บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

1. การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค differential display

จากผลการทำ differential display โดยใช้ primer ที่เป็น oligo dT primer จำนวน 8 ชนิด และ arbitary primer จำนวน 20 ชนิด คิดเป็นจำนวนทั้งหมด 160 คู่ primers พบ 47 คู่ primers ที่ให้แถบ DNA แตกต่างกัน ซึ่งเมื่อพิจารณาการใช้ไพรเมอร์ที่เป็น oligo dT primer แล้ว พบว่าการใช้ oligo dT primer แต่ละชนิดให้ผลการทดลอง (cDNA bands) ต่างกัน โดยมี oligo dT primer 2 ชนิดที่ไม่ให้แถบ cDNA ที่แตกต่างกันในทุกตัวอย่างพืช คือ oligo dT6 และ oligo dT7 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความจำเพาะของ oligo dT primer และ arbitary primer ที่ใช้ ต่อ mRNA จากตัวอย่างข้าวแตกต่างกัน จึงทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์ DNA มีความแตกต่างกัน (Bauer และคณะ, 1993)

จากรูปแบบของแถบ cDNA ที่ได้พบว่าหลายแถบมีลักษณะของการถูกกระตุ้นด้วยภาวะเค็ม (salt up-regulated) คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Ureda และคณะ (2002) ที่พบยีนจำนวนมากที่เป็น salt up-regulated ที่ได้จากการทำ differential display ใน barley ที่ได้รับภาวะเค็ม ซึ่งลักษณะของแถบ cDNA ที่ถูกกระตุ้นดังกล่าวอาจมีความเกี่ยวข้องกับยีนที่ควบคุมความสามารถในการทนเค็ม หรือความสามารถในการปรับตัวของข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 เมื่อได้รับภาวะเค็ม โดย Wei และคณะ (2000) พบลักษณะการแสดงออกของแถบ cDNA ที่เป็นแบบ salt up-regulated ในมะเขือเทศที่ได้รับภาวะเค็มในช่วงเวลาต่างๆ กัน โดยตัวอย่างของยีนที่พบได้แก่ *PIOX* ซึ่งอาจทำหน้าที่ในการช่วยลดการเกิด reactive oxygen species ในภาวะเค็ม และจากการศึกษาของ Li และ Chen (2000) พบยีน *S-adenosylmethyonine decarboxylase* ซึ่งเป็นยีนที่ encode ให้เอนไซม์ที่เป็น rate-limiting enzyme ในกระบวนการสังเคราะห์ polyamine ที่เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช โดยพบการแสดงออกของยีนนี้ในข้าวพันธุ์ทนเค็มมากกว่าในข้าวพันธุ์ปกติ และยังพบว่ายีนนี้ถูกชักนำให้มีการแสดงออกในข้าวพันธุ์ทนได้เร็วกว่าในข้าวพันธุ์ปกติ

2. **การโคลนชิ้นส่วน DNA ที่แตกต่างกัน**

จาก cDNA จำนวน 108 ชิ้นส่วน พบว่าสามารถนำมาเพิ่มปริมาณใหม่ด้วยวิธี PCR ได้เพียง 84 ชิ้นส่วน โดยในจำนวนนี้มี cDNA จำนวน 23 ชิ้นส่วน ถูกสังเคราะห์ได้ในปริมาณน้อยทำให้ไม่สามารถนำไปโคลนได้ เนื่องจากก่อนการนำชิ้นส่วน DNA ไปโคลน ต้องทำ DNA ให้บริสุทธิ์ด้วยการแยก DNA fragments จาก agarose gel โดยใช้ Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit (MOBIO Laboratories, Inc., USA) จึงมีการสูญเสีย DNA ไปบางส่วน ดังนั้นหากปริมาณ DNA ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR มีน้อยเมื่อทำการสกัดแยกอีกครั้ง ทำให้ได้ปริมาณ DNA ไม่เพียงพอต่อการโคลนได้

สำหรับ cDNA จำนวน 61 ชิ้นส่วน ที่สามารถทำการเพิ่มปริมาณจากปฏิกิริยา PCR ได้ในปริมาณมาก ถูกนำไปโคลนเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* โดยใช้ plasmid 2 ชนิด คือ plasmid ที่มี pBluescript II KS+ และ pGEM-T เป็น DNA พาหะ โดยผลจากการโคลนชิ้นส่วน DNA จำนวน 5 ชิ้นแรก คือ OsD1A11-2 OsD1A11-3 OsD1A16-1 OsD1A16-3 และ OsD1A16-4 เข้าสู่ pBluescript II KS+ เมื่อทำการตรวจสอบผลการโคลนพบชิ้นส่วน DNA แทรกอยู่ใน pBluescript II KS+ เพียง 1 โคลน คือ OsD1A16-1 ซึ่งประสิทธิภาพในการโคลนชิ้นส่วน DNA เข้าสู่ pBluescript II KS+ ไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นจึงเปลี่ยนมาใช้ plasmid pGEM แทน ซึ่งผลจากการโคลนชิ้นส่วน DNA จำนวน 56 ชิ้นส่วนที่เหลือ เมื่อนำไปตรวจสอบผลการโคลน พบ plasmid DNA ที่มีชิ้นส่วน DNA แทรกอยู่ใน plasmid จำนวน 53 โคลน ซึ่งจะเห็นได้ว่า plasmid pGEM-T มีประสิทธิภาพในการใช้โคลนชิ้นส่วน DNA ได้ดี

จากการใช้ plasmid pGEM-T แล้วพบว่ามีประสิทธิภาพในการโคลนสูงกว่า plasmid pBluescript II KS+ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในการโคลน PCR products เข้าสู่ plasmid pBluescript II KS+ ต้องผ่านขั้นตอนในการทำให้เป็น DNA ปลายทู่ก่อน (blunt end ligation) ซึ่งการทำปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้อาจมีประสิทธิภาพไม่ดีนัก จึงส่งผลถึงประสิทธิภาพในการโคลน ซึ่งต่างจาก plasmid pGEM-T ซึ่งเป็น pGEM® – T Vector System I Cloning kit plasmid pGEM-T นี้ถูกออกแบบมาเพื่อใช้สำหรับการโคลนชิ้นส่วน DNA ที่ได้จากการทำ PCR โดยเฉพาะ โดย pGEM-T จะมีปลายที่ห้อยด้วยเบส T ซึ่งสามารถจับกับปลายที่เป็นเบส A จาก PCR products ได้ดีกว่า ปลายที่เป็น blunt end

จึงทำให้มีโอกาสที่จะโคลนชิ้นส่วน DNA ได้มากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sgaramella และ Ehrlich (1978) อ้างถึงใน Cimmino และคณะ (1995) โดยพบว่า การเชื่อมต่อสาย DNA ด้วยปลายที่เป็น sticky end จะมีประสิทธิภาพดีกว่าปลายที่เป็น blunt end

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน DNA

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน DNA ที่โคลนได้จำนวน 54 โคลน มีเพียง 36 โคลน ที่สามารถได้ลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ได้ โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลในระดับโปรตีน (derived amino acid sequence) กับฐานข้อมูลมาตรฐานสากลของ EMBL databases พบว่ามี 27 โคลน ที่มีชิ้นส่วน DNA ที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนหลายชนิดที่มีรายงานหน้าที่ของโปรตีนแล้ว และอีก 9 โคลนมีความคล้ายคลึงกับโปรตีนที่ยังไม่มีรายงานหน้าที่ของโปรตีน ซึ่งโคลน 18 โคลนที่ไม่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ อาจเนื่องมาจาก DNA ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit (MOBIO Laboratories, Inc. USA) ยังไม่บริสุทธิ์เท่าที่ควร ซึ่งอาจจะต้องนำไปทำให้บริสุทธิ์ซ้ำอีกครั้ง

ในกลุ่มของโคลนที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนที่มีการศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่ของโปรตีนดังกล่าวนั้น มีจำนวน 10 โคลน ที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนในข้าว และ 3 โคลนที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนใน *Arabidopsis* ส่วนอีก 14 โคลนนั้นคล้ายคลึงกับโปรตีนของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น *Klebsiella aerogenes* และ *Acinetobacter* sp. เป็นต้น ในส่วนของโคลนที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่นั้น จำนวน 5 โคลน มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนของข้าว และอีก 4 โคลน มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนของจุลินทรีย์

สำหรับโคลนบางโคลนที่มี derived amino acid sequence คล้ายคลึงกับโปรตีนในข้าว และได้มีรายงานหน้าที่ของโปรตีนแล้ว อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะเค็ม เช่น OsD1B16-11 ที่คล้ายกับ RIM2 protein OsD1B15-5 ที่คล้ายกับ 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2, 6-bisphosphate 2-phosphatase และ OsD5C05-3 ที่คล้ายกับ putative cell wall protein ซึ่งมีรายงานว่า RIM2 protein เป็นโปรตีนที่พบเฉพาะในข้าว และมีการแสดงออกเมื่อพืชได้รับภาวะเครียด (Wang และคณะ, 2003) Banzai และคณะ (2003) พบว่ามีเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2,

6-bisphosphate 2-phosphatase เพิ่มขึ้นหลังจากที่ *Bruguiera gymnorrhiza* ได้รับภาวะเค็ม ซึ่งเอนไซม์นี้เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครส โดยรายงานว่าการที่พบเอนไซม์ชนิดนี้อาจเป็นการตอบสนองของพืชแบบหนึ่งเมื่อพืชได้รับภาวะขาดน้ำ นอกจากนี้ยังพบยีนที่เกี่ยวกับ putative cell wall protein ซึ่ง Marshall และคณะ (1999) พบว่า putative cell wall protein มีความเกี่ยวข้องกับภาวะเครียด ซึ่งพบว่ามีการตอบสนองของ cell wall protein เพิ่มขึ้นในภาวะขาดน้ำของพืช โดยมีการเจริญของขนรากยาวขึ้น เพื่อช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับน้ำได้มากขึ้น

ตัวอย่างโคลนที่มี derived amino acid sequence คล้ายคลึงกับโปรตีนที่พบใน *Arabidopsis* ที่อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนต่อภาวะเค็ม เช่น OsD1A14-6 ที่คล้ายกับ putative RING zinc finger protein ซึ่งมีรายงานว่า putative RING zinc finger protein เป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะเค็มของพืช โดยใน *Triticum aestivum* L. ที่ได้รับภาวะเค็มมีการแสดงออกของ zinc finger protein มากกว่าในภาวะปกติ (Nemoto และคณะ, 1999) นอกจากนี้ ได้มีการนำยีน *OSISAP1* ซึ่งมีส่วนของ zinc finger protein เข้าไปในยาสูบ พบว่าทำให้ยาสูบมีความสามารถในการทนต่อภาวะเค็ม แล้ง และภาวะเย็นได้มากขึ้น (Mukhopadhyay และคณะ, 2004)

สำหรับโคลนที่มี derived amino acid sequence คล้ายคลึงกับโปรตีนที่พบในแบคทีเรีย ที่อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับความสามารถในการตอบสนองต่อภาวะเค็ม เช่น OsD3A11-1 ที่คล้ายกับ glutamate synthase small subunit ใน *Klebsiella aerogenes* OsD1B15-1 ที่คล้ายกับ AcrB/AcrD/AcrF family cation efflux system protein ใน *Bacteroides fragilis* โดย glutamate synthase small subunit เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโพรลีน โดยจัดเป็นสารกลุ่ม osmolytes (Nuccio และคณะ, 1999) เมื่อพืชได้รับภาวะเครียดอาจมีการสร้างโพรลีน ซึ่งจัดเป็นการปรับตัวของพืชเมื่อพืชได้รับภาวะเครียดแบบหนึ่ง (Lyer and Caplan 1998) สำหรับโปรตีนในกลุ่ม cation efflux system นั้น มีรายงานความเกี่ยวข้องกับภาวะเค็ม โดยมีรายงานเกี่ยวกับยีน *AtHKT*1 ที่พบใน *Arabidopsis* ซึ่งเป็น cation efflux system protein ชนิดหนึ่ง โดยทำหน้าที่เกี่ยวการควบคุมการเข้าออกของโซเดียม และโพแทสเซียมไอออนภายในในเซลล์ (Rus และคณะ, 2001, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่า cation efflux system protein ช่วยให้ *Arabidopsis* (Apse และคณะ, 2003) ข้าว (Fukuda และคณะ, 2004) *Fusarium oxysporum* (Caracuel และคณะ., 2003) และยีสต์ (de Nadal และคณะ, 1999) มีความทนต่อภาวะ

เค็มได้ดีขึ้น และยังพบว่าการถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับ cation efflux system protein ให้กับ *Brassica* (Zhang และคณ, 2001) และ Tomato (Zhang และ Blumwald, 2001) ทำให้ transgenic plant ที่ได้สามารถทนเค็มต่อภาวะเค็มได้ดีขึ้น นอกจากนี้ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ยังพบโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของ transporter หลายชนิด ที่พบในแบคทีเรีย ซึ่งอาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขับสารพิษ และการเข้าออกของไอออนต่างๆ (Martinoia และคณะ, 2002)

ส่วนโคลนจำนวน 9 โคลน มีชิ้นส่วน DNA ที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนทั้งในข้าวและแบคทีเรีย แต่ยังไม่มีการรายงานหน้าที่ ดังนั้นการศึกษาในเชิงลึกของหน้าที่ยีนเหล่านี้อาจทำให้ทราบถึงยีนชนิดใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะเค็มของข้าวได้

จะเห็นได้ว่า เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของกลุ่มสิ่งมีชีวิต ที่ชิ้นส่วนของ DNA ที่ทำการศึกษานั้น จะมีชิ้นส่วนที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนของพืช ประมาณ 50% (18 โคลน) และอีก 50% จะมีความคล้ายคลึงกับโปรตีนในแบคทีเรีย โคลนที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนของแบคทีเรีย อาจเป็นส่วนหนึ่งของ false positive ที่เกิดขึ้น เนื่องมาจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ติดมาจากตัวอย่างพืช ซึ่งอาจจะเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้การศึกษาการแสดงออกของยีนโดยวิธี differential display มีเปอร์เซ็นต์ false positive สูง แต่อย่างไรก็ดี ยังไม่สามารถตัดสินใจได้ว่าโคลนดังกล่าวเป็น false positive ทั้งหมด จนกว่าจะได้ทำการศึกษาด้วย northern blot analysis (Zegzouti และคณะ, 1997) หรือ reverse northern blot (Vögeli-Lange และคณะ, 1996)

4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ได้ด้วย northern blot analysis

ในการทดลองนี้ได้คัดเลือก cDNA ที่โคลนได้ ที่มี derived amino acid sequence คล้ายคลึงกับสิ่งมีชีวิตมากที่สุด 9 ลำดับแรก โดยในจำนวนนี้เป็นโปรตีนในข้าว จำนวน 8 โคลน และเป็นโปรตีนในแบคทีเรียจำนวน 1 โคลน คือ glutamate synthase ที่พบใน *Klebsiella aerogenes* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ similarity สูง มาใช้เป็น probe เพื่อติดตามการแสดงออกของยีนเหล่านั้นในข้าว ด้วยวิธี northern blot analysis สำหรับโคลน OsD3A11-1, OsD3A11-2 และ OsD3A11-3 ต่างมีความเหมือนกับยีน glutamate synthase เหมือนกัน และมีขนาดของ DNA fragment ใกล้เคียงกันมาก โดยโคลนทั้งสามมี

ขนาด DNA fragment 669 666 และ 667 bp ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกมาเพียง 1 โคลน ที่มีขนาดยาวที่สุด เพื่อใช้ติดตามการแสดงออกของยีน

ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน พบว่าสามารถตรวจพบสัญญาณการแสดงออกของยีนจากการใช้ OsD1B16-11 เป็น probe โดยพบสัญญาณการแสดงออกของยีนเฉพาะในข้าว LPT123-TC171 ทั้งที่อยู่ในภาวะปกติ และได้รับภาวะเค็มเท่านั้น แต่มีสัญญาณการแสดงออกของยีนในข้าว LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะเค็มมากกว่าในภาวะปกติ เนื่องจากตรวจพบการแสดงออกของยีนในข้าว LPT123-TC171 ที่เป็นสายพันธุ์ทนเค็มเท่านั้น ซึ่งอาจเป็นส่วนของยีนที่มีการผันแปรทางพันธุกรรมไปจากข้าว LPT123 โดยมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนเค็ม เนื่องจากข้าว LPT123-TC171 เป็นข้าวที่ผ่านการเลี้ยงเนื้อเยื่อในระยะแคลลัส ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมได้มากในระยะเวลาอันสั้น (Vajrabhaya และ Vajrabhaya, 1974) โดย ทิพยวรรณ ธนไพศาล (2534) พบว่าข้าว LPT123-TC171 มีการกลายพันธุ์ในระดับยีน และจากการคัดเลือกความทนเค็มโดยใช้ selection medium ที่มีความเข้มข้น NaCl สูง พบว่า ยีนที่ควบคุมความทนเค็มเป็น incomplete dominance ซึ่งอาจเป็น single gene หรือ multiple allele ก็ได้ โดยอาจเกิด mutation ได้มากกว่า 1 ตำแหน่ง และสอดคล้องกับการศึกษาของ ปารวี ธิกาศ (2546) ที่พบความแปรผันทางพันธุกรรมของข้าว LPT123-TC171 ในระดับ DNA OsD1B16-11 เป็นโคลนที่มี derived amino acid sequence คล้ายคลึงกับ RIM2 protein โดยเป็นโปรตีนที่พบได้เฉพาะในข้าวเท่านั้น และมักแสดงออกเมื่อข้าวอยู่ในภาวะเครียด (Wang และคณะ, 2003) He และคณะ (2000) รายงานว่า RIM 2 protein น่าจะเป็นส่วนหนึ่งของ transposable elements ซึ่งเป็นส่วนที่มีความเกี่ยวข้องกับโครงสร้าง และวิวัฒนาการของจีโนมพืช (McClintock, 1984; McDonald, 1995; Kidwell และ Lisch,1997) นอกจากนั้น Hirochika (1993) พบว่าพืชจะมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ transposable elements เมื่อได้รับภาวะเครียด ซึ่งอาจเป็นการปรับตัวเพื่อตอบสนองต่อภาวะดังกล่าว (Wessler, 1996)

เมื่อใช้ OsD1B15-5 ซึ่งมี derived amino acid sequence คล้ายคลึงกับ putative 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2, 6-bisphosphate 2-phosphatase ที่พบในข้าว เป็น probe ผลตรวจพบสัญญาณการแสดงออกของยีนในข้าว LPT123 ที่ได้รับภาวะเค็ม และข้าว LPT123-TC171 ทั้งที่อยู่ในภาวะปกติและได้รับภาวะเค็ม แต่ไม่พบสัญญาณการแสดงออกของยีนในข้าว LPT123 ที่อยู่ในภาวะปกติ ซึ่งจากการศึกษาของ Banzai และคณะ (2003) ก็พบว่ามีการกระตุ้นการแสดงออกของยีน 6-phosphofructo-2-kinase/

fructose-2, 6-bisphosphate 2-phosphatase ใน *Bruguiera gymnorrhiza* ที่ได้รับภาวะเค็มเช่นกัน 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2, 6-bisphosphate 2-phosphatase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในกระบวนการ carbohydrate metabolism (Colosia, 1998 และ Neuhaus,1990) โดยเป็นตัวควบคุมปริมาณของ fructose-2, 6-bisphosphate ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครส (Draborg และคณะ, 1999; Kruger และคณะ, 1994) โดย Banzai และคณะ (2003) รายงานว่าการที่พบว่าพืชมีเอนไซม์ 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2, 6-bisphosphate 2-phosphatase เพิ่มขึ้นในภาวะเครียด อาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็น osmolyte ชนิดหนึ่ง ที่มีการสะสมระหว่างการปรับตัวของพืชเมื่อได้รับภาวะเค็ม

ผลจากการใช้ OsD1B18-18 ซึ่งมี derived amino acid sequence คล้ายคลึงกับ hypothetical protein เป็นprobe สามารถตรวจพบสัญญาณการแสดงออกของยีนในข้าว LPT123 ที่ได้รับในภาวะเค็ม และข้าว LPT123-TC171 ทั้งที่อยู่ในภาวะปกติและได้รับภาวะเค็ม แต่ไม่พบสัญญาณการแสดงออกของยีนในข้าว LPT123 ที่อยู่ในภาวะปกติ โดยโคลน OsD1B18-18 มาจากโคลนที่มีความเหมือนกับยีนในข้าว แต่เป็นยีนที่ยังไม่มีรายงานหน้าที่ของยีน ดังนั้นโคลนนี้จึงเป็นโคลนหนึ่งที่อาจทำให้ทราบถึงยีนชนิดใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะเค็มของข้าวได้

ผลจากการใช้ OsD2B15-2 ซึ่งมี derived amino acid sequence คล้ายคลึงกับ NAD(P) H-quinone oxidoreductase เป็น probe สามารถตรวจพบสัญญาณการแสดงออกของยีนในทุกตัวอย่างของข้าวที่ใช้ในการทดลอง แต่มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกัน โดยพบว่าข้าว LPT123 ที่อยู่ในภาวะปกติ มีสัญญาณการแสดงออกของยีนน้อยกว่า ข้าว LPT123 ที่ได้รับภาวะเค็ม และข้าว LPT123-TC171 ทั้งที่อยู่ในภาวะปกติและได้รับภาวะเค็ม ซึ่งผลเป็นไปในทำนองเดียวกันทั้ง 2 ชุดการทดลองของตัวอย่างพืช แต่ผลจากเนื้อเยื่อพืชชุดที่ 1 พบสัญญาณการแสดงออกของยีนในข้าว LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะเค็มมากกว่า ข้าว LPT123-TC171 ที่อยู่ในภาวะปกติ ในขณะที่เนื้อเยื่อพืชชุดที่ 2 พบสัญญาณการแสดงออกของยีนในข้าว LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะเค็มน้อยกว่าข้าว LPT123-TC171 ที่อยู่ในภาวะปกติ การที่พบการแสดงออกแตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจาก genetic background ของประชากรข้าวยังไม่ homogeneous (ปารวี ธิกาศ, 2546) หรืออาจเนื่องมาความผิดพลาดจากปริมาณ total RNA ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้ชุดตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชทดลองเพิ่มขึ้น เพื่อยืนยันผลการทดลอง หรืออาจทำ

northern blot analysis ด้วยการใช้ยีนที่เป็น internal control เช่น actin gene แทนการใช้ปริมาณ total RNA ในการควบคุมปริมาณ total RNA ในแต่ละตัวอย่างเนื้อเยื่อพืช สำหรับยีน NAD(P) H-quinone oxidoreductase ซึ่งเป็นเอนไซม์มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (Sparla และคณะ, 1996; Trost และคณะ, 1997) ซึ่ง Mano และคณะ (2002) พบว่าการที่พบ NAD(P) H-quinone oxidoreductase ในพืชที่อยู่ในภาวะเครียดอาจเป็นการปรับตัวเพื่อป้องกันการเกิด reactive oxygen species ซึ่ง *Arabidopsis thaliana* ที่อยู่ในภาวะ oxidative stress ก็มีการแสดงออกของยีน NAD(P) H-quinone oxidoreductase เพิ่มขึ้นเช่นกัน

ลักษณะการแสดงออกของยีนที่ได้จากการทำ northern blot analysis โดยใช้ probe ทั้ง 4 ชนิด พบว่า มีรูปแบบที่แตกต่างจากแถบ cDNA ที่ได้จากการทำ differential display ซึ่ง OsD1B16-11 OsD1B15-5 และ OsD2B15-2 มีรูปแบบการแสดงออกของแถบ cDNA ที่พบเฉพาะในข้าว 123-TC171 ที่ได้รับภาวะเค็มเท่านั้น ส่วน OsD1B18-18 พบการแสดงออกของแถบ cDNA ในข้าว 123-TC171 ทั้งที่ได้รับภาวะเค็ม และที่อยู่ในภาวะปกติ การพบการแสดงออกของยีนในตัวอย่างข้าวที่ได้จากการทำ northern blot analysis แต่ไม่พบการแสดงออกจากการทำ differential display อาจเป็นไปได้ว่าในขั้นตอนการทำ mRNA จากตัวอย่างข้าวในชุดนั้นๆ มีน้อยจนไม่เพียงพอที่จะสร้าง cDNA จากปฏิกิริยา RT ทำให้ไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนจากการทำ Differential display ได้

ผลจากการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี northern blot analysis ไม่พบสัญญาณการแสดงออกจากการใช้ OsD5C05-2 OsD1B14-12 OsD5C05-3 OsD3A11-1 และ OsD1B15-4 เป็น probe ทั้งที่พบการแสดงออกของแถบ cDNA เหล่านี้จากการทำ Differential display โดย OsD5C05-2 OsD5C05-3 OsD1B15-4 มีรูปแบบการแสดงออกของแถบ cDNA แบบที่ 4 ซึ่งพบการแสดงออกในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ ทั้งในภาวะปกติและในภาวะเค็ม แต่มีระดับความเข้มของแถบ cDNA ไม่เท่ากัน ส่วน OsD1B14-12 พบการแสดงออกของแถบ cDNA แบบที่ 1 ซึ่งพบการแสดงออกในข้าว LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะเค็มเท่านั้น และ OsD3A11-1 ซึ่งพบการแสดงออกของแถบ cDNA แบบที่ 3 ที่พบในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ หลังจากได้รับภาวะเค็มเท่านั้น อาจเป็นไปได้ว่าสัญญาณการแสดงออกของยีนมีน้อยทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้ หรือไม่มีการแสดงออกของยีนนี้ในต้นข้าว ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจาก derived amino acid sequence เหล่านี้เป็นส่วนของ false positive ที่อาจเกิดขึ้นได้ในการทำ differential display โดยมีสาเหตุมาจากความจำเพาะ

ของ arbitary primer ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR (Bauer และคณะ,1993) หรืออาจเกิดจากความแปรผันในปฏิกิริยา PCR ที่เกิดขึ้นในแต่ละครั้งของการทดลอง (Liang และ Pardee,1995)

ถึงแม้ว่าจะไม่พบการแสดงออกของยีนจากการใช้ probe เหล่านี้ ทำ northern blot analysis แต่ก็มีรายงานหน้าที่ของยีนจากโคลนที่นำมาทำ probe เหล่านี้ว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการปรับตัวของพืชเมื่อพืชได้รับภาวะเค็ม เช่น probe จากโคลน OsD5C05-3 ที่มีส่วนคล้ายคลึงกับยีนที่เกี่ยวข้องกับ putative cell wall protein ในข้าว เป็นที่ทราบกันดีว่า cell wall protein มีความเกี่ยวข้องกับการยืดยาว และการขยายขนาดของเซลล์ (Showalter, 2001) ซึ่ง Marshall และคณะ (1999) พบว่ามีการตอบสนองของ cell wall protein เพิ่มขึ้นในภาวะขาดน้ำ โดยมีการเจริญของขนรากยาวขึ้น เพื่อช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับน้ำได้มากขึ้น สำหรับโคลน OsD3A11-1 ที่มีส่วนคล้ายคลึงกับยีนสร้าง glutamate synthase small subunit ใน *Klebsiella aerogenes* ซึ่ง glutamate synthase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสังเคราะห์ glutamate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์ โพรลีน โดยโพรลีนเป็นสารจำพวก osmolyte ซึ่งช่วยในการรักษา osmotic potential ของเซลล์ ซึ่งเป็นกลไกการปรับตัวของพืชต่อภาวะขาดน้ำ (Lyer and Caplan 1998) มีรายงานของ Popova (2002) ว่ามีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ glutamate synthase เมื่อพืชได้รับภาวะเค็ม ซึ่งเป็นการปรับตัวของพืชแบบหนึ่งเมื่อได้รับภาวะเค็ม ดังนั้นส่วนของยีนเหล่านี้อาจจะเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะเค็ม ซึ่งอาจจะต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย