ เป็นเวลา 1 สัปดาห์

4 = LPT123-TC171 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่เติม 0.5% NaCl (w/v) เป็นเวลา 1สัปดาห์

5 = LPT123 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารภาวะปกติ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

6 = LPT123 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่เติม 0.5% NaCl (w/v) เป็นเวลา 2 สัปดาห์

7 = LPT123-TC171 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารภาวะปกติ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

8 = LPT123-TC171 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่เติม 0.5% NaCl (w/v) เป็นเวลา 2สัปดาห์

8.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน *OAT* ในข้าวพันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 ด้วยวิธี Northern Blot Analysis

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *OAT* ในข้าวพันธุ์เหลืองประทิวและสายพันธุ์ทนเค็มเหลืองประทิว 123-TC171 รุ่นที่ 6 ด้วยวิธี Northern Blot Analysis โดยใช้ *OAT* cDNA จาก mothbean (*Vigna aconitifolia*) ซึ่ง insert อยู่ใน pcDNA II เป็น probe อุณหภูมิ hybridization 42 °C และ 40 °C ไม่ปรากฏสัญญาณ mRNA ใดๆ เมื่อทำการทดลองโดยใช้อุณหภูมิ hybridization 38 °C พบว่าภาพที่ได้มี background สูงมากจนไม่สามารถระบุได้ว่ามีสัญญาณ mRNA หรือไม่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

1. การศึกษาอัตราการรอดตายของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง LPT123- TC171 รุ่นที่ 6 ในภาวะเค็ม

การศึกษาอัตรารอดตายในภาวะเค็มของกล้าข้าวอายุ 15 วันพบว่า ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 – TC171มีอัตรารอดตายสูงกว่าสายพันธุ์เดิมทั้งที่ให้ระดับความเค็ม 0.3%NaCl (w/v) และ 0.5% NaCl (w/v) แต่ในข้าวอายุ 15 วัน เมื่อได้รับภาวะเค็มที่ให้ NaCl 0.5%(w/v) เมื่อถึงสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลองพบว่าข้าวทั้งสองสายพันธุ์ตายทั้งหมด ทำให้ไม่สามารถศึกษาลักษณะการตอบสนองต่อความเค็มต่างๆ ได้ จึงเลือกใช้ความเค็มที่ระดับ 0.3% NaCl ในการศึกษาการตอบสนองต่อความเค็ม เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วันในการศึกษาด้านต่างๆ ต่อไป

การศึกษาอัตรารอดตายในภาวะเค็มของกล้าข้าวอายุ 22 วัน (มีใบจำนวน 5 ใบ) พบว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็มมีอัตราการรอดตายสูงกว่าสายพันธุ์เดิมเช่นกัน การทดลองครั้งนี้ให้ภาวะเค็มที่ 0.5 % NaCl เพียงภาวะเดียว เนื่องจากเป็นภาวะที่ได้รับการคัดเลือกสายพันธุ์ทนเค็มนี้ ในช่วงต้นกล้า 5 ใบมาแล้วเป็นเวลา 5 ชั่วรุ่น (ทิพยวรรณ ธนไพศาล, 2534)

อนึ่งผลการทดลองอัตรารอดตายไม่ได้ทำซ้ำเนื่องจากข้อจำกัดของระยะเวลาในการปลูกต่อการทดลองประมาณ 2 เดือน ที่จำเป็นต้องทำการทดลองวัดการเจริญเติบโต การสะสมโพรลีน และเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อใช้ในการสกัด RNA ต่อไป นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดของพื้นที่ปลูกทำให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนต้นที่ปลูกต่อครั้งได้ จึงไม่สามารถนำอัตรารอดตายมาวัดด้วยสถิติได้

อัตรารอดตายของข้าวสายพันธุ์ LPT123-TC171 ในรุ่นที่ 6 นี้เมื่อนำกลับไปเปรียบเทียบกับการศึกษาอัตรารอดตายของรุ่นที่ 1-5 ที่ศึกษาและคัดเลือกโดย ทิพยวรรณ ธนไพศาล (2534) ในภาวะเค็ม 0.5% NaCl (w/v)เมื่อต้นกล้ามีอายุ 22 วัน พบว่ามีอัตราการรอดตายลดลง คือจาก รุ่นที่ 5 มีอัตรารอดตาย 89.7% การศึกษาครั้งนี้อัตรารอดตายของกล้าข้าวอายุ 22 วันเมื่อได้รับภาวะเค็ม 0.5%(w/v) มีเพียง 46% ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนสถานที่ทำการทดลอง ลักษณะสภาพโรงเรือนที่มีลักษณะแตกต่างกันมีอิทธิพลต่ออุณหภูมิและแสงที่พืชได้รับขณะทำการทดลอง มีรายงานว่าอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ค่า EC เพิ่มขึ้น (อรุณี ยูวะนิยม, 2531) ซึ่งค่า EC ที่สูงจะทำให้ภาวะเค็มที่พืชได้รับรุนแรงขึ้น ประกอบกับอุณหภูมิที่สูง

ทำให้การคายน้ำของพืชมากขึ้นและทำให้มีการสะสมของโซเดียมไอออนและคลอไรด์ไอออนมากขึ้นตามไปด้วย (Neumann,1997) จึงอาจเป็นผลทำให้อัตราการรอดตายของ LPT123-TC171 ต่ำลง รวมทั้งอาจเป็นเพราะต้นข้าวที่ย้ายปลูกลงในภาวะเค็มนั้นยังคงได้รับความกระทบกระเทือนต่อการเจริญเติบโตขณะการย้ายปลูก

อัตรารอดตายในภาวะเค็มเมื่อต้นกล้ามีอายุ 15 วัน มีอัตรารอดตายต่ำกว่าอัตรารอดตายของต้นกล้าข้าวอายุ 22 วัน โดยมีอัตราการรอดตาย 30 %ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าเมื่อต้นข้าวอายุน้อยจะมีความทนทานต่อความเค็มต่ำกว่าต้นข้าวอายุมากขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Pearson และคณะ (1966) ซึ่งรายงานว่าข้าวจะตอบสนองต่อความเค็มในแต่ละช่วงอายุต่างกันด้วย

2. การศึกษาการเจริญเติบโตของข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 ในภาวะเค็ม

การศึกษาการเติบโตในต้นข้าวอายุ 15 วัน ให้ภาวะเค็มที่ NaCl 0.3%(w/v)พบว่า ข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 – TC171 มีการเจริญเติบโตแทบไม่แตกต่างกับข้าวเหลืองประทิว 123 สายพันธุ์เดิม ลักษณะที่แตกต่างกันชัดเจนที่สุดของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มกับสายพันธุ์เดิม คือ น้ำหนักสดของต้น ซึ่งเห็นชัดเจนในสัปดาห์ที่ 3 เป็นต้นไป ซึ่งเป็นไปได้ว่าการรักษาน้ำไว้ในเซลล์ของสายพันธุ์ทนเค็มน่าจะดีกว่าสายพันธุ์เดิม แต่หากพิจารณาจากน้ำหนักแห้งและพื้นที่ใบแล้วการเติบโตของต้นข้าวอายุ 15 วันที่ให้ภาวะเค็ม NaCl 0.3%(w/v) ของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ไม่แตกต่างกัน

การศึกษาการเติบโตในต้นข้าวอายุ 22 วัน ให้ภาวะเค็มที่ NaCl 0.5%(w/v)พบว่า ข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 – TC171 มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าสายพันธุ์เดิมอย่างชัดเจนมากกว่าผลที่ได้จากต้นข้าวอายุ 15 วัน โดยเฉพาะการรักษาน้ำหนักสดของต้นและรากมากกว่าสายพันธุ์เดิมอย่างชัดเจน น้ำหนักแห้งของต้นที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญแสดงถึงอัตราการเติบโตที่มากกว่า ในขณะที่น้ำหนักแห้งของรากและพื้นที่ใบมีความผันแปรที่ค่อนข้างสูงทั้งสองสายพันธุ์ อาจเป็นไปได้ว่าจะเกิดจากการตายของเนื้อเยื่อที่เกิดเนื่องจากภาวะเค็มและมีการสร้างใหม่ขึ้นมาทดแทน ทำให้น้ำหนักแห้งและพื้นที่ใบมีความแปรผันสูง

ลักษณะที่น่าสนใจเกี่ยวกับต้นกล้าอายุ 22 วันของสายพันธุ์ทนเค็มยังพบว่ามีการเจริญเติบโตในภาวะปกติสูงกว่าในต้นข้าวสายพันธุ์เดิมที่ปลูกในภาวะปกติเช่นเดียวกันด้วย ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนจากผลของน้ำหนักสดของต้นที่สายพันธุ์ทนเค็มสูงกว่าสายพันธุ์เดิมตลอดการทดลอง รวมทั้งน้ำหนักแห้งของต้นตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 และ 4 ของการทดลอง การเติบโตที่ดีกว่าเช่นนี้อาจส่งผลให้ความสามารถในการทนเค็มของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่มีอายุ 22 วันด้วย และแสดงให้เห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม การเกิดความแปรผันทางพันธุกรรม

ที่เกิดขึ้นในต้นข้าวสายพันธุ์ทนเค็มนี้ยังแสดงออกในลักษณะ Phenotype อื่นๆ ของต้นข้าวนอกเหนือจากความสามารถในการทนเค็มด้วย

จากการศึกษาทั้งอัตรารอดตายและการเจริญเติบโตของต้นข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่ได้รับภาวะปกติและภาวะเค็มจะเห็นได้ว่าอายุของต้นกล้าข้าวมีผลต่อความสามารถในการทนเค็มของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มนี้ด้วย โดยกล้าข้าวอายุน้อยจะมีความสามารถทนเค็มน้อยกว่ากล้าข้าวที่อายุมากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pearson และคณะ (1966) ที่ระบุว่ากล้าข้าวอายุ 2-5 ใบจะอ่อนแอต่อความเค็ม 2 ระยะคือ ต้นกล้า 2-5 ใบและระยะออกดอก ซึ่งต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันที่ทำการศึกษามีจำนวนใบ 5 ใบแล้วขณะเริ่มให้ภาวะเค็มอาจทำให้การทนทานต่อภาวะเค็มมากกว่า ในขณะที่ต้นกล้าข้าวอายุ 15 วันที่ทำการศึกษามีจำนวนใบ 3 ใบเมื่อเริ่มให้ภาวะเค็มทำให้สัปดาห์แรกของการให้ภาวะเค็มของกล้าข้าวอายุ 15 วันเป็นช่วงที่อ่อนแอมากกว่า

3. การศึกษาปริมาณโพรลีนในใบของข้าว LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123- TC171 ในภาวะเค็ม

ข้าวพันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123 – TC171 มีปริมาณโพรลีนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อได้รับภาวะเค็ม โดยเมื่อต้นข้าวทั้งสองสายพันธุ์อายุ 15 วันได้รับภาวะเค็ม NaCl 0.3% (w/v) พบว่ามีปริมาณโพรลีนในสัปดาห์ที่ 1 -3 ไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลของการเจริญเติบโต แต่เมื่อต้นข้าวอายุ 22 วันได้รับภาวะเค็ม NaCl 0.5%(w/v) พบว่าสายพันธุ์เดิมมีปริมาณโพรลีนสูงกว่าสายพันธุ์ทนเค็มอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลของปริมาณโพรลีนที่ได้จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าโพรลีนอาจไม่เกี่ยวข้องกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนเค็มของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มนี้ จากผลการทดลอง คือในช่วงอายุ 15 วันแม้จะมีอัตรารอดตายสูงกว่าแต่ผลการเจริญเติบโตและปริมาณโพรลีนระหว่างสองสายพันธุ์นี้มีแนวโน้มไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ช่วงอายุ 22 วัน สายพันธุ์ทนเค็มมีอัตรารอดตายและการเจริญเติบโตมากกว่า แต่ปริมาณโพรลีนน้อยกว่าสายพันธุ์เดิม ทำให้ผลการทดลองนี้น่าจะสนับสนุนแนวคิดของ Lutts และคณะ (1996,1999) ซึ่งทำการศึกษาเกี่ยวกับการสะสมโพรลีนในข้าวพันธุ์ทนเค็ม Nona Bokra และพบว่าข้าวพันธุ์ทนเค็มมีการสะสมโพรลีนที่ต่ำกว่าข้าวพันธุ์ที่ไวต่อความเค็ม(I Kong Pao) รวมทั้งปริมาณและการทำงานของเอนไซม์ OAT และ P5CR ไม่สอดคล้องกับโพรลีนที่สะสม จึงได้เสนอแนวคิดว่า การสะสมโพรลีนในข้าวเมื่อได้รับภาวะเค็มนั้นเป็นสัญญาณว่าข้าวมีความเสียหายเนื่องจากภาวะเค็ม สอดคล้องกับรายงานที่เสนอข้อขัดแย้งเกี่ยวกับบทบาทของโพรลีน โดยเสนอว่าการสะสมโพรลีนในพืชอาจเป็นผลของภาวะเครียด (Delauney and Verma, 1993; Hare and Cress, 1997; Madan *et al*., 1995: อ้างถึงใน Nanjo *et al*., 1999b) ได้ ผลการเจริญเติบโตชี้ให้เห็นว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็มน่าจะมี

การรักษาปริมาณน้ำในเนื้อเยื่อได้ดีกว่าทำให้คาดว่า osmotic stress ภายในเซลล์ของสายพันธุ์ทนเค็มเกิดน้อยกว่า ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการปรับตัวของข้าวสายพันธุ์นี้เป็นการสะสมไอออนหรือ Osmolyte ต่างๆ ไว้ใน vacuole และ cytosol เพื่อปรับค่าออสโมติก (Flowers *et al*., 1977)

ปริมาณโพรลีนที่มีในพืชเกิดจากความสมดุลระหว่างการสร้างและสลายโพรลีน เมื่อเกิดภาวะ osmotic stress การสลายโพรลีนจะถูกยับยั้ง (Boggess *et al*., 1976) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวมีเอนไซม์ proline dehydrogenase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และเมื่อกิจกรรมของเอนไซม์นี้ลดลงทำให้มีการสะสมโพรลีนสูงขึ้น (Nanjo *et al*., 1999) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าการเกิด osmotic stress ของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มมีน้อยกว่าในข้าวสายพันธุ์เดิม ทำให้กิจกรรมของ proline dehydrogenase ในข้าวสายพันธุ์เดิมถูกยับยั้งมากขึ้น จึงมีการสะสม โพรลีนสูงกว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม อย่างไรก็ดีควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกิจกรรมของเอนไซม์ proline dehydrogenase เพื่อตรวจสอบสมมติฐานดังกล่าว

นอกจากนี้ยังไม่แน่ชัดว่าความสามารถทนเค็มในข้าวเกิดจากการสะสมโพรลีน เนื่องจากมีรายงานเกี่ยวกับการเปรียบเทียบการสะสมโพรลีนและ glycine betaine ของพืชจำพวกหญ้ากับความสามารถทนเค็ม ซึ่งรายงานว่าความสามารถในการทนเค็มของพืชวงศ์ Poaceae บางชนิดน่าจะเป็นผลจากการสะสม glycine betaine มากกว่า (Colmer *et al*., 1995; Marcum, 1999) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็มนี้จะใช้สารอื่นนอกเหนือจากโพรลีนในการเพิ่มความสามารถในการทนเค็มเช่นกัน

4. การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ amplified ขึ้นด้วย primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *P5CS*

ชิ้นส่วน DNA ที่เพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR โดย primer P5CSa/P5CSs ซึ่งออกแบบโดย ผศ.ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล (ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) เพื่อโคลนยีน *P5CS* โดยอ้างอิงจากลำดับเบสของ cDNA *P5CS* ของ *Vigna aconitifolia* และ *Arabidopsis thaliana* มี 2 fragment ขนาดประมาณ 500 bp และ 2 kb ตามลำดับ(P5CS_500_no.1 และ P5CS_2KB_no.27)

จากผลการศึกษาลำดับเบสของโคลนที่ได้เทียบกับฐานข้อมูลลำดับเบส จึงเลือกใช้ P5CS_2KB_no.27 เป็น probe สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* เนื่องจากผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ *Oryza sativa P5CS1* mRNA (Accession number D49714) และ *O. sativa* (japonica cultivar-group) putative *P5CS* mRNA (Accession number NM190603) ดังนั้น

P5CS_2KB_no.27 จึงน่าจะสามารถเข้าจับกับ mRNA ได้ดีกว่า *P5CS* cDNA clone ของ mothbean (*Vigna aconitifolia*) (Hu *et al*., 1992) ที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นของพืชต่างวงศ์

ยีน *P5CS* ของข้าวในฐานข้อมูล Genbank มีเพียง 2 ยีนดังที่ได้กล่าวมาแล้ว putative *P5CS* mRNA ซึ่งมีผู้ศึกษาตำแหน่งแล้วถูกระบุอยู่บนโครโมโซม 1 ช่วงระหว่าง 1468654-1477215 ในขณะที่ *P5CS1* mRNA เมื่อศึกษาเทียบกับฐานข้อมูล genome ข้าว (RiceBlast) (http://riceblast.dna.affrc.go.jp) พบว่า *P5CS1* mRNA อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 เช่นกัน แม้ว่าจะอยู่บนโครโมโซมแท่งเดียวกัน และเป็นโคลนที่ได้จากข้าวพันธุ์ japonica เช่นเดียวกันแต่ *P5CS1* mRNA และ putative *P5CS* mRNAมีความคล้ายคลึงกันเพียง 77 % และยังมีขนาดแตกต่างกันด้วยคือ 2549 bp และ 2208 bp ตามลำดับ ทำให้มีความเป็นไปได้ว่า *P5CS* geneในข้าวจะมีลักษณะเป็น gene family ซึ่งทำให้สามารถตรวจสอบสัญญาณ mRNA หลายสัญญาณซึ่งมีขนาดต่างๆกันได้ ผลการทดลองในส่วนนี้มีความสอดคล้องกับรายงานของยีน *P5CS* ใน Arabidopsis ที่พบว่า *P5CS* gene มี 2 copy (Strizhov *et al*., 1997)

5. การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ amplified ขึ้นด้วย primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *OAT*

ชิ้นส่วน DNA ที่ทำการเพิ่มจำนวนด้วย PCR โดยใช้ primer OATa/OATs ซึ่งออกแบบโดย ผศ.ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล โดยอ้างอิงจากลำดับเบสของ *OAT* cDNA ของ *Vigna aconitifolia* และ *Arabidopsis thaliana* มี 4 fragment คือ ขนาด 500 800 1200 และ 2500 bp ตามลำดับ แต่เนื่องจาก DNA ที่ได้ไม่มีความคล้ายคลึงกับ *OAT* gene ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลลำดับเบส จึงเลือกใช้ *OAT* cDNA ของ mothbean (*Vigna aconitifolia*) (Delauney *et al*., 1993) เป็น probe แทน

Homology ระหว่าง *OAT* cDNA ของ *Vigna aconitifolia* และ *Arabidopsis thaliana* มีน้อยคือ 65% identity (Roosens *et al*.,1998) ดังนั้น primer ที่ออกแบบมาจึงอาจมี specific ต่ำ ประกอบกับการใช้ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ สูงและ annealing temperature ที่ต่ำมาก จึงทำให้เกิด mispriming โดยมีรายงานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของปริมาณ $MgCl_2$ ในปฏิกิริยา PCR พบว่าการใช้ $MgCl_2$ สูงกว่าระดับที่ใช้โดยทั่วไปคือ 1.5 mM $MgCl_2$(Henegariu *et al*., 1997) จะส่งผลให้เกิด mispriming ทำให้มีการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะกับยีนที่ต้องการศึกษา รวมทั้งการลด annealing temperature ลงยิ่งทำให้ unspecific bands เพิ่มปริมาณขึ้นด้วย (Henegariu *et al*., 1997) สิ่งเหล่านี้อาจทำให้ชิ้น

ส่วนโคลนที่ได้ไม่มีลำดับเบสที่เกี่ยวข้องกับ *OAT* gene เพราะชิ้นส่วนโคลนเหล่านี้เป็น unspecific bands

6. การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด RNA จากใบข้าว

ผลการศึกษา วิธีสกัด RNA 3 วิธี คือ วิธีการ Hot phenol (Anonymous, 1993) วิธีสกัด RNA จากเนื้อเยื่อที่มีแป้งมาก(Logemann *et al*., 1987) และการใช้ Trizol Reagent (GibcoBRL® California, USA) พบว่าการใช้ Trizol Reagent ให้ปริมาณ RNAมากที่สุด และให้ RNA ที่ปนเปื้อนน้อย แม้ว่าการสกัดในรากจะให้ปริมาณน้อยกว่าการสกัด RNA จากใบมาก แต่เนื่องจากผลการศึกษาด้วย Northern Blot Analysis ใน *Vigna* sp. พบว่าภาวะเค็มชักนำให้ยีน *P5CS* มีการแสดงออกเฉพาะที่ใบ (Hu *et al*, 1992) จึงเลือกใช้เนื้อเยื่อใบในการสกัดเพียงอย่างเดียวเพื่อทำ Northern Blot Analysis ส่วนการสกัดด้วย Hot phenol แม้ว่าจะให้ปริมาณ RNA ต่ำกว่าแต่การปนเปื้อนของ RNA มีน้อย ใกล้เคียงกับวิธีการที่ใช้ Trizol Reagent ในขณะที่การสกัดตามวิธีของ Logemann พบว่า RNA ที่ได้มีการปนเปื้อนสูงซึ่งไม่เหมาะในการใช้สกัด RNA เพื่อทำ Northern Blot Analysis แต่เนื่องจาก Trizol Reagent มีราคาแพงและปริมาณ RNA ที่ได้จากวิธี Hot phenol เมื่อคำนวณเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อตัวอย่างที่เก็บไว้เพื่อสกัด RNA พบว่าสามารถให้ปริมาณ RNA เพียงพอต่อการทำ Northern Blot Analysis จึงเลือกใช้วิธี Hot phenol ในการสกัด RNA จากใบข้าวต่อไป

7. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรลีนในข้าวพันธุ์เหลืองประทิวและสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลองเหลืองประทิว 123-TC171 รุ่นที่ 6 ในภาวะเค็ม ด้วยวิธี Northern Blot Analysis

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* ในข้าวพันธุ์เหลืองประทิวและสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่ผสม 0.3% NaCl (w/v) ในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 ของการทดลอง ด้วยวิธี Northern Blot Analysis โดยใช้โคลน P5CS_2KB_no.27 เป็น probe ผลปรากฏว่าเมื่อข้าวได้รับภาวะเค็มจะมีการแสดงออกของยีน *P5CS* ในระดับที่สูงกว่าเมื่อปลูกในภาวะปกติเมื่อได้รับภาวะเค็ม 1 และ 2 สัปดาห์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการแสดงออกของยีน *P5CS* ในพืชต่างๆ ที่ได้รับภาวะเค็ม เช่น *Arabidopsis thaliana* (Hu *et al*., 1992) และ *Vigna aconitifolia* (Delaney and Verma, 1993) เป็นต้น ขนาดของ band ที่แตกต่างกันของข้าวทั้งสองสายพันธุ์อาจเป็น mRNAต่างชนิดกัน การศึกษาในฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบว่ายีน *P5CS* ในข้าวพันธุ์ japonica มีอย่างน้อย 2 ยีน โดยมีขนาด 2.5 kb และ 2.2 kb ตามลำดับ อย่างไรก็ดีในงานวิจัยนี้ ซึ่งเป็นการศึกษาในข้าวพันธุ์ indica พบว่าขนาดของสัญญาณ mRNA ที่ตรวจพบมีขนาดแตกต่างจากขนาดของ *P5CS1* mRNA และ

putative *P5CS* mRNAในข้าวกลุ่ม japonica ที่มีผู้รายงานไว้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ายีน *P5CS* ในข้าวทั้งสองกลุ่มนี้มีขนาดแตกต่างกัน นอกจากนี้จากการศึกษาขนาดของ genome ของข้าวพันธุ์ indica ในประเทศจีนพบว่ามีขนาด genome ใหญ่กว่าข้าวกลุ่ม japonica ประมาณ 20% (อภิชาต วรรณวิจิตร, 2545) ซึ่งอาจจะทำให้มีขนาดและจำนวน copy ของยีน *P5CS* แตกต่างจากข้าวกลุ่ม japonica ได้

การศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* ในใบของข้าวLPT 123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 0.5%(w/v) พบสัญญาณ mRNA band ขนาดประมาณ 1.4 kb, 1.0 kb และ 0.8 kb โดย band ขนาดประมาณ 1.4 kb พบว่าเห็นเด่นชัดในทั้งสองสายพันธุ์เมื่อได้รับภาวะเค็มและพันธุ์ทนเค็มเมื่อได้รับภาวะเค็มในสัปดาห์แรก จากการประมาณด้วยสายตาพบว่า band ขนาดประมาณ 1.4 kb ในข้าวทั้งสองสายพันธุ์เมื่อได้รับภาวะเค็มในสัปดาห์ที่ 2 เข้มกว่าในสัปดาห์แรก ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโพรลีนที่มีแนวโน้มสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 2 นอกจากนั้น band ขนาดประมาณ 1.0 kb และ 0.8 kb ซึ่งปรากฏในทั้งสองสายพันธุ์ทั้งสองภาวะ เมื่อได้รับภาวะเค็มในสัปดาห์ที่ 2 พบว่ามีความเข้มของ band มากกว่าในภาวะปกติเช่นกัน ลักษณะของการเกิด band ของ *P5CS* จากการศึกษาในครั้งนี้ ทำให้เชื่อว่า *P5CS* gene ในข้าวสายพันธุ์นี้น่าจะมีมากกว่า 1 ยีน ใน Arabidopsis พบว่าการสังเคราะห์ P5CS enzyme ไม่ได้มาจากยีนเพียงตำแหน่งเดียว โดยมากจาก *AtP5CS1* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 2 และ *AtP5CS2* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 3 และมีการแสดงออกเป็นสัดส่วนต่างกันขึ้นกับเนื้อเยื่อพืช (Strizhov *et al*., 1997) การตรวจพบ mRNA ที่มีขนาดแตกต่างกันในต้นข้าวอายุต่างกันในการทดลองนี้อาจเป็นการแสดงถึงสัดส่วนการแสดงออกของยีน *P5CS* ที่แตกต่างกันในข้าวสายพันธุ์นี้ คือเมื่อต้นพืชอายุน้อยการแสดงออกของยีน *P5CS* ที่ตรวจได้ใน band ขนาดประมาณ1.0 kb และ 0.8 kb มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถ detect ได้ ซึ่งจะเป็นไปในแนวทางเดียวกับแนวคิดของการแสดงออกของยีน *AtP5CS1* และ AtP5CS2 ของ Arabidopsis ที่แตกต่างกันโดย *AtP5CS1* จะแสดงออกมากในเซลล์ทั่วไปในขณะที่ *AtP5CS2* จะแสดงออกมากในเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว รวมทั้งการให้ภาวะเครียดที่แตกต่างกันมีผลต่อช่วงเวลาที่ตอบสนองของทั้งสองยีนนี้แตกต่างกันด้วย (Strizhov *et al*., 1997)

นอกจากนี้การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนที่ใช้เป็น probe ยังพบว่ามีความคล้ายคลึงกับบางส่วนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mRNA อื่นๆ ที่ยังไม่ได้รับการระบุหน้าที่หรือความเกี่ยวพันกับยีนที่มีรายงานแล้ว จึงอาจเป็นไปได้ว่า สัญญาณ mRNA ขนาด 1.0 kb และ 0.8 kb ที่เห็นไม่ได้เกี่ยวข้องกับยีน *P5CS* แต่เป็นสัญญาณของ mRNA ของยีนอื่นๆ ที่มีความคล้ายคลึงกัน

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *OAT* ในข้าวพันธุ์เหลืองประทิวและสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง เหลืองประทิว 123-TC171 รุ่นที่ 6 ด้วยวิธี Northern Blot Analysis โดยใช้ *OAT* cDNA จาก mothbean (*Vigna aconitifolia*) ซึ่ง insert อยู่ใน pcDNA II เป็น probe ไม่พบสัญญาณ mRNA เนื่องจาก probe อาจมี homology ไม่เพียงพอที่จะเข้าจับกับ mRNA ที่อุณหภูมิ hybridization สูง (high stringency) หรือยีน *OAT* ของข้าวอาจมีการแสดงออกระดับต่ำมาก การลดอุณหภูมิ hybridization ลงมากพบว่ามี background สูงรบกวนจนไม่สามารถตรวจหาสัญญาณ mRNA ได้ จึงยังไม่สามารถสรุปรูปแบบการแสดงออกของยีน *OAT* ในการทดลองนี้ได้ อย่างไรก็ตามอาจเป็นไปได้ว่าการแสดงออกของ *OAT* เมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นแบบ down-regulated คล้ายกับรายงานของ Roosen และคณะ (1998) ใน *Arabidopsis thaliana* เกี่ยวกับการแสดงออกของยีน *OAT* ที่พบว่าปริมาณ mRNA และ ประสิทธิภาพของเอนไซม์ OAT จะลดลงเมื่ออยู่ใต้ภาวะเค็ม และ Delauney และคณะ(1993) รายงานเช่นเดียวกันใน *Vigna aconitifolia* โดยสรุป การสะสมโพรลีนอาจจะไม่เกี่ยวข้องกับความสามารถทนเค็มของ LPT123-TC171 แต่เป็นการตอบสนองต่อภาวะเค็มหรือเป็นความเสียหายที่เกิดขึ้นจากภาวะเค็ม และการแสดงออกของยีน *P5CS* ซึ่งอาจมีมากกว่า 1 ยีน น่าจะขึ้นอยู่กับอายุของพืช และมีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ทนเค็ม นอกจากนั้นในการทดลองนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการแสดงออกของยีน *OAT* เป็นอย่างไร แต่อาจเป็นไปได้ว่าถูกกดการแสดงออกโดยภาวะเค็มเหมือนในพืชอื่นที่มีผู้รายงานไว้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาอัตราการรอดตายของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง LPT123- TC171 รุ่นที่ 6 ในภาวะเค็ม

ข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม(LPT123 – TC171) ที่ผ่านการคัดเลือกภายใต้ภาวะเค็ม 6 ชั่วรุ่น ต้นกล้าที่ย้ายปลูกเมื่ออายุ 15 วัน มีอัตรารอดตายสูงกว่าสายพันธุ์เดิมทั้งในภาวะเค็มที่ให้ NaCl 0.3%(w/v) ต้นกล้าที่ย้ายปลูกเมื่ออายุ 15 วัน ในภาวะเค็มที่ให้ NaCl 0.5%(w/v)พบว่าข้าวทั้งสองสายพันธุ์ตายหมดก่อนสิ้นการทดลอง ต้นกล้าที่ย้ายปลูกเมื่ออายุ 22 วัน ในภาวะเค็มที่ให้ NaCl 0.5% ข้าวสายพันธุ์ทนเค็มมีอัตรารอดตายสูงกว่าสายพันธุ์เดิม

2. การศึกษาการเจริญเติบโตของข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 ในภาวะเค็ม

ข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม(LPT123 – TC171) ที่ผ่านการคัดเลือกภายใต้ภาวะเค็ม 6 ชั่วรุ่น มีความสามารถในการทนเค็มสูงกว่าสายพันธุ์เดิม ต้นกล้าอายุ 22 วันที่ให้ภาวะเค็มที่ NaCl 0.5%(w/v) พบว่าทั้งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของทั้งต้นและราก รวมทั้งพื้นที่ใบของสายพันธุ์ทนเค็มสูงกว่าสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ในต้นกล้าอายุ 15วัน ภาวะเค็มที่ให้ NaCl 0.3%(w/v) พบว่ามีเพียงน้ำหนักสดของต้นที่มีความแตกต่าง แต่น้ำหนักแห้งของต้น น้ำหนักแห้งของรากและพื้นที่ใบ ไม่มีความแตกต่างที่ชัดเจน แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการทนเค็มของ LPT123-TC171 ที่อายุต่างกันมีความสามารถในการทนเค็มได้แตกต่างกันด้วย

3. การศึกษาปริมาณโพรลีนในใบของข้าว LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123- TC171 ในภาวะเค็ม

ข้าว LPT123 และข้าว LPT123 – TC171 มีปริมาณโพรลีนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อได้รับภาวะเค็ม แต่การสะสมโพรลีนแตกต่างกันโดยเมื่อต้นข้าวอายุ 15 วัน ได้รับภาวะเค็ม NaCl 0.3% (w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสายพันธุ์ทนเค็มมีปริมาณโพรลีนไม่แตกต่างจากสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อต้นข้าวอายุ 22 วันได้รับภาวะเค็ม NaCl 0.5%(w/v) พบ

ว่าสายพันธุ์เดิมมีปริมาณโพรลีนสูงกว่าสายพันธุ์ทนเค็มอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ปริมาณโพรลีนสูงสุดที่วัดได้ภาวะเค็มทั้งสองพบในสัปดาห์ที่ 2 ของภาวะเค็มเช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองต่อภาวะเค็มด้วยการสะสมโพรลีนของ LPT123-TC171 ที่อายุต่างกันนั้นแตกต่างกันด้วย

4. การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ amplified ขึ้นด้วย primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *P5CS*

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR โดย primer P5CSa/P5CSs ได้ 2 ชิ้นส่วน คือ ขนาด 500 bp(P5CS_500_no.1) และ 2 kb (P5CS_2KB_no.27) ตามลำดับ เมื่อศึกษาลำดับเบสเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับเบส พบว่าโคลน P5CS_2KB_no.27 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของ mRNA *P5CS*1 ของข้าว ในขณะที่โคลน P5CS_500_no.1พบความคล้ายคลึงเล็กน้อยกับ mRNA ที่ไม่ได้ระบุหน้าที่

5. การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ amplified ขึ้นด้วย primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *OAT*

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR โดย primer OATa/OATs ได้ 4 ชิ้นส่วนคือ ขนาด 500 bp(OAT_500no.1_BW1) 800 bp(OAT_800_w1) 1200 bp (OAT_1.2_w4) และ 2500 bp(OAT_2.5_w1) เมื่อศึกษาลำดับเบสเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับเบส พบว่าโคลนทั้ง 4 ไม่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับลำดับเบสของ *OAT* gene ที่มีผู้รายงานในฐานข้อมูลลำดับเบส

6. การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด RNA จากต้นข้าว

การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด RNA จากต้นข้าวโดยการทดลองสกัด RNA ของใบข้าวและรากข้าวด้วยวิธีการ hot phenol(Anonymous, 1993) วิธีสกัด RNA จากเนื้อเยื่อที่มีแป้งมาก(Logemann *et al*., 1987) และการใช้ Trizol Reagent (GibcoBRL® California, USA) พบว่าการสกัดด้วยวิธีการ Trizol Reagent ให้ปริมาณ RNAมากที่สุดและมีการปนเปื้อนน้อย ในขณะที่วิธี Hot phenol และการสกัดด้วยวิธีของ Logemann และคณะ (1987) ให้ปริมาณใกล้เคียงกันแต่ RNA ที่สกัดด้วยวิธี Hot phenol มีการปนเปื้อนสารอื่นๆ น้อยกว่าวิธีการของ Logemann และคณะ (1987) โดยสรุปพบว่าวิธี Trizol Reagent และ Hot phenol สามารถใช้กับการสกัด RNA เพื่อใช้ในการทำ Northern Blot Analysis ต่อไปได้

7. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรลีนในข้าวพันธุ์เหลืองประทิวและสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลองเหลืองประทิว 123-TC171 รุ่นที่ 6 ในภาวะเค็ม ด้วยวิธี Northern Blot Analysis

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* ในข้าวพันธุ์เหลืองประทิวและสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 ของภาวะเค็ม ด้วยวิธี Northern Blot Analysis โดยใช้โคลน P5CS_2KB_no.27 เป็น probe ซึ่งการศึกษาลำดับเบสพบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสบางส่วนของ *P5CS* mRNA ในข้าวกลุ่ม japonica ผลปรากฏว่าเมื่อได้รับภาวะเค็มสัญญาณ mRNA ที่คาดว่าน่าจะเป็นยีน *P5CS* มีการแสดงออกมากกว่าเมื่อปลูกในภาวะปกติ

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *OAT* ในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ด้วยวิธี Northern Blot Analysis ในสัปดาห์ที่ 1-2 ของภาวะเค็ม โดยใช้ *OAT* cDNA จาก mothbean (*Vigna aconitifolia*) ในเวคเตอร์พาหะ pcDNA II เป็น probe (Delauney *et al*., 1993) ไม่พบสัญญาณ mRNA เนื่องจาก probe อาจมี homology ไม่เพียงพอที่จะเข้าจับกับ mRNA ในอุณหภูมิ hybridization สูง (high stringency) หรืออาจมีการแสดงออกระดับต่ำมาก การลดอุณหภูมิ hybridization ลงพบว่ามี background สูงรบกวนจนไม่สามารถตรวจหาสัญญาณ mRNA ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาการแสดงออกของ *P5CS* gene ตั้งแต่เริ่มต้นได้รับภาวะเค็ม เพื่อศึกษาการแสดงออกของ *P5CS* mRNA เปลี่ยนแปลงในช่วงเวลาที่แคบกว่าเดิม
2. เนื่องจากแถบสัญญาณ mRNA ที่พบในการศึกษาการแสดงออกของ *P5CS* mRNA ในต้นข้าวที่ได้รับภาวะเค็ม 0.3 % NaCl มีขนาดต่างกันเล็กน้อยในพันธุ์ทนเค็มและพันธุ์เดิม จึงน่าจะมีการศึกษาเกี่ยวกับลำดับเบสของ *P5CS* mRNA ของทั้งสองสายพันธุ์โดยใช้วิธี RT-PCR ต่อไป
3. ทำการปรับเปลี่ยน primer เพื่อโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความคล้ายคลึงกับ *OAT* gene เพื่อใช้เป็น probe ในการศึกษาการแสดงออกของ *OAT* mRNA ต่อไป เพื่อให้สามารถสรุปการแสดงออกของยีน *OAT* ในภาวะเค็มของข้าวสายพันธุ์นี้ได้
4. ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกิจกรรมของเอนไซม์ proline dehydrogenase ของข้าวทั้งสองสายพันธุ์เมื่อได้รับภาวะเค็ม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. 2527. ความรู้เรื่องดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. กรุงเทพมหานคร.กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

เกรียงไกร พันธุ์วรรณ์.2528. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ทนดินเค็มโดยวิธีการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม. รายงานผลการค้นคว้าวิจัยข้าวและธัญพืชเมืองหนาว. หน้า 145. กรุงเทพมหานคร. กรมวิชาการเกษตร.

ชัยนาม ดิสถาพร. 2531. ข้าวทนเค็ม. ความรู้เรื่องดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือหน้า 172-177.. กรุงเทพมหานคร. กรมพัฒนาที่ดิน.

ทรงชัย วัฒนพายัพกุล และคณะ. 2528. การคัดเลือกหาพันธุ์ข้าวนาสวนที่ทนทานต่อความเค็มในเขตศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี. รายงานผลการค้นคว้าวิจัยข้าวและธัญพืชเมืองหนาว.หน้า 145. กรุงเทพมหานคร. กรมวิชาการเกษตร.

ทิพยวรรณ ธนไพศาล. 2534. การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวทนเค็มที่เจริญจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธนะกาญจน์ มัญชุพานี. 2544. การสะสมโพรลีนและการแสดงออกของยีน Δ^1-pyrroline-5-carboxylate synthetase(P5CS) ในข้าว(*Oryza sativa* L.) สายพันธุ์ทนเค็มเมื่อได้รับภาวะเค็ม.วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ปีการศึกษา 2543. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปารวี ธิกาศ. 2546. เครื่องหมายทางพันธุกรรมของข้าว Oryza sativa L. พันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็มที่ตรวจสอบโดยวิธีอาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อภิชาต วรรณวิจิตร. 2545. จีโนมพืช. จีโนมิกส์ ภาษาแห่งชีวิต.หน้า 109-123. กรุงเทพมหานคร.มูลนิธิบัณฑิตยสภาวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.

อรุณี ยูวะนิยม. 2531. ดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. ความรู้เรื่องดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. กรุงเทพมหานคร.กรมพัฒนาที่ดิน.กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Ahmad I., Larher F. and Stewart G.R.1979 Sorbitol, a compatible osmotic solute in Plantago maritima. New Phytol. 82: 671-678.

Altschul S.F., Madden T.L., SchäfferA.A, Zhang J., Zhang Z., Miller W., and Lipman D.J. 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Anonymous. 1993. Hot Phenol RNA extraction. Department of Botany, University of Washington.

Bates, L.S.,Woldren, R.P. and Teare, I.D. 1973. Rapid determination fo free proline for water stress studies. Pl soil. 39:205-207.

Bernstein, L.1964. Salt tolerance of plants. Agri Information Bull. 283: 3-23.

Boggess S.F., Aspinall D. and Paleg L.G.1976a. Stress metabolism. IX. The significance of end-product inhibition of proline biosynthesis and of compartmentation in relation to stress-induced proline accumulation. Aust J Plant Physiol. 3: 513-525.

Boggess S.F., Stewart C.R., Aspinall D. and Paleg L.G. 1976b. Effect of water stress on proline synthesis from radioactive precursors. Plant Physiol. 58: 398–401.

Cascardo J.C.M.,Buzeli R.A.A., Almeida R.S., Otoni W.C.F, and Elizabeth P.B. 2001. Differential expression of the soybean BiP gene family. Plant Sci. 160(2):273-281.

Cheeseman J.M. 1988. Mechanisms of salinity tolerance in plants. Plant Physiol 87: 547–550.

Chen, C.T. and KaO, C.H. 1993. Osmotic stress and water stress have opposite effects on putrescine and praline production in exise rice leaves. Pl Growth Regul. 13:197-202.

Cramer G.R.,Epstein E., and Läuchli A. 1991. Effects of sodium, potassium and calcium on salt-stressed barley. II. Elemental analysis. Physiol Plant. 81:197-202.

Colmer T.D., Epstein E. and Dvorak J.1995. Differential solute regulation in leafblades of various ages in salt-sensitive wheat and a salt-tolerant wheat x *Lophopyrum elongatum*(Host) A. Löve Amphiploid. Plant Physiol. 108:1715-1724.

Delauney A.J. and Verma D.P.S.1990. A soybean delta1-pyrroline-5-carboxylate reductase gene was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. Mol Gen Genet. 221: 299-305.

Delauney A.J., Hu C.A., Kishor K., Verma D.P.S.1993. Cloning of ornithine δ-aminotransferase cDNA by *trans*-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. J Biol Chem 268: 18673–18678

Delauney, A.J. and Verma D.P.S. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. Plant J. 4: 215-223.

Flowers T.J. *et al.*1977. The Mechanism of salt tolerance in halophytes. Annu Rev Pl Physiol. 28:89-91.

Greenway H., Munns R .1980. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. Annu Rev Pl Physiol. 31: 149-190.

Hanson A.D. and Hitz W.D. 1982. Metabolic responses of mesophytes to plant after deficits. Annu Rev Pl Physiol. 33.163-203.

Han K.H. and Hwang C.H. 2003. Salt tolerance enhanced by transformation of a *P5CS* gene in carrot. J Pl Biotech. 5(3):157-161.

Hare P.D. and Cress W.A.1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. Pl Growth Regul. 21: 79-102.

Henegarui O., Heerama N.A., Dlouhy S.R., Vance G.H. and Vogt P.H. 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. Biotechnique. 23:504-511.

Heyser J.W., De Bruin D., Kincaid M.L., Johnson R.Y., Rodriguez M.M. and Robinson N.J. 1989a. Inhibition of NaCl-induced proline biosynthesis by exogenous proline in halophilic *Distichlis spicata* suspension cultures. J Exp Bot. 40: 225-232.

Heyser J.W., Chacon M.J. and Warren R.C. 1989b. Characterization of L-[5-13C]-proline biosynthesis in halophytic and nonhalophytic suspension cultures by 13C NMR. J Plant Physiol. 135: 459-466.

Hu C.A., Delauney A.J. and Verma D.P.S. 1992. A bifunctional enzyme (delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 89: 9354-9358.

Igarashi Y.,Yoshiba Y.,Sanada Y.,Yamaguchi-Shinozadi K., Wada K. and Shinozaki K. 1997. Characterization of the gene of *Delta super(1) pyrroline-5-carboxylate synthetase* and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. Pl Mol Biol. 33:857-865.

Iyer S. and Caplan A. 1998. Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. Plant Physiol. 116: 203–211.

Kaddah M.T. and Fakhry S.I. 1961. Tolerance of Egyptian rice to salt. Soil Sci. 91: 113-120.

Kishor P.B., Hong K.Z., Miao G.H., Hu C.A. and Verma D.P.S. 1995. Over-expression *of* Δ^1 - *pyrroline-5-carboxylate synthetase* increase proline production and confer osmotolerance in transgenic plant. Plant Physiol. 108:1387-1394.

Lee D.J. and Hwang C.H. 2003. Proline accumulation and *P5CS* (*Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase)* gene expression in response to salt stress in Zoysiagrasses. Korean J Crop Sci. 48:20-24.

Logemann J.,Schell J. and Willmitzer L.1987. Improved metheod for the isolation of RNA from plant tissues. Analyt Biochem. 163 :16-20.

Lutts S., Kinet J.M. and Bouharmont J. 1996. Effect of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa*(L.)) cultivars differing in salinity resistance. Pl Growth Regul. 19 :207-218.

Lutts S., Majerus V. and Kinet J.M.,1999 . NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. Physiol Plant. 105 :1399-3054.

Marcum K.B. 1999. Salinity tolerance mechanism of grasses in the subfamily chloridoideae. Crop Sci. 39: 1153-1160.

Mestichelli L.J.J., Gupta R.N. and Spenser I.D. 1979. The biosynthetic route from ornithine to proline. J Biol Chem. 254: 640-647.

Moeljopawiro S. and Ikehashi H.1981. Inheritance of salt tolerance in rice. Euphytica. 30: 291-300.

Morris C.J., Thompson J.F. and Johnson C.M.1969. Metabolism of glutamic acid and N-acetylglutamic acid in leaf discs and cell-free extracts of higher plants. Plant Physiol. 44: 1023-1026.

Muller E., Brown P.T.H., Hartke S. and Lorz H.1990. DNA variation in tissue-culture-derived rice plants. Theor Appl Genet. 80:673–679

Nanjo T., Kobayashi M., Yoshiba Y., Kakubari Y., Yamagushi-Shinozaki K. and Shinozaki K. 1999a. Antisense suppression of proline degradation improve tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. FBES Lett. 461:205-210.

Nanjo T., Kobayashi M., Yoshiba Y., Sanada Y.,Wada K., Tsukaya H., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. 1999b. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 18: 185-194.

Neumann P. 1997. Salinity resistance and plant growth revisited. Plant Cell Environ. 20: 1193-1198.

Nishi T., Yamada Y. and Takahashi E. 1968. Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. Nature. 219: 508-509.

Oaks A., Mitchell D.J., Barnard R.A. and Johnson F.J.1970. The regulation of proline biosynthesis in maize roots. Can J Bot. 48: 2249-2258.

Ocono K., 1978. High frequency mutations in rice plants regenerated from seed callus. 4th Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture, Calgary, p. 52.

Oono K. and Sakaguchi S. (1978) Induction of mutation in tissue culture and their use for plant breeding. II. Induction of saline resistant and copper sulfate resistant calluses and regeneration of plants. Jpn J Breed. 28 [Suppl 2]: 124–125.

Pearson G.A., Ayers A.D. and Eberhard D.L. 1966. Relative salt tolerance of rice during germination and early seedling development. Soil Sci. 102: 151-156.

Rhodes D., Handa S., Bressan R.A.1986. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. Plant Physiol. 82: 890-903.

Rodriguez M.M. and Heyzer J.W.1988. Growth inhibition by exogenous proline and its metabolism in saltgrass (*Distichlis spicata*) suspension cultures. Plant Cell Rep 7: 305–308.

Rodriguez H.G., Roberts J., Jordan W.R. and Drew M.C. 1997.Growth, Water Relations, and Accumulation of Organic and Inorganic Solutes in Roots of Maize Seedlings during Salt Stress. Plant Physiol.113 (3):881-893.

Roosens N.H.C.J., Thu T.T., Iskander H.M. and Jacobs M. 1998. Isolation of the ornithine-delta-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 117: 263-271.

Sakamoto A. and Murata N. 2002. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. Pl Cell and Environ. 25,163–171.

Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Savoure A., Hua X.J., Bertauche N., Van Montagu M. and Verbruggen N.1997. Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in Arabidopsis thaliana. Mol Gen Genet. 254: 104-109.

Smirnoff N. and Cumbes Q.J .1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. Phytochem. 28: 1057–1060.

Stavarek S.J. and Rains D.W. 1984. Cell culture techniques, selection, and physiological studies of salt tolerance. In: Salinity Tolerance in Plants: Strategies for Crop Improvement. Staples, R.C. and Toenniessen, G.A. eds. John Wiley, New York, pp. 321-334.

Stewart C.R. and Boggess S.F.1978. Metabolism of (5-3H) proline barley leaves and its use in measuring the effect of water stress on proline oxidation. Plant Physiol. 61: 654–657.

Stewart GR, Larher F .1980. Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress. In "The Biochemistry of Plants" pp. 609-635. BJ Miflin ed , Vol. 5, Academic Press, New York.

Strizhov N., Abraham E., Oekrresz L. Blickling S.,Zilberstein A., Schell J., Koncz C. and Szabados L. 1997. Differential expression of two *P5CS* gene controlling proline accumulation during salt-stress require ABA and is regulated by *ABA1*, *ABI1* and *AXR2* in Arabidopsis. Plant J. 12:557-569.

Taiz, L. and Zeiger, E.1998. Plant physiology. 2nd edn. The Benjamin cumming Publishing Co.,Inc.USA.

Tarczynski M.C., Jensen R.G. and Bohnert H.J. 1993 Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. Science. 259: 508-510.

Vajrabhaya M.*et al*. 1987. New varieties of rice for saline and acid soil through tissue culture. Final report. U.S. International Development Cooperation Agency. Bangkok. Thailand.

Vajrabhaya M. and Vajarabhaya T. 1991. Somaclonal variation of salt tolerance in rice in Y.P.S.Bajaj,(ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. Berlin Heidillberg:Spring-Valege. 14:368-382.

Wu L., Fan Z., Guo L., Li Y., Zhang W., Qu LJ., and Chen Z. 2003. Over-expression of an Arabidopsis δ-*OAT* gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice. Chin Sci Bull. 48(23):2594-2600.

Woo S.C, *et al.* 1988. *In Vitro* improvement of salt tolerant in a rice cultivar. Bot Bull Acad Sin. :199-104.

Yang H., Tabei Y., Hamada H., Kayano T. and Takaiwa F. 1999. Detection fo somaclonal variation in cultured rice cells using digoxigenin-based random amplified polymorphic DNA. Plant Cell Rep. 18:520-526.

Yeo, A.R., Yeo, M.A. and Flowers, T.J., 1987. The contribution of an apoplastic pathway to sodium uptake by rice roots in saline conditions. J. Exp. Bot. 38, 1141-1153.

Yoshiba Y., Kiyosue T., Katagiri T., Ueda H., Mizoguchi T., Yamaguchi-Shinozaki K., Wada K., Harada Y. and Shinozaki K.1995. Correlation between the induction of a gene for delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in Arabidopsis thaliana under osmotic stress. Plant J. 7: 751-760.

Zhu B., Su J., Chang M. and Verma D.P.S. 1998. Over-expression of Δ^1 *-pyrroline-5-carboxylate synthetase* gene and analyze of tolerance to water- and salt-stress in transgenic rice. Plant Sci 139:14-48.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 22 สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP no.2 (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991)

ชื่อสารเคมี	ปริมาณสาร (mg/L)
Macroelements	
KNO_3	580
$CaSO_4$	500
$MgSO_4.7H_2O$	450
Triple super phosphate	250
$((NH_4)_2SO_4)$	100
Microelements	160
Na_2EDTA	
$FeSO_4.7H_2O$	120
$MnSO_4.H_2O$	15
H_3BO_3	5
$ZnSO_4.7H2O$	1.5
KI	1.0
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.1
$CuSO_4.5H_2O$	0.05
$CoCl_2.6H_2O$	0.05

การเตรียม $FeSO_4$ stock ความเข้มข้น 30 g/L (1L)

1. ชั่ง Na_2EDTA 40 กรัม และ $FeSO_4.7H_2O$ 30 กรัม
2. แยกละลายในน้ำกลั่น 500 ml ทีละตัว ที่อุณหภูมิ 70-90 °C
3. ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน แล้วพ่นฟองอากาศประมาณ 3-4 ชั่วโมงจนกระทั่งสารละลายใส

ตารางที่ 23 ส่วนประกอบสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

สารละลาย	ส่วนประกอบ
acid ninhydrin	ninhydrin 1.25 กรัม glacial acetic acid 30 ml 6M phosphoric acid 20 ml นำไปอุ่นที่ 80 °C จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บสารละลายไว้ในที่เย็นอุณหภูมิประมาณ 4 °C และสารที่เตรียมต้องใช้ภายใน 24 ชั่วโมง
Denaturation buffer for RNA total volume 40 µl	11µl RNA sample 20µl formamid 7µl 37%formaldehyde 2µl 10X MOPS
DNA extraction buffer(CTAB)	2%(w/v) CTAB 1.4M NaCl 0.2%(v/v) mercaptoethanol 20mM EDTA 100mM Tris-HCl pH 8.0 2%(w/v) polyvinylpyrollidone(PVP)
DNA loading dye	50% glycerol 0.25% bromophenol blue
Formaldehyde gel	1.2g agarose ใน DEPC-water 84 ml 24ml 37% formaldehyde 12ml 10X MOPS
10X MOPS(10X formaldehyde gel running buffer)	0.2M MOPS 80mM sodium acetate 10mM EDTA
Primary wash buffer	0.5x SSC pH 7.0 0.4% SDS 6M urea

สารละลาย	ส่วนประกอบ
Secondary wash buffer	2X SSC
RNA loading dye	50%Glycerol 1mM EDTA 0.25% bromophenol blue
20X SSC	3M NaCl 0.3M sodium acetate ปรับ pH เป็น 7.0
50X TBE	54 g Tris-base 27.5 g Boric acid 20ml 0.5M EDTA pH 8.0
TE	10mM Tris pH 8.0 1mM EDTA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.วิธีการสกัด DNA ด้วยวิธี modified CTAB (ปารวี ธิกาศ, 2546)

1.1 บดตัวอย่างใบข้าว 0.1 กรัมด้วยไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด

1.2 เติม Extraction buffer 0.6 ml ซึ่งอุ่นให้ร้อนที่ 65 °C ผสมให้เข้ากัน

1.3 เทส่วนผสมทั้งหมดลงหลอด microcentrifuge นำไป incubate 60 °C 30 นาที

1.4 เติม phenol:chloroform:isoamylalcohol ปริมาตรเท่าส่วนผสมในหลอด

1.5 ปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C 10 นาที

1.6 แยก supernatant มาสกัดด้วย chloroform 2 ครั้งโดยใช้ปริมาตรเท่ากับสารละลายในหลอด

1.7 ปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C 10 นาที ดูดสารละลายใส่หลอดใหม่

1.8 เติม sodium acetate 0.1 เท่าและ isopropanol ที่แช่เย็น 0.6 เท่า เก็บที่ -20 °C 30 นาที

1.9 ปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C 10 นาที

1.10 ล้าง pellet ด้วย 70% ethanol นำไป air-dry เพื่อกำจัด ethanol

1.11 ละลาย pellet ด้วย TE buffer 40 μl

1.12 เติม RNase ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 20 μg/μl และนำไป incubate ที่ 37 °C 1ชั่วโมง

1.13 ปรับปริมาตรของ DNA ในหลอดให้เป็น 250 μl โดยใช้ TE buffer และเติม phenol:chloroform:isoamylalcohol 250 μl พลิกหลอดกลับไปมา

1.14 ปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C 10 นาที ดูดสารละลายใส่หลอดใหม่

1.15 สกัดซ้ำด้วย chloroform 2 ครั้ง และตกตะกอน DNA ด้วย sodium acetate 0.1เท่า และ abosolute ethanol ที่แช่เย็น 2 เท่า

1.16 ปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C 10 นาที

1.17 ล้าง pellet ด้วย 70% ethanol นำไป air-dry เพื่อกำจัด ethanol

1.18 ละลาย pellet ด้วย TE buffer ตามความต้องการ

1.19 วัดความเข้มข้นของสารละลายด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm

2.การทำ frozen stock (Sambrook และคณะ, 1978)

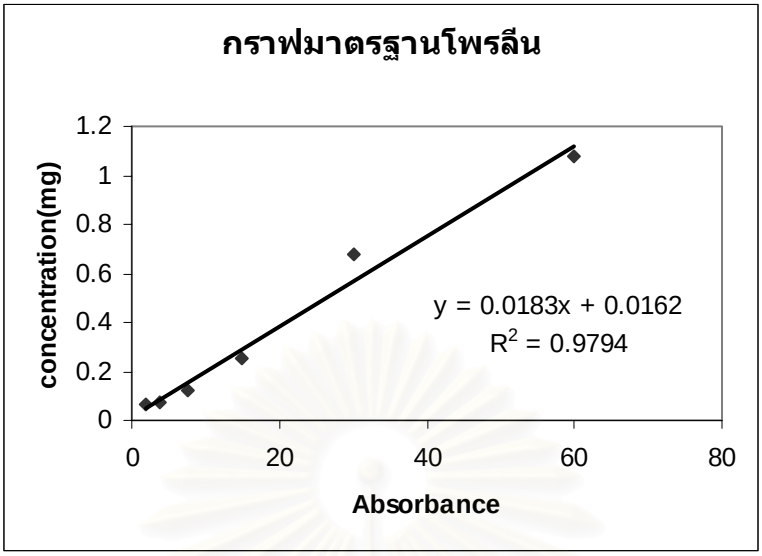
2.1 streak E.coli mมี DNA พาหะที่มีชิ้นส่วนของโคลน ลงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicilin 100 mg/ml นำไป incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2.2 เขี่ย single ลงบนอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicilin 100 mg/ml นำไป incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2.3 ปิเปตอาหารเหลวที่มี E.coli เจริญอยู่ 1 ml ใส่ vial ที่มี 87.7% glycerol ปริมาตร 1 ml ที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

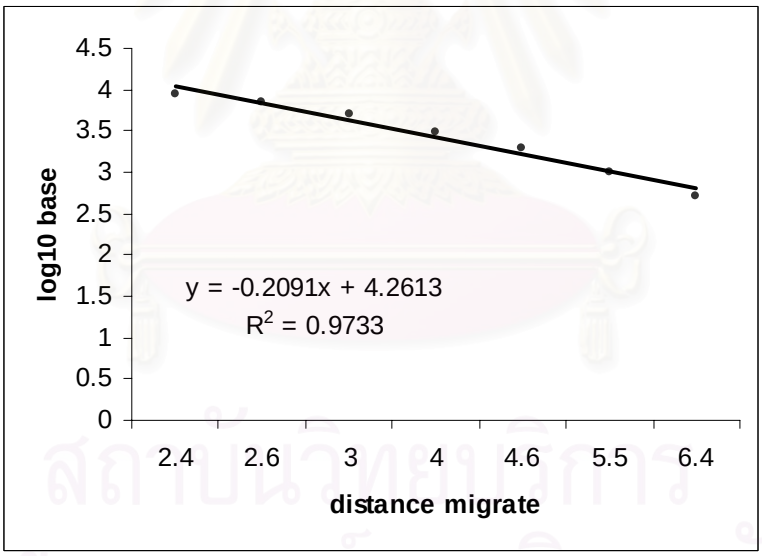
2.4 นำ vial ไปแช่ในไนโตรเจนเหลว และนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -70 °C

3.การวิเคราะห์ปริมาณโพรลีนจากค่าดูดกลืนแสง



รูปที่ 19 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโพรลีน

4.การหาขนาดจาก RNA Ladder



รูปที่ 20 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาขนาดของ RNA ladder(New England Biolabs, USA)

5.ลักษณะของต้นข้าวที่ได้รับภาวะเค็ม

LPT 123 0%NaCl LPT123 0.3% NaCl LPT123-TC171 0% NaCl LPT123TC1710.3%NaCl

ภาพที่ 21 ลักษณะต้นข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่ 6 เมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วันปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0% และ 0.3%(w/v) เป็นเวลา 3 สัปดาห์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.ลำดับเบสของโคลนทั้งหมด

*แถบสีเทาแสดง restriction site ของ *Eco*RI

1.1 P5CS_500_no.1

NCANGCTGCAGACGCGTTACGTATCGGATCCAGAATTCGTGAT

1 TGCATCAGGA CGTGACTCAA ACATTTTTAA AGATAAAATA CAAACAAGAC

51 CATATACTGC GGTCTCTTGG CCAAATCTAA CTCAAACCGA CATAACTAAC

101 CTAGTTAATA GGTACAATTG CCATACACGA GCTCTATCTC TGATTGACAA

151 TGACAGTTAT CTTGATCTAG GCCTATGCCG AGCCTAGATT AATACCATAT

201 CGGCAGCTTG CCATATCGGC CAAGTCAAGC CTTTGTCTAG TGTTTAGCCG

251 ATACGATATT CAACCGATAT TCAACCGATG TGCAGTTTGA CTTAGAGATC

301 AACTAGATTT TACACCTAAT CCGCTTCGAT CTTTCTTCTT CTCCAAATCT

351 GATGCCAAAT TCCGTTGTTA ACACCCGGTC CTCTAGCTCT CGGCCCTGAC

401 CCCACTCCTC CTCACCTGCA CCCGCCTCCT CTCCCTTTCT GTCCAAGGTG

451 CCCATCACTG TCCGCCTCG CCGCCGCCTC CTTCTCGCTC ACCGTCGGTC

501 AGACGGACAA CGAGATTAAG GAACTACTGG AACATGCACA TCAAGCGCAA

551 GCTCCTGAGT TGAGTCACGA CCTGGATGCA ATCTGAATTCGTCGA

1.2 P5CS_2KB_5_no.27

GCTGCAGACGCGTTACGTATCGG ATCCAGAATTCGTGAT

1 TGCATCAGGA CGTGACTCAA AAACAATTAA GAGAACACCT AATGGGCAAG

51 ATGTTTTCTC AAGAACTAAA TCAATCAGCA ACCTGGCAAA GGGGAAATCT

101 TTTTGTTAAA ATCGCTATGG ATATATCATC TAGAATCTAG AATTTCTGTG

151 AAATCTCATA GCAGATTTCT ATTAAAAAGA GTTTCTATTA AAAAGGGCTG

201 GCATTCACCT CTGTCTTTTT AAGTATCTGG TTTATAGGGT CTTCCATATT

251 TGCAAGGGTA CGAATAGATT TTGCAAGGCT TGCTATCTGC AAAAACATAA

301 AATATAATAC GAGTTAAACA AGACAAACAT ACATAAGAAA AGAGAAGTGT

351 CAGATATTTA ACAAATCAGT TAATTTGGCA AGGAAAATGA GGGGTCCACC

401 TTTCCTGGTT TTATAGTCAA TCTAGCAACC AAAGGCTTCT CATATCCAGC

451 AAACTTGGGC CGCAGCTACA TCAGCTTCAT TCTCAGACCT TATTAAATCC

501 TCATTTGCCT CCAAAGCATC TGCAACATCT AGCAATATCT TTTTCCGTTC

551 CTCTGATGAC AAATTCTGTT TCAAACAAAA CATATGGTAT CAGACTAGTA
601 TCACGGGTGA GCAAAAATAG TGAGCTAAAA CTTGAAATAG TGTGTAACTC
651 CACTGGGCAT AACAGANGGA CAAGAATTTT GTATGATTNG ACAANNATTA
701 ATACCTGTAG ACGCCNTGNA CAATCTCTTG CGGNACCAG CCATCTCACG
751 AGCACTAACA TCCTTAGATG ATTCCCCNAA TTCGCATNCT GGGNAAGAGA
801 GTACNANTTT TTCCCCTGAG AANNTTTAGA ANGCNCGATT TTCAACCCCN
851 TCAGGAAGAA AAAATAAAAN NTTNCCCNCT TTANAAAANA AANAGNTGNC
901 ACNCCTGACT

1.3 OAT_500no.1_BW1

NGCGGGGNCACGCATGCTGCAGACGCGTTACGTATCGGATCCAGAATTCGTGAT
1 TACTCTGCAG TAAATCAAAC CTTGGGTGCT TCTGGAGTAG ACATTTCAGA
51 AGCTTGCTGA TTCATCAGCT GGAACTACTT CCAGAACTGA ATTAAGTTTT
101 TCATTTGCAA AATCTTCAAT CCTTTTTGAA ATGCTTGCCA TAGGAAATAG
151 CTTATTTGCT ACCTGGTTAT TACCAAATGA GAAACAAAAT GGTTAAAATC
201 ACATAAATGC ATGTTTCATG CAAGCACAAA CAATTAGGTC AATTACCAAG
251 CGTATTGCCT TCATGCGGAC CTCATCTAGA TGATGGATTG AACTCTGCAC
301 AAAAATA ATCTGAATTCGTCGACAAGCTTCTCGAGCCTAGGCTAGCTCTA

1.4 OAT_800_W1

ATGCTGCAGACGCGTTACGTATCGGATCCAGAATTCGTGAT
1 TACTCTGCAG TAAATCAACA GGTGAACCAA AAACGTGGAA CAGACCACTT
51 ATACATTTTT ACTAGCATCA AATCAGATGA GATAAACAAT GAGAGGTGAT
101 GTAAGGACAG ATGAAAAACT GTAAGGGGAC GTGCTGCTTT GATTCATGCA
151 GCTAATGGTG GCAAATAAAG CAAAGAAAGC TGCCATAACT CTTAAGCTAT
201 GTAGAAAACA ACACATTTTC CAATGCACAC AGCCCATTCA ATAAGATATT
251 CAATCCAAAA GCATGAGTCA ATTGAGTCTA CATTTAA TTA GACTCAAAGA
301 GATTAACAGG GCCTTTAGTT CAATCATGGA TTGATCAGCT GTAATTTAAG
351 TCTTTAGTCT TTTTCTTTCC ACTCTTTTTGT CTTCCCTGNT AAATACTTTA
401 TTCTTTTATA ATATATACCG TGGGTGCCTC CCCCCACTGT CTTTTGATAA

451 TAAAAAAAAA AGCATGAGTC AAGTTGTAAA TATATTTTGG AAGATCATCC
501 GTGCCACAGT TTTTTAGTGT GTATAAGCTA AAGAACTATG GTATAGGTGT
551 AATTCCCATT TTGGAAATTG CACTGGCATA AATAAGAACT TAAGTGAACT
601 CTGCACCAAA TA

1.5 OAT_1.2_W4

NCACGTATCGGATCCAGAATTCGTGAT

1 TACTCTGCAG TAAATCAGTC ATCATCAAGT GTGTGCTCTG TGTCTTTCGT
51 GTCCAATAAT TTCAAAAAAA AAAAAACACA TCCCCAGTAT ACATATGAAT
101 AGCTGTATGC TAAGAGTAAC ATAAATAATA ATCAAATGTG GTGCACATAT
151 TATGCTTTTA TATGATATGT ACCTGACACC CAGGATTAAA CCAGCTTCCC
201 TTCGGGTCAT TGCAGGTTGA AAACCACCTT CATAGAATTT GCGCATCCTG
251 GGAACTATAG GCCTTGCTTT ATAAGCATGC CAAGCTTGGA TGCTATATCT
301 ACTGGCAAGG AGCAGCGGCT GCCACCGCAA GTCCTGTTAT AAGTGGTGCA
351 GCCTGCATAA GTTGAATATA TATTCATGAT TGAAAATGAA AATCGAACAA
401 CAGGATAACA TATAATCCAG AAGTTAGATA AATTAAAATAG CATGAGAAGA
451 CAATAGGAAT TGCTCACATA TTATGAAGTA ACAGGCCATC ACAGTTACCA
501 CTTACCAGAT TAACTATTGC TGCAATAAAT GGCAATGGCT AGCGAAATGG
551 TCTATCACTA ATCNAGTTGG CTTCATTCTA ATATTACTCT ATGCANGACT
601 TNGACAATAG GCAGTGTATG TACAAATTAG ANCACCATTT ANTATGANTA
651 CCATGGCGAA AGATGAGGAG ACANAAATTT GGTTTTA CTT CTTANNAGAA
701 TGGAAATTAC AGATTNTAGT CTGGTNNTCT GTCCNCTNGT TNAATCANTA
751 AGCGGCGCAN ACCACTGTNG NCAGCGNCGA TGGACATTCT TCCTGNACCC
801 NCCCNAACCT ATTCCCNCCN NTGTCCCCNA CNGGTACACC CAGTGNNTCC
851 CTNGTNNCAC TNGGGNNGAA TGTCAATGGC AATCCNCGGT TAACCCCANN
901 NGATNAGNNC NGGNCCNNC AGTCCNCCGT TACCCCGGCC A

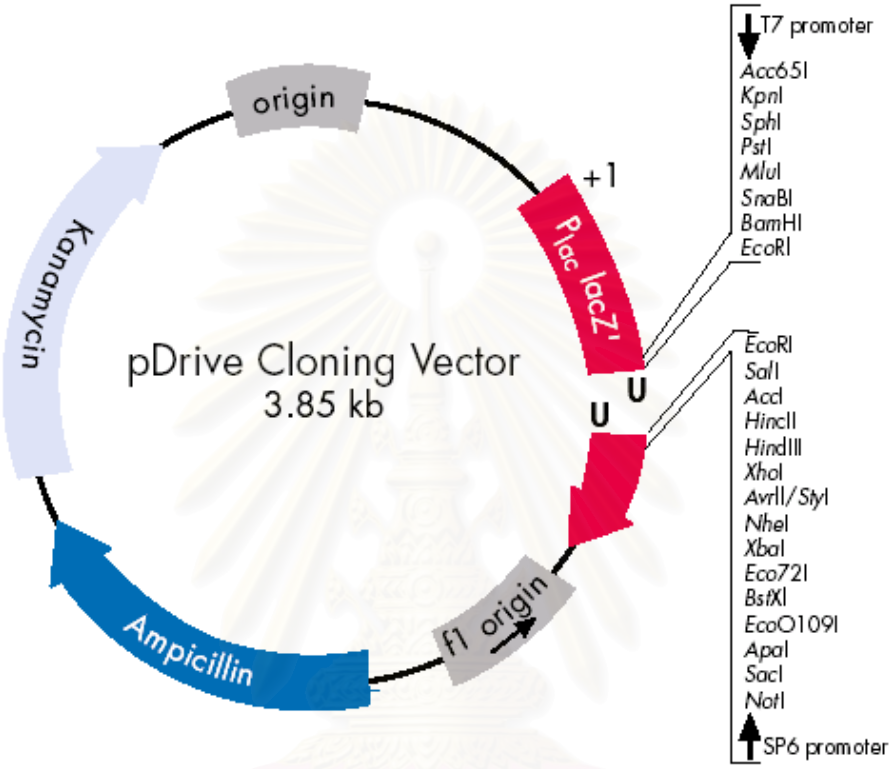
1.6 OAT_2.5_W1

CTGCAGACGCGTTACGTATCGGATCCAGAATTCGTGAT

1 TATTTTGTGC AGAGTTCAAA TTGTGTAAAT TCGGTTGGGG GCAAACTGAA
51 ATACCTTATG TCAAAAATTG CCAACATTGA TCAAGAGCAC AATTTCGATC
101 TCGACAATAA CACTGTCACA CTAGATGATT TATCTGAGGG CCAACGGTGT
151 GAGTTAGAGC AGGAAGTCGA GGTAGAAATT GCCAGAGCTA AGGGAACATA
201 AACTCATACG CTTGCAGAAA ACAAAGAATA GTGTTATTGC GAAACAGCAA
251 AAGCCGATAA ATTTAGAATT ATCGGCTAAT GAAAAGGAGG TAGCTATGCT
301 TGATTTATTC TGGAAACATA GGACCTTTTG TTTTGCCAGC TGAATTTCGT
351 GCCAAGGAAG TGGATGAACA TCTAGACGAT GGATCACGAA ATCGCGACGA
401 CAAGGCGGAA ATATTGGAGA GCCATCAACG AACCGAACTT AAACATCATT
451 CAAGTGAAAA AATCAGAATG CTTCTCCAAC ACATTAGATA AGGTAACGTT
501 TACAGGTAAT TTGCTTATTT CTCAATTTGA TAATGCTTCT GAAAATAATC
551 CATACATTAA TAATGTCACC ATGAATAATT CTAACAGATC GATTGGGGAG
601 ATTAATATTC TTGTTGGCAA TAATAAGTGT TAAATTTTCT ATTTCATCAT
651 TGACAAGTTA TGTCTACATG GTTGCTTATG ATCGAATCTA NAGCTANAGC
701 NCAAATTAAA TGGGGCTGAT ATAGCAGATA GTCTAATCAT GGACAGGGAA
751 TNTAGCGACA TGTANCNAAT GGGTAATGTA ATCGACCATT GTTGCTANCT
801 TAANCGTTCC CAAGTGTCGTT TAAGNAAAAA GTACTTGATG GCCTGGGACN
851 NTTNGGGATG CNANAAGTTA TAATGCGATN CNNCTGCCCC TCAATNAAAA
901 NTTGGAGGCT TCCCNCNGCT AGNGGATTCG CAAACCGNTA ANGCNNGTNC
951 CCAACCC

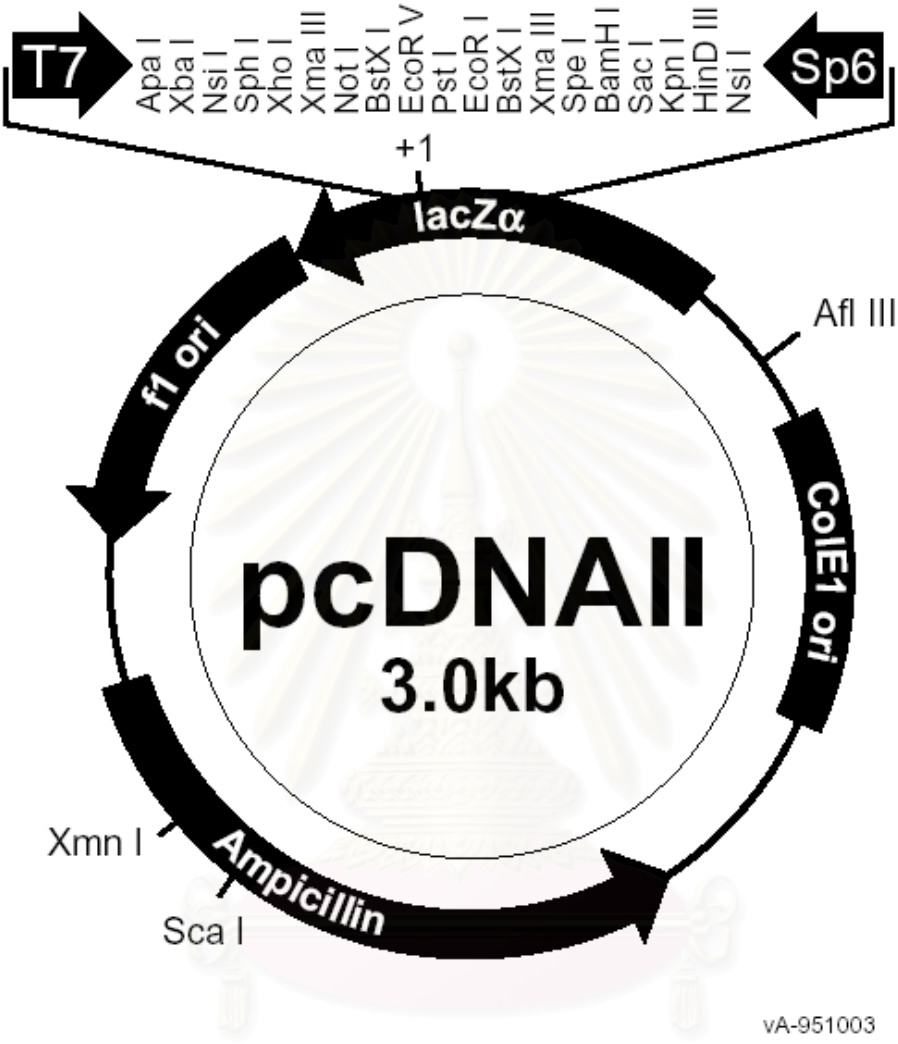
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. pDrive cloning vector (QIAGEN, USA)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. pCDNAII vector (Invitrogen, USA)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวธัญญารัตน์ คงขุนเทียน เกิดวันที่ 11 พฤศจิกายน พ.ศ. 2522 ที่จังหวัดเชียงใหม่ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2542 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2543 โดยได้รับทุนทบวงมหาวิทยาลัยและทุนรัชดาภิเษกสมโภช ในการสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ในระดับปริญญาโท-เอก และได้รับทุนพัฒนาอาจารย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตสารสนเทศ (วิทยาเขตราชบุรี) สนับสนุนค่าใช้จ่ายในการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย