

เครื่องหมายทางพันธุกรรมของข้าว *Oryza sativa* L.
พันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็มที่ตรวจสอบโดยวิธีอาร์เอพีดี



นางสาวปารวี ธิกาศ

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-3782-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC MARKERS OF THE SALT TOLERANT LINE OF RICE *Oryza sativa* L.
CULTIVAR LEUNG PRATEW DETECED BY RAPD METHOD



Miss Parawee Thikart

สถาบันวิทยบริการ

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

Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2003
ISBN 974-17-3782-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์ เครื่องหมายทางพันธุกรรมของข้าว *Oryza sativa* L. พันธุ์เหลืองประทิว
สายพันธุ์ทนเค็มที่ตรวจสอบโดยวิธีอาร์เอพีดี

โดย นางสาวปารวี ธิกาศ

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ศาสตราจารย์ กิตติคุณ มนทกานติ วัชรภักย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจริต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันท์)

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ศาสตราจารย์ กิตติคุณ มนทกานติ วัชรภักย์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. พงศ์ธาริน ไส่หิ์ตระกูล)

ปารวี ธิกาศ : เครื่องหมายทางพันธุกรรมของข้าว *Oryza sativa* L. พันธุ์เหลืองประทิว
สายพันธุ์ทนเค็มที่ตรวจสอบโดยวิธีอาร์เอพีดี (GENETIC MARKERS OF THE SALT
TOLERANT LINE OF RICE *Oryza sativa* L. CULTIVAR LEUNG PRATEW
DETECED BY RAPD METHOD) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์, อ. ที่ปรึกษา
ร่วม : ศ. กิตติคุณ มนทกานติ วัชรวิทย์, 117 หน้า. ISBN 974-17-3782-3

เมื่อทดสอบความสามารถในการทนแล้งของข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม
(LPT123-TC171) ที่เกิดจาก somaclonal variation ในหลอดทดลองและผ่านการคัดเลือกภายใต้
ภาวะเค็ม 10 ชั่วโมง พบว่า LPT123-TC171 มีความสูง น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นและราก
สูงกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มี PEG 6000 ความ
เข้มข้น 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากความสามารถในการทนแล้งของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มนี้ทำ
ให้คาดว่ายีนบางยีนที่เกี่ยวกับความสามารถในการทนแล้งและทนเค็มน่าจะมีความเกี่ยวข้องกัน
หรืออาจจะเป็นยีนในกลุ่มเดียวกัน และเมื่อนำข้าว LPT123-TC171 มาคัดเลือกภายใต้ภาวะแล้ง
ต่ออีกหนึ่งชั่วโมง พบว่าข้าว LPT123-TC171 รุ่นที่ 11 มีความทนทานต่อภาวะแล้งได้ดีขึ้น เมื่อ
เปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์ดังกล่าวในรุ่นที่ 10

การใช้ RAPD ศึกษาการแปรทางพันธุกรรมของข้าว LPT123-TC171 เปรียบเทียบกับข้าว
สายพันธุ์เดิม พบรูปแบบของแถบ DNA ที่แตกต่างกันในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งแสดงว่าข้าวทั้ง
สองสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุล เมื่อทำการโคลนชิ้นส่วน DNA ที่
แตกต่างกันระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ คือ 171_A_13, 123_B_18 และ 123_UBC_80 เพื่อใช้
เป็น probe ในการทำ Southern blot analysis ผลพบความแตกต่างกันของแบบแผนจีโนม
ระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งแสดงว่ามีการแปรทางพันธุกรรมเกิดขึ้นในระดับ DNA ในข้าว
LPT123-TC171 และเกิดขึ้นหลายตำแหน่ง การทำ hybridization ใน genomic DNA ของข้าวทั้ง
สองสายพันธุ์ โดยใช้ 171_A_13 และ 123_B_18 เป็น probe แสดงรูปแบบของ repeated
sequence hybridization และเมื่อใช้ 123_UBC_80 เป็น probe พบว่า 123_UBC_80 อาจเป็นส่วน
หนึ่งของ small gene family เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุ
กรรมที่โคลนได้เป็น probe ในการทำ Northern blot analysis ไม่พบสัญญาณ mRNA ในทุก
การทดลอง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการแสดงออกของยีนมีระดับต่ำจนไม่สามารถตรวจสอบได้หรือ
เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่โคลนได้เป็นบริเวณที่ไม่ใช่ coding sequence ซึ่งควรทำการศึกษา
ความเกี่ยวข้องของเครื่องหมายทางพันธุกรรมกับความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดต่อไป

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2546.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4372334923 : MAJOR GENETICS

KEY WORDS : RICE/ *Oryza sativa* L./ DROUGHT STRESS/ RAPD

PARAWEE THIKART : GENETIC MARKERS OF THE SALT TOLERANT LINE OF RICE *Oryza sativa* L. CULTIVAR LEUNG PRATEW DETECED BY RAPD METHOD

THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. DR. SUPACHITRA CHADCHAWAN, THESIS

CO-ADVISOR : PROF. MONTAKAN VAJRABHAYA, 117 pp. ISBN 974-17-3782-3

Drought-tolerant ability of salt-tolerant Leung Pratew (LPT123) rice line, LPT123-TC171, *in vitro* selected from somaclonal variegated LPT123 rice line under salt stress pressure with additional selection under salt stress condition for 10 generations, was determined by growth comparison between the original and the resistant rice lines, when they were grown in WP nutrient solution, containing 200 g/l PEG 6000 for 6 weeks. The significant higher shoot and root dry weights, including shoot height, were detected in LPT123-TC171 rice line. These suggested the overlapping between salt and drought resistant genes in rice. After selection under drought stress condition, LPT123-TC171 in the 11th generation showed the relatively higher drought tolerant ability compared to LPT123-TC171 in the 10th generation.

Genetic variation between the original and the stress-resistant lines, detected by RAPD method indicated the difference between these two lines at molecular level. The different RAPD fragments between the resistant and the original lines were cloned, and named 171_A_13, 123_B_18 and 123_UBC_80 respectively. Then they were used as probes for the Southern blot analysis to distinguish the genomic patterns between the two rice lines. The different genomic patterns were found which suggested the differences between these two lines at DNA level. Genomic DNA hybridization using 171_A_13 and 123_B_18 fragments as probes reflected the patterns of the repeated sequence hybridization, while the hybridization using 123_UBC_80 fragment as a probe suggested that this fragment might be a part of a small gene family in rice. Northern blot analysis using genetic markers as probes revealed that the gene expression might be too low to be detected in all samples analyzed, or the obtained fragments were not the coding region. Further analysis for the association between the genetic markers and stress tolerant ability is required.

Department.....Botany.....Student' s signature.....

Field of study.....Genetics.....Advisor' s signature.....

Academic year.....2003.....Co-Advisor' s signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้กำลังใจ และคำแนะนำต่างๆ ตลอดจนการทำวิจัยและตรวจแก้
ไขวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ กิตติคุณ มณฑกานติ วัชรภักย์ อาจารย์ที่
ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำและความช่วยเหลือต่างๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความ
สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันท์ ประธานกรรมการสอบวิทยา
นิพนธ์ อาจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์ และอาจารย์ ดร. พงศ์ธาริน ไฉ่หัตถะกุล กรรมการสอบวิทยา
นิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดจนการทำวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ธีรพร บุญยอังกฤษ สถาบันวิจัยข้าวปทุมธานี สถาบันวิจัย
ข้าวบางเขนและสถาบันวิจัยข้าวราชบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123

ขอขอบคุณทุนทบวงมหาวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ในระดับปริญญา
โท-เอกและทุนพัฒนาอาจารย์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติที่ให้ทุนสนับสนุนการ
ศึกษาและวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณรุปรุปรุ อัครเอกปัญญา คุณสหัช จันทนาอรพินท์ อาจารย์อัญชลี ใจดี
สำหรับความช่วยเหลือในการทำวิจัย คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ กำลังใจและความห่วงใย

ขอขอบคุณ คุณณภัทศรณ ปัญญาสุข คุณศักดิ์ชัย กรรมาวางกูร คุณธัญญารัตน์ คงขุน
เทียน คุณพงศธร กล่อมสกุล คุณสมพร มณีประสพสุข คุณชัชวาล วงศ์ชัย คุณสุวิชา วรรณวิเชียร
คุณอรรจ จันทรบาตร และทุกท่านในภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัยสำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจในการทำวิจัย

กราบขอบพระคุณคุณพ่อคุณแม่ และพี่ชาย ที่สนับสนุนในด้านการเรียน ตลอดจนเป็น
กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. การตรวจเอกสาร.....	4
กลไกการตอบสนองของพืชเมื่อพืชได้รับภาวะแล้งและภาวะเค็ม.....	4
ภาวะแล้งและภาวะเค็มกับการเจริญเติบโตของพืช.....	6
การค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะแล้งและภาวะเค็ม.....	8
เครื่องหมายทางพันธุกรรม.....	11
RAPD.....	11
3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	17
อุปกรณ์การศึกษา.....	17
วิธีการทดลอง.....	21
4. ผลการทดลอง.....	27
1. การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่ คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง.....	27
1.1 การศึกษาภาวะแล้งที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง.....	27
1.2 การเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่ 10 ในภาวะแล้ง.....	29
1.3 การเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่ 11 ในภาวะแล้ง.....	41

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2. การศึกษาการแปรทางพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์เดิม โดยวิธี RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	53
2.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม.....	53
2.1 การตรวจสอบรูปแบบของแถบ DNA ที่แสดง DNA polymorphism ของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ โดยวิธี RAPD.....	53
3. การโคลนเครื่องหมายทางพันธุกรรม.....	68
4. การศึกษาความเกี่ยวข้องของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากรAPDกับการแสดงออกของยีนในภาวะแล้งและภาวะเค็ม.....	73
4.1 การศึกษาจำนวนชุดของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากรAPD โดยวิธี Southern blot analysis.....	73
4.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ โดยวิธี Northern blot analysis.....	74
5. อภิปรายผลการทดลอง.....	87
1. การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง.....	87
2. การศึกษาการแปรทางพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์เดิม โดยวิธี RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	89
3. การโคลนเครื่องหมายทางพันธุกรรม.....	90
4. การศึกษาความเกี่ยวข้องของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากรAPDกับการแสดงออกของยีนในภาวะแล้งและภาวะเค็ม.....	91
6. สรุปผลการทดลอง.....	96
รายการอ้างอิง.....	99

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก.....	107
ภาคผนวก ก.....	108
ภาคผนวก ข.....	112
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	117



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	อัตราการรอดตายของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No. 2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากการเจริญเติบโตในภาวะแล้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์.....	28
2	ความสูงในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....	32
3	ความยาวรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....	33
4	น้ำหนักสดต้นในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....	35
5	น้ำหนักแห้งต้นในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....	36

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
6	<p>น้ำหนักสตรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญเติบโตในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....</p>	38
7	<p>น้ำหนักแห้งรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญเติบโตในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....</p>	39
8	<p>ความสูงในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญเติบโตในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....</p>	44
9	<p>ความยาวรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญเติบโตในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....</p>	45
10	<p>น้ำหนักสดต้นในแต่ละสัปดาห์ ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญเติบโตในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....</p>	47

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
11	<p>น้ำหนักแห้งต้นในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....</p>	48
12	<p>น้ำหนักสดรากในแต่ละสัปดาห์ ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....</p>	50
13	<p>น้ำหนักแห้งรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....</p>	51
14	<p>ขนาดของแถบ DNA ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) จากการทำ Southern blot analysis โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม123_B_18_14 เป็น probe.....</p>	75
15	<p>ขนาดของแถบ DNA ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) จากการทำ Southern blot analysis โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม 123_UBC_80_18 เป็น probe.....</p>	76

สารบัญรูปร่าง

รูปที่	หน้า
<p>1 ความสูงในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....</p>	34
<p>2 ความยาวรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....</p>	34
<p>3 น้ำหนักสดต้นในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....</p>	37
<p>4 น้ำหนักแห้งต้นในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....</p>	37
<p>5 น้ำหนักสดรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....</p>	40

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
<p>6 น้ำหนักแห้งรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุเหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุเหลืองประทิวสายพันธุทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....</p>	40
<p>7 ความสูงในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุเหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุเหลืองประทิวสายพันธุทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....</p>	46
<p>8 ความยาวรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุเหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุเหลืองประทิวสายพันธุทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....</p>	46
<p>9 น้ำหนักสดต้นในแต่ละสัปดาห์ ของข้าวพันธุเหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุเหลืองประทิวสายพันธุทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....</p>	49
<p>10 น้ำหนักแห้งต้นในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุเหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุเหลืองประทิวสายพันธุทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7).....</p>	49

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
11	52
12	52
13	55
14	56
15	57
16	58
17	59
18	60
19	61
20	62
21	63
22	64
23	65
24	66
25	67
26	71
27	71
28	71

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
29	การตรวจสอบขนาดของเครื่องหมายทางพันธุกรรม 123_UBC_80 ที่โคลนได้กับ fragment ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากวิธี RAPD.....	72
30	Southern blot analysis ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม 171_A_13_13 เป็น probe.....	77
31	Southern blot analysis ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม 123_B_18_14 เป็น probe.....	78
32	Southern blot analysis ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม 123_UBC_80_18 เป็น probe.....	79
33	รูปแบบของ total RNA ที่สกัดจากข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) ที่ได้รับภาวะปกติและภาวะเค็ม (NaCl 0.3 %) ในช่วงเวลาต่างๆ (ที่เวลา 0 วัน, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง).....	80
34	รูปแบบของ total RNA ที่สกัดจากข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ที่ได้รับภาวะปกติและภาวะเค็ม (NaCl 0.3 %) ในช่วงเวลาต่างๆ (ที่เวลา 0 วัน, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง).....	81
35	รูปแบบของ total RNA ที่สกัดจากข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ที่ได้รับภาวะปกติและภาวะแล้ง (PEG 6000) ในช่วงเวลาต่างๆ (ที่เวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง).....	82
36	รูปแบบของ total RNA ที่สกัดจากข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ที่ได้รับภาวะปกติและภาวะเค็ม (NaCl 0.3%) ในช่วงเวลาต่างๆ (ที่เวลา 0 วัน และ 1 อาทิตย์).....	83
37	รูปแบบของ total RNA ที่สกัดจากข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ที่ได้รับภาวะปกติและภาวะเค็ม (NaCl 0.3%) ในช่วงเวลาต่างๆ (ที่เวลา 2 อาทิตย์, สิ้นสุดการให้ภาวะเค็มและเจริญในภาวะปกติเป็นเวลา 1 วัน, 3 วัน).....	84

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
38	รูปแบบของ total RNA ที่สกัดจากข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ที่ได้รับภาวะปกติและภาวะแล้ง (PEG 6000) ในช่วงเวลาต่างๆ (ที่เวลา 0, 3 และ 5 วัน).....	85
39	รูปแบบของ total RNA ที่สกัดจากข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ที่ได้รับภาวะปกติและภาวะแล้ง (PEG 6000) ในช่วงเวลาต่างๆ (ที่เวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์).....	86



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นธัญพืชที่สำคัญของมนุษย์ โดยประชากรกว่าครึ่งโลกบริโภค ข้าวเป็นอาหารหลัก แม้ว่าประเทศไทยสามารถผลิตข้าวได้มากและเป็นผู้ส่งออกข้าวอันดับต้นๆ แต่ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ยังคงต่ำเมื่อเทียบกับของโลก เนื่องมาจากข้อจำกัดด้านการผลิต โดยปัจจัยที่สำคัญคือ ภาวะแล้งและภาวะเค็ม ซึ่งเป็นภาวะที่เกิดขึ้นในหลายพื้นที่ของประเทศ

ภาวะแล้งมีผลกระทบต่อพืชทั้งในระดับเซลล์ สรีรวิทยา และการเจริญเติบโต (Bray, 1993) ซึ่งพืชจะมีกลไกการปรับตัวต่อภาวะแล้ง เช่น การลดพื้นที่ใบและการปิดปากใบ (Taiz และ Zeiger, 1998) การสร้างสาร antioxidant เพื่อกำจัด reactive oxygen species (Yong และ Jung, 1999) และการสะสมสาร osmolytes จำพวก proline, glycine betaine และ น้ำตาล (Cushman และ Bohnert, 2000)

การตอบสนองต่อภาวะแล้งหลายประการเป็นผลมาจากการควบคุมในระดับการแสดงออกของยีน โปรตีนที่มาจากแสดงออกของยีนเหล่านี้ อาจมีหน้าที่ในการปกป้องโครงสร้างของเซลล์และรักษากระบวนการทำงานในไซโตพลาสซึม ควบคุมการเปลี่ยนแปลงค่า water potential ในเซลล์เพื่อกระตุ้นให้มีการนำน้ำหรือควบคุมการสะสมไอออน รวมถึงการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่ encode เอนไซม์สำหรับสังเคราะห์สาร osmolytes เพิ่มมากขึ้น (Bray, 1993) ตลอดจนยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในพืช (signal transduction) เพื่อให้เกิดการตอบสนองต่อภาวะแล้ง (Knight และ Knight, 2001)

กลไกการตอบสนองของพืช เมื่อพืชได้รับภาวะแล้งจะคล้ายกับการตอบสนองของพืชเมื่อพืชได้รับภาวะเค็ม (Smirnov, 1998) จึงคาดว่ายีนที่แสดงออกในขณะที่พืชได้รับภาวะแล้งและภาวะเค็มน่าจะมีความเกี่ยวข้องกัน หรืออาจจะเป็นยีนกลุ่มเดียวกัน มีรายงานว่ายีนที่ถูกชักนำให้มีการแสดงออกในภาวะแล้งสามารถถูกชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วยภาวะเค็มได้ในพืชหลายชนิด เช่น ข้าว (Mundy และ Chua, 1988) ถั่วฝักยาว (Iuchi และคณะ, 1996) มะเขือเทศ (Chen และ Tabaeizadeh, 1992) *Craterostigma plantagineum* (Piatkowski, และคณะ, 1990) และ *Arabidopsis thaliana* (Yamaguchi-Shinozaki และคณะ, 1995) เป็นต้น

ความเครียดจากภาวะแล้งและภาวะเค็มมีผลทำให้การเจริญเติบโตและการสร้างผลผลิตของพืชลดลง (Cushman และ Bohnert, 2000) โดยภาวะแวดล้อมเหล่านี้จะก่อให้เกิดความเครียดจากการขาดน้ำ ข้าวซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมีขีดจำกัดในการทนความเครียดจากภาวะแล้งและภาวะเค็ม ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวให้มีความสามารถในการทนต่อภาวะแล้งและภาวะเค็มสูงขึ้นในหลายวิธี ตั้งแต่การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมพันธุ์ (Nguyen และคณะ, 1997) การคัดเลือกจาก somaclonal variation ระหว่างการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อคัดเลือกข้าวทนเค็มและทนแล้ง (Vajrabhaya และ Vajrabhaya, 1991; Vajrabhaya และคณะ, 2001) ตลอดจนความพยายามที่จะสร้าง transgenic rice โดยใช้ยีน *HVA1* จากข้าวบาร์เลย์ เพื่อให้ได้ข้าวที่ทนต่อภาวะแล้งและภาวะเค็ม (Xu และคณะ, 1996)

สายพันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานต่อภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมที่ได้จากการคัดเลือกจากต้นที่มีการกลายพันธุ์ เช่น somaclonal variation ที่เกิดระหว่างการเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากจะมีประโยชน์ในด้านที่เป็นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีลักษณะที่ดีขึ้นแล้ว ยังสามารถใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาที่มีความเกี่ยวข้องกับการต้านทานภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้อีกด้วย

การศึกษาและรายงานการปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวทนแล้งมีอย่างแพร่หลาย แต่ภาพที่ชัดเจนของการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานแล้งของข้าวนั้นยังไม่เป็นที่ชัดเจนในปัจจุบัน การศึกษาในครั้งนี้จะเป็นการศึกษาความสามารถในการทนแล้งของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่ได้จากการคัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง และการใช้เทคนิค RAPD ในการศึกษาการแปรทางพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์เดิมมาเป็นข้าวสายพันธุ์ทนเค็มและทนแล้งเพื่อหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่อาจใช้บ่งชี้ความต้านทานภาวะเค็มและภาวะแล้งได้อันจะนำไปสู่การศึกษายีนที่ควบคุมลักษณะทนแล้งและเค็มของข้าว และการประยุกต์ใช้เพื่อการพัฒนาพืชทนแล้งและทนเค็มต่อไปได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการศึกษาทดลอง

1. ศึกษาความสามารถในการทนแล้งของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจาก somaclonal variation ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123
2. ตรวจสอบการแปรทางพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์เดิมกับข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่แสดงลักษณะทนแล้งโดยใช้วิธี RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)
3. ศึกษาความเกี่ยวข้องของเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ที่ได้กับการแสดงออกของยีนในภาวะแล้งและเค็ม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลที่ได้จะสามารถนำไปใช้ศึกษาในที่ควบคุมลักษณะความทนแล้งของข้าวและการประยุกต์ใช้เพื่อการพัฒนาพันธุ์พืชทนแล้งต่อไปได้ในอนาคต

แผนการดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาความสามารถในการทนแล้งของข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง
2. ศึกษาการแปรทางพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์เดิม โดยใช้วิธี RAPD
3. ศึกษาความเกี่ยวข้องของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จาก RAPD กับการแสดงออกของยีนในภาวะแล้ง
4. ศึกษาความเกี่ยวข้องของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จาก RAPD กับการแสดงออกของยีนในภาวะเค็ม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

กลไกการตอบสนองของพืชเมื่อพืชได้รับภาวะแล้งและภาวะเค็ม

ภาวะแล้งและภาวะเค็มเป็นปัจจัยแวดล้อมที่สำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างผลผลิตของพืช (Cushman และ Bohnert, 2000) โดยภาวะแวดล้อมเหล่านี้จะก่อให้เกิด osmotic stress เนื่องจากค่า water potential ในดินลดต่ำลงจนใกล้เคียงหรือต่ำกว่าภายในเซลล์รากพืช จะส่งผลทำให้พืชลำเลียงน้ำเข้าสู่รากพืชได้น้อยลง ซึ่งถ้าค่า water potential ในดินลดต่ำลงมากเกินกว่าภายในเซลล์รากพืช น้ำในเซลล์รากพืชจะเคลื่อนตัวออกสู่ภายนอก ทำให้พืชขาดน้ำอย่างรุนแรงและแห้งตายไปในที่สุด ซึ่งพืชมีกลไกการปรับตัวอันเนื่องมาจากภาวะแล้งอยู่ 3 วิธี (Taiz และ Zeiger, 1998)

1. Drought escape การปรับตัวให้มีวงจรชีวิตสั้นลง เพื่อหลีกเลี่ยงจากความแห้งแล้ง ทำให้พืชสามารถดำรงอยู่ในสภาพแวดล้อมได้
2. Desiccation postponement การปรับตัวให้มีความสามารถในการรักษาปริมาณน้ำภายในเนื้อเยื่อไว้ได้
3. Drought tolerance หรือ Desiccation tolerance การปรับตัวให้ยังคงรักษาการทำงานและหน้าที่ต่างๆ ภายในต้นพืชไว้ได้

ภาวะแล้งมีผลกระทบต่อพืชทั้งในระดับเซลล์ สรีรวิทยา และการเจริญเติบโต (Bray, 1993) ซึ่งพืชจะมีการตอบสนองต่อภาวะแล้ง เช่น การลดพื้นที่ใบและการปิดปากใบเพื่อลดการสูญเสียน้ำ (Taiz และ Zeiger, 1998) การสร้างสาร antioxidant เพื่อกำจัด reactive oxygen species (Yong และ Jung, 1999) การสร้างกรดแอมไซคลิกเพื่อให้ออกมาควบคุมการตอบสนองทางสรีรวิทยาต่างๆ (Bray, 1993) และการสะสมสาร compatible solute จำพวก proline, glycine betaine และ น้ำตาล เพื่อปรับค่า water potential ภายในเซลล์ (Cushman และ Bohnert, 2000) การเปลี่ยนแปลงการทำงานของยีนเมื่อได้รับภาวะแล้ง โดยโปรตีนที่มาจากการแสดงออกของยีนเหล่านี้ อาจมีหน้าที่ในการปกป้องโครงสร้างของเซลล์และรักษากระบวนการทำงานในไซโตพลาสซึม ควบคุมการเปลี่ยนแปลงค่า water potential ในเซลล์เพื่อกระตุ้นให้มีการนำเข้าน้ำหรือควบคุมการสะสมไอออน (Bray, 1993) ตลอดจนยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในพืช (signal transduction) เพื่อให้เกิดการตอบสนองต่อภาวะแล้ง (Knight และ Knight, 2001)

ภาวะเค็มส่งผลกระทบต่อพืชคล้ายคลึงกับภาวะแล้งในแง่ของการขาดน้ำ เนื่องมาจาก osmotic stress (Knight และคณะ, 1997) ซึ่งพืชที่สามารถเจริญเติบโตภายใต้ภาวะเค็มจะต้องมีกลไกการปรับตัวเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ภายใต้ภาวะเครียดนี้ได้ กลไกการปรับตัวของพืชเพื่อทนต่อภาวะเค็มแบ่งออกเป็น 2 วิธี (Munns, 2002)

1. ลดเกลือที่นำเข้าสู่ต้นพืช
2. ลดความเข้มข้นของเกลือภายในไซโตพลาสซึม

กลไกการปรับตัวของพืชในการลดเกลือที่จะนำเข้าสู่ต้นพืชคือ การขับเกลือ (salt exclusion) โดยมีหน้าที่ลดอัตราการสะสมของเกลือที่ transpiring organ เป็นการป้องกันไม่ให้เกลือไปสะสมที่ใบหรือยอด โดยที่เซลล์รากพืชจะมีการเลือกนำเกลือเข้าภายในต้นพืช (Munns, 2002) หรือพืชมีขบวนการควบคุมการลำเลียงไอออนของเกลือใน xylem เพื่อควบคุมการไหลของเกลือไปยังยอด (Hasegawa และคณะ, 2000) นอกจากนี้ยังมีการลำเลียงเกลือออกจาก xylem ในราก แล้วเคลื่อนย้ายออกจากพืชกลับสู่สารละลายในดิน (Munns, 2002) แต่ในพืชที่ทนเค็มบางชนิด เช่น *Tamarix* sp. และ *Atriplex* sp. ไม่สามารถขับเกลือที่รากได้ แต่มีการขับเกลือที่ต่อมเกลือ (salt gland) ที่ผิวของใบแทน (Taiz และ Zeiger, 1998)

กระบวนการ osmotic adjustment เป็นกลไกการปรับตัวของพืชอย่างหนึ่งในการปรับค่า water potential ในพืชให้ต่ำลงเพียงพอที่จะทำให้รากพืชสามารถดูดน้ำเข้าภายในเซลล์รากพืชได้ดีขึ้น ในภาวะเค็มพืชจะมีการปรับตัวโดยลดความเข้มข้นของเกลือภายในไซโตพลาสซึม โดยการลำเลียงไอออนของเกลือไปเก็บไว้ใน vacuole และการสังเคราะห์สาร compatible solute จำพวก proline (Lott และคณะ, 1999) glycine betaine (Jagendorf และ Takabe, 2001) และ น้ำตาล (Liu และ Staden, 2001) ในไซโตพลาสซึมเพื่อสร้างสมดุล osmotic pressure ของไอออนใน vacuole ซึ่งกระบวนการ osmotic adjustment ที่เกิดโดยการสะสมสาร compatible solute ของพืชภายใต้ภาวะเค็มเหมือนกับภาวะที่เกิดในพืชที่ประสบกับภาวะแล้ง เพราะการสะสมสารเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับ osmotic stress มากกว่าผลกระทบจากไอออนของเกลือ ซึ่งในงานวิจัยของ Wyn-Jones และ Storey (1978a) พบว่ามีการสะสม proline และ glycine betaine เพิ่มมากขึ้นในข้าวบาร์เลย์ที่อยู่ในภาวะแล้งและภาวะเค็มที่มีค่า osmotic pressure เดียวกัน นอกจากนี้ยังพบการสะสมน้ำตาลเพิ่มมากขึ้นในต้นกล้าข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) ที่ได้รับภาวะแล้งและภาวะเค็ม (Kerepesi และ Galiba, 2000)

ภาวะแล้งและภาวะเค็มกับการเจริญเติบโตของพืช

ภาวะแล้งส่งผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตของพืช เนื่องมาจากการเกิด osmotic stress ซึ่ง osmotic stress มีผลทำให้พืชดูดน้ำได้น้อยลง (Li และ Chen, 2000) โดยภาวะแล้งส่งผลกระทบต่อพืชตั้งแต่การงอกของเมล็ดไปจนถึงการเจริญเติบโตและการสร้างผลผลิต โดย Pérez-Molphe-Balch และคณะ (1996) ได้ทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) เมื่อได้รับภาวะแล้ง 3 พันธุ์ คือ Sinoloa, IR10120 และ Chiapas โดยเฉพาะเมล็ดข้าวบนกระดาษกรองที่ชุ่มด้วยน้ำที่มี PEG 8000 ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเมล็ด 5 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าวทั้งสามพันธุ์ลดลง เมื่อความเข้มข้นของ PEG 8000 เพิ่มขึ้น โดยพบว่า PEG 8000 ความเข้มข้น 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลรุนแรง ซึ่ง PEG 8000 ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ข้าวพันธุ์ Chiapas มีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ข้าวพันธุ์ IR10120 และ Sinoloa มีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลง 24 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะแล้งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว โดยพบว่าเมื่อให้ภาวะแล้งแก่ต้นข้าวอายุ 17 วัน โดยให้ PEG 8000 ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 28 วัน พบว่าการเจริญเติบโตของต้นข้าวลดลงในอัตราที่แปรผกผันกับความเข้มข้นของ PEG 8000 ที่สูงขึ้น แต่ภาวะแล้งส่งผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตของรากไม่มากนัก

จากการศึกษาผลของภาวะแล้งต่อการเจริญเติบโตของต้นมันสำปะหลัง 5 พันธุ์ โดย Alves และ Setter (2000) พบว่าภาวะแล้งทำให้การเจริญเติบโตและพื้นที่ใบของมันสำปะหลังลดลง ภาวะแล้งมีผลยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของพื้นที่ใบ โดยพบว่าหลังจากงดให้น้ำเป็นเวลา 3 วัน ใบของมันสำปะหลังมีอัตราการเจริญเติบโตของพื้นที่ใบลดลง 5 เท่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อรดให้น้ำนานขึ้น (6 วัน) อัตราการเจริญเติบโตของพื้นที่ใบลดลงเพิ่มมากขึ้นเป็น 21 เท่า เมื่อให้น้ำแก่ต้นมันสำปะหลังเพื่อให้เจริญในภาวะปกติ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของพื้นที่ใบเพิ่มขึ้นเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ หลังจากให้น้ำเป็นเวลา 3 วัน

Lu และ Neumann (1999) ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวพันธุ์ IR20 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไม่ทนต่อภาวะแล้ง โดยเติม PEG ลงไปในสารละลายธาตุอาหารเพื่อปรับค่า water potential ให้ลดลงจาก 0.0, -0.2, -0.4 จนกระทั่งถึง -0.6 MPa (24 ชั่วโมง) พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวลดลงในอัตราที่เพิ่มมากขึ้นตามค่า water potential ที่ลดลง

เมื่อพืชประสบกับภาวะเค็ม นอกจากพืชจะเกิด osmotic stress แล้ว พืชมีการสะสมไฮออนของเกลือมากขึ้น ทำให้เกิดความเป็นพิษจากไฮออนของเกลือที่พืชดูดเข้าไปสะสมมากเกินไปจนเกิดความจำเป็น ซึ่งส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์ (Greenway และ Munns, 1980) และความเค็มมีผลทำให้พืชขาดธาตุอาหารบางธาตุ ไฮออนที่มีอยู่มากมายในสารละลายดินเค็มทำให้สมดุลย์ของธาตุอาหารเสียไป (Werner และ Finkelstein, 1995) ซึ่งสาเหตุเหล่านี้ทำให้การเจริญเติบโตของพืชลดลง

การศึกษาผลของภาวะเค็มต่อการเจริญเติบโตของพืช มีการศึกษาผลของภาวะเค็มต่อการพัฒนาของใบข้าวโพด (*Zea mays* cv. G.S. 46) ที่ได้รับภาวะเค็ม โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 80 mM พบว่าการเจริญเติบโตของใบและการพัฒนาของยอดลดลง ผลของภาวะเค็มทำให้ความยาวของใบที่สามและใบที่สี่ของข้าวโพดลดลง 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และส่งผลให้อัตราการยึดตัวของใบที่สี่ลดลง 47 เปอร์เซ็นต์ (Neves-Piestun และ Bernstein, 2001)

สำหรับผลของภาวะเค็มต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว อายุ 5 วัน โดยเติมโซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายธาตุอาหาร ในอัตราส่วน 2 : 1 ปรับให้มีค่าการนำไฟฟ้าที่ 1.9, 3.4, 4.5, 6.1, 7.9 และ 11.5 dsm^{-1} พบว่าการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ตั้งแต่ได้รับภาวะเค็มที่ระดับต่ำสุด (1.9 dsm^{-1}) เป็นเวลา 20 วัน และเมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวโดยมีน้ำหนักแห้งต้นแตกต่างจากชุดควบคุมในทุกๆระดับ หลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 17 วัน โดยการเจริญเติบโตมีอัตราที่ลดลงมากขึ้น เมื่อความเค็มของเกลือเพิ่มขึ้น (Zeng และ Shannon, 2000)

Sibole และคณะ (1998) ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นกล้าถั่ว (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender) ที่ได้รับภาวะเค็ม โดยเพิ่มโซเดียมคลอไรด์ครั้งละ 25 mM ให้แก่ต้นกล้าถั่วทุกสองวัน จนกระทั่งมีระดับความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25, 50 และ 75 mM โดยพบว่าต้นกล้าถั่วที่ได้รับภาวะเค็มมีพื้นที่ใบลดลงในอัตราที่แปรผกผันกับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มสูงขึ้น และระยะเวลาที่ได้รับ โดยจะเห็นผลรุนแรงที่ความเข้มข้น 75 mM ซึ่งมีผลยับยั้งการแผ่ขยายของใบ และเมื่อให้ภาวะเค็มแก่ต้นกล้าถั่วเป็นเวลา 38 วัน พบว่าโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 50 และ 75 mM มีผลทำให้น้ำหนักแห้งต้นลดลง 24 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม อย่างไรก็ตามพบว่าที่ภาวะเค็มทุกระดับส่งผลกระทบต่อรากไม่มากนัก ดังนั้นจึงมีอัตราส่วนของน้ำหนักแห้งรากต่อน้ำหนักแห้งต้นเพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 25 และ 50 mM มีอัตราส่วนของน้ำหนักแห้งรากต่อน้ำหนักแห้งต้นเพิ่มขึ้น 80 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเข้มข้น 75 mM เพิ่มขึ้น 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

การค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะแล้งและภาวะเค็ม

กลไกการตอบสนองของพืช เมื่อพืชได้รับภาวะแล้งจะคล้ายกับการตอบสนองของพืช เมื่อพืชได้รับภาวะเค็ม (Smirnov, 1998) ดังนั้นจึงคาดว่ายีนที่แสดงออกในขณะที่ได้รับภาวะแล้ง และภาวะเค็มน่าจะมีความเกี่ยวข้องกันหรืออาจจะเป็นยีนในกลุ่มเดียวกัน

ภาวะแล้งและภาวะเค็มมี Signal Transduction Pathway ของยีนที่ตอบสนองต่อภาวะแล้งและภาวะเค็มร่วมกัน (Seki และคณะ, 2003) โดยในปี 2002 Seki และคณะ ใช้เทคนิค microarray ในการศึกษาการแสดงออกของยีนและหาความสัมพันธ์ของยีนที่แสดงออกในภาวะแล้งและภาวะเค็มใน *Arabidopsis thaliana* พบว่ามียีนจำนวน 101 ยีน ที่แสดงออกทั้งในภาวะแล้งและภาวะเค็ม โดยพบว่ายีนที่ถูกชักนำให้แสดงออกในภาวะแล้งมีจำนวน 277 ยีน และยีนที่สามารถถูกชักนำให้มีการแสดงออกในภาวะเค็มมีจำนวน 194 ยีน จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า ภาวะแล้งและภาวะเค็มมีผลบางอย่างต่อการแสดงออกของยีนในพืชร่วมกัน นอกจากนี้ยังพบว่า ยีนหลายชนิดถูกชักนำให้มีการแสดงออกในภาวะแล้งและเมื่อนำมาทดสอบในภาวะเค็มแล้วพบว่า มีการชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วยภาวะเค็มได้ เช่น ยีน *le16* จากมะเขือเทศ กลุ่มยีน cowpea clones responsive to dehydration (CPRD) จากถั่วฝักยาว เป็นต้น

Plant และคณะ (1990) ได้โคลนยีน *le16* จากใบของมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill cv Ailsa Craig) ที่แสดงออกเมื่อใบถูกวางทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *le16* ในใบและรากของมะเขือเทศที่ให้ภาวะแล้งต่างๆ กัน 3 แบบ คือ การวางไว้ให้แห้งจนมีน้ำหนักสดเหลืออยู่ 88 เปอร์เซ็นต์ การให้ภาวะแล้งโดยใช้ PEG ที่ปรับค่า water potential ของสารละลายธาตุอาหารเป็น -1.4 MPa และการให้ภาวะเค็มที่มีโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายธาตุอาหารความเข้มข้น 171 mM พบว่าในใบของมะเขือเทศที่ได้รับภาวะแล้งโดยถูกทำให้แห้งมีการสะสม *le16* mRNA เพิ่มมากขึ้น 127 เท่า และในใบที่ได้รับภาวะแล้งโดยใช้ PEG มีปริมาณ *le16* mRNA เพิ่มขึ้น 4.2 เท่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้ยีน *le16* ยังสามารถถูกชักนำให้มีการแสดงออกในใบของมะเขือเทศที่ได้รับภาวะเค็มได้ โดยมีปริมาณ *le16* mRNA เพิ่มขึ้น 4.6 เท่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน *le16* ในรากของมะเขือเทศในทุกการทดลอง

luchi และคณะ (1996) ได้โคลนกลุ่มยีน CPRD (cowpea clones responsive to dehydration) จำนวน 10 ยีน จากถั่วฝักยาว (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) สายพันธุ์ IT84S-2246-4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ทนแล้ง ที่ได้รับภาวะแล้งโดยวางทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 ชั่วโมงและทำการศึกษาระดับ CPRD mRNA ในใบของถั่วฝักยาวที่วางทิ้งไว้ให้แห้งที่เวลา 0, 1,

2, 5, 10 และ 24 ชั่วโมง พบยีน CPRD จำนวน 9 ยีน ที่สามารถถูกชักนำให้แสดงออกได้ แต่เวลาของการชักนำให้เกิดการแสดงออกของกลุ่มยีน CPRD ในยีนแต่ละยีนมีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ Iuhci และคณะ (1996) ได้ทำการทดลองศึกษาการแสดงออกของยีน CPRD เปรียบเทียบกับภาวะเครียดอื่นๆ คือ ภาวะเค็ม (salt stress) ภาวะเย็น (cold stress) และภาวะร้อน (heat stress) พบว่ายีน CPRD จำนวน 3 ยีน สามารถถูกชักนำให้มีการแสดงออกในภาวะเค็มได้ที่ระดับ 250 mM แต่ไม่สามารถถูกชักนำให้มีการแสดงออกในภาวะเย็น และภาวะร้อนได้

ในทางกลับกันมีงานวิจัยหลายงานที่แสดงให้เห็นว่ายีนที่ถูกชักนำให้มีการแสดงออกในภาวะเค็มสามารถถูกชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วยภาวะแล้งได้ โดย Claes และคณะ (1990) ได้โคลนยีน *saT* จากรากของข้าว (var. Indica cv Taichung native1) ที่ได้รับภาวะเค็มโดยมีความเข้มข้นของเกลือ MS (Murachige และ Skoog salt) 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วัน นำยีน *saT* ที่โคลนได้มาศึกษาการแสดงออกของยีนในแผ่นใบ กาบใบ และรากของข้าว เมื่อได้รับภาวะเค็มที่มีเกลือ MS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีการสะสม *saT* mRNA เพิ่มมากขึ้นในกาบใบ และราก ในขณะที่มี *saT* mRNA เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในแผ่นใบ อีกทั้งยังทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *saT* ในต้นกล้าข้าวอายุ 8 วัน ที่ได้รับภาวะเค็มโดยใช้โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีการสะสมของ *saT* mRNA เพิ่มขึ้น ในส่วนแผ่นใบและกาบใบเมื่อให้ภาวะเค็มด้วยโซเดียมคลอไรด์ และในส่วนของกาบใบเมื่อให้ภาวะเค็มด้วยโพแทสเซียมคลอไรด์ และยังพบอีกว่ายีน *saT* มีการแสดงออกในส่วนของกาบใบและรากของข้าวที่วางทิ้งไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง นอกจากนี้เมื่อใช้ PEG 5 เปอร์เซ็นต์ จำลองภาวะแล้งให้แก่ข้าว พบว่ายีน *saT* สามารถถูกชักนำให้แสดงออกในกาบใบและรากเช่นเดียวกัน

Bostock และ Quatrano (1992) ได้โคลนยีน *Em* จากเซลล์แขวนลอยของข้าวที่ได้รับภาวะเค็ม โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 M และนำมาทดสอบการแสดงออกของยีน *Em* กับภาวะเครียดอื่นๆ คือ ภาวะเย็น ภาวะร้อน เมื่อได้รับแสงอัลตราไวโอเล็ต เซลล์แขวนลอยที่ได้รับภาวะแล้งโดยวางไว้บนกระดาษกรองให้แห้งจนมีน้ำหนักสดเหลืออยู่ 90 50 และ 12-15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลปรากฏว่า ไม่พบการแสดงออกของยีน *Em* ในเซลล์แขวนลอยของข้าวที่ได้รับภาวะแล้งโดยวางไว้บนกระดาษกรองให้แห้งจนมีน้ำหนักสดเหลืออยู่ 90 และ 50 เปอร์เซ็นต์ แต่พบว่ามีปริมาณ *Em* mRNA เพิ่มสูงขึ้นพร้อมกับระดับฮอร์โมนกรดแอบไซซิก ในเซลล์แขวนลอยของข้าวที่วางไว้ให้แห้งจนมีน้ำหนักสดเหลือเพียง 12-15 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไม่พบการสะสมของ *Em* mRNA และฮอร์โมนกรดแอบไซซิกเพิ่มขึ้นในภาวะเย็น ภาวะร้อนและการได้รับแสงอัลตราไวโอเล็ต

Li และ Chen (2000) ได้โคลนยีน *SAMDC1* ที่ encode S-adenosylmethionine decarboxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ polyamine จากข้าวพันธุ์ Zhaiyeqing8 ที่ถูกชักนำให้แสดงออกเมื่อได้รับภาวะเค็ม หลังจากนั้นยังได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *SAMDC1* ในต้นกล้าข้าวที่ได้รับภาวะเค็ม โดยมีโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายธาตุอาหาร ความเข้มข้น 171 mM และในภาวะแล้งโดยใช้ PEG 6000 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีการแสดงออกของยีน *SAMDC1* โดยพบปริมาณ *SAMDC1* mRNA เพิ่มขึ้นในต้นกล้าข้าวที่ได้รับภาวะเค็มและภาวะแล้ง โดยในต้นกล้าที่ได้รับภาวะเค็มมีการสะสม *SAMDC1* mRNA เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง หลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และพบว่าการสะสม *SAMDC1* mRNA สูงสุดหลังจากต้นกล้าข้าวได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับในภาวะแล้งพบว่าภาวะแล้งสามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *SAMDC1* ได้ โดยมี *SAMDC1* mRNA เพิ่มมากขึ้น และจะมีระดับ *SAMDC1* mRNA สูงสุดหลังจากได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างงานวิจัยที่พบว่ายีนที่โคลนได้จากการชักนำให้มีการแสดงออกในภาวะแล้งสามารถถูกชักนำให้แสดงออกได้ด้วยภาวะเค็ม และในทางกลับกันยีนบางยีนที่โคลนได้จากการชักนำให้แสดงออกได้ในภาวะเค็มสามารถถูกชักนำให้แสดงออกได้ด้วยภาวะแล้งเช่นกัน งานวิจัยของ Liu และ Barid (2003) ได้โคลนยีนจากทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) ที่ได้รับภาวะแล้ง โดยการงดให้น้ำเป็นเวลา 6 วัน จำนวน 5 ยีน คือ VC2-D, CAp1-1U, Cap1-2U, Cap2-U และ GAp1-D และจากทานตะวันที่ได้รับภาวะเค็ม โดยมีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 250 mM ในสารละลายธาตุอาหาร จำนวน 12 ยีน คือ RSC1-U, SG2-U, SG4-U, RSC5-U, SC7-U, RSA1-U, SA3-U, RSG10-U, RSG11-U, RSG13-U, RSG15-U และ RSG22-D เมื่อนำมาทดสอบการแสดงออกของยีนที่โคลนได้ทั้งหมดภายใต้ภาวะแล้งและภาวะเค็ม พบยีนจำนวน 9 ยีน คือ RSC1-U, RSC5-U, SG2-U, RSG11-U, RSG15-U, RSG22-D, SA3-U, SC7-U ซึ่งโคลนได้จากการชักนำให้มีการแสดงออกในภาวะเค็ม และ Gap1-D ซึ่งโคลนได้จากการชักนำให้มีการแสดงออกในภาวะแล้ง สามารถถูกชักนำให้แสดงออกเมื่อได้รับภาวะแล้งและภาวะเค็มได้ โดยมีปริมาณ mRNA เพิ่มขึ้นในต้นและรากเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

จะเห็นได้ว่าการแสดงออกของยีนในพืชที่ตอบสนองต่อภาวะแล้งและภาวะเค็มนั้น มียีนอยู่จำนวนมากที่มีการตอบสนองต่อทั้งสองภาวะ ซึ่งกลุ่มยีนดังกล่าวอาจมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนทานต่อภาวะแล้งและภาวะเค็ม

เครื่องหมายทางพันธุกรรม

เครื่องหมายทางพันธุกรรม เป็นเครื่องหมายที่ใช้บ่งชี้ความจำเพาะของสายพันธุ์ โดยมีบริเวณในส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเป็นเอกลักษณ์ประจำสายพันธุ์ (William และคณะ, 1990) เครื่องหมายทางพันธุกรรมถูกพัฒนาขึ้นเพื่อเป็นเครื่องมือในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม (Detsika และคณะ, 2003) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการสืบค้นหายีนและวางตำแหน่งยีน (Ohmori และคณะ, 1995) และใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคต่างๆ มาใช้ในการหาเครื่องหมายทางพันธุกรรม เช่น

เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นการตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นส่วน DNA หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งเทคนิค RFLP มีข้อเสียคือ ต้องใช้เวลาในการศึกษานานและค่าใช้จ่ายสูง (Tatineni และคณะ, 1996)

เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ในระดับ DNA และสามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานได้ (Wachira และคณะ, 1995) เทคนิค RAPD สามารถใช้กับตัวอย่าง DNA ที่มีปริมาณน้อย (Devos และ Gale, 1992) มีความเร็ว ง่ายในการศึกษาและค่าใช้จ่ายไม่สูง นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในระดับเดียวกันกับเทคนิค RFLP ในการศึกษา genetic diversity ของข้าว (Fuentes และคณะ, 1999)

RAPD

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ถูกพัฒนาโดย Williams และคณะ ในปี 1990 เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตและใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังใช้ในการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานได้ (Wachira และคณะ, 1995) เทคนิค RAPD เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกรวดเร็ว โดยใช้ไพรเมอร์สายเดี่ยวที่มีลำดับเบสไม่เฉพาะเจาะจง มีความยาวประมาณ 9-10 นิวคลีโอไทด์ ใช้ genomic DNA เป็น template และนำมาทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) ทำให้เกิดแถบ DNA ขนาดต่างๆ ซึ่งอาจมีรูปแบบที่เหมือนหรือแตกต่างกัน ทำให้ได้เครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic markers) ที่มีความเป็นเอกลักษณ์ ซึ่งสามารถใช้บอกความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับ DNA ได้ นอกจากนี้เทคนิค RAPD ยังสามารถใช้ในการตรวจสอบได้ถึงในระดับ single base change ใน genomic DNA (Williams และคณะ, 1990)

ในปัจจุบันเทคนิค RAPD ถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย โดยใช้ในการศึกษาในพืชหลายชนิด เช่น ในกล้วย (Faure และคณะ, 1993) ข้าวบาร์เลย์ (Tinker และคณะ, 1993; Fernandez และคณะ, 2002) แอปเปิ้ล (Koller และคณะ, 1993) ข้าวโพด (Marsan และคณะ, 1993) แตงกวา (Kennard และคณะ, 1994) Indian mustard (Jain และคณะ, 1994) ข้าวฟ่าง (Pammi และคณะ, 1994) ถั่วสกุล *Lotus* (Campos และคณะ, 1994) ข้าวโอ๊ต (Wight และคณะ, 1994) ปาล์มน้ำมัน (Shah และคณะ, 1994) มันเทศ (Jarret และ Austin, 1994) กาแฟ (Orozco-Castillo และคณะ, 1994) มะเขือเทศ (Ohmori และคณะ, 1995) พืช (Rajapakse และคณะ, 1995) ชา (Wachira และคณะ, 1995) แตงโม (Lee และคณะ, 1996) ผือก (Irwin และคณะ, 1998) มะละกอ (Urasaki และคณะ, 2002) ฝ้าย (Lu และ Myers, 2002) และ ถั่วเหลือง (Cairo และคณะ, 2002) เป็นต้น

เทคนิค RAPD ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาทางพันธุกรรมของข้าวในหลายด้าน ทั้งในด้านการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรม (Ge และคณะ, 1999) การตรวจสอบการแปรทางพันธุกรรม (Godwin และคณะ, 1997) การจัดหมวดหมู่สายพันธุ์ข้าว (Yu และ Nguyen, 1994; Mackill, 1995; Fuentes และคณะ, 1999) การศึกษา Phylogenetic relationship (Ishii และคณะ, 1996) และการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Cao และ Oard, 1997) นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบเบื้องต้นในการเกิด segregation ของยีนเพื่อให้ท่านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในข้าวที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ โดยใช้เทคนิค RAPD เพื่อหาโมเลกุลเครื่องหมาย (Jeon และคณะ, 1999)

Yu และ Nguyen (1994) ได้นำเทคนิค RAPD มาใช้ในการตรวจสอบ DNA polymorphism และ genetics diversity ระหว่างข้าว (*Oryza sativa* L.) นาดอนและนาลุ่ม ซึ่งมีลักษณะความสามารถในการทนแล้ง (drought-resistance) แตกต่างกัน โดยใช้ข้าว 13 พันธุ์ แบ่งเป็นข้าวนาดอน 9 พันธุ์ และข้าวนาลุ่ม 4 พันธุ์ ใช้ไพรเมอร์จำนวน 42 ไพรเมอร์ ผลปรากฏว่าได้แถบ DNA รวมทั้งหมด 260 แถบ พบว่า 208 แถบ ซึ่งคิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ แสดง polymorphism ระหว่างพันธุ์ข้าวได้ โดยแถบ DNA มีขนาด 0.5-4.0 กิโลเบส ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ทั้งหมดจำนวน 42 ไพรเมอร์ มีเพียง 2 ไพรเมอร์ ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ได้และจากข้อมูลของ RAPD สามารถจัดหมวดหมู่ข้าวที่ทำการศึกษากออกเป็น 2 กลุ่ม คือ japonica และ indica โดยข้าวที่จัดอยู่ในกลุ่ม japonica ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มแรกมี ข้าวพันธุ์ Azucena, Rikuto Norin2 และ Moroberekan ส่วนในกลุ่มที่สองมี IAC25, IRAT13, US4 และ 63-83 สำหรับในกลุ่ม indica ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยเช่นเดียวกัน โดยกลุ่มแรกมี ข้าวพันธุ์ BPI 76-NS และ IR36 และในกลุ่มที่สองมีข้าวพันธุ์ IR20, MGL-2 และ Salumpikit นอกจากนี้ยัง

พบความแตกต่างทางพันธุกรรม (polymorphism) สูง ในพันธุ์ข้าวระหว่างกลุ่ม japonica และ indica ในขณะที่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำระหว่างพันธุ์ข้าวขนาดอนและนาลุ่ม ภายในกลุ่ม indica นอกจากนี้ Yu และ Nguyen ได้สร้าง dendrogram ของข้าวทั้ง 13 พันธุ์ โดยใช้ข้อมูลจาก RAPD และให้ผลคล้ายคลึงกับการวิเคราะห์หัตถ์ด้วย isozyme ของ Glazmann (1987) ซึ่ง Yu และ Nguyen ได้กล่าวว่า RAPD เป็นวิธีที่เป็นประโยชน์ในการสรุปหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ข้าว

มีรายงานการใช้ RAPD ในการจัดหมวดหมู่ของข้าวในลักษณะเดียวกันโดย Mackill (1995) ใช้เทคนิค RAPD ในการจัดหมวดหมู่ของข้าว japonica โดยใช้ข้าวทั้งหมดจำนวน 134 พันธุ์ แบ่งเป็น temperate japonica 110 พันธุ์ และ tropical japonica 24 พันธุ์ ใช้ไพรเมอร์จำนวน 120 ไพรเมอร์ โดยในการคัดเลือกไพรเมอร์ใช้ตัวอย่างข้าวจำนวน 8 พันธุ์ เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่คาดว่าจะแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ได้ และเมื่อนำไพรเมอร์ที่ผ่านการคัดเลือกมาใช้ในการทำ RAPD ในข้าวที่ทำการศึกษา ผลปรากฏว่าพบไพรเมอร์จำนวน 10 ไพรเมอร์ ที่สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์โดยพบแถบ DNA ที่แสดง polymorphism ทั้งหมด 30 แถบ ข้อมูลจาก RAPD ถูกนำไปใช้ในการจัดหมวดหมู่ของพันธุ์ข้าว โดยสามารถแบ่งพันธุ์ข้าว japonica ออกเป็น 2 กลุ่ม โดยในกลุ่มแรกส่วนใหญ่เป็น temperate japonica ประกอบด้วย 85 พันธุ์ ซึ่งเป็นข้าวที่มาจากประเทศญี่ปุ่น 2 พันธุ์ ทวีปยุโรป 28 พันธุ์ เกาหลี 10 พันธุ์ จีน 6 พันธุ์ ออสเตรเลีย 4 พันธุ์ tropical cultivar 3 พันธุ์ และ U.S. short/medium grain 13 พันธุ์ และพันธุ์ข้าวที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่สองมีทั้งหมด 31 พันธุ์ ซึ่งในกลุ่มที่สองสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีก 2 กลุ่ม โดยในกลุ่มย่อยกลุ่มที่หนึ่ง ประกอบด้วย U.S. long grain 13 พันธุ์ tropical japonica 7 พันธุ์ และพันธุ์ข้าวที่มาจากประเทศสเปน 1 พันธุ์ ส่วนกลุ่มย่อยกลุ่มที่สอง ประกอบด้วย U.S. medium grain 5 พันธุ์ tropical japonica 4 พันธุ์ และพันธุ์ข้าวที่มาจากประเทศญี่ปุ่น 1 พันธุ์

นอกจากนี้ Fuentes และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษา genetic diversity ในข้าว 18 พันธุ์ โดยใช้วิธี isozyme, RAPD และ RFLP markers เปรียบเทียบกัน ข้าวทั้ง 18 พันธุ์ แบ่งออกเป็นข้าวที่มีลักษณะต้นสูงจำนวน 3 พันธุ์ จากประเทศอินเดีย และข้าวที่มีลักษณะ semi-dwarf จำนวน 15 พันธุ์ ซึ่งมาจากประเทศฟิลิปปินส์ 2 พันธุ์ อินเดีย 1 พันธุ์ และคิวบา 12 พันธุ์ การใช้เทคนิค RAPD ในการศึกษา genetic diversity ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 60 ไพรเมอร์ เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่คาดว่าจะแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ ผลปรากฏว่าพบ 21 ไพรเมอร์ ที่พบแถบ DNA ที่แสดง polymorphism นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จาก RAPD, isozyme และ RFLP markers นำมาสร้าง dendrogram เพื่อจัดหมวดหมู่ของข้าวทั้ง 18 พันธุ์ พบว่า dendrogram ที่สร้างจากข้อ

มูลของ RAPD และ RFLP markers มีความคล้ายคลึงกัน ซึ่งวิธีทั้งสองสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง genotype ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต่างจาก dendrogram ที่สร้างจากข้อมูลของ isozyme ซึ่งให้ผลขัดแย้งกัน ซึ่ง Fuentes และคณะรายงานว่า RAPD และ RFLP markers เป็นวิธีที่เหมาะสมในการศึกษา genetic diversity ใน genotype ของข้าว

เทคนิค RAPD ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการหา Phylogenetic relationship โดย Ishii และคณะ (1996) ได้ศึกษา Phylogenetic relationship ใน A-genome species ของพืชในสกุล *Oryza* 4 ชนิด คือ *Oryza sativa* จำนวน 8 พันธุ์ *Oryza glaberrima* จำนวน 6 พันธุ์ *Oryza perrennis* จำนวน 13 พันธุ์ และ *Oryza breriligulata* จำนวน 2 พันธุ์ ในการศึกษาใช้ไพรเมอร์จำนวน 14 ไพรเมอร์ ทำการเปรียบเทียบรูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จาก RAPD และคำนวณสัดส่วนของแถบ DNA ระหว่างข้าว 29 พันธุ์ เพื่อสร้าง dendrogram ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ ซึ่ง Ishii และคณะ (1996) ได้รายงานว่า *Oryza sativa* และ *Oryza glaberrima* อาจจะมีต้นกำเนิดมาจาก Asian form ของ *Oryza perrennis* และจาก *Oryza breriligulata* ตามลำดับ

ในปี 1997 Cao และ Oard ได้ใช้เทคนิค RAPD ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในข้าว 26 พันธุ์ ในสหรัฐอเมริกา โดยมีการจัดกลุ่มของข้าวที่นำมาศึกษาตามลักษณะดังต่อไปนี้ medium/long grain length, maturity, aromatic และ amylose content ทำการคัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 220 ไพรเมอร์ โดยใช้ตัวอย่างข้าว 5 พันธุ์ ผลการคัดเลือกพบ 69 ไพรเมอร์ ที่คาดว่าจะแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ และเมื่อทำ RAPD โดยใช้ข้าวทั้งหมด 26 พันธุ์และใช้ไพรเมอร์ที่ผ่านการคัดเลือก พบว่าได้แถบ DNA ที่แสดง polymorphism จำนวน 92 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่าง 0.25-3.5 กิโลเบส การใช้ไพรเมอร์จำนวน 69 ไพรเมอร์ ไม่พบไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างของข้าวทุกพันธุ์ได้ พบเพียง 7 ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างในระหว่างพันธุ์ได้ในบางพันธุ์ เช่น ไพรเมอร์ OPT-17 ที่สามารถแยกความแตกต่างของข้าว 12 พันธุ์ จากข้าวทั้งหมด 26 พันธุ์ และข้อมูลจาก RAPD นำมาใช้ในการหาค่า genetic distance ในข้าวที่มีลักษณะ long และ medium grain เปรียบเทียบกับค่า genetic distance ที่ได้จากการใช้ข้อมูลจาก pedigree พบว่าค่า genetic distance ที่ได้จากการใช้ข้อมูลจาก pedigree มีค่าสูงกว่าค่า genetic distance ที่ได้จากการใช้ข้อมูลจาก RAPD และเมื่อสร้าง dendrogram ของข้าว 26 พันธุ์ จากข้อมูลที่ได้จาก RAPD พบว่าพันธุ์ข้าวที่จัดอยู่ในกลุ่ม maturity หรือ grain type ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งจะเหมือนกับ dendrogram ที่สร้างขึ้นมาโดยอาศัยข้อมูลจาก pedigree

Ge และคณะ (1999) ใช้เทคนิค RAPD ในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวป่า (*Oryza rufipogon*) 8 กลุ่มประชากร ซึ่งเก็บตัวอย่างมาจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศจีน 4 กลุ่มประชากร คือ กลุ่ม P01 จากเมือง Yuling จำนวน 10 ตัวอย่าง, กลุ่ม P02 จากเมือง Guixian 9 สายพันธุ์, กลุ่ม P03 จากเมือง Guipin 10 ตัวอย่าง และ P04 จากเมือง Rongxian จำนวน 11 ตัวอย่าง และข้าวจากประเทศบราซิล 4 กลุ่มประชากร คือ กลุ่ม B01 จาก Periquitinho Bay จำนวน 10 ตัวอย่าง, กลุ่ม B02 จาก Ressaca de Sao Tomé จำนวน 10 ตัวอย่าง, กลุ่ม B03 จาก Cuiucuiu Lake จำนวน 11 ตัวอย่าง และกลุ่ม B04 จาก Mamiá Lake จำนวน 9 ตัวอย่าง ในการศึกษาใช้ไพรเมอร์จำนวน 60 ไพรเมอร์ ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่คาดว่าจะแสดงความแตกต่างของข้าวในระหว่างกลุ่มประชากรได้ โดยใช้ตัวอย่างข้าวจากประเทศจีน 2 กลุ่มประชากร และข้าวจากประเทศบราซิล 2 กลุ่มประชากร ผลการคัดเลือกพบ 20 ไพรเมอร์ที่คาดว่าจะสามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ และเมื่อใช้ไพรเมอร์ที่ผ่านการคัดเลือกกับข้าวทั้ง 8 กลุ่มประชากร รวม 80 ตัวอย่าง พบว่าได้แถบ DNA จำนวน 95 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่าง 300-2,800 คู่เบส และได้แถบ DNA ที่เป็นแบบ polymorphic จำนวน 78 แถบ ซึ่งคิดเป็น 82.1 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าเมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ของแถบ DNA ที่เป็นแบบ polymorphic ในแต่ละกลุ่มประชากรและพื้นที่ ผลปรากฏว่าประชากรในกลุ่ม P04 ซึ่งมาจากประเทศจีน มีเปอร์เซ็นต์ของแถบ DNA ที่เป็นแบบ polymorphic สูงที่สุด คือ 43.2 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่ม B04 ซึ่งมาจากประเทศบราซิลมีเปอร์เซ็นต์ของแถบ DNA ที่เป็นแบบ polymorphic ต่ำที่สุด คือ 6.3 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าประชากรของข้าวที่มาจากประเทศจีนมีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรและพื้นที่มากกว่ากลุ่มประชากรข้าวที่มาจากประเทศบราซิล

Jeon และคณะ (1999) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค RAPD เพื่อเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบเบื้องต้น ในการ segregation ของยีน *Bph1* ในข้าวรุ่น F_2 ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ให้มีความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยการผสมพันธุ์ระหว่าง Korean rice พันธุ์ Gayabyeo ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และพันธุ์ Nagdongbyeo ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยใช้เทคนิค RAPD หาโมเลกุลเครื่องหมาย ในการศึกษาใช้ไพรเมอร์จำนวน 140 ไพรเมอร์ พบเพียง 1 ไพรเมอร์ คือ OPD-7 ที่พบแถบ DNA ขนาด 700 คู่เบส ปรากฏในข้าวพันธุ์ Gayabyeo และลูกผสมรุ่น F_2 ที่แสดงลักษณะต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ในขณะที่ไม่พบในพันธุ์ Nagdongbyeo และในลูกผสมรุ่น F_2 ที่แสดงลักษณะอ่อนแอต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล Jeon และคณะรายงานว่า แถบ DNA ขนาด 700 คู่เบส ที่ได้จาก RAPD มีความเกี่ยวข้องกับยีน *Bph1* ซึ่งสามารถที่จะนำโมเลกุลเครื่องหมายนี้ไปใช้ในการคัดเลือกต้นที่

คาดว่า จะต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ทำให้สะดวก รวดเร็ว และประหยัดเวลาในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่มีความต้านทาน

Godwin และคณะ (1997) ได้นำเทคนิค RAPD มาใช้ในการตรวจสอบการแปรทางพันธุกรรมของข้าว (var. indica cv.FR13A) ที่เกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง โดยข้าวที่ได้จาก somaclonal variation มี phenotype แตกต่างกันในหลายลักษณะ นำมาเปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์เดิม โดยแบ่งออกเป็น 12 สายพันธุ์ ซึ่งมี 7 สายพันธุ์ ที่มี phenotype เปลี่ยนไปเพียง 1 ลักษณะ เช่น ความสูง หรือ ความสามารถในการทนแล้งสูงขึ้น เป็นต้น และ 1 สายพันธุ์ มี phenotype เปลี่ยนแปลงไปมากกว่า 1 ลักษณะ คือ ลักษณะต้นเตี้ยและ biomass ลดลง และอีก 4 สายพันธุ์ มี phenotype ไม่แตกต่างจากสายพันธุ์เดิม เมื่อตรวจสอบรูปแบบของแถบ DNA โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 28 ไพรเมอร์ และพบ 6 ไพรเมอร์ ที่แสดงรูปแบบของแถบ DNA แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ที่ได้จาก somaclonal variation กับข้าวสายพันธุ์เดิม และพบว่าในข้าว 4 สายพันธุ์ที่มี phenotype ไม่แตกต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิม เมื่อตรวจสอบการแปรทางพันธุกรรมด้วย RAPD พบความแตกต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิมในระดับ DNA ดังนั้น Godwin และคณะ (1997) จึงคาดว่า การแปรทางพันธุกรรมที่ตรวจพบโดย RAPD อาจเป็นการแปรทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นใน DNA ตรงส่วนที่เป็น highly repeated sequence จึงทำให้ไม่เกี่ยวข้องกับ phenotype

จากรายงานข้างต้นจะเห็นว่าเทคนิค RAPD สามารถใช้ในการหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวที่มีการกลายพันธุ์ที่เกิดจาก somaclonal variation ระหว่างการเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ ซึ่งจะนำไปสู่การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องและความเข้าใจใน pathway ของการตอบสนองต่อภาวะเครียดได้ในที่สุด ดังนั้นในงานวิทยานิพนธ์นี้จะเป็นการศึกษาความสามารถในการทนแล้งของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่ได้จากการคัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง และการใช้เทคนิค RAPD ในการศึกษาการแปรทางพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์เดิมมาเป็นข้าวสายพันธุ์ทนเค็มและทนแล้งเพื่อหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่อาจใช้บ่งชี้ความต้านทานภาวะเค็มและภาวะแล้งได้ อันจะนำไปสู่การศึกษายีนที่ควบคุมลักษณะทนแล้งและเค็มของข้าว และการประยุกต์ใช้เพื่อการพัฒนาพืชทนแล้งและทนเค็มต่อไปได้ในอนาคต

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

พืชทดลอง

1. เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) เป็นสายพันธุ์หลักใช้เป็นชุดควบคุม
2. เมล็ดข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ที่ได้จากการเกิด somaclonal variation ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ในหลอดทดลอง และผ่านการผสมตัวเองมาแล้ว 10 และ 11 รุ่น

อุปกรณ์การศึกษา

1. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกข้าว

- ขวดแก้วขนาด 100 มิลลิลิตร
- กระบะพลาสติกสี่เหลี่ยมสีดำ ขนาดความจุ 5 ลิตร
- โฟมและฟองน้ำ
- กระจกดินเผาไม่มีรู ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 30 เซนติเมตร
- ดินเหนียว
- เครื่องวัดการนำไฟฟ้า (Digital conductivity meter)
- เครื่องวัด pH (pH meter)
- โรงเรือนมุงหลังคาพลาสติกใส
- ฝาดำคลุมโรงเรือนเพื่อควบคุมความยาวของช่วงวัน

2. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของพืช

- ตู้อบตัวอย่างพืช (Hot air oven)
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- ไม้บรรทัด

3. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

- เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (Programmable Thermal Controller รุ่น PTC-100™, MJ Research, Inc.)
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง (Deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

- โกร่งบด
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- ไมโครไปเปต
- หลอด microcentrifuge
- เครื่องซั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)
- ชุดแยกกรดนิวคลีอิก ด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ (Horizontal gel electrophoresis)
- เครื่องกำเนิดแสง UV (UV transilluminator)
- กล้องถ่ายภาพโพลาไรซ์

4. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการโคลนเครื่องหมายทางพันธุกรรม และการศึกษาการแสดงออก

- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง (Deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
- ตู้เย็น อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Microcentrifuge)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)
- หลอด microcentrifuge
- ไมโครไปเปต
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิสำหรับทำ Hybridization (Hybridization oven)
- เครื่องกำเนิดแสง UV (UV transilluminator)
- กล้องถ่ายภาพโพลาไรซ์
- ชุดแยกกรดนิวคลีอิก ด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ (Horizontal gel electrophoresis)
- ตู้อบ (Oven)
- เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer)
- แผ่นเมมเบรน (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, UK)

- X-ray film

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการปลูกข้าว

- Clorox 5.25 % (w/w)
- สารเคมีสำหรับเตรียมธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) (ดูในภาคผนวก ก)
- PEG 6000 (Merck, Germany)
- NaCl (Merck, Germany)
- ปุ๋ยยูเรีย สูตร 46-0-0
- ปุ๋ยเคมี สูตร 16-16-16
- สารเคมีสำหรับกำจัดโรคและแมลง อาโคฟอส (Global crops limited, Thailand)

2. สารเคมีที่ใช้ในการทำ RAPD

- 50x TAE (Tris acetate EDTA) (ดูในภาคผนวก ก)
- agarose
- Ethidium bromide

3. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA

- DNA extraction bufffer (CTAB) (ดูในภาคผนวก ก)
- ไนโตรเจนเหลวสำหรับบดตัวอย่าง
- Chloroform
- Phenol : Chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1)
- RNase
- Sodium acetate
- Isopropanol
- Ethyl alcohol
- TE buffer (ดูในภาคผนวก ก)

4. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA

- RNA extraction buffer (ดูในภาคผนวก ก)
- Phenol : Chloroform (1:1)
- Ethyl alcohol
- 10 M LiCl₂
- TE buffer

5. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Southern blot และ Northern blot Hybridization

- agarose
- DNA marker (1Kb DNA ladder หรือ Lamda DNA digested with *EcoRI* and *HindIII*, New England Biolabs, USA)
- RNA marker (RNA ladder, New England Biolabs, USA)
- 5x TBE (Tris borate EDTA) (ดูในภาคผนวก ก)
- 10x MOPS (ดูในภาคผนวก ก)
- Loading dye for DNA (ดูในภาคผนวก ก)
- Loading dye for RNA (ดูในภาคผนวก ก)
- Ethidium bromide
- 37% formaldehyde
- 40% formamide
- 20x SSC (ดูในภาคผนวก ก)
- ECL Labeling and Detection Kit (Amersham Pharmacia Biotech UK limited, UK)
- Depurination buffer (ดูในภาคผนวก ก)
- Denaturation buffer (ดูในภาคผนวก ก)
- Neutralization buffer (ดูในภาคผนวก ก)
- Primary wash buffer (ดูในภาคผนวก ก)
- สารเคมีที่ใช้ในการล้างฟิล์ม (developer และ fixer) (Kodak (Australasia) PTY. LYD.,Australia)

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง

1.1 การศึกษาภาวะแล้งที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง

- 1.1.1 เพาะเมล็ดข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 โดยนำเมล็ดข้าวมาแช่น้ำเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำมาฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย 30 % (v/v) clorox เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างให้สะอาดด้วยน้ำ 3-4 ครั้ง ก่อนที่จะนำมาเพาะในที่มืด โดยนำเมล็ดมาเรียงให้เป็นแถวบนกระดาษทิชชูที่ทำให้ชื้นด้วยน้ำเป็นเวลา 7 วัน เพื่อย้ายปลูกต่อไป
- 1.1.2 เมื่อต้นกล้ามีอายุ 7 วัน นับจากวันเพาะ ย้ายต้นกล้าลงปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 150 200 250 และ 300 g/l ทำโดยคัดเลือกต้นกล้าที่มีขนาดต้นใกล้เคียงกันนำไปปลูกในขวดแก้ว ขนาด 100 มิลลิลิตร ขวดละ 10 ต้น จำนวน 10 ขวด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรเดิม ที่ไม่มี PEG 6000 เป็นเวลา 1 สัปดาห์
- 1.1.3 วางขวดแก้วไว้ในโรงเรือนทดลองที่มีแสงตามธรรมชาติ ตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง ควบคุมระดับของสารละลายธาตุอาหารโดยเติมน้ำให้สารละลายธาตุอาหารอยู่ในระดับเดียวกันกับตอนเริ่มต้นการทดลองทุกวัน เปลี่ยนสารละลายทุกสัปดาห์
- 1.1.4 เก็บผลการทดลองโดยวัดอัตราการรอดตาย โดยจะนับจำนวนข้าวที่เหลืออยู่ทุกสัปดาห์

1.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่ 10 ในภาวะแล้ง

- 1.2.1 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 5 ซ้ำ เพื่อการศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่ 10 ในภาวะแล้ง
- 1.2.2 เพาะเมล็ดข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ตามวิธีการเพาะเมล็ดในข้อ 1.1.1

- 1.2.3 ย้ายต้นกล้าลงปลูกในขวดแก้วด้วยสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l ขวดละ 15 ต้น จำนวน 20 ขวด โดยปฏิบัติเช่นเดียวกันกับวิธีการทดลองในข้อ 1.1.3
- 1.2.4 หลังจากปลูกข้าวในภาวะแล้งเป็นเวลา 6 สัปดาห์ สิ้นสุดการให้ภาวะแล้งโดยย้ายปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่ไม่มี PEG 6000 เพื่อให้ต้นข้าวเจริญเติบโตในภาวะปกติ 1 สัปดาห์
- 1.2.5 เก็บผลการเจริญเติบโต โดยการวัดความสูงต้น ความยาวราก เก็บตัวอย่างพืชมาแยกส่วนต้นและราก นำมาชั่งน้ำหนักสด จากนั้นนำไปอบในตู้อบตัวอย่างพืชที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้งของต้นและรากด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 1.2.6 ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

1.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่ 11 ในภาวะแล้ง ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.2 โดยเปลี่ยนพืชทดลองจากข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่ 10 เป็นข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่ 11

2. การศึกษาการแปรทางพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์เดิม โดยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

2.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม

- 2.1.1 เพาะเมล็ดทั้งสองสายพันธุ์เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 1.1.1 ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ย้ายปลูกในสารละลายธาตุอาหารดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 200 g/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการคัดเลือกต้นที่รอด แบ่งเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกย้ายลงปลูกในกระถางและให้หมายเลข ทำการเพาะเลี้ยงจนได้เมล็ด (ตามวิธีการดังแสดงในภาคผนวก ข) เพื่อปลูกเก็บเมล็ดไว้ใช้ในการศึกษาข้าวสายพันธุ์นี้ในรุ่นที่ 11 ส่วนที่ 2 ย้ายลงปลูกในกระบะสี่เหลี่ยมสีดำ ขนาดความจ

5 ลิตร ด้วยสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่ไม่มี PEG 6000 เพื่อนำเนื้อเยื่อมาใช้ในการศึกษาการแปรทางพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม โดยให้แต่ละกระบะมีต้นกล้า 28 ต้น ภาวะการปลูกเป็นการปลูกในโรงเรือนทดลองและการดูแลเป็นไปตามที่ระบุไว้ในข้อ 1.1.3 ส่วนข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 ปลูกในสภาพปกติในโรงเรือนทดลอง และดูแลเช่นเดียวกันกับข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171

2.1.2 หลังจากนั้น 3 สัปดาห์ สกัด DNA จากใบข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ด้วยวิธี CTAB โดยดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) (ตามวิธีการดังแสดงในภาคผนวก ข) เพื่อใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์

2.1.3 ทดสอบไพรเมอร์ จำนวน 122 ไพรเมอร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยบริษัท Operon และ UBC เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่คาดว่าจะแสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ได้ โดยเปรียบเทียบรูปแบบของ DNA fragment ที่ได้จากวิธี RAPD เมื่อมี DNA จากข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 หรือสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 เป็น DNA template การทดสอบไพรเมอร์ทำโดยใช้ตัวอย่าง DNA ของข้าว สายพันธุ์ละ 1 ต้น เป็น template ในปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งมีสภาวะการทำปฏิกิริยาดังนี้

ปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 25 μ l ซึ่งประกอบด้วย

20 ng DNA

1x Reaction Buffer

1.5 μ M MgCl₂

0.4 μ M primer

200 μ M dNTPs

0.5 Unit *Taq* Polymerase

สภาวะที่ใช้ในการเพิ่ม DNA ใช้จำนวนรอบ 41 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอนการแยกสาย DNA อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ตามด้วยขั้นตอนจับคู่ของไพรเมอร์กับ DNA template ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และขั้นตอนสังเคราะห์ DNA ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และเมื่อครบจำนวนรอบให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส ต่อไปอีก 7 นาที การเปรียบเทียบรูปแบบ

DNA ที่ได้จากการทำ PCR ทำโดยนำมาแยกโดยให้เคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าในตัวกลางที่เป็น agarose gel ความเข้มข้น 2 % (w/v) ในสารละลาย 1X TAE และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 60 โวลต์ (2 โวลต์ ต่อ 1 เซนติเมตร) จากนั้นย้อมแถบ DNA ด้วย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 µg/ml นาน 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วนำไปส่องด้วยเครื่อง UV transilluminator และบันทึกภาพด้วยกล้องโฟลวออยด์

2.1.4 เลือกไพรเมอร์ที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ทั้งสองได้นำมาใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป

2.2 ตรวจสอบรูปแบบของแถบ DNA ที่แสดง DNA polymorphism ของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ โดยวิธี RAPD

2.2.1 ศึกษารูปแบบของแถบ DNA ที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ที่ได้จากข้อ 2.1.4 ดังเช่นวิธีการทดลองในข้อ 2.1.3 โดยศึกษาในข้าวทั้งสองสายพันธุ์สายพันธุ์ละ 20 ต้น

2.2.2 บันทึกภาพความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวทั้งสองสายพันธุ์โดยเปรียบเทียบรูปแบบของ DNA fragments ที่ได้

2.2.3 ทำการทดลองซ้ำด้วยไพรเมอร์เดิม จำนวน 3 ซ้ำ สำหรับไพรเมอร์ที่มีรูปแบบความแตกต่างในข้าวทั้งสองสายพันธุ์สม่ำเสมอ เพื่อยืนยันว่ารูปแบบของ DNA ที่ได้คงที่

2.2.4 DNA fragments ที่แตกต่างกัน จะถูกนำไปใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมต่อไป

3. การโคลนเครื่องหมายทางพันธุกรรม

3.1 ทำการโคลนชิ้นส่วนของ DNA ที่แสดง polymorphism ระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ โดยแยก DNA fragment ที่เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมออกจาก agarose gel โดยใช้ Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit (MOBIO Laboratories, Inc. USA) ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือ

3.2 ตรวจสอบชิ้นส่วนของ DNA ที่แยกได้กับขนาดของชิ้นส่วน DNA ที่เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม

- 3.3 ทำการโคลนเครื่องหมายทางพันธุกรรม ตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) โดยใช้ pBluescript KS+ เป็น DNA พาหะ และ/หรือ ใช้ QIAGEN PCR Cloning kit (QIAGEN) ซึ่งมี pDrive เป็น DNA พาหะตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือ
- 3.4 ตรวจสอบขนาดของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่โคลนได้กับขนาดของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากวิธี RAPD อีกครั้ง
- 3.5 ทำ frozen stock (ตามวิธีที่ระบุไว้ในภาคผนวก ข) เพื่อเก็บรักษาโคลนที่ได้ไว้ใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

4. การศึกษาความเกี่ยวข้องของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จาก RAPD กับการแสดงออกของยีนในภาวะแล้งและภาวะเค็ม

4.1 การศึกษาจำนวนชุดของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จาก RAPD โดยวิธี Southern blot analysis

- 4.1.1 สกัด DNA จากใบข้าว อายุ 4 สัปดาห์ ด้วยวิธี CTAB โดยดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) (ตามวิธีการดังแสดงในภาคผนวก ข)
- 4.1.2 ย่อยสลาย genomic DNA ที่สกัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) *EcoRI*, *HindIII* และ *BamHI* โดยใช้ปริมาณ DNA สุทธิ 40-50 μg
- 4.1.3 นำ DNA ที่ได้ทำการย่อยแล้วมาแยกแถบ DNA ให้เคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้า ในตัวกลางที่เป็น agarose gel ความเข้มข้น 0.8 % (w/v) ในสารละลาย 0.5x TBE และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 20 โวลต์ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง นำ gel ที่ได้ มาทำ Southern blot analysis ตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) โดยมีเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่โคลนได้จากข้อ 3 เป็น probes และติดฉลากโดย ECL Labeling and Detection Kit (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, UK) อุณหภูมิที่ใช้ในการทำ Hybridization คือ 42 องศาเซลเซียส ล้างด้วย primary wash buffer เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 2 ครั้ง และ secondary wash buffer 5 นาที ที่อุณหภูมิล้าง 2 ครั้ง ตรวจสอบผลการ hybridization ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือ

4.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ โดยวิธี Northern blot analysis

- 4.2.1 เพาะเมล็ดเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 1.1.1 ปลูกข้าวและให้ภาวะแล้งเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 1.2.3 เก็บตัวอย่างใบข้าวที่อยู่ในภาวะแล้ง 0 1 และ 3 วัน และ 1 2 และ 3 สัปดาห์
- 4.2.2 สำหรับการให้ภาวะเค็มแก่ต้นข้าว ย้ายต้นกล้าอายุ 7 วัน ลงปลูกในกระบะสี่เหลี่ยมสีดำ ขนาดความจุ 5 ลิตร ที่บรรจุสารละลายธาตุอาหาร สูตรดัดแปลง WP No.2 เพาะเลี้ยงจนกระทั่งต้นข้าวมีใบแก่จำนวน 5 ใบ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 สัปดาห์ หลังจากนั้นเปลี่ยนสารละลายในกระบะเป็นสารละลายที่ให้ภาวะเค็ม โดยปรับให้ในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.3 % เก็บตัวอย่างใบข้าวที่อยู่ในภาวะเค็ม โดยเก็บเป็นช่วงเวลาดังต่อไปนี้ คือ 0 1 3 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากได้รับภาวะเค็มและเวลา 0 1 และ 2 สัปดาห์หลังภาวะเค็ม จากนั้นย้ายลงปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรเดิมที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ แล้วทำการเก็บตัวอย่างใบข้าว 1 และ 3 วัน หลังจากการย้ายปลูก
- 4.2.3 สกัด RNA จากใบข้าว โดยวิธี Hot Phenol (ตามวิธีการดังแสดงในภาคผนวก ข)
- 4.2.4 นำ RNA ที่ได้ โดยใช้ปริมาณ RNA สุทธิ 15 μg มาวิเคราะห์การแสดงออกของยีน โดยวิธี Northern blot analysis ตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) โดยวิธีการดังนี้แยกแถบ RNA โดยให้เคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าในตุ๊กกลางที่เป็น formaldehyde gel ความเข้มข้น 1 % (v/v) ใน RNA Running buffer (1x MOPS) ใช้ความต่างศักย์ 120 โวลต์ (4 โวลต์ ต่อ 1 เซนติเมตร) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วิเคราะห์ RNA โดยวิธีการและสภาวะในการทำ hybridization เช่นเดียวกันกับในการทดลองข้อ 4.1.4

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง

1.1 การศึกษาภาวะแล้งที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง

เมื่อปลูกข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ในภาวะแล้งที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 150 200 250 และ 300 g/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายปลูกให้เจริญในภาวะปกติซึ่งไม่มี PEG 6000 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการนับจำนวนต้นข้าวที่เหลือในแต่ละสัปดาห์เพื่อหาอัตราการรอดตายของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ จากตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่าสำหรับต้นข้าวที่เจริญในภาวะปกติ ข้าวทั้งสองสายพันธุ์รอดตายทั้งหมด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PEG 6000 เป็น 150 g/l พบว่า ความแตกต่างของอัตราการรอดตายของข้าวทั้งสองสายพันธุ์เป็น 3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้นของ PEG 6000 ที่ 200 g/l อัตราการรอดตายของข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยมีความแตกต่างของอัตราการรอดตายของข้าวทั้งสองสายพันธุ์สูงถึง 29 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อความเข้มข้นของ PEG 6000 สูงขึ้นเป็น 250 g/l และ 300 g/l อัตราการรอดตายของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ลดลง โดยความแตกต่างของอัตราการรอดตายของข้าวทั้งสองสายพันธุ์เป็น 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่ความเข้มข้นของ PEG 6000 ที่ 300 g/l ฉะนั้นจึงเห็นได้ว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีการแสดงออกของการทนต่อภาวะแล้งได้ดีกว่าข้าวสายพันธุ์เดิม โดยมีความแตกต่างของอัตราการรอดตายของข้าวทั้งสองสายพันธุ์สูงที่สุดเมื่อปลูกในภาวะแล้งที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 200 g/l ดังนั้นที่ความเข้มข้นของ PEG 6000 ที่ 200 g/l จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 1 อัตราการรอดตายของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากการเจริญเติบโตในภาวะแล้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และเจริญเติบโตในภาวะปกติเป็นเวลา 1 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ PEG 6000 (g/l)	อัตราการรอดตายของต้นข้าว (%)		ความแตกต่างของอัตราการรอดตายของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ (%)
	LPT123	LPT123-TC171	
0	100	100	0
150	97	100	3
200	62	91	29
250	10	13	3
300	0	4	4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 การเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่ 10 ในภาวะแล้ง

ศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 โดยปลูกในขวดแก้วด้วยสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No. 2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l หลังจากปลูกข้าวในภาวะแล้งเป็นเวลา 6 สัปดาห์ และสิ้นสุดการให้ภาวะแล้งโดยย้ายปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่ไม่มี PEG 6000 เพื่อให้ต้นข้าวเจริญเติบโตในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ พบว่า

1.2.1 ความสูง

ความสูงของข้าวเหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ตลอดระยะเวลาการทดลองเป็นเวลา 7 สัปดาห์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อปลูกในภาวะปกติ แต่เมื่อให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์พบว่า ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีการเติบโตทางด้านความสูงมากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิม โดยมีความสูงแตกต่างกันทางสถิติ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 จนกระทั่งถึงสัปดาห์ที่ 6 แต่เมื่อสิ้นสุดการให้ภาวะแล้งในสัปดาห์ที่ 7 ความสูงของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่ผ่านการปลูกในภาวะแล้งยังคงต้นเตี้ยกว่าข้าวที่ปลูกในภาวะปกติมาโดยตลอด (ตารางที่ 2, รูปที่ 1)

1.2.2 ความยาวราก

ความยาวรากของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 เมื่อปลูกในภาวะปกติพบว่า ความยาวรากของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ตลอดระยะเวลาการทดลอง เมื่อให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์พบว่า ภายหลังจากการให้ภาวะแล้งเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ข้าวสายพันธุ์เดิมมีความยาวรากน้อยกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมที่เจริญในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีความยาวรากไม่แตกต่างจากข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ แต่เมื่อต้นข้าวอยู่ในภาวะแล้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 และข้าวสายพันธุ์เดิมมีความยาวรากไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่อยู่ในภาวะแล้งยังมีความยาวรากน้อยกว่าชุดควบคุม อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ คือในสัปดาห์ที่ 5 พบว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่อยู่ในภาวะแล้งสามารถกลับมามีความยาวรากไม่แตกต่างจากข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ ต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิมที่อยู่ในภาวะแล้งยังคงมีความยาวรากน้อยกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมที่เจริญในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อ

เวลาผ่านไป ความยาวรากของข้าวที่อยู่ในภาวะแล้งทั้งสองสายพันธุ์มีค่าน้อยกว่าข้าวที่เติบโตในภาวะปกติ (ตารางที่ 3, รูปที่ 2)

1.2.3 น้ำหนักสดต้น

เมื่อวัดน้ำหนักสดต้นของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่ปลูกในภาวะปกติพบว่า โดยส่วนใหญ่ตลอดระยะเวลาของการทดลอง ข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีน้ำหนักสดต้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้นในสัปดาห์ที่ 4 ที่ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีน้ำหนักสดต้นมากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์ปรากฏว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีน้ำหนักสดต้นมากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 จนกระทั่งถึงสัปดาห์ที่ 6 และเมื่อสิ้นสุดการให้ภาวะแล้งเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7) ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ก็ยังคงมีน้ำหนักสดต้นมากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิม อย่างไรก็ตามข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่อยู่ในภาวะแล้งจะมีน้ำหนักสดต้นน้อยกว่าข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่ปลูกในภาวะปกติ (ตารางที่ 4, รูปที่ 3)

1.2.4 น้ำหนักแห้งต้น

ข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติจะมีน้ำหนักแห้งต้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในช่วง 6 สัปดาห์แรกของการทดลอง แต่ในสัปดาห์ที่ 7 พบว่าข้าวสายพันธุ์เดิมมีน้ำหนักแห้งต้นมากกว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์พบว่า น้ำหนักแห้งต้นของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมที่ปลูกในภาวะแล้งเช่นกันอย่างเห็นได้ชัด ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 จนกระทั่งถึงสัปดาห์ที่ 7 เป็นที่น่าสังเกตว่าภายหลังการให้ภาวะแล้งเป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีผลทำให้น้ำหนักแห้งต้นของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ต่ำกว่าต้นที่เจริญในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่ออยู่ในภาวะแล้ง 2 สัปดาห์ ข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีน้ำหนักแห้งต้นไม่แตกต่างกันจากกล้าข้าวในชุดควบคุม อย่างไรก็ตามในสัปดาห์ที่ 3 หลังจากได้รับภาวะแล้งมีเฉพาะข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 เท่านั้นที่ยังคงรักษาน้ำหนักแห้งไว้ได้ใกล้เคียงกับต้นข้าวที่เจริญในภาวะปกติ ต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิมที่มีน้ำหนักแห้งต้นต่ำกว่าข้าวที่เจริญในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5, รูปที่ 4)

1.2.5 น้ำหนักสตราก

เมื่อวัดน้ำหนักสตรากของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ ตลอดระยะเวลา 6 สัปดาห์ของการทดลอง พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทำการทดลองจนกระทั่งถึงสัปดาห์ที่ 7 พบว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีน้ำหนักสตรากมากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์ปรากฏว่าภายหลังการให้ภาวะแล้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีเฉพาะข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 เท่านั้นที่ยังคงรักษาน้ำหนักสตรากไว้ได้ใกล้เคียงกับข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์เดิมที่ได้รับภาวะแล้งมีน้ำหนักสตรากต่ำกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมที่เจริญในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญ แต่หลังจากสัปดาห์ที่ 4 ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะแล้งจะมีน้ำหนักสตรากไม่แตกต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิมที่อยู่ในภาวะแล้งเช่นกัน และข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่อยู่ในภาวะแล้งนี้มีน้ำหนักสตรากน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6, รูปที่ 5)

1.2.6 น้ำหนักแห้งราก

น้ำหนักแห้งรากของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อปลูกในภาวะปกติ ตลอดระยะเวลาการทดลอง เมื่อให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์พบว่า ในช่วง 2 สัปดาห์แรกหลังจากให้ภาวะแล้ง ข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีน้ำหนักแห้งรากไม่แตกต่างจากกล้าข้าวในชุดควบคุม หลังจากให้ภาวะแล้งเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ข้าวสายพันธุ์เดิมมีน้ำหนักแห้งรากน้อยกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมที่เจริญในภาวะปกติ ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีน้ำหนักแห้งรากไม่แตกต่างจากข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติและยังคงรักษาน้ำหนักแห้งรากไว้ได้ใกล้เคียงกับน้ำหนักแห้งรากของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในชุดควบคุม ต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิมที่มีน้ำหนักแห้งรากน้อยกว่าข้าวที่เจริญในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 6 อย่างไรก็ตาม หลังสิ้นสุดการให้ภาวะแล้งเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าน้ำหนักแห้งรากของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่เจริญในภาวะแล้ง มีค่าต่ำกว่าน้ำหนักแห้งรากของข้าวที่เจริญเติบโตในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 7, รูปที่ 6)

ตารางที่ 2 ความสูงในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)

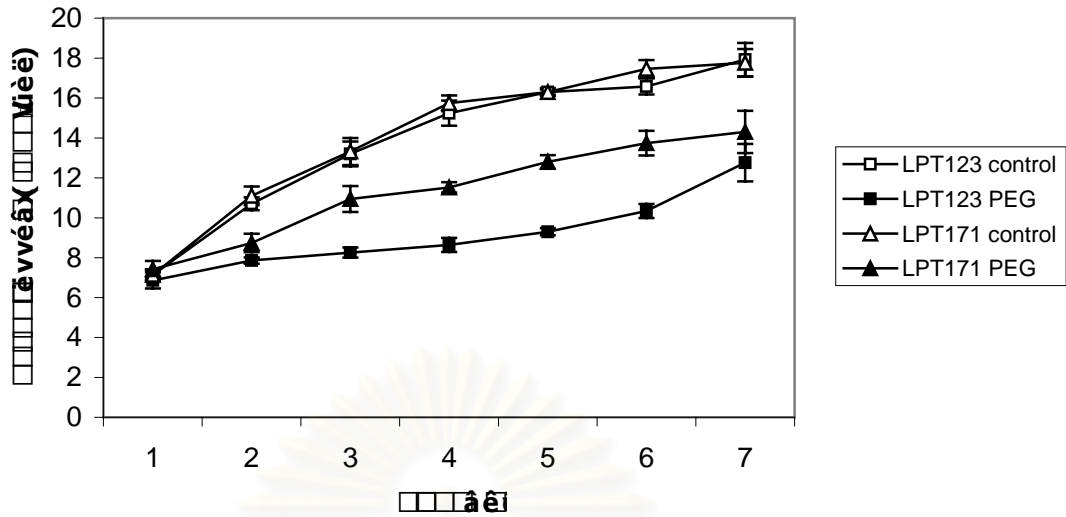
สายพันธุ์และภาวะการปลูก	ความสูงของต้นข้าว (เซนติเมตร)						
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7
LPT123 PEG 0 g/l	7.14 (± 0.27) ^a	10.70 (± 0.32) ^a	13.20 (± 0.62) ^a	15.24 (± 0.63) ^a	16.30 (± 0.20) ^a	16.58 (± 0.40) ^a	17.92 (± 0.84) ^a
LPT123-TC171 PEG 0g/l	7.14 (± 0.27) ^a	11.10 (± 0.47) ^a	13.32 (± 0.68) ^a	15.74 (± 0.39) ^a	16.30 (± 0.13) ^a	17.46 (± 0.44) ^a	17.76 (± 0.69) ^a
LPT123 PEG 200 g/l	6.86 (± 0.41) ^a	7.86 (± 0.16) ^b	8.26 (± 0.25) ^c	8.64 (± 0.35) ^c	9.30 (± 0.18) ^c	10.34 (± 0.35) ^c	12.76 (± 0.94) ^b
LPT123-TC171 PEG 200 g/l	7.42 (± 0.42) ^a	8.74 (± 0.46) ^b	10.94 (± 0.65) ^b	11.52 (± 0.26) ^b	12.80 (± 0.34) ^b	13.74 (± 0.62) ^b	14.30 (± 1.06) ^b

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวหลังเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

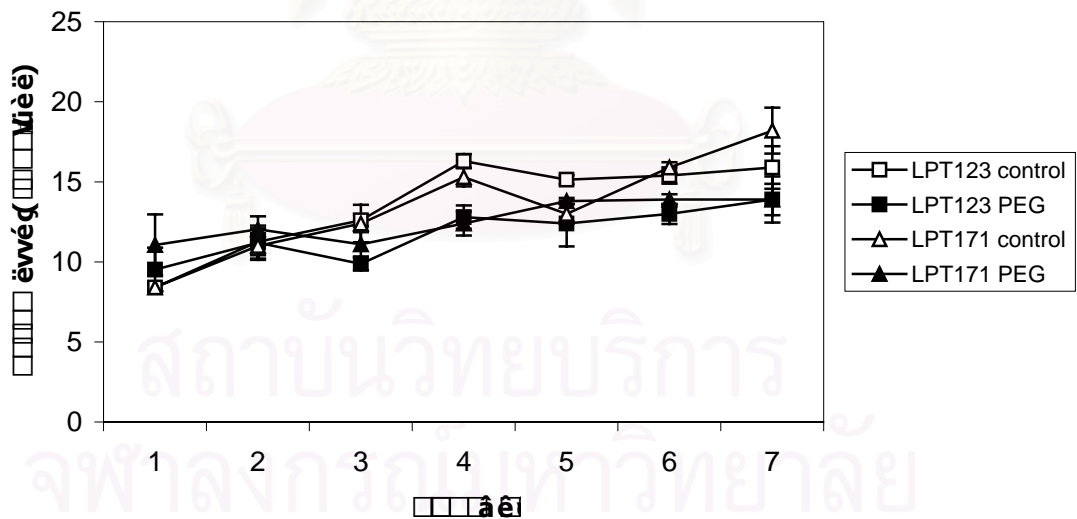
ตารางที่ 3 ความยาวรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่7)

สายพันธุ์และภาวะการปลูก	ความยาวราก (เซนติเมตร)						
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7
LPT123 PEG 0 g/l	8.40 (± 0.24) ^a	11.26 (± 0.84) ^a	12.60 (± 0.37) ^a	16.30 (± 0.44) ^a	15.14 (± 0.28) ^a	15.40 (± 0.51) ^a	15.90 (± 1.33) ^{ab}
LPT123-TC171 PEG 0g/l	8.40 (± 0.24) ^a	11.00 (± 0.79) ^a	12.40 (± 1.17) ^a	15.30 (± 0.58) ^a	13.00 (± 0.63) ^{ab}	15.90 (± 0.33) ^a	18.20 (± 1.43) ^a
LPT123 PEG 200 g/l	9.52 (± 1.37) ^a	11.20 (± 1.07) ^a	9.88 (± 0.40) ^b	12.80 (± 0.73) ^b	12.40 (± 1.43) ^b	13.00 (± 0.63) ^b	13.90 (± 0.98) ^b
LPT123-TC171 PEG 200 g/l	11.06 (± 1.91) ^a	12.04 (± 0.81) ^a	11.10 (± 0.76) ^{ab}	12.40 (± 0.75) ^b	13.80 (± 0.20) ^{ab}	13.90 (± 0.33) ^b	13.90 (± 1.44) ^b

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวหลังเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 1 ความสูงในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)



รูปที่ 2 ความยาวรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)

ตารางที่ 4 น้ำหนักสดต้นในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)

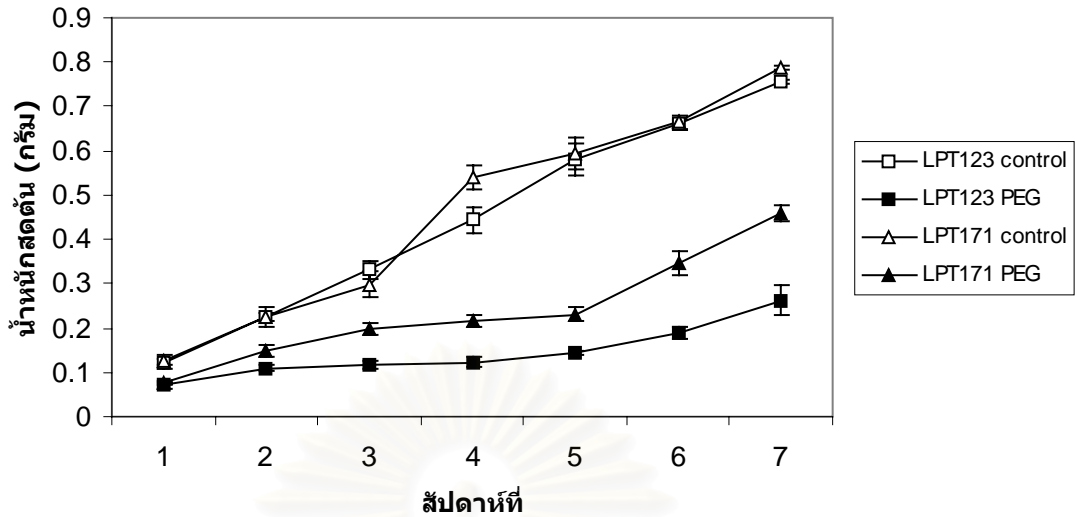
สายพันธุ์และ ภาวะการปลูก	น้ำหนักสดต้น (กรัม)						
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7
LPT123 PEG 0 g/l	0.1212 (± 0.0115) ^a	0.2269 (± 0.0089) ^a	0.3309 (± 0.0207) ^a	0.4437 (± 0.0275) ^b	0.5808 (± 0.0358) ^a	0.6599 (± 0.0113) ^a	0.7559 (± 0.0055) ^a
LPT123-TC171 PEG 0g/l	0.1268 (± 0.0111) ^a	0.2246 (± 0.0235) ^a	0.2979 (± 0.0291) ^a	0.5399 (± 0.0274) ^a	0.5942 (± 0.0357) ^a	0.6638 (± 0.0167) ^a	0.7866 (± 0.0055) ^a
LPT123 PEG 200 g/l	0.0713 (± 0.0061) ^b	0.1095 (± 0.0076) ^b	0.1159 (± 0.0099) ^c	0.1233 (± 0.0128) ^d	0.1442 (± 0.0028) ^c	0.1881 (± 0.0132) ^c	0.2623 (± 0.0349) ^c
LPT123-TC171 PEG 200 g/l	0.0766 (± 0.0063) ^b	0.1482 (± 0.0123) ^b	0.1975 (± 0.0145) ^b	0.2159 (± 0.0156) ^c	0.2311 (± 0.0158) ^b	0.3469 (± 0.0287) ^b	0.4572 (± 0.0177) ^b

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวหลังเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

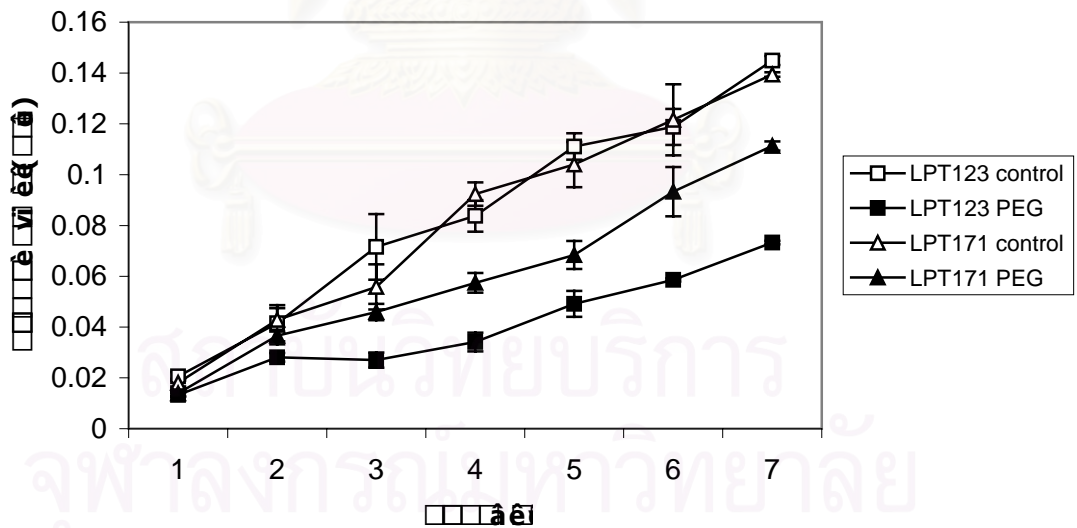
ตารางที่ 5 น้ำหนักแห้งต้นในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)

สายพันธุ์และ ภาวะการปลูก	น้ำหนักแห้งต้น (กรัม)						
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7
LPT123 PEG 0 g/l	0.0206 (± 0.0017) ^a	0.0415 (± 0.0071) ^a	0.0716 (± 0.0129) ^a	0.0838 (± 0.0062) ^a	0.1111 (± 0.0052) ^a	0.1188 (± 0.0071) ^a	0.1449 (± 0.0018) ^a
LPT123-TC171 PEG 0g/l	0.0181 (± 0.0015) ^a	0.0428 (± 0.0046) ^a	0.0558 (± 0.0089) ^{ab}	0.0924 (± 0.0046) ^a	0.1040 (± 0.0089) ^a	0.1216 (± 0.0140) ^a	0.1394 (± 0.0009) ^b
LPT123 PEG 200 g/l	0.0133 (± 0.0008) ^b	0.0281 (± 0.0017) ^a	0.0270 (± 0.0030) ^c	0.0341 (± 0.0037) ^c	0.0491 (± 0.0051) ^c	0.0586 (± 0.0006) ^b	0.0733 (± 0.0007) ^d
LPT123-TC171 PEG 200 g/l	0.0139 (± 0.0011) ^b	0.0366 (± 0.0034) ^a	0.0459 (± 0.0032) ^{bc}	0.0574 (± 0.0039) ^b	0.0684 (± 0.0055) ^b	0.0933 (± 0.0097) ^a	0.1113 (± 0.0018) ^c

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวหลังเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 3 น้ำหนักสดต้นในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)



รูปที่ 4 น้ำหนักแห้งต้นในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)

ตารางที่ 6 น้ำหนักสตรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญเติบโตในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)

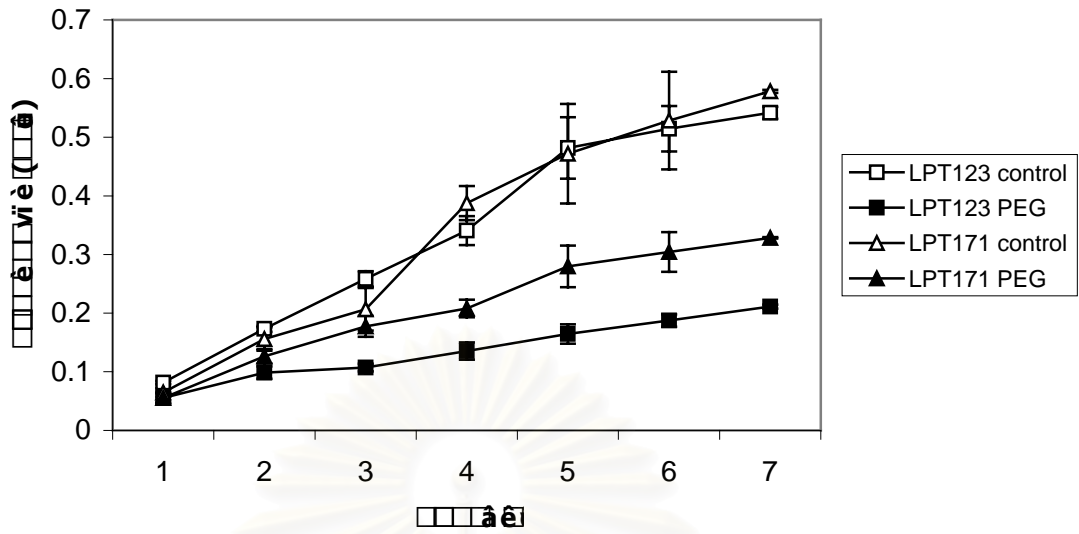
สายพันธุ์และ ภาวะการปลูก	น้ำหนักสตราก (กรัม)						
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7
LPT123 PEG 0 g/l	0.0816 (± 0.0028) ^a	0.1731 (± 0.0051) ^a	0.2586 (± 0.0132) ^a	0.3409 (± 0.0246) ^a	0.4817 (± 0.0524) ^a	0.5144 (± 0.0387) ^a	0.5417 (± 0.0103) ^b
LPT123-TC171 PEG 0g/l	0.0647 (± 0.0072) ^{ab}	0.1557 (± 0.0199) ^{ab}	0.2065 (± 0.0364) ^{ab}	0.3877 (± 0.0291) ^a	0.4719 (± 0.0848) ^a	0.5284 (± 0.0832) ^a	0.5783 (± 0.0026) ^a
LPT123 PEG 200 g/l	0.0553 (± 0.0102) ^b	0.0986 (± 0.0106) ^c	0.1072 (± 0.0065) ^c	0.1353 (± 0.0147) ^c	0.1644 (± 0.0165) ^b	0.1873 (± 0.0106) ^b	0.2111 (± 0.0034) ^d
LPT123-TC171 PEG 200 g/l	0.0553 (± 0.0075) ^b	0.1264 (± 0.0124) ^{bc}	0.1774 (± 0.0179) ^b	0.2079 (± 0.0149) ^b	0.2799 (± 0.0354) ^b	0.3044 (± 0.0339) ^b	0.3285 (± 0.0012) ^c

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวหลังเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

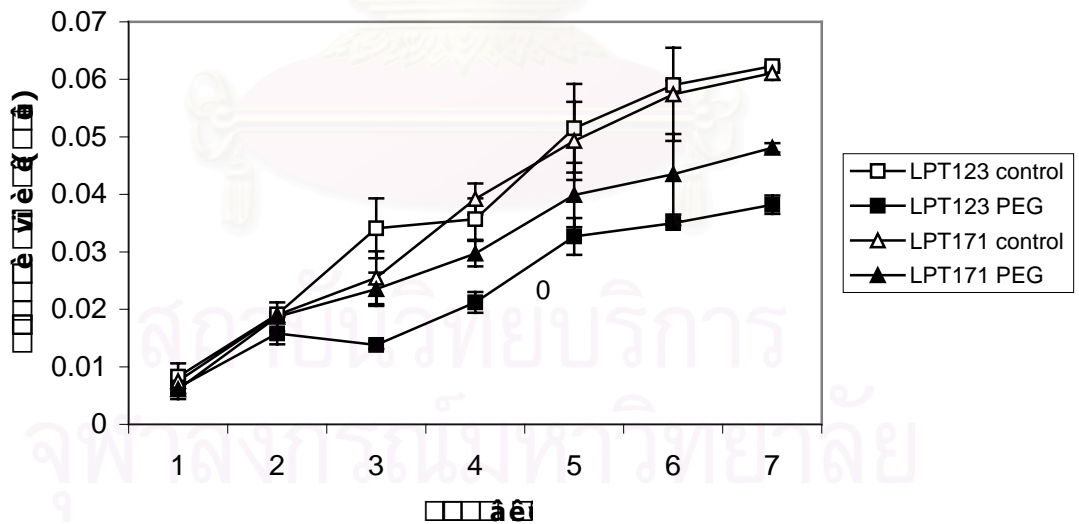
ตารางที่ 7 น้ำหนักแห้งรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)

สายพันธุ์และ ภาวะการปลูก	น้ำหนักแห้งราก (กรัม)						
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7
LPT123 PEG 0 g/l	0.0083 (± 0.0004) ^a	0.0191 (± 0.0004) ^a	0.0341 (± 0.0052) ^a	0.0357 (± 0.0036) ^{ab}	0.0515 (± 0.0077) ^a	0.0590 (± 0.0008) ^a	0.0623 (± 0.0004) ^a
LPT123-TC171 PEG 0g/l	0.0075 (± 0.0031) ^a	0.0190 (± 0.0003) ^a	0.0255 (± 0.0046) ^{ab}	0.0392 (± 0.0027) ^a	0.0493 (± 0.0068) ^a	0.0574 (± 0.0081) ^a	0.0611 (± 0.0012) ^a
LPT123 PEG 200 g/l	0.0064 (± 0.0010) ^a	0.0158 (± 0.0019) ^a	0.0138 (± 0.0007) ^b	0.0212 (± 0.0018) ^c	0.0327 (± 0.0032) ^a	0.0350 (± 0.0004) ^b	0.0382 (± 0.0016) ^c
LPT123-TC171 PEG 200 g/l	0.0061 (± 0.0009) ^a	0.0187 (± 0.0025) ^a	0.0235 (± 0.0029) ^{ab}	0.0297 (± 0.0022) ^b	0.0399 (± 0.0056) ^a	0.0435 (± 0.0070) ^{ab}	0.0481 (± 0.0008) ^b

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวหลังเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 5 น้ำหนักสตรากรในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)



รูปที่ 6 น้ำหนักแห้งรกรในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)

1.3 การเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่ 11 ในภาวะแล้ง

1.3.1 ความสูง

ความสูงของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 เมื่อเจริญในภาวะปกติ ไม่มีความแตกต่างกัน ใน 4 สัปดาห์แรกของการทดลอง จนกระทั่งถึงสัปดาห์ที่ 5 และ 6 พบว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีความสูงมากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7) ข้าวทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์พบว่า ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีความสูงมากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่ในสัปดาห์ที่ 1 จนกระทั่งถึงสิ้นสุดการให้ภาวะแล้งเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7) และยังพบว่าความสูงของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่อยู่ในภาวะแล้งนี้ไม่มีความแตกต่างกันกับข้าวที่เจริญในภาวะปกติตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 จนถึงสัปดาห์ที่ 4 หลังจากได้รับภาวะแล้ง ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์เดิมที่ได้รับภาวะแล้งจะมีความสูงน้อยกว่าข้าวที่เจริญในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตลอดระยะเวลาการทดลอง (ตารางที่ 8, รูปที่ 7)

1.3.2 ความยาวราก

เมื่อวัดความยาวรากของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 เมื่อปลูกในภาวะปกติพบว่า โดยส่วนใหญ่ตลอดระยะเวลาของการทดลอง ข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีความยาวรากไม่แตกต่างกัน เมื่อให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์ปรากฏว่า หลังจากให้ภาวะแล้งเป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีผลให้ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีความยาวรากสูงกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อข้าวทั้งสองสายพันธุ์อยู่ในภาวะแล้งแล้ว 3 สัปดาห์ พบว่าข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีความยาวรากไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามเมื่อให้ภาวะแล้งต่อไปอีก 1 สัปดาห์ พบว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 จะกลับมามีความยาวรากยาวกว่าข้าวสายพันธุ์เดิม แต่หลังจากสัปดาห์ที่ 4 ของการให้ภาวะแล้งจนกระทั่งถึงสิ้นสุดการให้ภาวะแล้งเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7) ข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่อยู่ในภาวะแล้งมีความยาวรากไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่า ภาวะแล้งมีผลทำให้รากของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ยาวกว่ารากของข้าวสายพันธุ์เดียวกันที่ปลูกในภาวะปกติ โดยสามารถสังเกตลักษณะดังกล่าวภายหลังจากการให้ภาวะแล้งแก่ข้าวเป็นเวลา 3-6 สัปดาห์ (ตารางที่ 9, รูปที่ 8)

1.3.3 น้ำหนักสดต้น

เมื่อวัดน้ำหนักสดต้นของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 เมื่อปลูกในภาวะปกติพบว่า โดยส่วนใหญ่ตลอดระยะเวลาของการทดลอง น้ำหนักสดต้นของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์พบว่า หลังการให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีน้ำหนักสดต้นมากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบว่าน้ำหนักสดต้นของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ไม่แตกต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิมที่เจริญในภาวะปกติ แต่เมื่ออยู่ในภาวะแล้งแล้ว 2 สัปดาห์ น้ำหนักสดต้นของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ไม่แตกต่างจากข้าวในชุดควบคุม และเมื่อข้าวทั้งสองสายพันธุ์ได้รับภาวะแล้งเป็นสัปดาห์ที่ 3 ปรากฏว่ามีเพียงข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 เท่านั้นที่มีน้ำหนักสดต้นใกล้เคียงกับข้าวที่เจริญในภาวะปกติ จนกระทั่งถึงการสิ้นสุดการให้ภาวะแล้งเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7) ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์เดิมที่อยู่ในภาวะแล้งมีน้ำหนักสดต้นน้อยกว่าข้าวที่เจริญในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 10, รูปที่ 9)

1.3.4 น้ำหนักแห้งต้น

เมื่อวัดน้ำหนักแห้งต้นของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 เมื่อปลูกในภาวะปกติพบว่า โดยส่วนใหญ่ตลอดระยะเวลาของการทดลอง น้ำหนักแห้งต้นของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ไม่แตกต่างกัน มีเฉพาะในบางสัปดาห์เท่านั้นที่พบข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีน้ำหนักแห้งต้นมากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิม เมื่อให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์พบว่า ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีน้ำหนักแห้งต้นแตกต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างเห็นได้ชัด โดยมีน้ำหนักแห้งต้นมากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมตลอดระยะเวลาการทดลอง 6 สัปดาห์ และเมื่อสิ้นสุดการให้ภาวะแล้ง 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7) ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ก็ยังคงมีน้ำหนักแห้งต้นมากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิม ภาวะแล้งมีผลทำให้น้ำหนักแห้งต้นของข้าวสายพันธุ์เดิมต่ำกว่าสายพันธุ์เดียวกันที่เจริญในภาวะปกติ ตั้งแต่ 1 สัปดาห์ หลังจากได้รับภาวะแล้ง แต่ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 สามารถรักษาน้ำหนักแห้งต้นให้ใกล้เคียงกับต้นที่เติบโตในภาวะปกติในช่วง 2 สัปดาห์แรกหลังจากได้รับภาวะแล้ง และปรากฏผลการลดลงของน้ำหนักแห้งต้นอันเนื่องมาจากภาวะแล้งหลังจากเติบโตในภาวะแล้งเป็นเวลา 3 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามหลังจากนั้น ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 กลับสามารถรักษาน้ำหนักแห้งต้นไว้ได้ ไม่แตกต่างจากต้นชุดควบคุมที่เจริญในภาวะปกติ ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 ภายใต้ภาวะแล้ง (ตารางที่ 11, รูปที่ 10)

1.3.5 น้ำหนักสตราก

เมื่อวัดน้ำหนักสตรากของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่ปลูกในภาวะปกติ พบว่าในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการทดลอง ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีน้ำหนักสตรากสูงกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในสัปดาห์ที่ 3 จนกระทั่งถึงสัปดาห์ที่ 7 ของการทดลอง ปรากฏว่าข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีน้ำหนักสตรากโดยส่วนใหญ่ไม่แตกต่างกัน และเมื่อให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าภายหลังการให้ภาวะแล้งเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ข้าวสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีน้ำหนักสตรากไม่แตกต่างจากข้าวสายพันธุ์เดียวกันที่เจริญในภาวะปกติ แต่หลังจากข้าวทั้งสองสายพันธุ์ได้รับภาวะแล้ง ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 จนกระทั่งถึงสัปดาห์ที่ 6 และสิ้นสุดการให้ภาวะแล้งเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7) มีเฉพาะข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 เท่านั้น ที่มีน้ำหนักสตรากใกล้เคียงกับข้าวที่เจริญในภาวะปกติ ต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิมที่มีน้ำหนักสตรากต่ำกว่าต้นข้าวที่เจริญในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 12, รูปที่ 11)

1.3.6 น้ำหนักแห้งราก

น้ำหนักแห้งรากของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่ปลูกในภาวะปกติมีน้ำหนักแห้งรากไม่แตกต่างกัน ในช่วง 5 สัปดาห์แรกของการทดลอง แต่ในสัปดาห์ที่ 6 พบว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีน้ำหนักแห้งรากน้อยกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7) ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีน้ำหนักแห้งรากไม่แตกต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิม และเมื่อให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์พบว่า การให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีผลให้น้ำหนักแห้งรากของข้าวสายพันธุ์เดิมมีน้ำหนักแห้งรากน้อยกว่าข้าวที่เจริญในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีน้ำหนักแห้งรากไม่แตกต่างจากข้าวที่เจริญในภาวะปกติ แต่เมื่ออยู่ในภาวะแล้งแล้ว 2 สัปดาห์ ข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีน้ำหนักแห้งรากไม่แตกต่างจากต้นข้าวในชุดควบคุม อย่างไรก็ตามในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 หลังจากได้รับภาวะแล้งแล้วพบว่า มีเฉพาะข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 เท่านั้นที่มีน้ำหนักแห้งรากไม่แตกต่างจากข้าวที่เจริญในภาวะปกติ ต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิมที่มีน้ำหนักแห้งรากต่ำกว่าข้าวที่เจริญในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 13, รูปที่ 12)

ตารางที่ 8 ความสูงในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)

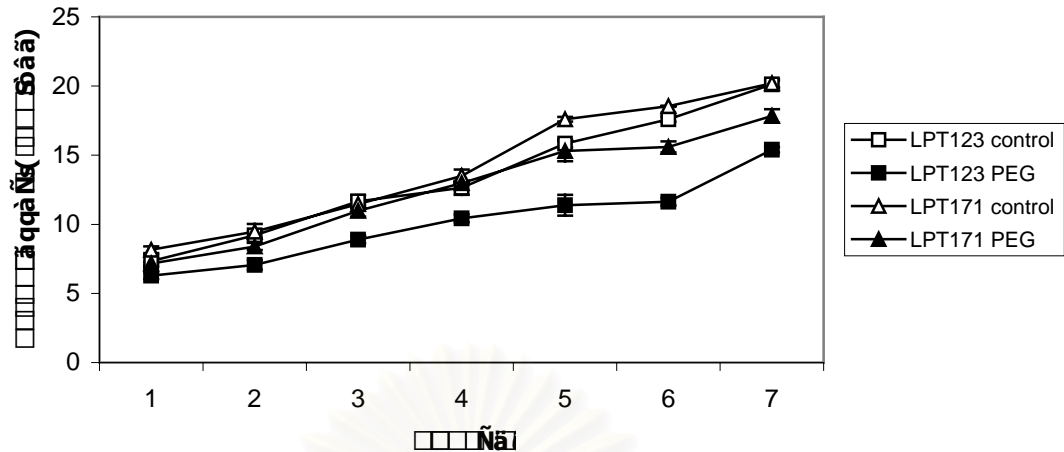
สายพันธุ์และ ภาวะการปลูก	ความสูงของต้นข้าว (เซนติเมตร)						
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7
LPT123 PEG 0 g/l	7.34 (± 0.45) ^{ab}	9.21 (± 0.19) ^a	11.66 (± 0.45) ^a	12.64 (± 0.50) ^a	15.84 (± 0.27) ^b	17.60 (± 0.18) ^b	20.12 (± 0.26) ^a
LPT123-TC171 PEG 0g/l	8.16 (± 0.25) ^a	9.48 (± 0.55) ^a	11.46 (± 0.30) ^a	13.50 (± 0.46) ^a	17.60 (± 0.17) ^a	18.54 (± 0.04) ^a	20.20 (± 0.30) ^a
LPT123 PEG 200 g/l	6.28 (± 0.24) ^c	7.06 (± 0.34) ^b	8.90 (± 0.27) ^b	10.44 (± 0.28) ^b	11.38 (± 0.75) ^c	11.64 (± 0.28) ^d	15.40 (± 0.20) ^c
LPT123-TC171 PEG 200 g/l	7.16 (± 0.11) ^b	8.40 (± 0.27) ^a	10.98 (± 0.42) ^a	12.98 (± 0.09) ^a	15.30 (± 0.73) ^b	15.60 (± 0.40) ^c	17.84 (± 0.49) ^b

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวหลังเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

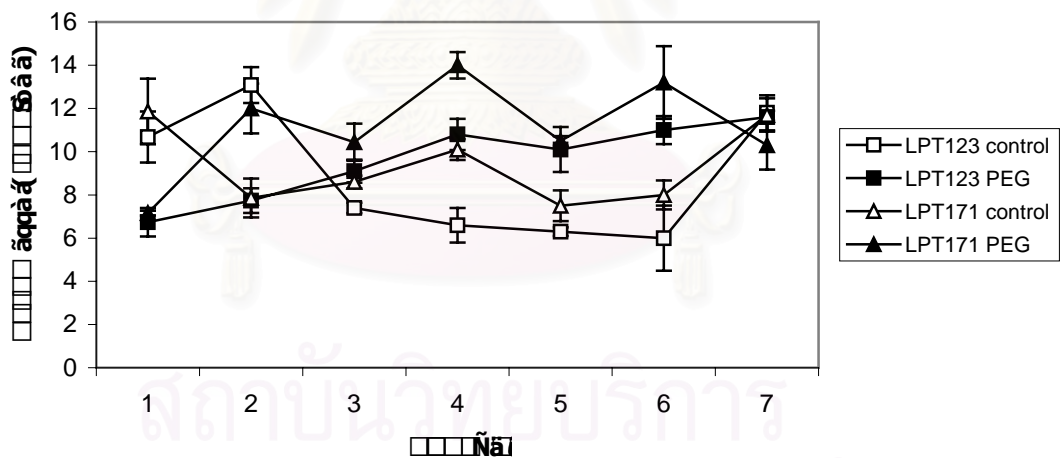
ตารางที่ 9 ความยาวรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่7)

สายพันธุ์และ ภาวะการปลูก	ความยาวราก (เซนติเมตร)						
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7
LPT123 PEG 0 g/l	10.68 (\pm 1.18) ^a	13.08 (\pm 0.83) ^a	7.40 (\pm 0.24) ^c	6.60 (\pm 0.80) ^c	6.30 (\pm 0.20) ^b	6.00 (\pm 1.51) ^c	11.80 (\pm 0.81) ^a
LPT123-TC171 PEG 0g/l	11.86 (\pm 1.52) ^a	7.86 (\pm 0.90) ^b	8.60 (\pm 0.29) ^{bc}	10.10 (\pm 0.48) ^b	7.50 (\pm 0.71) ^b	8.00 (\pm 0.67) ^{bc}	11.70 (\pm 0.77) ^a
LPT123 PEG 200 g/l	6.74 (\pm 0.66) ^b	7.74 (\pm 0.57) ^b	9.10 (\pm 0.53) ^{ab}	10.80 (\pm 0.72) ^b	10.10 (\pm 1.04) ^a	11.00 (\pm 0.65) ^{ab}	11.60 (\pm 0.29) ^a
LPT123-TC171 PEG 200 g/l	7.16 (\pm 0.11) ^b	12.00 (\pm 1.15) ^a	10.44 (\pm 0.86) ^a	14.00 (\pm 0.61) ^a	10.50 (\pm 0.22) ^a	13.20 (\pm 1.68) ^a	10.30 (\pm 1.13) ^a

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวหลังเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 7 ความสูงในแตละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)



รูปที่ 8 ความยาวรากในแตละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่7)

ตารางที่ 10 น้ำหนักสดต้นในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)

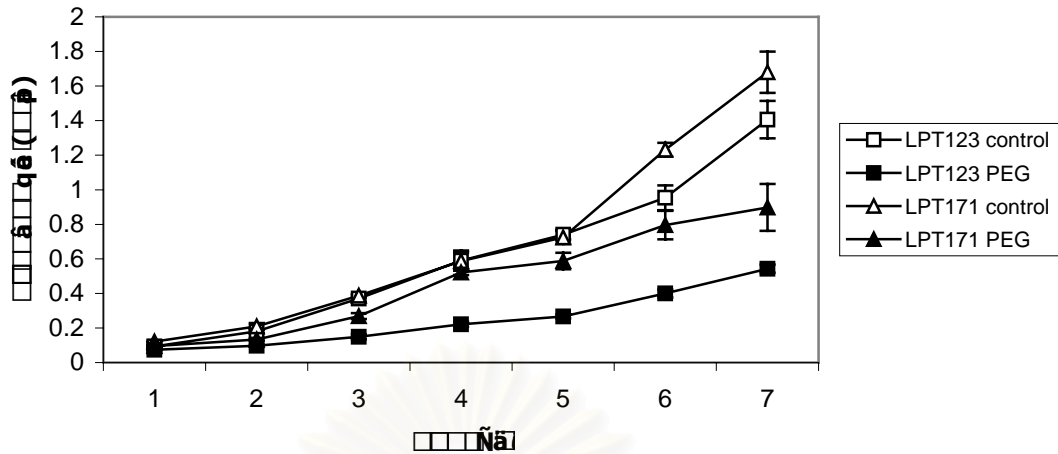
สายพันธุ์และ ภาวะการปลูก	น้ำหนักสดต้น (กรัม)						
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7
LPT123 PEG 0 g/l	0.0931 (± 0.0042) ^b	0.1809 (± 0.0116) ^a	0.3702 (± 0.0198) ^a	0.5893 (± 0.0581) ^a	0.7402 (± 0.0276) ^a	0.9540 (± 0.0716) ^b	1.4059 (± 0.1081) ^a
LPT123-TC171 PEG 0g/l	0.1214 (± 0.0051) ^a	0.2091 (± 0.0191) ^a	0.3868 (± 0.0105) ^a	0.5866 (± 0.0494) ^a	0.7245 (± 0.0377) ^a	1.2317 (± 0.0401) ^a	1.6797 (± 0.1194) ^a
LPT123 PEG 200 g/l	0.0739 (± 0.0040) ^c	0.0973 (± 0.0063) ^b	0.1487 (± 0.0143) ^c	0.2210 (± 0.0147) ^b	0.2667 (± 0.0115) ^c	0.3995 (± 0.0228) ^c	0.5427 (± 0.0238) ^c
LPT123-TC171 PEG 200 g/l	0.0956 (± 0.0058) ^b	0.1332 (± 0.0085) ^b	0.2688 (± 0.0175) ^b	0.5212 (± 0.0145) ^a	0.5874 (± 0.0479) ^b	0.7959 (± 0.0824) ^b	0.8979 (± 0.0135) ^b

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวหลังเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

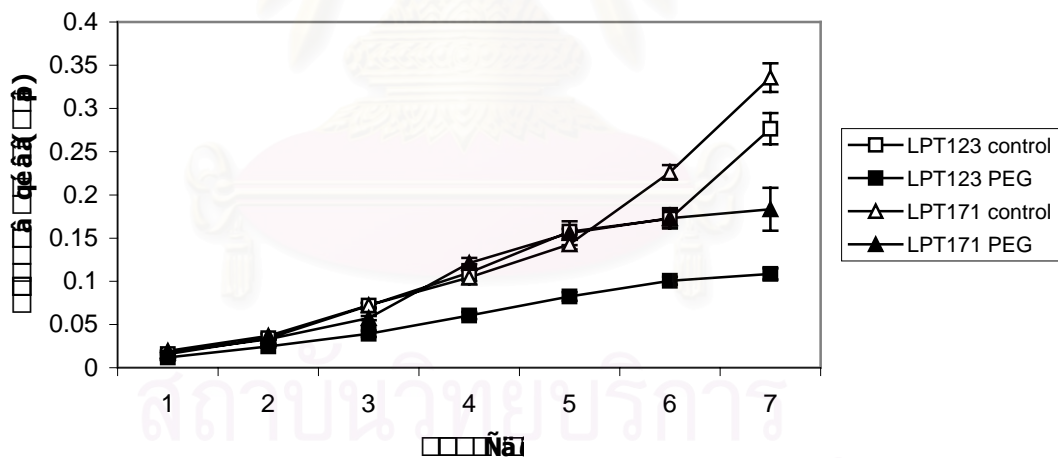
ตารางที่ 11 น้ำหนักแห้งต้นในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)

สายพันธุ์และ ภาวะการปลูก	น้ำหนักแห้งต้น (กรัม)						
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7
LPT123 PEG 0 g/l	0.0157 (± 0.0009) ^b	0.0340 (± 0.0013) ^a	0.0718 (± 0.0033) ^a	0.1099 (± 0.0098) ^a	0.1575 (± 0.0032) ^a	0.1726 (± 0.0103) ^b	0.2766 (± 0.0180) ^b
LPT123-TC171 PEG 0g/l	0.0194 (± 0.0008) ^a	0.0369 (± 0.0026) ^a	0.0722 (± 0.0026) ^a	0.1044 (± 0.0080) ^a	0.1429 (± 0.0059) ^a	0.2261 (± 0.0085) ^a	0.3357 (± 0.0165) ^a
LPT123 PEG 200 g/l	0.0119 (± 0.0011) ^c	0.0247 (± 0.0014) ^b	0.0393 (± 0.0037) ^c	0.0604 (± 0.0041) ^b	0.0824 (± 0.0050) ^b	0.1006 (± 0.0045) ^c	0.1085 (± 0.0065) ^d
LPT123-TC171 PEG 200 g/l	0.0175 (± 0.0008) ^{ab}	0.0329 (± 0.0010) ^a	0.0574 (± 0.0024) ^b	0.1210 (± 0.0059) ^a	0.1558 (± 0.0138) ^a	0.1730 (± 0.0117) ^b	0.1834 (± 0.0248) ^c

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวหลังเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 9 น้ำหนักสดต้นในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)



รูปที่ 10 น้ำหนักแห้งต้นในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)

ตารางที่ 12 น้ำหนักสตรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)

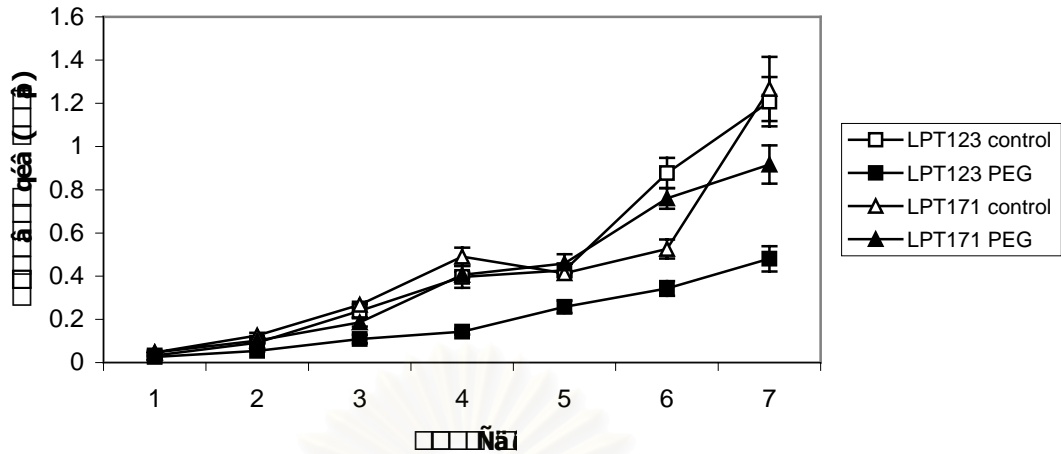
สายพันธุ์และ ภาวะการปลูก	น้ำหนักสตราก (กรัม)						
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7
LPT123 PEG 0 g/l	0.0328 (± 0.0031) ^b	0.0916 (± 0.0051) ^b	0.2395 (± 0.0300) ^{ab}	0.3963 (± 0.0502) ^a	0.4261 (± 0.0316) ^a	0.8776 (± 0.0701) ^a	1.2077 (± 0.1138) ^{ab}
LPT123-TC171 PEG 0g/l	0.0467 (± 0.0031) ^a	0.1250 (± 0.0129) ^a	0.2671 (± 0.0139) ^a	0.4899 (± 0.0418) ^a	0.4135 (± 0.0067) ^a	0.5258 (± 0.0443) ^b	1.2665 (± 0.1487) ^a
LPT123 PEG 200 g/l	0.0262 (± 0.0028) ^b	0.0542 (± 0.0038) ^c	0.1089 (± 0.0200) ^c	0.1426 (± 0.0129) ^b	0.2580 (± 0.0287) ^b	0.3425 (± 0.0340) ^c	0.4803 (± 0.0587) ^c
LPT123-TC171 PEG 200 g/l	0.0465 (± 0.0040) ^a	0.1017 (± 0.0125) ^{ab}	0.1861 (± 0.0193) ^b	0.4056 (± 0.0144) ^a	0.4580 (± 0.0430) ^a	0.7602 (± 0.0479) ^a	0.9168 (± 0.0885) ^b

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวหลังเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

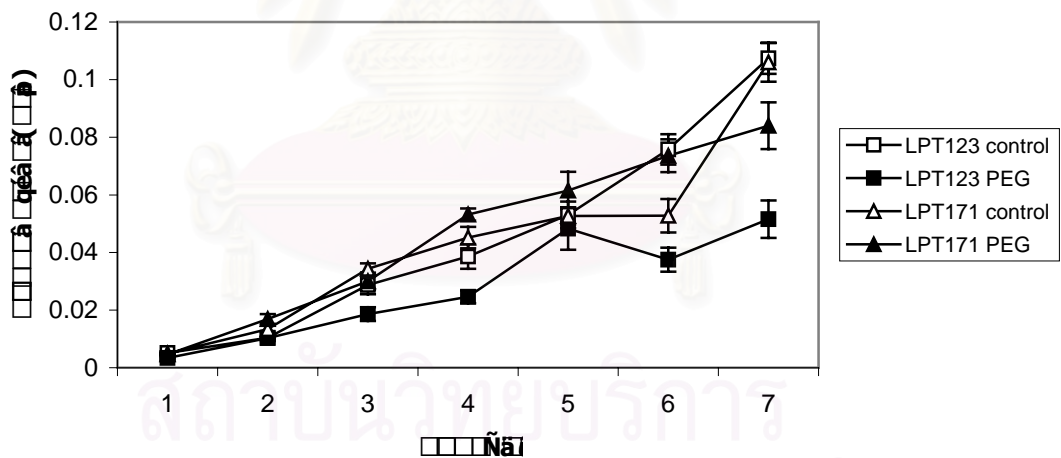
ตารางที่ 13 น้ำหนักแห้งรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)

สายพันธุ์และ ภาวะการปลูก	น้ำหนักแห้งราก (กรัม)						
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7
LPT123 PEG 0 g/l	0.0051 (± 0.0005) ^a	0.0104 (± 0.0003) ^b	0.0287 (± 0.0032) ^a	0.0386 (± 0.0043) ^b	0.0531 (± 0.0046) ^a	0.0758 (± 0.0053) ^a	0.1074 (± 0.0054) ^a
LPT123-TC171 PEG 0g/l	0.0049 (± 0.0003) ^a	0.0134 (± 0.0013) ^{ab}	0.0343 (± 0.0019) ^a	0.0452 (± 0.0037) ^{ab}	0.0527 (± 0.0029) ^a	0.0528 (± 0.0058) ^b	0.1060 (± 0.0067) ^a
LPT123 PEG 200 g/l	0.0034 (± 0.0003) ^b	0.0103 (± 0.0010) ^b	0.0186 (± 0.0024) ^b	0.0246 (± 0.0022) ^c	0.0483 (± 0.0073) ^a	0.0375 (± 0.0042) ^b	0.0516 (± 0.0065) ^c
LPT123-TC171 PEG 200 g/l	0.0046 (± 0.0004) ^a	0.0169 (± 0.0017) ^a	0.0300 (± 0.0030) ^a	0.0532 (± 0.0021) ^a	0.0615 (± 0.0065) ^a	0.0736 (± 0.0057) ^a	0.0840 (± 0.0081) ^b

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวหลังเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 11 น้ำหนักสตรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)



รูปที่ 12 น้ำหนักแห้งสตรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)

2. การศึกษาการแปรทางพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์เดิม โดยวิธี RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

2.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม

จากการทดสอบไพรเมอร์ จำนวน 122 ไพรเมอร์ เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่คาดว่าจะแสดงให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ผลการศึกษาพบไพรเมอร์ จำนวน 27 ไพรเมอร์ คือ A-13, A-14, A-17, A-20, B-13, B-14, B-17, B-18, C-08, UBC-1, UBC-2, UBC-4, UBC-12, UBC-32, UBC-34, UBC-51, UBC-57, UBC-64, UBC-73, UBC-74, UBC-75, UBC-76, UBC-80, UBC-82, UBC-85, UBC-88 และ UBC-89 (รูปที่ 13-18) ซึ่งคาดว่าน่าจะแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ได้ เนื่องจากไพรเมอร์เหล่านี้สามารถเพิ่มจำนวน DNA ที่มีขนาดแตกต่างกันจาก genomic DNA ของข้าวสายพันธุ์เดิมและข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171

2.2 การตรวจสอบรูปแบบของแถบ DNA ที่แสดง DNA Polymorphism ของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ โดยวิธี RAPD

จากการศึกษารูปแบบของแถบ DNA ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 สายพันธุ์ละ 20 ต้น โดยวิธี RAPD และใช้ไพรเมอร์ที่ผ่านการคัดเลือก จำนวน 27 ไพรเมอร์ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของแถบ DNA ระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ สามารถจำแนกรูปแบบของแถบ DNA ออกได้เป็น 3 รูปแบบ คือ

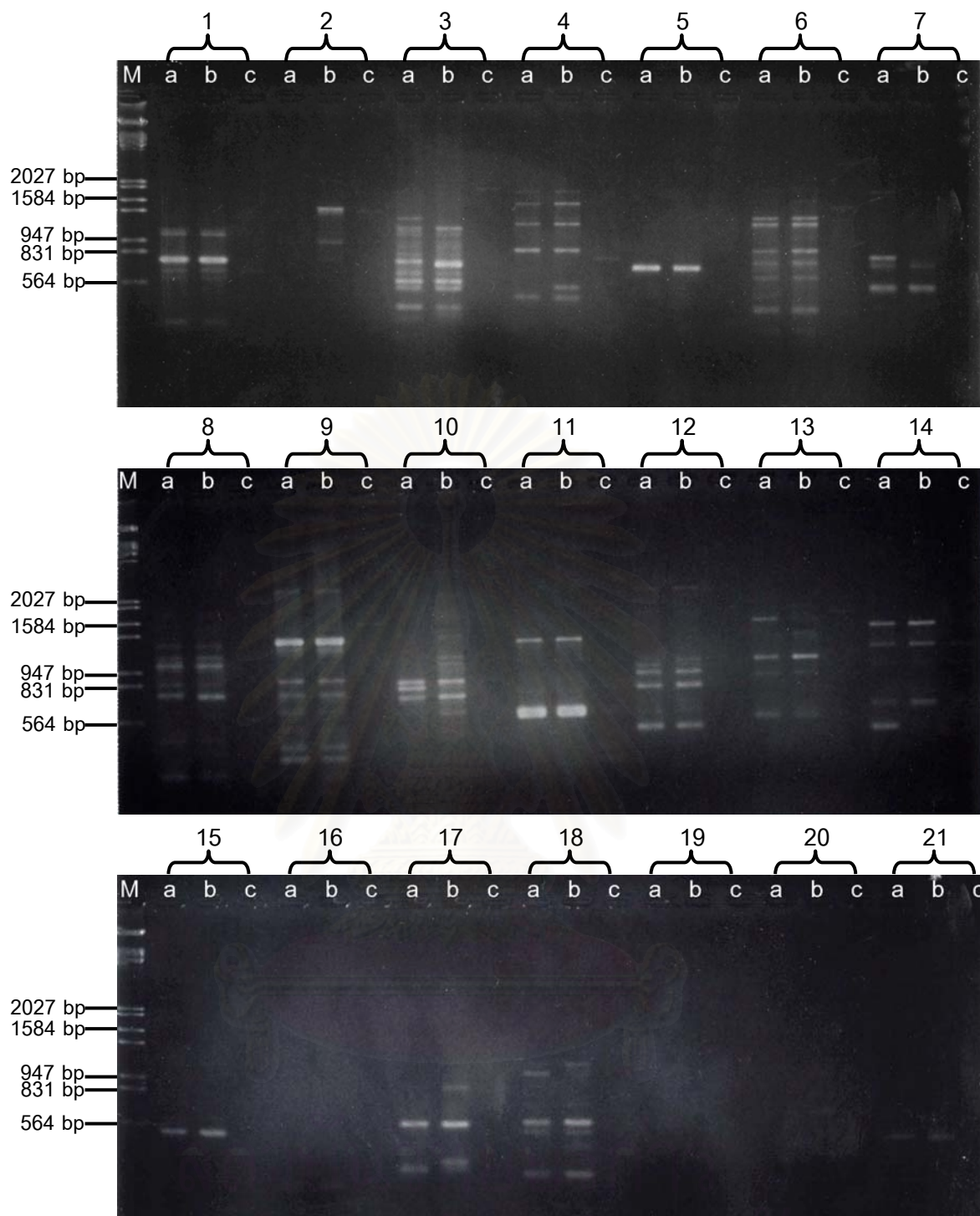
1. รูปแบบของแถบ DNA ระหว่างข้าวสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน มี variation ของแถบ DNA แต่พบได้เหมือนกันในตัวอย่างจากข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งจะพบเมื่อใช้ไพรเมอร์ A-14, A-17, A-20, B-13, B-14, B-17, C-08, UBC-1, UBC-2, UBC-4, UBC-12, UBC-32, UBC-34, UBC-57, UBC-64, UBC-73, UBC-75, UBC-76, UBC-82, UBC-85, UBC-88 และ UBC-89 ตัวอย่างแสดงดังรูปที่ 19-20

2. รูปแบบของแถบ DNA ระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกัน แต่ไม่มีความสม่ำเสมอ โดยอาจจะพบความแตกต่างในสายพันธุ์เดียวกัน และ/หรือความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ในบางต้น โดยรูปแบบของแถบ DNA ลักษณะนี้จะพบเมื่อใช้ไพรเมอร์ UBC-51 และ UBC-74 (รูปที่ 21-22)

3. รูปแบบของแถบ DNA ระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์อย่างสม่ำเสมอ พบในไพรเมอร์ A-13, B-18 และ UBC80 โดยแสดงแถบ DNA ที่แตกต่างกัน ดังครี (รูปที่ 23-25) ซึ่งแถบ DNA ที่แตกต่างกันในการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยไพรเมอร์ A-13 มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส พบปรากฏในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 แต่ไม่พบแถบ DNA นี้ในข้าวสายพันธุ์เดิม (รูปที่ 23) ส่วนในการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยไพรเมอร์ B-18 พบแถบ DNA ที่แตกต่างกันมีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส และพบแถบ DNA นี้ปรากฏเฉพาะในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 แต่ไม่พบในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 (รูปที่ 24) และการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยไพรเมอร์ UBC-80 พบแถบ DNA ที่แตกต่างกันมีขนาดประมาณ 300 คู่เบส และพบแถบ DNA นี้ปรากฏในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 แต่ไม่พบในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 (รูปที่ 25)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 รูปแบบของแถบ DNA จากการคัดเลือกไฟรเมอริที่ 1-21 โดยวิธี RAPD

โดย 1 = A-11 2 = A-12 3 = A-13 4 = A-14 5 = A-15 6 = A-16

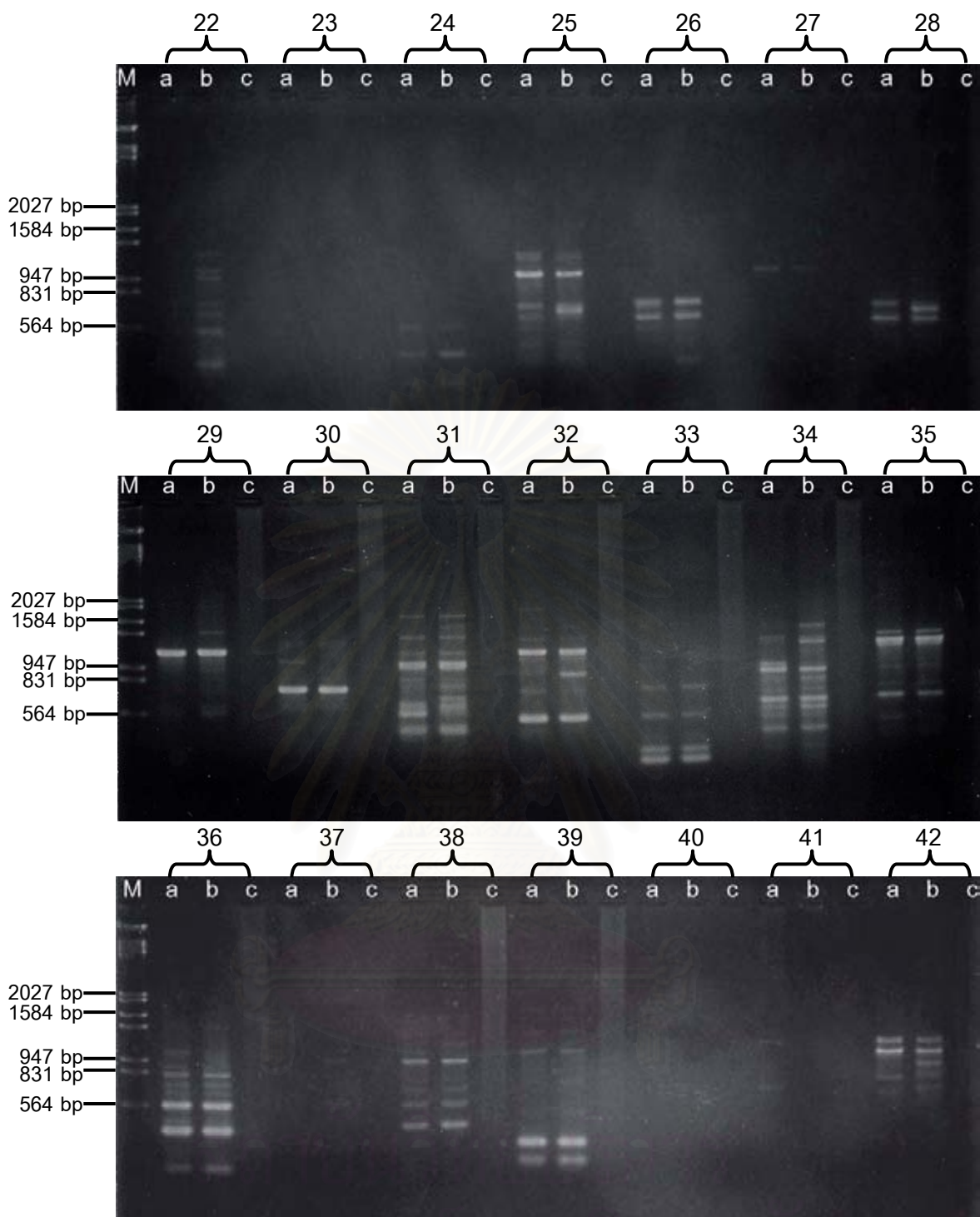
7 = A-17 8 = A-18 9 = A-19 10 = A-20 11 = B-18 12 = B-12

13 = B-13 14 = B-14 15 = B-15 16 = B-16 17 = B-17 18 = B-18

19 = B-19 20 = B-20 21 = C-01

M = marker (Lamda DNA digested with *EcoRI* and *HindIII*)

a = LPT-123 b = LPT123-TC171 c = negative control



รูปที่ 14 รูปแบบของแถบ DNA จากการคัดเลือกไฟรเมอริที่ 22-42 โดยวิธี RAPD

โดย 22 = C-02 23 = C-03 24 = C-04 25 = C-05 26 = C-06 27 = C-07

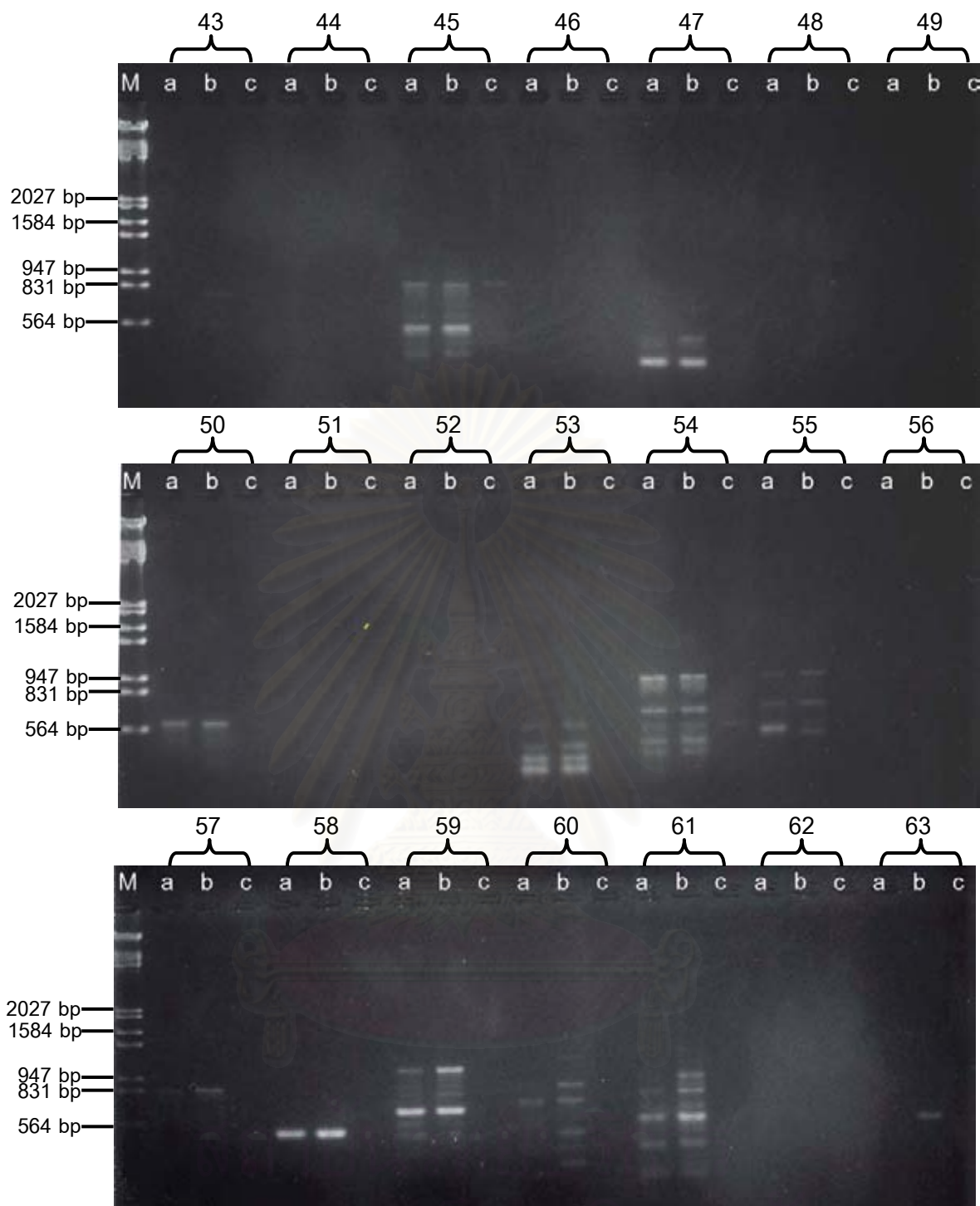
28 = C-08 29 = C-09 30 = C-10 31 = UBC-1 32 = UBC-2

33 = UBC-3 34 = UBC-4 35 = UBC-5 36 = UBC-6 37 = UBC-7

38 = UBC-8 39 = UBC-9 40 = UBC-10 41 = UBC-11 42 = UBC-12

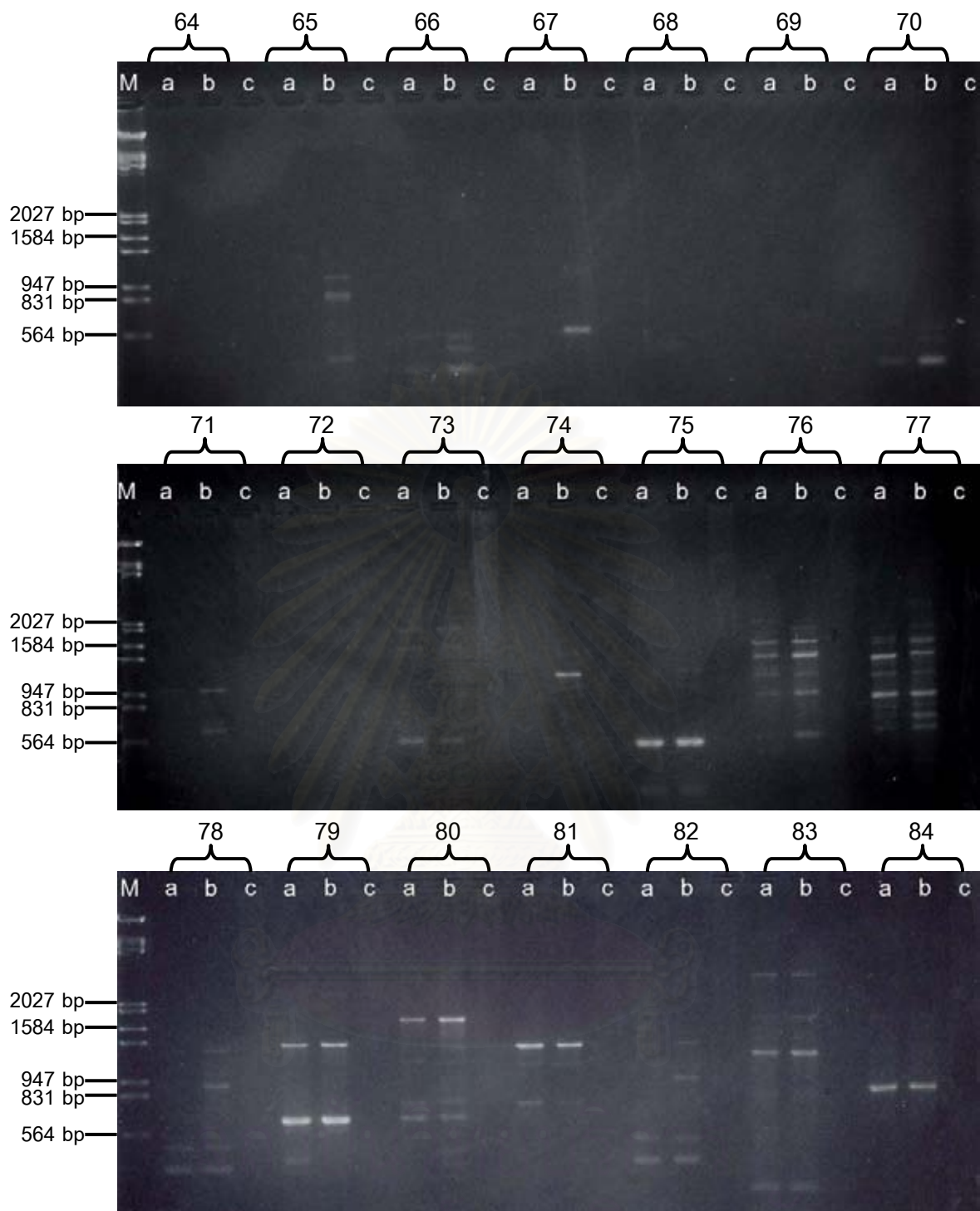
M = marker (Lamda DNA digested with *EcoRI* and *HindIII*)

a = LPT-123 b = LPT123-TC171 c = negative control



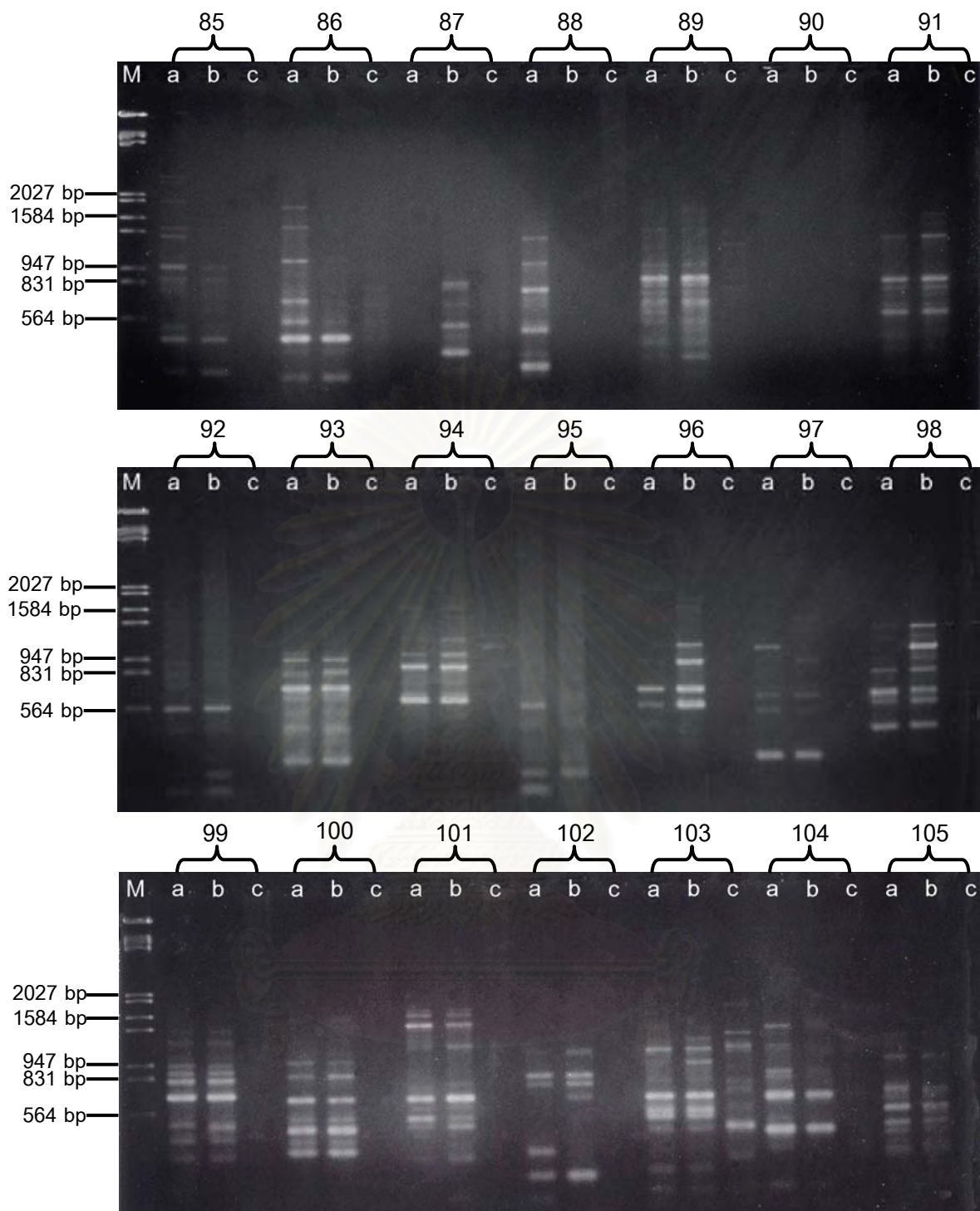
รูปที่ 15 รูปแบบของแถบ DNA จากการคัดเลือกไพรเมอร์ที่ 43-63 โดยวิธี RAPD

โดย 43 = UBC-13 44 = UBC-14 45 = UBC-15 46 = UBC-16 47 = UBC-17
 48 = UBC-18 49 = UBC-20 50 = UBC-21 51 = UBC-22 52 = UBC-23
 53 = UBC-24 54 = UBC-25 55 = UBC-26 56 = UBC-27 57 = UBC-28
 58 = UBC-30 59 = UBC-31 60 = UBC-32 61 = UBC-34 62 = UBC-35
 63 = UBC-36 M = marker (Lamda DNA digested with *EcoRI* and *HindIII*)
 a = LPT-123 b = LPT123-TC171 c = negative control



รูปที่ 16 รูปแบบของแถบ DNA จากการคัดเลือกไพรเมอร์ที่ 64-84 โดยวิธี RAPD

โดย 64 = UBC-37 65 = UBC-38 66 = UBC-39 67 = UBC-40 68 = UBC-41
 69 = UBC-42 70 = UBC-43 71 = UBC-45 72 = UBC-46 73 = UBC-47
 74 = UBC-48 75 = UBC-49 76 = UBC-50 77 = UBC-51 78 = UBC-52
 79 = UBC-54 80 = UBC-55 81 = UBC-57 82 = UBC-58 83 = UBC-59
 84 = UBC-60 M = marker (Lamda DNA digested with *EcoRI* and *HindIII*)
 a = LPT-123 b = LPT123-TC171 c = negative control



รูปที่ 17 รูปแบบของแถบ DNA จากการคัดเลือกไพรเมอร์ที่ 85-105 โดยวิธี RAPD

โดย 85 = UBC-63 86 = UBC-64 87 = UBC-65 88 = UBC-66 89 = UBC-67

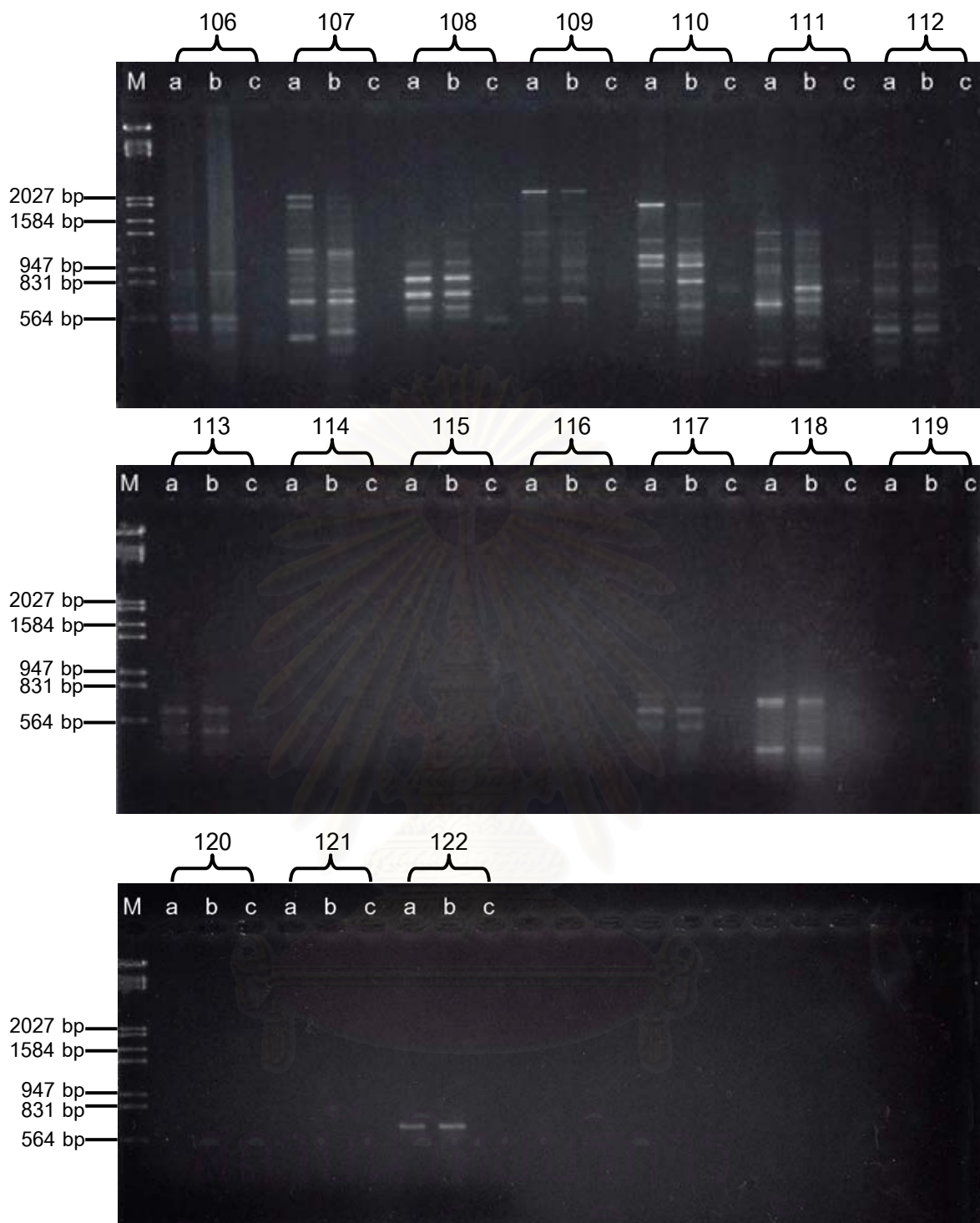
90 = UBC-68 91 = UBC-69 92 = UBC-70 93 = UBC-71 94 = UBC-72

95 = UBC-73 96 = UBC-74 97 = UBC-75 98 = UBC-76 99 = UBC-77

100 = UBC-78 101 = UBC-79 102 = UBC-80 103 = UBC-81 104 = UBC-82

105 = UBC-83 M = marker (Lamda DNA digested with *EcoRI* and *HindIII*)

a = LPT-123 b = LPT123-TC171 c = negative control



รูปที่ 18 รูปแบบของแถบ DNA จากการคัดเลือกไฟรเมอริที่ 106-122 โดยวิธี RAPD

โดย 106 = UBC-84 107 = UBC-85 108 = UBC-86 109 = UBC-87

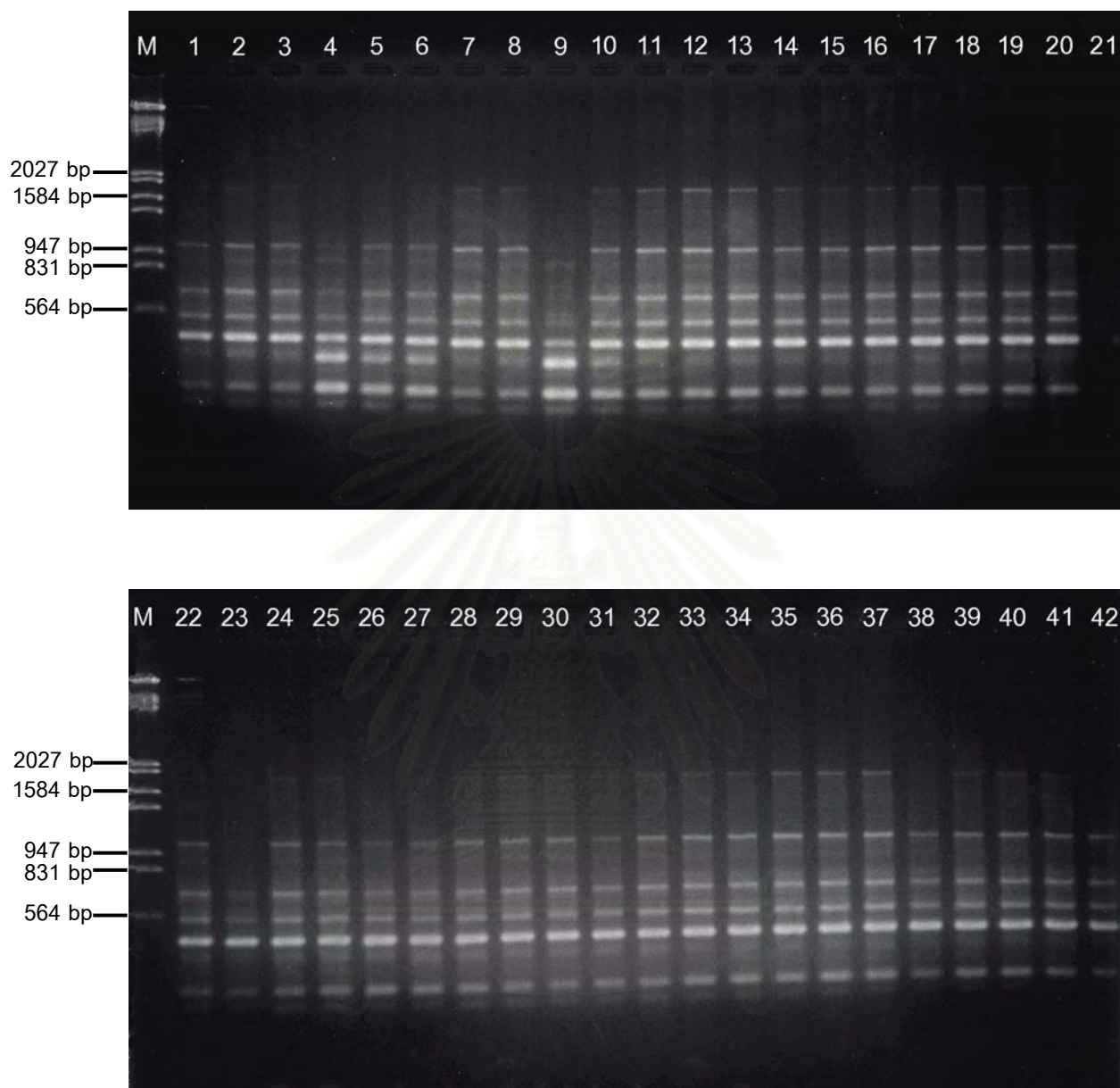
110 = UBC-88 111 = UBC-89 112 = UBC-90 113 = UBC-91

114 = UBC-92 115 = UBC-93 116 = UBC-94 117 = UBC-95

118 = UBC-96 119 = UBC-97 120 = UBC-98 121 = UBC-99

122 = UBC-100 M = marker (Lamda DNA digested with *EcoRI* and *HindIII*)

a = LPT-123 b = LPT123-TC171 c = negative control



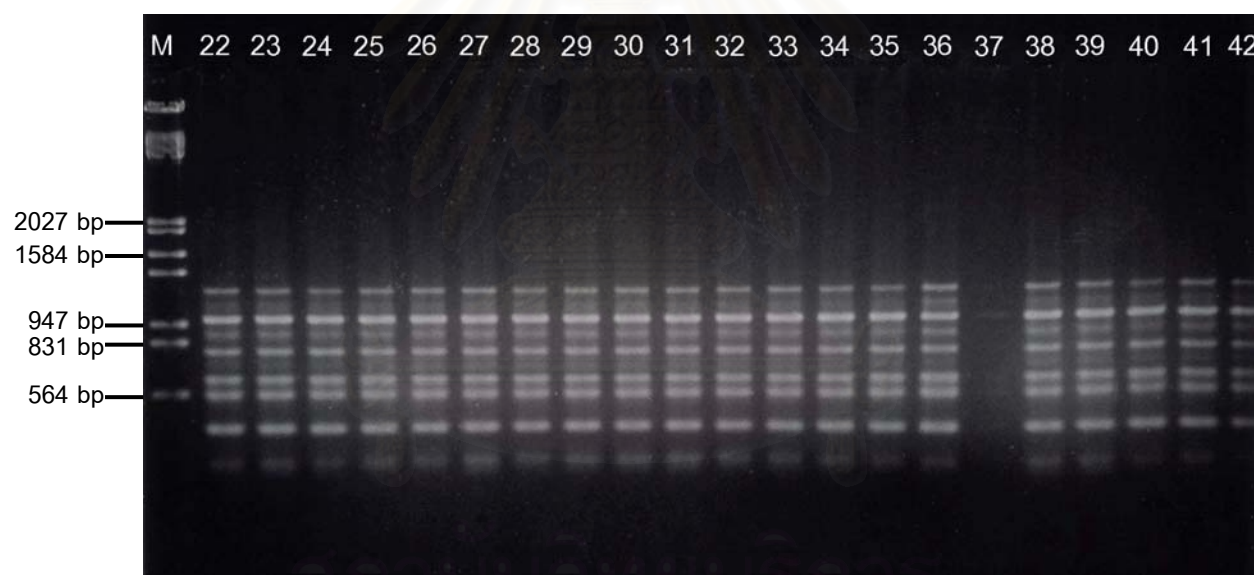
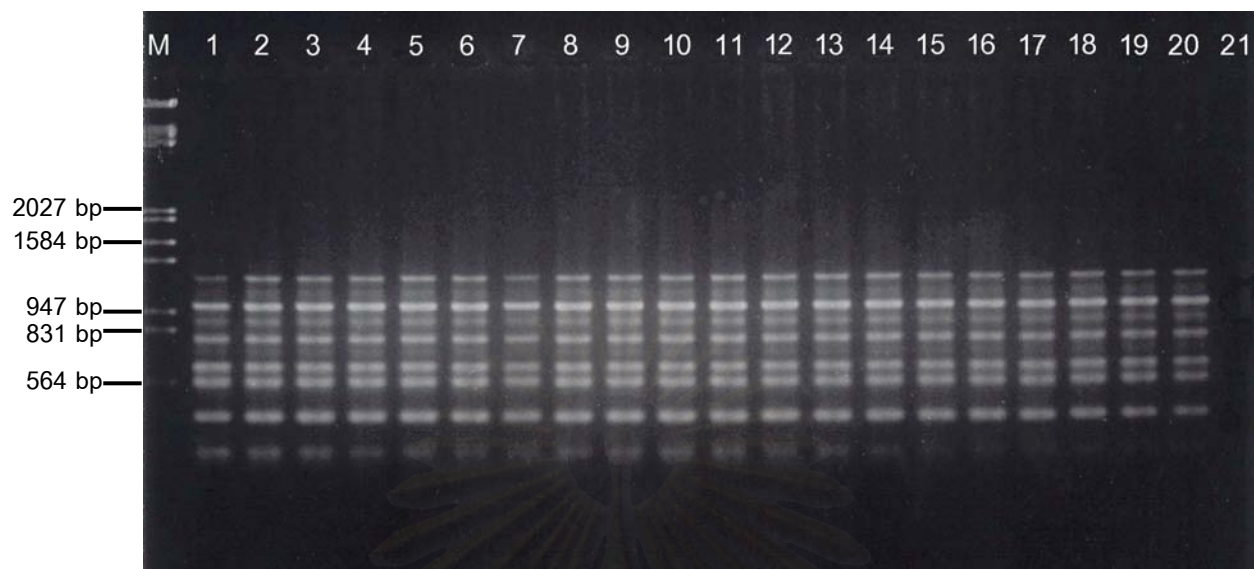
รูปที่ 19 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากวิธี RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ UBC-64

โดย 1-10 = LPT123 No.1-10 11-20 = LPT123-TC171 No.1-10

21 = negative control 22 = LPT123 No.1

23-32 = LPT123 No.11-20 33-42 = LPT123-TC171 No.11-20

M = marker (Lamda DNA digested with *EcoRI* and *HindIII*)



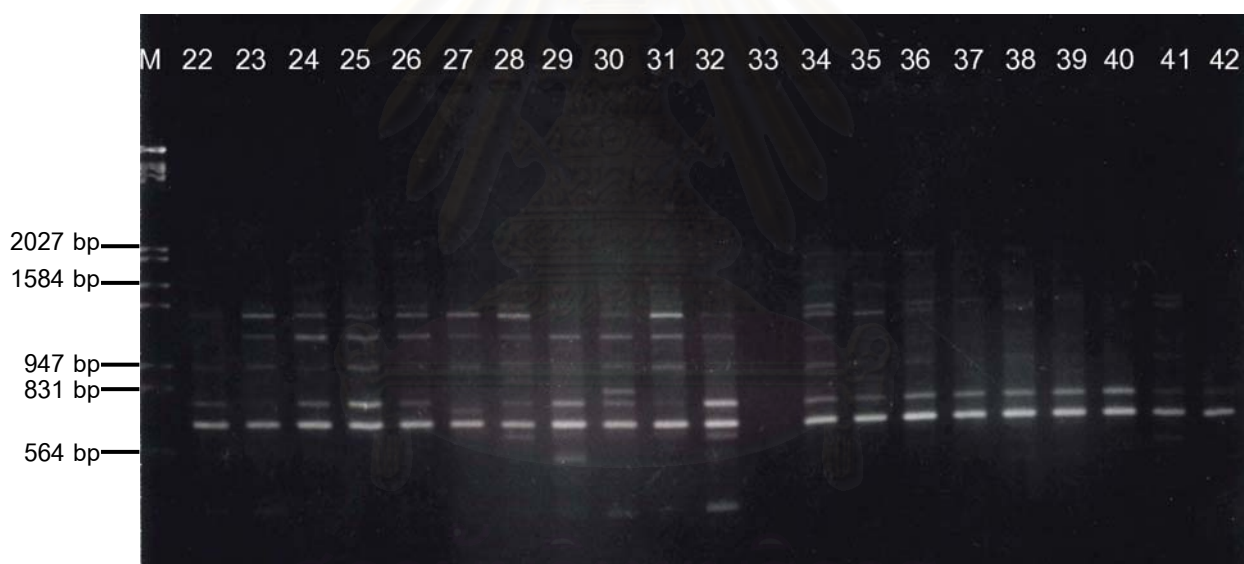
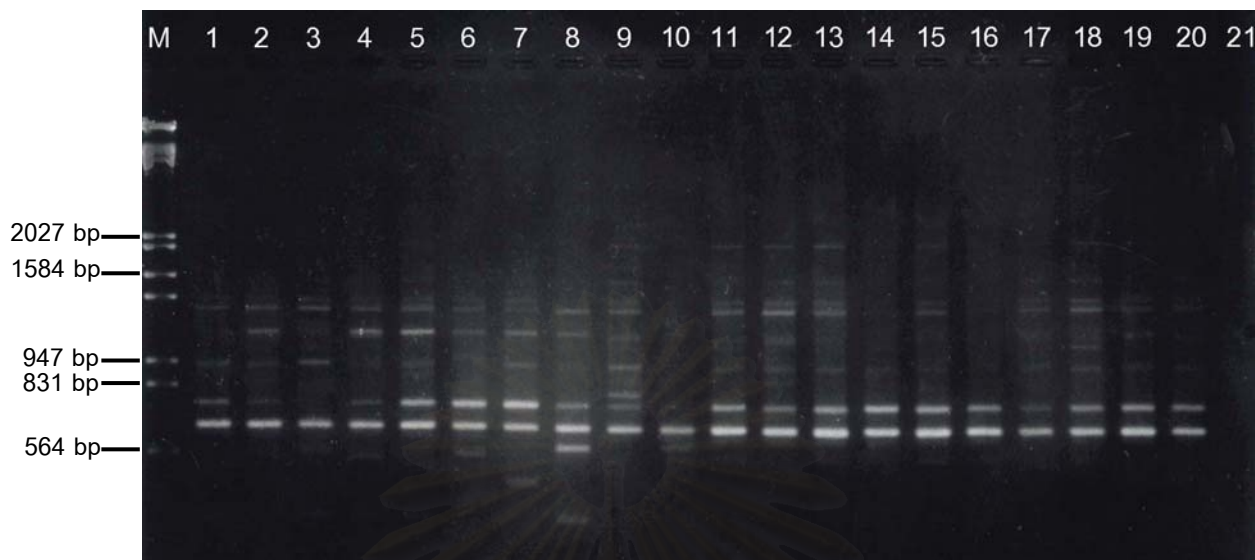
รูปที่ 20 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากวิธี RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ UBC-76

โดย 1-10 = LPT123 No.1-10 11-20 = LPT123-TC171 No.1-10

21 = negative control 22 = LPT123 No.1

23-32 = LPT123 No.11-20 33-42 = LPT123-TC171 No.11-20

M = marker (Lamda DNA digested with *EcoRI* and *HindIII*)



รูปที่ 21 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากวิธี RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ UBC-51

โดย 1-10 = LPT123 No.1-10 11-20 = LPT123-TC171 No.1-10

21 = negative control 22 = LPT123 No.1

23-32 = LPT123 No.11-20 33-42 = LPT123-TC171 No.11-20

M = marker (Lamda DNA digested with *EcoRI* and *HindIII*)



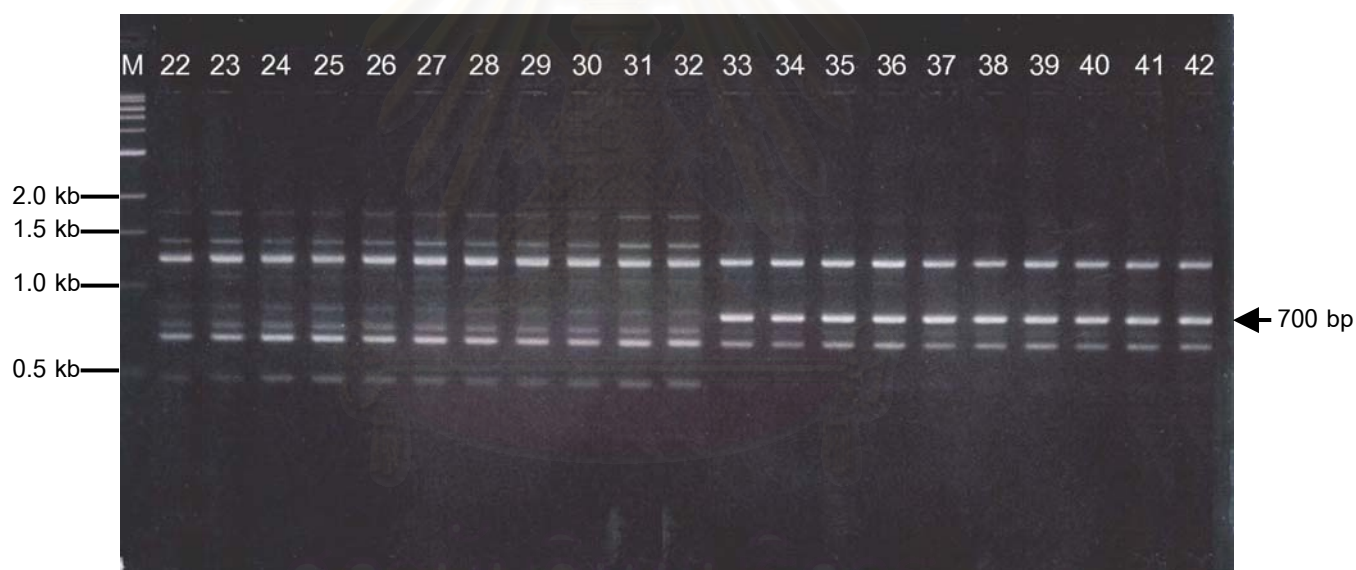
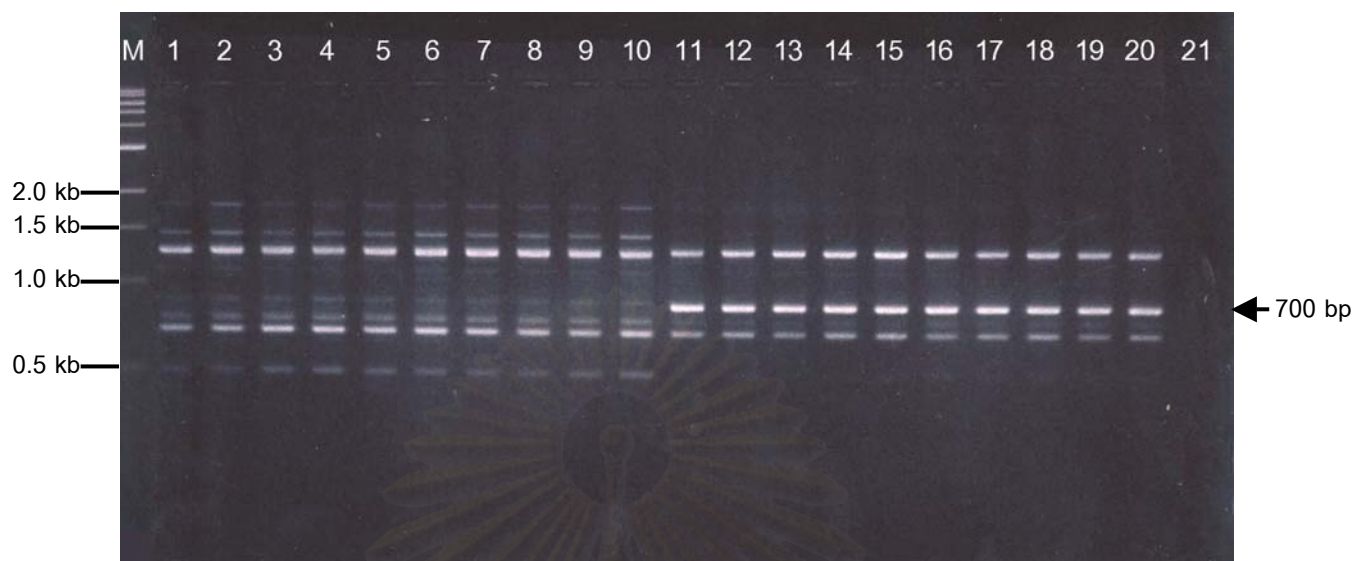
รูปที่ 22 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากวิธี RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ UBC-74

โดย 1-10 = LPT123 No.1-10 11-20 = LPT123-TC171 No.1-10

21 = negative control 22 = LPT123 No.1

23-32 = LPT123 No.11-20 33-42 = LPT123-TC171 No.11-20

M = marker (Lamda DNA digested with *EcoRI* and *HindIII*)



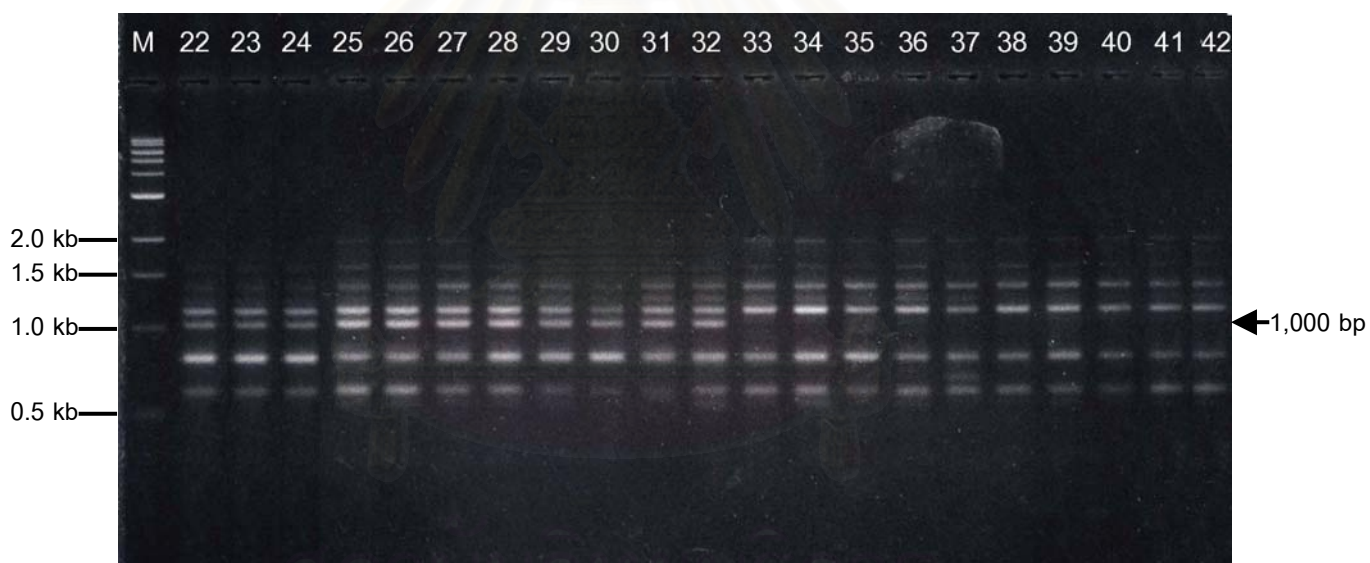
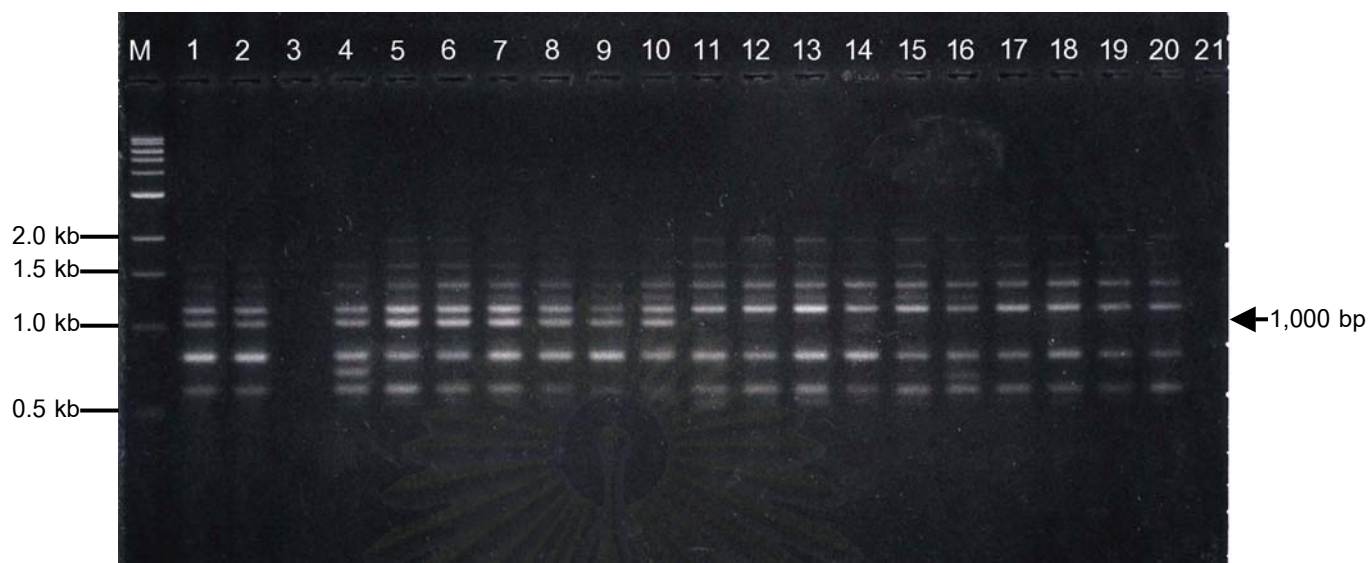
รูปที่ 23 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากวิธี RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A-13

โดย 1-10 = LPT123 No.1-10 11-20 = LPT123-TC171 No.1-10

21 = negative control 22 = LPT123 No.1

23-32 = LPT123 No.11-20 33-42 = LPT123-TC171 No.11-20

M = marker (1 kb ladder)



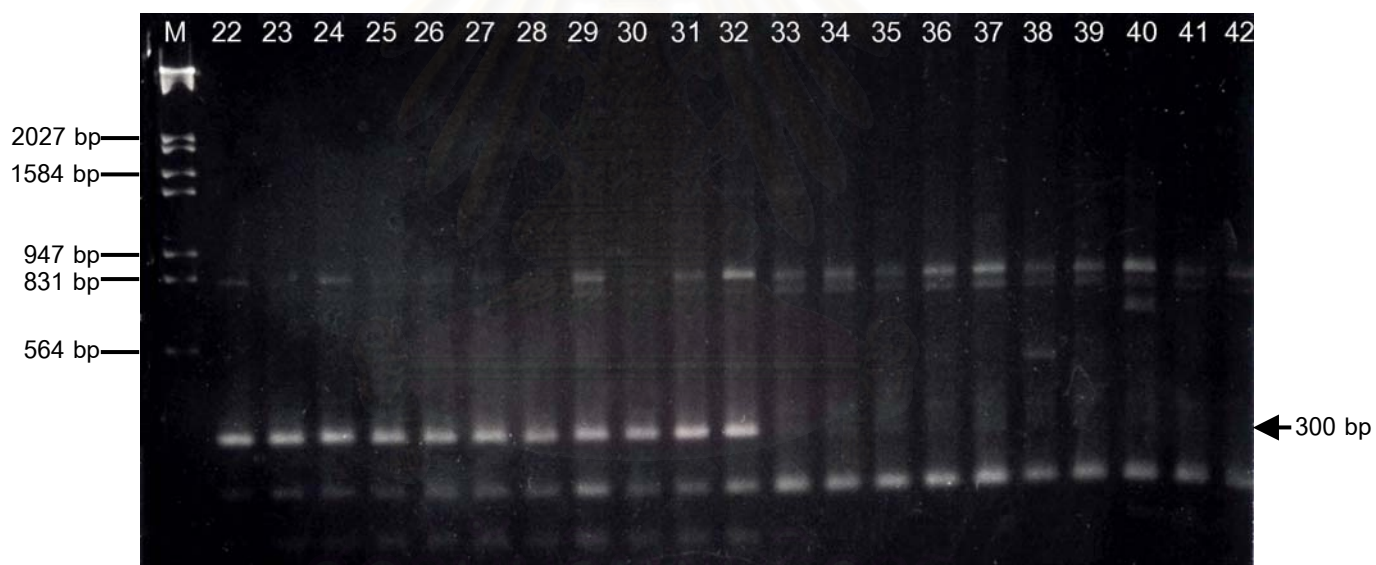
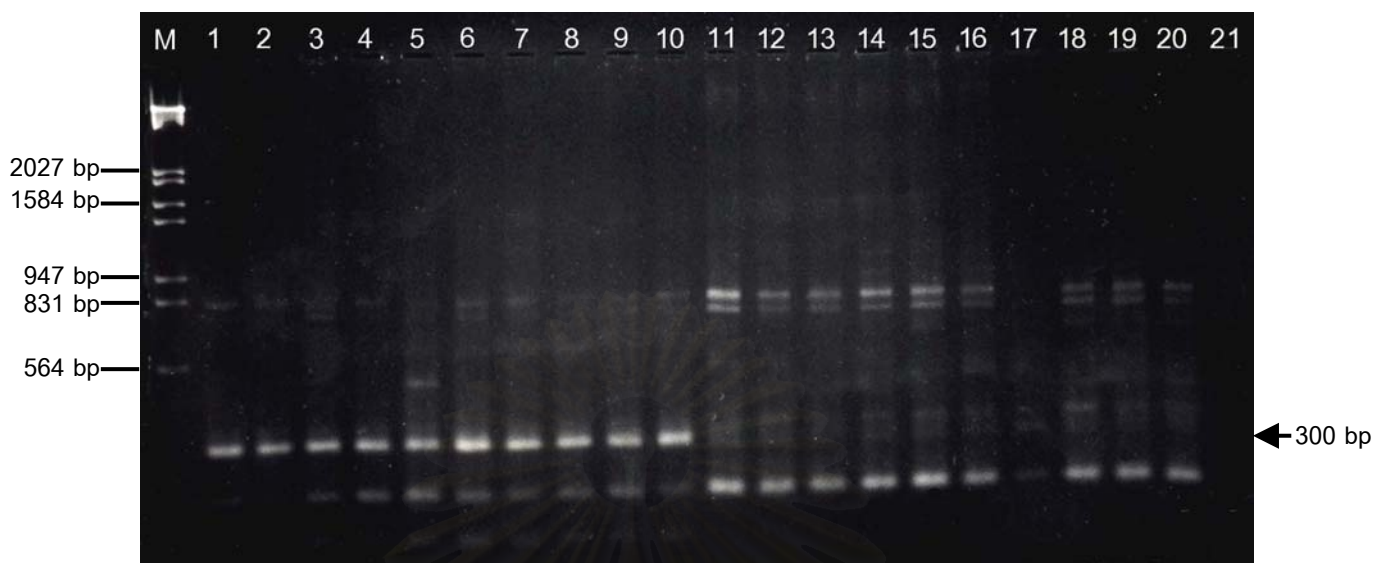
รูปที่ 24 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากวิธี RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ B-18

โดย 1-10 = LPT123 No.1-10 11-20 = LPT123-TC171 No.1-10

21 = negative control 22 = LPT123 No.1

23-32 = LPT123 No.11-20 33-42 = LPT123-TC171 No.11-20

M = marker (1 kb ladder)



รูปที่ 25 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากวิธี RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ UBC-80

โดย 1-10 = LPT123 No.1-10 11-20 = LPT123-TC171 No.1-10

21 = negative control 22 = LPT123 No.1

23-32 = LPT123 No.11-20 33-42 = LPT123-TC171 No.11-20

M = marker (Lamda DNA digested with *EcoRI* and *HindIII*)

3. การโคลนเครื่องหมายทางพันธุกรรม

ทำการโคลนชิ้นส่วนของ DNA ที่แสดง polymorphism ระหว่างข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่ได้จากวิธี RAPD เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ จำนวน 3 fragments คือ 171_A_13, 123_B_18 และ 123_UBC_80 โดยมีรายละเอียดดังนี้

171_A_13 ซึ่งได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ด้วยไพรเมอร์ A-13 มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส ทำการโคลนเครื่องหมายทางพันธุกรรม 171_A_13 โดยใช้ QIAGEN PCR cloning kit (QIAGEN) ซึ่งมี pDrive เป็น DNA พาหะ ผลการ transformation ได้โคโลนีสีฟ้า ประมาณ 50 โคโลนี และ โคโลนีสีขาว จำนวน 20 โคโลนี นำ positive clones (โคโลนีสีขาว) ที่ได้ไปตรวจสอบพบว่า เมื่อนำ plasmid ในแต่ละโคลนมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ซึ่งจะสามารถตรวจสอบขนาดของ inserted fragment ได้โดยเปรียบเทียบ inserted fragment กับเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากวิธี RAPD (รูปที่ 26) ผลปรากฏว่า

- 171_A_13 โคลน หมายเลข 1 ไม่มีชิ้นส่วนของ DNA ที่เป็น insert
- 171_A_13 โคลน หมายเลข 2 และ 3 มีชิ้นส่วนของ DNA ที่เป็น insert ขนาดประมาณ 600 คู่เบส
- 171_A_13 โคลน หมายเลข 4-8, 10-20 มีชิ้นส่วนของ DNA ที่เป็น insert ขนาดประมาณ 700 คู่เบส และมีขนาดเท่ากับ fragment ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากวิธี RAPD

ดังนั้นจึงทำการสุ่มเลือก 171_A_13 หมายเลข 13 เพื่อใช้เป็น probe ในการศึกษาขั้นต่อไป

123_B_18 ซึ่งได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ของข้าวสายพันธุ์เดิม ด้วยไพรเมอร์ B-18 มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส ทำการโคลนเครื่องหมายทางพันธุกรรม 123_B_18 โดยใช้ QIAGEN PCR cloning kit (QIAGEN) ซึ่งมี pDrive เป็น DNA พาหะ ผลการ transformation ได้โคโลนีสีฟ้า ประมาณ 80 โคโลนี และโคโลนีสีขาว จำนวน 28 โคโลนี นำ positive clones (โคโลนีสีขาว) ที่ได้ไปตรวจสอบพบว่า เมื่อนำ plasmid แต่ละโคลนมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ซึ่งจะสามารถตรวจสอบขนาดของ inserted fragment ได้โดยเปรียบเทียบ inserted fragment กับเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากวิธี RAPD (รูปที่ 27-28) ผลปรากฏว่า

- 123_B_18 โคลน หมายเลข 1, 4, 10, 18, 23, 24 ไม่มีชิ้นส่วนของ DNA ที่เป็น insert
- 123_B_18 โคลน หมายเลข 5, 7, 12 มีชิ้นส่วนของ DNA ที่เป็น insert ขนาดประมาณ 300 คู่เบส
- 123_B_18 โคลน หมายเลข 13 มีชิ้นส่วนของ DNA ที่เป็น insert ขนาดประมาณ 400 คู่เบส
- 123_B_18 โคลน หมายเลข 8 และ 9 มีชิ้นส่วนของ DNA ที่เป็น insert ขนาดประมาณ 500 คู่เบส
- 123_B_18 โคลน หมายเลข 2, 3, 6, 11, 17, 19, 20, 21, 27 มีชิ้นส่วนของ DNA ที่เป็น insert ขนาดประมาณ 600 คู่เบส
- 123_B_18 โคลน หมายเลข 15 และ 16 มีชิ้นส่วนของ DNA ที่เป็น insert ขนาดประมาณ 800 คู่เบส
- 123_B_18 โคลน หมายเลข 14, 22, 25, 26, 28 มีชิ้นส่วนของ DNA ที่เป็น insert ขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส และมีขนาดเท่ากับ fragment ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากวิธี RAPD

ดังนั้นจึงทำการสุ่มเลือก 123_B_18 หมายเลข 14 เพื่อใช้เป็น probe ในการศึกษาขั้นต่อไป

123_UBC_80 ซึ่งได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ของข้าวสาลีพันธุ์เดิม ด้วยไพรมเมอร์ UBC-80 มีขนาดประมาณ 300 คู่เบส ทำการโคลนเครื่องหมายทางพันธุกรรม 123_UBC_80 ตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) 123_UBC_80 ที่สกัดแยกได้ถูกนำมาทำให้เป็น blunt end fragment ด้วยเอนไซม์ Klenow Fragment DNA Polymerase I (New England Biolabs, USA) และโคลนเข้าสู่ pBluescript KS+ (Stratagene) เป็น DNA พาหะ ที่ตำแหน่ง *EcoRV* ผลการ transformation ได้โคโลนีสีฟ้าจำนวนมาก ไม่สามารถนับได้ และโคโลนีสีขาว จำนวน 20 โคโลนี นำ positive clones (โคโลนีสีขาว) ที่ได้ไปตรวจสอบพบว่า เมื่อนำ plasmid ในแต่ละโคลนมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* ซึ่งจะสามารถตรวจสอบขนาดของ inserted fragment ได้โดยเปรียบเทียบ inserted fragment กับเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากวิธี RAPD (รูปที่ 29) ผลปรากฏว่า

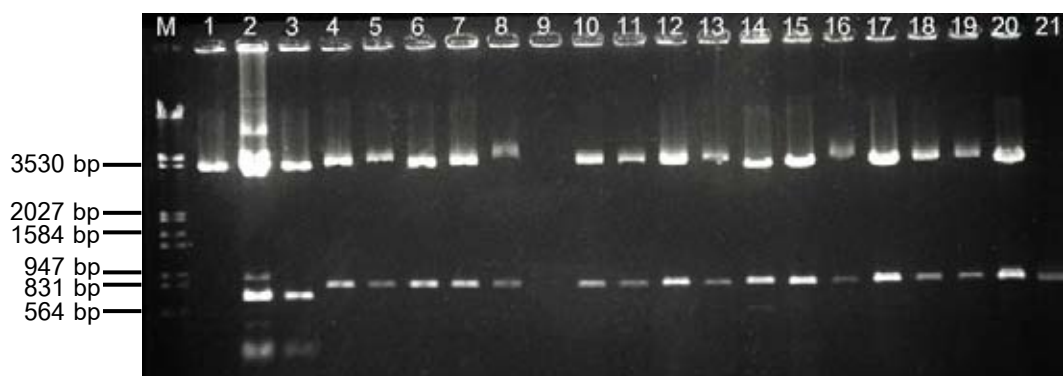
- 123_UBC_80 โคลน หมายเลข 1-17 และ 20 ไม่มีชิ้นส่วนของ DNA ที่เป็น insert

- 123_UBC_80 โคลน หมายเลข 18 และ 19 มีชิ้นส่วนของ DNA ที่เป็น insert ขนาดประมาณ 300 คู่เบส และมีขนาดเท่ากับ fragment ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากวิธี RAPD

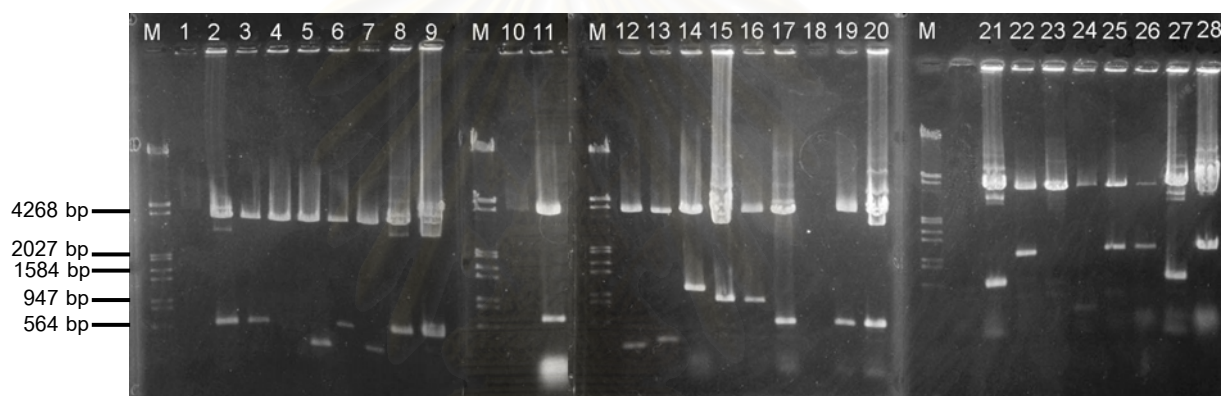
ดังนั้นจึงทำการสุ่มเลือก 123_UBC_80 หมายเลข 18 เพื่อใช้เป็น probe ในการศึกษาขั้นต่อไป



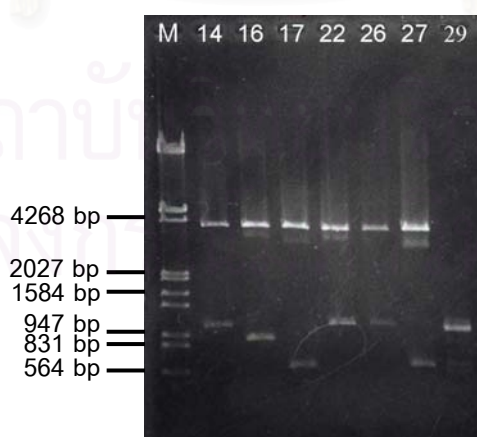
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



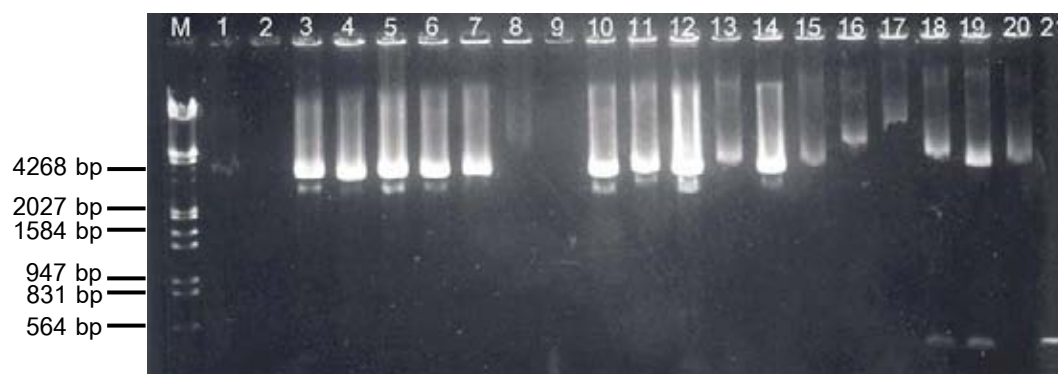
รูปที่ 26 การตรวจสอบขนาดของเครื่องหมายทางพันธุกรรม 171_A_13 ที่โคลนได้ (เลขที่ 2-8, 10-20) กับ fragment ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากวิธี RAPD (เลขที่ 21)
M = marker (Lamda DNA digested with *EcoRI* and *HindIII*)



รูปที่ 27 การตรวจสอบขนาดของเครื่องหมายทางพันธุกรรม 123_B_18 ที่โคลนได้ (เลขที่ 1-28)
M = marker (Lamda DNA digested with *EcoRI* and *HindIII*)



รูปที่ 28 การตรวจสอบขนาดของเครื่องหมายทางพันธุกรรม 123_B_18 ที่โคลนได้ (เลขที่ 14, 16, 17, 22, 26, 27) กับ fragment ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากวิธี RAPD (เลขที่ 29) M = marker (Lamda DNA digested with *EcoRI* and *HindIII*)



รูปที่ 29 การตรวจสอบขนาดของเครื่องหมายทางพันธุกรรม 123_UBC_80 ที่โคลนได้ (เลนที่ 18-19) กับ fragment ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากวิธี RAPD (เลนที่ 21) M = marker (Lamda DNA digested with *EcoRI* and *HindIII*)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การศึกษาความเกี่ยวข้องของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จาก RAPD กับการแสดงออกของยีนในภาวะแล้งและภาวะเค็ม

4.1 การศึกษาจำนวนชุดของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จาก RAPD โดยวิธี

Southern blot analysis

จากการศึกษาจำนวนชุดของเครื่องหมายทางพันธุกรรมในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ด้วยวิธี Southern blot analysis โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่โคลนได้ จำนวน 3 fragments คือ 171_A_13 โคลน หมายเลข 13 (171_A_13_13), 123_B_18 โคลน หมายเลข 14 (123_B_18_14) และ 123_UBC_80 โคลน หมายเลข 18 (123_UBC_18_18) เป็น probe ผลปรากฏโดยมีรายละเอียดดังนี้

171_A_13_13 เป็น probe พบแถบ DNA จำนวนมาก ไม่สามารถนับแถบ DNA ได้ และแถบ DNA ที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ (รูปที่ 30)

123_B_18_14 เป็น probe ปรากฏแถบ DNA ในแต่ละสายพันธุ์ จำนวน 19 แถบ และไม่มีความแตกต่างกันระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* แต่ในการตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ปรากฏแถบ DNA ในแต่ละสายพันธุ์ จำนวน 22 แถบ โดยพบแถบ DNA ขนาด 1.6 กิโลเบส พบปรากฏในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 แต่ไม่พบในข้าวสายพันธุ์เดิม (รูปที่ 31 แถบที่ F) และพบว่าแถบ DNA ระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์บางแถบ DNA มีขนาดแตกต่างกัน ดังสรุปในตารางที่ 14 โดยแถบ DNA ของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 จะมีขนาดใหญ่กว่าข้าวสายพันธุ์เดิมเล็กน้อย (รูปที่ 31 แถบที่ A, B, C, D, E, G) ส่วนในการตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* ปรากฏแถบ DNA ในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 จำนวน 19 แถบ และในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 จำนวน 18 แถบ โดยพบแถบ DNA ขนาด 4.4 กิโลเบส ปรากฏในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 แต่ไม่พบในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 (รูปที่ 31 แถบที่ A)

123_UBC_80_18 เป็น probe เมื่อตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ปรากฏแถบ DNA ในแต่ละสายพันธุ์ จำนวน 5 แถบ และพบแถบ DNA ระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในบางแถบ DNA มีขนาดแตกต่างกัน โดยแถบ DNA ของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 จะมีขนาดใหญ่กว่าข้าวสายพันธุ์เดิมเล็กน้อย โดยแถบที่ A ในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีขนาด 4.9 กิโลเบส ในขณะที่ข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 มีขนาด 4.7 กิโลเบส และแถบที่ B ในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีขนาด 3.9 กิโลเบส ในขณะที่ข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 มีขนาด 3.8 กิโลเบส และในการตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

*Hind*III ปรากฏแถบ DNA ในแต่ละสายพันธุ์ จำนวน 5 แถบ และพบแถบ DNA ระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในบางแถบ DNA มีขนาดแตกต่างกัน โดยแถบ DNA ของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 จะมีขนาดใหญ่กว่าข้าวสายพันธุ์เดิม โดยแถบที่ A ในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีขนาด 6.8 กิโลเบส ในขณะที่ข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 มีขนาด 6.5 กิโลเบส และแถบที่ B ในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีขนาด 4.7 กิโลเบส ในขณะที่ข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 มีขนาด 4.5 กิโลเบส ส่วนในการตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ปรากฏแถบ DNA ในแต่ละสายพันธุ์ จำนวน 4 แถบ และไม่มี ความแตกต่างกันระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ (ตารางที่ 15, รูปที่ 32)

4.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ โดยวิธี Northern blot analysis

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ด้วยวิธี Northern blot analysis โดย probe ด้วยเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่โคลนได้ จำนวน 3 fragments คือ 171_A_13_13, 123_B_18_14 และ 123_UBC_80_18 ผลการทดลองพบว่าไม่ปรากฏแถบขึ้นในทุกระยะของการทดลองในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ดังรูปที่ 33-39

ตารางที่ 14 ขนาดของแถบ DNA ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) จากการทำ Southern blot analysis โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม 123_B_18_14 เป็น probe

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	แถบ DNA ที่	ขนาดโดยประมาณที่ปรากฏใน LPT123 (kb) *	ขนาดโดยประมาณที่ปรากฏใน LPT123-TC171 (kb) *
<i>Hind</i> III	A	4.2	4.4
	B	3.4	3.6
	C	3.1	3.2
	D	2.6	2.7
	E	2.3	2.4
	F	-	1.6
	G	1.3	1.4
<i>Bam</i> HI	A	4.4	-

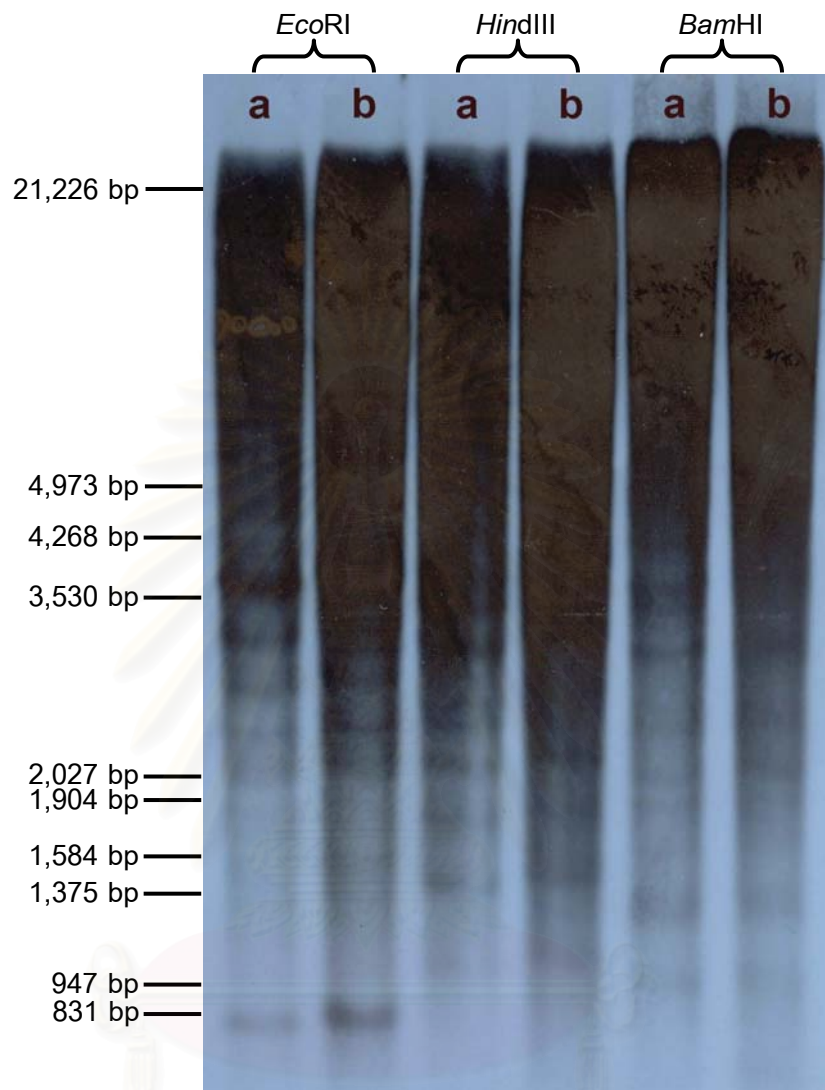
* คำนวณโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ของ DNA marker

ตารางที่ 15 ขนาดของจำนวนแถบ DNA ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) จากการทำ Southern blot analysis โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม 123_UBC_80_18 เป็น probe

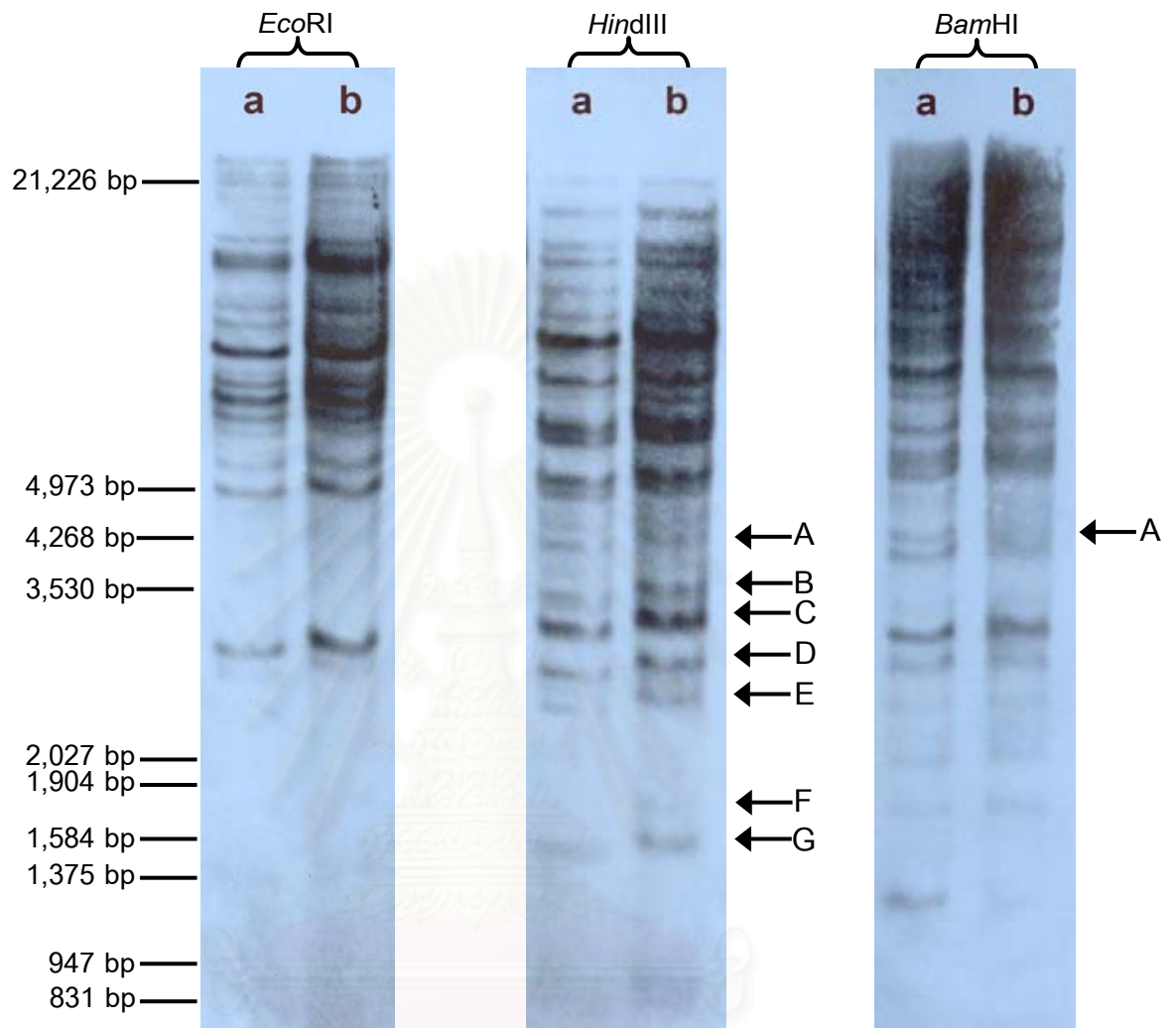
เอนไซม์ตัดจำเพาะ	แถบ DNA ที่	ขนาดโดยประมาณที่ปรากฏใน LPT123 (kb) *	ขนาดโดยประมาณที่ปรากฏใน LPT123-TC171 (kb) *
<i>EcoRI</i>	A	13.7	13.7
	B	11.3	11.3
	C	10.4	10.4
	D	4.7	4.9
	E	3.8	3.9
<i>HindIII</i>	A	13.7	13.7
	B	10.4	10.4
	C	8.3	8.3
	D	6.5	6.8
	E	4.5	4.7
<i>BamHI</i>	A	10.4	10.4
	B	7.1	7.1
	C	6.1	6.1
	D	4.5	4.5

* คำนวณโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ของ DNA marker

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

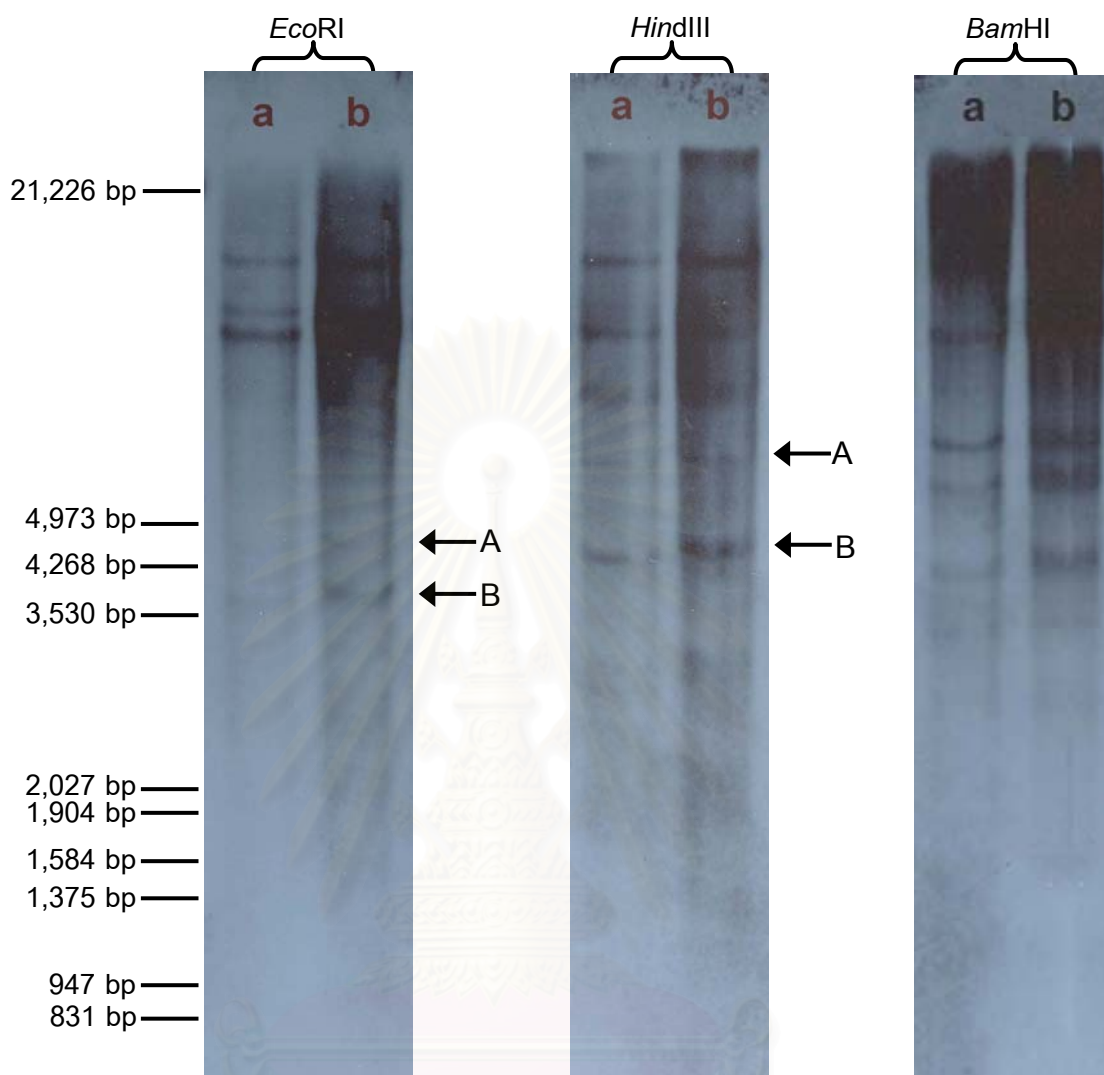


รูปที่ 30 Southern blot analysis ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม 171_A_13_13 เป็น probe โดย a = LPT123 b = LPT123-TC171

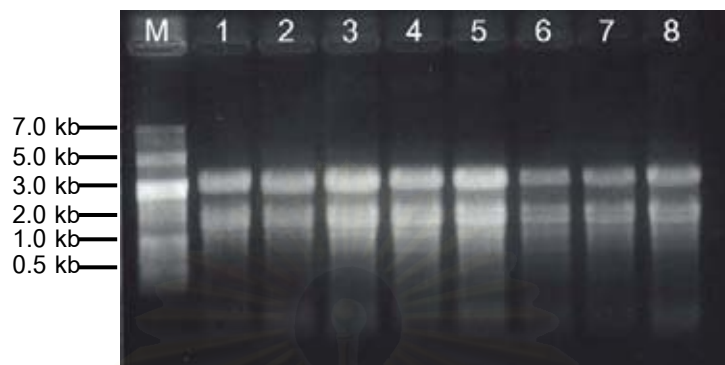


รูปที่ 31 Southern blot analysis ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม 123_B_18_14 เป็น probe โดย a = LPT123 b = LPT123-TC171

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 32 Southern blot analysis ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม 123_UBC_80_18 เป็น probe โดย a = LPT123 b = LPT123-TC171



รูปที่ 33 รูปแบบของ total RNA ที่สกัดจากข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 ที่ได้รับภาวะปกติและภาวะเค็ม (NaCl 0.3 %) ในช่วงเวลาต่างๆ เมื่อแยกด้วย 1% formaldehyde-agarose gel โดย เลน M = RNA ladder

1 = LPT123 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 0 วัน

2 = LPT123 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 0 วัน

3 = LPT123 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 1 ชั่วโมง

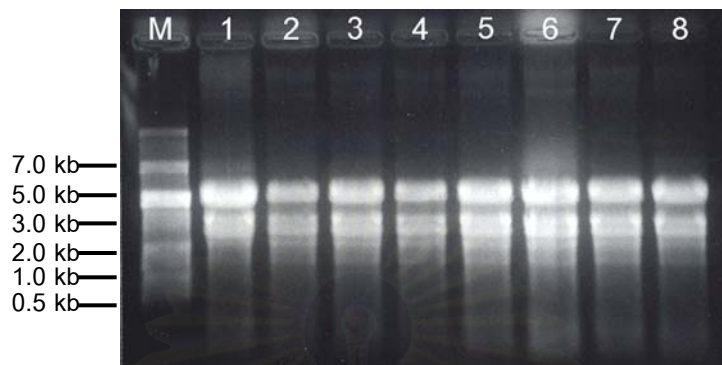
4 = LPT123 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5 = LPT123 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 3 ชั่วโมง

6 = LPT123 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

7 = LPT123 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 6 ชั่วโมง

8 = LPT123 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

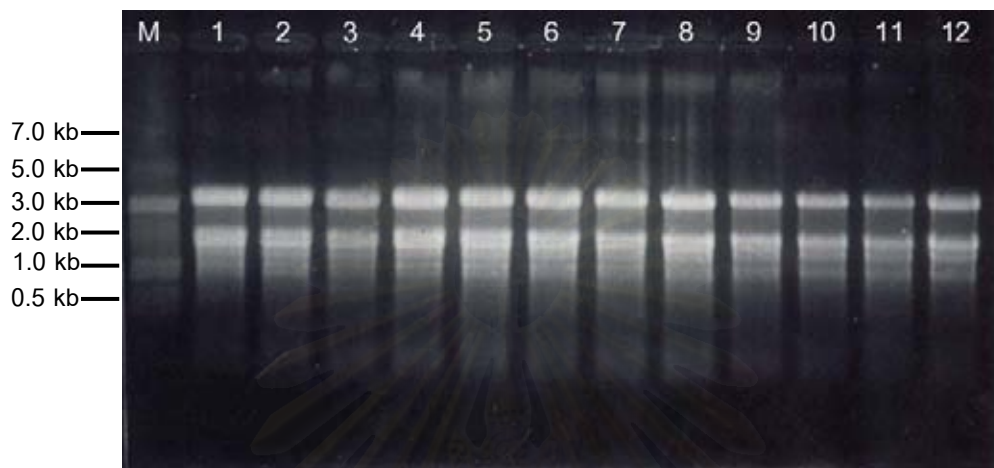


รูปที่ 34 รูปแบบของ total RNA ที่สกัดจากข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ที่ได้รับภาวะปกติและภาวะเค็ม (NaCl 0.3 %) ในช่วงเวลาต่างๆ เมื่อแยกด้วย 1% formaldehyde-agarose gel

โดย เลน M = RNA ladder

- 1 = LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 0 วัน
- 2 = LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 0 วัน
- 3 = LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 1 ชั่วโมง
- 4 = LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 5 = LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 3 ชั่วโมง
- 6 = LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- 7 = LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 6 ชั่วโมง
- 8 = LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

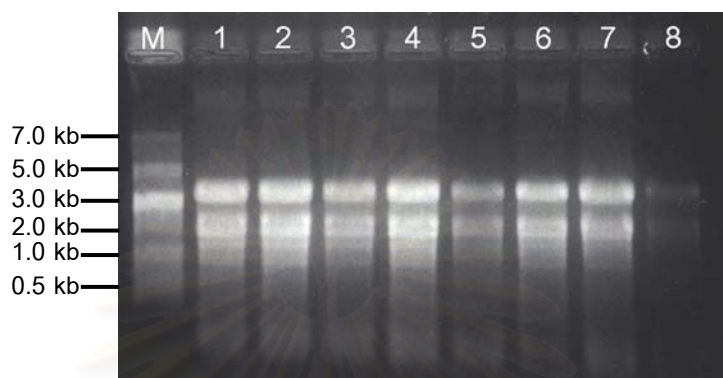
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 35 รูปแบบของ total RNA ที่สกัดจากข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และข้าวพันธุ์เหลืองประทิว สายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ที่ได้รับภาวะปกติและภาวะแล้ง (PEG 6000) ในช่วงเวลาต่างๆ เมื่อแยกด้วย 1% formaldehyde-agarose gel

โดย เลข M = RNA ladder

- 1 = LPT123 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 12 ชั่วโมง
- 2 = LPT123 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
- 3 = LPT123 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 24 ชั่วโมง
- 4 = LPT123 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 5 = LPT123 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 48 ชั่วโมง
- 6 = LPT123 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- 7 = LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 12 ชั่วโมง
- 8 = LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
- 9 = LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 24 ชั่วโมง
- 10 = LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 11 = LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 48 ชั่วโมง
- 12 = LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 36 รูปแบบของ total RNA ที่สกัดจากข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และข้าวพันธุ์เหลืองประทิว สายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ที่ได้รับภาวะปกติและภาวะเค็ม (NaCl 0.3 %) ในช่วงเวลาต่างๆ เมื่อแยกด้วย 1% formaldehyde-agarose gel

โดย เลน M = RNA ladder

1 = LPT123 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 0 วัน

2 = LPT123 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 0 วัน

3 = LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 0 วัน

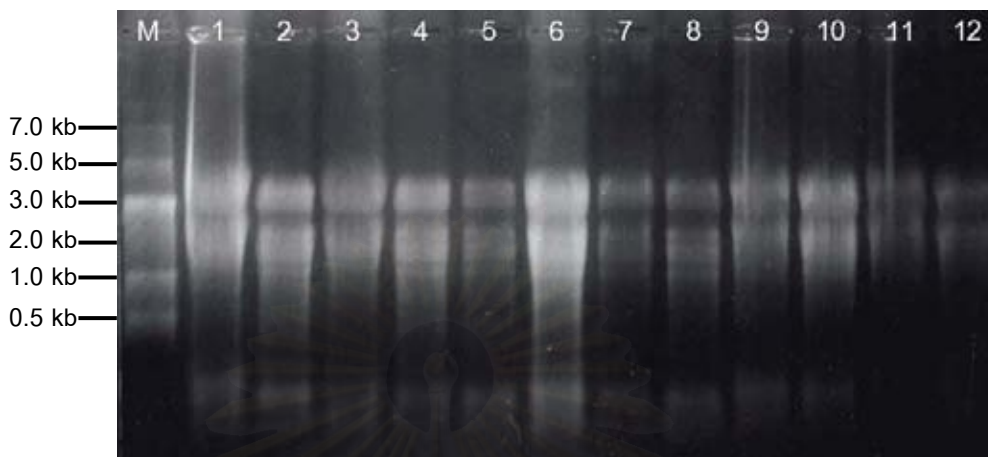
4 = LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 0 วัน

5 = LPT123 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 1 อาทิตย์

6 = LPT123 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 1 อาทิตย์

7 = LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 1 อาทิตย์

8 = LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 1 อาทิตย์



รูปที่ 37 รูปแบบของ total RNA ที่สกัดจากข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และข้าวพันธุ์เหลืองประทิว สายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ที่ได้รับภาวะปกติและภาวะเค็ม (NaCl 0.3%) ในช่วงเวลาต่างๆ เมื่อแยกด้วย 1% formaldehyde-agarose gel โดย

เลน M = RNA ladder

1 = LPT123 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 2 อาทิตย์

2 = LPT123 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 2 อาทิตย์

3 = LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 2 อาทิตย์

4 = LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะเค็ม เป็นเวลา 2 อาทิตย์

5 = LPT123 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 1 วัน

6 = LPT123 สิ้นสุดการให้ภาวะเค็มและเจริญในภาวะปกติ เป็นเวลา 1 วัน

7 = LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 1 วัน

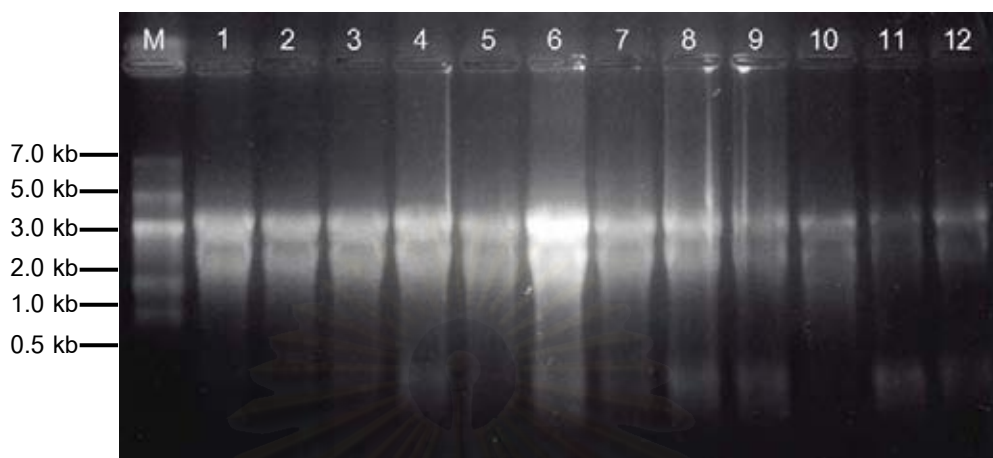
8 = LPT123-TC171 สิ้นสุดการให้ภาวะเค็มและเจริญในภาวะปกติ เป็นเวลา 1 วัน

9 = LPT123 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 3 วัน

10 = LPT123 สิ้นสุดการให้ภาวะเค็มและเจริญในภาวะปกติ เป็นเวลา 3 วัน

11 = LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 3 วัน

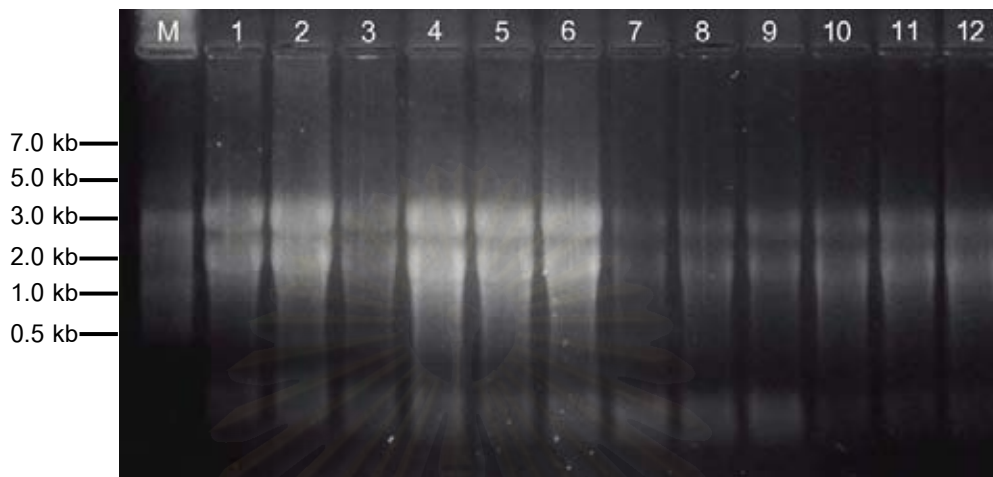
12 = LPT123-TC171 สิ้นสุดการให้ภาวะเค็มและเจริญในภาวะปกติ เป็นเวลา 3 วัน



รูปที่ 38 รูปแบบของ total RNA ที่สกัดจากข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และข้าวพันธุ์เหลืองประทิว สายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ที่ได้รับภาวะปกติและภาวะแล้ง (PEG 6000) ในช่วงเวลาต่างๆ เมื่อแยกด้วย 1% formaldehyde-agarose gel

โดย เลน M = RNA ladder

- 1 = LPT123 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 0 วัน
- 2 = LPT123 ที่ได้รับภาวะแล้ง เป็นเวลา 0 วัน
- 3 = LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 0 วัน
- 4 = LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะแล้ง เป็นเวลา 0 วัน
- 5 = LPT123 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 3 วัน
- 6 = LPT123 ที่ได้รับภาวะแล้ง เป็นเวลา 3 วัน
- 7 = LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 3 วัน
- 8 = LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะแล้ง เป็นเวลา 3 วัน
- 9 = LPT123 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 5 วัน
- 10 = LPT123 ที่ได้รับภาวะแล้ง เป็นเวลา 5 วัน
- 11 = LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 5 วัน
- 12 = LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะแล้ง เป็นเวลา 5 วัน



รูปที่ 39 รูปแบบของ total RNA ที่สกัดจากข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และข้าวพันธุ์เหลืองประทิว สายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ที่ได้รับภาวะปกติและภาวะแล้ง (PEG 6000) ในช่วงเวลาต่างๆ เมื่อแยกด้วย 1% formaldehyde-agarose gel

โดย เลข M = RNA ladder

- 1 = LPT123 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 1 สัปดาห์
- 2 = LPT123 ที่ได้รับภาวะแล้ง เป็นเวลา 1 สัปดาห์
- 3 = LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 1 สัปดาห์
- 4 = LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะแล้ง เป็นเวลา 1 สัปดาห์
- 5 = LPT123 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 2 สัปดาห์
- 6 = LPT123 ที่ได้รับภาวะแล้ง เป็นเวลา 2 สัปดาห์
- 7 = LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 2 สัปดาห์
- 8 = LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะแล้ง เป็นเวลา 2 สัปดาห์
- 9 = LPT123 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 3 สัปดาห์
- 10 = LPT123 ที่ได้รับภาวะแล้ง เป็นเวลา 3 สัปดาห์
- 11 = LPT123-TC171 ที่เจริญในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) ที่เวลา 3 สัปดาห์
- 12 = LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะแล้ง เป็นเวลา 3 สัปดาห์

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

1. การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง

1.1 การศึกษาภาวะแล้งที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง

ศึกษาความเข้มข้นของ PEG 6000 ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดลอง โดยปลูกข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ในภาวะแล้งที่ความเข้มข้น 0 150 200 250 และ 300 g/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายปลูกให้เจริญในภาวะปกติซึ่งไม่มี PEG 6000 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 แสดงความสามารถในการทนแล้งได้ดีกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างเห็นได้ชัดที่ความเข้มข้น 200 g/l โดยมีความแตกต่างของอัตราการรอดตายของข้าวทั้งสองสายพันธุ์สูงที่สุดถึง 29 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้นของ PEG 6000 ที่ 200 g/l มีจำนวนต้นข้าวที่เหลือรอดมากพอที่จะใช้ในการศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ต่อไป

ในส่วนของการทดลองการศึกษาระดับที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดลอง ไม่ได้ใช้สถิติในการวิเคราะห์ผลการทดลอง เนื่องจากความจำกัดในเรื่องเมล็ดข้าวของสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 สำหรับใช้ในการทดลองมีไม่มากนัก จึงทำให้ไม่สามารถทำการทดลองหลายซ้ำเพื่อนำผลไปวิเคราะห์ทางสถิติได้

1.2 การเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่ 10 และรุ่นที่ 11 ในภาวะแล้ง

ในการศึกษาความสามารถในการทนแล้งของข้าวเหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ในรุ่นที่ 10 และ 11 โดยการวัดความสูง ความยาวราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นและราก เมื่อได้รับภาวะแล้ง โดยใช้ PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และสิ้นสุดการให้ภาวะแล้งโดยย้ายปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่ไม่มี PEG 6000 เพื่อให้ต้นข้าวเจริญเติบโตในภาวะปกติเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีความสามารถในการทนแล้งได้ โดยมีการเจริญเติบโตทางด้านความสูง น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นและรากแตกต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิมที่ได้รับภาวะแล้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีความสามารถทนต่อภาวะแล้งได้ อาจเนื่องมาจากกลุ่มยีนที่แสดงออกเมื่อข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ได้รับภาวะแล้งและภาวะเค็มมีความเกี่ยวข้องกันหรืออาจเป็นยีนในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ในงานวิจัยของ Seki และคณะ (2002) ได้จัดกลุ่มยีนของ Arabidopsis ที่แสดงออกในภาวะแล้งและภาวะเค็มที่ได้จากเทคนิค microarray พบยีนที่ถูกชักนำให้แสดงออกได้ในภาวะแล้งหรือภาวะเค็มมี overlapping กัน จำนวน 101 ยีน ซึ่งมาจากยีนที่ถูกชักนำให้แสดงออกในภาวะแล้ง จำนวน 277 ยีนและมาจากยีนที่ถูกชักนำให้แสดงออกได้ด้วยภาวะเค็ม จำนวน 194 ยีน

ในการศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในภาวะแล้ง จะเห็นว่าความยาวรากที่วัดได้ในแต่ละสัปดาห์มีความผันแปรค่อนข้างสูง ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการสุ่มเก็บตัวอย่างของข้าวไม่ได้ใช้ต้นข้าวต้นเดิมเพราะต้องใช้ในการวัดน้ำหนักแห้ง จึงต้องทำการสุ่มเก็บตัวอย่างโดยใช้ข้าวต้นใหม่ในแต่ละสัปดาห์ และการเก็บตัวอย่างข้าวอาจใช้จำนวนไม่มากพอ

ความยาวรากของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งรากมากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องมาจากข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 อาจเกิดการแปรทางพันธุกรรมโดยส่งผลต่อ anatomy ของราก เช่น อาจมีจำนวนรากฝอยเพิ่มมากขึ้น ทำให้ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ตั้งตัวได้เร็วก่อนที่ความแล้งจะมีผลต่อ phenotype ของต้นกล้า

จากผลการเจริญเติบโตทางด้านความสูง น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นและรากของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ในรุ่นที่11 มีแนวโน้มที่จะทนต่อภาวะแล้งได้ดีกว่าในรุ่นที่ 10 โดยพบว่าความสูง น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นและรากของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่ 11 แตกต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิม เมื่อได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่10 มีความสูง น้ำหนักสดต้นและรากแตกต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิมหลังจากได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และมีน้ำหนักแห้งของต้นและรากแตกต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิมหลังจากได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ อาจเป็นเพราะข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่11 ผ่านการคัดเลือกภายใต้ภาวะแล้งมาแล้ว 1 ชั่วโมง ทำให้มีโอกาสได้ลักษณะทนแล้งที่ดีกว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่ 10 จึงทำให้ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 รุ่นที่11 มีแนวโน้มที่จะทนต่อภาวะแล้งได้ดีกว่ารุ่นที่ 10

2. การศึกษาการแปรทางพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์เดิม โดยวิธี RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

จากผลการคัดเลือกไพรมอร์ จำนวน 122 ไพรมอร์ พบไพรมอร์ จำนวน 27 ไพรมอร์ ซึ่งคาดว่าน่าจะแสดงให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ได้ และเมื่อนำไพรมอร์ที่ผ่านการคัดเลือกมาใช้ในการตรวจสอบรูปแบบของแถบ DNA โดยวิธี RAPD โดยใช้ข้าวสายพันธุ์ละ 20 ต้น พบว่าไพรมอร์ A-13, B-18 และ UBC-80 สามารถเพิ่มจำนวน DNA ที่มีรูปแบบแตกต่างกันระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์อย่างสม่ำเสมอ

ส่วนไพรมอร์จำนวน 22 ไพรมอร์ ที่ให้รูปแบบของแถบ DNA ระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งไม่ควรจะพบรูปแบบเช่นนี้ในการทดลอง เพราะไพรมอร์ที่ใช้ได้ผ่านการคัดเลือกไพรมอร์มาแล้ว อาจเนื่องมาจากคุณภาพของ DNA มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ DNA ในการทำ RAPD ซึ่งส่งผลต่อความเข้มของแถบ DNA (Hallden และคณะ, 1996) และพบว่าเทคนิค RAPD เป็นเทคนิคที่มีความ sensitive สูง (Devos และ Gale, 1992) จึงมีโอกาสที่ทำการทดลองซ้ำด้วยไพรมอร์เดิมแล้วพบว่าอาจได้รูปแบบไม่เหมือนเดิม จึงทำให้พบรูปแบบนี้ในการตรวจสอบรูปแบบโดยใช้ข้าวสายพันธุ์ละ 20 ต้น ในการทำ RAPD ด้วยไพรมอร์ทั้ง 22 ไพรมอร์ ดังนั้นจึงต้องทำการทดลองซ้ำหลายครั้งเพื่อยืนยันรูปแบบของ DNA ที่ได้มีความคงที่ ซึ่งจากการวิจัยครั้งนี้ รูปแบบของ RAPD ที่แสดงความแตกต่างที่รายงานไว้ ได้มาจากการทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยที่ผลการทดลองคงเดิมสม่ำเสมอ

นอกจากนี้ไพรมอร์ UBC-51 และ UBC-74 ที่ให้รูปแบบของแถบ DNA ระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน แต่ไม่มีความสม่ำเสมอ โดยอาจจะพบแตกต่างในสายพันธุ์เดียวกัน และ/หรือความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ในบางต้น อาจเป็นผลเนื่องมาจาก genetic background ของประชากรแต่ละสายพันธุ์ยังไม่ homogeneous จึงพบแถบ DNA ที่แตกต่างกันในแต่ละประชากร

จากผลการศึกษาการแปรทางพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 เปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์เดิมด้วยวิธี RAPD ซึ่งให้เห็นว่า เกิดการแปรทางพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 ในหลอดทดลอง ในระดับ DNA ซึ่งมีงานวิจัยในก่อนหน้านี้นางานวิจัยของ Godwin และคณะ (1997) ที่ใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจสอบการแปรทางพันธุกรรมของข้าว (var. indica cv.FR13A) ที่เกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง โดยข้าวที่ได้จาก somaclonal

variation มี phenotype แตกต่างกันในหลายลักษณะ โดยเปรียบเทียบรูปแบบของแถบ DNA กับข้าวสายพันธุ์เดิม ซึ่งจากการศึกษา Godwin และคณะ (1997) ใช้ไพรเมอร์จำนวน 28 ไพรเมอร์ จากผลการศึกษาพบไพรเมอร์ จำนวน 6 ไพรเมอร์ ที่แสดงรูปแบบของแถบ DNA ที่แตกต่างกัน ระหว่างสายพันธุ์ที่ได้จาก somaclonal variation กับสายพันธุ์เดิม ดังนั้นจากการใช้ RAPD ตรวจสอบ พบว่ามีการแปรทางพันธุกรรมในระดับ DNA ในข้าวทุกสายพันธุ์ที่นำมาตรวจสอบ

จะเห็นว่าวิธี RAPD สามารถใช้ในการตรวจสอบการแปรทางพันธุกรรมในข้าวที่เกิด somaclonal variation ในหลอดทดลองได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธี RAPD ในการตรวจสอบ ความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวในระหว่างพันธุ์ ดังเช่นในงานวิจัยของ Yu และ Nguyen ใช้ วิธีนี้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมในข้าว 13 พันธุ์ โดยแบ่งเป็นข้าวขนาดอน 9 พันธุ์ และ ข้าวขนาดลุ่ม 4 พันธุ์ เพื่อจัดหมวดหมู่ของสายพันธุ์ข้าว โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 42 ไพรเมอร์ มี เพียง 2 ไพรเมอร์เท่านั้น ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวทั้ง 13 พันธุ์ได้ ซึ่ง แสดงให้เห็นว่าข้าวทั้ง 13 พันธุ์ มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง การทำ RAPD จากการใช้ไพรเมอร์ 40 ไพรเมอร์ ได้แถบ DNA ทั้งหมด 260 แถบ โดย 208 แถบ คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ แสดง polymorphism จากเปอร์เซ็นต์ของแถบ DNA ที่เป็นแบบ polymorphic แสดงว่าวิธี RAPD สามารถใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ข้าวได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้วิธี RAPD ยังสามารถใช้ตรวจสอบความแตกต่างของข้าวในระดับกลุ่มประชากรได้ โดยพบเปอร์เซ็นต์ของ แถบ DNA ที่เป็นแบบ polymorphic ถึง 82.1 เปอร์เซ็นต์ ในงานวิจัยของ Ge และคณะ (1999) ที่ ใช้วิธี RAPD ในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรข้าวป่า (*Oryza rufipogon*) ที่มีการเก็บตัวอย่างข้าวจากพื้นที่ต่างๆในประเทศจีนและบราซิล ในการศึกษาใช้ไพรเมอร์ จำนวน 60 ไพรเมอร์ และเมื่อใช้ไพรเมอร์ที่ผ่านการคัดเลือกกับข้าวทั้ง 8 กลุ่มประชากร รวม 80 ตัวอย่าง พบว่าได้แถบ DNA จำนวน 95 แถบ และได้แถบ DNA ที่เป็นแบบ polymorphic จำนวน 78 แถบ โดยพบว่าประชากรของข้าวที่มาจากประเทศจีนมีความแตกต่างทางพันธุกรรม ระหว่างประชากรและพื้นที่มากกว่ากลุ่มประชากรข้าวที่มาจากประเทศบราซิล ซึ่งจากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการใช้เทคนิค RAPD มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของ ข้าวได้เป็นอย่างดี

3. การโคลนเครื่องหมายทางพันธุกรรม

การโคลนชิ้นส่วนของ DNA ที่แสดง polymorphism ระหว่างข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่ได้จากวิธี RAPD เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ จำนวน 3 fragments คือ 171_A_13, 123_B_18 และ 123_UBC_80 จากผลการโคลน

เครื่องหมายทางพันธุกรรม 171_A_13 ซึ่งมีขนาดประมาณ 700 คู่เบส พบว่าได้โคลนที่มี insert ขนาดที่ไม่ตรงกับความคาดหมาย 2 โคลน มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส และในการโคลนเครื่องหมายทางพันธุกรรม 123_B_18 ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส ได้โคลนที่มี insert ไม่ตรงกับความคาดหมายถึง 17 โคลน มีขนาดตั้งแต่ประมาณ 300 คู่เบส จนกระทั่งถึงประมาณ 800 คู่เบส ซึ่งอาจเกิดเนื่องมาจากการสกัดแยกชิ้นส่วน DNA ออกจาก agarose gel โดยใช้ Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit (MOBIO Laboratories, Inc. USA) ในขั้นตอนการสกัดแยกตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือ อาจส่งผลให้ชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการสกัดแยกเกิดการแตกหัก ทำให้ได้ชิ้นส่วนของ DNA ที่มีขนาดต่างๆ และเมื่อทำการโคลนด้วยการใช้ QIAGEN PCR Cloning kit จึงมีโอกาสที่ชิ้นส่วน DNA ขนาดต่างๆ ที่ไม่ต้องการเหล่านี้จะต่อเข้ากับ pDrive ซึ่งเป็น DNA พาหะ เมื่อทำการตรวจสอบขนาดของ inserted fragment จึงพบ fragment ขนาดต่างๆ กัน

4. การศึกษาความเกี่ยวข้องของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จาก RAPD กับการแสดงออกของยีนในภาวะแล้งและภาวะเค็ม

4.1 การศึกษาจำนวนชุดของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จาก RAPD โดยวิธี

Southern blot analysis

จากผลการศึกษาจำนวนชุดของเครื่องหมายทางพันธุกรรม ใน genomic DNA ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่โคลนได้ จำนวน 3 fragments คือ 171_A_13_13 123_B_18_14 และ 123_UBC_80_18 เป็น probes พบแถบ DNA จำนวนมากในการ hybridize ด้วย 171_A_13_13 และ 123_B_18_14 จึงอาจเป็นไปได้ว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรม 171_A_13 และ 123_B_18 ที่ได้จากวิธี RAPD เป็น repeated DNA sequence ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 171_A_13_13 (Accession number : AY364604 ใน GenBank) ซึ่งพบว่ามีคล้ายคลึงกับ Ty3/gypsy-like retrotransposon ซึ่งเป็นส่วนที่เป็น repeated DNA sequence ในข้าว (Chavane และคณะ, 1998) ส่วนในการใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม 123_UBC_80_18 เป็น probe พบแถบ DNA จำนวน 4-5 แถบ ในการตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในแต่ละเอนไซม์ จากผลการทดลองจึงคาดว่า 123_UBC_80 อาจเป็นส่วนหนึ่งของยีนใน small gene family

จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากวิธี RAPD อาจมีโอกาที่จะได้ส่วนที่เป็น repeated DNA sequence ซึ่งพบในงานวิจัยที่มีรายงานก่อนหน้านี้ในงานวิจัยของ Godwin และคณะ (1997) ได้นำเทคนิค RAPD มาใช้ในการตรวจสอบการแปรทางพันธุกรรมของข้าว (var. indica cv.FR13A) ที่เกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง โดยข้าวที่ได้จาก somaclonal variation มี phenotype แตกต่างกันในหลายลักษณะ โดยแบ่งออกเป็น 12 สายพันธุ์ ซึ่งมี 7 สายพันธุ์ ที่มี phenotype เปลี่ยนไปเพียง 1 ลักษณะ และ 1 สายพันธุ์ มี phenotype เปลี่ยนแปลงไปมากกว่า 1 ลักษณะ และอีก 4 สายพันธุ์ มี phenotype ไม่แตกต่างจากสายพันธุ์เดิม เมื่อตรวจสอบรูปแบบของแถบ DNA โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 28 ไพรเมอร์ และพบ 6 ไพรเมอร์ คือ A-1, A-13, A-17, A-18, A-20 และ B-20 ที่แสดงรูปแบบของแถบ DNA แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ที่ได้จาก somaclonal variation กับข้าวสายพันธุ์เดิม และการใช้ RAPD9I ตรวจสอบ พบว่ามีการแปรทางพันธุกรรมในระดับ DNA ในข้าวทุกสายพันธุ์ที่นำมาตรวจสอบ โดยพบว่าในข้าว 4 สายพันธุ์ที่มี phenotype ไม่แตกต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิม มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากข้าวสายพันธุ์เดิมในระดับ DNA ดังนั้น Godwin และคณะ (1997) จึงคาดว่า การแปรทางพันธุกรรมที่ตรวจพบโดย RAPD อาจเป็นการแปรทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นใน DNA ตรงส่วนที่เป็น highly repeated sequence จึงทำให้ไม่เกี่ยวข้องกับ phenotype และเป็นที่น่าสนใจว่าไพรเมอร์ A-13 ซึ่งลำดับเบสของไพรเมอร์คือ 5' CAGCACCCAC 3' สามารถแสดงรูปแบบของแถบ DNA ที่มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ในข้าว FR13A ในงานวิจัยของ Godwin และคณะ (1997) สามารถใช้ในการตรวจสอบการแปรทางพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ได้อีกด้วย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะไพรเมอร์ A-13 มีโอกาสที่จะไปจับกับ genomic DNA ของข้าวในช่วงที่เป็น repeated DNA sequence ที่มีการแปรทางพันธุกรรมสูง

นอกจากนี้ยังพบในงานวิจัยของ Devos และ Gale (1992) ที่ได้ใช้เทคนิค RAPD ในการหาเครื่องหมายทางพันธุกรรม ในข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) จำนวน 12 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 6 ไพรเมอร์ ผลการทดลองพบว่า เมื่อโคลนเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากวิธี RAPD และนำมาใช้เป็น probe ในการทำ Southern blot hybridization ใน genomic DNA ของข้าวสาลี พบว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่โคลนได้ เป็น repeated DNA sequence ซึ่งจะพบผลในลักษณะเดียวกันในงานวิจัยของ Jeon และคณะ (1999) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจสอบการ segregation ของยีน *Bph1* ในลูกผสมรุ่น F_2 ในข้าวที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ให้มีความต้านทานต่อแมลงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยใช้เทคนิค RAPD หาโมเลกุลเครื่องหมาย (DNA markers) ในข้าวสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล พบว่าจากไพรเมอร์ จำนวน 140 ไพรเมอร์ มีเพียง 1 ไพรเมอร์ คือ OPD-7 ที่พบแถบ DNA ขนาด 700 คู่เบส (RRD7) ปรากฏ

ในข้าวสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล แต่ไม่พบในข้าวสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เมื่อทำการโคลนโมเลกุลเครื่องหมาย RRD7 และใช้เป็น probe ในการทำ Southern blot hybridization ผลปรากฏว่า โมเลกุลเครื่องหมาย RRD7 เป็น repeated DNA sequence แต่ Jeon และคณะ (1999) รายงานว่าโมเลกุลเครื่องหมาย RRD7 น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับยีน *Bph1*

จากการวิจัยต่างๆ มีรายงานว่าโมเลกุลเครื่องหมายที่ได้จากวิธี RAPD มีโอกาสที่จะเป็นส่วนที่เป็น repeated DNA sequence และอาจจะเป็นการยากที่จะแปลผลถึงกลไกการทำงานของ DNA บริเวณดังกล่าวที่มีต่อลักษณะ phenotype ที่เกิดขึ้น แต่ในบางกรณีวิธี RAPD ก็มีประสิทธิภาพในการหาโมเลกุลเครื่องหมายที่มีความเกี่ยวข้องกับยีน เช่นในการศึกษาของ Urasaki และคณะ (2002) ได้ใช้เทคนิค RAPD ในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างเพศในมะละกอ (*Carica papaya* L.) จำนวน 17 ต้น โดยแบ่งเป็นต้นตัวผู้ (ต้นที่มีแต่ดอกตัวผู้) จำนวน 6 ต้น ต้นตัวเมีย (ต้นที่มีแต่ดอกตัวเมีย) จำนวน 7 ต้น และต้นกระเทย (ต้นที่มีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมีย) จำนวน 4 ต้น โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 25 ไพรเมอร์ พบไพรเมอร์ IBRC-RP07 ที่สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างเพศได้ โดยพบแถบ DNA ขนาด 450 คู่เบส (PSDM) ในมะละกอต้นตัวผู้และต้นกระเทย ในขณะที่ไม่พบในมะละกอต้นตัวเมีย เมื่อทำการโคลน PSDM และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า PSDM ไม่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใดๆ ใน GenBank และเมื่อออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PSDM ในบริเวณภายในของชิ้นส่วน DNA และนำไปทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ DNA จากมะละกอทั้ง 3 แบบ พบ DNA fragment ขนาด 225 คู่เบส เฉพาะในต้นตัวผู้และต้นกระเทย จึงแสดงว่า specific DNA region ของ PSDM มีอยู่เฉพาะในต้นตัวผู้และต้นกระเทยเท่านั้น และการที่ไม่พบ PSDM ในมะละกอต้นตัวเมียไม่ได้เกิดจาก base change ที่ primer-binding sites และเมื่อทำ Southern blot hybridization โดยใช้ PSDM เป็น probe ในมะละกอต้นตัวผู้และต้นกระเทย พบแถบ DNA จำนวน 2 แถบ ในการตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และพบแถบ DNA จำนวน 1 แถบ ในการตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI* แต่ไม่ปรากฏแถบ DNA ในมะละกอต้นตัวเมีย ซึ่งสรุปได้ว่า PSDM พบเฉพาะใน genome ของมะละกอต้นตัวผู้และต้นกระเทยเท่านั้น ซึ่ง PSDM น่าจะอยู่ที่บริเวณของโครโมโซมที่มีความเกี่ยวข้องกับเพศผู้และกระเทยของมะละกอ

นอกจากนี้ Ohmori และคณะ (1995) ได้ใช้วิธี RAPD ในการหาโมเลกุลเครื่องหมายที่ linked กับ Tm-2 locus ในมะเขือเทศ โดยใช้มะเขือเทศ 3 พันธุ์ คือ พันธุ์ GCR26 var. Craigella ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อ *Tomato mosaic virus* (ToMV), GCR236 ที่มียีน Tm-2 และยีน *nv* และ พันธุ์ CGR267 ที่มียีน Tm-2a โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 220 ไพรเมอร์ จากการคัดเลือกไพร

เมอร์ พบ 43 โพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ในมะเขือเทศได้ และพบแถบ DNA จำนวน 53 แถบ ที่เป็นแบบ polymorphic เมื่อเลือก RAPD marker จำนวน 13 fragments มาศึกษา linkage กับ *nv* locus ซึ่ง linked กับ Tm-2 locus โดยดูการ segregation ของยีนในรุ่น F₂ พบว่า RAPD marker ทั้ง 13 fragments มีความเกี่ยวข้องกับยีน Tm-2 และ Tm-2a ซึ่ง Ohmori และคณะได้รายงานไว้ว่า เทคนิค RAPD มีประโยชน์ในการหาตำแหน่งของยีนที่สนใจได้

แม้ว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรม 171_A_13_13 และ 123_B_18_14 เป็นส่วนที่เป็น repeated DNA sequence และ 123_UBC_80 อาจเป็นส่วนหนึ่งของยีนใน small gene family แต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่โคลนได้ทั้ง 3 fragment มีความเกี่ยวข้องกับยีนที่ทำให้มีความสามารถในการทนแล้งและทนเค็มในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT13-TC171 หรือไม่ ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไป

ส่วนในการทำ Southern blot hybridization โดยใช้ 123_B_18_14 เป็น probe เมื่อตัด genomic DNA ของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่า แถบ DNA ของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีขนาดใหญ่กว่าข้าวสายพันธุ์เดิมเล็กน้อย และยังพบว่า เมื่อตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI พบแถบ DNA ขนาด 4.4 กิโลเบส ในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 แต่ไม่พบในข้าวสายพันธุ์เดิม ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เกิดการแปรทางพันธุกรรมเกิดขึ้นในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 และเป็นการแปรทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในหลายตำแหน่ง ซึ่งจะพบในลักษณะเดียวกันเมื่อใช้ 123_UBC_80_18 เป็น probe

การแปรทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 อาจเกิดเนื่องมาจาก base insertion หรือ base substitution ทำให้ได้แถบ DNA ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งการเกิด mutation ในลักษณะเช่นนี้มักจะเกิดตรงบริเวณที่เป็น repeated DNA sequence (Snustad และคณะ, 1997)

4.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ โดยวิธี Northern blot analysis

จากผลการศึกษาการแสดงออกของยีนในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ด้วยวิธี Northern blot hybridization โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่โคลนได้จำนวน 3 fragments คือ 171_A_13_13 123_B_18_14 และ 123_UBC_80_18 เป็น probe พบว่าไม่ปรากฏสัญญาณ mRNA ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมขึ้นในทุกระยะของการทดลองในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเครื่องหมายทางพันธุกรรม 171_A_13_13

และ 123_B_18_14 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น repeated DNA sequence ซึ่งอาจไม่ใช่ส่วนที่เป็น coding sequence จึงไม่ถูก transcribed เป็น mRNA

ส่วนเครื่องหมายทางพันธุกรรม 123_UBC_80_18 ซึ่งคาดว่าเป็นส่วนหนึ่งใน small gene family แต่เมื่อนำมาใช้เป็น probe ในการศึกษาการแสดงออกของยีน ผลไม่พบสัญญาณ 123_UBC_80 mRNA ที่ตัวอย่างข้าวในทุกระยะของการทดลองเช่นกัน จึงคาดว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรม 123_UBC_80_18 อาจมีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในส่วนที่เป็น non-coding sequence ของยีนดังกล่าว เช่น เป็นบริเวณ regulatory region หรือเป็นส่วนของ intron ดังนั้นเมื่อใช้เป็น probe ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วย Northern blot hybridization จึงไม่พบสัญญาณของ 123_UBC_80 mRNA ที่ตัวอย่างใด

ในทางกลับกันผลการทดลองข้างต้นยังไม่เพียงพอที่จะระบุได้แน่ชัดว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่โคลนได้เป็น non-coding sequence แต่มีความเป็นไปได้ว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่โคลนได้ทั้ง 3 fragments อาจเป็น coding region แต่มีการแสดงออกในระดับที่ต่ำมากในเนื้อเยื่อพืชต่างๆ ที่ทำการตรวจสอบ จนไม่สามารถทำการตรวจสอบได้ด้วยวิธี Northern blot analysis จึงต้องทำการศึกษาต่อไป โดยอาจศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้วิธี RT-PCR (Sung และคณะ, 2001) ในกรณีที่คาดว่ายีนที่ต้องการศึกษามีการแสดงออกในระดับที่ต่ำมาก เพื่อตรวจสอบเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่โคลนได้มีการแสดงออกในภาวะแล้งและภาวะเค็มหรือไม่ หรืออาจใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่โคลนได้ ซึ่งอาจจะมี ความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank ซึ่งจะนำไปสู่การค้นพบยีนที่อาจจะมี ความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนต่อภาวะแล้งและภาวะเค็มในพืช นอกจากนี้ อาจทดสอบความ เกี่ยวข้องของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่โคลนได้กับภาวะแล้งและภาวะเค็มโดยการติดตามความ สัมพันธ์ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมกับลูกผสมที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ (plant breeding) ซึ่ง มีความสามารถในการทนแล้งและ/หรือทนเค็มแตกต่างกันว่าลักษณะการทนแล้งและทนเค็ม และ การ segregation ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมในรุ่นลูกมีความสัมพันธ์กันหรือไม่ (Jeon และ คณะ, 1999)

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง

ข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ที่ผ่านการคัดเลือกภายใต้ภาวะเค็ม 10 ชั่วโมง มีความสามารถในการทนแล้งได้ โดยพบว่ามีความสูง น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นและรากแตกต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิม เมื่อให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อนำมาคัดเลือกภายใต้ภาวะแล้งต่ออีก 1 ชั่วโมง พบว่าข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) รุ่นที่ 11 มีความทนทานต่อภาวะแล้งได้ดีขึ้นเล็กน้อย

2. การศึกษาการแปรทางพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์เดิม โดยวิธี RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

จากการตรวจสอบการแปรทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) เปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์เดิม โดยใช้วิธี RAPD พบไพรเมอร์ A-13, B-18 และ UBC-80 สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ได้ ซึ่งจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า เกิดการแปรทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 ในหลอดทดลองในระดับโมเลกุล

3. การโคลนเครื่องหมายทางพันธุกรรม

โคลนชิ้นส่วน DNA ที่แสดง polymorphism ระหว่างข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 จำนวน 3 fragments คือ 171_A_13 เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส 123_B_18 และ 123_UBC_80 เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส และ 300 คู่เบส ตามลำดับ

4. การศึกษาความเกี่ยวข้องของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จาก RAPD กับการแสดงออกของยีนในภาวะแล้งและภาวะเค็ม

เมื่อใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่โคลนได้เป็น probe ในการทำ Southern blot analysis พบแถบ DNA ที่แตกต่างกันระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งเป็นการยืนยันว่ามีการแปรทางพันธุกรรมเกิดขึ้นในข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) และเป็นการแปรทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในหลายตำแหน่ง โดยเครื่องหมายทางพันธุกรรม 171_A_13 และ 123_B_18 เป็นส่วนที่เป็น repeated DNA sequence และ 123_UBC_80 คาดว่าเป็นส่วน non-coding sequence ใน small gene family และการศึกษาการแสดงออกของยีน โดย Northern blot analysis ไม่พบสัญญาณ mRNA ในทุกการทดลอง เนื่องจากส่วนของ DNA ที่ใช้เป็น probe ทั้ง 3 ส่วน อาจไม่อยู่ในบริเวณที่เป็น coding sequence หรือหากเป็น coding sequence ก็อาจมีการแสดงออกในระดับที่ต่ำมาก จนไม่สามารถตรวจสอบได้ในภาวะที่ทำการศึกษา

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการทนแล้งของข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ในรุ่นที่ 10 และรุ่นที่ 11 เพิ่มเติมและควรทำการทดลองในช่วงเวลาเดียวกัน
2. ในการศึกษาการแปรทางพันธุกรรมระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ โดยวิธี RAPD ควรใช้จำนวนไพรเมอร์เพิ่มขึ้น เพื่อจะได้มีโอกาสได้แถบ DNA ที่มีความแตกต่างกันระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ตลอดจนการค้นพบยีนที่อาจจะเกี่ยวข้องกับการทนภาวะแล้งและภาวะเค็มในข้าวได้
3. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเครื่องหมายทางพันธุกรรม 123_UBC_80 ที่คาดว่าเป็นส่วนหนึ่งของ small gene family ว่ามีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนแล้งและทนเค็มของข้าวหรือไม่
4. ศึกษาความเกี่ยวข้องของเครื่องหมายทางพันธุกรรมทั้ง 3 fragments กับความสามารถในการทนแล้งและทนเค็ม โดยการใช้เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช (plant breeding) และศึกษาการถ่ายทอดลักษณะการทนแล้งและทนเค็ม และการ segregation ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมทั้ง 3 fragments มีความสัมพันธ์กันหรือไม่
5. ควรทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่โคลนได้ทั้ง 3 fragments เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank ซึ่งอาจนำไปสู่การค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้งในพืช
6. นำข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ที่ผ่านการคัดเลือกภายใต้ภาวะแล้ง 1 ชั่วรุ่น นำมาคัดเลือกภายใต้ภาวะแล้งต่ออีก 3 ชั่วรุ่น แล้วนำมาทดสอบในภาวะเค็มว่ายังมีความสามารถในการทนเค็มได้อยู่หรือไม่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- Alves, A. C. A. and Setter, L. T. 2000. Response of Cassava to water deficit: leaf area growth and abscisic acid. **Crop Science** 40: 131-137.
- Bostock, M. R. and Quatrano, S. R. 1992. Regulation of *Em* gene expression in rice. **Plant Physiology** 98: 1356-1363.
- Bray, A.E. 1993. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology** 103: 1035-1040.
- Campos, L. P., Raelson, J. V. and Grant, W. F. 1994. Genome relationship among Lotus species based on random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Theoretical and Applied Genetics** 88: 417-422.
- Cao, D. and Oard, J. H. 1997. Pedigree and RAPD-based DNA analysis of commercial U. S. rice cultivars. **Crop Science** 37: 1630-1635.
- Cario, C. A., Stein, J., Delgado, L., Bortolotti, S., Guelman, S. A., Ortiz, J. P. and Morandi, E. N. 2002. Tagging the juvenile locus in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) with molecular marker. **Euphytica** 124: 387-395.
- Chavanne, F., Zhang, D. X., Liaud, M. F. and Cerff, R. 1998. Structure and evolution of Cyclops: a novel giant retrotransposon of the Ty3/Gypsy family highly amplified in pea and other legume species. **Plant Molecular Biology** 37: 363-375.
- Chen, R. D. and Tabaeizadeh, Z. 1992. Alteration of gene expression in tomato plant (*Lycopersicon esculentum*) by drought and salt stress. **Genome** 35: 385-391.
- Claes, B., Dekeyser, R., Villarroel, R., Bulcke, M., Bauw, G., Montagu, M. and Caplan, A. 1990. Characterization of a rice gene showing organ-specific expression in response to salt and drought. **The Plant Cell** 2: 19-27.
- Cushman, C. J. and Bohnert, J. H. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. **Current Opinion in Plant Biology** 3: 117-124.
- Detsika, G. M., Corkill, E. J., Magalhães, M., Glendinning, J. K., Hart, A. C. and Winstanley, C. 2003. Molecular typing of, and distribution of genetic markers among, *Burkholderia cepacia* complex isolates from Brazil. **Journal of Microbiology** 41: 4148-4153.
- Devos, K. M., and Gale, M. D. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. **Theoretical and Applied Genetics** 84: 567-572.

- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small amount of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin** 19: 11-15.
- Faure, S., Noyer, J. L., Horry, J. P., Bakry, F., Lanaud, C. and Gonzalez-de-Leon, D. 1993. A molecular marker-based linkage map of diploid bananas (*Musa acuminata*). **Theoretical and Applied Genetics** 87: 517-526.
- Fernandez, M. E., Figueiras, M. E. and Benito, C. 2002. The use of ISSR and RAPD marker for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known original. **Theoretical and Applied Genetics** 104: 845-851.
- Fuentes, L. J., Escobar, F., Alvarez, A., Gallego, G., Duque, C. M., Ferrer, M., Deus, E. J. and Tohme, M. J. 1999. Analyses of genetic diversity in Cuban rice varieties using isozyme, RAPD and RFLP markers. **Euphytica** 109: 107-115.
- Ge, S., Oliveira, X. C. G., Schaal, A. B., Gao, L. and Hong, D. Y. 1999. RAPD variation within and between natural population of the wild rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil. **Heredity** 82: 638-644.
- Glazmann, J. C. 1987. Isozyme and classification of Asia rice varieties. **Theoretical and Applied Genetics** 74: 21-30.
- Godwin, I. D., Sangduen, N., Kuanuvathaidach, R., Piperidis, G. and Adkins, S. W. 1997. RAPD polymorphisms among variant and phenotypically normal rice (*Oryza sativa* var. indica) somaclonal progenies. **Plant Cell Reports** 16: 320-324.
- Greenway, H. and Munn, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology** 31: 149-190.
- Halldén, C., Hansen, M., Nilsson, O. N., Hjerdin, A. and Säll, T. 1996. Competition as a source of errors in RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics** 93: 1185-1192.
- Hasegawa, M. P., Bressan, A. R., Zhu, J. and Bohert, J. H. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 51: 463-499.
- Irwin, S. V., Kaufusi, P., Banks, K., de-la-Pena, R. and Cho, J. J. 1998. Molecular characterization of taro (*Colocasia esculenta*) using RAPD marker. **Euphytica** 99: 183-189.

- Ishii, T., Nakano, T., Maeda, H. and Kamijima, O. 1996. Phylogenetic relationship in A-genome species of rice as revealed by RAPD analysis. **Gene and Genetics Systems** 71: 195-201.
- Iuchi, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Terao, T. and Shinozaki, K. 1996. Novel drought-inducible gene in the highly drought-tolerant cowpea: Cloning of cDNAs and analysis of the expression of the corresponding genes. **Plant Cell Physiology** 37: 1073-1082.
- Jagendorf, T. A. and Takabe, T. 2001. Inducers of Glycinebetaine synthesis in barley. **Plant Physiology** 127: 1827-1835.
- Jain, A., Bhatia, S., Banga, S. S., Prakash, S. and Lakshmikumaran, M. 1994. Potential use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationship to heterosis. **Theoretical and Applied Genetics** 88: 116-122.
- Jarret, R. L. and Austin, D. F. 1994. Genetic diversity and systematic relationship in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and related species as revealed by RAPD analysis. **Genetic Resource and Crop-Evolution** 41: 165-173.
- Jeon, H. Y., Ahn, N. S., Choi, C. H., Hahn, R. T. and Moon, P. H. 1999. Identification of RAPD marker linked to a brown planthopper resistance gene in rice. **Euphytica** 107: 23-28.
- Kennard, W. C., Poetter, K., Dijkhuizen, A., Meglic, V., Staub, J. E. and Havey, M. J. 1994. Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease-resistance, and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber. **Theoretical and Applied Genetics** 89: 42-48.
- Kerepesi, I. and Galiba, G. 2000. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. **Crop Science** 40: 482-487.
- Knight, H., Trewavas, J. A. and Knight, R. M. 1997. Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. **The Plant Journal** 12: 1067-1078.
- Knight, H. and Knight, R. M. 2001. Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. **TRENDS in Plant Science** 6: 262-267.
- Koller, B., Lehmann, A., McDermott, J. M. and Gessler, C. 1993. Identification of apple cultivar using RAPD marker. **Theoretical and Applied Genetics** 85: 901-904.

- Lee, S. J., Shin, J. S., Park, K. W. and Hong, Y. P. 1996. Detection of genetic diversity using RAPD-PCR and sugar analysis in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.) germplasm. **Theoretical and Applied Genetics** 92: 719-725.
- Li, Y. Z. and Chen, Y. S. 2000. Differential accumulation of the S-adenosylmethionine decarboxylase transcript in rice seedlings in response to salt and drought stresses. **Theoretical and Applied Genetics** 100: 782-788.
- Liu, T. and Staden, J. V. 2001. Partitioning of carbohydrate in salt-sensitive and salt-tolerant soybean callus culture under salinity stress and its subsequent relief. **Plant Growth Regulation** 33: 13-17.
- Liu, X. and Baird, V. W. 2003. Differential expression of genes regulated in response to drought or salinity stress in sunflower. **Crop Science** 43:678-687.
- Lott, S., Majerus, V. and Kinet, J. M. 1999. NaCl effect on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Physiology Plant** 105: 450-458.
- Lu, Z. and Neumann, M. P. 1999. Water stress inhibits hydraulic conductance and leaf growth in rice seedlings but not the transport of water via mercury-sensitive water channels in the root. **Plant physiology** 120: 143-151.
- Lu, H. J. and Myers, G. O. 2002. Genetic relationships and discrimination of ten influential upland cotton varieties using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics** 105: 325-331.
- Mackill, J. D. 1995. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. **Crop Science** 35: 889-894.
- Marsan, P. A., Egidy, G., Monfredini, G., Di-Silvestro, S. and Motto, M. 1993. RAPD markers in maize genetic analysis. **Maydica** 38: 259-264.
- Mundy, J. and Chua, N. 1988. Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. **EMBO Journal** 7: 2279-2286.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**. 25: 239-250.
- Neves-Piestum, G. B. and Bernstein, N. 2001. Salinity-induced inhibition of leaf elongation in maize is not mediated by changes in cell wall acidification capacity. **Plant physiology** 125: 1419-1428.

- Nguyen, H. T., Babu, R. C. and Blum, A. 1997. Breeding for drought resistance in rice: Physiology and molecular genetics considerations. **Crop Science** 37: 1426-1434.
- Ohmori, T., Murata, M. and Motoyoshi, F. 1995. Identification of RAPD markers linked to the *Tm-2* locus in tomato. **Theoretical and Applied Genetics** 90: 307-311.
- Orozco-Castillo, C., Chalmers, K. J., Waugh, R. and Powell, W. 1994. Detection of genetic diversity and selection gene introgression in coffee using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics** 87: 934-940.
- Pammi, S., Schertz, K., Xu, G., Hart, G. and Mullet, J. E. 1994. Random-amplified-polymorphic DNA markers in sorghum. **Theoretical and Applied Genetics** 89: 80-88.
- Pérez-Molphe-Balch, E., Gidekel, M., Segura-Nieto, M., herrera-Estrella, L. and Ochoa-Alejo, N. 1996. Effect of water stress on plant growth and root proteins in three cultivars of rice (*Oryza sativa*) with different levels of drought tolerance. **Physiologia Plantarum** 96: 284-290.
- Piatkowski, D., Schneider, K., Salamini, F. and Bartels, D. 1990. Characterization of five abscisic acid-responsive cDNA clones isolated from the desiccation-tolerant plant *Craterostigma plantagineum* and their relationship to other water-stress genes. **Plant Physiology** 94: 1682-1688.
- Plant, L. A., Cohen, A., Moses, S. M. and Bray, A. E. 1991. Nucleotide sequence and spatial expression pattern of a drought- and abscisic acid-induced gene of tomato. **Plant Physiology** 97: 900-906.
- Rajapakse, S., Belthoff, L. E. He, G., Estager, A. E., Scorza, R., Verde, I., Ballard, R. E., Baird, W. V. and Callahan, A. 1995. Genetic linkage mapping in peach using morphological, RFLP and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics** 90: 503-510.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning a Laboratory Manual** 2nd ed. Cold Springs Harbor, New York.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schulz, B., Westphal, L. and Wricke, G. 1993-1994. Linkage groups of isozymes, RFLP and RAPD markers in carrot (*Daucus carota* L. sativus). **Euphytica** 74: 67-76.

- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P. Kawai, J., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K. 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **The Plant Journal** 31: 279-292.
- Seki, M., Kamei, A., Yamaguchi-shinozaki, K. and Shinozaki, K. 2003. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. **Current Opinion in Biotechnology** 14: 194-199.
- Shah, H. F., Rashid, O., Simons, J. A. and Dunsdon, A. 1994. The utility of RAPD markers for the determination of genetic variation in oil palm (*Elaeis guineensis*). **Theoretical and Applied Genetics** 89: 713-718.
- Sibole, J., Montero, E., Cabot, C., Poschenrieder, C. and Barcelo, J. 1998. Role of sodium in the ABA-mediated long-term growth response of bean to salt stress. **Physiologia Plantarum** 104: 299-305.
- Smirnov, N. 1998. Plant resistance to environmental stress. **Current Opinion in Biotechnology** 9: 214-219.
- Snustad, D. P., Simmons, J. M. and Jenkins, B. J. 1997. **Principles of Genetics**. John Wiley & Sons, Inc.
- Sung, D. Y., Vierling, E. and Guy, L. C. 2001. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis Hsp70* gene family. **Plant Physiology** 126: 789-800.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. **Plant Physiology**. 2nd ed. Massachusetts. Sinauer Associates.
- Tatineni, V., Cantrell, R. G. and Davis, D. D. 1996. Genetic diversity in Elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. **Crop Science** 36: 186-193.
- Tinker, N. A., Fortin, M. G. and Mather, D. E. 1993. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. **Theoretical and Applied Genetics** 85: 976-984.

- Urasaki, N., Tokumoto, M., Tarora, K. and Ban, Y. 2002. A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 104: 281-285.
- Vajrabhaya, M. and Vajrabhaya, T. 1991. Somaclonal variation of salt tolerance in rice. In Y. P. S. Bajaj, (ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. 14: 368-382.
- Vajrabhaya, M., Kumpun, W. and Chadchawan, S. 2001. Solute accumulation in drought tolerance rice. **Science Asia** 27: 93-97.
- Wachira, F. N., Waugh, R., Hackett, C. A. and Powell, W. 1995. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers. **Genome** 38: 201-210.
- Werner, J. E. and Finkelstein, R. R. 1995. Arabidopsis mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. **Physiology Plant** 93: 659-666.
- Wight, C. P., Penner, G. A., O'Donoghue, L. S., Burrows, V. D., Molnar, S. J. and Fedak, G. 1994. The identification of random amplified polymorphic DNA marker for daylength insensitivity in oat. **Genome** 37: 910-914.
- Williams, G. K. J., Kubelik, R. A., Livak, J. K., Rafalski, J. A. and Tingey, V. S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. 18: 6531-6535.
- Wyn-Jones, R. G. and Storey, R. 1978a. Salt stress and comparative physiology in the Gramineae. II. Glycinebetaine and proline accumulation in two salt- and water-stressed barley cultivars. **Australian Journal of Plant Physiology** 5: 817-829.
- Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., David Ho, T. and Wu, R. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. **Plant Physiology** 110: 249-257.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T. and Shinozaki, K. 1995. Regulation of genes that are induced by drought stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Research** 108: 127-136.
- Yong, C. B. and Jung, J. 1990. Water deficit induced oxidative stress and antioxidative defenses in rice plants. **Journal of Plant Physiology** 155: 255-261.
- Yu, X. L. and Nguyen, T. H. 1994. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.) **Theoretical and Applied Genetics** 87: 668-672.

Zeng, L. and Shannon, C. M. 2000. Salinity effect on seedling growth and yield components of rice. *Crop Science* 40: 996-1003.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 1991
(Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991)

ชื่อสารเคมี	ปริมาณสาร (mg/l)
Macroelements	
Potassium nitrate (KNO_3)	580
Calcium sulfate (CaSO_4)	500
Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	450
Triple super phosphate	250
Ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	100
Microelements	
di-sodium ethylene diamine tetraacetate (Na_2EDTA) *	160
Ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) *	120
Manganese sulfate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	15
Boric acid (H_3BO_3)	5
Zinc sulfate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.5
Potassium iodide (KI)	1.0
Sodium molybdate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1
Copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.05
Cobalt chloride ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.05

* การเตรียม FeSO_4 stock ความเข้มข้น 30 g/l (1L)

- 1.1 ชั่ง Na_2EDTA 40 g และ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 30 g
- 1.2 แยกละลายในน้ำกลั่น 500 ml ที่ละตัว ที่อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส
- 1.3 ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน แล้วพ่นฟองอากาศประมาณ 3-4 ชั่วโมง จนกระทั่งสารละลายใส

2. สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

สารละลาย	ส่วนประกอบ
Denaturation buffer	1.5 M NaCl 0.5 M NaOH
Denaturing buffer (for RNA) For total volume 40 μ l	11 μ l RNA sample 20 μ l 40% formamide 7 μ l 37% formaldehyde 2 μ l 10x MOPS
Depurination buffer	0.25 M HCl
DNA extraction buffer (CTAB)	2 % (w/v) CTAB 1.4 M NaCl 0.2 % (v/v) β -mercaptoethanol 20 mM EDTA 100 mM Tris-HCl pH 8.0 2 % PVP (Polyvinylpyrrolidone)
DNA loading dye	50% Glycerol 0.25% bromophenol blue
formaldehyde gel	1.5 g agarose ในน้ำกลั่น 105 ml 30 ml formaldehyde 15 ml 10x MOPS
10x formaldehyde gel- running buffer (10x MOPS)	0.2 M MOPS 80 mM sodium acetate 10mM EDTA
Neutralization buffer	1.5 M NaCl 0.5 M Tris-HCl pH 7.5
Primary wash buffer	0.5x SSC pH 7.0 0.4% SDS 6 M Urea

สารละลาย	ส่วนประกอบ
RNA extraction buffer	100 mM Tris pH 9.0 100 mM NaCl 20 mM EDTA 1% lauryl sarcosinate 0.1% (v/v) β -mercaptoethanol 0.1% DEPC (diethyl pyrrocarbonate)
RNA loading dye	50% Glycerol 1 mM EDTA 0.25% bromophenol blue
20x SSC	3 M NaCl 0.3 M sodium acetate
50x TAE	242 g Tris-base 57.1 ml glycial acetic acid 100 ml 0.5 M EDTA pH 8.0
5x TBE	54 g Tris-base 27.5 g Boric acid 20 ml 0.5 M EDTA pH 8.0
TE	10 mM Tris pH 8.0 1 mM EDTA



ภาคผนวก ข

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. วิธีการสกัด DNA ด้วยวิธี CTAB (ดัดแปลงจากวิธีของ Dolye และ Dolye, 1987)

- 1.1 บดตัวอย่างใบข้าว 0.1 g กับไนโตรเจนเหลว ด้วยโกร่งบดที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว
- 1.2 เติม DNA extraction buffer 0.6 ml ซึ่งอุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน
- 1.3 เทส่วนผสมทั้งหมดใส่ในหลอด microcentrifuge และนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- 1.4 เติม phenol: chloroform: isoamyl-alcohol ในปริมาณเท่ากับส่วนผสมในหลอด ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมา
- 1.5 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 1.6 แยกส่วน supernatant มาสกัดซ้ำด้วย chloroform 2 ครั้ง โดยใช้ปริมาตรเท่ากับสารละลายในหลอด
- 1.7 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และดูสารละลายชั้นบนในหลอดใหม่
- 1.8 เติม sodium acetate 0.1 เท่า และ isopropanol ที่แช่เย็น 0.6 เท่า เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- 1.9 ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 1.10 ล้าง pellet ด้วย 70% ethanol และนำไป air dry ให้ ethanol ระเหยจนหมด
- 1.11 ละลาย pellet ด้วย TE buffer 40 μ l
- 1.12 เติม RNase ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 20 μ g/ μ l และนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง
- 1.13 ปรับปริมาตรของ DNA ในหลอดให้เป็น 250 μ l โดยใช้ TE buffer และเติม phenol: chloroform: isoamyl-alcohol 250 μ l พลิกหลอดกลับไปมา
- 1.14 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และดูสารละลายชั้นบนในหลอดใหม่
- 1.15 สกัดซ้ำด้วย chloroform 2 ครั้ง และตกตะกอน DNA ด้วย sodium acetate 0.1 เท่า และ absolute ethanol ที่แช่เย็น 2 เท่า
- 1.16 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 1.17 ล้าง pellet ด้วย 70% ethanol และนำไป air dry ให้ ethanol ระเหยจนหมด

- 1.18 ละลาย pellet ด้วย TE buffer (ปริมาตรที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณ DNA ที่สกัดได้)
- 1.19 วัดความเข้มข้นของสารละลายด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

การสกัด DNA สำหรับใช้ในการทำ RAPD ใช้ตัวอย่างใบข้าว 0.1 g และสำหรับใช้ในการทำ southern blot ใช้ตัวอย่างใบข้าว 1 g

2. การปลูกต้นข้าวที่คัดเลือกได้เพื่อเก็บเมล็ด

เมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 4 ของการให้ภาวะแล้ง คัดเลือกต้นที่รอดตายและแข็งแรง นำไปปลูกในดินเหนียว ในกระถางเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ให้หมายเลขประจำต้น เต็มปุ๋ยเคมี สูตร 16-16-16 ปริมาณ 3 กรัม ต่อกระถางก่อนปลูก 1 วัน และเติมปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) ปริมาณ 3 กรัมต่อกระถางเมื่อข้าวแตกกอประมาณ 30-40 วันหลังการปลูก ในระหว่างการปลูกเพื่อเก็บเมล็ด จำกัดโรคและแมลงตามการระบาดและควบคุมน้ำในกระถางให้ท่วมหน้าดินประมาณ 1-3 เซนติเมตร จนกว่าจะเก็บเมล็ด สำหรับการปลูกข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 ซึ่งเป็นข้าวไวแสงนอกฤดูกาล ใช้วิธีคลุมผ้าดำเพื่อปรับช่วงมืด ให้เป็นแบบกลางคืนยาว โดยให้ช่วงสว่าง/มืด ใน 1 วัน เป็น 8/16 ชั่วโมง โดยคลุมผ้าไว้อย่างน้อย 14 วัน เพื่อกระตุ้นการเกิดตาดอก (flower bud initiation) เมื่อเมล็ดแก่จัด เก็บรวงนำไปตากแดดให้แห้ง เก็บเมล็ดในตู้เย็นที่ 10 องศาเซลเซียส สำหรับการปลูกในรอบต่อไป

3. การสกัด RNA ด้วยวิธี hot phenol

- 3.1 บดตัวอย่างใบข้าวที่อยู่ในภาวะแช่แข็งประมาณ 0.2 g กับไนโตรเจนเหลว ในโถรงบดที่ผ่านการทำลาย RNase แล้ว จากนั้นตัดตัวอย่างพืชใส่หลอด microcentrifuge ที่ทำให้เย็นจัดด้วยไนโตรเจนเหลว
- 3.2 เติ RNA extraction buffer และ phenol:chloroform อย่างละ 800 μ l ซึ่งอุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นำไป vortex และแช่ลงในน้ำแข็ง
- 3.3 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- 3.4 แยกส่วน supernatant และนำมาสกัดซ้ำด้วย phenol:chloroform อีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ปริมาตรเท่ากับสารละลายในหลอด ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่
- 3.5 เติม 95% ethanol 2 เท่า เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

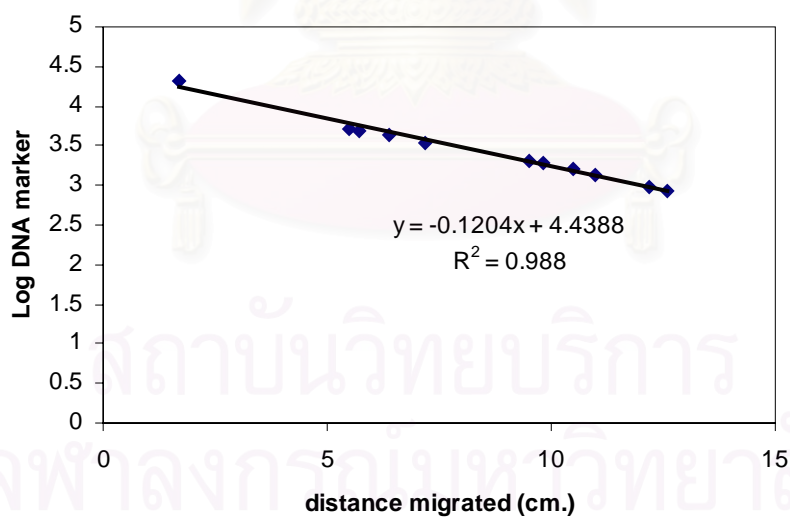
- 3.6 บั่นเหวียงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 3.7 ล้าง pellet ด้วย 80 % ethanol และนำไป air dry ที่อุณหภูมิห้อง ให้ ethanol ระเหยจนหมด
- 3.4 ละลาย pellet ใน DEPC treated TE buffer แล้ว 100 μ l
- 3.5 เติม DEPC treated TE buffer 60 μ l และ 10 M LiCl₂ 40 μ l (ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 M LiCl₂) เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 16 ชั่วโมง
- 3.8 บั่นเหวียงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 3.6 3.11 ละลาย pellet ใน DEPC treated TE buffer 20 μ l
- 3.12 วัดความเข้มข้นของสารละลายด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพื่อประมาณค่าความเข้มข้นของ RNA

4. การทำ frozen stock (Sambrook และคณะ, 1978)

- 4.1 streak *E. coli* ที่มี DNA พาหะที่ถูกตัดต่อโดยใส่เครื่องหมายทางพันธุกรรมเป็น insert ลงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicilin 100 mg/ml นำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
- 4.2 เขี่ย single colony ลงอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicilin 100 mg/ml ปริมาตร 10 ml นำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส และเขย่า เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
- 4.3 หลังจากนั้นไปเปิดอาหารเหลว LB ที่มี *E. coli* เจริญเติบโตอยู่ 1 ml ใส่ใน vial ที่มี glycerol 87.7 % 1 ml (ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) เขย่าให้เข้ากัน
- 4.4 นำ vial ไปแช่ไนโตรเจนเหลว และนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

5. การหาขนาด DNA marker (Lamda DNA digest with *EcoRI* and *HindIII*)

Lamda DNA digest with <i>EcoRI</i> and <i>HindIII</i>	Distance migrate (cm.)	Log ₁₀ DNA marker
21,226	1.7	4.3268
4,973	5.7	3.6966
4,268	6.4	3.6302
3,530	7.2	3.5477
2,027	9.5	3.3068
1,904	9.8	3.2796
1,584	10.5	3.1997
1,375	11	3.1383
947	12.2	2.9763
831	12.6	2.9196



รูปที่ 1๗ ตัวอย่างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาขนาดของ DNA marker (Lamda DNA digest with *EcoRI* and *HindIII*)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปารวี ธิกาศ เกิดวันที่ 4 มีนาคม พ.ศ. 2521 ที่จังหวัดเชียงใหม่ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2542 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2543 โดยได้รับทุนทบวงมหาวิทยาลัยสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ในระดับปริญญาโท-เอก และทุนพัฒนาอาจารย์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย