



การศึกษาการแสดงผลของยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาล และแลกเปลี่ยนโซเดียมไอออน/โปรตอน
ภายใต้สภาวะเครียดต่อเกลือในข้าว

โดย

นายอภิพร ชาวปากน้ำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การศึกษาการแสดงออกของยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาล และแลกเปลี่ยนโซเดียมไอออน/โปรตอน
ภายใต้สภาวะเครียดต่อเกลือในข้าว

โดย
นายอภิพร ชาวปากน้ำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**EXPRESSION ANALYSIS OF SUGAR TRANSPORTER AND Na⁺/H⁺ EXCHANGER GENES
DURING SALT STRESS IN RICE**

By

Aphiraporn Chaopaknam

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

MASTER OF SCIENCE

Department of Biotechnology

Graduate School

SILPAKORN UNIVERSITY

2009

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “การศึกษาการ
แสดงออกของยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาล และแลกเปลี่ยนโซเดียมไอออน/โปรตอนภายใต้สภาวะเครียดต่อ
เกลือในข้าว” เสนอโดย นายอภิพร ชาวปากน้ำ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย ชินะตั้งกูร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา
2. รองศาสตราจารย์ ดร.กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิริย์)

...../...../.....

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.กุนาถ อบสุวรรณ)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา)

...../...../.....

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ)

...../...../.....

...../...../.....

48401203 : สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คำสำคัญ : ความเครียดต่อเกลือ / ขาวดอกมะลิ105 / การเคลื่อนย้ายน้ำตาล

อภิพร ชาวปากน้ำ : การศึกษาการแสดงออกของยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาล และแลกเปลี่ยนโซเดียมไอออน/โปรตอนภายใต้สภาวะเครียดต่อเกลือในข้าว. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ. ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา, รศ. ดร.กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ และ ผศ. ดร.เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ. 95 หน้า.

ผลผลิตของข้าวได้รับผลกระทบจากความเครียดของเกลือ เมื่อข้าวอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ดินเค็ม ข้าวจะมีการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไป ชักนำให้เกิดการสร้างโปรตีนใหม่ และกระตุ้น หรือกวดวิถีชีวเคมีต่างๆ งานวิจัยนี้สนใจศึกษาการแสดงออกของยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลซูโครส (*OsSUT1*) ยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (*OsMST3*) และแลกเปลี่ยนประจุโซเดียม/โปรตอน (*OsNHX1*) ในส่วนของ source และ sink organs ของข้าวขาวดอกมะลิ105 ในระยะต่างๆ ภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็มโดยใช้วิธี semi-quantitative RT-PCR จากผลการทดลองพบการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน *OsMST3* และ *OsNHX1* ทั้งในส่วนของ source และ sink organs ของข้าวในทุกๆระยะที่ได้รับสารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ โดย *OsNHX1* จะมีการแสดงออกในส่วนของ sink organs มากในช่วงแรกของการทดสอบและค่อยๆลดระดับลงมา ขณะที่การแสดงออกของยีนดังกล่าวในส่วนของ source organs กลับเพิ่มสูงขึ้นในเวลาต่อมา ส่วนการแสดงออกของยีน *OsSUT1* ค่อนข้างคงที่ทั้งในส่วนของ source และ sink organs ของข้าวในทุกๆระยะที่ได้รับสารละลายเกลือ NaCl นอกจากนี้ยังได้มีการวัดปริมาณของน้ำตาลซูโครสและกลูโคสด้วย ซึ่งพบว่าให้ผลที่มีแนวโน้มที่สอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *OsMST3* และ *OsSUT1* จากผลการทดลองทั้งหมดอาจบ่งชี้ได้ว่า ข้าวขาวดอกมะลิ 105 จะมีการลดความเป็นพิษของโซเดียมไอออนในไซโตซอลโดยการลำเลียงไปเก็บไว้ในแวคคิวโอลและมีการเคลื่อนย้ายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสูงขึ้นเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในการซ่อมแซมเซลล์ที่เสียหายและใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์สารจำพวกโพลีออลเพื่อทำหน้าที่รักษาสมดุลออสโมติกภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังมีการคงระดับของน้ำตาลซูโครสเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรอง

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. 2. 3.

48401203 : MAJOR : BIOTECHNOLOGY

KEY WORDS : SALT STRESS / KDML105 / SUGAR PARTITIONING

APHIRAPORN CHAOPAKNAM : EXPRESSION ANALYSIS OF SUGAR

TRANSPORTER AND Na⁺/H⁺ EXCHANGER GENES DURING SALT STRESS IN RICE. THESIS

ADVISORS : ASST. PROF. BUDSARAPORN NGAMPANYA, ASSOC. PROF. KALYANEE

JIRASRIPONGPUN , AND ASST. PROF. JESDAWAN WICHITWECHAKARN, 95 pp.

Rice productivity is severely affected by salt stress. When rice is in unsuitable environmental condition, such as soil salinity, it can also be affected by change in gene expression, leading to the synthesis of novel proteins and activation or repression of biochemical pathways. This research is interested in the expression analysis of sucrose transporter (*OsSUT1*), monosaccharide transporter (*OsMST3*) and Na⁺/H⁺ exchanger genes in source and sink organs of Khao Dawk Mali 105 rice at different development stages under salt stress condition by using Semi-quantitative RT-PCR. The results showed that the increased expression of *OsMST3* and *OsNHX1* in both source and sink organs of rice in every developmental stage when 100mM NaCl was treated. The *OsNHX1* expression in sink organ at the early period of NaCl treatment is higher than the expression in source organs and decreased during the time course of NaCl treatment. On the contrary, the high expression of *OsNHX1* in source organs was found in later period. In addition, the expression of *OsSUT1* tends to be constant in both source and sink organs of NaCl-treated rice. Beside the gene expression analysis, sucrose and glucose contents were also quantified. The sucrose and glucose levels tended to be consistent with the expression levels of *OsSUT1* and *OsMST3*. All data obtained from this research suggested that the toxicity of Na⁺ in NaCl-treated rice was reduced by transportation of Na⁺ from cytosol into vacuole. The amount of monosaccharide transport was rather high in order to be utilized as energy source for damaged cell repair and used as substrates for polyols synthesis in osmotic homeostasis within cells. In addition, the level of sucrose was maintained as a source of reserved storage energy.

Department of Biotechnology Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2009

Student's signature

Thesis Advisors' signature 1. 2. 3.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องข้อมูล ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์และตรวจแก้ไข วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์ ผศ.ดร.เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ ผศ. ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ และดร.กฤษณา ออบสุวรรณ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่าน ที่ได้มอบวิชาความรู้และให้คำแนะนำ ที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณทิพาภรณ์ ทรัพย์สมบูรณ์ คุณประไพ บางเขย และเจ้าหน้าที่ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพที่อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในด้านเครื่องมืออุปกรณ์และ สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณพิศมัย ชวาลกุล ที่ให้ความช่วยเหลือในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ รวมทั้ง น้องๆ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรมทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจในการทำงานมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ได้ให้ทุนสนับสนุน งานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดา และน้อง ๆ ที่ได้ให้กำลังใจ และสนับสนุน ปัจจัยทางด้านการศึกษามาโดยตลอด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์การศึกษา	4
ขอบเขตการศึกษา.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
แหล่งกำเนิด และวิวัฒนาการข้าว (The Origin and Development of Rice)	5
ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (Khao Dawk Mali 105)	6
การลำเลียงน้ำตาลซูโครสในระยะทางไกลของพืชชั้นสูง (Long-Distance Transport of Sugar in Higher Plant).....	8
ผลกระทบของความเค็มต่อพืช (Effect of Salt Stress on Plants).....	13
การควบคุมสมดุลของประจุภายใต้ความเครียดต่อเกลือ (Regulation of Ion Homeostasis under Salt Stress)	14
3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	19
สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	19
วิธีการทดลอง	24
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	37
5 สรุปผลการทดลอง	68
บรรณานุกรม	69

	หน้า
ภาคผนวก	73
ภาคผนวก ก.....	73
ภาคผนวก ข.....	81
ภาคผนวก ค.....	88
ภาคผนวก ง	93
ประวัติผู้วิจัย	95

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	พีชชนิดต่างๆ กับค่า threshold salinity และปริมาณผลผลิตที่ลดลงต่อหน่วย.....	13
2	สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายธาตุอาหารสูตร WP ดัดแปลง.....	74
3	การเตรียมสารละลายซูโครสมาตรฐาน ความเข้มข้น 0-1.0 mg/ml	75
4	ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่วัดได้ของข้าวอายุ 14 วัน	84
5	ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่วัดได้ของข้าวอายุ 30 วัน	84
6	ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่วัดได้ของข้าวระยะตั้งท้องก่อนออกรวง	85
7	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้ของข้าวอายุ 14 วัน	86
8	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้ของข้าวอายุ 30 วัน	86
9	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้ของข้าวระยะตั้งท้องก่อนออกรวง	87

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การลำเลียงน้ำตาลซูโครสระยะทางไกล (long-distance sugar transport) ระหว่าง sources และ sinks	9
2	Topological models ของ disaccharide และ monosaccharide transporter	10
3	Yeast system สำหรับการทำให้ functional cloning ของ sucrose transporters	11
4	SOS signaling pathway สำหรับการปรับสมดุลประจุ ภายใต้ภาวะเครียดต่อเกลือใน <i>Arabidopsis</i>	15
5	การย้ายแถบดีเอ็นเอไปยังเมมเบรน (DNA transfer to membrane).....	33
6	Amino acid sequences alignment ของยีน <i>OsMST1</i> , <i>OsMST2</i> และ <i>OsMST3</i> โดยใช้โปรแกรม Vector NTI.....	38
7	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>OsMST3</i> ที่ใช้เป็นยีนติดตาม (gene probe).....	39
8	Nucleotide sequences alignment ของยีน <i>OsNHX1</i> ในรูปแบบ mRNA และ genomic DNA	46
9	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>OsNHX1</i> ที่ใช้เป็นยีนติดตาม (gene probe)	47
10	Gel electrophoresis ของ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ โดยใช้ TSUT1 F และ TSUT1 R primer บน 1% agarose gel	48
11	Gel electrophoresis ของ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ โดยใช้ MST3 F และ MST3 R primer บน 1% agarose gel.....	49
12	Gel electrophoresis ของ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ โดยใช้ <i>OsNHX1_F38-59</i> และ <i>OsNHX1_R336-357</i> primer บน 1% agarose gel	50
13	Nucleotide sequences alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน <i>OsMST3</i> และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ที่ต้องการใช้เป็นยีนติดตาม <i>OsMST3</i>	52
14	Nucleotide sequences alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน <i>OsNHX1</i> และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ที่ต้องการใช้เป็นยีนติดตาม <i>OsNHX1</i>	55
15	Southern blot hybridization ของการแสดงออกยีน 18s rRNA ของข้าว ระยะต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์	56

ภาพที่		หน้า
16	Southern blot hybridization ของการแสดงออกยีน <i>OsSUT1</i> , <i>OsMST3</i> และ <i>OsNHX1</i> ของข้าวอายุ 14 วัน ภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์.....	59
17	Southern blot hybridization ของการแสดงออกยีน <i>OsSUT1</i> , <i>OsMST3</i> และ <i>OsNHX1</i> ของข้าวอายุ 30 วัน ภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์.....	59
18	Southern blot hybridization ของการแสดงออกยีน <i>OsSUT1</i> , <i>OsMST3</i> และ <i>OsNHX1</i> ของข้าวระยะตั้งท้องก่อนออกรวงภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์	60
19	ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่วัดได้ในข้าวอายุ 14 วัน ที่ช่วงเวลาต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีการให้เกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์	63
20	ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่วัดได้ในข้าวอายุ 30 วัน ที่ช่วงเวลาต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีการให้เกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์	64
21	ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่วัดได้ในข้าวระยะตั้งท้องก่อนออกรวง ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ภายใต้สภาวะที่มีการให้เกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์.....	64
22	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้ในข้าวอายุ 14 วัน ที่ช่วงเวลาต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีการให้เกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์	66
23	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้ในข้าวอายุ 30 วัน ที่ช่วงเวลาต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีการให้เกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์	66
24	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้ในข้าวระยะตั้งท้องก่อนออกรวง ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ภายใต้สภาวะที่มีการให้เกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์.....	67

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ดินเค็ม คือ ดินที่มีปริมาณเกลือสูงจนมีผลเสียต่อพืช ซึ่งพิจารณาได้จากค่าการนำไฟฟ้า [electrical conductivity (EC)] ของดิน ในดินเค็มมีค่าการนำไฟฟ้าของดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำมากกว่า 4 dS m^{-1} มีไอออนที่เกี่ยวข้องหลายตัว แต่ที่สำคัญ คือ ไอออนของ โซเดียม (Na) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) คลอไรด์ และซัลเฟต ผลของดินเค็มที่มีต่อพืชคือทำให้พืชขาดน้ำ เพราะพืชดูดน้ำไปใช้ไม่ได้ เกิดความเป็นพิษของ โซเดียมและคลอไรด์ การมีเกลือมากยังไปยับยั้งการดูดใช้ โพแทสเซียมและแคลเซียมด้วย นอกจากนี้ยังทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์และอัตราการสังเคราะห์แสง ลดลง เพิ่มอัตราการหายใจและเพิ่มปริมาณ ไนโตรเจนในพืช ขณะที่ปริมาณ โพแทสเซียมและแคลเซียมกลับลดลงเนื่องจากการดูดใช้ลดลง ซึ่งปัญหาดินเค็มนั้นจัดว่าเป็นอุปสรรคอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของพืช (กรมการข้าว 2550) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยมีพื้นที่ดินเค็มครอบคลุมมากถึง 22 ล้านไร่ ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 พื้นที่คือ ดินเค็มชายฝั่งทะเล (coastal saline soil) และดินเค็มในภาคพื้นทวีปหรือดินเค็มนอกพื้นที่ชายฝั่งทะเล (inland saline soil) ปัญหาในเรื่องของดินเค็มจึงส่งผลกระทบต่อผลผลิตพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งในข้าว ซึ่งเป็นอาหารหลักและสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศไทยเป็นอย่างมาก โดยพบว่าปัญหาการผลิตข้าวบริเวณดินเค็มชายฝั่งทะเลนั้นจะเกิดจากดินและน้ำโดยตรง เนื่องจากน้ำทะเลท่วมถึงตลอดปี ระดับน้ำใต้ดินอยู่สูงเกือบถึงผิวดิน มีธาตุหรือสารประกอบที่เป็นพิษต่อข้าวเข้มข้นสูงเกินไป เช่น โซเดียม คลอไรด์ โบรอน และไบคาร์บอเนต รวมทั้งเกิดความไม่สมดุลของธาตุอาหารพืช และสำหรับดินเค็มในภาคพื้นทวีป ซึ่งมีพื้นที่อยู่ประมาณ 18 ล้านไร่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและกระจายเป็นหย่อม ไม้ค่อยสม่ำเสมอ โดยในพื้นที่เดียวกันมีเกลือสะสมในชั้นดินไม่เท่ากันและเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล ทำให้ข้าวที่ปลูกให้ผลผลิตต่ำมาก ประมาณ 10-15 ถังต่อไร่เท่านั้น และพบว่าความเค็มที่เพิ่มขึ้น 6.3, 11.8 และ 25.6 dS m^{-1} จะทำความสูญเสียให้แก่ผลผลิตเป็น 70, 74 และ 90% จากระดับเศรษฐกิจตามลำดับ ปัจจุบันการแก้ไขปัญหาคับเกษตรกรทางหนึ่งของรัฐบาลก็คือ การแนะนำให้ปลูกข้าวพันธุ์ที่สามารถทนเค็มได้ อย่างไรก็ตามพันธุ์ข้าวที่แนะนำให้ปลูกอยู่ในปัจจุบัน เช่น กข6 (RD6) ขาวดอกมะลิ105 (KDML105) และ กข15 (RD15) เป็นต้น ก็ยังมีความทนเค็มได้ไม่ดีพอ (กรมวิชาการเกษตร 2552) ทำให้มีความพยายามที่จะปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ทนเค็มโดยวิธีการต่างๆ สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแบบดั้งเดิม (conventional method) จะอาศัยการผสมและ

คัดเลือกพันธุ์ (breeding and selection) ซึ่งนับเป็นวิธีที่ให้ผลดีแต่ใช้เวลานานมาก ส่วนการใช้ความรู้ทางด้านพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เข้ามาช่วย แม้จะเป็นวิธีที่สามารถทำได้ในระยะเวลาที่สั้นลงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีแบบดั้งเดิม แต่ความสำเร็จของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ทนเค็ม โดยวิธีการหลังนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาและค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเค็มก่อนจึงจะเห็นผลสำเร็จ ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับระดับการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะเครียดต่อเกลือ จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะทำให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชทนเค็มได้

เมื่อพืชอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจะทำให้เกิดภาวะเครียด (stress) ทำให้การแสดงออกของโปรตีนต่างๆ เปลี่ยนแปลงและเกิดการกระตุ้น (activation) หรือการกด (repression) วิถีชีวเคมี (biochemical pathway) ใหม่ๆ ขึ้น พืชจะมีกลไกการลดความเครียดลงโดยการปรับเปลี่ยนกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ เช่น การพยายามลดความเป็นพิษของ reactive oxygen species (ROS) ที่เกิดขึ้นโดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ที่ทำหน้าที่เป็น antioxidants โดยไปจับกับ ROS (ROS scavenging) เช่น catalase (CAT) superoxide dismutase (SOD) (Tanaka และคณะ 1999) ascorbate peroxidase (ASX) หรือ glutathione cycle (GST/ GPX) เป็นต้น การรักษาสมดุลของอออนและน้ำภายในและภายนอกเซลล์ผ่านโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการเคลื่อนย้าย (transporters) ต่างๆ ได้แก่ K^+ channels K^+ transporters (HTK) (Maathuis และคณะ 1997) Na^+/H^+ antiporter (Fukuda และคณะ 1999; Wu และคณะ 2005; Popova และ Gollmack 2006; Ouziad และคณะ 2006) aquaporins transporter (Ouziad และคณะ 2006) และ transporters อื่นๆ (ATPases และ amino acid หรือ sugar transporters) (Bohnert และคณะ 1998) ก็เป็นการลดภาวะเครียดที่พบเสมอในพืชที่อยู่ในสภาวะที่แห้งแล้ง (drought) และมีความเค็ม (salinity) นอกจากกลไกดังกล่าวแล้วการสร้างและสะสม metabolites อื่นๆ เพื่อรักษาสมดุลของเซลล์ เช่น น้ำตาล กรดอะมิโน (Pérez-Alfocea และ Larher 1995) รวมถึงน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆขึ้นในเซลล์พืชที่อยู่ภายใต้ภาวะเครียดก็จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการเคลื่อนย้ายและลำเลียงคาร์บอน (carbon partitioning) จากอวัยวะที่มีการสังเคราะห์ (source organ) ไปยังส่วนที่ไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง (sink organ) (Pattanagul และ Madore 1999) ด้วย จากข้อเท็จจริงดังที่ได้กล่าวไปแล้วทำให้มีการเพิ่มความสามารถในการทนเค็มในพืชต่างๆ โดยผ่านการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องต่างๆ เป็นต้นว่ามีการถ่ายยีน Na^+/H^+ antiporter และ SOD ไปยัง ryegrass (Wu และคณะ 2005) และข้าว (Tanaka และคณะ 1999) ตามลำดับ ทำให้พืชทั้งสองชนิดมีความสามารถในการทนเค็มเพิ่มขึ้น

สำหรับในงานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาล (sugar transporters) ทั้งชนิดโมเลกุลคู่และเดี่ยวภายใต้สภาวะเครียดที่มีเกลือโซเดียมคลอ

ไรด์ (NaCl) ในข้าวพันธุ์ KDML105 เนื่องจากยังไม่มีการศึกษากันมากนัก เท่าที่ปรากฏให้เห็นก็จะมีเพียงรายงานวิจัยของ Noiraud และคณะ (2000) ที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลซูโครสภายใต้สภาวะเครียดต่อเกลือ NaCl ใน celery (*Apium graveolens* L.) ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ที่สังเคราะห์น้ำตาลแมนนิทอลและซูโครสที่ใบแล้วลำเลียงไปยัง sink organs และเมื่ออยู่ภายใต้ภาวะเครียดจะปรับเปลี่ยนการขนย้ายสารประกอบคาร์บอนที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic carbon) จากซูโครสไปเป็นแมนนิทอลในสัดส่วนที่สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้คือ เมื่อ celery ได้รับสารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ นาน 4 สัปดาห์จะทำให้ระดับการแสดงออกของ *AsSUT1* (*A. graveolens* Suc uptake transporter1) ลดลงในทุกส่วนของอวัยวะพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของรากนั้นลดลงมากเป็นพิเศษ บ่งชี้ถึงความพยายามของ celery cells ที่จะคงระดับของน้ำตาลแมนนิทอลภายในเซลล์ให้สูงเพื่อทำหน้าที่เป็น osmoprotectant โดยการไ้ระดับของน้ำตาลซูโครสไปกด (repress) การแสดงออกของ mannitol dehydrogenase ดังนั้น จึงมีการคงระดับการแสดงออกของ *AsSUT1* ไว้และการแสดงออกที่ลดลงเป็นอย่างมากก็อาจเป็นเพราะความต้องการใช้พลังงานเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์นั้นลดลง (Noiraud และคณะ 2000) อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองดังกล่าวอาจไม่เหมือนกับในข้าว ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและการศึกษาเฉพาะการแสดงออกของ *AsSUT1* ซึ่งเป็นยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลชนิดโมเลกุลคู่ (disaccharide transporter) ก็ยังไม่เพียงพอที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ carbon partitioning จาก source ไปยัง sink organs ได้ ดังนั้น การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลทั้งที่เป็นชนิดโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide transporter) และคู่ (disaccharide transporter) ตลอดจนการวัดความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (sucrose) และกลูโคส (glucose) ทั้งในส่วนของใบ (source organs) และรากกับรวงข้าว (sink organs) ในระยะต่างๆ ที่มีความไวต่อความเค็ม น่าจะทำให้ได้ข้อมูลเพียงพอที่จะทราบถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ sugar transporters และ carbon partitioning ภายใต้ภาวะเครียดที่มีเกลือ ซึ่งจะนำไปสู่การควบคุมการแสดงออกของยีนได้อย่างเหมาะสมและพัฒนาสร้างข้าวทนเค็มได้ต่อไป นอกจากนี้การศึกษากการแสดงออกของ Na^+/H^+ exchanger gene ที่มีการแสดงออกในรากและต้นข้าวที่ได้รับเกลือ NaCl (Fukuda และคณะ 1999) ควบคู่ไปด้วยก็อาจจะทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนดังกล่าวนี้กับ sugar transporter genes ได้ดียิ่งขึ้น

ในงานวิจัยนี้จะทำการทดลองโดยใช้ข้าวขาวดอกมะลิ105 (KDML105) ซึ่งเป็นข้าวเจ้าพันธุ์พื้นเมืองที่รัฐบาลส่งเสริมให้ปลูกแบบข้าวนาสวนมาเป็นพืชต้นแบบ (plant model) ในการทดสอบระดับการแสดงออกของยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลและแลกเปลี่ยนโซเดียมออกซิเจน/โปรตอนภายใต้ภาวะเครียดต่อเกลือ โดยทำการศึกษาตั้งแต่การปลูกข้าวและเก็บที่ระยะที่มีความไวต่อเกลือ

ตั้งแต่วัยต้นอ่อนอายุ 14 วัน ระยะต้นกล้าข้าวอายุ 30 วัน และระยะต้นข้าวตั้งท้องก่อนออกรวง มาทำการทดสอบด้วยสารละลายเกลือ NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปศึกษา การแสดงออกของยีนดังกล่าวในส่วนของต้นและรากที่ระยะต้นอ่อนอายุ 14 และ 30 วัน และใน ส่วนของใบธงและรวงในระยะต้นข้าวตั้งท้องก่อนออกรวงโดยอาศัยเทคนิค semi-quantitative PCR พร้อมทั้งวัดระดับน้ำตาลซูโครส และกลูโคสอีกด้วย

ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *OsSUT1*, *OsMST3* และ *NHX1* ภายใต้สภาวะเครียด ต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ในข้าวที่ระยะต่างๆ
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลซูโครสและกลูโคสในข้าวภายใต้สภาวะเครียด ต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระยะต่างๆ
3. เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *OsSUT1*, *OsMST3* และ *NHX1* ที่มีต่อสภาวะ เครียดต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ในข้าวและการเปลี่ยนแปลงน้ำตาล

ขอบเขตของการศึกษา

1. ศึกษาการแสดงผลการแสดงออกของยีน *OsSUT1*, *OsMST3* และ *NHX1* ภายใต้สภาวะเครียด ต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ในข้าวขาวดอกมะลิ105 (KDML105) ในส่วนของต้นและ รากที่ระยะต้นอ่อนอายุ 14 วันและต้นข้าวอายุ 30 วัน และในส่วนของใบธงและรวง ของข้าวในระยะข้าวตั้งท้องก่อนออกรวงโดยใช้เทคนิค semi-quantitative PCR
2. หาปริมาณน้ำตาลซูโครสและกลูโคสของข้าวภายใต้สภาวะเครียดต่อเกลือโซเดียม คลอไรด์ในข้าวขาวดอกมะลิ105 (KDML105) ในส่วนของต้นและรากที่ระยะต้นอ่อน อายุ 14 วันและต้นข้าวอายุ 30 วัน และในส่วนของใบธงและรวงของข้าวในระยะข้าว ตั้งท้องก่อนออกรวงด้วยวิธี resorcinol-HCl และ glucose oxidase ตามลำดับ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. แหล่งกำเนิด และวิวัฒนาการข้าว (The Origin and Development of Rice)

ข้าวเป็นพืชล้มลุกตระกูลหญ้า (annual grass) ถูกจัดอยู่ในสกุลออไรซา (genus *Oryza*) ของวงศ์เกรมินี (family Poaceae หรือ gramineae) สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในเขตร้อน (tropical zone) และเขตอบอุ่น (temperate zone) จำนวนชนิด (species) ทั้งหมดที่พบในสกุลออไรซาของข้าว นั้น มีประมาณ 20 ชนิดด้วยกัน ข้าวที่ขึ้นอยู่ในท้องที่ต่างๆ ของโลกแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ ออไรซา ซาไทวา (*Oryza sativa*) ซึ่งมีแหล่งกำเนิดในทวีปเอเชีย และมีการปลูกกันทั่วไปใน เอเชีย และแหล่งอื่น ๆ ของโลก ออไรซา กลาเบอร์ริมา (*Oryza glaberrima*) ซึ่งมีแหล่งกำเนิด และ ปลูกเฉพาะในแอฟริกา และข้าวป่า (wild rice) ซึ่งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในประเทศต่างๆ ของทุก ทวีปที่ปลูกข้าว เช่น ออไรซา เพอเรนนิส (*Oryza perennis*) ออไรซา ออฟฟิซินาลิส (*Oryza officinalis*) ออไรซา สปอนทาเนีย (*Oryza spontanea*) ออไรซา นิวารา (*Oryza nivara*) เป็นต้น

จากการสำรวจพบว่าแหล่งปลูกข้าวของเอเชียในสมัยก่อนนั้นมีหลายแห่งด้วยกัน เช่น บริเวณที่ราบของแม่น้ำตอนเหนือในอินเดีย บริเวณตะวันออกเฉียงใต้ของเทือกเขาหิมาลัยผ่าน บริเวณ ตอนบนของพม่า ภาคเหนือของประเทศไทย ลาว และเวียดนามเหนือไปจดบริเวณด้าน ตะวันตกเฉียงใต้ และตอนใต้ของประเทศจีน จัดอยู่ในพวกออไรซา ซาไทวา ซึ่งเป็นสาเหตุให้มีการ แบ่งข้าวออไรซา ซาไทวา เป็น 3 ชนิด ได้แก่

อินดิกา (Indica) - มีเมล็ดยาวเรียวยาวเจริญเติบโตในบริเวณเขตร้อน เช่น ศรีลังกา จีนตอน ใต้ และตอนกลาง อินเดีย อินโดนีเซีย บังกลาเทศ ไทย ฟิลิปปินส์ เป็นต้น

จาโปนิกา (Japonica) - เมล็ดสั้นป้อม มีเอนไซม์อะไมเลส (amylase) ต่ำ เจริญเติบโต ในเขตอบอุ่น เช่น ประเทศจีนตอนเหนือ และตะวันออกเฉียงใต้ ญี่ปุ่น เกาหลี ยุโรปตอนใต้ รัสเซีย อเมริกา ใต้ เป็นต้น

จาวานิกา (Javanica) - เป็นข้าวต้นสูง เมล็ดใหญ่ป้อม สันนิษฐานว่า เกิดขึ้นจากการ คัดเลือกพันธุ์มาจากข้าวอินดิกา และได้นำมาปลูกในประเทศอินโดนีเซียครั้งแรก และต่อมาก็มีการ นำไปปลูกบ้างในประเทศฟิลิปปินส์ ได้หวัน และญี่ปุ่น แต่อย่างไรก็ตามข้าวจาวานิกานี้ส่วนใหญ่ จะปลูกในประเทศอินโดนีเซียเท่านั้น (บุญหงษ์ จงคิด 2547)

2. ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (Khao Dawk Mali 105)

2.1 ประวัติพันธุ์ - ได้มาโดยนายสุนทร สีหะเนิน พนักงานเกษตร รวบรวมจากอำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา เมื่อปี พ.ศ. 2493 - 2494 จำนวน 199 รวง แล้วนำไปคัดเลือกแบบคัดพันธุ์บริสุทธิ์ (pure line selection) และปลูกเปรียบเทียบพันธุ์ที่สถานีทดลองข้าว โคกสำโรง แล้วปลูกเปรียบเทียบกับพันธุ์ท้องถิ่นในภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จนได้สายพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 4-2-105 ซึ่งเลข 4 หมายถึงสถานที่เก็บรวงข้าว คือ อ.บางคล้า เลข 2 หมายถึง พันธุ์ทดสอบที่ 2 คือ ข้าวดอกมะลิ และเลข 105 หมายถึง แถวหรือรวงที่ 105 จากจำนวน 199 รวง โดยได้รับการรับรองพันธุ์ จากคณะกรรมการพิจารณาพันธุ์ ให้ใช้ขยายพันธุ์เป็นพันธุ์รับรอง เมื่อวันที่ 25 พฤษภาคม 2502 และให้ชื่อว่า ข้าวดอกมะลิ 105 (กรมการข้าว 2552)

2.2 ลักษณะประจำพันธุ์

- 2.2.1 เป็นข้าวเจ้า สูงประมาณ 140 เซนติเมตร
- 2.2.2 เป็นข้าวพันธุ์ไวต่อช่วงแสง ปลูกได้เฉพาะนาปี
- 2.2.3 ลำต้นสีเขียวจาง ใบสีเขียวยาวค่อนข้างแคบ ฟางอ่อน ใบธงทำมุมกว้างกับรวง
- 2.2.4 เมล็ดข้าวรูปร่างเรียวยาว ข้าวเปลือกสีฟาง
- 2.2.5 อายุเก็บเกี่ยว ประมาณ 25 พฤศจิกายน
- 2.2.6 ระยะพักตัวของเมล็ด ประมาณ 8 สัปดาห์
- 2.2.7 เมล็ดข้าวกล็อง กว้าง \times ยาว \times หนา = $2.1 \times 7.5 \times 1.8$ มิลลิเมตร
- 2.2.8 ปริมาณอะไมโลส 12-17%
- 2.2.9 คุณภาพข้าวสุก นุ่มหอม
- 2.2.10 ผลผลิตประมาณ 363 กิโลกรัมต่อไร่

2.3 ลักษณะเด่น

- 2.3.1 ทนแล้งได้ดีพอสมควร ปลูกเป็นข้าวไร่ได้
- 2.3.2 เมล็ดข้าวสารใส แกร่ง คุณภาพการขัดสีดี
- 2.3.3 คุณภาพการหุงต้มมีกลิ่นหอมและอ่อนนุ่ม
- 2.3.4 โรงสีมีความต้องการสูง จำหน่ายได้ราคาดี
- 2.3.5 แดกกอดี ต้นสูง เก็บเกี่ยวง่าย
- 2.3.6 ทนต่อสภาพดินเปรี้ยว และดินเค็ม

2.4 ลักษณะด้อย

- 2.4.1 ไม่ต้านทานโรคใบสีส้ม โรคขอบใบแห้ง โรคใบไหม้ และโรคใบหงิก
- 2.4.2 ไม่ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยจักจั่นสีเขียว และหนอนกอ

2.5 ส่วนประกอบต่างๆ ของต้นข้าว

2.5.1 ราก - รากข้าวเป็นระบบรากฝอย ประกอบด้วย ระบบรากและรากขนอ่อน การเจริญเติบโตของราก จะแบ่งย่อยออกเป็น 3 ชุด รากชุดแรกเกิดขึ้นหลังจากการงอก รากชุดที่สองเป็นรากที่เกิดจากข้อใต้ดินของต้นข้าวอ่อน รากชุดที่สามเป็นรากค้ำจุนหรือรากฝังดินเกิดจากข้อเหนือระดับผิวดิน รากทำหน้าที่ในการยึดลำต้น ดูคน้ำ และลำเลียงธาตุอาหาร ไปยังส่วนต่างๆ ของต้นข้าว

2.5.2 ลำต้น - ลำต้นของต้นข้าวเกิดจากชุดของข้อและปล้องที่เรียงต่อสลับกัน โดยมีผนังกันข้อกันแต่ละปล้อง บริเวณข้อเป็นที่เกิดของใบและตา บริเวณ โคนต้นจะมีข้อที่ค่อนข้างถี่ และเป็นจุดที่หน่อข้าวจะแตกออกเป็นต้นใหม่ ลำต้นทำหน้าที่พยุงใบ ดอก และรวง เพื่อให้ใบรับแสงสำหรับการสร้างอาหารและลำเลียงน้ำ อาหาร ไปยังส่วนต่างๆ ของลำต้น

2.5.3 ใบ - ข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ใบของต้นข้าวมีลักษณะเป็นแผ่นแบน บาง และยาวเรียวยาว ใบเกิดจากข้อของลำต้น เรียงสลับกันเป็นสองแนว ใบข้าวประกอบด้วย ด้วนใบ กาบใบหรือก้านใบ ข้อต่อใบ หูใบ และเขี้ยวกันแมลง ใบข้าวใบแรกที่เกิดจากต้นแม่จะมีลักษณะคล้ายกาบใบ ส่วนใบข้าวที่อยู่บนสุดของต้นข้าวได้ช่อดอกข้าวหรือรวงข้าว เรียกว่า ใบธง ในระยะที่ข้าวออกดอกผสมเกสรสร้างรวง และเมล็ดจะได้รับสารอาหารส่วนใหญ่จากใบธง และใบล่างถัดมาอีก 2-3 ใบ หน้าที่หลักของใบคือ การสร้างอาหาร

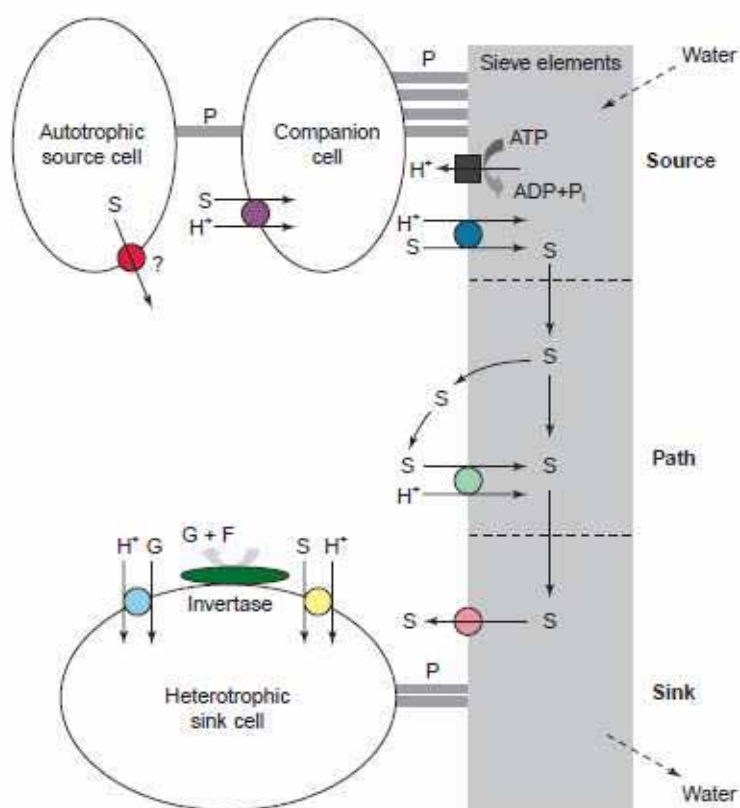
2.5.4 รวงข้าว - รวงข้าวประกอบด้วยแขนงอันแรกของช่อดอก ที่เกิดจากข้อด้านบนของคอรวง แขนงอันต่อไปเกิดจากแกนกลางของรวง บนแขนงจะแตกกิ่งเล็ก ซึ่งแต่ละกิ่งจะมีดอกข้าวเกิดขึ้น แขนงและกิ่งเล็กนี้เรียกว่า กระจ่าง ถ้าข้าวมีกระจ่างถี่แสดงว่ามีจำนวนดอกในรวงมาก แต่ถ้ากระจ่างห่างแสดงว่ามีจำนวนดอกในรวงน้อย

2.5.5 ดอกข้าว - ดอกข้าวประกอบด้วย กลีบฝ่อ มี 2 ปุ่มติดอยู่ที่คอรวงและส่วนปลายที่ต่อจากก้านดอกย่อย ช่อดอกเกิดถัดจากกลีบฝ่อขึ้นมาอยู่ระหว่างกลีบรองดอกและเปลือกดอกใหญ่ เป็นส่วนที่อยู่ติดกับเมล็ดของข้าว กลีบรองดอก อยู่ระหว่างกลีบฝ่อ และดอกข้าวเปลือกมี 2 เปลือก คือเปลือกดอกใหญ่และเปลือกดอกเล็ก ส่วนยอดของเปลือกดอกใหญ่บางพันธุ์จะมีปลายแหลมยื่นออกหรือเรียกว่า หาง เปลือกดอกทำหน้าที่ป้องกันและห่อหุ้มดอกไว้ข้างใน ดอกข้าวเป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีทั้งเกสรตัวผู้ และเกสรตัวเมียอยู่ภายในดอกเดียวกัน อับเกสรตัวผู้มีจำนวน 6 ชั่นและรังไข่ 1 รัง เชื่อมกันด้วยก้านฟูรับละอองเกสร ดอกข้าวสามารถผสมพันธุ์ได้ด้วยตัวเอง (มูลนิธิข้าวขวัญ 2552)

3. การลำเลียงน้ำตาลระยะทางไกลในพืชชั้นสูง (Long-Distance Transport of Sugar in Higher Plant)

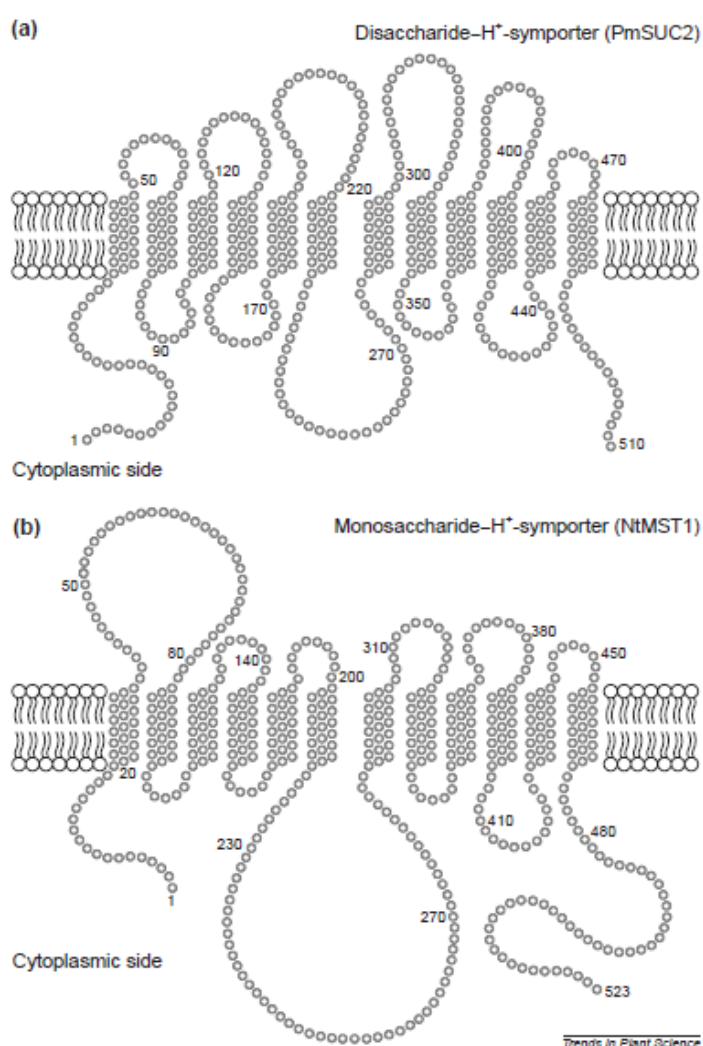
ส่วนของอวัยวะพืชที่ไม่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสง (non photosynthesis organs) เองได้ หรือที่เรียกว่า 'sink' จำเป็นต้องได้รับสารอาหาร หรือ อินทรีย์คาร์บอนจากเนื้อเยื่อที่เรียกว่า 'source' ซึ่งเป็นส่วนที่สร้างอาหารได้เองโดยอาศัยขบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) โดยคาร์บอนมากกว่า 80% ที่ได้จากขบวนการสังเคราะห์แสงจะถูกลำเลียงจากใบไปสู่ส่วนต่างๆ ที่ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมและการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะเหล่านั้น ซึ่งการเคลื่อนย้ายเหล่านี้จะเกิดขึ้นที่บริเวณท่อลำเลียงอาหาร (phloem) เป็นหลัก เรียกว่า phloem loading

ในพืชชั้นสูงมักพบกระบวนการ CO_2 fixation เกิดขึ้นโดยที่เซลล์ชั้นมีโซฟิลล์ (mesophyll cells) ของใบ ได้ผลิตผลิตภัณฑ์หลักเป็นน้ำตาล ที่ต้องอาศัยกลไกต่างๆ ในการนำส่งไปยังอวัยวะต่างๆ ได้อย่างเพียงพอเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช โดยสิ่งที่มีบทบาทสำคัญต่อกลไกดังกล่าวนี้ก็คือ โปรตีนเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายน้ำตาล (sugar transporter) โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายน้ำตาลโมเลกุลคู่ (sucrose หรือ disaccharide transporter) และกลุ่มที่ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide transporter) ซึ่งกระบวนการเคลื่อนย้ายน้ำตาลที่เกิดขึ้นนี้ส่วนใหญ่เกิดขึ้นในเซลล์ของ vascular system และ phloem sieve elements ดังภาพที่ 1 จากเริ่มแรกที่มีการสังเคราะห์น้ำตาลขึ้น จะมีการเคลื่อนย้ายน้ำตาลจาก mesophyll cells ไปยัง sieve element-companion cell (SE-CCC) เรียกว่า symplastic loading คือการเคลื่อนย้ายจากเซลล์หนึ่งไปสู่อีกเซลล์หนึ่งผ่านทาง plasmodesmata แต่อย่างไรก็ตาม ก็มีน้ำตาลซูโครสบางส่วนที่รั่วหลุดออกจากเซลล์ไป จะถูกนำกลับเข้าไปใน SE-CCC เรียกว่า apoplastic loading อาศัย plasma membrane sucrose- H^+ symporters และน้ำตาลซูโครสที่ถูกลำเลียงเข้ามาอยู่ในส่วนของ sieve elements ก็จะถูกลำเลียงต่อไปยัง sink organs ในแบบที่เรียกว่า long-distance transport โดยอาศัย sugar transporters ที่อยู่บริเวณต่างๆ ระหว่างเส้นทางการลำเลียง สำหรับการลำเลียงน้ำตาลซูโครสเข้าไปในเซลล์ของ sink organ อาจเกิดขึ้นได้ทั้งแบบ symplastic และ apoplastic ขึ้นกับชนิดของอวัยวะ หรือเนื้อเยื่อ และช่วงระยะของการพัฒนาเจริญเติบโตในพืช น้ำตาลที่ขนส่งมายัง sink มีทั้งแบบที่มาจากส่วนของ apoplast โดยตรงผ่านทาง sucrose transporters หรือทางอ้อมคือ น้ำตาลซูโครสจะถูกไฮโดรไลซ์ไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสด้วย cell-wall-bound invertases และนำเข้าสู่เซลล์โดยอาศัย monosaccharide transporters (Bush 1999; Kühn และคณะ 1999; Lemoine 2000; Williams และคณะ 2000) ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาล (sugar transporter genes)



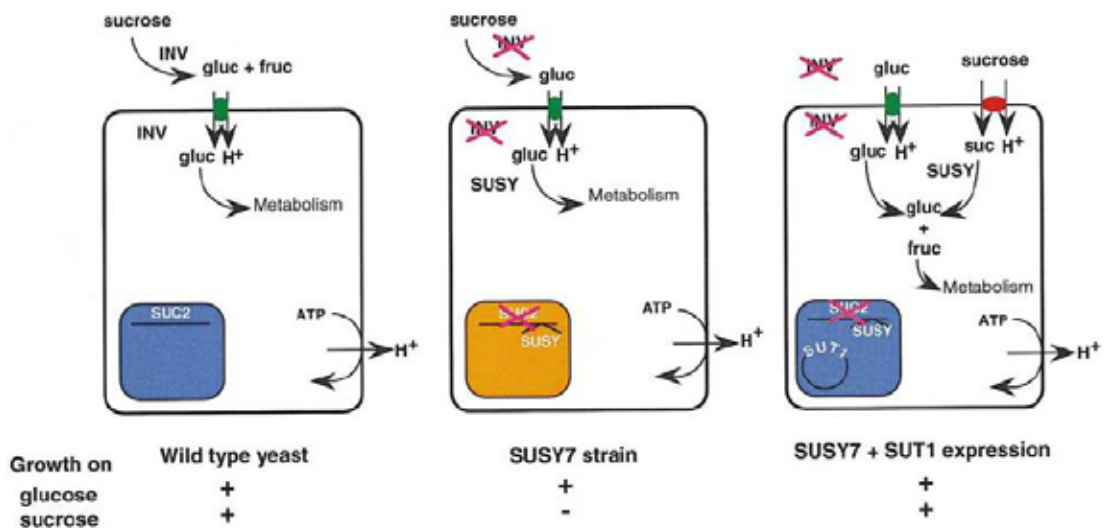
ภาพที่ 1 การลำเลียงน้ำตาลซูโครสระยะทางไกล (long-distance sugar transport) ระหว่าง sources และ sinks โดยอาศัยการทำงานของ sugar transporters เกิดขึ้นใน sieve elements ของ phloem ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ vascular system ซึ่งน้ำตาลซูโครส (S) จะเคลื่อนที่จาก mesophyll cells (source cell) ไปยัง sieve element-companion cell แบบ symplastic ผ่านทาง plasmodesmata (P) อย่างไรก็ตามในพืชบางชนิดก็มีน้ำตาลซูโครสบางส่วนที่รั่วหลุดออกจากเซลล์ไปอยู่ในส่วนของ apoplast และเป็นไปได้ว่าอาจเป็นผลจากการทำงานของ sucrose efflux carriers (วงกลมสีแดง) และน้ำตาลซูโครสจะถูกนำกลับเข้าสู่ sieve elements และ companion cells ด้วย plasma membrane proton-sucrose symporters (วงกลมสีม่วงและสีน้ำเงินเข้ม) พลังงานที่ใช้ในการเคลื่อนย้ายดังกล่าวได้จาก plasma membrane H^+ -ATPase (สีเหลี่ยมสีดำ) และในระหว่างการเคลื่อนย้ายน้ำตาลซูโครสบางส่วนที่หลุดรั่วออกระหว่างทางเคลื่อนย้ายจะถูกนำกลับเข้าสู่ phloem โดยอาศัย sucrose carriers (วงกลมสีเขียวอ่อน) และเมื่อเคลื่อนย้ายไปจนถึง sink น้ำตาลซูโครสจะถูกนำเข้าสู่ sink โดยเกิดขึ้นทั้งอาศัย sucrose efflux carrier (วงกลมสีชมพู) ผ่านทาง plasma membrane sucrose transporters (วงกลมสีเหลือง) หรือมีการไฮโดรไลซ์ไปเป็นน้ำตาลกลูโคส (G) และน้ำตาลฟรุกโตส (F) ด้วย cell-wall invertase (วงรีสีเขียวเข้ม) ก่อนที่จะนำเข้าสู่เซลล์โดยผ่านทาง plasma membrane monosaccharide transporters (วงกลมสีฟ้าอ่อน) (Williams และคณะ 2000)

3.1 โครงสร้างของ Sugar Transporter transporter ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า major facilitator superfamily (MFS) (Mager และคณะ 1993; Saier และคณะ 1999) ซึ่งประกอบขึ้นด้วย 12 transmembrane domain (TMDs) ที่มี hydrophilic loop ตรงกลางทำให้เกิดโครงสร้างแบบ 6-loop-6-structure ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยทั้ง disaccharide transporter (DST) และ monosaccharide transporter (MST) ต่างก็มีลักษณะของโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน โดยที่ DST จะมีการแสดงออกเป็นพิเศษในพืช ส่วน MST นั้นจะสามารถพบได้ใน bacteria Fungi และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Williams และคณะ 2000)



ภาพที่ 2 Topological models ของ disaccharide (a) และ monosaccharide transporter (b) (Williams และคณะ 2000)

3.2 ยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharide Transporter Gene) *OsSUT1* เป็นยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลตัวแรกที่ได้อิโคลนขึ้นมาในข้าว cDNA ของ *OsSUT1* มี open reading frame 1,611 bp (537 amino acids) ประกอบด้วย 12 transmembrane domains และแสดงความเหมือน 76.8- 79.7% กับโปรตีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลที่แสดงออกในพืชใบเลี้ยงคู่อื่นๆ (Hirose และคณะ 1997) มีความสำคัญในระบบ phloem loading และ long-distance transport (Riesmeier และคณะ 1994, Kühn และคณะ 1996) ควบคุมการเคลื่อนย้ายน้ำตาลจาก source organ ไปยัง sink organ พบในพวกตระกูลธัญพืชต่างๆ มีการทดลองเพื่อศึกษาหาหน้าที่ของยีนดังกล่าวโดยการทำ functional complementation ของ modified yeast strains ที่ไม่สามารถย่อยซูโครสจากภายนอกเซลล์ได้ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 Yeast system สำหรับการทำให้ functional cloning ของ sucrose transporters wild-type yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้เนื่องจากการทำงานของ เอนไซม์ extracellular invertase และ hexose transporters ใน plasma membrane (ซ้าย) ยีสต์สายพันธุ์ *SUSY7* เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่ถูกดัดแปลงให้ไม่มีเอนไซม์ invertase ทั้งในและนอกเซลล์ ไม่สามารถใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ (กลาง) เซลล์ยีสต์สายพันธุ์ *SUSY7* ที่มี ยีน *SUT1* จึงมีการแสดงออกของ sugar transporter ที่ผิวของ plasma membrane สามารถนำน้ำตาลซูโครสเข้าสู่เซลล์ และเกิดกระบวนการ sucrose synthase เพื่อเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่เซลล์นำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ (ขวา) เครื่องหมาย (+) และ (-) แทนความสามารถ และไม่สามารถเจริญเติบโตได้ของยีสต์ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน fruc, fructose; gluc, glucose; INV, invertase; suc, sucrose; SUC2, invertase gene; SUSY, sucrose synthase; SUT1, sucrose transporter1 gene. (Lalonde และคณะ 1999)

3.3 ยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharide Transporter Gene) *OsMST*

น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานหลักของทั้งสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถสังเคราะห์แสงเองได้ (heterotrophic organisms) และพืช ในปฏิกิริยาของวัฏจักรเคลวิน (calvin cycle) และ gluconeogenesis คาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกตรึงด้วยปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสง จะถูกเปลี่ยนให้เป็น monosaccharides เช่น น้ำตาลกลูโคส (glucose) หรือฟรุคโตส (fructose) ซึ่งเป็นหน่วยหลักของการนำไปใช้ในขบวนการคาร์ตาบอลิซึมของคาร์บอน (carbon catabolism) การเก็บรักษา และการลำเลียง และบ่อยครั้งที่น้ำตาลเหล่านี้จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ Masked form ซึ่งไม่สามารถถูกย่อยได้ง่ายด้วยเอนไซม์ของเซลล์ปกติ เช่น เก็บอยู่ในรูปของแป้ง หรือน้ำตาลซูโครส และอนุพันธ์อื่นๆ (raffinose และ verbascose) หรือในรูปของน้ำตาลอัลกอฮอล์ (sugar alcohols) ซึ่งสารประกอบต่างๆ เหล่านี้สังเคราะห์ได้จากน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอื่นๆ โดยการเก็บน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเหล่านี้ในรูปอื่นดังที่กล่าวมาจะช่วยให้เก็บได้เป็นระยะเวลาสั้นหรือเคลื่อนย้ายไปยังส่วนต่างๆ ของพืชได้โดยไม่ถูกย่อยสลายจากเอนไซม์ หรือถูกเปลี่ยนกลับไปอยู่ในรูปของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอื่นๆ

พืชหลายชนิดที่มีเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่ไม่มีสีเขียว เป็นส่วนที่ไม่สามารถสังเคราะห์แสงเองได้ ต้องอาศัยแหล่งคาร์บอนจากเนื้อเยื่อส่วนที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ โดยพบว่าเซลล์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์แสงเองได้ต่างๆ เหล่านี้จะเชื่อมต่อกับ phloem เพื่อให้สามารถขนส่งน้ำตาลซูโครสและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่ได้จากการสังเคราะห์แสงลำเลียงไปสู่เซลล์ได้ แต่อย่างไรก็ตามมีน้ำตาลซูโครสบางส่วนที่หลุดร่วงจาก phloem ออกมาในส่วนของ apoplast ของเซลล์หรือเนื้อเยื่อเหล่านี้ สามารถดึงกลับไปยังเซลล์ได้ด้วย Sucrose transporter ที่อยู่ตรงส่วนของ plasma membrane หรือถูก hydrolysis เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวโดยเอนไซม์ invertase ที่อยู่ตรงส่วนของผนังเซลล์ (cell wall bound invertase) ก่อนที่จะลำเลียงเข้าสู่เซลล์โดย monosaccharide transporter จากตรงจุดนี้จะทำให้เข้าใจถึงบทบาทหน้าที่และความสำคัญของ extracellular sucrose hydrolysis และ monosaccharide transporter ที่มีต่อการเจริญเติบโตของพืช (Sherson และคณะ 2000; Büttner และ Sauer 2000)

กว่า 10 ปีที่ได้มีการโคลนยีนที่กำหนดรหัส (encode) เป็น monosaccharide transporter โดย glucose transporter ของพืชที่ถูกโคลนเป็นชนิดแรกคือ *Chlorella vulgaris* (Sauer และ Tanner 1989) ซึ่งถูกเปลี่ยนชื่อในภายหลังเป็น *Chlorella kessleri* โดย Dr. Erich Kessler มหาวิทยาลัย Erlangen ซึ่งเป็นสาหร่ายเซลล์เดียวที่พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนของ monosaccharide H⁺ symporter (*CkHUPI*) มีความคล้ายคลึง (homology) กับ facilitate monosaccharide transport ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จากนั้นยังมีการโคลนยีน monosaccharide transporter เพื่อศึกษาอีกมากมาย โดยพบ

จำนวน 26 ยีน ใน *Arabidopsis thaliana* (Lalonde และคณะ 1999) และ 20 ยีนใน *Saccharomyces cerevisiae* (Kruckeberg 1996)

OsMST3 เป็นยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาล โมเลกุลเดี่ยวของข้าวประกอบด้วย 6 transmembrane domains จำนวน 2 ชุด มีการแสดงออกมากใน sink organs โดยเฉพาะที่ sclerenchyma cells ในราก เนื่องจากเป็นส่วนที่มีการแบ่งเซลล์เจริญเติบโตมากเกี่ยวข้องกับการสะสมของน้ำตาล โมเลกุลเดี่ยว เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ที่ระยะ cell thickening นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีนดังกล่าวในแคลลัสด้วย (Toyofuku และคณะ 2000) ในการศึกษา monosaccharide transport ในพืช พบว่า มีหน้าที่หลักในการลำเลียงน้ำตาล โมเลกุลเดี่ยวใน sink organ ทั้งยังพบว่ามีส่วนสำคัญในการตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดจากภาวะแวดล้อม เช่น เกิดบาดแผล หรือ โคนกักกินจากแมลง (Truenit และคณะ 1996) เป็นต้น

4. ผลกระทบของความเค็มต่อพืช (Effect of Salt Stress on Plants)

ความเค็มเป็นหนึ่งในความเครียดจากสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic stresses) ที่มีผลกระทบต่อคุณภาพและผลผลิตของพืช ตามที่ USDA salinity laboratory ระบุไว้ว่า ดินเค็มคือ ดินที่มีค่าการนำไฟฟ้าของดิน (EC_e) ที่ประมาณ 4 dS m^{-1} (4 dS m^{-1} ประมาณ 40 mM NaCl) หรือมากกว่า โดย รั้วพืชและผักส่วนใหญ่ที่จำแนกเป็นพืชจำพวก glycophytes จะมีความไวต่อดินเค็มสูง แม้กระทั่งในดินที่มีค่า $EC_e < 4 \text{ dS m}^{-1}$ ซึ่งค่าต่ำสุดที่พืชทนได้ (threshold salinity) นั้นจะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 พืชชนิดต่างๆ กับค่า threshold salinity และปริมาณผลผลิตที่ลดลงต่อหน่วย (Maas 1990)

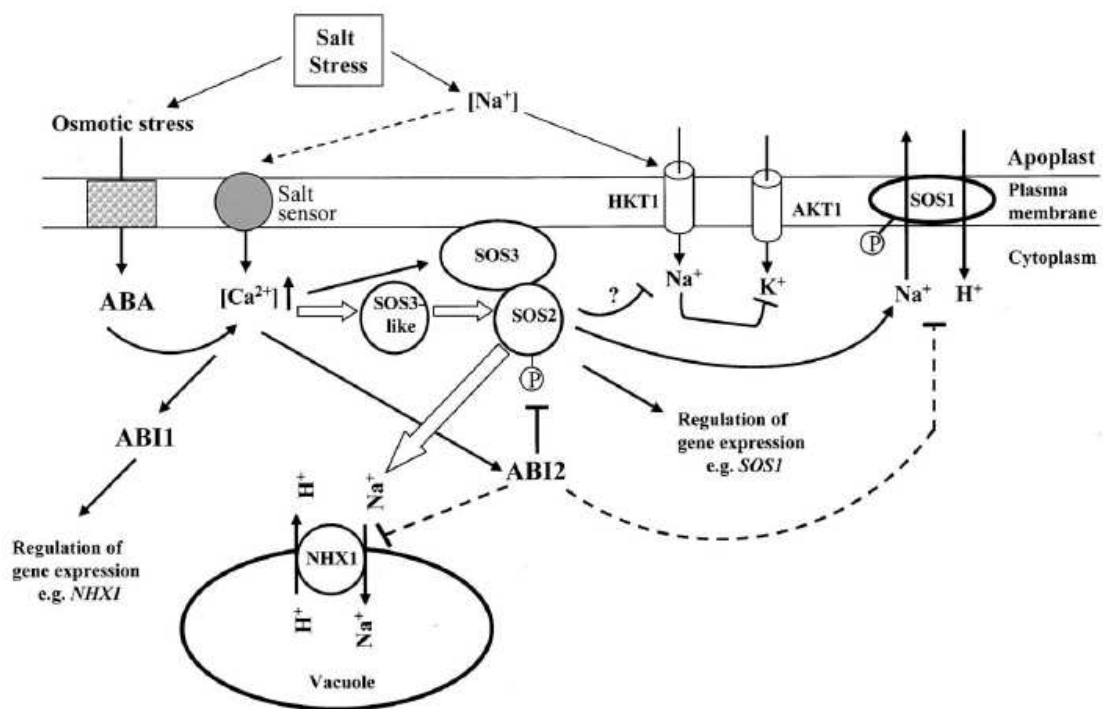
Crop	Threshold salinity	Decrease in yield
	dS m^{-1}	Slope % per dS m^{-1}
Bean (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	1.0	19.0
Eggplant (<i>Solanum melongena</i> L.)	1.1	6.9
Onion (<i>Allium cepa</i> L.)	1.2	16.0
Pepper (<i>Capsicum annuum</i> L.)	1.5	14.0
Corn (<i>Zea mays</i> L.)	1.7	12.0
Sugarcane (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	1.7	5.9
Potato (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	1.7	12.0
Cabbage (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.)	1.8	9.7
Tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	2.5	9.9
Rice, paddy (<i>Oryza sativa</i> L.)	3.0	12.0
Peanut (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	3.2	29.0
Soybean [<i>Glycine max</i> (L.) Merr.]	5.0	20.0
Wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.)	6.0	7.1
Sugar beet (<i>Beta vulgaris</i> L.)	7.0	5.9
Cotton (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	7.7	5.2
Barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	8.0	5.0

ผลกระทบของความเค็มต่อพืชอาจเนื่องมาจากความเป็นพิษของประจุ (ion cytotoxicity) (ส่วนมากเนื่องจากประจุ Na^+ Cl^- และ SO_4^{2-}) และความเครียดจากแรงดันออสโมติก (osmotic stress) (Zhu 2002) ซึ่งพืชส่วนใหญ่จะมีความไวต่อความเค็ม แม้กระทั่งในดินที่มีค่า EC_e น้อยกว่า 3.0 dS m^{-1} (จากตารางที่ 1) หรือก็คือ ค่า osmotic potential น้อยกว่า -0.117 MPa (osmotic potential = $-0.39 \times \text{EC}_e$) ที่ความเค็มระดับนี้พืชจะมีความไวตอบสนองต่อความเป็นพิษของประจุ (ion toxicity) มากกว่าความเครียดที่เกิดจากแรงดันออสโมติก (osmotic stress) ซึ่งความเป็นพิษของประจุนั้นเกิดจากการแทนที่ประจุของ K^+ ด้วย Na^+ ในปฏิกิริยาชีวเคมีและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง และสูญเสียหน้าที่ของโปรตีนเนื่องจากประจุ Na^+ และ Cl^- ไปล้อมรอบและไปรบกวนด้วยการเกิดปฏิสัมพันธ์แบบนอนโควาเลนต์ (noncovalent interaction) กับกรดอะมิโนเหล่านั้น การเสียสมดุลของเมตาบอลิซึม (metabolic imbalances) ที่เกิดจากสาเหตุต่างๆ ได้แก่ ความเป็นพิษจากประจุ (ionic toxicity) ความเครียดจากแรงดันออสโมติก (osmotic stress) และการขาดสารอาหาร (nutritional deficiency) ภายใต้อาณาเขตความเค็มอาจนำไปสู่การเกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งคือภาวะที่มีอนุมูลอิสระมากมายเสียหายสารต้านอนุมูลอิสระมีไม่เพียงพอ และจากสาเหตุดังกล่าวส่งผลให้เกิดการทำลาย ดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน และโมเลกุลขนาดเล็กอื่นๆ โดยการทำลายดังกล่าวจัดเป็น oxidative damage (Chinnusamy และคณะ 2005)

5. การควบคุมสมดุลของประจุภายใต้ความเครียดต่อเกลือ (Regulation of Ion Homeostasis under Salt Stress)

ภายใต้ภาวะเครียดต่อเกลือ พืชจะพยายามรักษาระดับความเข้มข้นของประจุโพแทสเซียม (K^+) ให้สูงกว่าระดับความเข้มข้นของประจุโซเดียม (Na^+) ภายในไซโตซอล (cytosol) ด้วยการควบคุมการลำเลียงไอออน (ion flux) ที่เป็นกลไกสำคัญของเซลล์เพื่อรักษาระดับไอออนเป็นพิษ (toxic ions) ให้อยู่ระดับต่ำ และคงไว้ซึ่งประจุที่จำเป็น (essential ions) โดยปกติแล้วเมื่อ Na^+ เคลื่อนที่ผ่านเข้ามาทาง nonspecific ion channels ภายใต้อาณาเขตความเค็มอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิด membrane depolarization ที่ไปกระตุ้น Ca^{2+} channels ทำให้เกิด Ca^{2+} oscillations และส่งสัญญาณความเครียดต่อเกลือขึ้น ในขณะที่ปริมาณเซลล์ลดลงเพราะการสูญเสียแรงดันเต่ง (turgor loss) และทำให้ plasma membrane หดตัวออกจากผนังเซลล์ ซึ่งส่งสัญญาณที่อาจรับรู้ได้โดย channels ต่างๆ ที่ถูกกระตุ้นและ transmembrane protein kinases นอกจากนี้ความเค็มยังไปควบคุมให้มีการสังเคราะห์ฮอร์โมน ABA (Abscisic acid) มากขึ้น และทำให้เกิดการสะสมของ ROS (reactive oxygen species) ด้วย โดย ABA และ ROS มีส่วนในการทำหน้าที่ควบคุมสมดุลของประจุ และควบคุมการถูกทำลายจากภาวะเครียดและกระบวนการซ่อมแซมด้วย

การควบคุมการนำเข้า K^+ และ/หรือ การป้องกันการผ่านเข้ามาของ Na^+ การลำเลียง Na^+ ออกจากเซลล์และการใช้ประโยชน์จาก Na^+ เพื่อปรับสมดุล osmotic ล้วนเป็นกลยุทธ์ที่ใช้ตามปกติของพืชเพื่อคงระดับของ K^+/Na^+ ใน cytosol ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม การรักษาสมดุลของประจุเกิดขึ้นทั้งการเก็บ Na^+ ไปไว้ใน vacuole หรือการสังเคราะห์พวกสาร compatible solute ต่างๆ โดยระบบที่ใช้ลดความเป็นพิษของ ROS และ โปรตีนที่ตอบสนองต่อความเครียดอยู่ในตระกูลเดียวกันกับโปรตีน LEA (Late Embryogenesis Abundant) ซึ่งมีส่วนช่วยในการป้องกันการถูกทำลายจากความเครียดต่อเกลือ นอกจากนี้กลไกต่างๆเหล่านี้แล้วยังพบว่ามีกลไกในการขับเกลือออกจากเซลล์ของพืชทนเค็ม (halophytic plants) ด้วย ดังนั้นการควบคุมอย่างถูกต้องและเหมาะสมของระบบการขนส่งไอออน (ion transport systems) เป็นสิ่งสำคัญสำหรับการต้านทานความเค็ม เพื่อความเข้าใจลึกซึ้งในการรักษาสมดุลของประจุภายใต้สภาวะเครียดต่อเกลือ ได้มีการนำเอา *SOS* (Salt Overly Sensitive) mutants ของ *Arabidopsis* มาวิเคราะห์การทำงานระดับพันธุศาสตร์โมเลกุล (Zhu 2003) ดังรายละเอียดที่ปรากฏในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 SOS signaling pathway สำหรับการปรับสมดุลประจุภายใต้ภาวะเครียดต่อเกลือใน *Arabidopsis* (Chinnusamy และคณะ 2005)

5.1 Sodium Influx และ K^+/Na^+ Balance ของ K^+/Na^+ ที่สูงใน cytosol เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการทำงานในระดับเซลล์ของพืชให้เป็นปกติ โดยจะมีการแข่งขันการดูดซับของ Na^+ กับ K^+ ผ่านทาง Na^+-K^+ cotransporter และอาจไปขัดขวาง K^+ -specific transporter ของเซลล์รากภายใต้ความเค็ม ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษของ Na^+ และทำให้ความเข้มข้นของ K^+ ไม่เพียงพอสำหรับปฏิกิริยาต่างๆที่ใช้เอนไซม์และการปรับสมดุลออสโมติก โดยจะมีการนำ Na^+ เข้ามา (sodium influx) ยัง cytosol ของเซลล์ราก ผ่าน cation channels หรือ transporters ต่างๆ ทั้งแบบคัดเลือกและไม่คัดเลือก (selective and nonselective) หรือมีการนำ Na^+ เข้ามายังระบบไหลเวียนในท่อลำเลียงน้ำของราก (root xylem stream) ผ่าน apoplastic pathway ขึ้นกับชนิดของพืช ซึ่งเป็นกลไกที่พบในข้าว แต่การสะสมของ silica และการเกิด polymerization ของ silicate ใน endodermis และ rhizodermis จะขัดขวางการนำ Na^+ ผ่านเข้ามาของรากของข้าวโดยอาศัยกลไกของ apoplastic pathway การจำกัดปริมาณการนำเข้า Na^+ เข้ามายังเซลล์ของรากหรือเข้าไปยังระบบไหลเวียนของท่อลำเลียงจึงเป็นเพียงแนวทางเดียวของพืชในการที่จะรักษาระดับของ K^+/Na^+ ใน cytosol ให้เหมาะสมได้ ดังนั้นการไปกีดการแสดงออกของ Na^+ transporter (HKT) จะทำให้พืชมีความสามารถในการทนเค็มมากขึ้น

5.2 Sodium Efflux การนำ Na^+ ออกจากเซลล์ของราก (sodium efflux) เป็นกลไกในการป้องกันการสะสมระดับความเป็นพิษของ Na^+ ใน cytosol และยังเป็นกลไกการลำเลียง Na^+ ไปยังส่วนของต้นด้วย การศึกษาในระดับพันธุศาสตร์โมเลกุลใน *SOS* (*S*alt *O*verly *S*ensitive) mutants ของ *Arabidopsis* ทำให้ระบุได้ว่า plasma membrane Na^+/H^+ antiporter, SOS1 มีบทบาทสำคัญในการลำเลียง Na^+ ออกจากเซลล์ผิวของรากภายใต้ความเค็ม โดยยีนดังกล่าวจะมีการแสดงออกที่สูงขึ้น sodium efflux โดยการทำงานของ SOS1 ยังมีส่วนสำคัญต่อกลไกต้านทานความเค็มของเซลล์เนื้อเยื่อเจริญ เช่น ปลายรากและปลายยอดของพืชที่กำลังเจริญเติบโต เนื่องจากเซลล์เหล่านี้มีขนาด vacuole ที่ไม่ใหญ่พอสำหรับกักเก็บ Na^+ (sodium compartmentation) การแสดงออกของยีน *SOS1* จะค่อนข้างสูงแต่จะมากเป็นพิเศษในเซลล์ผิวที่อยู่ล้อมรอบปลายรากและใน parenchyma cells รอบขอบของ xylem ดังนั้น SOS1 จึงทำหน้าที่เป็น Na^+/H^+ antiporter บน plasma membrane และมีบทบาทสำคัญต่อ sodium efflux จากเซลล์ของรากและการลำเลียงในระยะทางไกล (long distance transport) ของ Na^+ จากรากไปยังต้น ซึ่ง sodium efflux ผ่านการทำงานของ SOS1 ภายใต้ความเค็มจะถูกควบคุมด้วย SOS3-SOS2 kinase complex ดังแสดงในภาพที่ 4

5.3 Sodium Compartmentation แรงดันเต่งจำเป็นต่อการขยายขนาดและการเจริญเติบโตของเซลล์และยังมีผลต่อการปิดเปิดของปากใบในพืชด้วย การลดลงของ water potential เนื่องจากดินเค็มจะทำให้เกิด osmotic stress นำไปสู่การสูญเสียความเต่งของเซลล์พืช ทำให้พืชมีกลไกการปรับสมดุลออสโมติก โดยการสะสม active solute เพื่อรักษาระดับการดูดรับน้ำ และแรงดันเต่งภายใต้ภาวะดังกล่าว สำหรับการปรับสมดุลออสโมติกนั้นพืชจะใช้ไอออนอนินทรีย์ (inorganic ions) เช่น Na^+ และ K^+ และ/หรือ organic compatible solutes ที่สังเคราะห์ขึ้น เช่น proline betaine polyols และ soluble sugars การนำเอา Na^+ เข้าไปเก็บใน vacuole นับเป็นสิ่งสำคัญ และเป็นกลยุทธ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการที่จะรักษาสมดุลออสโมติกและยังช่วยลดความเข้มข้นของ Na^+ ใน cytosol อีกด้วย โดยการผ่านของ Na^+ เข้าไปยัง vacuole จะอาศัยการแสดงออกและการทำงานของ Na^+/H^+ antiporter และ V-type H^+ -ATPase ร่วมกับ H^+ -PPase ซึ่งการเติมหมู่ฟอสเฟตเหล่านี้จะทำให้เกิด proton gradient ที่จำเป็นต่อการทำงานของ Na^+/H^+ antiporter

พบการชักนำ tonoplast Na^+/H^+ antiporter *NHX1* gene ใน *Arabidopsis* และข้าว เนื่องจากความเค็มและฮอร์โมน ABA และ tonoplast Na^+/H^+ exchange activity ไม่ได้ถูกควบคุมด้วย SOS3 โดยตรง แต่การปฏิสัมพันธ์ของ SOS2 กับ calcium sensor proteins ในพืช คือ ScaBP1 (SOS3-like calcium binding proteins 1) อาจส่งสัญญาณให้ SOS2 ไปควบคุมการทำงานของ tonoplast Na^+/H^+ exchanger ดังแสดงในภาพที่ 4

สำหรับในข้าวก็มีการโคลนยีน *OsNHX1* (Na^+/H^+ exchanger gene) ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกของกลไก Na^+/H^+ exchanger บริเวณ membrane ของแวคคิวโอล (vacuole) มีขนาด 1608 bp และมีการแสดงออกเมื่อได้รับเกลือ (Fukuda และคณะ 1999) ยีนนี้ทำหน้าที่ในการควบคุมระดับของ pH ปริมาตรของเซลล์ และระดับของโซเดียมใน cytoplasm พบในสัตว์ ยีสต์ แบคทีเรีย และพืช โดยในพืชจะเกี่ยวข้องกับกลไกต้านทานความเค็ม เนื่องจากโปรตีนที่เกิดจากการควบคุมของยีนดังกล่าวมีหน้าที่ในการดึงเอาโซเดียมเข้าไปเก็บไว้ในแวคคิวโอล เพื่อลดระดับความเป็นพิษใน cytoplasm เพื่อคงระดับโซเดียมใน cytoplasm

5.4 Compatible Osmolytes เมื่ออยู่ภายใต้ภาวะ osmotic stress พืชมักจะใช้อิออนในการปรับสมดุลออสโมติกมากกว่าการสังเคราะห์ organic osmolytes โดยพืชหลายชนิดจะมีการสะสม organic osmolytes (เช่น proline betaine polyols และ soluble sugars) เพื่อต้านทานต่อภาวะดังกล่าว โดย glycine betaine และ trehalose จะทำหน้าที่เป็น osmoprotectants โดยการไปทำให้ quaternary structures ของโปรตีนมีความเสถียรและการจัดเรียงตัวของชั้น membrane ส่วน mannitol จะทำหน้าที่เป็นตัวจับอนุมูลอิสระ (free-radical scavenger) ในขณะที่ proline จะทำหน้าที่

เป็น storage sink เพื่อเก็บ carbon และ nitrogen และยังทำหน้าที่เป็น free-radical scavenger อีกด้วย จึงพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารต่างๆเหล่านี้จะมีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับความเค็มและความเข้มข้นของการสะสมของ osmoprotectants เหล่านี้ที่เพิ่มสูงขึ้นจะมีความสัมพันธ์กับการต้านทานต่อภาวะ osmotic stress จากความสำคัญของสารเหล่านี้จึงมีการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม โดยใส่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารดังกล่าวเข้าไปทำให้พืชสามารถทนต่อภาวะเครียดได้สูงขึ้น ตัวอย่างของพืชที่มีการดัดแปลงพันธุกรรมและใส่ยีนดังกล่าวเข้าไป ได้แก่ *Arabidopsis* rice wheat และ *Brassica* เป็นต้น (Chinnusamy และคณะ 2005)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สารเคมีและอุปกรณ์

1. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาเป็นสารเคมีที่ใช้ศึกษาในระดับ Molecular biology grade

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Agar bacteriological	Scharlau Chemie
Agarose	Gibco BRL
Ampicillin	Fluka
Bacto tryptone	Scharlau Chemie
Bacto yeast extract	Scharlau Chemie
Bromophenol blue	Fluka
Calcium chloride	Fluka
Chloroform	Lab Scan
CTAB (Cetyl triethylammonium bromide)	Sigma
Deoxynucleotide-5'-triphosphate (dNTP)	BIO-RAD
3,5-Dinitrosalicylic acid	Fluka
DNA Ladder 1kb	Fermentas/NEB
Ethanol	Mallinckrodt
Ethidium bromide	Fluka
Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	Fluka
Glacial acetic acid	Anala R
Glucose	Sigma
Glycerol	Invitrogen
Hydrochloric acid	LAB-SCAN
Isoamyl alcohol	Merck

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Liquid nitrogen	Mastertax
Lithium chloride	Merck
N,N-Dimethylformamide	Fluka
Magnesium chloride	Fluka
Maleic acid	Fluka
2-Mercaptoethanol	Sigma
MST3 F primer และ MST3 R primer	Bio Basic Inc.
3-(N-Morpholino)propanesulphonic acid (MOPs)	Bio Basic Inc.
Oligo dT ₍₁₂₋₁₈₎	Invitrogen
OsNHX1_F38-59 primer และ OsNHX1_R336-357 primer	Bio basic Inc.
Phenol	AMRESCO
Resorcinol	Fluka
18s forward primer and 18s reverse primer	Bio basic Inc.
Sodium acetate	Riedel-de Haen
Sodium chloride	Fluka
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Fluka
Sodium hydroxide	Lab Scan
Sucrose	Sigma
TRI Reagent	Molecular Research Center inc.
Tris base	AMRESCO
Tris-HCl	Lab-scan
TSUT1 F primer and TSUT1 R primer	Bio basic Inc.
VC 100bp Plus DNA Ladder (<i>ready-to-use</i>)	Vivantis

2. เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองและแหล่งที่มา

เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นสารเคมีที่ใช้ศึกษาในระดับ Molecular biology grade

เอนไซม์	บริษัทผู้ผลิต
Taq DNA Polymerase (recombinant)	Fermentas
T4 DNA ligase	Promega
M-MuLV reverse transcriptase	Fermentas

3. ชุดสกัดและติดฉลากสำเร็จรูปและแหล่งที่มา

ชุดสกัดและติดฉลากสำเร็จรูป	บริษัทผู้ผลิต
HiYield™ Gel / PCR Extraction Kit	Real Biotech
DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I	Roche

4. เครื่องมือ/อุปกรณ์และบริษัทผู้ผลิตเครื่องมือ

เครื่องมือ/อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
Cool-hotter dry bath incubator	Major Science
Cuvette	Starna®
Gel document	SYNGENE
Hybond nylon membrane	Hybond™ -N+ Amersham
Hot plate	Hot plate (Framo-Geratetechnik D-7821 Eisenbach Hochschwaxwald 1)
Incubator	DAIHAN Scientific Co., Ltd.
Microcentrifuge	Gyrozen
Microcentrifuge	LABNET INTERNATIONAL
Micropipette	GILSON, BIO-RAD
Microwave	Microwave (Tubora TRX248G)
YSI 2365 Glucose (Dextrose) Membrane Kit	YSI Life Sciences

เครื่องมือ/อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
Parafilm	Pechiney Plastic Packing (M)
Shaker	Super Line : SP-KR
Spectrophotometer	Spectronic Instrument : Spectronic Genesys 8
Vortex	Scientific industries : vortex-genie 2
Vacuum desicator chamber	Kartell
Water bath	Eyela shaker water bath : Model ss-820
กระดาษกรอง	Whatman 3 MM
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	Sartorius Basic BA20015 Precisa XT1200C
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Sartorius Basic BA20015 Precisa XT1200C
เครื่องผลิตน้ำ MilliQ	ELGA (Maxima LS. Model)
เครื่องผลิตน้ำกลั่น	ELGA (Reservoir75 : LC136)
เครื่อง PCR	PERKIN ELMER:GeneAmp PCR System 2400
ตู้เย็น	Whirlpool
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	pH Meter CG840 Cyber500 Type S201B
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์	Autoclave 'Tomy-SS325' Tomy KogyoCo., Ltd 3-14-17, Togara, Nerimaku

5. พืชทดลอง

เมล็ดข้าว ในงานวิจัยนี้ใช้เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) ชนิด Indica พันธุ์ข้าวดอกมะลิ105 (KDML105) จากกรมวิชาการเกษตร

6. เชื้อแบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่มีพลาสมิด pBluescript ซึ่งสอดแทรกด้วยยีน *OsSUT1* รูป mRNA ที่เจริญอยู่ในอาหารเหลว LB medium (Luria Bertani; 1% tryptone, 0.5% yeast extract และ 1% NaCl หรือ LB Agar; 1.5% agar plates)

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการคัดเลือกเซลล์ลูกผสม (transformant cells) คือ LB medium ที่เติมยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดลองนี้คือ ampicillin ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ในการเจริญของเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน และเก็บรักษาเชื้อที่เจริญที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-3 สัปดาห์

สำหรับการเก็บเชื้อไว้เป็น stock cultures ใช้สภาวะแช่แข็งโดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญใน LB medium ที่เจริญถึงขั้น exponential phase โดยนำเชื้อปริมาณ 500 ไมโครลิตรกับ 40% glycerol ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 500 ไมโครลิตรผสมกันในอัตราส่วน 1:1 แล้วเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส

7. ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

7.1 ไพร์เมอร์สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน 18s ribosomal RNA ที่ทำหน้าที่เป็น loading control คือ 18s forward primer ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

5' AAC TAG CTA TGC GGA GCC AT 3'

และ 18s reverse primer ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

5' AGG TTC AAT GGA CTT CTC GC 3'

7.2 ไพร์เมอร์สำหรับตรวจการแสดงออกของยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลโมเลกุลคู่ *OsSUT1* คือ TSUT1 F (forward primer) ซึ่งมีลำดับ นิวคลีโอไทด์ ดังนี้

5' GGG ATT CTG GCT TCT TGA T 3'

และ TSUT1 R (reverse primer) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

5' CGA ATT CAG TAG CAG GCC AA 3'

7.3 ไพร์เมอร์สำหรับตรวจการแสดงออกของยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว *OsMST3* คือ MST3 F (forward primer) ซึ่งมีลำดับ นิวคลีโอไทด์ ดังนี้

5' CAG GCA AGG ACT ACC CTG GCA 3'

และ MST3 R (reverse primer) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

5' ACC GAC TGA TTG GCG AAG CCG ACG 3'

7.4 ไพร์เมอร์สำหรับตรวจการแสดงออกของยีนแลกเปลี่ยนโซเดียม/โปรตอนอออน *OsNHX1* คือ OsNHX1_F38-59 (forward primer) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

5' AGC CAA CCG AGA GAG GTC TCG A 3'

และ OsNHX1_R336-357 (reverse primer) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

5' ACG CGT AGT CGG AGG TCG TGT A 3'

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมพืชทดลอง

1.1 ต้นข้าวอายุ 14 วัน เพาะเมล็ดข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) โดยนำไปล้างน้ำประปา 3 ครั้ง จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยการแช่ในเอทานอล 95% เป็นเวลา 1 นาที แล้วแช่สารละลายคลอโรกซ์ 40% เป็นเวลา 40 นาที สุดท้ายล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการทำไร้เชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 5 นาที แช่เมล็ดข้าวปริมาณน้ำประมาณ 3-4 วัน แล้วนำไปปลูกในกระบะทรายรดด้วยปุ๋ยข้าวผสมปุ๋ยยูเรียอัตราส่วน 2:1 และฉีดพ่นด้วยสารละลายเหล็กความเข้มข้น 3.72 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14 วัน

1.2 ต้นข้าวอายุ 30 วัน เพาะเมล็ดข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) โดยนำไปล้างน้ำประปา 3 ครั้ง จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยการแช่ในเอทานอล 95% เป็นเวลา 1 นาที แล้วแช่สารละลายคลอโรกซ์ 40% เป็นเวลา 40 นาที สุดท้ายล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการทำไร้เชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 5 นาที แช่เมล็ดข้าวปริมาณน้ำประมาณ 3-4 วัน แล้วนำไปปลูกในกระบะทรายรดด้วยปุ๋ยข้าวผสมปุ๋ยยูเรียอัตราส่วน 2:1 และฉีดพ่นด้วยสารละลายเหล็กความเข้มข้น 3.72 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 30 วัน

1.3 ต้นข้าวระยะตั้งท้องก่อนออกรวง เพาะเมล็ดข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) โดยนำไปล้างน้ำประปา 3 ครั้ง จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยการแช่ในเอทานอล 95% เป็นเวลา 1 นาที แล้วแช่สารละลายคลอโรกซ์ 40% เป็นเวลา 40 นาที สุดท้ายล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการทำไร้เชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 5 นาที แช่เมล็ดข้าวปริมาณน้ำประมาณ 3-4 วัน แล้วนำไปปลูกในกระบะทรายรดด้วยปุ๋ยข้าวผสมปุ๋ยยูเรียอัตราส่วน 2:1 และฉีดพ่นด้วยสารละลายเหล็กความเข้มข้น 3.72 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 30 วัน จากนั้นย้ายต้นข้าวไปปลูกลงในกระถางดิน แล้วใส่ปุ๋ยข้าวผสมปุ๋ยยูเรียอัตราส่วน 2:1 โดยใส่เดือนละครั้งจนถึงระยะตั้งท้องก่อนออกรวง (ประมาณ 90 วัน)

1.4 ทดสอบด้วยเกลือ นำต้นข้าวที่มีอายุ 14, 30 วันหรือระยะตั้งท้องก่อนออกรวง (ประมาณ 90 วัน) มาทดสอบด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์นาน 0, 3, 6, 9, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ โดยข้าวที่มีอายุ 14 และ 30 วันจะเก็บแยก

ส่วนต้นและราก ส่วนข้าวในระยะตั้งท้องก่อนออกรวงจะเก็บแยกส่วนใบธง ใบรองใบธง กาบใบ รวง ปล้องใต้รวง และราก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ต่อไป

2. การเตรียมยีนติดตาม *OsMST3* และ *OsNHX1*

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากพืชทดลอง นำต้นข้าวอายุประมาณ 14 วันมาสกัด genomic DNA ด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ นำต้นอ่อนข้าวมาทำการบดด้วยไนโตรเจนเหลว ใส่สารละลาย extraction buffer (1M Tris-HCl pH8.0, 0.5 M NaCl, CTAB และ β -mercaptoethanol) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรและ 20% SDS ปริมาตร 40 ไมโครลิตรในโกร่งเย็น จากนั้นนำไปบดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติม chloroform: isoamylalcohol (24 : 1) ขนาดปริมาณเท่ากับสารละลายผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ 1,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดส่วนใส (supernatant) ใส่ลงใน eppendorf ใหม่ จากนั้นเติม 3M CH_3COONa ปริมาตร เท่ากับ 1/10 ของสารละลายส่วนใสที่ได้ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายส่วนใส ผสมให้เข้ากัน โดยพลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอพันเป็นเกลียว นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้งเก็บตะกอน (pellet) แล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol หมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที หลังจากนั้นทำตะกอนให้แห้งภายใต้สุญญากาศ (vacuum dry condition) นาน 5 นาที หรือปล่อยให้แห้งด้วยอากาศ แล้วนำตะกอนละลายด้วยน้ำ Milli Q ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 20 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การออกแบบไพรเมอร์ (Primers) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OsMST3* และ *OsNHX1* ที่มีอยู่ใน GenBank เป็นต้นแบบในการออกแบบ primer โดยมีการนำสายนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับยีนในกลุ่มเดียวกันโดยใช้โปรแกรม Vector NTI และใช้โปรแกรม FASTPCR ในการออกแบบ primer โดยกำหนดให้ primer ที่ต้องการมี fragment product ไม่เกิน 500 bp และมีค่า T_m (melting temperature) ไม่เกิน 65 องศาเซลเซียส

2.3 การโคลนยีนติดตามโดยวิธีพีซีอาร์ (PCR) การโคลนยีนติดตามโดยใช้เทคนิค PCR ทำโดยการนำเอา DNA ที่สกัดจากต้นอ่อน ข้าวอายุ 14 วันมาเป็นแม่แบบ (template) โดยใช้ MST3 F (5' CAG GCA AGG ACT ACC CTG GCA 3') และ MST3 R (5' ACC GAC TGA TTG GCG AAG CCG ACG 3') เป็นคู่ primer สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *OsMST3* และใช้ *OsNHX1*_F38-59 (5' AGC CAA CCG AGA GAG GTC TCG A 3') และ *OsNHX1*_R336-35 (5'

ACG CGT AGT CGG AGG TCG TGT A 3') เป็นคู่ primer สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *OsNHX1* ดังรายละเอียดต่อไปนี้

การเตรียม reaction mixture ทำได้ดังนี้คือ เติมส่วนที่เป็นบัฟเฟอร์ (10x PCR buffer 1+KCl-MgCl₂) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นิวคลีโอไทด์ผสม (dNTP mix) ที่มีความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร primer แต่ละชนิดปริมาตรละ 0.2 ไมโครลิตร และส่วนเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิต/ไมโครลิตร (Fermentas, Germany) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร และเติมน้ำ MilliQ จนครบปริมาตรสุดท้ายคือ 20 ไมโครลิตร ผสมกันเบาๆ นำไป spin down แล้วใส่ในเครื่อง DNA thermal cycle : GeneAmp PCR System2400 (Perkin Elmer, USA)

เพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *OsMST3* โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรมที่ 1 (Initial Denaturation)	ที่ 95 องศาเซลเซียส	5 นาที	
โปรแกรมที่ 2 (Denaturation)	ที่ 94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	} 35 รอบ
(Annealing)	ที่ 58 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
(Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
โปรแกรมที่ 3 (Final Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส	7 นาที	
	ที่ 4 องศาเซลเซียส	∞	

สำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *OsNHX1* ตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรมที่ 1 (Initial Denaturation)	ที่ 95 องศาเซลเซียส	5 นาที	
โปรแกรมที่ 2 (Denaturation)	ที่ 94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	} 35 รอบ
(Annealing)	ที่ 58 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
(Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
โปรแกรมที่ 3 (Final Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส	7 นาที	
	ที่ 4 องศาเซลเซียส	∞	

2.4 การสกัดดีเอ็นเอที่ต้องการจากเจลโดยใช้ HiYield™ Gel / PCR Extraction

Kit นำชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากกระบวนการ PCR มาทำบริสุทธิ์ด้วย HiYield™ Gel / PCR Extraction Kit (Real-Biotech, Taiwan) เริ่มจากการตัดเจลตรงตำแหน่งของดีเอ็นเอที่ต้องการใส่หลอด eppendorf แล้วเติม 500 ไมโครลิตรของ DF buffer ลงในหลอดตัวอย่างผสมให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีหรือจนเจลละลายหมดใน

ระหว่างการบ่มทำการ vortex ทุกๆ 2-3 นาที นำ DF column ใส่ใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายจากชั้นก่อนหน้านี้เทใส่ใน DF column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทสารละลายที่ผ่านลงมาจาก column ที่ทิ้ง จากนั้นเติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงใน DE column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อ นาที นาน 30 วินาที เทสารละลายที่ผ่านลงมาจาก column ที่ทิ้ง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ย้าย DF column ใส่ในหลอด eppendorf ใหม่แล้วเติม elution buffer หรือ น้ำ Milli Q ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 15 - 30 ไมโครลิตร(ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแถบ ดีเอ็นเอบนเจล) ใส่ตรงกลางของ DF membrane ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ elute ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนติดตามที่โคลนได้ หลังจากสกัดแถบดีเอ็นเอที่ ต้องการจากเจลแล้ว ส่ง PCR fragment ที่สกัดได้ดังกล่าวพร้อมกับ forward และ reverse primer ไป หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ BIOSERVICE UNIT (BSU service)

3. การเตรียมยีนติดตาม *OsSUT1*

3.1 การสกัดพลาสมิดของแบคทีเรียด้วยวิธี Rapid Alkaline Lysis คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ซึ่งมีพลาสมิด pBluescript ที่มียีน *OsSUT1* ในรูปของ mRNA แทรกอยู่ ที่เจริญอยู่บน LB agar plates ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ไปเลี้ยงต่อในอาหาร LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ปริมาตร 3 มิลลิลิตรบ่มเชื้อข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าจนเชื้อเจริญถึงระยะ log phase (ประมาณ 16 ชั่วโมง) จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ได้ ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีแล้วเทอาหารทิ้ง จากนั้นละลาย ตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วย ice cold solution I (Tris-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมสารละลายด้วยการ vortex แล้วเติม solution II (NaOH ความเข้มข้น 0.4 นอร์มัล, 2% SDS) ที่เตรียมใหม่ทุกครั้งปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมาหลายๆ ครั้งแล้วเติม ice-cold solution III (potassium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์, glacial acetic acid ความเข้มข้น 5 โมลาร์) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดทดลองกลับไปมา 10 วินาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนใสลงใน eppendorf ใหม่ แล้วเติมสารละลาย

phenol/chloroform (1/1) ปริมาตรเท่ากับสารละลายส่วนใส ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนบนซึ่งมีพลาสมิดดีเอ็นเออยู่มากตกตะกอนด้วย absolute ethanol ปริมาตรเป็น 2.5 เท่าของสารละลาย ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เติสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เติสารละลายทิ้ง ทำให้ตะกอนแห้ง หลังจากนั้นละลายตะกอนด้วย น้ำ Milli Q ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

3.2 การเตรียมยีนติดตามโดยวิธี PCR การเตรียมยีนติดตาม *OsSUT1* โดยใช้เทคนิค PCR ทำโดยการนำเอาพลาสมิด pBluescript ที่มียีน *OsSUT1* รูป mRNA แทรกอยู่เป็น template โดยใช้ TSUT1 F (5' GGG ATT CTG GCT TCT TGA T 3') และ TSUT1 R (5' CGA ATT CAG TAG CAG GCC AA 3') เป็นคู่ primer สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ดังรายละเอียดต่อไปนี้

การเตรียม reaction mixture ทำได้ดังนี้คือ เติมส่วนที่เป็นบัฟเฟอร์ (10x PCR buffer 1+KCl-MgCl₂) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นิวคลีโอไทด์ผสม (dNTP mix) ที่มีความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร primer แต่ละชนิดปริมาตรละ 0.2 ไมโครลิตร และส่วนเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิต/ไมโครลิตร (Fermentas, Germany) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร และเติมน้ำ MilliQ จนครบปริมาตรสุดท้ายคือ 20 ไมโครลิตร ผสมกันเบาๆ นำไป spin down แล้วใส่ในเครื่อง DNA thermal cycle : GeneAmp PCR System2400 (Perkin Elmer, USA)

เพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *OsSUT1* โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรมที่ 1 (Initial Denaturation)	ที่ 95 องศาเซลเซียส	5 นาที	} 35 รอบ
โปรแกรมที่ 2 (Denaturation)	ที่ 94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
(Annealing)	ที่ 53 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
(Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
โปรแกรมที่ 3 (Final Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส	7 วินาที	
	ที่ 4 องศาเซลเซียส	∞	

4. การสกัดอาร์เอ็นเอรวม (Total RNA)

นำตัวอย่างข้าวที่ระยะ 14, 30 วัน และระยะตั้งท้องก่อนออกรวงมาสกัด RNA ด้วยสารละลาย TRI reagent ตามขั้นตอนดังนี้

4.1 Homogenization ใส่สารละลาย TRI reagent 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดที่ใส่ตัวอย่างที่บดไว้แล้วด้วยไนโตรเจนเหลว

4.2 Phase Separation เก็บ homogenate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ใส่สารละลาย chloroform 0.2 มิลลิลิตร ต่อสารละลาย TRI reagent 1 มิลลิลิตร (ใส่ 100 ไมโครลิตร เนื่องจากใส่ TRI reagent 0.5 มิลลิลิตร) ปิดฝาเขย่าอย่างแรง 15 วินาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส จะมีส่วนบนที่เป็นสารละลาย aqueous phase ซึ่งเป็นส่วนที่มี RNA

4.3 RNA Precipitation ถ่ายเอาส่วนบนที่เป็น aqueous phase ใส่ในหลอดใหม่ ใส่สารละลาย isopropanol 0.5 มิลลิลิตร ต่อสารละลาย TRI reagent 1 มิลลิลิตร (ใส่ 0.250 มิลลิลิตร เนื่องจากใส่ TRI reagent 0.5 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 8 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

4.4 RNA Wash ทิ้งสารละลายส่วนบน เก็บตะกอน RNA ล้างตะกอนด้วย 75% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปวัดปริมาณ RNA) ปั่นเหวี่ยง 7,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทเอาสารละลายเอทานอลออก แล้วทำให้ตะกอนแห้งด้วย vacuum pump จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำ Milli Q ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

5. สร้างสายดีเอ็นเอคู่สม (Complementary DNA, cDNA) จาก Total RNA

5.1 เติมส่วนผสมดังต่อไปนี้ในหลอด sterile eppendorf

- Total RNA 1 ไมโครกรัม
- Oligo (dT)₁₈ 1 ไมโครกรัม (1 ไมโครลิตร)
- ใส่ MilliQ water ให้ครบ 11 ไมโครลิตร

5.2 นำไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็ง

5.3 นำไปเติมสารละลายดังต่อไปนี้ตามลำดับ

- 5x Reaction buffer for M-MuLV RT 4 ไมโครลิตร
- สารละลาย dNTP mix 2 ไมโครลิตร
- Ribonuclease Inhibitor 20 ยูนิต (0.5 ไมโครลิตร)
- MilliQ water ให้ครบ 19 ไมโครลิตร

5.4 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

5.5 เติม reverse transcriptase M-MuLV RT 200 ยูนิต (1 ไมโครลิตร)

5.6 บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

5.7 หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วจุ่มลงน้ำแข็ง

6. การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค Southern Blotting และ Hybridization

6.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยวิธี PCR

6.1.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 18s ribosomal RNA การเตรียม reaction mixture ทำได้ดังนี้คือ เติมส่วนที่เป็นบัฟเฟอร์ (10x PCR buffer + KCl - MgCl₂) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นิวคลีโอไทด์ผสม (dNTP mix) ที่มีความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร 18s forward primer (5' AAC TAG CTA TGC GGA GCC AT 3') ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร และ 18s reverse primer (5' AGG TTC AAT GGA CTT CTC GC 3') ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรละ 0.2 ไมโครลิตร และส่วนเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิต/ไมโครลิตร (Fermentas, Germany) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร และเติมน้ำ MilliQ จนครบปริมาตรสุดท้ายคือ 20 ไมโครลิตร ผสมกันเบาๆ นำไป spin down แล้วใส่ในเครื่อง DNA thermal cycle : GeneAmp PCR System2400 (Perkin Elmer, USA)

สำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน 18s ribosomal RNA ตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรมที่ 1 (Initial Denaturation)	ที่ 95 องศาเซลเซียส	5 นาที	} 28 รอบ
โปรแกรมที่ 2 (Denaturation)	ที่ 94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
(Annealing)	ที่ 50 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
(Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
โปรแกรมที่ 3 (Final Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส	7 วินาที	
	ที่ 4 องศาเซลเซียส	∞	

6.1.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *OsSUT1* การเตรียม reaction mixture ทำได้ดังนี้คือ เติมส่วนที่เป็นบัฟเฟอร์ (10x PCR buffer + KCl - MgCl₂) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นิวคลีโอไทด์ผสม (dNTP mix) ที่มีความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร TSUT1 F

primer (5' GGG ATT CTG GCT TCT TGA T 3') ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร และ TSUT1 R primer (5' CGA ATT CAG TAG CAG GCC AA 3') ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรละ 0.2 ไมโครลิตร และส่วนเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิต/ไมโครลิตร (Fermentas, Germany) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร และเติมน้ำ MilliQ จนครบปริมาตรสุดท้ายคือ 20 ไมโครลิตร ผสมกันเบาๆ นำไป spin down แล้วใส่ในเครื่อง DNA thermal cycle : GeneAmp PCR System2400 (Perkin Elmer, USA)

สำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *OsSUT1* ตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรมที่ 1 (Initial Denaturation)	ที่ 95 องศาเซลเซียส	5 นาที	} 30 รอบ
โปรแกรมที่ 2 (Denaturation)	ที่ 94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
(Annealing)	ที่ 53 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
(Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
โปรแกรมที่ 3 (Final Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส	7 วินาที	
	ที่ 4 องศาเซลเซียส	∞	

6.1.3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *OsMST3* การเตรียม reaction mixture ทำได้ดังนี้คือ เติมส่วนที่เป็นบัฟเฟอร์ (10x PCR buffer + KCl – MgCl₂) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นิวคลีโอไทด์ผสม (dNTP mix) ที่มีความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร MST3 F primer (5' CAG GCA AGG ACT ACC CTG GCA 3') ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร และ MST3 R primer (5' ACC GAC TGA TTG GCG AAG CCG ACG 3') ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรละ 0.2 ไมโครลิตร และส่วนเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิต/ไมโครลิตร (Fermentas, Germany) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร และเติมน้ำ MilliQ จนครบปริมาตรสุดท้ายคือ 20 ไมโครลิตร ผสมกันเบาๆ นำไป spin down แล้วใส่ในเครื่อง DNA thermal cycle : GeneAmp PCR System2400 (Perkin Elmer, USA)

เพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *OsMST3* โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรมที่ 1 (Initial Denaturation)	ที่ 95 องศาเซลเซียส	5 นาที	} 30 รอบ
โปรแกรมที่ 2 (Denaturation)	ที่ 94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
(Annealing)	ที่ 58 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
(Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
โปรแกรมที่ 3 (Final Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส	7 วินาที	

6.1.4 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *OsNHX1* การเตรียม reaction mixture ทำได้ดังนี้คือ เติมส่วนที่เป็นบัฟเฟอร์ (10x PCR buffer + KCl - MgCl₂) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นิวคลีโอไทด์ผสม (dNTP mix) ที่มีความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร *OsNHX1_F38-59* primer (5' AGC CAA CCG AGA GAG GTC TCG A 3') ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร และ *OsNHX1_R336-35* primer (5' ACG CGT AGT CGG AGG TCG TGT A 3') ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรละ 0.2 ไมโครลิตร และส่วนเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิต/ไมโครลิตร (Fermentas, Germany) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร และเติมน้ำ MilliQ จนครบปริมาตรสุดท้ายคือ 20 ไมโครลิตร ผสมกันเบาๆ นำไป spin down แล้วใส่ในเครื่อง DNA thermal cycle : GeneAmp PCR System2400 (Perkin Elmer, USA)

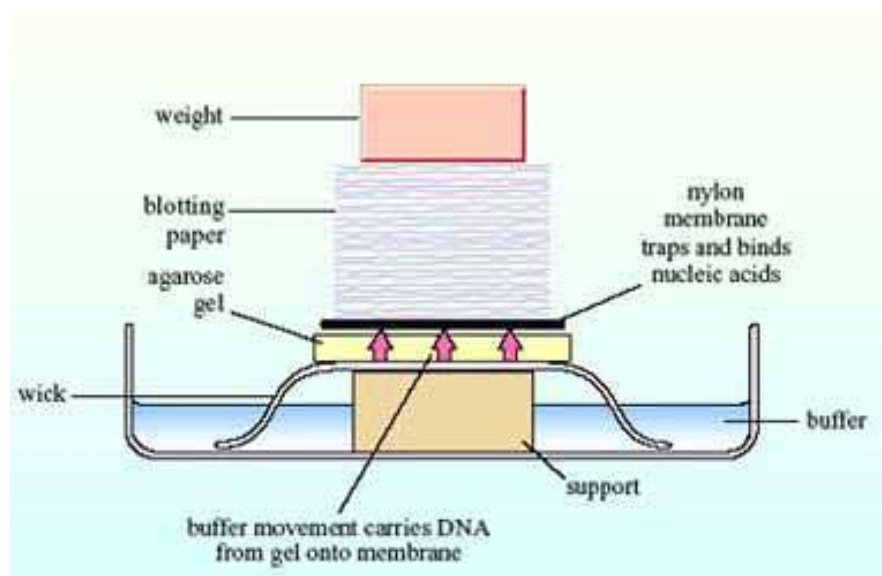
สำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *OsNHX1* ตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรมที่ 1 (Initial Denaturation)	ที่ 95 องศาเซลเซียส	5 นาที	} 30 รอบ
โปรแกรมที่ 2 (Denaturation)	ที่ 94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
(Annealing)	ที่ 58 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
(Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
โปรแกรมที่ 3 (Final Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส	7 วินาที	
	ที่ 4 องศาเซลเซียส	∞	

6.2 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตโฟรีซิส PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ตัวอย่าง ลงในหลุม agarose gel (ภาคผนวก ก.) ที่เตรียมไว้แล้ว นำไป Run ใน 1x TAE buffer (ภาคผนวก ก.) บนเครื่อง gel electrophoresis โดยตั้งค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ ระยะเวลา 35 นาที แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของแถบของดีเอ็นเอ เทียบกับ DNA marker ด้วยเครื่อง gel documentation

6.3 การถ่ายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบไปบนแผ่นไนลอน นำแผ่นเจลที่ได้ล้างด้วยน้ำ Milli Q ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง แล้วนำแผ่นเจลแช่ในสารละลาย depurination solution (HCl ความเข้มข้น 0.125 โมลาร์) เขย่าเบาๆ นาน 10 นาที ล้างเจลด้วยน้ำ Milli Q ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง ทำให้ดีเอ็นเอเปลี่ยนสภาพโดยแช่ใน denaturing buffer (NaCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ + NaOH ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์) เขย่าเบาๆ นาน 30 นาที ล้างเจลด้วยน้ำ Milli Q ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

แล้ว 1 ครั้ง แช่เจลลงใน neutralization buffer (NaCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ + Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์, pH 7.4) เขย่าเบาๆ นาน 30 นาที เพื่อปรับสภาพเจลให้เป็นกลาง ในระหว่างรอให้เตรียมอุปกรณ์เพื่อทำการ blotting ดังแสดงใน ภาพที่ 5 มีรายละเอียดดังนี้ นำปลายสองด้านของกระดาษกรอง 3MM ที่ใช้เป็นสะพานในการส่งผ่านดีเอ็นเอจุ่มลงใน 6x SSC (Tri-Sodium citrate + NaCl , pH 7-8) ตัดแผ่น Hybond nylon membrane (Amersham , USA) ให้มีขนาดเท่ากับแผ่นเจลที่ต้องการ blot จากนั้นวางแผ่นเจลลงบนกระดาษกรองที่ชุ่มด้วย 6x SSC ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ วางแผ่น Hybond nylon membrane ลงบนเจลระวังอย่าให้มีฟองอากาศ วางกระดาษกรอง 3 MM ซึ่งมีขนาดเท่ากับแผ่นเจลประมาณ 5- 6 แผ่นลงบนแผ่น Hybond nylon membrane วางกระดาษทิชชูลงบนกระดาษกรอง แล้ววางอุปกรณ์ที่มีน้ำหนักวางทับลงบนกระดาษกรองหมั่นเปลี่ยนทิชชูบ่อยๆ ทิ้งไว้ 1 คืน ทำเครื่องหมายที่แผ่น Hybond nylon membrane แล้วแยกออกจากแผ่นเจล นำแผ่นไนลอนไปล้าง 5 นาทีในน้ำ Milli Q ที่มาเชื้อ ปล่อยให้แห้งด้วยอากาศ หลังจากนั้นตรึงดีเอ็นเอให้อยู่บนเมมเบรนในตู้ oven ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไป hybridize กับ gene probe ที่เตรียมไว้ หรือเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ hybridize



ภาพที่ 5 การย้ายแถบดีเอ็นเอไปยังเมมเบรน (DNA transfer to membrane)

ที่มา: <http://openlearn.open.ac.uk/mod/resource/view.php?id=172575>

6.4 การติดฉลากยีนติดตาม (Gene probe) ด้วย Dig (Digoxigenin) ติดฉลากยีนติดตามด้วย DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) มีขั้นตอนดังนี้ นำยีนติดตามที่ elute ได้จากเจลความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมใส่ใน eppendorf จากนั้นเติมน้ำ Milli Q ที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้มีปริมาตรรวม 16 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเปลี่ยนสภาพดีเอ็นเอ (denature DNA) โดยนำไปบ่มที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีในน้ำแข็ง จากนั้นจึงเติม DIG High Prime (50 μ l DIG High Prime, 5x Conc. labeling mixture containing optical concentrations of random primers, nucleotides, DIG-dNTP (alkali-label), Klenow enzyme and buffer components) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง หรือบ่มข้ามคืน และทำการหยุดปฏิกิริยาโดยเติม EDTA ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ซึ่งสุดท้ายแล้วจะมีปริมาตรรวม 22 ไมโครลิตร

6.5 การ Hybridization การทำ pre hybridization โดยนำแผ่นไนลอนที่ได้รับการย้ายแถบ DNA จากตัวอย่างที่ทำการทดลองใส่ลงใน ถูพลาสติก แล้วเติม preheat DIG Easy Hyb Granules 10 มิลลิลิตรปิดผนึกถุง แล้วนำไปบ่มใน hybridization oven ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

การทำ hybridization โดยเติม denatured DIG - labeled DNA probe (นำ DIG-labeled DNA probe ; ยีนติดตามผลที่ติดฉลากด้วย Dig ความเข้มข้นประมาณ 25 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตรไปต้มนาน 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที) ที่เตรียมไว้แล้วประมาณ 3.5 มิลลิลิตร ต่อ 100 ตารางเมตรของแผ่นไนลอน ลงในแผ่นไนลอนที่ผ่านการ pre hybridization ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มข้ามคืนใน hybridization oven ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

6.6 การตรวจสอบสัญญาณบนแผ่นไนลอน ทำ hybridization แล้วเทสารละลายทิ้งแล้วนำแผ่นไนลอนล้างใน 2x SSC, 0.1% SDS 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างซ้ำอีกด้วย 0.5x SSC, 0.1% SDS 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที บ่มใน hybridization oven ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เทสารละลายทิ้ง นำแผ่นไนลอนที่ผ่านการล้างเติม washing buffer (maleic acid ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์, NaCl ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.5, 0.3% (v/v) Tween 20) ให้ท่วมแผ่นไนลอนเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วเติม blocking solution (เจือจาง 10x blocking solution ในอัตราส่วน 1:10 ด้วย maleic acid buffer) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า 30 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วเติมสารละลาย antibody solution (หมูนหิวียง anti-digoxigenin-AP 5 นาที ที่ 10,000 รอบ

ก่อนที่ คุณเอาสารละลายที่ผิว จากนั้นเจือจาง anti-digoxigenin-AP 1:5000 (150 มิลลิยูนิท/ มิลลิลิตร) ด้วย blocking solution) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่านาน 30 นาที เทสารละลายทิ้ง จากนั้นทำการล้างแผ่นไนลอนใน washing buffer 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที เทสารละลายทิ้ง เติมสารละลาย detection buffer (Tris - HCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์, NaCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์, pH 9.5 (20 องศาเซลเซียส)) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า 2-5 นาที เทสารละลายทิ้ง จากนั้นนำแผ่นไนลอนใส่ในถุงพลาสติก แล้วเติม color substrate solution (เติม NBT/BCIP stock solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปใน detection buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการปิดผนึกถุง แล้วนำไปบ่มในที่มืด โดยไม่มีการเขย่าจนกระทั่งเห็นแถบดีเอ็นเอ จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 50 มิลลิลิตร ของ น้ำ Milli Q หรือ TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) ทำการบันทึกภาพ

7. การหาปริมาณน้ำตาล

7.1 สกัดน้ำตาลจากตัวอย่าง นำตัวอย่างประมาณ 0.2 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง สกัดน้ำตาลออกจากเนื้อเยื่อโดยการเติม 80% ethanol ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อสกัดน้ำตาลออกจากตัวอย่าง เก็บสารละลายที่ได้ แล้วเติม 80% ethanol ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นเช่นเดิม ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลซูโครส และกลูโคสที่อยู่ในตัวอย่าง

7.2 วัดน้ำตาล Sucrose โดยวิธี Resorcinol-HCl (ตุลาพร และ วัฒนา 2549)

7.2.1 นำสารละลายน้ำตาลที่สกัดได้หรือสารละลายซูโครสมาตฐานมา 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

7.2.2 เติมสารละลาย 1% resorcinol (ใน 95% ethanol) ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร

7.2.3 เติมกรดไฮโดรคลอริก 30% ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร

7.2.4 นำไปแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็น

7.2.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

7.2.6 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในสารละลายตัวอย่าง

7.3 วัดน้ำตาล Glucose ด้วยเครื่อง YSI

- 7.3.1 นำสารละลายน้ำตาลที่สกัดได้มา 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด eppendorf
- 7.3.2 ชั่งน้ำหนักรวมของหลอดและสารละลายน้ำตาล พร้อมจดบันทึก
- 7.3.3 นำหลอดที่บรรจุสารละลายน้ำตาลไปให้ความร้อนด้วยกล่องให้ความร้อน (heat box) ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เพื่อระเหยแอลกอฮอล์ออก เป็นเวลา 40 นาที
- 7.3.4 จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก และคำนวณปริมาตรที่เหลือในหลอด
- 7.3.5 ปรับปริมาตรของสารละลายในหลอดให้เท่าเดิมด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ
- 7.3.6 นำไปวัดปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่อง YSI

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การออกแบบ Primer

1.1 การออกแบบ Primer ของยีน *OsMST3*

เพื่อออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะกับยีน *OsMST3* จึงต้องหาลำดับ amino acid และลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบ mRNA ของยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในข้าวคือ *OsMST1* (accession no. BAB19862.1/ AB052883), *OsMST2* (accession no. BAB19863.1/ AB052884.1) และ *OsMST3* (accession no. BAB19864.1/ AB052885.1) ผ่าน website www.ncbi.nlm.nih.gov แล้วนำยีนทั้ง 3 ตัว มาเปรียบเทียบดูการจัดเรียงลำดับ amino acids และ nucleotides (amino acids/nucleotides sequence alignment) เพื่อหาบริเวณแตกต่างของยีน ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 6 จากนั้นเลือกบริเวณของ amino acid ในลำดับที่ 3-17 และ 145-154 ซึ่งมีชนิดของ amino acid ที่ความแตกต่างกันในยีนทั้ง 3 ตัวมาออกแบบ primer เพื่อให้จำเพาะกับยีน *OsMST3* เท่านั้น ซึ่งออกแบบให้มี PCR product ขนาดไม่เกิน 500 bp และมีค่า T_m (melting temperature) ประมาณไม่เกิน 65°C โดยใช้โปรแกรม FastPCR ออกแบบ primer ในช่วงของสายนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 1-500 ของยีน *OsMST3* (accession no. AB052885.1) แล้วทำการพิจารณาค่า T_m และค่า G-C content แล้วจึงตัดสินใจเลือก

>1F32_52 $T_m=62.4^{\circ}\text{C}$ $T_m(10)=39.4^{\circ}\text{C}$ CG%=61.9 MW=6425.2 21 bp: PCR efficiency (quality)=116

>1R438_461 $T_m=65.8^{\circ}\text{C}$ $T_m(10)=41.3^{\circ}\text{C}$ CG%=62.5 MW=7387.8 24 bp: PCR efficiency (quality)=127

ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ คือ

forward primer (MST3 F) 5'CAGGCAAGGACTACCCTGGCA 3'

และ reverse primer (MST3 R) 5'ACCGACTGATTGGCGAAGCCGACG 3'

โดย primer คู่ดังกล่าวจะให้ PCR product ขนาดประมาณ 430 bp ดังแสดงในภาพที่ 7

		1	60
OsMST1	(1)	MAGGVIVANDGGSVVDHGRLTFSVITCLVAASGGLIFGYDVGISGGVSTMEPFLRRF	
OsMST2	(1)	MAAATA-ADVAEDTASVYSGKLTLYVFLTCGVAATGGLIIGYDIGISGGVTSMDTFLGKF	
OsMST3	(1)	MAGGAV---VSTGAGKDYPSGKLTLYVFLTCVVAATGGLIFGYDIGISGGVTSMDPFLRRF	
Consensus	(1)	MAGG I A VADGSA DY GKLTLFVFLTCVVAATGGLIFGYDIGISGGVTSMDPFLRRF	
		61	120
OsMST1	(61)	FGVVRMAEARPGNEVCVYDSQALTAFTSSLYVAGLVASLVASRVTRAMGRQAVMVMGG	
OsMST2	(60)	FPVSLHQEQTAQGTSOYCKFNSQPLTAFTSSLYLAALVASFFVASFTRALGRKWSMFGGG	
OsMST3	(58)	FPEVYRKKQMDKKNQYCKYDNLQLQTFSSLYLAALVSSFFAATVTRVLGRKWSMFAGG	
Consensus	(61)	FP VLRK Q A NQYCKYDSQ LTAFTSSLYLAALVASFFAASVTRALGRKWSMFAGG	
		121	180
OsMST1	(121)	ALFFAGGAVTGFVNIAMLIVGRMLLGFVGFNTQAAPLFLAEMAPTRWRGSLTAGFQFF	
OsMST2	(120)	VSFLAGATLNGAARNVAMLIVGRILLGIGVAF CGLSTPIYLSEMAPRLRGMNLNIGLQLM	
OsMST3	(118)	LTFLIGAAALNGAAENVAMLIVGRILLGVGVGFANQSVPIYLSEMAPRLRGMNLNIGFQLM	
Consensus	(121)	LSFLAGAALNGAA NVAMLIVGRILLGIGVGF NQS PIYLSEMAP RLRGMNLNIGFQLM	
		181	240
OsMST1	(181)	LAVGVVIAITVTNYFASRVP--WGWRLSLGLAGAPAVVIFLGFALFLTDTPSSSLVMRGDTAR	
OsMST2	(180)	ITVGIISANLVNYGAAKIRGGWGWVSLGLAAAPACVIAVGSFLFLPDSFSSLINRGRHEQ	
OsMST3	(178)	ITIGILAAELINYGTAIKAGWGWVSLALAAVPAIITLGSFLFLPDTNLSLIDRGHPEA	
Consensus	(181)	ITVGIILAA LINYGAAKIKAGWGWVSLGLAAAPAA VI LGSFLFLPDTPSSLI RG E	
		241	300
OsMST1	(239)	ARAA LAPGARGWRRTRRSWKGLVRAVEVARQGEDGAFRR---MAAREYRPNLVFAVAM	
OsMST2	(240)	ARRVLR-IRGTDEVDDEYGDLVAAASEIEVYSGCSARRRPWRDVLQRRYRQQLAMAVLI	
OsMST3	(238)	AERMLRR-IRGSDVDVSEYADLVAASEESK-----LVQHPRNLLRRKYRAQLTMAICI	
Consensus	(241)	ARRMLRR IRGSD E W IVAASEIAK A RRPWR ILRRKYRQQL MAV I	
		301	360
OsMST1	(296)	PMFFQLTGIVIVISFFSPLVFRTVGFGSNAAALMGNVILGAVNLVCLMLSLTVLIDRYGRKVL	
OsMST2	(299)	PFQQLTGINVIMFYAPVLFKTIKGLGDSLMSAVITGLVNIIVATFVSIATVDSLGRKRL	
OsMST3	(292)	PFQQLTGINVIMFYAPVLFDTLGFKSDASLMSAVITGLVNVFATLVSIFTVDRLGRKRL	
Consensus	(301)	PFQQLTGINVIMFYAPVLFKTIKGFSDASLMSAVITGLVNIIVATLVS I TVDRLGRKRL	
		361	420
OsMST1	(356)	FMVGGAIMIIAQVVAWIMGAQVCKNGSEAMARPYAVAVVAFTCLHTAGFGWSWGPLGWV	
OsMST2	(359)	LFQGGQMLVSVQVIIGTLIGVVFCTSGDGNISRALAVCIVVFICVYVAGFAWSWGPLGVL	
OsMST3	(352)	FLQGGQMVVCQVVVGTLLAVKFCGTSIGDIPKGYAAVVVLFICMYVAGFAWSWGPLGWL	
Consensus	(361)	FLQGGQMVVAQVIVGTLLIGV FGTSG G IARAYAV VVLFICLYVAGFAWSWGPLGWL	
		421	480
OsMST1	(416)	IPGEIFPVDIRSAGOAMNVSIGLGLTFVQTQSFLAMLCRFRYGTFAYYAAWVAVMTVFIA	
OsMST2	(419)	LPSEIFPLEVRPAGQISVAVNMLCTFAVAEAFPLMLCHMRFGLEFYFFSGWVIVMTLTVS	
OsMST3	(412)	VPSEIFPLEIRPAGQISVSVNMLTFVIAQAFLTMLCHMKFGLFYFFAGVWVIMTVFIA	
Consensus	(421)	IPSEIFPLEIRPAGQISVSVNML TFVIAQAFL MLCHMRFGLEFYFFAGWVIVMTVFIA	
		481	527
OsMST1	(476)	VFLPETKGVPLESMATVVARHWYWKRFAREQPKTSADEPTGTY----	
OsMST2	(479)	AFLPETKGVPIEKMTVVWRTHWFWRGFYCNQDADAHVQVANSKV---	
OsMST3	(472)	LFLPETKNVPIEMVVLVKSHWFWRRFIGDHDVHVGANHVSNNKLQP	
Consensus	(481)	LFLPETKGVPIE M LVVKSHWFWRRF DQD AA N S	

ภาพที่ 6 Amino acid sequences alignment ของยีน *OsMST1*, *OsMST2* และ *OsMST3* โดยใช้โปรแกรม Vector NTI

```

1   ATGGCCGGCG GCGCGGTGGT GAGCACGGGG GCAGGCAAGG ACTACCCTGG
   TACCGGCCGC CGCGCCACCA CTCGTGCCCC CGTCCGTTCG TGATGGGACC
51  CAAGCTCACC CTCTTCGTCT TCTTCACATG CGTCGTGCGC GCCACCGGTG
   GTTCGAGTGG GAGAAGCAGA AGAAGTGTAC GCAGCAGCGG CCGTGGCCAC
101 GTCTCATCTT CGGATATGAC ATCGGTATAT CAGGTGGTGT GACGTCCATG
   CAGAGTAGAA GCCTATACTG TAGCCATATA GTCCACCACA CTGCAGGTAC
151 GACCCGTTCC TGAGGAAGTT CTTCCCGGAG GTGTATCGGA AGAAGCAGAT
   CTGGGCAAGG ACTCCTTCAA GAAGGGCCTC CACATAGCCT TCTTCGTCTA
201 GGGCGACAAG AACCAACCAGT ACTGCAAGTA CGACAACCAG CTGCTGCAGA
   CCGCCTGTTC TTGTTGGTCA TGACGTTTCAT GCTGTTGGTC GACGACGTCT
251 CCTTCACCTC GTCGCTCTAC CTCGCCGCCC TCGTCTCCTC CTTCTTCGCC
   GGAAGTGGAG CAGCGAGATG GAGCGGCGGG AGCAGAGGAG GAAGAAGCGG
301 GCCACCGTCA CCCGCGTCCT CGGCCGCAAG TGGTCCATGT TCGCCGGCGG
   CCGTGGCAGT GGGCGCAGGA GCCGGCGTTC ACCAGGTACA AGCGGCCGCC
351 CCTCACCTTC CTCATCGGCG CCGCCCTCAA CGGCGCCGCC GAGAACGTGC
   GGAGTGGAA GAGTAGCCGC GCGGGGAGTT GCCGCGCGCG CTCTTGCAGC
401 CCATGCTCAT CGTCGGTCGT ATCCTCCTCG GTGTGCGCGT CGGCTTCGCC
   GGTACGAGTA GCAGCCAGCA TAGGAGGAGC CACAGCCGCA GCCGAAGCGG
451 AATCAGTCGG TGCCGGTGTG CTTGTGCGGAG ATGGCGCCGG CTCGGCTGCG
   TTAGTCAGCC ACGGCCACAT GAACAGCCTC TACCGCGGCC GAGCCGACGC

```

ภาพที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OsMST3* ที่ใช้เป็นยีนติดตาม (gene probe)

ตัวอักษรสีแดง คือ forward primer และ reverse primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน

1.2 การออกแบบ Primer ของยีน *OsNHX1*

ออกแบบโดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปของ genomic DNA และ mRNA ของยีน *OsNHX1* จาก www.ncbi.nlm.nih.gov มาเปรียบเทียบดูการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignment) เพื่อหาบริเวณ intron และ exon ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 8

		1		50
OsNHX1mRNA	(1)	GAGAAGAGAGTTTTGTAGCGAGCTCGCGCGAATGCGAAGCCAACCGAGAG		
OsNHX1gene	(1)	GAGAAGAGAGTTTTGTAGCGAGCTCGCGCGAATGCGAAGCCAACCGAGAG		
Consensus	(1)	GAGAAGAGAGTTTTGTAGCGAGCTCGCGCGAATGCGAAGCCAACCGAGAG		
		51		100
OsNHX1mRNA	(51)	AGGTCTCGATACCAAATCCCGATTTCTCAACCTGAATCCCCCCCCACGT		
OsNHX1gene	(51)	AGGTCTCGATACCAAATCCCGATTTCTCAACCTGAATCCCCCCCCACGT		
Consensus	(51)	AGGTCTCGATACCAAATCCCGATTTCTCAACCTGAATCCCCCCCCACGT		
		101		150
OsNHX1mRNA	(101)	TCCTCGTTTCAATCTGTTTCGTCTGCGAATCGAATTCTTTGTTTTTTTTTTC		
OsNHX1gene	(101)	TCCTCGTTTCAATCTGTTTCGTCTGCGAATCGAATTCTTTGTTTTTTTTTTC		
Consensus	(101)	TCCTCGTTTCAATCTGTTTCGTCTGCGAATCGAATTCTTTGTTTTTTTTTTC		
		151		200
OsNHX1mRNA	(151)	TCTAATTTTACCGGGAATTGTGCAATTAGGCATTCACCAACGAGCAAGAG		
OsNHX1gene	(151)	TCTAATTTTACCGGGAATTGTGCAATTAGGCATTCACCAACGAGCAAGAG		
Consensus	(151)	TCTAATTTTACCGGGAATTGTGCAATTAGGCATTCACCAACGAGCAAGAG		

		201		250
OsNHX1mRNA	(201)	GGGAGTGGATTGGTTGGTTAAAGCTCCGCATCTTGCGGCGGAAATCTCGC		
OsNHX1gene	(201)	GGGAGTGGATTGGTTGGTTAAAGCTCCGCATCTTGCGGCGGAAATCTCGC		
Consensus	(201)	GGGAGTGGATTGGTTGGTTAAAGCTCCGCATCTTGCGGCGGAAATCTCGC		
		251		300
OsNHX1mRNA	(251)	TCTCTTCTCTGCGGTGGGTGGCCGAGAAAGTCGCCGCCGGTGAGGCATGG		
OsNHX1gene	(251)	TCTCTTCTCTGCGGTGGGTGGCCGAGAAAGTCGCCGCCGGTGAGGCATGG		
Consensus	(251)	TCTCTTCTCTGCGGTGGGTGGCCGAGAAAGTCGCCGCCGGTGAGGCATGG		
		301		350
OsNHX1mRNA	(301)	GGATGGAGGTGGCGGCGGCGGCTGGGGGCTCTGTACACGACCTCCGAC		
OsNHX1gene	(301)	GGATGGAGGTGGCGGCGGCGGCTGGGGGCTCTGTACACGACCTCCGAC		
Consensus	(301)	GGATGGAGGTGGCGGCGGCGGCTGGGGGCTCTGTACACGACCTCCGAC		
		351		400
OsNHX1mRNA	(351)	TACGCGTCGGTGGTGTCCATCAACCTGTTTCGTCGCGCTGCTCTGCGCCTG		
OsNHX1gene	(351)	TACGCGTCGGTGGTGTCCATCAACCTGTTTCGTCGCGCTGCTCTGCGCCTG		
Consensus	(351)	TACGCGTCGGTGGTGTCCATCAACCTGTTTCGTCGCGCTGCTCTGCGCCTG		
		401		450
OsNHX1mRNA	(401)	CATCGTCCTCGGCCACCTCCTCGAGGAGAATCGCTGGGTCAATGAGTCCA		
OsNHX1gene	(401)	CATCGTCCTCGGCCACCTCCTCGAGGAGAATCGCTGGGTCAATGAGTCCA		
Consensus	(401)	CATCGTCCTCGGCCACCTCCTCGAGGAGAATCGCTGGGTCAATGAGTCCA		
		451		500
OsNHX1mRNA	(451)	TCACCGCGCTCATCATCG		
OsNHX1gene	(451)	TCACCGCGCTCATCATCGTAAGCGCACACACCATTGCTGTGATTGATT		
Consensus	(451)	TCACCGCGCTCATCATCG		
		501		550
OsNHX1mRNA	(469)	-----		
OsNHX1gene	(501)	GATCGATTGATTGCCATTGTTGCTGACGCACGCTTGCTGCTCGATGATT		
Consensus	(501)	-----		
		551		600
OsNHX1mRNA	(469)	-----GGCTCTGCACCGGCGTGGTGATCTTGCTGA		
OsNHX1gene	(551)	TGCTTGCTTGCTTGGGCAGGGCTCTGCACCGGCGTGGTGATCTTGCTGA		
Consensus	(551)	GGCTCTGCACCGGCGTGGTGATCTTGCTGA		
		601		650
OsNHX1mRNA	(499)	TGACCAAAGGGAAGAGCTCGCACTTATTTCGTCTTCAGTGAGGATCTCTTC		
OsNHX1gene	(601)	TGACCAAAGGGAAGAGCTCGCACTTATTTCGTCTTCAGTGAGGATCTCTTC		
Consensus	(601)	TGACCAAAGGGAAGAGCTCGCACTTATTTCGTCTTCAGTGAGGATCTCTTC		
		651		700
OsNHX1mRNA	(549)	TTCATCTACCTCCTCCCTCCGATCATCTTCAATGCAGG		
OsNHX1gene	(651)	TTCATCTACCTCCTCCCTCCGATCATCTTCAATGCAGG		
Consensus	(651)	TTCATCTACCTCCTCCCTCCGATCATCTTCAATGCAGG		
		701		750
OsNHX1mRNA	(587)	-----		
OsNHX1gene	(701)	GCTTCGGCGTGTCTTGCTGTGGTTAGATTTTCGGCTTCAGTTCCTTTTGT		
Consensus	(701)	-----		
		751		800
OsNHX1mRNA	(587)	-----		
OsNHX1gene	(751)	GGCACATGGTGGTGTACAAGTTTTTCTGGGGATTGGGGAATCTGTTTGC		
Consensus	(751)	-----		
		801		850
OsNHX1mRNA	(587)	-----		
OsNHX1gene	(801)	TGCTGGTGGTACACTGTGTACGCGTGGCTGGTTTCTTGTGTTTCTTCT		
Consensus	(801)	-----		
		851		900
OsNHX1mRNA	(587)	-----		
OsNHX1gene	(851)	GGGCCTAGCTGTCTGTCCGTCGATGTCTTAGACATGGCTGCTAGTTCATA		
Consensus	(851)	-----		

		901		950
OsNHX1mRNA	(587)	-----		
OsNHX1gene	(901)	CTGTGCAGGTTGTGGGTGAATTTTTTTTTTGTTCCTCTTTAAGACAGAG		
Consensus	(901)			
		951		1000
OsNHX1mRNA	(587)	-----		
OsNHX1gene	(951)	ATGGATTACTCTCGTCTTACTGGCATACTTGACTTGCCAGCTCGAACT		
Consensus	(951)			
		1001		1050
OsNHX1mRNA	(587)	-----		
OsNHX1gene	(1001)	GCTGATTGGTACAGTATGGAGTAGCAACTGTAATCTTGACCATTGCATGA		
Consensus	(1001)			
		1051		1100
OsNHX1mRNA	(587)	-----		
OsNHX1gene	(1051)	AGCATTGAGAAAATGCTGAAAGATTATTTGTTCCTTTAATTTAATTATTAT		
Consensus	(1051)			
		1101		1150
OsNHX1mRNA	(587)	-----		
OsNHX1gene	(1101)	ATATTGATTGACTGTGCAACAGCTTCTGTCTCCTAGAGTTCTACTCTTGG		
Consensus	(1101)			
		1151		1200
OsNHX1mRNA	(587)	-----		
OsNHX1gene	(1151)	TCCATTTACAGTGGTTAGTAGTACTGGTCATCCAACACCATGAAGGCATG		
Consensus	(1151)			
		1201		1250
OsNHX1mRNA	(587)	-----		
OsNHX1gene	(1201)	AGAGGGATATGGTCCTGTCAAGAGTGATGGCGTGATCAATTTCTGAAAGA		
Consensus	(1201)			
		1251		1300
OsNHX1mRNA	(587)	-----		
OsNHX1gene	(1251)	ACAGTGGCCATGCTAGTCCGAATTTGGTTGAGCATTTAATCCCCTTTTGA		
Consensus	(1251)			
		1301		1350
OsNHX1mRNA	(587)	-----		
OsNHX1gene	(1301)	AGGTTTTTGGGCCATCCATATAGATTTGAAGTAGGGTTGTAGGAGTAAAG		
Consensus	(1301)			
		1351		1400
OsNHX1mRNA	(587)	-----		
OsNHX1gene	(1351)	CTGAATATTATGGGCCCATGTTTGCTTTCACATTTAGGAATTGCAAAGTC		
Consensus	(1351)			
		1401		1450
OsNHX1mRNA	(587)	-----		
OsNHX1gene	(1401)	TCTCTTTGGGAAAAGGCACAAGTCCTTTTGTAGTTTCAGAGTTACTCTATT		
Consensus	(1401)			
		1451		1500
OsNHX1mRNA	(587)	-----		
OsNHX1gene	(1451)	TTCGTTCCCTTTCTGCTTTGCTTGAACTTTTATTTTTTTTATTCATATAA		
Consensus	(1451)			
		1501		1550
OsNHX1mRNA	(587)	-----		
OsNHX1gene	(1501)	TAAACAAGTTGCTGAATAATTCACGGGAAAAAAGCATCGTCCTGGTC		
Consensus	(1501)			
		1551		1600
OsNHX1mRNA	(587)	-----	TTTTCAGGTAAAGAAAAAGCAATTCCTC	
OsNHX1gene	(1551)	CTCACAAATATTTTCCATCAGTTTTCAGGTAAAGAAAAAGCAATTCCTC	TTTTCAGGTAAAGAAAAAGCAATTCCTC	
Consensus	(1551)		TTTTCAGGTAAAGAAAAAGCAATTCCTC	

		1601		1650
OsNHX1mRNA	(615)	CGGAATTT	CATGACGATCACATTATTTGGAGCCGTCGGGACAATGATATC	
OsNHX1gene	(1601)	CGGAATTT	CATGACGATCACATTATTTGGAGCCGTCGGGACAATGATATC	
Consensus	(1601)	CGGAATTT	CATGACGATCACATTATTTGGAGCCGTCGGGACAATGATATC	
		1651		1700
OsNHX1mRNA	(665)	CTTTTT	CACAATATCTATTG	
OsNHX1gene	(1651)	CTTTTT	CACAATATCTATTG	GTACGTTCTTTCAGAAATGATTCTTAATTC
Consensus	(1651)	CTTTTT	CACAATATCTATTG	
		1701		1750
OsNHX1mRNA	(685)	-----	-----	-----
OsNHX1gene	(1701)	TTCCGTGAGTTGGTAGTGCTTTCATTTTCTGTTGTTCCGTGTAACCTTTT		
Consensus	(1701)	TTCCGTGAGTTGGTAGTGCTTTCATTTTCTGTTGTTCCGTGTAACCTTTT		
		1751		1800
OsNHX1mRNA	(685)	-----	-----	CTGCCATT
OsNHX1gene	(1751)	GGACTTCTGAGATTCTGACTCTGATCAATTTCTTAATTTTCAG		CTGCCATT
Consensus	(1751)	GGACTTCTGAGATTCTGACTCTGATCAATTTCTTAATTTTCAG		CTGCCATT
		1801		1850
OsNHX1mRNA	(693)	GCAATATT	CAGCAGAATGAACATTGGAACGCTGGATGTAGGAGATTTTCT	
OsNHX1gene	(1801)	GCAATATT	CAGCAGAATGAACATTGGAACGCTGGATGTAGGAGATTTTCT	
Consensus	(1801)	GCAATATT	CAGCAGAATGAACATTGGAACGCTGGATGTAGGAGATTTTCT	
		1851		1900
OsNHX1mRNA	(743)	TG	-----	-----
OsNHX1gene	(1851)	TG	GTAAGCCATGGCTATCTTCTGTCATGATCATGCTGGCACTAATATTGA	
Consensus	(1851)	TG	GTAAGCCATGGCTATCTTCTGTCATGATCATGCTGGCACTAATATTGA	
		1901		1950
OsNHX1mRNA	(745)	-----	-----	-----
OsNHX1gene	(1901)	CACCATGTGAGCATCATTTCTCCTGTTGACTGTTATGTTCAATGTGCAG		
Consensus	(1901)	CACCATGTGAGCATCATTTCTCCTGTTGACTGTTATGTTCAATGTGCAG		
		1951		2000
OsNHX1mRNA	(745)	CAATTGGAGCCATCTTTTCTGCGACAGATTCTGTCTGCACATTGCAGGT		
OsNHX1gene	(1951)	CAATTGGAGCCATCTTTTCTGCGACAGATTCTGTCTGCACATTGCAGGT		
Consensus	(1951)	CAATTGGAGCCATCTTTTCTGCGACAGATTCTGTCTGCACATTGCAGGT		
		2001		2050
OsNHX1mRNA	(794)	-----	-----	-----
OsNHX1gene	(2001)	AGTTGAACAAATTTTGCATACCTCGAGAGAGACCTGGATTCAACGTGCT		
Consensus	(2001)	AGTTGAACAAATTTTGCATACCTCGAGAGAGACCTGGATTCAACGTGCT		
		2051		2100
OsNHX1mRNA	(794)	-----	-----	CCTCAATCAGGATGAGACACC
OsNHX1gene	(2051)	AATGTAATGATCTTAACCCAAAACAGGT		CCTCAATCAGGATGAGACACC
Consensus	(2051)	AATGTAATGATCTTAACCCAAAACAGGT		CCTCAATCAGGATGAGACACC
		2101		2150
OsNHX1mRNA	(815)	CTTTTT	TGACAGTCTGGTATTCGGTGAAGGTGTTGTGAACGATGCTACAT	
OsNHX1gene	(2101)	CTTTTT	TGACAGTCTGGTATTCGGTGAAGGTGTTGTGAACGATGCTACAT	
Consensus	(2101)	CTTTTT	TGACAGTCTGGTATTCGGTGAAGGTGTTGTGAACGATGCTACAT	
		2151		2200
OsNHX1mRNA	(865)	CAATTGTGCTTTTCAACGCACTACAGAACTTTGATCTTGTCCACATAGAT		
OsNHX1gene	(2151)	CAATTGTGCTTTTCAACGCACTACAGAACTTTGATCTTGTCCACATAGAT		
Consensus	(2151)	CAATTGTGCTTTTCAACGCACTACAGAACTTTGATCTTGTCCACATAGAT		
		2201		2250
OsNHX1mRNA	(915)	GCGGCTGTCGTTCTGAAATTCCTGGGGAACTTCCTTTTATTTATTTTTGTGTC		
OsNHX1gene	(2201)	GCGGCTGTCGTTCTGAAATTCCTGGGGAACTTCCTTTTATTTATTTTTGTGTC		
Consensus	(2201)	GCGGCTGTCGTTCTGAAATTCCTGGGGAACTTCCTTTTATTTATTTTTGTGTC		
		2251		2300
OsNHX1mRNA	(965)	GAGCACCTT	CCTTGGAGTATTTG	-----
OsNHX1gene	(2251)	GAGCACCTT	CCTTGGAGTATTTG	TAAGTTGATTCTTAAGTTTCACTTTTT
Consensus	(2251)	GAGCACCTT	CCTTGGAGTATTTG	TAAGTTGATTCTTAAGTTTCACTTTTT

		2301		2350
OsNHX1mRNA	(988)	-----		
OsNHX1gene	(2301)	ACATCTTACTGTCTGTCTTGACTCTACTGCTTGGTTGACACATGTAAACT		
Consensus	(2301)			
		2351		2400
OsNHX1mRNA	(988)	-----CTGGATTGCTCAGTGCATACATAAT		
OsNHX1gene	(2351)	TAATATTCTTCTTCCACCCTGCAGGCTGGATTGCTCAGTGCATACATAAT		
Consensus	(2351)			CTGGATTGCTCAGTGCATACATAAT
		2401		2450
OsNHX1mRNA	(1013)	CAAGAAGCTATACATTGGAAGG-----		
OsNHX1gene	(2401)	CAAGAAGCTATACATTGGAAGGTTAGTTAAGCCCAAACAAACCCTCATTA		
Consensus	(2401)	CAAGAAGCTATACATTGGAAGG		
		2451		2500
OsNHX1mRNA	(1035)	-----		
OsNHX1gene	(2451)	GTTAACGGTTTTTATGCTCAGTGTAACTTGGATGTTGGTACTGATTCCA		
Consensus	(2451)			
		2501		2550
OsNHX1mRNA	(1035)	--CATTCTACTGACCGTGAGGTTGCCCTTATGATGCTCATGGCTTACCTT		
OsNHX1gene	(2501)	GGCATTCTACTGACCGTGAGGTTGCCCTTATGATGCTCATGGCTTACCTT		
Consensus	(2501)	CATTCTACTGACCGTGAGGTTGCCCTTATGATGCTCATGGCTTACCTT		
		2551		2600
OsNHX1mRNA	(1083)	TCATATATGCTGGCTGAG-----		
OsNHX1gene	(2551)	TCATATATGCTGGCTGAGGTGTGCCTCTGCTTTGATGCAGTATCAAAT		
Consensus	(2551)	TCATATATGCTGGCTGAG		
		2601		2650
OsNHX1mRNA	(1101)	-----		
OsNHX1gene	(2601)	TGCATATAGTTTCATTTTATAGTTTGATTTTATCTACTTTGTTTGTGTTGA		
Consensus	(2601)			
		2651		2700
OsNHX1mRNA	(1101)	-----TTGCTAGATTTGAGCGGCATTCTCACCGTATTCTTCTGTGG		
OsNHX1gene	(2651)	TATTGGCAGTTGCTAGATTTGAGCGGCATTCTCACCGTATTCTTCTGTGG		
Consensus	(2651)	TTGCTAGATTTGAGCGGCATTCTCACCGTATTCTTCTGTGG		
		2701		2750
OsNHX1mRNA	(1142)	TATTGTAATGTCACATTACACTTGGCATAACGTCACAGAGAGTTCAAGAG		
OsNHX1gene	(2701)	TATTGTAATGTCACATTACACTTGGCATAACGTCACAGAGAGTTCAAGAG		
Consensus	(2701)	TATTGTAATGTCACATTACACTTGGCATAACGTCACAGAGAGTTCAAGAG		
		2751		2800
OsNHX1mRNA	(1192)	TTACAACAAAG-----		
OsNHX1gene	(2751)	TTACAACAAAGTAAATTATAATTCTCATTCCATATTCTACTGTTTAAATGA		
Consensus	(2751)	TTACAACAAAG		
		2801		2850
OsNHX1mRNA	(1203)	-----		
OsNHX1gene	(2801)	TTAGCTTCAGTTCGTAGAAAAACTAAACAAAACCTTACTGGTTTGTGTTTGT		
Consensus	(2801)			
		2851		2900
OsNHX1mRNA	(1203)	-----CACGCATTTGCAACTCTGTCCTTCATTGCTGAGACT		
OsNHX1gene	(2851)	CCTTTCACCTCAGGCACGCATTTGCAACTCTGTCCTTCATTGCTGAGACT		
Consensus	(2851)	CACGCATTTGCAACTCTGTCCTTCATTGCTGAGACT		
		2901		2950
OsNHX1mRNA	(1239)	TTTCTCTTCTGTATGTTGGGATGGATGCATTGGATATTGAAAAATGGGA		
OsNHX1gene	(2901)	TTTCTCTTCTGTATGTTGGGATGGATGCATTGGATATTGAAAAATGGGA		
Consensus	(2901)	TTTCTCTTCTGTATGTTGGGATGGATGCATTGGATATTGAAAAATGGGA		
		2951		3000
OsNHX1mRNA	(1289)	GTTTGCCAGTGACA-----		
OsNHX1gene	(2951)	GTTTGCCAGTGACAGGCTGATACATGTTCTCATACCTAATTCCTATTTA		
Consensus	(2951)	GTTTGCCAGTGACA		

		3001		3050
OsNHX1mRNA	(1303)	-----	GACCTGGCA	
OsNHX1gene	(3001)	TGGATATGGAGACTCAATTTTACTTCTCTTTCCCATTCGCA	GACCTGGCA	
Consensus	(3001)		GACCTGGCA	
		3051		3100
OsNHX1mRNA	(1312)	AATCCATTGGGATAAGCTCAATTTTGCTAGGATTGGTTCTGATTGGAAGA		
OsNHX1gene	(3051)	AATCCATTGGGATAAGCTCAATTTTGCTAGGATTGGTTCTGATTGGAAGA		
Consensus	(3051)	AATCCATTGGGATAAGCTCAATTTTGCTAGGATTGGTTCTGATTGGAAGA		
		3101		3150
OsNHX1mRNA	(1362)	GCTGCTTTTGTATTCCCGCTGTCGTTCTTGTCGAACCTAACAAAGAAGGC		
OsNHX1gene	(3101)	GCTGCTTTTGTATTCCCGCTGTCGTTCTTGTCGAACCTAACAAAGAAGGC		
Consensus	(3101)	GCTGCTTTTGTATTCCCGCTGTCGTTCTTGTCGAACCTAACAAAGAAGGC		
		3151		3200
OsNHX1mRNA	(1412)	ACCGAATGAAAAAATAACCTGGAGACAGCAAGT	-----	
OsNHX1gene	(3151)	ACCGAATGAAAAAATAACCTGGAGACAGCAAGT	GAGTATCTGGTGTATGA	
Consensus	(3151)	ACCGAATGAAAAAATAACCTGGAGACAGCAAGT		
		3201		3250
OsNHX1mRNA	(1445)	-----		
OsNHX1gene	(3201)	TCAGACAATTTTCATTTGAATTCGACTTGCCATCTGCTAACTGAATTTCT		
Consensus	(3201)			
		3251		3300
OsNHX1mRNA	(1445)	-----	TGTAATATGGTGGGCTGGGCTGATGAGAGGAGCTGTGTCC	
OsNHX1gene	(3251)	CTCGATAGGT	TGTAATATGGTGGGCTGGGCTGATGAGAGGAGCTGTGTCC	
Consensus	(3251)		TGTAATATGGTGGGCTGGGCTGATGAGAGGAGCTGTGTCC	
		3301		3350
OsNHX1mRNA	(1485)	ATTGCTCTTGCTTACAATAAG	-----	
OsNHX1gene	(3301)	ATTGCTCTTGCTTACAATAAG	GTCAGTCCGTCAGTGCAAGACTATTGCTT	
Consensus	(3301)	ATTGCTCTTGCTTACAATAAG		
		3351		3400
OsNHX1mRNA	(1506)	-----		
OsNHX1gene	(3351)	CACACCATCTGTATATCTGTATTTCTTCTCATCTTGCCATTAATTAGT		
Consensus	(3351)			
		3401		3450
OsNHX1mRNA	(1506)	-----		
OsNHX1gene	(3401)	CCCAGGAGAAGTATGTCTTAGTTTCTTCTCCTTAAGCTTAAGTGTCTCGT		
Consensus	(3401)			
		3451		3500
OsNHX1mRNA	(1506)	-----	TTTACAAGATCTGGCCATACTCAGCTGCACGGCAATGCA	
OsNHX1gene	(3451)	TGCAATTGCAG	TTTACAAGATCTGGCCATACTCAGCTGCACGGCAATGCA	
Consensus	(3451)		TTTACAAGATCTGGCCATACTCAGCTGCACGGCAATGCA	
		3501		3550
OsNHX1mRNA	(1545)	ATAATGATCACCAGCACCATCACTGTCGTTCTTTTTAGCACTATGGT	---	
OsNHX1gene	(3501)	ATAATGATCACCAGCACCATCACTGTCGTTCTTTTTAGCACTATGGT	GAG	
Consensus	(3501)	ATAATGATCACCAGCACCATCACTGTCGTTCTTTTTAGCACTATGGT		
		3551		3600
OsNHX1mRNA	(1592)	-----		
OsNHX1gene	(3551)	TCATCTTACTGCAACCTATGCCTAACGCAAAGCGTCCTTTTTTCATCCAA		
Consensus	(3551)			
		3601		3650
OsNHX1mRNA	(1592)	-----		
OsNHX1gene	(3601)	GTTTGTGCCACATGTCTGAATTCACCCCTAACAGGACCTCAGCATTA		
Consensus	(3601)			
		3651		3700
OsNHX1mRNA	(1592)	-----		
OsNHX1gene	(3651)	GCTAACCTAATAATAAGTTCCTCAAAGTCGATTGTCAAATCAAATTTGTC		
Consensus	(3651)			


```

3701                                     3750
OsNHX1mRNA (1592) -----
OsNHX1gene (3701) AGCTGTGACAAAAGTAATCTGGAAGCTTGTAATGTTGAACATGCTCTAAT
Consensus (3701)

3751                                     3800
OsNHX1mRNA (1592) -----
OsNHX1gene (3751) CCAACCAAAAACCAACTACTGACCCGAGAAATGAAATCATGTCTTTTTGTCC
Consensus (3751)

3801                                     3850
OsNHX1mRNA (1592) -----
OsNHX1gene (3801) CTACTATCTTGTCTCTTCTTATCCCTTCTGAAGAGATTGCCGTACCGTC
Consensus (3801)

3851                                     3900
OsNHX1mRNA (1592) -----
OsNHX1gene (3851) CAGTCATTGACTCATCGTCCATATTTCTCACATGACATGGATCAAGGATGG
Consensus (3851)

3901                                     3950
OsNHX1mRNA (1592) -----
OsNHX1gene (3901) CACAATTATTTGAAATTAATTGTCGTTTGTACTACTAGCTTTTCGTTTT
Consensus (3901)

3951                                     4000
OsNHX1mRNA (1592) -----
OsNHX1gene (3951) AGTTTTCTGGATGTTTTCTTTAGGAAGACATACATGTGTTCATCATGTCGAA
Consensus (3951)

4001                                     4050
OsNHX1mRNA (1592) -----
OsNHX1gene (4001) TTGCGCATCCAATCACTTGATTGTTTACGAGCTAAATCCTTGTTTCAGAAT
Consensus (4001)

4051                                     4100
OsNHX1mRNA (1592) -----
OsNHX1gene (4051) CCCTGGAAGCTCAAAATGTGCAAAACATCTATTTTTGTGAAACATACTGAC
Consensus (4051)

4101                                     4150
OsNHX1mRNA (1592) -----ATTTGGGATGATGACAAAAGCCATTGATCA
OsNHX1gene (4101) ATTTATAAATGTTTATTAGGTATTTGGGATGATGACAAAAGCCATTGATCA
Consensus (4101) ATTTGGGATGATGACAAAAGCCATTGATCA

4151                                     4200
OsNHX1mRNA (1621) GGCTGCTGCTACCGGCTCAGGCCATCCTGTCACCTCTGAGCCTTCATCA
OsNHX1gene (4151) GGCTGCTGCTACCGGCTCAGGCCATCCTGTCACCTCTGAGCCTTCATCA
Consensus (4151) GGCTGCTGCTACCGGCTCAGGCCATCCTGTCACCTCTGAGCCTTCATCA

4201                                     4250
OsNHX1mRNA (1671) CCAAAGTCCCTGCATTTCTCCTCTCCTGACAAGCATGCAAGGTTCTGACCT
OsNHX1gene (4201) CCAAAGTCCCTGCATTTCTCCTCTCCTGACAAGCATGCAAGGTTCTGACCT
Consensus (4201) CCAAAGTCCCTGCATTTCTCCTCTCCTGACAAGCATGCAAGGTTCTGACCT

4251                                     4300
OsNHX1mRNA (1721) CGAGAGTACAACCAACATTGTGAGGCCTTCCAGCCTCCGGATGCTCCTCA
OsNHX1gene (4251) CGAGAGTACAACCAACATTGTGAGGCCTTCCAGCCTCCGGATGCTCCTCA
Consensus (4251) CGAGAGTACAACCAACATTGTGAGGCCTTCCAGCCTCCGGATGCTCCTCA

4301                                     4350
OsNHX1mRNA (1771) CCAAGCCGACCCACACTGTCCACTACTACTGGCGCAAGTTCGACGACGCG
OsNHX1gene (4301) CCAAGCCGACCCACACTGTCCACTACTACTGGCGCAAGTTCGACGACGCG
Consensus (4301) CCAAGCCGACCCACACTGTCCACTACTACTGGCGCAAGTTCGACGACGCG

4351                                     4400
OsNHX1mRNA (1821) CTGATGCGACCGATGTTTGGCGGGCGCGGGTTCGTGCCCTTCTCCCCTGG
OsNHX1gene (4351) CTGATGCGACCGATGTTTGGCGGGCGCGGGTTCGTGCCCTTCTCCCCTGG
Consensus (4351) CTGATGCGACCGATGTTTGGCGGGCGCGGGTTCGTGCCCTTCTCCCCTGG

```

		4401		4450
OsNHX1mRNA	(1871)	ATCACCAACCGAGCAGAGCCATGGAGGAAGATGAACAGTGC AAAGAAATG		
OsNHX1gene	(4401)	ATCACCAACCGAGCAGAGCCATGGAGGAAGATGAACAGTGC AAAGAAATG		
Consensus	(4401)	ATCACCAACCGAGCAGAGCCATGGAGGAAGATGAACAGTGC AAAGAAATG		4451
				4500
OsNHX1mRNA	(1921)	AGAATGGAATGGTTGATGAGGAGAATACATGTAAAATGTGACAGCAAAG		
OsNHX1gene	(4451)	AGAATGGAATGGTTGATGAGGAGAATACATGTAAAATGTGACAGCAAAG		
Consensus	(4451)	AGAATGGAATGGTTGATGAGGAGAATACATGTAAAATGTGACAGCAAAG		4501
				4550
OsNHX1mRNA	(1971)	AGAGAAGGCAAGTTTTGGGTTTGTAGAGTTTGGCTGCTGCTAATGAGTTG		
OsNHX1gene	(4501)	AGAGAAGGCAAGTTTTGGGTTTGTAGAGTTTGGCTGCTGCTAATGAGTTG		
Consensus	(4501)	AGAGAAGGCAAGTTTTGGGTTTGTAGAGTTTGGCTGCTGCTAATGAGTTG		4551
				4600
OsNHX1mRNA	(2021)	TTGATAGTGCCTATATTCTTCAGAACTTCAGATGGTGCCTCACCAAGGCC		
OsNHX1gene	(4551)	TTGATAGTGCCTATATTCTTCAGAACTTCAGATGGTGCCTCACCAAGGCC		
Consensus	(4551)	TTGATAGTGCCTATATTCTTCAGAACTTCAGATGGTGCCTCACCAAGGCC		4601
				4650
OsNHX1mRNA	(2071)	TAAGAGCCAGGAGGACCTTCTGATAATGGTTCGGGATGATTGGTTTTGTTC		
OsNHX1gene	(4601)	TAAGAGCCAGGAGGACCTTCTGATAATGGTTCGGGATGATTGGTTTTGTTC		
Consensus	(4601)	TAAGAGCCAGGAGGACCTTCTGATAATGGTTCGGGATGATTGGTTTTGTTC		4651
				4700
OsNHX1mRNA	(2121)	TGTCAGGATGAACCCTAGTGAGTGACACAGGGTGATGTGCTCCGACAACC		
OsNHX1gene	(4651)	TGTCAGGATGAACCCTAGTGAGTGACACAGGGTGATGTGCTCCGACAACC		
Consensus	(4651)	TGTCAGGATGAACCCTAGTGAGTGACACAGGGTGATGTGCTCCGACAACC		4701
				4750
OsNHX1mRNA	(2171)	TGTAATTTTTGTAGATTAACAGCCCCATTTGTACCTGTCTACCATCTTTA		
OsNHX1gene	(4701)	TGTAATTTTTGTAGATTAACAGCCCCATTTGTACCTGTCTACCATCTTTA		
Consensus	(4701)	TGTAATTTTTGTAGATTAACAGCCCCATTTGTACCTGTCTACCATCTTTA		4751
				4800
OsNHX1mRNA	(2221)	GTTGGCGGGTGTCTTTCCCTAGTTGCCACCCTGCATGTAAAATGAAATTC		
OsNHX1gene	(4751)	GTTGGCGGGTGTCTTTCCCTAGTTGCCACCCTGCATGTAAAATGAAATTC		
Consensus	(4751)	GTTGGCGGGTGTCTTTCCCTAGTTGCCACCCTGCATGTAAAATGAAATTC		4801
				4850
OsNHX1mRNA	(2271)	TCCGCCAAAATAGATTTGTGTGTATAATAATTTTGCTTGGTTG		
OsNHX1gene	(4801)	TCCGCCAAAATAGATTTGTGTGTATAATAATTTTGCTTGGTTG		
Consensus	(4801)	TCCGCCAAAATAGATTTGTGTGTATAATAATTTTGCTTGGTTG		4851
				4867
OsNHX1mRNA	(2314)	-----		
OsNHX1gene	(4851)	GGTATGGCATGGTTTGC		
Consensus	(4851)			

ภาพที่ 8 Nucleotide sequences alignment ของยีน *OsNHX1* ในรูป mRNA และ genomic DNA

ตัวอักษรสีแดงพื้นสีเทา คือ exon ของยีน และ ตัวอักษรสีดำ คือ intron ของยีน

จากนั้นเลือกช่วงพื้นที่ของ exon ที่ไม่มี intron คือ ช่วง 1-500 bp แรกไปออกแบบ primer โดยใช้โปรแกรม FastPCR เพื่อกำหนดให้มี PCR product ขนาดไม่เกิน 500 bp และมีค่า T_m (melting temperature) ประมาณไม่เกิน 65°C ได้คู่ primer ที่อยู่ใน exon ที่ 1 ของยีน ดังนี้คือ 2F1_38-59 (*OsNHX1_F38-59*) และ 3R1_336-357 (*OsNHX1_R336-357*) มีรายละเอียดดังนี้

2F1_38-59	AGCCAACCGAGAGAGGTCTCGA	22	62.0°C	35.9°C	59.1%	104
3R1_336-357	ACGCGTAGTCGGAGGTCGTGTA	22	62.0°C	34.7°C	59.1%	105

และให้ PCR product ขนาดประมาณ 320 bp ดังแสดงในภาพที่ 9

```

1  GAGAAGAGAG TTTTGTAGCG AGCTCGCGCG AATGCGAAGC CAACCGAGAG
   CTCTTCTCTC AAAACATCGC TCGAGCGCGC TTACGCTTCG GTTGGCTCTC
51  AGGTCTCGAT ACCAAATCCC GATTTCTCAA CCTGAATCCC CCCCCACGT
   TCCAGAGCTA TGGTTTAGGG CTAAAGAGTT GGACTTAGGG GGGGGGTGCA
101 TCCTCGTTTC AATCTGTTCG TCTGCGAATC GAATTCCTTG TTTTTTTTTT
   AGGAGCAAAG TTAGACAAGC AGACGCTTAG CTTAAGAAAC AAAAAAAAAAG
151 TCTAATTTTA CCGGGAATTG TCGAATTAGG CATTACCAA CGAGCAAGAG
   AGATTAAAAT GGCCCTTAAC AGCTTAATCC GTAAGTGGTT GCTCGTTCTC
201 GGGAGTGGAT TGGTTGGTTA AAGCTCCGCA TCTTGCGGCG GAAATCTCGC
   CCCTCACCTA ACCAACCAAT TTCGAGGCGT AGAACGCCGC CTTTAGAGCG
251 TCTCTTCTCT GCGGTGGGTG GCCGGAGAAG TCGCCGCCGG TGAGGCATGG
   AGAGAAGAGA CGCCACCAC CCGCCTCTTC AGCGGCGGCC ACTCCGTACC
301 GGATGGAGGT GCGGCGGCG CCGCTGGGG CTCTGTACAC GACCTCCGAC
   CCTACCTCCA CCGCCGCCGC GCCGACCCCC GAGACATGTG CTGGAGGCTG
351 TACGCGTCCG TGGTGTCCAT CAACCTGTTC GTCGCGCTGC TCTGCGCCTG
   ATGCGCAGCC ACCACAGGTA GTTGGACAAG CAGCGCGACG AGACGCGGAC
401 CATCGTCCTC GGCCACCTCC TCGAGGAGAA TCGCTGGGTC AATGAGTCCA
   GTAGCAGGAG CCGGTGGAGG AGCTCCTCTT AGCGACCCAG TTACTCAGGT
451 TCACCGCGCT CATCATCGGG CTCTGCACCG GCGTGGTGAT CTTGCTGATG
   AGTGCGCGCA GTAGTAGCCC GAGACGTGGC CGCACCACTA GAACGACTAC

```

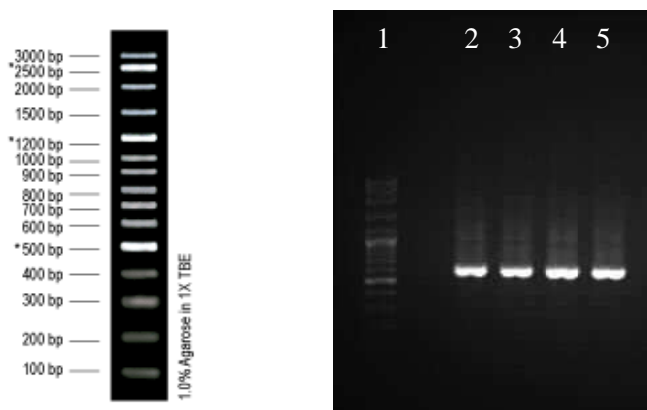
ภาพที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OsNHX1* ที่ใช้เป็นยีนติดตาม (gene probe)

ตัวอักษรสีแดง คือ forward primer (*OsNHX1_F38-59*) และ reverse primer (*OsNHX1_R336-357*)
ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน

2. การเพิ่มปริมาณยีนติดตามโดยเทคนิค PCR

2.1 การเพิ่มปริมาณยีนติดตาม *OsSUT1*

นำ pBluescript ที่มียีน *OsSUT1* รูป mRNA แทรกอยู่เป็น template และใช้คู่ primer TSUT1 F และ TSUT1 R ในการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 10 พบแถบของ PCR product ที่มีขนาดใกล้เคียงกับ DNA marker ขนาด 500 bp จึงได้ตัด PCR product ดังกล่าวไปทำบริสุทธิ์เพื่อนำไปใช้เป็นยีนติดตามต่อไป



ภาพที่ 10 Gel electrophoresis ของ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ โดยใช้ TSUT1 F และ TSUT1 R primer บน 1% agarose gel

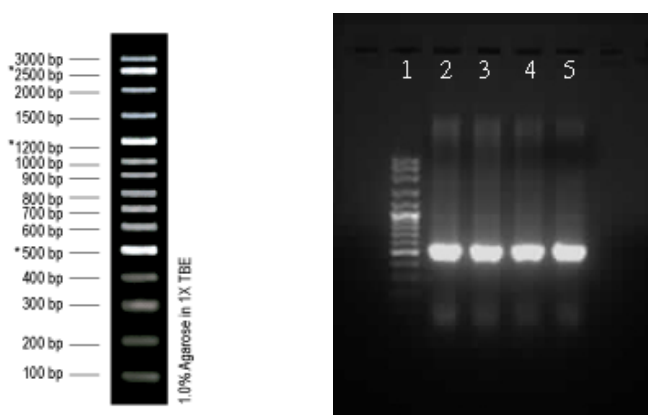
โดย Lane ที่ 1 : DNA marker (VC 100 bp plus)

Lane ที่ 2- 5 : PCR product ที่ใช้ pBluescript

ที่มียีน *OsSUT1* รูป mRNA แทรกอยู่เป็น template

2.2 การเพิ่มปริมาณยีนติดตาม *OsMST3*

เพิ่มปริมาณยีนติดตามด้วยการทำ PCR โดยใช้ genomic DNA ที่สกัดจากต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่มีอายุ 14 วัน สำหรับเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้คู่ primer MST3 F และ MST3 R ในการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 11 พบแถบของ PCR product ที่มีขนาดอยู่ใกล้เคียงกับ DNA marker ขนาด 500 bp ซึ่งมีขนาดที่ใกล้เคียงกับที่ได้ออกแบบไว้ คือ 430 bp จึงได้ตัด PCR product ดังกล่าวไปทำบริสุทธิ์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



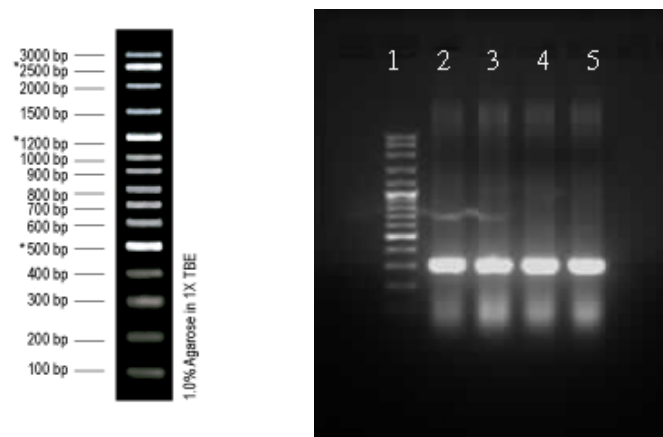
ภาพที่ 11 Gel electrophoresis ของ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ โดยใช้ MST3 F และ MST3 R primer บน 1% Agarose gel

โดย Lane ที่ 1 : DNA marker (VC 100 bp plus)

Lane ที่ 2- 5 : PCR product เมื่อใช้ rice genomic DNA เป็น template

2.3 การเพิ่มปริมาณยีนติดตาม *OsNHX1*

นำ genomic DNA ที่ได้จากการสกัดต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกเป็นเวลา 14 วัน มาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำ PCR และใช้คู่ primer *OsNHX1_F38-59* และ *OsNHX1_R336-357* ในการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 12 พบแถบ PCR product ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกับ DNA marker ขนาด 300 bp ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับที่ต้องการคือ 320 bp จึงตัดแถบ PCR product ดังกล่าวไปทำบริสุทธิ์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



ภาพที่ 12 Gel electrophoresis ของ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยใช้

OsNHX1_F38-59 และ OsNHX1_R336-357 primer บน 1% agarose gel

โดย Lane ที่ 1 : DNA marker (VC 100 bp plus)

Lane ที่ 2-5 : PCR product เมื่อใช้ rice genomic DNA เป็น template

3. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนติดตาม *OsMST3* และ *OsNHX1*

จากการนำแถบ PCR product ของยีน *OsMST3* และ *OsNHX1* มาทำบริสุทธิ์แล้วส่งไป

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ BSU จากนั้นนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 13 และ 14

		1		50
MST3	(1)	-----	-----	ATGGCCGG
MST3_F lastest	(1)	CCCTCTTCGTCTTCTTCATGNCGNTCGNTCGCCGCCACCGGN	TGG	NTCT
Consensus	(1)			TGG
		51		100
MST3	(9)	CGGCG-CGGTGG-TGAGCA	CGGGG----	CAGGCAAGGAC-----TAC
MST3_F lastest	(51)	CATCTTCGGNATA	TGACATCGCGTTATAT	CAGGTACGAACAATTAATTA
Consensus	(51)	C C CGG TGA CG G	CAGG A G AC	TA
		101		150
MST3	(46)	CCTGGCAAGCTCAC	CCTCTTCGTCCTCTT	CACATGCGTCG-TCGCCGC--
MST3_F lastest	(101)	CTATATAATCTCAC	TAAATTTGTTCAATGGTGCCTTGAATCTATCTATATAT	
Consensus	(101)	C A CTCAC	TT TC T T C TG TC TC	
		151		200
MST3	(93)	---CACCGGTGGTCTCATCTTCGGA--	TATGACATCGGTA-TAT-CAGGT	
MST3_F lastest	(151)	ATAATCATGAACAAATAAATAAT	TAAAACAATAATATACACAGGT	
Consensus	(151)	CA TG C AT T A TA ACA	TA TA CAGGT	
		201		250
MST3	(136)	GGTGTGACGTCCATGGACCCGTTCC	TGAGGAAGTTCTTCCCGGAGGTGTA	
MST3_F lastest	(201)	GGTGTGACGTCCATGGACCCGTTCC	TGAGGAAGTTCTTCCCGGAGGTGTA	
Consensus	(201)	GGTGTGACGTCCATGGACCCGTTCC	TGAGGAAGTTCTTCCCGGAGGTGTA	
		251		300
MST3	(186)	TCGGAAGAAGCAGATGGCGGACAAGAACA	ACCAGTACTGCAAGTACGACA	
MST3_F lastest	(251)	TCGGAAGAAGCAGATGGCGGACAAGAACA	ACCAGTACTGCAAGTACGACA	
Consensus	(251)	TCGGAAGAAGCAGATGGCGGACAAGAACA	ACCAGTACTGCAAGTACGACA	

```

301 350
MST3 (236) ACCAGCTGCTGCAGACCTTCACCTCGTCGCTCTACCTCGCCGCCCTCGTC
MST3_F lastest (301) ACCAGCTGCTGCAGACCTTCACCTCGTCGCTCTACCTCGCCGCCCTCGTC
Consensus (301) ACCAGCTGCTGCAGACCTTCACCTCGTCGCTCTACCTCGCCGCCCTCGTC
351 400
MST3 (286) TCCTCCTTCTTCGCCGCCACCGTCACCCGCGTCCTCGGCCGCAAGTGGTC
MST3_F lastest (351) TCCTCCTTCTTCGCCGCCACCGTCACCCGCGTCCTCGGCCGCAAGTGGTC
Consensus (351) TCCTCCTTCTTCGCCGCCACCGTCACCCGCGTCCTCGGCCGCAAGTGGTC
401 450
MST3 (336) CATGTTGCGCCGGCGGCCTCACCTTCCTCATCGGCCGCCCTCAACGGCG
MST3_F lastest (401) CATGTTGCGCCGGCGGCCTCACCTTCCTCATCGGCCGCCCTCAACGGCG
Consensus (401) CATGTTGCGCCGGCGGCCTCACCTTCCTCATCGGCCGCCCTCAACGGCG
451 500
MST3 (386) CCGCCGAGAACGTGCGCATGCTCATCGTCGTCGTATCTCTCTCGGTGTC
MST3_F lastest (451) CCNCCNAGAACNNCNCNNGNCCNNNNNNNGNNNNNNNNNCNNNNNNGNN
Consensus (451) CC CC AGAAC C C G C G C G
501 550
MST3 (436) GGCGTCGGCTTCGCCAATCAGTCGGTGCCGGTGTACTTGTTCGGAGATGGC
MST3_F lastest (501) NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
Consensus (501)
551 600
MST3 (486) GCCGGCTCGGCTGCGGGGATGCTGAACATCGGGTCCAGCTGATGATCA
MST3_F lastest (551) NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
Consensus (551)
601 650
MST3 (536) CCATCGGCATCCTGGCGGCGGAGCTGATAAACTACGGGACGGCGAAGATC
MST3_F lastest (601) NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
Consensus (601)
651 700
MST3 (586) AAGCCGGGTGGGGATGGCGGGTGGCCTGGCGTGGCCGCCGTCCCCGC
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (651)
701 750
MST3 (636) CGCCATCATACCCTCGGCTCCCTCTTCTCCCGACACCCCAACTCGC
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (701)
751 800
MST3 (686) TCATCGACAGGGCCACCCGAGGCGGCGGAGCGCATGCTCCGGCGCATC
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (751)
801 850
MST3 (736) CGCGGCTCCGACGTGGACGTGTCGGAGGAGTACGCGGACCTGGTGGCGGC
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (801)
851 900
MST3 (786) GAGCGAGGAGTCGAAGCTGGTGCAGCACCCGTGGCGCAACATCCTCCGCC
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (851)
901 950
MST3 (836) GCAAGTACCGCGCCAGCTCACCATGGCCATCTGCATCCCCTTCTTCCAG
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (901)
951 1000
MST3 (886) CAGCTACCGGATCAACGTATCATGTTCTACGCCCCGTGCTGTTCCGA
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (951)
1001 1050
MST3 (936) CACCCTGGGCTTCAAGAGCGACGCGTCGCTCATGTCCGCCGTATCACGG
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (1001)

```

```

          1051                                     1100
MST3      (986) GCCTCGTCAACGTCTTCGCCACGCTGGTGTCCATCTTCACCGTGGACCGC
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (1051)

          1101                                     1150
MST3      (1036) CTCGGCCGCCCAAGCTGTTCTGCAGGGCGGGGCGCAGATGGTGGTGTG
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (1101)

          1151                                     1200
MST3      (1086) CCAGGTGGTGGTGGGGACGCTGATCGCCGTC AAGTTCGGGACGAGCGGCA
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (1151)

          1201                                     1250
MST3      (1136) TCGGCGACATCCCCAAGGGGTACGCGCGGTGGTGGTGTCTTTCATCTGC
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (1201)

          1251                                     1300
MST3      (1186) ATGTACGTGGCAGGGTTCGCGTGGTTCGTGGGGCCCACTGGGGTGGCTCGT
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (1251)

          1301                                     1350
MST3      (1236) CCCCAGCGAGATCTTCCCGCTGGAGATCCGGCCGGCGGGGCAGAGCATCA
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (1301)

          1351                                     1400
MST3      (1286) ACGTGTCCGGTGAACATGCTCTTACCTTCGTCATCGCGCAGGCCTTCCTC
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (1351)

          1401                                     1450
MST3      (1336) ACCATGCTCTGCCACATGAAGTTCGGCCTCTTCTACTTCTTCGCCGGATG
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (1401)

          1451                                     1500
MST3      (1386) GGTCGTCATCATGACCGTCTTCATCGCCCTCTTCCTCCCCGAGACCAAGA
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (1451)

          1501                                     1550
MST3      (1436) ACGTCCCCATCGAGGAGATGGTGTCTCGTCTGGAAGTCCCACTGGTTCTGG
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (1501)

          1551                                     1600
MST3      (1486) CGCCGATTCATCGGAGACCACGACGTCCACGTCGGCGCCAACCACGTCTC
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (1551)

          1601                                     1622
MST3      (1536) CAACAATAAGCTCCAACCATAA
MST3_F lastest (640) -----
Consensus (1601)

```

ภาพที่ 13 Nucleotide sequences alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OsMST3* และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ที่ต้องการใช้เป็นยีนติดตาม *OsMST3*


```

1 50
NHX1_NHX1 (1) GAGAAGAGAGTTTTGTAGCGAGCTCGCGCAATGCGAAGCCAACCGAGAG
NHX1_F lastest_Edit (1) -----
Consensus (1)

51 100
NHX1_NHX1 (51) AGGTCTCGATACCAAATCCCGATTTCTCAACTGAAATCCCCCCCCACGT
NHX1_F lastest_Edit (1) -----GTNATCCGAATTTCTCACCTGTAAATCCCCCCCCACGT
Consensus (51) ATCC ATTTCTCA C AATCCCCCCCCACGT

101 150
NHX1_NHX1 (101) TCCTCGTTTCAATCTGTTCTGCTGCGAATCGAATTCCTTGTTTTTTTTTTC
NHX1_F lastest_Edit (39) TCCTCGTTTCAATCTGTTCTGCTGCGAATCGAATTCCTTGTTTTTTTTTTC
Consensus (101) TCCTCGTTTCAATCTGTTCTGCTGCGAATCGAATTCCTTGTTTTTTTTTTC

151 200
NHX1_NHX1 (151) TCTAATTTTACCGGGAATTGTGCAATTAGGCATTACCAACGAGCAAGAG
NHX1_F lastest_Edit (89) TCTAATTTTACCGGGAATTGTGCAATTAGGCATTACCAACGAGCAAGAG
Consensus (151) TCTAATTTTACCGGGAATTGTGCAATTAGGCATTACCAACGAGCAAGAG

201 250
NHX1_NHX1 (201) GGGAGTGGATTGGTTGGTTAAAGCTCCGCATCTTGCGCGGAAATCTCGC
NHX1_F lastest_Edit (139) GGGAGTGGATTGGTTGGTTAAAGCTCCGCATCTTGCGCGGAAATCTCGC
Consensus (201) GGGAGTGGATTGGTTGGTTAAAGCTCCGCATCTTGCGCGGAAATCTCGC

251 300
NHX1_NHX1 (251) TCTCTTCTCTGCGGTGGGTGGCCGGAGAAGTCCGCCCGGTGAGGCATGG
NHX1_F lastest_Edit (189) TCTCTTCTCTGCGGTGGGTGGCCGGAGAAGTCCGCCCGGTGAGGCATGG
Consensus (251) TCTCTTCTCTGCGGTGGGTGGCCGGAGAAGTCCGCCCGGTGAGGCATGG

301 350
NHX1_NHX1 (301) GGATGGAGGTGCGCGCGCGCGGCTGGGGCTCTGTACACGACCTCCGAC
NHX1_F lastest_Edit (239) GGATGGAGGTGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
Consensus (301) GGATGGAGGTG

351 400
NHX1_NHX1 (351) TACGCGTCGGTGGTGTCCATCAACCTGTTCTGTCGCGCTGCTCTGCGCCTG
NHX1_F lastest_Edit (289) NNNAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
Consensus (351)

401 450
NHX1_NHX1 (401) CATCGTCCTCGCCACCTCCTCGAGGAGAATCGCTGGGTCAATGAGTCCA
NHX1_F lastest_Edit (339) NNNNNN-----
Consensus (401)

451 500
NHX1_NHX1 (451) TCACCGCGCTCATCATCGGGCTCTGCACCGCGTGGTGATCTTGCTGATG
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (451)

501 550
NHX1_NHX1 (501) ACCAAAGGGAAGAGCTCGCACTTATTCTTCTCAGTGAGGATCTCTTCTT
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (501)

551 600
NHX1_NHX1 (551) CATCTACCTCCTCCCTCCGATCATCTTCAATGCAGGTTTTCAGGTAAGA
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (551)

601 650
NHX1_NHX1 (601) AAAAGCAATTCTTCCGGAATTTATGACGATCACATTATTTGAGCCGTC
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (601)

651 700
NHX1_NHX1 (651) GGGACAATGATATCCTTTTTTCAATATCTATGCTGCCATTGCAATATT
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (651)

701 750
NHX1_NHX1 (701) CAGCAGAAATGAACATTGGAACGCTGGATGTAGGAGATTTCTTGCAATTG
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (701)

751 800
NHX1_NHX1 (751) GAGCCATCTTTTCTGCGACAGATTCTGTCTGCACATTGCAGGTCCTCAAT
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (751)

801 850
NHX1_NHX1 (801) CAGGATGAGACACCCTTTTTGTACAGTCTGGTATTCGGTGAAGGTGTTGT
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (801)

```

		851	900
NHX1_F	NHX1	(851) GAACGATGCTACATCAATTGTGCTTTTCAACGCACTACAGAACTTTGATC	
	lastest_Edit	(345) -----	
	Consensus	(851) -----	
		901	950
NHX1_F	NHX1	(901) TTGTCCACATAGATGCGGCTGTCGTTCTGAAATTCCTGGGGAACCTTCTTT	
	lastest_Edit	(345) -----	
	Consensus	(901) -----	
		951	1000
NHX1_F	NHX1	(951) TATTTATTTTTGTGCGAGCACCTTCCTTGGAGTATTTGCTGGATTGCTCAG	
	lastest_Edit	(345) -----	
	Consensus	(951) -----	
		1001	1050
NHX1_F	NHX1	(1001) TGCATACATAATCAAGAAGCTATACATTGGAAGGCATCTACTGACCGTG	
	lastest_Edit	(345) -----	
	Consensus	(1001) -----	
		1051	1100
NHX1_F	NHX1	(1051) AGGTTGCCCTTATGATGCTCATGGCTTACCTTCATATATGCTGGCTGAG	
	lastest_Edit	(345) -----	
	Consensus	(1051) -----	
		1101	1150
NHX1_F	NHX1	(1101) TGCTAGATTTGAGCGGCATTCTCACCGTATTCTTCTGTGGTATTGTAAT	
	lastest_Edit	(345) -----	
	Consensus	(1101) -----	
		1151	1200
NHX1_F	NHX1	(1151) GTCACATTACACTTGGCATAACGTCACAGAGAGTTCAAGAGTTACAACAA	
	lastest_Edit	(345) -----	
	Consensus	(1151) -----	
		1201	1250
NHX1_F	NHX1	(1201) AGCACGCATTTGCAACTCTGTCCTTCATTGCTGAGACTTTTCTCTTCTCTG	
	lastest_Edit	(345) -----	
	Consensus	(1201) -----	
		1251	1300
NHX1_F	NHX1	(1251) TATGTTGGGATGGATGCATTGGATATTGAAAAATGGGAGTTTGCCAGTGA	
	lastest_Edit	(345) -----	
	Consensus	(1251) -----	
		1301	1350
NHX1_F	NHX1	(1301) CAGACCTGGCAAATCCATTGGGATAAGCTCAATTTTGCTAGGATTGGTTC	
	lastest_Edit	(345) -----	
	Consensus	(1301) -----	
		1351	1400
NHX1_F	NHX1	(1351) TGATTGGAAGAGCTGCTTTTGTATTCCCGCTGTCGTTCTTGTGGAACCTA	
	lastest_Edit	(345) -----	
	Consensus	(1351) -----	
		1401	1450
NHX1_F	NHX1	(1401) ACAAGAAGGCACCGAATGAAAAAATAACCTGGAGACAGCAAGTTGTAAT	
	lastest_Edit	(345) -----	
	Consensus	(1401) -----	
		1451	1500
NHX1_F	NHX1	(1451) ATGGTGGGCTGGGCTGATGAGAGGAGCTGTGTCGATTGCTCTTGCTTACA	
	lastest_Edit	(345) -----	
	Consensus	(1451) -----	
		1501	1550
NHX1_F	NHX1	(1501) ATAAGTTTACAAGATCTGGCCATACTCAGCTGCACGGCAATGCAATAATG	
	lastest_Edit	(345) -----	
	Consensus	(1501) -----	
		1551	1600
NHX1_F	NHX1	(1551) ATCACCAGCACCATCACTGTCGTTCTTTTAGCACTATGGTATTTGGGAT	
	lastest_Edit	(345) -----	
	Consensus	(1551) -----	
		1601	1650
NHX1_F	NHX1	(1601) GATGACAAAGCCATTGATCAGGCTGCTGCTACCGCCTCAGGCCATCCTG	
	lastest_Edit	(345) -----	
	Consensus	(1601) -----	
		1651	1700
NHX1_F	NHX1	(1651) TCACCTCTGAGCCTTCATCACCAAAGTCCCTGCATTCTCCTCTCCTGACA	
	lastest_Edit	(345) -----	
	Consensus	(1651) -----	
		1701	1750
NHX1_F	NHX1	(1701) AGCATGCAAGGTTCTGACCTCGAGAGTACAACCAACATTTGTGAGGCCTTC	
	lastest_Edit	(345) -----	
	Consensus	(1701) -----	

```

1751 1800
NHX1 (1751) CAGCCTCCGGATGCTCCTCACCAAGCCGACCCACACTGTCCACTACTACT
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (1751)

1801 1850
NHX1 (1801) GGCGCAAGTTCGACGACGCGCTGATGCGACCGATGTTTGGCGGGCGCGGG
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (1801)

1851 1900
NHX1 (1851) TTCGTGCCCTTCTCCCCTGGATCACCAACCGAGCAGAGCCATGGAGGAAG
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (1851)

1901 1950
NHX1 (1901) ATGAACAGTGCAAAGAAATGAGAATGGAATGGTTGATGAGGAGAATACAT
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (1901)

1951 2000
NHX1 (1951) GTAAATGTGACAGCAAAAGAGAGAAGGCAAGTTTTGGGTTTGTAGAGTT
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (1951)

2001 2050
NHX1 (2001) TGGCTGCTGCTAATGAGTTGTTGATAGTGCCTATATTCTTCAGAACTCA
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (2001)

2051 2100
NHX1 (2051) GATGGTGCCTCACCAAGGCCTAAGAGCCAGGAGGACCTTCTGATAATGGT
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (2051)

2101 2150
NHX1 (2101) TCGGGATGATTGGTTTGTCTGTCAGGATGAACCCTAGTGAGTGACACAG
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (2101)

2151 2200
NHX1 (2151) GGTGATGTGCTCCGACAACTGTAAATTTTGTAGATTAACAGCCCCATTT
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (2151)

2201 2250
NHX1 (2201) GTACCTGTCTACCATCTTTAGTTGGCGGGTGTCTTTCTTAGTTGCCACC
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (2201)

2251 2300
NHX1 (2251) CTGCATGTAAAATGAAATTCTCCGCCAAAATAGATTTGTGTGTATAATAA
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (2251)

2301 2313
NHX1 (2301) TTTTGCTGGTTG
NHX1_F lastest_Edit (345) -----
Consensus (2301)

```

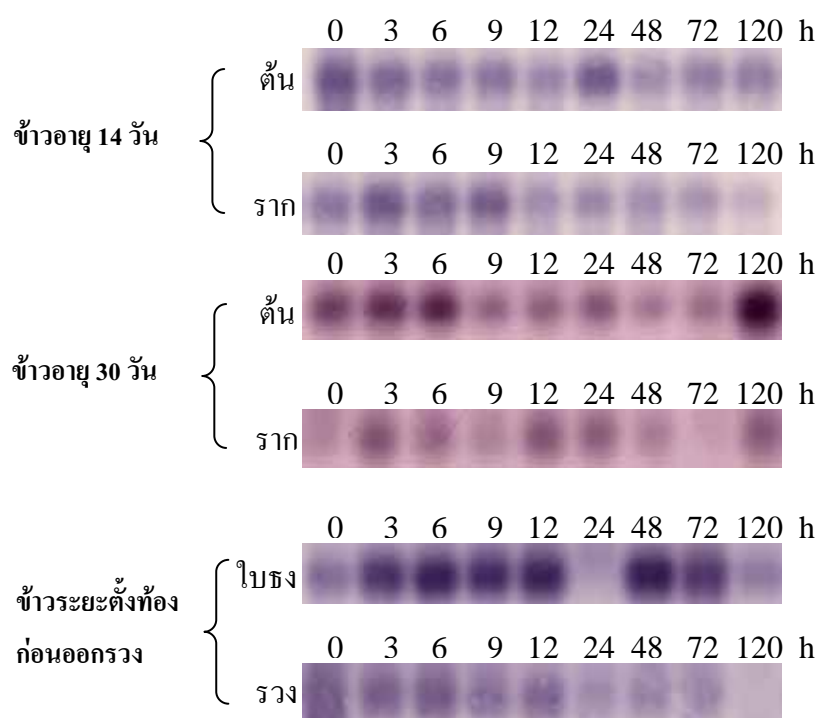
ภาพที่ 14 Nucleotide sequences alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OsNHX1* และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ที่ต้องการใช้เป็นยีนติดตาม *OsNHX1*

จากการทำ nucleotide sequences alignment จะเห็นได้ว่า PCR product ของทั้งยีน *OsMST3* และ *OsNHX1* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองที่จะใช้เป็นยีนติดตาม

4. วิเคราะห์การแสดงออกของยีน *OsSUT1*, *OsMST3* และ *OsNHX1* ในข้าวตัวอย่างที่ระยะต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl โดยวิธี Semi – Quantitative RT-PCR

4.1 การตรวจสอบปริมาณ cDNA เริ่มต้นของข้าวที่ระยะต่างๆ

เพื่อตรวจสอบปริมาณ cDNA ของข้าวที่ใช้ในการติดตามการแสดงออกของยีนซึ่งเตรียมจาก total RNA เริ่มต้นว่ามีความเท่ากัน จึงวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลา (constitutive expression) ก่อน ซึ่งในการทดลองนี้ได้วิเคราะห์การแสดงออกของยีน 18s rRNA โดยนำ cDNA ที่สังเคราะห์โดยวิธี RT-PCR ของข้าวที่ระยะต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl มาเป็นแม่แบบในการทำ PCR และใช้คู่ primer ที่จำเพาะกับยีน และใช้จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา 28 รอบ ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 15 ซึ่งให้ทราบถึงปริมาณ RNA ที่เท่ากันในตัวอย่างส่วนใหญ่ และสามารถนำไปใช้เป็นแม่แบบในการวิเคราะห์ถึงระดับการแสดงออกของยีน *OsSUT1*, *OsMST3* และ *OsNHX1* ที่ระยะต่างๆ ของข้าวภายใต้สภาวะดังกล่าว



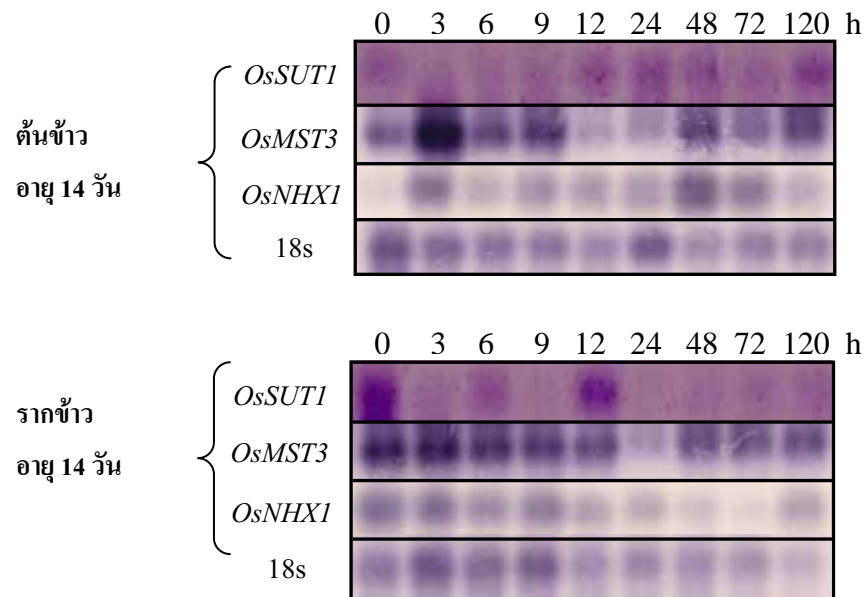
ภาพที่ 15 Southern blot hybridization ของการแสดงออกยีน 18s rRNA ของข้าวระยะต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ โดยแต่ละ Lane คือระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างหลังการทดสอบด้วยสารละลายเกลือ NaCl ที่ 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ

4.2 การแสดงออกของยีน *OsSUT1*, *OsMST3* และ *OsNHX1* ในข้าวที่ระยะต่างๆภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl

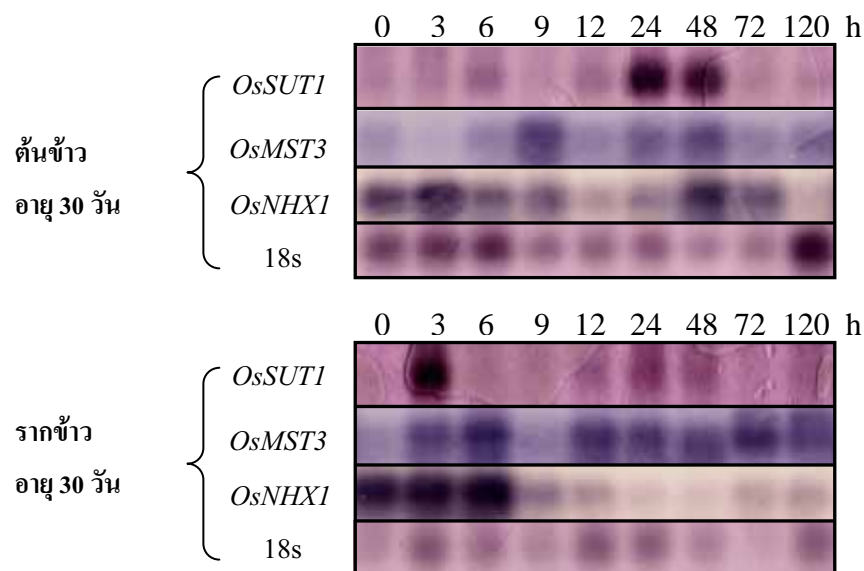
จากการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *OsSUT1*, *OsMST3* และ *OsNHX1* ในข้าว Indica พันธุ์ KDML105 ที่ระยะต่างๆภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 16-18 โดยพบระดับการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของยีน *OsNHX1* ทั้งในส่วนของ source และ sink organs ที่ได้รับสารละลายเกลือ NaCl เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวที่ไม่ได้รับสารละลายเกลือและพบแนวโน้มการแสดงออกของยีนที่สูงในช่วงแรกของการให้สารละลายเกลือในส่วนของ sink organs (รากอายุ 14 และ 30 วันและรวงของข้าวระยะตั้งท้องก่อนออกรวง) จากนั้นจึงค่อยลดระดับลงมาแล้วไปแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นในส่วนของ source organs (ต้นอายุ 14 และ 30 วันและใบธงของต้นข้าวระยะตั้งท้องก่อนออกรวง) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fukuda และคณะ (1999) ที่พบการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของยีน *OsNHX1* ทั้งในส่วนต้นและรากของข้าว Japonica พันธุ์ Nipponbare อายุ 7 วันที่ได้รับสารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ โดยการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นในช่วงแรกของการให้สารละลายเกลือบ่งชี้ถึงความพยายามของเซลล์ทั้งในส่วนของ source และ sink organs ที่จะลดระดับความเป็นพิษของ Na^+ โดยผ่านกลไกการทำงานของ Na^+/H^+ antiporter ต่างๆ ซึ่งจะมีทั้งที่ทำหน้าที่ในการขับ Na^+ ออกจากเซลล์หรือจำกัดการสะสม Na^+ โดยการดึงเอา Na^+ ที่อยู่ในส่วนของไซโตซอล (cytosol) ไปเก็บไว้ในแวคิวโอล (vacuole) ขึ้นอยู่กับชนิดของ Na^+/H^+ antiporter ซึ่งพืชส่วนใหญ่จะไวต่อความเค็มแม้จะมีค่า $EC_e < 3.0 \text{ dS m}^{-1}$ หรือมีค่า osmotic potential น้อยกว่า -0.117 MPa (ตารางที่ 1) ก็ตามและที่ความเค็มระดับนี้พืชจะตอบสนองต่อความเป็นพิษของประจุ (ion toxicity) มากกว่าความเครียดที่เกิดจากแรงดันออสโมติก (osmotic stress) ซึ่งความเป็นพิษของประจุนั้นเกิดจากการแทนที่ประจุของ K^+ ด้วย Na^+ ในปฏิกิริยาชีวเคมีและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและสูญเสียหน้าที่ของโปรตีนบางชนิดเนื่องจากประจุ Na^+ และ Cl^- เข้าไปล้อมรอบและไปรบกวนด้วยการเกิดปฏิสัมพันธ์แบบนอนโควาเลนต์ (noncovalent interaction) กับกรดอะมิโนเหล่านี้ (Chinnusamy และคณะ 2005) และโดยปกติแล้วเซลล์พืชสามารถตรวจจับ (sensor) สัญญาณปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นของ Na^+ ที่ผิวของ plasma membrane ได้โดยผ่านการทำงานของ transmembrane protein หรือตรวจจับสัญญาณที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ด้วย Na^+ sensitive enzymes ซึ่งโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น salt stress sensor ก็คือ plasma membrane Na^+/H^+ antiporter SOS1 (Salt Overly Sensitive 1) ทั้งนี้ก็เพราะว่า โปรตีนดังกล่าวมีส่วนของ long cytoplasmic tail ที่อาจทำหน้าที่เป็น Na^+ sensor นอกจากนี้โปรตีนดังกล่าวยังทำหน้าที่ลำเลียง Na^+ ออกจากเซลล์ (sodium efflux) เพื่อรักษาสัดส่วนของ K^+ และ Na^+ ใน cytosol ให้สมดุล (K^+/Na^+ balance) ดังแสดงในภาพ

ที่ 4 ซึ่งการควบคุมการนำเข้า K^+ และ/หรือป้องกันการผ่านเข้ามาของ Na^+ , การลำเลียง Na^+ ออกจากเซลล์ และการใช้ประโยชน์ของ Na^+ เพื่อปรับสมดุลออสโมติกล้วนเป็นกลไกพื้นฐานที่พืชใช้เพื่อคงระดับของ K^+/Na^+ ratio ในไซโตพลาสซึมให้เป็นไปตามที่ต้องการได้ (Zhu 2003)

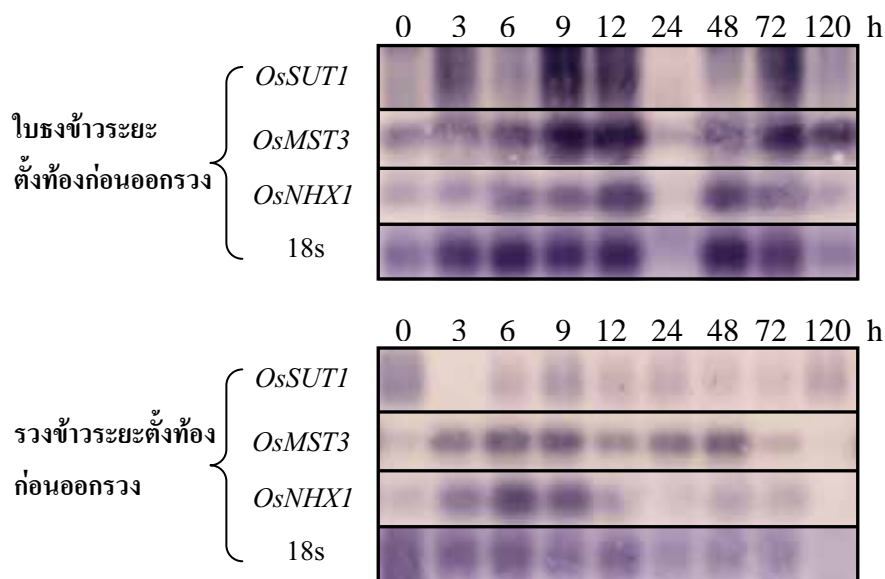
สำหรับการแสดงออกที่สูงในระยะแรกภายหลังจากการให้สารละลายเกลือของยีน *OsNHX1* ในส่วนของรากและลดระดับลงในเวลาต่อมา จากนั้นจึงปรากฏให้เห็นการแสดงออกของยีน *OsNHX1* ที่เพิ่มขึ้นในส่วนของต้น แสดงให้เห็นถึงการตอบสนองที่เกิดในเซลล์ของราก ซึ่งเป็นส่วนที่สัมผัสกับสารละลายเกลือโดยตรงก่อน จากนั้นจึงมีการลำเลียง Na^+ จากเซลล์ของรากไปยังเซลล์ในส่วนของ source organs ทำให้เห็นการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของยีน *OsNHX1* ในเวลาต่อมาที่น่าสังเกตก็คือ ส่วนของรวงซึ่งจัดเป็น sink organ แม้จะไม่ได้สัมผัสกับสารละลายเกลือโดยตรงแต่ก็มีการแสดงออกของยีน *OsNHX1* ที่สูงในช่วงแรกเช่นเดียวกับราก ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่รายงานว่า เมื่อพืชอยู่ภายใต้ความเค็ม จะมีการลดความเป็นพิษของ Na^+ เพื่อรักษา K^+/Na^+ ratio ในไซโตพลาสซึมให้สูงโดยการลำเลียง Na^+ ออกจากเซลล์รากต่อไปยังส่วนของต้น (Na^+ efflux) แบบ long distance ด้วยการทำงานของ plasma membrane Na^+/H^+ antiporter SOS1 โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเนื้อเยื่อเจริญของเซลล์ปลายรากและปลายยอดที่กำลังเจริญเติบโตจะมีขนาดของ vacuole ที่มีขนาดไม่ใหญ่พอที่จะกักเก็บ Na^+ (sodium compartmentation) ไว้จึงเลือกที่จะลำเลียง Na^+ ออกจากเซลล์มากกว่า ในขณะที่ *OsNHX1* ซึ่งเป็น tonoplast Na^+/H^+ antiporter จะทำหน้าที่ป้องกันการสะสมระดับความเป็นพิษของ Na^+ ใน cytosol โดยการลำเลียงไปเก็บไว้ในส่วนของ vacuole (Na^+ compartmentation) (Chinnusamy และคณะ 2005)



ภาพที่ 16 Southern blot hybridization ของการแสดงออกยีน *OsSUT1*, *OsMST3* และ *OsNHX1* ของข้าวอายุ 14 วันภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ โดยแต่ละ Lane คือ ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างหลังการทดสอบด้วยสารละลายเกลือ NaCl ที่ 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ



ภาพที่ 17 Southern blot hybridization ของการแสดงออกยีน *OsSUT1*, *OsMST3* และ *OsNHX1* ของข้าวอายุ 30 วันภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ โดยแต่ละ Lane คือ ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างหลังการทดสอบด้วยสารละลายเกลือ NaCl ที่ 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ



ภาพที่ 18 Southern blot hybridization ของการแสดงออกยีน *OsSUT1*, *OsMST3* และ *OsNHX1* ของข้าวระยะตั้งท้องก่อนออกรวงภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ โดยแต่ละ Lane คือ ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างหลังการทดสอบด้วยสารละลายเกลือ NaCl ที่ 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ

สำหรับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงน้ำตาลนั้นพบว่า ยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (*OsMST3*) มีระดับการ transcription ที่สูงขึ้นทั้งในส่วนของ source และ sink organs เมื่ออยู่ภายใต้ภาวะเครียดที่มีสารละลายเกลือ (ภาพที่ 16-18) โดยในภาวะปกติจะตรวจพบการ transcription ของยีน *OsMST3* ในส่วนของแผ่นใบ (leaf blade) กาบใบ (leaf sheath) แคลลัส (callus) และราก (root) ของข้าว และพบมากเป็นพิเศษที่ท่อลำเลียงน้ำ (xylem) และเซลล์สเคลอเรนไคมา (sclerenchyma cells) ที่อยู่ในราก ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความเกี่ยวข้องของยีนดังกล่าวนี้ที่มีต่อการสะสม monosaccharides เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ (cell wall) ให้หนาขึ้น (Toyofuku และคณะ 2000) อาจมีความเป็นไปได้ว่า เมื่อเซลล์ของรากข้าวบางส่วนถูกทำลายจากภาวะความเป็นพิษของ Na^+ ทำให้ต้องการพลังงานสูงขึ้นเพื่อนำไปซ่อมแซมเซลล์ที่ถูกทำลาย ดังนั้น จึงมีการลำเลียงน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมากขึ้น ทำให้เห็นการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีน *OsMST3* ในส่วนของราก ซึ่งเป็น sink organ สำหรับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเมื่อได้รับอิทธิพลจากภาวะเครียดจากเกลือนั้นยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน เท่าที่มีรายงานไว้ก็มีแต่การศึกษาการแสดงออกของยีน *AtSTP4* ซึ่งเป็นยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของ *Arabidopsis* เมื่อได้รับภาวะเครียดจากการเกิดบาดแผล (wounding) สารกระตุ้น

(elicitors) และการเข้าบุกรุกของเชื้อรา (fungal attacks) ที่ได้แสดงให้เห็นว่า ยีนดังกล่าวจะมีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อได้รับผลกระทบจากปัจจัยต่างๆ ดังกล่าว ซึ่งกระตุ้นให้มีการลำเลียงเอาน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเข้ามายังเซลล์ของ sink organs (root tips และ anthers) เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการคาร์โบไฮเดรตของเซลล์ที่เพิ่มสูงขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ก่อให้เกิดความเครียด (Truenit และคณะ 1996) จากที่กล่าวมา จึงมีแนวโน้มที่เป็นไปได้ว่า เมื่ออยู่ภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็ม ยีน *OsMST3* จะมีบทบาทที่คล้ายกับยีน *AtSTP4* ของ *Arabidopsis* คือ ช่วยในการลำเลียงน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเข้ามาเพิ่มขึ้นเพื่อเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ที่ถูกทำลาย นอกเหนือจากบทบาทดังกล่าวนี้แล้ว การแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของยีน *OsMST3* ทั้งในส่วนของ source และ sink organs เมื่ออยู่ภายใต้ภาวะเครียดที่มีสารละลายเกลือที่เข้มข้นอาจอธิบายได้ดังนี้คือ ยีน *OsMST3* จะลำเลียงน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเข้ามาเพื่อทำหน้าที่รักษาสมดุลออสโมติกภายในเซลล์และดักจับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการที่เซลล์ถูกทำลาย (oxidative damage) โดยมีรายงานว่า พืชหลายชนิดมีการสะสมของคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาล (กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส ฟรุคแตน) และแป้งเมื่ออยู่ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ โดยเฉพาะการสะสมของน้ำตาลรูปที่ละลายน้ำได้ (soluble sugars) ซึ่งมีบทบาทในแง่ของการปกป้องและรักษาสมดุลออสโมติก เป็นแหล่งสะสมสารจำพวกคาร์บอน (carbon storage) และดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) (Parvaiz และ Satyawati 2008) และยิ่งไปกว่านั้นก็คือ การสะสมของ polyols หลายชนิด เช่น *myo*-inositol, ononitol, pinitol, sorbitol, mannitol, erythritol และ glycerol ที่ทำหน้าที่เป็นสาร osmoprotectants ในเซลล์พืชเมื่ออยู่ภายใต้ภาวะเครียดจากภาวะเครียดจากความเค็มนั้น ล้วนใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ทั้งสิ้น (Maksup 2007) จากที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้น จึงให้เห็นว่า เมื่อข้าวอยู่ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ ยีน *OsMST3* จะทำหน้าที่ลำเลียงน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเข้ามาเพื่อช่วยแซมแซมเซลล์ที่ถูกทำลายและเป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์สารจำพวก polyols เพื่อรักษาสมดุลออสโมติกภายในเซลล์

ส่วนการแสดงออกของยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลซูโครส (*OsSUT1*) นั้นพบว่า มีระดับการแสดงออกที่ค่อนข้างคงที่ทั้งในส่วนของ source และ sink organs เมื่ออยู่ภายใต้ภาวะเครียดที่มีสารละลายเกลือ (ภาพที่ 16-18) สำหรับในภาวะปกตินั้น จะพบการแสดงออกของยีน *OsSUT1* ใน source organs ของข้าว เช่น แผ่นใบ (leaf blade) กาบใบ (leaf sheath) และเมล็ดที่กำลังงอก (germinating seed) ในขณะที่การแสดงออกของยีนในบางส่วนของ sink organs เช่น รวงข้าวก่อนแทงช่อ (panicles before heading) และรากนั้นค่อนข้างน้อยหรือแทบไม่พบการแสดงออก และยีนดังกล่าวนี้ยังมีบทบาทสำคัญต่อการลำเลียงน้ำตาลซูโครสผ่านระบบท่อลำเลียงอาหาร (phloem loading of sucrose) ซึ่งสำคัญต่อการลำเลียงน้ำตาลซูโครสแบบ long distance (Hirose และคณะ

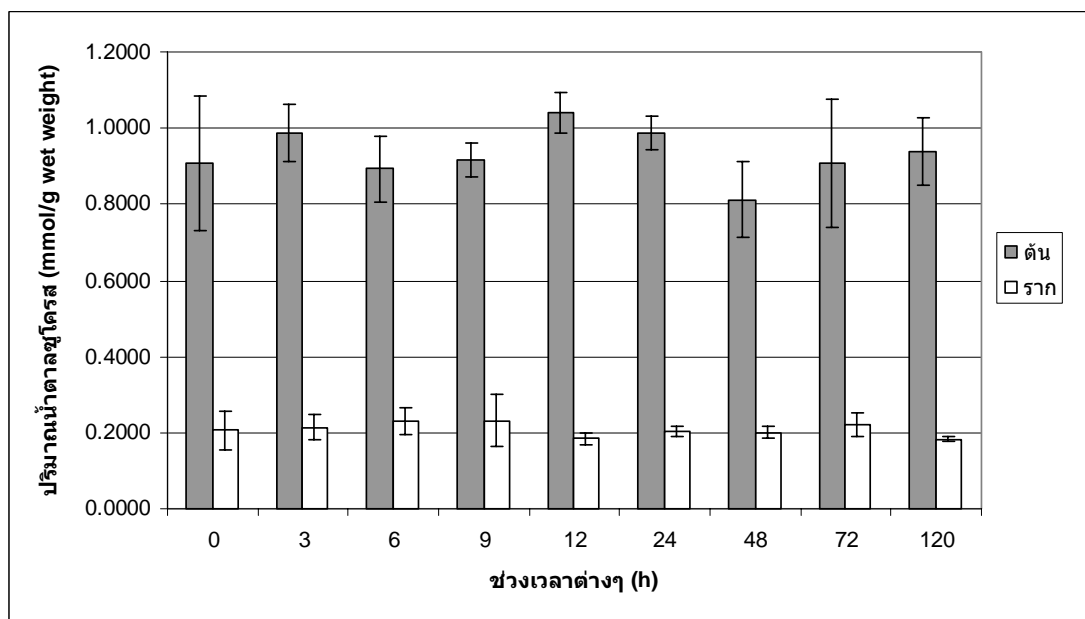
1997) จากผลการทดลองที่ได้ อาจแสดงให้เห็นถึงความพยายามของเซลล์ในการที่จะรักษาระดับของน้ำตาลซูโครสภายในเซลล์ไว้เพื่อเป็นแหล่งพลังงานสำรองและนำออกมาใช้ก็ต่อเมื่อน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งพลังงานหลัก (กลูโคส) เริ่มหมดลง ซึ่งจะเห็นได้จากการแสดงออกของยีนที่สูงขึ้นในบางช่วงเพื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครส จากนั้นน้ำตาลดังกล่าวนี้จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เตส (invertase) ต่อไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสเพื่อเป็นแหล่งพลังงานให้เพียงพอต่อเซลล์พืชที่ถูกทำลายต่อไป นอกจากนี้ยังอาจมีความเป็นไปได้ว่า การแสดงออกที่ค่อนข้างคงที่ของยีนดังกล่าวอาจเนื่องมาจากการที่เซลล์พืชจะมีอัตราการสังเคราะห์แสงลดลงเมื่ออยู่ภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็มทำให้ได้ผลิตภัณฑ์หลักคือ กลูโคสน้อยลง ส่งผลให้การสังเคราะห์ซูโครสเพื่อลำเลียงไปเก็บยังส่วนต่างๆ นั้นน้อยลงด้วย ดังนั้นการแสดงออกของยีนดังกล่าวจึงค่อนข้างคงที่หรือน้อยลง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การคงระดับของน้ำตาลซูโครสในเซลล์ของ celery เมื่อได้รับสารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์นาน 4 สัปดาห์มีผลไปกวดการแสดงออกของเอนไซม์ mannitol dehydrogenase เพื่อไม่ให้ไปมีผลกระทบต่อระดับน้ำตาลแมนนิทอลที่ทำหน้าที่เป็น osmoprotectant และจากการศึกษาการแสดงออกของยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลซูโครสใน celery (*AgSUT1*) เมื่อได้รับเกลือ NaCl ก็พบว่า *AgSUT1* มีระดับการแสดงออกที่ลดลงในทุกส่วนของอวัยวะ โดยเฉพาะในส่วนของราก (Noiraud และคณะ 2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานการสะสมของน้ำตาลอัลทอสอลล์หลักๆ คือ แมนนิทอล และ ซอร์บิทอลในข้าวไทยบางสายพันธุ์ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับภาวะเครียดที่มีเกลือโดย Maksup (2007) ซึ่งเป็นการเข้าถึงกลไกในการตอบสนองของเซลล์พืชไม่ว่าจะเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ (celery) หรือใบเลี้ยงเดี่ยว (ข้าว) ที่ตอบสนองต่อภาวะเครียดของเซลล์ โดยการสะสมและลำเลียงน้ำตาลอัลทอสอลล์ไปยังเซลล์ต่างๆ เพื่อรักษาค่าออสโมซิสภายในเซลล์ให้สมดุลก่อน จากนั้น transporters ตัวอื่นๆ จึงเริ่มทำงาน ดังที่ปรากฏในผลที่ได้จากงานวิจัยนี้

5. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลในข้าวที่ระยะต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl

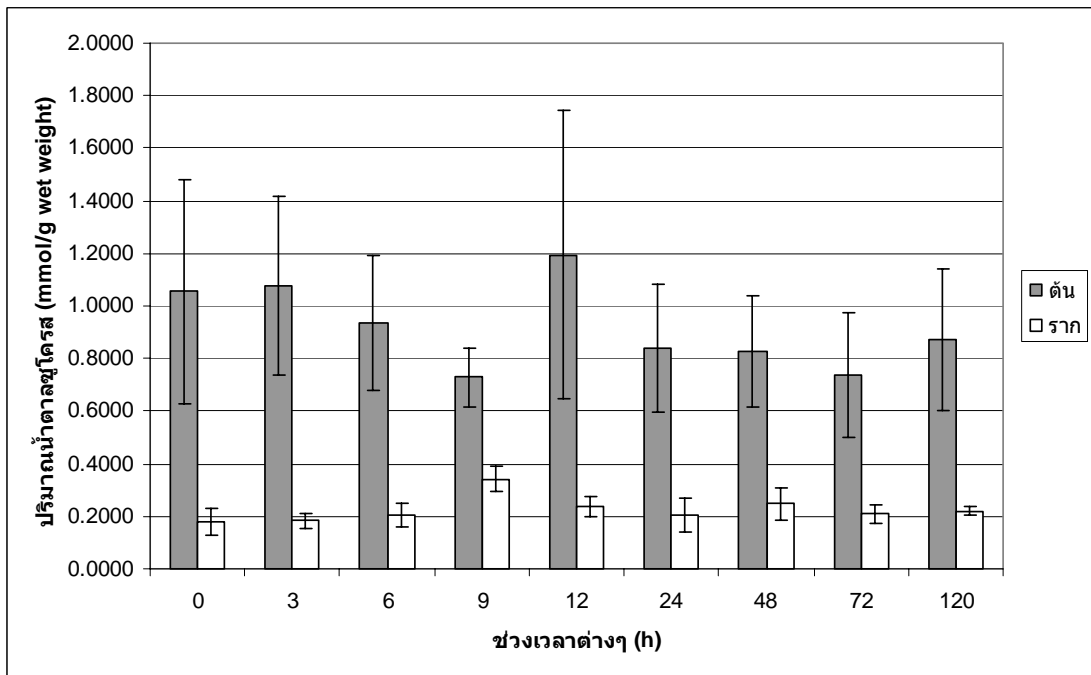
5.1 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลซูโครสในข้าวที่ระยะต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl

จากการวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสในช่วงเวลาต่างๆ พบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสที่วัดได้ในต้นและรากข้าวอายุ 14 วัน ไม่มีความแตกต่างของปริมาณน้ำตาลในช่วงเวลาต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 19 สอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *OsSUT1* ซึ่งได้อธิบายถึงการรักษาระดับน้ำตาลซูโครสภายในเซลล์ไว้เช่นเดียวกับที่ปรากฏในงานวิจัยของ Noiraud และคณะ 2000 เกี่ยวกับกลไกในการต่อต้านความเป็นพิษจาก NaCl ซึ่งได้กล่าวถึงการที่น้ำตาลซูโครสไปมีผลในการกวดการทำงานของ mannitol catabolism เพื่อให้เกิดการสะสมของน้ำตาลแมนนิทอลจากกระบวนการ

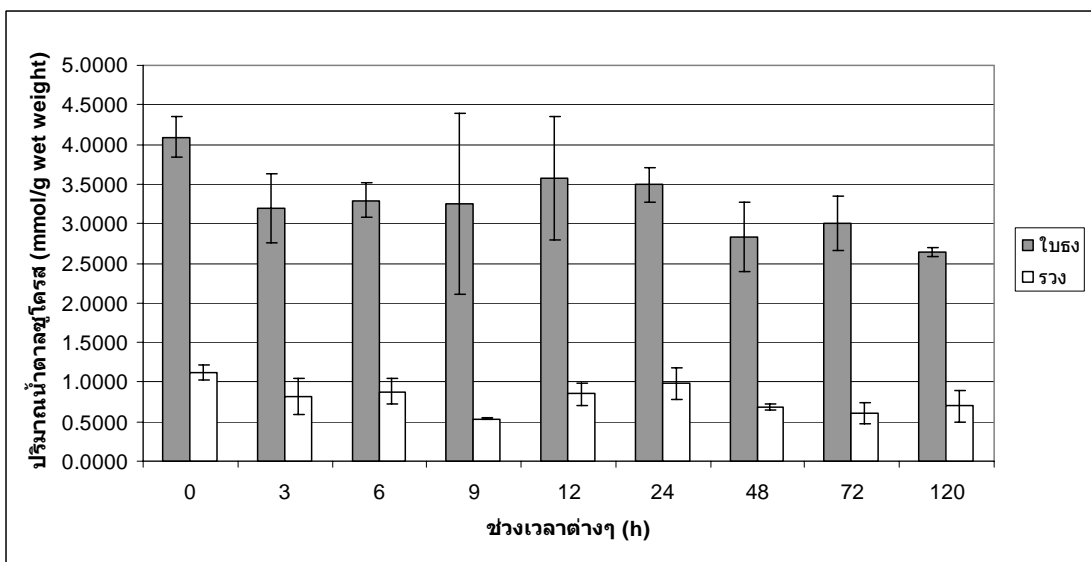
mannitol synthesis ผลลัพธ์เช่นเดียวกับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่วัดได้ในต้น และรากอายุ 30 วัน แสดงดังภาพที่ 20 แต่ในชั่วระยะเวลาตั้งท้องก่อนออกรวงนั้นปริมาณน้ำตาลซูโครสที่วัดได้กลับมีแนวโน้มที่ลดลง สามารถอธิบายได้ว่า ที่ระยะตั้งท้องก่อนออกรวงนั้นมีระดับของการใช้พลังงานที่สูงกว่าระยะอื่นๆ ด้วยอวัยวะที่เจริญพัฒนา และความต้องการพลังงานที่มากกว่า ในการสะสมเตรียมพร้อมสำหรับการสร้างเมล็ด ร่วมด้วยกับกลไกในการต้านความเป็นพิษจาก Na^+ จึงทำให้การทำงานของยีน *OsSUT1* ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายน้ำตาลซูโครสในอวัยวะต่างๆ ลดลงอย่างเห็นได้ชัดในใบธง ดังงานวิจัยของ Noiraud และคณะ (2000) ที่ทดลองใน celery ได้กล่าวว่าการสังเคราะห์น้ำตาลแมนนิทอลและน้ำตาลซูโครสจะเกิดขึ้นที่ส่วนใบของพืช จากนั้นจึงมีการขนส่งไปยัง sink organs ด้วยความพยายามในการรักษากระบวนการ mannitol synthesis ให้คงไว้จึงจำเป็นต้องอาศัยน้ำตาลซูโครสดังสาเหตุที่ได้กล่าวข้างต้น อาจส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีน *OsSUT1* ที่ลดลงในเวลาต่อมา ดังภาพที่ 21



ภาพที่ 19 ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่วัดได้ในข้าวอายุ 14 วัน ที่ช่วงเวลาต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์



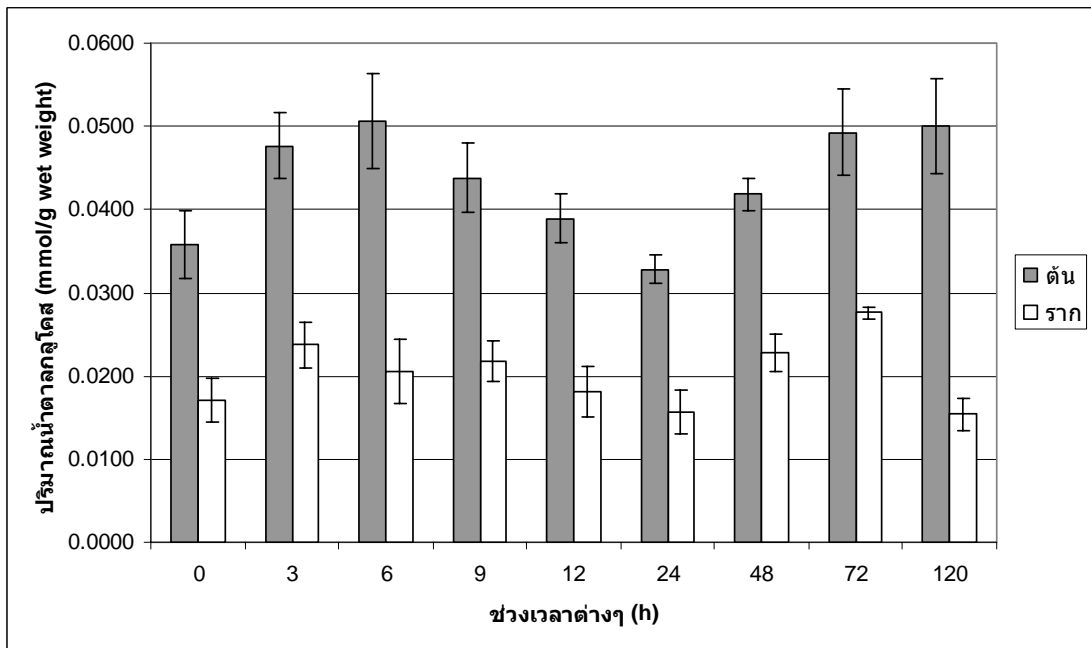
ภาพที่ 20 ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่วัดได้ในข้าวอายุ 30 วัน ที่ช่วงเวลาต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์



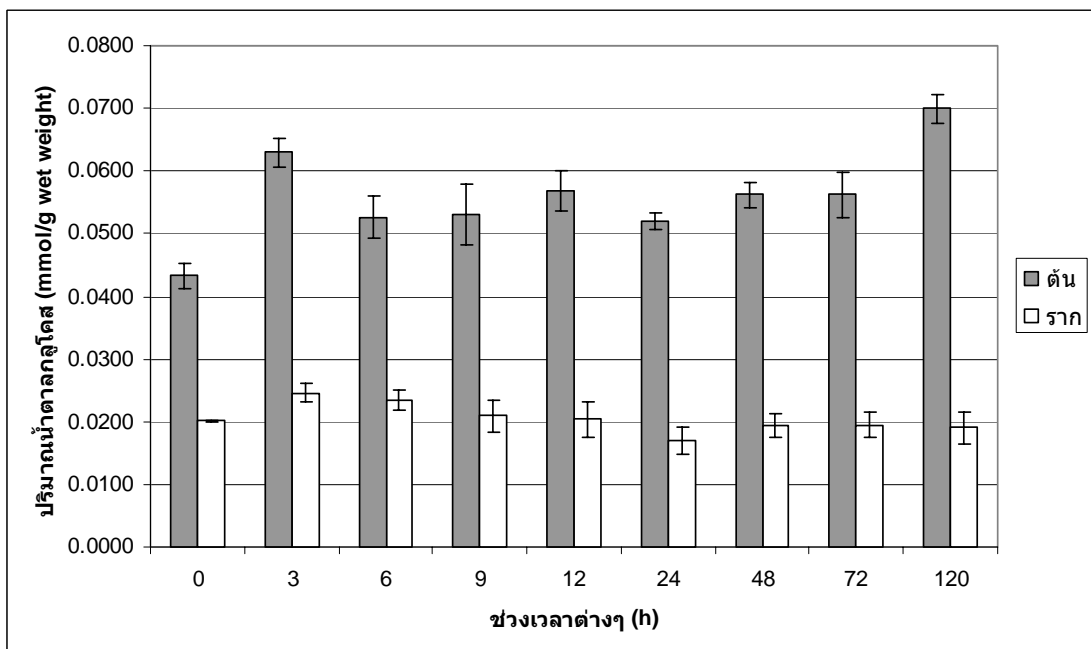
ภาพที่ 21 ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่วัดได้ในข้าวระยะตั้งท้องก่อนออกรวงที่ช่วงเวลาต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคส ในข้าวที่ระยะต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl

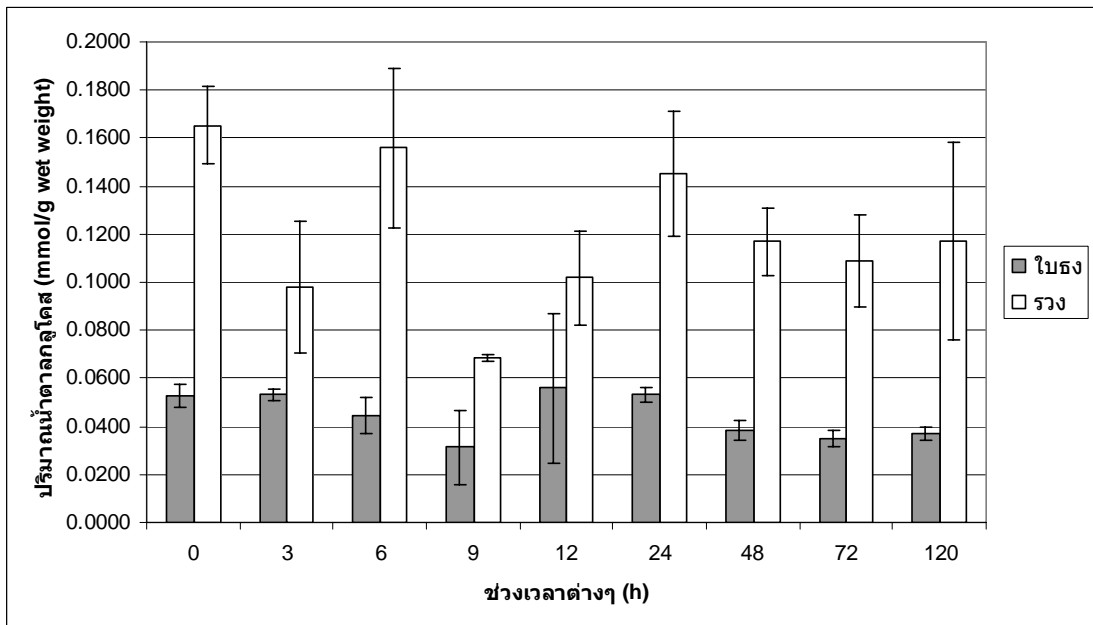
การวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสในข้าวพบว่า ที่อายุ 14 วัน มีการเพิ่มขึ้น และลดลง ในช่วงวันแรกของการให้สารละลายเกลือ จากนั้นจะมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นในเวลาต่อมาทั้งในส่วน ของต้นและราก ดังภาพที่ 22 อาจด้วยสาเหตุที่พืชในระยะนี้มีความไวต่อความเป็นพิษของเกลือที่ มากเป็นพิเศษ เมื่ออยู่ในสภาวะเครียดต่อเกลือจึงต้องการน้ำตาลกลูโคสสูง เพื่อนำมาเป็นแหล่ง พลังงานหลักในการซ่อมแซมเซลล์ที่ถูกทำลาย ขณะเดียวกันเซลล์พืชจะมีกลไกในการรักษาสมดุล ออสโมติกภายในเซลล์ด้วยการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสบางส่วนให้ไปอยู่ในรูปของน้ำตาลแมนนิทอล เพื่อทำหน้าที่เป็น osmoprotectants และ radical scavenger ทำให้ระดับของน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้ใน ช่วงแรกมีปริมาณที่ลดลง สำหรับการสังเคราะห์น้ำตาลแมนนิทอลนั้นจะอาศัยกลูโคสหรือฟรุกโตส เป็นสารตั้งต้น โดยกลูโคสจะถูกเปลี่ยนไปเป็น glucose-6-phosphate (G-6-P) ก่อน แล้วจึงอาศัย เอนไซม์ glucose-6-phosphate isomerase (G6P isomerase) ต่อไปเป็น fructose-6-phosphate (F-6-P) และถูกเปลี่ยนต่อไปด้วยเอนไซม์ manose-6-phosphate reductase (M6PR) และ phosphatase (Pase) ทำให้ได้น้ำตาลแมนนิทอลในที่สุด ส่วนฟรุกโตสจะเปลี่ยนเป็น Fructose-6-phosphate (F-6-P) โดย อาศัย hexokinase และค่อยเข้าสู่ขบวนการสังเคราะห์น้ำตาลแมนนิทอล (อ้างอิงโดย Maksup 2007) จากนั้นจะมีการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสเพื่อใช้ใน กระบวนการดังกล่าวทำให้สามารถวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้นได้ในเวลาต่อมา ส่วนระดับ น้ำตาลกลูโคสในส่วน of ต้นและรากข้าวอายุ 30 วันจะสูงขึ้นเล็กน้อยในช่วงแรกเมื่อ ได้รับ สารละลายเกลือ NaCl และจะลดลงมาในระดับที่ค่อนข้างคงที่ในเวลาต่อมา ซึ่งก็อาจอธิบายได้ คล้ายๆ กับการตอบสนองของต้นข้าวอายุ 14 วันต่อภาวะเครียดจากเกลือ อย่างไรก็ตามในระยะตั้ง ท้องก่อนออกรวงจะมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ค่อนข้างคงที่ทั้งในส่วน of ใบธงและรวง ดังภาพที่ 23-24 ซึ่งไม่ค่อยสอดคล้องกับผลการแสดงออกของยีน *OsMST3* ที่มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น ในส่วน of รวง ดังนั้น การทดลองในระยะนี้อาจต้องมีการทำซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลองอีกครั้ง



ภาพที่ 22 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้ในข้าวอายุ 14 วัน ที่ช่วงเวลาต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 23 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้ในข้าวอายุ 30 วัน ที่ช่วงเวลาต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์



ภาพที่ 24 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้ในข้าวระยะตั้งท้องก่อนออกรวงที่ช่วงเวลาต่างๆ ภายใต้สภาวะที่มีการให้สารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. น้ำตาลซูโครสไม่ได้มีบทบาทหลักในกลไกการต้านทานความเป็นพิษของเกลือ แต่มีส่วนช่วยในทางอ้อม คือเป็นแหล่งพลังงานคาร์บอนให้กับเซลล์ที่ต้องการพลังงานเป็นพิเศษ เช่น บริเวณที่มีการบาดเจ็บจากความเป็นพิษของเกลือ โดยพืชจะมีกลไกในการคงระดับของน้ำตาลซูโครสในเซลล์ไว้ให้คงที่ทั้งใน source และ sink organs แม้จะมีน้ำตาลบางส่วนที่เปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์รูปอื่นก็ตาม
2. น้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เป็นแหล่งพลังงานสำคัญของเซลล์ จึงมีการแสดงออกของยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (*OsMST3*) ที่สูงกว่ายีนเคลื่อนย้ายน้ำตาลโมเลกุลคู่ (*OsSUT1*) ในส่วนของ source และ sink organs เมื่ออยู่ได้สภาวะเครียดต่อเกลือ เนื่องจากที่สภาวะดังกล่าวเซลล์ต้องการพลังงานที่สูงเพิ่มมากขึ้นเพื่อนำไปใช้ในการแบ่งเซลล์ชดเชยในส่วนที่ถูกทำลายจากความเป็นพิษของอิออนเกลือต่าง ๆ โดยเฉพาะส่วนที่สัมผัสกับสารละลาย NaCl มากที่สุด นอกจากนี้ยังอาจมีการนำเอาน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารจำพวก polyols ที่ทำหน้าที่เป็น osmoprotectants ในเซลล์ที่อยู่ภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็ม
3. Na^+/H^+ exchanger เป็นหนึ่งในกลไกสำคัญของพืชในการต้านทานความเป็นพิษของอิออนเกลือ โดยการนำเอาอิออน Na^+ ไปเก็บไว้ในแวคคิวโอลเพื่อลดความเป็นพิษในไซโตพลาสซึม โดยมีการแสดงออกใน sink มากกว่าที่ source organs ในช่วงแรกเนื่องจากเป็นส่วนที่สัมผัสโดยตรงกับเกลือ NaCl จากนั้นอิออน Na^+ จึงถูกเคลื่อนย้ายจาก sink ไปยัง source organs ในภายหลังทำให้มีการแสดงออกของยีน *OsNHX1* ใน source มากกว่า sink organs ในช่วงท้ายของการทดสอบด้วยเกลือ NaCl
4. ภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็ม ข้าวในระยะต่างๆ ที่ไวต่อภาวะดังกล่าวจะสร้างกลไกในการป้องกันตนเองโดยมีการขับ Na^+ ออกจากเซลล์และจำกัดปริมาณของ Na^+ ในเซลล์เพื่อรักษาสมดุลออสโมติกภายในเซลล์และมีการนำน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมาใช้เป็นแหล่งพลังงานหลักเพื่อซ่อมแซมเซลล์ที่ถูกทำลายและใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์สารที่ทำหน้าที่เป็น osmoprotectants ในขณะที่น้ำตาลซูโครสจะมีการรักษาระดับเอาไว้และถูกนำมาใช้เมื่อมีความต้องการใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพิ่มมากขึ้นในเวลา

บรรณานุกรม

- กรมการข้าวกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. องค์ความรู้เรื่องข้าว [Online]. Accessed 29 June 2550.
Available from http://www.ricethailand.go.th/rkb/data_004/rice_xx2-04_manage_002-2.html
- _____. ชาวดอกมะลิ 105 (Khao Dawk Mali 105) [Online]. Accessed 3 September 2552.
Available from <http://www.ricethailand.go.th/brrd/tech/KDM105.htm>
- กรมวิชาการเกษตร. ปัญหาข้าวในพื้นที่ดินเค็ม [Online]. Accessed 29 June 2550. Available from
<http://www.doa.go.th/rri/PTTwebsite/stress1.html>
- มูลนิธิข้าวขวัญ. จากต้นข้าวมาเป็นเมล็ด [Online]. Accessed 5 September 2552. Available from
<http://gotoknow.org/blog/ngos/13662>
- ตุลาพร แก้วแก่น และวัฒนา พัฒนากุล. 2549. ผลของสภาวะขาดน้ำจากความแล้งและความเครียด
เกลือต่อลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการและเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในข้าว
ระยะต้นกล้า. *วารสารวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น* 11 (4): 260-268.
- บุญหงษ์ จงคิด. 2547. ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- Bohnert, H. J. and Sheveleva, E. 1998. Plant Stress Adaptations- Making Metabolism Move.
Plant Biology 1; 267-274.
- Bush, D. R. 1999. Sugar Transporters in Plant Biology. *Plant Biology* 2; 187-191.
- Büttner, M. and Sauer, N. 2000. Monosaccharide Transporters in Plants: Structure, Function and
Physiology. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465; 263-274.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A. and Zhu, J.-K. 2005. Understanding and Improving Salt Tolerance
in Plants. *Crop Science* 45; 437-448.
- Fukuda, A., Nakamura, A. and Tanaka, Y. 1999. Molecular Cloning and Expression of The
Na⁺/H⁺ Exchanger Gene in *Oryza sativa*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1446: 149-
155.
- Hirose, T., Imaizumi, N., Scofield, G. N., Furbank, R. T., and Ohsugi, R. 1997. CDNA Cloning
and Tissue Specific Expression of a Gene for Sucrose Transporter from Rice (*Oryza
sativa* L.). *Plant and Cell Physiology* 38 (12): 1389-1396.

- Kruckeberg, H. and Hata, S. 1996. The Hexose Transporter Family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology* 166; 283-292.
- Kühn, C., Quick, W. P., Schulz, A., Riesmeier, J. W., Sonnewald, U. and Frommer, W. B. 1996. Companion Cell-Specific Inhibition of The Potato Sucrose Transporter SUT1. *Plant Cell and Environment* 19; 1115-1123.
- Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barker, L., Patrick, J. W., Frommer, W. B. and Ward, J. M. 1999. The Dual Function of Sugar Carriers: Transport and Sugar Sensing. *The Plant Cell* 11; 707-726.
- Lemoine, R. 2000. Sucrose Transporters in Plants: Update on Function and Structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465; 246-262.
- Maas, E. V. 1990. Crop Salt Tolerance. *Agricultural Salinity Assessment and Management. ASCE Manuals and Reports on Engineering Practice* 71; 262-304.
- Maathuis, F. J. M., Ichida, A. M., Sanders, D. and Schroeder, J. I. 1997. Roles of Higher Plant K⁺ Channels. *Plant Physiology* 114; 1141-1149.
- Mager, M. D. and Saier, M. H. Jr. 1993. A Major Superfamily of Transmembrane Facilitators that Catalyse Uniport, Symport and Antiport. *Trends in Biochemical Sciences* 1; 13-20.
- Maksup S. 2007. Changes of Sugar Alcohol Content and Related Gene Expression During Early Period of Salt Stress in Thai Rice (*Oryza sativa* L. Spp. *Indica*) Lines. *Master Thesis*, Mahidol University. 83pp.
- Noiraud, N., Delrot, S. and Lemoine, R. 2000. The Sucrose Transporter of Celery. Identification and Expression during Salt Stress. *Plant Physiology* 122; 1447-1455.
- Ouziad, F., Wilde, P., Schmelzer, E., Hildebrandt, U. and Bothe, H. 2006. Analysis of Expression of Aquaporins and Na⁺/H⁺ Transporters in Tomato Colonized by Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Affected by Salt Stress. *Environmental and Experimental Botany* 57; 177-186.
- Parvaiz, A. and Satyawati, S. 2008. Salt stress and Phyto-biochemical Responses of Plants – A Review. *Plant, Soil and Environment* 54 (3): 89-99.
- Pattangul, W. and Madore, M. A. 1999. Water Deficit Effects on Raffinose Family Oligosaccharide Metabolism in Coleus. *Plant Physiology* 121; 987-993.

- Pérez-Alfocea, F. and Larher, F. 1995. Sucrose and Proline Accumulation and Sugar Efflux in Tomato Leaf Discs Affected by NaCl and Polyethylene Glycol 6000 Iso-osmotic Stresses. *Plant Science* 107; 9-15.
- Popova, O. V and Golldack, D. 2007. In the Halotolerant *Lobularia maritima* (Brassicaceae) Salt Adaptation Correlates with Activation of the Vacuolar H⁺-ATPase and the Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiporter. *Plant Physiology* 164 (10): 1278-1288.
- Riesmeier, J. W., Willmitzer, L. and Frommer, W. B. 1994. Evidence for An Essential Role of The Sucrose Transporter in Phloem Loading and Assimilate Partitioning. *The EMBO Journal* 13 (1): 1-7.
- Saier, M. H. Jr., Beatty, J. T., Goffeau, A., Harley, K. T., Heijne, W. H. M., Huang, S. C., Jack, D. L., Jähn, P. S., Lew, K., Liu, J., Pao, S. S., Paulsen, L. T., Tseng, T. T. and Virk, P. S. 1999. The Major Facilitator Superfamily. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 1; 257-279.
- Sauer, N. and Tanner, W. 1989. The Hexose Carrier form *Chlorella* cDNA Cloning of A Eucaryotic H⁺-cotransporter. *FEBS Letters*. 259; 43-46.
- Sherson, S. M., Alford, H. L., Forbes, S. M., Wallace, G. and Smith, S. M. 2003. Roles of Cell-wall Invertases and Monosaccharide Transporters in The Growth and Development of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 54 (382): 525-531.
- Tanaka, Y., Hibino, T., Hayashi, Y., Tanaka, A., Kishitani, S., Takabe, T., Yokota, S. and Takabe, T. 1999. Salt Tolerance of Transgenic Rice Overexpressing Yeast Mitochondrial Mn-SOD in Chloroplasts. *Plant Science* 148; 131-138.
- Toyofuku, K., Kasahara, M., and Yamaguchi, J. 2000. Characterization and Expression of Monosaccharide Transporters (*OsMSTs*) in Rice. *Plant and Cell Physiology* 41 (8): 940-947.
- Truenit, E., Schmid, J., Epple, P., Illig, J. and Sauer, N. 1996. The Sink-Specific and Stress-Regulated *Arabidopsis STP4* Gene: Enhanced Expression of a Gene Encoding a Monosaccharide Transporter by Wounding, Elicitors, and Pathogen Challenge. *The Plant Cell* 8; 2169-2182.
- Williams, L. E., Lemoine, R., and Sauer, N. 2000. Sugar Transporters in Higher Plants-a Diversity of Roles and Complex Regulation. *Trends in Plant Science* 5 (7): 283-290.

- Wu, Y- Y., Chen, Q- J., Chen, M., Chen, J. and Wang, X- C. 2005. Salt- Tolerant Transgenic Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.) Obtained by *Agrobacterium tumefaciens*- Mediated Transformation of Vacuolar Na⁺/ H⁺ Antiporter Gene. *Plant Science* 169; 65-73.
- Zhu, J.-K. 2002. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annu. Rev. Plant Biology* 53; 247-273.
- _____. 2003. Regulation of Ion Homeostasis under Salt Stress. *Plant Biology* 6; 441-445.

ภาคผนวก ก

การเตรียม LB medium (1,000 ml.)

1. ใส่น้ำ bacto-tryptone 10 g/l
2. ใส่น้ำ bacto-yeast extract 5 g/l
3. ใส่น้ำ NaCl 10 g/l
4. ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 ml
5. ปรับ pH 7.5 และนำไป autoclave ที่ความดัน 15 psi, 121°C นาน 15 นาที
6. ในกรณีที่ต้องเติม ampicillin ควรเติมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเท่ากับ 100 µg/ml โดยจากตัวอย่างต้องเติม ampicillin ปริมาตร 100 µl (เมื่อใช้ ampicillin ความเข้มข้นเท่ากับ 100 mg/ml)

สารละลายปุ๋ย WP คัดแปลง

ตารางที่ 2 สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายธาตุอาหารสูตร WP คัดแปลง (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991)

สารเคมี	ปริมาณ (mg/l)
KNO ₃	580
CaSO ₄	500
MgSO ₄ ·7H ₂ O	450
Triple superphosphate	250
(NH ₄) ₂ SO ₄	200
Unilate (FeEDTA 13.2%)	53
MnSO ₄ ·1H ₂ O	15
H ₃ BO ₃	5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.5
KI	1.0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.1
CUSO ₄ ·5H ₂ O	0.05
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.05

การเตรียมสารละลายซูโครสมาตรฐาน (100ml.)

เตรียม stock solution 1 mg/ml

- ชั่งน้ำตาลซูโครส 0.1 g

- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 ml

ตารางที่ 3 การเตรียมสารละลายซูโครสมาตรฐาน ความเข้มข้น 0-1.0 mg/ml

หลอดที่	สารละลายซูโครส (ml)	น้ำกลั่น (ml)	สารละลายซูโครสมาตรฐาน (mg/ml)
1	0	1.00	0
2	0.2	0.8	0.2
3	0.4	0.6	0.4
4	0.6	0.4	0.6
5	0.8	0.8	0.8
6	1.0	0.0	1.0

การเตรียม 1% resorcinol (100 ml)

1. ชั่ง resorcinol 1 g ละลายใน 95% ethanol
2. ปรับปริมาตรด้วย 95% ethanol ให้ได้ 100 ml

การเตรียม 30% HCl (250 ml)

1. ปิเปตกรด HCl เข้มข้น ปริมาตร 75 ml แล้วใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ประมาณ 150 ml (ทำในตู้ควัน)
2. ผสมแล้วเทลงในขวดปริมาตร 250 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 250 ml

การเตรียม 95% ethanol จาก 99.9% ethanol (250 ml)

1. จะใช้ 99.9% ethanol = $\frac{95.0\% \times 250}{99.9\%}$ = 237.74 ml
2. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น 250ml

การเตรียม 80% ethanol จาก 95% ethanol (250 ml)

1. จะใช้ 95% ethanol = $\frac{80.0\% \times 250}{95.0\%}$ = 210.53 ml
2. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น 250ml

การเตรียม Fe-stock (100x) ปริมาตร 1,000 ml.

- FeSO₄·7H₂O 2.785 g/l
- Na₂EDTA·2H₂O 3.735 g/l

การเตรียม Fe (1x) ปริมาตร 1,000 ml.

- เตรียมจาก Fe-stock (100x) โดยเจือจาง 10 เท่า
- Fe-stock (100x) 10 ml
 - ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น 1,000 ml

การเตรียม Extraction bufferประกอบด้วย

- 1 M Tris-HCl pH 8.0
- 0.5 M EDTA pH 8.0
- 5 M NaCl
- CTAB
- β-mercaptoethanol

ขั้นตอนการเตรียม

1. ตวงสารต่าง ๆ ให้ได้ปริมาตรดังต่อไปนี้

- | | |
|-----------------------|---------------|
| - 1 M Tris-HCl pH 8.0 | ปริมาตร 10 ml |
| - 0.5 M EDTA pH 8.0 | ปริมาตร 4 ml |
| - 5 M NaCl | ปริมาตร 28 ml |
| - CTAB | 2 g |
| - β-mercaptoethanol | ปริมาตร 2 ml |

2. ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml โดยใช้ Milli Q water ที่ sterile แล้ว

สารละลาย 1 M Tris-HCl pH 8.0ขั้นตอนการเตรียม

1. ตวง Tris base ปริมาตร 50 ml ผสมกับ 0.1 N NaCl ปริมาตร 29.2 ml
2. ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100 ml ด้วยน้ำ Milli Q ที่ sterile แล้ว และทำการปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 8.0

สารละลาย 0.5 M EDTA pH 8.0ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งสาร EDTA เท่ากับ 18.164 g
2. ละลายในน้ำ Milli Q ที่ sterile แล้วปริมาตร 100 ml และทำการปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 8.0

สารละลาย 5 M NaClขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งสาร NaCl เท่ากับ 29.2 g
2. ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ml
3. นำสารละลายที่เตรียมได้ทำการฆ่าเชื้อโดยการ autoclave ที่ความดัน 15 psi, 121°C นาน 15 นาที

สารละลาย 20% SDS (sodium dodecyl sulfate)ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง SDS 10 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 25 ml
2. ปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml ด้วยน้ำ Milli Q ที่ sterile แล้ว

สารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (24:1)ขั้นตอนการเตรียม

1. ตวง chloroform ปริมาตร 96 ml และ isoamyl alcohol ปริมาตร 4 ml ด้วยกระบอกตวงที่ sterile แล้วใส่ขวดที่ sterile แล้ว
2. ผสมสารละลายให้เข้ากัน

สารละลาย 3 M sodium acetate pH5.6ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งสาร sodium acetate 12.3 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 30 ml
2. ปรับ pH ของสารละลายด้วย glacial acetic acid ให้ pH สุดท้ายเท่ากับ 5.6
3. ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 50 ml ด้วยน้ำกลั่น
4. นำสารละลายที่เตรียมได้ทำการฆ่าเชื้อโดยการ autoclave ที่ความดัน 15 psi, 121°C นาน 15 นาที

การเตรียม 70% ethanol จาก 95 % ethanol (250 ml)ขั้นตอนการเตรียม

$$1. \text{ จะใช้ } 95\% \text{ ethanol} = \frac{70.0\% \times 250}{95.0\%} = 184.21 \text{ ml}$$

2. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น 250ml

สารละลาย 0.4 M NaOHขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งสาร NaOH 0.8 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 30 ml

2. ปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml ด้วยน้ำกลั่น

3. นำสารละลายที่เตรียมได้ทำการฆ่าเชื้อโดยการ autoclave ที่ความดัน 15 psi, 121°C นาน 15 นาที

สารละลาย 0.4 M NaOH/2% SDS (ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง)ขั้นตอนการเตรียม

1. เตรียมสารละลาย 0.4 M NaOH และ 2% SDS

2. ผสมสารทั้งสองในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร

สารละลาย phenol : chloroform (1:1)ขั้นตอนการเตรียม

1. ตวง chloroform และ phenol ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตรด้วยกระบอกตวงที่ sterile แล้ว

2. ผสมสารละลายให้เข้ากัน

สารละลาย 50X TAE bufferขั้นตอนการเตรียม

Tris base 242 g

EDTA, sodium salt 18.6 g

เติมน้ำกลั่น 800 ml ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย glacial acetic acid ให้ได้ pH 8

แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml เก็บที่อุณหภูมิห้อง

6X agarose gel-loading buffer

ขั้นตอนการเตรียม

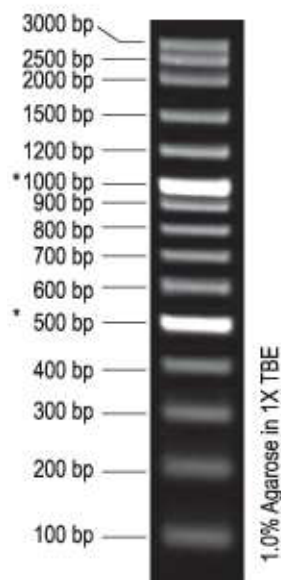
1. เตรียมสารเคมีต่าง ๆ ดังต่อไปนี้
 - 0.25% bromophenol blue
 - 40% (w/v) sucrose in water
2. ละลาย sucrose ในน้ำกลั่น จากนั้นจึงละลาย bromophenol blue ลงไป
3. ผสมให้เข้ากันแล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 μm ใส่ลงในขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในตู้ปลอดเชื้อ

การทำ agarose gel electrophoresis

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง agarose 0.6 g ละลายใน 1x TAE buffer 60 ml นำไปต้มจนกระทั่ง agarose ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนประมาณ 60 °C ใส่ ethidium bromide ลงไป 30 μl แล้วเทลงบน gel chamber ที่มีหวีเสียบอยู่
3. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30-40 นาที ให้เจลแข็งตัว ดึงเอาหวีออก จากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้ใส่ลงในเครื่อง electroporation แล้วเท 1x TAE buffer ลงไปให้ท่วมแผ่นเจล
4. นำ DNA ที่ต้องการผสมกับ loading dye ด้วยอัตราส่วน 3:1 แล้วหยอดลงในช่องที่เตรียมไว้บนเจล
5. ต่อขั้วอิเล็กโทรดเข้ากับ power supply โดยให้กระแสวิ่งจากขั้วลบไปยังขั้วบวก 100 โวลต์ ใช้เวลา 35 นาที
6. ปิด power supply แล้วค่อยๆ นำเจลออกมาจาก gel chamber แช่เจลลงในน้ำกลั่น
7. นำไปส่องดูแถบต่างๆภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต
8. จัดบันทึก หรือถ่ายรูปแถบที่เกิดขึ้นเพื่อไว้สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

VC 100bp Plus DNA Ladder (ready - to - use)



ที่มา : www.vivantis.com

Nucleic acid transfer buffer (20x SSC)

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง Tri-sodium citrate 88.23 g และ NaCl 175.32 g
2. เติมน้ำกลั่นลงไป 800 ml แล้วผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 ml ด้วยน้ำกลั่น
แล้วนำไป autoclave ที่ความดัน 15 psi, 121°C นาน 40 นาที

Nucleic acid transfer buffer (6x SSC)

เตรียมโดยใช้สารละลาย 20x SSC ปริมาตร 90 ml เติมน้ำกลั่นลงไป 210 ml ผสมให้เข้ากัน

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์น้ำตาลซูโครสด้วยวิธี Resorcinol-HCl

สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (mg/ml) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 520nm เป็นดังนี้

กำหนดให้ X = ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (mg/ml)

Y = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm

สำหรับข้าวอายุ 14 วัน

$$\text{สกัดครั้งที่ 1} \quad Y = 0.08x$$

$$\text{สกัดครั้งที่ 2} \quad Y = 0.0842x$$

$$\text{สกัดครั้งที่ 3} \quad Y = 0.0767x$$

สำหรับข้าวอายุ 30 วัน

$$\text{ต้นสกัดครั้งที่ 1} \quad Y = 0.0979x$$

$$\text{ต้นสกัดครั้งที่ 2-3} \quad Y = 0.1630x$$

$$\text{รากสกัดครั้งที่ 1} \quad Y = 0.1135x$$

$$\text{รากสกัดครั้งที่ 2-3} \quad Y = 0.0963x$$

สำหรับข้าวระยะตั้งท้องก่อนออกรวง

$$\text{สกัดครั้งที่ 1 0h-6h} \quad Y = 0.125x$$

$$\text{สกัดครั้งที่ 1 9h-24h} \quad Y = 0.1098x$$

$$\text{สกัดครั้งที่ 1 48h-120h} \quad Y = 0.1091x$$

$$\text{สกัดครั้งที่ 2 0h-3h} \quad Y = 0.1096x$$

$$\text{สกัดครั้งที่ 2 6h-12h} \quad Y = 0.104x$$

$$\text{สกัดครั้งที่ 2 24h-72h} \quad Y = 0.1003x$$

$$\text{สกัดครั้งที่ 2 120h-สกัดครั้งที่ 3 0h} \quad Y = 0.0986x$$

$$\text{สกัดครั้งที่ 3 3h-9h} \quad Y = 0.1007x$$

$$\text{สกัดครั้งที่ 3 12h-48h} \quad Y = 0.1045x$$

$$\text{สกัดครั้งที่ 3 72h-120h} \quad Y = 0.1202x$$

ตัวอย่างการคำนวณ

ใบของต้นข้าวที่ระยะ 14 วัน นำมาทดสอบด้วยเกลือวันที่ 1 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 520nm อยู่ที่ 0.1810 และจากกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซูโครส (x) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm (y) ดังนี้ $y = 0.08x$

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างแทนลงใน y จะได้

$$y = 0.08x$$

$$0.1810 = 0.08x$$

$$x = 2.2625 \text{ mg/ml}$$

ดังนั้นต้นข้าวที่ระยะ 14 วัน นำมาทดสอบด้วยเกลือวันที่ 1 มีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 520nm อยู่ที่ 0.1810 จะมีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 2.2625 mg/ml

จากตัวอย่างการคำนวณข้างต้นจะได้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในตัวอย่างต่างๆ ดังแสดงตามตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 4 ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่วัดได้ของข้าวอายุ 14 วัน

		ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่วัดได้ในช่วงเวลาต่างๆ (mmol/g wet weight)								
		0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h
ต้น	ครั้งที่1	0.7518	1.0452	0.8928	0.9667	1.0645	1.0300	0.8895	0.8459	0.9403
	ครั้งที่2	0.8711	1.0195	0.8038	0.9101	0.9810	0.9927	0.6998	0.7771	1.0272
	ครั้งที่3	1.0993	0.9039	0.9805	0.8786	1.0777	0.9401	0.8473	1.0993	0.8495
	เฉลี่ย	0.9074	0.9896	0.8924	0.9185	1.0411	0.9876	0.8122	0.9074	0.9390
	SD.	0.1766	0.0753	0.0883	0.0446	0.0524	0.0452	0.0996	0.1697	0.0889
ราก	ครั้งที่1	0.2620	0.2311	0.2676	0.2272	0.1677	0.1897	0.1894	0.2547	0.1746
	ครั้งที่2	0.1631	0.2329	0.1973	0.3032	0.1837	0.2098	0.1971	0.1956	0.1860
	ครั้งที่3	0.1960	0.1746	0.2279	0.1644	0.2009	0.2120	0.2166	0.2109	0.1880
	เฉลี่ย	0.2070	0.2128	0.2309	0.2316	0.1841	0.2038	0.2010	0.2204	0.1828
	SD.	0.0504	0.0332	0.0352	0.0695	0.0166	0.0123	0.0140	0.0307	0.0072

ตารางที่ 5 ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่วัดได้ของข้าวอายุ 30 วัน

		ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่วัดได้ในช่วงเวลาต่างๆ (mmol/g wet weight)								
		0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h
ต้น	ครั้งที่1	1.5436	1.4641	1.2278	0.8573	1.8267	1.1161	1.0593	1.0125	1.1661
	ครั้งที่2	0.7814	0.8259	0.7538	0.6657	0.8761	0.7600	0.7747	0.6209	0.6347
	ครั้งที่3	0.8401	0.9390	0.8225	0.6603	0.8812	0.6490	0.6442	0.5806	0.8128
	เฉลี่ย	1.0550	1.0763	0.9347	0.7278	1.1947	0.8417	0.8261	0.7380	0.8712
	SD.	0.4241	0.3405	0.2561	0.1123	0.5473	0.2441	0.2122	0.2385	0.2705
ราก	ครั้งที่1	0.1431	0.1681	0.1699	0.3048	0.2207	0.1581	0.1990	0.1716	0.2405
	ครั้งที่2	0.2380	0.1657	0.1891	0.3946	0.2786	0.2783	0.2302	0.2446	0.2097
	ครั้งที่3	0.1620	0.2164	0.2540	0.3282	0.2088	0.1832	0.3167	0.2111	0.2095
	เฉลี่ย	0.1810	0.1834	0.2043	0.3425	0.2360	0.2065	0.2486	0.2091	0.2199
	SD.	0.0502	0.0286	0.0441	0.0466	0.0373	0.0634	0.0609	0.0365	0.0178

ตารางที่ 6 ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่วัดได้ของข้าวระยะตั้งท้องก่อนออกรวง

		ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่วัดได้ในช่วงเวลาต่างๆ (mmol/g wet weight)								
		0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h
ใบธง	สกัดครั้งที่ 1	3.8323	2.9010	3.4590	2.0796	2.9115	3.2475	2.3461	2.9361	2.6071
	สกัดครั้งที่ 2	4.0957	2.9832	3.3846	3.2854	4.4294	3.6743	3.1728	3.3666	2.6178
	สกัดครั้งที่ 3	4.3551	3.6992	3.0458	4.3599	3.3785	3.5599	2.9888	2.7029	2.7045
	เฉลี่ย	4.0943	3.1945	3.2965	3.2416	3.5732	3.4939	2.8359	3.0019	2.6431
	SD.	0.2614	0.4390	0.2203	1.1408	0.7774	0.2209	0.4340	0.3367	0.0534
ใบรอง	สกัดครั้งที่ 1	3.5734	3.9487	3.5663	2.2097	3.4631	2.9724	2.6132	2.3681	1.9709
	สกัดครั้งที่ 2	4.8876	3.9124	3.6775	3.0663	3.1730	4.1244	2.4819	2.8596	2.2407
	สกัดครั้งที่ 3	5.4423	4.2522	2.5790	3.0098	3.6784	4.2598	2.6790	2.9937	2.9302
	เฉลี่ย	4.6344	4.0378	3.2743	2.7620	3.4382	3.7855	2.5913	2.7405	2.3806
	SD.	0.9598	0.1866	0.6047	0.4791	0.2537	0.7075	0.1004	0.3294	0.4947
กาบใบ	สกัดครั้งที่ 1	0.6872	0.4052	0.6429	0.3851	0.9141	0.6531	0.5147	0.3715	0.5006
	สกัดครั้งที่ 2	0.3916	0.5655	0.6091	0.4316	0.5073	0.4317	0.4276	0.5021	0.5818
	สกัดครั้งที่ 3	0.4312	0.5436	0.7669	0.4605	0.5984	0.6361	0.5783	0.6878	0.3879
	เฉลี่ย	0.5033	0.5048	0.6730	0.4257	0.6733	0.5736	0.5069	0.5205	0.4901
	SD.	0.1605	0.0869	0.0831	0.0380	0.2135	0.1232	0.0756	0.1589	0.0973
รวง	สกัดครั้งที่ 1	1.1104	0.8886	0.9348	0.5294	0.8393	1.1866	0.7025	0.4631	0.4845
	สกัดครั้งที่ 2	1.0285	0.5684	1.0033	0.5358	0.7189	0.7884	0.6444	0.7257	0.8605
	สกัดครั้งที่ 3	1.2180	1.0030	0.7053	0.5420	1.0031	0.9687	0.7141	0.6407	0.7376
	เฉลี่ย	1.1190	0.8200	0.8811	0.5357	0.8537	0.9813	0.6870	0.6098	0.6942
	SD.	0.0950	0.2252	0.1561	0.0063	0.1427	0.1994	0.0374	0.1340	0.1917
ปล้อง	สกัดครั้งที่ 1	0.7269	0.7225	0.9103	0.4379	0.6133	0.9710	0.3642	0.5358	0.4794
	สกัดครั้งที่ 2	1.0555	1.1957	0.7253	0.5250	0.5109	0.5386	0.3652	0.3485	0.3457
	สกัดครั้งที่ 3	0.5796	0.7595	0.6462	0.4316	0.6716	0.4808	0.2361	0.5014	0.3575
	เฉลี่ย	0.7873	0.8926	0.7606	0.4648	0.5986	0.6635	0.3218	0.4619	0.3942
	SD.	0.2436	0.2632	0.1355	0.0522	0.0813	0.2679	0.0743	0.0997	0.0740
ราก	สกัดครั้งที่ 1	0.2548	0.1502	0.2253	0.1857	0.2545	0.2873	0.1552	0.0983	0.1143
	สกัดครั้งที่ 2	0.1698	0.1629	0.3493	0.1759	0.2004	0.2158	0.1746	0.1229	0.1794
	สกัดครั้งที่ 3	0.1928	0.1931	0.1934	0.2366	0.2423	0.2012	0.1412	0.1272	0.1893
	เฉลี่ย	0.2058	0.1687	0.2560	0.1994	0.2324	0.2348	0.1570	0.1161	0.1610
	SD.	0.0439	0.0220	0.0824	0.0326	0.0284	0.0461	0.0168	0.0156	0.0407

ตารางที่ 7 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้ของข้าวอายุ 14 วัน

		ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้ในช่วงเวลาต่างๆ (mmol/g wet weight)								
		0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h
ต้น	ครั้งที่1	0.0313	0.0450	0.0460	0.0475	0.0357	0.0339	0.0407	0.0512	0.0472
	ครั้งที่2	0.0390	0.0523	0.0569	0.0445	0.0416	0.0308	0.0439	0.0435	0.0566
	ครั้งที่3	0.0370	0.0457	0.0490	0.0394	0.0394	0.0337	0.0408	0.0533	0.0463
	เฉลี่ย	0.0358	0.0477	0.0506	0.0438	0.0389	0.0328	0.0418	0.0493	0.0501
	SD.	0.0040	0.0040	0.0057	0.0041	0.0030	0.0017	0.0018	0.0051	0.0057
ราก	ครั้งที่1	0.0200	0.0224	0.0243	0.0240	0.0164	0.0183	0.0205	0.0284	0.0132
	ครั้งที่2	0.0166	0.0269	0.0209	0.0223	0.0215	0.0159	0.0228	0.0270	0.0169
	ครั้งที่3	0.0148	0.0217	0.0166	0.0191	0.0162	0.0129	0.0251	0.0274	0.0160
	เฉลี่ย	0.0171	0.0237	0.0206	0.0218	0.0180	0.0157	0.0228	0.0276	0.0154
	SD.	0.0026	0.0028	0.0038	0.0025	0.0030	0.0027	0.0023	0.0007	0.0019

ตารางที่ 8 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้ของข้าวอายุ 30 วัน

		ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้ในช่วงเวลาต่างๆ (mmol/g wet weight)								
		0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h
ต้น	ครั้งที่1	0.0422	0.0636	0.0534	0.0484	0.0553	0.0514	0.0541	0.0521	0.0706
	ครั้งที่2	0.0455	0.0605	0.0490	0.0524	0.0547	0.0537	0.0581	0.0582	0.0675
	ครั้งที่3	0.0421	0.0649	0.0554	0.0581	0.0604	0.0512	0.0565	0.0584	0.0717
	เฉลี่ย	0.0433	0.0630	0.0526	0.0530	0.0568	0.0521	0.0562	0.0562	0.0699
	SD.	0.0019	0.0023	0.0033	0.0049	0.0031	0.0013	0.0020	0.0036	0.0022
ราก	ครั้งที่1	0.0200	0.0237	0.0218	0.0184	0.0174	0.0173	0.0186	0.0178	0.0179
	ครั้งที่2	0.0202	0.0263	0.0237	0.0235	0.0206	0.0190	0.0215	0.0217	0.0219
	ครั้งที่3	0.0202	0.0238	0.0248	0.0207	0.0231	0.0148	0.0179	0.0188	0.0173
	เฉลี่ย	0.0201	0.0246	0.0234	0.0209	0.0204	0.0170	0.0193	0.0195	0.0191
	SD.	0.0001	0.0015	0.0015	0.0025	0.0028	0.0021	0.0019	0.0020	0.0025

ตารางที่ 9 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้ของข้าวระยะตั้งท้องก่อนออกรวง

		ปริมาณน้ำตาลที่วัดได้ในช่วงเวลาต่างๆ (mmol/g wet weight)								
		0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h
ใบธง	สักคครั้งที่1	0.0574	0.0507	0.0463	0.0144	0.0916	0.0524	0.0410	0.0350	0.0347
	สักคครั้งที่2	0.0481	0.0536	0.0507	0.0357	0.0422	0.0568	0.0399	0.0380	0.0368
	สักคครั้งที่3	0.0524	0.0551	0.0363	0.0439	0.0342	0.0503	0.0339	0.0312	0.0400
	เฉลี่ย	0.0526	0.0531	0.0444	0.0313	0.0560	0.0531	0.0383	0.0347	0.0372
	SD.	0.0047	0.0023	0.0074	0.0152	0.0311	0.0033	0.0039	0.0034	0.0026
ใบรอง	สักคครั้งที่1	0.0435	0.0482	0.0446	0.0215	0.0472	0.0477	0.0303	0.0303	0.0466
	สักคครั้งที่2	0.0435	0.0576	0.0370	0.0310	0.0370	0.0365	0.0247	0.0349	0.0300
	สักคครั้งที่3	0.0519	0.0538	0.0026	0.0370	0.0466	0.0443	0.0342	0.0315	0.0406
	เฉลี่ย	0.0463	0.0532	0.0281	0.0298	0.0436	0.0428	0.0297	0.0322	0.0391
	SD.	0.0048	0.0047	0.0224	0.0078	0.0057	0.0058	0.0048	0.0024	0.0084
กาบใบ	สักคครั้งที่1	0.1028	0.0589	0.0921	0.0376	0.1132	0.0582	0.0972	0.0667	0.0787
	สักคครั้งที่2	0.0486	0.0800	0.0793	0.0363	0.0586	0.0648	0.0720	0.0783	0.0870
	สักคครั้งที่3	0.0252	0.0715	0.0753	0.0314	0.0598	0.0539	0.1109	0.1167	0.1572
	เฉลี่ย	0.0589	0.0701	0.0823	0.0351	0.0772	0.0590	0.0934	0.0872	0.1076
	SD.	0.0398	0.0106	0.0088	0.0032	0.0312	0.0055	0.0197	0.0262	0.0431
รวง	สักคครั้งที่1	0.1837	0.1206	0.1717	0.0698	0.1064	0.1675	0.1314	0.0871	0.0809
	สักคครั้งที่2	0.1602	0.0673	0.1780	0.0681	0.0804	0.1168	0.1037	0.1226	0.1619
	สักคครั้งที่3	0.1522	0.1054	0.1179	0.0672	0.1188	0.1517	0.1157	0.1173	0.1095
	เฉลี่ย	0.1654	0.0978	0.1559	0.0684	0.1019	0.1453	0.1169	0.1090	0.1174
	SD.	0.0163	0.0275	0.0331	0.0013	0.0196	0.0259	0.0139	0.0192	0.0411
ปล้อง	สักคครั้งที่1	0.1308	0.1049	0.1391	0.0604	0.0865	0.1397	0.0517	0.0867	0.0815
	สักคครั้งที่2	0.1328	0.1784	0.1197	0.0623	0.0603	0.0754	0.0524	0.0601	0.0704
	สักคครั้งที่3	0.0759	0.0936	0.0917	0.0600	0.0879	0.0651	0.0345	0.0684	0.0542
	เฉลี่ย	0.1132	0.1256	0.1168	0.0609	0.0782	0.0934	0.0462	0.0717	0.0687
	SD.	0.0323	0.0460	0.0238	0.0012	0.0155	0.0404	0.0102	0.0136	0.0138
ราก	สักคครั้งที่1	0.0083	0.0068	0.0039	0.0089	0.0052	0.0042	0.0043	0.0076	0.0036
	สักคครั้งที่2	0.0098	0.0120	0.0090	0.0070	0.0068	0.0013	0.0030	0.0045	0.0039
	สักคครั้งที่3	0.0059	0.0053	0.0094	0.0069	0.0095	0.0030	0.0033	0.0062	0.0030
	เฉลี่ย	0.0080	0.0080	0.0074	0.0076	0.0072	0.0028	0.0035	0.0061	0.0035
	SD.	0.0019	0.0035	0.0031	0.0011	0.0022	0.0014	0.0007	0.0015	0.0005

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทำ Southern Blot Analysis และ Hybridization

1. การเตรียมสารที่ใช้ในการทำ Southern blot analysis

1) Extraction buffer

guanidium thiocyanate	50	กรัม
sodium citrate dihydrate	0.74	กรัม
N-lauroylsarcosine sodium salt	0.5	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร นำไป autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที

2) Nucleic acid transfer buffer (20x SSC)

tri-sodium citrate	88.23	กรัม
NaCl	175.32	กรัม

เติมน้ำกลั่นลงไป 800 มิลลิลิตรแล้วผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไป autoclaved ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที

3) Depurination solution

HCl	11	กรัม
น้ำกลั่น	989	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน

4) Denaturation buffer

NaCl	87.66	กรัม
NaOH	20	กรัม

เติมน้ำกลั่นลงไป 800 มิลลิลิตรแล้วผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไป autoclaved ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที

5) Neutralization buffer

NaCl	87.66	กรัม
------	-------	------

Tris base	60.5	กรัม
-----------	------	------

เติมน้ำกลั่นลงไป 800 มิลลิลิตรแล้วผสมให้เข้ากัน ทำการปรับ pH = 7.5 โดยใช้ conc. HCl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไป autoclaved ที่ 121 องศาเซลเซียสนาน 40 นาที

2. DIG High Prime DNA Labeling and Detection starter Kit**1) EDTA**

- 0.2 M ethylenediamino tetraacetic acid pH 8.0

2) vial 1 (DIG High Prime)

- 50 µl DIG High Prime
- 5x conc.labelling mixture containing optical concentrations of random primers, nucleotides, DIG-dNTP (alkali-label), Klenow enzyme and buffer components clear, viscous solution

3) vial 2 (DIG – labeled Control DNA)

- ปริมาตร 20 µl
- 5 µg/ml pBR328 DNA (linearized with Bam HI), Clear solution

4) vial 3 (DNA Dilution Buffer)

- ปริมาตร 3 x 1ml
- 50 µg/ml herring sperm DNA in 10 mM Tris-HCl
- 1 mM EDTA ; pH 8.0 at 25 °C
- clear solution

5) vial 4 (Anti-Digoxigenin-AP Conjugate)

- ปริมาตร 100 µl มีความเข้มข้น 750 U/ml
- จากแกะ, Fab-fragments, conjugated to alkaline phosphatase, clear solution

6) vial 5 (NBT-BCIP)

- ปริมาตร 6 x 1 ml
- 50x conc. stock solution (18.75 mg/ml nitroblue tetrazolium chloride and 9.4 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate in 67% (v/v)DMSO)
- clear solution

7) vial 6 (Blocking solution)

- ปริมาตร 4 x 100 ml
- 10x conc. Yellow, viscous solution

8) vial 7 (DIG Easy Hyb Granules)

- ปริมาตร 4 x 100 ml
- Hybridization solution

9) washing buffer

- 0.1 M Maleic acid
- 0.15 M NaCl
- ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.5 ที่ 20 °C

10) Malaic acid buffer

- 0.1 M Malaic acid
- 0.15 M NaCl
- ปรับ pH ด้วย NaOH (solid) ให้เท่ากับ 7.5 ที่ 20 °C

11) Detection buffer

- 0.1 M Tris-HCl
- 0.1 M NaCl
- ปรับ pH ให้เท่ากับ 9.5 ที่ 20 °C

12) TE-buffer

- 10 mM Tris-HCl
- 1 mM EDTA
- ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0

13) Blocking solution (ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง)

- เจือจาง 10x Blocking solution (vial 6) ในอัตราส่วน 1:10 ด้วย Malaic acid buffer

14) Antibody solution

- ทำการปั่นเหวี่ยง Anti-Digoxigenin-AP (vial 4) 5 นาที ที่ 10,000 rpm ดูดเอาสารละลายที่ผิว จากนั้นเจือจาง Anti-Digoxigenin-AP 1:5000 (150 U/ml) ด้วย Blocking solution

15) Color substrate solution (ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งและเก็บในที่มืด)

- เติม 20 μ l ของ NBT/BCIP stock solution (vial 5) ลงไปใน 2 ml ของ Detection buffer

16) DIG-labeled DNA probe

นำ DIG-labeled DNA probe (ยีนติดตามที่ติดฉลากด้วย DIG) ความเข้มข้นประมาณ 25 ng/ml ไปต้มนาน 5 นาที แล้วใส่ในน้ำแข็งทันที

ภาคผนวก ง

การนำเสนอผลงานที่เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์ในรูปแบบโปสเตอร์

- 1) **Chaopaknam A**, Bouson S, Sakunsaknimitr N, Wiboonchok A and Ngampanya B. 2008. Sugar partitioning and sugar transporter genes expression in rice seedlings treated by sodium chloride. For poster presentation in The 4th Naresuan Research Conference. Naresuan University, Pitsanuloke Thailand, 28- 29 July 2008.
- 2) Ngampanya B, Rungsawang E, Prasarthsil P and **Chaopaknam A**. 2008. Comparison between in planta transformation and callus- mediated methods in indica rice (*Oryza sativa* L.) CV. KDML105. For poster presentation in The 34th Congress on Science and Technology of Thailand (STT34). The Queen Sirikit National Convention Center (QSNCC) in Bangkok, Thailand, 31October- 2 November 2008.
- 3) **Chaopaknam A** and Ngampanya B. Expression analysis of Na⁺/H⁺ exchanger and sugar transporter genes in NaCl- treated rice seedlings. For poster presentation in The 21st annual meeting of the Thai society for biotechnology. The Queen Sirikit National Convention Center (QSNCC) in Bangkok, Thailand, September 24- 25, 2009.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - สกุล นาย อภिरพร ชาวปากน้ำ
Mr. Aphiraporn Chaopaknam

วัน เดือน ปีเกิด 10 มีนาคม 2526

ที่อยู่ปัจจุบัน 53/6 หมู่ 4 ต.บางหญ้าแพรก อ.เมือง จ.สมุทรสาคร 74000
โทรศัพท์ 086-6122465

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2547 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยศิลปากร

พ.ศ. 2548 ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยศิลปากร

วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา (ชื่อเรื่อง/ ปีที่ดำเนินการ ทั้งระดับปริญญาตรีและปริญญาโท)

พ.ศ. 2546-2547 วิทยานิพนธ์ เรื่อง การตรวจสอบ และคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้าง
สารยับยั้งเชื้อก่อโรค American Foulbrood (*P.l.larvae*)

พ.ศ. 2550-2552 วิทยานิพนธ์ เรื่อง การศึกษาการแสดงออกของยีนเคลื่อนย้ายน้ำตาล และ
แลกเปลี่ยน โขเดียมอออน/โปรตอนภายใต้สภาวะเครียดต่อเกลือในข้าว