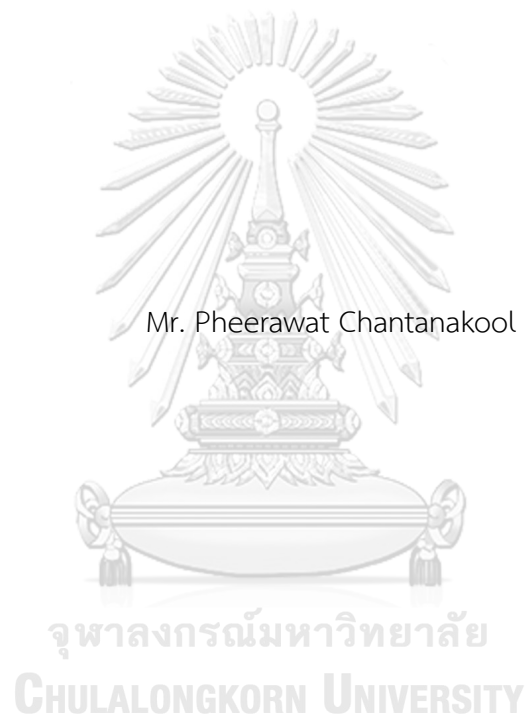


ทรานสคริปโทมของข่าวพันธุ์พื้นเมืองไทยภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็ม



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2562  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TRANSCRIPTOME OF LOCAL THAI RICE CULTIVAR UNDER SALT STRESS CONDITION



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

Department of Botany

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ทรานสคริปโทมของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยภายใต้ภาวะ เครียดจากความเค็ม
โดย	นายพีรวัฒน์ จันทนกุล
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิติพร พลายมาศ

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ  
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ เสรีภาพ)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิติพร พลายมาศ)	
.....	กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จุฑามาศ ชัยวนนท์)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.ดวงใจ สุริยาอรุณโรจน์)	

พิรวัสร์ จันทนกุล : ทรานสคริปโทมของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็ม. ( TRANSCRIPTOME OF LOCAL THAI RICE CULTIVAR UNDER SALT STRESS CONDITION) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ศ. ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร.กิติพร พลายมาศ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชอาหารสำคัญในภูมิภาคเอเชีย ซึ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยนั้นถือเป็นแหล่งผลิตข้าวสำคัญที่มีคุณภาพดีแต่มีผลผลิตต่ำเนื่องจากภาวะดินเค็มที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและความสามารถในการติดเมล็ด จากการประเมินการตอบสนองต่อภาวะเค็มในกล้าข้าวพบว่าข้าวพันธุ์หลวงประทานซึ่งเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยแสดงลักษณะการทนเค็ม ดังนั้น จึงทำการศึกษาด้านทรานสคริปโทมที่เวลา 0 3 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากได้รับภาวะเค็มเพื่อศึกษากลไกการทนเค็มของข้าวพันธุ์นี้โดยใช้เทคนิค 3'-Tag RNA-seq ผลการศึกษาพบว่ามียีนที่แสดงออกอย่างแตกต่างเป็นครั้งแรกภายหลังเผชิญกับภาวะเค็มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ได้แก่ *OsRCI2-5* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงพบว่า *OsRMC* ซึ่งเป็นยีนที่สามารถตอบสนองต่อภาวะเครียดจากความเค็มแสดงออกมาอย่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อพืชเผชิญกับภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่ามียีนที่แสดงออกอย่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจำนวน 63 ยีน ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนเค็ม ผลการวิเคราะห์โครมาทอสโอมของยีนที่ภาวะเค็มทั้ง 63 ยีน จากการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบพลวัตบางส่วน พบว่า *OsRCI2-5* และ *OsRMC* มีการแสดงออกพร้อมกับยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ประกอบด้วย Transcription factor และ Ubiquitin ligase enzyme โดยในภาวะเค็ม *OsRMC* มีส่วนทำให้มีการแสดงออกมากขึ้นของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองเพื่อป้องกันตนเองของพืชจากปัจจัยทางชีวภาพ การศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลกระทบของภาวะเค็มต่อการแสดงออกของยีนที่ระบุได้ ด้วย qRT-PCR ในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า *OsRCI2-5* และ *OsRMC* เป็นยีนที่พืชตอบสนองต่อภาวะเค็มและเกี่ยวข้องกับกลไกการทนเค็มในข้าวพันธุ์หลวงประทาน

สาขาวิชา พฤษศาสตร์

ปีการศึกษา 2562

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5972028723 : MAJOR BOTANY

KEYWORD: transcriptome, salt stress, Thai rice cultivars, gene co-expression network, 3'-Tag RNA-seq

Pheerawat Chantanakool : TRANSCRIPTOME OF LOCAL THAI RICE CULTIVAR UNDER SALT STRESS CONDITION. Advisor: Prof. SUPACHITRA CHADCHAWAN, Ph.D. Co-advisor: Asst. Prof. KITIPORN PLAIMAS, Ph.D.

Rice (*Oryza sativa* L.) has been a staple food source for many Asian countries. The northeastern of Thailand is one of the main regions for high quality rice farming. However, the grain yield obtained from rice grown in this area is quite low due to soil salinity, which affects plant growth, development and fertility. Based on the evaluation of rice seedling responses to salinity stress, 'Luang Prathan' rice, one of local Thai rice cultivars, performed salinity tolerance characters. To investigate the mechanisms of salt tolerance, transcriptomes of 'Luang Prathan' rice after 0, 3, 6, 12, 24, and 48 hours after salt stress treatment were explored by using 3'-Tag RNA-seq. The differentially expressed gene (DEG) was first detected after 12 hours of stress treatment, which is *OsRC12-5*, the gene involving in salt stress signal transduction. After 24 hours of salt stress, *OsRMC*, a gene responding to salt stress was detected as the significant differentially expressed gene. On the next timing, 48 hours of salt stress, 63 DEGs were detected, most of which were the genes with the stress protection functions. The result of gene co-expression network derived from partial dynamical correlation coefficient of 64 DEGs shows co-expression of *OsRC12-5* and *OsRMC* with stress responsive regulator gene, transcription factor and ubiquitin ligase enzyme. Moreover, in salinity condition, *OsRMC* might plays a role in the induction of gene involve with plant defense response. Based on the validation of these expressed

Field of Study: Botany

Student's Signature .....

Academic Year: 2019

Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์ และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กิติพร พลายมาศ ที่มีส่วนทำให้เกิดหัวข้อวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ขึ้น รวมถึงให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ตลอดระยะเวลาที่ทำงานวิจัย รวมถึงช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ อีกทั้งยังให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ เสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกวรรณ เสรีภาพ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จุฑามาศ ชัยวรรณ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ดวงใจ สุริยาอรุณโรจน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวสำหรับใช้ในการศึกษาจากศูนย์วิจัยข้าวนครราชสีมา สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว จังหวัดนครราชสีมา ตลอดจนสละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยให้คำแนะนำแก้ไขให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ Professor Dr. Luca Comai ที่ให้คำแนะนำและอนุญาตให้ทำวิทยานิพนธ์ที่ UC Davis Genome Center, University of California Davis ประเทศสหรัฐอเมริกา

ขอขอบคุณ Dr. Isabelle M. Henry, Helen Tsai, Sergio Silva, Meric C. Lieberman และสมาชิก Comai lab ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือตลอดการทำวิทยานิพนธ์ที่ University of California Davis

ขอขอบคุณ ดร.พนิตา ชูติมานุกูล และสมาชิกศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านสิ่งแวดล้อมและสรีรวิทยาของพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านสำหรับความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) สำหรับทุนการศึกษาและเงินทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนเป็นอย่างดีตลอดการทำวิทยานิพนธ์

พีรวัฒน์ จันทนกุล

## สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2. วัตถุประสงค์.....	3
1.3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร.....	4
2.1. ข้าวและอุปสรรคในการผลิตข้าว.....	4
2.2. ความเครียดจากภาวะเค็มของพืช.....	5
2.3. การตอบสนองของพืชต่อความเครียดจากภาวะเค็ม.....	7
2.4. การศึกษากลไกและยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเค็มในข้าว.....	10
2.5. การศึกษา gene expression profile ด้วยวิธีทางทรานสคริปโทม.....	12
2.6. การศึกษาทรานสคริปโทมด้วย 3'-Tag RNA-seq.....	16
2.7. โครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีน.....	18
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการศึกษา.....	23

3.1. อุปกรณ์การศึกษา.....	23
3.1.1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา .....	23
3.1.2. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ.....	23
3.1.3. สารเคมี 24	
3.2. วิธีการศึกษา.....	25
3.2.1. การคัดเลือกข้าวพันธุ์พื้นเมืองทนเค็มจากลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็ม	25
3.2.1.1. การศึกษาเบื้องต้นในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์.....	25
3.2.1.1.1. การเตรียมพืชทดลอง.....	25
3.2.1.1.2. สภาพการทดลองและการออกแบบการทดลอง.....	26
3.2.1.1.3. การเก็บผลลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็ม.....	26
3.2.1.1.4. การวิเคราะห์ผล.....	27
3.2.1.2. การศึกษาเพื่อยืนยันผลในกล้าข้าวจำนวน 4 พันธุ์.....	27
3.2.2. การศึกษา gene expression profiles ของข้าวพันธุ์ที่ทนเค็มเพื่อเข้าใจกลไกการตอบสนองของพืชต่อภาวะเค็ม.....	28
3.2.2.1. การปลูกและการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่จะถูกนำไปสกัด RNA.....	28
3.2.2.2. การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อสกัด total RNA.....	28
3.2.2.3. การเตรียม RNA-seq libraries (3'-Taq RNA-seq libraries).....	29
3.2.2.4. การศึกษาทรานสคริปโทมด้วย 3'-Taq RNA-seq.....	29
3.2.2.5. การวิเคราะห์ gene set enrichment analysis.....	30
3.2.2.6. การระบุยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการทนเค็ม.....	30
3.2.3. การวิเคราะห์โครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (gene co-expression network).30	
3.2.4. การศึกษาเพื่อยืนยันผลกระทบของภาวะเค็มที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่ระบุได้.....	31
บทที่ 4 ผลการศึกษา .....	33



4.1. การคัดเลือกข้าวพันธุ์พื้นเมืองทนเค็มจากลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็ม.....	33
4.1.1. การศึกษาเบื้องต้นในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์.....	33
4.1.2. การศึกษาเพื่อยืนยันผลในกล้าข้าวจำนวน 4 พันธุ์.....	39
4.2. การศึกษา gene expression profiles ของข้าวพันธุ์ที่ทนเค็มเพื่อเข้าใจกลไกการตอบสนอง ของพืชต่อภาวะเค็ม.....	43
4.2.1. การปลูกและการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่จะถูกนำไปสกัด RNA .....	43
4.2.2. การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อสกัด total RNA .....	46
4.2.3. การเตรียม RNA-seq libraries (3'-Tag RNA-seq libraries).....	47
4.2.4. การศึกษาทรานสคริปโทมด้วย 3'-Tag RNA-seq .....	47
4.2.5. การวิเคราะห์ gene set enrichment analysis .....	51
4.2.6. การระบุยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการทนเค็ม.....	53
4.3. การวิเคราะห์โครงข่ายการแสดงออกพร้อมของยีน (gene co-expression network).....	53
4.4. การศึกษาเพื่อยืนยันผลกระทบของภาวะเค็มที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่ระบุได้.....	60
บทที่ 5     อภิปรายผลการศึกษา .....	62
5.1. การคัดเลือกข้าวพันธุ์พื้นเมืองทนเค็มจากลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็ม.....	62
5.2. การศึกษา gene expression profiles ของข้าวพันธุ์ที่ทนเค็มเพื่อเข้าใจกลไกการตอบสนอง ของพืชต่อภาวะเค็ม.....	64
5.2.1. การเปลี่ยนแปลงที่ 12 ชั่วโมง หลังจากเผชิญกับภาวะเค็ม .....	64
5.2.2. การเปลี่ยนแปลงที่ 24 ชั่วโมง หลังจากเผชิญกับภาวะเค็ม .....	65
5.2.3. การเปลี่ยนแปลงที่ 48 ชั่วโมง หลังจากเผชิญกับภาวะเค็ม .....	66
5.2.3.1. การเปลี่ยนแปลงของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น ๆ และยีน ที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณในเซลล์.....	66
5.2.3.2. การเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่โดยตรงในการป้องกัน ตัวเองจากความเครียดเนื่องจากสิ่งแวดล้อม .....	68

5.3. การวิเคราะห์โครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (gene co-expression network).....72

5.4. การศึกษาเพื่อยืนยันผลกระทบของภาวะเค็มที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่ระบุได้..... 74

บทที่ 6      สรุปผลการศึกษา ..... 77

ภาคผนวก ก ..... 79

    ก.1 รหัสต้นแบบ (source code) ที่ใช้ในการสร้างโครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (gene co-expression network) .....80

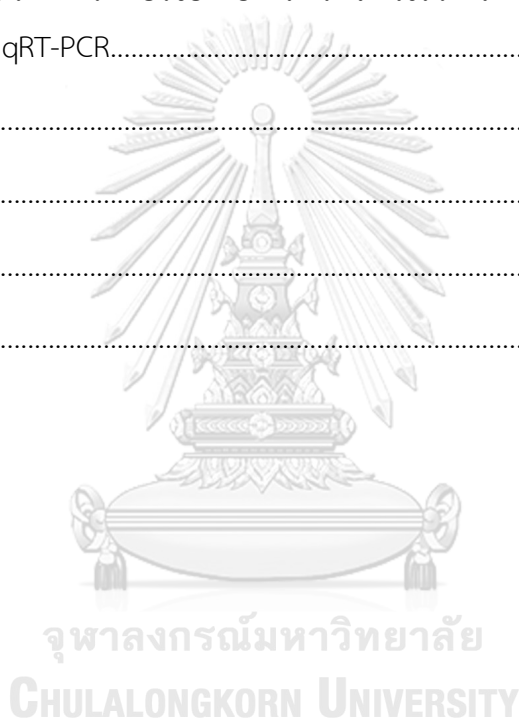
    ก.2 primers ของยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการทนเค็มที่ใช้ในการศึกษาเพื่อยืนยันผลกระทบของภาวะเค็มด้วย qRT-PCR.....82

ภาคผนวก ข ..... 85

ภาคผนวก ค ..... 97

บรรณานุกรม ..... 2

ประวัติผู้เขียน ..... 20



## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ลักษณะที่สำคัญของข้าวในแต่ละพันธุ์ (ประพาส วีระแพทย์, 2520).....	4
ตารางที่ 2 เกณฑ์การให้คะแนนความเสียหายจากความเค็ม (Salt injury score: SIS) (Gregario, Senedhira, and Mendoza, 1997) .....	12
ตารางที่ 3 ข้อดีและข้อเสียของวิธีต่าง ๆ ที่ใช้วัดการแสดงออกร่วมของยีน (Opgen-Rhein and Strimmer, 2006a; Weirauch, 2011; Song, Langfelder, and Horvath, 2012).....	22
ตารางที่ 4 GO term ในส่วนของ biological process ที่มี p-value สูงที่สุด 20 ลำดับแรก จากการวิเคราะห์ gene set enrichment analysis .....	52
ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ GCN ของ DEGs จำนวน 63 ยีน จากข้อมูล time-series transcriptome ของข้าวพันธุ์หลวงประเภทที่ cut-off thresholds ค่าต่าง ๆ.....	55
ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ SI_SIS ของการศึกษาเบื้องต้นในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์ (ตารางแสดงผลของวันที่ 1 ถึงวันที่ 5 หลังจากที่ถูกกล้าข้าวเผชิญกับความเค็ม) 86	
ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ SI_SIS ของการศึกษาเบื้องต้นในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์ (ตารางแสดงผลของวันที่ 6 ถึงวันที่ 9).....	87
ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ SI_SPAD ของการศึกษาเบื้องต้นในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์ (ตารางแสดงผลของวันที่ 1 ถึงวันที่ 5 หลังจากที่ถูกกล้าข้าวเผชิญกับความเค็ม) 88	
ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ SI_SPAD ของการศึกษาเบื้องต้นในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์ (ตารางแสดงผลของวันที่ 6 ถึงวันที่ 9 หลังจากที่ถูกกล้าข้าวเผชิญกับความเค็ม) 89	
ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ SI_Fv/Fm ของการศึกษาเบื้องต้นในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์ (ตารางแสดงผลของวันที่ 1 ถึงวันที่ 5 หลังจากที่ถูกกล้าข้าวเผชิญกับความเค็ม).....	90
ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ SI_Fv/Fm ของการศึกษาเบื้องต้นในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์ (ตารางแสดงผลของวันที่ 6 ถึงวันที่ 9 หลังจากที่ถูกกล้าข้าวเผชิญกับความเค็ม) .....	91

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของการศึกษาเพื่อ  
 ยืนยันผลในกล้าข้าวจำนวน 4 พันธุ์ เมื่อข้าวได้รับความเค็มเป็นเวลา 3 6 9 วัน .....92

ตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของการศึกษาใน  
 กล้าข้าวอายุ 20 วัน จำนวน 4 พันธุ์ เมื่อข้าวได้รับ ภาวะเค็มเป็นเวลา 3 6 9 วัน สำหรับใช้ใน  
 การศึกษาเพื่อยืนยันผลกระทบของภาวะเค็มที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่ระบุได้.....94

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในการศึกษาเพื่อยืนยันผลกระทบของภาวะ  
 เค็มที่มีต่อการแสดงออกของยีน OsRC12-5 ด้วยเทคนิค qRT-PCR ในกล้าข้าวจำนวน 4 พันธุ์ เมื่อข้าว  
 เผลี่ยกับความเค็มเป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง .....95

ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในการศึกษาเพื่อยืนยันผลกระทบของภาวะ  
 เค็มที่มีต่อการแสดงออกของยีน OsRMC ด้วยเทคนิค qRT-PCR ในกล้าข้าวจำนวน 4 พันธุ์ เมื่อข้าว  
 เผลี่ยกับความเค็มเป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง .....96

ตารางที่ 16 ข้อมูลสรุป sequencing reads ที่ map ได้กับฐานข้อมูลของ MSU 7.0 ทั้ง 36  
 libraries .....98

ตารางที่ 17 Down-regulated DEGs ที่วิเคราะห์ได้จากข้าวพันธุ์หลวงประทานที่เผลี่ยกับภาวะเค็ม  
 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ..... 100

ตารางที่ 18 Up-regulated DEGs ที่วิเคราะห์ได้จากข้าวพันธุ์หลวงประทานที่เผลี่ยกับภาวะเค็มเป็น  
 เวลา 48 ชั่วโมง..... 104

## สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 gene body coverage ที่อ่านได้จาก cDNA ทั้งหมด (A) และ gene body coverage ที่อ่านได้จากยีน Unc50 (B) ซึ่งมาจากการเตรียม cDNA library ด้วยวิธี 3'-Tag RNA-seq (LEXO) และวิธีดั้งเดิม (KAPA) (Ma et al., 2019) .....	16
ภาพที่ 2 ขั้นตอนการเตรียม cDNA library สำหรับศึกษาด้วยวิธี RNA sequencing แบบดั้งเดิม (KAPA) และวิธีของ 3'-Tag RNA-seq (LEXO) (Ma et al., 2019).....	18
ภาพที่ 3 ขั้นตอนการสร้างโครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (Mohammad and Oloomi, 2014) .....	21
ภาพที่ 4 ผลการวิเคราะห์กลุ่ม (clustering analysis) แบบ Ward's method ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 12 พันธุ์ จากค่าดัชนีเสถียรภาพของลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็ม ภายหลังต้นกล้าข้าวอายุ 14 วัน เปรียบกับความเค็มเป็นเวลา 1-9 วัน.....	35
ภาพที่ 5 ค่าดัชนีเสถียรภาพของค่าคะแนนความเสียหายจากความเค็ม (SI_SIS) ภายหลังต้นกล้าข้าวอายุ 14 วัน เปรียบกับความเค็มที่ 115 mM NaCl จากการศึกษาในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์ (Error bar = $\pm$ SE, ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%).....	36
ภาพที่ 6 ค่าดัชนีเสถียรภาพของความเขียวใบ (SI_SPAD) ภายหลังต้นกล้าข้าวอายุ 14 วัน เปรียบกับความเค็มที่ 115 mM NaCl จากการศึกษา ในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์ (Error bar = $\pm$ SE, ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) .....	37
ภาพที่ 7 ค่าดัชนีเสถียรภาพของ Chlorophyll fluorescence (SI_Fv/Fm) ภายหลังต้นกล้าข้าวอายุ 14 วัน เปรียบกับความเค็มที่ 115 mM NaCl จากการศึกษาในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์ (ns = ไม่มี ความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) .....	38
ภาพที่ 8 ค่าดัชนีเสถียรภาพของค่าคะแนนความเสียหายจากความเค็ม (SI_SIS) ของของข้าวพันธุ์ Pokkali หลวงประทาน (Luang Prathan) มะยม (Mayom) และ IR29 อายุ 14 วัน ภายหลังเปรียบเทียบกับความเค็มที่ 115 mM NaCl เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 วัน (Error bar = $\pm$ SE, ตัวอักษร ภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) ...	40

ภาพที่ 9 ค่าดัชนีเสถียรภาพ (stability index: SI) ในพารามิเตอร์ต่าง ๆ (SPAD = ค่าความเขียวใบ (A), Fv/Fm = ค่า chlorophyll fluorescence (B), FW = น้ำหนักสด (C), DW = น้ำหนักแห้ง (D), %CMS = เสถียรภาพเยื่อหุ้มเซลล์ (E), %RWC = ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (F) ของข้าวพันธุ์ Pokkali หลวงประทาน(Luang Prathan) มะยม (Mayom) และ IR29 อายุ 14 วัน ภายหลังจากเผชิญกับความเค็มที่ 115 mM NaCl เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 วัน (Error bar = ± SE, ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%).....41

ภาพที่ 10 ภาพถ่ายของข้าวพันธุ์ Pokkali หลวงประทาน (Luang Prathan) มะยม (Mayom) และ IR29 ที่อายุ 14 วัน ภายหลังจากเผชิญกับภาวะปกติ และภาวะเค็ม (115 mM NaCl) เป็นเวลา 3 6 และ 9 วัน (DAT = day after treatment, c = control, s = salt stress).....42

ภาพที่ 11 ค่าดัชนีเสถียรภาพ (stability index: SI) ในพารามิเตอร์ต่าง ๆ (SIS = ค่าคะแนนความเสียหายจากความเค็ม (A), SPAD = ค่าความเขียวใบ (B), Fv/Fm = ค่า chlorophyll fluorescence) (C) ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ อายุ 20 วัน ที่เผชิญกับความเค็ม เป็นเวลา 0 3 6 9 และ 12 วัน.....44

ภาพที่ 12 ลักษณะของข้าวพันธุ์ Pokkali หลวงประทาน (Luang Prathan) มะยม (Mayom).....45

ภาพที่ 13 ผลการตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วย gel electrophoresis ที่ได้ภายหลังจากการสกัดโดยใช้ 0.8 %w/v agarose gel ใน 0.5X TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100V เป็นเวลา 25 นาที ..46

ภาพที่ 14 ผลการตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วย gel electrophoresis ที่ได้ภายหลังจากการสกัด (A) และภายหลังจากกำจัด gDNA ด้วย DNase I (B) โดยใช้ 1.5 %w/v agarose gel ใน 0.5X TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 110V เป็นเวลา 45 นาที (ลูกศรสีแดงแสดงแถบของ gDNA ที่ปนเปื้อน, LM = low molecular weight DNA Ladder, 1Kb = 1Kb DNA ladder).....47

ภาพที่ 15 sequencing reads ของ *OsEf-1α* จากทั้ง 36 libraries ที่ถูก align กับ MSU Rice Genome Annotation Release 7 (MSU 7.0) จากโปรแกรม IGV version 2.8.6 .....48

ภาพที่ 16 density plot ของ transformed data จากตัวอย่างจาก library ต่าง ๆ.....50

ภาพที่ 17 จำนวน DEGs ที่วิเคราะห์ได้จาก DESeq2 platform จากข้อมูลทรานสคริปโทมของข้าวพันธุ์หลวงประทานที่เผชิญกับภาวะเค็มที่ 0 3 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค 3'-Tag RNA-seq.....50

ภาพที่ 18 สัดส่วนของ GO term ของ up-regulated genes (ซ้าย) down-regulated genes (ขวา) เมื่อข้าวพันธุ์หลวงประทานเผชิญกับภาวะเค็มที่ 115 mM NaCl เป็นเวลา 48 ชั่วโมง .....51

ภาพที่ 19 GCN ของ DEGs จำนวน 63 ยีน จากข้อมูล time-series transcriptome ของข้าวพันธุ์ หลวงประทาน (cut-off threshold = 0.5, ลูกครีสีแดง และลูกครีสีน้ำเงินแสดงโหนดของ OsRC12-5 และ OsRMC ตามลำดับ).....	56
ภาพที่ 20 GCN ของ DEGs จำนวน 63 ยีน จากข้อมูล time-series transcriptome ของข้าวพันธุ์ หลวงประทาน (cut-off threshold = 0.6, ลูกครีสีแดง และลูกครีสีน้ำเงินแสดงโหนดของ OsRC12-5 และ OsRMC ตามลำดับ).....	57
ภาพที่ 21 GCN ของ DEGs จำนวน 63 ยีน จากข้อมูล time-series transcriptome ของข้าวพันธุ์ หลวงประทาน (cut-off threshold = 0.7, ลูกครีสีแดง และลูกครีสีน้ำเงินแสดงโหนดของ OsRC12-5 และ OsRMC ตามลำดับ).....	58
ภาพที่ 22 GCN ของ DEGs จำนวน 63 ยีน จากข้อมูล time-series transcriptome ของข้าวพันธุ์ หลวงประทาน (cut-off threshold = 0.8, ลูกครีสีแดง และลูกครีสีน้ำเงินแสดงโหนดของ OsRC12-5 และ OsRMC ตามลำดับ).....	59
ภาพที่ 23 การแสดงออกของยีน OsRC12-5 ในข้าวพันธุ์ Pokkali หลวงประทาน (Luang Prathan) มะยม (Mayom) และ IR29 ที่มีอายุ 20 วันแล้วเผชิญกับความเค็มที่ 115 mM NaCl เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง (error bar = $\pm$ SE, block = 4, ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างแสดงค่าเฉลี่ยที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, ns = ไม่แตกต่าง) .....	61
ภาพที่ 24 การแสดงออกของยีน <i>OsRMC</i> ในข้าวพันธุ์ Pokkali หลวงประทาน (Luang Prathan) มะยม (Mayom) และ IR29 ที่มีอายุ 20 วันแล้วเผชิญกับความเค็มที่ 115 mM NaCl เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง (error bar = $\pm$ SE, block = 4, ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างแสดงค่าเฉลี่ยที่ต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, ns = ไม่แตกต่างกัน) .....	61
ภาพที่ 25 คุณสมบัติของ primers ที่ใช้ศึกษาการแสดงออกของ OsRC12-5 ที่ออกแบบได้.....	82
ภาพที่ 26 คุณสมบัติของ primers ที่ใช้ศึกษาการแสดงออกของ OsRMC ที่ออกแบบได้ .....	83
ภาพที่ 27 ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของเครื่อง qRT-PCR .....	83
ภาพที่ 28 Standard curve ของ OsEF-1 $\alpha$ .....	84
ภาพที่ 29 Standard curve ของ OsRC12-5.....	84
ภาพที่ 30 Standard curve ของ OsRMC.....	84

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญต่อประชากรโลกโดยเฉพาะในทวีปเอเชีย สำหรับการผลิตข้าวให้ได้ผลผลิตที่น่าพอใจจำเป็นต้องมีการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ให้เหมาะสม โดยเฉพาะปัจจัยที่ส่งผลทางลบต่อผลผลิตข้าวจำเป็นต้องมีการดูแลเพื่อให้ปัจจัยนั้นส่งผลต่อผลผลิตน้อยที่สุด หนึ่งในปัจจัยที่ส่งผลลบต่อผลผลิตข้าว คือ ความเครียดจากภาวะเค็ม (salt stress) ซึ่งเกษตรกรที่ปลูกข้าว ในหลายพื้นที่กำลังเผชิญกับปัญหาเหล่านี้โดยเฉพาะประเทศไทย (ศูนย์ศึกษาการพัฒนาภูพานอันเนื่องมาจากพระราชดำริ, 2555) ดังนั้นการเข้าใจเกี่ยวกับกลไกของพืชในการปรับตัวต่อภาวะเค็มนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์ หรือการแก้ปัญหาลักษณะของภาวะเค็มที่มีต่อข้าวได้อย่างตรงจุด ซึ่งนักวิทยาศาสตร์ได้มีการศึกษาถึงกลไกดังกล่าวในข้าวมาเป็นระยะเวลาอันยาวนาน โดยเฉพาะนักชีววิทยาโมเลกุลของพืช (Wu et al., 2015) ความสามารถในการทนต่อภาวะเค็มของพืชนั้นเป็นลักษณะถ่ายทอดเชิงปริมาณ (quantitative trait) ซึ่งถูกควบคุมโดยการทำงานของหลายยีน (polygene) ในปัจจุบันมีการค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อภาวะเค็มมากมาย โดยพบว่ายีนส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ (signal transduction) การควบคุมการถอดรหัส (transcription regulation) การเข้าออกของไอออน (ion transport) และเกี่ยวกับวิถีเมแทบอลิซึม (metabolic pathways) (สุมาลี ชุกำแพง, 2555) การค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อภาวะเค็มนี้ได้มาจากการศึกษาหลายวิธีซึ่งรวมทั้งวิธีทางทรานสคริปโทม (transcriptomic approach) (Reddy et al., 2017)

ทรานสคริปโทม (transcriptome) เป็นการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ในจีโนม (genome) ซึ่งคือ RNA transcript ทั้งหมดที่แสดงออก ณ ช่วงเวลาหนึ่ง การศึกษาการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ได้มีการพัฒนาเทคนิคที่ใช้ศึกษามาอย่างต่อเนื่อง ในปัจจุบันด้วยเทคโนโลยีของ high-throughput sequencing ทำให้นักวิจัยสามารถศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mRNA ทั้งหมดโดยการทำ RNA sequencing (RNA-seq) ซึ่งจะได้ข้อมูลทรานสคริปโทมที่ครอบคลุมและละเอียดกว่าเทคนิคการศึกษาทรานสคริปโทมในยุคก่อนหน้า (Spies and Ciaudo, 2015) ปัจจุบันเทคนิค 3'-Tag RNA-seq เป็นเทคนิคในการศึกษาทรานสคริปโทมที่มีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าเทคนิค RNA sequencing แบบพื้นฐาน และได้ข้อมูลปริมาณการแสดงออกของยีน (gene expression level) ที่แม่นยำกว่า เนื่องจากเทคนิคนี้จะเตรียม complementary DNA (cDNA) library จากการสร้าง cDNA ด้วยการทำกระบวนการย้อนการถอดรหัส (reverse transcription) จากปลายด้าน 3'-end



ของ mRNA (messenger RNA) เริ่มแรกเพียงหนึ่งสายเท่านั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ (sequencing read) เพียงหนึ่งสายจึงหมายถึงมีการถอดรหัส (transcription) ของยีนหนึ่ง ๆ จนกลายเป็นทรานสคริป (transcript) หรือ mRNA จากยีนนั้น ๆ หนึ่งครั้ง ในขณะที่วิธีพื้นฐานจะทำการบวกรหัสย้อนการถอดรหัสจาก mRNA ทั้งสายที่ถูกทำให้กลายเป็น ชิ้นย่อยหลายชิ้น (fragmentation) sequencing read ที่อ่านได้หนึ่งสายจึงไม่ได้บ่งบอกถึง จำนวนที่แท้จริงของการถอดรหัสในยีนนั้น การศึกษาด้วยวิธีนี้บางกรณีจึงจำเป็นต้องมีการทำ short read assembly และตัดแปรรหัสข้อมูลเพื่อให้ทราบปริมาณการแสดงออกของยีนที่แท้จริงซึ่งมีโอกาสเกิดข้อผิดพลาดสูง การศึกษาทรานสคริปโทมด้วยเทคนิค 3'-Tag RNA-seq จึงมีความเหมาะสมสำหรับการศึกษาทรานสคริปโทมที่มุ่งเน้นที่จะทราบปริมาณการแสดงออกของยีนที่แม่นยำโดยมีจุดประสงค์เพื่อที่จะหายีนที่แสดงออกอย่างแตกต่าง (Differentially expressed genes: DEGs) โดยเป็นเทคนิคที่มีค่าใช้จ่ายน้อยเนื่องจากใช้ปริมาณ cDNA library สำหรับที่จะนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในปริมาณน้อยกว่าเมื่อเทียบกับเทคนิค RNA sequencing แบบพื้นฐาน แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาด้วยเทคนิคนี้สามารถทำได้แค่สิ่งมีชีวิตกลุ่มยูแคริโอต (eukaryotic organism) ที่มี reference genome ที่สมบูรณ์ อีกทั้งยังไม่สามารถใช้ศึกษา alternative splice variation ที่เกิดขึ้นได้ (Lohman, Weber, and Bolnick, 2016; Froenicke, 2018)

การศึกษาด้วยวิธีทรานสคริปโทมนั้นถูกนำมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในช่วงเวลาที่เผชิญกับภาวะเครียดทำให้นักสรีรวิทยาของพืชเข้าใจกระบวนการทางชีววิทยาที่ทำให้พืชทนต่อความเครียดมากขึ้น โดยที่ผ่านมามีการออกแบบการทดลองเพื่อเก็บตัวอย่างสำหรับศึกษาได้สองวิธี (Dutta, Snyder, and Klapa, 2007) คือ 1. แบบ snapshot เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนจากตัวอย่างพืชที่เผชิญกับภาวะต่างกันในช่วงเวลาใดเวลาหนึ่ง อาทิ การศึกษาของ Walia et al. (2005) ที่ศึกษาในข้าวพันธุ์ FL428 การศึกษาของ Zhou et al. (2016) ที่ศึกษาด้วย RNA-seq ใน Dongxiang Wild Rice (*Oryza rufipogon* Griff.) 2. แบบ time-series เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนจากตัวอย่างพืชที่เผชิญกับภาวะต่างกันโดยติดตามการแสดงออกที่เวลาต่าง ๆ ซึ่งจะช่วยให้เห็นการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกิดขึ้นภายหลังเผชิญกับภาวะนั้น ๆ และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางชีววิทยาบางอย่าง (Dutta, Snyder, and Klapa, 2007; Spies and Ciaudo, 2015) อาทิ การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาเพื่อตอบสนองต่อภาวะเครียดที่แต่ละกระบวนการย่อย ๆ เกิดขึ้นที่เวลาต่างกัน อย่างเช่น การศึกษาของ Kawasaki et al. (2001) ที่ศึกษา time-series transcriptome ด้วยเทคนิค microarray ในข้าวพันธุ์ Pokkali การศึกษาของ Zhou et al. (2007) ในข้าวพันธุ์ Minghui 63 การศึกษาของ Kumari et al. (2009) ในข้าวพันธุ์ IR64 ซึ่งล้วนแล้วมาจากการที่นักสรีรวิทยาเชื่อมโยงกับการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของพืช

ที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มและความสามารถในการรักษาคุณภาพสำหรับการเจริญเติบโต ทำให้ได้มาซึ่ง germplasm ที่ใช้ในการศึกษา

เนื่องจากประเทศไทยมีข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีจำนวนมากจึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และมีการเพาะปลูกในสภาพแวดล้อมที่ต่างกันในแต่ละท้องถิ่น และมีการคัดเลือกเก็บสายพันธุ์ที่ดีไว้ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยหลายพันธุ์มีความสามารถในการทนเค็ม (นพคุณ คุณผลวัฒนา, 2558) แต่ยังคงมีการศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาต่อภาวะเค็มสำหรับข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยไม่มากนัก ในงานวิจัยครั้งนี้จึงได้ดำเนินการคัดเลือกข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีความสามารถในการทนเค็มโดยการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็ม อาทิ ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ด้วยแสงและค่าคะแนนความเสียหายจากความเค็ม (Gregario, Senedhira, and Mendoza, 1997) เป็นต้น สำหรับศึกษา time-series transcriptome ด้วยเทคนิค 3'-Tag RNA-seq ในขณะที่พืชตอบสนองต่อภาวะเค็มที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษา gene expression profile ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่ทนเค็มเพื่อเข้าใจกลไกการตอบสนองของพืชต่อภาวะเค็มมากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยมุ่งหวังว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยน่าจะมีกลไกการทนเค็มบางอย่างที่แตกต่างไปจากข้าวพันธุ์มาตรฐานทนเค็มและข้าวพันธุ์ทนเค็มอื่น ๆ ที่มีการศึกษามาก่อนหน้าแล้ว โดยในการศึกษานี้จะมีการระบุยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการทนเค็ม (putative salt tolerant candidate genes) มีการวิเคราะห์โครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (gene co-expression network) และยืนยันผลกระทบของภาวะเค็มที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่ระบุได้ด้วยการทำ quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) ซึ่งการเข้าใจกลไกในการทนเค็มและการทราบยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการทนเค็มของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยนั้นจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคต

## 1.2. วัตถุประสงค์

- 1.2.1. ศึกษาการทนเค็มของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยด้วยวิธีการศึกษาทรานสคริปโทม
- 1.2.2. ทำนายยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการทนเค็ม (putative salt tolerant candidate genes)

## 1.3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การทราบถึงพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยที่มีความสามารถในการทนเค็ม และกลไกการทนเค็มที่สามารถทำนายยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการทนเค็มได้จะสามารถนำข้อมูลเหล่านี้ไปใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวสายพันธุ์ทนเค็มได้ต่อไปในอนาคต

## บทที่ 2

### ตรวจสอบเอกสาร

#### 2.1. ข้าวและอุปสรรคในการผลิตข้าว

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ POACEAE เช่นเดียวกับหญ้า มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ปลูกขึ้นง่ายเนื่องจากมีความทนทานและสามารถเจริญอยู่ในหลายสภาพภูมิอากาศในแต่ละภูมิภาคของโลก ไม่ว่าจะเป็นในถิ่นแห้งแล้งแบบทะเลทราย ในพื้นที่ราบลุ่มน้ำท่วมถึง หรือแม้กระทั่งบนเทือกเขาที่มีอุณหภูมิต่ำ (ประพาส วีระแพทย์, 2520) ข้าวนี้ถือว่ามีผลสำคัญต่อประชากรโลกอย่างมากเนื่องจากเป็นพืชธัญญาหารหลักของโลก โดยเฉพาะคนในทวีปเอเชีย ซึ่งปัจจุบันมีแนวโน้มของการบริโภคข้าวเป็นอาหารมากขึ้นทุกปี (Mohanty, 2013; Rabara et al., 2018; Koizumi and Furuhashi, 2020)

ปัจจุบันมีการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นและเมล็ดข้าวในทางอนุกรมวิธานเพื่อจำแนกข้าวในระดับต่ำกว่าสปีชีส์ได้เป็นพันธุ์ (varieties) ต่าง ๆ ดังตาราง 1 ซึ่งแต่ละพันธุ์นั้นนิยมปลูกในทวีปเอเชียที่บริเวณต่าง ๆ กัน โดยที่ *Oryza sativa* var. *indica* เป็นข้าวที่ปลูกในประเทศเขตร้อน อาทิ ศรีลังกา จีนตอนใต้และตอนกลาง อินเดีย อินโดนีเซีย บังกลาเทศ ไทย ฟิลิปปินส์ เป็นต้น *Oryza sativa* var. *japonica* เป็นข้าวที่ปลูกในประเทศจีนตอนเหนือและตะวันออก ญี่ปุ่น เกาหลี และประเทศอื่น ๆ ที่อยู่ในเขตอบอุ่น ส่วน *Oryza sativa* var. *javanica* เป็นข้าวที่พบว่ามี การปลูกในประเทศอินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ เป็นต้น แต่ไม่ค่อยได้รับความนิยมเนื่องจากข้าวพันธุ์นี้ให้ผลผลิตที่ค่อนข้างต่ำ (ประพาส วีระแพทย์, 2520)

ตารางที่ 1 ลักษณะที่สำคัญของข้าวในแต่ละพันธุ์ (ประพาส วีระแพทย์, 2520)

ลักษณะที่สำคัญของข้าว	<i>O. sativa</i> var. <i>indica</i>	<i>O. sativa</i> var. <i>japonica</i>	<i>O. sativa</i> var. <i>javanica</i>
ใบ	กว้าง สีเขียวอ่อน	แคบ สีเขียวแก่	กว้าง แฉก สีเขียวอ่อน
เมล็ด	ยาว ค่อนข้างแบน	สั้น กลม	กว้างหนา
กอก	แตกกอกมาก	แตกกอกปานกลาง	แตกกอน้อย
ต้น	สูง อ่อน	เตี้ย แข็ง	สูง แข็ง
หางของเมล็ด	สั้น	สั้นมาก-ยาว	สั้นมาก-ยาว
ขนของข้าวเปลือก	สั้นมาก	ขนมาก และยาว	ขนยาว
การร่วง	เมล็ดร่วงง่าย	เมล็ดร่วงยาก	เมล็ดร่วงยาก

สำหรับการผลิตข้าวให้ได้ผลผลิตที่น่าพอใจ โดยมีคุณภาพที่ดี ผลิตได้ปริมาณที่เหมาะสมนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายปัจจัยที่เข้ามาส่งผลต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวในระหว่างที่ดำเนินการปลูก ไม่ว่าจะเป็นที่ชนิดพันธุ์ข้าวที่ใช้ปลูกซึ่งแต่ละท้องที่ก็มีพันธุ์ข้าวพื้นเมือง (rice cultivar) แตกต่างออกไปตามแต่ละพื้นที่ ลักษณะของเมล็ดพันธุ์ วัชพืช โรคข้าว แมลงศัตรูข้าว และการขาดการจัดการ หลังการเก็บเกี่ยวที่ดี ล้วนแล้วเป็นปัจจัยทางชีวภาพที่เข้ามาส่งผลต่อผลผลิตข้าว ส่วนปัจจัยทางกายภาพที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของต้นข้าวแล้วส่งผลต่อผลผลิตข้าว นั้นพบว่ามาจากปัญหาจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของข้าว อาทิ ปัญหาจากดินในบริเวณที่ทำการปลูก การเผชิญกับความเครียดจากภาวะเค็ม (salt stress) การจัดการน้ำที่ไม่ดี การเผชิญกับความเครียดจากภาวะแล้ง (drought stress) การที่ข้าวถูกเผชิญกับน้ำท่วมในระยะสั้น และการที่ข้าวเผชิญกับอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น (Duwayri, Tran, and Nguyen, 1999)

## 2.2. ความเครียดจากภาวะเค็มของพืช

ความเครียดจากภาวะเค็มของพืช (plant salt stress) หมายถึง สภาวะที่พืชเจริญอยู่บริเวณดินที่มีสารละลายเกลืออยู่ปริมาณสูง ส่งผลให้การเจริญเติบโตของพืชหยุดชะงักหรือตายได้ (Zhu, 2007) ซึ่งถ้าหากพืชไม่ทนเค็มหรือทนเค็มได้น้อยเผชิญกับความเค็มก็จะแสดงอาการคล้ายกับการที่พืชขาดน้ำ เช่น การเจริญเติบโตโดยรวมถูกชะงักและมีขนาดเล็กกว่าพืชที่ปลูกในดินธรรมดา รวมทั้งอาจมีอาการใบม้วนเพื่อลดการคายน้ำ หรือใบอาจมีสีเขียวเข้มแกมน้ำเงิน (bluish green) มากกว่าพืชในสภาวะปกติ เนื่องจากในช่วงแรกที่พืชเผชิญกับภาวะเค็มจะสร้างใบที่มีคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) มาก และมีสารเคลือบใบ (cuticle) หนาเพื่อลดการสูญเสียน้ำหรือในบางกรณีอาจมีอาการปลายใบไหม้ (tip burn) เกิดจุดประ (mottles) บนใบ มีใบม้วน และเหลืองเนื่องจากขาดคลอโรฟิลล์ หรืออาจมีใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ปลายใบและขอบใบแห้งกรอบ เป็นต้น (อรุณี ยูวะนิยม, 2547)

การที่พืชเผชิญกับภาวะเค็มนั้นจะส่งผลให้การเจริญเติบโตของพืช ผลผลิต และคุณภาพของพืชนั้นลดลง อันเป็นผลมาจาก

1. ความเครียดออสโมติก (osmotic stress) ซึ่งเป็นความเครียดที่พืชเผชิญเมื่อพืชเจริญอยู่ในที่ที่สารละลายภายในดินมีความเข้มข้นมากกว่าภายในต้นพืช ทำให้ศักย์ (water potential,  $\Psi_w$ ) ของน้ำในดินมีค่าต่ำกว่าศักย์ของน้ำภายในต้นพืช เซลล์พืชจึงมีโอกาสขาดน้ำและตายได้ เพราะน้ำจะไหลจากบริเวณที่มีศักย์สูง (เกลือเจือจาง) ไปสู่บริเวณที่มีศักย์ต่ำกว่า (เกลือเข้มข้น) (Ayers, 1975; Zhu, 2007; Yadav et al., 2011; Liang et al., 2018; อรุณี ยูวะนิยม, 2547)

2. ความเป็นพิษจากไอออน (ion toxicity) เนื่องจากไอออนบางชนิดที่พืชสะสมเข้าไปมีมากเกินไปเกินความจำเป็นของพืช (Ayers, 1975) อาจทำให้พืชแสดงอาการขอบใบไหม้และลามไปถึงเส้นกลาง

ใบในที่สุด สำหรับไอออนสำคัญที่ไปมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของพืชในสถานะเค็มนั้น ได้แก่ โซเดียมไอออน ( $\text{Na}^+$ ) และคลอไรด์ไอออน ( $\text{Cl}^-$ ) ซึ่งมีผลทำให้พืชตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ลดลง สังเคราะห์โปรตีนได้ลดลง และมีอัตราการเจริญเติบโตที่น้อยลงในที่สุด (Ayers, 1975; Zhu, 2007; Yadav et al., 2011; Liang et al., 2018; อรุณี ยูวะนิยม, 2547)

3. ความไม่สมดุลของธาตุอาหาร (plant nutrient imbalance) ทำให้พืชแสดงอาการเป็นพิษหรืออาการขาดธาตุอาหารซึ่งเป็นผลมาจากประจุธาตุบางชนิดในสารละลายดินมีมากกว่าระดับปกติและไปส่งผลยับยั้งขัดขวางการดูดธาตุอาหารอื่น ๆ ซึ่งส่งผลกระทบต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาหลาย ๆ อย่างที่เกิดขึ้นในพืช อาทิ กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) เนื่องจากการขาดธาตุ Mg และ N ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) นั้นย่อมส่งผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นอย่างมาก (Yadav et al., 2011; อรุณี ยูวะนิยม, 2547)

4. ความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งเป็นผลมาจากสารอนุมูลอิสระ เช่น superoxide radicals, hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) และ hydroxyl radicals ( $\text{OH}^\cdot$ ) ที่พืชถูกชักนำให้สร้างขึ้นเมื่อเผชิญกับภาวะเครียด โดยสารอนุมูลอิสระเหล่านี้จะไปทำลายส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก เยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น (Ayers, 1975; Zhu, 2007; Yadav et al., 2011; Liang et al., 2018; อรุณี ยูวะนิยม, 2547)

ในปัจจุบันพบว่าข้าวนั้นเป็นพืชอาหารที่ได้รับผลกระทบจากภาวะเค็ม เนื่องจากพื้นที่ปลูกข้าวในหลายพื้นที่เป็นที่ประสบปัญหาดินเค็ม ซึ่งดินที่มีเกลือสะสมอยู่ในปริมาณมากย่อมทำให้คุณสมบัติทางกายภาพของดินเปลี่ยนไปในทางที่ไม่ดี เป็นอันตรายต่อระบบราก และส่งผลการดูดน้ำและแร่ธาตุในดินไปใช้ (ศูนย์ศึกษาการพัฒนาภูพานอันเนื่องมาจากพระราชดำริ, 2555) โดยมีรายงานว่าหากข้าวเจริญอยู่ในพื้นที่ที่มีค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายที่สกัดจากดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำที่อุณหภูมิ  $25^\circ\text{C}$  ( $\text{EC}_e$ ) ประมาณ 4 dS/m จะถือว่าข้าวเผชิญกับภาวะเครียดเค็มปานกลาง และหากข้าวเจริญอยู่ในพื้นที่ที่มีค่า  $\text{EC}_e$  มากกว่า 8 dS/m จะถือว่าข้าวเผชิญกับภาวะเครียดเค็มสูง และหากข้าวเผชิญกับภาวะเครียดเค็มเป็นเวลานานย่อมส่งผลให้ข้าวตายหรือมีอัตราการเจริญเติบโตที่เปลี่ยนไปซึ่งเป็นผลมาจากการปรับตัวของข้าวเพื่อให้เจริญอยู่ได้ในภาวะเค็ม โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงกลไกบางอย่างที่เป็นการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี การเปลี่ยนแปลงสรีรวิทยา และการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาซึ่งสังเกตอาการได้โดยทั่วไปโดยพบว่าใบจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีขาวหรือน้ำตาล ปลายใบไหม้ ใบม้วนหรือตาย การเจริญเติบโตโดยรวมหยุดชะงัก การแตกกอ (tillering) เกิดขึ้นน้อย การเจริญของรากต่ำและไม่มีประสิทธิภาพ ส่งผลให้ข้าวเจริญเติบโตในแปลงไม่สม่ำเสมอ ยิ่งไปกว่านั้นยังส่งผลกระทบต่อพัฒนาการของเมล็ดข้าว ทำให้การติดเมล็ดน้อย และส่งผลกระทบต่อผลผลิตในที่สุด (IRRI, 2006) ซึ่งหลายพื้นที่กำลังเผชิญกับปัญหานี้ อาทิ ในตอนใต้ของอินเดียพบว่ามีผลผลิตข้าวลดลงถึง 23 kg/ha เมื่อข้าวประสบกับปัญหาดินเค็ม (Duwayri, Tran, and Nguyen,

1999) และในบริเวณดินดอนสามเหลี่ยมปากแม่น้ำโขงในประเทศเวียดนามซึ่งเป็นแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญก็ประสบปัญหากับความเค็มเช่นกัน (Nhan et al., 2012) สำหรับประเทศไทยนั้นพบว่าปัญหาดินเค็มนับว่าเป็นปัญหาที่สำคัญเนื่องจากในหลายท้องที่ที่มีการเพาะปลูกนั้นเกษตรกรกำลังเผชิญกับปัญหาดินเค็มโดยเฉพาะอย่างยิ่งภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีดินเค็มกระจายอยู่ทั่วไปประมาณ 17.8 ล้านไร่ และร้อยละ 76 ของพื้นที่ดังกล่าวเป็นพื้นที่ปลูกข้าว (ศูนย์ศึกษาการพัฒนาภูพานอันเนื่องมาจากพระราชดำริ, 2555) อีกทั้งยังมีบริเวณภาคกลางบางส่วนที่เป็นแหล่งปลูกข้าวแต่ก็ประสบปัญหาดินเค็มหรือน้ำที่ใช้ในการทำการเกษตรมีปริมาณเกลือสูงซึ่งเป็นผลอันเนื่องมาจากน้ำทะเลหนุนสูงในช่วงจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศ ซึ่งภาครัฐจำเป็นต้องมีการบริหารจัดการน้ำที่ดีเพื่อสร้างสมดุลระหว่างน้ำในเขื่อนที่ต้องถูกระบายเพื่อผลักดันน้ำเค็มที่รุกเข้ามาและน้ำที่จะถูกจัดสรรเพื่อใช้ในการทำการเกษตร ซึ่งปัจจุบันรัฐจำเป็นต้องรับมือกับการป้องกันภาวะเค็มและภาวะแล้งเพื่อไม่ให้กระทบต่อภาคเกษตรกรรมของไทยโดยเฉพาะการปลูกข้าว (ไทยพับลิก้า, 2563)

### 2.3. การตอบสนองของพืชต่อความเครียดจากภาวะเค็ม

ในภาวะที่พืชเผชิญกับสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ อาทิ ความเครียดจากภาวะเค็ม เซลล์พืชจะสามารถรับรู้และสามารถตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่เผชิญอยู่ได้ เนื่องจากเซลล์พืชมีกระบวนการส่งสัญญาณในเซลล์ (cellular signal transduction) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เซลล์รับรู้ปัจจัยกระตุ้นจากภายนอก (signal perception) แล้วถ่ายทอดหรือขยายสัญญาณ (transduction) ผ่านการทำงานของโมเลกุลหลายชนิดภายในเซลล์ (relays molecule) แล้วก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน (alteration of gene expression) โดยเป็นยีนที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชีวเคมีภายในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา แล้วก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคศาสตร์และสัณฐานวิทยาตามมาซึ่งมีความจำเพาะกับสิ่งแวดล้อมที่พืชเผชิญอยู่เพื่อให้พืชสามารถปรับตัวให้ดำรงอยู่กับสิ่งแวดล้อมนั้น ๆ ได้ (Buchanan, Gruissem, and Jones, 2015; Tripathy et al., 2019; Zelm, Zhang, and Testerink, 2020) โดยพบว่ายีนที่ถูกชักนำให้มีการแสดงออกนั้นสามารถจำแนกตามหน้าที่ในการทำงานได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ (Hirt and Shinozaki, 2003)

1. ยีนที่ทำหน้าที่โดยตรงในการป้องกันตัวเองจากความเครียดเนื่องจากสิ่งแวดล้อม (directly protect against environmental stress) ซึ่งสามารถจำแนกได้ ดังนี้

1.1 ยีนที่ทำหน้าที่รับมือกับความเครียดออสโมติก อาทิ ยีนที่สามารถ encode ให้ water channel protein หรือ Aquaporins (Liu et al., 2019) ยีนที่สามารถ encode ให้ Late Embryogenesis Abundant (LEA) protein (Moons, De Keyser, and Van Montagu, 1997; Buchanan, Gruissem, and Jones, 2015) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และสะสม compatible solutes ซึ่งเป็นสารในรูปน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาล

โมเลกุลคู่ sugar alcohol หรือกรดอะมิโนบางตัว เช่น proline เป็นต้น โดยมีจุดประสงค์เพื่อรักษาเซลล์ภายในต้นพืชเพื่อแก้ไขปัญหาการขาดน้ำของพืชอันเนื่องมาจากค่าเซลล์ของน้ำภายในดินต่ำกว่าภายในรากแล้วส่งผลให้รากดูดน้ำไปใช้ไม่ได้ รวมทั้งยีนที่ทำหน้าที่โดยตรงให้พืชมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาเพื่อรักษาสมดุลของการใช้น้ำให้เพียงพอต่อความต้องการ อาทิ การเปลี่ยนแปลงอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง การเปิดปิดของปากใบ และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของราก เป็นต้น (Buchanan, Grisse, and Jones, 2015; Zelm, Zhang, and Testerink, 2020)

1.2 ยีนที่แก้ไขปัญหาความเป็นพิษจากอออนบางชนิดและความไม่สมดุลของธาตุอาหาร อาทิ ยีนที่เกี่ยวข้องกับ compartmentation ผ่านการทำงานของ ion channel protein ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมภาวะจรัลของอออน (ion homeostasis) ให้ใกล้เคียงกับภาวะปกติด้วย โดยจะคงรักษาอออนที่มีความจำเป็นเอาไว้ และกำจัดอออนที่เป็นพิษและมีมากเกินไปหรือนำไปเก็บไว้ใน vacuole อาทิ ควบคุมให้อัตราส่วนของ  $K^+/Na^+$  สูง เนื่องจากสภาวะปกติ  $K^+$  มีความจำเป็นต่อพืชและพบในปริมาณมากภายในเซลล์ (100-200 mM) ส่วน  $Na^+$  พบอยู่ในปริมาณน้อย (1-10 mM) (Buchanan, Grisse, and Jones, 2015; Zelm, Zhang, and Testerink, 2020; สุมาลี ชูกำแหง, 2555)

1.3 ยีนที่ทำหน้าที่รับมือกับความเครียดออกซิเดชัน อาทิ ยีนที่ทำหน้าที่ลดหรือบรรเทาความเป็นพิษของสารอนุมูลอิสระโดยสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในรูปของเอนไซม์ เช่น superoxide dismutases (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), glutathione-S-transferases (GST), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), dehydroascorbate reductase (DHAR), glutathione reductase (GR) และ glutathione peroxidases (GPX) เป็นต้น หรือเป็นยีนที่ encode ให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์อย่างเช่น glutathione (GSH), ascorbic acid (AA), tocopherols (TOCs), carotenoids (CARs) และ flavonoids เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะเปลี่ยนสารอนุมูลอิสระให้อยู่ในรูปที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์หรือเป็นพิษต่อเซลล์น้อย (Buchanan, Grisse, and Jones, 2015; Tripathy et al., 2019; สุมาลี ชูกำแหง, 2555)

2. ยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น ๆ และยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ (regulate gene expression and signal transduction) ได้แก่

2.1 ยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น ๆ โดยควบคุมในขั้นตอนของการถอดรหัส (transcriptional control) ซึ่งเป็น DNA binding protein อาทิ transcription factor (TFs) ซึ่งสามารถถูกชักนำให้มีการแสดงออกในระหว่างที่พืชเผชิญกับความเครียด

จากสิ่งแวดล้อมชนิดต่าง ๆ และมักทำงานร่วมกันเป็นโครงข่ายอันสลับซับซ้อน ในปัจจุบันสามารถจำแนกออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ ได้ อาทิ DREB family ซึ่งเป็นกลุ่มของ Dehydration responsive element binding protein, ERF family หรือ Ethylene-responsive element binding factor, Zinc finger family, WRKY family, MYB family, bZIP family, NAC family, กลุ่มของ Hemeodomain transcription factor และกลุ่มของ basic helix-loop-helix protein เป็นต้น (Shanker and Venkateswarlu, 2011)

2.2 ยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ในการควบคุมหลังการถอดรหัส (post-transcriptional control) อาทิ ยีนที่ encode ให้ RNA binding protein ยีนที่เกี่ยวข้องกับ post-transcription processing ที่เปลี่ยน pre-mRNA เป็น mRNA ยีนที่ควบคุม RNA splicing (Sripinyowanich et al., 2013; Udomchalothorn et al., 2017) และยีนที่เกี่ยวข้องกับ RNA interference เป็นต้น (Mangrauthia et al., 2013)

2.3 ยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ในการควบคุมภายหลังการแปลรหัส (post-translational control) อาทิ ยีนที่เกี่ยวข้องกับ protein modification (Pou et al., 2016) และ ubiquitin ligase enzyme (Zhang et al., 2015) เป็นต้น

2.4 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ อาทิ Protein kinase และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ phosphoinositide metabolism และยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีของฮอร์โมนพืชชนิดต่าง ๆ ซึ่งทำงานร่วมกัน (cross-talk) เป็นต้น (Hirt and Shinozaki, 2003; Halbeisen et al., 2008)

แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังคงมีการศึกษากลไกการตอบสนองของพืชต่อภาวะเค็มอย่างต่อเนื่องและยังไม่สิ้นสุดเพราะปรากฏการณ์ทางชีววิทยามีกลไกที่ซับซ้อนก่อบรรยากาศความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตนั้นส่งผลให้พืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างออกไปและมีกลไกที่แตกต่างกันในการเผชิญกับภาวะเค็ม การศึกษากลไกการตอบสนองของพืชต่อภาวะเค็มเพื่อให้ทราบกลไกและยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเค็มในพืชนั้นยังคงเป็นอีกหนึ่งภารกิจสำคัญของนักวิจัยที่ต้องทำให้สำเร็จเพื่อเป็นองค์ความรู้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ และเป็นฐานข้อมูลสำหรับการจัดการเกษตรตามแนวทางการทำการเกษตรแบบอัจฉริยะ (smart farming หรือ intelligent farming) ที่ต้องพึ่งพาองค์ความรู้ที่มีศึกษามาอย่างต่อเนื่อง อันเป็นความหวังใหม่ของเกษตรกรและผู้บริโภคทั่วโลกที่ต้องการความยั่งยืนทานด้านการเกษตรสืบไป (Tantalaki, Souravlas, and Roumeliotis, 2019; สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2563)



## 2.4. การศึกษาไกลและยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเค็มในข้าว

ด้วยเหตุที่ข้าวเป็นพืชอาหารที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก และมีแหล่งผลิตข้าวกระจายอยู่หลายภูมิภาคทั่วโลกซึ่งแตกต่างกันไปตามลักษณะของภูมิอากาศ และจากสิ่งแวดล้อมที่มีความแปรผันไปในแต่ละพื้นที่ทำให้ข้าวเป็นพืชที่มีความหลากหลายสูงเพราะถูกคัดเลือกสายพันธุ์มาอย่างยาวนาน (ประพาส วีระแพทย์, 2520) สำหรับประเทศไทยนั้นมียางานว่าคนไทยมีความผูกพันกับข้าวและการปลูกข้าวมาตั้งแต่อดีต มีการพัฒนาและคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีลักษณะดีมาอย่างต่อเนื่อง โดยในรัชสมัยของพระบาทสมเด็จพระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัวฯ ได้มีพระราชดำริให้กระทรวงเกษตรราธิการ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ในขณะนั้น) จัดให้มีการประกวดพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของเกษตรกรจากพื้นที่ต่าง ๆ ทว่าราชอาณาจักรเพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรมีการพัฒนาสายพันธุ์และเก็บรักษาข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีลักษณะดีเอาไว้ เพื่อนำไปแจกจ่ายให้เกษตรกรทำพันธุ์เพาะปลูกในโอกาสต่าง ๆ (การประกวดพันธุ์ข้าว ที่วัดสุทัศน์เทพวราราม, 2452; แจ้งความกระทรวงเกษตรราธิการเรื่องมีผู้ให้พันธุ์ข้าวปลูกแก่กระทรวงเกษตรราธิการสำหรับแจกให้ชาวนาให้ทำพันธุ์เพาะปลูก, 2471) อาทิ ในพระราชพิธีจรดพระนังคัลแรกนาขวัญซึ่งถูกจัดขึ้นเพื่อเป็นขวัญกำลังใจและเปิดโอกาสให้เกษตรกรเก็บเมล็ดพันธุ์ที่ดีไปใช้ปลูกในนาของตน (พระบาทสมเด็จพระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัว, 2431) ทำให้ในปัจจุบันมียางานว่าประเทศไทยมีข้าวไม่น้อยกว่า 3,500 พันธุ์ ประกอบด้วยข้าวป่า (wild rice) ข้าวพันธุ์พื้นเมือง (local cultivars) จากการคัดเลือก และข้าวที่ถูกปรับปรุงพันธุ์ขึ้นใหม่ (breeding) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดขึ้นมาจากการศึกษาวิจัย (Meepriruk et al., 2016) ด้วยเหตุนี้ข้าวไทยโดยเฉพาะข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยจึงเป็นที่นิยมอย่างยิ่งในการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มโดยมีจุดประสงค์ที่จะคัดเลือกพันธุ์ที่มีความสามารถในการทนเค็มและมุ่งหวังที่จะนำไปศึกษาต่อเพื่อที่จะทราบกลไกและยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเค็มจากข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย เพื่อที่จะต่อยอดสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชที่มีความสามารถในการทนเค็มในอนาคต อาทิ การศึกษาของ สมศรี อรุณินท์ และคณะ (2524) จำนวน 222 พันธุ์ โดยศึกษาความสามารถในการงอกในน้ำเกลือ ศึกษาค่าคะแนนความเสียหายจากความเค็ม และปริมาณผลผลิตของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ การศึกษาของ Khunpolwattana et al. (2013) ที่ศึกษาฟีโนไทป์ (phenotype) บางประการที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มในต้นกล้าข้าวพื้นเมืองไทยจำนวน 51 พันธุ์ ซึ่งพบว่าข้าวพันธุ์หลวงประธาน (Luang Prathan) เป็นข้าวที่มีความสามารถในการทนเค็มใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ Pokkali ที่เป็นข้าวพันธุ์ทนเค็มมาตรฐาน เป็นต้น

เนื่องจากความสามารถในการทนต่อภาวะเค็มของข้าวนั้นเป็นลักษณะถ่ายทอดเชิงปริมาณ (quantitative trait) ซึ่งถูกควบคุมโดยการทำงานของหลายยีน (polygene) (สุมาลี ชุกกำแพง, 2555) ทำให้การศึกษากลไกและยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเค็มในข้าวนิยมเริ่มต้นศึกษาด้วยวิธี forward genetics กล่าวคือมีการนำตัวอย่างข้าวที่มีพันธุกรรมต่างกันอันเนื่องมาจากความหลากหลายทาง

ชีวภาพหรือต่างกันเพราะถูกชักนำให้มีการกลายพันธุ์มาประเมินฟีโนไทป์หรือลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็ม เพื่อมุ่งหน้าไปสู่การหาคำตอบที่ต้องการระบุว่ายีนใดมีส่วนเกี่ยวข้องในการกำหนดให้ปรากฏฟีโนไทป์นั้น ๆ ในขณะที่ข้าวเผชิญกับความเค็ม (Reddy et al., 2017)

ในส่วนของประเมินลักษณะทางสรีรวิทยาต่าง ๆ ของข้าวในขณะที่เผชิญกับความเค็มนั้น ในปัจจุบันนักวิจัยนิยมศึกษาจากความสามารถในการรักษาคุณภาพของกระบวนการต่าง ๆ เพื่อคงความสามารถในการเจริญเติบโต และการดำรงอยู่ได้เมื่อข้าวเผชิญกับความเครียดจากภาวะเค็ม อาทิ

1. วัดเสถียรภาพเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane stability: %CMS) เพื่อประเมินความสามารถในการรักษาเสถียรภาพของการทำงานในกระบวนการภายในเซลล์อันเป็นการดำเนินการทางอ้อม
2. วัดอัตราการเจริญเติบโตเมื่อข้าวเผชิญกับภาวะเครียด ด้วยการประเมินชีวมวล (biomass) จากน้ำหนักสด (fresh weight) และน้ำหนักแห้ง (dry weight)
3. ประเมินความสามารถในการรักษาคุณภาพของน้ำภายในเซลล์ด้วยการวัดค่าปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (relative water content: %RWC)
4. ประเมินประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ด้วยแสง เช่น การวัด chlorophyll content หรือค่าความเขียวใบ การศึกษาประสิทธิภาพของระบบแสง II (Photosystem II: PSII) ด้วยการวัดค่า chlorophyll fluorescence (Fv/Fm) ซึ่งจะทำให้สามารถประเมินประสิทธิภาพของ PSII ในการเกิด photochemical reaction ได้
6. วัดคุณลักษณะ ปริมาณ และความสมบูรณ์ของผลผลิต (yield-related traits)
7. ศึกษาปริมาณหรือสัดส่วนของไอออนต่าง ๆ อาทิ สัดส่วนของ  $K^+/Na^+$  ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ
8. ศึกษาปริมาณเมแทบอลิต์หรือโปรตีนบางชนิด อาทิ compatible solute และ สารต้านอนุมูลอิสระในรูปของเอนไซม์
9. ประเมินคะแนนความเสียหายจากความเค็ม (salt injury score: SIS) ซึ่งเป็นการประเมินความสามารถในการทนเค็มของข้าวจากลักษณะอาการที่เกิดขึ้น

ขณะที่ข้าวเผชิญกับความเครียดจากภาวะเค็มตามวิธีของ Gregario, Senedhira, and Mendoza (1997) ดังตารางที่ 2 เป็นต้น (Khunpolwattana et al., 2013; Reddy et al., 2017; Jaiswal et al., 2019)

สำหรับการศึกษาเพื่อมุ่งหน้าไปสู่การหาคำตอบที่ต้องการระบุว่ายีนใดมีส่วนเกี่ยวข้องในการกำหนดลักษณะที่ศึกษามาได้นั้น ปัจจุบันนักวิจัยโดยเฉพาะนักสรีรวิทยาของพืชได้นำเอาพัฒนาการความก้าวหน้าของโอมิกส์ (omics) มาใช้ในการระบุยีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับกลไกการทนเค็มของข้าว ด้วยวิธีจีโนมิกส์ (genomics) ทรานสคริปโทมิกส์ (transcriptomics) และ โปรตีโอมิกส์ (proteomics) อาทิ การศึกษาของ Lekklar et al. (2019) ซึ่งใช้วิธีศึกษาทางจีโนม (genome) ด้วยการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มทั้งการสังเคราะห์ด้วยแสง คุณลักษณะของผลผลิต และเสถียรภาพเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane stability: %CMS) ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยจำนวน 104 พันธุ์ นำมาเชื่อมโยงกับข้อมูลทั้งจีโนมเพื่อทำนายกลไกหรือยีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการทนเค็ม ในส่วนของการศึกษาด้วยวิธีทางโปรตีโอม (proteome) นั้นเป็นวิธีที่ทำให้

ทราบโปรตีนทั้งหมดที่แสดงออกมาในภาวะหนึ่ง ๆ ณ ช่วงเวลาหนึ่ง ๆ อาทิ การศึกษาของ Zhang et al. (2009) ได้ใช้วิธี two-dimensional gel electrophoresis เพื่อศึกษาโปรตีนที่มีการแสดงออกอย่างแตกต่าง (differentially expressed protein) ระหว่างภาวะปกติและภาวะเค็มจนสุดท้ายพบว่า OsRMC เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกอย่างมากซึ่งคาดว่าจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทนเค็มในข้าว ซึ่งการศึกษาด้วยวิธีโปรตีโอมิกส์นั้นเป็นวิธีที่น่าเชื่อถือทำให้ทราบปริมาณและชนิดของโปรตีนที่ถูกแสดงออกมาเพื่อทำหน้าที่รับมือกับภาวะเค็มจริงเพราะเป็นผลลัพธ์สุดท้ายของการควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับต่าง ๆ ทั้งระดับ transcription การควบคุมระดับ post-transcription และ post-translation แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาเพื่อระบุยีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการทนเค็มจากการศึกษาด้วยวิธีทางโปรตีโอมนั้นค่อนข้างยากเพราะโมเลกุลของโปรตีนมีความซับซ้อน มีคุณสมบัติทางเคมีที่แตกต่าง ทำให้ยากต่อการสกัดแยกทำให้บริสุทธิ์ หรือเพิ่มจำนวนในหลอดทดลองเพื่อใช้ศึกษาซ้ำ ดังนั้นการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเค็มในข้าว นั้นจึงนิยมศึกษาด้วยวิธีทางทรานสคริปโทม (transcriptome) มากกว่าเพราะทำให้ทราบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนทั้งหมดซึ่งเกิดขึ้นเป็นอันดับแรกภายหลังจากข้าวเผชิญกับภาวะเค็ม (Reddy et al., 2017; Fahimirad and Ghorbanpour, 2019)

ตารางที่ 2 เกณฑ์การให้คะแนนความเสียหายจากความเค็ม (Salt injury score: SIS) (Gregario, Senedhira, and Mendoza, 1997)

score	score observation	tolerance
1	Normal growth	Highly tolerant
3	Nearly normal growth; Leaf tips or few leaves whitish and rolled	Tolerant
5	Growth severely retarded; Most leaves rolled; only a few are elongation	Moderately tolerant
7	Complete cessation of growth; Most leaves dry; some plants drying	Susceptible
9	Almost all plants dead or drying	Highly susceptible

## 2.5. การศึกษา gene expression profile ด้วยวิธีทางทรานสคริปโทม

การศึกษา gene expression profile เป็นการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ในจีโนม (genome) ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่การแสดงออกของยีนมีรูปแบบที่แตกต่างออกไปตาม

ชนิด เนื้อเยื่อ ระยะ พัฒนาการ และสิ่งแวดล้อมในขณะนั้นที่เซลล์ของสิ่งมีชีวิตเผชิญอยู่ โดยศึกษาจากทรานสคริปโทมหรือ RNA transcript ทั้งหมดซึ่งถูกถอดรหัส (transcription) มาจากยีนต่าง ๆ ในจีโนมซึ่งถูกแสดงออกมา ณ ช่วงเวลาหนึ่ง ๆ ขณะที่ผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างมาเพื่อทำการศึกษา (NHGRI, 2015; Lowe et al., 2017)

ในปัจจุบันการศึกษาทรานสคริปโทมนั้นได้ถูกพัฒนาวิธีการอย่างต่อเนื่องควบคู่ไปกับการพัฒนาของเทคโนโลยีที่ใช้ในการศึกษาวิจัยทางชีววิทยาโมเลกุล (molecular biology) โดยจุดเริ่มต้นของการศึกษาทรานสคริปโทมเกิดขึ้นจากการค้นพบเอนไซม์ที่สามารถทำกระบวนการย้อนการถอดรหัส (reverse transcriptase enzyme) เพื่อเปลี่ยน RNA เป็น cDNA (complementary DNA) จนทำให้ง่ายต่อการศึกษาหรือเพิ่มจำนวนในหลอดทดลองเนื่องจาก DNA มีความเสถียรมากกว่า RNA กอปรกับการพัฒนาเทคโนโลยีที่ทำให้สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ได้ (sequencing technology) จนทำให้มีการศึกษาทรานสคริปโทมด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ESTs (expressed sequence tags) โดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ transcript แต่ละตัวจาก cDNA libraries ด้วย Sanger sequencing (Adams et al., 1991) ซึ่งเป็นวิธีที่ต้องใช้เวลาและแรงงานเป็นอย่างมาก จนต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิค SAGE (serial analysis of gene expression) โดยการนำ cDNA ประมาณ 14-20 bp จากปลายด้าน 3'-end ของ transcript มาต่อกันเป็นท่อนยาว (concatemer) แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ concatemer โดย Sanger sequencing เพื่อทราบชนิดและปริมาณของ transcript ทั้งหมดที่ตัวอย่างมีการแสดงออก (Velculescu et al., 1995) รวมทั้งวิธี CAGE (cap analysis of gene expression) ซึ่งใช้หลักการเดียวกันกับ SAGE แต่เปลี่ยนมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากปลายด้าน 5'-end ของ transcript (Wang, Gerstein, and Snyder, 2009)

ต่อมาเมื่อการพัฒนาด้านความรู้ทางด้านชีววิทยาโมเลกุลก้าวไปอีกขั้นจากฐานข้อมูลของ ESTs รวมทั้งการพัฒนาเทคโนโลยีที่ใช้พื้นฐานของหลักการ hybridization และ image processing technology ก่อให้เกิดการพัฒนาเทคนิค microarray อันเป็นการนำลำดับนิวคลีโอไทด์หรือ ESTs ของยีนที่สนใจศึกษามาเป็น probe ด้วยการยึดติดกับพื้นผิว (chip) แล้วศึกษาปริมาณ transcript ที่สนใจในตัวอย่างจาก cDNA ของยีนนั้นที่เกิด hybridization กับ probe โดยอาศัยหลักการเข้าคู่กันของเบสคู่สม (complementary base pair) แล้วใช้ image processing technology วัดค่าการเรืองแสง fluorescence ของแต่ละยีนที่ศึกษาซึ่งทำให้ทราบระดับการแสดงออกของยีนที่สนใจได้อย่างรวดเร็วต่างจากวิธีอื่น ๆ ที่เคยมีมา จนในที่สุด พัฒนาการของเทคนิคที่ใช้ศึกษาทรานสคริปโทมก็พัฒนามาจนถึงเทคโนโลยีที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบันคือ RNA sequencing (RNA-Seq) หรือการศึกษาทรานสคริปโทมจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ทั้งหมดจากตัวอย่างซึ่งเป็นผลมาจากพัฒนาการของเทคโนโลยี high-throughput sequencing อาทิ sequencing by synthesis

(Solexa/Illumina, San Diego, CA, USA) จนทำให้ค่าใช้จ่ายของการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำลง เพราะเป็นเทคนิคที่ใช้แรงงานและเวลาไม่มากเช่นเดิมอย่าง Sanger sequencing (Lowe et al., 2017)

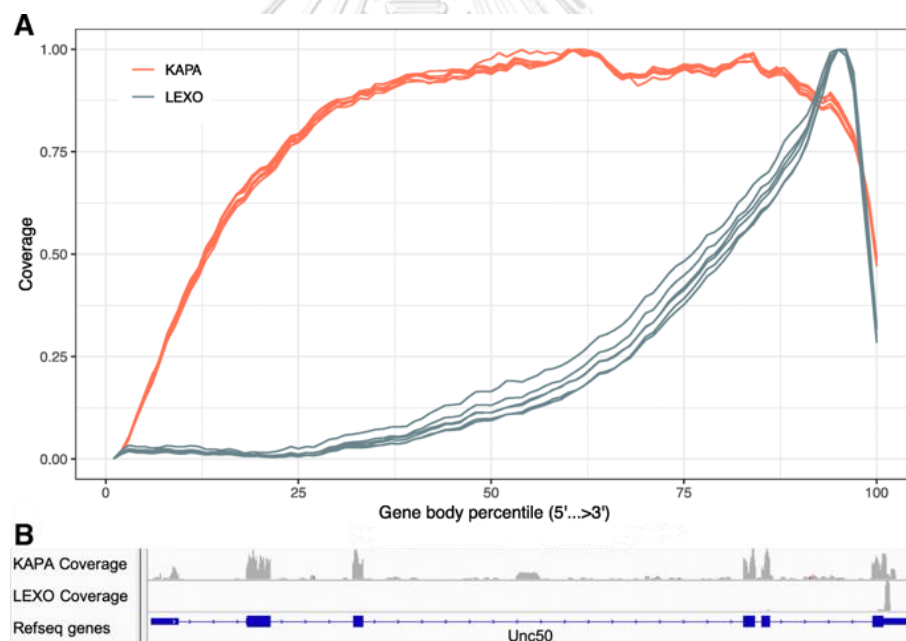
RNA sequencing เป็นวิธีการที่นิยมศึกษาทรานสคริปโทมในปัจจุบันโดยอาศัยหลักการของ high-throughput sequencing เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ transcript ทั้งหมดที่ถูกถอดรหัสมา ซึ่งเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น ๆ ที่เคยมีมา เพราะสามารถใช้ศึกษาทรานสคริปโทมของสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่มีฐานข้อมูลจีโนม (reference genome) และทราบข้อมูลบางอย่างที่วิธีอื่นไม่สามารถทราบได้ เช่น alternative splice variation และ allelic variation โดยการทำให้ RNA sequencing แบบ pair-end sequencing เป็นต้น (Lowe et al., 2017) สำหรับการศึกษาด้านทรานสคริปโทมด้วยวิธี RNA sequencing นั้น จะเริ่มจากการสกัดเพื่อนำ RNA ทั้งหมดหรือเฉพาะ mRNA ออกมา RNA ที่สกัดได้จะถูกนำมาใช้ทั้งเส้นหรือทำให้เป็นท่อนสั้น (fragmentation) ประมาณ 30-400 bp ก่อน แล้วนำไปสังเคราะห์เป็น cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription เพื่อสร้าง cDNA library ซึ่งในขั้นตอนของการสังเคราะห์ cDNA อาจมีการดัดแปลง primers ให้สามารถสร้างสาย cDNA ที่แต่ละท่อนต่อกับ adapter ซึ่งมีความแตกต่างกันไปตามรายละเอียดปลีกย่อยของแต่ละเกณฑ์วิธีซึ่งขึ้นอยู่กับแพลตฟอร์มที่จะใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และส่วนมาก cDNA ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่จะมีการต่อกับ DNA barcode หรือ library index โดยมีจุดประสงค์เพื่อใช้จำแนก cDNA library ที่มีที่มาต่างกัน จากนั้นเมื่อได้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ทั้งหมดในตัวอย่าง ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้จาก cDNA หนึ่งเส้น (sequencing read) จะถูกตัดในส่วน of adapter และ library index ออกแล้วจัดกลุ่มอิงตาม library index เพื่อทราบว่า sequencing read ที่อ่านได้มาจากตัวอย่างหรือมาจาก cDNA library ใด โดยขั้นตอนต่อมาอาจต้องดำเนินการทำ short read assembly หากมีความจำเป็นแล้วจึงนำไป align หรือเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ (mapping) หากตัวอย่างที่ใช้ศึกษามีฐานข้อมูลของจีโนมอยู่แล้วซึ่งจะทำให้ทราบว่ามีการแสดงออกของยีนอะไรและมากน้อยเท่าไรโดยการแปรผลตาม sequencing depth ของแต่ละ sequencing read ที่ align ได้กับยีนต่าง ๆ ในจีโนม แต่อย่างไรก็ตามในกรณีที่ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาเป็นสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่มีฐานข้อมูลจีโนมจะไม่สามารถดำเนินการตามวิธีข้างต้นได้แต่จำเป็นต้องมีขั้นตอนของ *De novo* transcriptome assembly เพื่อสร้าง genome-scale transcription map ก่อนที่จะนำไปศึกษาระดับการแสดงออกของยีนแต่ละยีนซึ่งวิธีทางทรานสคริปโทมอื่น ๆ ก่อนหน้าไม่สามารถดำเนินการได้หรือหากดำเนินการได้ก็ใช้เวลาและค่าใช้จ่ายสูงกว่าซึ่งไม่เป็นที่นิยมในปัจจุบัน (Wang, Gerstein, and Snyder, 2009) ด้วยความพิเศษของวิธี RNA sequencing ทำให้ปัจจุบันนักวิจัยสาขาต่าง ๆ ได้นำเทคนิคนี้มาใช้ศึกษาทรานสคริปโทมจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ อยู่เสมอ ทั้งการศึกษากลไกของเซลล์

ในการตอบสนองต่อยา การศึกษาบทบาทหน้าที่ของยีนหรือโปรตีนบางชนิดหากถูกดัดแปรพันธุกรรมให้มีการแสดงออกมากเกินไปหรือหยุดการแสดงออก การศึกษาทางด้านพัฒนาการหรือปรากฏการณ์ทางชีววิทยาที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต ตลอดจนการศึกษาเพื่อเข้าใจกลไกของสิ่งมีชีวิตบางชนิดที่ตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตที่เกี่ยวข้องกับการเกษตรและเป็นแหล่งอาหารอย่างเช่นข้าว เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาสายพันธุ์ให้มีลักษณะดีและทนต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น (Lowe et al., 2017)

ในส่วนของการศึกษาทรานสคริปโทมเพื่อเข้าใจกระบวนการทางชีววิทยาของข้าวที่เผชิญกับความเครียดจากภาวะเค็มและเข้าใจกลไกการทนเค็มในข้าวนั้นสามารถดำเนินการได้ด้วยการศึกษาการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ในข้าวพันธุ์ทนเค็มโดยเปรียบเทียบระหว่างภาวะปกติและภาวะเค็มหรือการศึกษาการแสดงออกของยีนระหว่างข้าวพันธุ์ทนเค็มและข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็มเมื่อเผชิญภาวะเค็ม โดยจะต้องทำ differentially expressed analysis อาทิ DESeq2 analysis (Love, Huber, and Anders, 2014) เพื่อทราบยีนที่แสดงออกอย่างแตกต่างหรือ DEGs (differentially expressed genes) ซึ่งมีแนวโน้มที่จะเกี่ยวข้องกับกลไกในการทนเค็มของข้าว ยิ่งไปกว่านั้นเพื่อทราบวิถี (pathway) หรือกลุ่มของยีนที่มีบทบาทในกลไกการทนเค็มจำเป็นต้องนำ DEGs มาวิเคราะห์ gene set enrichment analysis เพื่อทราบกลุ่มของยีนที่ทำหน้าที่หลัก ๆ ในกระบวนการทนเค็มผ่านการพิจารณา gene ontology (GO) term (Yi, Du, and Su, 2013) ตลอดจนวิเคราะห์โครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (gene co-expression network: GCN) ซึ่งเป็นการจัดกลุ่มของยีนตามรูปแบบการแสดงออกจากข้อมูลทรานสคริปโทมจะทำให้เข้าใจปรากฏการณ์ทางชีววิทยาของข้าวที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มว่ายีนใดมีแนวโน้มที่จะมีความสำคัญและยีนใดแสดงออกมาร่วมกัน (Weston et al., 2008) โดยที่ผ่านมามีการออกแบบการทดลองเพื่อเก็บตัวอย่างสำหรับศึกษาทรานสคริปโทมในข้าวซึ่งเผชิญกับภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ 2 วิธี คือ 1. แบบ snapshot เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนจากตัวอย่าง ณ ช่วงเวลาใดเวลาหนึ่งอันเป็นการมองการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกิดขึ้นเพียงจุดเดียว 2. แบบ time-series เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนจากตัวอย่างพืชโดยติดตามการแสดงออกที่เวลาต่าง ๆ ภายหลังจากเผชิญกับภาวะนั้น ๆ ทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาต่าง ๆ ซึ่งความเปลี่ยนแปลงของปรากฏการณ์ทางชีววิทยาจะเกิดขึ้นแบบต่อเนื่องและสัมพันธ์กัน (Dutta, Snyder, and Klapa, 2007; Spies and Ciaudo, 2015) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษา time-series transcriptome ยังมีการศึกษาไม่มากนัก เพราะมีค่าใช้จ่ายสูงเพราะต้องดำเนินการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างจำนวนมาก แต่เมื่อมีการพัฒนาการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี 3'-Tag RNA sequencing (Froenicke, 2018) ทำให้การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของทรานสคริปโทมมีค่าใช้จ่ายต่ำลง

## 2.6. การศึกษาทรานสคริปโทมด้วย 3'-Tag RNA-seq

3'-Tag RNA-seq (3'-Tag RNA sequencing) เป็นเทคนิคในการศึกษาทรานสคริปโทมที่มีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าเทคนิค RNA sequencing แบบพื้นฐาน และได้ข้อมูลปริมาณการแสดงออกของยีน (gene expression level) ที่แม่นยำกว่า ซึ่งความแตกต่างระหว่างสองขั้นตอนนี้อยู่ที่ขั้นตอนในการเตรียม cDNA library และผลลัพธ์ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ซึ่งวิธีดั้งเดิม mRNA ทั้งสายจะถูกสังเคราะห์เป็น cDNA ขณะที่เทคนิค 3'-Tag RNA-seq นั้นจะได้ cDNA เฉพาะปลายด้าน 3'-end ที่มีความยาวไม่มาก ทำให้ผลที่ได้มี gene body coverage ไม่เท่ากัน ดังภาพที่ 1A ซึ่งวิธีแบบดั้งเดิม gene body coverage ที่อ่านได้จะครอบคลุม mRNA ทั้งสาย ขณะที่เทคนิค 3'-Tag RNA-seq พบว่ามีเพียงเฉพาะด้าน 3'-end เท่านั้นที่พบ ซึ่งอาจเป็นส่วนของ 3'-UTR และบางบริเวณของ exon ที่อยู่ติดกับ 3'-UTR ดังภาพที่ 1B ซึ่งส่งผลให้การศึกษาด้วยวิธี 3'-Tag RNA-seq มีค่าใช้จ่ายที่ถูกกว่าเพราะไม่ได้ศึกษาจาก mRNA ทั้งสาย ปริมาณ cDNA เริ่มต้นในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์จึงน้อยกว่าวิธีดั้งเดิม ซึ่งส่งผลให้มีค่าใช้จ่ายที่ถูกลง (Froenicke, 2018; Ma et al., 2019; Lexogen, 2020)



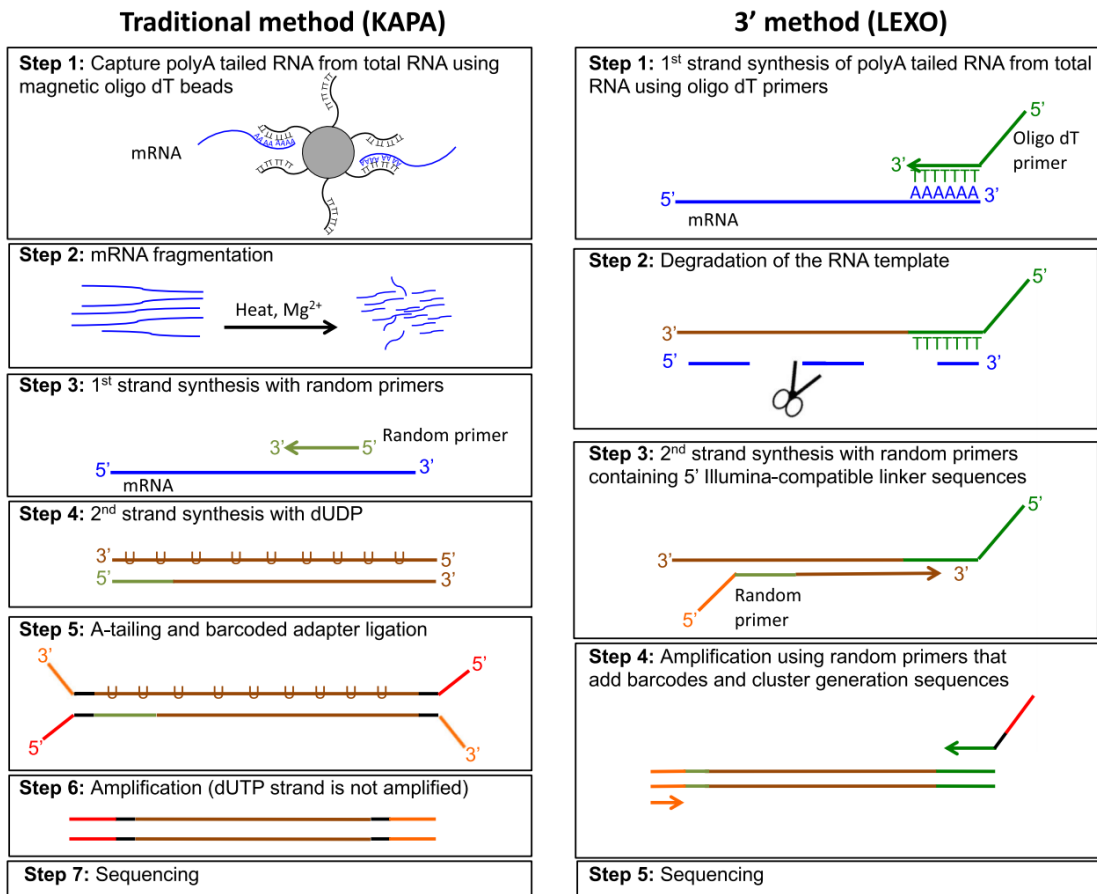
ภาพที่ 1 gene body coverage ที่อ่านได้จาก cDNA ทั้งหมด (A) และ gene body coverage ที่อ่านได้จากยีน *Unc50* (B) ซึ่งมาจากการเตรียม cDNA library ด้วยวิธี 3'-Tag RNA-seq (LEXO) และวิธีดั้งเดิม (KAPA) (Ma et al., 2019)

ยิ่งไปกว่านั้นในการเตรียม cDNA library เพื่อศึกษาด้วยเทคนิค 3'-Tag RNA-seq นั้นยังมีขั้นตอนที่น้อยกว่าโดยมีเพียง 4 ขั้นตอน ในขณะที่วิธีดั้งเดิมจำเป็นต้องมีถึง 6 ขั้นตอน กล่าวคือ

วิธีเตรียม cDNA library สำหรับ 3'-Tag RNA-seq ไม่มีขั้นตอนของการแยก mRNA ออกมาด้วย oligo dT beads เพราะในขั้นตอนของการสังเคราะห์ cDNA นั้นจะใช้ oligo dT primers แทน ซึ่งสามารถเกาะบริเวณ poly(A) tails ที่ปลายด้าน 3'-end ของ mRNA ได้ ซึ่งทำให้ 1<sup>st</sup> strand cDNA ที่สังเคราะห์ได้ในขั้นตอนนี้ล้วนแล้วมาจาก mRNA ทั้งสิ้น (ภาพที่ 2) ยิ่งไปกว่านั้นการเตรียม cDNA library สำหรับ 3'-Tag RNA-seq นั้นไม่จำเป็นต้องทำให้ mRNA แยกออกเป็นสายสั้นเสียก่อน จำนวน sequencing read ที่วัดได้จากยีนใด ๆ จึงเท่ากับปริมาณ transcript ของยีนนั้นที่แสดงออกอย่างแท้จริง กล่าวคือ sequencing read ที่อ่านได้หนึ่งสายจะเท่ากับ mRNA ที่ถูกถอดรหัสออกมาหนึ่งครั้ง ในขณะที่วิธีพื้นฐานที่ sequencing read ที่อ่านได้หนึ่งสายจะไม่ได้บ่งบอกถึงจำนวนที่แท้จริงของ mRNA ที่มีการแสดงออกเพราะ sequencing read ที่อ่านได้มาจาก cDNA ที่สังเคราะห์มาจาก fragmented mRNA ในบางกรณีโดยเฉพาะการศึกษาในสิ่งมีชีวิตที่ไม่มี reference genome ผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องทำ short read assembly และตัดแปรข้อมูลเพื่อให้ทราบปริมาณการแสดงออกของยีนที่แท้จริงก่อนจึงจะนำไปวิเคราะห์เพื่อแปรผลได้ซึ่งขั้นตอนดังกล่าวมีโอกาสเกิดข้อผิดพลาดสูง (Froenicke, 2018; Ma et al., 2019; Lexogen, 2020) ซึ่งเห็นได้ชัดจากการศึกษาเปรียบเทียบเทคนิค 3'-Tag RNA-seq และวิธีดั้งเดิม ซึ่งพบว่าวิธีดั้งเดิมจะตรวจพบ sequencing read ของ transcript จากยีนสายสั้น ๆ ได้ปริมาณน้อยกว่า ซึ่งอาจส่งผลให้ข้อมูลบางส่วนหายไปแล้วส่งผลให้ DEGs ที่วิเคราะห์ได้มีจำนวนมากกว่าการศึกษาด้วย 3'-Tag RNA-seq อันเป็นผลมาจาก false positive (Ma et al., 2019)

ด้วยเหตุนี้การศึกษาทรานสคริปโทมด้วยเทคนิค 3'-Tag RNA-seq จึงมีความเหมาะสมสำหรับการศึกษาทรานสคริปโทมที่มุ่งเน้นที่จะทราบปริมาณการแสดงออกของยีนที่แม่นยำโดยมีจุดประสงค์เพื่อที่จะหายีนที่แสดงออกอย่างแตกต่างเพียงอย่างเดียว และมีค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่าเนื่องจากมีขั้นตอนของการเตรียม cDNA library ที่ไม่ยุ่งยาก ใช้ปริมาณ cDNA library สำหรับที่จะนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยกว่าเมื่อเทียบกับเทคนิค RNA sequencing แบบพื้นฐาน แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาด้วยเทคนิคนี้ก็มีข้อจำกัดบางประการเพราะสามารถทำได้แค่สิ่งมีชีวิตในกลุ่มยูแคริโอต (eukaryotic organism) ที่มีฐานข้อมูลจีโนมที่สมบูรณ์ อีกทั้งยังไม่สามารถใช้ศึกษา alternative splice variation และ allelic variation ที่เกิดขึ้นได้ (Lohman, Weber, and Bolnick, 2016; Froenicke, 2018)





ภาพที่ 2 ขั้นตอนการเตรียม cDNA library สำหรับศึกษาด้วยวิธี RNA sequencing แบบดั้งเดิม (KAPA) และวิธีของ 3'-Tag RNA-seq (LEXO) (Ma et al., 2019)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 2.7. โครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีน

โครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (gene co-expression network) หรือ GCN หมายถึง กราฟไม่มีทิศทาง (undirected graph) ที่โหนด (node) แต่ละจุดเป็นตัวแทนของยีนแต่ละยีน และ หากโหนดคู่ใดมีเส้นเชื่อม (edge) ระหว่างกันจะแสดงว่ายีนคู่นั้นมีความสัมพันธ์กันหรือมีการแสดงออกร่วมกัน (co-expression) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Stuart et al., 2003) ซึ่งปัจจุบันการวิเคราะห์ GCN เป็นที่นิยมในการนำมาศึกษาเพื่อให้เข้าใจกลไกที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตในภาวะหนึ่ง ๆ ทำให้ทราบกลุ่มยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกร่วมกันอันเป็นผลมาจากมีการเพิ่มหรือลดการแสดงออกไปทิศทางเดียวกันเมื่อเผชิญกับภาวะนั้น ๆ ซึ่งจะทำให้เข้าใจปรากฏการณ์ทางชีววิทยามากขึ้นเพราะยีนที่มีการแสดงออกร่วมกันย่อมแสดงออกมาเพื่อตอบสนองต่อภาวะนั้น ๆ อาจทำหน้าที่คล้ายกัน อยู่ในวิถีเดียวกัน หรือถูก encode ออกมาเพื่อรวมกันเป็น protein complex หรืออาจถูกควบคุมด้วย transcription factor ตัวเดียวกัน เป็นต้น (Weirauch, 2011)

โครงข่ายการแสดงผลออกกร่วมของยีนนั้นสามารถสร้างได้จากข้อมูลทรานสคริปโทมที่ศึกษาได้ด้วยวิธี microarray หรือ RNA sequencing ผ่านการใช้ชุดคำสั่งจากโปรแกรมสำเร็จ (package) ที่ถูกพัฒนาขึ้นและมีมากมายหลายวิธีขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการวิเคราะห์ การออกแบบการทดลอง และรูปแบบของชุดข้อมูลที่จะใช้สร้างโครงข่ายการแสดงผลออกกร่วมของยีนซึ่งไม่มีวิธีใดวิธีหนึ่งที่ตายตัว แต่หากพิจารณาโดยสรุปขั้นตอนหลักในการสร้างโครงข่ายการแสดงผลออกกร่วมของยีนสามารถดำเนินการได้เพียง 2 ขั้นตอนคือ 1. วัดการแสดงผลออกกร่วม (co-expression measure) ของยีนแต่ละคู่ 2. เลือกค่า cut-off threshold เพื่อกำหนดเส้นเชื่อมของยีนแต่ละคู่

การวัดการแสดงผลออกกร่วมนั้นเป็นการนำค่าระดับการแสดงผลออกที่ตัวอย่าง ๆ ต่างของยีนแต่ละยีนมาเปรียบเทียบกับกันเป็นคู่ ๆ ทุกคู่ เพื่อวิเคราะห์รูปแบบการแสดงผลออกของยีนแต่ละคู่ที่ตัวอย่างต่าง ๆ ว่ามีความสัมพันธ์กันหรือไม่ และสัมพันธ์กันในทิศทางใด วิธีการคำนวณค่าที่ใช้บอกความสัมพันธ์ของระดับการแสดงผลออกยีนแต่ละคู่นั้นมีหลายวิธี อาทิ สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient) สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบสเปียร์แมน (Spearman's rank correlation coefficient) ค่าสารสนเทศร่วม (mutual information) ระยะทางแบบยูคลิด (Euclidean distance) และ สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบพลวัตบางส่วน (partially dynamic correlation coefficient) เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียต่างกั้ดังสรุปไว้ในตารางที่ 3 โดยขั้นแรกในการคำนวณนั้นต้องเตรียมข้อมูลให้อยู่ในรูป expression matrix หรือ ตารางเมทริกซ์ที่แสดงระดับการแสดงผลออกของยีนแต่ละยีนที่ตัวอย่างต่าง ๆ และภายหลังจากการคำนวณจะได้ตารางผลการวัดการแสดงผลออกกร่วมหรือ similarity matrix ออกมาซึ่งเป็นตารางที่แสดงค่าความสัมพันธ์หรือความเหมือนของยีนแต่ละคู่ที่คำนวณได้ ดังภาพที่ 3 (Opgen-Rhein and Strimmer, 2006a; Weirauch, 2011; Villa-Vialaneix et al., 2013)

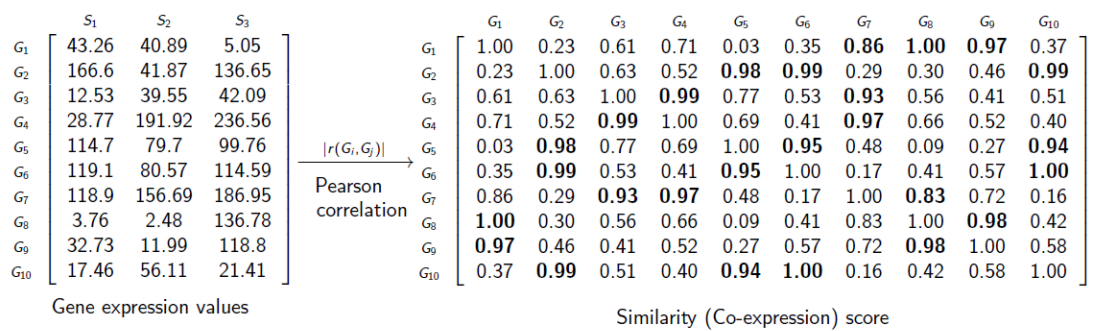
ในส่วนของการเลือกค่า cut-off threshold (threshold selection) เพื่อกำหนดเส้นเชื่อมของยีนแต่ละคู่นั้นมีวิธีการที่หลากหลาย อาทิ การใช้ Fisher's z-transformation เพื่อคำนวณ z-score ของค่าความสัมพันธ์ที่ได้แต่ละค่าแล้วแปลงเป็นค่า p-value จากนั้นจึงกำหนดค่า cut-off จากค่า p-value ที่ต้องการ การเลือกจาก threshold โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การจัดกลุ่ม (clustering coefficient) หรือการเลือก threshold ที่ทำให้โครงข่ายการแสดงผลออกกร่วมของยีนที่ได้มีลักษณะเป็น scale-free topology เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามโครงข่ายการแสดงผลออกกร่วมของยีนที่ได้ อาจไม่สื่อความหมายที่เกิดขึ้นจริงในปรากฏการณ์ทางชีววิทยา ดังนั้นการเลือกค่า threshold จึงขึ้นอยู่กับผู้วิจัยและชนิดของข้อมูลด้วยเพราะบางครั้งต้องใช้ดุลยพินิจเพื่อพิจารณาว่าควรใช้ threshold ที่เท่าไรที่สามารถสร้างโครงข่ายการแสดงผลออกกร่วมของยีนได้ใกล้เคียงกับโครงข่ายการทำงานที่เกิดขึ้นจริงตามปรากฏการณ์ทางชีววิทยาได้ และท้ายที่สุดเมื่อเลือกค่า threshold ได้แล้วค่าความสัมพันธ์ที่คำนวณได้ของยีนแต่ละคู่จะถูกพิจารณาว่าอยู่ในช่วงที่กำหนดหรือไม่ จากนั้น

similarity matrix จะถูกแปรผลด้วยค่า threshold ทำให้ได้ adjacency matrix สำหรับการสร้างโครงข่ายความสัมพันธ์ระหว่างยีนแต่ละคู่ โดยแต่ละค่าในเมทริกซ์จะมีค่าเป็น 0 (ไม่มีการแสดงออกร่วมกัน) หรือ 1 (มีการแสดงออกร่วมกัน) ดังภาพที่ 3 ทั้งนี้ ในบางงานวิจัยจะใช้ความสัมพันธ์ที่คำนวณได้โดยตรงมากำหนดเป็นค่าถ่วงน้ำหนักให้กับเส้นเชื่อมในโครงข่ายได้ เพื่อสร้างเป็น weighted network (Zhang and Horvath, 2005; Elo et al., 2007; Weirauch, 2011) ที่บ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงร่วมกันของยีนแต่ละคู่ว่ามีมากหรือน้อยแตกต่างกันได้อีกด้วย

ด้วยความก้าวหน้าด้านเทคโนโลยีทำให้ทุกวันนี้ได้นำพาให้นักวิจัยที่เชี่ยวชาญศาสตร์ต่าง ๆ มีโอกาสในการพบปะและร่วมมือกันมากขึ้น ส่งผลให้ปัจจุบันนักสรีรวิทยาของพืชได้นำข้อมูลทรานสคริปโทมมาศึกษาเพื่อเข้าใจกระบวนการทางชีววิทยาที่เกิดขึ้นผ่านการวิเคราะห์โครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีน ซึ่งไม่เพียงแต่ทราบกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกร่วมกันเท่านั้น แต่ยังมีวิเคราะห์เพิ่มเติมทำให้ทราบยีนที่มีบทบาทสำคัญต่อยีนอื่น ๆ ในโครงข่ายการแสดงร่วมกันของยีนได้อีกด้วย อาทิ การพิจารณา degree และ betweenness centrality ใน module ที่สนใจ จากการจัดกลุ่มของยีนบนโครงข่าย เป็นต้น โดยมีจุดประสงค์เพื่อหายีนที่เป็น hub และ bridging node ตามลำดับ เนื่องจากคาดว่าน่าจะมีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีนอื่น ๆ เพราะ hub เป็นยีนที่แสดงออกร่วมกับยีนอื่น ๆ มากที่สุด และ bridging node จะเป็นยีนที่เป็นจุดเชื่อมต่อระหว่าง module ซึ่งมีความสำคัญต่อการทำงานของยีนอื่น ๆ อย่างมากเพราะว่าหากขาดหายไปคาดว่าจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของยีนใน module อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง (Aoki, Ogata, and Shibata, 2007; Azuaje, 2014) ด้วยเหตุนี้การวิเคราะห์โครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีนจึงถูกนำมาใช้โดยเป็นกลยุทธ์หนึ่งสำหรับนักสรีรวิทยาของพืชที่ต้องการศึกษาปรากฏการณ์ทางชีววิทยาที่พืชมีต่อภาวะต่าง ๆ รวมทั้งกลไกการทนต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม วิธีที่เกี่ยวข้อง และยีนที่สำคัญซึ่งมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีนอื่น ๆ เพื่อทำหน้าที่รับมือกับภาวะที่ไม่เหมาะสมสำหรับเป็นองค์ความรู้เพื่อพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อใช้ในการเกษตรให้มีประสิทธิภาพและผลผลิตมากขึ้น (Schaefer, Michno, and Myers, 2017) เช่น การศึกษาของ Smita et al. (2013) ที่ศึกษากลไกการทนแล้งของข้าวจากการโครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีน การศึกษาของ Nounjan et al. (2016) และ Nounjan et al. (2018) ที่วิเคราะห์โครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีนเพื่อทำความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการทนเค็มในข้าว เป็นต้น

อย่างไรก็ตามการศึกษากลไกการทนเค็มในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยยังมีน้อย การศึกษาทรานสคริปโทมและวิเคราะห์โครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีนโดยใช้ข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยในการศึกษานั้นยังไม่เป็นที่ปรากฏว่ามีการศึกษามาก่อน ดังนั้นเพื่อให้เข้าใจกลไกการทนเค็มในข้าวมากขึ้น การศึกษาเพื่อคัดเลือกข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีลักษณะทนเค็มมากที่สุดเพื่อนำมาศึกษา

ทรานสคริปโทมและวิเคราะห์โครงสร้างการแสดงออกร่วมของยีนน่าจะทำให้นักสรีรวิทยาของพืชเข้าใจกลไกทนเค็มในข้าวมากขึ้นเพราะข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยมีความหลากหลายสูงและบางชนิดมีความสามารถในการทนต่อความเครียดจากภาวะเค็มได้ดี องค์ความรู้ที่ได้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีลักษณะทนต่อความเครียดจากภาวะเค็มโดยใช้ข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีการคัดเลือกมาอย่างยาวนานเป็น germplasm ซึ่งจะสร้างคุณประโยชน์อย่างมหาศาลต่อชาวโลก



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการสร้างโครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (Mohammad and Oloomi, 2014)

ตารางที่ 3 ข้อดีและข้อเสียของวิธีต่าง ๆ ที่ใช้วัดการแสดงผลออกกร่วมของยีน (Opgen-Rhein and Strimmer, 2006a; Weirauch, 2011; Song, Langfelder, and Horvath, 2012)

วิธีวัดการแสดงผลออกกร่วม	ข้อดี	ข้อเสีย
Pearson's correlation coefficient	- บอกขนาดและทิศทางของความสัมพันธ์แบบ linear ได้ดี	- ไม่สามารถหาความสัมพันธ์แบบ non-linear ได้ - sensitive ต่อ outliers
Spearman's rank correlation coefficient	- ไม่ sensitive ต่อ outliers	- อาจทำให้ได้ false positives มากหากมีจำนวนตัวอย่างน้อย
Mutual information	- สามารถหาความสัมพันธ์แบบ non-linear relationships	- ความสัมพันธ์แบบ non-linear บางรูปแบบไม่มีความหมายในเชิงชีววิทยา
Euclidean distance	- การคำนวณไม่ซับซ้อน	- ไม่สามารถหาความสัมพันธ์ของยีนที่มีระดับการแสดงออกต่างกันมากได้ - อาจได้ false positive หากยีนคู่หนึ่งมีระดับการแสดงออกต่ำทั้งคู่
Partial dynamical correlation coefficient	- หาความสัมพันธ์ของข้อมูลแบบ time series ได้	- ไม่สามารถเปรียบเทียบข้อมูลแบบ time-series ที่มีความซับซ้อนได้ (อาจมีการแสดงออกที่มีความเร็วต่างกัน)

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

#### 3.1. อุปกรณ์การศึกษา

##### 3.1.1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดข้าวจาก ดร.ดวงใจ สุริยาอรุณโรจน์ ศูนย์วิจัยข้าวนครราชสีมา สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 12 พันธุ์ ประกอบด้วย เมล็ดข้าวพันธุ์ไทย 10 พันธุ์ ได้แก่ พวงทอง (Puang Tawng) ดอดอกไม้ (Daw Dawk Mai) จุดมอญ (Jud Mawn) ขาวแก้ว (Khao Gaew) ดอสามเดือน (Daw Sahn Deuan) มะยม (Mayom) ตาบาน (Tah Bahn) เหลืองพวงทอง (Leuang Puang Tawng) หลวงประทาน (Luang Prathan) และอีลาย (E-Lai) และเมล็ดข้าวพันธุ์ทนเค็มมาตรฐานและพันธุ์ไม่ทนเค็มมาตรฐาน 2 พันธุ์ ได้แก่ Pokkali และ IR29 ตามลำดับ

##### 3.1.2. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

- จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- ดินร่วนปนทรายชุดดินพินาย (สำนักสำรวจและวิจัยทรัพยากรดิน กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์) จากสำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว จังหวัดนครราชสีมา
- กระบะพลาสติกสำหรับรองน้ำขนาด กว้าง×ยาว×สูง เท่ากับ 40×54×14 cm
- ตะกร้าพลาสติกสำหรับบรรจุกระถางขนาด กว้าง×ยาว×สูง เท่ากับ 27×37×13 cm
- กระถางพลาสติกปลูกต้นไม้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.62 cm
- ถังน้ำพลาสติกขนาด 100 ลิตร
- เขี่ยกตวงขนาด 5 ลิตร
- เครื่องวัดการนำไฟฟ้า (Digital conductivity meter) (SevenCompact™ Conductivity S230, Mettler Toledo, Switzerland)
- กระติกสำหรับใส่ไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บตัวอย่าง (Thermal Insulated Container PRO-1801, Thermos®, Illinois, USA)

- Aluminum foil (Diamond™, Zhengzhou Xinlilai Aluminum Foil Co.,Ltd, Henan, China)
- กรรไกร
- ช้อนตักสาร (Spatula)
- โกร่งบดตัวอย่าง (mortar and pestle)
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (FED240, BINDER Inc., New York, USA)
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่งของหน่วยกรัม (ML204/01, Mettler Toledo, Ohio, USA)
- Micropipette (Mettler Toledo, Ohio, USA)
- Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml (Eppendorf®, Hamburg, Germany)
- Microcentrifuge tube ขนาด 50 ml (Eppendorf®, Hamburg, Germany)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- เครื่องวัดความเขียวใบ (SPAD-502 chlorophyll meter) (Minolta Camera Co. Ltd., Osaka, Japan)
- เครื่อง Pocket PEA chlorophyll fluorimeter สำหรับวัดค่า chlorophyll fluorescence (Fv/Fm) (Hansatech Instruments Ltd, King's Lynn, UK)
- NanoDrop™ 2000 Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA)
- Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA)
- 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies Inc., California, USA)
- Hiseq4000 sequencer (Illumina Inc., California, USA)
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine หรือ Thermal cycler) (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA)
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (Real-time PCR) (CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA)

### 3.1.3. สารเคมี

- Sodium chloride (NaCl) (Srichand United Dispensary Co., Ltd., Bangkok, Thailand)
- ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

- RNase free water (DEPC-treated water)
- น้ำยาสกัด RNA (RNA purification reagent) (PureLink™, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA)
- DNase I (RNase-free) (New England Biolabs Inc., Massachusetts, USA)
- DNase I (RNase-free) (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA)
- Mag-Bind® TotalPure NGS (Omega Bio-Tek Inc., Georgia, USA)
- Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA)
- QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD for Illumina (Lexogen Inc., New Hampshire, USA)
- น้ำยาสกัด RNA (GENEZol™ Reagent, Geneaid Biotech Ltd., New Taipei City, Taiwan)
- Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs Inc., Massachusetts, USA)
- AccuPower® RT PreMix (Bioneer Inc., California, USA)

### 3.2. วิธีการศึกษา

3.2.1. การคัดเลือกข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่เก็บจากลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็ม

3.2.1.1. การศึกษาเบื้องต้นในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์

3.2.1.1.1. การเตรียมพืชทดลอง

นำข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.ดวงใจ สุริยาอรุณโรจน์ ศูนย์วิจัยข้าวนครราชสีมา สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 10 พันธุ์ ได้แก่ พวงทอง (Puang Tawng) ดอกดอกไม้ (Daw Dawk Mai) จุดมอญ (Jud Mawn) ขาวแก้ว (Khao Gaew) ดอกสามเดือน (Daw Sahm Deuan) มะยม (Mayom) ตาบาน (Tah Bahn) เหลืองพวงทอง (Leuang Puang Tawng) หลวงประทาน (Luang Prathan) อีลาย (E-Lai) และข้าวพันธุ์มาตรฐานทนเค็มและไม่ทน ได้แก่ Pokkali และ IR29 ตามลำดับ นำมาทำลายระยะพักตัวด้วยการอบในตู้อบลมร้อน (FED240, BINDER Inc., New York, USA) ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปเพาะด้วยน้ำกรองในจานเพาะเชื้อโดยเปลี่ยนน้ำกรองทุกวันจนกระทั่งเมล็ดงอก จากนั้นจึงนำต้นกล้าข้าวไปปรับตัวกับสภาพแวดล้อมด้วยการรับแสงแดดทุกวันจนกระทั่งต้นกล้าข้าวมีอายุ 6 วัน



### 3.2.1.1.2. สภาพการทดลองและการออกแบบการทดลอง

นำต้นกล้าข้าวทุกพันธุ์ปลูกในดินร่วนปนทรายชุดดินพินาย (สำนักสำรวจและวิจัยทรัพยากรดิน กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์) ในกระถางพลาสติก ปลูกต้นไม้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.62 cm ซึ่งบรรจุอยู่ในตะกร้าพลาสติก ขนาด 27x37x13 cm ที่แช่อยู่ในกระบะพลาสติกสำหรับรองน้ำขนาด 40x54x14 cm และบรรจุน้ำกรองอยู่จนกระทั่งต้นกล้ามีอายุ 14 วัน พืชทดลองชุดหนึ่งจะถูกเปลี่ยนน้ำที่บรรจุเป็นน้ำกรอง (ภาวะควบคุม) และสารละลายเกลือความเข้มข้น 115 mM (ภาวะเค็ม) ตามวิธีของนพคุณ คุณผลวัฒนา (2558) ออกแบบการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) อย่างน้อย 3 block โดยกำหนดให้แต่ละ block คือโต๊ะที่วางกระบะพลาสติก โดยแต่ละ block มีหน่วยทดลอง (experimental unit) ที่ครอบคลุมทุก ๆ ทรีตเมนต์ (treatment)

### 3.2.1.1.3. การเก็บผลลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็ม

ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มทุกวันตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงวันที่ 9 ภายหลังจากข้าวเผชิญกับภาวะต่าง ๆ และบันทึกค่า ดังนี้

1. ค่า chlorophyll fluorescence (Fv/Fm) ด้วยเครื่อง Pocket PEA chlorophyll fluorimeter (Hansatech Instruments Ltd, King's Lynn, UK)
2. ค่าความเขียวใบ (SPAD) โดยใช้เครื่อง SPAD-502 chlorophyll meter (Minolta Camera Co. Ltd., Osaka, Japan)
3. คะแนนความเสียหายจากการได้รับความเครียดจากความเค็มตามมาตรฐานของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติหรือค่าคะแนนความเสียหายจากความเค็ม (Salt injury score: SIS) ดังตารางที่ 2 (Gregario, Senedhira, and Mendozo, 1997)

โดยที่เก็บค่าพารามิเตอร์ในข้อ 1 และ 2 จากใบซึ่งมีการขยายขนาดของใบเต็มที่ ที่อายุน้อยที่สุด (youngest fully expanded leaf) ตามวิธีของ Udomchalothorn et al. (2017) แล้วนำข้อมูลที่เก็บได้ทั้งหมดมาแปลงเป็นค่าดัชนีเสถียรภาพ (Stability index: SI) เพื่อดูความสามารถของข้าวในการรักษาสภาพว่าเปลี่ยนแปลงเป็นสัดส่วนเท่าใดภายหลังจากได้รับภาวะเค็มโดยคำนวณได้จากสูตร

$$SI = Y_s/Y_p$$

เมื่อ  $Y_s$  คือ ค่าพารามิเตอร์จากพืชที่เจริญเติบโตในภาวะเค็ม

$Y_p$  คือ ค่าพารามิเตอร์จากพืชที่เจริญเติบโตในภาวะปกติ

#### 3.2.1.1.4. การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติของดัชนีเสถียรภาพของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ด้วย One-Way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Duncan's Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วย SPSS version 22.0 (IBM, New York, USA) จัดกลุ่มข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ตามค่าเฉลี่ยดัชนีเสถียรภาพของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ด้วยการวิเคราะห์กลุ่ม (clustering analysis) แบบ Ward's method (Milligan, 1980) ด้วย <http://shinyheatmap.com/> (Khomtchouk, Hennessy, and Wahlestedt, 2017) เพื่อสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ของนพคุณ คุณผลวัฒนา (2558) และใช้ระบุข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีลักษณะทนเค็มมากที่สุดเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

#### 3.2.1.2. การศึกษาเพื่อยืนยันผลในกล้าข้าวจำนวน 4 พันธุ์

ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มเพิ่มเติมด้วยการทำการทดลองอีกครั้งโดยปลูกข้าวพื้นเมืองทนเค็ม (พันธุ์เป้าหมาย) และพันธุ์ไม่ทนเค็มอย่างละ 1 พันธุ์ และปลูกร่วมกับข้าวพันธุ์ Pokkali และ IR29 ซึ่งเป็นพันธุ์มาตรฐานทนเค็มและไม่ทนเค็มตามลำดับ ดำเนินการทดลองในสภาพแวดล้อมเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.2.1.1. โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD จำนวน อย่างน้อย 4 block เมื่อต้นกล้าข้าวมีอายุ 14 วัน ให้ภาวะเค็มโดยให้สารละลายเกลือความเข้มข้น 115 mM และชุดควบคุมได้รับน้ำกรอง เก็บข้อมูลทางสรีรวิทยา ได้แก่

1. ค่า chlorophyll fluorescence (Fv/Fm) โดยใช้เครื่อง Pocket PEA chlorophyll fluorimeter (Hansatech Instruments Ltd, King's Lynn, UK)
2. ค่าความเขียวใบ (SPAD) โดยใช้เครื่อง SPAD-502 chlorophyll meter (Minolta Camera Co. Ltd., Osaka, Japan)
3. ค่าคะแนนความเสียหายจากความเค็ม (Salt injury score: SIS) (Gregario, Senedhira, and Mendoza, 1997)
4. น้ำหนักสด (fresh weight: FW)
5. น้ำหนักแห้ง (dry weight: DW)
6. เสถียรภาพเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane stability: %CMS)
7. ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (relative water content: %RWC)

โดยเก็บค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ จากใบซึ่งมีการขยายขนาดของใบเต็มที่ที่ยาอายุน้อยที่สุดยกเว้นค่าคะแนนความเสียหายจากความเค็มที่จะสังเกตจากต้นข้าวทั้งต้น ตามวิธีของ

นพคุณ คุณผลวัฒนา (2558) และ Udomchalothorn et al. (2017) หลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 0 3 6 9 นำมาคำนวณค่าดัชนีเสถียรภาพของแต่ละพารามิเตอร์แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วย One-Way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Duncan's Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วย SPSS version 22.0 (IBM, New York, USA)

### 3.2.2. การศึกษา gene expression profiles ของข้าวพันธุ์ที่ทนเค็มเพื่อเข้าใจกลไกการตอบสนองของพืชต่อภาวะเค็ม

#### 3.2.2.1. การปลูกและการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่จะถูกนำไปสกัด RNA

เพื่อให้ตัวอย่าง RNA ของข้าวพื้นเมืองไทยที่นำมาศึกษานั้นเป็นการแสดงออกของยีนที่ทนต่อภาวะเค็มที่แท้จริง ในการทดลองจึงทำการปลูกข้าวพื้นเมืองทนเค็ม (พันธุ์เป้าหมาย) และพันธุ์ไม่ทนเค็มอย่างละ 1 พันธุ์ โดยปลูกร่วมกับข้าวพันธุ์ Pokkali และ IR29 เป็นพันธุ์มาตรฐานทนเค็มและไม่ทนเค็มตามลำดับ เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.2.1.2 โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD จำนวน อย่างน้อย 4 ซ้ำ (4 block) เมื่อต้นกล้าข้าวมีอายุ 20 วัน จึงนำไปเผชิญกับภาวะควบคุมและภาวะเค็มแล้วจึงเก็บข้อมูลทางสรีรวิทยาเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1 หลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 0 3 6 9 และ 12 วัน นำมาคำนวณดัชนีเสถียรภาพของทุกพารามิเตอร์ นำไปวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าทางสรีรวิทยาเพื่อแสดงว่าพืชเป้าหมายมีการแสดงออกแบบทนเค็มใกล้เคียงกับพันธุ์ทนเค็มมาตรฐานและแตกต่างจากพันธุ์ไม่ทนเค็ม จากนั้นปลูกข้าวพื้นเมืองทนเค็ม (พันธุ์เป้าหมาย) ในสภาวะและสิ่งแวดล้อมเดียวกันสำหรับเป็นตัวอย่างเพื่อใช้ศึกษา gene expression profile

#### 3.2.2.2. การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อสกัด total RNA

เก็บตัวอย่างส่วนเหนือดินของข้าวพื้นเมืองทนเค็มที่อายุ 20 วัน จากชุดตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.2.1 จำนวนอย่างน้อย 3 ซ้ำ (biological replicate) ที่เวลา 0 3 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากได้รับภาวะเค็มโดยมีพืชที่ปลูกในภาวะปกติเป็นการทดลองชุดควบคุมสำหรับเตรียม cDNA library ทั้งหมด 36 library (2 ภาวะ x 6 ช่วงเวลา x 3 ซ้ำ) เมื่อถึงเวลาที่กำหนดเนื้อเยื่อจะเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวทันทีแล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$

### 3.2.2.3. การเตรียม RNA-seq libraries (3'-Taq RNA-seq libraries)

เตรียม RNA-seq libraries จากตัวอย่างที่เก็บในข้อ 3.2.2.2 รวมทั้งสิ้น 36 libraries โดยใช้น้ำยาสกัด RNA จากตัวอย่างพืช (Plant RNA purification reagent) (PureLink™, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) ต่อมานำไปกำจัด genomic DNA (gDNA) ที่ปนเปื้อนด้วย DNase I (RNase-free) (New England Biolabs Inc., Massachusetts, USA) แล้วจึงตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วย gel electrophoresis จากนั้นทำให้ RNA มีความบริสุทธิ์ด้วย 1.8X Mag-Bind® TotalPure NGS (Omega Bio-Tek Inc., Georgia, USA) และวัดปริมาณของ RNA ด้วย NanoDrop™ 2000 Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) และ Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) จากนั้นจึงนำไปสร้าง 3'-Taq RNA-seq libraries โดยแปลง messenger RNA (mRNA) ทางปลายด้าน 3'UTR เป็น complementary DNA (cDNA) สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ด้วย QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD for Illumina (Lexogen Inc., New Hampshire, USA) โดยจะตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ 3'-Taq RNA-seq libraries ทั้ง 36 libraries ด้วย 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies Inc., California, USA) ก่อนนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

### 3.2.2.4. การศึกษาทรานสคริปโทมด้วย 3'-Taq RNA-seq

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA library ที่เตรียมไว้ทั้ง 36 libraries โดยใช้ HiSeq4000 sequencer (Illumina Inc., California, USA) จากนั้นนำ sequencing reads ที่ได้ map กับจีโนมของ *Oryza sativa* var. *japonica* โดยใช้ฐานข้อมูลของ MSU Rice Genome Annotation Release 7 (MSU 7.0) (Kawahara et al., 2013) โดยใช้ STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner (Dobin et al., 2013) นับปริมาณการแสดงออกของยีน (count reads per gene) ในแต่ละ library ด้วย HTSeq platform (Anders, Pyl, and Huber, 2015) และวิเคราะห์หายีนที่แสดงออกแตกต่างกัน (Differentially expressed genes: DEGs) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ระหว่างภาวะควบคุมและภาวะเค็มโดยใช้ DESeq2 platform (Love, Huber, and Anders, 2014) โดยดำเนินการผ่าน <http://bioinformatics.sdstate.edu/idep> หรือ iDEP.82 ซึ่งเป็น web-based analytics tool โดยในการวิเคราะห์จะกำหนดค่า cut-off ให้เป็น 1.5 minimum fold change และ 0.10 false discovery rate (FDR) ตามลำดับ (Ge, Son, and Yao, 2018)

### 3.2.2.5. การวิเคราะห์ *gene set enrichment analysis*

นำ DEGs list ในแต่ละช่วงเวลา วิเคราะห์ *gene set enrichment analysis* ด้วย PlantGSEA (<http://structuralbiology.cau.edu.cn/PlantGSEA/>) (Yi, Du, and Su, 2013) เพื่อให้เข้าใจกลไกทางชีววิทยาที่เกิดขึ้นขณะที่พืชตอบสนองต่อภาวะเค็มที่เวลาต่าง ๆ ทั้ง 6 ช่วงเวลา

### 3.2.2.6. การระบุยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการทนเค็ม

พิจารณา DEGs ที่เวลาต่าง ๆ เพื่อระบุยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการทนเค็ม (putative salt tolerant candidate gene) อย่างน้อย 1-2 ยีน โดยพิจารณาจาก *gene ontology term* (GO term) ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะเค็มโดยเป็นยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น ๆ (regulation of gene expression) หรือเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ (signal transduction) และแสดงออกมาในช่วงแรกที่ข้าวได้รับภาวะเค็ม

### 3.2.3. การวิเคราะห์โครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (gene co-expression network)

การวิเคราะห์โครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีนมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา ยีนที่มีการแสดงออกร่วมกับยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการทนเค็มที่ระบุได้เพื่อให้เข้าใจกลไกการทนเค็มในข้าวที่ศึกษา โดยสร้าง *gene co-expression network* แบบ *weighted network* ที่กำหนดให้ DEGs แต่ละยีนเป็นโหนด (node) และการแสดงออกร่วมกันของยีนพร้อมค่าความสัมพันธ์ที่คำนวณได้เป็นเส้นเชื่อม (edge)

การสร้าง *gene co-expression network* จะอาศัยข้อมูลระดับการแสดงออกที่ดัดแปรข้อมูลแล้ว (normalized expression level) ซึ่งอยู่ในหน่วยของ  $\log_2(\text{CPM}+4)$  ที่ได้มาจากขั้นตอน Pre-process โดย EdgeR package ของการวิเคราะห์ทรานสคริปโทมจากตัวอย่างที่ข้าวได้รับภาวะเค็มในทุกช่วงเวลามาคำนวณหา Partial dynamical correlation coefficient ของ DEGs แต่ละคู่ด้วย longitudinal R package ซึ่งเป็นชุดคำสั่งจากโปรแกรมสำเร็จที่ดำเนินการผ่าน RStudio version 1.2.5033 (RStudio Inc., Massachusetts, USA) ตามวิธีของ Opgen-Rhein and Strimmer (2006a) ทำให้ได้ไฟล์ correlation matrix จากนั้นใช้ชุดคำสั่งของ igraph R package (Csardi and Nepusz, 2006) เพื่อแปลง correlation matrix เป็นโครงข่าย (network) แล้วส่งออกไฟล์โครงข่ายให้สามารถนำไปวิเคราะห์ในโปรแกรม CytoScape version 3.7.2 (ISB, Washington, USA) ที่ช่วยในการวาดภาพโครงข่ายและคำนวณค่าความสำคัญหรือความเป็นศูนย์กลางของระบบ (centrality) ของโหนด

ยีนต่าง ๆ ของโครงข่ายได้ โดยการทดลองนี้จะทดลองเปลี่ยนค่า cut-off threshold สำหรับค่าความสัมพันธ์ที่หาได้ให้มีค่าที่ 0.5 0.6 0.7 และ 0.8 ตามลำดับ เพื่อหาโครงข่ายการแสดงออกที่รวมที่ เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วย นอกจากนี้ยังพิจารณาวิเคราะห์ไปถึงข้อมูลโครงสร้างพื้นฐานของโครงข่ายด้วย การคำนวณค่าอย่าง clustering coefficient, network density, average number of neighbors และ isolated nodes เพื่อให้เห็นลักษณะรวมของโครงข่ายไว้ด้วย โดยการวิเคราะห์ครั้งนี้มีรหัสต้นแบบ (source code) ที่ดำเนินการผ่าน RStudio version 1.2.5033 (RStudio Inc., Massachusetts, USA) ดังภาคผนวก ก.1

#### 3.2.4. การศึกษาเพื่อยืนยันผลกระทบของภาวะเค็มที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่ระบุได้

ศึกษาการแสดงออกของยีนที่คัดเลือกได้ว่ามีการตอบสนองต่อภาวะเค็มหรือไม่ อย่างไร โดยสกัด RNA จากข้าวที่ปลูกไว้ในข้อ 3.2.2.1 จากเนื้อเยื่อส่วนเหนือดินที่อายุ 20 วัน ที่เวลาต่าง ๆ หลังจากได้ภาวะเค็มเป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมงหลังได้รับภาวะเค็ม โดยมีจำนวน 4 ซ้ำ (4 blocks) ด้วยน้ำยาสกัด RNA (GENEzol™ Reagent, Geneaid Biotech Ltd., New Taipei City, Taiwan) จากนั้นกำจัด genomic DNA ด้วย DNase I (RNase-free) (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) แล้วแปลง mRNA ที่ได้เป็น cDNA ด้วย AccuPower® RT PreMix (Bioneer Inc., California, USA)

ออกแบบ primers เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการทนเค็มด้วย <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> จากนั้นตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของ primers ที่ออกแบบได้เพื่อหลีกเลี่ยง self-dimer และ hetero-dimer tendencies ด้วย <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer> โดย primers ที่ออกแบบเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีคุณสมบัติและข้อมูลดังภาคผนวก ก.2

ในส่วนของการทำ quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) จะใช้ Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs Inc., Massachusetts, USA) โดยจำเป็นต้องมีการศึกษา optimal annealing temperature ( $T_a$  Opt) ที่เหมาะสม ของแต่ละ primers ซึ่งพบว่า primers ของทุกยีนมี  $T_a$  Opt เท่ากับ 61.5 °C จากนั้นจึงทำ standard curve PCR ของแต่ละ primers เพื่อให้ได้ค่า primer efficiency ของยีนแต่ละยีนที่ใช้ (ได้ผลดังภาพที่ 28-30 ภาคผนวก ก.) สำหรับการคำนวณหาค่า relative gene expression ratio โดยในการศึกษาครั้งนี้มี *OsEf-1 α* gene (GenBank accession No.GQ848074.1) เป็น internal control และใช้วิธีการคำนวณตามวิธีของ Pfaffl (2004) ซึ่งมีสมการ ดังนี้

$$Ratio = \frac{E_{target} \Delta CP_{target}(MEAN Control - MEAN sample)}{E_{ref} \Delta CP_{ref}(MEAN Control - MEAN sample)}$$

เมื่อ	E	คือ	primer efficiency ของยีน ได้มาจากการทำ standard curve
	CP	คือ	crossing point
	sample	คือ	ตัวอย่างที่ต้องการคำนวณ relative gene expression ratio
	control	คือ	ตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ในการศึกษาครั้งนี้ กำหนดให้เป็นตัวอย่างที่มาจากต้นกล้าข้าวพันธุ์ Pokkali ในสภาวะควบคุมที่เวลา 0 ชั่วโมง โดยเป็นค่ามาจาก block เดียวกันกับ sample ที่ต้องการคำนวณ
	target	คือ	ยีนที่ต้องการศึกษา
	ref	คือ	ยีนที่เป็น internal control ( <i>OsEf-1α</i> )
	MEAN	คือ	ค่าเฉลี่ยของ CP จากตัวอย่างใด ๆ ที่คำนวณมาจาก 3 technical replications

เมื่อได้ค่า relative gene expression ratio ของตัวอย่างต่าง ๆ แล้ว ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย Two-Way ANOVA แบบ RCBD จำนวน 4 block โดยมีจุดประสงค์เพื่อทดสอบความแตกต่างของ 2 ปัจจัยหลัก ได้แก่ 1. พันธุ์ข้าว (หลวงประทาน, มะยม, Pokkali และ IR29) และ 2. ภาวะที่ต้นกล้าข้าวเจริญอยู่ (ภาวะควบคุมและภาวะเค็ม) ตลอดจนทดสอบปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยทั้งสองร่วมด้วย โดยการวิเคราะห์ผลทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จะวิเคราะห์แยกกันในแต่ละช่วงเวลาผ่านโปรแกรม SPSS version 22.0 (IBM, New York, USA)

## บทที่ 4

### ผลการศึกษา

#### 4.1. การคัดเลือกข้าวพันธุ์พื้นเมืองทนเค็มจากลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็ม

##### 4.1.1. การศึกษาเบื้องต้นในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์

ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้ปลูกข้าวจำนวน 12 พันธุ์ ในสองสภาวะได้แก่ ภาวะควบคุมและภาวะเค็ม (ปลูกใน 115 mM NaCl) โดยมีจุดประสงค์เพื่อคัดเลือกข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีลักษณะทนเค็มมากที่สุดสำหรับนำมาศึกษา gene expression profiles เพื่อเข้าใจกลไกและระบุยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการทนเค็ม

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ดำเนินการศึกษาในกล้าข้าวอายุ 14 วัน ภายหลังจากต้นกล้าข้าวเผชิญกับภาวะปกติและภาวะเค็มแล้วผู้วิจัยได้บันทึกค่าลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มทุกวัน เป็นเวลา 9 วัน เพื่อนำมาคำนวณค่าดัชนีเสถียรภาพของค่าลักษณะทางสรีรวิทยาต่าง ๆ อันประกอบไปด้วย 1. ค่าดัชนีเสถียรภาพของค่าคะแนนความเสียหายจากความเค็ม (SI\_SIS) 2. ค่าดัชนีเสถียรภาพของค่าความเขียวใบ (SI\_SPAD) และ 3. ค่าดัชนีเสถียรภาพของค่า chlorophyll fluorescence (SI\_Fv/Fm) เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและจัดกลุ่มข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ตามค่าดัชนีเสถียรภาพของค่าลักษณะทางสรีรวิทยาที่ศึกษา

จากผลการศึกษาพบว่าข้าวทั้ง 12 พันธุ์ มีค่า SI\_SIS ต่างกันเมื่อการทดลองผ่านไปแล้ว 4 วัน จวบจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 9 (ตารางที่ 6-7 ภาคผนวก ข. และภาพที่ 5) โดยพบว่าในวันที่ 4 ข้าวพันธุ์มะยม และ IR29 ที่เป็นพันธุ์ไม่ทนเค็มมาตรฐานเริ่มมีบางส่วนของใบมีสีจางและม้วน มีค่า SI\_SIS อยู่ที่  $3.17 \pm 0.60$  และ  $3.00 \pm 0.45$  ตามลำดับซึ่งแตกต่างจากข้าวพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเมื่อการทดลองดำเนินไปถึงวันที่ 5 พบว่าข้าวพันธุ์มะยมและ IR29 ยังคงมีค่า SI\_SIS สูงมากที่สุดเนื่องจากมีใบม้วนมากขึ้น มีค่า SI\_SIS อยู่ที่  $4.17 \pm 0.60$  และ  $4.33 \pm 0.76$  ตามลำดับ ในขณะที่ข้าวพันธุ์หลวงประทานและ Pokkali ที่เป็นพันธุ์ทนเค็มมาตรฐานมีค่า SI\_SIS ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเพราะยังคงแสดงลักษณะปกติมีเพียงบางซี่ของการทดลองที่ปลายใบมีอาการม้วนงอเล็กน้อยทำให้มีค่า SI\_SIS อยู่ที่  $2.17 \pm 0.31$  และ  $1.83 \pm 0.17$  ตามลำดับ ซึ่งถือว่ามามีค่าต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อื่น ๆ โดยสามารถเห็นรูปแบบความแตกต่างของ SI\_SIS เช่นนี้ได้ชัดเจนจนกระทั่งการทดลองดำเนินไปถึงวันที่ 7 ซึ่งพบว่าค่า SI\_SIS ในวันที่ 8 และ 9 ข้าวพันธุ์ Pokkali ที่เป็นข้าวพันธุ์ทนเค็มมาตรฐานมีค่า SI\_SIS ต่ำที่สุด คือ  $2.83 \pm 0.31$  และ  $3.17 \pm 0.31$  ตามลำดับ ซึ่งมีค่าแตกต่างจากข้าวพันธุ์หลวงประทานที่มีค่าเท่ากับ



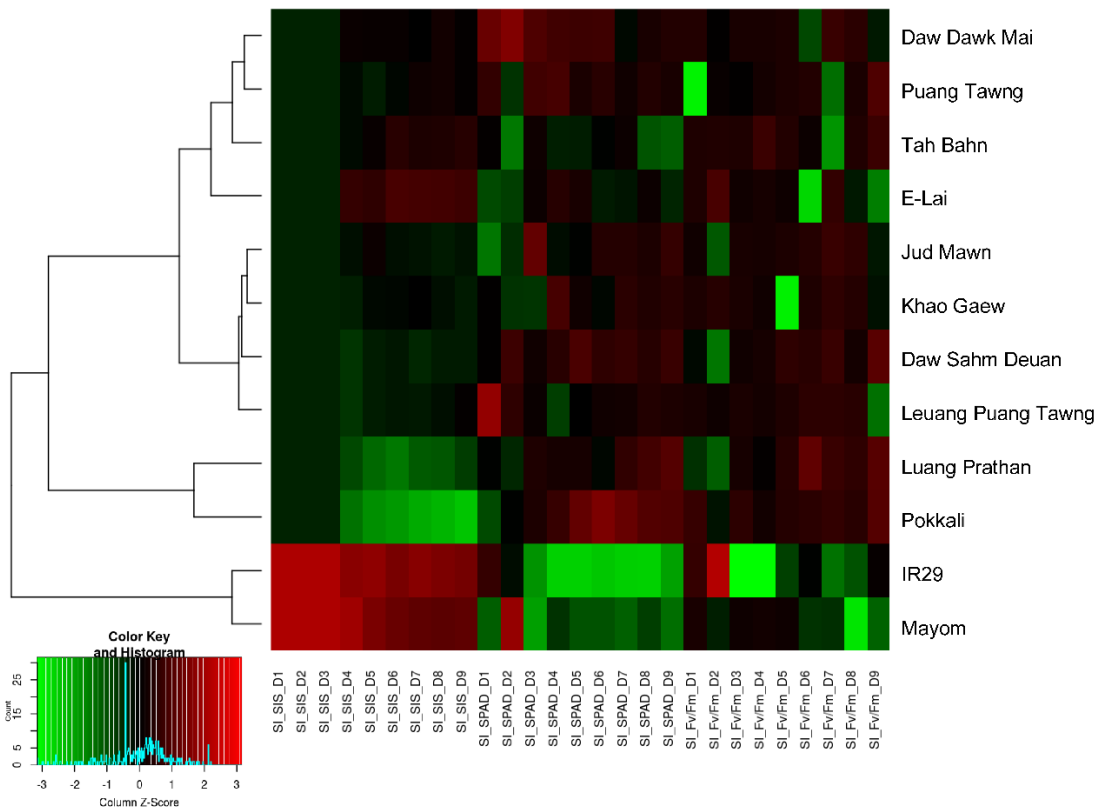
4.17 ± 0.31 และ 5.17 ± 0.31 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่อย่างไรก็ตามข้าวพันธุ์หลวงประทานยังคงเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีความสามารถในการทนเค็มมากที่สุดหากพิจารณาจากค่า SI\_SIS ซึ่งแตกต่างอย่างชัดเจนจากข้าวพันธุ์มะยมที่พบว่าเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีค่า SI\_SIS เท่ากับข้าวพันธุ์ IR29 ที่เป็นข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็มมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังภาพที่ 5

ในส่วนของค่า SI\_SPAD พบว่าข้าวพันธุ์ต่าง ๆ มีค่า SI\_SPAD ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $p < 0.05$  เริ่มแรกในวันที่ 6 หลังจากเริ่มทดลอง (ตารางที่ 8-9 ภาคผนวก ข. และภาพที่ 6) โดยพบว่าข้าวพันธุ์ Pokkali มีค่า SI\_SPAD เท่ากับ  $1.28 \pm 0.06$  ซึ่งหมายความว่าข้าวพันธุ์ Pokkali ในภาวะเค็มมีความเขียวใบบอกมากกว่าภาวะปกติประมาณ 1.28 เท่า ขณะที่ข้าวพันธุ์อื่นมี SI\_SPAD อยู่ที่ประมาณ 1 ยกเว้นข้าวพันธุ์มะยมและ IR29 ที่มีค่า SI\_SPAD เท่ากับ  $0.97 \pm 0.21$  และ  $0.79 \pm 0.17$  ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงความเขียวของใบลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับภาวะปกติ ซึ่งผลการทดลองในวันที่ 7 ก็มีแนวโน้มเช่นเดียวกับวันที่ 6 แต่หากพิจารณาผลในวันที่ 8 และวันที่ 9 กลับพบว่าข้าวพันธุ์หลวงประทานมีความสามารถในการเพิ่มค่าความเขียวใบเมื่อเผชิญกับภาวะเค็มถึง  $1.30 \pm 0.04$  เท่าซึ่งมีค่ามากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์อื่น ๆ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในกลุ่มเดียวกับข้าวพันธุ์ Pokkali ที่เป็นข้าวพันธุ์ทนเค็มมาตรฐานและข้าวพันธุ์อื่น ๆ ยกเว้นข้าวพันธุ์มะยม ตาบาน และ IR29 ที่มีค่าเท่ากับ  $0.44 \pm 0.22$ ,  $0.61 \pm 0.27$  และ  $0.67 \pm 0.22$  ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากข้าวพันธุ์ที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สำหรับค่า SI\_Fv/Fm เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ย (ตารางที่ 10-11 ภาคผนวก ข.) และแนวโน้มของกราฟ SI\_Fv/Fm (ภาพที่ 7) พบว่าข้าวพันธุ์ Pokkali หลวงประทาน พวงทอง ดอสามเดือน และตาบาน มีค่า SI\_Fv/Fm อยู่ที่ประมาณ 1 ในวันที่ 9 ขณะที่ข้าวพันธุ์อื่น ๆ ได้แก่ พวงทอง ดอดอกไม้ จุดมอญ เหลืองพวงทอง อีลาย มะยม และ IR29 มีค่า SI\_Fv/Fm ค่อนข้างต่ำ แต่อย่างไรก็ตามจากการทดสอบสถิติพบว่าค่าเฉลี่ย SI\_Fv/Fm ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

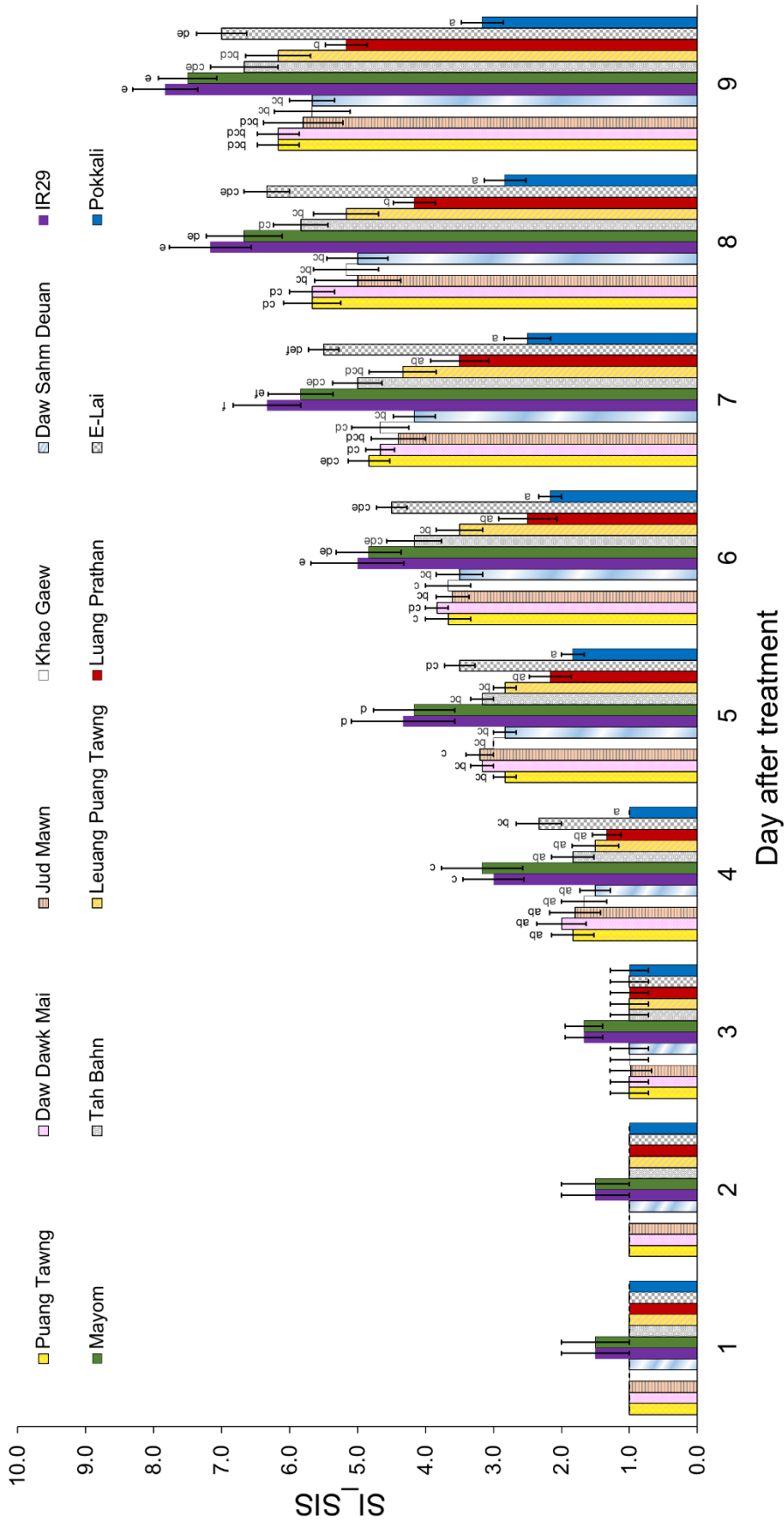
เพื่อจัดกลุ่มข้าวพันธุ์ต่าง ๆ จากลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อความเค็ม ผู้วิจัยได้นำค่าเฉลี่ยดัชนีเสถียรภาพของค่าสรีรวิทยาทุกค่า ที่วันต่าง ๆ มาดำเนินการวิเคราะห์กลุ่ม (clustering analysis) เพื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของนพคุณ คุณผลวัฒนา (2558) ที่มีมาก่อนหน้า ผลการศึกษาพบว่าสามารถจัดกลุ่มข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ได้ดังภาพที่ 4 โดยข้าวพันธุ์หลวงประทานถูกจัดให้อยู่กลุ่มเดียวกับข้าวพันธุ์ Pokkali ที่เป็นข้าวพันธุ์ทนเค็มมาตรฐาน ในขณะที่ข้าวพันธุ์มะยมถูกจัดกลุ่มให้รวมอยู่กับข้าวพันธุ์ IR29 ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็มมาตรฐาน ดังนั้นข้าวพันธุ์หลวงประทาน มะยม Pokkali และ IR29 จึงถูกเลือกให้นำมา

ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อความเค็มอีกครั้งโดยพิจารณาพารามิเตอร์อื่น ๆ ร่วมด้วย เพื่อยืนยันผลการทดลองและความสามารถในการทนเค็มของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยทั้งสองที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีความสามารถในการทนเค็มจะถูกนำไปศึกษา gene expression profiles ในลำดับถัดไป

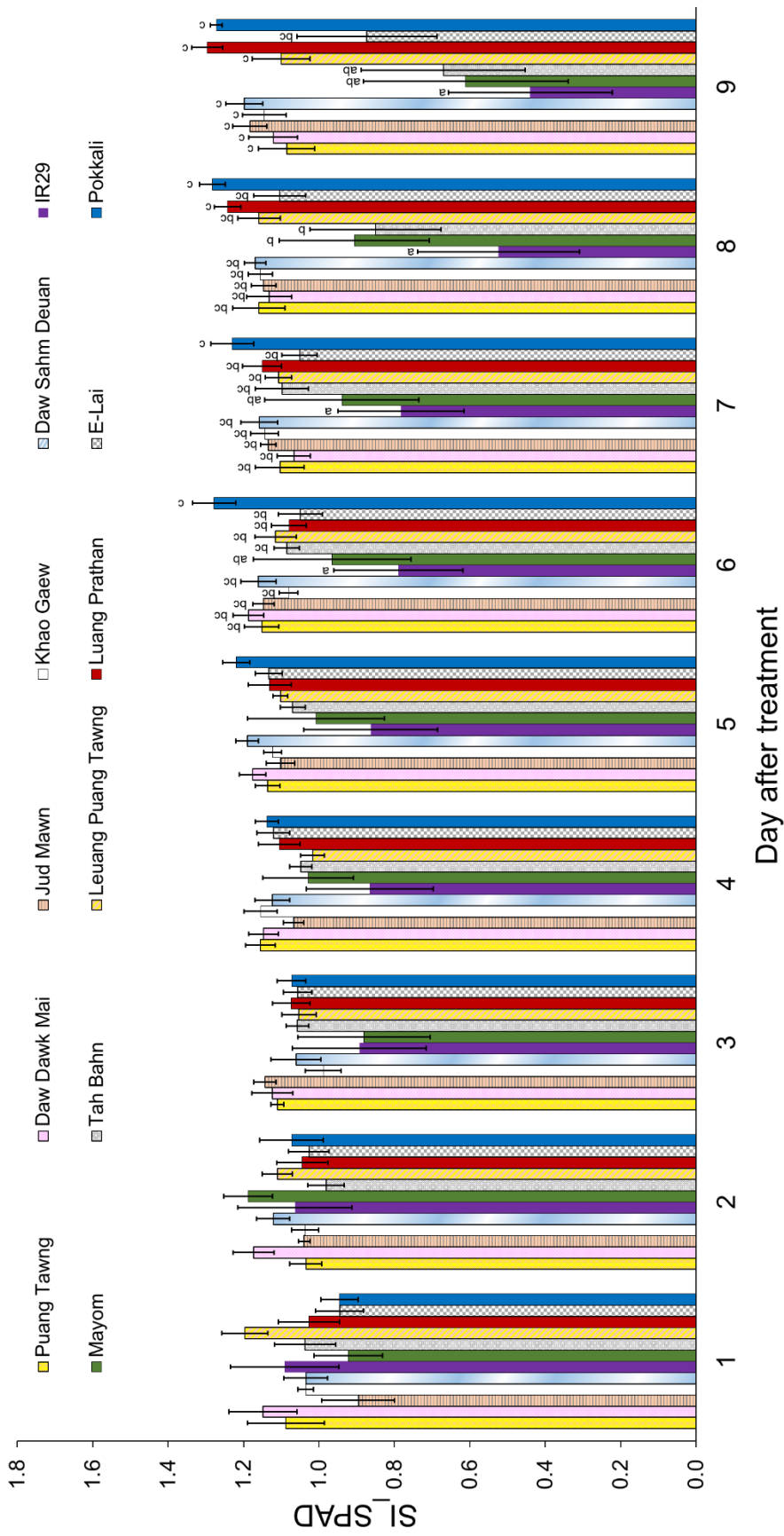


CHULALONGKORN UNIVERSITY

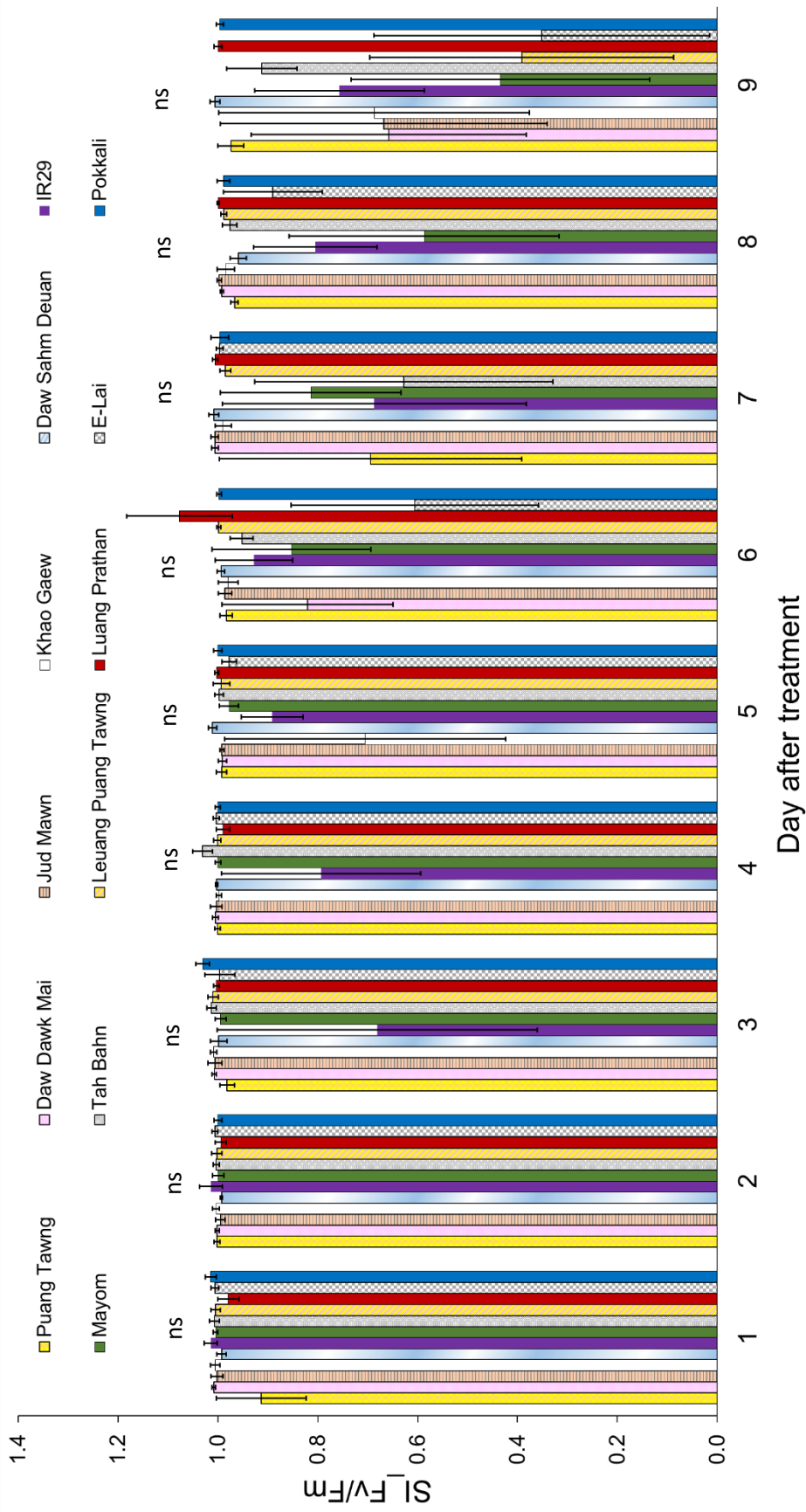
ภาพที่ 4 ผลการวิเคราะห์กลุ่ม (clustering analysis) แบบ Ward's method ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 12 พันธุ์ จากค่าดัชนีเสถียรภาพของลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็ม ภายหลังจากกล้าข้าวอายุ 14 วัน เปรียบเทียบกับความเค็มเป็นเวลา 1-9 วัน



ภาพที่ 5 ค่าดัชนีเสถียรภาพของค่าคะแนนความเสียหายจากความเค็ม (SI\_SIS) ภายหลังจากการแช่ข้าวอายุ 14 วัน เปรียบกับภาวะเค็มที่ 115 mM NaCl จากการศึกษานี้ในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์ (Error bar = ± SE, ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)



ภาพที่ 6 ค่าดัชนีเสถียรภาพของคลอโรฟิลล์ (SI\_SPAD) ภายหลังจากต้นกล้าข้าวอายุ 14 วัน เติบโตกับความเค็มที่ 115 mM NaCl จากการศึกษาในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์ (Error bar = ± SE, ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)



ภาพที่ 7 ค่าดัชนีเสถียรภาพของ Chlorophyll fluorescence ( $SI_{Fv/Fm}$ ) ภายหลังต้นกล้าข้าวอายุ 14 วัน เปรียบกับความเค็มที่ 115 mM NaCl จากการศึกษาในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์ (ns = ไม่มีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)

#### 4.1.2. การศึกษาเพื่อยืนยันผลในกล้าข้าวจำนวน 4 พันธุ์

ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มอีกครั้ง โดยศึกษาในข้าวจำนวน 4 พันธุ์ ประกอบด้วยข้าวพันธุ์ Pokkali หลวงประทาน มะยม และ IR29 โดยดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้าโดยยังคงศึกษา SI\_SIS (ภาพที่ 8), SI\_SPAD (ภาพที่ 9 A) และ SI\_Fv/Fm (ภาพที่ 9 B) เช่นเดิม แต่พิจารณาพารามิเตอร์อื่นร่วมด้วย ได้แก่ ดัชนีเสถียรภาพของน้ำหนักสด (SI\_FW) (ภาพที่ 9 C) ดัชนีเสถียรภาพของน้ำหนักแห้ง (SI\_DW) (ภาพที่ 9 D) ดัชนีเสถียรภาพของเสถียรภาพเยื่อหุ้มเซลล์ (SI\_%CMS) (ภาพที่ 9 E) และดัชนีเสถียรภาพของปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (SI\_%RWC) (ภาพที่ 9 F) ซึ่งจะสามารถอนุมานได้ถึงความสามารถของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ในการทนเค็มได้จากการประเมิน Biomass (SI\_FW และ SI\_DW) ความปกติของกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ด้วยการพิจารณา SI\_%CMS ความสามารถในการรักษาภาวะธำรงดุลของน้ำภายในเซลล์ด้วยการพิจารณา SI\_%RWC โดยการทดลองครั้งนี้ดำเนินการในต้นกล้าข้าวอายุ 14 วันเช่นเดิม แต่จะเก็บผลการทดลองที่ 3 6 และ 9 วันหลังเริ่มทดลอง

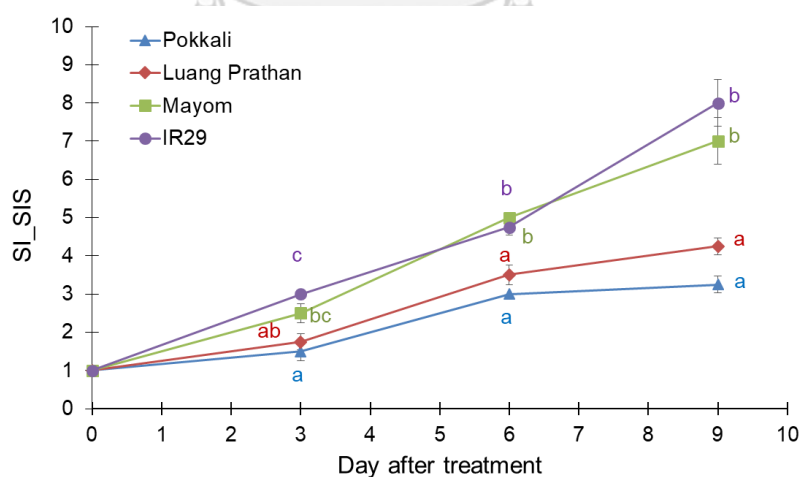
จากผลการศึกษาพบว่าข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ยังคงมีการรักษาเสถียรภาพของลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มเช่นเดียวกับการศึกษาเบื้องต้นในข้าว 12 พันธุ์ โดยพบว่าเริ่มสังเกตเห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่า SI\_SIS ได้ในวันที่ 3 หลังเริ่มทดลอง โดยข้าวพันธุ์หลวงประทานและ Pokkali ยังคงมีลักษณะโดยรวมปกติ โดยมีค่า SI\_SIS อยู่ที่  $1.75 \pm 0.43$  และ  $1.50 \pm 0.5$  ตามลำดับ (ตารางที่ 12 ภาคผนวก ข.) ขณะที่ข้าวพันธุ์มะยมและ IR29 เริ่มแสดงอาการโดยมีบางส่วนของใบม้วนงอ ทำให้มีค่า SI\_SIS อยู่ที่  $2.50 \pm 0.50$  และ  $3.00 \pm 0.00$  ตามลำดับ (ตารางที่ 12 ภาคผนวก ข.) โดยค่า SI\_SIS สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ของข้าวพันธุ์ทนเค็มและไม่ทนเค็มได้อย่างชัดเจนตั้งแต่วันที่ 6 จนถึงวันที่ 9 ของการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ภาพที่ 8)

สำหรับค่า SI\_SPAD พบว่าข้าวทั้ง 4 พันธุ์มีค่าเฉลี่ยต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $p < 0.05$  เช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้า (ตารางที่ 12 ภาคผนวก ข.) โดยพบว่าข้าวพันธุ์หลวงประทาน และ Pokkali ยังคงรักษาเสถียรภาพของค่าความเขียวใบได้ จวบจนกระทั่งวันที่ 9 ของการทดลอง กล่าวคือมีค่า SI\_SPAD เท่ากับ  $1.01 \pm 0.12$  และ  $1.21 \pm 0.07$  ตามลำดับ ขณะที่ข้าวพันธุ์มะยมมีค่า SI\_SPAD ลดลงจนมีค่าใกล้เคียง 0 เท่ากับข้าวพันธุ์ IR29 ในวันสุดท้ายของการทดลอง (ภาพที่ 9 A) เนื่องจากใบอ่อนที่สุดที่มีการขยายขนาดของใบเต็มที่ (youngest fully expanded leaf) ของข้าวพันธุ์มะยมและ IR29 ที่เผชิญกับภาวะเค็มตาย โดยข้าวพันธุ์มะยมยังคงมีใบอ่อนสีเขียวที่เกิดขึ้นใหม่เพียงหนึ่งใบ ขณะที่ข้าวพันธุ์ IR29

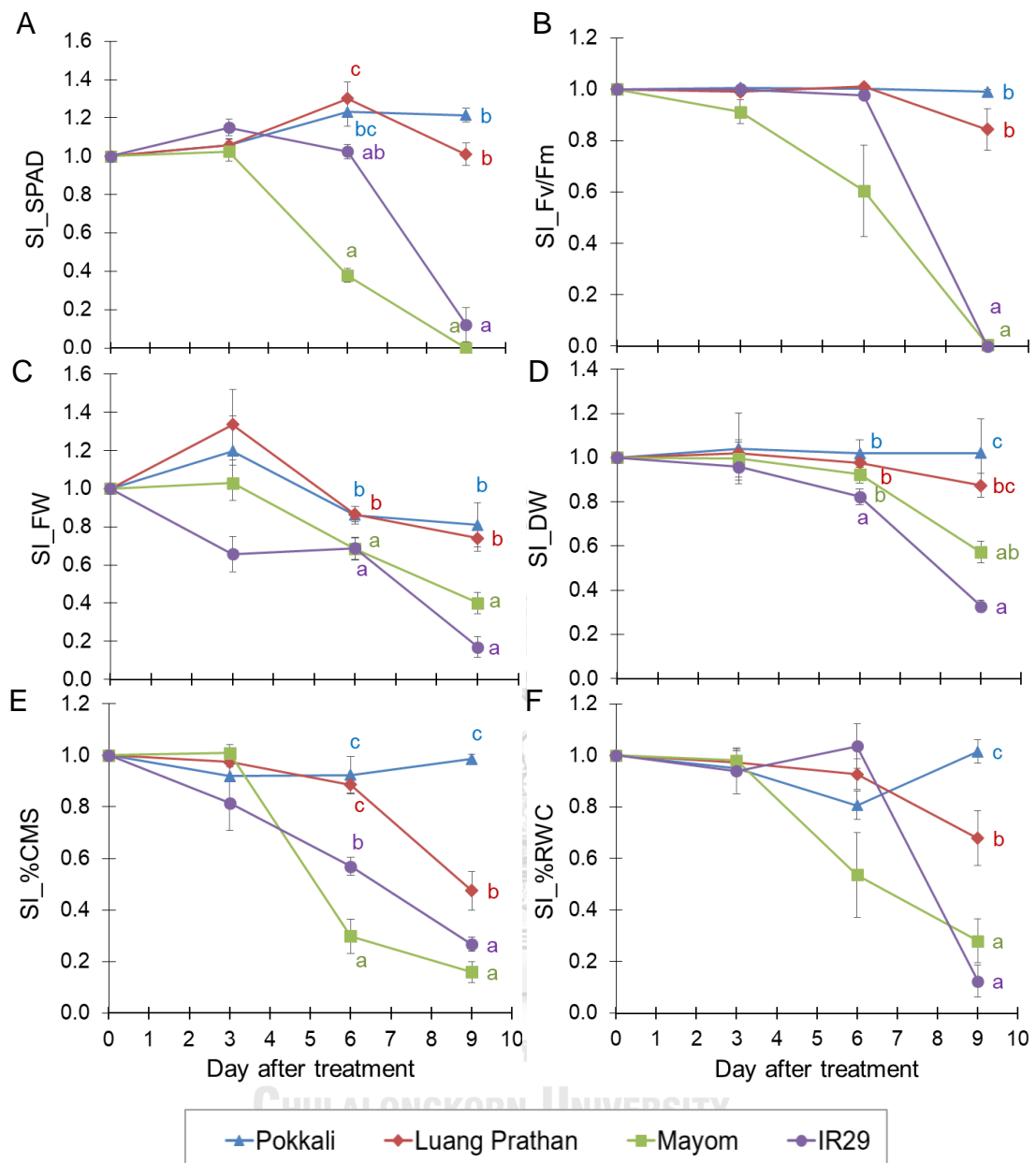
ตายเกือบทั้งต้น ดังภาพที่ 10 ทำให้ค่า SI\_SPAD ในวันที่ 9 ข้าวพันธุ์หลวงประธานและ Pokkali มีค่ามากกว่าและแตกต่างจากข้าวพันธุ์มะยมกับ IR29 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ค่า SI\_Fv/Fm จากการทดลองครั้งนี้ (ภาพที่ 9 B) พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ  $p < 0.05$  ในวันที่ 9 (ตารางที่ 12 ภาคผนวก ข.) โดยข้าวพันธุ์หลวงประธานและ Pokkali ยังคงรักษาเสถียรภาพของค่า Fv/Fm ได้ ซึ่งแตกต่างจากข้าวพันธุ์มะยมและ IR29 ที่ใบที่อ่อนที่สุดที่มีการขยายขนาดเต็มที่แห้งตาย จนไม่สามารถวัดค่าดังกล่าวได้

นอกจากนี้สำหรับพารามิเตอร์อื่น ๆ ได้แก่ น้ำหนักสด (ภาพที่ 9 C) น้ำหนักแห้ง (ภาพที่ 9 D) และเสถียรภาพเยื่อหุ้มเซลล์ (ภาพที่ 9 E) ที่ผู้วิจัยศึกษาเพิ่มเติมพบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตั้งแต่วันที่ 6 ของการทดลอง ยกเว้น SI\_%RWC (ภาพที่ 9 F) ที่พบความแตกต่างในวันที่ 9 หลังเริ่มทดลอง โดยค่าเฉลี่ยของดัชนีเสถียรภาพของทุกพารามิเตอร์มีรูปแบบและแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือข้าวพันธุ์หลวงประธานมีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ Pokkali ที่เป็นพันธุ์มาตรฐานทนเค็ม ในทางกลับกันข้าวพันธุ์มะยมมีค่าเฉลี่ยที่มีแนวโน้มใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ IR29 ที่เป็นพันธุ์มาตรฐานไม่ทนเค็ม (ตารางที่ 12 ภาคผนวก ข. และภาพที่ 9 C - F) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองเบื้องต้นในข้าวจำนวน 12 พันธุ์ ดังนั้นข้าวพันธุ์หลวงประธานจึงเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีความสามารถในการทนเค็มมากที่สุด และจะถูกนำไปศึกษา gene expression profile เพื่อทำความเข้าใจกลไกการทนเค็มและระบุยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการทนเค็มด้วยวิธีทางทรานสคริปโทมในลำดับต่อไป

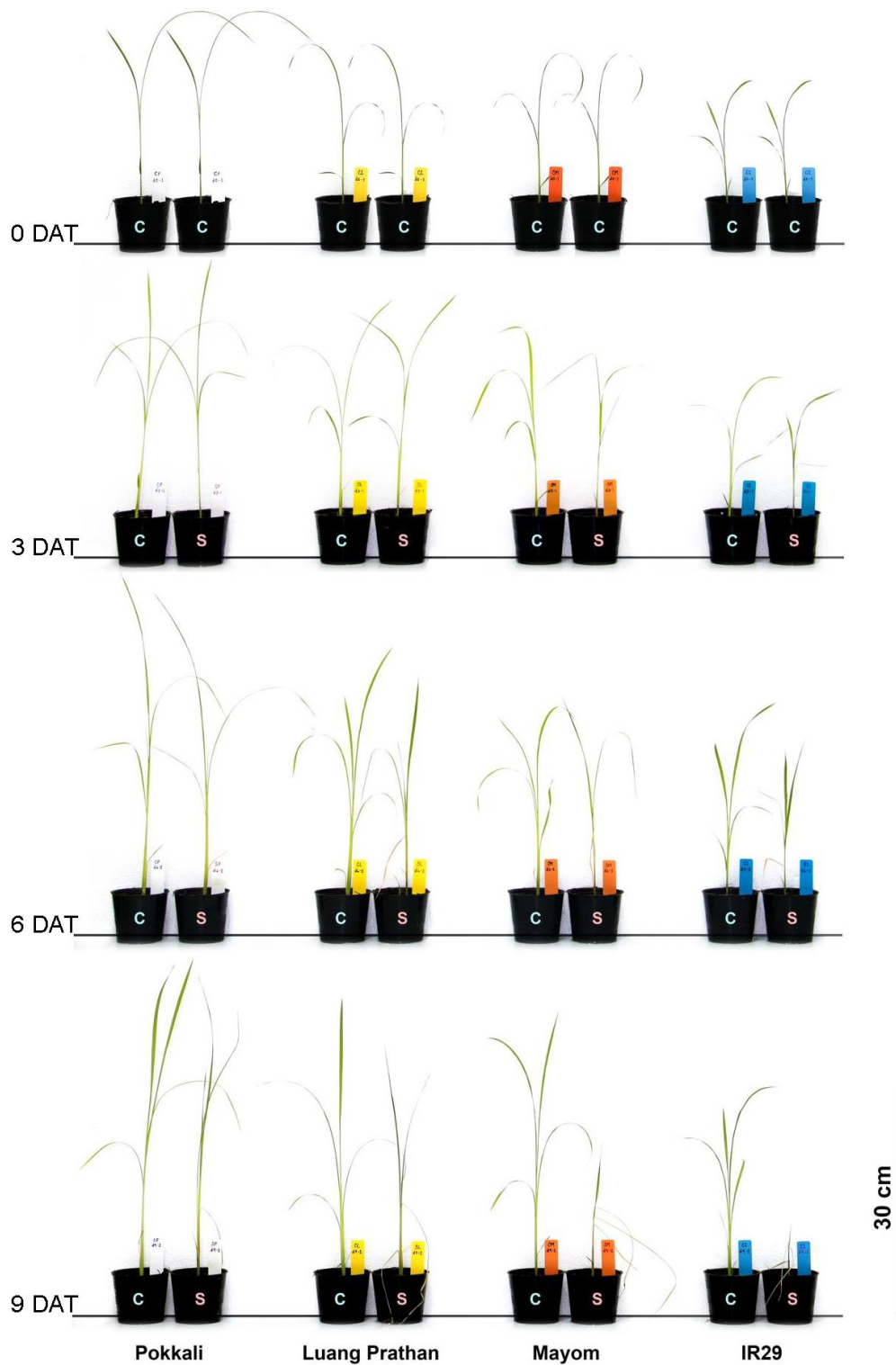


ภาพที่ 8 ค่าดัชนีเสถียรภาพของค่าคะแนนความเสียหายจากความเค็ม (SI\_SIS) ของของข้าวพันธุ์ Pokkali หลวงประธาน (Luang Prathan) มะยม (Mayom) และ IR29 อายุ 14 วัน ภายหลังเผชิญกับความเค็มที่ 115 mM NaCl เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 วัน (Error bar =  $\pm$  SE, ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)



ภาพที่ 9 ค่าดัชนีเสถียรภาพ (stability index: SI) ในพารามิเตอร์ต่าง ๆ (SPAD = ค่าความเขียวใบ (A), Fv/Fm = ค่า chlorophyll fluorescence (B), FW = น้ำหนักสด (C), DW = น้ำหนักแห้ง (D), %CMS = เสถียรภาพเยื่อหุ้มเซลล์ (E), %RWC = ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (F)) ของข้าวพันธุ์ Pokkali หลวงประทาน(Luang Prathan) มะยม (Mayom) และ IR29 อายุ 14 วัน ภายหลังเผชิญกับความเค็มที่ 115 mM NaCl เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 วัน (Error bar = ± SE, ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)





ภาพที่ 10 ภาพถ่ายของข้าวพันธุ์ Pokkali หลวงประทาน (Luang Prathan) มะยม (Mayom) และ IR29 ที่อายุ 14 วัน ภายหลังจากเผชิญกับภาวะปกติ และภาวะเค็ม (115 mM NaCl) เป็นเวลา 3 6 และ 9 วัน (DAT = day after treatment, c = control, s = salt stress)

## 4.2. การศึกษา gene expression profiles ของข้าวพันธุ์ที่ทนเค็มเพื่อเข้าใจกลไกการตอบสนองของพืชต่อภาวะเค็ม

### 4.2.1. การปลูกและการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่จะถูกนำไปสกัด RNA

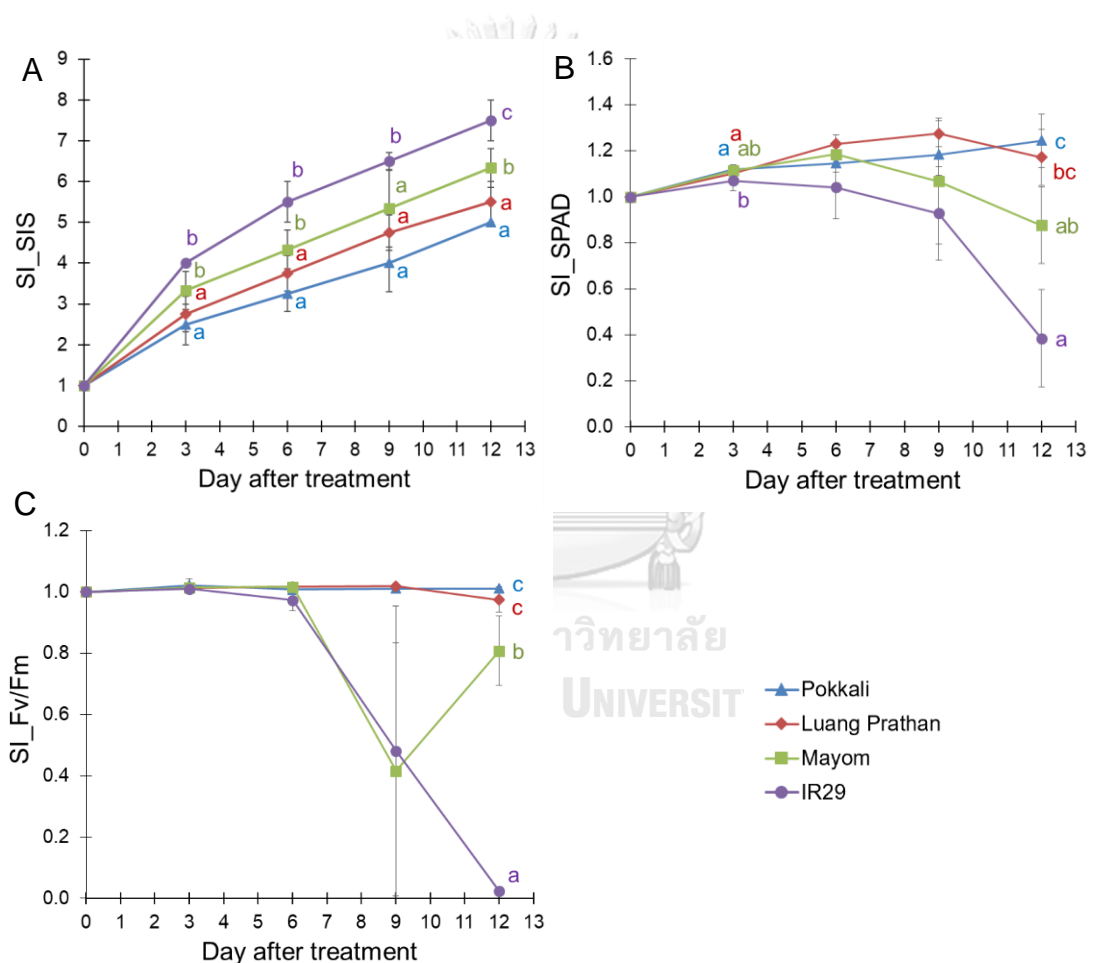
ในการปลูกข้าวเพื่อเก็บเนื้อเยื่อพืชสำหรับการศึกษา gene expression profile นั้น ผู้วิจัยไม่สามารถดำเนินการทดลองในต้นกล้าข้าวเมื่ออายุถึง 14 วันได้ เนื่องจากประสบปัญหาจากสภาพอากาศที่เป็นอุปสรรคกับการดำเนินการเก็บตัวอย่าง ผู้วิจัยจึงเลื่อนการทดลองออกไปให้ต้นกล้าข้าวมีอายุครบ 20 วันจึงเริ่มการทดลองให้ภาวะเค็ม โดยให้สารละลาย NaCl ที่ความเข้มข้น 115 mM และให้น้ำกรองสำหรับการทดลองชุดควบคุม ด้วยสภาพภูมิอากาศแตกต่างจากการทำการทดลองในครั้งก่อน การเก็บเนื้อเยื่อเพื่อศึกษา gene expression profile ควรเป็นเนื้อเยื่อจากพืชที่ได้รับความเครียดจากความเค็ม จึงทำการเก็บข้อมูลทางสรีรวิทยาเพื่อเป็นการยืนยันภาวะเครียดจากความเค็มที่เกิดขึ้น ดังนั้นจึงดำเนินการปลูกข้าวพันธุ์หลวงประทานพร้อมกับข้าวพันธุ์มะยม Pokkali และ IR29 อีกครั้งเพื่อเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อสำหรับสกัด RNA และศึกษา SI\_SIS, SI\_SPAD และ SI\_Fv/Fm ที่เวลา 3 6 9 และ 12 วัน หลังจากเริ่มทดลอง โดยแต่ละชุดการทดลองมีจำนวน 4 block

จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อต้นกล้าข้าวพันธุ์ต่าง ๆ อายุ 20 วันเผชิญกับภาวะเค็ม เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน จะสังเกตเห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของ SI\_SIS ได้ (ตารางที่ 13 ภาคผนวก ข. และภาพที่ 11 A) โดยข้าวพันธุ์หลวงประทานยังคงมีค่า SI\_SIS ใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ Pokkali จนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 12 ซึ่งพบว่ามีค่า SI\_SIS เท่ากับ  $5.50 \pm 0.50$  และ  $5.00 \pm 0.00$  ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าข้าวพันธุ์มะยม ( $SI_SIS = 6.33 \pm 0.47$ ) และ IR29 ( $SI_SIS = 7.50 \pm 0.50$ ) แต่อย่างไรก็ตามการทดลองในต้นกล้าข้าวอายุ 20 วัน พบว่าข้าวพันธุ์มะยมมี SI\_SIS ต่ำกว่าข้าวพันธุ์ IR29 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  ซึ่งเห็นได้ชัดว่าเมื่อเวลาผ่านไปแล้ว 16 วันหลังจากได้รับภาวะเค็ม ข้าวพันธุ์มะยมยังมีการเจริญเติบโตต่อไปได้ ขณะที่ข้าวพันธุ์ IR29 ตายเกือบทั้งต้นดังภาพที่ 12

สำหรับค่า SI\_SPAD ของการทดลองครั้งนี้พบว่าค่าเฉลี่ยของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ มีค่าต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในวันที่ 3 ซึ่งต่างจากการทดลองก่อนหน้านี้ที่จะพบความแตกต่างในวันที่ 6 โดยวันที่ 3 ข้าวพันธุ์ IR29 จะมีค่า SI\_SPAD ต่างจากข้าวพันธุ์หลวงประทานและ Pokkali แต่อย่างไรก็ตามในวันที่ 6 และวันที่ 9 ของการทดลองนั้นกลับไม่มีความแตกต่างทางสถิติของข้าวทั้ง 4 พันธุ์ แต่จะสามารถเห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้เมื่อการทดลองดำเนินไปถึงวันที่ 12 โดยที่หากพิจารณาแนวโน้มของกราฟ SI\_SPAD

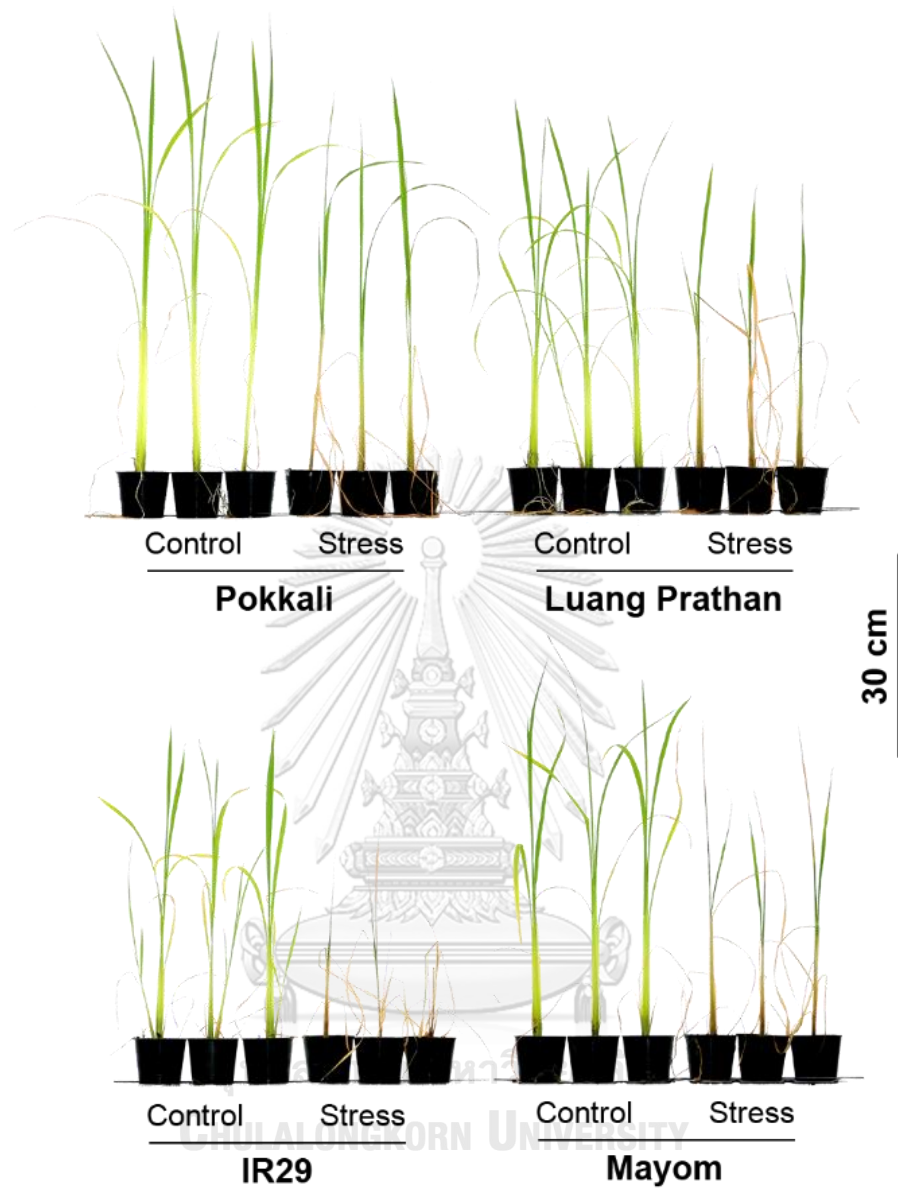
แล้วจะพบว่าข้าวพันธุ์ IR29 มีแนวโน้มของการเสถียรภาพเร็วกว่าข้าวพันธุ์มะยม หลวงประทาน และ Pokkali ตามลำดับ (ภาพ 11 B)

ในส่วนของ SI\_Fv/Fm ผลการทดสอบสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในวันที่ 12 โดยข้าวพันธุ์หลวงประทานและ Pokkali มีค่าไม่แตกต่างกัน โดยมีค่ามากกว่าข้าวพันธุ์มะยมและ IR29 แต่อย่างไรก็ตามหากพิจารณาแนวโน้มของกราฟ SI\_Fv/Fm จะพบว่าข้าวพันธุ์มะยมและ IR29 มีค่า SI\_Fv/Fm ลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่ข้าวพันธุ์มะยมสามารถสร้างใบใหม่ขึ้นมาได้ทำให้ค่า SI\_Fv/Fm สูงขึ้นในวันที่ 12 (ภาพ 11 C)



ภาพที่ 11 ค่าดัชนีเสถียรภาพ (stability index: SI) ในพารามิเตอร์ต่าง ๆ (SIS = ค่าคะแนนความเสียหายจากความเค็ม (A), SPAD = ค่าความเขียวใบ (B), Fv/Fm = ค่า chlorophyll fluorescence) (C) ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ อายุ 20 วัน ที่เผชิญกับความเค็ม เป็นเวลา 0 3 6 9 และ 12 วัน

(Error bar =  $\pm$  SE, ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)

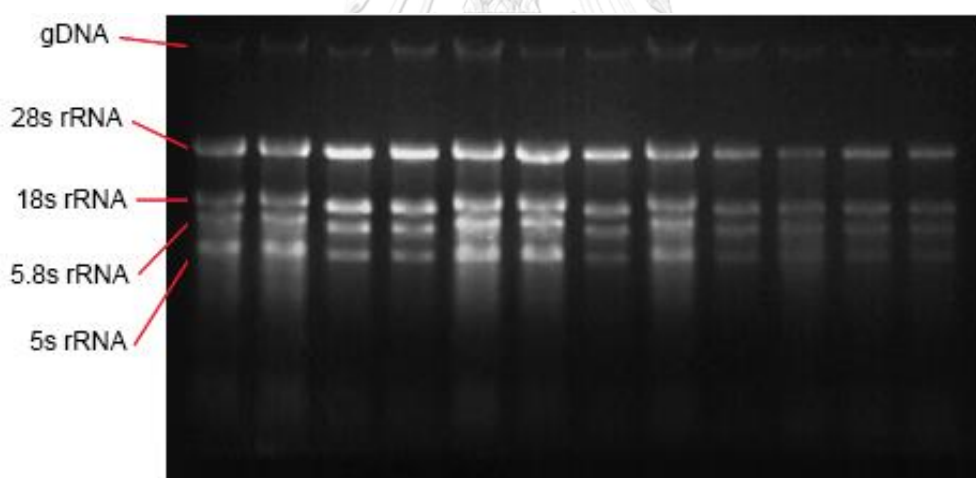


ภาพที่ 12 ลักษณะของข้าวพันธุ์ Pokkali หลวงประทาน (Luang Prathan) มะยม (Mayom) และ IR29 อายุ 36 วัน ที่ได้รับความเค็มจากสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 115 mM เป็นเวลา 16 วัน

#### 4.2.2. การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อสกัด total RNA

ผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างส่วนเหนือดินของข้าวพันธุ์หลวงประทานซึ่งเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยทนเค็มที่อายุ 20 วัน เมื่อเผชิญกับภาวะควบคุม และภาวะเค็ม (115 mM NaCl) เป็นเวลา 0 3 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น สำหรับสกัด RNA และเตรียม cDNA library ทั้งหมด 36 library (2 ภาวะ x 6 ช่วงเวลา x 3 ซ้ำ) แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะดำเนินการสกัด

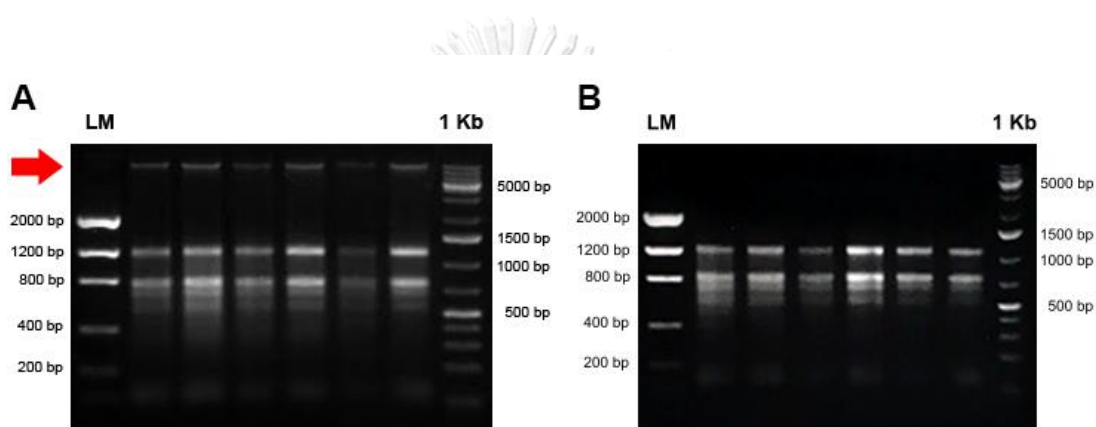
เมื่อผู้วิจัยดำเนินการสกัด RNA ภายหลังจากการสกัดผู้วิจัยได้ตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วย NanoDrop™ 2000 Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) และ gel electrophoresis ซึ่งพบว่าตัวอย่าง RNA ที่สกัดได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ (มีค่า 260/280 Ratio และ 260/230 Ratio ที่ประมาณ 2.0 และ 2.0 - 2.2 ตามลำดับ) มีความสมบูรณ์และยังไม่เสื่อมคุณภาพ (degradation) เนื่องจากยังปรากฏแถบของ ribosomal RNA (rRNA) ที่ขนาดต่าง ๆ ชัดเจน มีปริมาณและคุณภาพเพียงพอที่จะนำไปเตรียม cDNA libraries ทั้ง 36 libraries สำหรับการศึกษาด้วย 3'-Taq RNA-seq ต่อไป ดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 ผลการตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วย gel electrophoresis ที่ได้ภายหลังจากการสกัด โดยใช้ 0.8 %w/v agarose gel ใน 0.5X TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100V เป็นเวลา 25 นาที

#### 4.2.3. การเตรียม RNA-seq libraries (3'-Tag RNA-seq libraries)

เนื่องจากการเตรียม cDNA libraries สำหรับศึกษาด้วย 3'-Tag RNA-seq libraries จำเป็นต้องเตรียมจากตัวอย่าง RNA ที่บริสุทธิ์และไม่ควรมีการปนเปื้อนของ genomic DNA (gDNA) ผู้วิจัยจึงดำเนินการกำจัด gDNA ออกด้วยการทำปฏิกิริยากับ DNase I (New England Biolabs Inc., Massachusetts, USA) และตรวจสอบผลการกำจัด gDNA ด้วยการทำ gel electrophoresis โดยพบว่าขั้นตอนการกำจัด gDNA ที่ดำเนินการมีประสิทธิภาพในการกำจัด gDNA ที่ปนเปื้อนมาได้เพราะไม่มีแถบของ gDNA ปรากฏให้เห็นภายหลังการกำจัด (ภาพที่ 14)

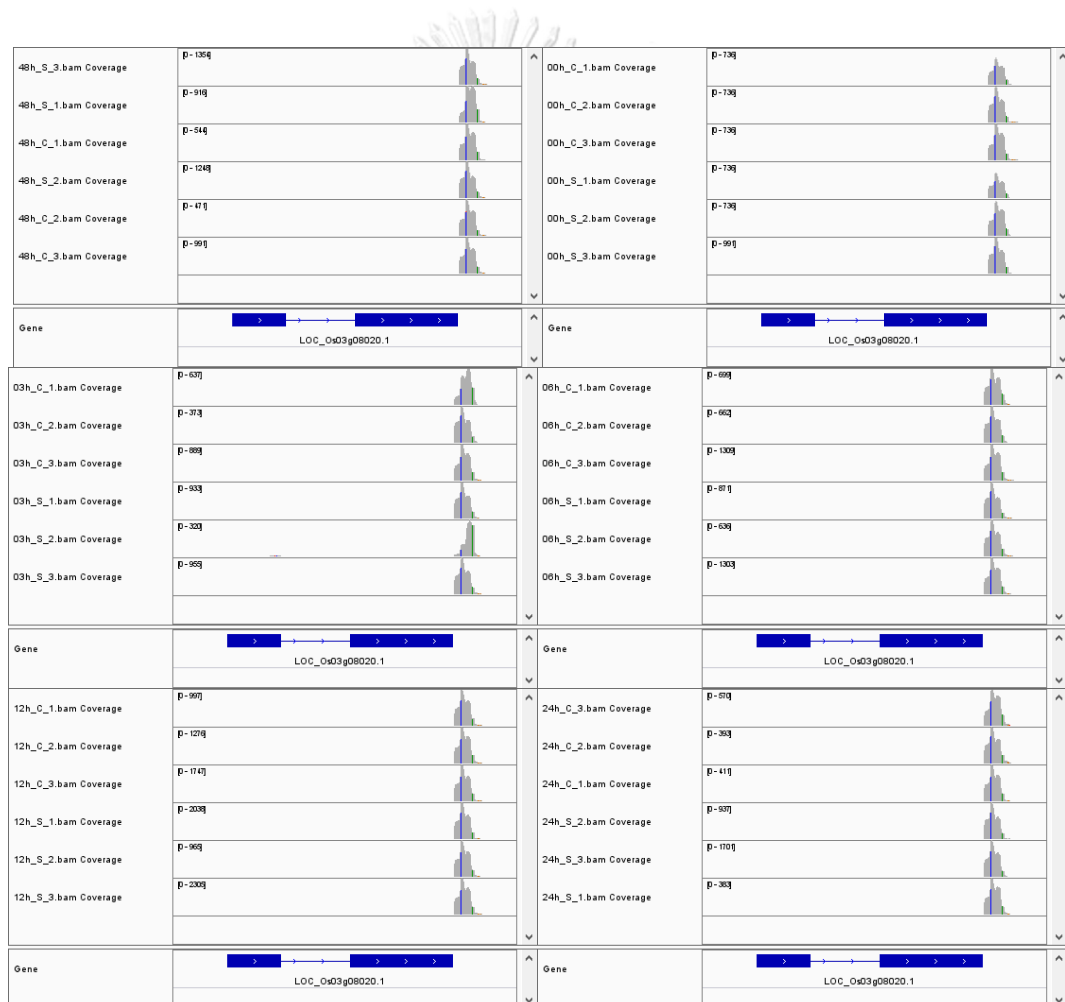


ภาพที่ 14 ผลการตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วย gel electrophoresis ที่ได้ภายหลังจากการสกัด (A) และภายหลังจากการกำจัด gDNA ด้วย DNase I (B) โดยใช้ 1.5 %w/v agarose gel ใน 0.5X TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 110V เป็นเวลา 45 นาที (ลูกศรสีแดงแสดงแถบของ gDNA ที่ปนเปื้อน, LM = low molecular weight DNA Ladder, 1Kb = 1Kb DNA ladder)

#### 4.2.4. การศึกษาทรานสคริปโทมด้วย 3'-Tag RNA-seq

ในการศึกษาทรานสคริปโทมด้วย 3'-Tag RNA-seq นี้ผู้วิจัยได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA library ที่เตรียมไว้ทั้ง 36 libraries ด้วย Hiseq4000 sequencer (Illumina Inc., California, USA) และเมื่อดำเนินการนำ sequencing reads มา map กับฐานข้อมูลจีโนมข้าว *Oryza sativa* var. *japonica* จาก MSU Rice Genome Annotation Release 7 (MSU 7.0) (Kawahara et al., 2013) แล้วพบว่าในแต่ละ library มีค่าเฉลี่ยของ mapped reads เท่ากับ 1,426,980.56 reads โดยในแต่ละ library มียีนที่แสดงออก (expressed genes) เฉลี่ยประมาณ 18,006.25 ยีน ซึ่งทุก ๆ library มียีนที่แสดงออกคิดเป็นร้อยละ 32.16 ของยีนทั้งหมดในข้าวโดยเฉลี่ย (ดังตารางที่ 16 ภาคผนวก ค.)

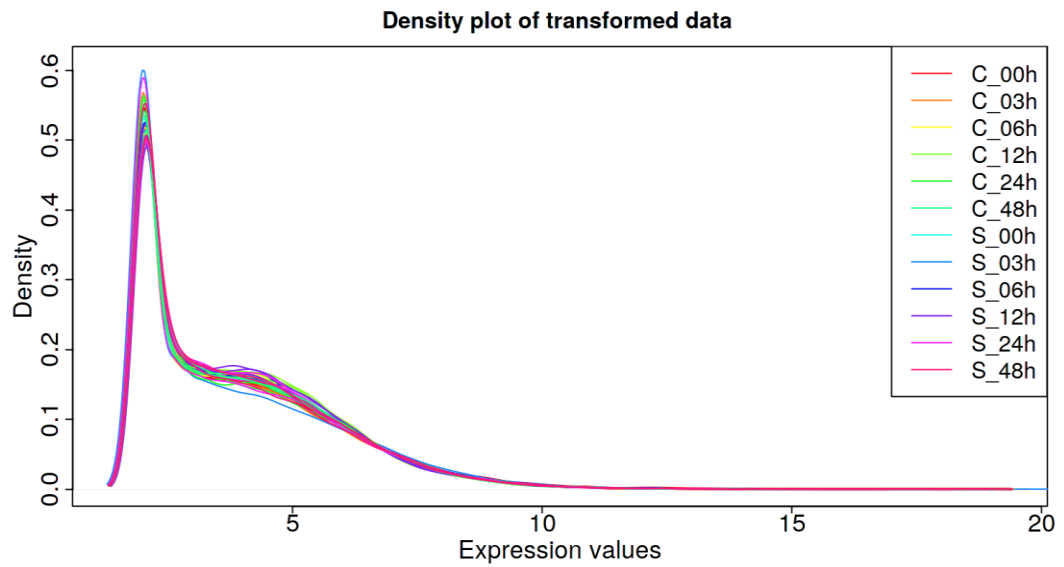
สืบเนื่องจากการเตรียม 3'-Tag RNA-seq libraries นั้นมีการใช้ oligo dT primers และ random primers ในการเตรียม โดยมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาและนับจำนวนของ cDNA ที่สังเคราะห์มาได้ซึ่งเป็นส่วนของปลายด้าน 3'-end ของ mRNA ที่แสดงออกมาแต่ละสาย ภายหลังจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 36 libraries ผู้วิจัยได้ลองตรวจสอบผลของ mapped reads ที่ได้ด้วยโปรแกรม Integrated Genome Browser (IGV) version 2.8.6 (NCI, Maryland, USA) (Robinson et al., 2011) โดยพบว่าผลที่ได้มี gene body coverage อยู่ค่อนข้างไปทางปลายด้าน 3'-end ทั้งหมดดังภาพที่ 15 ซึ่งสรุปได้ว่าการเตรียม cDNA ตามที่ได้ดำเนินการมามีประสิทธิภาพสำหรับการศึกษาทรานสคริปโทมด้วย 3'-Tag-RNA-seq



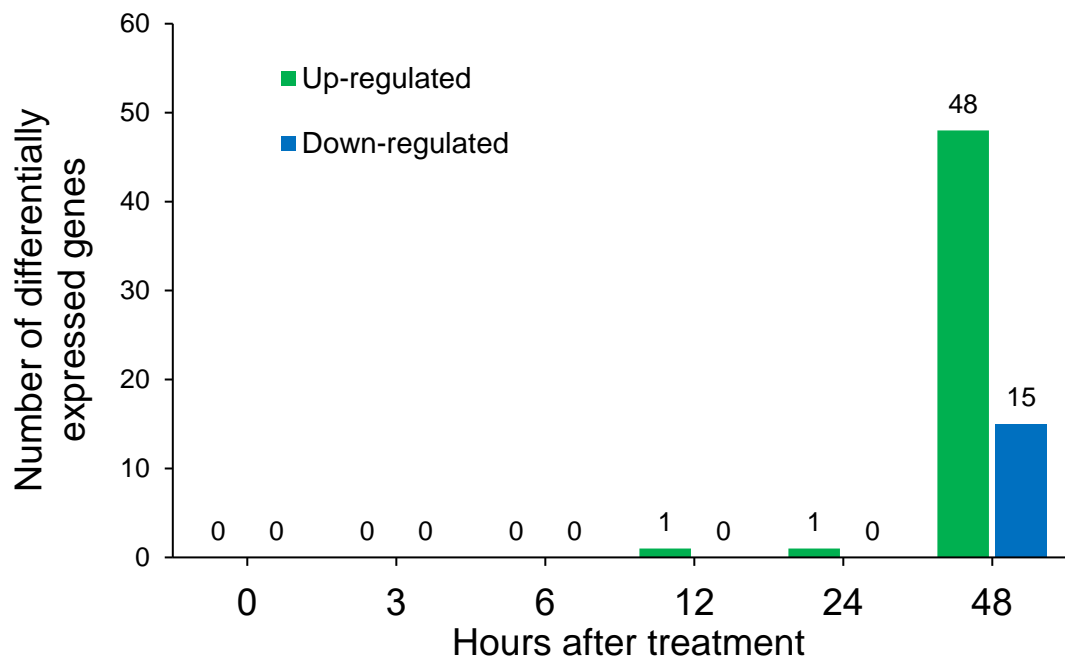
ภาพที่ 15 sequencing reads ของ *OsEf-1α* จากทั้ง 36 libraries ที่ถูก align กับ MSU Rice Genome Annotation Release 7 (MSU 7.0) จากโปรแกรม IGV version 2.8.6

สำหรับการวิเคราะห์หา ยีนที่แสดงออกอย่างแตกต่าง (differentially expressed genes: DEGs) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ระหว่างภาวะควบคุมและภาวะเค็ม ผู้วิจัยได้นำผลปริมาณการ แสดงออกของยีน (count reads per gene) ทุก ๆ library มาวิเคราะห์ผ่าน iDEP.82 โดยเริ่มแรกข้อมูลทั้งหมดจะถูกตัดแปรรูปข้อมูลให้ยีนในแต่ละ library สามารถเปรียบเทียบกัน ได้ด้วย edgeR package (Robinson, McCarthy, and Smyth, 2010) จนได้ค่าระดับการ แสดงออก (expression value) ของยีนแต่ละยีนใน library ต่าง ๆ ที่อยู่ในรูปของ  $\log_2(\text{CPM}+4)$  ซึ่งการศึกษา density plot ของข้อมูลที่มีการตัดแปรรูป (transformed data) ใน แต่ละ library พบว่ามี density เท่ากัน (ดังภาพที่ 16) ต่อมา ยีนที่มีค่า count reads per gene มากกว่า 0.5 counts per million (CPM) อย่างน้อย 1 libraries จะถูกคัดเลือกเพื่อเก็บไว้ โดย พบว่ามีจำนวน 24,502 ยีนที่ผ่านการคัดเลือกซึ่งจะถูกนำไปวิเคราะห์หา DEGs ด้วย DESeq2 platform (Love, Huber, and Anders, 2014) ที่กำหนดให้มีค่า cut-off เท่ากับ 1.5 minimum fold change และ false discovery rate (FDR) เท่ากับ 0.10 โดยผลการวิเคราะห์ พบว่าข้าวพันธุ์หลวงประทานมีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในภาวะควบคุมและภาวะเค็ม เป็นครั้งแรกภายหลังเผชิญกับภาวะเค็มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จำนวน 1 ยีน คือ LOC\_Os03g17790 หรือ OsRCI2-5 (*Rare Cold-Inducible 2-5*) ต่อมาเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงพบว่ามี DEG จำนวน 1 ยีนเช่นกัน คือ LOC\_Os04g56430 หรือ OsRMC (*Root Meander Curling*) โดยข้าวพันธุ์หลวงประทานในภาวะเค็มมีการแสดงออกของยีนทั้งสอง มากกว่าภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสุดท้ายเมื่อข้าวพันธุ์หลวงประทานได้เผชิญกับ ภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามียีนที่แสดงออกในภาวะเค็มแตกต่างจากยีนที่มีการ แสดงออกในภาวะปกติ จำนวน 63 ยีน โดยเป็นยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulated genes) จำนวน 48 ยีน และลดลง (down-regulated genes) จำนวน 15 ยีน โดยยังคงมีการ แสดงออกอย่างแตกต่างของ OsRCI2-5 และ OsRMC ที่ 48 ชั่วโมงหลังจากข้าวพันธุ์หลวง ประทานเผชิญกับภาวะเค็ม ดังภาพที่ 17 ซึ่งผู้วิจัยได้ศึกษา gene ontology (GO) term และ หน้าที่ของ DEGs แต่ละตัวดังปรากฏในตารางที่ 17 และตารางที่ 18 ของภาคผนวก ค.





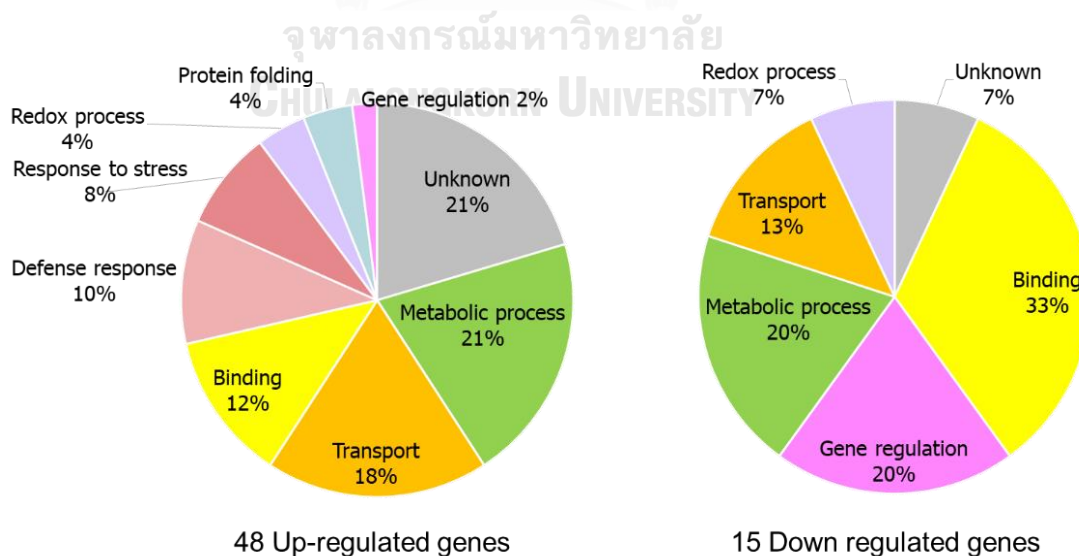
ภาพที่ 16 density plot ของ transformed data จากตัวอย่างจาก library ต่าง ๆ



ภาพที่ 17 จำนวน DEGs ที่วิเคราะห์ได้จาก DESeq2 platform จากข้อมูลทรานสคริปโทมของข้าวพันธุ์หลวงประทานที่เผชิญกับภาวะเค็มที่ 0 3 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค 3'-Tag RNA-seq

#### 4.2.5. การวิเคราะห์ gene set enrichment analysis

ผู้วิจัยได้นำรายชื่อ DEGs ทั้ง 63 ยีน ซึ่งวิเคราะห์ได้จากชุดการทดลองที่ข้าวพันธุ์หลวง ประทานเผชิญกับภาวะเค็มที่ 115 mM NaCl เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยประกอบไปด้วย up-regulated genes จำนวน 48 ยีน และ down-regulated genes จำนวน 15 ยีน มาพิจารณา GO term โดยพบว่าเมื่อข้าวพันธุ์หลวง ประทานเผชิญกับภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะมีการแสดงออกของยีนที่เป็น up-regulated genes ซึ่งมี GO term เกี่ยวข้องกับ metabolic process มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 21 ของ DEGs ทั้งหมด ลำดับถัดมาเป็นยีนที่มี ontology term เกี่ยวข้องกับ transport (18%) binding (12%) defense response (10%) response to stress (8%) redox process (4%) และ protein folding (4%) ตามลำดับ โดยอันดับสุดท้ายซึ่งคิดเป็นร้อยละ 2 ของ up-regulated genes เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น (gene regulation) โดยการวิเคราะห์ครั้งนี้พบว่ามียีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด (unknown) ถึงร้อยละ 21 (ภาพที่ 18 ซ้าย) อย่างไรก็ตามในส่วนของยีนที่เป็น down-regulated genes พบว่ามียีนที่ไม่ทราบหน้าที่เพียงแค่ 7% มีสัดส่วนของยีนที่มี GO term เกี่ยวข้องกับ binding มากที่สุด (33%) โดยมีการแสดงออกที่ลดลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับ gene regulation ถึง 20% ขณะที่ยีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ metabolic process (20%) transport (13%) และ redox process (7%) มีสัดส่วนใกล้เคียงกับ up-regulated genes ยิ่งไปกว่านั้นยังไม่พบยีนที่มี GO term เกี่ยวข้องกับ defense response และ response to stress ใน down-regulated genes ดังภาพที่ 18 ขวา



ภาพที่ 18 สัดส่วนของ GO term ของ up-regulated genes (ซ้าย) down-regulated genes (ขวา) เมื่อข้าวพันธุ์หลวง ประทานเผชิญกับภาวะเค็มที่ 115 mM NaCl เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ในส่วนของการวิเคราะห์ Gene set enrichment analysis ของ DEGs ทั้ง 63 ยีน พบว่ามี GO term ในส่วนของ biological process ที่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จำนวน 92 GO terms โดย 20 GO terms ที่มีค่า p-value สูง 20 อันดับแรก มี GO term เกี่ยวข้องกับการควบคุมทางลบ (negative regulation) ของกระบวนการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในเซลล์ การตอบสนองต่อความเครียด (response to stress) การควบคุมทางลบของ peptidase activity ซึ่งเกี่ยวข้องกับ defense response การควบคุมกระบวนการย่อยสลายของโปรตีน (regulation of proteolysis) การลำเลียงของเหลว (fluid transport) เป็นต้น ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 GO term ในส่วนของ biological process ที่มี p-value สูงที่สุด 20 ลำดับแรก จากการวิเคราะห์ gene set enrichment analysis

p-value	Genes in list	Total genes	Functional Category
0.00019	5	97	Negative regulation of hydrolase activity
0.00115	5	183	Negative regulation of cellular protein metabolic process
0.00115	5	201	Negative regulation of catalytic activity
0.00115	5	203	Negative regulation of molecular function
0.00115	5	183	Negative regulation of protein metabolic process
0.00115	5	210	Regulation of hydrolase activity
0.00115	11	1420	Response to stress
0.00147	7	550	Response to oxygen-containing compound
0.00366	3	63	Negative regulation of peptidase activity
0.00366	3	63	Negative regulation of endopeptidase activity
0.00366	3	65	Negative regulation of proteolysis
0.00366	3	65	Regulation of peptidase activity
0.00366	3	64	Regulation of endopeptidase activity
0.00600	5	347	Negative regulation of nitrogen compound metabolic process
0.00740	5	369	Negative regulation of cellular metabolic process
0.00798	5	401	Response to acid chemical
0.00798	3	104	Regulation of proteolysis
0.00798	5	428	Regulation of cellular protein metabolic process
0.00798	2	24	Fluid transport

#### 4.2.6. การระบุยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการทนเค็ม

จากการศึกษาในข้างต้นพบว่าที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมงภายหลังข้าวพันธุ์หลงประทานเผชิญกับภาวะเค็มมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของ *OsRC12-5* และ *OsRMC* ตามลำดับ โดยที่เวลา 48 ชั่วโมง ยังคงพบที่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของยีนทั้งสองอยู่ และเมื่อพิจารณาหน้าที่ของยีนทั้งสองพบว่า *OsRC12-5* เป็นยีนที่มีการแสดงออกที่เยื่อหุ้มเซลล์ เกี่ยวข้องกับกลไกการทนต่อภาวะแล้ง ภาวะอุณหภูมิต่ำ และภาวะเค็ม จากการศึกษาของ Li et al. (2014) โดยคาดว่าน่าจะทำหน้าที่เป็น membrane protein หรือ signal peptide ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณในเซลล์ (cellular signal transduction) ในขณะที่ *OsRMC* พบว่าเป็นยีนที่ encode ให้ cysteine-rich receptor-like protein kinase ซึ่งแสดงออกอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ การศึกษาก่อนหน้าพบว่าสามารถถูกชักนำให้มีการแสดงออกได้ด้วย JA มีการแสดงออกต่อภาวะเค็มและพบว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการ regulation of iron acquisition ซึ่งการแสดงออกของ *OsRMC* นี้สามารถถูกควบคุมได้ด้วย OsEREBP2 ซึ่งเป็น transcription factor (TF) ในกลุ่ม APETALA2/ethylene response factor (AP2/ERF) ที่จะตอบสนองต่อภาวะที่อุณหภูมิต่ำ ความแห้งแล้ง ความเค็ม และกรดแอบไซซิก (ABA) (Jiang et al., 2007; Zhang et al., 2009; Serra et al., 2013; Yang et al., 2013) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงระบุว่า *OsRC12-5* และ *OsRMC* เป็นยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการทนเค็มของข้าวพันธุ์หลงประทานซึ่งเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่ถูกประเมินว่ามีความสามารถในการทนเค็มใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ Pokkali ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์มาตรฐานทนเค็มจากการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อความเค็มที่ดำเนินการมาก่อนหน้า

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.3. การวิเคราะห์โครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (gene co-expression network)

จากการคำนวณ partial dynamical correlation coefficient (PDCC) ของ DEGs แต่ละคู่ จาก normalized expression values ของ DEGs ต่าง ๆ จำนวน 63 ยีน จากตัวอย่างข้าวพันธุ์หลงประทานที่เผชิญกับภาวะเค็มเป็นเวลา 0 3 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง ช่วงเวลาละ 3 ชั่วโมง และปรับเปลี่ยนค่า cut-off thresholds ให้มีค่าต่าง ๆ เพื่อคงค่าความสัมพันธ์ของยีนคู่ที่มีค่าสัมบูรณ์ของ partial dynamical correlation coefficient มากกว่าค่า cut-off threshold ไว้ และตัดเส้นเชื่อมของคู่ยีนที่มีค่าสัมบูรณ์ดังกล่าวต่ำกว่า threshold ออก

จากการกำหนดค่า cut-off threshold ไว้ที่ 0.5 0.6 0.7 และ 0.8 ทำให้ได้โครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (gene co-expression network: GCN) ดังภาพที่ 19-22 ตามลำดับ โดยตัวอักษรสีดำของโนหนดแสดง DEGs ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อข้าวเผชิญกับความเค็ม (up-regulated genes) และตัวอักษรสีแดงแสดง DEGs ที่มีการแสดงออกลดลงเมื่อข้าวเผชิญกับความ

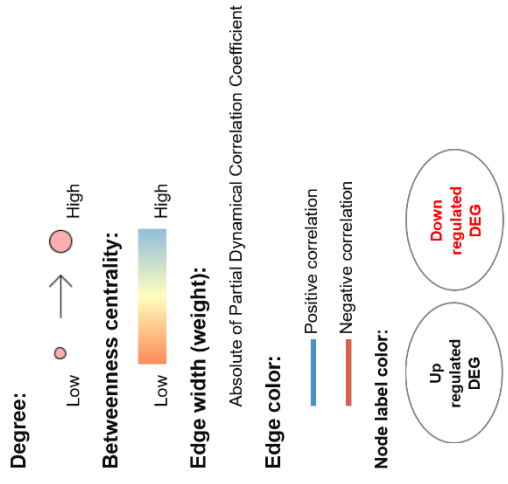
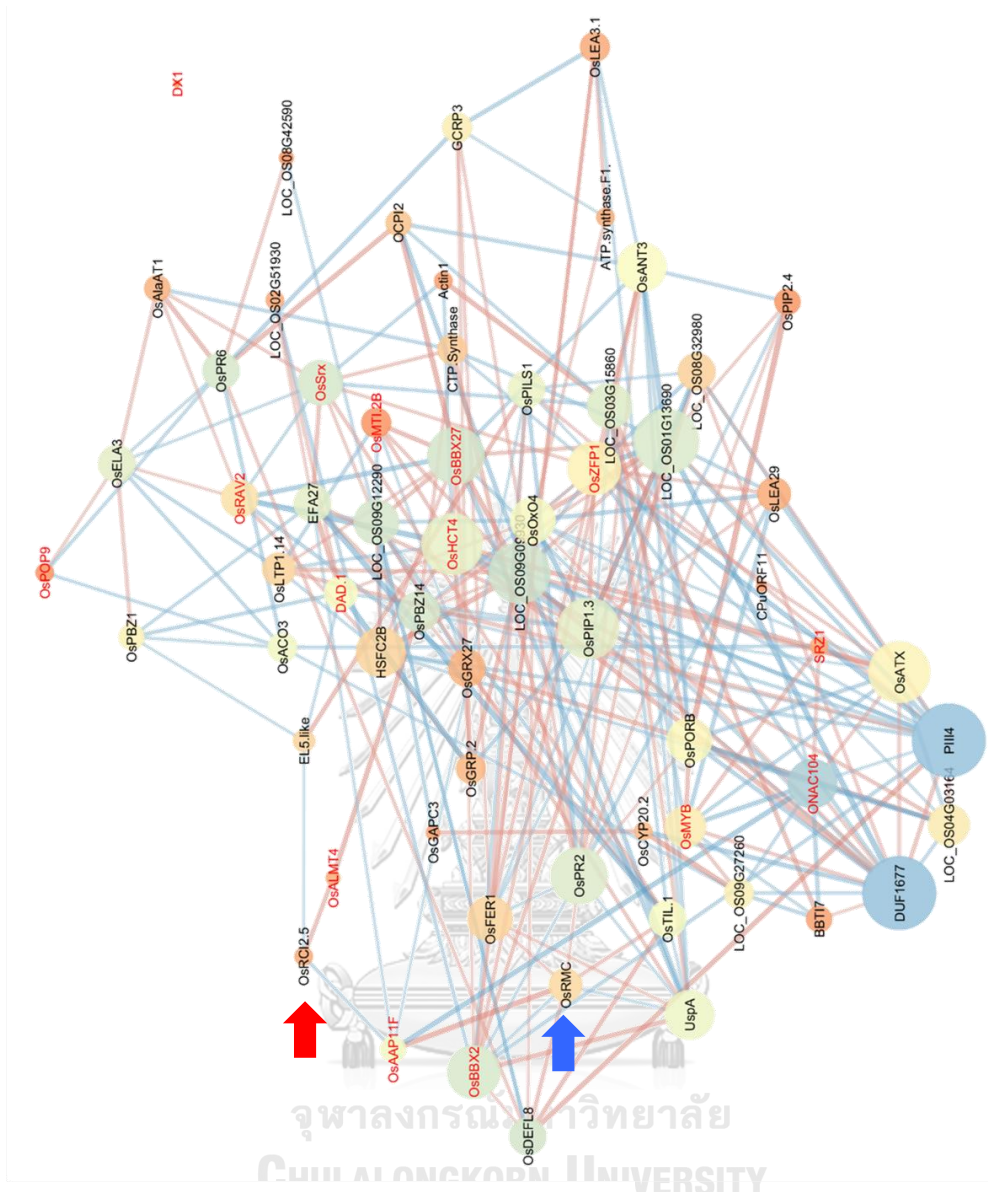
เค็ม (down-regulated genes) ขนาดของโหนดแสดงค่า degree สีของโหนดแสดงค่า betweenness centrality ยีนที่มีการแสดงออกพร้อม (co-expression) จะถูกเชื่อมด้วยเส้นเชื่อม (edge) โดยที่ความหนาของเส้นเชื่อมมาจาก ค่าสัมบูรณ์ของการวัดการแสดงออกพร้อม (co-expression measure) สีของเส้นเชื่อมแสดงทิศทางความสัมพันธ์ที่ได้จากการวัดการแสดงออกพร้อมของโหนดทั้งสอง ซึ่งแต่ละโครงข่ายที่ได้พบว่ามีรายชื่อของยีนที่มีค่า degree และ betweenness centrality สูงสุดแตกต่างกัน ดังตารางที่ 5 และเมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์โครงข่าย (network analysis) พบว่า ค่า network density ค่า clustering coefficient และค่าเฉลี่ยของ neighbor (average number of neighbors) ในแต่ละโครงข่ายมีค่าลดลงหากมีการเพิ่มค่า cut-off thresholds ให้สูงขึ้น นอกจากนี้หากพิจารณาที่จำนวน isolated nodes และจำนวนของ sub-graphs ในแต่ละโครงข่ายแล้ว พบว่าค่าจะแปรผันตรงตามค่า cut-off thresholds ที่มากขึ้น (ตารางที่ 5) เนื่องจากโครงข่ายที่ได้มีจำนวนเส้นเชื่อม (edge) ระหว่างโหนดโหนด (node) น้อย การเกาะกลุ่มในโครงข่ายจึงเกิดขึ้นน้อย

สำหรับการศึกษายีนที่มีการแสดงออกพร้อมกับ *OsRC12-5* และ *OsRMC* พบว่าหากลดค่า cut-off thresholds ลง ยีนทั้งสองจะมีค่า degree เพิ่มขึ้น กล่าวคือพบความสัมพันธ์หรือมีการแสดงออกพร้อมกับยีนอื่น ๆ มากขึ้น (ดังตารางที่ 5) โดยพบว่า *OsRC12-5* มีการแสดงออกพร้อมกับ *OsAAP11F* (*Amino Acid Permease 11F*) หรือ *LOC\_Os05g34980* (PDCC = 0.610) และ *EL5-like* (*E3 ubiquitin-protein ligase EL5-like*) หรือ *LOC\_Os05g29710* (PDCC = 0.612) ในโครงข่ายที่ค่า cut-off threshold เท่ากับ 0.6 แต่เมื่อลดค่านี้อลงให้เท่ากับ 0.5 พบว่า *OsRC12-5* จะแสดงออกพร้อมกับยีนในข้างต้นและ *OsALMT4* (*Aluminum-activated Malate Transporter 4*) หรือ *LOC\_Os01g12210* (PDCC = -0.542) ร่วมด้วย ในขณะที่ *OsRMC* ในโครงข่ายที่มีค่า cut-off threshold เท่ากับ 0.6 พบว่ามีการแสดงออกพร้อมกับยีนอื่น ๆ จำนวน 4 ยีน ได้แก่ 1. *OsBBX2* (*B-Box-containing protein 2*) หรือ *LOC\_Os02g07930* (PDCC = 0.691) 2. *UspA* (*Universal stress protein A domain containing protein*) หรือ *LOC\_Os01g32780* (PDCC = -0.634) 3. *OsFER1* (*Ferritin 1*) หรือ *LOC\_Os11g01530* (PDCC = 0.624) และ 4. *OsDEFL8* (*Defensin-like 8*) หรือ *LOC\_Os03g03810* (PDCC = -0.612) และเมื่อลดค่า cut-off threshold ให้มีค่าเท่ากับ 0.5 จะพบว่า *OsRMC* มีการแสดงออกพร้อมกับยีนอื่น ๆ จำนวน 7 ยีน ประกอบด้วย 4 ยีนในข้างต้นและอีก 3 ยีน ได้แก่ 1. *OsAAP11F* เช่นเดียวกับ *OsRC12-5* (PDCC = 0.531) 2. *OsPR2* (*Pathogenesis-related gene 2*) หรือ *LOC\_Os05g31140* (PDCC = 0.523) และ 3. *OsTIL-1* (*Temperature-induced lipocalin-1*) หรือ *LOC\_Os02g39930* (PDCC = 0.521) ดังภาพที่ 19 และ 20 โดยที่เมื่อเพิ่มค่า cut-off threshold ให้มีค่าเท่ากับ 0.7 และ 0.8 จะไม่สามารถ

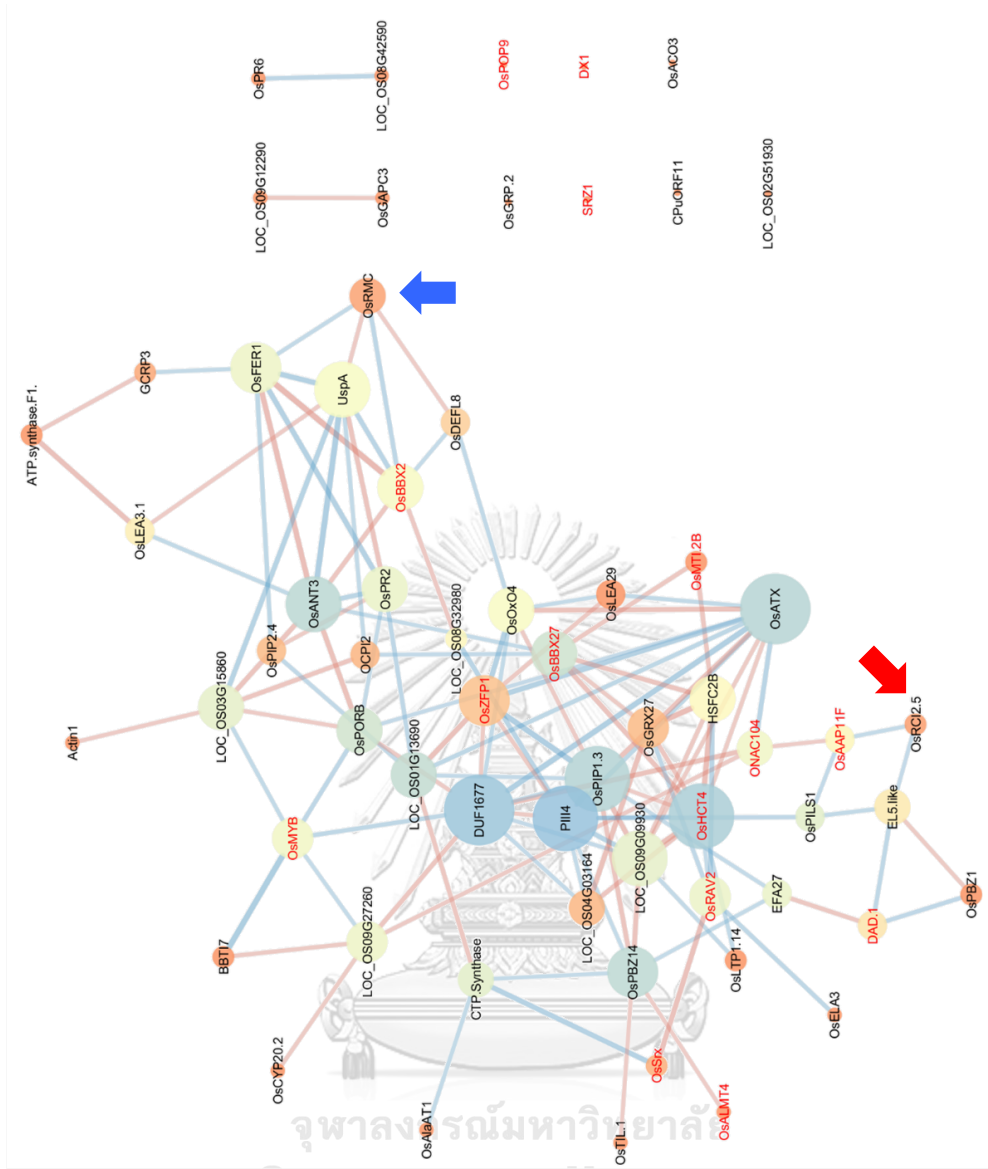
ศึกษาความสัมพันธ์ของ *OsRC12-5* และ *OsRMC* กับยีนอื่น ๆ ได้เลย เนื่องจากผลการวัดการ แสดงออกรวมของยีนทั้งสองโดยใช้ PDCC มีค่าสัมบูรณ์ไม่ถึง 0.7 และ 0.8

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ GCN ของ DEGs จำนวน 63 ยีน จากข้อมูล time-series transcriptome ของข้าวพันธุ์หลวงประทานที่ cut-off thresholds ค่าต่าง ๆ

Network analysis	cut-off thresholds			
	0.5	0.6	0.7	0.8
Network density	0.125	0.061	0.018	0.005
Clustering coefficient	0.394	0.281	0.178	0.037
Avg. number of neighbors	7.778	3.810	1.143	0.286
Isolated nodes	1	7	33	50
Number of sub-graphs	1	3	4	5
Degree of <i>OsRMC</i>	7	4	0	0
Betweenness of <i>OsRMC</i>	0.015	0.005	0	0
Degree of <i>OsRC12-5</i>	3	2	0	0
Betweenness of <i>OsRC12-5</i>	0.004	0.003	0	0
Top 3 Degree	1. <i>PIII4</i> 1. <i>DUF1677</i> 2. <i>LOC_Os01g13690</i> 3. <i>LOC_Os09g09930</i> 3. <i>OsPIP1.3</i> 3. <i>OsATX</i> 3. <i>OsHCT4</i>	1. <i>OsATX</i> 1. <i>DUF1677</i> 2. <i>OsPIP1.3</i> 2. <i>PIII4</i> 2. <i>OsHCT4</i> 3. <i>UspA</i> 3. <i>OsANT3</i> 3. <i>LOC_Os09g09930</i>	1. <i>UspA</i> 1. <i>OsATX</i> 1. <i>OsANT3</i> 2. <i>OsPIP1.3</i> 2. <i>HSFC2B</i> 2. <i>LOC_Os09g09930</i> 2. <i>OsFER1</i> 3. <i>OsZFP1</i> 3. <i>OsPR2</i> 3. <i>OsHCT4</i>	1. <i>OsFER1</i> 2. <i>UspA</i> 2. <i>OsANT3</i> 2. <i>OsZFP1</i> 3. <i>BBT17</i> 3. <i>OsATX</i> 3. <i>OsPIP1.3</i> 3. <i>OsOxO4</i> 3. <i>DUF1677</i> 3. <i>HSFC2B</i> 3. <i>OsGRX27</i> 3. <i>OsBBX2</i> 3. <i>OsMYB</i>
Top 3 Betweenness	<i>DUF1677</i> <i>PIII4</i> <i>ONAC104</i>	<i>PIII4</i> <i>DUF1677</i> <i>OsHCT4</i>	<i>LOC_Os09g09930</i> <i>OsHCT4</i> <i>OsPIP1.3</i>	<i>OsZFP1</i> <i>OsFER1</i> <i>UspA</i>



ภาพที่ 19 GCN ของ DEGs จำนวน 63 ยีน จากข้อมูล time-series transcriptome ของข้าวพันธุ์หลวงประมาณ (cut-off threshold = 0.5, ลูกศรสีแดง และลูกศรสีน้ำเงินแสดงโหนดของ OsRQ2-5 และ OsRMC ตามลำดับ)



**Degree:**  Low  High

**Betweenness centrality:**  Low  High

**Edge width (weight):** Absolute of Partial Dynamical Correlation Coefficient

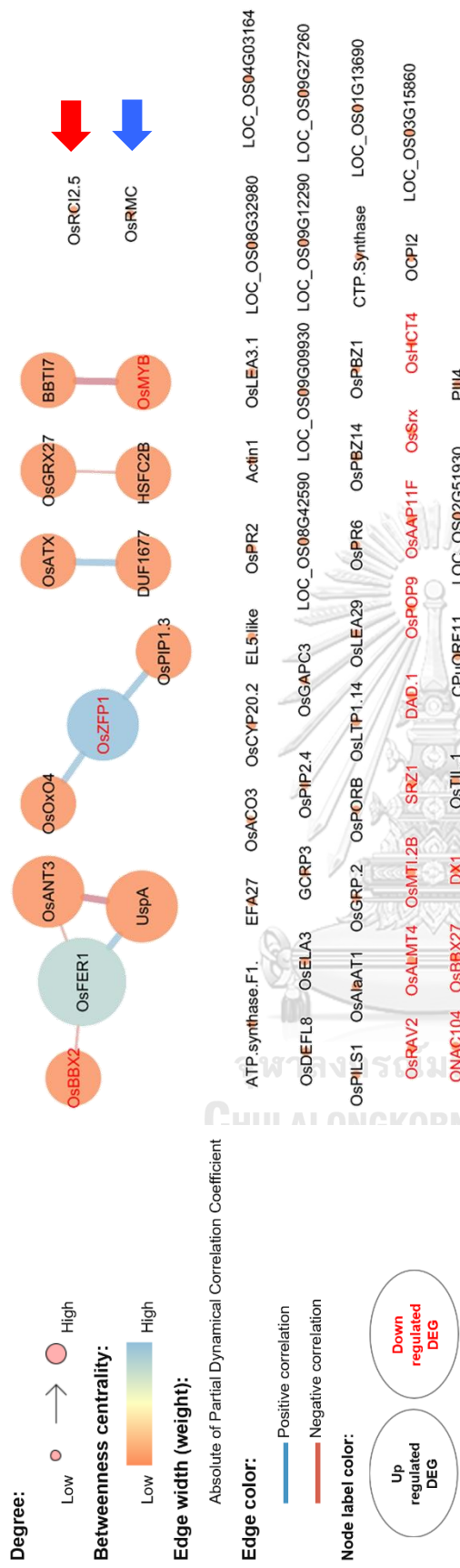
**Edge color:**  Positive correlation  Negative correlation

**Node label color:** Up regulated DEG Down regulated DEG

ภาพที่ 20 GCN ของ DEGs จำนวน 63 ยีน จากข้อมูล time-series transcriptome ของข้าวพันธุ์หลวงประมาณ (cut-off threshold = 0.6, ถูกครีตีแดง และลูกศรสีน้ำเงินแสดงโหนดของ OsRMI2-5 และ OsRMI2 ตามลำดับ)







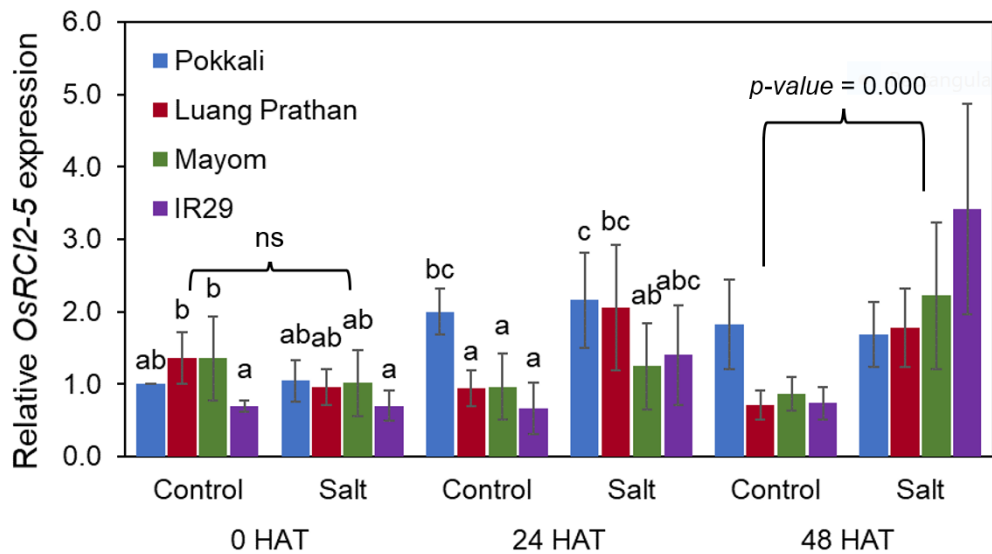
ภาพที่ 22 GCN ของ DEGs จำนวน 63 ยีน จากข้อมูล time-series transcriptome ของข้าวพันธุ์หลงประทาน (cut-off threshold = 0.8, ลูกครีสีแดง และลูกครีน้ำเงินแสดงโหนดของ OsRC12-5 และ OsRMC ตามลำดับ)

#### 4.4. การศึกษาเพื่อยืนยันผลกระทบของภาวะเค็มที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่ระบุได้

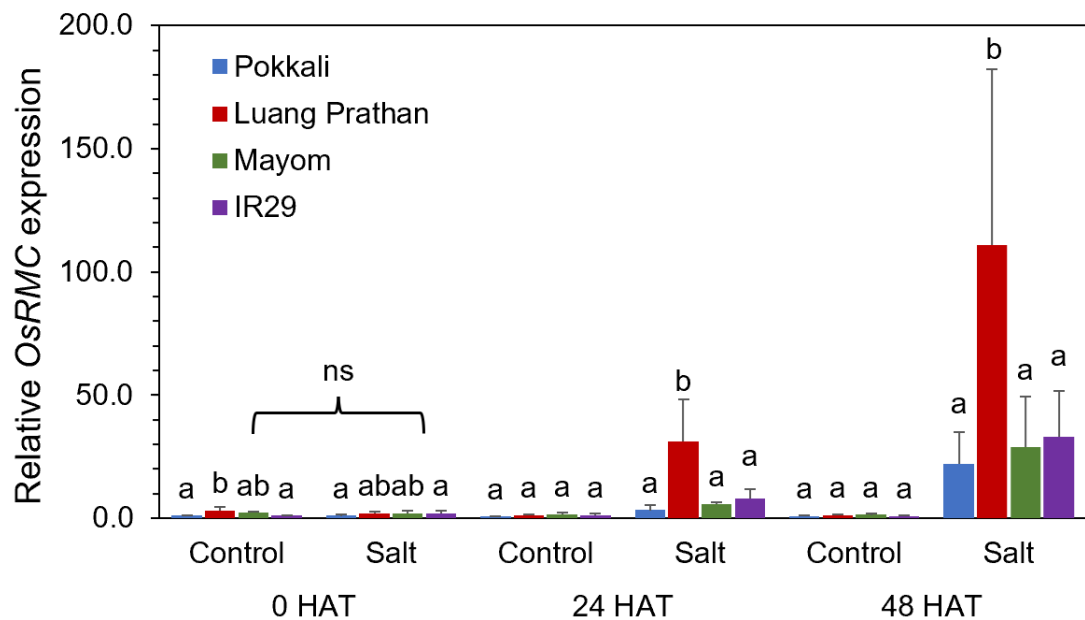
ผู้วิจัยได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *OsRC12-5* และ *OsRMC* โดยมีจุดประสงค์เพื่อยืนยันผลการศึกษาทรานสคริปโทมของข้าวพันธุ์หลวงประทานด้วยวิธี 3' Tag RNA-seq และยืนยันผลกระทบของภาวะเค็มที่มีต่อการแสดงออกของยีนทั้งสองในข้าวพันธุ์หลวงประทานเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ Pokkali มะยม และ IR29 ซึ่งมีความสามารถในการทนต่อภาวะเค็มได้ต่างกัน

ผลการศึกษาพบว่าต้นกล้าข้าวอายุ 20 วันพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อเริ่มทดลองจะมีการแสดงออกของ *OsRC12-5* ในชุดการทดลองที่เผชิญกับภาวะปกติและภาวะเค็มเท่ากันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยข้าวพันธุ์ IR29 มีการแสดงออกของ *OsRC12-5* ต่ำที่สุดทั้งสองภาวะ (ภาพที่ 23) และเมื่อการทดลองดำเนินไปแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าข้าวพันธุ์หลวงประทานมีการแสดงออกของ *OsRC12-5* มากขึ้นเมื่อเผชิญกับภาวะเค็มซึ่งมีค่าเท่ากับข้าวพันธุ์ Pokkali ในขณะที่ข้าวพันธุ์มะยมและ IR29 มีการแสดงออกของ *OsRC12-5* ต่ำและไม่แตกต่างกันในสองภาวะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ภาพที่ 23) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อข้าวทั้ง 4 พันธุ์เผชิญกับภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่ามีปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยหลักทั้งสองคือ พันธุ์ข้าวและภาวะที่ข้าวเจริญอยู่ซึ่งทำให้การวิเคราะห์สถิติพบเพียงความแตกต่างในการแสดงออกของ *OsRC12-5* ในข้าวที่เจริญอยู่ภาวะต่างกันและไม่พบความแตกต่างในข้าวแต่ละพันธุ์ซึ่งหากพิจารณาจากกราฟจะพบว่า *OsRC12-5* เป็นยีนที่ข้าวจะแสดงออกมากขึ้นหากเผชิญอยู่กับภาวะเค็มยกเว้นข้าวพันธุ์ Pokkali ที่ทั้งสองภาวะแสดงออกเท่ากัน โดยมี relative gene expression ratio อยู่ที่  $1.682 \pm 0.444$  หากเทียบกับการแสดงออกในข้าวพันธุ์ Pokkali ที่ภาวะปกติเมื่อเริ่มต้นการทดลอง ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์หลวงประทานที่มี relative gene expression ratio อยู่ที่  $1.776 \pm 0.535$  ในขณะที่ข้าวพันธุ์มะยม และ IR29 มีค่าสูงถึง  $2.224 \pm 1.012$  และ  $3.416 \pm 1.458$  ตามลำดับ ดังตารางที่ 14 ภาคผนวก ข.

สำหรับการแสดงออกของ *OsRMC* พบว่าเมื่อเริ่มทดลอง ข้าวแต่ละพันธุ์มีการแสดงออกของ *OsRMC* ได้ต่างกันโดยข้าวพันธุ์หลวงประทานมีแนวโน้มว่าจะมีการแสดงออกสูงที่สุด แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบความแตกต่างระหว่างภาวะทั้งสองในข้าวทุกพันธุ์ (ภาพที่ 24) และปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยหลักทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 15 ภาคผนวก ข.) แต่เมื่อข้าวพันธุ์ต่าง ๆ เผชิญกับภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเป็นต้นไป ผู้วิจัยพบว่ามีปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยหลักทั้งสอง และปัจจัยทั้งสองก่อให้เกิดความแตกต่างในการแสดงออกของ *OsRMC* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ  $p < 0.05$  โดยพบว่าข้าวทุกพันธุ์เมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะมีการแสดงออกของ *OsRMC* เพิ่มขึ้นและจะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอีกหากยังคงได้รับภาวะเค็มต่อไปจนถึง 48 ชั่วโมง ซึ่งข้าวพันธุ์หลวงประทานมีการแสดงออกของ *OsRMC* มากกว่าข้าวพันธุ์อื่นอย่างโดดเด่น ดังภาพที่ 24



ภาพที่ 23 การแสดงออกของยีน *OsRC12-5* ในข้าวพันธุ์ Pokkali หลวงประทาน (Luang Prathan) มะยม (Mayom) และ IR29 ที่มีอายุ 20 วันแล้วเผชิญกับความเค็มที่ 115 mM NaCl เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง (error bar =  $\pm$  SE, block = 4, ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างแสดงค่าเฉลี่ยที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, ns = ไม่แตกต่าง)



ภาพที่ 24 การแสดงออกของยีน *OsRMC* ในข้าวพันธุ์ Pokkali หลวงประทาน (Luang Prathan) มะยม (Mayom) และ IR29 ที่มีอายุ 20 วันแล้วเผชิญกับความเค็มที่ 115 mM NaCl เป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง (error bar =  $\pm$  SE, block = 4, ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างแสดงค่าเฉลี่ยที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, ns = ไม่แตกต่างกัน)

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการศึกษา

#### 5.1. การคัดเลือกข้าวพันธุ์พื้นเมืองทนเค็มจากลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็ม

จากการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มที่ 115 mM NaCl ของกล้าข้าวอายุ 14 วัน จำนวน 12 พันธุ์ โดยเบื้องต้นจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติและจัดกลุ่มตามการวิเคราะห์กลุ่ม (clustering analysis) พบว่าข้าวพันธุ์หลวงประทานเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีความสามารถในการทนต่อภาวะเค็มมากที่สุดซึ่งใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ Pokkali ที่เป็นข้าวพันธุ์ทนเค็มมาตรฐาน ในขณะที่ข้าวพันธุ์มะยมเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีลักษณะอ่อนแอที่สุดเมื่อเผชิญกับภาวะเค็มเช่นเดียวกับข้าวพันธุ์ IR29 ที่เป็นพันธุ์ข้าวไม่ทนเค็มมาตรฐาน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของนพคุณ คุณผลวัฒนา (2558) ที่ดำเนินการศึกษาและจัดกลุ่มข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยตามลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มที่ 115 mM NaCl เช่นเดียวกัน โดยพบว่าข้าวพันธุ์หลวงประทานถูกจัดกลุ่มให้เป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีความสามารถในการทนเค็มสูง

จากการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มเพิ่มเติมด้วยการทำการทดลองอีกครั้งพบว่าปัจจัยที่ทำให้ข้าวพันธุ์หลวงประทานและ Pokkali มีความสามารถในการทนเค็มคือการคงความสามารถในการรักษาคุณภาพของน้ำภายในเซลล์ไว้ได้เนื่องจากเมื่อเผชิญกับภาวะเค็มข้าวทั้งสองมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำสัมพัทธ์ไม่มากเท่าข้าวพันธุ์อื่น ๆ (SI\_%RWC มีค่าใกล้เคียง 1 มากกว่าข้าวพันธุ์มะยมและ IR29) ซึ่งความสามารถในการรักษาภาวะอรัญดุลของน้ำภายในเซลล์ถือว่ามีมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อกลไกการทนเค็มในพืชซึ่งมักแสดงอาการเครียดต่อภาวะแล้งอันเป็นความเครียดออสโมติก (osmotic stress) และส่งผลต่อเสถียรภาพของกระบวนการทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ (Zhu, 2007; Yadav et al., 2011; Liang et al., 2018) ซึ่งข้าวพันธุ์หลวงประทานและ Pokkali ยังคงมีความสามารถเหล่านี้อยู่ เนื่องจากเมื่อเผชิญอยู่ในภาวะเค็มข้าวทั้งสองยังมีกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงได้ปกติ มีรักษาปริมาณ chlorophyll ซึ่งพิจารณาได้จากค่าการคงความเขียวของใบ และยังรักษาประสิทธิภาพของระบบแสง II (PSII efficiency) ในการเกิด photochemical reaction ได้ ซึ่งพิจารณาได้จากค่าดัชนีเสถียรภาพของค่า chlorophyll fluorescence (SI\_Fv/Fm) (Jamil et al., 2007) ยิ่งไปกว่านั้น การที่ข้าวพันธุ์หลวงประทานและ Pokkali มีความสามารถในการรักษาดัชนีเสถียรภาพของเสถียรภาพเยื่อหุ้มเซลล์ (SI\_%CMS) อนุมานได้ว่า membrane protein ซึ่งส่วนใหญ่เป็น channel protein และโปรตีนที่ทำงานเป็นตัวรับและส่งสัญญาณในกระบวนการส่งสัญญาณในเซลล์ (cellular signal transduction) สามารถทำงานได้และทำให้ข้าวพันธุ์ทนเค็มทั้งสองสามารถเปลี่ยนแปลงการ

แสดงออกของยีนเพื่อรับมือกับความเครียดจากภาวะเค็มได้ โดยบรรเทา แก้ไข หรือหลีกเลี่ยงที่จะประสบกับความเครียดออสโมติก ความเป็นพิษจากไอออน (ion toxicity) ความไม่สมดุลของธาตุอาหาร (plant nutrient imbalance) และความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ที่เกิดขึ้น (Tripathy et al., 2000; Babu et al., 2004) โดยทำยที่สุดข้าวพันธุ์ทนเค็มจะยังคงมีศักยภาพในการเจริญเติบโตได้ดีในภาวะเค็ม ซึ่งการทดลองครั้งข้าวพันธุ์หลวงประทานและ Pokkali แสดงให้เห็นเป็นที่ชัดเจนว่าสามารถรักษาเสถียรภาพของการเจริญเติบโตแม้จะเผชิญกับภาวะเค็มได้ โดยมีค่าดัชนีเสถียรภาพของน้ำหนัสด (SI\_FW) และดัชนีเสถียรภาพของน้ำหนักแห้ง (SI\_DW) ที่แสดงให้เห็นเป็นที่ประจักษ์

สำหรับความแตกต่างระหว่างอายุของต้นกล้าข้าวที่เผชิญกับความเค็มนั้นพบว่าไม่ทำให้ความแตกต่างของความสามารถในการทนเค็มระหว่างข้าวทั้ง 4 พันธุ์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมระหว่างการทดลองในต้นกล้าข้าวอายุ 14 วัน และ 20 วัน โดยพบว่าข้าวพันธุ์หลวงประทานและ Pokkali มีความสามารถในการทนเค็มได้ดีกว่าข้าวพันธุ์มะยมและ IR29 ซึ่งเห็นได้ชัดจากค่า SI\_SIS แต่อย่างไรก็ตามหากพิจารณาที่ค่า SI\_SPAD และ SI\_Fv/Fm จะพบว่าการทดลองกับข้าวที่เริ่มแรกอายุ 20 วันจะเห็นความแตกต่างของ SI\_SPAD ได้ในวันที่ 3 ซึ่งเร็วกว่า ขณะที่ค่า SI\_Fv/Fm จะเห็นความแตกต่างในวันที่ 12 ซึ่งช้ากว่าการทดลองในข้าวอายุ 14 วัน โดยเป็นผลอันเนื่องมาจากระยะของพัฒนาการที่ต่างกันของกล้าข้าวในการทดลองทั้งสอง กล้าข้าวที่อายุ 20 วัน ใบอ่อนที่สุดที่ขยายขนาดเต็มที่ (youngest fully expanded leaf) ที่ใช้วัดค่า SPAD มีอายุมากกว่าใบจากกล้าข้าวในอายุ 14 วัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Mitsuya et al. (2003) ที่พบว่าความเสียหายที่เกิดจากภาวะเค็มจะมากขึ้นตามอายุของพืช ซึ่งใบข้าวที่อายุมากกว่าจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงเร็วกว่าใบข้าวที่อายุน้อย เนื่องจากใบข้าวที่อายุมากจะมีปริมาณของสารอนุมูลอิสระสูงแม้ว่าอยู่ในภาวะปกติ ทำให้เนื้อเยื่อในส่วนนั้นได้รับความเครียดออกซิเดชันรุนแรงกว่า นอกจากนี้สำหรับค่า SI\_Fv/Fm ที่ไม่พบความแตกต่างในวันที่ 9 เป็นผลมาจากความแปรปรวนที่สูงในข้าวพันธุ์มะยมและ IR29 ที่พบว่าใบเต็มที่ที่อายุน้อยที่สุดมีอาการเครียดในบาง block ของการทดลองเท่านั้น การทดสอบสถิติจึงยังไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  ในวันที่ 9 แต่เมื่อการทดลองดำเนินไปจนถึงวันที่ 12 ใบอ่อนที่สุดที่ขยายขนาดเต็มที่ที่ใช้วัดมาจากใบอ่อนที่เกิดขึ้นใหม่ในข้าวพันธุ์มะยมในขณะที่ข้าวพันธุ์ IR29 ไม่มีใบใหม่เกิดขึ้น หลังจากได้รับภาวะเค็มและมีอาการเครียดจนตายเกือบทั้งต้นอย่างเห็นได้ชัด การทดสอบสถิติสำหรับค่า SI\_Fv/Fm จึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เนื่องจากการศึกษาในกล้าข้าวอายุ 20 วัน ให้ผลในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาในกล้าข้าวอายุ 14 วัน ดังนั้นการศึกษาทรานสคริปโทมและการแสดงออกของยีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการทนเค็มเพื่อยืนยันผลกระทบของภาวะเค็มด้วยวิธี quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) ในข้าวทั้ง 4 พันธุ์ จึงจะดำเนินการในกล้าข้าวอายุ 20 วัน เพื่อหลีกเลี่ยงสภาพอากาศที่

แปรปรวนในขณะดำเนินการทดลอง รวมถึงให้สอดคล้องกับอายุของต้นกล้าข้าวที่เกษตรกรใช้กล้าข้าว อายุ 20-30 วันในการปักดำ (กรมการข้าว) อันจะเป็นองค์ความรู้สำหรับปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความสามารถในการทนเค็มได้ในอนาคต โดยการศึกษาทรานสคริปโทมนั้นจะดำเนินการในข้าวพันธุ์ หลวงประทานเนื่องจากเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีความสามารถในการทนต่อภาวะเค็มมากที่สุด

## 5.2. การศึกษา gene expression profiles ของข้าวพันธุ์ที่ทนเค็มเพื่อเข้าใจกลไกการตอบสนองของพืชต่อภาวะเค็ม

เพื่อที่จะศึกษา gene expression profiles ของข้าวพันธุ์หลวงประทานและเข้าใจกลไกการตอบสนองของข้าวพันธุ์หลวงประทานต่อภาวะเค็ม ผู้วิจัยได้นำตัวอย่างกล้าข้าวส่วนเหนือดินของข้าวพันธุ์หลวงประทานที่อายุ 20 วันหลังจากได้รับภาวะเค็มที่ 0 3 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง ทั้งสองภาวะ จำนวนอย่างน้อย 3 ซ้ำ ไปใช้ในการสกัด RNA เพื่อการศึกษา transcriptome โดยการสร้าง 3'-Tag RNA-seq libraries จำนวน 36 libraries เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์หายินที่แสดงออกแตกต่างกัน (differentially expressed gene: DEG) ซึ่งพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ (sequencing reads) เป็นส่วนทางด้าน 3'-end ของยีนที่ map ได้กับฐานข้อมูลจีโนม จึงเป็นที่มั่นใจว่าการเตรียม 3'-Tag RNA-seq libraries จำนวน 36 libraries ในครั้งนี้มีประสิทธิภาพ

ในส่วนของการวิเคราะห์หายินที่แสดงออกอย่างแตกต่างกันนั้นผู้วิจัยได้ดำเนินการโดยวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างภาวะควบคุมและภาวะเค็มที่ช่วงเวลาต่าง ๆ จำนวน 6 ช่วงเวลา ซึ่งได้ผลลัพธ์เป็นจำนวน DEGs ที่ค่อนข้างน้อยและสอดคล้องกับ Ma et al. (2019) ที่รายงานว่าการศึกษาวิเคราะห์หายินที่แสดงออกอย่างแตกต่างจากการศึกษาทรานสคริปโทมด้วย 3'-Tag RNA-seq จะให้ผลลัพธ์ที่ค่อนข้างแม่นยำและไม่มี false positive ซึ่งจะทำให้ได้ DEGs จำนวนที่ต่ำกว่าการวิเคราะห์ transcriptome แบบดั้งเดิม

### 5.2.1. การเปลี่ยนแปลงที่ 12 ชั่วโมง หลังจากเผชิญกับภาวะเค็ม

หลังจากติดตามการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกิดขึ้นภายหลังต้นกล้าข้าวพันธุ์หลวงประทานอายุ 20 วันเผชิญกับภาวะเค็มเป็นเวลา 0 3 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค 3'-tag RNA-seq และวิเคราะห์หายินที่แสดงออกอย่างแตกต่างระหว่างภาวะควบคุมและภาวะเค็ม จากการวิเคราะห์พบว่ามี DEG ปรากฏเป็นครั้งแรกเมื่อการทดลองดำเนินไปแล้วเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จำนวน 1 ยีน คือ *OsRCI2-5 (Rare Cold-Inducible 2-5)* หรือ *LOC\_Os03g17790* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yeo, Bhawe, and San Hwang (2018) ที่พบว่าข้าวพันธุ์ Bajong ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองของประเทศมาเลเซียที่มีความสามารถในการทนเค็มเมื่อต้นกล้าอายุ 14 วัน เผชิญกับภาวะเค็มที่ 100 mM NaCl เป็นเวลา 6 ชั่วโมงจะมีการ

แสดงออกของ *OsRC12-5* เพิ่มมากขึ้น โดย Li et al. (2014) รายงานการศึกษาเกี่ยวกับ *OsRC12-5* ว่าเป็นยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดจากภาวะแล้ง (drought stress) ความเครียดเนื่องจากอุณหภูมิต่ำ (cold stress) และความเครียดจากภาวะเค็ม (salt stress) โดยสามารถ encode ให้โปรตีนที่มี 2 transmembrane domain จึงพบการแสดงออกบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) และคาดว่ามีส่วนที่เป็น signal peptide ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณในเซลล์เพื่อตอบสนองต่อภาวะแล้ง โดยหากทำให้ *OsRC12-5* มีการแสดงออกมากขึ้น จะยิ่งส่งเสริมให้ข้าวมีความสามารถในการทนต่อภาวะแล้งมากขึ้น และมีแนวโน้มที่จะให้ผลในลักษณะเดียวกันกับความสามารถในการทนต่อภาวะเค็ม เนื่องจากยีนที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มหลายยีนมีการตอบสนองต่อภาวะแล้งด้วยเพราะกลไกการตอบสนองต่อภาวะแล้งและภาวะเค็มมีการควบคุมการทำงานบางส่วนร่วมกันในพืช (Nakashima, Yamaguchi-Shinozaki, and Shinozaki, 2014) จึงเป็นไปได้ที่ *OsRC12-5* จะเป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้ข้าวพันธุ์หลวงประทานมีความสามารถในการทนเค็ม เนื่องจากเป็นยีนที่แสดงออกมาในช่วงแรก ๆ และมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณในเซลล์ โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนเพื่อให้สามารถดำรงอยู่ได้ในภาวะเค็มซึ่งข้าวจะเผชิญกับความเครียดออกซิเดชันและความเครียดออกซิเดชันเช่นเดียวกับข้าวที่เจริญอยู่ในภาวะแล้ง

#### 5.2.2. การเปลี่ยนแปลงที่ 24 ชั่วโมง หลังจากเผชิญกับภาวะเค็ม

เมื่อข้าวพันธุ์หลวงประทานเผชิญกับภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า *OsRMC* (*Root Meander Curling*) หรือ *LOC\_Os04g56430* เป็นยีนที่มีการแสดงออกอย่างแตกต่าง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาด้วยวิธีทางโปรตีโอม (proteome) ที่มีมาก่อนหน้าซึ่งพบว่าเมื่อพืชเริ่มได้รับภาวะเครียดจากความเค็มจะมีโปรตีน *OsRMC* แสดงออกในปริมาณมากในบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Guo and Song, 2009) โดยการศึกษาในข้าวพบว่าเมื่อทำให้ยีนดังกล่าวมีการแสดงออกน้อยลงจะทำให้ข้าวทนเค็มได้มากขึ้น (Zhang et al., 2009) แต่ถ้าหากทำให้มีการแสดงออกมากขึ้นข้าวจะสามารถเจริญได้ในดินที่ขาดธาตุเหล็ก โดยก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างรากให้มีความเหมาะสมและส่งเสริมการได้มาซึ่งเฟอร์รัสไอออน ( $Fe^{2+}$ ) (Yang et al., 2013) โดยที่ *OsRMC* นั้นเป็นยีนที่จะถูกควบคุมการแสดงออกด้วย *OsEREBP2* ซึ่งเป็น Transcription Factor (TF) ในกลุ่ม APETALA2/ethylene response factor (AP2/ERF) ที่จะตอบสนองต่อภาวะที่อุณหภูมิต่ำ ภาวะแล้ง ภาวะเค็ม และกรดแอบไซซิก (ABA) ที่ล้วนแล้วเป็นความเครียดอันเนื่องมาจากปัจจัยทางกายภาพ (abiotic stress) (Serra et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตามได้มีรายงานว่า *OsRMC* มีบทบาทเกี่ยวกับการตอบสนองเพื่อป้องกันตนเองของพืช (plant defense response) ต่อความเครียดอันเนื่องมาจากปัจจัยทางชีวภาพ



(biotic stress) ด้วย เพราะสามารถถูกชักนำให้มีการแสดงออกมากขึ้นด้วย Jasmonic acid (JA) และเกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณในเซลล์เนื่องจาก OsRMC เป็น receptor like protein kinase (Kim et al., 2004) ด้วยเหตุนี้ OsRMC จึงน่าจะเป็นยีนที่มีบทบาทอย่างยิ่งต่อกลไกการทนเค็มในข้าวพันธุ์หลวงประทาน โดยทำหน้าที่ในกระบวนการส่งสัญญาณในเซลล์และเป็นสื่อกลางในการทำงานร่วมกันของฮอร์โมนพืชต่าง ๆ แบบ crosstalk เพื่อที่จะตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Yang et al., 2019)

### 5.2.3. การเปลี่ยนแปลงที่ 48 ชั่วโมง หลังจากเผชิญกับภาวะเค็ม

เมื่อการทดลองดำเนินผ่านไปเป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่ามียีนที่แสดงออกแตกต่างจากยีนที่มีการแสดงออกในภาวะปกติ จำนวน 63 ยีน เป็นยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulated genes) จำนวน 48 ยีน และลดลง (down-regulated genes) จำนวน 15 ยีน โดยพบว่า เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่โดยตรงในการป้องกันตัวเองจากความเครียดเนื่องจากสิ่งแวดล้อม (directly protect against environmental stress) และเป็นยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น ๆ (regulate gene expression) รวมทั้งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณในเซลล์ (cellular signal transduction)

#### 5.2.3.1. การเปลี่ยนแปลงของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น ๆ และยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณในเซลล์

ในข้าวพันธุ์หลวงประทานเมื่อเผชิญกับความเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่ายีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ส่วนใหญ่คือ Transcription factor (TF) ซึ่งพบว่าที่ 48 ชั่วโมงมีการแสดงออกมากขึ้นของ *HSFC2B* (*Heat Stress Transcription Factor C-2B*) หรือ *LOC\_Os06g35960* ซึ่งเป็น TF ของกลไกการทนร้อนในพืช (Wang, Zhang, and Shou, 2009) ที่พบว่าจะมีการแสดงออกมากขึ้นเมื่อเผชิญกับภาวะแล้งจากการศึกษาในข้าวบาร์เลย์ (Reddy et al., 2014) นอกจากนี้ที่ 48 ชั่วโมงยังพบว่าข้าวหลวงประทานมีการแสดงออกที่น้อยลงของ TF ที่ส่วนใหญ่พบว่าทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมทางลบ (negative regulator) หรือทำหน้าที่เป็น repressor ของการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อความเครียด (stress responsive genes) อาทิ

1. *OsRAV2* (*Related to ABI3/VP protein 2*) หรือ *LOC\_Os01g04800* สามารถ encode ให้ AP2/ERF and B3 domain-containing protein ที่มีการตอบสนองต่อภาวะเค็มจากการศึกษาของ Duan et al. (2016)

2. *ONAC104* (*NAC domain-containing protein 104*) หรือ *LOC\_Os08g10080* negative regulator ของยีนที่ตอบสนองต่อภาวะแล้ง (Fang, Xie, and Xiong, 2014)
3. *OsMYB* (*MYB family transcription factor*) หรือ *LOC\_Os05g50350* TF ในกลุ่มที่ควบคุมการเจริญและการเติบโตในพืชและการตอบสนองต่อความเครียดจากภาวะเค็มและภาวะแล้ง (Xiong et al., 2014)
4. *OsSRZ1* (*Stress Repressive Zinc finger protein 1*) หรือ *LOC\_Os02g10920* repressor ของยีนที่ตอบสนองต่อ abiotic stress (Huang et al., 2008)
5. *OsZFP1* (*Zinc Finger Protein 1*) หรือ *LOC\_Os06g04920* repressor ของยีนที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มและสามารถถูกชักนำให้แสดงออกได้ด้วย Abscisic acid (ABA) (Jin et al., 2004)
6. *OsBBX2* (*B-Box zinc finger family protein 2*) หรือ *LOC\_Os02g07930* TF ในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญและการเติบโตของพืช (Huang et al., 2012)
8. *OsBBX27* (*B-Box zinc finger family protein 27*) หรือ *LOC\_Os09g06464* TF ที่หากทำให้มีการแสดงออกมากขึ้นจะผลให้เกิดการออกดอกช้าในข้าว (Kim et al., 2008)

นอกจากนี้ที่ 48 ชั่วโมงหลังจากข้าวพันธุ์หลวงประทานเผชิญกับภาวะเค็มยังพบว่ามี การแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของยีนที่ควบคุมการแสดงออกยีนอื่น ๆ ภายหลังการแปรรหัส (post-translational control) ร่วมด้วย อาทิ *LOC\_Os05g29710* หรือ *EL5-like* ที่สามารถ encode ให้ *RING-type E3 ubiquitin-protein ligase EL5-like* ซึ่งเป็นโปรตีนที่มี 2 domain คือ RING domain และ E3 domain โดย E3 domain จะสามารถจับกับโปรตีนเป้าหมาย และก่อให้เกิดการย้ายและเติม ubiquitin จาก E2 protein ที่มาเกาะอยู่กับ RING domain ได้ ซึ่งโปรตีนเป้าหมายที่ถูกติดฉลากด้วย ubiquitin จะถูกนำไปกำจัดด้วย ligase enzyme ในลำดับต่อไป โดยการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า *EL5-like* เป็นยีนที่มีการแสดงออกมากในพืชที่ขาดธาตุไนโตรเจนและน่าจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อความไม่สมดุลของธาตุอาหารในระดับ post-translation (Katoh et al., 2005) ซึ่งความไม่สมดุลของธาตุอาหารนั้นเป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นเมื่อพืชได้รับภาวะเค็มได้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับโปรตีนเป้าหมายที่ควบคุมด้วย EL5-like protein

ยิ่งไปกว่านั้นที่ 48 ชั่วโมง ยังพบการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณร่วมด้วย อาทิ *OsRC12-5* และ *OsRMC* ที่พบว่ามีการแสดงออกอย่างแตกต่างที่ 12 และ 24 ชั่วโมงหลังข้าวพันธุ์หลวงประทานเผชิญกับภาวะเค็มดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่ที่ 48 ชั่วโมงนี้ยังมีการแสดงออกมากขึ้นของ *EFA27* (*EF-hand, Abscisic acid responsive 27-kDa protein*) หรือ *LOC\_Os04g43200* ยีนที่มีการตอบสนองต่อ ABA และความเครียดออกซิเดติก และเป็นโปรตีนที่มี  $Ca^{2+}$  binding domain ที่สามารถจับกับแคลเซียมไอออน ( $Ca^{2+}$ ) ซึ่งเป็น second messengers ของกระบวนการส่งสัญญาณในเซลล์ได้ (Frandsen et al., 1996) นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกมากขึ้นของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และการลำเลียงของฮอร์โมนพืช อาทิ *OsACO3* (*Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase 3*) หรือ *LOC\_Os02g53180* ที่ encode ให้โปรตีนในวิถีการสังเคราะห์ ethylene (Chae et al., 2000) และ *OsPILS1* (*PIN Likes 1*) หรือ *LOC\_Os09g31478* ยีนที่ encode ให้ auxin efflux carrier domain containing protein ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการลำเลียง auxin (Mohanta, Mohanta, and Bae, 2015) เป็นต้น

ด้วยเหตุที่ข้าวพันธุ์หลวงประทานมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมยีนอื่น ๆ ที่จะแสดงออกเพื่อตอบสนองต่อภาวะเค็มในระดับต่าง ๆ ทั้งการควบคุมในขั้นตอนของการถอดรหัส (transcriptional control) การควบคุมภายหลังการแปลรหัส การสังเคราะห์และเคลื่อนย้ายฮอร์โมนพืช และการเปลี่ยนแปลงการส่งสัญญาณในเซลล์แล้วแต่ส่งเสริมให้ข้าวพันธุ์หลวงประทานมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่รับมือกับความเครียดจากภาวะเค็มได้

## CHULALONGKORN UNIVERSITY

### 5.2.3.2. การเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่โดยตรงในการป้องกันตัวเองจากความเครียดเนื่องจากสิ่งแวดล้อม

ที่เวลา 48 ชั่วโมงภายหลังจากข้าวพันธุ์หลวงประทานเผชิญกับภาวะเค็มนั้น มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่โดยตรงในการป้องกันตนเองจากความเครียดเนื่องจากสิ่งแวดล้อมร่วมด้วย โดยพบว่ามีการแสดงออกมากขึ้นของยีนที่เกี่ยวข้องกับการบรรเทา แก๊ซ หรือหลีกเลี่ยงที่จะประสบกับความเครียดออกซิเดติก อาทิ ยีนที่ encode ให้ Plasma membrane intrinsic protein หรือ Aquaporins ซึ่งเป็นโปรตีนที่พืชใช้ในการลำเลียงการเข้าออกของน้ำภายในเซลล์ ได้แก่ *OsPIP1-3* (*LOC\_Os02g57720*) (Lian et al., 2004; Liu et al., 2019) และ *OsPIP2-4* (*LOC\_Os07g26630*) (Kumar et al., 2014) เป็นต้น รวมทั้งยีนที่ encode ให้ Late

Embryogenesis Abundant (LEA) protein ได้แก่ *OsLEA3-1* (*LOC\_Os05g46480*) และ *OsLEA2-9* (*LOC\_Os11g26790*) ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ในการป้องกันการเกาะกลุ่มกันของโปรตีน (protein aggregation) ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ในภาวะที่เซลล์พืชเผชิญกับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม อาทิ ภาวะแล้ง และภาวะเค็ม เป็นต้น (Goyal, Walton, and Tunnacliffe, 2005) ดังนั้น *Aquaporins* และ *LEA genes* ที่แสดงออกมากขึ้นในข้าวพันธุ์หลวงประทานที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังเผชิญกับภาวะเค็มมีความเป็นไปได้สูงที่ทำให้ข้าวพันธุ์หลวงประทานสามารถเจริญในภาวะเค็มได้ โดยยังคงความสามารถในการรักษาภาวะอับดุลของน้ำภายในเซลล์ซึ่งสามารถพิจารณาได้จาก SI\_%RWC จากการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

ยิ่งไปกว่านั้นที่ 48 ชั่วโมงยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันความเครียดอันเนื่องมาจากความไม่สมดุลของธาตุอาหารและความเป็นพิษจากอ็อกซิเจนที่เกิดขึ้นในขณะที่ข้าวพันธุ์หลวงประทานเผชิญอยู่กับภาวะเค็มร่วมด้วย อาทิ มีการแสดงออกมากขึ้นของ *OsATX* หรือ *LOC\_Os01g61070* ที่ encode ให้ Heavy metal transport/detoxification protein domain containing protein ที่พบว่ามี การตอบสนองต่อ Salicylic acid (SA) JA และ ABA (Agrawal et al., 2002) ในทางกลับกันมีการลดลงของ *OsALMT4* (*Aluminum-activated Malate Transporter 4*) หรือ *LOC\_Os01g12210* channel protein สำหรับนำไอออนลบ (anion) เข้าสู่เซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่าพืชที่เผชิญกับภาวะเค็มจะลดการนำไอออนลบเข้าสู่เซลล์โดยมีกิจกรรมของ anion channel protein ลดลง (Yamashita and Matsumoto, 1996) ยิ่งไปกว่านั้นยังพบการลดลงของ *OsMTI-2B* (*Metallothionein I-2B*) หรือ *LOC\_Os01g74300* อีกด้วย ซึ่งยีนดังกล่าวสามารถ encode ให้ cytoplasmic metal binding proteins ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสะสมและนำเข้าไอออนเข้าสู่เซลล์ (Pirzadeh and Shahpiri, 2016) ดังนั้นการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของยีนที่เกี่ยวข้องกับการบรรเทาพิษจากโลหะหนักและการลดลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับการนำไอออนเข้าสู่เซลล์จึงเป็นความสามารถอย่างหนึ่งซึ่งถือเป็นกลไกสำคัญในการทนเค็มของข้าวพันธุ์หลวงประทาน

สำหรับความเครียดออกซิเดชันที่มักเกิดขึ้นอันเป็นผลพวงจากความเครียดจากสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสมนั้น ในข้าวหลวงประทานที่ 48 ชั่วโมงพบว่าการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการรับมือกับความเครียดออกซิเดชันไม่มากนัก โดยพบเพียง *LOC\_Os08g42590* ที่ encode ให้ stress up-regulated Nod 19 family protein และ *OsSrx* (*Sulfiredoxin-1*) หรือ *LOC\_Os06g07760* ซึ่งทั้งสองเกี่ยวข้องกับการรับมือต่อความเครียดออกซิเดชันจากการศึกษาก่อนหน้า (Liu et al., 2006; Naya et al.,

2014) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อข้าวพันธุ์หลวงประทานเผชิญกับภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งผ่านไปเพียงสองวันยังไม่พบอาการเครียดจากภาวะเค็มให้เห็นจึงเป็นไปได้ว่าในขณะนั้นข้าวพันธุ์หลวงประทานยังไม่เผชิญกับความเครียดออกซิเดชันมากนัก จึงยังไม่เปลี่ยนแปลงการแสดงออกเพื่อรับมือกับความเครียดออกซิเดชันซึ่งมักเกิดขึ้นที่ระยะหลัง ๆ เมื่อพืชเผชิญกับภาวะเค็ม (Prisco, Gomes-Filho, and Miranda, 2016)

นอกจากนี้สิ่งหนึ่งที่พบว่ามี การเปลี่ยนแปลงเมื่อข้าวพันธุ์หลวงประทานเผชิญกับภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง คือมีการเพิ่มประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ อาทิ *OsPORB* (*Protochlorophyllide Oxidoreductase B*) หรือ *LOC\_Os10g35370* ที่สามารถ encode ให้เอนไซม์ที่เปลี่ยน Protochlorophyllide ไปเป็น Chlorophyllide ซึ่งเป็นตัวตั้งต้นในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ (Sakuraba et al., 2013) ยิ่งไปกว่านั้นยังพบ การเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับ chloroplast precursor อาทิ *OsFER1* (*Ferritin 1*) หรือ *LOC\_Os11g01530* (Stein, Ricachenevsky, and Fett, 2009) และยีนที่รักษาเสถียรภาพของคลอโรพลาสต์เมื่อภาวะในเซลล์ไม่เหมาะสม อาทิ *OsTIL-1* (*Temperature-Induced Lipocalin 1*) หรือ *LOC\_Os02g39930* ซึ่งพบว่าในภาวะเค็ม *OsTIL-1* สามารถ re-translocation จากเยื่อหุ้มเซลล์มาที่บริเวณเยื่อหุ้มคลอโรพลาสต์เพื่อทำหน้าที่ลดความเป็นพิษจากอ็อกซิเจนที่เกิดขึ้นกับคลอโรพลาสต์ได้ (Abo-Ogiala et al., 2014) ซึ่งความสามารถของข้าวพันธุ์หลวงประทานในการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนให้มีการเพิ่มปริมาณคลอโรพลาสต์และรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง ตลอดจนความสามารถในการรักษาเสถียรภาพของคลอโรพลาสต์จากความเป็นพิษจากอ็อกซิเจน ล้วนแล้วส่งผลให้ข้าวพันธุ์หลวงประทานมีความสามารถในการทนต่อภาวะเค็มด้วยการคงความสามารถในการสังเคราะห์ด้วยแสงไว้แม้เผชิญกับภาวะเค็มซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มก่อนหน้านี้พบว่าข้าวพันธุ์หลวงประทานยังคงรักษาเสถียรภาพในการสังเคราะห์ด้วยแสงไว้ได้จากการพิจารณาค่า *SI\_SPAD* และ *SI\_Fv/Fm* แล้วทำให้ข้าวพันธุ์หลวงประทานยังคงมีการเจริญเติบโตได้มากขึ้น ซึ่งก็เป็นไปในแนวทางเดียวกันกับการแสดงออกมากขึ้นของยีนที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมและการเจริญเติบโต อาทิ 1. *LOC\_Os03g52660* หรือ *ATP synthase F1 $\delta$*  2. *LOC\_Os10g25130* หรือ *OsAlaAT1* (*Alanine Aminotransferase-1*) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แป้ง (Miyashita et al., 2007) 3. *LOC\_Os08g03290* หรือ *OsGAPC3* (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang et al. (2011) ที่พบว่าเป็นยีนที่มีบทบาทต่อกลไกการทนเค็มของข้าว และ 4. *LOC\_Os05g01270* หรือ

*OsCYP20-2 (Cyclophilin 20-2)* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการยืดยาวของเซลล์ (cell elongation) ผ่านการควบคุมประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ด้วยแสง (Kim et al., 2012) เป็นต้น

ด้วยเหตุที่ 24 ชั่วโมงภายหลังข้าวพันธุ์หลวงประทานเผชิญภาวะเค็มพบว่า มีการแสดงออกมากขึ้นของ *OsRMC* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณในเซลล์ และเกี่ยวข้องกับ JA ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่ส่งเสริมให้พืชมีกลไกการป้องกันตนเองจากความเครียดอันเนื่องมาจากปัจจัยทางชีวภาพ ดังนั้นที่ 48 ชั่วโมงภายหลังเผชิญกับภาวะเค็ม จึงพบว่ามียีนที่ทำหน้าที่โดยตรงต่อกระบวนการตอบสนองเพื่อป้องกันตนเองของพืชหลายยีน แสดงออกมากขึ้นซึ่งมีสัดส่วนเป็นร้อยละ 10 ของ up-regulated genes โดยบางยีนเป็นยีนที่มีการแสดงออกต่อความเครียดอันเนื่องมาจากปัจจัยทางกายภาพร่วมกับ อาทิ *Pathogen Related (PR) genes* ซึ่งเป็นยีนที่พบว่ามีบทบาทตอบสนองต่อ JA ABA และ ethylene ในการส่งเสริมให้พืชทนต่อโรคพืชและการกักกินของแมลงศัตรูพืชได้ ได้แก่ *OsPR2 (LOC\_Os05g31140)* และ *OsPR6 (LOC\_Os12g25090)* เป็นต้น (Gómez-Ariza et al., 2007; Akiyama et al., 2009) *BBT17 (Bowman-Birk Trypsin Inhibitor 7)* หรือ *LOC\_Os01g03390* ที่ถูกชักนำให้แสดงออกมากขึ้นได้ด้วยภาวะเค็ม (Lakra et al., 2019) *OsDEFL8 (Defensin-Like 8)* หรือ *LOC\_Os03g03810* ยีนที่ encode ให้ plant antimicrobial peptides และเป็นยีนที่คาดว่าจะตอบสนองได้ต่อภาวะแล้ง (Weerawanich et al., 2018) *OCPI2 (Chymotrypsin Protease Inhibitor 2)* หรือ *LOC\_Os01g42860* ที่สามารถแสดงออกได้ในภาวะที่พืชเผชิญกับความเครียดออกซิเดติก (Singh, Sahi, and Grover, 2009; Tiwari et al., 2015) และ *Probenazole-inducible gene (PBZ)* หรือ *PR10* ที่สามารถตอบสนองต่อความเครียดอันเนื่องมาจากปัจจัยทางกายภาพได้ เช่น *OsPBZ1 (LOC\_Os12g36880)* และ *OsPBZ14 (LOC\_Os12g36830)* เป็นต้น

ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่ความสามารถในการทนเค็มของข้าวพันธุ์หลวงประทาน นั้นเกิดจากการทำงานร่วมกันของยีนจำนวนมาก เป็นโครงข่ายสลับซับซ้อนซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันของฮอร์โมนแบบ crosstalk โดย gene expression profile ของข้าวพันธุ์หลวงประทานที่ 48 ชั่วโมงหลังเผชิญกับภาวะเค็มแสดงให้เห็นว่าไม่ได้มีเพียงการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่โดยตรงในการปรับตัวต่อภาวะเค็ม แต่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ปรับตัวให้พร้อมรับความเครียดจากปัจจัยทางชีวภาพร่วมด้วย

### 5.3. การวิเคราะห์โครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (gene co-expression network)

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้นำ 63 DEGs ที่วิเคราะห์ได้ภายหลังข้าวพันธุ์หลวงประทาน เผลอชัญกับภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาสร้างโครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (gene co-expression network: GCN) จากข้อมูลระดับการแสดงออกในภาวะเค็มทั้ง 6 ช่วงเวลา โดยเลือกใช้ partial dynamical correlation coefficient มาวัดการแสดงออกร่วม ตามวิธีของ Opgen-Rhein and Strimmer (2006a) เนื่องจากเป็นการวัดการแสดงออกร่วมที่ได้รับการยอมรับ ในการสร้าง GCN จากข้อมูลแบบ time-series (Riccadonna et al., 2016) เนื่องจากวิธีดังกล่าว จะวิเคราะห์สหสัมพันธ์ของยีนแต่ละคู่จาก gene expression curve ที่สร้างขึ้นจากข้อมูลระดับการ แสดงออกแบบที่เวลาต่าง ๆ โดยใช้พื้นฐานของ functional data analysis ที่สามารถประยุกต์ใช้ได้ กับข้อมูล time-series transcriptome ที่แต่ละช่วงเวลามีระยะห่างไม่เท่ากัน (Opgen-Rhein and Strimmer, 2006b; Opgen-Rhein and Strimmer, 2006a) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่ ศึกษา gene expression profiles ที่ 0 3 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง โดยพบว่าสามารถคำนวณ partial dynamical correlation coefficient ของยีนแต่ละคู่เพื่อสร้าง GCN ได้

เนื่องจากการเลือกค่า cut-off threshold สำหรับสร้าง GCN นั้นไม่ได้ถูกจำกัดให้เลือกใช้ วิธีใดวิธีหนึ่งเป็นมาตรฐาน จึงเป็นศิลปะอย่างหนึ่งของผู้วิจัยด้านชีววิทยาโมเลกุลของพืชที่ต้องปรับค่า cut-off threshold ให้เหมาะสม ซึ่งขึ้นอยู่กับความจำเพาะของข้อมูล จุดประสงค์ของการสร้าง GCN และความสามารถในการสื่อได้ถึงโครงข่ายที่เกิดขึ้นจริงตามธรรมชาติ ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ ปรับเปลี่ยนค่า cut-off threshold ไว้ที่ค่าต่าง ๆ ได้แก่ 0.5 0.6 0.7 และ 0.8 ซึ่งพบว่าค่า cut-off threshold ต่ำจะทำให้ GCN ที่ได้มีความหนาแน่นของโครงข่าย (network density) สูง ซึ่งทำให้ค่า clustering coefficient สูงขึ้นตามเช่นเดียวกับการศึกษาของ Suratane et al. (2018)

อย่างไรก็ตามการสร้าง GCN ในครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษายีนที่มีแนวโน้มว่าจะมีการ แสดงออกร่วมกับ *OsRC12-5* และ *OsRMC* ซึ่งพบว่าค่า cut-off threshold ที่ 0.7 และ 0.8 จะให้ GCN ที่ *OsRC12-5* และ *OsRMC* ไม่มีการแสดงออกร่วมกับยีนอื่นเลย การเลือกค่า cut-off threshold ตั้งแต่ 0.7 ขึ้นไป จึงอาจไม่เหมาะสมต่อวัตถุประสงค์ที่สร้าง GCN ครั้งนี้ เนื่องจาก การศึกษาครั้งนี้เป็นการสร้าง GCN จากข้อมูลระดับการแสดงออกที่เวลาต่าง ๆ ของ DEGs เพียง 63 ยีน ไม่ใช่การนำยีนทั้งหมดที่มีการแสดงออกในจีโนมมาศึกษา ดังนั้นค่าสัมบูรณ์ของ partial dynamical correlation coefficient ของ *OsRC12-5* และ *OsRMC* กับยีนใด ๆ ที่มีค่ามากกว่า 0.7 ขึ้นไปจึงไม่ปรากฏในการศึกษาครั้งนี้

ในทางกลับกันหากพิจารณา GCN ที่สร้างโดยปรับค่า cut-off threshold ให้มีค่าน้อยกว่า หรือเท่ากับ 0.6 GCN ที่ได้มีแนวโน้มที่จะเป็นโครงข่ายที่เหมาะสมมากกว่า ซึ่งพิจารณาได้จากลักษณะ ของ GCN ที่สร้างได้ โดย GCN ที่มีค่า cut-off threshold เท่ากับ 0.5 พบว่า *ONAC104* มีค่า

betweenness centrality อยู่ใน 3 ลำดับแรกที่มีค่าสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่ายีนที่มีแนวโน้มว่าจะมีความสำคัญต่อยีนอื่น ๆ มักมีค่า betweenness centrality สูง และมีแนวโน้มที่จะเป็น hub ของโครงข่าย (Aoki, Ogata, and Shibata, 2007; Azuaje, 2014) ซึ่ง ONAC104 เป็น negative regulator ของยีนที่ตอบสนองต่อภาวะแล้ง ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อภาวะแล้งในระดับการถอดรหัส (Fang, Xie, and Xiong, 2014) จึงน่าจะมีความสำคัญต่อโครงข่ายของยีนที่มีการแสดงออกในข้าวพันธุ์หลวงประทานที่เผชิญกับภาวะเค็ม

เมื่อพิจารณาถึงยีนต่าง ๆ ที่มีการแสดงออกร่วมกับ *OsRCI2-5* และ *OsRMC* ที่ค่า cut-off threshold เท่ากับ 0.5 พบว่ายีนที่มีการแสดงออกร่วมกับยีนทั้งสองมีแนวโน้มจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทนเค็มของข้าวพันธุ์หลวงประทานทั้งหมด โดยพบว่า *OsRCI2-5* มีการแสดงออกร่วมกับ *EL5-like* ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น ๆ โดยเป็นการควบคุมภายหลังการแปลรหัสตั้งที่กล่าวมาแล้วข้างต้น รวมทั้งมีการแสดงออกร่วมกับ *OsALMT4* และ *OsAAP11F* (Amino Acid Permease 11F) หรือ *LOC\_Os05g34980* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการปรับตัวเพื่อรักษาภาวะสมดุลของออสโมนและการเคลื่อนย้ายกรดอะมิโนให้เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลง วิถีเมทาบอลิซึม ตามลำดับ ในขณะที่ *OsRMC* ที่พบว่าเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ ในเซลล์เพื่อตอบสนองต่อภาวะเค็มและคาดว่าเกี่ยวข้องกับวิถีของการตอบสนองต่อความเครียดอันเนื่องมาจากปัจจัยทางชีวภาพ พบว่ามีการแสดงออกร่วมกับ *OsBBX2* และ *UspA* (*LOC\_Os01g32780*) ซึ่งเป็น TF ของยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดอันเนื่องมาจากปัจจัยทางกายภาพ (Shalmani et al., 2019) และ Universal stress protein A domain containing protein ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบการแสดงออกร่วมกับ *OsTIL-2* และ *OsFER1* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับคลอโรพลาสต์ (Stein, Ricachenevsky, and Fett, 2009; Abo-Ogiala et al., 2014) และยังคงพบการแสดงออกร่วมกับยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดอันเนื่องมาจากปัจจัยทางชีวภาพ ได้แก่ *OsPR2* และ *OsDEFL8* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองเพื่อป้องกันตนเองของพืช โดยทั้ง *OsRCI2-5* และ *OsRMC* มี *OsAAP11F* ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงวิถีเมทาบอลิซึมเป็นยีนที่มีการแสดงออกร่วมกันจากการวัดการแสดงออกร่วมด้วย partial dynamical correlation coefficient

ด้วยเหตุที่ *OsRCI2-5* และ *OsRMC* เป็นยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการทนเค็มโดยทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณและมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกก่อนยีนอื่น ๆ ดังนั้นจึงพบว่ายีนทั้งสองมีการแสดงออกร่วมกับยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมยีนอื่น ๆ ทั้งการควบคุมการถอดรหัส และการควบคุมภายหลังการแปลรหัสเพื่อให้มีการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ที่จะตอบสนองต่อภาวะเค็ม และทำให้ข้าวพันธุ์หลวงประทานมีความสามารถในการทนต่อภาวะเค็มได้ โดยผลการวิเคราะห์ GCN ที่สร้างขึ้นโดยมีค่า cut-off threshold เท่ากับ 0.5 ยังคงส่งเสริมสมมุติฐานที่กล่าวว่า *OsRMC* น่าจะ



มีความเกี่ยวข้องกับวิธีการตอบสนองต่อความเครียดอันเนื่องมาจากปัจจัยทางชีวภาพร่วมด้วยเพราะมีการแสดงออกร่วมกับยีนที่เกี่ยวกับการตอบสนองเพื่อป้องกันตนเองของพืชจากปัจจัยทางชีวภาพ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่า *OsRMC* สามารถชักนำให้มีการแสดงออกมากขึ้นด้วย JA อันเป็นฮอร์โมนสำคัญในวิธีการตอบสนองต่อความเครียดอันเนื่องมาจากปัจจัยทางชีวภาพของพืช (Kim et al., 2004)

#### 5.4. การศึกษาเพื่อยืนยันผลกระทบของภาวะเค็มที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่ระบุได้

เมื่อผู้วิจัยได้ศึกษาการแสดงออกของ *OsRCL2-5* และ *OsRMC* ด้วยวิธี qRT-PCR เพื่อยืนยันผลกระทบของภาวะเค็มที่มีต่อการแสดงออกของยีนทั้งสองที่ระบุได้เมื่อเผชิญกับภาวะเค็มที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าระดับการแสดงออกของ *OsRCL2-5* และ *OsRMC* ในข้าวพันธุ์หลวงประทานให้ผลไปในทางเดียวกันกับการศึกษาทรานสคริปโทมด้วยวิธี 3'-Tag RNA seq ที่พบว่าข้าวพันธุ์หลวงประทานในช่วงเวลาแรก *OsRCL2-5* และ *OsRMC* จะยังไม่มีเปลี่ยนแปลงการแสดงออกและเมื่อเวลาผ่านไปที่ 12 และ 24 ชั่วโมงหลังเผชิญกับภาวะเค็มจะมีการแสดงออกมากขึ้นของ *OsRCL2-5* และ *OsRMC* ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างของ *OsRCL2-5* ที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งการศึกษาด้วย qRT-PCR พบว่าให้ผลตรงกับการศึกษาด้วย 3'-Tag RNA seq ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยมีการแสดงออกของ *OsRMC* เช่นเดียวกับการศึกษาด้วย 3'-Tag RNA seq แต่กลับพบว่า *OsRCL2-5* มีระดับการแสดงออกระหว่างภาวะเค็มและภาวะปกติแตกต่างกันที่ 24 ชั่วโมงร่วมด้วย โดยอาจเป็นผลมาจากการตั้งค่าในการวิเคราะห์หายีนที่แสดงออกอย่างแตกต่างด้วย DESeq2 analysis ที่กำหนดให้ minimum fold change เท่ากับ 1.5 ดังนั้นค่าระดับการแสดงออกที่ตัดแปรข้อมูลแล้ว (normalized expression level) ซึ่งอยู่ในหน่วยของ  $\log_2(\text{CPM}+4)$  ระหว่างทั้งสองภาวะถ้าต่างกันน้อยกว่า 1.5 เท่าจะไม่ถูกกำหนดให้เป็น DEG กอปรกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี DESeq2 analysis ที่ผ่านมาได้ตั้งค่าให้มีโอกาสพบ false positive ต่ำมาก กล่าวคือมี false discovery rate (FDR) เท่า 0.10 ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า *OsRCL2-5* ที่พบว่าแตกต่างในช่วงเวลา 24 ชั่วโมงในการศึกษาด้วย qRT-PCR อาจเป็นความแตกต่างที่เกิดขึ้นเนื่องจากการวิเคราะห์สถิติที่ต่างกันซึ่งการทดสอบสถิติของการศึกษาด้วย qRT-PCR พบว่าบางทรีตเมนต์ (treatment) มีความแปรปรวนภายในทรีตเมนต์ค่อนข้างสูงอีกทั้งยังเป็นการทดสอบสถิติแบบ Two-Way ANOVA ที่บางช่วงเวลาพบอิทธิพลของ block รวมทั้งปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยหลักทั้งสอง คือ พันธุ์ข้าวและภาวะที่กล้าข้าวเผชิญซึ่งอาจส่งผลต่อการแปลผลข้อมูลได้ โดยทั้งนี้อาจมีผลมาจากความแตกต่างจากสิ่งแวดล้อมร่วมด้วยเนื่องจากการทดลองเพื่อเก็บตัวอย่างเพื่อสกัด RNA ทั้งสองวิธีไม่ได้ดำเนินการในช่วงเวลาเดียวกัน (Ge, Son, and Yao, 2018) แต่อย่างไรก็ตามที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังข้าวพันธุ์หลวงประทานเผชิญกับภาวะเค็ม

พบว่ามี การแสดงออกอย่างแตกต่างของ *OsRC12-5* และ *OsRMC* เช่นเดียวกันระหว่างการศึกษาด้วย qRT-PCR และ 3'-Tag RNA seq

ยิ่งไปกว่านั้นหากพิจารณาการแสดงออกของ *OsRC12-5* และ *OsRMC* ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ประกอบด้วยข้าวพันธุ์ Pokkali หลวงประทาน ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์ทนเค็ม และมะยม และ IR29 ที่เป็นข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็ม จะพบว่า *OsRC12-5* และ *OsRMC* มีแนวโน้มที่จะเป็นยีนที่มีบทบาทต่อกลไกการทนเค็มในข้าวทุกพันธุ์ โดยการแสดงออกของ *OsRC12-5* พบว่าเป็นยีนที่สามารถชักนำให้มีการแสดงออกมากขึ้นได้ด้วยภาวะเค็มในข้าวพันธุ์หลวงประทาน มะยม และ IR29 ยกเว้นในข้าวพันธุ์ Pokkali ที่เป็นข้าวพันธุ์มาตรฐานทนเค็มซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าข้าวพันธุ์ Pokkali มีความสามารถปรับระดับการแสดงออกของ *OsRC12-5* ที่ภาวะปกติให้มีความเหมาะสมต่อการเผชิญกับภาวะเค็มได้ตลอดเวลา ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกที่พบในข้าวพันธุ์หลวงประทานซึ่งมีความสามารถในการทนต่อภาวะเค็มใกล้เคียงกับ Pokkali โดยพบว่าข้าวพันธุ์หลวงประทานที่ภาวะเค็มจะสามารถเพิ่มการแสดงออกของ *OsRC12-5* ให้ใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ Pokkali ที่ภาวะเค็มได้ตลอดการทดลอง ซึ่งแตกต่างจากข้าวพันธุ์มะยมและ IR29 อย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า *OsRC12-5* น่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเค็มจริง และมีส่วนทำให้ข้าวพันธุ์หลวงประทานมีความสามารถในการทนเค็มใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ Pokkali ที่เป็นข้าวพันธุ์ทนเค็มมาตรฐาน โดยความสามารถในการรักษา ระดับการแสดงออกของ *OsRC12-5* ให้เหมาะสมในข้าวพันธุ์หลวงประทานที่ได้รับภาวะเค็มนั้นเป็นคุณสมบัติสำคัญที่ทำให้ข้าวพันธุ์หลวงประทานมีความสามารถในการทนต่อภาวะเค็มมากกว่าข้าวพันธุ์มะยมและ IR29

สำหรับการศึกษากการแสดงออกของ *OsRMC* ด้วยวิธี qRT-PCR พบว่าให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาด้วยวิธี 3'-Tag RNA-seq โดยพบว่า *OsRMC* เป็นยีนที่สามารถชักนำให้มีการแสดงออกได้ด้วยภาวะเค็มในข้าวทุกพันธุ์เมื่อเผชิญกับภาวะเค็มที่ 115 mM NaCl เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และมีการแสดงออกมากยิ่งขึ้นไปกว่าเดิมเมื่อการทดลองดำเนินไปจนถึง 48 ชั่วโมง โดยข้าวพันธุ์หลวงประทานสามารถเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ *OsRMC* ในภาวะเค็มให้มีการแสดงออกมากขึ้นได้อย่างโดดเด่นต่างจากข้าวพันธุ์อื่น ๆ ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงหลังเผชิญกับภาวะเค็ม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา gene expression profile ของข้าวพันธุ์หลวงประทานที่เวลา 48 ชั่วโมงที่พบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองเพื่อป้องกันตนเองของพืชแสดงออกมากขึ้นโดยคิดเป็นร้อยละ 10 ของ up-regulated gene โดยกลุ่มยีนดังกล่าวนั้นอาจถูกควบคุมการทำงานโดย *OsRMC* ที่แสดงออกอย่างแตกต่างที่ 24 ชั่วโมงก่อนหน้า โดยทำงานเป็นตัวส่งสัญญาณในเซลล์ที่สามารถตอบสนองต่อภาวะเค็มและอาจเป็นสื่อกลางหรือทำงานร่วมกับวิธีการทำงานของฮอร์โมนพืชต่าง ๆ แบบ crosstalk เพื่อนำมาให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนต่าง ๆ และเพิ่มภูมิคุ้มกันโดยรวมต่อ

สิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ทั้งที่มีสาเหตุมาจากปัจจัยกายภาพและปัจจัยชีวภาพ ซึ่งถือเป็นคุณสมบัติ  
อันน่าอัศจรรย์ของข้าวพันธุ์หลวงประทานที่เป็นประโยชน์ต่อนักปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต



## บทที่ 6

### สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าข้าวพันธุ์หลวงประทานเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีความสามารถในการทนเค็มมากที่สุด ทั้งการศึกษาในกล้าข้าวอายุ 14 วัน และ 20 วัน เนื่องจากข้าวพันธุ์หลวงประทานเมื่อเผชิญกับภาวะเค็มที่ 115 mM NaCl สามารถรักษาภาวะอรัญดุลของน้ำภายในเซลล์และเสถียรภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ไว้ได้ และยังคงมีกระบวนการต่าง ๆ ทางสรีรวิทยาเป็นปกติ รวมถึงการสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อสร้างพลังงานสำหรับการเจริญเติบโตในภาวะเค็ม ซึ่งหลวงประทานมีความสามารถใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ Pokkali และแตกต่างจากข้าวพันธุ์มะยมและ IR29

สำหรับการศึกษา gene expression profile ด้วยวิธีทางทรานสคริปโทมโดยเทคนิค 3'-Tag RNA-seq พบว่าข้าวหลวงประทานเมื่อเผชิญกับภาวะเค็มมี *OsRC12-5* และ *OsRMC* เป็นยีนที่มีการแสดงออกอย่างแตกต่าง (differentially expressed genes: DEGs) ที่ 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ และเป็นยีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับกลไกการทนเค็มของข้าวพันธุ์หลวงประทาน เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณในเซลล์ (cellular signal transduction) และมีการแสดงออกในช่วงเวลาแรก ๆ เมื่อเผชิญกับภาวะเค็ม ต่อมาที่เวลา 48 ชั่วโมงพบว่ามี DEGs จำนวน 63 ยีน โดยเป็นยีนที่มีการแสดงออกมากขึ้นเมื่อข้าวพันธุ์หลวงประทานเผชิญกับภาวะเค็ม (up-regulated genes) จำนวน 48 ยีน และเป็นยีนที่มีการแสดงออกลดลง (down-regulated genes) จำนวน 15 ยีน

จากการพิจารณา gene ontology (GO) term ของ DEGs ที่วิเคราะห์ได้พบที่มีการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ทั้งการควบคุมในขั้นตอนการถอดรหัส (transcriptional control) โดยมีการแสดงออกลดน้อยลงของ repressor ของ stress responsive gene อาทิ *ONAC104* มีการควบคุมภายหลังการแปลรหัส (post-translational control) โดยทำงานผ่าน E3 ubiquitin-protein ligase EL5-like มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่การส่งสัญญาณในเซลล์รวมถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ เคลื่อนย้าย และการทำงานของฮอร์โมนพืช ยิ่งไปกว่านั้นยังพบการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ทำหน้าที่โดยตรงในการป้องกันตัวเองจากความเครียดเนื่องจากสิ่งแวดล้อมทั้งยีนที่รับมือกับความเครียดออสโมติก (osmotic stress) อาทิ Aquaporins และ LEA gene ยีนที่ตอบสนองต่อความไม่สมดุลของธาตุอาหาร (nutrient imbalance) และความเป็นพิษจากไอออนบางชนิด (ion toxicity) ยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมและ

การเพิ่มประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสงด้วยการเพิ่มจำนวนคลอโรพลาสต์และการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ ตลอดจนยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองเพื่อป้องกันตนเองของพืช (plant defense response) จากความเครียดอันเนื่องมาจากปัจจัยทางชีวภาพ (biotic stress) เป็นต้น

การสร้างโครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (gene co-expression network: GCN) จากข้อมูลการแสดงออกในภาวะเค็มของ DEGs จำนวน 63 ยีน ที่เวลาต่าง ๆ พบว่าสามารถใช้ศึกษายีนที่มีการแสดงออกร่วมกับ *OsRC12-5* และ *OsRMC* ได้ หาก GCN มีค่า cut-off threshold น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.6 ซึ่งที่ cut-off threshold เท่ากับ 0.5 พบว่า *OsRC12-5* และ *OsRMC* มีการแสดงออกร่วมกับยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่นร่วมด้วยซึ่งเป็นการควบคุมทั้งในระดับการถอดรหัสและการควบคุมหลังการแปลรหัสตามลำดับ ซึ่งยีนส่วนใหญ่ที่แสดงออกร่วมกับ *OsRC12-5* และ *OsRMC* ทั้งหมดมีแนวโน้มที่จะเป็นยีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการทนเค็มยิ่งไปกว่านั้นยังพบยีนที่เกี่ยวข้องกับ biotic stress แสดงออกร่วมกับ *OsRMC* ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า *OsRMC* มีแนวโน้มที่จะเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณในเซลล์ที่ตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอันเนื่องมาจากปัจจัยต่าง ๆ โดยที่มีการทำงานร่วมกันกับฮอร์โมนพืชหลายชนิดแบบ crosstalk โดยเฉพาะการตอบสนองต่อ jasmonic acid (JA) ซึ่งก่อให้เกิดการตอบสนองเพื่อป้องกันตนเองของพืชจากปัจจัยทางชีวภาพร่วมด้วย ซึ่งล้วนแล้วเป็นการส่งเสริมให้ข้าวพันธุ์หลวงประทานมีภูมิคุ้มกันโดยรวมที่จะเผชิญกับสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมโดยเฉพาะภาวะเค็มได้

สำหรับการศึกษาเพื่อยืนยันผลกระทบของภาวะเค็มที่มีต่อการแสดงออกของ *OsRC12-5* และ *OsRMC* ด้วย quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) พบว่ายีนทั้งสองมีการแสดงออกสอดคล้องกับการศึกษาทรานสคริปโทมด้วย 3'-Tag RNA-seq โดยทั้งคู่เป็นยีนที่ถูกชักนำให้มีการแสดงออกได้ด้วยภาวะเค็มในข้าวส่วนใหญ่ โดยสาเหตุสำคัญที่ทำให้ข้าวพันธุ์หลวงประทานมีความสามารถในการทนต่อภาวะเค็มมากกว่าข้าวพันธุ์อื่น ๆ คือความสามารถในการรักษาระดับการแสดงออกของ *OsRC12-5* เมื่อเผชิญกับภาวะเค็มได้เท่ากับการแสดงออกในข้าวพันธุ์ Pokkali ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์มาตรฐานทนเค็ม ยิ่งไปกว่านั้นคือความสามารถในการเพิ่มการแสดงออก *OsRMC* เมื่อเผชิญกับภาวะเค็มได้มากกว่าข้าวพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าน่าจะเป็นกลไกอย่างหนึ่งที่ข้าวพันธุ์หลวงประทานแตกต่างจากข้าวพันธุ์อื่น ๆ ที่ศึกษา โดยมีความสามารถในการส่งสัญญาณผ่าน *OsRMC* ให้มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนต่าง ๆ เพื่อเผชิญกับสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจากหลายสาเหตุด้วยการเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ด้วยแสง เปลี่ยนแปลงวิถีเมแทบอลิซึมเพื่อให้มีความสามารถในการทนต่อโรค รวมทั้งเสริมสร้างความแข็งแรงให้กับต้นพืชเพื่อป้องกันการกัดกินจากศัตรูพืช ซึ่งล้วนแล้วส่งเสริมให้ข้าวพันธุ์หลวงประทานมีความสามารถในการทนต่อภาวะเค็มได้มากยิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์ในการใช้ข้าวพันธุ์หลวงประทานอันเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยทนเค็มเป็น germplasm สำหรับการพัฒนาพันธุ์ข้าวทนเค็มต่อไปในอนาคต



## ก.1 รหัสต้นแบบ (source code) ที่ใช้ในการสร้างโครงข่ายการแสดงออกร่วมของยีน (gene co-expression network)

```
#####
##### Pheerawat : longitudinal package #####
#####

### set directory folder ###
setwd("C:\\Path\\of\\Directory\\folder")

### read transformed expression value of DEGs table ###
stampdeg<-read.csv("expression table of DEGs filename.csv", row.names = 1)
typeof(stampdeg)

### transform read table list to matrix ###
stampdeg<-as.matrix(stampdeg)
typeof(stampdeg) #if console show 'double', is work

### load longitudinal package ###
#install.packages("longitudinal") #first time only
library(longitudinal)

### change matrix to longitudinal data ###
stampdegl<-as.longitudinal(stampdeg, repeats = 3,time = c(0,3,6,12,24,48) )
is.longitudinal(stampdegl) # result is 'TRUE' --> work

### Information checking ###
attributes(stampdegl)
summary(stampdegl)
get.time.repeats(stampdegl)
plot(stampdegl,(1:1))

# dynamical partial correlation
# (this takes into account of the unequal spacings between time points)
dynpc_stampdegl <- dyn.pcor(stampdegl, lambda=0)
write.csv(dynpc_stampdegl,"dynpc_stampdegl3s.csv",row.names = T)

#####
##### Pheerawat : Igraph to create graph from adjmatrix #####
#####

### Download and install the package
#install.packages("igraph") #First time only

### Load igraph package ###
library(igraph)

### read adjacent matrix file ###
adjm<-read.csv("dynpc_stampdegl3s.csv", row.names = 1)
typeof(adjm)
adjm<-as.matrix(adjm) #change to matrix
typeof(adjm) #show 'double'

### plot adjmatrix to network ###
g1 <- graph_from_adjacency_matrix(adjm, mode = "min",weight = T,diag =T)
g1
g1 <- simplify(g1) # removes self-loops
print(g1)
typeof(g1)
E(g1)$weight # show weight data
plot(g1)
```

```

### set min cut-off threshold to remove ###

thresholdg2<-0.50 # set 1st treshold
E(g1)$weight
g2 <- delete.edges(g1, which(abs(E(g1)$weight) < thresholdg2))
g2 <- simplify(g2)
E(g2)$weight
min(E(g2)$weight)
max(E(g2)$weight)
plot(g2)

thresholdg3<-0.60 # set 2st treshold
E(g1)$weight
g3 <- delete.edges(g1, which(abs(E(g1)$weight) < thresholdg3))
g3 <- simplify(g3)
E(g3)$weight
min(E(g3)$weight)
max(E(g3)$weight)
plot(g3)

thresholdg4<-0.70 # set 3th treshold
E(g1)$weight
g4 <- delete.edges(g1, which(abs(E(g1)$weight) < thresholdg4))
g4 <- simplify(g4)
E(g4)$weight
min(E(g4)$weight)
max(E(g4)$weight)
plot(g4)

thresholdg5<-0.80 # set 4th treshold
E(g1)$weight
g5 <- delete.edges(g1, which(abs(E(g1)$weight) < thresholdg5))
g5 <- simplify(g5)
E(g5)$weight
min(E(g5)$weight)
max(E(g5)$weight)
plot(g5)

#####
##### Pheerawat : RCy3 package to export to open in Cytoscape #####
#####

### install and load Rcy ###
if(!"RCy3" %in% installed.packages()){
  install.packages("BiocManager")
  BiocManager::install("RCy3")
}
library(RCy3)
library(igraph)

### export to cytoscape ###
createNetworkFromIgraph(g2,"stampdeg3s_gs_0.50")
createNetworkFromIgraph(g3,"stampdeg3s_gs_0.60")
createNetworkFromIgraph(g4,"stampdeg3s_gs_0.70")
createNetworkFromIgraph(g5,"stampdeg3s_gs_0.80")

#####
##### END ## PHEERAWAT ## END #####
#####

```



## ก.2 primers ของยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการทนเค็มที่ใช้ในการศึกษาเพื่อยืนยันผลกระทบของภาวะเค็มด้วย qRT-PCR

### OsRCI2-5 (LOC\_Os03g17790.1)

Genomic sequence length: 643 nucleotides

CDS length: 165 nucleotides

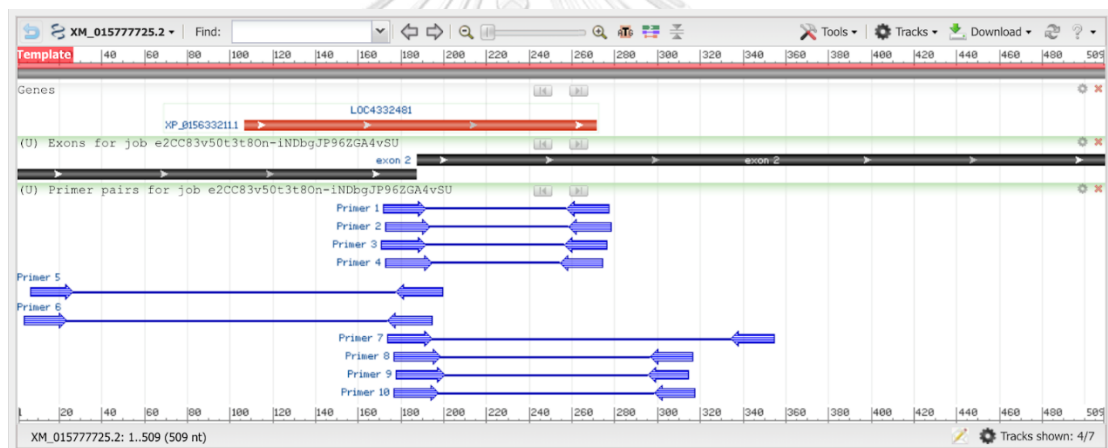
Protein length: 54 amino acids

Fw\_OsRCI (181): 5'-GCTACGGCTTGGGTATTGAGT-3'

Rv\_OsRCI (181): 5'-CACCACAGCACAGCATCAGT-3'

Product size: 181 bp

Optimum  $T_a$ : 61.5 °C



#### Primer pair 7

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCTACGGCTTGGGTATTGAGT	Plus	21	174	194	60.13	52.38	3.00	1.00
Reverse primer	CACCACAGCACAGCATCAGT	Minus	20	354	335	60.89	55.00	2.00	2.00
Product length	181								
Exon junction	187/188 (forward primer) on template <a href="#">XM_015777725.2</a>								

#### Products on intended targets

>[XM\\_015777725.2](#) PREDICTED: Oryza sativa Japonica Group low temperature-induced protein It101.2 (LOC4332481), mRNA

```
product length = 181
Forward primer 1 GCTACGGCTTGGGTATTGAGT 21
Template       174 ..... 194

Reverse primer 1 CACCACAGCACAGCATCAGT 20
Template       354 ..... 335
```

ภาพที่ 25 คุณสมบัติของ primers ที่ใช้ศึกษาการแสดงออกของ OsRCI2-5 ที่ออกแบบได้

### OsRMC (LOC\_Os04g56430)

Genomic sequence length: 1071 nucleotides

CDS length: 777 nucleotides

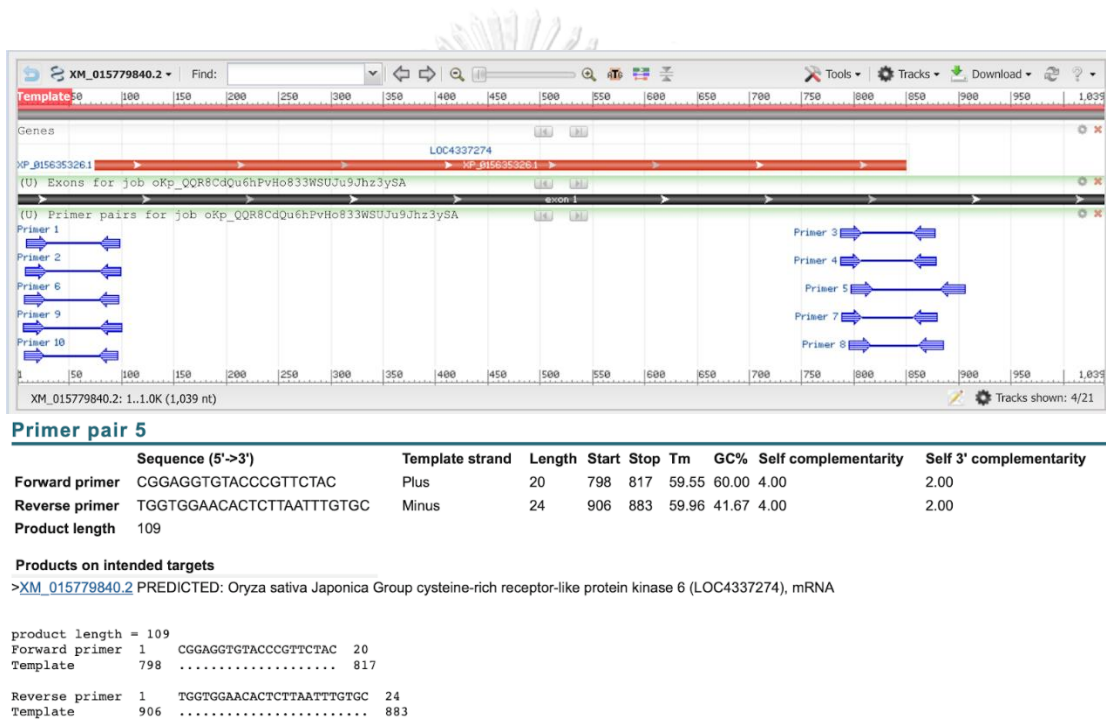
Protein length: 258 amino acids

Fw\_OsRMC(109): 5'-CGGAGGTGTACCCGTTCTAC-3'

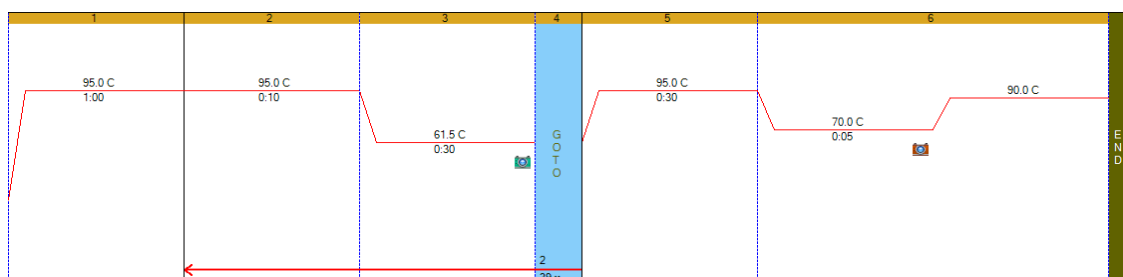
Rv\_OsRMC(109): 5'-TGGTGGAACTCTTAATTTGTGC-3'

Product size: 109 bp

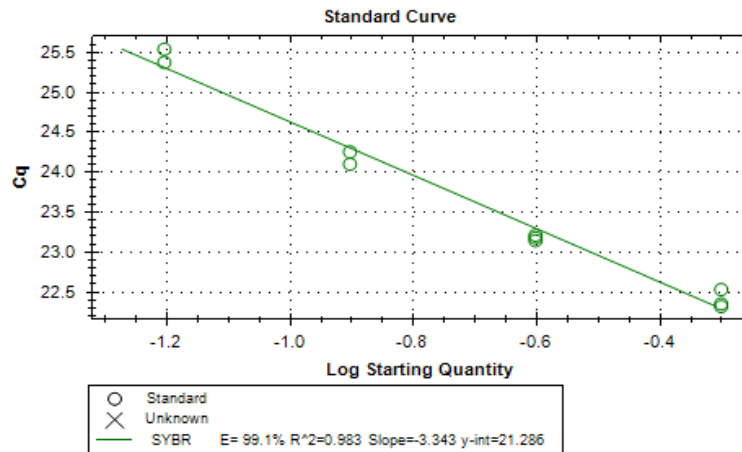
Optimum  $T_a$ : 61.5 °C



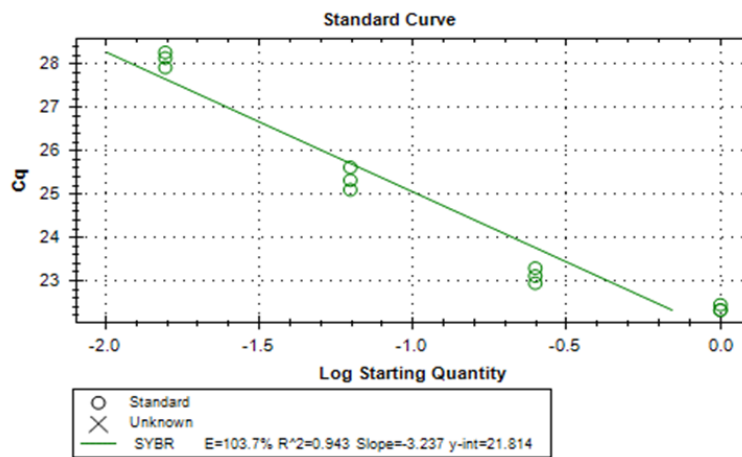
ภาพที่ 26 คุณสมบัติของ primers ที่ใช้ศึกษาการแสดงออกของ OsRMC ที่ออกแบบได้



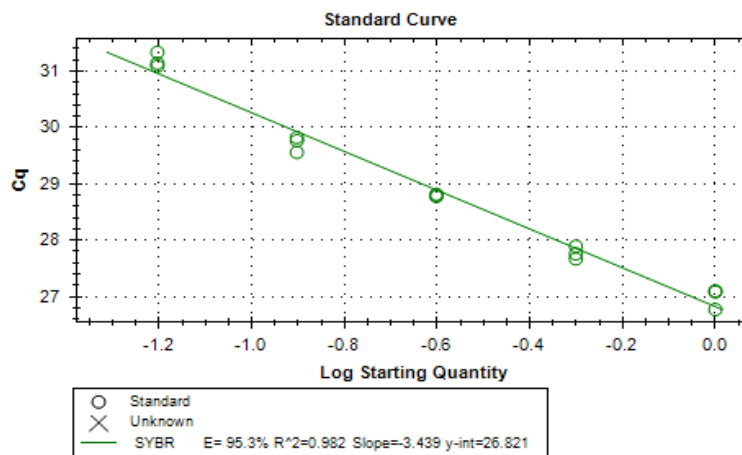
ภาพที่ 27 ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของเครื่อง qRT-PCR



ภาพที่ 28 Standard curve ของ OsEF-1α



ภาพที่ 29 Standard curve ของ OsRC12-5



ภาพที่ 30 Standard curve ของ OsRMC



ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ SI\_SIS ของการศึกษาร้อยละของต้นในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์ (ตารางแสดงผลของวันที่ 1 ถึงวันที่ 5  
หลังจากที่กล้าข้าวเผชิญกับความเค็ม)

Cultivars	SI_SIS (Mean $\pm$ SE)					
	1 DAT	2 DAT	3 DAT	4 DAT	5 DAT	
Puang Tawng	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.28	1.83 $\pm$ 0.31	2.83 $\pm$ 0.17	bc
Daw Dawk Mai	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.28	2.00 $\pm$ 0.37	3.17 $\pm$ 0.17	bc
Jud Mawn	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	0.98 $\pm$ 0.31	1.80 $\pm$ 0.37	3.20 $\pm$ 0.20	C
Khao Gaew	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.28	1.67 $\pm$ 0.33	3.00 $\pm$ 0.00	bc
Daw Sahn Deuan	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.28	1.50 $\pm$ 0.22	2.83 $\pm$ 0.17	bc
IR29	1.50 $\pm$ 0.50	1.50 $\pm$ 0.50	1.67 $\pm$ 0.28	3.00 $\pm$ 0.45	4.33 $\pm$ 0.76	d
Mayom	1.50 $\pm$ 0.50	1.50 $\pm$ 0.50	1.67 $\pm$ 0.28	3.17 $\pm$ 0.60	4.17 $\pm$ 0.60	d
Tah Bahn	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.28	1.83 $\pm$ 0.31	3.17 $\pm$ 0.17	bc
Leuang Puang Tawng	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.28	1.50 $\pm$ 0.34	2.83 $\pm$ 0.17	bc
Luang Prathan	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.28	1.33 $\pm$ 0.21	2.17 $\pm$ 0.31	ab
E-Lai	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.28	2.33 $\pm$ 0.33	3.50 $\pm$ 0.22	cd
Pokkali	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.28	1.00 $\pm$ 0.00	1.83 $\pm$ 0.17	a
<b>Treatment (p-value)</b>	0.564	0.564	0.564	0.000	0.000	
<b>Block (p-value)</b>	0.569	0.569	0.569	0.081	0.041	

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ SI\_SIS ของการศึกษาระดับปริญญาตรีในกล้วยไม้จำนวน 12 พันธุ์ (ตารางแสดงผลของวันที่ 6 ถึงวันที่ 9 หลังจากปลูกกล้วยไม้กับความเค็ม)

Cultivars	SI_SIS (Mean $\pm$ SE)								
	6 DAT	7 DAT	8 DAT	9 DAT	6 DAT	7 DAT	8 DAT	9 DAT	6 DAT
Puang Tawng	3.67 $\pm$ 0.33	4.83 $\pm$ 0.31	5.67 $\pm$ 0.42	6.17 $\pm$ 0.31	c	cde	cd	bcd	bcd
Daw Dawk Mai	3.83 $\pm$ 0.17	4.67 $\pm$ 0.21	5.67 $\pm$ 0.33	6.17 $\pm$ 0.31	cd	cd	cd	bcd	bcd
Jud Mawn	3.60 $\pm$ 0.24	4.40 $\pm$ 0.40	5.00 $\pm$ 0.63	5.80 $\pm$ 0.58	bc	bcd	bc	bcd	bcd
Khao Gaew	3.67 $\pm$ 0.33	4.67 $\pm$ 0.42	5.17 $\pm$ 0.48	5.67 $\pm$ 0.56	c	cd	bc	bc	bc
Daw Sahn Deuan	3.50 $\pm$ 0.34	4.17 $\pm$ 0.31	5.00 $\pm$ 0.45	5.67 $\pm$ 0.33	bc	bc	bc	bc	bc
IR29	5.00 $\pm$ 0.68	6.33 $\pm$ 0.49	7.17 $\pm$ 0.60	7.83 $\pm$ 0.48	e	f	e	e	e
Mayom	4.83 $\pm$ 0.48	5.83 $\pm$ 0.48	6.67 $\pm$ 0.56	7.50 $\pm$ 0.43	de	ef	de	e	e
Tah Bahn	4.17 $\pm$ 0.40	5.00 $\pm$ 0.37	5.83 $\pm$ 0.40	6.67 $\pm$ 0.49	cde	cde	cd	cde	cde
Leuang Puang Tawng	3.50 $\pm$ 0.34	4.33 $\pm$ 0.49	5.17 $\pm$ 0.48	6.17 $\pm$ 0.48	bc	bcd	bc	bcd	bcd
Luang Prathan	2.50 $\pm$ 0.43	3.50 $\pm$ 0.43	4.17 $\pm$ 0.31	5.17 $\pm$ 0.31	ab	ab	b	b	b
E-Lai	4.50 $\pm$ 0.22	5.50 $\pm$ 0.22	6.33 $\pm$ 0.33	7.00 $\pm$ 0.37	cde	edf	cde	de	de
Pokkali	2.17 $\pm$ 0.17	2.50 $\pm$ 0.34	2.83 $\pm$ 0.31	3.17 $\pm$ 0.31	a	a	a	a	a
<b>Treatment (p-value)</b>	0.000	0.000	0.000	0.000					
<b>Block (p-value)</b>	0.124	0.030	0.860	0.095					

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ SI\_SPAD ของการศึกษารองต้นในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์ (ตารางแสดงผลของวันที่ 1 ถึงวันที่ 5 หลังจากปลูกกล้าข้าวเชิงกับความเค็ม)

Cultivars	SI_SPAD (Mean ± SE)				
	1 DAT	2 DAT	3 DAT	4 DAT	5 DAT
Puang Tawng	1.09 ± 0.10	1.03 ± 0.04	1.11 ± 0.02	1.16 ± 0.04	1.14 ± 0.03
Daw Dawk Mai	1.15 ± 0.09	1.17 ± 0.05	1.12 ± 0.05	1.15 ± 0.04	1.18 ± 0.04
Jud Mawn	0.90 ± 0.10	1.04 ± 0.02	1.14 ± 0.03	1.07 ± 0.03	1.10 ± 0.04
Khao Gaew	1.04 ± 0.02	1.04 ± 0.04	0.99 ± 0.05	1.15 ± 0.04	1.12 ± 0.02
Daw Sahn Deuan	1.03 ± 0.06	1.12 ± 0.04	1.06 ± 0.07	1.12 ± 0.05	1.19 ± 0.03
IR29	1.09 ± 0.14	1.06 ± 0.15	0.89 ± 0.18	0.87 ± 0.17	0.86 ± 0.18
Mayom	0.92 ± 0.09	1.19 ± 0.06	0.88 ± 0.18	1.03 ± 0.12	1.01 ± 0.18
Tah Bahn	1.04 ± 0.08	0.98 ± 0.05	1.06 ± 0.03	1.05 ± 0.03	1.07 ± 0.03
Leuang Puang Tawng	1.20 ± 0.06	1.11 ± 0.04	1.05 ± 0.05	1.02 ± 0.03	1.10 ± 0.02
Luang Prathan	1.03 ± 0.08	1.04 ± 0.07	1.07 ± 0.05	1.11 ± 0.06	1.13 ± 0.06
E-Lai	0.95 ± 0.06	1.03 ± 0.05	1.06 ± 0.04	1.12 ± 0.04	1.13 ± 0.04
Pokkali	0.95 ± 0.05	1.07 ± 0.08	1.07 ± 0.04	1.14 ± 0.03	1.22 ± 0.04
<b>Treatment (p-value)</b>	0.340	0.474	0.373	0.133	0.146
<b>Block (p-value)</b>	0.541	0.028	0.036	0.062	0.045

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ SI\_SPAD ของการศึกษารับรองต้นในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์ (ตารางแสดงผลของวันที่ 6 ถึงวันที่ 9 หลังจากปลูกกล้าข้าวเชิงกับความเค็ม)

Cultivars	SI_SPAD (Mean $\pm$ SE)			
	6 DAT	7 DAT	8 DAT	9 DAT
Puang Tawng	1.15 $\pm$ 0.05 bc	1.10 $\pm$ 0.06 bc	1.16 $\pm$ 0.07 bc	1.09 $\pm$ 0.07 c
Daw Dawk Mai	1.19 $\pm$ 0.04 bc	1.07 $\pm$ 0.04 bc	1.13 $\pm$ 0.06 bc	1.12 $\pm$ 0.06 c
Jud Mawn	1.15 $\pm$ 0.03 bc	1.13 $\pm$ 0.02 bc	1.15 $\pm$ 0.03 bc	1.18 $\pm$ 0.04 c
Khao Gaew	1.08 $\pm$ 0.02 bc	1.14 $\pm$ 0.04 bc	1.16 $\pm$ 0.03 bc	1.15 $\pm$ 0.06 c
Daw Sahn Deuan	1.16 $\pm$ 0.05 bc	1.16 $\pm$ 0.05 bc	1.17 $\pm$ 0.03 bc	1.20 $\pm$ 0.05 c
IR29	0.79 $\pm$ 0.17 a	0.78 $\pm$ 0.17 a	0.52 $\pm$ 0.21 a	0.44 $\pm$ 0.22 a
Mayom	0.97 $\pm$ 0.21 ab	0.94 $\pm$ 0.20 ab	0.91 $\pm$ 0.20 b	0.61 $\pm$ 0.27 ab
Tah Bahn	1.09 $\pm$ 0.03 bc	1.10 $\pm$ 0.07 bc	0.85 $\pm$ 0.17 b	0.67 $\pm$ 0.22 ab
Leuang Puang Tawng	1.12 $\pm$ 0.06 bc	1.11 $\pm$ 0.04 bc	1.16 $\pm$ 0.06 bc	1.10 $\pm$ 0.08 c
Luang Prathan	1.08 $\pm$ 0.05 bc	1.15 $\pm$ 0.05 bc	1.24 $\pm$ 0.04 c	1.30 $\pm$ 0.04 c
E-Lai	1.05 $\pm$ 0.06 bc	1.05 $\pm$ 0.05 bc	1.10 $\pm$ 0.07 bc	0.87 $\pm$ 0.19 bc
Pokkali	1.28 $\pm$ 0.06 c	1.23 $\pm$ 0.06 c	1.28 $\pm$ 0.03 c	1.27 $\pm$ 0.02 c
<b>Treatment (p-value)</b>	0.028	0.040	0.000	0.000
<b>Block (p-value)</b>	0.027	0.016	0.019	0.062



ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ SI\_Fv/Fm ของการศึกษารับรองต้นในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์ (ตารางแสดงผลของวันที่ 1 ถึงวันที่ 5 หลังจากปลูกกล้าข้าวเชิงภูมิคุ้มกัน)

Cultivars	SI_Fv/Fm (Mean $\pm$ SE)				
	1 DAT	2 DAT	3 DAT	4 DAT	5 DAT
Puang Tawng	0.91 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.01
Daw Dawk Mai	1.01 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.01 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.01
Jud Mawn	1.00 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.01	1.01 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.00
Khao Gaew	1.01 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.01 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	0.71 $\pm$ 0.28
Daw Sahm Deuan	0.99 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.00	1.01 $\pm$ 0.01
IR29	1.01 $\pm$ 0.01	1.01 $\pm$ 0.02	0.68 $\pm$ 0.32	0.79 $\pm$ 0.20	0.89 $\pm$ 0.06
Mayom	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0.02
Tah Bahn	1.01 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.01 $\pm$ 0.01	1.03 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.01
Leuang Puang Tawng	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.01 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.02
Luang Prathan	0.98 $\pm$ 0.02	0.99 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.00
E-Lai	1.01 $\pm$ 0.01	1.01 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0.01
Pokkali	1.01 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.03 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01
<b>Treatment (p-value)</b>	0.474	0.867	0.482	0.424	0.444
<b>Block (p-value)</b>	0.241	0.002	0.481	0.533	0.443

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ SI\_Fv/Fm ของการศึกษารุ่นต้นในกล้าข้าวจำนวน 12 พันธุ์ (ตารางแสดงผลของวันที่ 6 ถึงวันที่ 9 หลังจากที่กล้าข้าวเผชิญกับความเค็ม)

Cultivars	SI_Fv/Fm (Mean ± SE)				
	6 DAT	7 DAT	8 DAT	9 DAT	
Puang Tawng	0.98 ± 0.01	0.69 ± 0.30	0.97 ± 0.01	0.97 ± 0.03	
Daw Dawk Mai	0.82 ± 0.17	1.01 ± 0.01	0.99 ± 0.00	0.66 ± 0.28	
Jud Mawn	0.99 ± 0.01	1.01 ± 0.01	1.00 ± 0.00	0.67 ± 0.33	
Khao Gaew	0.98 ± 0.02	0.99 ± 0.02	0.98 ± 0.02	0.69 ± 0.31	
Daw Sahm Deuan	0.99 ± 0.01	1.01 ± 0.01	0.96 ± 0.02	1.01 ± 0.01	
IR29	0.93 ± 0.08	0.69 ± 0.30	0.80 ± 0.12	0.76 ± 0.17	
Mayom	0.85 ± 0.16	0.81 ± 0.18	0.59 ± 0.27	0.43 ± 0.30	
Tah Bahn	0.95 ± 0.02	0.63 ± 0.30	0.98 ± 0.01	0.91 ± 0.07	
Leuang Puang Tawng	1.00 ± 0.00	0.99 ± 0.01	0.99 ± 0.01	0.39 ± 0.30	
Luang Prathan	1.08 ± 0.11	1.01 ± 0.01	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.01	
E-Lai	0.61 ± 0.25	1.00 ± 0.01	0.89 ± 0.10	0.35 ± 0.34	
Pokkali	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.02	0.99 ± 0.01	1.00 ± 0.01	
<b>Treatment (p-value)</b>	0.279	0.581	0.124	0.265	
<b>Block (p-value)</b>	0.533	0.457	0.428	0.105	

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของการศึกษาเพื่อยืนยันผลในกล้าข้าวจำนวน 4 พันธุ์ เมื่อข้าวได้รับความเค็ม  
เป็นเวลา 3 6 9 วัน

DAT	Parameters	Pokkali	Luang Prathan	Mayom	IR29	Treatment		Block
						(p-value)	(p-value)	
3	SI_SIS	1.50 ± 0.50	1.75 ± 0.43	2.50 ± 0.50	3.00 ± 0.00	c	0.012	0.880
	SI_SPAD	1.06 ± 0.06	1.06 ± 0.06	1.03 ± 0.10	1.15 ± 0.08		0.064	0.008
	SI_FVFM	1.01 ± 0.01	0.99 ± 0.04	0.91 ± 0.09	1.00 ± 0.02		0.164	0.475
	SI_%CMS	0.92 ± 0.18	0.97 ± 0.04	1.01 ± 0.07	0.82 ± 0.21		0.473	0.728
	SI_FW	1.20 ± 0.37	1.34 ± 0.37	1.03 ± 0.19	0.66 ± 0.32		0.106	0.328
	SI_DW	1.04 ± 0.32	1.02 ± 0.10	1.00 ± 0.17	0.96 ± 0.12		0.962	0.514
	SI_RWC	0.95 ± 0.03	0.97 ± 0.09	0.98 ± 0.09	0.94 ± 0.18		0.974	0.981
6	SI_SIS	1.50 ± 0.50	1.75 ± 0.43	2.50 ± 0.50	3.00 ± 0.00	b	0.000	0.194
	SI_SPAD	1.06 ± 0.06	1.06 ± 0.06	1.03 ± 0.10	1.15 ± 0.08	ab	0.000	0.449
	SI_FVFM	1.01 ± 0.01	0.99 ± 0.04	0.91 ± 0.09	1.00 ± 0.02		0.064	0.488
	SI_%CMS	0.92 ± 0.18	0.97 ± 0.04	1.01 ± 0.07	0.82 ± 0.21	b	0.000	0.403
	SI_FW	1.20 ± 0.37	1.34 ± 0.37	1.03 ± 0.19	0.66 ± 0.32	a	0.007	0.015
	SI_DW	1.04 ± 0.32	1.02 ± 0.10	1.00 ± 0.17	0.96 ± 0.12	a	0.007	0.007
	SI_RWC	0.95 ± 0.03	0.97 ± 0.09	0.98 ± 0.09	0.94 ± 0.18		0.084	0.736

DAT	Parameters	Luang Prathan			Mayom			IR29			Treatment		Block
		Pokkali									(p-value)	(p-value)	
9	SI_SIS	3.25 ± 0.43	a	4.25 ± 0.43	a	7.00 ± 1.22	b	8.00 ± 1.22	b	1.22 ± 1.22	b	0.000	0.030
	SI_SPAD	1.21 ± 0.07	b	1.01 ± 0.12	b	0.00 ± 0.00	a	0.12 ± 0.18	a	0.18 ± 0.18	a	0.000	0.772
	SI_FVFM	0.99 ± 0.02	b	0.84 ± 0.16	b	0.01 ± 0.01	a	0.18 ± 0.27	a	0.27 ± 0.27	a	0.000	0.667
	SI_%CMS	0.99 ± 0.04	c	0.47 ± 0.15	b	0.16 ± 0.08	a	0.27 ± 0.06	a	0.06 ± 0.06	a	0.000	0.341
	SI_FW	0.81 ± 0.23	b	0.74 ± 0.14	b	0.40 ± 0.11	a	0.17 ± 0.04	a	0.04 ± 0.04	a	0.003	0.942
	SI_DW	1.02 ± 0.31	c	0.87 ± 0.11	bc	0.57 ± 0.10	ab	0.33 ± 0.05	a	0.05 ± 0.05	a	0.006	0.782
	SI_RWC	1.02 ± 0.09	c	0.68 ± 0.21	b	0.28 ± 0.17	a	0.12 ± 0.13	a	0.13 ± 0.13	a	0.001	0.829

ตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของการศึกษานอกห้องเรียน 20 วัน จำนวน 4 พันธุ์ เมื่อชาวไร่รับ  
ภาวะเค็มเป็นเวลา 3-9 วัน สำหรับใช้ในการศึกษาเพื่อยืนยันผลกระทบของภาวะเค็มที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่ระบุได้

DAT	Parameters	Pokkali	Luang Prathan	Mayom	IR29	Treatment		Block
						(p-value)	(p-value)	
3	SI_SIS	2.50 ± 0.50	2.75 ± 0.43	3.33 ± 0.47	4.00 ± 0.00	b	0.000	0.487
	SI_SPAD	1.02 ± 0.02	1.01 ± 0.01	1.01 ± 0.01	1.01 ± 0.01	ab	0.014	0.491
	SI_FVFM <sup>ns</sup>	1.12 ± 0.01	1.10 ± 0.02	1.11 ± 0.02	1.07 ± 0.04		0.112	0.826
6	SI_SIS	3.25 ± 0.43	3.75 ± 0.43	4.33 ± 0.47	5.50 ± 0.50	b	0.032	0.920
	SI_SPAD <sup>ns</sup>	1.01 ± 0.01	1.02 ± 0.01	1.02 ± 0.01	0.97 ± 0.03		0.499	0.071
	SI_FVFM <sup>ns</sup>	1.15 ± 0.04	1.23 ± 0.04	1.18 ± 0.03	1.04 ± 0.14		0.248	0.299
9	SI_SIS	4.00 ± 0.71	4.75 ± 0.43	5.33 ± 0.94	6.50 ± 0.20	b	0.001	0.018
	SI_SPAD <sup>ns</sup>	1.01 ± 0.01	1.02 ± 0.01	0.42 ± 0.42	0.48 ± 0.47		0.531	0.715
	SI_FVFM <sup>ns</sup>	1.18 ± 0.09	1.27 ± 0.06	1.07 ± 0.27	0.93 ± 0.20		0.065	0.263
12	SI_SIS	5.00 ± 0.00	5.50 ± 0.50	6.33 ± 0.47	7.50 ± 0.50	c	0.000	0.126
	SI_SPAD	1.01 ± 0.01	0.97 ± 0.04	0.14 ± 0.12	0.02 ± 0.02	a	0.001	0.364
	SI_FVFM	1.24 ± 0.12	1.17 ± 0.12	0.88 ± 0.17	0.38 ± 0.21	a	0.000	0.649

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในการศึกษาเพื่อยืนยันผลการระบุของภาวะเค็มที่มีต่อการแสดงออกของยีน OsRCI2-5 ด้วยเทคนิค qRT-PCR ในกล้าข้าวจำนวน 4 พันธุ์ เมื่อข้าวเผชิญกับความเค็มเป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง

HAT	Cultivar	Control	Salt stress		OsRCI2-5 p-value			
			Cultivar	Condition	Interaction	Block		
0	Pokkali	1.000 ± 0.000	ab	1.044 ± 0.290	ab			
	Luang Prathan	1.355 ± 0.354	b	0.955 ± 0.246	ab	0.024	0.146	0.021
	Mayom	1.355 ± 0.577	b	1.018 ± 0.457	ab			
	IR29	0.695 ± 0.079	a	0.697 ± 0.206	a			
24	Pokkali	2.000 ± 0.315	bc	2.156 ± 0.661	c			
	Luang Prathan	0.940 ± 0.250	a	2.050 ± 0.865	bc	0.003	0.007	0.301
	Mayom	0.961 ± 0.458	a	1.248 ± 0.594	ab			0.015
	IR29	0.664 ± 0.350	a	1.403 ± 0.686	abc			
48	Pokkali	1.824 ± 0.619	a	1.683 ± 0.444	a			
	Luang Prathan	0.711 ± 0.195	a	1.776 ± 0.535	a	0.124	0.000	0.004
	Mayom	0.863 ± 0.235	a	2.224 ± 1.012	a			0.008
	IR29	0.735 ± 0.225	a	3.416 ± 1.458	a			

ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์สถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในการศึกษาเพื่อประเมินผลกระทบของภาวะเค็มที่มีต่อการแสดงออกของยีน OsRMC ด้วยเทคนิค qRT-PCR ในกล้าข้าวจำนวน 4 พันธุ์ เมื่อข้าวเมล็ดสุกกับความเค็มเป็นเวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง

HAT	Cultivar	Control	Salt stress	OsRMC p-value		
				Cultivar	Condition	Interaction
0	Pokkali	1.000 ± 0.000 a	0.962 ± 0.593 a			
	Luang Prathan	3.044 ± 1.558 b	0.962 ± 0.725 ab	0.004	0.614	0.000
	Mayom	2.125 ± 0.584 ab	0.962 ± 1.033 ab			
	IR29	0.999 ± 0.350 a	0.962 ± 1.412 a			
24	Pokkali	0.615 ± 0.088 a	3.251 ± 1.999 a			
	Luang Prathan	0.615 ± 0.417 a	31.285 ± 17.074 b	0.002	0.000	0.331
	Mayom	0.615 ± 0.807 a	5.814 ± 0.735 a			
	IR29	0.615 ± 0.726 a	8.017 ± 3.613 a			
48	Pokkali	0.849 ± 0.293 a	22.117 ± 12.994 a			
	Luang Prathan	1.153 ± 0.331 a	110.744 ± 71.443 b	0.018	0.000	0.075
	Mayom	1.356 ± 0.541 a	28.832 ± 20.519 a			
	IR29	0.774 ± 0.231 a	32.941 ± 18.668 a			





ตารางที่ 16 ข้อมูลสรุป sequencing reads ที่ map ได้กับฐานข้อมูลของ MSU 7.0 ทั้ง 36 libraries

library no.	library name	mapped reads	mapped genes	% expressed gene	alignment not unique	ambiguous	no feature	not aligned
1	C_00h_1	1100827	17147	30.63	329023	2048	128559	0
2	C_00h_2	1171160	17756	31.72	389577	2058	142111	0
3	C_00h_3	1288704	18037	32.22	229259	2149	148889	0
4	S_00h_1	758992	16622	29.69	230227	1558	92784	0
5	S_00h_2	895308	17452	31.17	248196	1610	108663	0
6	S_00h_3	1632627	18390	32.85	291070	2830	180508	0
7	C_03h_1	1255209	16999	30.36	469137	4009	158286	0
8	C_03h_2	712846	16574	29.60	176391	1337	83515	0
9	C_03h_3	1713451	18510	33.06	328986	3922	190070	0
10	S_03h_1	1499581	18262	32.62	365648	3166	175172	0
11	S_03h_2	809117	15602	27.87	349886	3772	133890	0
12	S_03h_3	1889380	18638	33.29	277567	3331	207526	0
13	C_06h_1	1116735	17871	31.92	267260	2506	135403	0
14	C_06h_2	1165174	17788	31.77	206866	2239	130437	0
15	C_06h_3	2484537	19280	34.44	300475	4979	263043	0
16	S_06h_1	1342784	18144	32.41	320901	3073	155639	0
17	S_06h_2	1087066	17645	31.52	216605	2257	124687	0

library no.	library name	mapped reads	mapped genes	% expressed gene	alignment not unique	ambiguous	no feature	not aligned
18	S_06h_3	1992620	18866	33.70	210825	4562	212718	0
19	C_12h_1	1089011	18345	32.77	390971	1302	155793	0
20	C_12h_2	1352758	18876	33.72	391921	1544	184464	0
21	C_12h_3	2334590	19829	35.42	361829	2654	292952	0
22	S_12h_1	1805443	18460	32.97	584639	2429	258295	0
23	S_12h_2	1204562	18625	33.27	359138	1332	167546	0
24	S_12h_3	2638079	20000	35.72	384204	2807	330766	0
25	C_24h_1	867953	16839	30.08	280443	1575	105009	0
26	C_24h_2	796030	16840	30.08	275247	1265	95754	0
27	C_24h_3	1147295	17272	30.85	213056	2250	124784	0
28	S_24h_1	690213	16183	28.91	208455	1289	82360	0
29	S_24h_2	1251186	18254	32.60	322660	2052	151519	0
30	S_24h_3	2078266	19290	34.46	353176	3126	239816	0
31	C_48h_1	790079	17186	30.70	261792	1399	101612	0
32	C_48h_2	941379	17310	30.92	260827	1338	117576	0
33	C_48h_3	2156279	19234	34.36	425849	2937	242252	0
34	S_48h_1	1778694	17636	31.50	548805	4658	228483	0
35	S_48h_2	2411633	19314	34.50	586494	3468	289141	0
36	S_48h_3	2121732	19149	34.20	334629	2752	237274	0

ตารางที่ 17 Down-regulated DEGs ที่วิเคราะห์ได้จากข้าวพันธุ์หลวงประทานที่เผชิญกับภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Gene	Symbol	Description	Normalized expression value [ $\log_2(\text{CPM}+4)$ ]
			—○— control —○— stress
LOC_OS01G04800	OsRAV2	AP2/ERF and B3 domain-containing protein, Salt stress response (Duan et al., 2016)	
LOC_OS01G12210	OsALMT4	Aluminum-activated malate transporter, Malate-permeable anion channel, Facilitation of malate efflux from cells. Potassium deficiency response (Shankar et al., 2013)	
LOC_OS01G74300	OsMTI-2B	RicMT (Metallothionein-like protein), cytoplasmic metal binding proteins (Pirzadeh and Shahpiri, 2016)	
LOC_OS02G07930	OsBBX2	Zinc finger, B-box domain containing protein, abiotic stress response. (Shalmani et al., 2019)	

Gene	Symbol	Description	Normalized expression value [ $\log_2(\text{CPM}+4)$ ]
<i>LOC_OS02G10920</i>	<i>SRZ1</i>	Similar to Testis expressed sequence 13A protein, stress repressive zinc finger protein 1 (Huang et al., 2008)	<p>— control — stress</p>
<i>LOC_OS02G43700</i>	<i>DAD-1</i>	Similar to Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 14 (Fragment). Putative defective in anther dehiscence1 (DAD-1), response to salt and osmotic stress in <i>Arabidopsis thaliana</i> (Ellinger and Kubigsteltig, 2010)	
<i>LOC_OS04G47360</i>	<i>OsPOP9</i>	Similar to Prolyl endopeptidase (EC 3.4.21.26) (Post-proline cleaving enzyme) (PE). Potassium deficiency response (Shankar et al., 2013) down เมื่อขาด K	
<i>LOC_OS05G34980</i>	<i>OsAAP11F</i>	Amino acid permease, Transport of amino acids	

Gene	Symbol	Description	Normalized expression value [ $\log_2(\text{CPM}+4)$ ]																					
<i>LOC_OS05G50350</i>	<i>OsMYB</i>	MYB family transcription factor, putative, expressed. (Katiyar et al., 2012)	<p>Normalized expression value [<math>\log_2(\text{CPM}+4)</math>]</p> <p>— control — stress</p> <table border="1"> <caption>Data for LOC_OS05G50350</caption> <thead> <tr> <th>HAT</th> <th>control</th> <th>stress</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>4.5</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>5.0</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>4.5</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>3.5</td><td>3.0</td></tr> <tr><td>24</td><td>4.5</td><td>4.0</td></tr> <tr><td>48</td><td>5.0</td><td>4.0</td></tr> </tbody> </table>	HAT	control	stress	0	4.5	4.5	3	5.0	4.5	6	4.5	4.5	12	3.5	3.0	24	4.5	4.0	48	5.0	4.0
HAT	control	stress																						
0	4.5	4.5																						
3	5.0	4.5																						
6	4.5	4.5																						
12	3.5	3.0																						
24	4.5	4.0																						
48	5.0	4.0																						
<i>LOC_OS06G04920</i>	<i>OsZFP1, SRZ3</i>	Similar to RNA-binding protein EWS. Zinc finger protein 1. Stress repressive zinc finger protein 3. Potassium deficiency response (Shankar et al., 2013). Repressor of salt responsive gene, response to ABA (Jin et al., 2004)	<table border="1"> <caption>Data for LOC_OS06G04920</caption> <thead> <tr> <th>HAT</th> <th>control</th> <th>stress</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>9.0</td><td>9.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>8.0</td><td>8.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>8.0</td><td>8.0</td></tr> <tr><td>12</td><td>6.5</td><td>6.0</td></tr> <tr><td>24</td><td>9.0</td><td>8.0</td></tr> <tr><td>48</td><td>8.5</td><td>6.5</td></tr> </tbody> </table>	HAT	control	stress	0	9.0	9.0	3	8.0	8.0	6	8.0	8.0	12	6.5	6.0	24	9.0	8.0	48	8.5	6.5
HAT	control	stress																						
0	9.0	9.0																						
3	8.0	8.0																						
6	8.0	8.0																						
12	6.5	6.0																						
24	9.0	8.0																						
48	8.5	6.5																						
<i>LOC_OS06G07760</i>	<i>OsSrx</i>	Sulfiredoxin-1, putative, expressed. Oxidative stress response in <i>Arabidopsis thaliana</i> (Liu et al., 2006).	<table border="1"> <caption>Data for LOC_OS06G07760</caption> <thead> <tr> <th>HAT</th> <th>control</th> <th>stress</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>7.5</td><td>7.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>7.0</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>7.0</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>12</td><td>6.5</td><td>6.0</td></tr> <tr><td>24</td><td>7.5</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>48</td><td>7.5</td><td>7.0</td></tr> </tbody> </table>	HAT	control	stress	0	7.5	7.5	3	7.0	7.0	6	7.0	7.0	12	6.5	6.0	24	7.5	7.0	48	7.5	7.0
HAT	control	stress																						
0	7.5	7.5																						
3	7.0	7.0																						
6	7.0	7.0																						
12	6.5	6.0																						
24	7.5	7.0																						
48	7.5	7.0																						
<i>LOC_OS06G08640</i>	<i>OsHCT4</i>	Transferase family protein. Hydroxycinnamoyltransferase 4	<table border="1"> <caption>Data for LOC_OS06G08640</caption> <thead> <tr> <th>HAT</th> <th>control</th> <th>stress</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>6.5</td><td>6.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>6.0</td><td>6.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>5.5</td><td>5.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>4.5</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>24</td><td>6.5</td><td>6.0</td></tr> <tr><td>48</td><td>6.5</td><td>5.5</td></tr> </tbody> </table>	HAT	control	stress	0	6.5	6.5	3	6.0	6.0	6	5.5	5.5	12	4.5	4.5	24	6.5	6.0	48	6.5	5.5
HAT	control	stress																						
0	6.5	6.5																						
3	6.0	6.0																						
6	5.5	5.5																						
12	4.5	4.5																						
24	6.5	6.0																						
48	6.5	5.5																						

Gene	Symbol	Description	Normalized expression value [ $\log_2(\text{CPM}+4)$ ]																						
			control	stress																					
<i>LOC_OS08G10080</i>	<i>OMTN6</i> , <i>ONAC104</i>	NAC transcription factor, Negative regulation of drought tolerance (Fang, Xie, and Xiong, 2014)	<table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS08G10080</caption> <thead> <tr> <th>HAT</th> <th>control</th> <th>stress</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>6.8</td><td>6.8</td></tr> <tr><td>3</td><td>5.8</td><td>5.8</td></tr> <tr><td>6</td><td>5.2</td><td>5.2</td></tr> <tr><td>12</td><td>5.5</td><td>4.8</td></tr> <tr><td>24</td><td>7.0</td><td>6.8</td></tr> <tr><td>48</td><td>7.0</td><td>5.8</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	6.8	6.8	3	5.8	5.8	6	5.2	5.2	12	5.5	4.8	24	7.0	6.8	48	7.0	5.8
HAT	control	stress																							
0	6.8	6.8																							
3	5.8	5.8																							
6	5.2	5.2																							
12	5.5	4.8																							
24	7.0	6.8																							
48	7.0	5.8																							
<i>LOC_OS09G06464</i>	<i>OsBBX27</i> , <i>OsCO3</i>	Zinc finger, B-box domain containing protein. CCT/B-box zinc finger protein. Overexpression of <i>OsBBX27</i> caused late flowering under short day. (Kim et al., 2008)	<table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS09G06464</caption> <thead> <tr> <th>HAT</th> <th>control</th> <th>stress</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>6.0</td><td>5.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>4.0</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>4.2</td><td>4.2</td></tr> <tr><td>12</td><td>2.5</td><td>2.5</td></tr> <tr><td>24</td><td>6.0</td><td>5.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>6.5</td><td>4.5</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	6.0	5.5	3	4.0	4.5	6	4.2	4.2	12	2.5	2.5	24	6.0	5.5	48	6.5	4.5
HAT	control	stress																							
0	6.0	5.5																							
3	4.0	4.5																							
6	4.2	4.2																							
12	2.5	2.5																							
24	6.0	5.5																							
48	6.5	4.5																							
<i>LOC_OS12G33120</i>	<i>DX1</i>	Hypothetical conserved gene. Green tissue-specific expression gene DX1 (Ye, Zhou, and Lin, 2012)	<table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS12G33120</caption> <thead> <tr> <th>HAT</th> <th>control</th> <th>stress</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>9.5</td><td>9.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>9.5</td><td>9.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>9.5</td><td>9.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>9.5</td><td>9.5</td></tr> <tr><td>24</td><td>9.5</td><td>9.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>9.5</td><td>9.5</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	9.5	9.5	3	9.5	9.5	6	9.5	9.5	12	9.5	9.5	24	9.5	9.5	48	9.5	9.5
HAT	control	stress																							
0	9.5	9.5																							
3	9.5	9.5																							
6	9.5	9.5																							
12	9.5	9.5																							
24	9.5	9.5																							
48	9.5	9.5																							

ตารางที่ 18 Up-regulated DEGs ที่วิเคราะห์ได้จากข้าวพันธุ์หลวงประทานที่เผชิญกับภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Gene	Symbols	Description	Normalized expression value [ $\log_2(\text{CPM}+4)$ ]
LOC_OS01G03390	BBT17	Hypothetical conserved gene, Bowman-Birk type bran trypsin inhibitor precursor, putative salt stress response (Lakra et al., 2019)	<p>Legend: control (blue line), stress (green line)</p>
LOC_OS01G13690	-	Similar to Branched-chain-amino acid aminotransferase-like protein 3, chloroplast precursor (Jeong, 2018)	<p>Legend: control (blue line), stress (green line)</p>
LOC_OS01G32780	UspA	UspA domain containing protein. Universal stress protein domain containing protein, salt stress response (Wani and Hossain, 2015)	<p>Legend: control (blue line), stress (green line)</p>
LOC_OS01G42860	OCPI2	Chymotrypsin protease inhibitor, enhance salt and osmotic stress tolerance (Singh, Sahi, and Grover, 2009; Tiwari et al., 2015)	<p>Legend: control (blue line), stress (green line)</p>

Gene	Symbols	Description	Normalized expression value [ $\log_2(\text{CPM}+4)$ ]																						
			control	stress																					
<i>LOC_OS01G43020</i>	-	CTP synthase protein, similar to salt stress response protein in Sweet sorghum ( <i>Sb03g027960</i> ) (Bergonti, 2013)	<p>LOC_OS01G43020</p> <table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS01G43020</caption> <thead> <tr> <th>HAT</th> <th>control</th> <th>stress</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>5.0</td><td>5.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>5.5</td><td>5.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>5.8</td><td>6.0</td></tr> <tr><td>12</td><td>5.5</td><td>5.8</td></tr> <tr><td>24</td><td>5.0</td><td>5.0</td></tr> <tr><td>48</td><td>4.5</td><td>5.5</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	5.0	5.0	3	5.5	5.5	6	5.8	6.0	12	5.5	5.8	24	5.0	5.0	48	4.5	5.5
HAT	control	stress																							
0	5.0	5.0																							
3	5.5	5.5																							
6	5.8	6.0																							
12	5.5	5.8																							
24	5.0	5.0																							
48	4.5	5.5																							
<i>LOC_OS01G61070</i>	<i>OsATX</i>	Heavy metal transport/detoxification protein domain containing protein, defense/stress responses in rice (Agrawal et al., 2002)	<p>LOC_OS01G61070</p> <table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS01G61070</caption> <thead> <tr> <th>HAT</th> <th>control</th> <th>stress</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>4.5</td><td>5.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>5.5</td><td>6.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>5.5</td><td>5.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>4.5</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>24</td><td>5.0</td><td>5.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>4.5</td><td>6.0</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	4.5	5.0	3	5.5	6.0	6	5.5	5.5	12	4.5	4.5	24	5.0	5.5	48	4.5	6.0
HAT	control	stress																							
0	4.5	5.0																							
3	5.5	6.0																							
6	5.5	5.5																							
12	4.5	4.5																							
24	5.0	5.5																							
48	4.5	6.0																							
<i>LOC_OS02G01240</i>	<i>CPuORF11</i>	Conserved peptide uORF-containing transcript, Ankyrin repeat containing protein	<p>LOC_OS02G01240</p> <table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS02G01240</caption> <thead> <tr> <th>HAT</th> <th>control</th> <th>stress</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>6.5</td><td>6.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>7.0</td><td>7.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>7.0</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>12</td><td>6.5</td><td>6.5</td></tr> <tr><td>24</td><td>7.0</td><td>7.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>6.5</td><td>7.5</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	6.5	6.5	3	7.0	7.5	6	7.0	7.0	12	6.5	6.5	24	7.0	7.5	48	6.5	7.5
HAT	control	stress																							
0	6.5	6.5																							
3	7.0	7.5																							
6	7.0	7.0																							
12	6.5	6.5																							
24	7.0	7.5																							
48	6.5	7.5																							
<i>LOC_OS02G39930</i>	<i>OstIL-1</i>	Temperature-induced lipocalin-1, shared drought-adaptive DEGs across-species (Arabidopsis, rice, wheat and barley) (Shaar-Moshe, Hübner, and Peleg, 2015) DEG of 2 contrasting rice genotype (NPBA and LYP9) under salt stress (Hussain et al., 2019)	<p>LOC_OS02G39930</p> <table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS02G39930</caption> <thead> <tr> <th>HAT</th> <th>control</th> <th>stress</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>6.5</td><td>6.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>7.0</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>7.5</td><td>7.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>8.5</td><td>9.0</td></tr> <tr><td>24</td><td>6.5</td><td>6.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>6.5</td><td>7.5</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	6.5	6.5	3	7.0	7.0	6	7.5	7.5	12	8.5	9.0	24	6.5	6.5	48	6.5	7.5
HAT	control	stress																							
0	6.5	6.5																							
3	7.0	7.0																							
6	7.5	7.5																							
12	8.5	9.0																							
24	6.5	6.5																							
48	6.5	7.5																							



Gene	Symbols	Description	Normalized expression value [ $\log_2(\text{CPM}+4)$ ]																					
<i>LOC_OS02G44980</i>	<i>OsANT3</i>	Similar to amino acid transport protein, aromatic and neutral amino acid transporter 3 (Zhao et al., 2012)	<p>Normalized expression value [<math>\log_2(\text{CPM}+4)</math>]</p> <p>— control — stress</p> <table border="1"> <caption>Data for LOC_OS02G44980</caption> <thead> <tr> <th>HAT</th> <th>control</th> <th>stress</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>7.8</td><td>7.8</td></tr> <tr><td>3</td><td>7.5</td><td>7.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>7.5</td><td>7.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>7.0</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>24</td><td>8.0</td><td>8.0</td></tr> <tr><td>48</td><td>8.0</td><td>8.5</td></tr> </tbody> </table>	HAT	control	stress	0	7.8	7.8	3	7.5	7.5	6	7.5	7.5	12	7.0	7.0	24	8.0	8.0	48	8.0	8.5
HAT	control	stress																						
0	7.8	7.8																						
3	7.5	7.5																						
6	7.5	7.5																						
12	7.0	7.0																						
24	8.0	8.0																						
48	8.0	8.5																						
<i>LOC_OS02G51930</i>	-	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase domain containing protein, cytokinin-O-glucosyltransferase 2, shared drought-adaptive DEGs across-species (Arabidopsis, rice, wheat and barley) (Shaar-Moshe, Hübner, and Peleg, 2015)	<table border="1"> <caption>Data for LOC_OS02G51930</caption> <thead> <tr> <th>HAT</th> <th>control</th> <th>stress</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>6.0</td><td>6.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>7.5</td><td>8.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>7.0</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>12</td><td>4.5</td><td>5.5</td></tr> <tr><td>24</td><td>6.0</td><td>6.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>6.0</td><td>7.5</td></tr> </tbody> </table>	HAT	control	stress	0	6.0	6.0	3	7.5	8.0	6	7.0	7.0	12	4.5	5.5	24	6.0	6.5	48	6.0	7.5
HAT	control	stress																						
0	6.0	6.0																						
3	7.5	8.0																						
6	7.0	7.0																						
12	4.5	5.5																						
24	6.0	6.5																						
48	6.0	7.5																						
<i>LOC_OS02G53180</i>	<i>OsACO3</i>	ACC oxidase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase protein, Ethylene biosynthesis (Rzewuski and Sauter, 2008)	<table border="1"> <caption>Data for LOC_OS02G53180</caption> <thead> <tr> <th>HAT</th> <th>control</th> <th>stress</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>6.0</td><td>6.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>6.5</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>6.5</td><td>6.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>6.5</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>24</td><td>6.0</td><td>6.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>5.5</td><td>7.0</td></tr> </tbody> </table>	HAT	control	stress	0	6.0	6.0	3	6.5	7.0	6	6.5	6.5	12	6.5	7.0	24	6.0	6.5	48	5.5	7.0
HAT	control	stress																						
0	6.0	6.0																						
3	6.5	7.0																						
6	6.5	6.5																						
12	6.5	7.0																						
24	6.0	6.5																						
48	5.5	7.0																						
<i>LOC_OS02G57720</i>	<i>OsPIP1-3, RWC3</i>	Plasma membrane intrinsic protein, Promotion of plant tolerance to water deficit and growth, aquaporin protein (Lian et al., 2004; Silveira et al., 2015; Liu et al., 2019)	<table border="1"> <caption>Data for LOC_OS02G57720</caption> <thead> <tr> <th>HAT</th> <th>control</th> <th>stress</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>10.0</td><td>10.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>10.5</td><td>11.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>10.0</td><td>10.0</td></tr> <tr><td>12</td><td>7.0</td><td>8.0</td></tr> <tr><td>24</td><td>10.0</td><td>10.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>9.5</td><td>11.0</td></tr> </tbody> </table>	HAT	control	stress	0	10.0	10.0	3	10.5	11.0	6	10.0	10.0	12	7.0	8.0	24	10.0	10.5	48	9.5	11.0
HAT	control	stress																						
0	10.0	10.0																						
3	10.5	11.0																						
6	10.0	10.0																						
12	7.0	8.0																						
24	10.0	10.5																						
48	9.5	11.0																						

Gene	Symbols	Description	Normalized expression value [ $\log_2(\text{CPM}+4)$ ]	
			control	stress
<i>LOC_OS03G03810</i>	<i>OsDEFL8</i> , <i>OsDf-08</i>	Similar to Cp-thionin. Defensin and Defensin-like DEFL family (Weerawanich et al., 2018)		
<i>LOC_OS03G15860</i>	-	Mitochondrial substrate carrier family protein.		
<i>LOC_OS03G17790</i>	<i>OsRCI2-5</i>	RCI2 (rare cold-inducible 2) family protein, drought resistance, putative low temperature and salt responsive protein (Li et al., 2014)		
<i>LOC_OS03G48780</i>	<i>OsOxO4</i> , <i>OsGLP3-6</i> , <i>GLP3-6</i>	oxalate oxidase 4, german-like protein 3-6, similar to Oxalate oxidase 1 (EC 1.2.3.4) (Germin). Cupin domain containing protein, putative salt stress response (Kong et al., 2019)		

Gene	Symbols	Description	Normalized expression value [ $\log_2(\text{CPM}+4)$ ]																					
<i>LOC_OS03G52370</i>	<i>P1114</i>	Conserved hypothetical protein, Proteinase inhibitor II family protein precursor, associated with bacterial blight resistance (Jung et al., 2014)	<p>Legend: control (blue line), stress (green line)</p> <table border="1"> <caption>Normalized expression data for LOC_OS03G52370</caption> <thead> <tr> <th>HAT</th> <th>control</th> <th>stress</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>3.5</td><td>3.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>3.5</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>3.5</td><td>3.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>3.5</td><td>3.5</td></tr> <tr><td>24</td><td>3.5</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>3.5</td><td>5.5</td></tr> </tbody> </table>	HAT	control	stress	0	3.5	3.5	3	3.5	4.5	6	3.5	3.5	12	3.5	3.5	24	3.5	4.5	48	3.5	5.5
HAT	control	stress																						
0	3.5	3.5																						
3	3.5	4.5																						
6	3.5	3.5																						
12	3.5	3.5																						
24	3.5	4.5																						
48	3.5	5.5																						
<i>LOC_OS03G52660</i>	-	ATP synthase F1, delta subunit family protein	<table border="1"> <caption>Normalized expression data for LOC_OS03G52660</caption> <thead> <tr> <th>HAT</th> <th>control</th> <th>stress</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>7.0</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>7.0</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>7.0</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>12</td><td>7.0</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>24</td><td>7.0</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>48</td><td>7.0</td><td>7.0</td></tr> </tbody> </table>	HAT	control	stress	0	7.0	7.0	3	7.0	7.0	6	7.0	7.0	12	7.0	7.0	24	7.0	7.0	48	7.0	7.0
HAT	control	stress																						
0	7.0	7.0																						
3	7.0	7.0																						
6	7.0	7.0																						
12	7.0	7.0																						
24	7.0	7.0																						
48	7.0	7.0																						
<i>LOC_OS04G03164</i>	-	Hypothetical conserved gene, putative abiotic stress responses, up-regulated gene in <i>OsNAC5</i> overexpressing transgenic plants (Takasaki et al., 2010)	<table border="1"> <caption>Normalized expression data for LOC_OS04G03164</caption> <thead> <tr> <th>HAT</th> <th>control</th> <th>stress</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>3.5</td><td>3.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>3.5</td><td>3.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>3.5</td><td>3.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>3.5</td><td>5.5</td></tr> <tr><td>24</td><td>3.5</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>3.5</td><td>5.5</td></tr> </tbody> </table>	HAT	control	stress	0	3.5	3.5	3	3.5	3.5	6	3.5	3.5	12	3.5	5.5	24	3.5	4.5	48	3.5	5.5
HAT	control	stress																						
0	3.5	3.5																						
3	3.5	3.5																						
6	3.5	3.5																						
12	3.5	5.5																						
24	3.5	4.5																						
48	3.5	5.5																						
<i>LOC_OS04G43200</i>	<i>EFA27</i>	EFA27 for EF hand, abscisic acid responsive 27-kDa protein, Caleosin related protein, response to osmotic stress and ABA (Frandsen et al., 1996)	<table border="1"> <caption>Normalized expression data for LOC_OS04G43200</caption> <thead> <tr> <th>HAT</th> <th>control</th> <th>stress</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>3.5</td><td>3.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>3.5</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>3.5</td><td>3.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>3.5</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>24</td><td>3.5</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>3.5</td><td>5.5</td></tr> </tbody> </table>	HAT	control	stress	0	3.5	3.5	3	3.5	4.5	6	3.5	3.5	12	3.5	4.5	24	3.5	4.5	48	3.5	5.5
HAT	control	stress																						
0	3.5	3.5																						
3	3.5	4.5																						
6	3.5	3.5																						
12	3.5	4.5																						
24	3.5	4.5																						
48	3.5	5.5																						

Gene	Symbols	Description	Normalized expression value [ $\log_2(\text{CPM}+4)$ ]																						
			control	stress																					
<i>LOC_OS04G56430</i>	<i>OsRMC</i> , <i>OsRLK</i> , <i>OsDUF26</i>	Receptor-like protein, Root development, Salt stress response, Regulation of iron acquisition, cysteine-rich receptor-like protein kinase (Jiang et al., 2007; Zhang et al., 2009; Serra et al., 2013; Yang et al., 2013)	<table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS04G56430</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>3.5</td><td>3.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>3.0</td><td>3.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>3.0</td><td>3.0</td></tr> <tr><td>12</td><td>3.5</td><td>5.0</td></tr> <tr><td>24</td><td>3.0</td><td>5.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>2.5</td><td>6.0</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	3.5	3.5	3	3.0	3.0	6	3.0	3.0	12	3.5	5.0	24	3.0	5.5	48	2.5	6.0
HAT	control	stress																							
0	3.5	3.5																							
3	3.0	3.0																							
6	3.0	3.0																							
12	3.5	5.0																							
24	3.0	5.5																							
48	2.5	6.0																							
<i>LOC_OS05G01270</i>	<i>OsCYP20-2</i> , <i>OsCYP-11</i>	Cyclophilin, Mediation of chilling tolerance and cell elongation, abiotic stress response (Kim et al., 2012; Ge et al., 2020)	<table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS05G01270</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>8.5</td><td>8.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>8.5</td><td>8.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>8.5</td><td>8.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>8.5</td><td>8.5</td></tr> <tr><td>24</td><td>8.0</td><td>8.0</td></tr> <tr><td>48</td><td>7.0</td><td>8.0</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	8.5	8.5	3	8.5	8.5	6	8.5	8.5	12	8.5	8.5	24	8.0	8.0	48	7.0	8.0
HAT	control	stress																							
0	8.5	8.5																							
3	8.5	8.5																							
6	8.5	8.5																							
12	8.5	8.5																							
24	8.0	8.0																							
48	7.0	8.0																							
<i>LOC_OS05G29710</i>	<i>EL5-like</i>	Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type domain containing protein, RING-H2 finger protein, encoding an E3 ubiquitin ligase, putative nitrogen-sensitive genes in roots (Hsieh et al., 2018)	<table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS05G29710</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>4.5</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>4.0</td><td>4.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>4.0</td><td>4.0</td></tr> <tr><td>12</td><td>6.0</td><td>7.5</td></tr> <tr><td>24</td><td>5.0</td><td>6.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>4.0</td><td>6.5</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	4.5	4.5	3	4.0	4.0	6	4.0	4.0	12	6.0	7.5	24	5.0	6.5	48	4.0	6.5
HAT	control	stress																							
0	4.5	4.5																							
3	4.0	4.0																							
6	4.0	4.0																							
12	6.0	7.5																							
24	5.0	6.5																							
48	4.0	6.5																							
<i>LOC_OS05G31140</i>	<i>OsEGL1</i> , <i>OsPR2</i> , <i>Gns1</i>	Beta-glucanase precursor; response to wounding, methyl jasmonate, abscisic acid, and ethephon in rice seedlings (Akiyama et al., 2009)	<table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS05G31140</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>7.0</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>6.5</td><td>6.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>5.0</td><td>5.0</td></tr> <tr><td>12</td><td>6.0</td><td>6.5</td></tr> <tr><td>24</td><td>7.5</td><td>8.0</td></tr> <tr><td>48</td><td>7.5</td><td>8.5</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	7.0	7.0	3	6.5	6.5	6	5.0	5.0	12	6.0	6.5	24	7.5	8.0	48	7.5	8.5
HAT	control	stress																							
0	7.0	7.0																							
3	6.5	6.5																							
6	5.0	5.0																							
12	6.0	6.5																							
24	7.5	8.0																							
48	7.5	8.5																							

Gene	Symbols	Description	Normalized expression value [ $\log_2(\text{CPM}+4)$ ]	
			control	stress
<i>LOC_OS05G36290</i>	<i>Actin1</i>	rice <i>Actin 1</i>		
<i>LOC_OS05G46480</i>	<i>OsLEA3-1</i> , <i>OsLEA3</i>	Similar to Isoform 2 of Late embryogenesis abundant protein, group 3, LEA-like protein (Moons, De Keyser, and Van Montagu, 1997; Xiao et al., 2007)		
<i>LOC_OS06G09900</i>	<i>DUF1677</i>	Expressed protein, protein of unknown function (DUF1677)		
<i>LOC_OS06G35960</i>	<i>HSFC2B</i>	Similar to Heat stress transcription factor C-2b, HSF-type DNA-binding domain containing protein (Wang, Zhang, and Shou, 2009), was upregulated under drought in barley (Reddy et al., 2014)		

Gene	Symbols	Description	Normalized expression value [ $\log_2(\text{CPM}+4)$ ]																						
			control	stress																					
<i>LOC_OS06G46740</i>	<i>OsELA3</i> , <i>ELA3</i> , <i>OsENODL18</i>	Cupredoxin domain containing protein, early nodulin-like protein 18, early nodulin-like arabinogalactan protein 3, were up-regulated by drought and ABA treatment. (Mareri, Romi, and Cai, 2019)	<table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS06G46740</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>4.0</td><td>3.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>3.5</td><td>3.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>3.5</td><td>3.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>3.0</td><td>4.0</td></tr> <tr><td>24</td><td>3.0</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>3.0</td><td>5.0</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	4.0	3.0	3	3.5	3.5	6	3.5	3.5	12	3.0	4.0	24	3.0	4.5	48	3.0	5.0
HAT	control	stress																							
0	4.0	3.0																							
3	3.5	3.5																							
6	3.5	3.5																							
12	3.0	4.0																							
24	3.0	4.5																							
48	3.0	5.0																							
<i>LOC_OS07G03180</i>	<i>GCRP3</i>	Glycine and cysteine rich family protein precursor, similar to cold shock protein-1,	<table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS07G03180</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>5.0</td><td>5.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>5.5</td><td>5.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>5.5</td><td>5.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>6.0</td><td>6.0</td></tr> <tr><td>24</td><td>5.5</td><td>5.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>5.0</td><td>6.0</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	5.0	5.0	3	5.5	5.5	6	5.5	5.5	12	6.0	6.0	24	5.5	5.5	48	5.0	6.0
HAT	control	stress																							
0	5.0	5.0																							
3	5.5	5.5																							
6	5.5	5.5																							
12	6.0	6.0																							
24	5.5	5.5																							
48	5.0	6.0																							
<i>LOC_OS07G26630</i>	<i>OsPIP2-4</i>	Aquaporin PIP2-4, Plasma membrane intrinsic protein 2-4, similar to Plasma membrane integral protein ZmPIP2-6, response to salt and ABA treatment (Guo et al., 2006)	<table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS07G26630</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>5.0</td><td>5.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>5.5</td><td>6.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>4.5</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>2.0</td><td>2.0</td></tr> <tr><td>24</td><td>4.0</td><td>4.0</td></tr> <tr><td>48</td><td>4.0</td><td>5.0</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	5.0	5.0	3	5.5	6.0	6	4.5	4.5	12	2.0	2.0	24	4.0	4.0	48	4.0	5.0
HAT	control	stress																							
0	5.0	5.0																							
3	5.5	6.0																							
6	4.5	4.5																							
12	2.0	2.0																							
24	4.0	4.0																							
48	4.0	5.0																							
<i>LOC_OS08G03290</i>	<i>OsGAPC3</i> , <i>OsGAPDH1</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, plays important roles in salt stress tolerance in rice (Zhang et al., 2011)	<table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS08G03290</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>10.0</td><td>10.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>10.5</td><td>10.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>11.0</td><td>11.0</td></tr> <tr><td>12</td><td>10.0</td><td>10.0</td></tr> <tr><td>24</td><td>10.0</td><td>10.0</td></tr> <tr><td>48</td><td>10.0</td><td>11.0</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	10.0	10.0	3	10.5	10.5	6	11.0	11.0	12	10.0	10.0	24	10.0	10.0	48	10.0	11.0
HAT	control	stress																							
0	10.0	10.0																							
3	10.5	10.5																							
6	11.0	11.0																							
12	10.0	10.0																							
24	10.0	10.0																							
48	10.0	11.0																							

Gene	Symbols	Description	Normalized expression value [ $\log_2(\text{CPM}+4)$ ]																						
			control	stress																					
<i>LOC_OS08G32980</i>	-	Hypothetical conserved gene, similar to DRP2 protein (Fragment)	<table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS08G32980</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>8.0</td><td>8.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>8.5</td><td>8.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>8.0</td><td>8.0</td></tr> <tr><td>12</td><td>7.5</td><td>7.5</td></tr> <tr><td>24</td><td>8.5</td><td>8.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>8.5</td><td>9.0</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	8.0	8.0	3	8.5	8.5	6	8.0	8.0	12	7.5	7.5	24	8.5	8.5	48	8.5	9.0
HAT	control	stress																							
0	8.0	8.0																							
3	8.5	8.5																							
6	8.0	8.0																							
12	7.5	7.5																							
24	8.5	8.5																							
48	8.5	9.0																							
<i>LOC_OS08G42590</i>	-	Stress up-regulated Nod 19 family protein, similar to MtN19, is relevant for common bean plants to cope with oxidative stress (Naya et al., 2014)	<table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS08G42590</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>6.0</td><td>6.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>6.5</td><td>6.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>7.5</td><td>7.8</td></tr> <tr><td>12</td><td>7.0</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>24</td><td>6.0</td><td>6.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>5.5</td><td>6.5</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	6.0	6.0	3	6.5	6.5	6	7.5	7.8	12	7.0	7.0	24	6.0	6.5	48	5.5	6.5
HAT	control	stress																							
0	6.0	6.0																							
3	6.5	6.5																							
6	7.5	7.8																							
12	7.0	7.0																							
24	6.0	6.5																							
48	5.5	6.5																							
<i>LOC_OS09G09930</i>	-	Heavy metal transport/detoxification protein domain containing protein. DEG of 2 contrasting rice genotype (IR64 and PL177) under salt stress (Wang et al., 2016)	<table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS09G09930</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>7.0</td><td>7.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>8.0</td><td>8.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>8.0</td><td>8.0</td></tr> <tr><td>12</td><td>5.5</td><td>5.5</td></tr> <tr><td>24</td><td>6.5</td><td>6.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>6.5</td><td>7.5</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	7.0	7.5	3	8.0	8.5	6	8.0	8.0	12	5.5	5.5	24	6.5	6.5	48	6.5	7.5
HAT	control	stress																							
0	7.0	7.5																							
3	8.0	8.5																							
6	8.0	8.0																							
12	5.5	5.5																							
24	6.5	6.5																							
48	6.5	7.5																							
<i>LOC_OS09G12290</i>	-	Similar to Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase 2, chloroplast precursor (AK-HD 2) (AK-HSDH 2)	<table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS09G12290</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>5.0</td><td>5.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>4.5</td><td>4.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>4.0</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>3.0</td><td>3.0</td></tr> <tr><td>24</td><td>5.0</td><td>5.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>4.5</td><td>5.5</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	5.0	5.5	3	4.5	4.0	6	4.0	4.5	12	3.0	3.0	24	5.0	5.5	48	4.5	5.5
HAT	control	stress																							
0	5.0	5.5																							
3	4.5	4.0																							
6	4.0	4.5																							
12	3.0	3.0																							
24	5.0	5.5																							
48	4.5	5.5																							

Gene	Symbols	Description	Normalized expression value [ $\log_2(\text{CPM}+4)$ ]																						
			control	stress																					
<i>LOC_OS09G27260</i>	-	Similar to plant viral-response family protein; can be regulated by ABA independent drought responsive TF ( <i>OsNF-YA7</i> ) (Lee et al., 2015)	<table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS09G27260</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>3.5</td><td>3.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>3.5</td><td>4.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>3.5</td><td>3.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>3.0</td><td>3.5</td></tr> <tr><td>24</td><td>3.5</td><td>4.0</td></tr> <tr><td>48</td><td>3.0</td><td>5.0</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	3.5	3.5	3	3.5	4.0	6	3.5	3.5	12	3.0	3.5	24	3.5	4.0	48	3.0	5.0
HAT	control	stress																							
0	3.5	3.5																							
3	3.5	4.0																							
6	3.5	3.5																							
12	3.0	3.5																							
24	3.5	4.0																							
48	3.0	5.0																							
<i>LOC_OS09G31478</i>	<i>OsPILS1</i> , <i>PILS1</i>	Auxin efflux carrier domain containing protein, PIN likes 1 (Mohanta, Mohanta, and Bae, 2015)	<table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS09G31478</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>3.5</td><td>3.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>3.5</td><td>3.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>3.0</td><td>3.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>3.5</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>24</td><td>3.5</td><td>4.0</td></tr> <tr><td>48</td><td>3.5</td><td>5.5</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	3.5	3.5	3	3.5	3.5	6	3.0	3.5	12	3.5	4.5	24	3.5	4.0	48	3.5	5.5
HAT	control	stress																							
0	3.5	3.5																							
3	3.5	3.5																							
6	3.0	3.5																							
12	3.5	4.5																							
24	3.5	4.0																							
48	3.5	5.5																							
<i>LOC_OS10G25130</i>	<i>OsAlaAT1</i>	Alanine aminotransferase, starch synthesis in developing seeds, rapid conversion of alanine to pyruvate during recovery from low-oxygen stress in <i>Arabidopsis thaliana</i> (Miyashita et al., 2007)	<table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS10G25130</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>4.5</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>4.5</td><td>5.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>4.5</td><td>5.0</td></tr> <tr><td>12</td><td>4.5</td><td>5.5</td></tr> <tr><td>24</td><td>4.5</td><td>5.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>4.5</td><td>6.0</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	4.5	4.5	3	4.5	5.0	6	4.5	5.0	12	4.5	5.5	24	4.5	5.5	48	4.5	6.0
HAT	control	stress																							
0	4.5	4.5																							
3	4.5	5.0																							
6	4.5	5.0																							
12	4.5	5.5																							
24	4.5	5.5																							
48	4.5	6.0																							
<i>LOC_OS10G31330</i>	<i>OsGRP-2</i> , <i>Osgrp-2</i> , <i>GRP</i> , <i>GRCWP</i>	Similar to Glycine-rich cell wall structural protein 2 precursor, retrotransposon protein (Liu et al., 2003a; Liu et al., 2003b)	<table border="1"> <caption>Normalized expression for LOC_OS10G31330</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>7.5</td><td>7.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>7.5</td><td>7.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>7.5</td><td>7.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>7.5</td><td>7.5</td></tr> <tr><td>24</td><td>7.5</td><td>7.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>7.0</td><td>8.5</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	7.5	7.5	3	7.5	7.5	6	7.5	7.5	12	7.5	7.5	24	7.5	7.5	48	7.0	8.5
HAT	control	stress																							
0	7.5	7.5																							
3	7.5	7.5																							
6	7.5	7.5																							
12	7.5	7.5																							
24	7.5	7.5																							
48	7.0	8.5																							



Gene	Symbols	Description	Normalized expression value [ $\log_2(\text{CPM}+4)$ ]	
			control	stress
<i>LOC_OS10G35370</i>	<i>FGL</i> , <i>OsPorB</i> , <i>OsPORB</i>	Faded Green Leaf, Similar to Protochlorophyllide reductase B, chloroplastic. NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase, Chlorophyll synthesis (Sakuraba et al., 2013; Kwon et al., 2017)		
<i>LOC_OS11G01530</i>	<i>OsFER1</i> , <i>OsFer1</i>	Similar to Ferritin 1, chloroplast precursor (Stein, Ricachenevsky, and Fett, 2009) associated with the excess ROS in chloroplast (Deák et al., 1999) expressed in <i>Thellungiella halophila</i> to salinity stress (Gao et al., 2008)		
<i>LOC_OS11G24070</i>	<i>OsLTP1.14</i> , <i>LTPL10</i>	Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor, Similar to Lipid transfer protein LPT III. type 1 non-specific lipid transfer protein 14, shared drought-adaptive DEGs across-species (Arabidopsis, rice, wheat and barley) (Shaar-Moshe, Hübner, and Peleg, 2015)		
<i>LOC_OS11G26790</i>	<i>OsRAB21</i> , <i>OsRab16A</i> , <i>OsLEA29</i>	Dehydrin, similar to water-stress inducible protein RAB21, responsive to ABA gene 16A, late embryogenesis abundant protein 29; response to ABA, drought, and salt stress (Mundy and Chua, 1988; Ganguly et al., 2012; Xiong et al., 2014)		

Gene	Symbols	Description	Normalized expression value [ $\log_2(\text{CPM}+4)$ ]																						
			control	stress																					
<i>LOC_OS12G07650</i>	<i>OsGRX27</i> , <i>OsGrx_S16</i>	Similar to Glutaredoxin-like protein. Glutaredoxin subgroup II. Response to ABA (Garg et al., 2010)	<table border="1"> <caption>Approximate data for LOC_OS12G07650</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>7.0</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>7.0</td><td>7.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>7.5</td><td>8.0</td></tr> <tr><td>12</td><td>8.0</td><td>8.0</td></tr> <tr><td>24</td><td>6.5</td><td>6.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>6.0</td><td>6.5</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	7.0	7.0	3	7.0	7.0	6	7.5	8.0	12	8.0	8.0	24	6.5	6.5	48	6.0	6.5
HAT	control	stress																							
0	7.0	7.0																							
3	7.0	7.0																							
6	7.5	8.0																							
12	8.0	8.0																							
24	6.5	6.5																							
48	6.0	6.5																							
<i>LOC_OS12G25090</i>	<i>OsSci1</i> , <i>OsPR6</i>	Similar to MPI, pathogenesis-related 6 (Gómez-Ariza et al., 2007)	<table border="1"> <caption>Approximate data for LOC_OS12G25090</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>4.5</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>3</td><td>3.5</td><td>3.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>2.5</td><td>2.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>3.5</td><td>4.0</td></tr> <tr><td>24</td><td>5.0</td><td>5.5</td></tr> <tr><td>48</td><td>4.0</td><td>6.0</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	4.5	4.5	3	3.5	3.5	6	2.5	2.5	12	3.5	4.0	24	5.0	5.5	48	4.0	6.0
HAT	control	stress																							
0	4.5	4.5																							
3	3.5	3.5																							
6	2.5	2.5																							
12	3.5	4.0																							
24	5.0	5.5																							
48	4.0	6.0																							
<i>LOC_OS12G36830</i>	<i>OsPBZ14</i> , <i>RSOsPR10</i> ,	Similar to Probenazole-inducible protein PBZ1, pathogenesis-related Bet v I family protein PR10. response to environmental stresses via JA/ethylene & SA signaling pathways in rice roots, might be regulated by <i>OsRMC</i> (Hashimoto et al., 2004; Jiang et al., 2007; Takeuchi et al., 2011)	<table border="1"> <caption>Approximate data for LOC_OS12G36830</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>4.0</td><td>3.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>4.5</td><td>4.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>4.0</td><td>4.0</td></tr> <tr><td>12</td><td>5.0</td><td>5.0</td></tr> <tr><td>24</td><td>3.5</td><td>4.0</td></tr> <tr><td>48</td><td>3.0</td><td>4.5</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	4.0	3.0	3	4.5	4.5	6	4.0	4.0	12	5.0	5.0	24	3.5	4.0	48	3.0	4.5
HAT	control	stress																							
0	4.0	3.0																							
3	4.5	4.5																							
6	4.0	4.0																							
12	5.0	5.0																							
24	3.5	4.0																							
48	3.0	4.5																							
<i>LOC_OS12G36880</i>	<i>OsPBZ1</i> , <i>OsPR10a</i> ,	Pathogen resistance protein PBZ1, 17 kDa RNase, Disease resistance, pathogenesis-related Bet v I family protein PR10A, putative response to drought stress (Gayen et al., 2019)	<table border="1"> <caption>Approximate data for LOC_OS12G36880</caption> <thead> <tr><th>HAT</th><th>control</th><th>stress</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>7.0</td><td>6.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>7.5</td><td>7.5</td></tr> <tr><td>6</td><td>7.5</td><td>7.5</td></tr> <tr><td>12</td><td>8.0</td><td>8.5</td></tr> <tr><td>24</td><td>6.5</td><td>8.0</td></tr> <tr><td>48</td><td>6.5</td><td>9.5</td></tr> </tbody> </table>		HAT	control	stress	0	7.0	6.0	3	7.5	7.5	6	7.5	7.5	12	8.0	8.5	24	6.5	8.0	48	6.5	9.5
HAT	control	stress																							
0	7.0	6.0																							
3	7.5	7.5																							
6	7.5	7.5																							
12	8.0	8.5																							
24	6.5	8.0																							
48	6.5	9.5																							



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## บรรณานุกรม

- Abo-Ogiala, A., Carsjens, C., Diekmann, H., Fayyaz, P., Herrfurth, C., et al. 2014. Temperature-induced lipocalin (TIL) is translocated under salt stress and protects chloroplasts from ion toxicity. Journal of plant physiology 171: 250-259.
- Adams, M. D., Kelley, J. M., Gocayne, J. D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M. H., et al. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. Science 252: 1651-1656.
- Agrawal, G. K., Rakwal, R., Jwa, N. S., and Agrawal, V. P. 2002. Characterization of a novel rice gene *OsATX* and modulation of its expression by components of the stress signalling pathways. Physiologia Plantarum 116: 87-95.
- Akiyama, T., Jin, S., Yoshida, M., Hoshino, T., Opassiri, R., et al. 2009. Expression of an endo-(1, 3; 1, 4)- $\beta$ -glucanase in response to wounding, methyl jasmonate, abscisic acid and ethephon in rice seedlings. Journal of Plant Physiology 166: 1814-1825.
- Anders, S., Pyl, P. T., and Huber, W. 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics 31: 166-169.
- Aoki, K., Ogata, Y., and Shibata, D. 2007. Approaches for extracting practical information from gene co-expression networks in plant biology. Plant and Cell Physiology 48: 381-390.
- Ayers, R. S. 1975. Prognosis of salinity and alkalinity: Interpretation of quality of water for irrigation FAO Soils Bulletin 31: 221-240.
- Azuaje, F. J. 2014. Selecting biologically informative genes in co-expression networks with a centrality score. Biology direct 9: 12.
- Babu, R. C., Zhang, J., Blum, A., Ho, T.-H. D., Wu, R., et al. 2004. HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. Plant Science 166: 855-862.
- Bergonti, M. 2013. Physiological and Molecular Analysis of Drought Response in Sweet Sorghum. Doctoral Thesis, Doctoral School on the Agro-Food System,

Università Cattolica del Sacro Cuore.

- Buchanan, B. B., Gruissem, W., and Jones, R. L. 2015. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. 2nd Edition. Chichester, WS: John Wiley & Sons, Ltd.
- Chae, H. S., Cho, Y. G., Park, M. Y., Lee, M. C., Eun, M. Y., et al. 2000. Hormonal cross-talk between auxin and ethylene differentially regulates the expression of two members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). Plant and Cell Physiology 41: 354-362.
- Csardi, G., and Nepusz, T. 2006. The igraph software package for complex network research. Inter Journal, Complex Systems 1695: 1-9.
- Deák, M., Horváth, G. V., Davletova, S., Török, K., Sass, L., et al. 1999. Plants ectopically expressing the ironbinding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. Nature Biotechnology 17: 192-196.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., et al. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics 29: 15-21.
- Duan, Y. B., Li, J., Qin, R. Y., Xu, R. F., Li, H., et al. 2016. Identification of a regulatory element responsible for salt induction of rice *OsRAV2* through *ex situ* and *in situ* promoter analysis. Plant Molecular Biology 90: 49-62.
- Dutta, B., Snyder, R., and Klapa, M. I. 2007. Significance analysis of time-series transcriptomic data: A methodology that enables the identification and further exploration of the differentially expressed genes at each time-point. Biotechnology and Bioengineering 98: 668-678.
- Duwayri, M., Tran, D., and Nguyen, V. 1999. Reflections on yield gaps in rice production. International Rice Commission Newsletter 48: 13-26.
- Ellinger, D., and Kubigsteltig, I. I. 2010. Involvement of *DAD1-like lipases* in response to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. Plant Signaling & Behavior 5: 1269-1271.
- Elo, L. L., Järvenpää, H., Orešič, M., Lahesmaa, R., and Aittokallio, T. 2007. Systematic construction of gene coexpression networks with applications to human T helper cell differentiation process. Bioinformatics 23: 2096-2103.
- Fahimirad, S., and Ghorbanpour, M. 2019. Omics approaches in developing abiotic stress

- tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). In M. Hasanuzzaman, Fujita, M., Nahar, K., and Biswas, J. K. (ed.), Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance, pp. 767-779. Sawston, UK: Woodhead Publishing.
- Fang, Y., Xie, K., and Xiong, L. 2014. Conserved *miR164*-targeted *NAC* genes negatively regulate drought resistance in rice. Journal of Experimental Botany 65: 2119-2135.
- Frandsen, G., Müller-Uri, F., Nielsen, M., Mundy, J., and Skriver, K. 1996. Novel plant Ca-binding protein expressed in response to abscisic acid and osmotic stress. Journal of Biological Chemistry 271: 343-348.
- Froenicke, L. 2018. DNA Technologies and Expression Analysis Core Laboratory: Gene Expression Profiling with Tag-Seq. [Online]. Available from: <https://dnatech.genomecenter.ucdavis.edu/tag-seq-gene-expression-profiling> [March 21, 2020].
- Ganguly, M., Datta, K., Roychoudhury, A., Gayen, D., Sengupta, D. N., et al. 2012. Overexpression of *Rab16A* gene in indica rice variety for generating enhanced salt tolerance. Plant Signaling & Behavior 7: 502-509.
- Gao, F., Zhou, Y., Huang, L., He, D., and Zhang, G. 2008. Proteomic analysis of long-term salinity stress-responsive proteins in *Thellungiella halophila* leaves. Chinese Science Bulletin 53: 3530-3537.
- Garg, R., Jhanwar, S., Tyagi, A. K., and Jain, M. 2010. Genome-wide survey and expression analysis suggest diverse roles of *glutaredoxin* gene family members during development and response to various stimuli in rice. DNA Research 17: 353-367.
- Gayen, D., Barua, P., Lande, N. V., Varshney, S., Sengupta, S., et al. 2019. Dehydration-responsive alterations in the chloroplast proteome and cell metabolomic profile of rice reveals key stress adaptation responses. Environmental and Experimental Botany 160: 12-24.
- Ge, Q., Zhang, Y., Xu, Y., Bai, M., Luo, W., et al. 2020. Cyclophilin OsCYP20-2 with a novel variant integrates defense and cell elongation for chilling response in rice. The New Phytologist 225: 2453.

- Ge, S. X., Son, E. W., and Yao, R. 2018. iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. BMC Bioinformatics 19: 534.
- Gómez-Ariza, J., Campo, S., Rufat, M., Estopà, M., Messeguer, J., et al. 2007. Sucrose-mediated priming of plant defense responses and broad-spectrum disease resistance by overexpression of the maize pathogenesis-related PRms protein in rice plants. Molecular Plant-Microbe Interactions 20: 832-842.
- Goyal, K., Walton, L. J., and Tunnacliffe, A. 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. Biochemical Journal 388: 151-157.
- Gregario, G., Senedhira, D., and Mendoza, R. 1997. Screening rice for salinity tolerance. IRRI Discussions Paper Series No. 22.
- Guo, L., Wang, Z. Y., Lin, H., Cui, W. E., Chen, J., et al. 2006. Expression and functional analysis of the rice plasma-membrane intrinsic protein gene family. Cell Research 16: 277-286.
- Guo, Y., and Song, Y. 2009. Differential proteomic analysis of apoplastic proteins during initial phase of salt stress in rice. Plant Signaling & Behavior 4: 121-122.
- Halbeisen, R. E., Galgano, A., Scherrer, T., and Gerber, A. P. 2008. Post-transcriptional gene regulation: from genome-wide studies to principles. Cellular and Molecular Life Sciences 65: 798.
- Hashimoto, M., Kisseleva, L., Sawa, S., Furukawa, T., Komatsu, S., et al. 2004. A novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. Plant and Cell Physiology 45: 550-559.
- Hirt, H., and Shinozaki, K. 2003. Plant responses to abiotic stress. Germany: Springer Science & Business Media.
- Hsieh, P. H., Kan, C. C., Wu, H. Y., Yang, H. C., and Hsieh, M. H. 2018. Early molecular events associated with nitrogen deficiency in rice seedling roots. Scientific Reports 8: 1-23.
- Huang, J., Wang, M. M., Jiang, Y., Wang, Q. H., Huang, X., et al. 2008. Stress repressive expression of rice *SRZ1* and characterization of plant *SRZ* gene family. Plant Science 174: 227-235.

- Huang, J., Zhao, X., Weng, X., Wang, L., and Xie, W. 2012. The rice B-box zinc finger gene family: genomic identification, characterization, expression profiling and diurnal analysis. PLoS One 7: e48242.
- Hussain, S., Zhu, C., Bai, Z., Huang, J., Zhu, L., et al. 2019. iTRAQ-based protein profiling and biochemical analysis of two contrasting rice genotypes revealed their differential responses to salt stress. International Journal of Molecular Sciences 20: 547.
- IRRI. 2006. Breeding for salt tolerance in rice. [Online]. Available from: [http://www.knowledgebank.irri.org/ricebreedingcourse/Breeding\\_for\\_salt\\_tolerance.htm](http://www.knowledgebank.irri.org/ricebreedingcourse/Breeding_for_salt_tolerance.htm) [January 21, 2020].
- Jaiswal, S., Gautam, R., Singh, R., Krishnamurthy, S., Ali, S., et al. 2019. Harmonizing technological advances in phenomics and genomics for enhanced salt tolerance in rice from a practical perspective. Rice 12: 89.
- Jamil, M., Lee, K. J., Kim, J. M., Kim, H. S., and Rha, E. S. 2007. Salinity reduced growth PS2 photochemistry and chlorophyll content in radish. Scientia Agricola 64: 111-118.
- Jeong, H. I. 2018. Overexpression of OsAT-IV, a branched-chain amino acid aminotransferase gene, confers drought stress tolerance in rice. Doctoral dissertation, Department of International Agricultural Technology, Seoul National University.
- Jiang, J., Li, J., Xu, Y., Han, Y., Bai, Y., et al. 2007. RNAi knockdown of *Oryza sativa* root meander curling gene led to altered root development and coiling which were mediated by jasmonic acid signalling in rice. Plant, Cell & Environment 30: 690-699.
- Jin, K., Wanhong, C., Jinsong, Z., and Shouyi, C. 2004. Transgenic analysis of a salt-inhibited *OsZFPI* gene from rice. Acta Botanica Sinica 46: 573-577.
- Jung, K. H., Han, M., Yoo, Y., Nguyen, M. P., Lee, C., et al. 2014. Development of defense signaling pathways against bacterial blight disease in rice using genome-wide transcriptome data. Journal of Agricultural Science 6: 48.
- Katiyar, A., Smita, S., Lenka, S. K., Rajwanshi, R., Chinnusamy, V., et al. 2012. Genome-wide classification and expression analysis of *MYB* transcription factor families



- in rice and *Arabidopsis*. *BMC Genomics* 13: 544.
- Katoh, S., Tsunoda, Y., Murata, K., Minami, E., and Katoh, E. 2005. Active site residues and amino acid specificity of the ubiquitin carrier protein-binding RING-H2 finger domain. *Journal of Biological Chemistry* 280: 41015-41024.
- Kawahara, Y., de la Bastide, M., Hamilton, J. P., Kanamori, H., McCombie, W. R., et al. 2013. Improvement of the *Oryza sativa Nipponbare* reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice* 6: 4.
- Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., et al. 2001. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant Cell* 13: 889-905.
- Khomtchouk, B. B., Hennessy, J. R., and Wahlestedt, C. 2017. Shinyheatmap: Ultra fast low memory heatmap web interface for big data genomics. *PLoS One* 12: e0176334.
- Khunpolwattana, N., Chotechuen, S., Suriyaarunroj, D., Kositsup, B., Buaboocha, T., et al. 2013. Some physiological phenotypes responding to salt stress of local thai rice seedlings. *Thai Journal of Genetics* 1: 280-284.
- Kim, S. K., You, Y. N., Park, J. C., Joung, Y., Kim, B. G., et al. 2012. The rice thylakoid luminal cyclophilin *OsCYP20-2* confers enhanced environmental stress tolerance in tobacco and *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* 31: 417-426.
- Kim, S. K., Yun, C. H., Lee, J. H., Jang, Y. H., Park, H. Y., et al. 2008. *OsCO3*, a *CONSTANS-LIKE* gene, controls flowering by negatively regulating the expression of *FT-like* genes under SD conditions in rice. *Planta* 228: 355.
- Kim, S. T., Kim, S. G., Hwang, D. H., Kang, S. Y., Kim, H. J., et al. 2004. Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Proteomics* 4: 3569-3578.
- Koizumi, T., and Furuhashi, G. 2020. Global rice market projections distinguishing japonica and indica rice under climate change. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARO* 54: 63-91.
- Kong, W., Zhong, H., Gong, Z., Fang, X., Sun, T., et al. 2019. Meta-analysis of salt stress transcriptome responses in different rice genotypes at the seedling stage.

Plants 8.

- Kumar, K., Mosa, K. A., Chhikara, S., Musante, C., White, J. C., et al. 2014. Two rice plasma membrane intrinsic proteins, OsPIP2; 4 and OsPIP2; 7, are involved in transport and providing tolerance to boron toxicity. Planta 239: 187-198.
- Kumari, S., nee Sabharwal, V. P., Kushwaha, H. R., Sopory, S. K., Singla-Pareek, S. L., et al. 2009. Transcriptome map for seedling stage specific salinity stress response indicates a specific set of genes as candidate for saline tolerance in *Oryza sativa* L. Functional and Integrative Genomics 9: 109.
- Kwon, C., Kim, S. H., Song, G., Kim, D., and Paek, N. C. 2017. Two *NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase (POR)* isoforms play distinct roles in environmental adaptation in rice. Rice 10: 1-14.
- Lakra, N., Kaur, C., Singla-Pareek, S. L., and Pareek, A. 2019. Mapping the 'early salinity response' triggered proteome adaptation in contrasting rice genotypes using iTRAQ approach. Rice 12: 3.
- Lee, D. K., Kim, H. I., Jang, G., Chung, P. J., Jeong, J. S., et al. 2015. The NF-YA transcription factor *OsNF-YA7* confers drought stress tolerance of rice in an abscisic acid independent manner. Plant Science 241: 199-210.
- Lekklar, C., Pongpanich, M., Suriya-arunroj, D., Chinpongpanich, A., Tsai, H., et al. 2019. Genome-wide association study for salinity tolerance at the flowering stage in a panel of rice accessions from Thailand. BMC Genomics 20: 76.
- Lexogen. 2020. 3' mRNA-Seq Library Prep Kit User Guide. [Online]. Available from: [https://www.lexogen.com/wp-content/uploads/2020/04/015UG009V0252\\_QuantSeq\\_Illumina\\_2020-04-03.pdf](https://www.lexogen.com/wp-content/uploads/2020/04/015UG009V0252_QuantSeq_Illumina_2020-04-03.pdf) [April 3, 2020].
- Li, L., Li, N., Song, S., Li, Y., Xia, X., et al. 2014. Cloning and characterization of the drought-resistance *OsRC12-5* gene in rice (*Oryza sativa* L.). Genetics and Molecular Research 13: 4022-4035.
- Lian, H.-L., Yu, X., Ye, Q., Ding, X.-S., Kitagawa, Y., et al. 2004. The role of aquaporin *RWC3* in drought avoidance in rice. Plant and Cell Physiology 45: 481-489.
- Liang, W., Ma, X., Wan, P., and Liu, L. 2018. Plant salt-tolerance mechanism: A review. Biochemical and Biophysical Research Communications 495: 286-291.

- Liu, S., Fukumoto, T., Gena, P., Feng, P., Sun, Q., et al. 2019. Ectopic expression of a rice plasma membrane intrinsic protein (OsPIP1; 3) promotes plant growth and water uptake. The Plant Journal 1-18.
- Liu, X. P., Liu, X. Y., Zhang, J., Xia, Z. L., Liu, X., et al. 2006. Molecular and functional characterization of sulfiredoxin homologs from higher plants. Cell Research 16: 287-296.
- Liu, Z., Wang, J., Wang, Q., Huang, X., Xu, W., et al. 2003a. Structure, expression pattern and chromosomal localization of the rice *Osgrp-2* gene. Science in China Series C: Life Sciences 46: 584.
- Liu, Z. Z., Wang, J. L., Huang, X., Xu, W. H., Liu, Z. M., et al. 2003b. The promoter of a rice glycine-rich protein gene, *Osgrp-2*, confers vascular-specific expression in transgenic plants. Planta 216: 824-833.
- Lohman, B. K., Weber, J. N., and Bolnick, D. I. 2016. Evaluation of TagSeq, a reliable low-cost alternative for RNA seq. Molecular Ecology Resources 16: 1315-1321.
- Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology 15: 550.
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., and Shafee, T. 2017. Transcriptomics technologies. PLoS Computational Biology 13: 1-23.
- Ma, F., Fuqua, B. K., Hasin, Y., Yukhtman, C., Vulpe, C. D., et al. 2019. A comparison between whole transcript and 3'RNA sequencing methods using Kapa and Lexogen library preparation methods. BMC Genomics 20: 1-12.
- Mangrauthia, S. K., Agarwal, S., Sailaja, B., Madhav, M. S., and Voleti, S. 2013. MicroRNAs and their role in salt stress response in plants. In A. M. M. Ahmad P., and Prasad M. N. V. (ed.), Salt Stress in Plants, pp. 15-46. New York, USA: Springer.
- Mareri, L., Romi, M., and Cai, G. 2019. Arabinogalactan proteins: actors or spectators during abiotic and biotic stress in plants? Plant Biosystems 153: 173-185.
- Meepriruk, M., Boonpitak, S., Pongpinyoopat, S., Plailaharn, S., Rattansu, S., et al. 2016. Diversity of local rice varieties in Nai Muang and Sai Ngam district, Kamphaeng Phet province. In 4th Rajabhat University National and International Research and Academic Conference (RUNIRAC IV), pp. 498-505. 22-26 November 2015 at

Buriram Rajabhat University, Buriram Province.

- Milligan, G. W. 1980. An examination of the effect of six types of error perturbation on fifteen clustering algorithms. Psychometrika 45: 325-342.
- Mitsuya, S., Kawasaki, M., Taniguchi, M., and Miyake, H. 2003. Relationship between salinity-induced damages and aging in rice leaf tissues. Plant Production Science 6: 213-218.
- Miyashita, Y., Dolferus, R., Ismond, K. P., and Good, A. G. 2007. Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 49: 1108-1121.
- Mohammad, S., and Oloomi, H. 2014. Gene Co-expression Network Construction Steps. [Online]. Available from: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gene\\_co-expression\\_network\\_construction\\_steps.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gene_co-expression_network_construction_steps.png) [March 10, 2020].
- Mohanta, T. K., Mohanta, N., and Bae, H. 2015. Identification and expression analysis of *PIN-like (PILS)* gene family of rice treated with auxin and cytokinin. Genes 6: 622-640.
- Mohanty, S. 2013. Trends in global rice consumption. Rice Today 12: 44-45.
- Moons, A., De Keyser, A., and Van Montagu, M. 1997. A group 3 LEA cDNA of rice, responsive to abscisic acid, but not to jasmonic acid, shows variety-specific differences in salt stress response. Gene 191: 197-204.
- Mundy, J., and Chua, N.-H. 1988. Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. The EMBO Journal 7: 2279-2286.
- Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. 2014. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. Frontiers in Plant Science 5: 170.
- Naya, L., Paul, S., Valdés-López, O., Mendoza-Soto, A., and Nova-Franco, B. 2014. Regulation of copper homeostasis and biotic interactions by microRNA. PLoS One 9: 1-13.
- Nhan, D. K., Phap, V. A., Phuc, T. H., and Trung, N. H. 2012. Rice production response and technological measures to adapt to salinity intrusion in the coastal Mekong delta. Report for the Mekong Program on Water Environment and

Resilience : 1-14.

- NHGRI. 2015. Transcriptome Fact Sheet. [Online]. Available from: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Transcriptome-Fact-Sheet> [March 21, 2020].
- Nounjan, N., Chansongkrow, P., Charoensawan, V., Siangliw, J. L., Toojinda, T., et al. 2018. High performance of photosynthesis and osmotic adjustment are associated with salt tolerance ability in rice carrying drought tolerance QTL: physiological and co-expression network analysis. Frontiers in Plant Science 9: 1135.
- Nounjan, N., Siangliw, J. L., Toojinda, T., Chadchawan, S., and Theerakulpisut, P. 2016. Salt-responsive mechanisms in chromosome segment substitution lines of rice (*Oryza sativa* L. cv. *KDML105*). Plant Physiology and Biochemistry 103: 96-105.
- Opgen-Rhein, R., and Strimmer, K. 2006a. Inferring gene dependency networks from genomic longitudinal data: a functional data approach. RevStat 4: 53-65.
- Opgen-Rhein, R., and Strimmer, K. 2006b. Using regularized dynamic correlation to infer gene dependency networks from time-series microarray data. In Proceedings of the 4th International Workshop on Computational Systems Biology (WCSB 2006), Tampere, 73-76.
- Pfaffl, M. W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. AZ of Quantitative PCR 1: 89-113.
- Pirzadeh, S., and Shahpiri, A. 2016. Functional characterization of a type 2 metallothionein isoform (OsMTI-2b) from rice. International Journal of Biological Macromolecules 88: 491-496.
- Pou, A., Jeanguenin, L., Milhiet, T., Batoko, H., Chaumont, F., et al. 2016. Salinity-mediated transcriptional and post-translational regulation of the Arabidopsis aquaporin *PIP2; 7*. Plant Molecular Biology 92: 731-744.
- Prisco, J. T., Gomes-Filho, E., and Miranda, R. S. 2016. Physiology and biochemistry of plants growing under salt stress. In H. R. D. Gheyi, N. S. Lacerda, C. F. and Gomes Filho, E. (ed.), Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados, pp. 163-180. Fortaleza, BR: INCTSal.
- Rabara, R. C., Ferrer, M. C., Jara-Rabara, J., and Sotto, R. C. 2018. Securing diversity for

- food security: The case of conservation and use of rice genetic resources. In Özge Çelik (ed.), New Visions in Plant Science, pp. 81-96. London, UK: IntechOpen.
- Reddy, I. N. B. L., Kim, B. K., Yoon, I. S., Kim, K. H., and Kwon, T. R. 2017. Salt tolerance in rice: focus on mechanisms and approaches. Rice Science 24: 123-144.
- Reddy, P. S., Kishor, P. B. K., Seiler, C., Kuhlmann, M., Eschen-Lippold, L., et al. 2014. Unraveling regulation of the small heat shock proteins by the heat shock factor *HvHsfB2c* in barley: its implications in drought stress response and seed development. PLoS One 9.
- Riccadonna, S., Jurman, G., Visintainer, R., Filosi, M., and Furlanello, C. 2016. DTW-MIC coexpression networks from time-course data. PLoS One 11.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., et al. 2011. Integrative genomics viewer. Nature Biotechnology 29: 24-26.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26: 139-140.
- Rzewuski, G., and Sauter, M. 2008. Ethylene biosynthesis and signaling in rice. Plant Science 175: 32-42.
- Sakuraba, Y., Rahman, M. L., Cho, S. H., Kim, Y. S., Koh, H. J., et al. 2013. The *rice faded green leaf* locus encodes protochlorophyllide oxidoreductase B and is essential for chlorophyll synthesis under high light conditions. The Plant Journal 74: 122-133.
- Schaefer, R. J., Michno, J. M., and Myers, C. L. 2017. Unraveling gene function in agricultural species using gene co-expression networks. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms 1860: 53-63.
- Serra, T. S., Figueiredo, D. D., Cordeiro, A. M., Almeida, D. M., Lourenço, T., et al. 2013. OsRMC, a negative regulator of salt stress response in rice, is regulated by two AP2/ERF transcription factors. Plant Molecular Biology 82: 439-455.
- Shaar-Moshe, L., Hübner, S., and Peleg, Z. 2015. Identification of conserved drought-adaptive genes using a cross-species meta-analysis approach. BMC Plant Biology 15: 111.

- Shalmani, A., Jing, X. Q., Shi, Y., Muhammad, I., Zhou, M. R., et al. 2019. Characterization of *B-BOX* gene family and their expression profiles under hormonal, abiotic and metal stresses in Poaceae plants. *BMC Genomics* 20: 27.
- Shankar, A., Singh, A., Kanwar, P., Srivastava, A., and Pandey, A. 2013. Gene expression analysis of rice seedling under potassium deprivation reveals. *PLoS One* 8: 1-23.
- Shanker, A., and Venkateswarlu, B. 2011. *Abiotic Stress Response in Plants: Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*. Rijeka, Croatia: InTech.
- Silveira, R. D., Abreu, F. R. M., Mamidi, S., McClean, P. E., Vianello, R. P., et al. 2015. Expression of drought tolerance genes in tropical upland rice cultivars (*Oryza sativa*). *Genetics and Molecular Research* 14: 8181-8200.
- Singh, A., Sahi, C., and Grover, A. 2009. Chymotrypsin protease inhibitor gene family in rice: Genomic organization and evidence for the presence of a bidirectional promoter shared between two chymotrypsin protease inhibitor genes. *Gene* 428: 9-19.
- Smita, S., Katiyar, A., Pandey, D. M., Chinnusamy, V., Archak, S., et al. 2013. Identification of conserved drought stress responsive gene-network across tissues and developmental stages in rice. *Bioinformatics* 9: 72.
- Song, L., Langfelder, P., and Horvath, S. 2012. Comparison of co-expression measures: mutual information, correlation, and model based indices. *BMC Bioinformatics* 13: 328.
- Spies, D., and Ciaudo, C. 2015. Dynamics in transcriptomics: advancements in RNA-seq time course and downstream analysis. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 13: 469-477.
- Sripinyowanich, S., Chamnanmanoontham, N., Udomchalothorn, T., Maneeprasopsuk, S., Santawee, P., et al. 2013. Overexpression of a partial fragment of the salt-responsive gene *OsNUC1* enhances salt adaptation in transgenic *Arabidopsis thaliana* and rice (*Oryza sativa* L.) during salt stress. *Plant Science* 213: 67-78.
- Stein, R. J., Ricachenevsky, F. K., and Fett, J. P. 2009. Differential regulation of the two rice ferritin genes (*OsFER1* and *OsFER2*). *Plant Science* 177: 563-569.
- Stuart, J. M., Segal, E., Koller, D., and Kim, S. K. 2003. A gene-coexpression network for

- global discovery of conserved genetic modules. Science 302: 249-255.
- Surataneer, A., Chokrathok, C., Chutimanukul, P., Khruuasan, N., Buaboocha, T., et al. 2018. Two-state co-expression network analysis to identify genes related to salt tolerance in Thai rice. Genes 9: 594.
- Takasaki, H., Maruyama, K., Kidokoro, S., Ito, Y., Fujita, Y., et al. 2010. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. Molecular Genetics and Genomics 284: 173-183.
- Takeuchi, K., Gyohda, A., Tominaga, M., Kawakatsu, M., Hatakeyama, A., et al. 2011. *RSOsPR10* expression in response to environmental stresses is regulated antagonistically by jasmonate/ethylene and salicylic acid signaling pathways in rice roots. Plant and Cell Physiology 52: 1686-1696.
- Tantalaki, N., Souravlas, S., and Roumeliotis, M. 2019. Data-driven decision making in precision agriculture: The rise of big data in agricultural systems. Journal of Agricultural & Food Information 20: 344-380.
- Tiwari, L. D., Mittal, D., Mishra, R. C., and Grover, A. 2015. Constitutive over-expression of rice chymotrypsin protease inhibitor gene *OCPI2* results in enhanced growth, salinity and osmotic stress tolerance of the transgenic *Arabidopsis* plants. Plant Physiology and Biochemistry 92: 48-55.
- Tripathy, J., Zhang, J., Robin, S., Nguyen, T. T., and Nguyen, H. 2000. QTLs for cell-membrane stability mapped in rice (*Oryza sativa* L.) under drought stress. Theoretical and Applied Genetics 100: 1197-1202.
- Tripathy, S. K., Nayak, G., Naik, J., Patnaik, M., Dash, A. P., et al. 2019. Signal transduction in plants under drought and salt stress-an overview. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 8: 318-325.
- Udomchalothorn, T., Plaimas, K., Sripinyowanich, S., Boonchai, C., Kojonna, T., et al. 2017. *OsNucleolin1-L* expression in *Arabidopsis* enhances photosynthesis via transcriptome modification under salt stress conditions. Plant and Cell Physiology 58: 717-734.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. 1995. Serial analysis of gene expression. Science 270: 484-487.



- Villa-Vialaneix, N., Liaubet, L., Laurent, T., Cherel, P., Gamot, A., et al. 2013. The structure of a gene co-expression network reveals biological functions underlying eQTLs. *PloS One* 8: 1-13.
- Walia, H., Wilson, C., Condamine, P., Liu, X., Ismail, A. M., et al. 2005. Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage. *Plant Physiology* 139: 822-835.
- Wang, C., Zhang, Q., and Shou, H.-x. 2009. Identification and expression analysis of *OsHsfs* in rice. *Journal of Zhejiang University Science B* 10: 291-300.
- Wang, W.-S., Zhao, X.-Q., Li, M., Huang, L.-Y., Xu, J.-L., et al. 2016. Complex molecular mechanisms underlying seedling salt tolerance in rice revealed by comparative transcriptome and metabolomic profiling. *Journal of Experimental Botany* 67: 405-419.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10: 57-63.
- Wani, S. H., and Hossain, M. A. 2015. *Managing Salt Tolerance in Plants: Molecular and Genomic Perspectives*. London, NY: CRC Press.
- Weerawanich, K., Webster, G., Ma, J. K., Phoolcharoen, W., and Sirikantaramas, S. 2018. Gene expression analysis, subcellular localization, and in planta antimicrobial activity of rice (*Oryza sativa* L.) defensin 7 and 8. *Plant Physiology and Biochemistry* 124: 160-166.
- Weirauch, M. T. 2011. Gene coexpression networks for the analysis of DNA microarray data. *Applied Statistics for Network Biology: Methods in Systems Biology* 1: 215-250.
- Weston, D. J., Gunter, L. E., Rogers, A., and Wulfschleger, S. D. 2008. Connecting genes, coexpression modules, and molecular signatures to environmental stress phenotypes in plants. *BMC Systems Biology* 2: 1-17.
- Wu, H., Ye, H., Yao, R., Zhang, T., and Xiong, L. 2015. OsJAZ9 acts as a transcriptional regulator in jasmonate signaling and modulates salt stress tolerance in rice. *Plant Science* 232: 1-12.
- Xiao, B., Huang, Y., Tang, N., and Xiong, L. 2007. Over-expression of a *LEA* gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theoretical and*

Applied Genetics 115: 35-46.

- Xiong, H., Li, J., Liu, P., Duan, J., Zhao, Y., et al. 2014. Overexpression of *OsMYB48-1*, a novel MYB-related transcription factor, enhances drought and salinity tolerance in rice. PLoS One 9: 1-13.
- Yadav, S., Irfan, M., Ahmad, A., and Hayat, S. 2011. Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: a review. Journal of Environmental Biology 32: 667.
- Yamashita, K., and Matsumoto, H. 1996. Salt stress-induced enhancement of anion efflux and anion transport activity in plasma membrane of barley roots. Soil Science and Plant Nutrition 42: 209-213.
- Yang, A., Li, Y., Xu, Y., and Zhang, W.-H. 2013. A receptor-like protein RMC is involved in regulation of iron acquisition in rice. Journal of Experimental Botany 64: 5009-5020.
- Yang, J., Duan, G., Li, C., Liu, L., Han, G., et al. 2019. The crosstalks between jasmonic acid and other plant hormone signaling highlight the involvement of jasmonic acid as a core component in plant response to biotic and abiotic stresses. Frontiers in Plant Science 10.
- Ye, R., Zhou, F., and Lin, Y. 2012. Two novel positive cis-regulatory elements involved in green tissue-specific promoter activity in rice (*Oryza sativa* L ssp. *japonica*). Plant Cell Reports 31: 1159-1172.
- Yeo, B. P. H., Bhawe, M., and San Hwang, S. 2018. Effects of acute salt stress on modulation of gene expression in a Malaysian salt-tolerant indigenous rice variety, Bajong. Journal of Plant Research 131: 191-202.
- Yi, X., Du, Z., and Su, Z. 2013. PlantGSEA: a gene set enrichment analysis toolkit for plant community. Nucleic Acids Research 41: W98-W103.
- Zelm, E. v., Zhang, Y., and Testerink, C. 2020. Salt tolerance mechanisms of plants. Annual Review of Plant Biology 71: 1-31.
- Zhang, B., and Horvath, S. 2005. A general framework for weighted gene co-expression network analysis. Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology 4: 1-43.
- Zhang, H., Cui, F., Wu, Y., Lou, L., Liu, L., et al. 2015. The RING finger ubiquitin E3 ligase

- SDIR1 targets SDIR1-INTERACTING PROTEIN1 for degradation to modulate the salt stress response and ABA signaling in *Arabidopsis*. The Plant Cell 27: 214-227.
- Zhang, L., Tian, L. H., Zhao, J. F., Song, Y., Zhang, C. J., et al. 2009. Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. Plant Physiology 149: 916-928.
- Zhang, X. H., Rao, X. L., Shi, H. T., Li, R.-J., and Lu, Y.-T. 2011. Overexpression of a cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene *OsGAPC3* confers salt tolerance in rice. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 107: 1.
- Zhao, H., Ma, H., Yu, L., Wang, X., and Zhao, J. 2012. Genome-wide survey and expression analysis of amino acid transporter gene family in rice (*Oryza sativa* L.). PLoS One 7: 1-18.
- Zhou, J., Wang, X., Jiao, Y., Qin, Y., Liu, X., et al. 2007. Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf, and panicle. Plant Molecular Biology 63: 591-608.
- Zhou, Y., Yang, P., Cui, F., Zhang, F., Luo, X., et al. 2016. Transcriptome analysis of salt stress responsiveness in the seedlings of Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). PLoS One 11: 1-25.
- Zhu, J. K. 2007. Plant salt stress. Encyclopedia of Life Sciences, pp. 1-3. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Ltd.
- กรมการข้าว. การปลูก ดูแลรักษา และใช้ปุ๋ยในนาข้าว. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.ricethailand.go.th/Rkb/management/index.php-file=content.php&id=1.htm> [30 มิถุนายน 2563].
- การประกวดพันธุ์ข้าว ที่วัดสุทัศน์เทพวราราม พ.ศ. 2452. ราชกิจจานุเบกษา 26 (11 เมษายน 2452): 65-71.
- แจ้งความกระทรวงเกษตรธิการเรื่องมีผู้ให้พันธุ์ข้าวปลูกแก่กระทรวงเกษตรธิการสำหรับแจกให้ชาวนา ให้ทำพันธุ์เพาะปลูก พ.ศ. 2471. ราชกิจจานุเบกษา 45 (6 พฤษภาคม 2471): 415-416.
- ไทยพับลิก้า. 2563. KKP Research วิเคราะห์วิกฤตภัยแล้ง 2020 ปีนี้รุนแรงแค่ไหน – ความเสี่ยงต่อเศรษฐกิจไทย. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <https://thaipublica.org/2020/01/kkp-research03/> [14 มกราคม 2563].
- นพคุณ คุณผลวัฒนา. 2558. การประเมินความสามารถทนเค็มของต้นกล้าข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยและการ

- เชื่อมโยงทั้งจีโนมกับลักษณะทนเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ประพาส วีระแพทย์. 2520. ข้าว. สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ 3: 6-75.
- พระบาทสมเด็จพระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัว. 2431. พระราชพิธีสิบสองเดือน. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ไทย.
- ศูนย์ศึกษาการพัฒนาภูพานอันเนื่องมาจากพระราชดำริ. 2555. คู่มือการจัดการดินเค็มเพื่อปลูกข้าว. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานคณะกรรมการพิเศษเพื่อประสานงานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ.
- สมศรี อรุณินท์ และคณะ. 2524. รายงานวิชาการประจำปี 2554: การศึกษาเปรียบเทียบพันธุ์ข้าวทนเค็ม. กรุงเทพมหานคร: กองบริหารดินและน้ำ, กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร. 2563. เกษตรอัจฉริยะความหวังใหม่ของภาคการเกษตรไทย. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: [http://www.arda.or.th/knowledge\\_detail.php?id=7](http://www.arda.or.th/knowledge_detail.php?id=7) [15 เมษายน 2563].
- สำนักสำรวจและวิจัยทรัพยากรดิน กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ลักษณะและสมบัติของชุดดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: [http://oss101.ldd.go.th/thaisoils\\_museum/pf\\_desc/northeast/Pm.htm](http://oss101.ldd.go.th/thaisoils_museum/pf_desc/northeast/Pm.htm) [30 มีนาคม 2563].
- สุมาลี ชุกำแพง. 2555. พืชในภาวะเครียดเกลือ. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย 4: 15-24.
- อรุณี ยูวะนิยม. 2547. คู่มือการจัดการแก้ไขปัญหาดินเค็ม. กรุงเทพมหานคร: สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พีรวัฒน์ จันทนกุล
วัน เดือน ปี เกิด	31 กรกฎาคม 2536
สถานที่เกิด	นครนายก
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2558 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้รับการสนับสนุนด้านการศึกษาจากโครงการพัฒนาและส่งเสริม ผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.)
ที่อยู่ปัจจุบัน	54/3 ม.10 ถ.สุวรรณศร ต.บ้านนา อ.บ้านนา จ.นครนายก 26110
ผลงานตีพิมพ์	Chantanakool, P. Buaboocha, T. Comai, L. and Chadchawan, S. 2019. Transcriptome of local Thai rice cultivar under salt stress. Proceedings of the National Genetics Conference. 20-21 June 2019, Pattaya, pp. 230-239.