

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

Salt and Drought Tolerance Cross-talk and Proline Biosynthesis during  
Osmotic Stress in Rice (*Oryza sativa* L.)

โดย

ศุภจิตรา ชัชวาลย์

พงศ์ธาริน โสฬ์ตระกูล

ฐปนา อัครเอกปัญญา

มนทกานติ วัชรภักย์

สถาบันวิทยบริการ

ตุลาคม 2550

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ซึ่งได้สนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ การวิจัยในครั้งนี้มีอาจสำเร็จได้หากไม่ได้รับความร่วมมือจากนิสิตภาควิชาพฤกษศาสตร์ นางสาวชญารัตน์ คงขุนเทียน นางสาวปารวี ธิกาศ นายพงศธรณ์ กล่อมสกุล และนักศึกษาในโครงการ พสวท. โครงการโอลิมปิกวิชาการ นางสาวจุฑามาศ แซ่เซียว



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย Salt and Drought Tolerance Cross-talk and Proline Biosynthesis during Osmotic Stress in Rice (*Oryza sativa* L.)

ชื่อผู้วิจัย ศุภจิตรา ชัชวาลย์ พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล รูปนา อัครเอกปัญญา มณฑกานติ  
วัชรภักย์

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ ตุลาคม พ.ศ. 2550

### บทคัดย่อ

จากการทดลองพบว่าข้าวสายพันธุ์เค็ม LPT171 ซึ่งได้จากการแปรของเนื้อเยื่อร่างกายในหลอดทดลองจากเซลล์ของข้าวพันธุ์เค็มคือ LPT123 มีความสามารถในการทนแล้งสูงกว่าข้าวพันธุ์เค็ม เมื่อปลูกข้าวสายพันธุ์ LPT171 และ LPT123 ในภาวะเค็มพบว่าการสะสมโพรลีนในเนื้อเยื่อใบเพิ่มขึ้น โดยข้าว LPT123 มีระดับโพรลีนสูงกว่าข้าว LPT171 อย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 หลังจากได้รับภาวะเค็มในทางตรงกันข้าม เมื่อปลูกในภาวะแล้งการเพิ่มขึ้นของปริมาณโพรลีนที่สะสมในใบของข้าวทั้งสองพันธุ์ / สายพันธุ์ ไม่แตกต่างกัน จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการสะสมโพรลีนในข้าวเป็นการตอบสนองอย่างหนึ่งต่อภาวะเครียดจากการขาดน้ำ และความเค็ม แต่อาจไม่ได้ส่งผลโดยตรงต่อระดับความสามารถในการทนเค็มของข้าวทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความสามารถในการทนเค็มประกอบด้วยกลไกที่หลากหลายและถูกควบคุมด้วยยีนหลายยีน เมื่อโคลนบางส่วนของยีน *P5CS* จากจีโนมของข้าวสายพันธุ์ LPT171 และนำมาใช้เป็นโพรบเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* พบว่า ชิ้นส่วนของยีนดังกล่าวสามารถตรวจจับสัญญาณการแสดงออกได้ทั้ง *OsP5CS1* และ *OsP5CS2* ในกล้าข้าวอายุ 15 วันพบว่าความเค็มชักนำให้ข้าว LPT171 มีการแสดงออกของ *P5CS1* สูงขึ้น แต่ใน ข้าว LPT123 มีการแสดงออกของ *P5CS2* สูงขึ้น อย่างไรก็ดี เมื่อทำการตรวจสอบในกล้าข้าวอายุ 22 วันที่ได้รับภาวะเค็มพบว่า ทั้ง *P5CS1* และ *P5CS2* ในข้าวทั้งสองพันธุ์ / สายพันธุ์มีการแสดงออกมากขึ้น การโคลนบางส่วนของยีน *OsOAT* จากจีโนมของข้าว LPT123 และ ข้าว LPT171 ไม่สามารถทำได้ ผลของการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับยีน *OAT* นั้นกลับได้ส่วนของยีนอื่นๆ รวมทั้งบางส่วนของ transposable element mutator เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย Southern blot โดยใช้บางส่วนของ transposable element mutator และ *OAT* cDNA ของ mothbean (*Vigna acoutifolia*) เป็นโพรบพบว่า ได้รูปแบบของ hybridization เหมือนกัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่า ยีน *OAT* ในข้าวอาจถูกรบกวนโดยการแทรกของ transposable element มาก่อนในช่วงของวิวัฒนาการทำให้การโคลนจาก genomic DNA ทำได้ยาก อย่างไรก็ดี กิจกรรมของเอนไซม์ *OAT* สามารถตรวจพบได้ในข้าวทั้งสองพันธุ์ / สายพันธุ์ โดยเมื่อข้าว LPT171 ได้รับความเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบกิจกรรมของ *OAT* เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ข้าว LPT123 มีกิจกรรมของเอนไซม์ *OAT* เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับความเค็มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าการสังเคราะห์โพรลีนในข้าวใช้ทั้ง glutamate และ ornithine เป็นสารตั้งต้น จากงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่ากลไกการสะสมโพรลีนในข้าว LPT123 และ LPT171 ในภาวะเครียดมีระบบการควบคุมที่ต่างกันโดยพิจารณาจากความแตกต่างของปริมาณของโพรลีนที่สะสม การแสดงออกของยีน *P5CS* และช่วงเวลาการทำงานของเอนไซม์ *OAT* ที่เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับภาวะเครียด ซึ่งลักษณะต่างๆดังกล่าวนี้อาจส่งผลโดยรวมให้ข้าวทั้งสองพันธุ์ / สายพันธุ์มีความสามารถในการทนเค็มและแล้งแตกต่างกัน

## บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

**Project Title** Salt and Drought Tolerance Cross-talk and Proline Biosynthesis during Osmotic Stress in Rice (*Oryza sativa* L.)

**Name of the Investigators** Supachitra Chadchawan Pongtharin Lotrakul Thapana  
Bangyeekhun Montakan Vajrabhaya

**Year** October 2007

### Abstract

The salt-tolerant rice line, LPT171, obtained from somaclonal variation, was verified to have drought resistant ability. When LPT171 rice line and its original cultivar, LPT123, were grown under salt-stress condition, proline accumulation in leaf tissues was detected. LPT123 showed the significant higher level of leaf proline content after 1 week of salt stress, when compared to the proline content in LPT171 leaves. In contrast, the higher level of proline content of the two rice lines was similar during drought stress condition. This suggests that proline accumulation is the plant response to water and salinity stress, but it may not directly contribute to stress tolerant ability, because several mechanisms contribute to the salt tolerant ability, which is regulated by multiple genes. Partial *P5CS* gene was cloned from LPT171 genomic DNA and was used as a probe to detect *P5CS* gene expression during salt stress condition. It was found that in 15 day-old seedlings, *P5CS2* was responsible for proline synthesis in LPT123 during salt stress, while *P5CS1* was clearly induced in LPT171 during salt stress. However, in 22 day-old seedlings, both *P5CS* genes were induced by salt stress. Partial *OAT* gene was unable to be cloned from genomic DNA. The specific probes for *OAT* gene amplified other genes, including the partial sequence of transposable protein, Mutator. Based on the Southern blot hybridization, it was suggested that *OAT* gene in LPT123 and LPT171 rice was interfered with transposable element, *mutator* during its genome evolution, resulting in the difficulty for *OAT* gene cloning from rice genomic DNA. However, *OAT* activity could be detected in rice leaf tissues. *OAT* activity in LPT 171 rice was increased within 24 hours under salt stress condition, while LPT123 *OAT* activity was shown for up-regulation after 72 hours of salt stress. Therefore, it can be concluded that both glutamate and ornithine are the substrate for proline synthesis during salt stress condition in rice. It is also suggested that mechanisms for proline accumulation regulation during salt stress condition in the salt sensitive, LPT123 and the salt – tolerant line, LPT171 are different, according to the difference in the level of proline content, *P5CS* gene expression and timing for *OAT* up-regulation.

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
รายการตารางประกอบ	ฉ
รายการรูปประกอบ	ช
บทนำ	1
การสำรวจแนวคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
วิธีการวิจัย	7
ผลของการวิจัย	9
อภิปรายผลการวิจัย	30
สรุปผลการวิจัย	34
ข้อเสนอแนะ	35
การเผยแพร่ผลงานวิจัย	36
เอกสารอ้างอิง	37

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการตารางประกอบ

	หน้า
ตารางที่ 1 อัตราการรอดตายของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123)และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT-171) ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากการเจริญเติบโตในภาวะแล้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์และเจริญเติบโตในภาวะปกติเป็นเวลา 1 สัปดาห์	9
ตารางที่ 2 ปริมาณโพรลินในใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT-171 เมื่อปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v)	16
ตารางที่ 3 ปริมาณโพรลินในใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT-171 เมื่อปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี Polyethylene Glycol (PEG) 6000 ที่ความเข้มข้น 0 และ 22.5 กรัม / ลิตร (w/v)	17
ตารางที่ 4 ตารางแสดงความคล้ายคลึงลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสของ P5CS_580	19
ตารางที่ 5 ตารางแสดงความคล้ายคลึงลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสของP5CS_2KB_no.27	21

## รายการรูปประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 กระบวนการสังเคราะห์โพรตีนของพืช (ดัดแปลงจาก Roosens <i>et al.</i> , 1998)	5
รูปที่ 2 ความสูงในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT-171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)	12
รูปที่ 3 ความยาวรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT-171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)	12
รูปที่ 4 น้ำหนักสดต้นในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT-171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)	13
รูปที่ 5 น้ำหนักแห้งต้นในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT-171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)	13
รูปที่ 6 น้ำหนักสดรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT-171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)	14
รูปที่ 7 น้ำหนักแห้งรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT-171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)	14
รูปที่ 8 ปริมาณโพรตีนในใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT-171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์	16
รูปที่ 9 ปริมาณโพรตีนในใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT-171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 0 และ 22.5% (w/v) เป็นเวลา 18 วัน	17
รูปที่ 10 DNA fragment ที่ amplify ได้ ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นส่วนของ P5CS gene	18
รูปที่ 11 การแสดงออกของ P5CS genes ในข้าวพันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ LPT-171 ระยะ 3 ใบในภาวะปกติ และภาวะที่ได้รับความเค็ม	25



- รูปที่ 12 การแสดงออกของ *P5CS* genes ในข้าวพันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ LPT-171  
ระยะ 5 ใบในภาวะปกติ และภาวะที่ได้รับความเค็ม 25
- รูปที่ 13 การแสดงออกของยีน *P5CS* ในข้าวพันธุ์ LPT123 และ ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม  
LPT123-TC171 เมื่ออยู่ในภาวะปกติ (1) ภาวะปกติที่ได้รับการพ่นน้ำ(2) ภาวะปกติที่ได้รับ  
การพ่น 100 $\mu$ M ABA (3) ภาวะแล้ง (4) ภาวะแล้งที่ได้รับการพ่นน้ำ(5) หรือภาวะแล้งที่  
ได้รับการพ่น 100 $\mu$ M ABA (6) เป็นเวลา 3 6 9 12 และ 15 วัน 26
- รูปที่ 14 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนของ *OAT* gene ที่แปรความ  
เข้มข้นของ MgCl<sub>2</sub> 3 ระดับความเข้มข้น 27
- รูปที่ 15 Southern blot analysis โดยใช้ OAT0.6 15\_2 (A) และ *OAT* gene ของ *Vigna*  
*acoutifolia* (B) เป็น probe 29
- รูปที่ 16 *OAT* activity ในข้าวพันธุ์ LPT123 และ สายพันธุ์ LPT-171 เมื่ออยู่ในภาวะปกติ  
(non-stress) หรือ ได้รับความเค็ม ด้วย 85mM NaCl (salt stress) เป็นเวลา 0-72  
ชั่วโมง 29



## บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และของโลก จึงมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพ มาใช้ในการศึกษาและพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีการให้ผลผลิตที่ดีขึ้นทั้งในเชิงปริมาณ และคุณภาพ ในปัจจุบันเป็นที่ตระหนักแล้วว่าความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับสรีรวิทยาและชีวเคมีของข้าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเป็นพื้นฐานที่สำคัญที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาพันธุ์ข้าวตลอดจนการปรับปรุงวิธีการปลูกเพื่อเพิ่มผลผลิตให้ดียิ่งขึ้น (O'Toole *et al.*, 2001) สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ เช่น อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำเกินไป ภาวะการขาดน้ำ ภาวะเค็ม ล้วนแต่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเจริญเติบโตของพืช และอาจจะทำให้พืชตายได้หากต้องอยู่ในภาวะที่ไม่เหมาะสมนั้นนานเกินไป พืชที่มีความสามารถในการปรับตัวตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมนั้นๆ ได้ดีกว่า ก็จะมีโอกาสอยู่รอดได้มากกว่า ในบรรดาสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมทั้งหลาย ภาวะเค็มและภาวะแล้งนั้นเป็นปัจจัยที่มีผู้สนใจศึกษากันอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีผลทำให้เกิดความเสียหายต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชอย่างรุนแรง (Agrios, 1996)

ด้วยความพยายามที่จะพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของข้าว ศาสตราจารย์กิตติคุณ ดร.ถาวร และศาสตราจารย์กิตติคุณ มณฑกานติ วัชรภักย์ ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวทนเค็มจากเซลล์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์เหลืองประทิว (LPT) ในหลอดทดลอง (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) หลังจากได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะทนเค็มดังกล่าวมาถึง 6 ชั่วรุ่น สามารถคัดเลือกได้สายพันธุ์ข้าวที่มีความคงตัวทางด้านพันธุกรรม (LPT-171) ซึ่งมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาทางสรีรวิทยาและพันธุศาสตร์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับความทนเค็มในข้าว เนื่องจาก LPT และ LPT-171 มีความแตกต่างเฉพาะลักษณะความทนเค็ม ในขณะที่ลักษณะอื่นๆ และ genetic background มีความคล้ายคลึงกันมาก ดังนั้น ข้าวทั้งสองสายพันธุ์นี้จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษาทางสรีรวิทยาและพันธุศาสตร์ของลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความทนเค็ม โดยสามารถใช้ข้าวพันธุ์เหลืองประทิวพันธุ์ต้นกำเนิด (wild type rice line) เป็นพืชชุดควบคุมในการทำการทดลองศึกษาเปรียบเทียบการตอบสนองทางสรีรวิทยาและการแสดงออกทางพันธุกรรมกับข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกได้

ผลการศึกษาการตอบสนองของพืชที่เจริญภายใต้สภาวะเครียด (environmental stress) ในระดับชีววิทยาโมเลกุลพบว่า ยีนที่ตอบสนองต่อสิ่งเร้าทางกายภาพต่างๆ ที่ไม่เหมาะสมของพืชนั้นมักมีความเชื่อมโยงสัมพันธ์กัน (cross-talk) (Knight and Knight, 2001; Zhang and Klessig, 2001) ดังนั้น จึงเป็นที่น่าสนใจว่าพืชที่มีความสามารถในการทนเค็มได้ดีนั้นจะมีความสามารถในการทนภาวะแล้งได้ดีขึ้นด้วยหรือไม่เพียงใด

ศาสตราจารย์กิตติคุณ มณฑกานติ วัชรภักย์ และคณะ พบว่า ข้าวสายพันธุ์ทนแล้งที่ได้จากการกลายพันธุ์แล้วทำการคัดเลือกลักษณะทนแล้งที่ดีขึ้นจำนวน 4 สายพันธุ์ ล้วนมีความสามารถในการสะสมโพรลีน ซึ่งเป็น compatible solute ชนิดหนึ่ง ได้ในปริมาณสูงกว่าข้าวสายพันธุ์ต้นกำเนิดซึ่งมีความสามารถในการทนแล้งต่ำกว่า การสะสมโพรลีนที่มากขึ้นนี้อาจเป็นกลไกหนึ่งที่ข้าวใช้ในการต้านทานต่อภาวะขาดน้ำ (Vajrabhaya *et al.*, 2000) ซึ่งผลที่ได้นี้คล้ายคลึงกับงานวิจัยที่ทำการศึกษาค้นคว้าโดย Igarashi *et al.* (1997) ที่พบว่าข้าวพันธุ์ทนเค็มมีความสามารถในการสะสมโพรลีนสูงกว่าข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็ม อย่างไรก็ตาม Lutts *et al.* (1996) ก็มีข้อโต้แย้งเพราะได้ผลการทดลองในทางตรงกันข้าม และคาดว่าเกิดการสะสมโพรลีนนั้นเป็น

อาการที่แสดงถึง ความเสียหาย (injury) ของเซลล์พืชมากกว่าจะแสดงถึงความสามารถในการต้านทานต่อภาวะเค็ม เนื่องจากยังมีความขัดแย้งของข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับบทบาทของการสะสมโพรลีนในข้าวที่อยู่ภายใต้ภาวะเค็มดังกล่าว ดังนั้น การที่คณะผู้วิจัย มีสายพันธุ์ข้าว LPT-171 ซึ่งเป็น **mutated line** ซึ่งคาดว่ายีนที่เกิดการกลายพันธุ์นั้นเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับความทนเค็ม ก็จะสามารถนำข้าวสายพันธุ์นี้มาใช้ศึกษากระบวนการตอบสนองต่อภาวะเค็มในระดับโมเลกุลได้ และหากคณะผู้วิจัยสามารถพิสูจน์ได้ว่า การเกิดการกลายพันธุ์นั้นมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการสะสมโพรลีนในภาวะเค็ม และ/หรือ ภาวะแล้ง ก็อาจสามารถเชื่อมโยงข้อมูล กับบทบาทของการสะสมโพรลีนในภาวะแล้งและเค็ม ในข้าวได้อีกทางหนึ่ง

ในการศึกษาการสะสมโพรลีนของข้าวในภาวะเค็มในระดับโมเลกุลนั้น มีรายงานที่ เกิดจากการทำงานของยีน *P5CS* ( $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase) (Igarashi *et al.*, 1997) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโพรลีนโดยมี glutamate เป็นสารตั้งต้น (Yoshida *et al.*, 1995) ส่วนใน mothbean (*Vigna aconitifolia*) นั้น พบว่าการสะสมโพรลีนในภาวะเครียดเกิดจากกระบวนการสังเคราะห์โพรลีนที่มาจากการทำงานของ pathway ที่ต่างกันโดยจะขึ้นกับอายุของพืช กล่าวคือ เมื่อเป็นต้นกล้า หากได้รับภาวะเครียด mothbean จะสร้างโพรลีนเพิ่มขึ้นโดยพบว่ามี การแสดงออกของยีน *P5CS* และ *OAT* (*ornithine aminotransferase*) เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงว่า การสังเคราะห์โพรลีนที่เพิ่มขึ้นนี้อาจมาจากกระบวนการสร้างโพรลีนที่ใช้ glutamate เป็นสารตั้งต้น (จากการทำงานของ *P5CS*) และจากกระบวนการที่ใช้ ornithine เป็นสารตั้งต้น (จากการทำงานของ *OAT*) ส่วนในต้นที่เจริญเติบโตเต็มที่ หากได้รับภาวะเค็ม การสะสมโพรลีนที่สูงขึ้นนั้นพบว่ามีมาจากการทำงานของยีน *P5CS* เพียงอย่างเดียว เพราะเฉพาะยีน *P5CS* เท่านั้นที่มีการแสดงออกสูงขึ้น แต่อย่างไรก็ดี จากการศึกษาการสะสมโพรลีนในข้าวของกลุ่มนักวิจัยทั้งสองกลุ่มข้างต้น (Lutts *et al.*, 1996; Igarashi *et al.*, 1997) ทำการศึกษาในข้าวที่ได้รับความเค็มเมื่ออายุ 24 วันเท่านั้น ไม่ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างโพรลีนเมื่อข้าวได้รับภาวะเค็มในระยะต้นกล้า จากการรายงานในพืชหลายชนิดพบว่า พืชจะมีความไวต่อความเค็มอยู่ในสองระยะ คือในระยะที่เป็นต้นกล้า และในระยะที่จะมีการสร้างดอก และผล (reproductive stage) ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาว่า การสร้างโพรลีนในข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกได้นั้นมีการสร้างโดยใช้ pathway ไດ ซึ่งพิจารณาจากการแสดงออกของยีน *P5CS* และ *OAT* เมื่อข้าวได้รับภาวะเค็ม และเปรียบเทียบว่าการแสดงออกของยีนดังกล่าวเหมือนหรือแตกต่างจากสายพันธุ์เดิมหรือไม่ อย่างไร ซึ่งข้อมูลที่ได้จะนำไปสู่คำตอบว่า **gene mutation** ที่เกิดขึ้นที่ทำให้ความสามารถในการทนเค็มของข้าวพันธุ์นี้สูงขึ้นนั้นมาจากเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนในการสร้างโพรลีนดังกล่าวหรือไม่ อย่างไร และเมื่อข้าวสายพันธุ์นี้อยู่ในภาวะแล้งกระบวนการสะสมโพรลีนดังกล่าวเกิดขึ้น หรือไม่ อย่างไร

ข้อสรุปที่ได้จากการศึกษานี้จะสามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อการพัฒนาพันธุ์ข้าวทนเค็ม ตลอดจนนำไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์ทนเค็มของพืชอื่น ๆ ต่อไปอีกด้วย

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ตรวจสอบความสามารถในการทนแล้งของข้าวพันธุ์ทนเค็มที่ได้จากการกลายพันธุ์ในหลอดทดลอง (LPT-171) ของเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT)
2. เปรียบเทียบความสามารถในการสะสมโพรลีนในข้าวสายพันธุ์ LPT-171 และสายพันธุ์ LPT123 เมื่อเจริญเติบโตในภาวะแล้ง และภาวะเค็ม
3. ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *P5CS* และ *OAT* ในข้าวทั้งสองสายพันธุ์เมื่อได้รับภาวะเค็ม และภาวะแล้ง



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

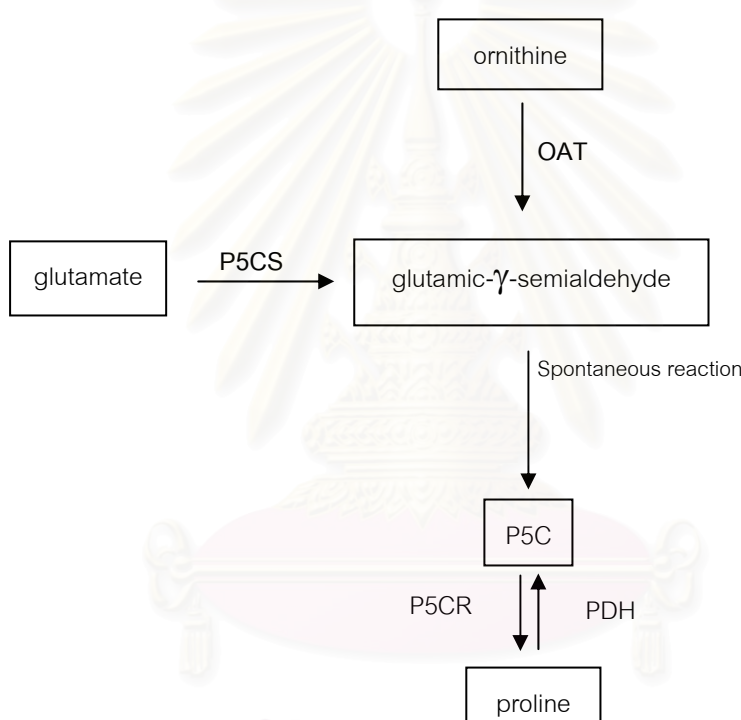
ภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม (environmental stress) ในพืชมีหลายรูปแบบ ทั้งความเครียดจากความร้อน ความเครียดจากเย็น ความแล้ง และความเค็ม เป็นต้น ไม่ว่าจะเป็นความเครียดจากภาวะใด ก็ล้วนแต่มีผลทำให้การเจริญเติบโตของพืชลดลง และมักนำไปสู่การลดลงของผลผลิต ในบรรดาความเครียดทั้งหลายเหล่านี้ osmotic stress ซึ่งเป็นความเครียดที่เกี่ยวข้องกับ ภาวะแล้ง และ ภาวะเค็มนี้ เป็นปัญหาที่สำคัญของพืชเพราะมีผลทำให้พืชมีการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตที่ลดลงอย่างชัดเจน (ศุภจิตรา ชัชวาลย์ และคณะ, 2545)

บทความปริทรรศน์หลายชิ้นในระยะหลัง (Knight and Knight, 2001; Zhang and Klessig, 2001; Zhu, 2001) ได้เสนอว่าการตอบสนองของพืชในภาวะแล้ง และ ภาวะเค็มนั้นมีลักษณะที่เชื่อมโยงกันได้ หรือที่เรียกว่ามี cross-talk ซึ่งกันและกัน ทั้งนี้เนื่องจากมีข้อมูลที่บ่งชี้ว่า การตอบสนองต่อภาวะแล้ง และภาวะเค็ม นั้นมีการใช้ signal transduction pathway บางส่วนร่วมกัน

ปรากฏการณ์การตอบสนองต่อภาวะเค็มและภาวะแล้ง ของสิ่งมีชีวิตอย่างหนึ่งคือการสะสมสารที่คาดว่าน่าจะมีผลเกี่ยวข้องกับการควบคุม osmolarity ของเซลล์ ที่เรียกว่าเป็น compatible solutes ซึ่งได้แก่ น้ำตาล และกรดอะมิโนชนิดต่างๆ เป็นต้น (Yordanov *et al.*, 2000) โพรลีนก็เป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่พบว่ามี การสะสมเพิ่มขึ้นในพืชหลายชนิดที่เผชิญกับ osmotic stress เช่น ข้าว (Igarashi *et al.*, 1997; Vajrabhaya *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 1997; Lutts *et al.*, 1996; Igarashi *et al.*, 2000) *Arabidopsis thaliana* (Roosens *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1996) มะเขือเทศ (Fujita *et al.*, 1998) และในถั่ว mothbean (*Vigna acountifolia*) (Delauney and Verma, 1993) เป็นต้น บทบาทของโพรลีนที่เพิ่มขึ้นมีด้วยกัน หลากหลาย เช่น มีผู้เสนอว่าโพรลีน มีบทบาทในการปรับ osmotic potential ภายในเซลล์ (Taiz and Zeiger, 1998) มีบทบาทต่อการรักษาสภาพของเอนไซม์ Rubisco (Solomon *et al.*, 1994) เมื่อพืชอยู่ใน ภาวะเครียด ช่วยรักษาโครงสร้างของเซลล์ (Van Rensburg *et al.*, 1993) และป้องกันการทำลายของ free radicals ที่เกิดขึ้นในภาวะเครียด (Alia *et al.*, 1995) ด้วยบทบาทดังกล่าวข้างต้นจึงมีผู้เสนอว่า พืชที่มีความสามารถในการสะสมโพรลีนได้มาก ควรจะสามารถทนต่อ osmotic stress ได้ดี ซึ่งมีผู้ทำการวิจัย สันนิษฐานแนวคิดดังกล่าวโดยพบว่า พืชสายพันธุ์ทนเค็ม และพืชสายพันธุ์ทนแล้ง ของพืชหลายชนิดสามารถ สะสมโพรลีนได้สูงกว่าพืชสายพันธุ์ที่มีความทนต่อสภาวะดังกล่าวต่ำกว่า (Vajrabhaya *et al.*, 2000; Igarashi *et al.*, 1997) จากการศึกษาใน transgenic rice ที่ได้รับการถ่ายยีน  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) ซึ่งเป็นยีนในกระบวนการสังเคราะห์โพรลีนจาก glutamate ได้แสดงให้เห็นว่า ข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนมีการเจริญเติบโตในภาวะเค็มดีขึ้น (Cheng *et al.*, 2001) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากการ overexpress ยีน P5CS ในยาสูบ ซึ่งพบว่ายาสูบสามารถทนเค็มได้ดีขึ้น (Kishor *et al.*, 1995) อย่างไรก็ดี ในพืชบางชนิดก็พบว่าพันธุ์ที่อ่อนแอกว่า กลับมีการสะสมโพรลีนสูงกว่า เช่น ในถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill) (พรศักดิ์ ภักดีวารภรณ์, 2543 และ รูปนา อัครเอกปัญญา, 2544) และในข้าว บางพันธุ์ (Lutts *et al.*, 1996) เป็นต้น Lutts *et al.*, (1996) จึงเสนอว่าการสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้นในข้าวที่ได้รับ ภาวะเค็มนี้ เป็นอาการที่แสดงถึงความเสียหาย (injury) ของเซลล์อันเนื่องมาจากความเค็มมากกว่าที่จะมี บทบาทที่ทำให้พืชมีความต้านทานต่อความเค็มสูงขึ้น นอกจากนี้ Garcia *et al.*(1997) ได้ทำการทดลองโดย ให้โพรลีนจากภายนอกแก่ข้าวแล้วพบว่าเกิดการกระตุ้น salt injury เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ดีก็มีผลการ ทดลองที่ขัดแย้งกัน ที่พบว่าข้าวพันธุ์ทนเค็มมีการสะสมโพรลีนสูงกว่าพันธุ์ที่ไม่ทนเค็ม (Igarashi *et al.*,

1997) จะเห็นได้ว่า การสะสมโพรลีนที่ตอบสนองต่อ osmotic stress ในพืชต่างชนิดนั้นมีความหลากหลายสูง และยังไม่เป็นที่ชัดเจนเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการสะสมโพรลีน และความสามารถในการทนเค็ม

สำหรับกลไกการสังเคราะห์โพรลีนในพืชโดยทั่วไป เริ่มจากการเปลี่ยน glutamic- $\gamma$ -semialdehyde แบบ spontaneous เป็น pyrroline-5-carboxylate (P5C) จากนั้นจึงถูก reduced โดยเอนไซม์ pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) ไปเป็น โพรลีน สาร P5C อาจถูกสร้างมาจาก glutamate หรือ ornithine โดย P5CS จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน glutamate เป็น P5C ส่วน OAT (ornithine- $\delta$ -aminotransferase) จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน ornithine เป็น P5C เช่นกัน (Stewart, 1981; Delauney and Verma, 1990; Delauney *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 1992) ดังภาพที่ 1



รูปที่1 กระบวนการสังเคราะห์โพรลีนของพืช (ดัดแปลงจาก Roosens *et al.*, 1998)

ใน mothbean ที่เจริญภายใต้ osmotic stress และได้รับไนโตรเจนในปริมาณจำกัด พบว่าการสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้น และพบว่าการแสดงออกของยีน *P5CS* เพิ่มขึ้น ในขณะที่ยีน *OAT* ถูกยับยั้งการแสดงออก จึงคาดว่า การแสดงออกของยีน *P5CS* ที่สูงขึ้นนี้เป็นผลให้มีการสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้น (Delauney and Verma, 1993) และเมื่อภาวะเครียดนั้นผ่านไปโพรลีนก็จะลดระดับลงดังเดิม ซึ่งมาจากการทำงานของเอนไซม์ proline dehydrogenase (PDH) และ P5C dehydrogenase (Kiyosue *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1996; Verbruggen *et al.*, 1996) ส่วนการสังเคราะห์โพรลีนในภาวะเครียดโดยเอนไซม์ *OAT* นั้นพบในต้นกล้าของ *Arabidopsis* ที่ได้รับความเค็ม โดยมีการสะสมของโพรลีนเกิดขึ้นซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของทั้ง *OAT* และ *P5CS* แต่เมื่อทำการศึกษาใน *Arabidopsis* ที่เจริญเต็มที่แล้ว เมื่อได้รับความเค็มกลับพบว่า มีเฉพาะ *P5CS* เท่านั้นที่แสดงออกมากขึ้น (Roosens *et al.*, 1998)



การวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาว่า การสร้างโปรตีนในข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ ระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีกระบวนการสร้างจาก pathway ใด โดยพิจารณาจากการแสดงออกของยีน *P5CS* และ *OAT* เมื่อข้าวได้รับภาวะเค็มในสองช่วงอายุ และเปรียบเทียบว่าการแสดงออกของยีนดังกล่าว เหมือนหรือแตกต่างจากกระบวนการในสายพันธุ์เดิมหรือไม่ อย่างไร ซึ่งจะนำไปสู่คำตอบว่า gene mutation ที่เกิดขึ้นแล้วทำให้ความสามารถในการทนเค็มของข้าวพันธุ์นี้สูงขึ้นนั้นมาจากกระบวนการดังกล่าวหรือไม่ อย่างไร และเมื่อข้าวอยู่ภาวะแล้งกระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นหรือไม่ อย่างไร



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## วิธีการวิจัย

### พืชทดลอง

ในการทดลองทุกการทดลอง ใช้ข้าว (*Oryza sativa* L.) 2 สายพันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 สายพันธุ์ wild type (LPT) และข้าวสายพันธุ์กลายพันธุ์ (mutated line : LPT-171) ที่คัดจากเนื้อเยื่อของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และผ่านการคัดเลือกลักษณะทนเค็มแล้วอย่างน้อย 6ชั่วรุ่น (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991)

### การวางแผนการทดลอง

การเปรียบเทียบการเจริญเติบโต การเปรียบเทียบปริมาณโพรลินในเนื้อเยื่อใบข้าวที่เจริญเติบโตในภาวะต่างๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) และมีจำนวนซ้ำ (replicate) ไม่น้อยกว่า 4 ซ้ำ

### ขั้นตอนวิธีการวิจัย

#### 1. การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT-171)

ศึกษาความสามารถในการทนแล้ง โดยการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของข้าว LPT-171 กับข้าว LPT เมื่อเจริญเติบโตในภาวะแล้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ การให้ภาวะแล้งทำโดยการใช้สาร polyethylene glycol (PEG) 6000 ตามวิธีของ Vajrabhaya *et al.* (2001) การวัดการเจริญเติบโตทำโดยการวัดน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นและราก ความสูงของต้น และความยาวของราก ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้ววิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติจากแผนการทดลองที่ได้วางไว้ มีการทดลองชุดควบคุมคือข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตในภาวะปกติ

#### 2. การศึกษาความสามารถในการสะสมโพรลิน ในข้าวทั้งสองสายพันธุ์เมื่อเจริญเติบโตในภาวะแล้งหรือเค็ม

2.1 ทำการตรวจวัดปริมาณโพรลินในใบข้าว ตามวิธีของ Bates *et al.* (1973) ในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อเจริญเติบโตในภาวะปกติ คือในสารละลายธาตุอาหารสูตร modified WP (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) เปรียบเทียบกับเมื่อเจริญในภาวะเค็มคือ ในสารละลายธาตุอาหารสูตรเดียวกันที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 85 mM และควบคุมค่า EC (electroconductivity) ให้อยู่ประมาณ 9-10 dS/m เก็บผลการทดลอง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้ววิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณโพรลินตามแผนการทดลองทางสถิติที่วางไว้

2.2 ทำการตรวจวัดปริมาณโพรลินในใบข้าวตามวิธีของ Bates *et al.* (1973) ในข้าวทั้งสองสายพันธุ์เมื่อเจริญเติบโตในภาวะปกติ เช่นเดียวกับในข้อ 2.1 เปรียบเทียบกับเมื่อเจริญในภาวะแล้ง การให้ภาวะแล้งทำเช่นเดียวกันกับข้อ 1 เก็บผลการทดลองทุก 3 วัน เป็นเวลา 18 วัน แล้วเปรียบเทียบวิเคราะห์ปริมาณโพรลินตามแผนการทดลองทางสถิติที่วางไว้

#### 3. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรลิน ในข้าวที่เจริญในภาวะเครียด

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรลินมีหลายยีนด้วยกัน แต่เพื่อที่จะศึกษาว่า ในภาวะเค็ม หากมีการสร้างโพรลินเพิ่มมากขึ้น เพื่อตอบสนองต่อภาวะเค็มนั้น โพรลินที่ถูกสร้างขึ้นนี้มาจากกรดอะมิโนชนิดใด ระหว่าง ornithine และ glutamate จึงเลือกศึกษายีนที่เกี่ยวข้องทั้ง 2 ชนิดคือ OAT และ P5CS

##### 3.1 การศึกษาการทำงานของยีน P5CS มีขั้นตอนดังนี้

3.1.1 partial amplification ของยีน P5CS โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งจะอาศัยการออกแบบ primers จาก conserved sequences ของยีน P5CS ที่เก็บใน GENBANK แล้ว amplify



fragment ของยีนดังกล่าวจาก genomic DNA ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 ศึกษาลำดับเบสเพื่อตรวจสอบว่าเป็นยีน *P5CS* ที่ถูกต้อง

3.1.2 ศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* โดยใช้ชิ้นส่วนของยีนที่โคลนได้ในข้อ 3.1.1 เป็น probe ในเนื้อเยื่อใบข้าวจากต้นข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งได้รับความเค็ม 85 mM NaCl ในระยะอายุ 3 ใบ ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

3.1.3 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.2 แต่เปลี่ยนเนื้อเยื่อใบข้าวเป็นข้าวที่ได้รับความเค็ม เมื่ออยู่ในระยะ 5 ใบ

3.1.4 ศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* โดยใช้ชิ้นส่วนของยีนที่โคลนได้ในข้อ 3.1.1 เป็น probe ในเนื้อเยื่อใบข้าวจากต้นข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งได้รับความเค็มโดยการเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่มีการเติม PEG6000 ที่ระดับความเข้มข้น 225 g/l ในระยะอายุ 3 ใบ ทุก 3 วัน เป็นเวลา 15 วัน

3.2 การศึกษาการทำงานของยีน *OAT* มีขั้นตอนดังนี้

3.2.1 partial amplification ของยีน *OAT* โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งจะอาศัยการออกแบบ primers จาก conserved sequences ของยีน *OAT* ที่เก็บใน GENBANK แล้ว amplify fragment ของยีนดังกล่าวจาก genomic DNA ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 แล้วศึกษาลำดับเบส

3.2.2 ศึกษา *OAT* gene organization โดยใช้ *OAT* ของ *Vigna acoutifolia* เป็น probe เปรียบเทียบกับการใช้ partial fragment ของ putative *OAT* ที่โคลนได้จากข้อ 3.2.2

3.2.3 ศึกษาการทำงานของ *OAT* โดยการศึกษา enzyme activity ของ *OAT* ตามวิธีของ Kim et al. (1994) เมื่อปลูกข้าวทั้งสองสายพันธุ์/พันธุ์ ในภาวะเค็ม

4. วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

## ผลของการวิจัย

### 1. การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง

#### 1.1 การศึกษาภาวะแล้งที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง

เมื่อปลูกข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 ในภาวะแล้งที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 150 200 250 และ 300 g/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายปลูกให้เจริญในภาวะปกติซึ่งไม่มี PEG 6000 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการนับจำนวนต้นข้าวที่เหลืองในแต่ละสัปดาห์เพื่อหาอัตราการรอดตายของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ 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 LPT-171 มีการแสดงออกของการทนต่อภาวะแล้งได้ดีกว่าข้าวสายพันธุ์เดิม โดยมีความแตกต่างของอัตราการรอดตายของข้าวทั้งสองสายพันธุ์สูงที่สุดเมื่อปลูกในภาวะแล้งที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 200 g/l ดังนั้นที่ความเข้มข้นของ PEG 6000 ที่ 200 g/l จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดลองต่อไป

**ตารางที่ 1** อัตราการรอดตายของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT-171) ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากการเจริญเติบโตในภาวะแล้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และเจริญเติบโตในภาวะปกติเป็นเวลา 1 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ PEG 6000 (g/l)	อัตราการรอดตายของต้นข้าว (%)		ความแตกต่างของอัตราการรอดตายของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ (%)
	LPT123	LPT-171	
0	100	100	0
150	97	100	3
200	62	91	29
250	10	13	3
300	0	4	4

## 1.2 การเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 ในภาวะแล้ง

ศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 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 LPT-171 ตลอดระยะเวลาการทดลองเป็นเวลา 7 สัปดาห์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อปลูกในภาวะปกติ แต่เมื่อให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์พบว่า ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 มีการเติบโตทางด้านความสูงมากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิม โดยมีความสูงแตกต่างกันทางสถิติ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 จนกระทั่งถึงสัปดาห์ที่ 6 แต่เมื่อสิ้นสุดการให้ภาวะแล้งในสัปดาห์ที่ 7 ความสูงของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่ผ่านการปลูกในภาวะแล้งยังคงต้นเตี้ยกว่าข้าวที่ปลูกในภาวะปกติมาโดยตลอด (รูปที่ 2)

### 1.2.2 ความยาวราก

ความยาวรากของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 เมื่อปลูกในภาวะปกติพบว่า ความยาวรากของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ตลอดระยะเวลาการทดลอง เมื่อให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์พบว่า ภายหลังจากให้ภาวะแล้งเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ข้าวสายพันธุ์เดิมมีความยาวรากน้อยกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมที่เจริญในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 มีความยาวรากไม่แตกต่างจากข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 ที่เจริญในภาวะปกติ แต่เมื่อต้นข้าวอยู่ในภาวะแล้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 และข้าวสายพันธุ์เดิมมีความยาวรากไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่อยู่ในภาวะแล้งยังมีความยาวรากน้อยกว่าชุดควบคุม อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ คือในสัปดาห์ที่ 5 พบว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 ที่อยู่ในภาวะแล้งสามารถกลับมาที่มีความยาวรากไม่แตกต่างจากข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 ที่เจริญในภาวะปกติ ต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิมที่อยู่ในภาวะแล้งยังคงมีความยาวรากน้อยกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมที่เจริญในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเวลาผ่านไป ความยาวรากของข้าวที่อยู่ในภาวะแล้งทั้งสองสายพันธุ์มีค่าน้อยกว่าข้าวที่เติบโตในภาวะปกติ (รูปที่ 3)

### 1.2.3 น้ำหนักสดต้น

เมื่อวัดน้ำหนักสดต้นของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 ที่ปลูกในภาวะปกติพบว่า โดยส่วนใหญ่ตลอดระยะเวลาของการทดลอง ข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีน้ำหนักสดต้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้นในสัปดาห์ที่ 4 ที่ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 มีน้ำหนักสดต้นมากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์ปรากฏว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 มีน้ำหนักสดต้นมากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 จนกระทั่งถึงสัปดาห์ที่ 6 และเมื่อสิ้นสุดการให้ภาวะแล้งเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7) ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 ก็ยังคงมีน้ำหนักสดต้นมากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิม อย่างไรก็ตามข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 ที่อยู่ในภาวะแล้งจะมีน้ำหนักสดต้นน้อยกว่าข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่ปลูกในภาวะปกติ (รูปที่ 4)

### 1.2.4 น้ำหนักแห้งต้น

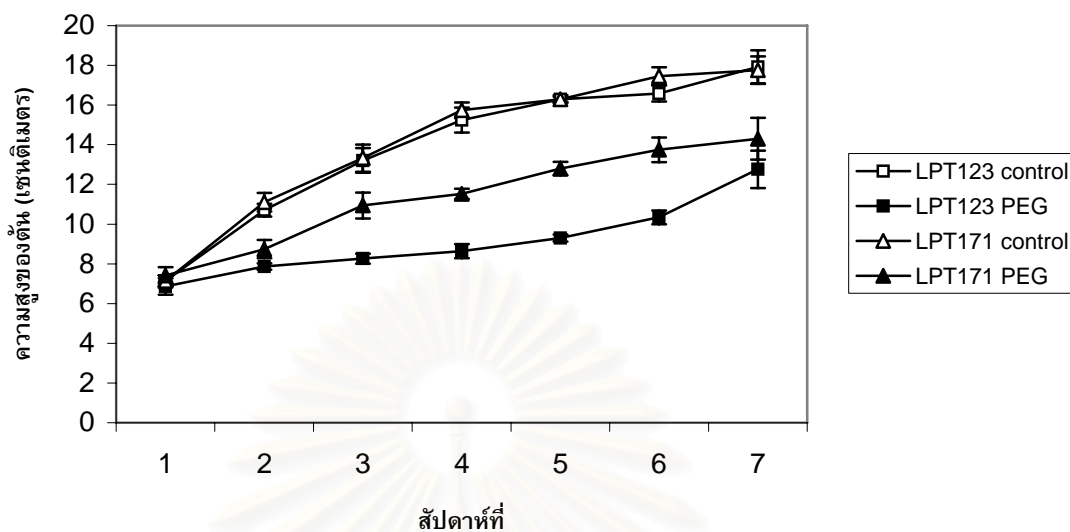
ข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 ที่เจริญในภาวะปกติ จะมีน้ำหนักแห้งต้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในช่วง 6 สัปดาห์แรกของการทดลอง แต่ในสัปดาห์ที่ 7 พบว่าข้าวสายพันธุ์เดิมมีน้ำหนักแห้งต้นมากกว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์พบว่า น้ำหนักแห้งต้นของข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 มากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมที่ปลูกในภาวะแล้งเช่นกันอย่างเห็นได้ชัด ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 จนกระทั่งถึงสัปดาห์ที่ 7 เป็นที่น่าสังเกตว่าภายหลังการให้ภาวะแล้งเป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีผลทำให้น้ำหนักแห้งต้นของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ต่ำกว่าต้นที่เจริญในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่ออยู่ในภาวะแล้ง 2 สัปดาห์ ข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีน้ำหนักแห้งต้นไม่แตกต่างกันจากกล้าข้าวในชุดควบคุม อย่างไรก็ตามในสัปดาห์ที่ 3 หลังจากได้รับภาวะแล้งมีเฉพาะข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 เท่านั้นที่ยังคงรักษาน้ำหนักแห้งไว้ได้ใกล้เคียงกับต้นข้าวที่เจริญในภาวะปกติ ต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิมที่มีน้ำหนักแห้งต้นต่ำกว่าข้าวที่เจริญในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 5)

### 1.2.5 น้ำหนักสดราก

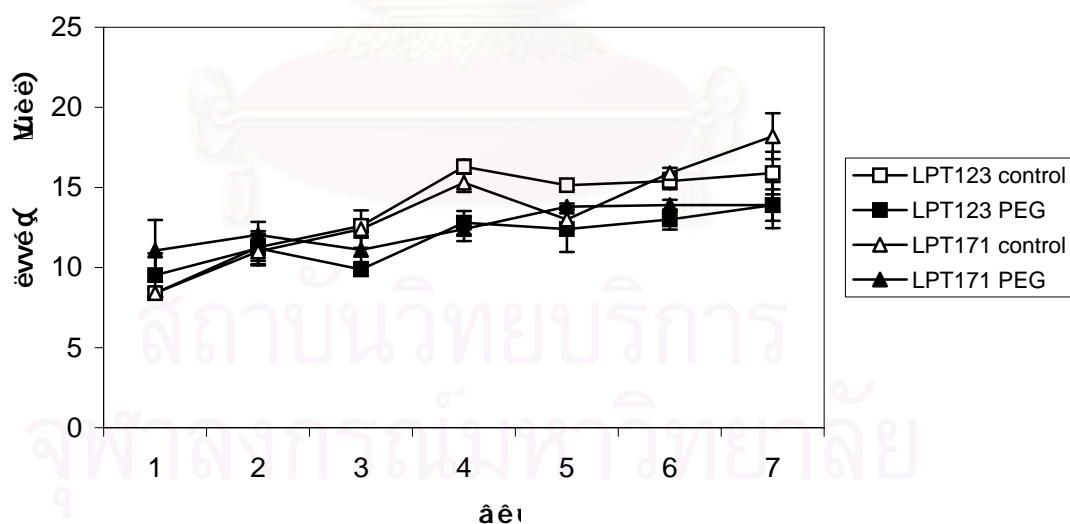
เมื่อวัดน้ำหนักสดรากของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 ที่เจริญในภาวะปกติ ตลอดระยะเวลา 6 สัปดาห์ของการทดลอง พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทำการทดลองจนกระทั่งถึงสัปดาห์ที่ 7 พบว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 มีน้ำหนักสดรากมากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์ปรากฏว่าภายหลังการให้ภาวะแล้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีเฉพาะข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 เท่านั้นที่ยังคงรักษาน้ำหนักสดรากไว้ได้ใกล้เคียงกับข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 ที่เจริญในภาวะปกติ ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์เดิมที่ได้รับภาวะแล้งมีน้ำหนักสดรากต่ำกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมที่เจริญในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญ แต่หลังจากสัปดาห์ที่ 4 ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 ที่ได้รับภาวะแล้งจะมีน้ำหนักสดรากไม่แตกต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิมที่อยู่ในภาวะแล้งเช่นกัน และข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่อยู่ในภาวะแล้งนี้มีน้ำหนักสดรากลดกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 6)

### 1.2.6 น้ำหนักแห้งราก

น้ำหนักแห้งรากของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อปลูกในภาวะปกติ ตลอดระยะเวลาการทดลอง เมื่อให้ภาวะแล้งแก่ข้าวทั้งสองสายพันธุ์พบว่า ในช่วง 2 สัปดาห์แรกหลังจากให้ภาวะแล้ง ข้าวทั้งสองสายพันธุ์มีน้ำหนักแห้งรากไม่แตกต่างจากกล้าข้าวในชุดควบคุม หลังจากให้ภาวะแล้งเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ข้าวสายพันธุ์เดิมมีน้ำหนักแห้งรากลดกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมที่เจริญในภาวะปกติ ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 มีน้ำหนักแห้งรากไม่แตกต่างจากข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 ที่เจริญในภาวะปกติและยังคงรักษาน้ำหนักแห้งรากไว้ได้ใกล้เคียงกับน้ำหนักแห้งรากของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในชุดควบคุม ต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิมที่มีน้ำหนักแห้งรากลดกว่าข้าวที่เจริญในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 6 อย่างไรก็ตาม หลังสิ้นสุดการให้ภาวะแล้งเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าน้ำหนักแห้งรากของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่เจริญในภาวะแล้ง มีค่าต่ำกว่าน้ำหนักแห้งรากของข้าวที่เจริญเติบโตในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 7)

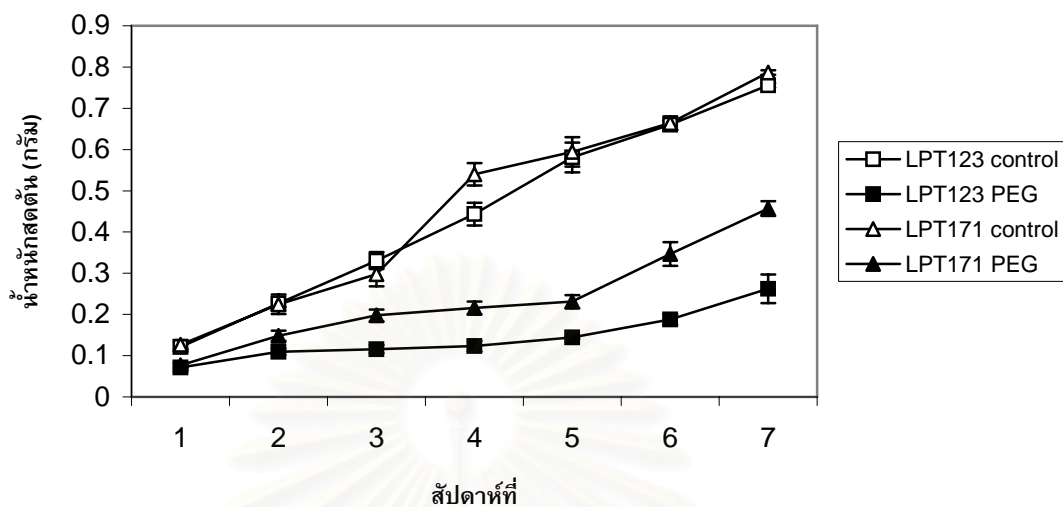


รูปที่ 2 ความสูงในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT-171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)

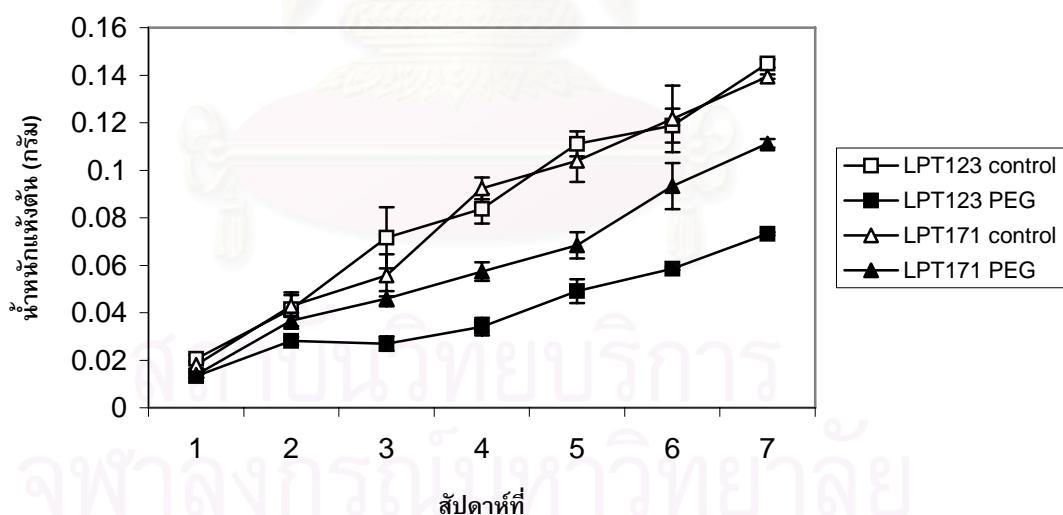


รูปที่ 3 ความยาวรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT-171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่7)

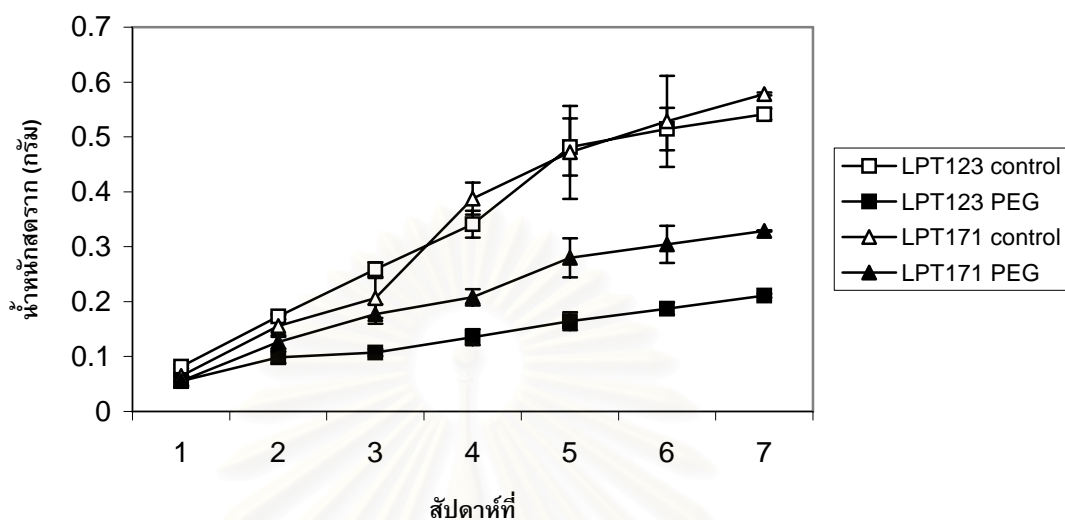




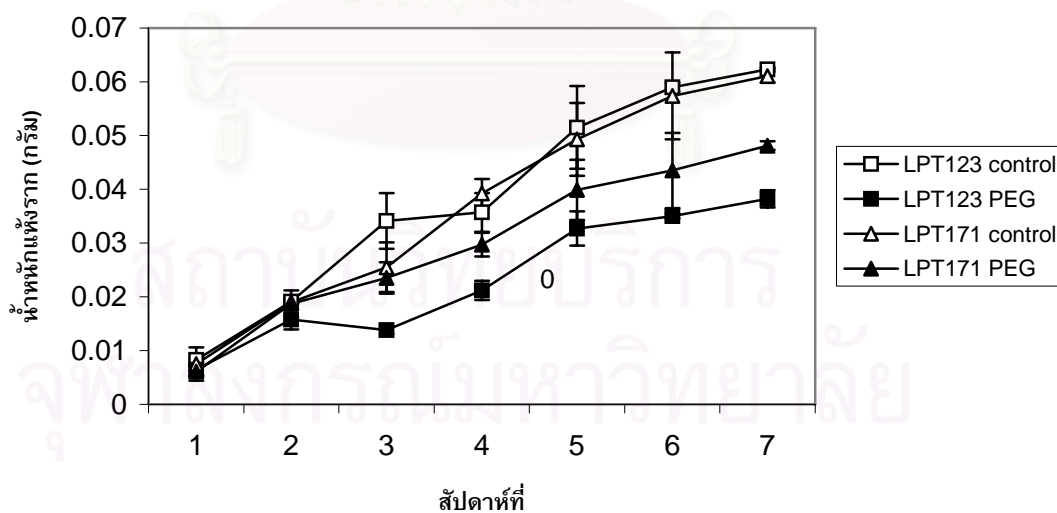
รูปที่ 4 น้ำหนักสดต้นในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT-171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)



รูปที่ 5 น้ำหนักแห้งต้นในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT-171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)



รูปที่ 6 น้ำหนักสตรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT-171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)



รูปที่ 7 น้ำหนักแห้งสตรากในแต่ละสัปดาห์ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) และข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT-171) รุ่นที่ 10 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์และหลังจากเจริญในภาวะปกติ 1 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 7)



## 2. การศึกษาปริมาณโพรลินในใบของกล้าข้าวอายุ 22 วัน พันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 เมื่อเติบโตในภาวะเค็ม หรือ ภาวะแล้ง

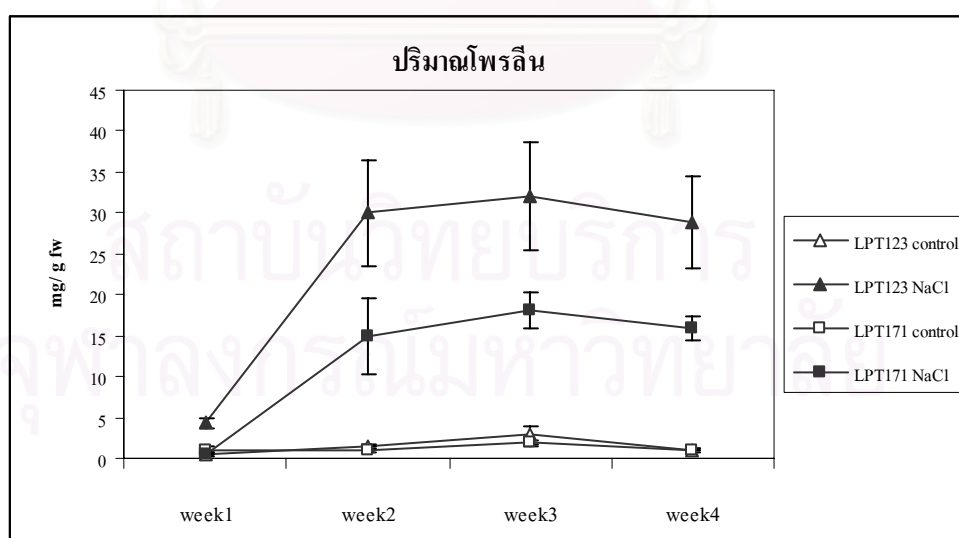
2.1 วัดปริมาณโพรลินของข้าว LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 ที่ย้ายปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5% (w/v) เมื่อให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณโพรลินของข้าวทั้งสองสายพันธุ์เมื่อได้รับภาวะปกติไม่มีความแตกต่างกันทางสถิตินับแต่สัปดาห์ที่ 2 ตลอดการทดลอง แต่เมื่อได้รับภาวะเค็ม ปริมาณโพรลินของข้าวสายพันธุ์เดิมมากกว่าปริมาณโพรลินของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มเมื่อได้รับภาวะเค็มตลอดการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโพรลินในข้าวสายพันธุ์ทั้งสองสายพันธุ์เมื่อได้รับภาวะเค็มกับปริมาณโพรลินในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในภาวะปกติ พบว่าปริมาณโพรลินของข้าวสายพันธุ์เดิมที่ได้รับภาวะเค็มมากกว่าปริมาณโพรลินของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญตลอดการทดลองการทดลอง และปริมาณโพรลินของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มเมื่อได้รับภาวะเค็มมากกว่าปริมาณโพรลินของข้าวทั้งสองสายพันธุ์เมื่อปลูกในภาวะปกติ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง(ตารางที่ 2, รูปที่ 8)

2.2 วัดปริมาณโพรลินของข้าว LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 ที่ย้ายปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 0 และ 22.5% (w/v) พบว่า ปริมาณโพรลินของข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ เมื่อเติบโตในภาวะปกติไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อให้ภาวะแล้ง ที่ระดับของ PEG ความเข้มข้น 22.5 % ซึ่งปรับจากภาวะที่ใช้ในการเปรียบเทียบความสามารถในการทนภาวะแล้ง ที่ระดับ 20 % เล็กน้อยเพื่อให้เห็นผลการตอบสนองชัดเจนยิ่งขึ้น พบว่าข้าวสายพันธุ์ LPT-171 มีการสะสมโพรลินได้เร็วกว่า LPT123 เล็กน้อย แต่อย่างไรก็ดี ภายหลังจากการที่อยู่ในภาวะเป็นแล้งเป็นเวลา 18 วัน LPT123 มีปริมาณโพรลินในใบสูงกว่า LPT-171 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3, รูปที่ 9)

ตารางที่ 2 ปริมาณโพรลินในใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT-171 เมื่อปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตรตัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v)

สายพันธุ์และ ภาวะปลูก	ปริมาณโพรลิน (มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักสด )			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
LPT123 NaCl 0%(w/v)	0.4387(±0.0791) <sup>a</sup>	1.5219(±0.1266) <sup>a</sup>	2.8531(±1.0403) <sup>a</sup>	1.0807(±0.1729) <sup>a</sup>
LPT123 NaCl 0.5%(w/v)	4.3323(±0.5852) <sup>c</sup>	30.001(±6.4078) <sup>c</sup>	31.951(±6.6116) <sup>c</sup>	28.7941(±5.6451) <sup>c</sup>
LPT-171 NaCl 0%(w/v)	1.0800(±0.4377) <sup>b</sup>	0.9584(±0.2986) <sup>a</sup>	1.9102(±0.3965) <sup>a</sup>	0.87439(±0.2466) <sup>a</sup>
LPT-171 NaCl 0.%(w/v)	0.5748(±0.0954) <sup>ab</sup>	14.935(±4.6875) <sup>b</sup>	18.101(±2.1383) <sup>b</sup>	15.8858(±1.4984) <sup>b</sup>

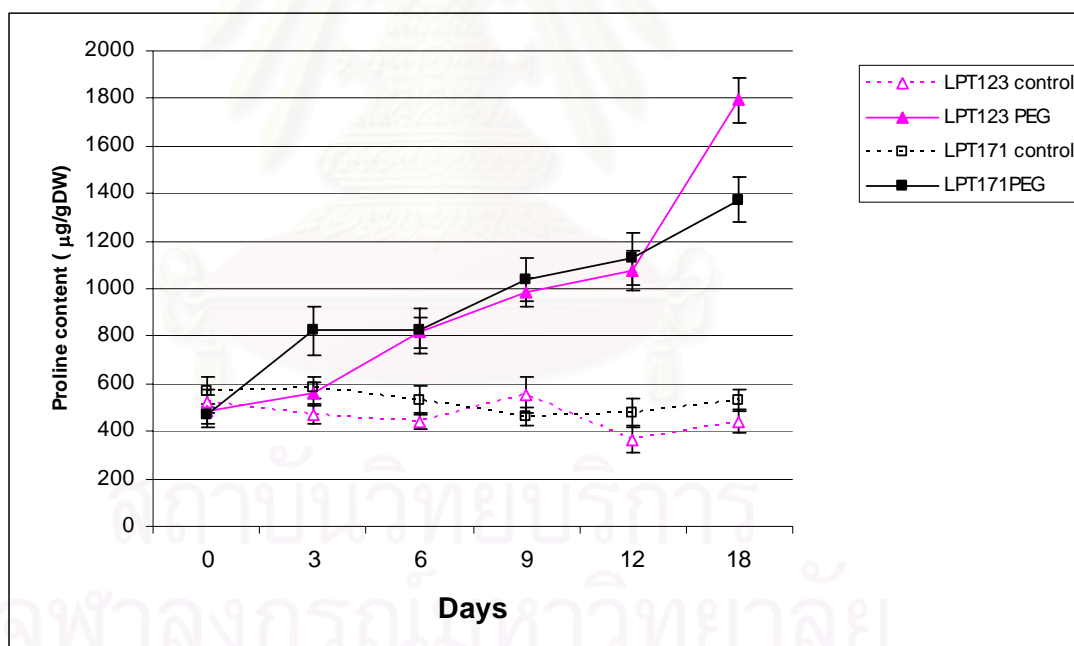
ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันหลังตัวเลขในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P< 0.05)



รูปที่ 8 ปริมาณโพรลินในใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT-171 รุ่นที่ 6 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรตัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.5%(w/v) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 3 ปริมาณโพรลีนในใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT-171 เมื่อปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 22 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี Polyethylene Glycol (PEG) 6000 ที่ความเข้มข้น 0 และ 22.5 กรัม / ลิตร (w/v)

สายพันธุ์และ ภาวะปลูก	ปริมาณโพรลีน (มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง )					
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12	วันที่ 18
LPT123 PEG 0%(w/v)	0.52 ± 0.05	0.47 ± 0.04	0.44 ± 0.04	0.55 ± 0.08	0.37 ± 0.06	0.44 ± 0.05
LPT123 PEG 22.5%(w/v)	0.48 ± 0.07	0.56 ± 0.05	0.81 ± 0.06	0.99 ± 0.06	1.08 ± 0.08	1.79 ± 0.09
LPT-171 PEG 0%(w/v)	0.57 ± 0.05	0.59 ± 0.05	0.53 ± 0.06	0.46 ± 0.04	0.48 ± 0.06	0.53 ± 0.05
LPT-171 PEG 22.5 % (w/v)	0.47 ± 0.03	0.83 ± 0.10	0.82 ± 0.09	1.04 ± 0.09	1.13 ± 0.11	1.37 ± 0.10



รูปที่ 9 ปริมาณโพรลีนในใบของต้นข้าว LPT123 และข้าว LPT-171 เมื่อปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มี PEG 0 และ 22.5% (w/v) เป็นเวลา 18 วัน

### 3. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรีลิน ในข้าวที่เจริญในภาวะเครียด

#### 3.1 การศึกษาการทำงานของยีน *P5CS*

3.1.1 การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ amplified ขึ้นด้วย primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *P5CS*

เมื่อทำการ amplify genomic DNA ของข้าวโดยใช้ specific primer สำหรับ *P5CS* gene คือ *P5CSa* (5'-gcatcaggwgcgkgactcaa-3') และ *P5CSs* (5'-ctsatggctctctacgata-3') และใช้ annealing temperature 2 แบบ คือ 41° และ 43°C พบว่าสามารถ amplify DNA ได้ 2 fragment ขนาด ประมาณ 600 bp และ 2000 bp ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 DNA fragment ที่ amplify ได้ ซึ่งคาดว่าจะน่าจะเป็นส่วนของ *P5CS* gene

เมื่อทำการโคลนและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า มีขนาด 580 คู่เบส (ลำดับเบสแสดงในภาคผนวก ค) กำหนดชื่อเป็น *P5CS\_580* เมื่อทำการตรวจสอบหาชิ้นส่วน DNA ที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกันด้วย program BLASTN 2.2.8 (Altschu *et al.*, 1997) แล้วพบว่าคล้ายคลึงกับลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสดังนี้

ตารางที่ 4 ตารางแสดงความคล้ายคลึงลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสของ P5CS\_580

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

เมื่อตรวจสอบด้วย program tblastx ผ่านทาง web site <http://www.tigr.org/> พบว่า P5CS\_580 คาดว่าเป็นส่วนของ DNA fragment ที่คล้ายคลึงกับ putative retroelement ในข้าว

```
>RF|NP_921344.1|37534084|NM_196362 putative retroelement {Oryza sativa
(japonica cultivar-group);} (exp=-1; wgp=0; cg=0;
closed=0; pub=1;
rf_status=provisional;
)^|^GB|AAP53631.1|31431925|AE016959
transposon protein, putative, CACTA, En/Spm sub-class
{Oryza sativa
(japonica cultivar-group);} (exp=-1; wgp=1; cg=0;
closed=0; pub=0;
rf_status=; )|^|^GB|AAM01120.1|19881719|AC108884 Putative
retroelement {Oryza sativa (japonica cultivar-group);}
(exp=-1;
wgp=1; cg=0; closed=0; pub=0; rf_status=; )
Length = 266
```

Score = 1372 (488.0 bits), Expect = 2.4e-139, P = 2.4e-139  
Identities = 266/266 (100%), Positives = 266/266 (100%)

```
Query: 1 MLALIARAIEMGYLFRRTRQKRERIPPALHEGRLIGKGTVGKKRFYDDDYKAVAEAHSSV 60
MLALIARAIEMGYLFRRTRQKRERIPPALHEGRLIGKGTVGKKRFYDDDYKAVAEAHSSV
Sbjct: 1 MLALIARAIEMGYLFRRTRQKRERIPPALHEGRLIGKGTVGKKRFYDDDYKAVAEAHSSV 60
Query: 61 LQQLAILELYIDEKHKNEIRACNRRSATWISKEQKHKFPPELLKQNLSEFGESLEEKNIA 120
LQQLAILELYIDEKHKNEIRACNRRSATWISKEQKHKFPPELLKQNLSEFGESLEEKNIA
Sbjct: 61 LQQLAILELYIDEKHKNEIRACNRRSATWISKEQKHKFPPELLKQNLSEFGESLEEKNIA 120
Query: 121 EAGKWPNLPRDLMASIVEKEKIGEFVARREHDELTAALGTAESGRVGRGKSSRTSWNVGF 180
EAGKWPNLPRDLMASIVEKEKIGEFVARREHDELTAALGTAESGRVGRGKSSRTSWNVGF
Sbjct: 121 EAGKWPNLPRDLMASIVEKEKIGEFVARREHDELTAALGTAESGRVGRGKSSRTSWNVGF 180
Query: 181 PKESKSYKKRDTYNTKLREKKVTQOVTQQFYRLAAQHPQAFPYLTPQAEQTVQIPSSIGS 240
PKESKSYKKRDTYNTKLREKKVTQOVTQQFYRLAAQHPQAFPYLTPQAEQTVQIPSSIGS
Sbjct: 181 PKESKSYKKRDTYNTKLREKKVTQOVTQQFYRLAAQHPQAFPYLTPQAEQTVQIPSSIGS 240
Query: 241 IETTSYSVDLITGPTPCNLVVPIGKA 266
IETTSYSVDLITGPTPCNLVVPIGKA
Sbjct: 241 IETTSYSVDLITGPTPCNLVVPIGKA 266
```

```
>GB|AAK50402.1|13940600|AC021891 Putative retroelement {Oryza sativa
(japonica
  cultivar-group);} (exp=-1; wgp=1; cg=0; closed=0; pub=0;
  rf_status=; )
  Length = 406
```

Score = 586 (211.3 bits), Expect = 4.6e-56, P = 4.6e-56  
Identities = 126/188 (67%), Positives = 145/188 (77%)

```
Query: 24 RIPPALHEGRLIGKGTVGKKRFYDDDYKAVAEAHSSVLQQLAILELYIDEKHKNEIRACN 83
RIPPALHEGRLIGKGTVGKKRFYDDDYKAVAEAHSSVLQQLAILELYIDEKHKNEIRACN
Sbjct: 123 RIPPALHEGRLIGKGTVGKKRFYDDDYKAVAEAHSSVLQQLAILELYIDEKHKNEIRACN 182

Query: 84 PRRSATWISKEQKHKFPPELLKDQNLSEFESLEEKNIAGKWPNLPRDLMASIVEKEKIG 143
PRRSATWISKEQKHKFPPELLKDQNLSEFESLEEKNIAGKWPNLPRDLMA G
Sbjct: 183 PRRSATWISKEQKHKFPPELLKDQNLSEFESLEEKNIAGKWPNLPRDLMAMYGIN---G 239

Query: 144 EFVARREHDELTAALGTAEHSGRV-RGKSSRTSWNV-GFPKESKSYKKRDTYNTKLRREK 201
+ DE +AA +A + G V + +++++ ++ G P + R T N + ++K
Sbjct: 240 YMFYMKGKDEKSAQNSA-YDGHVDQWRATKETFAAEGKPLLQPLNPR-TRNWIVEKEK 297

Query: 202 VTQQVTQQ 209
+ + V ++
Sbjct: 298 IGEFVARR 305
```

Score = 548 (198.0 bits), Expect = 1.6e-62, Sum P(2) = 1.6e-62  
Identities = 115/131 (87%), Positives = 115/131 (87%)

```
Query: 136 IVEKEKIGEFVARREHDELTAALGTAEHSGRVGKSSRTSWNVGFPKESKSYKKRDTYNT 195
IVEKEKIGEFVARREHDELTAALGTAEHSGR ESKSYKKRDTYNT
Sbjct: 292 IVEKEKIGEFVARREHDELTAALGTAEHSGR-----ESKSYKKRDTYNT 335

Query: 196 KLREKVTQQVTQQFYRLAAQHPQAFPYLTPQAEQTVQIPSSIGSIETTSYSVDLITGPT 255
KLREKVTQQVTQQFYRLAAQHPQAFPYLTPQAEQTVQIPSSIGSIETTSYSVDLITGPT
Sbjct: 336 KLREKVTQQVTQQFYRLAAQHPQAFPYLTPQAEQTVQIPSSIGSIETTSYSVDLITGPT 395

Query: 256 PCNLVVPIGKA 266
PCNLVVPIGKA
Sbjct: 396 PCNLVVPIGKA 406
```

Score = 117 (46.2 bits), Expect = 1.6e-62, Sum P(2) = 1.6e-62  
Identities = 33/64 (51%), Positives = 36/64 (56%)

```
Query: 1 MLALIARAIEMGYLFRRTRQKRERIPPALHEGRLIGK---TVGKKRFYDDDYKAVAEAH 57
MLALIARAIEMGYLFRRTRQKRER LIG +G R Y+ +
Sbjct: 1 MLALIARAIEMGYLFRRTRQKRERYNCLNRAPSLIGNDGYPKLGSYRAQVIPYRLYQPSA 60
Query: 58 SSVL 61
SS L
Sbjct: 61 SSSL 64
```

สำหรับ DNA fragment ที่มีขนาดประมาณ 2.0 kb โดยกำหนดให้ชื่อ P5CS\_2KB เมื่อทำการโคลนและตรวจสอบลำดับเบส พบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสดังตารางที่ 5 ซึ่งปรากฏว่ามีความคล้ายคลึงสูงที่สุดกับ ยีน *delta-pyrroline-5-carboxylate synthase 1 (P5CS1 gene)* ดังนั้นจึงใช้ DNA fragment นี้เป็น probe ในการศึกษาการแสดงออกของยีน



ตารางที่ 5 ตารางแสดงความคล้ายคลึงลำดับเบสในฐานข้อมูลลำดับเบสของP5CS\_2KB\_no.27

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



3.1.2 ศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* โดยใช้ชิ้นส่วนของยีนที่โคลนได้ *P5CS\_2KB* เป็น probe ในเนื้อเยื่อใบข้าวจากต้นข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งได้รับความเค็ม 85 mM NaCl ในระยะอายุ 3 ใบ ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

จากการทำ northern blot analysis พบว่า *P5CS\_2KB* probe สามารถตรวจจับ homologous element 2 ขนาด คือ 2.8 kb และ 2.7 kb (รูปที่ 11) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hur et al. (2004) ที่พบว่า *P5CS* gene ในข้าวประกอบด้วย *P5CS1* และ *P5CS2* gene

ในภาวะปกติข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ มีการแสดงออกของ *P5CS* gene ไม่ชัดเจนนัก ซึ่งสอดคล้องกับระดับของการสะสมโพรลีนในใบที่เกิดขึ้น แต่เมื่อข้าวทั้งสองพันธุ์ / สายพันธุ์ ได้รับความเค็มที่ความเข้มข้น 85mM NaCl (S) การแสดงออกของ *P5CS* gene เพิ่มมากขึ้น โดย ในข้าว LPT123 สามารถตรวจพบการแสดงออกของ *P5CS* gene transcript ขนาดประมาณ 2.7 kb ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของ *P5CS2* gene ในขณะที่ ในข้าว LPT123TC171 ที่อยู่ในภาวะเค็ม *P5CS* gene transcript ที่พบมีขนาด 2.8 kb ซึ่งสอดคล้องกับยีน *P5CS1*

3.1.3 ศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* โดยใช้ชิ้นส่วนของยีนที่โคลนได้ *P5CS\_2KB* เป็น probe ในเนื้อเยื่อใบข้าวจากต้นข้าวทั้งสองพันธุ์/ สายพันธุ์ ซึ่งได้รับความเค็ม 85 mM NaCl ในระยะอายุ 5 ใบ ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ข้าวที่ระยะ 5 ใบนี้สามารถสามารถตรวจพบการแสดงออกได้ทั้ง *P5CS1* และ *P5CS2* gene transcript แม้เจริญในภาวะปกติ และการแสดงออกของทั้งสองยีนเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเจริญในภาวะที่ได้รับ ความเครียดจากความเค็ม (รูปที่ 12) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ทั้ง *P5CS1* และ *P5CS2* มีบทบาทต่อการสร้าง โพรลีนเมื่อตอบสนองต่อภาวะเครียดในข้าวในระยะ 5 ใบ

3.1.4 ศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* โดยใช้ชิ้นส่วนของยีนที่โคลนได้ในข้อ 3.1.1 เป็น probe ในเนื้อเยื่อใบข้าวจากต้นข้าวทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งได้รับความเค็มโดยการเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่มีการ เติม PEG6000 ที่ระดับความเข้มข้น 225 g/l ในระยะอายุ 3 ใบ ทุก 3 วัน เป็นเวลา 15 วัน

ในภาวะปกติ การแสดงออกของ *P5CS1* และ *P5CS2* ไม่ชัดเจนนักเช่นเดียวกับผลการ ทดลองในชุดควบคุมเมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในสภาวะเค็ม แต่เมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 3 วัน การแสดงออกของ *P5CS1* และ *P5CS2* เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (รูปที่ 13) การให้ 100  $\mu$ M ABA จาก ภายนอกเพิ่มเติมยังส่งผลให้มีการแสดงออกของ *P5CS1* และ *P5CS2* ในภาวะเค็มเพิ่มขึ้นอีกด้วย (lane 6) หลังจากวันที่ 3 ที่ได้รับภาวะเค็ม การแสดงออกของ *P5CS1* และ *P5CS2* ลดลง โดยที่ชุดการทดลองที่ เนื้อเยื่อได้รับ 100  $\mu$ M ABA มีการแสดงออกของ *P5CS1* และ *P5CS2* สูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ

3.4 การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ amplified ขึ้นด้วย primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อ ยีน *OAT*

เมื่อทำปฏิกิริยา PCR ใน 3 ภาวะคือ  $MgCl_2$  1.5, 2.0 และ 2.5 mM และทำการตรวจสอบด้วย เครื่องมือแยกกรดนิวคลีอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ พบว่าชุดการทดลองที่ 1 (lane ที่ 1 ในรูปที่ 14) และ 3 (lane ที่ 3 ในรูปที่ 14) พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 4 แถบ ขนาดประมาณ 500 คู่เบส ขนาดประมาณ 600 คู่เบส ขนาดประมาณ 800 คู่เบส และขนาดประมาณ 1200 คู่เบสตามลำดับ ชุดการทดลองที่ 2 พบแถบดี

เอ็นเอ 5 แถบ โดยมี 4 แถบเหมือนกับชุดการทดลองที่ 1 และ 3 แต่พบแถบดีเอ็นเออีก 1 แถบที่ขนาดประมาณ 2500 คู่เบส (lane ที่ 2 รูปที่ 14) ซึ่งได้เลือกแถบดีเอ็นเอที่ได้จากชุดการทดลองที่ 2 เพื่อทำการโคลนต่อไป

เมื่อทำการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของชิ้น DNA ขนาด 2.5 kb ซึ่งให้ชื่อว่า putOAT2.5 พบว่าเมื่อ translate แล้วตรวจสอบลำดับความเหมือนของโปรตีนที่ได้ มีความคล้ายกับ putative uncharacterized protein ในข้าว

```
tr A3A317 Putative uncharacterized protein [OsJ_005189] 256
    A3A317_ORYSJ [Oryza sativa subsp. japonica (Rice)] AA align
```

Score = 209 bits (533), Expect = 5e-53  
Identities = 109/139 (78%), Positives = 109/139 (78%)

```
Query: 3 AEFKLCCKFGWGQTEIPMSKIANIDQEHNFXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 62
          AEFKLCCKFGWGQTEIPMSKIANIDQEHNF SEG
Sbjct: 118 AEFKLCCKFGWGQTEIPMSKIANIDQEHNFDDLNNVTVLDDLSEGQRCELEQEVEVEIAEL 177

Query: 63 XXHKLIRLQKTKNSVIAKQQKPINLELSANEKEVAMLDLSGNIGPFVLPAEFRAKEVDEH 122
          HKLIRLQKTKNSVIAKQQKPINLELSANEKEVAMLDLSGNIGPFVLPAEFRAKEVDEH
Sbjct: 178 REHKLIRLQKTKNSVIAKQQKPINLELSANEKEVAMLDLSGNIGPFVLPAEFRAKEVDEH 237

Query: 123 LDDGSRNRDDKAEILESHQ 141
          LDDGSRNRDDKAEILESHQ
Sbjct: 238 LDDGSRNRDDKAEILESHQ 256
```

เมื่อนำ DNA fragment ขนาด 1.2 kb ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และตรวจสอบกับฐานข้อมูลพบว่า เมื่อ translate แล้วลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว สามารถได้ผลิตภัณฑ์ ซึ่งมี homology กับ DNA J protein ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับ protein interaction และ protein dissociation

```
tr Q5ZCC4 Putative DNAJ domain-containing; methylation-controlled J protein 112 AA
    Q5ZCC4_ORYSJ (Os01g0157800 protein) [P0011G08.42] [Oryza sativa japonica (Rice)] align
```

Score = 64.3 bits (155), Expect = 2e-09  
Identities = 30/33 (90%), Positives = 30/33 (90%)

```
Query: 23 KXRPIVPRMRKFYEGGFQPMAMTRREAGLILGVR 55
          K RPIVPRMRKFYEGGFQPM RREAGLILGVR
Sbjct: 29 KARPIVPRMRKFYEGGFQPEMARREAGLILGVR 61
```

ส่วน DNA fragment ขนาด 0.8 kb ไม่พบว่าสามารถ translate ได้ putative protein ด้วย Software translate ของ Expsy (<http://au.expasy.org/tools/dna.html>)

เมื่อนำ DNA fragment (OAT 0.6 15\_2) ขนาดประมาณ 0.6 kb ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และตรวจสอบกับฐานข้อมูลพบว่า เมื่อ translate แล้วบางส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว สามารถได้ผลิตภัณฑ์ ซึ่งมี homology กับ transposon protein, mutator ดังนี้

Tr [Q53M25](#)  
 Q53M25\_ORYSA **Transposon protein, putative, mutator sub-class**  
**[LOC\_Os11g13640]**  
**[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]**  
 1566 AA [align](#)  
 Score = 370 bits (951), Expect = e-102  
 Identities = 174/179 (97%), Positives = 176/179 (98%)

Query: 1 NDVADEYWCYDSKQVKVGMFHDKGHLQDAVKRWAFVQKREFRVKVSNRRTTYDVKCIQGG 60  
 ND D +WCYDSKQVKVGMFHDKGHLQDAVKRWAFVQKREFRVKVSNRRTTYDVKCIQGG  
 Sbjct: 235 NDGLDAHWCYDSKQVKVGMFHDKGHLQDAVKRWAFVQKREFRVKVSNRRTTYDVKCIQGG 294

Query: 61 CPWRVHGYKPQHDTLWVASRVEQHTCLENTRLVHRNLTAAFVAQMVYSKVVRKTSLSPF 120  
 CPWRVHGYKPQHDTLWVASRVEQHTCLENTRLVHRNLTAAFVAQMVYSKVVRKTSLSPF  
 Sbjct: 295 CPWRVHGYKPQHDTLWVASRVEQHTCLENTRLVHRNLTAAFVAQMVYSKVVRKTSLSPF 354

Query: 121 TIMHDVEKEYGYEISYDKAWRAKQKALEMRFPTYEDSYHNLPPLEVMQARNPGTHMAM 179  
 TIMHDVEKEYGYEISYDKAWRAKQKALEMRFPTYEDSYHNLPPLEVMQARNPGTHMA+  
 Sbjct: 355 TIMHDVEKEYGYEISYDKAWRAKQKALEMRFPTYEDSYHNLPPLEVMQARNPGTHMAI 413

DNA fragment ขนาดประมาณ 0.5 kb เมื่อนำไป blast โดยใช้ <http://riceblast.dna.affrc.go.jp/>  
 พบว่า มี homology บางส่วนเหมือนกับ EST clone [CB629231](#) ซึ่งเมื่อตรวจสอบแล้วพบว่าเป็น cDNA  
 clone ที่คาดว่าสามารถ translate ให้ putative symplekin protein

tr [Q69R94](#) **Putative symplekin (Os07g069390 protein)** 1245  
 Q69R94\_ORYSJ **[P0627E10.2] [Oryza** AA  
**sativa subsp. japonica (Rice)]** [align](#)

Score = 498 bits (1281), Expect = e-139  
 Identities = 254/254 (100%), Positives = 254/254 (100%)

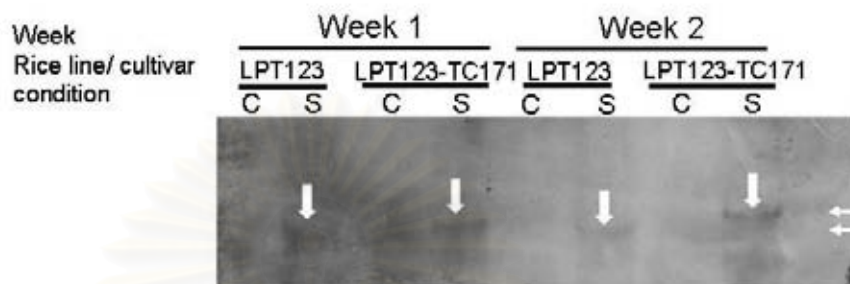
Query: 1 SAGLSLAQSSETRSPSSSMVEASQTQFSYSSTLTSQHVLPLKLVVTNIDLSDEAKDLLQKE 60  
 SAGLSLAQSSETRSPSSSMVEASQTQFSYSSTLTSQHVLPLKLVVTNIDLSDEAKDLLQKE  
 Sbjct: 588 SAGLSLAQSSETRSPSSSMVEASQTQFSYSSTLTSQHVLPLKLVVTNIDLSDEAKDLLQKE 647

Query: 61 AFLRILDCKQDASGGSIARLPLLAHLGVEFPLELDPWELLQKHVLSDYVNNEGHELTLC 120  
 AFLRILDCKQDASGGSIARLPLLAHLGVEFPLELDPWELLQKHVLSDYVNNEGHELTLC  
 Sbjct: 648 AFLRILDCKQDASGGSIARLPLLAHLGVEFPLELDPWELLQKHVLSDYVNNEGHELTLC 707

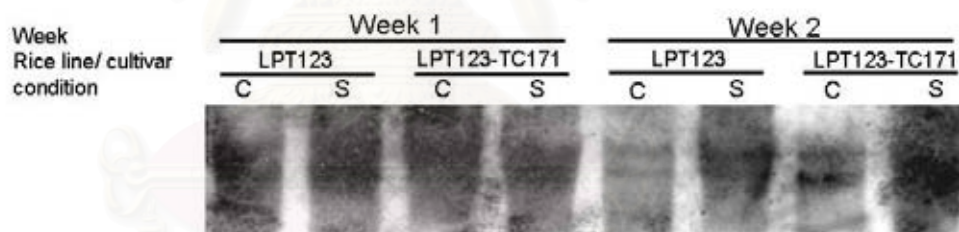
Query: 121 ILNRLYREAEQDQDFLSSRTATS VYESFLLTVAENLRDMFPASDKSLGKLLCEIPYLPEG 180  
 ILNRLYREAEQDQDFLSSRTATS VYESFLLTVAENLRDMFPASDKSLGKLLCEIPYLPEG  
 Sbjct: 708 ILNRLYREAEQDQDFLSSRTATS VYESFLLTVAENLRDMFPASDKSLGKLLCEIPYLPEG 767

Query: 181 VLKLLLEGLCSPGSNEKQDKDLQSGDRVTQGLSAVWNLIMLRPSNRDRCLEIALQSSIHHHL 240  
 VLKLLLEGLCSPGSNEKQDKDLQSGDRVTQGLSAVWNLIMLRPSNRDRCLEIALQSSIHHHL  
 Sbjct: 768 VLKLLLEGLCSPGSNEKQDKDLQSGDRVTQGLSAVWNLIMLRPSNRDRCLEIALQSSIHHHL 827

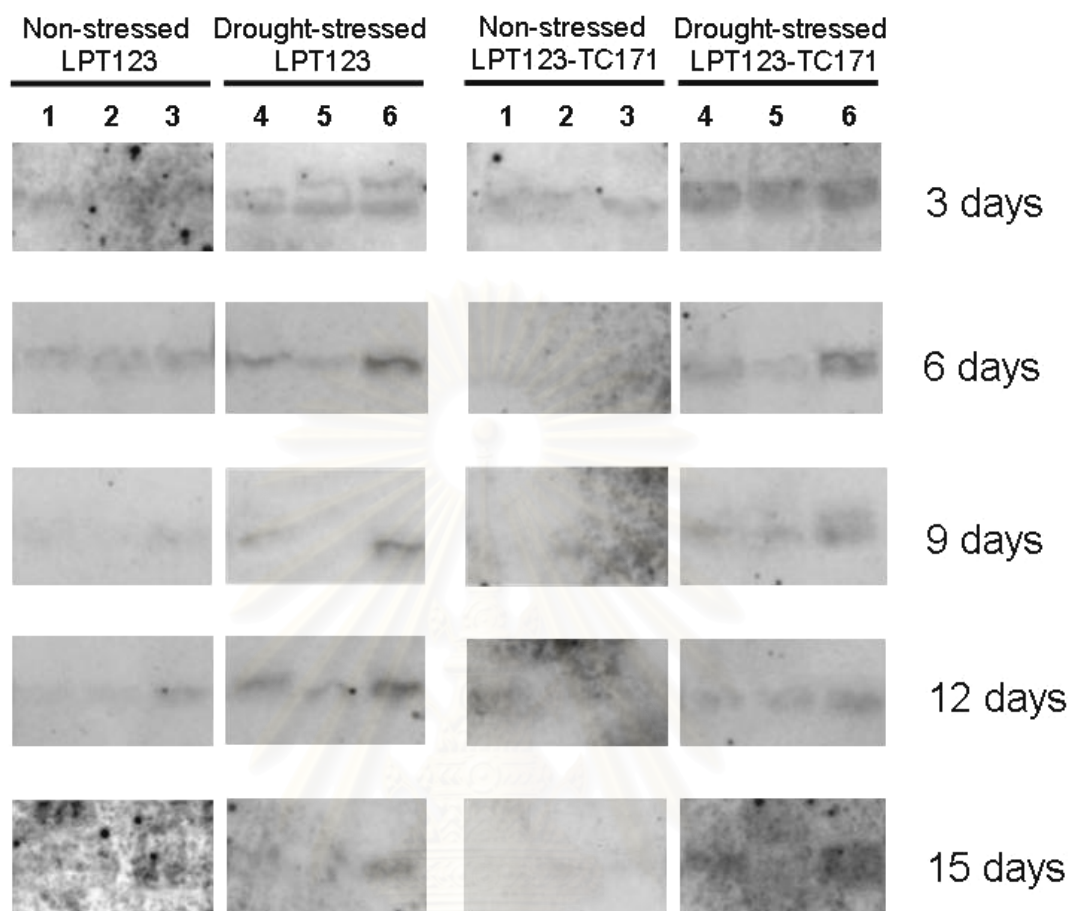
Query: 241 DEVRMKAIRLVANK 254  
 DEVRMKAIRLVANK  
 Sbjct: 828 DEVRMKAIRLVANK 841



รูปที่ 11 การแสดงออกของ *P5CS* genes ในข้าวพันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ LPT-171 ระยะ 3 ใบในภาวะปกติ และภาวะที่ได้รับความเค็ม  
 C - ชุดควบคุมพืชเติบโตในภาวะปกติ  
 S - พืชเติบโตในภาวะที่ได้รับความเค็ม



รูปที่ 12 การแสดงออกของ *P5CS* genes ในข้าวพันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ LPT-171 ระยะ 5 ใบในภาวะปกติ และภาวะที่ได้รับความเค็ม  
 C - ชุดควบคุมพืชเติบโตในภาวะปกติ  
 S - พืชเติบโตในภาวะที่ได้รับความเค็ม

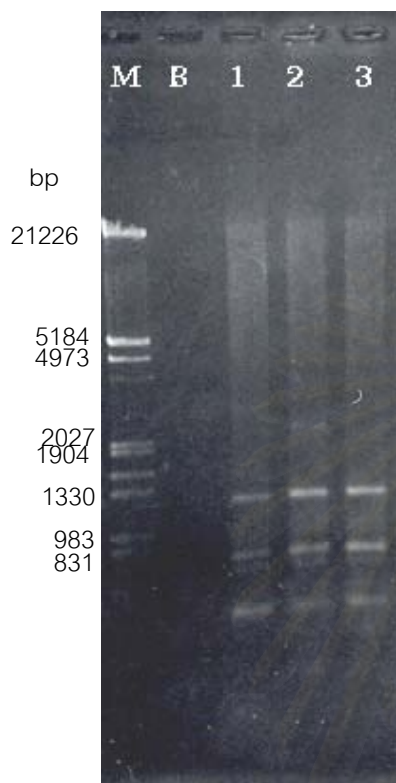


รูปที่ 13 การแสดงออกของยีน P5CS ในข้าวพันธุ์ LPT123 และ ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 เมื่ออยู่ในภาวะปกติ (1) ภาวะปกติที่ได้รับการพ่นน้ำ(2) ภาวะปกติที่ได้รับการพ่น 100 $\mu$ M ABA (3) ภาวะแล้ง (4) ภาวะแล้งที่ได้รับการพ่นน้ำ(5) หรือภาวะแล้งที่ได้รับการพ่น 100 $\mu$ M ABA (6) เป็นเวลา 3 6 9 12 และ 15 วัน

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มขึ้นส่วนของ OAT gene ที่แปรความเข้มข้นของ  $MgCl_2$  3 ระดับ ความเข้มข้น



โดย M = Marker (Lamda DNA digested with *EcoRI* and *HinDIII*)

B = ปฏิกิริยา PCR ไม่ใส่ template (Blank)

1= ปฏิกิริยา PCR 1.5  $\mu M$   $MgCl_2$  ใช้ primer OATa/OATs Annealing temperature 37 °C

2= ปฏิกิริยา PCR 2.0  $\mu M$   $MgCl_2$  ใช้ primer OATa/OATs Annealing temperature 37 °C

3= ปฏิกิริยา PCR 2.5  $\mu M$   $MgCl_2$  ใช้ primer OATa/OATs Annealing temperature 37 °C

4 = ปฏิกิริยา PCR 1.5  $\mu M$   $MgCl_2$  ใช้ primer Actin1/Actin2 (positive control) Annealing temperature 37 °C

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 ศึกษา OAT gene organization โดยใช้ OAT ของ *Vigna acoutifolia* เป็น probe เปรียบเทียบกับ การใช้ partial fragment ของ putative OAT ที่โคลนได้จากข้อ 3.1

เมื่อใช้ OAT ของ *Vigna acoutifolia* เป็น probe เปรียบเทียบกับการใช้ partial fragment ของ putative OAT ที่โคลนได้จากข้อ 3.1 8 คือ DNA fragment ขนาด 0.6 kb (OAT 0.6 15\_2) เป็น probe ได้ผลดังรูปที่ 15 ซึ่งจะเห็นได้ว่า มีลักษณะคล้ายคลึงกันคือ พบ multiple copies ของ fragment ดังกล่าว

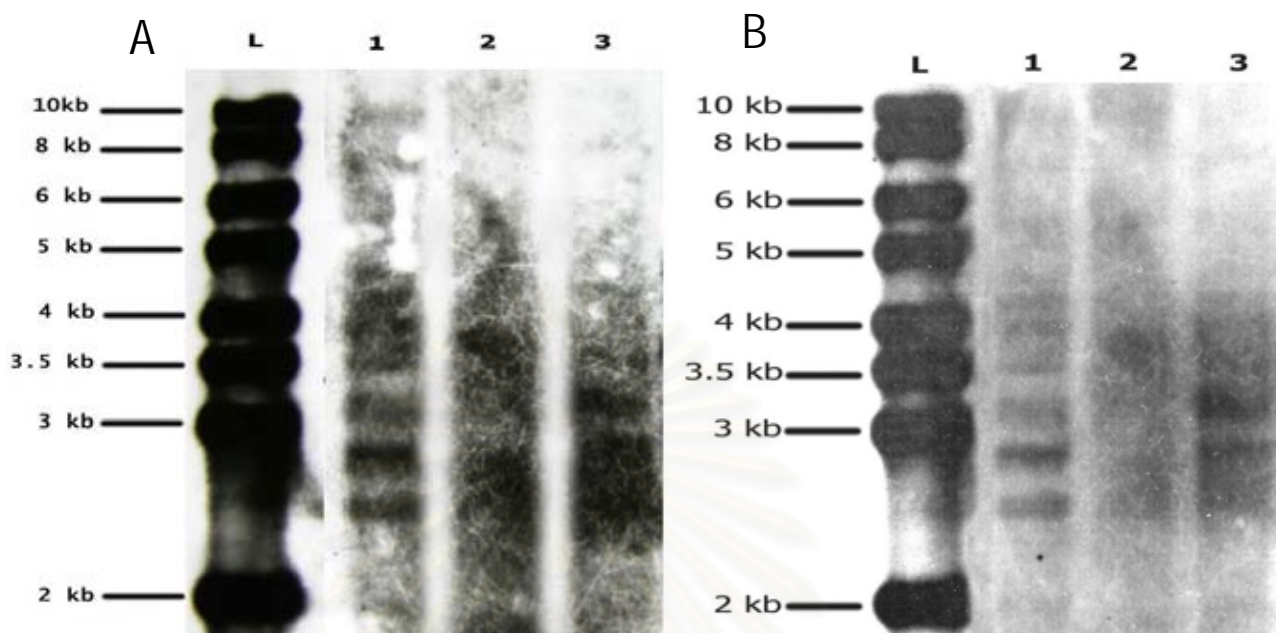
3.2.3 ศึกษาการทำงานของ OAT โดยการศึกษา enzyme activity ของ OAT เมื่อปลูกข้าวทั้งสองสายพันธุ์/พันธุ์ ในภาวะเค็ม

จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ OAT โดยใช้ ninhydrin method (Kimet al., 1994) พบว่า OAT ในข้าวทั้ง 2 พันธุ์ / สายพันธุ์ มีการทำงานเพิ่มขึ้น ภายใน 72 ชั่วโมงภายหลังได้รับภาวะเค็ม โดยข้าว LPT123-TC 171 เริ่มมีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 24 ชั่วโมงภายหลังได้รับภาวะเค็ม ในขณะที่ ข้าว LPT123 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นหลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (รูปที่ 16)



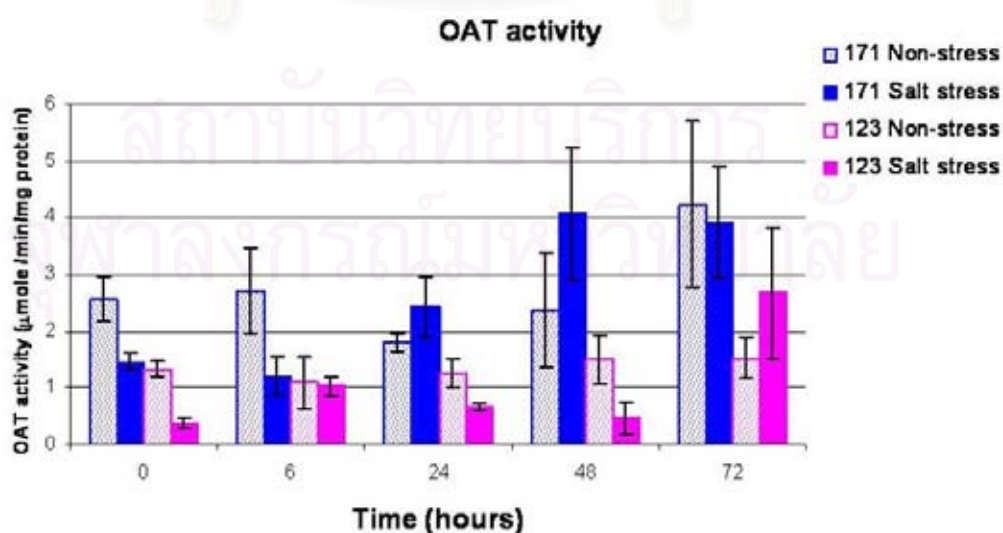
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 15 Southern blot analysis โดยใช้ OAT0.6 15\_2 (A) และ OAT gene ของ *Vigna acoutifolia* (B) เป็น probe ซึ่ง lane ต่างๆมีตัวอย่างดังนี้

- L Ladder
- 1 Genomic DNA of LPT-123 digested with *Hind III*
- 2 Genomic DNA of LPT-123-TC171 digested with *EcoRI*
- 3 Genomic DNA of LPT-123-TC 171 digested with *Hind III*



รูปที่ 16 OAT activity ในข้าวพันธุ์ LPT123 และ สายพันธุ์ LPT-171 เมื่ออยู่ในภาวะปกติ (non-stress) หรือ ได้รับภาวะเค็ม ด้วย 85mM NaCl (salt stress) เป็นเวลา 0-72 ชั่วโมง

## อภิปรายผลการวิจัย

### 1. การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง

#### 1.1 การศึกษาภาวะแล้งที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง

ศึกษาความเข้มข้นของ PEG 6000 ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดลอง โดยปลูกข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 ในภาวะแล้งที่ความเข้มข้น 0 150 200 250 และ 300 g/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายปลูกให้เจริญในภาวะปกติซึ่งไม่มี PEG 6000 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 แสดงความสามารถในการทนแล้งได้ดีกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างเห็นได้ชัดที่ความเข้มข้น 200 g/l โดยมีความแตกต่างของอัตราการรอดตายของข้าวทั้งสองสายพันธุ์สูงที่สุดถึง 29 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้นของ PEG 6000 ที่ 200 g/l มีจำนวนต้นข้าวที่เหลือรอดมากพอที่จะใช้ในการศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ต่อไป

ในส่วนของการทดลองการศึกษาระยะแล้งที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง ไม่ได้ใช้สถิติในการวิเคราะห์ผลการทดลอง เนื่องจากความจำกัดในเรื่องเมล็ดข้าวของสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 สำหรับใช้ในการทดลองมีไม่มากนัก จึงทำให้ไม่สามารถทำการทดลองหลายซ้ำเพื่อนำผลไปวิเคราะห์ทางสถิติได้

#### 1.2 การเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171

ในการศึกษาความสามารถในการทนแล้งของข้าวเหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 โดยการวัดความสูง ความยาวราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นและราก เมื่อได้รับภาวะแล้ง โดยใช้ PEG 6000 ความเข้มข้น 0 และ 200 g/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และสิ้นสุดการให้ภาวะแล้งโดยย้ายปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่ไม่มี PEG 6000 เพื่อให้ต้นข้าวเจริญเติบโตในภาวะปกติเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 มีความสามารถในการทนแล้งได้ โดยมีการเจริญเติบโตทางด้านความสูง น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นและรากแตกต่างจากข้าวสายพันธุ์เดิมที่ได้รับภาวะแล้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 มีความสามารถทนต่อภาวะแล้งได้ อาจเนื่องจากกลุ่มยีนที่แสดงออกเมื่อข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 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 LPT-171 ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งรากมากกว่าข้าวสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องมาจากข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 อาจเกิดการแปรทางพันธุกรรมโดย

ส่งผลต่อ anatomy ของราก เช่น อาจมีจำนวนรากฝอยเพิ่มมากขึ้น ทำให้ข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 ตั้งตัวได้เร็วก่อนที่ความแล้งจะมีผลต่อ phenotype ของต้นกล้า

## 2. การศึกษาปริมาณโพสลิโนในใบของกล้าข้าวอายุ 22 วัน พันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 เมื่อเติบโตในภาวะเค็ม หรือ ภาวะแล้ง

ข้าวพันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ทนเค็ม LPT -171 มีปริมาณโพสลิโนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อได้รับภาวะเค็ม โดยเมื่อต้นข้าวอายุ 22 วันได้รับภาวะเค็ม NaCl 0.5%(w/v) พบว่าสายพันธุ์เดิม(LPT123) มีปริมาณโพสลิโนสูงกว่าสายพันธุ์ทนเค็ม(LPT-171) อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลของปริมาณโพสลิโนที่ได้จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าโพสลิโนอาจไม่เกี่ยวข้องของกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนเค็มของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มนี้

จากผลการทดลองสายพันธุ์ทนเค็มมีอัตราการตายและการเจริญเติบโตมากกว่า แต่ปริมาณโพสลิโนน้อยกว่าสายพันธุ์เดิม ทำให้ผลการทดลองนี้น่าจะสนับสนุนแนวคิดของ Lutts และคณะ (1996,1999) ซึ่งทำการศึกษเกี่ยวกับการสะสมโพสลิโนในข้าวพันธุ์ทนเค็ม Nona Bokra และพบว่าข้าวพันธุ์ทนเค็มมีการสะสมโพสลิโนที่ต่ำกว่าข้าวพันธุ์ที่ไวต่อความเค็ม( I Kong Pao) รวมทั้งปริมาณและการทำงานของเอนไซม์ OAT และ P5CR ไม่สอดคล้องกับโพสลิโนที่สะสม จึงได้เสนอแนวคิดว่าการสะสมโพสลิโนในข้าวเมื่อได้รับภาวะเค็มนั้นเป็นสัญญาณว่าข้าวมีความเสียหายเนื่องจากภาวะเค็ม อย่างไรก็ตาม รายงานต่างๆอีกหลายชิ้นก็ได้เสนอบทบาทของโพสลิโนต่อการเพิ่มความสามารถในการทนเค็ม (Delauney and Verma, 1993; Hare and Cress, 1997)

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

ภายใต้ภาวะแล้งพบว่าการสะสมโพสลิโนในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์เพิ่มขึ้นน้อยกว่าในภาวะเค็มมาก การเพิ่มขึ้นดังกล่าวในข้าว LPT-171 มีแนวโน้มที่จะเกิดขึ้นได้รวดเร็วกว่าและมากกว่าในข้าว LPT123 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ วรัญญา คำบัน (2541) และ ธนะกาญจน์ มัญชุพาศณี (2543) ได้รายงานไว้ว่า ข้าวสายพันธุ์ทนเค็มจะมีความสามารถในการสะสมโพสลิโนภายใต้ภาวะขาดน้ำได้มากกว่าข้าวพันธุ์เดิมซึ่งไม่ทน แต่ในการทดลองครั้งนี้พบว่า ปริมาณโพสลิโนสูงสุดของข้าวสายพันธุ์ทนเค็มและข้าวพันธุ์เดิมนั้นมีค่าสูงสุดที่ไม่แตกต่างกัน แสดงถึงความหลากหลายของกลไกในข้าวที่ใช้ในการต้านทานต่อภาวะเครียด ซึ่งอาจมีความแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์และพื้นฐานทางพันธุกรรมของแต่ละพันธุ์ข้าว

## 3. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพสลิโน ในข้าวที่เจริญในภาวะเครียด

ชิ้นส่วน DNA ที่เพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR โดย primer P5CSa/P5CSs เพื่อโคลนยีน P5CS โดยอ้างอิงจากลำดับเบสของ cDNA P5CS ของ *Vigna aconitifolia* และ *Arabidopsis thaliana* มี 2 fragment ขนาดประมาณ 500 bp และ 2 kb ตามลำดับ(P5CS\_500\_no.1 และ P5CS\_2KB\_no.27)

จากผลการศึกษาลำดับเบสของโคลนที่ได้เทียบกับฐานข้อมูลลำดับเบส จึงเลือกใช้ P5CS\_2KB\_no.27 เป็น probe สำหรับการศึกษากการแสดงออกของยีน P5CS เนื่องจากผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ *Oryza sativa* P5CS1 mRNA

(Accession number D49714) และ *O. sativa* (japonica cultivar-group) putative *P5CS* mRNA (Accession number NM190603) นอกจากนี้ ใน *Arabidopsis* พบว่า *P5CS* gene มี 2 copies เช่นกัน (Strizhov et al., 1997)

Hur et al. (2004) ได้รายงานการทำงานของ *OsP5CS1* (accession no. AK102633) และ *OsP5CS2* (accession no. AK101230) โดยพบว่า *OsP5CS1* มีการแสดงออกตลอดเวลาในทุกอวัยวะ ในขณะที่ *OsP5CS2* แสดงออกมากในข้าวที่โตเต็มที่ และค่อนข้างมีความจำเพาะใน stamen และ mature spikelet ซึ่งต่างจาก *OsP5CS1*

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนทั้งสองโดยใช้ Northern blot analysis และใช้ genomic DNA ซึ่งเป็น partial *OsP5CS1* gene เป็น probe สามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนทั้งสองได้ ดังที่ปรากฏแถบขึ้น 2 ขนาด ประมาณ 2.7 และ 2.8 kb ซึ่งแถบ ขนาด 2.8 kb ควรแสดงถึงการแสดงออกของ *OsP5CS1* และ แถบขนาด 2.7 kb แสดงถึงการแสดงออกของ *OsP5CS2* (ประมาณจากขนาดของ *OsP5CS1* และ *OsP5CS2* (Hur et al., 2004)) ดังนั้นจะเห็นว่าในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ที่ทำการศึกษานี้ เมื่ออยู่ในระยะต้นกล้า (seedling) อายุประมาณ 15 วัน เมื่อได้รับภาวะเค็มมีการทำงานของ *OsP5CS* gene ที่แตกต่างกัน โดยพันธุ์เดิม LPT123 ซึ่งมีความทนเค็มน้อยกว่าใช้การทำงานผ่าน *OsP5CS2* มากกว่า *OsP5CS1* ในขณะที่พันธุ์ทนเค็ม LPT-171 ทำงานผ่าน *OsP5CS1* มากกว่า *OsP5CS2* ในช่วง 2 สัปดาห์ หลังจากได้รับภาวะเค็ม ในการศึกษาของ Hur et al., (2004) พบว่าในต้นกล้าอายุ 2 สัปดาห์ เมื่อได้รับ NaCl ที่ความเข้มข้น 250 mM ทั้ง *OsP5CS1* และ *OsP5CS2* ในใบมีการแสดงออกมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างของการแสดงออกของยีนทั้ง 2 นี้ อาจมีสาเหตุมาจากความแตกต่างของพันธุ์ เวลาที่ตรวจสอบการแสดงออก ตลอดจนระดับความเครียดที่พืชได้รับ

ความแตกต่างของ *OsP5CS1* และ *OsP5CS2* ในระยะต้นกล้านี้ ชี้ให้เห็นว่า การควบคุมการแสดงออกของ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรลีนที่ตอบสนองต่อภาวะเค็ม คือ *OsP5CS1* และ *OsP5CS2* มีการควบคุมที่ต่างกันในช่วง 2 พันธุ์/สายพันธุ์ และการเกิด somaclonal variation ที่มีผลทำให้ LPT123-TC 171 ซึ่งมีความสามารถในการทนเค็มและทนแล้งสูงชันนี้ มีความเชื่อมโยงกับระบบการควบคุมการแสดงออกของกระบวนการตอบสนองที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์โพรลีนร่วมด้วย อย่างไรก็ตาม ลักษณะความแตกต่างในการแสดงออกของยีนทั้งสองนี้ไม่พบในการศึกษาการแสดงออกของยีน *OsP5CS1* และ *OsP5CS2* ในต้นกล้าที่มีอายุมากขึ้น (22 วัน)

ในภาวะแล้งพบว่า สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ *P5CS1* และ *P5CS2* ได้ทั้งสองยีนโดยการแสดงออกสูงสุดพบในวันที่ 3 หลังจากได้รับภาวะแล้ง และยังคงพบว่าการพ่น ABA จากภายนอกมีผลทำให้มีการแสดงออกของยีนทั้งสองได้นานขึ้น

สำหรับการโคลน partial *OAT* gene ในข้าวที่ทำการออกแบบ primer และ amplification จาก genomic DNA ของข้าว ซึ่งได้ amplified fragment 5 ขนาด แต่เมื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลแล้วไม่พบความคล้ายคลึงกับ *OAT* gene ซึ่งในการศึกษาดังกล่าวได้มีการทดลองเปลี่ยน primer หลายครั้ง แต่ไม่ประสบความสำเร็จในการทำ partial cloning ของ *OAT* gene และเนื่องจากยังไม่มีรายงานกลไกการทำงานของ *OAT* gene expression ในข้าว และ เมื่อนำ putative *OAT* cDNA ไป blast ในฐานข้อมูล EST ของ Rice GAAS (<http://riceblast.dna.affrc.go.jp/>) แล้วเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบว่า มีความคล้ายคลึงเฉพาะ cDNA ที่เตรียมได้จาก



rice callus (accession no. AU069087) จึงเห็นว่าการทำ partial OAT cDNA อาจสูญเปล่าหากไม่ได้ช่วงการ แสดงออกที่เหมาะสมมาใช้ในการศึกษา

อย่างไรก็ดี จากชิ้นส่วนของ amplified DNA ที่ได้ clone OAT 0.6 15\_2 มีความคล้ายคลึงกับ transposon protein จึงมีสมมติฐานว่า OAT gene ในข้าวอาจมี insertion ของ transposon mutator (Mao et al., 2000) ซึ่งเป็น transposon ที่พบได้ใน Angiosperm (Lisch, 2002) และผ่านวิวัฒนาการการเคลื่อนย้าย ของ transposon ไปยังตำแหน่งต่างๆของ genome อาจมีส่วนที่เป็น OAT-like element ตามไปด้วยทำให้ใน การทำ amplification จาก genomic DNA เป็นไปได้ยาก เพื่อทดสอบสมมติฐานดังกล่าว จึงออกแบบการ ทดลองเพื่อเปรียบเทียบรูปแบบของ rice genomic DNA hybridization โดยใช้ OAT 0.6 15\_2 ซึ่งมี homology กับ transposon protein และ OAT cDNA ของ *Vigna acoutifolia* เป็น probe ซึ่งพบว่า probe ทั้ง สองให้รูปแบบของ hybridization ที่เหมือนกันทั้งใน genomic DNA ที่ได้จาก LPT123 และ genomic DNA ที่ได้ จาก LPT-171 (รูปที่ 13) เพียงแต่สัญญาณที่เกิดจาก hybridization ของ OAT cDNA จาก *Vigna acoutifolia* ให้สัญญาณที่ต่ำกว่าทั้งนี้อาจเกิดจากเป็น OAT gene จากต่าง species จึงมี % homology น้อย กว่า ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า OAT gene ในข้าวที่ทำการศึกษามีการแทรกของ mutator transposon ในช่วง ของ genome evolution ซึ่งทำให้ การทำ amplification ของ partial OAT gene จาก genomic DNA ประสบ ปัญหา

ดังนั้น ในการศึกษาแสดงออกของ OAT gene expression จึงเปลี่ยนแนวทางการศึกษาโดย การใช้การตรวจสอบกิจกรรมของ OAT โดยใช้ ninhydrin method (Kim et al., 1994) ซึ่งพบว่า ข้าวทั้งสอง พันธุ์ / สายพันธุ์มีกิจกรรมของ OAT ในภาวะปกติ โดยข้าว LPT123 มีกิจกรรมของ OAT ต่ำกว่า LPT123-171 และเมื่อได้รับภาวะเค็ม ก็แนวโน้มมีกิจกรรมของ OAT เพิ่มขึ้น โดย LPT123-171 มีการเพิ่มกิจกรรมของ เอนไซม์ OAT ตั้งแต่ 24 ชั่วโมง หลังจากได้รับภาวะเค็ม ส่วน LPT123 มีกิจกรรมของ OAT เพิ่มขึ้น หลังจาก 72 ชั่วโมงภายใต้ภาวะเค็ม มีข้อสังเกตว่า ในภาวะ non-stress ข้าว LPT123-171 มี OAT activity สูงขึ้นนั้น อาจเนื่องมาจากมีผลกระทบจากภายนอกบางประการที่กระตุ้นให้ ข้าวสายพันธุ์ดังกล่าวมี OAT activity สูงขึ้น และจากลักษณะของข้าวสายพันธุ์นี้ค่อนข้างมี variation ของ OAT activity ค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตามแนวโน้ม ของ OAT activity ที่สูงขึ้นนี้ก็ไม่ได้ทำให้ OAT activity ของข้าวในช่วงดังกล่าวสูงกว่าช่วงเวลาอื่นๆที่อยู่ใน ภาวะ non-stress อย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า มีการใช้ ornithine เป็นสารตั้งต้นในการสร้างโพรลีน ใน สภาวะเครียดจากความเค็มในข้าวทั้งสองพันธุ์ / สายพันธุ์ ที่ทำการศึกษา และการชักนำให้มีการแสดงออก ของ P5CS genes ในภาวะเค็มก็เป็นข้อมูลที่แสดงถึงการใช้ glutamate เป็นสารตั้งต้นในการสะสมโพรลีนเมื่อ ได้รับความเครียดจากความเค็ม

## สรุปผลการวิจัย

1. LPT-171 ซึ่งเป็นข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่ได้จาก somaclonal variation มีความสามารถในการทนแล้งเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งคาดว่าเกิดการเกิด mutation ในหลอดทดลองดังกล่าวทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในส่วน of ยีนที่ทำหน้าที่ร่วมในกระบวนการทนเค็มและทนแล้ง
2. ภาวะเค็มและภาวะแล้งมีผลทำให้ข้าวมีการสะสมโปรตีนสูงขึ้น แต่ในภาวะเค็มแสดงระดับการสะสมโปรตีนที่สูงกว่า อย่างไรก็ตามความสามารถในการสะสมโปรตีนไม่ยืนยันถึงความสามารถในการทนทานต่อภาวะเครียด แต่อาจเป็นเพียงอาการที่ตอบสนองต่อภาวะเครียดเท่านั้น
3. Partial *OsP5CS1* genomic clone - P5CS\_2KB สามารถตรวจวัดการแสดงออกของทั้ง *OsP5CS1* และ *OsP5CS2* โดยการใช้ northern blot analysis ซึ่งพบว่า ในต้นกล้าอายุ 15 วัน เมื่อได้รับภาวะเค็ม LPT123 มีการแสดงออกของ *OsP5CS2* เพิ่มขึ้น ในขณะที่ LPT-171 มีการแสดงออกของ *OsP5CS1* เพิ่มขึ้น แต่ในต้นกล้าอายุ 22 วัน เมื่อได้รับภาวะเค็มและภาวะแล้ง ทั้ง *OsP5CS1* และ *OsP5CS2* มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นในข้าวทั้งสองพันธุ์ / สายพันธุ์
4. การโคลน partial *OAT* gene จาก genomic DNA ไม่สามารถทำได้ เนื่องจาก *OAT* gene อาจเป็นตำแหน่งที่เคยได้รับ insertion จาก mutator transposon ใน genome evolution
5. ภาวะเครียดจากความเค็มสามารถชักนำให้มี *OAT* activity สูงขึ้นในข้าวทั้งสองพันธุ์ / สายพันธุ์ โดยข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT-171 มีการเพิ่มขึ้นของ *OAT* activity ภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับภาวะเค็ม ในขณะที่ข้าวไม่ทนเค็ม LPT123 มีการเพิ่ม *OAT* activity ใน 72 ชั่วโมง หลังได้รับภาวะเค็ม
6. การสะสมโปรตีนเนื่องจากภาวะเครียดจากความเค็มในข้าวมีการใช้กระบวนการสังเคราะห์ ทั้ง glutamate pathway และ ornithine pathway



### ข้อเสนอแนะ

1. การสะสมโพรตีนที่ตอบสนองต่อความเค็มในช่วงอายุ 15 วันอาจไม่สอดคล้องกับความสามารถในการทนเค็ม แต่การทดลองนี้ไม่สามารถสรุปได้สำหรับกลไกการทนเค็มในช่วงอายุอื่นของข้าว จึงควรมีการศึกษาที่ชัดเจน เนื่องจากเมื่อต่างช่วงอายุ ต่างพันธุ์ก็สามารถใช้กลไกที่แตกต่างกันได้
2. การทราบช่วงการทำงานของ OAT activity อาจใช้เป็นข้อมูลหากต้องการศึกษาระดับโมเลกุลของ OAT gene ต่อไป



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## การเผยแพร่ผลงานวิจัย

### การเผยแพร่ผลงานในการประชุมวิชาการระดับชาติ

Khongkhuntian, T., Vajrabhaya, M. and Chadchawan, S. 2003. Growth and Proline Accumulation During Salt-Stress Condition in Rice (*Oryza sativa* L. Cv. Leung Pra Tew). Extended Abstracts. 29th Congress on Science and Technology of Thailand. P.62.

### การเผยแพร่ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

Thikart, P., Kowanij, D. Seelanan, T., Vajrabhaya, M., Bangyeekhun, T., Chadchawan, S. 2005. Genetic Variation and Stress Tolerance of Somaclonal Variegated Rice and Its Original Cultivar. **J.Sci.Res.Chula.Univ.** 30:63-75.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## เอกสารอ้างอิง

- ฐปนา อัครเอกปัญญา. 2544. ผลของไซโตเดียมคลอไรด์และไซโตเดียมคลอไรด์แอกคิเลเมชันต่อการสะสมโพรลีนและการแสดงออกของยีน *P5CS* ในถั่วเหลืองบางพันธุ์. วิทยานิพนธ์. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ชนะกาญจน์ มัญชุพาศน์. 2543. การสะสมโพรลีน และการแสดงออกของยีน  $\Delta^1$ -pyrroline - 5 - carboxylate synthetase ในข้าว *Oryza sativa* L. สายพันธุ์ทนเค็ม เมื่อได้รับภาวะเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญา. ภาควิชาพฤกษศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พรศักดิ์ ภักดีวารภรณ์. 2543. ผลของไซโตเดียมคลอไรด์ที่มีต่อการเจริญเติบโตและการสะสมโพรลีนไซโตเดียมไอออนและคลอไรด์ไอออนในถั่วเหลือง *Glycine max* (L.) Merrill. วิทยานิพนธ์. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วรัญญา คำปັນ. 2541. ปริมาณโพรลีนและน้ำตาลเมื่อข้าวอยู่ในสภาวะแล้ง และการคัดเลือกข้าวทนแล้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาพฤกษศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศุภจิตรา ชัชวาลย์ กนกวรรณ เกิดในมงคล และ ปรีดา บุญ-หลง. 2545. สรีรวิทยาของการตอบสนองต่อภาวะเครียดของพืช. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ (Section T). 1:221-241.
- Agrios, GN. 1996. CHAPTER 10. Environmental factors that cause plant disease. In **Plant Pathology 4<sup>th</sup>**. Academic Press, USA. pp.225-244.
- Alia Prasad, K.V.S.K. and Pradha Saradhi, P. 1995. Effect of zinc on free radicals and proline in *Brassica* and *Cajanus*. **Phytochemistry**. 39:45-47.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A, Zhang J., Zhang Z., Miller W., and Lipman D.J. 1997, Bates, L.S., Woldren, R.P. and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *PI Soil*. 39:205-207
- Cheng, Z.Q., Targolli, J., Su, J., He, C.K., Li, F., and Wu, R. 2001. Transgenic approaches for generating rice tolerant of dehydration stress. In **Rice Genetics IV** Khush, G.S. Brar, D.S., Hardy, B. (eds.) Science Publishers Inc. Enfield U.S.A. pp. 423-438.
- Delauney, A.J. and Verma, D.P.S. 1990. A soybean gene encoding  $\Delta^1$  pyrroline-5-carboxylate reductase was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. **Mol. Gen. Genet.** 221:299-305.
- Delauney, A.J. and Verma, D.P.S. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **Plant J.** 4:215-223.
- Flowers T.J. et al. 1977. The Mechanism of salt tolerance in halophytes. **Annu Rev PI Physiol.** 28:89-91.

- Fujita, T., Maggio, A., Garcia-Rios, M., Bressan, R.A., and Csonka, L.N. 1998. Comparative analysis of the regulation of expression and structures of two evolutionarily divergent genes for  $\Delta^1$ pyrroline-5-carboxylate synthetase from tomato. **Plant Physiol.** **118**:661-674.
- Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- Garcia, A.B., Engler, J-de A., Iyer, S., Gerats, T., Van Montagu, M., Caplan, A.B. 1997. Effects of Osmoprotectants upon NaCl Stress in Rice. **Plant Physiol.** **115**:159-169.
- Hare P.D. and Cress W.A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *PI Growth Regul.* **21**: 79-102.
- Hu, C.A., Delauney, A.J., and Verma, D.P.S. 1992. A bifunctional enzyme ( $\Delta^1$ pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyses the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**:9354-9358.
- Hur, J., Jung, K-H., Lee, C.-H., An, G. 2004. Stress-inducible OsP5CS2 gene is essential for salt and cold tolerance in rice. **Plant Sci.** **167**: 417-426.
- Igarashi, Y., Yoshiba, Y., Sanad, Y., Wada, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. 1997. Characterization of the gene for  $\Delta^1$ pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. **Plant. Mol. Biol.** **33**:857-865.
- Igarashi, Y., Yoshiba, Y., Takeshita, T., Nomura, S., Otomo, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2000. Molecular Cloning and Characterization of a cDNA Encoding Proline Transporter in Rice. **Plant Cell Physiol.** **41**:750-756.
- Kim, H-R., Rho, H-W., Park, J-W., Park, B-H., Kim, J-S., Lee, M.-W. 1994. Assay of ornithine aminotransferase with ninhydrin. **Anal. Biochem.** **223**: 205-207.
- Kishor, K.P.B., Hong, Z., Miao, G.H., Hu, A.A., and Verma, D.P.S. 1995. Overexpression of  $\Delta^1$ pyrroline-5-carboxylate synthetase increase proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiol.** **108**:1387-1394.
- Kiyosue, T., Yoshiba, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. 1996. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. **Plant Cell.** **8**:1323-1335.
- Knight, H. and Knight, M.R. 2001. Abiotic stress signaling pathways : Specificity and cross-talk. **Trends Plant Sci.** **6**:262-267.
- Lisch, D. 2002. Mutator transposons. **Trends Plant Sci.** **7**: 498-504
- Lutts, S., Kinet, J-M., Bouharmont, J. 1996. Effects of salt stress on growth the mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. **Plant Growth Reg.** **19**:207-218.

- Mao, L., Wood, T.C., Yu, Y., Budiman, M. A., Tomkins, J., Woo, S., Sasinowski, M., Presting, G., Frisch, D., Goff, S., Dean, R. A. and Wing, R. A. 2000. Rice Transposable elements: A Survey of 73,000 sequence-tagged-connectors. **Genome Res.** **10**: 982-990.
- O'Toole, J.C., Toenniessen, G.H., Murashige, T., Harris, R.R., and Herdt, R.W. 2001. The Rockefeller Foundation's International Programme on Rice Biotechnology. In **Rice Genetics IV** Khush, G.S. Brar, D.S., Hardy, B. (eds.) Science Publishers Inc. Enfield U.S.A. pp. 39-59.
- Peng, Z., Lu, Q., and Verma, D.P.S. 1996. Reciprocal regulation of  $\Delta^1$ pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after somotic stress in plants. **Mol. Gen. Genet.** **253**: 334-341.
- Roosens, N.H.C.J., Thu, T.T., Iskandar, H.M., and Jacobs, M. 1998. Isolation of the *Ornithine- $\delta$ -aminotransferase* cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.** **117**:263-271.
- Solomon, A., Beer, S., Waisel, Y., Jones, G.P., and Paleg, L.G. 1994. Effects of NaCl on the carboxylating activity of Rubisco from *Tamarix jordanis* in the presence and absence of proline-related compatible solutes. **Physiol. Plant.** **90**:198-204.
- Stewart, C.R. 1981. In **the Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plant** (Paleg LG and Aspinall D. eds) pp.243-259. Academic Press. Sydney Australia.
- Strizhov, N., Abraham, E., Oekresz, L., Blicking, S., Ziberstine, A., Schell, J., Koncz, C. and Szabados, L. 1997. Differential expression of two P5CS gene controlling proline accumulation during salt-stress require ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXP2 in *Arabidopsis*. *Plant J.* **12**: 557-569.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. In **Plant Physiology** (2<sup>nd</sup> eds). Massachusetts.Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Vajrabhaya, M. and Vajrabhaya, T. 1991. Somaclonal variation of salt tolerance in rice. In **YPS Bajaj (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlin Heidillberg : Spring-Valege. 14:368-382.
- Vajrabhaya, M., Kumpun, W., and Chadchawan, S. 2001. The Solute Accumulation: The Mechanism for Drought Tolerance in RD23 Rice (*Oryza sativa* L.) Lines. **Science Asia.** **27**:93-97.
- Van Rensburg, L., Krüger, G.H.J., Krüger, H. 1993. Proline accumulation as drought tolerance selection criterion : Its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum* L. **Journal PI Physiol.** **141**:188-194.
- Verbruggen, N., Hua, X-J., May, M., and van Montagu, M. 1996. Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis : evidence for a negative transcriptional regulator. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **13**:8787-8791.
- Yordanov., I., Velikiva, V., and Tsonev, T. 2000. Plant Responses to drought, acclimation and stress tolerance. **Photosyn.** **38**:171-186.

- Yoshida, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K., Hatada, Y., and Shinozaki, K. 1995. Correlation between the induction of a gene for  $\Delta^1$  pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. **Plant J.** 7:751-760.
- Zhang, S. and Klessig, D.F. 2001. MAPK cascades in plant defense signaling. **Trends Plant Sci.** 6:520-527.
- Zhu, J-K. 2001. Cell signaling under salt, water and cold stresses. **Curr Opin PI Biol.** 4: 401-406.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย