

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

(Methodology)

การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่ทนแล้งและไม่ทนแล้ง

ในการศึกษานี้เบื้องต้นได้คัดเลือกสายพันธุ์ข้าวมาศึกษาทั้งหมด 14 สายพันธุ์
(ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1

ชื่อสายพันธุ์ ลักษณะและที่มาของข้าวที่คัดเลือกมาใช้ในการศึกษา

ลำดับ	รหัส	สายพันธุ์	ลักษณะ	ที่มา
1	B25	IR 2035-117-3	ทนแล้ง	ศูนย์วิจัยข้าวนานาชาติประเทศฟิลิปปินส์
2	B42	IR 52	ทนแล้ง	ศูนย์วิจัยข้าวนานาชาติประเทศฟิลิปปินส์
3	B54	IR 43	ทนแล้ง	ศูนย์วิจัยข้าวนานาชาติประเทศฟิลิปปินส์
4	B64	IR 5178-1-1-4	ทนแล้ง	ศูนย์วิจัยข้าวนานาชาติประเทศฟิลิปปินส์
5	B71	IR 64	ไม่ทนแล้ง	หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ข้าว
6	B72	AZUCENA	ทนแล้ง	หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ข้าว
7	B73	IR 68586-F2CA-143	ทนแล้ง	หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ข้าว
8	B74	SRN1	ไม่ทนแล้ง	หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ข้าว
9	B75	KDML105(U)	ไม่ทนแล้ง	หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ข้าว
10	B76	1093#69 RGDU03062(2)-1020-0-0-0	ทนแล้ง	หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ข้าว
11	B77	1093#11 RGDU03062(4)-85-0-0-0	ทนแล้ง	หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ข้าว
12	B78	1093#70 RGDU03062(2)-113-0-0-0	ทนแล้ง	หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ข้าว
13	B19	PTT 1	ไม่ทนแล้ง	ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี
14	B79	Pokali	ทนแล้ง	ศูนย์วิจัยข้าวนานาชาติประเทศฟิลิปปินส์

พันธุ์ข้าวหมายเลข 1-4 และ 14 เป็นข้าวที่ได้มาจากศูนย์วิจัยข้าวนานาชาติ ประเทศฟิลิปปินส์ (IRRI) ส่วนข้าวหมายเลข 5-12 เป็นข้าวที่ได้มาจากหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ข้าวมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และหมายเลข 13 เป็นข้าวไทยที่ได้มาจากศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี ข้าว IR64 เป็นข้าวที่นิยมนำมาใช้เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อความแห้งแล้ง (Kathiresan et al., 2006) PTT1 และ SRN1 เป็นข้าวไทยที่ปลูกในภาคกลางของประเทศ ไทย และเป็นข้าวนาข้าวชลประทาน ส่วนข้าวพันธุ์อื่น ๆ เป็นพันธุ์ที่มีรายงานว่าทนต่อความแห้งแล้ง โดยเฉพาะ Azucena และ Pokkali ที่มีรายงานว่ามีความทนแล้งเป็นอย่างดี และนิยมนำมาใช้ศึกษาเป็นข้าวที่ทนแล้ง (Kathiresan et al., 2006; Salekdeh et al., 2002) แต่ในพันธุ์อื่น ๆ ข้อมูลยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าทนแล้งได้ดีแค่ไหน

ในขั้นตอนแรกได้ทำการปลูกข้าวชุดแรกเพื่อศึกษาวนออกดอกของข้าวแต่ละสายพันธุ์ และนำมาเป็นข้อมูลในการให้ข้าวงดการให้น้ำ เนื่องจากเมื่อเก็บข้อมูลวันออกดอกแล้วพบว่าข้าวในแต่ละพันธุ์มีระยะเวลาในการออกดอกไม่พร้อมกันมีผลทำให้ช่วงเวลาที่ทำการงดการให้น้ำข้าวที่ระยะตั้งท้องไม่พร้อมกันซึ่งอาจจะทำให้ผลการทดลองเกิดความคลาดเคลื่อนได้ ดังนั้นต่อมาจึงได้ออกแบบการทดลองโดยปลูกข้าวแต่ละพันธุ์ไม่พร้อมกัน เพื่อให้ข้าวออกดอกพร้อมกัน ทำให้งดการให้น้ำข้าวพร้อมกันได้โดยที่ข้าวอยู่ในระยะการเจริญเติบโตเดียวกัน ซึ่งจะช่วยลดการคลาดเคลื่อนที่เกิดจากความแตกต่างระหว่างวัน, อุณหภูมิ และความชื้น ได้ เป็นต้น ในการทดลองนี้ได้ปลูกข้าวทั้ง 14 สายพันธุ์ประมาณพันธุ์ละ 20 ต้น นำมาปลูกลงในถุงที่มีรูโดยบรรจุดินประมาณถุงละ 3 กิโลกรัม (Ji et al., 2005) และนำถุงที่ปลูกข้าวไปใส่ลงในกระถางที่ใส่น้ำจนท่วมถุง และใส่น้ำในปริมาณเท่า ๆ กันทุกวันจนกระทั่งถึงเวลาทดลองให้ข้าวงดการให้น้ำ ข้าวเหล่านี้ได้ปลูกไว้ในโรงเรือนตาข่ายในสภาพธรรมชาติ จนกระทั่งประมาณ 1 เดือนก่อนข้าวออกดอกจึงได้ย้ายข้าวเข้าไปในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 28 °C แล้วทำการทดลองงดการให้น้ำข้าวที่ก่อนออกดอกประมาณ 7-11 วัน เพราะการที่ข้าวขาดน้ำในช่วงที่ข้าวใกล้จะออกดอกจะมีผลต่อการติดเมล็ดของข้าวมากที่สุดเนื่องจากการขาดน้ำจะไปยับยั้งการพัฒนาของเกสรตัวผู้และการแทงของช่อดอก (Ji et al., 2005) ในแต่ละสายพันธุ์ได้แบ่งข้าวออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ทดลองงดการให้น้ำข้าว ส่วนกลุ่มที่ 2 อยู่ในสภาวะปกติ ทำการงดการให้น้ำข้าวจนกระทั่งใบข้าวทุกใบม้วนจึงให้น้ำกลับเป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นงดการให้น้ำข้าวอีกรอบจนกระทั่งใบม้วนเช่นกันแล้วจึงให้น้ำกลับจนกระทั่งเก็บผลผลิต (Yue et al., 2006) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยให้ต้นข้าวเป็นหน่วยทดลองซึ่งในข้าวแต่ละพันธุ์จะมีหน่วยทดลองประมาณ 4-6 หน่วยทดลอง และกำหนดให้สายพันธุ์ข้าวเป็นทรีทเมนต์มี 8 ทรีทเมนต์ ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ

เก็บข้อมูลของระยะเวลาที่ข้าวแต่ละสายพันธุ์สามารถขาดน้ำได้ หลังจากนั้นคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่สนใจไปศึกษาในระดับต่อไป

การคัดเลือกข้าวที่มีการให้ผลผลิตที่เสถียรภาพในสภาวะแล้ง

คัดเลือกพันธุ์ข้าวที่สนใจทั้งกลุ่มที่ทนแล้งและไม่ทนแล้งจาก 3.1 โดยแต่ละการทดลองได้ปลูกข้าวแต่ละพันธุ์ประมาณพันธุ์ละ 10 – 15 ต้น โดยวิธีการปลูกเหมือนกับหัวข้อ 3.1 ทำการออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาผลผลิตโดยการให้น้ำข้าว 3 แบบ ดังต่อไปนี้

1) ในแบบการทดลองนี้ได้ออกแบบการทดลองแบบ CRD โดยปลูกข้าวจนถึงระยะก่อนวันออกดอกประมาณ 7-11 วัน แบ่งข้าวแต่ละพันธุ์ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นข้าวที่จะงดการให้น้ำ เริ่มการทดลองงดการให้น้ำข้าวจนกระทั่งใบข้าวทุกใบม้วน จากนั้นจึงให้น้ำข้าว 1 วัน และทำการงดการให้น้ำข้าวอีกรอบจนกระทั่งใบข้าวทุกใบม้วนจึงให้น้ำกลับจนกระทั่งเก็บผลผลิต (Yue et al., 2005) และกลุ่มที่ 2 จะให้น้ำปกติ (Control) ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้วิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ $P = 0.05$

2) วิธีการงดการให้น้ำข้าวเริ่มดน้ำก่อนข้าวออกดอกประมาณ 7-11 วัน แต่ในการทดลองนี้งดให้น้ำข้าวเป็นระยะเวลา 14 วัน (เป็นช่วงเวลาโดยเฉลี่ยที่ข้าวกลุ่มที่ทนแล้งสามารถขาดน้ำได้) แล้วให้น้ำกลับ 1 วัน และงดให้น้ำข้าวอีกรอบเป็นเวลา 14 วันเช่นกัน หลังจากนั้นให้น้ำข้าวปกติจนถึงเก็บผลผลิต วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองซ้ำ 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้วิธี LSD ที่ $P = 0.05$

3) วิธีการงดการให้น้ำข้าวจะเริ่มงดการให้น้ำก่อนข้าวออกดอกประมาณ 7-11 วัน แต่ในการทดลองนี้งดการให้น้ำข้าวเป็นระยะเวลา 7 วัน (เป็นช่วงเวลาโดยเฉลี่ยที่ข้าวกลุ่มที่อ่อนแอต่อความแห้งแล้งสามารถขาดน้ำได้) แล้วให้น้ำกลับ 1 วัน และงดให้น้ำข้าวอีกรอบเป็นเวลา 7 วันเช่นกัน หลังจากนั้นให้น้ำข้าวปกติจนถึงเก็บผลผลิต วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้วิธี LSD ที่ $P = 0.05$

หลังจากนั้นเก็บข้อมูลต่าง ๆ คือ ระยะเวลาการงดการให้น้ำของข้าว (แบบการทดลองที่ 1), น้ำหนักแห้ง, ความสูงของข้าว, จำนวนช่อ, น้ำหนักเมล็ดและจำนวนเมล็ด เป็นต้น ทั้งนี้ต้องมีการปรับสภาวะและควบคุมสภาวะแวดล้อมให้คงที่ เช่น อุณหภูมิ และความชื้น เป็นต้น เพื่อให้ได้ข้อมูลต่าง ๆ ที่คงที่และเที่ยงตรง

การคัดเลือกยีนมาศึกษาและการออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ RT-PCR

ในการศึกษานี้ได้เลือกยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการพัฒนาช่อดอก และ/หรือ ยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะความเครียดต่าง ๆ ที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ มาประมาณ 50 ยีน (Lan et al., 2004; Lan et al., 2005; Lu et al., 2006; Bao et al., 2005; Tang et al., 2005) (ตารางที่ 3.2) นำมาศึกษาการแสดงออกยีนในช่อดอกในสภาวะแล้ง โดยวิธี RT-PCR

ตารางที่ 3.2

รายชื่อยีน หน้าที่และที่มาของยีนที่คัดเลือกมาศึกษา

ชื่อยีน	หน้าที่ของยีน	อ้างอิง
Os04g44060	Aquaporin PIP2.2, putative	(Lan et al., 2004)
Os02g44630	Aquaporin RWC3	(Lan et al., 2004)
Os11g40150	DNA repair protein RAD51 homolog A	(Tang et al., 2005)
Os02g25900	pollen signalling protein with adenylyl cyclase activity	(Tang et al., 2005)
Os09g30320	BURP domain containing protein	(Tang et al., 2005)
Os03g44710	YABBY protein, putative	(Tang et al., 2005)
Os02g48790	AML1, putative, expressed	(Tang et al., 2005)
Os11g04960	No apical meristem protein	(Tang et al., 2005)
Os07g06620	YABBY protein, putative	(Tang et al., 2005)
Os01g16870	Piwi domain containing protein	(Lan et al., 2005)
Os12g37840	Boron transporter 1	(Lan et al., 2005)
Os01g66120	NAC-domain containing protein 2	(Lan et al., 2005)
Os01g03340	Bowman-Birk type bran trypsin inhibitor precursor	(Lan et al., 2005)
Os05g46480	Late embryogenesis abundant protein	(Lan et al., 2005)
Os06g49430	Protein kinase domain containing protein	(Lan et al., 2005)
Os02g44870	Dehydrin family protein	(Lan et al., 2005)
Os03g45280	Dehydrin family protein	(Lan et al., 2005)
Os08g06110	myb-like DNA-binding domain, SHAQKYF protein	(Lan et al., 2005)

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

ชื่อยีน	หน้าที่ของยีน	อ้างอิง
Os05g29810	AP2 domain containing protein	(Lan et al., 2005)
Os01g07120	AP2 domain containing protein	(Lan et al., 2004)
Os02g02840	RAC-like GTP binding protein RHO1	(Bao et al., 2005)
Os04g41960	NADP-dependent oxidoreductase P1	(Bao et al., 2005)
Os01g72550	EF hand family protein	(Bao et al., 2005)
Os06g43810	expressed protein	(Bao et al., 2005)
Os01g06460	SAT5, putative, expressed	(Bao et al., 2005)
Os02g07230	Porphobilinogen deaminase, chloroplast precursor	(Bao et al., 2005)
Os07g03200	Phytosulfokines 4 precursor	(Bao et al., 2005)
Os06g43090	Myb-like DNA-binding domain containing protein	(Bao et al., 2005)
Os02g51350	kelch repeat-containing F-box family protein	(Bao et al., 2005)
Os01g03330	Bowman-Birk type bran trypsin inhibitor precursor	(Bao et al., 2005)
Os03g25270	pyrrolidone-carboxylate peptidase family protein	(Bao et al., 2005)
Os09g38320	Phytoene synthase, chloroplast precursor	(Bao et al., 2005)
Os02g40530	Myb-like DNA-binding domain containing protein	(Bao et al., 2005)
Os02g11850	hypothetical protein	(Bao et al., 2005)
Os10g25290	ZIM motif family protein	(Bao et al., 2005)
Os12g04240	EF hand family protein	(Bao et al., 2005)
Os01g73910	expressed protein	(Bao et al., 2005)
Os08g39300	Serine-glyoxylate aminotransferase	(Bao et al., 2005)
Os01g72740	Cytochrome P450 family protein	(Bao et al., 2005)
Os04g12710	Indole-3-acetate beta-glucosyltransferase	(Bao et al., 2005)
Os08g06530	Rubredoxin family protein	(Bao et al., 2005)
Os04g53760	Kinesin-1, putative	(Lu et al., 2006)
Os03g19080	expressed protein	(Lu et al., 2006)
Os02g06340	EH-domain containing protein 1	(Lu et al., 2006)

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

ชื่อยีน	หน้าที่ของยีน	อ้างอิง
Os03g30740	expressed protein	(Lu et al., 2006)
Os01g67740	SMC proteins Flexible Hinge Domain containing protein,	(Lu et al., 2006)
Os08g41950	SRF-type transcription factor family protein	(Lu et al., 2006)
Os06g51110	G2/mitotic-specific cyclin 2, putative	(Lu et al., 2006)
Os03g02290	kinesin motor protein, putative, expressed	(Lu et al., 2006)
Os03g14250	expressed protein	(Lu et al., 2006)

นำยีนที่คัดเลือกมาออกแบบ Primer โดยในขั้นแรกนำ Accession number ของแต่ละยีนไปหาลำดับเบสใน <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> เมื่อได้ลำดับเบสแล้วนำไป Blast ใน <http://www.gramec.org/> เพื่อดูว่าเป็นยีนใดในข้าว หลังจากนั้นจึงนำลำดับเบสของยีนในฐานข้อมูลข้าวไปออกแบบ Primer โดยใช้โปรแกรม Primer 3 ในฐานข้อมูลของ Biology workbench (<http://workbench.sdsc.edu/>) ในการออกแบบ primer ใช้หลักการที่ว่า จะให้ Reverse primer ตกอยู่ที่ Exon หนึ่ง และ Forward primer ตกที่อีก Exon หนึ่ง โดยมี Intron ขั้วกลาง เหตุผลเพื่อสามารถแยกผลผลิต PCR ที่เกิดจากต้นแบบเป็น DNA กับต้นแบบเป็น RNA ซึ่งทำให้ได้ขนาดของ DNA มีขนาดใหญ่กว่า RNA ทำให้แยกได้ว่าไม่มี DNA มาปนอยู่ในตัวอย่าง RNA ที่ใช้ หลังจากนั้นทำการตรวจสอบ primer ว่าสามารถนำมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกยีนได้หรือไม่ และหาอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยใช้เทคนิค PCR

ศึกษาการแสดงออกยีนในข้าวที่ทนแล้งและไม่ทนแล้งในสภาวะขาดน้ำ เปรียบเทียบกับสภาวะให้น้ำปกติ (Control)

การศึกษาระดับการแสดงออกยีนทั้ง 50 ยีน (ตารางที่ 3.2) ในข้าวทนแล้งและข้าวที่ไม่ทนแล้งในสภาวะที่ขาดน้ำ เปรียบเทียบกับในสภาวะให้น้ำปกติ โดยเก็บตัวอย่างข้อข้าวจากกลุ่มที่งดให้น้ำที่ระยะหลังการให้น้ำ 2 วันและ 14 วัน และเก็บตัวอย่างจากกลุ่มที่ให้น้ำปกติที่ระยะเวลาเดียวกันทุกครั้ง เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C หลังจากนั้นนำมาสกัด RNA โดยใช้ TRIzolTM Reagent (Invitrogen, USA) และนำไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer

หลังจากนั้นนำมาสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ cDNA synthesis kit (Fermentas) สังเคราะห์ cDNA จาก total RNA แล้วจึงนำ cDNA มาทำ PCR เพื่อการแสดงผลออกยีน หลังจากนั้น เปรียบเทียบระดับการแสดงออกยีนแต่ละยีน

เปรียบเทียบการแสดงออกยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการให้ผลผลิตเสถียรภาพของ ข้าวในสภาวะแล้ง

จากผลการศึกษาการแสดงออกของยีน ได้คัดเลือกกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกในกลุ่มข้าวที่มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของผลผลิตไม่มากต่างจากกลุ่มสายพันธุ์ข้าวที่มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของผลผลิตมากมาศึกษาการแสดงออกยีนในช่อดอกที่ระยะก่อนงอการให้น้ำ 1 วันและหลังการให้น้ำทุก ๆ 2 วัน ด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อศึกษาดูว่ายีนที่สนใจมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกเป็นอย่างไรบ้างและจะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงในวันที่เท่าไรหลังการให้น้ำเมื่อเทียบกับสภาวะปกติ

ศึกษาการแสดงออกยีนที่สนใจในส่วนต่าง ๆ ของข้าว

การศึกษาศึกษาการแสดงออกยีนที่สนใจในส่วนต่าง ๆ ของข้าว คือ ใบ ราก ลำต้นและช่อดอก เพื่อดูว่ายีนที่สนใจนี้มีการแสดงออกเฉพาะในช่อดอกหรือมีการแสดงออกที่ส่วนอื่น ๆ ของข้าวด้วย โดยจะเก็บตัวอย่างใบ ราก ลำต้นและช่อดอกของข้าวแต่ละสายพันธุ์ในสภาวะปกติมาสกัด RNA ด้วย TRIzolTM Reagents (Invitrogen , USA) และนำไปศึกษาการแสดงออกยีนโดยเทคนิค RT-PCR

การศึกษาลำดับเบส Promoter ของยีนที่สนใจในข้าวแต่ละพันธุ์

นำยีนที่สนใจที่คาดว่าจะมีผลต่อการเพิ่มเสถียรภาพของผลผลิตในสภาวะแล้งไปหาลำดับเบสในส่วนของ Promoter ในข้าวพันธุ์ที่เห็นความแตกต่างของการแสดงออกยีน การหาลำดับเบสของ promoter ทำได้โดยการนำลำดับเบสของยีนที่สนใจในฐานะข้อมูลของ http://www.gramene.org/Oryza_sativa/ ในส่วนที่อยู่เหนือ ATG ประมาณ 1.8 kb มาออกแบบ

primer โดยใช้โปรแกรม Primer 3 (<http://workbench.sdsc.edu/>) กำหนดให้ขนาดของผลผลิต PCR ประมาณ 700-800 bp และแต่ละผลผลิต PCR จะต้องมีส่วนที่ Overlap กันประมาณ 100 bp เพื่อจะได้นำลำดับเบสมาต่อกันได้ หลังจากได้ primer แล้วนำไปทำ PCR กับตัวอย่าง DNA ของข้าวแต่ละพันธุ์ที่สนใจ สกัด DNA ด้วยวิธี Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) หลังจากได้ผลผลิต PCR แล้วนำส่งไปหาลำดับเบส ที่บริษัท Macrogen (ประเทศเกาหลี) หลังจากนั้น นำลำดับเบสของแต่ละชิ้น มาต่อกันด้วยโปรแกรม Blast ใน <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi> แล้วนำไปวิเคราะห์ Promoter motif และหา *cis*-acting element ในข้าวแต่ละพันธุ์เนื่องจาก *cis*-acting element เป็นส่วนที่ควบคุมการจับของ Transcription factors อื่น ๆ ซึ่งอาจจะมีผลในการควบคุมการแสดงออกอื่น โดยใช้โปรแกรม PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) หลังจากนั้นนำ *cis*-acting element ที่ได้ไปเปรียบเทียบกันเพื่อหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มข้าวที่มีเสถียรภาพการให้ผลผลิตมาก กับข้าวกลุ่มที่มีเสถียรภาพการให้ผลผลิตน้อย ในสภาวะแล้ง