



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์

สาขา

พันธุศาสตร์

ภาควิชา

เรื่อง การโคลนยีน *Arsenate reductase* และ *Phytochelatinsynthase* ที่ตอบสนองต่อสารหนู
ในข้าวขาวดอกมะลิ 105

Cloning of *Arsenate reductase* and *Phytochelatinsynthase* genes related to arsenic
response in Khoaw Dok Mali 105 rice

นามผู้วิจัย นางสาวปรรรัตน์ ปฏิพิพัฒน์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์อรุณทิพย์ ธรรมชัยพิเนต, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลนยีน *Arsenate reductase* และ *Phytochelatase synthase* ที่ตอบสนองต่อสารหนูใน

ข้าวขาวดอกมะลิ 105

Cloning of *Arsenate reductase* and *Phytochelatase synthase* genes related to arsenic response in

Khoaw Dok Mali 105 rice

โดย

นางสาวปวรรณ ปฏิพัฒน์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปวรรัตน์ ปฏิพัฒน์ 2557: การโคลนยีน *Arsenate reductase* และ *Phytochelatin synthase* ที่ตอบสนองต่อสารหนูในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์, Ph.D. 99 หน้า

การสะสมสารหนู (arsenic, As) ในพืชเป็นปริมาณสูงจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช ดังนั้นเมื่อพืชได้รับสารหนูเข้าทางเซลล์ราก จึงเกิดกลไกการลดความเป็นพิษของสารหนูที่เข้าสู่เซลล์พืชด้วยเอนไซม์หลัก คือ *arsenate reductase* (AR) และ *phytochelatin synthase* (PCS) งานวิจัยนี้ได้โคลนยีนสองชนิดที่เกี่ยวข้องกับกลไกดังกล่าวจากรากของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับสารหนู โดยพบว่ายีน *arsenate reductase* ที่โคลนได้ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 414 คู่เบส กำหนดการสร้างสายโพลีเปปไทด์ 137 เรสซิดิวส์ ที่ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนส่วนอนุรักษ์ HisCys(X)₃Arg ซึ่งมีหน้าที่สำคัญต่อปฏิกิริยารีดักเทส และพบว่ามี ความคล้ายกับ *arsenate reductase* ที่ได้จากข้าวแอฟริกา (*Oryza glaberrima* Steud.) นอกจากนี้ ยังประสบความสำเร็จในการโคลนบางส่วนของยีน *phytochelatin synthase* ขนาด 1,251 คู่เบส ที่กำหนดการสร้างสายโพลีเปปไทด์ที่มีความยาวกรดอะมิโน 416 เรสซิดิวส์ ลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายกับ *phytochelatin synthase* จากข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) ทั้งยังพบกรดอะมิโนส่วนอนุรักษ์ CysCys(X)₃Cys(X)₂Cys บริเวณปลาย C-terminal ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการจับกับโลหะหนักและสารหนู การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *arsenate reductase* และ *phytochelatin synthase* ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR ในรากของข้าว 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวเจ้า (พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ ไรซ์เบอร์รี่) และ ข้าวเหนียว (พันธุ์ กข 6 และ หางยี 71) พบว่า โดยปกติ การแสดงออกของยีน *arsenate reductase* และ *phytochelatin synthase* พบสูงที่สุดในรากของข้าวเหนียว กข 6 และ ข้าวเจ้าขาวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม หลังจากข้าวได้รับสารหนู (50 μ M) พบว่าการแสดงออกของยีน *arsenate reductase* สูงขึ้นเป็น 2.3, 1.02 และ 0.3 เท่า ในรากข้าวขาวดอกมะลิ 105 หางยี 71 และ ไรซ์เบอร์รี่ ตามลำดับ สำหรับข้าวเหนียว กข 6 การแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ในขณะที่การแสดงออกของยีน *phytochelatin synthase* เพิ่มขึ้นเป็น 2.5, 1.4 และ 0.4 เท่า ในรากข้าวเจ้าไรซ์เบอร์รี่ ข้าวเหนียว กข 6 ข้าวเจ้าขาวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ และไม่พบการเปลี่ยนแปลงในข้าวเหนียวหางยี 71

Pawonrat Patipipat 2014: Cloning of *Arsenate reductase* and *Phytochelatin synthase* genes related to arsenic response in Khoaw Dok Mali 105 rice. Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Associate Professor Pattana Srifah Hunhne, Ph.D. 99 pages.

Accumulation of arsenic (As) in plant at high level can severely inhibit plant growth. Therefore, when plants uptake arsenic substance into root cells, arsenic detoxification mechanism in plant cells is activated by major enzymes such as arsenate reductase (AR) and phytochelatin synthase (PCS). In this study, two involving detoxification genes were cloned from root of arsenic-treated *Oryza sativa* L. ssp. *indica*, cv. Khao Dawk Mali 105 (Jasmine rice). The results showed that the cloned gene consists of 414 bp encoding a polypeptide with 137 amino acids long. This encoded amino acid sequences contain the consensus motif HisCys(X)₃Arg that is essential for reductase activity and are similar to the arsenate reductase polypeptide from African rice (*Oryza glaberrima* Steud.). Moreover, the partial *phytochelatin synthase* gene, containing 1,251 bp, was successfully cloned. The obtained *phytochelatin synthase* gene encoded for 416 amino acid polypeptides which highly related to phytochelatin synthase from wheat (*Triticum aestivum* L.). The deduced amino acid sequence contained consensus motif CysCys(X)₃Cys(X)₂Cys at C-terminal which serves as a sensor for heavy metal ions and arsenic. The expression levels of *arsenate reductase* and *phytochelatin synthase* genes in four different rice cultivars, *Oryza sativa* var. *indica* (Khao Dawk Mali 105 and Riceberry) and *O. sativa* var. *glutinosa* (Korkhor 6 and Hang Yi 71) were analyzed by quantitative real-time PCR. Normally, the most expression level of *arsenate reductase* and *phytochelatin synthase* genes shows in Korkhor 6 and Khao Dawk Mali 105, respectively. However, after exposure to arsenic (50 µM), the expression of *arsenate reductase* was up-regulated to 2.3, 1.02 and 0.3X in roots of Khao Dawk Mali 105, Hang Yi 71 and Riceberry, but did not in Korkhor 6. While the expression of *phytochelatin synthase* gene was up-regulated to 2.5, 1.4 and 0.4X in roots of Riceberry, Korkhor 6 and Khao Dawk Mali 105 and no gene expression change found in Hang Yi 71.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้ช่วยในการวางแผนการวิจัย ให้คำปรึกษาแนะนำและชี้แนวทางในการแก้ปัญหา ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาพันธุศาสตร์ นักวิจัยของสถาบันวิจัยจุพภรณ์และสมาชิกห้องปฏิบัติการ 4505 ที่คอยสั่งสอน ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนสำเร็จ

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง ในภาควิชาพันธุศาสตร์ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้มาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงสำหรับคุณพ่อ คุณแม่ และน้องสาว ทุกคนในครอบครัวที่ให้ความรัก ความเข้าใจและกำลังใจ ให้การสนับสนุนในการศึกษาตลอดมา

ปวรรัตน์ ปฏิพิพัฒน์
มิถุนายน 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	27
ผลและวิจารณ์	34
สรุปและข้อเสนอแนะ	65
สรุป	65
ข้อเสนอแนะ	65
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	66
ภาคผนวก	77
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	99

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สรุปผลการวิเคราะห์ฐานข้อมูลโลหะหนักในดินเกษตรกรรมที่ใช้ปลูกข้าว	7
2	ปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากรากข้าว	34
3	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนยีน <i>arsenate reductase</i>	37
4	การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนองค์ประกอบของยีน <i>arsenate reductase</i> ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับพืชชนิดอื่น	41
5	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนยีน <i>phytochelatase synthase</i>	46
6	การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนองค์ประกอบของยีน <i>phytochelatase synthase</i> ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับพืชชนิดอื่น	53
7	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของด้วยวิธี quantitative real-time PCR	58
8	ระดับการแสดงออกของยีน <i>arsenate reductase</i> และ <i>phytochelatase synthase</i> ในรากข้าว 4 สายพันธุ์ที่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนเท่า (X) เมื่อได้รับสารหนู (50 μ M) นาน 1 สัปดาห์	63

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
1	สรุปผลการวิเคราะห์ฐานข้อมูลโลหะหนักในดินเกษตรกรรมที่ใช้ปลูกข้าว	88
2	ข้อมูลการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน <i>arsenate reductase</i>	93
3	ระดับการแสดงออกของยีน <i>arsenate reductase</i> (relative expression ratio) ใน รากข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ได้รับและไม่ได้รับสารหนู	95
4	ข้อมูลการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน <i>phytochelatase synthase</i>	96
5	ระดับการแสดงออกของยีน <i>phytochelatase synthase</i> (relative expression ratio) ในรากข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ได้รับและไม่ได้รับสารหนู	98

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การรับและลำเลียงอาร์เซนไนต์เข้าสู่ต้นข้าว	11
2	การรับสารหนู ปฏิกิริยาเคมีและการขนส่งสารหนูในต้นข้าว	14
3	ขบวนการสังเคราะห์ phytochelatins ในพืชชั้นสูง	18
4	ต้นข้าว 4 สายพันธุ์ที่ได้รับและไม่ได้รับสารหนูเป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากต้นข้าวอายุ 3 สัปดาห์ (ได้รับการอนุเคราะห์จากนางสาวกฤษฎา พินิจ นักวิจัยประจำห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์)	28
5	เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการสกัดอาร์เอ็นเอจากรากข้าวด้วย trizol reagent (1) ข้าวดอกมะลิ 105 (control) (2) ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (As treated) (3) ไรซ์เบอร์รี่ (control) (4) ไรซ์เบอร์รี่ (As treated) (5) กข 6 (control) (6) กข 6 (As treated) (7) หางยี 71 (control) (8) หางยี 71 (As treated)	35
6	การวิเคราะห์ multiple alignment ของ arsenate reductase จากลำดับนิวคลีโอไทด์ (ก) และกรดอะมิโน (ข) ที่มีในฐานข้อมูล ตำแหน่งอนุรักษ์ที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์แสดงในกรอบสี่เหลี่ยม	36
7	การสังเคราะห์ยีน <i>arsenate reductase</i> ด้วยวิธีพีซีอาร์ (ก) แผนภาพการสังเคราะห์ของยีน <i>arsenate reductase</i> (ข) เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของชิ้นดีเอ็นเอของยีน <i>arsenate reductase</i> ขนาด 414 คู่เบส	38
8	การตรวจสอบพลาสมิดที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอยีน <i>arsenate reductase</i> (ก) ยีน <i>arsenate reductase</i> ที่สังเคราะห์ได้จากโคลนีสีขาวทั้งหมด 8 โคลน (59-93) (ข) พลาสมิดสายผสมของยีน <i>arsenate reductase</i> (59-93) เปรียบเทียบกับ (C) พลาสมิด pGEM®-T Easy ที่ไม่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ	39
9	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>arsenate reductase</i> มีขนาด 414 คู่เบสที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนความยาว 137 เรสซิดิวส์ ส่วนที่ขีดเส้นใต้แสดง start codon (ATG) และ stop codon (TAA)	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
10	การทำ multiple alignment เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน arsenate reductase ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับพืชชนิดอื่น บริเวณอนุรักษ์ HisCys(X) ₅ Arg แสดงในกรอบสี่เหลี่ยม	42
11	phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของ arsenate reductase ในข้าวขาวดอกมะลิ 105กับพืชชนิดอื่นอีก 10 ชนิด (วิเคราะห์ด้วย neighbor-joining method, ทำซ้ำทั้งหมด 1000 ครั้ง)	43
12	การวิเคราะห์ multiple alignment ของ phytochelatin synthase จากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนจากที่มีในฐานข้อมูล ตำแหน่งอนุรักษ์ที่ใช้อยู่แบบไพรเมอร์แสดงในกรอบสี่เหลี่ยม	45
13	การสังเคราะห์ยีน <i>phytochelatin synthase</i> ด้วยวิธีพีซีอาร์ (ก) แผนภาพการสังเคราะห์ของยีน <i>phytochelatin synthase</i> บริเวณปลาย 3' (ข) เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของชิ้นดีเอ็นเอของยีน <i>phytochelatin synthase</i> บริเวณปลาย 3' ขนาดประมาณ 1500 คู่เบส	47
14	การสังเคราะห์ยีน <i>phytochelatin synthase</i> ด้วยวิธีพีซีอาร์ (ก) แผนภาพการสังเคราะห์ของยีน <i>phytochelatin synthase</i> (ข) เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของชิ้นดีเอ็นเอของยีน <i>phytochelatin synthase</i> บริเวณกลางยีนขนาด 398 คู่เบส	48
15	การตรวจสอบพลาสมิดที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอยีน <i>phytochelatin synthase</i> บริเวณปลาย 3' (ก) ยีน <i>phytochelatin synthase</i> ที่สังเคราะห์ได้จากโคโลนีสีขาว (ข) พลาสมิดสายผสมของยีน <i>phytochelatin synthase</i> เปรียบเทียบกับ (C) พลาสมิด pGEM®-T Easy ที่ไม่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ	49
16	การตรวจสอบพลาสมิดที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอยีน <i>phytochelatin synthase</i> บริเวณกลางยีน (ก) ยีน <i>phytochelatin synthase</i> ที่สังเคราะห์ได้จากโคโลนีสีขาว (ข) พลาสมิดสายผสมของยีน <i>phytochelatin synthase</i> บริเวณกลางยีนเปรียบเทียบกับ (C) พลาสมิด pGEM®-T Easy ที่ไม่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ	50
17	แผนภาพการสังเคราะห์ของยีน <i>phytochelatin synthase</i> บริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้อนทับกันแสดงในกรอบสี่เหลี่ยม	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่มีการแปลรหัสของยีน <i>phytochelatase</i> ขนาด 1,251 คู่เบส ที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนความยาว 416 เรสซิดิวส์ จากลำดับเบสทั้งหมด 1,876 ส่วนที่ขีดเส้นใต้แสดง stop codon (TAA) และ poly A signal (ATTAAA)	52
19	การทำ multiple alignment เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน <i>phytochelatase</i> ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับพืชชนิดอื่นๆ บริเวณอนุรักษ์ CysCysXXXCysXXCys แสดงในกรอบสี่เหลี่ยม	54
20	phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของ <i>phytochelatase</i> ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับพืชชนิดอื่นๆ 11 ชนิด (วิเคราะห์ด้วย neighbor-joining method, ทำซ้ำทั้งหมด 1000 ครั้ง)	56
21	ระดับการแสดงออกของยีน <i>arsenate reductase</i> ในรากข้าว 4 สายพันธุ์ที่ได้รับ (50 μ M) และไม่ได้รับสารหนู (0 μ M) ตรวจสอบด้วยวิธี qPCR (ก) กราฟแท่งแสดงระดับการแสดงออกของยีน <i>arsenate reductase</i> (ข) ปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>arsenate reductase</i> ที่สังเคราะห์ด้วย RT-PCR จำนวน 27 รอบ (ค) ปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>arsenate reductase</i> ที่ได้จากการทำ qPCR จำนวน 40 รอบ (ง) ปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>eukaryotic elongation factor 1-alpha</i> ที่ได้จากการทำ RT-PCR จำนวน 27 รอบ	60
22	ระดับการแสดงออกของยีน <i>phytochelatase</i> ในรากข้าว 4 สายพันธุ์ที่ได้รับ (50 μ M) และไม่ได้รับสารหนู (0 μ M) ตรวจสอบด้วยวิธี qPCR (ก) กราฟแท่งแสดงระดับการแสดงออกของยีน <i>phytochelatase</i> (ข) ปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>phytochelatase</i> ที่สังเคราะห์ด้วย RT-PCR จำนวน 27 รอบ (ค) ปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>phytochelatase</i> ที่ได้จากการทำ qPCR จำนวน 40 รอบ (ง) ปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>eukaryotic elongation factor 1-alpha</i> ที่ได้จากการทำ RT-PCR จำนวน 27 รอบ	62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
1 แผนที่ยีนของพลาสมิด pGEM-T easy	78
2 การวิเคราะห์ multiple alignment ของยีน <i>arsenate reductase</i> จาก sequence ที่มีในฐานข้อมูล โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งของไพรเมอร์แสดงในกรอบสี่เหลี่ยม	79
3 การวิเคราะห์ multiple alignment ของยีน <i>phytochelatinsynthase</i> จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล GenBank ตำแหน่งของไพรเมอร์แสดงในกรอบสี่เหลี่ยม	81
4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>phytochelatinsynthase</i> จากผลผลิตพีซีอาร์บริเวณกลางยีน (ขีดเส้นใต้) และ บริเวณปลาย 3' ตัวหนาแสดงส่วนที่เป็น stop codon (TAA) และ poly A signal (ATTAAA) บริเวณที่ซ้อนทับกันแสดงในกรอบสี่เหลี่ยม	85
5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>arsenate reductase</i> ด้วยวิธี quantitative real-time PCR (ก) amplification plot ของยีน <i>eukaryotic elongation factor 1-alpha</i> (ข) amplification plot ของยีน <i>arsenate reductase</i> และ <i>eukaryotic elongation factor 1-alpha</i> (ค) melting curve	86
6 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>phytochelatinsynthase</i> ด้วยวิธี quantitative real-time PCR (ก) amplification plot ของยีน <i>eukaryotic elongation factor 1-alpha</i> (ข) amplification plot ของยีน <i>phytochelatinsynthase</i> และ <i>eukaryotic elongation factor 1-alpha</i> (ค) melting curve	87

การโคลนยีน *Arsenate reductase* และ *Phytochelatinsynthase* ที่ตอบสนองต่อสารหนู ในข้าวขาวดอกมะลิ 105

Cloning of *Arsenate reductase* and *Phytochelatinsynthase* genes related to arsenic response in Khoaw Dok Mali 105 rice

คำนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย ทั้งนี้เพราะการเกษตรส่วนใหญ่ของประเทศไทยปลูกข้าวเป็นพืชหลัก ประเทศไทยมีพื้นที่สำหรับการเพาะปลูกข้าวประมาณ 67 ล้านไร่ หรือคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่การเกษตรทั้งหมด ปัจจุบันข้าวยังเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ ในแต่ละปีข้าวที่เหลือจากการบริโภค จะถูกส่งไปจำหน่ายยังประเทศต่างๆ ประเทศไทยครองความเป็นอันดับหนึ่งในการส่งออกข้าว นับตั้งแต่ พ.ศ. 2522 เป็นต้นมา โดยส่งออกข้าวสารประมาณ 3 ล้านตันและสูงถึง 6 ล้านตันในปี พ.ศ. 2540 (เปรม, 2556) แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการด้านการผลิตของประเทศไทยซึ่งเหนือกว่าหลายประเทศที่เป็นคู่แข่งสำคัญ เช่น อินเดีย เวียดนาม พม่า และสหรัฐอเมริกา ปัญหาอย่างหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อส่งออกข้าวในหลายประเทศ คือ พบว่ามีการปนเปื้อนของสารหนูในเมล็ดข้าว ซึ่งนอกจากจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพของข้าวแล้วยังส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่บริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก จากการสำรวจเมล็ดข้าวในปัจจุบันพบว่าการปนเปื้อนสารหนูมาจากดินที่ใช้ปลูกข้าว (Meharg *et al.*, 2008) โดยเฉพาะเมื่อปลูกข้าวในที่ชุ่มน้ำหรือน้ำท่วม และน้ำที่ปนเปื้อนสารหนู สารหนูจะถูกดูดซึมจากรากส่งต่อผ่านท่อลำเลียงน้ำไปยังยอดและสะสมในเมล็ดข้าวในที่สุด (Zhao *et al.*, 2008) เนื่องจากสารหนูไม่ใช่ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อพืช ดังนั้นหากพืชได้รับสารหนูและเกิดการสะสมในพืชเป็นปริมาณสูงมีผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชได้ นอกจากนี้สารหนูที่สะสมในเมล็ดข้าวยังจัดเป็นสารพิษที่มีผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์โดยตรงในระดับรุนแรง การได้รับสารหนูในปริมาณมากมักจะมีอาการเฉียบพลัน เช่น ปวดท้อง ท้องเสีย วิงเวียน อาเจียน กล้ามเนื้อเกร็งและอาจเสียชีวิต แต่ถ้าได้รับในปริมาณน้อยๆ สะสม จะทำให้มีอาการเรื้อรัง เช่น มีตุ่มขึ้นตามบริเวณฝ่ามือฝ่าเท้า ผิวหนังเปลี่ยนสีเป็นจุดสีน้ำตาล และอาจส่งผลกระทบต่อระบบเลือด ระบบประสาท (Meharg, 2004)

สารหนูที่พบในเซลล์สิ่งมีชีวิตจัดเป็นอนินทรีย์สารที่อยู่ใน 2 รูปแบบ คือ อาร์เซเนต (arsenate, As(V)) และ อาร์เซไนต์ (arsenite, As(III)) ในเซลล์พืชอาร์เซเนตจะถูก reduce ให้เป็นอาร์เซไนต์โดยเอนไซม์ *arsenate reductase* (AR) (Ghosh *et al.*, 1999) สารหนูอาร์เซไนต์บางส่วน

จะถูกส่งขึ้นไปยังยอดแล้วสะสมในเมล็ด บางส่วนจะเข้าจับกับโปรตีน phytochelatins (PCs) ซึ่งถูกสร้างมาจากเอนไซม์ phytochelatase (PCS) โดยใช้ glutathione (GSH) เป็นสารตั้งต้น อาร์เซไนต์จะจับเข้ากับโปรตีน phytochelatase รวมเป็น complex และเข้าไปสะสมในแวคิวโอลเพื่อลดความเป็นพิษในเซลล์ (Waqar *et al.*, 2009) ดังนั้น การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์และโปรตีนต่างๆ ในกระบวนการเมตาบอลิซึมเหล่านี้จึงมีผลต่อการสะสมสารหนูในเซลล์ของพืช

เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาชนิดของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารหนูในข้าวสายพันธุ์ไทยที่ปลูกเป็นการค้า ดังนั้นในการศึกษารุ่นนี้จึงมุ่งเน้นไปที่ชนิดของยีนที่เกี่ยวข้องกับการลดความเป็นพิษของสารหนู พร้อมทั้งศึกษาความไวในการตอบสนองของยีนที่มีต่อสารหนูในข้าว 4 สายพันธุ์ ทั้งข้าวเจ้าที่มีเมล็ดสีขาวและสีแดงรวมทั้งข้าวเหนียว ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานต่อสารหนูได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์

เพื่อโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเมตาบอลิซึมของสารหนู จำนวน 2 ยีน คือ *arsenate reductase (AR)* และ *phytochelatin synthase (PCS)* ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 และศึกษาการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ในข้าวไทย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวขาวดอกมะลิ 105, ข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่, ข้าวเหนียว กข 6 และข้าวเหนียวหางยี 71



การตรวจเอกสาร

1. ความเป็นพิษของสารหนูต่อมนุษย์

สารหนูที่พบในธรรมชาตินั้นมีอยู่สองรูปแบบ คือ สารหนูในรูปอินทรีย์และอนินทรีย์ สารหนูที่อยู่ในรูปอินทรีย์จะมีความเป็นพิษน้อยกว่า เนื่องจากสารหนูที่อยู่ในรูปอินทรีย์นั้นสามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้น้อยเมื่อเทียบกับสารหนูอนินทรีย์และยังขับออกจากร่างกายได้เร็วกว่าอีกด้วย เมื่อร่างกายของมนุษย์ได้รับสารหนูจะเกิดอาการเป็นพิษซึ่งมีอยู่สองกรณีคือ อาการเป็นพิษแบบเฉียบพลันและอาการเป็นพิษแบบเรื้อรัง (ศูนย์ข้อมูลพิษวิทยา, 2545)

อาการพิษเฉียบพลันนั้นจะพบเมื่อได้รับสารหนูปริมาณมาก กรณีนี้ผู้ป่วยจะมีการปวดท้องอย่างรุนแรง ท้องเสีย วิงเวียน อาเจียน แน่นหน้าอก กล้ามเนื้อเกร็ง หดสติและอาจเสียชีวิตได้ หากผู้ป่วยยังไม่เสียชีวิตในเวลาอันสั้นก็อาจพบว่ามีผื่นร่วงทั้งศีรษะและอาการทางผิวหนัง เช่น ผื่นลอกหรือเป็นแผลพุพองไปทั่วทั้งตัว ซึ่งอาการที่แสดงออกมาจะเป็นอย่างไรนั้นขึ้นอยู่กับบริเวณที่รับสารหนู รูปแบบและปริมาณที่ได้รับ เช่น (กฤษณา, 2550)

(1) หากได้รับสารหนูทางการหายใจจะส่งผลให้ระคายเคืองเยื่อทางเดินหายใจ ผู้ป่วยจะเริ่มมีอาการไอ เจ็บคอ หายใจได้ลำบาก อาจมีอาการรุนแรงจนคออักเสบ ปอดบวม น้ำ หรือถึงขั้นระบบหายใจล้มเหลว

(2) หากสัมผัสสารพิษทางผิวหนังจะทำให้เกิดการระคายเคือง สารหนูจะไปกัดกร่อนผิวหนังทำให้ผิวหนังเป็นผื่นและเกิดการอักเสบ

(3) หากสัมผัสสารพิษทางตาจะทำให้ระคายเคืองตา มีอาการคันตา แสบตา น้ำตาไหล เยื่อตาอักเสบ ผู้ป่วยอาจมีอาการแพ้แสงและมองเห็นภาพไม่ชัดตามมา

(4) หากสัมผัสสารพิษทางการกิน จะเกิดอาการแสบริมฝีปาก ลมหายใจมีกลิ่นคล้ายกระเทียม ผู้ป่วยอาจรู้สึกติบตันในลำคอกลืนอาหารได้ลำบาก ต่อมาผู้ป่วยอาจมีอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ถ่ายอุจจาระเป็นเลือดหรือเป็นสีเหมือนน้ำชาขาว

(5) หากได้รับสารหนูในรูปของแก๊สอาร์ซีน (arsine) หลังได้รับแก๊สประมาณ 2-4 ชั่วโมง จะมีอาการปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน หายใจติดขัด ปวดท้องบริเวณลำไส้ใหญ่ มีอาการเม็ดเลือดแดงแตก หากได้รับแก๊สอาร์ซีนในปริมาณมากจะทำให้เสียชีวิตทันทีโดยไม่แสดงอาการพิษอื่นๆ (กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

อาการเป็นพิษเรื้อรังนั้นจะพบเมื่อผู้ป่วยได้รับสารหนูในปริมาณน้อยแล้วสะสมจนมีระดับสูงขึ้น โดยที่ผู้ป่วยไม่ได้รู้สึกถึงความเป็นพิษจนกว่าจะมีอาการแสดงออกมา อาการที่พบมักเป็นอาการเรื้อรัง เช่น มีคุ่มขึ้นตามบริเวณฝ่ามือฝ่าเท้า ผิวหนังเปลี่ยนสีเป็นจุดสีน้ำตาล และอาจส่งผลต่อระบบเลือด ระบบประสาท รวมถึงอวัยวะต่างๆ เช่น ตับและไต ผู้ป่วยมักจะมีร่างกายทรุดโทรม ผอม ซีด อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร มีอาการชาตามปลายมือปลายเท้า มีการศึกษาพบว่าผู้ที่อาศัยในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของสารหนูนั้นมีความเสี่ยงสูงต่อการเป็นมะเร็งหลายชนิด แต่ที่แน่นอนที่สุดคือ มะเร็งผิวหนัง มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และมะเร็งปอด เป็นต้น

อาการแสดงร่วมของความเป็นพิษทั้งชนิดเฉียบพลันและเรื้อรังคือ พบเส้นลายขวางสีขาวที่เล็บ (Mee's lines) พบเซลล์ผิวหนังหนาบริเวณฝ่ามือ หน้าแดง และเหงื่อออก นอกจากนี้สารหนูสามารถผ่านรกได้ ทำให้เกิดผลต่อทารกในครรภ์ ทารกมีภาวะน้ำหนักแรกคลอดน้อย หรือเกิดความผิดปกติในครรภ์ได้ (กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

สารหนูสามารถเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์ได้หลายทางไม่ว่าจะเป็นการหายใจ เช่น การรับฝุ่นไอ หรือหมอกควันที่มีสารหนูปนเปื้อน การสัมผัสทางผิวหนังและการรับประทานอาหารหรือน้ำดื่มที่มีการปนเปื้อนของสารหนูเข้าไป โดยส่วนใหญ่แล้วมักจะเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์จากการบริโภคอาหารแล้วดูดซึมผ่านทางเดินอาหารมากกว่ากรณีอื่นๆ อย่างไรก็ตามมีการศึกษาวิจัยพบว่าร่างกายของมนุษย์นั้นสามารถขับสารหนูออกมาได้เองเมื่อได้รับสารหนูปริมาณไม่มากนัก โดยพบว่า ประมาณ 80-90% ของสารหนูที่เข้าสู่ร่างกาย จะถูกกำจัดออกจากร่างกายทางปัสสาวะภายในเวลา 2 วัน (Buschmann *et al.*, 2007) องค์การอนามัยโลก (WHO, 1981) รายงานว่า เมื่อสารหนูเข้าสู่ร่างกายจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดก่อนส่งต่อไปยังอวัยวะอื่นๆ แล้วในที่สุดจะถูกขับออกมาทางปัสสาวะ อุจจาระ บางส่วนจะสะสมอยู่ในเส้นผม และเล็บ พบว่าการขับออกทางลมหายใจมีน้อยมาก เมื่อได้รับสารหนูในวันแรกจะมีการขับออกทางปัสสาวะร้อยละ 25 และหลังจากนั้นร่างกายจะขับออกทางปัสสาวะและอุจจาระเรื่อยๆ ภายใน 12 วัน ถ้าหากสารหนูถูกขับออกไปไม่หมดจะไปสะสมที่เส้นผมและกระดูก

2. การกระจายของสารหนูในสิ่งแวดล้อม

สารหนูเป็นธาตุเคมีที่สามารถพบในดิน หิน น้ำ และอากาศ ซึ่งเป็นสารที่สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติหรือเกิดจากการปนเปื้อนที่มาจากการกระทำของมนุษย์ (Meharg, 2004)

ในธรรมชาติสารหนูจะอยู่ในรูปของสารประกอบภายในหินและแร่ต่างๆ สารหนูที่พบกระจายตามธรรมชาติเกิดจากการผุพังของเปลือกโลกหรือจากการชะล้างโดยน้ำฝน เมื่อฝนตก

น้ำฝนจะไปชะล้างหินและแร่ที่มีสารหนูเป็นองค์ประกอบแล้วกระจายลงสู่สิ่งแวดล้อมไม่ว่าจะเป็นพื้นดิน ชั้นใต้ดินหรือแหล่งน้ำตามธรรมชาติ เช่น แม่น้ำ มหาสมุทร ทะเลสาบ บึง เป็นต้น

นอกจากสารหนูจะเกิดจากธรรมชาติแล้วกิจกรรมของมนุษย์ยังเป็นผู้การสำคัญที่ทำให้เกิดการปลดปล่อยสารหนูออกสู่สิ่งแวดล้อมมากขึ้นด้วย โลหะหนักต่างๆรวมทั้งสารหนูที่ปนเปื้อนไปสู่สิ่งแวดล้อมจะถ่ายทอดไปตามห่วงโซ่อาหาร เกิดการสะสมและนำมาสู่ผลกระทบต่อมนุษย์ แหล่งที่มาของสารหนูจากกิจกรรมของมนุษย์ที่สำคัญมีหลายแหล่งด้วยกัน เช่น

(1) ด้านเกษตรกรรม การใช้สารเคมีทางการเกษตรซึ่งมีสารหนูเป็นองค์ประกอบ เช่น ยาฆ่าแมลง สารกำจัดวัชพืช ปุ๋ยซูเปอร์ฟอสเฟต (superphosphate) ซึ่งประกอบด้วยสารหนูประมาณ 1% ส่งผลให้มีการปนเปื้อนสารหนูในดินและแหล่งน้ำบริเวณที่มนุษย์ทำการเกษตร นอกจากนี้ สารหนูบางส่วนยังอาจถูกพืชดูดซับเข้าไป บางส่วนอาจปนเปื้อนในน้ำใต้ดิน เป็นต้น ซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในบริเวณพื้นที่ดังกล่าว

(2) ด้านอุตสาหกรรม พบได้มากในงานหลอมโลหะ หรือถลุงแร่ เช่น เหมืองคิงกูดอุตสาหกรรมผลิตสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ที่ใช้สารหนูเป็นส่วนผสม นอกจากนี้ มีการใช้สารหนูและสารประกอบของสารหนู ในการผลิตอัลลอยด์ (alloys) แบตเตอรี่ที่หุ้มสายเคเบิลผสมในสี อุตสาหกรรมแก้ว ใช้ในการฟอกหนัง และสารทนอมเนื้อไม้ ส่วนแก๊สอาร์ซีนีใช้มากในอุตสาหกรรมชิ้นส่วนอิเล็กทรอนิกส์

การปลดปล่อยของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม น้ำเสียจากเหมืองแร่ น้ำเสียจากชุมชนทั้งหมดนี้สามารถเป็นแหล่งกำเนิดของสารหนูหรือโลหะหนักต่างๆนำมาสู่การกระจายและสะสมในสิ่งแวดล้อม

(3) ด้านการแพทย์ ใช้รักษาโรคที่เกิดจากโปรโตซัวและพยาธิบางชนิด ผสมในยาปฏิชีวนะ โลหะอัลลอยด์ที่ใช้ในการผ่าตัด

ปริมาณสารหนูที่พบในดินนั้นมีความแตกต่างกันในปริมาณความมากน้อยซึ่งผันแปรไปในแต่ละพื้นที่ ในปี พ.ศ. 2553 สำนักงานวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดินได้จัดทำโครงการศึกษาติดตาม และพัฒนาระบบฐานข้อมูลโลหะหนักในดินที่ใช้ปลูกข้าว (ตารางผนวกที่ 1) ในพื้นที่ต่างๆของประเทศไทย ทั้งหมด 75 จังหวัด (ยกเว้นจังหวัดหนองคายและบึงกาฬ) เพื่อวิเคราะห์โลหะหนัก ได้แก่ สารหนู แคดเมียม ทองแดง ตะกั่ว และสังกะสี ที่ปนเปื้อนอยู่ในดินที่ใช้ปลูกข้าว โดยการสำรวจรวบรวมตัวอย่างตั้งแต่ เดือนพฤศจิกายน 2552 ถึง กันยายน 2553 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างดินพบว่าในพื้นที่ปลูกข้าวที่ศึกษามีค่าเฉลี่ยของโลหะหนักประเภท แคดเมียม ทองแดง ตะกั่ว และ

สังกะสีเท่ากับ 0.31, 12.97, 12.97 และ 27.33 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 1) การวิเคราะห์ข้อมูลในตารางผนวกที่ 1 พบการปนเปื้อนของสารหนูในดินมีค่าเฉลี่ย 6.93 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยพบว่าดินบริเวณอำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย มีปริมาณสารหนูมากที่สุด ถึง 26.745 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และดินในบริเวณอำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ พบการปนเปื้อนของสารหนู น้อยมาก คือ 0.653 มิลลิกรัม/กิโลกรัม อย่างไรก็ตาม ในช่วงฤดูหนาวพบปริมาณสารหนู แคดเมียม ทองแดงและสังกะสี มากกว่าในฤดูฝนซึ่งจะพบปริมาณสารปรอทสูงสุด (ตารางที่ 1) (สำนักงานวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน, 2553) โดยในปี 2547 กรมควบคุมมลพิษได้กำหนดมาตรฐานคุณภาพดินของประเทศไทยที่ใช้ประโยชน์เพื่อการอยู่อาศัยและเกษตรกรรมต้องมีสารหนูไม่เกิน 3.9 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และคุณภาพดินที่ใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ มีสารหนูไม่เกิน 27 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (กรมควบคุมมลพิษ, 2547) เนื่องจากผลจากการสำรวจดินในบางท้องที่มีการปนเปื้อนของสารหนูเกินมาตรฐาน จึงสมควรได้รับการตรวจสอบและดูแลอย่างใกล้ชิด เพราะอาจส่งผลกระทบต่อปริมาณสารหนูที่สะสมในเมล็ดข้าว

ตารางที่ 1 สรุปผลการวิเคราะห์ฐานข้อมูลโลหะหนักในดินเกษตรกรรมที่ใช้ปลูกข้าว (สำนักงานวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน, 2553)

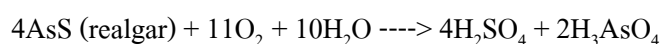
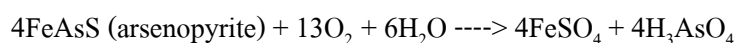
โลหะหนัก	As	Cd	Cu	Pb	Zn
			(mg/kg)		
ค่าเฉลี่ย (142 ตัวอย่าง)	6.934	0.314	12.968	12.969	27.332
ค่าเฉลี่ยในฤดูร้อน (44 ตัวอย่าง)	5.984	0.285	8.557	11.747	20.857
ค่าเฉลี่ยในฤดูหนาว (91 ตัวอย่าง)	7.639	0.338	18.625	13.422	35.414
ค่าเฉลี่ยในฤดูฝน (7 ตัวอย่าง)	3.835	0.242	10.828	15.192	30.785
ค่าสูงสุด	26.745	1.100	85.800	38.350	70.700
	จ. เชียงราย	จ. เชียงราย	จ. กรุงเทพฯ	จ. ราชบุรี	จ. นครปฐม
ค่าต่ำสุด	0.653	0.050	1.000	1.800	4.000
	จ. ชัยภูมิ	จ. นครพนม	จ. ตรัง	จ. นครพนม	จ. ตรัง

3. คุณสมบัติทางเคมีของสารหนู

สารหนูในตารางธาตุมีสัญลักษณ์คือ As เป็นธาตุกึ่งโลหะลำดับที่ 33 มีน้ำหนักโมเลกุล 74.9216 มีจุดเดือดเท่ากับ 615 องศาเซลเซียสและมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 818 องศาเซลเซียส สารหนูแสดงประจุได้หลายค่าคือ +3, +5, 0 และ -3 แต่ส่วนใหญ่จะพบในรูป +3 คือ อาร์เซนไนต์ และ +5 คือ อาร์เซนต โดยสารหนูในรูปของอาร์เซนไนต์จะมีความเสถียรและมีความเป็นพิษมากกว่าในรูปของอาร์เซนต สารหนูเป็นธาตุที่พบอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติมักสะสมอยู่ในหิน ดิน แหล่งแร่ในปริมาณที่แตกต่างกัน ธาตุสารหนูเป็นองค์ประกอบของแร่ประมาณ 245 ชนิด ที่พบทั่วไปคือ เป็นองค์ประกอบของแร่อาซิโนไฟไรต์ (arsenopyrite) ซึ่งมีปริมาณสารหนูแตกต่างกันตั้งแต่ร้อยละ 0.02-0.5 สารประกอบสารหนูสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มตามคุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพ (Cullen and Reimer, 1989) ดังนี้

1. สารประกอบอินทรีย์ ซึ่งประกอบไปด้วย กลุ่ม trivalent เช่น trimethylarsine $[(CH_3)_3As]$, dimethylarsine $[(CH_3)_2AsH]$ และกลุ่ม pentavalent เช่น dimethylarsinic acid $[(CH_3)_2AsO(OH)]$
2. สารประกอบอนินทรีย์ ซึ่งประกอบไปด้วย กลุ่ม trivalent compounds เช่น arsenic trioxide (As_2O_3) , arsenic trichloride $(AsCl_3)$, sodium arsenite $(NaAsO_2)$ และกลุ่ม pentavalent compounds (arsenate, AsV) เช่น arsenic acid (H_3AsO_4) และ arsenic pentoxide (As_2O_5)
3. แก๊สอาร์ซีน (arsine or arsenic hydride, AsH_3) เป็นแก๊สพิษที่เป็นอันตรายทำให้ถึงแก่ชีวิตได้หากได้รับในปริมาณมาก สารหนูในรูปของแก๊สอาร์ซีนนี้ไม่ควรเกิน 0.2 มิลลิกรัม/อากาศลูกบาศก์เมตร หรือ 0.05 ส่วนในล้านส่วนของอากาศ (กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

สารหนูที่เป็นองค์ประกอบของแร่ต่างๆ เช่น arsenopyrite, orpiment, realgar, cobaltite และ proustite เป็นต้น แร่เหล่านี้มักพบตามแหล่งแร่และมีอยู่ในหิน เมื่อมีการผุพังของหินหรือแร่จะทำให้สารหนูสัมผัสกับอากาศและน้ำ จึงเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแล้วเปลี่ยนสารหนูไปอยู่ในรูปของสารประกอบอาร์ซีนต (Boyle and Jonasson, 1973) ดังสมการ



กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารหนูดังสมการที่กล่าวมานี้ทำให้มีสารประกอบของสารหนูสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมตามบริเวณต่างๆ เช่น พื้นดิน พื้นน้ำ นอกจากสารหนูจะถูกปล่อยออกจากสิ่งแวดล้อมโดยธรรมชาติแล้วยังสามารถเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น ด้วยคุณสมบัติของสารหนูที่มีจุดเดือดเท่ากับ 615 องศาเซลเซียสและมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 818 องศาเซลเซียส (Jain and Ali, 2000) ทำให้ไม่ละลายน้ำและแขวนลอยอยู่ในแหล่งน้ำ เมื่อสารหนูจับตัวกับอนุภาคของดินก็จะตกตะกอนและทับถมลงสู่พื้นน้ำ สารหนูที่อยู่ในดินตะกอนตื้นๆ นั้นมีโอกาสที่จะแพร่กระจายเข้าไปสู่พืชหรือสัตว์น้ำต่างๆ โดยสารหนูที่ละลายน้ำจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้ทางระบบทางผิวหนังและทางเดินอาหาร เข้าไปสะสมในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ เมื่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ กินพืชหรือสัตว์นั้นๆ สารหนูก็จะถ่ายทอดไปสะสมในร่างกาย และเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร ซึ่งผู้บริโภคชั้นบนสุดก็คือมนุษย์ นั้นหมายความว่ามนุษย์ก็จะมีสารหนูสะสมในร่างกาย ถ้าหากได้รับสารหนูในระดับเกินค่ามาตรฐาน (0.01 mg kg^{-1}) (WHO, 2003) อาจจะทำให้เกิดอาการเป็นพิษเรื้อรัง

4. ขบวนการเมตาบอลิซึมของสารหนูในพืช

สารหนูที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม จะถูกดูดซับโดยพืชผ่านทางราก เมื่อพืชได้รับสารหนู สารหนูจะเข้าไปรบกวนขบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ในเซลล์ ซึ่งส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช ตัวอย่างเช่น สารหนูเข้าไปรบกวนการทำงานของ ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ โดยสารหนูสามารถจับกับหมู่ hydroxyl ($-OH$) ของฟอสเฟตในกรดนิวคลีอิก ได้อย่างแน่นหนา ทำให้พันธะ ester ระหว่างหมู่ฟอสเฟตกับหมู่ hydroxyl ของน้ำตาล pentose สามารถสลายได้ง่ายขึ้น (Abedin and Meharg 2002) และยังสามารถจับกับหมู่ sulfhydryl ($-SH$) บนสายพอลิเพปไทด์ซึ่งส่งผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีน นอกจากนี้ยังก่อให้เกิด reactive oxygen species และ ปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่มีผลเสียต่อเซลล์พืชอีกด้วย (Hartley-Whitaker *et al.*, 2001) ในพืชชั้นสูงชนิดต่างๆ สารหนูที่เข้าสู่เซลล์พืชยังส่งผลกระทบต่อกระบวนการ glycolysis และการสังเคราะห์ ATP (oxidative phosphorylation) ในขบวนการหายใจระดับเซลล์ (Hindmarsh, 2000)

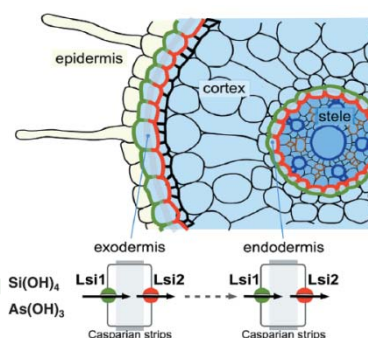
ในบรรดาพืชทั้งหมดข้าวเป็นพืชที่มีโอกาสได้รับสารหนูสูงที่สุด (Williams *et al.*, 2007) เนื่องจาก ข้าวเป็นธัญพืชที่ต้องการน้ำหล่อเลี้ยงในระหว่างการเจริญเติบโต ชาวนาจึงนิยมปลูกข้าวในพื้นที่ราบลุ่มและมีน้ำขัง ส่งผลให้พืชชนิดนี้มีโอกาสได้รับสารหนูสูงกว่าธัญพืชชนิดอื่น Xu *et al.* (2008) พบว่าในดินที่มีน้ำท่วมขัง มีปริมาณการสะสมของสารหนูมากกว่าในดินปกติ 7-16 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่า ข้าวที่ปลูกในดินที่มีน้ำขัง มีสารหนูสะสมอยู่ในยอดและเมล็ดข้าว สูงกว่าการปลูกในดินปกติ 2.6-2.9 เท่า และมีผลต่อการสะสมของสารหนูในเมล็ดข้าว ปัจจุบัน พบว่า มี

การปนเปื้อนของสารหนูในเมล็ดข้าวในปริมาณสูงขึ้น เนื่องจาก มีสารหนูกระจายสู่สิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้นจากกิจกรรมต่างๆของมนุษย์

สารหนูที่พบในเมล็ดข้าวโดยส่วนใหญ่มักพบในรูปของอนินทรีย์สาร ได้แก่ อาร์เซนิต และอาร์เซไนต์ นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในรูปของอินทรีย์สารที่ถูกเติมหมู่เมทิล ได้แก่ กรดไดเมทิลอาร์ซีนิก (dimethylarsinic acid, DMA) และ กรดโมโนเมทิลอาร์โซนิค (monomethylarsonic acid, MMA) ซึ่งมีความเป็นพิษน้อยกว่าสารหนูอนินทรีย์ (Williams *et al.*, 2005) Somenahally *et al.* (2011) รายงานว่า อาร์เซนิต, อาร์เซไนต์ และ กรดไดเมทิลอาร์ซีนิก เป็นรูปแบบของสารหนูที่มักพบใน rhizosphere และ iron plaque บริเวณรากข้าว รวมทั้งในเมล็ดข้าวด้วย Smith *et al.* (2009) ทำการศึกษาสารหนูที่สะสมในบริเวณต่างๆ ของข้าว โดยใช้ x-ray absorption near edge structure (XANES) พบสารหนูกระจายอยู่ทั่วไปตามเนื้อเยื่อต่างๆ ซึ่งส่วนมากพบอยู่ในรูปของอาร์เซไนต์

4.1 การรับสารหนู (arsenic influx)

ในสถานะที่ดินมีน้ำท่วมขังหรือในสถานะที่ขาดออกซิเจน (anaerobic environment) สารหนูมักอยู่ในรูป reduced form หรืออาร์เซไนต์ (Xu *et al.*, 2008) การรับอาร์เซไนต์เข้าสู่เซลล์สิ่งมีชีวิต ได้มีการศึกษาใน *E. coli*, ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่า อาร์เซไนต์จะเข้าสู่เซลล์ผ่านทางโปรตีนในกลุ่ม aquaporin ประเภท aquaglyceroporins ที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์เมมเบรนของพืช มีหน้าที่ในการคัดกรองให้เฉพาะโมเลกุลของน้ำและอนุภาคที่มีขนาดเล็ก เช่น กลีเซอรอล รวมทั้งอาร์เซไนต์ ผ่านเข้าออกภายในเซลล์ได้ (Bhattacharjee and Rosen, 2007) โดยโปรตีนชนิดนี้ใน *E. coli* คือ GlpF ในยีสต์ คือ Fsp1p และ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ AQP7 และ AQP9 (Liu *et al.*, 2004) การศึกษาในข้าวพบว่า อาร์เซไนต์จะเข้าสู่เซลล์รากโดยใช้ช่องทางเดียวกับซิลิกอน (Si) ผ่านทางโปรตีน ประเภท aquaglyceroporins ที่เรียกว่า nodulin26-like intrinsic protein (NIPs) หรือ silicon influx transporter (Isi1) และ อาร์เซไนต์ที่เข้าสู่เซลล์จะเข้าสู่ท่อลำเลียงน้ำผ่านทาง Si efflux transporter (Isi2) (Ma *et al.*, 2008) เมื่อรับอาร์เซไนต์เข้าสู่เซลล์ชั้นนอก (exodermis) อาร์เซไนต์จะถูกส่งต่อไปยัง Isi1 และ Isi2 ของเซลล์ชั้นใน (endodermis) ที่ทำหน้าที่ส่งผ่านอาร์เซไนต์เข้าไปยัง xylem ด้วย Isi2 จากนั้นอาร์เซไนต์จะถูกส่งต่อไปยังยอด และสะสมในเมล็ดข้าวในที่สุด (ภาพที่ 1) (Zhao *et al.*, 2008)



ภาพที่ 1 การรับและลำเลียงอาร์เซไนต์เข้าสู่ต้นข้าว

ที่มา: Zhao *et al.* (2008)

นอกจาก Lsi1 และ Lsi2 จะเป็นทางผ่านของอาร์เซไนต์แล้ว ยังเป็นช่องทางในการรับสารหนูในรูปที่ถูกเติมหมู่เมทิล ได้แก่ กรดไดเมทิลอาร์ซีนิก และ กรดโมโนเมทิลอาร์ซีนิก อีกด้วย (Li *et al.*, 2009) Dallagnol *et al.* (2009) ได้ทำการยับยั้งโปรตีน Lsi1 เพื่อลดการรับอาร์เซไนต์เข้าสู่รากข้าว พบว่า ยังส่งผลต่อการรับซิลิกอนเข้าสู่เซลล์อีกด้วย เนื่องจากซิลิกอนเป็นธาตุอาหารที่มีประโยชน์สำหรับต้นข้าว จึงทำให้ต้นข้าวชะงักการเจริญเติบโต ใบข้าวมีสีเหลืองและกระด้าง ดังนั้น การใช้ปุ๋ยที่มีซิลิกอนเป็นองค์ประกอบนอกจากจะช่วยเพิ่มผลผลิตของข้าวแล้ว ยังช่วยลดการรับอาร์เซไนต์เข้าสู่ต้นข้าวด้วย (Ma and Yamaji, 2006)

ในดินปกติที่ไม่มีน้ำท่วมขังหรือในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic environment) มักพบสารหนูในรูปของอาร์เซเนต (Meharg, 1994) อาร์เซเนตสามารถเข้าสู่เซลล์รากโดยช่องทางเดียวกับฟอสเฟต เนื่องจากสารทั้งสองชนิดมีโครงสร้างคล้ายกัน (analogue) โปรตีนที่เป็นทางผ่านของฟอสเฟตนี้ได้มีการศึกษาในพืชชนิดต่างๆ โดยพบว่ามีมากกว่า 100 ชนิด ซึ่งจัดอยู่ใน phosphate transporter 1 (Pht1) family และมีการแสดงออกเฉพาะในเซลล์ราก (Buches, 2007; Mudge *et al.*, 2002) ในอะราบิโดฟซิส (*Arabidopsis thaliana*) พบว่า Pht1;1 และ Pht1;4 ทำหน้าที่รับฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์ เมื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่โปรตีนดังกล่าว พบว่า อะราบิโดฟซิสสามารถอยู่ในสภาวะที่ปนเปื้อนอาร์เซเนตได้ดีขึ้น (Shin *et al.*, 2004) การศึกษาในข้าวพบว่าอาร์เซเนตสามารถเข้าสู่เซลล์รากผ่านทาง phosphate transporter เช่นเดียวกัน โดยฟอสเฟตที่อยู่ในดินช่วยในการลดอาร์เซเนตที่เข้าสู่เซลล์ (Zhao *et al.*, 2008)

4.2 การลดความเป็นพิษของสารหนู (arsenic detoxification)

ในเซลล์พืชอาร์เซนิกที่เข้าสู่เซลล์ผ่านทาง phosphate transporter จะถูกรีดิวซ์ให้อยู่ในรูปของอาร์เซไนต์โดยเอนไซม์ arsenate reductase และมี glutathione ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ปฏิกิริยารีดักชันโดยเอนไซม์ arsenate reductase นี้เป็นขั้นตอนแรกในขบวนการเมตาบอลิซึมของสารหนูที่เกิดขึ้นภายในเซลล์และนับว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญเพราะมีผลต่อขบวนการลดความเป็นพิษของสารหนูและการกำจัดสารหนูซึ่งเป็นขบวนการที่จะเกิดขึ้นถัดไป (Ghosh *et al.*, 1999) การเปลี่ยนรูปของอาร์เซนิกเป็นอาร์เซไนต์นั้นสามารถเกิดขึ้นได้เองโดยการรับอิเล็กตรอนจาก glutathione และไม่ต้องมีเอนไซม์มาเป็นตัวกระตุ้น (non-enzymatic pathway) แต่ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นได้ช้ามาก ดังนั้นอาร์เซไนต์ซึ่งถูกเปลี่ยนรูปมาจากอาร์เซนิกที่พบในเซลล์โดยส่วนใหญ่จึงมาจากปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวกระตุ้น (enzymatic pathway) (Delnomdedieu *et al.*, 1994)

หลังจากนั้นสารหนูอาร์เซไนต์ทั้งที่มาจากการเปลี่ยนรูปของอาร์เซนิกและการรับเข้าสู่เซลล์ผ่านทาง Isi1 จะถูกพาเข้าสู่แวคิวโอลเพื่อลดความเป็นพิษในเซลล์ โดยโปรตีน phytochelatins ที่ถูกสังเคราะห์มาจากเอนไซม์ phytochelatin synthase และมี glutathione ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น (Wagar *et al.*, 2009) อาร์เซไนต์จะเข้าจับบริเวณหมู่ sulphhydryl (-SH) ของโปรตีน phytochelatins เป็น องค์ประกอบรวมซับซ้อนซึ่งมีหลายรูปแบบก่อนที่จะถูกส่งเข้าสู่แวคิวโอล ได้แก่ As(III)-(PC₂)₂, As(III)-PC₃, และ GSH-As(III)-PC₂ เป็นต้น (Raab *et al.*, 2007) ดังนั้น เมื่อตรวจสอบภายในแวคิวโอลจึงสามารถพบองค์ประกอบซับซ้อนเหล่านี้ได้เป็นจำนวนมาก (Sneller *et al.*, 1999) การศึกษาในทานตะวัน (*Helianthus annuus*) พบว่านอกจากจะพบองค์ประกอบระหว่างอาร์เซไนต์และ phytochelatins แล้วยังพบองค์ประกอบรวมระหว่างกรดโมโนเมทิลอาร์โซนิคและ phytochelatins อีกด้วย (MMA-PC₂) (Raab *et al.*, 2005)

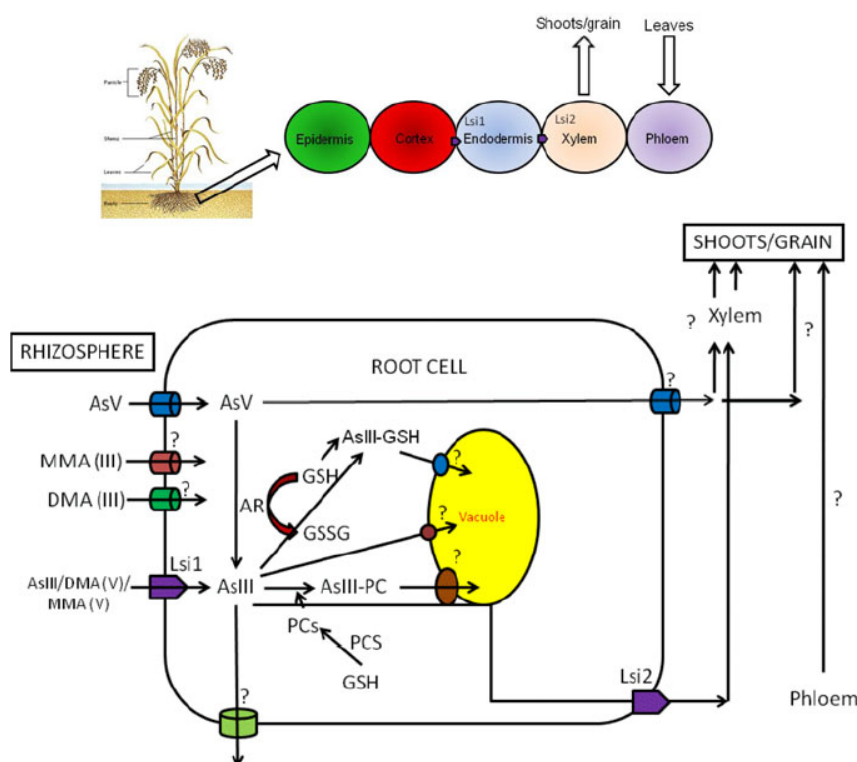
องค์ประกอบรวมของสารหนูและ phytochelatins เข้าสู่แวคิวโอลผ่านโปรตีนที่เมมเบรนชนิดใดนั้นในพืชยังไม่ทราบแน่ชัด การศึกษาในยีสต์พบว่า vacuolar membrane transporter yeast cadmium factor 1p (Ycf1p) เป็นทางผ่านขององค์ประกอบรวมของแคดเมียมหรือสารหนูกับ phytochelatins เข้าสู่แวคิวโอล โดย Ycf1p เป็นโปรตีนในกลุ่ม ATP-binding cassette (ABC) และยังเป็นทางผ่านขององค์ประกอบรวมของ Cd-(GSH)₂ และ As(III)-(GSH)₃ อีกด้วย (Li *et al.*, 1997)

4.3 การขนส่งและการปลดปล่อยสารหนู (arsenic transport and efflux)

ปริมาณสารหนูที่พบในข้าวพบบมากที่สุด คือ บริเวณราก ลำต้น ใบ เปลือกและเมล็ด ตามลำดับ (Liu *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008) สารหนูที่เข้าสู่รากจะเคลื่อนเข้าสู่ ลำต้น ใบและเข้าไปสะสมอยู่ในเมล็ด ขบวนการขนส่งสารหนูผ่านท่อลำเลียงอาหารในข้าวนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด การศึกษาในอะราบิโดฟซิส (Li *et al.*, 2006) และผักกาดก้านขาว (*Brassica napus*) (Mendoza-Cozatl *et al.*, 2008) พบว่า โปรตีน phytochelatins และ องค์ประกอบรวม Cd-PC และ Cd-GSH สามารถเคลื่อนที่สู่ยอดผ่านทางท่อลำเลียงอาหารได้ แต่องค์ประกอบรวมของโปรตีน phytochelatins และ สารหนู จะเสถียรเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีค่า pH มากกว่า 7.5 จึงไม่สามารถผ่านท่อลำเลียงอาหารซึ่งมีค่า pH เป็นกรดได้

เมื่อนำของเหลวในท่อลำเลียงน้ำ (xylem sap) มาตรวจสอบปริมาณสารหนู ในพืชหลายชนิด สารหนูที่พบโดยส่วนใหญ่มีอยู่ในรูปของอาร์เซไนต์ คิดเป็น ร้อยละ 81-100 ในข้าว (Zhao *et al.*, 2008) และยังพบ กรดไดเมทิลอาร์ซีนิกน้อยกว่าร้อยละ 4 ของสารหนูที่พบทั้งหมดใน xylem sap ของแตงกวา (*Cucumis sativus*) (Mihucz *et al.*, 2005) และมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) (Xu *et al.*, 2007) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าไม่พบองค์ประกอบรวมของโปรตีน phytochelatins และอาร์เซไนต์ ใน xylem sap ของผักกาดเขียว (*Brassica juncea*) (Pickering *et al.*, 2000) และทานตะวัน (Raab *et al.*, 2005) แสดงว่า สารหนูสามารถเคลื่อนสู่ยอดผ่านทางท่อลำเลียงน้ำในรูปของโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งมักพบในรูปของอาร์เซไนต์ เนื่องจาก ในเซลล์รากมีการเปลี่ยนรูปสารหนูอาร์เซเนตเป็นอาร์เซไนต์ได้อย่างรวดเร็ว (Zhao *et al.*, 2008)

สารหนูอาร์เซเนตสามารถเคลื่อนที่สู่ยอดผ่านทางท่อลำเลียงน้ำได้เช่นเดียวกับฟอสเฟต แต่มักไม่พบสารหนูอาร์เซเนตใน xylem sap เพราะมักถูกเปลี่ยนรูปเป็นอาร์เซไนต์โดยเอนไซม์ arsenate reductase ในเซลล์รากอย่างรวดเร็ว งานวิจัยของ Quaghebeur and Rengel (2004) ที่ศึกษาในอะราบิโดฟซิสสายพันธุ์กลาย *pho1* ซึ่งไม่สามารถเคลื่อนย้ายฟอสเฟตและอาร์เซเนตผ่านทางท่อลำเลียงน้ำได้ ส่งผลให้การสะสมอาร์เซเนตในบริเวณยอดลดลง จากนั้นสารหนูอาร์เซไนต์ที่ไม่ได้ถูกพาเข้าสู่แคว้นโวลจะเข้าสู่ท่อลำเลียงน้ำผ่านทางโปรตีน Isi2 (Ma *et al.*, 2008) การรับสารหนู ปฏิกริยาเคมีและการขนส่งสารหนูในต้นข้าวแสดงในภาพที่ 2 (Tuli *et al.*, 2010)



ภาพที่ 2 การรับสารหนู ปฏิกิริยาเคมีและการขนส่งสารหนูในต้นข้าว

ที่มา: Tuli *et al.* (2010)

การปลดปล่อยสารหนูออกจากเซลล์นั้นเป็นช่องทางหนึ่งของการลดความเป็นพิษของสารหนู ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด สารหนูมักถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์ในรูปของอาร์เซไนต์ เช่น จุลินทรีย์ต่างๆ การปลดปล่อยสารหนูจะเริ่มจากปฏิกิริยารีดักชัน เปลี่ยนสารหนูในรูปของอาร์เซเนตให้เป็นอาร์เซไนต์ก่อน จากนั้นจึงขับออกในรูปของอาร์เซไนต์ (Bhattacharjee and Rosen, 2007) ใน *E. coli* อาร์เซไนต์จะถูกขับออกจากเซลล์ผ่านทาง โปรตีน ArsB หรือ ArsAB complexes ซึ่งต้องอาศัยพลังงานจาก ATP (Dey *et al.*, 1994) และในยีสต์คือ Acr3p (Wysocki *et al.*, 1997) การศึกษาในพืช พบว่า อาร์เซไนต์จะถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์ผ่านทางโปรตีนในกลุ่ม aquaporin ช่องทางเดียวกับการรับเข้ามา โดยรูปแบบของการปลดปล่อยเป็นแบบ bidirectional passage หรือ diffusion นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด (Mitani *et al.*, 2008) Bienert *et al.* (2008) ทำการเพิ่มการแสดงออกของยีน *OsNIPs* หรือ *lsi1* ที่แยกจากข้าวในยีสต์ พบว่ายีสต์สามารถทนอยู่ในสภาวะที่เป็นอาร์เซเนตได้ดีขึ้น โดยอธิบายว่า อาร์เซเนตที่เข้าสู่เซลล์จะถูก reduce ให้อยู่ในรูปของอาร์เซไนต์ จากนั้นอาร์เซไนต์จะถูกขับออกจากเซลล์ผ่านทางโปรตีน *OsNIPs* เพื่อลดความเป็นพิษในเซลล์ Xu *et al.*

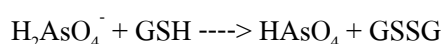
(2007) พบว่า ในมะเขือเทศสามารถปลดปล่อยสารหนูอาร์เซนตออกจากเซลล์ได้โดยใช้ช่องทางเดียวกับฟอสเฟต แต่สารหนูมักเปลี่ยนรูปเป็นอาร์เซไนต์อย่างรวดเร็ว สารหนูที่ขับออกจากเซลล์จึงมักอยู่ในรูปของอาร์เซไนต์มากกว่า

สารหนูสามารถพบกระจายได้ทั่วไปตามส่วนต่างๆ ของต้นข้าว *Abedin et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาปริมาณสารหนูที่พบในบริเวณต่างๆ ของต้นข้าวที่ปลูกในบังกลาเทศ ได้แก่ ราก ลำต้น เปลือกและเมล็ดข้าว พบว่า มีการสะสมสารหนูมากที่สุดในราก ลำต้น เปลือกและเมล็ดตามลำดับ เมื่อให้สารหนูที่ความเข้มข้นต่ำ (0.1 mg As l^{-1}) พบว่า มีสารหนูสะสมอยู่ใน ราก ลำต้น เปลือก และเมล็ด เท่ากับ 18.6, 3.9, 0.7 และ 0.24 mg kg^{-1} และเมื่อให้สารหนูที่ความเข้มข้นสูงขึ้น (8 mg As l^{-1}) พบว่ามีการสะสมในปริมาณสูงขึ้น เป็น 107.5, 91.8, 2.82 และ 0.42 mg kg^{-1} ในราก ลำต้น เปลือก และ เมล็ดข้าว แสดงให้เห็นว่า สารหนูมีการเคลื่อนที่ขึ้นสู่ยอด และสะสมอยู่ในบริเวณต่างๆ ของต้นข้าว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ *Rahman et al.* (2007) ที่ได้ศึกษาปริมาณสารหนูในบริเวณต่างๆ ของต้นข้าวที่ปลูกในบังกลาเทศเช่นเดียวกัน พบว่า มีสารหนูสะสมมากที่สุดในส่วนของลำต้น เปลือกและเมล็ด ตามลำดับ โดยมีค่าเท่ากับ 20.6, 1.6 และ 0.5 mg kg^{-1} สารหนูที่พบมักอยู่ในรูปสารอนินทรีย์ ได้แก่ อาร์เซนิต และอาร์เซไนต์ สำหรับสารหนูอินทรีย์มักพบในปริมาณน้อยมาก ซึ่งมักพบในรูปของกรดไดเมทิลอาร์ซีนิก มีรายงานว่า สารหนูอินทรีย์ในรูปที่ถูกเติมหมู่เมทิลนี้ มาจากดินที่ใช้ปลูกข้าวโดยดูดซึมผ่านทางรากเช่นเดียวกับสารหนูในรูปแบบอื่นๆ ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น อย่างไรก็ตาม พบว่า ในระบบพืชไร้ดิน (hydroponics) ยังคงพบสารหนูในรูปกรดไดเมทิลอาร์ซีนิกและกรดโมโนเมทิลอาร์ซีนิก แต่พบในปริมาณน้อยกว่าร้อยละ 1 ของสารหนูที่พบทั้งหมด (*Quaghebeur and Rengel, 2003; Xu et al., 2007*)

5. การศึกษายีนในข้าวและสิ่งมีชีวิตอื่น

5.1 arsenate reductase

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเมตาบอลิซึมของสารหนูในเซลล์พืช ได้แก่ *arsenate reductase* และ *phytochelatin synthase* ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้นว่าสารหนูที่อยู่ในรูปอาร์เซนิตซึ่งผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์รากทาง phosphate transporter จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของอาร์เซไนต์โดยเอนไซม์ *arsenate reductase* และมี glutathione ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (*Waqar et al., 2009*) ดังสมการ



การศึกษาปฏิกิริยารีดักชันของสารหนูโดยเอนไซม์ arsenate reductase ในจุลินทรีย์และพืช (Messens and Silver, 2006) ได้จำแนกเอนไซม์ออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ ArsC ที่แยกจาก *E. coli* ซึ่งมี glutaredoxin และ glutathione เป็นตัวให้อิเล็กตรอน กลุ่มที่สองคือ ArsC จาก *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* ซึ่งมี thioredoxin เป็นตัวให้อิเล็กตรอน และ Acr2p จากยีสต์และโปรโตซัว (*Leishmania major*) ซึ่งมี glutaredoxin และ glutathione เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

การวิเคราะห์ปริมาณสารหนูในเนื้อเยื่อพืชหลาย ชนิดพบว่าสารหนูที่พบโดยส่วนใหญ่อยู่ในรูปของอาร์เซไนต์ ยกตัวอย่างเช่น ร้อยละ 96-100 ในรากและยอดของผักกาดเขียว (Pickering *et al.*, 2000) ร้อยละ 97-100 ในใบของอะราบิโดฟซิส (Dhankher *et al.*, 2002) และ ร้อยละ 92-99 ในรากของข้าวและมะเขือเทศ (Xu *et al.*, 2007) แสดงให้เห็นว่าในพืชมีประสิทธิภาพสูงในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารหนู

การทำงานของ arsenate reductase จะช่วยลดการสะสมสารหนูจากรากขึ้นสู่ยอด เนื่องจาก ในเซลล์รากอาร์เซเนตจะถูกเปลี่ยนรูปเป็นอาร์เซไนต์และเข้าไปสะสมในแวคิวโอลอย่างรวดเร็ว เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จะทำให้มีสารหนูอาร์เซเนตบริเวณรากมากขึ้นและไปสะสมในส่วนยอดผ่านทางท่อลำเลียงน้ำ (Zhao *et al.*, 2008) Dhankher *et al.* (2006) ได้ทำการให้ 100 μ M sodium arsenate แก่อะราบิโดฟซิสเป็นเวลาสามสัปดาห์ พบว่ามีสารหนูสะสมอยู่ในบริเวณรากสูงกว่าส่วนยอด และเมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *arsenate reductase* (*AtACR2*) ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอย่างหนึ่ง พบการสะสมสารหนูบริเวณยอดมากขึ้น และอะราบิโดฟซิสสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารหนูได้น้อยลง นอกจากนี้ ยังพบการทำงานของเอนไซม์ในเซลล์รากอยู่ในระดับสูงเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อส่วนอื่น

Duan *et al.* (2005) รายงานว่าการทำงานของ arsenate reductase (PvAcr2p) ในกุศหมาก ทำให้พืชชนิดนี้สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารหนู และยังส่งผลให้กุศหมากสามารถสะสมสารหนูได้เป็นปริมาณมาก (As hyperaccumulator) โดยพบว่า สารหนูมักสะสมอยู่บริเวณยอดในรูปของอาร์เซไนต์ ซึ่งมาจากการเกิดปฏิกิริยารีดักชันโดยเอนไซม์ arsenate reductase ที่เกิดขึ้นบริเวณราก และในผักกาดเขียว อาร์เซไนต์ที่สะสมบริเวณยอดมาจากปฏิกิริยารีดักชันที่เกิดขึ้นในราก เช่นเดียวกัน (Pickering *et al.*, 2000) เมื่อเพิ่มการแสดงออกของ *PvAcr2p* ใน *E. coli* สายพันธุ์กลายที่ไม่มีการแสดงออกของ *arsenate reductase* (*arsC*) พบว่า *E. coli* สามารถเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารหนูได้ดีขึ้น (Ellis *et al.*, 2006)

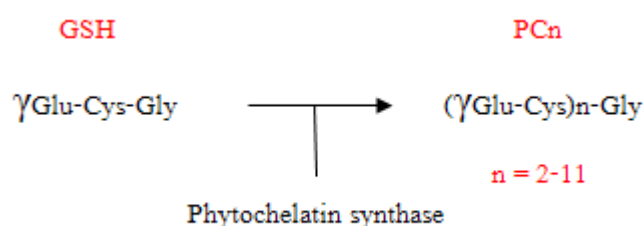
นอกจาก arsenate reductase จะมีผลต่อปฏิกิริยารีดักชันของสารหนูแล้ว ใน *E. coli* ยีน *arsC* ยังมีผลต่อปฏิกิริยารีดักชันของแคดเมียมด้วย เมื่อเพิ่มการแสดงออกของ *arsC* ในอะราบิโดพซิสและยาสูบ และให้โลหะแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 50, 75, และ 100 μM พบว่าพืชทั้งสองชนิดสามารถทนต่อโลหะหนักแคดเมียมได้ดีกว่าต้นที่เป็น wild-type โดยมีความยาวของรากและใบมากกว่า ในขณะที่ wild-type จะเกิดการเจริญเติบโต ใบและลำต้นกลายเป็นสีเหลือง (Dhankher *et al.*, 2003)

แม้ว่าสารหนูในรูปของอาร์เซไนต์จะมีความเป็นพิษต่อพืชมากกว่าสารหนูในรูปอาร์เซเนต แต่สารหนูรูปแบบที่พบในพืชไม่ว่าจะเป็นในส่วนของรากหรือยอดมักพบในรูปของอาร์เซไนต์ เพราะว่าภายในเซลล์พืชนั้นมีโปรตีนพิเศษ ทำหน้าที่สำหรับนำสารหนูในรูปของอาร์เซไนต์เข้าไปสะสมในแวคิวโอลเพื่อลดความเป็นพิษในเซลล์ ดังนั้นนอกจากขบวนการเปลี่ยนรูปของสารหนูโดยเอนไซม์ arsenate reductase ซึ่งเกิดขึ้นเป็นขั้นตอนแรกจะมีความสำคัญแล้ว ขบวนการพาสารหนูในรูปของอาร์เซไนต์ทั้งที่มาจากการเปลี่ยนรูปของอาร์เซเนตและการรับอาร์เซไนต์เข้าสู่เซลล์รากพืชโดยผ่านทาง aquaporin channel เข้าไปสะสมในแวคิวโอลก็มีความสำคัญเช่นกัน (Lombi *et al.*, 2002)

5.2 phytochelatins synthase

phytochelatins เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการลดความเป็นพิษภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่เกิดจากโลหะหนักต่างๆ เช่น ตะกั่ว, แคดเมียม, ทองแดง, สังกะสี และสารหนู โปรตีน phytochelatins เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ที่มีสูตรโครงสร้างดังนี้ $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ โดยที่ n เท่ากับ 2-11 (Ramos *et al.*, 2008) ในเซลล์พืชกระบวนสังเคราะห์โปรตีน phytochelatins โดยเอนไซม์ phytochelatins synthase จะใช้ glutathione เป็นสารตั้งต้น (ภาพที่ 3)

มีรายงานว่าองค์ประกอบซับซ้อนระหว่าง phytochelatins และ อาร์เซไนต์มีความสำคัญต่อขบวนการลดความเป็นพิษของสารหนู (As detoxification) ช่วยลดประสิทธิภาพในการสะสมสารหนูของพืช (As-non-hyperaccumulating plants) และช่วยให้พืชสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารหนูได้ นอกจากนี้การที่พืชได้รับสารหนูยังเป็นการกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ phytochelatins อีกด้วย (Sneller *et al.*, 1999)



ภาพที่ 3 ขบวนการสังเคราะห์ phytochelatins ในพืชชั้นสูง

ที่มา: Braz (2005)

พืชของสารหนูรวมถึงโลหะหนักชนิดต่างๆ ที่มีผลเสียต่อเซลล์เกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น โลหะหนักเข้าจับกับโปรตีนบริเวณหมู่ thioyl-, carboxyl- หรือ histidyl- ทำให้มีผลเสียต่อกิจกรรมและหน้าที่ของโปรตีนเหล่านั้น นอกจากนี้ยังอาจทำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์โดยตรง ดังนั้นพืชจึงมีการป้องกันตัวเองโดยการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในระบบขจัดอนุมูลอิสระ (Sharma and Dietz, 2008) รวมถึงการสร้าง phytochelatins และ glutathione (สารตั้งต้น) (Cobbett and Goldsbrough, 2002) นอกจาก glutathione จะถูกใช้เป็สารตั้งต้นแล้วยังมีบทบาทร่วมในการขจัดอนุมูลอิสระอีกด้วย (May *et al.*, 1998) มีรายงานว่า การเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน *phytochelatin synthase* และการสังเคราะห์ glutathione ในพืช ส่งผลให้พืชสามารถต้านทานต่อแคดเมียมได้ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตามหากมากเกินไปก็อาจทำให้เกิดสภาวะ oxidative stress ได้ (Nocito *et al.*, 2006)

โลหะหนักมีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของ phytochelatin synthase ในพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ อะราบิโดฟซิส (Vatamaniuk *et al.*, 1999), ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) (Clemens *et al.*, 1999), ผักกาดเขียว (Heiss *et al.*, 2003), ผักกาดหอม (*Lactuca sativa*) (He *et al.*, 2005) และ *Lotus japonicas* (Ramos *et al.*, 2008)

Duan *et al.* (2011) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของ phytochelatins กับการสะสมสารหนูในเมล็ดข้าว 6 สายพันธุ์ ที่พบสารหนูในเมล็ดแตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ที่มีสารหนูสะสมอยู่ในเมล็ดน้อยจะมีปริมาณโปรตีน phytochelatins ในบริเวณยอดมากกว่าสายพันธุ์ที่มีสารหนูสะสมอยู่ในเมล็ดมาก นอกจากนี้ เมื่อให้สาร L-buthionine sulfoximine (0.5 mM) ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการสร้าง glutathione (Cobbett, 2000) โดยการฉีดลงบนใบข้าว พบว่า ปริมาณโปรตีน phytochelatins ลดลงร้อยละ 20-55 glutathione ลดลงร้อยละ 40-63 และมีการสะสมสารหนูบริเวณยอดน้อยลง

ในขณะที่เมล็ดเพิ่มมากขึ้น แสดงให้เห็นว่า การพาสารหนูเข้าสู่แวคิวโอลของ phytochelatins ที่เกิดขึ้นบริเวณยอดนั้น มีผลต่อการลดปริมาณสารหนูที่สะสมในเมล็ดข้าว นอกจากนี้การให้สาร L-buthionine sulphoximine ใน velvet grass (*Holcus lanatus*) สายพันธุ์ที่ทนและไม่ทนต่อสารหนู พบว่า พืชทั้งสองสายพันธุ์ไม่สามารถอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารหนูได้ (Schat *et al.*, 2002)

เนื่องจาก การสังเคราะห์ phytochelatins โดยเอนไซม์ phytochelatin synthase การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารหนูโดยเอนไซม์ arsenate reductase และการสังเคราะห์ glutathione มีบทบาทสำคัญที่ทำให้พืชสามารถทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารหนูและโลหะหนัก จึงได้มีการสร้างพืชปรับปรุงพันธุ์ (transgenic plant) ชนิดต่างๆ โดยเพิ่มการแสดงออกของยีน เช่น งานวิจัยของ Dhanker *et al.* (2002) ทำการเพิ่มการแสดงออกของยีนสองชนิดจาก *E. coli* ในอะราบิโดฟซิส ได้แก่ *arsC* เพื่อเพิ่มปฏิกิริยารีดักชันของสารหนูในรูปของอาร์เซนิต และ γ -glutamylcysteine synthetase (γ -ECS) เพื่อเพิ่มการสังเคราะห์ glutathione ส่งผลให้อะราบิโดฟซิส สามารถเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนอาร์เซนิตได้ งานวิจัยของ Li *et al.* (2004) ทำการเพิ่มการแสดงออกของยีน *phytochelatin synthase* (*AtPCS1*) ในอะราบิโดฟซิส พบว่าพืชปรับปรุงพันธุ์ที่ได้ (*AtPCS1*-overexpressing lines) มีปริมาณโปรตีนสูงกว่าต้นที่เป็น wild type โดยเฉพาะในบริเวณราก และสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนอาร์เซนิตได้ดีขึ้น แต่กลับพบว่าทนต่อโลหะหนักแคดเมียมได้น้อยลง การเพิ่มการแสดงออกของ *AtPCS1* ในยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ส่งผลให้ต้นยาสูบทนต่อสารหนูได้มากขึ้น (Wojas *et al.*, 2009) ในขณะที่การเพิ่ม *AtPCS1* ในผักกาดเขียว ความสามารถในการทนสารหนูของพืชเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Gasic and Korban, 2007) การเพิ่มการแสดงออกของ *AtPCS1* ในอะราบิโดฟซิสควบคู่กับการเพิ่มการแสดงออกของยีน *GSH1* พบว่าพืชสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนโลหะหนักได้ดีและมีปริมาณ phytochelatins มากกว่าสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกเพียงแค่นเดียว (Guo *et al.*, 2008)

6. ข้าว

ข้าวเป็นธัญพืชเก่าแก่ที่มนุษย์ใช้เป็นอาหารมาเป็นเวลานาน ปัจจุบันประชากรเกือบครึ่งโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก ในบรรดาธัญพืชที่เป็นแหล่งสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรต ข้าวจัดว่าเป็นพืชที่มีความสำคัญต่อมนุษย์มากที่สุด ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย ทั้งนี้เพราะการเกษตรส่วนใหญ่ของประเทศปลูกข้าวเป็นพืชหลัก ประเทศไทยมีพื้นที่สำหรับการเพาะปลูกข้าวประมาณ 67 ล้านไร่ หรือคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่การเกษตรทั้งหมด ปัจจุบันข้าวยังเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ ในแต่ละปีข้าวที่เหลือจากการ

บริโภค ถูกส่งไปจำหน่ายยังต่างประเทศ เช่น สิงคโปร์ ฮองกง มาเลเซีย อินโดนีเซีย อิหร่าน และจีน ประเทศไทยทรงความเป็นอันดับหนึ่งในการส่งออกข้าว นับตั้งแต่ พ.ศ. 2522 เป็นต้นมา โดยส่งออกข้าวสารปริมาณ 3 ล้านตันและสูงถึง 6 ล้านตันในปี พ.ศ. 2540 แสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีความสามารถในการด้านการผลิตเหนือกว่าหลายประเทศที่เป็นคู่แข่งสำคัญ เช่น อินเดีย เวียดนาม พม่า และสหรัฐอเมริกา (เปรม, 2556) แต่ในปัจจุบันตลาดข้าวคุณภาพต่ำถูกเวียดนามและพม่ายึดครองจากไทยไปเกือบหมดแล้ว ดังนั้นในอนาคตจึงจำเป็นต้องพัฒนาคุณภาพและปริมาณผลผลิต โดยมุ่งเน้นไปที่การผลิตข้าวให้มีคุณภาพสูงเพื่อการส่งออกโดยอาศัยความได้เปรียบทางด้านชื่อเสียงว่าเป็นผู้ผลิตข้าวคุณภาพสูงและเป็นผู้ส่งออกข้าวรายใหญ่ที่สุดของโลกมาเป็นเวลานาน

ข้าวมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* L. จัดอยู่ในวงศ์เดียวกับธัญพืช เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวพันธุ์ที่นิยมบริโภคมีอยู่ 2 พันธุ์ใหญ่ๆ คือ *Oryza glaberrima* ข้าวพันธุ์นี้ปลูกเฉพาะในทวีปแอฟริกาและ *Oryza sativa* ซึ่งปลูกกันทั่วไปในทวีปเอเชีย ข้าวชนิด *Oryza sativa* ยังแยกออกได้เป็น *Oryza sativa indica* เป็นข้าวที่ปลูกมากในเขตร้อน เช่น ไทย ศรีลังกา อินเดีย อินโดนีเซีย บังกลาเทศ ฟิลิปปินส์ จีนตอนใต้และตอนกลาง *Oryza sativa japonica* เป็นข้าวที่ปลูกมากในเขตอบอุ่น เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี จีนตอนเหนือ และ *Oryza sativa Javanica* เป็นข้าวที่ปลูกในประเทศอินโดนีเซียเท่านั้น (มูลนิธิข้าวไทยในพระบรมราชูปถัมภ์, 2556) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าวแบ่งออกได้เป็นลักษณะที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโต และลักษณะที่เกี่ยวกับการขยายพันธุ์

ลักษณะที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโต (วาสนา, 2523)

(1) ราก (root) รากข้าวจัดอยู่ในระบบรากฝอย (fibrous root system) ประกอบด้วยรากเล็กๆ ที่แตกออกมาที่ข้อโคนต้นที่อยู่ใต้ดิน รากเล็กๆ นี้จะมีรากขนอ่อน (root hair) ทำหน้าที่ดูดอาหาร รากข้าวส่วนใหญ่จะแตกที่ข้อในดินที่ใกล้ผิวดิน แต่มีบางครั้งที่รากข้าวจะแตกออกมาตามข้อที่อยู่ในน้ำเหนือผิวดิน รากแรกที่ยื่นออกมาจากจุดกำเนิดเรียกว่า primary seminal root (radicle) ซึ่งรากนี้จะมีอายุอยู่ไม่นาน ส่วนรากที่แตกออกมาตามข้อเรียกว่า adventitious root

(2) ลำต้น (stem) มีลักษณะเป็นโพรงตรงกลางและแบ่งออกเป็นปล้องๆ โดยมีข้อกั้นระหว่างปล้อง ความยาวของปล้องนั้นแตกต่างกัน ปล้องซึ่งอยู่ที่โคนต้นจะสั้นกว่าและหนากว่า ปล้องซึ่งอยู่ที่ปลายของลำต้น นอกจากนี้ ปล้องซึ่งอยู่ที่โคนจะมีขนาดโตกว่าปล้องที่อยู่ตรงส่วนปลาย ที่ข้อซึ่งเป็นส่วนที่แบ่งลำต้นออกเป็นปล้องๆ นั้นเป็นที่เกิดของใบมีตาสำหรับเจริญเติบโตออกมาเป็นหน่อใหม่ข้อละหนึ่งตา สีของข้อแตกต่างกันไปตามชนิดของพันธุ์ข้าว ซึ่งอาจจะเป็นสี

เหลือง หรือสีม่วงก็ได้ ส่วนความยาวของปล้องนั้นก็แตกต่างกันไปตามชนิดของพันธุ์ พันธุ์ต้นสูงจะมีปล้องยาวกว่าพันธุ์ต้นเตี้ย ต้นข้าวถูกห่อด้วยกาบใบจึงทำให้ไม่สามารถมองเห็นลำต้นหรือปล้องของต้นข้าวในระยะแตกกอ แต่ต้นข้าวมีการยืดลำต้นสูงในระยะออกรวงจนสามารถมองเห็นลำต้นได้

(3) ใบ (leaf) ใบข้าวมีลักษณะเป็นแผ่นบาง แฉกและยาว มีกำเนิดจากข้อในทิศทางสลับกันตรงกันข้าม ใบประกอบด้วย 2 ส่วนคือ กาบใบ (leaf sheath) และตัวใบ (leaf blade) กาบใบคือ ก้านใบ (peduncle) ที่เปลี่ยนรูปมา มีกำเนิดจากข้อและห่อหุ้มปล้องที่อยู่เหนือขึ้นไป แต่ละข้อจะมีเพียงกาบใบเดียวเท่านั้น ตัวใบ (leaf blade) จะเชื่อมต่อกับกาบใบตรงที่เรียกว่า ข้อต่อใบ (collar) ตัวใบมีเส้นใบ (vein) เป็นเส้นขนานตามลักษณะของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีท่อน้ำท่ออาหารใหญ่อยู่กลางใบเรียกว่า เส้นกลางใบ (midrib) ใบของข้าวแต่ละพันธุ์จะมีความยาว ความกว้าง สี และการหักมุมของใบกับลำต้นต่างกันไป ที่ข้อต่อใบ จะมีอวัยวะที่เห็นได้ชัดอยู่ 2 ชนิด คือ หูใบ หรือเขี้ยวกันแมลง (auricle) มีลักษณะเป็นพู่เล็กๆ อยู่ข้างละอันที่ด้านในของข้อต่อใบ และมีอวัยวะที่มีลักษณะเป็นแผ่นบางใส เรียกว่า ลิ้นใบหรือเขือกันฝน (ligule)

ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการขยายพันธุ์ (วาสนา, 2523)

(1) รวงข้าว (panicle) รวงข้าว คือ ช่อดอก (inflorescence) ของข้าว เกิดขึ้นที่ข้อของปล้องอันสุดท้ายของต้นข้าว ระยะตั้งแต่ข้อของปล้องสุดท้ายลงมาจนถึงกาบของใบธง เรียกว่า คอรวง (neck) รวงข้าวประกอบด้วยก้านอันใหญ่ต่อจากคอรวงขึ้นไปแล้วแตกแขนงออกไปมากมาย โดยแต่ละข้อของก้านอันใหญ่แตกแขนงออกไปเรียกว่า แขนงที่หนึ่ง (primary branches) และแต่ละข้อของแขนงที่หนึ่ง จะแตกแขนงออกไปอีกเป็นแขนงที่สอง (secondary branches) ที่แขนงที่สองนี้ เป็นที่เกิดของก้านดอก (pedicel) และดอกข้าว (spikelet)

(2) ดอกข้าว (spikelet) ดอกข้าวเป็นดอกชนิดที่เรียกว่า ดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower) เพราะมีเกสรตัวผู้ และเกสรตัวเมีย อยู่ในดอกเดียวกัน ฉะนั้น การผสมเกสรส่วนใหญ่จึงเป็นแบบการผสมตัวเอง (self-fertilization) และมีการผสมเกสรแบบข้ามต้น (cross-fertilization) เป็นจำนวนน้อยมาก หรือประมาณ 0.5-5% เท่านั้น ดังนั้นพันธุ์ต่างๆ ของข้าวที่ปลูกอยู่ทั่วไปนั้น จึงมีลักษณะเป็น homozygous gene ที่ควบคุมลักษณะต่างๆ ดอกข้าวเกิดเป็นกลุ่มเรียกว่า spikelet ประกอบด้วย กลีบดอกที่หุ้ม spikelet 2 กลีบ ได้แก่ กลีบด้านนอก (outer glume) และกลีบด้านใน (inner glume) แต่มองเห็นไม่ชัด (rudimentary glume) ดอกประกอบด้วยดอกย่อย (floret) 3 ดอก มีดอกย่อยเพียงดอกเดียวที่มีการเจริญ เรียกว่า flowering glume ส่วนดอกย่อยที่ไม่เจริญเหลือเฉพาะส่วน lemma เรียกว่า sterile lemma หรือ non-flowering glume หรือ empty glume ดอกย่อยที่มีการ

เจริญประกอบด้วยกลีบดอกย่อยด้านนอก (lemma) ที่มีเส้นตามความยาว 5 เส้น และกลีบดอกย่อยด้านใน (palea) ที่มีเส้นตามความยาว 3 เส้น ดอกย่อยประกอบด้วย เกสรตัวผู้ (stamen) ที่มีก้านชูละอองเกสรตัวผู้ (filament) และอับละอองเกสรตัวผู้ (anther) ส่วนเกสรตัวเมีย (pistil) ประกอบด้วยรังไข่ (ovary) ก้านชูเกสรตัวเมีย (style) สัน ปลายเกสรตัวเมีย (stigma) แยกเป็น 2 แฉก มีลักษณะคล้ายขนนกเรียกว่า plumose stigma และเยื่อรองรับไข่ (lodicule) อยู่ในส่วนฐานของรังไข่

(3) เมล็ดข้าว (seed) เมล็ดข้าวคือ ส่วนที่เป็นแป้งที่เรียกว่า เอ็นโดสเปิร์ม (endosperm) และส่วนที่เป็นคัพภะ ซึ่งห่อหุ้มไว้โดยเปลือกนอกใหญ่สองแผ่น เอ็นโดสเปิร์มเป็นแป้งที่เรบริกค คัพภะเป็นส่วนที่มีชีวิตและงอกออกมาเป็นต้นข้าวเมื่อเอาไปเพาะ การที่ละอองเกสรตัวผู้ตกลงบนที่รับละอองเกสรของเกสรตัวเมียนั้น เรียกว่า การผสมเกสร หลังจากการผสมเกสรเล็กน้อย ละอองเกสรตัวผู้ก็จะตกลงไปในก้านของที่รับละอองเกสร เพื่อจะได้ให้นิวเคลียสจากละอองเกสรตัวผู้ลงไปผสมโดยรวมตัวกับไข่และนิวเคลียสอื่นๆในรังไข่ นิวเคลียสที่ไดรรวมตัวกับไข่จะเจริญเติบโตเป็นคัพภะ ส่วนนิวเคลียสที่ไดรรวมตัวกับนิวเคลียสอื่นๆ (polar nuclei) ก็จะเจริญเติบโตเป็นแป้งที่เรียกว่าเอ็นโดสเปิร์ม หลังจากการผสมเกสรประมาณ 30 วันเมล็ดข้าวก็จะแก่พร้อมที่จะเก็บเกี่ยว

เมื่อได้แกะเปลือกนอกของเมล็ดข้าวเปลือกที่เก็บเกี่ยวมา จะได้เมล็ดข้าวที่เรียกว่า ข้าวกล้อง (brown rice) เมล็ดข้าวกล้องมักจะเป็นสีน้ำตาลอ่อนๆและเมื่อผ่าตัดเมล็ดข้าวกล้องออกตามความยาวแล้วศึกษาลักษณะของมันอย่างละเอียดจะพบว่า เมล็ดข้าวกล้องประกอบด้วยเยื่อชั้นนอกบางๆเรียกว่า ชั้นเพอริคาร์พ (pericarp layers) จำนวน 3 ชั้น เยื่อชั้นกลางบางๆหนึ่งชั้นเรียกว่า เท็กเมน (tegmen) และเยื่อชั้นในบางๆอีกหนึ่งชั้นเรียกว่า ชั้นอะลูโรน (aleurone layer) ถ้าชั้นเพอริคาร์พเป็นสีน้ำตาล เมล็ดข้าวกล้องก็จะเป็นสีน้ำตาล และถ้าชั้นเพอริคาร์พเป็นสีแดงเมล็ดข้าวกล้องก็จะเป็นสีแดง ส่วนภายในที่เป็นแป้งจะมีลักษณะเป็นแป้งสีขาว โดยข้าวเหนียวจะมีแป้งเป็นสีขาวขุ่น ส่วนข้าวเจ้ามีแป้งใสกว่า

โปรตีนในเมล็ดข้าวจะอยู่รอบนอกใกล้ๆกับชั้นในของชั้นอะลูโรน ดังนั้น การสีข้าวเอาชั้นอะลูโรนออกไปมาก ทำให้สีน้ำตาลหรือสีแดงของข้าวกล้องถูกขัดออกไปหมด มีผลให้โปรตีนและแร่ธาตุดังกล่าวถูกขัดออกไปด้วย โดยทั่วไปข้าวกล้องมีโปรตีนประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อขัดให้ขาวจนเป็นข้าวสารแล้วจะมีโปรตีนเหลืออยู่เพียง 6-8 เปอร์เซ็นต์

ข้าวที่ปลูกโดยทั่วไปสามารถจำแนกออกเป็นชนิดต่างๆได้หลายชนิดตามวิธีการจำแนกดังนี้ (ปราณีต, 2531)

(1) จำแนกตามคุณสมบัติของเมล็ดข้าวโดยแบ่งตามส่วนประกอบหลักของข้าวคือ แป้ง (starch) ซึ่งประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ประเภทโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ได้แก่ อะไมโลส (amylose) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์แบบโซ่ตรงและ อะไมโลเพกทิน (amylopectin) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์แบบโซ่กิ่งจึงมีโครงสร้างที่เหนียวและแข็งแรงกว่าอะไมโลส หากจำแนกตามคุณสมบัติดังกล่าวจะแบ่งออกได้เป็น ข้าวเหนียว (glutinous rice) และข้าวเจ้า (non-glutinous rice) โดยข้าวเหนียวจะมีเมล็ดสีขาวขุ่นเมื่อนำไปหุงต้มจะเหนียวและเมล็ดเกาะตัวกันดี เนื่องจากข้าวชนิดนี้มีส่วนของอะไมโลเพกทิน มากกว่าร้อยละ 82 โดยน้ำหนัก ส่วนของอะไมโลสน้อยมาก ในขณะที่ข้าวเจ้า ข้าวชนิดนี้จะมีเมล็ดใสกว่าข้าวเหนียวเมื่อนำไปหุงต้ม จะไม่ค่อยเกาะตัว มักจะร่วนซุยไม่เหนียวติดกัน เนื่องจากแป้งในเมล็ดพวกข้าวอะไมโลสจะมีปริมาณสูงกว่าในข้าวเหนียวคือประมาณร้อยละ 8-36 ส่วนของอะไมโลเพกทินประมาณร้อยละ 64-92

(2) จำแนกตามสภาพพื้นที่ปลูก ได้แก่ ข้าวไร่ (upland rice) หมายถึง ข้าวที่ปลูกในที่ดอน ไม่มีน้ำขัง ไม่มีคันนา โดยปลูกเหมือนกับพืชไร่ทั่วไป เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง และถั่วต่างๆ ข้าวนาสวน (lowland rice) หมายถึง ข้าวที่ปลูกในพื้นที่ที่มีระดับน้ำตั้งแต่ 5-10 เซนติเมตร จนถึง 70-80 เซนติเมตรและข้าวขึ้นน้ำหรือข้าวนาเมือง (floating rice or deep water) หมายถึง ข้าวที่ปลูกในพื้นที่ระดับน้ำตั้งแต่ 80 เซนติเมตรขึ้นไปจนถึง 3-4 เมตร

(3) จำแนกตามฤดูกาลปลูก ได้แก่ ข้าวนาปีหรือข้าวหน้าน้ำฝน (rainfed rice) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ปลูกในฤดูกาลทำนา คือ ฤดูฝนและข้าวนาปรัง (off-season rice) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ปลูกและออกดอกได้เมื่อครบอายุไม่ว่าปลูกเดือนไหน

(4) จำแนกตามความว่องไวต่อช่วงแสงซึ่งแบ่งออกเป็น ข้าวที่ไวต่อช่วงแสง เป็นข้าวพันธุ์ที่จะออกดอกในช่วงเดือนที่เวลากลางวันสั้นกว่ากลางคืน เช่น ในฤดูหนาวและข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง ข้าวประเภทนี้จะออกดอกตามอายุ ความยาวของช่วงแสงไม่มีอิทธิพลต่อการออกดอก ดังนั้นจึงเป็นข้าวที่ปลูกได้ทั้งปีไม่ว่าช่วงไหน

(5) จำแนกตามอายุการเก็บเกี่ยว ได้แก่ ข้าวเบา (early variety) คือข้าวที่มีอายุเก็บเกี่ยว 90 -100 วัน, ข้าวกลาง (medium variety) คือข้าวที่มีอายุเก็บเกี่ยว 100-120 วันและข้าวหนัก (late variety) คือข้าวที่มีอายุเก็บเกี่ยว 120 วันขึ้นไป

(6) จำแนกรูปร่างของเมล็ดข้าวสารได้แก่ ข้าวเมล็ดสั้น (short grain) ความยาวไม่เกิน 5.50 มิลลิเมตร, ข้าวเมล็ดยาวปานกลาง (medium-long grain) ความยาว 5.51 - 6.00 มิลลิเมตร,

ข้าวเมล็ดยาว (long grain) ความยาว 6.61-7.50 และข้าวเมล็ดยาวมาก (extra long grain) ความยาวมากกว่า 7.50 มิลลิเมตรขึ้นไป

ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสารหนู ในข้าวสายพันธุ์ไทยที่ปลูกเป็นการค้าและเป็นที่ยอมรับในการบริโภคทั้งข้าวเจ้าและข้าวเหนียวรวม 4 สายพันธุ์ คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105, ข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่, ข้าวเหนียว กข 6 และข้าวเหนียวหางยี 71

6.1 ข้าวขาวดอกมะลิ 105

ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวเจ้าสายพันธุ์ดีชนิดหนึ่งที่ชาวนานิยมปลูก เมื่อ พ.ศ. 2493-2494 นายสุนทร สีหะเนิน พนักงานเกษตรได้รวบรวมพันธุ์ข้าวหอมพื้นเมืองจากทุ่งนาในเขตอำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 199 รวง มาปลูกเพื่อศึกษาพันธุ์ พบว่าข้าวหอมรวงที่ 105 ที่มีลักษณะพิเศษ คือ มีเมล็ดอ่อนนุ่มและมีกลิ่นหอมเมื่อนำมาหุงต้ม จึงได้มีการปรับปรุงพันธุ์ให้บริสุทธิ์ตามหลักวิชาการจนได้พันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และคณะกรรมการการพิจารณาพันธุ์ได้ประกาศให้ใช้ขยายพันธุ์เมื่อวันที่ 25 พฤษภาคม พ.ศ. 2502

เนื่องจากมีเมล็ดข้าวที่สวย เรียวยาว คุณภาพการหุงต้มดีได้ข้าวที่มีรสนุ่มนวลและมีกลิ่นหอม จึงเป็นข้าวที่นิยมมากในประเทศไทยและตลาดใกล้เคียงคือ สิงคโปร์ มาเลเซีย และทางตะวันออกกลาง

ลักษณะประจำพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ต้นสูงประมาณ 140 เซนติเมตร จัดเป็นข้าวชนิดไวต่อช่วงแสง ให้ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 363 กิโลกรัมต่อไร่ เมล็ดมีระยะพักตัวประมาณ 8 สัปดาห์ปริมาณอะมิโลสเท่ากับ 12-17 % เมื่อหุงสุกจะนุ่มและมีกลิ่นหอม เมล็ดข้าวสารใส คุณภาพการสีดี ต้นข้าวทนแล้งได้ดี ทนต่อสภาพดินเปรี้ยวและดินเค็ม ไม่ต้านทานโรคใบสีส้ม โรคขอบใบแห้ง โรคไหม้ และโรคใบหงิก รวมทั้งแมลงศัตรูพืชต่างๆเช่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยจักจั่นสีเขียวและหนอนกอ (กรมการข้าว, 2556)

6.2 ข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่

ข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ (riceberry) เป็นพันธุ์ข้าวที่มีชื่อเสียงเรื่องความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ นักวิจัยผู้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวนี้คือ รศ.ดร.อภิชาติ วรรณวิจิตร ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าวมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ข้าวไรซ์เบอร์รี่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวเจ้าหอมชนิดกับขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์จากกรมการข้าว) ลักษณะเป็นข้าวเจ้าสีม่วง

คุณสมบัติเด่นทางด้านโภชนาการของข้าวไรซ์เบอร์รี่คือ มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง ได้แก่ เบต้าแคโรทีน, แกมมา-โอไรซานอล, วิตามินอี, แทนนิน, สังกะสีและฟอสเฟต ข้าวชนิดนี้มีดัชนีน้ำตาลต่ำหรือปานกลาง นอกจากนี้รำข้าวและน้ำมันรำข้าวยังมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่ดีเหมาะสำหรับใช้ทำผลิตภัณฑ์อาหารเชิงบำบัดอีกด้วย

ลักษณะประจำพันธุ์ข้าวไรซ์เบอร์รี่ เป็นข้าวเจ้าสีม่วงเข้มที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงรูปร่างเมล็ดเรียวยาว ได้ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 300-500 กิโลกรัมต่อไร่ มีอายุการเก็บเกี่ยว 130 วันเมื่อหุงสุกจะมีความนุ่มนวลมาก ต้นข้าวต้านทานต่อโรคไหม้แต่ไม่ต้านทานโรคยอดฝักดาบหรือโรคหาลาว (กรกัญญา และ ปานทิพย์, 2556)

Leardkamolkarn *et al.* (2011) รายงานว่าส่วนของรำข้าว (rice bran) ในข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่มีปริมาณ polyphenolic ถึง 752.1 mg/100g, anthocyanin 250.36 mg/100g และ beta-carotene 63.3 ug/100g ซึ่งสารทั้งสามชนิดนี้มีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่ก่อให้เกิดผลเสียต่อร่างกาย เช่น ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์, โครงสร้างของ DNA และ RNA ตลอดจนชีวโมเลกุลในเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคหลายชนิดเช่น โรคหัวใจ, เบาหวาน, โรคไต, โรคข้อ และยังเป็นสารก่อมะเร็งอีกด้วย จากการศึกษาด้วยวิธี ORAC (oxygen radical absorbance capacity) ในรำข้าวไรซ์เบอร์รี่พบว่ามีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูง ถึง 229 ถึง 304.7 umole/g ซึ่งสูงกว่าการดื่มน้ำผลไม้หรือน้ำชาเขียวที่ขายตามท้องตลาด ดังนั้น ข้าวที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูงจึงได้รับความนิยมจากผู้บริโภคเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากผู้คนในยุคปัจจุบันไม่ได้กินข้าวแค่เพื่ออิ่มท้องแต่กินเพื่อป้องกันการเกิดโรคด้วย

6.3 ข้าวเหนียว กข 6

เป็นพันธุ์ข้าวเหนียวซึ่งถูกปรับปรุงพันธุ์โดยการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมโดยใช้รังสีแกมมาขนาด 20 กิโลแตรด อบเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 แล้วนำไปปลูกคัดเลือกที่สถานีทดลองข้าวบางเขนและสถานีทดลองข้าวพิมาย จากการคัดเลือกได้นำข้าวเหนียวหลายสายพันธุ์ในข้าวชั่วที่ 2 นำไปปลูกคัดเลือกจนอยู่ตัวได้สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงที่สุดคือขาวดอกมะลิ 105 65 จี 2 ยู-68-254 คณะกรรมการพิจารณาพันธุ์ให้ใช้ขยายพันธุ์เป็นข้าวพันธุ์ กข 6 เมื่อวันที่ 4 พฤษภาคม 2520 นับว่าเป็นข้าวพันธุ์ดีพันธุ์แรกของประเทศไทย ที่ได้จากการชักนำให้เปลี่ยนแปลงพันธุกรรมโดยใช้รังสี เมื่อเทียบกับข้าวพันธุ์ กข อื่นๆที่เป็นข้าวเหนียวด้วยกันข้าวพันธุ์นี้ได้รับความนิยมในการปลูกมากที่สุด เพราะให้ผลผลิตสูง คุณภาพการหุงต้มได้ข้าวหนึ่งที่อ่อนนุ่มมีกลิ่นหอม

ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวเหนียว กข 6 ต้นข้าวสูงประมาณ 154 เซนติเมตร ทรงกอกระจายเล็กน้อย ใบยาวสีเขียวเข้ม เมล็ดมีลักษณะยาวเรียว ข้าวพันธุ์นี้จัดเป็นข้าวชนิดไวต่อช่วงแสง ให้ผลผลิตสูงเฉลี่ยประมาณ 666 กิโลกรัมต่อไร่ เมล็ดข้าวมีระยะพักตัวประมาณ 7 สัปดาห์ คุณภาพการสีและหุงต้มดีได้ข้าวเหนียวที่มีกลิ่นหอม ต้นข้าวต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลแต่ไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง โรคไหม้และไม่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและแมลงบั่ว (กรมการข้าว, 2556)

6.4 ข้าวเหนียวหางยี 71

หางยี 71 เป็นข้าวเหนียวพันธุ์พื้นเมืองที่มีการปลูกกันมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ข้าวพันธุ์นี้ได้มาจากการรวบรวมพันธุ์ข้าวโดยพนักงานข้าว อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร เมื่อปี พ.ศ. 2506 จากนั้นนำมาปลูกเพื่อคัดเลือกพันธุ์ตามสถานีทดลองข้าวต่างๆ จนได้ข้าวเหนียวพันธุ์ 563-2-71 ซึ่งเป็นข้าวเหนียวเมล็ดยาว อายุเบา ให้ผลผลิตสูง เมื่อนำไปหุงต้มข้าวจะนุ่ม เหนียว มีคุณภาพดี คณะกรรมการพิจารณาพันธุ์ให้ใช้ขยายพันธุ์เมื่อปี พ.ศ. 2511 ให้ชื่อพันธุ์ว่า หางยี 71

ลักษณะประจำพันธุ์ข้าวเหนียวหางยี 71 ต้นข้าวสูงประมาณ 152 เซนติเมตรลำต้นสีเขียว ใบแคบและยาวสีเขียวเข้ม รวงที่โผล่ออกมาใหม่มีระแงงแผ่ออกคล้ายดินนาก เมล็ดข้าวมีรูปร่างเรียวข้าวพันธุ์นี้ให้ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 506 กิโลกรัมต่อไร่ เมล็ดมีระยะพักตัวประมาณ 1 สัปดาห์คุณภาพการหุงต้มดี สามารถต้านทานโรคไหม้โรคใบจุดสีน้ำตาลแต่ไม่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง โรคใบสีส้มเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และแมลงบั่ว (กรมการข้าว, 2556)

เนื่องจากสารหนูมีผลกระทบโดยตรงกับการเจริญเติบโตของต้นและคุณภาพของเมล็ดข้าว ดังนั้น การโคลน วิเคราะห์และศึกษาการแสดงออกของยีน *arsenate reductase* และ *phytochelatin synthase* ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเมตาบอลิซึมของสารหนู จึงมีความสำคัญต่อการลดความเป็นพิษในเซลล์และการเจริญเติบโตของข้าว ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่ทนต่อสารหนู โดยการคัดเลือกพันธุ์ที่มีความไวต่อการกำจัดสารหนู หรือการส่งเสริมการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การโคลนยีนจากรากข้าว

1.1 ข้าวที่ใช้ในการทดลอง

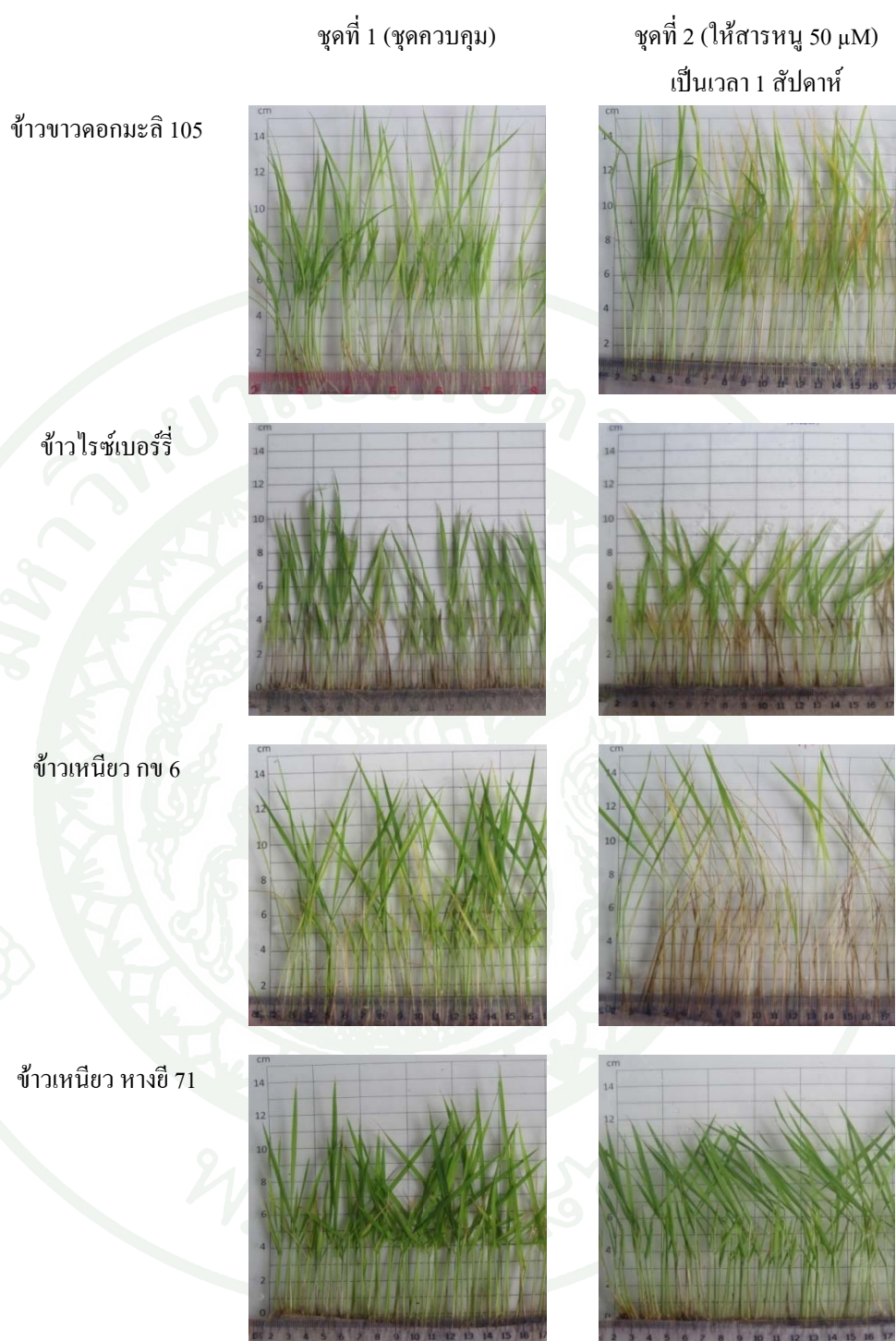
ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ข้าวเจ้าและข้าวเหนียวจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร 6 ข้าวเหนียว กข 6, และข้าวเหนียวหางยี 71 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวหนองคาย และข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.อภิชาติ วรรณวิจิตร ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าวมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน

1.2 การปลูกข้าวและการให้สารหนู (ได้รับความอนุเคราะห์จากนางสาวกฤษฎา พินิจ นักวิจัยประจำห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์)

เรียงเมล็ดข้าวจำนวน 100 เมล็ด (ต่อ 1 สายพันธุ์) ลงในภาชนะปลูก ซึ่งมีขนาด 17X30X15 เซนติเมตร ที่เติมน้ำ 500 มิลลิลิตรทั้งหมด 6 ใบ โดยแบ่งเป็น 2 ชุดการทดลอง ชุดละ 3 ใบ (3 ซ้ำ) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นเปลี่ยนน้ำในภาชนะชุดที่ 1 เป็นน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร (ตัวควบคุม) และชุดที่ 2 เป็นสารหนูที่มีความเข้มข้น $50 \mu\text{M}$ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เป็นเวลาอีก 1 สัปดาห์ โดยตรวจสอบปริมาตรน้ำในภาชนะปลูกทุกๆ 24 ชั่วโมงให้มีปริมาตร 500 มิลลิลิตรอยู่เสมอ บันทึกการงอก การเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทุกสัปดาห์จนครบ 3 สัปดาห์ (ภาพที่ 4) แล้วแยกเอาบริเวณรากมาสกัดอาร์เอ็นเอ

1.3 การแยกอาร์เอ็นเอ

แยกอาร์เอ็นเอรวมจากรากข้าวโดยใช้ trizol reagent (Gibco BRL, สหรัฐอเมริกา) นำ 0.2 กรัม ของตัวอย่างบดเป็นผงและแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่หลอดเติม trizol reagent 1 มิลลิลิตร เขย่ากลับขึ้นมาแล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบ ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที ดูดส่วนใสย้ายใส่หลอดใหม่แล้วเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 1 เท่าตัว เขย่าให้เข้ากันจะสังเกตเห็นสายยาวๆของอาร์เอ็นเอ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้งเดิม 70% เอทานอล 1 มิลลิลิตร (เก็บไว้ที่ -30 องศาเซลเซียส) นำมาทำให้ตะกอนแห้งภายใต้สภาพสุญญากาศ ละลายในน้ำกลั่น (DEPC treated water)



ภาพที่ 4 ต้นข้าว 4 สายพันธุ์ที่ได้รับและไม่ได้รับสารหนูเป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากต้นข้าวอายุ 3 สัปดาห์ (ได้รับการอนุเคราะห์จากนางสาวกฤษฎา พินิจ นักวิจัยประจำห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์)

1.4 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรก โดยใช้ Ready-To-Go You-Prime first strand kit (GE Healthcare Biosciences, สหรัฐอเมริกา)

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรก (first strand synthesis) โดยใช้ Ready-To-Go You-Prime first strand beads (GE Healthcare Biosciences, สหรัฐอเมริกา) นำอาร์เอ็นเอ 5 ไมโครกรัม ต่อไมโครลิตรมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 29 ไมโครลิตร ไปอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำแข็งทันที 2 นาที แล้วคูลอาร์เอ็นเอที่เตรียมไว้ลงบนเม็คบิทและเติมไพรเมอร์ RACE-T จำนวน 2 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาทีโดยไม่เกาะหลอด จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยการเคาะที่หลอด หรือคูดขึ้นลงด้วยปิเปต ปั่นเหวี่ยงช่วงสั้น 5 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

1.5 การออกแบบไพรเมอร์

หาข้อมูลของยีน *arsenate reductase* และ *phytochelatase* ในพืชชนิดต่างๆ ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) และ UniProt (<http://www.uniprot.org>) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ได้มาทำ multiple alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) เลือกส่วนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์เพื่อออกแบบไพรเมอร์ ทำการตรวจสอบระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวของไพรเมอร์ ปริมาณของ G/C content ที่เหมาะสม การเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ และการจับกันเองของไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม netprimer (<http://www.netprimer.com>) จากนั้นเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม ให้มีความยาวประมาณ 15-25 นิวคลีโอไทด์

1.6 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Mastercycler[®] gradient, Eppendorf, สหรัฐอเมริกา) โดยใช้ปฏิกิริยาในหลอดทดลองขนาด 200 ไมโครลิตร โดยมีส่วนประกอบและความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ เอนไซม์ *i-Taq* DNA Polymerase (Intron Biotechnology, เกาหลี) นำ first strand DNA ประมาณ 25 นาโนกรัม ใช้ไพรเมอร์สำหรับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ชนิดละ 10 ไมโครกรัม, 2mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, 2.5 unit ของ *i-Taq* DNA Polymerase (Intron Biotechnology, เกาหลี) ต่อการทำปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร

ใช้อุณหภูมิในการสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย initiation denaturation step ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีจำนวน 1 รอบ และ denaturation step ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing step ที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที extension step ที่ 72 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาประมาณ 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เมื่อสังเคราะห์เสร็จแล้ว นำดีเอ็นเอที่เตรียมได้ 1 ไมโครลิตร มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบน 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder หรือ 100 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, สหรัฐอเมริกา) แล้วตรวจสอบด้วย UV-transilluminator

1.7 การสกัดดีเอ็นเอจากเจล

นำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากกระบวนการพีซีอาร์มาแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบน agarose gel จากนั้นสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, เยอรมนี) เติม 3 เท่าโดยปริมาตร ของบัฟเฟอร์ QG ต่อ 1 เท่าของน้ำหนักเจล (ประมาณ 100 มิลลิกรัม-100 ไมโครกรัม) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จนเจลละลาย คูดสารละลายใส่ในคอลัมน์ หมุนเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที เติมบัฟเฟอร์ QG 500 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที ล้างตะกอนด้วยการเติมน้ำบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที หมุนเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้งแล้วหมุนเหวี่ยงอีกครั้งนาน 1 นาที ละลายตะกอนด้วยการเติมน้ำบัฟเฟอร์ EB 30 ไมโครลิตร ผ่านคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบน agarose gel

1.8 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ใน *E. Coli*

นำดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับ pGEM[®]-T vector (Promega Corporation) (ภาพผนวกที่ 1) ด้วยปริมาณของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้คำนวณได้จาก

Ng of vector x kb size of insert

————— X insert : vector-inolar ratio = ng of insert

Kb size of vector

ต่อ Vector และขึ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ T₄ DNA ligase (2.5 Unit ต่อ 100 ไมโครลิตร) ผสมกับ 1X reaction buffer (promega Corporation) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน

การนำดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) ที่ได้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH 5- α ใช้วิธี heat shock transformation (Sambrook *et al.*, 1989) แล้วคัดเลือกโคโลนีโดยเลี้ยง *E. coli* บนอาหาร LA ผสม 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แอมพิซิลิน (ampicillin) ที่มี 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) และ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) โดยจะคัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีสีขาวมาตรวจสอบขึ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

1.9 การตรวจสอบโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสมด้วยวิธีพีซีอาร์

ชุดเซลล์แบคทีเรียต้นแบบละลายในน้ำกลั่น แล้วทำการสังเคราะห์สังเคราะห์ขึ้นดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SP6 และ T7 หรือไพรเมอร์คู่ที่มีความจำเพาะกับยีน โดยตั้งโปรแกรมที่ 1 ที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมที่ 2 ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 20 รอบ และโปรแกรมที่ 3 ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที นำผลพีซีอาร์มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบน 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder เลือกโคโลนีที่มีขึ้นดีเอ็นเอที่เราต้องการแทรกอยู่มาแยกพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด AxyPrep Plasmid Miniprep kit (Axygen Bioscience, สหรัฐอเมริกา) ตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้บน 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ส่งบริษัท macrogen (เกาหลีใต้) เพื่อหาลำดับเบสของยีนที่โคลนได้

2. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของยีนที่ได้

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้ มาแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน ด้วยโปรแกรม ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/>) จากนั้นสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกันที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนที่ได้ กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่มีรายงานในฐานข้อมูล ด้วยโปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) และสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0 (<http://www.megasoftware.net>) (Tamura *et al.*, 2007)

3. การตรวจสอบการแสดงออกด้วยวิธี Quantitative Real-time PCR

3.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจสอบการแสดงออก

สกัดอาร์เอ็นเอรวมจากรากข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ จากนั้นทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรกจากอาร์เอ็นเอจากแต่ละส่วนด้วยไพรเมอร์ 3 ชนิด คือ ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อปลาย 3' ของยีน *arsenate reductase*, *phytochelatinsynthase* และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อปลาย 3' ของยีน *eukaryotic elongation factor 1-alpha (eEF-1a)* ซึ่งเป็นยีนมาตรฐานในการทดลอง โดยใช้ชุด Ready-To-Go You-Prime first strand kit (GE Healthcare Biosciences, สหรัฐอเมริกา)

3.2 การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Quantitative Real-time PCR

นำดีเอ็นเอสายแรกที่เตรียมด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *arsenate reductase*, *phytochelatinsynthase* และจำเพาะต่อ housekeeping gene ที่ใช้เป็นยีนมาตรฐาน คือ *eukaryotic elongation factor 1-alpha (eEF-1a)* เป็น template ตรวจหาโปรแกรมที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์สำหรับยีนเพื่อเพิ่มปริมาณยีนนั้น ซึ่งต้องทดสอบหาโปรแกรมที่ทำให้ทุกยีน รวมทั้งยีนที่เป็นตัวควบคุมเพิ่มปริมาณได้อย่างถูกต้อง โดยต้องได้ขนาดของดีเอ็นเอตรงกับที่คาดการณ์ไว้และไม่มีผลผลิตฟิชัวร์ขนาดอื่นๆ ด้วยชุด KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kits (Kapa Biosystems, USA) ส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยา ได้แก่ First strand cDNA 0.15 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ชนิด forward 0.15 พิโคโมล ชนิด reverse 0.15 พิโคโมล 1x KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix ไมโครลิตร ในปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ใส่สารละลายที่เตรียมไว้ลงในหลอด qPCR ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาใน Applied Biosystems StepOnePlus (Applied Biosystems, สหรัฐอเมริกา) เริ่มจากเปิดโปรแกรม step one software V.2.1 แล้วเลือก set up ตามด้วย design wizard จากนั้นตั้งชื่อการทดลองแล้วกำหนดค่า method and material โดย condition method เลือก quantitation comparative C_T และ reagent เลือก SYBR green จากนั้นระบุจำนวนตัวอย่าง (target) จำนวนซ้ำ (replicate) และยีนที่ใช้เป็นยีนมาตรฐาน (control) กำหนดให้มีสภาวะการทำงานโดยโปรแกรมที่ 1 ที่ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมที่ 2 ที่ 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 7 วินาที จำนวน 40 รอบ และโปรแกรมที่ 3 สำหรับตรวจสอบค่า melting curve ที่ 94 องศาเซลเซียส 15 วินาที 60 องศาเซลเซียส 15 วินาที และเพิ่มเป็น 95 องศาเซลเซียส ภายใน 20 นาที และ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ บันทึกผลค่า threshold cycle หรือ C_T ที่ได้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีน

3.3 การวิเคราะห์ผลที่ได้จาก Quantitative Real-time PCR

นำค่า C_T ที่ได้ของทุกตัวอย่างมาทำการคำนวณเพื่อหาค่า relative expression ratio ตามวิธีการของ (Livak and Schmittgen, 2001) โดยใช้โปรแกรม microsoft excel (Microsoft, สหรัฐอเมริกา) ซึ่งค่า relative expression ratio มีสูตรในการคำนวณดังนี้

สูตร
เมื่อ

$$\text{relative expression ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T, \text{target}} - C_{T, \text{calibrator}}) - (\text{Mean } C_{T, \text{target}} - \text{Mean } C_{T, \text{calibrator}})$$

$$C_{T, \text{target}} = \text{ค่า } C_T \text{ ของยีนที่สนใจ (target)}$$

$$C_{T, \text{calibrator}} = \text{ค่า } C_T \text{ ของยีนควบคุมของยีนที่สนใจนั้นๆ (ที่จัดเป็นคู่ของยีน target)}$$

$$\text{Mean } C_{T, \text{target}} = \text{ค่าเฉลี่ย } C_T \text{ ของตัวอย่างที่ให้เป็น calibrator}$$

$$\text{Mean } C_{T, \text{calibrator}} = \text{ค่าเฉลี่ย } C_T \text{ ของยีนควบคุมของตัวอย่างที่ให้เป็น calibrator}$$

ที่มา: คัดแปลงจาก Livak and Schmittgen (2001)

ค่า C_T ที่ได้แบ่งออกเป็นค่า C_T ของยีนที่สนใจ และค่า C_T ของยีนควบคุม นำค่า C_T ทั้งสองของแต่ละตัวอย่าง (ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ) บันทึกลงในตาราง microsoft excel ทำการคำนวณค่าเฉลี่ย C_T ของแต่ละตัวอย่าง เพื่อหาตัวอย่างที่เป็น calibrator โดยเลือกจากตัวอย่างที่มีค่าเฉลี่ย C_T ของยีนที่สนใจสูงสุด จากนั้นหาค่า relative expression ratio โดยใช้สูตรคำนวณข้างต้น (ตารางผนวกที่ 2, 4)

ผลและวิจารณ์

1. การแยกอาร์เอ็นเอจากรากข้าวด้วย Trizol reagent

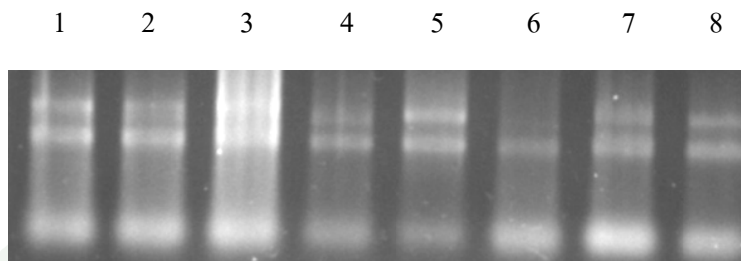
หลังจากสกัดอาร์เอ็นเอจากรากข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ได้รับและไม่ได้รับสารหนูด้วย trizol reagent นำอาร์เอ็นเอที่แยกได้ไปตรวจสอบคุณภาพโดยการวัดค่า optical density (O.D.) หรือค่าการดูดกลืนแสง โดยอาร์เอ็นเอที่ได้จากรากข้าวมีคุณภาพดี สะอาด ต้องมีค่า A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.8-2.0 หากมีค่าน้อยกว่านี้แสดงว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีการปนเปื้อนจากโปรตีน ฟีนอล หรือสารเคมีอื่นๆ (Sharma *et al.*, 2003) ซึ่งจากผลการทดลองอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากรากข้าวมีคุณภาพค่อนข้างดี คือ มีค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.83-2.08 (ตารางที่ 2) จากนั้นนำอาร์เอ็นเอไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel แล้วตรวจสอบด้วย UV-transilluminater (ภาพที่ 5)

ตารางที่ 2 ปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากรากข้าว

ตัวอย่าง	Conc. (ng/ μ l) / ข้าว 0.2 กรัม	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}
ข้าวดอกมะลิ 105 (Control)	335.8	8.394	4.037	2.08
ข้าวดอกมะลิ 105 (As)	486.6	12.164	6.595	1.85
ไรซ์เบอร์รี่ (Control)	265.0	6.625	3.231	2.05
ไรซ์เบอร์รี่ (As)	186.7	4.669	2.409	1.94
กข 6 (Control)	121.7	3.044	1.662	1.83
กข 6 (As)	268.7	6.717	3.571	1.88
หางยี 71 (Control)	486.6	12.166	6.537	1.86
หางยี 71 (As)	170.7	4.267	2.331	1.83

พบว่า RNA ที่สกัดได้มีการปนเปื้อนจาก genomic DNA เล็กน้อยโดยเฉพาะ RNA ที่ได้จากรากข้าวไรซ์เบอร์รี่ซึ่งจะเห็นจากภาพได้ชัดเจนที่สุด (ภาพที่ 5(3)) ปัญหานี้อาจแก้ไขได้โดยการใช้เอนไซม์ DNase I เพื่อกำจัด genomic DNA ที่ไม่ต้องการออกหลังจากสกัด RNA เสร็จเรียบร้อยแล้ว นอกจากนี้จะเห็นว่า RNA ในบางตัวอย่างมีการเสียสภาพเล็กน้อย เช่น RNA จากข้าวเหนียวพันธุ์

กข 6 ที่ได้รับสารหนู (ภาพที่ 5(6)) จึงต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของเอนไซม์ RNase ในทุกๆ ขั้นตอน



ภาพที่ 5 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสอาร์เอ็นเอที่สกัดจากรากข้าวด้วย trizol reagent

- (1) ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (control) (2) ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (As treated) (3) ไรซ์เบอร์รี่ (control) (4) ไรซ์เบอร์รี่ (As treated) (5) กข 6 (control) (6) กข 6 (As treated) (7) หางยี่ 71 (control) (8) หางยี่ 71 (As treated)

2. การสังเคราะห์ยีน *arsenate reductase* ในรากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ด้วยวิธี RT-PCR

2.1 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์เพื่อโคลนยีน *arsenate reductase* โดยการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์ของ *arsenate reductase* ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank และ UniProt ด้วยโปรแกรม ClustalW ในพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ ข้าว (*Oryza sativa* accession AAK20061), ข้าวแอฟริกา (*Oryza glaberrima* accession IIQVM3), ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* accession EER94555, XP002467557, C5WTH4), ข้าวโพด (*Zea mays* accession AFW88260, NP001144297, B6TQK1), ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* accession M0WIP5) และข้าวฟ่างหางกระรอก (*Setaria italica* accession XM004983711, K4AGK1) (ภาพผนวกที่ 2) ผลจากการทำ multiple alignment ของลำดับกรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีส่วนอนุรักษ์ที่สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์ทั้งชนิด forward และ reverse (ภาพที่ 6)

หลังจากได้ตำแหน่งอนุรักษ์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ยีนและทำการออกแบบไพรเมอร์แล้ว นำไพรเมอร์ที่ได้ไปตรวจสอบปริมาณ G/C และค่า T_m ที่เหมาะสม การเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ และการจับกันเองของไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม netprimer (<http://www.netprimer.com>) (ตารางที่ 3)

(ก)

AR1 F	
EER94555Sorghum_bicolor	ATGGCGCGGAGCGTGTCTGTA
AFW88260Zea_mays	CGTTTCGGCGGCGAAGCTGGTGTCCATGGC 50
XM004983711Setaria_italica	ATGGCGCGGAGCGTATCGTA
AAK200610ryza_sativa_Japonica	CGTTTCGGCGGCGAAGCTGGTGTCCATGGC 50
	ATGGCGCGGAGCGTGTCTGTA
	CGTTTCGGCGGCGAAGCTGGTGTCTATGGC 50
	ATGGCGCGGAGCGTGTCTGTA
	CGTTTCGGCGGCGAAGCTCCTGGCCATGGC 50
	*****.*
EER94555Sorghum_bicolor	GCGAGGCAATCCCCGCCTCGCCATCATCGACGTCAGGGATGAGGAGAGGA 100
AFW88260Zea_mays	GCGAGGCAATCCCCGCCTCGCCATCATCGACGTCAGGGATGAGGAGAGGA 100
XM004983711Setaria_italica	GCGCGGCAATCCCCGCCTCGCCATCATCGACGTCAGGGACGAGGAGAGGA 100
AAK200610ryza_sativa_Japonica	GCGCAGCAACCCCCGCCTCGCCATCATCGACGTCAGGGACGAGGAGAGGA 100
	***.*
EER94555Sorghum_bicolor	ATCATGGTACTGGAGCTCGGGTTTAACGGATGGGAGGGTTTCGGGGCAGCC 350
AFW88260Zea_mays	ATCATGGTACTGGAGCTCGGGTTTAACGGATGGGAGGGTTTCAGGGCAGCC 350
XM004983711Setaria_italica	ATCATGGTACTGGAGCTCGGGTTTAACGGATGGGAGGGTTTCAGGGCAGCC 350
AAK200610ryza_sativa_Japonica	ATCATGGTACTGGAGCTCGGGTTTAACGGATGGGAGGGTTTCAGGGCAGCC 350
	*****.*
EER94555Sorghum_bicolor	TGTCTGCCGCTGCACGGACGCTCCTTGCAAAGGGACGTGCTGTAA--- 396
AFW88260Zea_mays	TGTCTGCAGCTGCACGGACGCTCATTGCAAAGGGACGTGCTGTAA--- 396
XM004983711Setaria_italica	TGTTTGCCGCTGCACGGACGCTCCTTGCAAAGGGACGTGCTCATGA--- 396
AAK200610ryza_sativa_Japonica	CGTTTGCCGCTGCACGGACGCTCCTTGCAAAGGCACATGCTCACCTGAAG 400
	**.*
EER94555Sorghum_bicolor	-----
AFW88260Zea_mays	-----
XM004983711Setaria_italica	-----
AAK200610ryza_sativa_Japonica	AACCTGAGTTGTAA 414

ARend_R

(ข)

AR1_F	
XP002467557Sorghum_bicolor	MARSVSYSAAKLVSMMARGNPRLAIDVRDEERSYQAHAGSHHFASGSF 50
C5WTH4Sorghum_bicolor	MARSVSYSAAKLVSMMARGNPRLAIDVRDEERSYQAHAGSHHFASGSF 50
NP001144297Zea_mays	MARSVSYSAAKLVSMMARGNPRLAIDVRDEERSYQAHAGSHHFASGSF 50
B6TQK1Zea_mays	MARSVSYSAAKLVSMMARGNPRLAIDVRDEERSYQAHAGSHHFASGSF 50
K4AGK1Setaria_italica	MARSVSYSAAKLVSMMARGNPRVAIDVRDEERSYQAHAGSHHFASGSF 50
M0WIP5Hordeum_vulgare	MARSVSYSAAKLVSMMARGN-RVAIDVRDEERSYQAHAGSHHFASGSF 49
I1QVM3Oryza_glaberrima	MARSVSYSAAKLVSMMARGNPRVAIDVRDEERSYQAHAGSHHFSSRSF 50
	*****.*
XP002467557Sorghum_bicolor	EARMPELARAASGKDTLVFHCALSQVRGPTCARMFSDYLSSETKEDSGIKN 100
C5WTH4Sorghum_bicolor	EARMPELARAASGKDTLVFHCALSQVRGPTCARMFSDYLSSETKEDSGIKN 100
NP001144297Zea_mays	EARMPELVRAASGKDTLVFHCALSQVRGPTCARMFSDYLSSETKEDSGIKN 100
B6TQK1Zea_mays	EARMPELVRAASGKDTLVFHCALSQVRGPTCARMFSDYLSSETKEDSGIKN 100
K4AGK1Setaria_italica	AARMPELVQAASGKDTLVFHCALSQVRGPTCARMFSDYLSSETKEDSGIKN 100
M0WIP5Hordeum_vulgare	AARMPELVRAATSGKDTLVFHCALSQVRGPTCARMFSDYLSSETKEDSGIKN 99
I1QVM3Oryza_glaberrima	AARLPELARATGDKDTLVFHCALSQVRGPTCARMFSDYLSSETKEDSGIKN 100
	**.*
XP002467557Sorghum_bicolor	IMVLELGFNGWEGSGQPVCRCTDAPCKGTCC----- 131
C5WTH4Sorghum_bicolor	IMVLELGFNGWEGSGQPVCRCTDAPCKGTCC----- 131
NP001144297Zea_mays	IMVLERGFNGWEGSGQPVCSCTDAHCKGTCS----- 131
B6TQK1Zea_mays	IMVLERGFNGWEGSGQPVCSCTDAHCKGTCS----- 131
K4AGK1Setaria_italica	IMVLELGFNGWEGSGQPVCRCTDAPCKGTCS----- 131
M0WIP5Hordeum_vulgare	IMVLERGFNGWEGSGQPVCHCKDAPCKGTCS----- 130
I1QVM3Oryza_glaberrima	IMVLERGFNGWELSGQPVCRCTDAPCKGTCSPEEPEL 137
	*****.*

ARend_R

ภาพที่ 6 การวิเคราะห์ multiple alignment ของ arsenate reductase จากลำดับนิวคลีโอไทด์ (ก) และกรดอะมิโน (ข) ที่มีในฐานข้อมูล ตำแหน่งอนุรักษ์ที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์แสดงในกรอบสี่เหลี่ยม

โดยทั่วไปไพรเมอร์ควรมีความยาวอยู่ในช่วง 18-24 คู่เบส การใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นประมาณ 15 คู่เบสหรือน้อยกว่านั้น โอกาสที่ไพรเมอร์จะจับกับแม่พิมพ์ในตำแหน่งอื่นหรือโอกาสในการเกิด amplified product แบบไม่จำเพาะจะมีสูง แต่หากยาวเกินไปก็มีโอกาสที่ไพรเมอร์จะจับกันเองสูงเช่นกัน ค่า T_m ของไพรเมอร์ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 55-65 องศาเซลเซียส ค่า T_m ในช่วงนี้จะเกาะติดกับแม่พิมพ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาเดียวกันไม่ควรต่างกันเกิน 5 องศาเซลเซียส ปริมาณ G/C content ควรอยู่ที่ประมาณ 40-60 เปอร์เซ็นต์ เพราะไพรเมอร์ที่มีปริมาณ G/C สูงจะเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบได้อย่างสมบูรณ์และมีเสถียรภาพ ส่วนไพรเมอร์ที่มีปริมาณ A/T สูง จะให้ค่า T_m ของไพรเมอร์ต่ำกว่า การทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำเกินไปอาจส่งผลให้ไพรเมอร์เข้าเกาะกับตำแหน่งที่ไม่ถูกต้องบนสายดีเอ็นเอ นอกจากนี้ไพรเมอร์ที่ดีต้องไม่เกิดโครงสร้างทุติยภูมิ ซึ่งควรมีค่า ΔG สูงกว่า -3 kcal/mol หากต่ำกว่านี้จะมีโอกาสเกิด hairpin loop ได้ การจับกันเองของไพรเมอร์ไม่ควรเกิน 4 พันธะและแต่ละช่วงไม่ควรติดกัน (Kamel, 2003)

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนยีน *arsenate reductase*

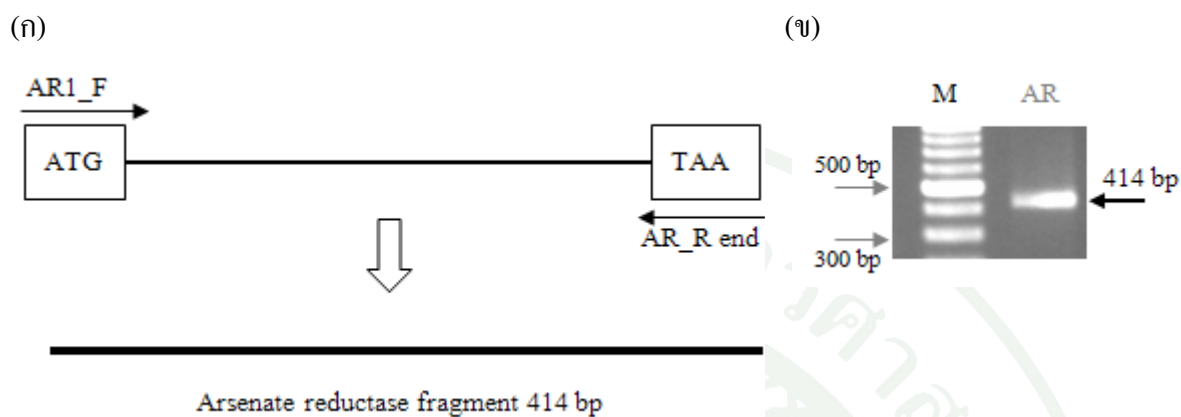
Primer	Sequence	Tm (°C)
AR1_F	5'ATGGCGCGGAGCGTGTCGTAC3'	67.2
ARend_R	5'TTACAACTCAGGTTCTTCAGGTGA3'	60.0

2.2 การสังเคราะห์ยีน *arsenate reductase* ด้วยวิธีพีซีอาร์

หลังจากแยกอาร์เอ็นเอของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ด้วย trizol reagent ดังที่กล่าวไปข้างต้นแล้ว นำอาร์เอ็นเอรวมจำนวน 5 ไมโครกรัม มาสร้างดีเอ็นเอสายแรกแล้วนำดีเอ็นเอสายแรกมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *arsenate reductase* โดยใช้เอนไซม์ i-taq DNA polymerase ดังรายละเอียดต่อไปนี้

นำดีเอ็นเอสายแรกมาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน *arsenate reductase* ด้วยไพรเมอร์ AR1_F และ ARend_R โดยใช้อุณหภูมิในการสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย initiation denaturation step ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีจำนวน 1 รอบ และ denaturation step ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing step ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที extension step ที่ 72 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาประมาณ 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที เมื่อสังเคราะห์เสร็จแล้ว นำดีเอ็นเอที่เตรียมได้ 1 ไมโครลิตร มาตรวจสอบด้วย

วิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบน agarose gel พบว่าผลผลิตพีซีอาร์มีขนาด 414 คู่เบส ซึ่งมีขนาดตรงตามที่คาดหวัง (ภาพที่ 7)



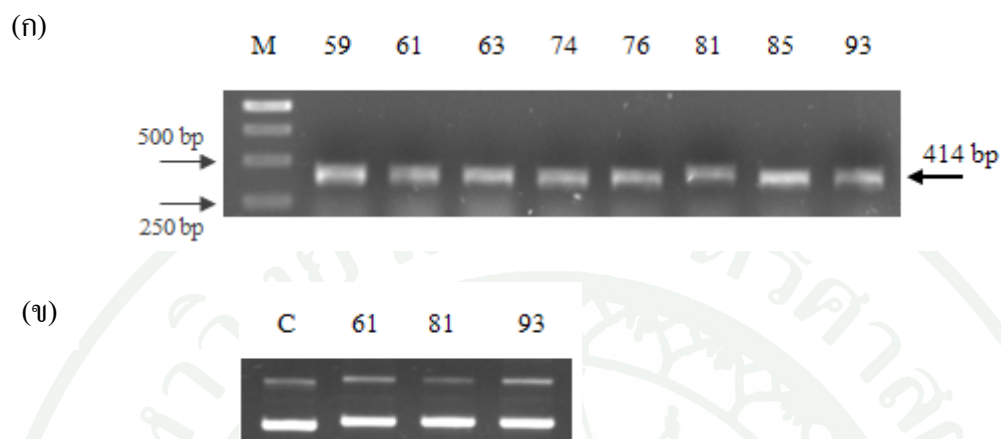
ภาพที่ 7 การสังเคราะห์ยีน *arsenate reductase* ด้วยวิธีพีซีอาร์

(ก) แผนภาพการสังเคราะห์ของยีน *arsenate reductase* (ข) เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของชิ้นดีเอ็นเอของยีน *arsenate reductase* ขนาด 414 คู่เบส

2.3 การโคลนยีนที่สังเคราะห์ได้ในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

นำผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *arsenate reductase* ขนาด 414 คู่เบส ที่ได้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้บน agarose gel จากนั้นสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เชื่อมต่อกับ พลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector เพื่อถ่ายเข้าไปในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5- α ด้วยวิธี heat shock transformation แล้วคัดเลือกโคโลนีบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ได้โคโลนีที่มีสีขาวจำนวน 8 โคโลนี และสีฟ้าจำนวน 14 โคโลนี คัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีสีขาวซึ่งมีลำดับที่ 59, 61, 63, 74, 76, 81, 85 และ 93 มาตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *arsenate reductase* คือ ไพรเมอร์ AR1_F และ ARend_R เมื่อสังเคราะห์เสร็จแล้ว นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบน พบว่าผลผลิตพีซีอาร์มีขนาด 414 คู่เบส ซึ่งมีขนาดตรงตามที่คาดหวัง (ภาพที่ 8 (ก)) จากนั้นสุ่มเลือกโคโลนีที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแทรกอยู่มา สกัดแยกพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด โดยเลือกโคโลนีลำดับที่ 61, 81 และ 93 ตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้บน agarose gel เทียบกับพลาสมิดที่สกัดจากโคโลนีสีฟ้าซึ่งเป็นพลาสมิด pGEM[®]-T Easy ที่ไม่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ (ภาพที่ 8 (ข)) จากนั้นนำพลาสมิดจากโคโลนีที่ 61 ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 90 นาโนกรัมต่อ

ไมโครลิตร จำนวน 8 ไมโครลิตร (ไพรเมอร์ T7 2 ไมโครลิตร) ส่งบริษัท macrogen เพื่อหาลำดับเบสของยีน



ภาพที่ 8 การตรวจสอบพลาสมิดที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอยีน *arsenate reductase*

(ก) ยีน *arsenate reductase* ที่สังเคราะห์ได้จากโคลนีสีขาวทั้งหมด 8 โคลน (59-93)

(ข) พลาสมิดสายผสมของยีน *arsenate reductase* (59-93) เปรียบเทียบกับ (C) พลาสมิด pGEM[®]-T Easy ที่ไม่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ

2.4 การวิเคราะห์ยีน *arsenate reductase* ที่โคลนได้จากรากของข้าวขาวดอกมะลิ 105

ผลจากการศึกษาพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *arsenate reductase* ที่โคลนได้มีขนาด 414 คู่เบส เมื่อนำมาแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ORF finder ซึ่งแปลรหัสได้ 1 open reading frame (ORF) ที่กำหนดการสร้างสายโพลีเปปไทด์ขนาดความยาว 137 เรสซิดิวส์ (ภาพที่ 9)

```

1 ATGgcgcgggagcgtgtcgtacgtgtcggcggaagctcctggcc
  M A R S V S Y V S A A K L L A
46 atggcgcgcgggaacccccgcgtcgcgcacatcgacgtcagggac
  M A R G N P R V A I I D V R D
91 gaggagaggagctaccaggcgcacatcgagggtcgcaccacttc
  E E R S Y Q A H I G R S H H F
136 tccagccgcagcttcgcggcgcggtgcccggagctcgcgcgtgcc
  S S R S F A A R L P E L A R A
181 accggcgacaaggacaccgtcgtcttccactgcgccctcagcaag
  T G D K D T V V F H C A L S K
226 gtgcgaggtccatcgtgtgccaagatgttctccgactatctatct
  V R G P S C A K M F S D Y L S
271 gagaccaaggaagaatcaggaacaaagaacatcatggtgctggaa
  E T K E E S G T K N I M V L E
316 cgtgggttcaatggatgggagctttcgggacaacccgttgccgg
  R G F N G W E L S G Q P V C R
361 tgcactgatgcccttgcaaaggcacatgctcacctgaagaacct
  C T D A P C K G T C S P E E P
406 gagttgTAA 414

```

ภาพที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *arsenate reductase* มีขนาด 414 คู่เบสที่แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนความยาว 137 เรสซิดิวส์ ส่วนที่ขีดเส้นใต้แสดง start codon (ATG) และ stop codon (TAA)

เมื่อนำข้อมูลการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ได้มาเปรียบเทียบกับโปรตีนที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLASTP พบว่ามีความคล้ายคลึงกับโปรตีนที่พบในพืชหลายชนิดโดยเฉพาะในกลุ่มธัญพืช (ตารางที่ 4) ได้แก่ ข้าวแอฟริกา (*Oryza glaberrima* accession I1QVM3), ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* accession C5WTH4), ข้าวโพด (*Zea mays* accession B6TQK1) และ ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* accession M0WIP5) เป็นต้น คิดเป็นร้อยละ 99, 85, 83, และ 83 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนองค์ประกอบของยีน *arsenate reductase* ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับพืชชนิดอื่น

Accession #	Plant Species	Common name	Amino acid	%Identity
AHX22004	<i>Oryza sativa</i> L. cv. Khao Dawk Mali 105	ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (jasmine rice)	137	100
I1QVM3	<i>Oryza glaberrima</i>	ข้าวแอฟริกา (african Rice)	137	99
C5WTH4	<i>Sorghum bicolor</i>	ข้าวฟ่าง (sorghum)	131	85
B6TQK1	<i>Zea mays</i>	ข้าวโพด (corn)	131	83
M0WIP5	<i>Hordeum vulgare</i>	ข้าวบาร์เลย์ (barley)	130	83
XP004983768	<i>Setaria italica</i>	ข้าวฟ่างหางกระรอก (foxtail millet)	131	83
I1I5V8	<i>Brachypodium distachyon</i>	purple false brome	131	82
AAU11500	<i>Holcus lanatus</i>	velvet grass	131	71
ADK38620	<i>Ipomoea batata</i>	มันต่อเผือก (sweet potato)	139	57
ABM05620	<i>Pteris vittata</i>	กูดหมาก (chinese brake fern)	130	48
NP_568119	<i>Arabidopsis thaliana</i>	อะราบิโดฟซิส (mousear cress)	130	59

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับโปรตีนที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล พบว่ามีความคล้ายกับพืชชนิดต่าง ๆ คิดเป็นร้อยละ 48-99 (ตารางที่ 4) ประกอบด้วยพืชใบเลี้ยงเดี่ยว 7 ชนิด ได้แก่ ข้าวแอฟริกา, ข้าวฟ่าง, ข้าวโพด, ข้าวบาร์เลย์, ข้าวฟ่างหางกระรอก (*Setaria italica* accession XP004983768), purple false brome (*Brachypodium distachyon* accession I1I5V8) และ velvet grass (*Holcus lanatus* accession AAU11500) พืชใบเลี้ยงคู่อีก 2 ชนิด ได้แก่ มันต่อเผือก (*Ipomoea batata* accession ADK38620) และอะราบิโดฟซิส (accession NP_568119) รวมทั้งพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มไร้เมล็ด ได้แก่ กูดหมาก (*Pteris vittata* accession ABM05620) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนทั้งหมดมาทำการ alignment ด้วยโปรแกรม clustalW พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์

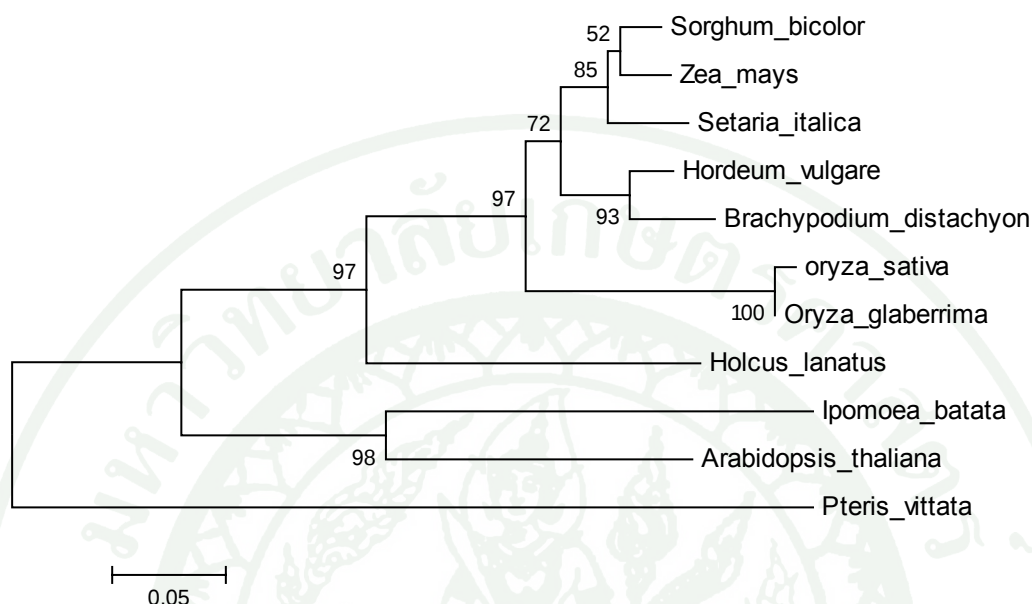
เป็นโมทีฟ (motif) คือ HisCys(X)₅Arg (X คือ กรดอะมิโนชนิดใดก็ได้) ในพืชทุกชนิด โดยในข้าว
ข้าวดอกมะลิ 105 มีลำดับกรดอะมิโนเป็น His⁷⁰CyS⁷¹AlaLeuSerLysValArg⁷⁷ (ภาพที่ 10)

Ipomoea_batata	MTRS--TTYITASQLLSLKR-RPNIAIVDVRDDERSCDGHIAGSLHFASD 47
Arabidopsis_thaliana	MARS--ISYITSTQLLPLHR-RPNIAIIDVRDEERNYDGHIGSLHYASG 47
oryza_sativa	MARS--VSYSVSAAKLLAMARGNPRVAIIDVRDEERSYQAHIGRSHHFSSR 48
Oryza_glaberrima	MARS--VSYSVSAAKLLAMARGNPRVAIIDVRDEERSYQAHIGGSHHFSSR 48
Sorghum_bicolor	MARS--VSYSVSAAKLVSMARGNPRVAIIDVRDEERSYQAHIGSHHFASG 48
Zea_mays	MARS--VSYSVSAAKLVSMARGNPRVAIIDVRDEERSYQAHIGSHHFASG 48
Setaria_italica	MARS--VSYSVSAAKLVSMARGNPRVAIIDVRDEERSYQAHIGSHHFASG 48
Hordeum_vulgare	MARS--VSYSVSAAKLVSMARGN-RVAVIDVRDEERSYQAHIGSHHFASG 47
Brachypodium_distachyon	MARS--VSCVSAAKLVSMTRGNRLAVIDVRDEERSYQAHIGSHHFASG 48
Holcus_lanatus	MARKG-VSYVTAAELVSLVR-DPRVAIIDVRDEERICDAHIGSHHYASD 48
Pteris_vittata	MASLHTLSYITASELQRLQP-NSKLAIIDVRDEERSYDGHIGSWHFASD 49
	*: : : : : * : : : : * : : : : * : : : : *
Ipomoea_batata	TFLDKLPSLVQSVKGKDTLVFHCALSQVRGPKCARRLAEYLSDEMDDAG 97
Arabidopsis_thaliana	SFDDKISHLVQNVKDKDTLVFHCALSQVRGPTCARRLVNYL-DEKKEDTG 96
oryza_sativa	SFAARLPELARATGDKDVTVFHCALSKVRGPSCAKMFSDYL-SETKEESG 97
Oryza_glaberrima	SFAARLPELARATGDKDVTVFHCALSKVRGPSCAKMFSDYL-SETKEESG 97
Sorghum_bicolor	SFEARMPELARAASGKDTLVFHCALSQVRGPTCARMFSDYL-SETKEDSG 97
Zea_mays	SFEARMPELVRAASGKDTLVFHCALSQVRGPTCARMFSDYL-SETKEDSG 97
Setaria_italica	SFAARMPELVQAASGKDTLVFHCALSQVRGPTCARMFFDYL-SETKEDSE 97
Hordeum_vulgare	SFAARMPELVRAATSGKDTLVFHCALSQVRGPSCARMFSDYL-SESKEDSG 96
Brachypodium_distachyon	SFAARLPELVRAATSGKDTLVFHCALSQVRGPSCARMFSDYL-SESKEDSG 97
Holcus_lanatus	GFAERLPEIAEATRAKETLVFHCALSQVRGPTCARMFSDYL-SEAKEDSG 97
Pteris_vittata	TFVEELPALVGKLEGQEAUVFHCALSKVRGPSCAKKFVDHL-ATLASYN 98
	* : : : : : * : : : : * : : : : *
	HC.....R
Ipomoea_batata	IKNIMVLERGYNWEASGRPVCRCTDVFCKDNSEHGQSQNS 139
Arabidopsis_thaliana	IKNIMILERGFNGWEASGKPVCRCAEVPCKGDCA----- 130
oryza_sativa	TKNIMVLERGYNWELSGQPVCRCTDAPCKGTCSPEEPEL-- 137
Oryza_glaberrima	TKNIMVLERGYNWELSGQPVCRCTDAPCKGTCSPEEPEL-- 137
Sorghum_bicolor	IKNIMVLELGFNGWEGSQPVCRCTDAPCKGTCC----- 131
Zea_mays	IKNIMVLERGYNWEGSQPVCSCTDAHCKGTCS----- 131
Setaria_italica	IKNIMVLELGFNGWEGSQPVCRCTDAPCKGTCS----- 131
Hordeum_vulgare	IKNIMVLERGYNWEISGQPVCHCKDAPCKGTCS----- 130
Brachypodium_distachyon	IKNIMVLERGYNWEISGQHVCKDAPCKGTCS----- 131
Holcus_lanatus	VKSITILERGFNGWELSGRPVCRCKDAPCKGVCS----- 131
Pteris_vittata	APQVYVLERGFNGWASAGHPVCNCAQPHCKG-C----- 130
	: : : : : * : : : : * : : : : *

ภาพที่ 10 การทำ multiple alignment เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน arsenate reductase ของข้าว
ข้าวดอกมะลิ 105 กับพืชชนิดอื่น บริเวณอนุรักษ์ HisCys(X)₅Arg แสดงในกรอบสี่เหลี่ยม

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโปรตีนด้วย phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม
MEGA 4.0 (ภาพที่ 11) พบว่าโปรตีน arsenate reductase ในข้าวข้าวดอกมะลิ 105 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม
เดียวกับ ข้าวแอฟริกา (accession I1QVM3) และมีความใกล้เคียงกับโปรตีน arsenate reductase ที่พบ
ในข้าวฟ่าง (accession C5WTH4), ข้าวโพด (accession B6TQK1), ข้าวฟ่างหางกระรอก (accession
XP004983768), ข้าวบาร์เลย์ (accession M0WIP5) และ purple false brome (accession I1I5V8) ซึ่ง
จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเช่นเดียวกัน ในขณะที่มีความแตกต่างจากพืชใบเลี้ยงคู่ ได้แก่ มันต่อเผือก
(accession ADK38620) และอะราบิดอปซิส (accession NP_568119) และ arsenate reductase จาก

กุศหมาก (accession ABM05620) ซึ่งจัดเป็นเฟิร์น จึงถูกจัดออกจากกลุ่มของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่



ภาพที่ 11 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของ arsenate reductase ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับพืชชนิดอื่นอีก 10 ชนิด (วิเคราะห์ด้วย neighbor-joining method, ทำซ้ำทั้งหมด 1000 ครั้ง)

เอนไซม์ arsenate reductase เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการลดความเป็นพิษของสารหนูที่เกิดขึ้นในเซลล์และเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะต่อสารหนูเท่านั้นไม่เกี่ยวข้องกับโลหะหนักอื่นๆ ดังนั้น การศึกษาขบวนการเมตาบอลิซึมของสารหนูที่เกี่ยวข้องกับ arsenate reductase ในข้าวสายพันธุ์ที่นิยมบริโภคในประเทศไทยจึงมีความสำคัญ ผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ลำดับกรดอะมิโน arsenate reductase ของยีนที่ได้โคลนจากรากของข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีขนาดต่างจากเอนไซม์ชนิดเดียวกันที่พบในพืชชนิดอื่นๆ ทั้งพืชชั้นต่ำ พืชใบเลี้ยงคู่ และพืชใบเลี้ยงเดี่ยวซึ่งมีความยาว 130-139 เรสซิดิวส์ (ตารางที่ 4) โดยมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันคิดเป็นร้อยละ 48-85 อย่างไรก็ตามพบว่า arsenate reductase ทั้งหมดมีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์เป็นโมทีฟ (motif) คือ HisCys(X)₅Arg (ภาพที่ 10) ซึ่งเป็นลำดับกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ arsenate reductase เมื่อทำให้เกิดการกลายที่กรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine) หรือ อาร์จินีน (arginine) ในบริเวณโมทีฟ HisCys(X)₅Arg ของ arsenate reductase ในยีสต์ พบว่าความสามารถในการทำปฏิกิริยารีดักชันเปลี่ยนสารหนูในรูปของอาร์เซเนตเป็นอาร์เซไนด์ของยีสต์ลดลง

(Mukhopadhyay *et al.*, 2000; Mukhopadhyay and Rosen, 2001) แสดงให้เห็นว่าบริเวณโมทิฟดังกล่าวมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์

เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน arsenate reductase ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับโปรตีนที่มีรายงานในฐานข้อมูลพบว่ามี ความคล้ายคลึงกับโปรตีนในกลุ่ม phosphatase ได้แก่ dual-specificity phosphatases 25 (CDC25) ใน purple false brome (accession XP_003574287) (ร้อยละ 82), อะราบิดอพิซิส (accession NP_568119) (ร้อยละ 59), มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* accession XP_004230082) (ร้อยละ 58) และ บ๊วย (*Prunus mume* accession XP_008241391) (ร้อยละ 56) และยังมีความคล้ายคลึงกับโปรตีน rhodanese ใน velvet grass (accession AAU11500) (ร้อยละ 71) ผลจาก BLASTP พบว่าโปรตีนเหล่านี้มีโดเมนที่อยู่ใน family เดียวกัน คือ rhodanese family และลำดับกรดอะมิโนยังพบบริเวณโมทิฟ HisCys(X)₅Arg แสดงให้เห็นว่าโปรตีนเหล่านี้มีความใกล้เคียงกัน ในโปรโตซัว *Leishmania major* โปรตีน arsenate reductase (LmACR2) นอกจากจะมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ reductase แล้วยังมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ phosphatase ด้วย (Zhou *et al.*, 2004) ในยีสต์และ *E. coli* เอนไซม์ arsenate reductase มีวิวัฒนาการร่วมกับเอนไซม์ phosphatase และมีความคล้ายคลึงกับ phosphatase ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mukhopadhyay and Rosen, 2002) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโปรตีนด้วย phylogenetic tree พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ ข้าวแอฟริกา, ข้าวฟ่าง, ข้าวโพด, ข้าวบาร์เลย์, ข้าวฟ่างหางกระรอก และ purple false brome ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและแยกออกจากมันต่อเฟือกและอะราบิดอพิซิส ซึ่งเป็นกลุ่มของพืชใบเลี้ยงคู่

3. การสังเคราะห์ยีน *phytochelatin synthase* ในรากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ด้วยวิธี RT-PCR

3.1 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน *phytochelatin synthase* โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *phytochelatin synthase* ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม clustalW ในพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ ข้าว (*Oryza sativa* accession EAY98053, EEE63734, AAO13349), ข้าวสาลี (*Triticum aestivum* accession AF093752), และหญ้าแพรก (*Cynodon dactylon* accession AY553634) (ภาพผนวกที่ 3)

ผลจากการทำ multiple alignment พบว่ามีส่วนอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโน ที่จะนำมาออกแบบไพรเมอร์ชนิด forward โดยใช้คู่กับไพรเมอร์ชนิด reverse ที่มี oligodT คือ RACE(T) สำหรับเพิ่มปริมาณยีนบริเวณปลาย 3' รวมทั้งไพรเมอร์ชนิด forward และชนิด reverse สำหรับการโคลนบริเวณส่วนกลางของยีน (ภาพที่ 12) (ตารางที่ 5)

EAY980530ryza_sativaIndica	GCATCGACCCGGGGCGGCGGTGGAAGGGCCCTGGCGGTGGTTTCGACGAG 300
EEE637340ryza_sativaJaponica	GCATCGACCCGGGGCGGCGGTGGAAGGGCCCTGGCGGTGGTTTCGACGAG 300
AA0133490ryza_sativa	GCATCGACCCGGGGCGGCGGTGGAAGGGCCCTGGCAGTGGTTTCGACGAG 300
AF093752Triticum_aestivum	CCATCGACCCGGGGCGGCGGTGGAAGGGCCCTGGCGGTGGTTTCGACGAG 255
AY553634Cynodon_dactylon	CCATCGACCCGGGGCGGCGGTGGAAGGGCCCTGGCGGTGGTTTCGACGAG 261
PCS301 F	
EAY980530ryza_sativaIndica	TCCATGCTCGACTGCTGCGAGCGCCTCGACACGGTCAGGGCGGAGGGGAT 350
EEE637340ryza_sativaJaponica	TCCATGCTCGACTGCTGCGAGCACCTCGACACGGTCAGGGCGGAGGGGAT 350
AA0133490ryza_sativa	TCCATGCTCGACTGCTGCGAGCACCTCGACACGGTCAGGGCGGAGGGGAT 350
AF093752Triticum_aestivum	TCCATGCTCGACTGCTGCGAGCCCTCCACAAGGTCAAGGCCGAGGGCAT 305
AY553634Cynodon_dactylon	TCAATGCTCGATTGCTGCGAGCTCCTCGACAAGGTCAAGGCCAGGGCAT 311

EAY980530ryza_sativaIndica	CACCTTCGGCAAGGTGCCTGCCTCGCCACTGCTCCGGCGCCGACGTCC 400
EEE637340ryza_sativaJaponica	CACCTTCGGCAAGGTGCCTGCCTCGCCACTGCTCCGGCGCCGACGTCC 400
AA0133490ryza_sativa	CACCTTCGGCAAGGTGCCTGCCTCGCCACTGCTCCGGCGCCGACGTCC 400
AF093752Triticum_aestivum	CACCTTCGGCAAGGTGCCTGCCTCGCGCACTGCGCCGGCGCCGTGTCC 355
AY553634Cynodon_dactylon	CACCTTCGGCAAGGTGCCTGCCTCGCGCACTGCTCCGGCGCCAGGTCC 361

EAY980530ryza_sativaIndica	GCACCTTCGGCGCCGCCAGGCCACGCTCGCCGACCTCCGGCGCCACCTC 450
EEE637340ryza_sativaJaponica	GCACCTTCGGCGCCGCCAGGCCACGCTCGCCGACCTCCGGCGCCACCTC 450
AA0133490ryza_sativa	GCACCTTCGGCGCCGCCAGGCCACGCTCGCCGACCTCCGGCGCCACCTC 450
AF093752Triticum_aestivum	AGTCCTTCGGCGCCGACCAAGCCACCTCCACGACTTCGGCGCCACCTC 405
AY553634Cynodon_dactylon	AGTCTTTCGGCGCCAACCGAGCCACCTCAACGACTTCGCGAGCATCTC 411

EAY980530ryza_sativaIndica	CTGCGCTGCGCCTCTCCAGGATTGCCATCTCGTCGCTCCTACCACCG 500
EEE637340ryza_sativaJaponica	CTGCGCTGCGCCTCTCCAGGATTGCCATCTCGTCGCTCCTACCACCG 500
AA0133490ryza_sativa	CTGCGCTGCGCCTCTCCAGGATTGCCATCTCGTCGCTCCTACCACCG 500
AF093752Triticum_aestivum	ACGCGCTGCGCCTCTCCAGGACTGCCATCTCATCTCCTCCTACCACAG 455
AY553634Cynodon_dactylon	GTCCGCTGCGTCTCTCAAGATTGCCATCTCATCGCTCCTACCACAG 461

EAY980530ryza_sativaIndica	GAAGCTTCTCGGCCAGACTGGAACAGGGCATTCTCGCCGATTGGCGGCT 550
EEE637340ryza_sativaJaponica	GAAGCTTCTCGGCCAGACTGGAACAGGGCATTCTCGCCGATTGGCGGCT 550
AA0133490ryza_sativa	GAAGCTTCTCGGCCAGACTGGAACAGGGCATTCTCGCCGATTGGCGGCT 550
AF093752Triticum_aestivum	GAGGCCCTTCAAGCAGACTGGGACTGGCCATTCTCACCGATCGGGGGT 505
AY553634Cynodon_dactylon	GAGGCCTTTACAGCAGACTGGAAGTGGGCACTTCTCCCAATCGGTGGCT 511

EAY980530ryza_sativaIndica	ACCATGCTGGGCAAGGACATGGCGCTGATCCTGGATGTCGCTCGTTCAAA 600
EEE637340ryza_sativaJaponica	ACCATGCTGGGCAAGGACATGGCGCTGATCCTGGATGTCGCTCGTTCAAA 600
AA0133490ryza_sativa	ACCATGCTGGGCAAGGACATGGCGCTGATCCTGGATGTCGCTCGTTCAAA 600
AF093752Triticum_aestivum	ATCATGCCGAGAAAGACATGGCGCTCATCTTGGATGTTGCGCGCTTCAAA 555
AY553634Cynodon_dactylon	ACCACGCCGGACAGGATATGGCGCTTATCTTTGATGTTGCCCGATTCAAG 561

EAY980530ryza_sativaIndica	TACCTCCTCATTGGATTCCGCTGCCGCTTCTTTGGGAAGCCATGAACAC 650
EEE637340ryza_sativaJaponica	TACCTCCTCATTGGATTCCGCTGCCGCTTCTTTGGGAAGCCATGAACAC 650
AA0133490ryza_sativa	TACCTCCTCATTGGATTCCGCTGCCGCTTCTTTGGGAAGCCATGAACAC 650
AF093752Triticum_aestivum	TACCTCCTCATTGGGTTCCATTGACGCTTCTCTGGGATGCCATGAACAC 605
AY553634Cynodon_dactylon	TACCTCCACATTGGGTTCCACTGCCACTTCTTAGGAAGCCATTAATAC 611

PCS679 F	
EAY980530ryza_sativaIndica	GATTGATGAAGCAACTGGGCTTCTCAGGGGTTTCATGCTTATCTCAAGGA 700
EEE637340ryza_sativaJaponica	GATTGATGAAGCAACTGGGCTTCTCAGGGGTTTCATGCTTATCTCAAGGA 700
AA0133490ryza_sativa	GATTGATGAGGCAACTGGGCTTCTCAGGGGTTTCATGCTTATCTCAAGGA 700
AF093752Triticum_aestivum	GACTGATGAAGCAACTGGGCTTCTCAGGGGTTTCATGCTTATCTCAAGGC 655
AY553634Cynodon_dactylon	GACTGATGAAGCAACTGGGCTTCTCAGAGGGTACATGCTCGTATCAAGGC 661

PCS698 R	
EAY980530ryza_sativaIndica	ATACTGAAGCTCCTTTATTGATCCGTGCAGTGAATTGCAGGGATGAAAGC 750
EEE637340ryza_sativaJaponica	ATACTGAAGCTCCTTTATTGATCCGTGCAGTGAATTGCAGGGATGAAAGC 750
AA0133490ryza_sativa	ATACTGAAGCTCCTTTATTGATCCGTGCAGTGAATTGCAGGGATGAAAGC 744
AF093752Triticum_aestivum	GCAGTTCAGCTCCTTCTTCTGCTACACAGTGAAGTTCGCGCCATGGAAGT 705
AY553634Cynodon_dactylon	ACACTGCAGCTCCTTCTGTTACTGTACACAGTGAAGTTCGAGAGAGGAAAGC 711

ภาพที่ 12 แสดงการวิเคราะห์ multiple alignment ของ phytochelatin synthase จากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนจากที่มีในฐานข้อมูล ตำแหน่งอนุรักษ์ที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์แสดงในกรอบสี่เหลี่ยม

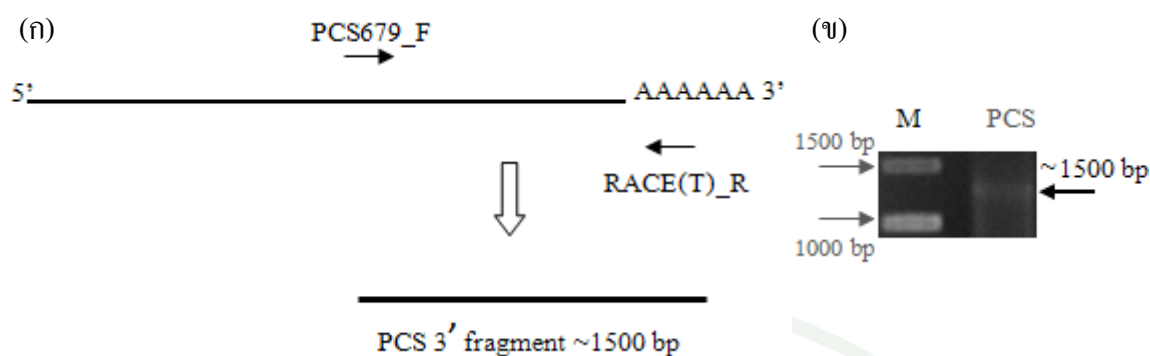
ตารางที่ 5 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการโคลนยีน *phytochelatase*

primer	Sequence	Tm (°C)
PCS679_F	5'GGGTTCATGCTTATCTCAAG3'	56.4
RACE(T)	5'GACTCGAGTCGACATCGTTTTTTTTTTTTTTTTT3'	57.0
PCS301_F	5'GGGTTCATGCTTATCTCAAG3'	60.0
PCS698_R	5'CTTGAGATAAGCATGAACCC3'	58.0

3.2 การสังเคราะห์ยีน *phytochelatase*

หลังจากแยกอาร์เอ็นเอของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และสร้างดีเอ็นเอสายแรกแล้ว นำดีเอ็นเอสายแรกมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *phytochelatase* ด้วยวิธีพีซีอาร์ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

นำดีเอ็นเอสายแรกมาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน *phytochelatase* บริเวณปลาย 3' ด้วยไพรมเมอร์ PCS679_F และ RACE(T) โดยใช้อุณหภูมิในการสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย initiation denaturation step ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีจำนวน 1 รอบ และ denaturation step ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing step ที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที extension step ที่ 72 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาประมาณ 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เมื่อสังเคราะห์เสร็จแล้ว นำดีเอ็นเอที่เตรียมได้ 1 ไมโครลิตร มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดประมาณ 1500 คู่เบส (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 การสังเคราะห์ยีน *phytochelatase* บริเวณปลาย 3' ด้วยวิธีพีซีอาร์

(ก) แผนภาพการสังเคราะห์ของยีน *phytochelatase* บริเวณปลาย 3'

(ข) เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของชิ้นดีเอ็นเอของยีน *phytochelatase* บริเวณปลาย 3' ขนาดประมาณ 1500 คู่เบส

จากนั้นนำดีเอ็นเอสายแรกมาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน *phytochelatase* บริเวณกลางยีนด้วยไพรเมอร์ PCS301_F และ PCS698_R โดยใช้อุณหภูมิในการสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย initiation denaturation step ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีจำนวน 1 รอบ และ denaturation step ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing step ที่อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที extension step ที่ 72 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาประมาณ 20 วินาทีจำนวน 30 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียสนาน 2 นาที เมื่อสังเคราะห์เสร็จแล้วตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าผลผลิตพีซีอาร์มีขนาด 398 คู่เบส (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 การสังเคราะห์ยีน *phytochelatin synthase* บริเวณกลางยีนด้วยวิธีพีซีอาร์

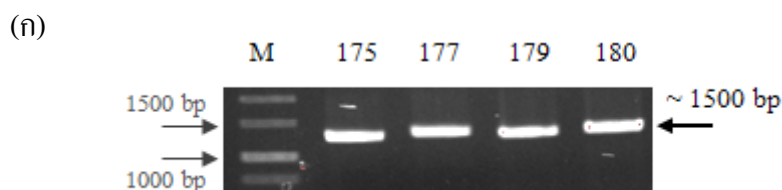
(ก) แผนภาพการสังเคราะห์ของยีน *phytochelatin synthase*

(ข) เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของชิ้นดีเอ็นเอของยีน *phytochelatin synthase* บริเวณกลางยีน ขนาด 398 คู่เบส

3.3 การโคลนยีนที่สังเคราะห์ได้ในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

นำผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *phytochelatin synthase* บริเวณปลาย 3' ขนาดประมาณ 1500 คู่เบส และบริเวณกลางยีนขนาด 398 คู่เบส มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้บน agarose gel จากนั้นสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T Easy vector เพื่อถ่ายเข้าไปในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5- α แล้วคัดเลือกโคโลนีบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน

สำหรับยีนบริเวณปลาย 3' พบโคโลนีสีขาวทั้งหมด 4 โคโลนีและโคโลนีสีฟ้า 55 โคโลนี คัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวลำดับที่ 175, 177, 179, และ 180 มาตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *phytochelatin synthase* บริเวณปลาย 3' คือ ไพรเมอร์ PCS679_F และ RACE(T) เมื่อสังเคราะห์เสร็จแล้ว นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดประมาณ 1500 คู่เบส (ภาพที่ 15 (ก)) จากนั้นนำโคโลนีที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแทรกอยู่มาสกัดแยกพลาสมิด ตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้บน agarose gel เทียบกับพลาสมิดที่สกัดจากโคโลนีสีฟ้าซึ่งเป็นพลาสมิด pGEM®-T Easy ที่ไม่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ (ภาพที่ 15 (ข)) จากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้จากโคลนลำดับที่ 177 ความเข้มข้น 161.1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งมีขนาดใหญ่มากกว่าพลาสมิด pGEM®-T Easy ที่ไม่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ จำนวน 4 ไมโครลิตร (ไพรเมอร์ SP6 2 ไมโครลิตร) ส่งบริษัท macrogen เพื่อหาลำดับเบสของยีนที่โคลนได้



ภาพที่ 15 การตรวจสอบพลาสมิดที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอยีน *phytochelatin synthase* บริเวณปลาย 3'

(ก) ยีน *phytochelatin synthase* ที่สังเคราะห์ได้จากโคลนีสีขาว

(ข) พลาสมิดสายผสมของยีน *phytochelatin synthase* เปรียบเทียบกับพลาสมิด pGEM[®]-T Easy ที่ไม่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ (C)

สำหรับชิ้นดีเอ็นเอบริเวณกลางยีน คัดเลือกเฉพาะโคลนีสีขาวลำดับที่ 45, 46, 47, 48, 49 และ 52 มาตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะ คือ ไพรเมอร์ PCS301_F และ PCS698_R เมื่อสังเคราะห์เสร็จแล้ว นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าผลผลิตพีซีอาร์มีขนาด 398 คู่เบส (ภาพที่ 16 (ก)) จากนั้นสุ่มเลือกโคลนลำดับที่ 46 และ 49 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแทรกอยู่มาสกัดพลาสมิด ตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้บน agarose gel เทียบกับพลาสมิด pGEM[®]-T Easy ที่ไม่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ (ภาพที่ 16 (ข)) จากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้จากโคลนลำดับที่ 49 ความเข้มข้น 110.2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิด pGEM[®]-T ที่ไม่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ จำนวน 5 ไมโครลิตร (ไพรเมอร์ T7 2 ไมโครลิตร) ไปหาลำดับเบสของยีน



ภาพที่ 16 การตรวจสอบพลาสมิดที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอยีน *phytochelatin synthase* บริเวณกลางยีน

(ก) ยีน *phytochelatin synthase* บริเวณกลางยีนที่สังเคราะห์ได้จากโคลนีสีขาว

(ข) พลาสมิดสายผสมของยีน *phytochelatin synthase* บริเวณกลางยีนเปรียบเทียบกับ (C)

พลาสมิด pGEM[®]-T Easy ที่ไม่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ

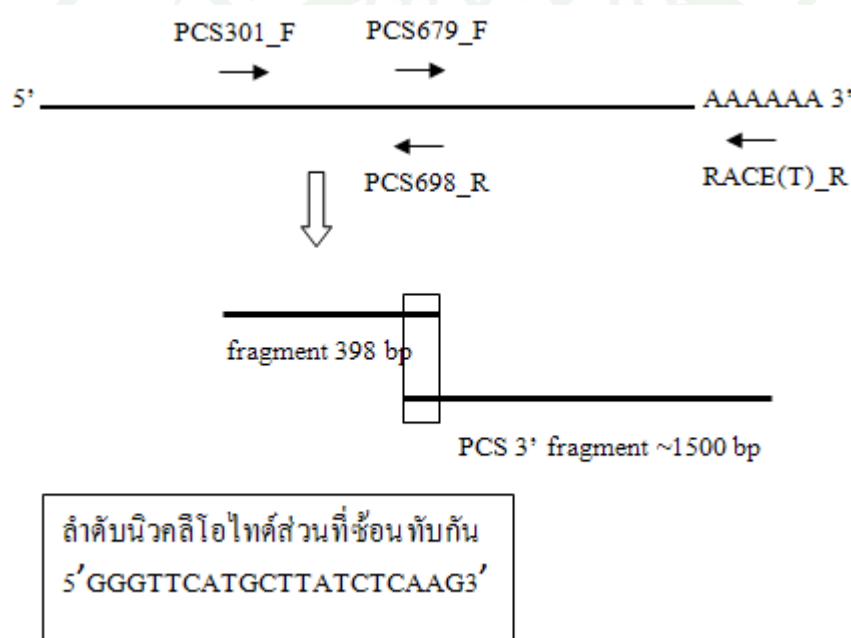
3.4 การวิเคราะห์ยีน *phytochelatin synthase* ที่โคลนได้จากรากของข้าวขาวดอกมะลิ 105

จากการโคลนดีเอ็นเอผลผลิตพีซีอาร์ทางด้านปลาย 3' ของยีน *phytochelatin synthase* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้ประกอบด้วย 1,498 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็นยีน 873 คู่เบส และส่วนปลาย 3' ที่ไม่ได้ถูกแปลรหัส (3' untranslated region) อีก 625 คู่เบส ผลจากการใช้โปรแกรม poly A signal miner (<http://dnafsminer.bic.nus.edu.sg/PolyA.html>) พบตำแหน่ง poly A signal (ATTAAG) อยู่บนนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 1,534 ซึ่งมีความสำคัญในขบวนการตัดอาร์เอ็นเอสายสังเคราะห์ ณ จุดตัดจำเพาะที่อยู่ห่างออกไป ตำแหน่ง poly A signal นี้พบในพืชชนิดอื่นๆ เช่น ข้าวสาลี (*Triticum aestivum* accession AF093752) ณ นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1,805 หญ้าแพรก (*Cynodon dactylon* accession AF384111) ตำแหน่ง 1,826 และกระเทียม (*Allium sativum* accession AF384110) ตำแหน่ง 1,732 เป็นต้น เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้ไปเปรียบเทียบกับโปรตีนที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLASTX พบว่ายีนที่โคลนได้มีความเหมือนกับ hypothetical protein (accession EEC79817) ที่แยกจากข้าว *Oryza sativa* คิดเป็นร้อยละ 99 ซึ่งกำหนดการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนขนาด 290 เรสซิดิวส์

ผลจากการโคลนยีน *phytochelatin synthase* บริเวณกลางยีน พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาด 398 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้ไปเปรียบเทียบกับโปรตีนที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLASTX พบว่ายีนที่ได้กำหนดการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนขนาด 132 เรสซิดิวส์

มีขนาด 132 เรสซิดิวส์และมีความเหมือนกับ hypothetical protein (accession EEC79817) ที่แยกจากข้าว *Oryza sativa* คิดเป็นร้อยละ 99 เช่นเดียวกัน

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มารวมกันโดยผลผลิตพีซีอาร์ทั้งสองจะมีบริเวณซ้อนทับกันอยู่ 20 คู่เบส (ภาพผนวกที่ 4) ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่บนไพรเมอร์ PCS679_F และ PCS698_R ดังแผนภาพ (ภาพที่ 17) ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่เป็นยีนทั้งหมด 1,251 คู่เบส จากนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1,876 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนทั้งหมด 416 เรสซิดิวส์ และตำแหน่ง poly A signal (ATTAAA) ณ เบสตำแหน่งที่ 1,534 (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 17 แผนภาพการสังเคราะห์ของยีน *phytochelatin synthase* บริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้อนทับกันแสดงในกรอบสี่เหลี่ยม

เมื่อนำข้อมูลของกรดอะมิโนที่ได้มาเปรียบเทียบกับโปรตีนที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับโปรตีน *phytochelatin synthase* ในพืชหลายชนิดที่ระดับที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 6)

```

1  tccatgctcgactgctgagccctcgacaaggtgaaggcggaggccatcaccttcgcc
   S M L D C C E P L D K V K A E G I T F A
61  aaactcgctgctcgccactgcccgggtgccaatgtccgctccttccgcccgcag
   K L A C L A H C A G A N V R S F R A D Q
121 tccaccatccacgacttccgccaccatctcgtccgctctgcctcctcccaggactgccat
   S T I H D F R H H L V R S A S S Q D C H
181 ctcacatccctaccacaggaagcctttcaaacagactggaaccggccatttctctcca
   L I A S Y H R K P F K Q T G T G H F S P
241 atcggcgactaccatgccggccaagacatggcgcttatcctggatgtcgcccgcttcaaa
   I G D Y H A G Q D M A L I L D V A R F K
301 tacctcctcactgggttccactcccactgctttgggaagccatgaatacaactgatgac
   Y P P H W V P L P L L W E A M N T T D D
361 gcgactggctactcagggggttcatgcttatctcaaggcactctgcagctccttcattg
   A T G L L R G F M L I S R H S A A P S L
421 ctctacacagtgaattgcagagatgaaagctggaagcatggcgaagtattgcatggaa
   L Y T V S C R D E S W K S M A K Y C M E
481 gatgtaccgatcttcttaaggatgagagtgtagacaatgttccagcacttctgtccgc
   D V P D L L K D E S V D N V P A L L S R
541 ttagtgaatcccttccgccaatgctggaatttgatcaaatgggttattgaagttagg
   L V K S L P A N A G N L I K W V I E V R
601 agacaagaggaaggaggatcaggattaagcaaaggaggagaaagggcttatttgaag
   R Q E E G G S G L S K E E E E R L I L K
661 gaaatgactacagcaagtccgtgatactgagcttttagattagtcctggaactgcaa
   E M I L Q Q V R D T E L F R L V R E L Q
721 ttcactaagcagccatgtttagttagtctcatattcaagtgtatgattcctttacctgg
   F T K Q P C C S C S Y S S D D D S F T W
781 attgcagcctctgtgtgtgcaagggccgcattgtcaacagggaatctttcatcaaaa
   I A A S V C C Q G A A L L T G N L S S K
841 gatgggttctgtgcagagaaactgttcaaatgtgtacaagtggatggatgggacct
   D G F C C R E T C F K C V Q V D G D G P
901 aagactgtcggttacaggcacagcgggttcaggagtcaatgaacaaagtgtgatgctt
   K T I V T Q R A V S G V N E Q S V D M L
961 ctaccgatatccacattggaacaagcgtgtgcaattcaattcaagcaacgaggtgtc
   L P I S T L E T S V C N S N S S N E V V
1021 aaatatccatctagaacagatattttaactgttctattgtcgtggtttacatcctagcaca
   K Y P S R T D I L T V L L L A L H P S T
1081 tgggtgggcattaaagacgagaggctgaaagctgaattccagagtcttatttcaacagac
   W V G I K D E R L K A E F Q S L I S T D
1141 attcttcatgatgatcttaaacgagagatattacatctaagacggcaactccattatgtg
   I L H D D L K R E I L H L R R Q L H Y V
1201 aggtcctgtaaagaggaggaatatggagatcctgtgccacaatcccatTAACaatgatgc
   R S C K E E E Y G D P V P Q S H -
1261 aaatcgcgagcttggttacctggagatgcaaaaaaagggttagaggaggaactacat
1321 actccgtattacctttgttctgagtgaggacttctcatttttgagacacctgacctgaga
1381 cggatccgtgtagacatgttcatgttcacctgtggtcgtttctcttggttagtgacaa
1441 ctgacaactagcggggaggcaccgctaattgtgctgggtgtgtccttgcaaaagtctca
1501 aataacgcaatggcggattatttcacctttatattaaaaaaatttgaaggggcattt
1561 agggggtaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaacgattccatccggtaattccaattcc
1621 cggcgccagggggcgggagatggagtcggccattccccttaaggggggataaatactgg
1681 gcggttttaagctggtgggaaacaggggtccataaaccttgaacccttccccctgggta
1741 agaagcccaagctccacttcccttagagagcctgggggaaaaccggggtggacggggca
1801 aaccacctctcttcttaccctggcctaaccataaaaaaaattcagttaagga
1861 aaggaaaaaatataa

```

ภาพที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่มีการแปลรหัสของยีน *phytochelatase synthase* ขนาด 1,251 คู่เบส ที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนความยาว 416 เรสซิดิวส์ จากลำดับเบสทั้งหมด 1,876 ส่วนที่ขีดเส้นใต้แสดง Stop codon (TAA) และ poly A signal (ATTAAA)

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนองค์ประกอบของยีน *phytochelatase* ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับพืชชนิดอื่น

Accession #	Plant Species	Common name	#Amino acid Partial/Complete	%Identity
AHX22005	<i>Oryza sativa</i> L. cv. Khao Dawk Mali 105	ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (jasmine rice)	416/516	100
EEC79817	<i>Oryza sativa</i>	ข้าว (rice)	416/415 (partial)	99
AFU06381	<i>Phragmites australis</i>	อ้อเล็ก (reed)	413/498	75
AAO13810	<i>Cynodon dactylon</i>	หญ้าแพรก (bermuda grass)	417/504	71
Q9SWW5	<i>Triticum aestivum</i>	ข้าวสาลี (wheat)	415/500	76
AAG22095	<i>Typha latifolia</i>	ธูปฤาษี (broadleaf cattail)	422/422	59
BAN08523	<i>Nelumbo nucifera</i>	บัวหลวง (sacred lotus)	420/505	60
AAO13809	<i>Allium sativum</i>	กระเทียม (garlic)	421/506	58
NP001235576	<i>Glycine max</i>	ถั่วเหลือง (soybean)	413/498	54
AAU93349	<i>Lactuca sativa</i>	ผักกาดหอม (lettuce)	405/490	54
AAD16046	<i>Arabidopsis thaliana</i>	อะราบิโดพซิส (mousear cress)	400/485	52
CAC37692	<i>Brassica juncea</i>	ผักกาดเขียว (leaf mustard)	400/485	52
AEY68568	<i>Pyrus betulifolia</i>	birch-leaved Pear	412/497	55

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโพลีเปปไทด์ที่โคลนได้กับโปรตีน *phytochelatase* ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกันคิดเป็นร้อยละ 52-76 (ตารางที่ 6) โดยลำดับกรดอะมิโนที่พบในข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน *phytochelatase* ที่พบในข้าวสาลี (accession Q9SWW5) มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 76

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาทำ multiple alignment กับพืชอีก 11 ชนิด (ตารางที่ 6) ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่า ลำดับกรดอะมิโนมีความต่างกันในบริเวณปลาย C-terminal ของ phytochelatase และพบลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ CysCysXXXCysXXCys (X คือ กรดอะมิโนชนิดใดก็ได้) (ภาพที่ 19) ในพืชหลายชนิด ได้แก่ ข้าวสาลี (accession Q9SWW5), บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* accession BAN08523), ถั่วเหลือง (*Glycine max* accession NP001235576), Birch-leaved Pear (*Pyrus betulifolia* accession AEY68568), อะราบิดอสิส (accession AAD16046), ผักกาดเขียว (accession CAC37692), และ อ้อเล็ก (*Phragmites australis* accession AFU06381) โดยในข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีลำดับเป็น CysCysArgGluThrCysPheLysCys นอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโนอนุรักษ์ชนิดอื่นหลายตำแหน่ง (ภาพที่ 19)

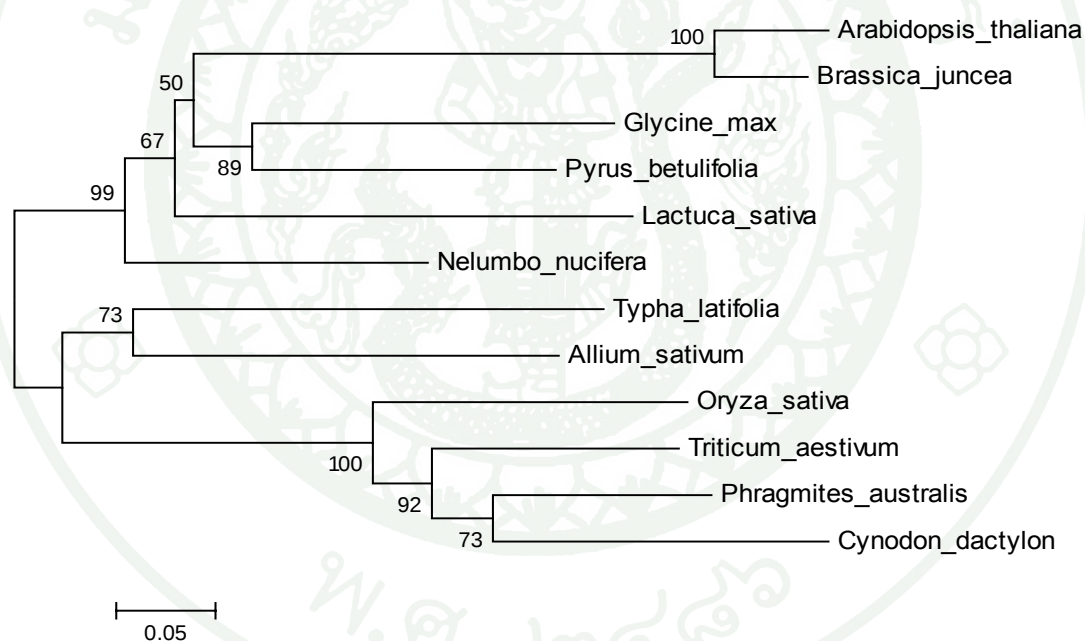
Glycine_max	SMLDCCEPLETVKARGITFGKLVCLAHQAGAKVEAFHATHSSIDDFRKYVKKCSMSDDCH	60
Pyrus_betulifolia	SMLDCCEPLETVKEKGISFGKLVCLAHQAGAKVEAFRTNHSTIDDFRKYVRCSTSDCH	60
Arabidopsis_thaliana	SMLDCCEPLEVVKKEGSGFVKVCLAHQSGAKVEAFRTSQSTIDDFRKFMVKCTSSENCH	60
Brassica_juncea	SMLDCCEPLEAVKEKGISFGKLVCLAHQSGAKVEAFRTNQTTIDDFRKFMVKCTSSENCH	60
Lactuca_sativa	SMLDCCEPLEKVKAKGISFGKLVCLAHQAGAKVEAFRTNQSNIDEFRKHVIACSTSDCH	60
Nelumbo_nucifera	SMLDCCEPLEKIKAKGIAFGKLVCLAHQAGAKVEAFRTNQSTLNDFRQHVIITCTSSDNH	60
Typha_latifolia	SMLDCCEPLEKIKAEGITFGKLVCLAHQAGXKVEAFRTNQSTIDDFRKHVIITCTSSDNH	60
Allium_sativum	SMLDCCEPLEKVKKEGITFGKLVCLAHQAGANVQAIRTSQGSLEDFRQHIIRCTSSDDCH	60
Phragmites_australis	SMLDCCEPLDKVKAQGITFGKLVCLAHQSGANVQSFRTNRATIHDFRRHLIRCASSQDCH	60
Cynodon_dactylon	SMLDCCEPLDKVKAQGITFGKLVCLAHQAGADVQTFRTNRITLEDLRRHLIRCASSQDCH	60
Triticum_aestivum	SMLDCCEPLHKVKAEGITFGKLVCLAHQAGARVQSFRTNQTTIHDFRAHLIRCASSQDCH	60
Oryza_sativa	SMLDCCEPLDKVKAEGITFAKLAVCLAHQAGANVRSFRADQSTIHDFRRHLIRCASSQDCH	60
	***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	C C C C	
Glycine_max	VISSYHRAALKQTGIGHFSPIGGYHVGRDMALILDVARFKYPPHWIPLKLLWEAGMNYIDE	120
Pyrus_betulifolia	VISSYDRSVLKQTGTGHFSPIGGYHAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWDAMNNVDS	120
Arabidopsis_thaliana	MISTYHRGVFKQTGTGHFSPIGGYNAERDMPLILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQ	120
Brassica_juncea	MISTYHRGVFKQTGTGHFSPIGGYNAERDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDD	120
Lactuca_sativa	VISSYNRATFKQTGTGHFSPIGYSYHAGRDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMDTLDD	120
Nelumbo_nucifera	VITSYHRASFQKTGTGHFSPIGGYHAGRDMVILILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMNTVDE	120
Typha_latifolia	LVSYSRKLKFKQTGTGHFSPIGGYHSGKDMVILILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMNTVDK	120
Allium_sativum	VITSYNRKAFQKTGTGHFSPIGGYHKGSDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMKYEDP	120
Phragmites_australis	LIASYHREPQKTGTGHFSPIGGYHAGQDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMNTTDE	120
Cynodon_dactylon	LIASYHRKAFQKTGTGHFSPIGGYHAGQDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMNTTDE	120
Triticum_aestivum	LISSYHRSPFKQTGTGHFSPIGGYHAEKDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWDAMNTTDE	120
Oryza_sativa	LIASYHRKPFQKTGTGHFSPIGDYHAGQDMALILDVARFKYPPHWVPLKLLWEAMNTTDD	120
	:: : * * : * * * * * : * : * * * : * * * * * : * : * : *	
Glycine_max	DTGQSRGFMLVSRPHREPGLLYTLSCKHESWVNIKFLMDDVPLLLKSEVDKILQVSVI	180
Pyrus_betulifolia	STGQRRGFVLISRPHEPGLLYTLSCKHESWVGVARYLMDVPLLLKSEVDKIQEVLVS	180
Arabidopsis_thaliana	STGKRRGFMLISRPHEPGLLYTLSCKHESWVNIKFLMDDVPLLLKSEVDKILQVSVI	180
Brassica_juncea	STGKRRGFMLISRPHEPGLLYTLSCKHESWVNIKFLMDDVPLLLKSEVDKILQVSVI	180
Lactuca_sativa	ASGFRRGFMLISRLQRPALLYTLSCKHESWVNIKFLMDDVPLLLKSEVDKILQVSVI	180
Nelumbo_nucifera	TTGNRYRGFMLISRLHRAPSLLYTLSCKHESWVSTSKYLMDDVPLLLKSEVDKILQVSVI	180
Typha_latifolia	ATGCLRGFMLISRFQKASSLYTLSCRHESWVSMVKYLIDDVPIILKSGSLGADAPVLL	180
Allium_sativum	ATGYPRGFMLISRLQRPALLYTLSCRHESWVQTAHYLMDDVPIILKKANLNTVQDVLSL	180
Phragmites_australis	STGLHRGFMLISRHTAAPSLLYTVSCGNESWKSIAKYCVEDLPNLLKAESPDDVPTLLSH	180
Cynodon_dactylon	STRLLRGFMLISRHTAAPSLLYTVSCGNESWKSIAKYCVEDLPNLLKAENLNVPTLLSC	180
Triticum_aestivum	ATGLLRGFMLVSRSSAPSLLYTVSCGHGSWKSIAKYCVEDLPNLLKDESNDVPTLLSR	180
Oryza_sativa	ATGLLRGFMLISRHAAPSLLYTVSCRNESWKSIAKYCMEDVPLLLKDESNDVNPALLSR	180
	: * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : *	

ภาพที่ 19 การทำ Multiple alignment เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน phytochelatase ของ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับพืชชนิดอื่นๆ บริเวณอนุรักษ์ CysCysXXXCysXXCys และ ตำแหน่งกรดอะมิโนอนุรักษ์ชนิดอื่นแสดงในกรอบสี่เหลี่ยม

Glycine_max	IAASLPSNFEEFIKWIAEIRREDGGPSLSAEEKARLAIKEEVLKQVQETGLFKHVASFL	240
Pyrus_betulifolia	VFMSLPSYFGQFIKWVAEVRREDGGQSLSPEEKARLAVKEEVLKQVQDTGLFKHVAELL	240
Arabidopsis_thaliana	VFKSLPSNFNFQFIRWVAEIRITEDSNQNLSAEEKSRLKLQVLKEVHETELFKHINKFL	240
Brassica_juncea	VFKSLPSNFNTFIRWVAEVRIADTKQNLSAEEKSRLNLKQVVLKEVHETELFKHISKFL	240
Lactuca_sativa	VFNLSPSKFLEFIKWVAEVRTEEGDQSLSPEEQERLAIKGEILKQVQSELYRHVTEFL	240
Nelumbo_nucifera	VFTSLPNNFGFEFIKWVAEVRREQEDNSSLSTEEKERLAVKEEVLKQVREAGLYKHVTEWF	240
Typha_latifolia	LKSLPANAGDFIKWFAEVRREQEQSRISKEEKERLALKEEVLQVQVETELKYVKNVL	240
Allium_sativum	IFKSLLSNAGDFIKWVAEVRREE-NSALSKEEKERLAIKEIVLQQIRETKLYKYVSEWL	239
Phragmites_australis	LIESLPANAGALIKWVVEVRKEEGRPTLSKEEKERLFLKENVLQQVRDTKLFYEVHGQQ	240
Cynodon_dactylon	LIETLPANAGALIKWVVEVRKEEGSSLSIEEKERLSMKEIVLQQVRDTRFTILHDLK	240
Triticum_aestivum	LVESLPANAGDLIKCVIEVRKEEGESSLSKEEKERLFLKEKVLQQIRDTRFVHVELQ	240
Oryza_sativa	LVKSLPANAGNLIKWVIEVRREQEEGSSLSKEEEERLILKEMILQQVRDTLFRVRELQ	240
	: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Glycine_max	SS---SCSRQQVSGDGLTPIAASVCCQGAAILGGK-PSSAG-YCCRETCLKCLKA-ED	294
Pyrus_betulifolia	SSAH-SCCGNLYSGHEENLPNIAASVCCQGAAILSGN-SAFSGVYCCQETCVKCFKA-NG	297
Arabidopsis_thaliana	ST-----VGYESDLYAAAKACCCQGAAILSG---SPSKEFCCRETCTVKCIKG-PD	286
Brassica_juncea	ST-----VGYESDLYAAAKACCCQGAAILSG---CSSKEYCCRETCTVCKVG-PG	286
Lactuca_sativa	LSEKSGCNGPLCLGKESSLDIAASVCCQGAAILLEGKRESSNGFCCKETKVHCLKSNEG	300
Nelumbo_nucifera	SSANSCCQNIPLSDGDDTLISQIAASVCCQGAELLTGN-SSTSNEFCCKETCTVKCLKA-NG	298
Typha_latifolia	SSANSCCTNFSFPNNKDFLPEIAATVCCQGAALLTGN-VGGKEEFCCKSTVSKCFTT-NG	298
Allium_sativum	SDMRSCCCNASAFSGKDSLTDIAASVCCQGAALLLAGN-LGRDNKSCCLKETCVNNVKS-NG	297
Phragmites_australis	Y-AKSCCSCSSSS-EEDSLTRIAAAVCCQGVAMLSGN-LASRDGLCCRETCTCIRCIQA-NG	296
Cynodon_dactylon	IGNIQCKCKSLSSGRRFYCLKLQVAVCCQEAAMLSGS-IASNNGFCCRETCTFSSVQA-NG	298
Triticum_aestivum	YPKGLCGSCSSSS-DEDSLAEIAATVCCQGAFLSGN-LVSRDGLCCRETCTKCIIEA-NG	297
Oryza_sativa	FTKQPCSCSYSS-DDDSFTWIAASVCCQGAALLTGN-LSSKDGFCCRETCTFKCQVQV-DG	297
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	CC CC...C.C	
Glycine_max	DKPITMVSGTVVNGNSEQGVVDLIPSSSEKLCCICSKS--KYIRVHPASTDVLTVLLLSL	352
Pyrus_betulifolia	DKPVTVSGTVVNGGTEEKMDMLVPSSKTNNSGCSA-----IGIHPASNDVLTALLLAL	351
Arabidopsis_thaliana	DSEGTVVTVGVRDNEQKVDLLVPSTQT--ECECG----PEATYPAGNDVFTALLLAL	339
Brassica_juncea	EAEGTVTVGVRDNEQKVDLLVPSTQT--DCECG----PEANFPAGNDVFTVLLLAL	339
Lactuca_sativa	EMGVTVVGKVMNGMSEQHVDMLIPS-----IGMHPASNDVLTLLLAL	344
Nelumbo_nucifera	DMPVTVVGTVLSGCSEQGVLLVPSSPTRRRACCSSSSNYFGMHPVSNVDVTVLLLAL	358
Typha_latifolia	NGPTTIIISGTVVSDGKEQGVMDLVPVSPTKSSCCRSGLSNGVAI-HPASNDVLTVLLLAL	357
Allium_sativum	GGPITVVGTVVSEGGEQGVMDLVPSTSPSKSHGCNAGSSSFCAIHPGHGDVLTILSLAL	357
Phragmites_australis	DGLKTVISGTVVSEGNEQAVDMLPISSPYTSSCNSTVS-DEIVNYPSTNDVLTVLLLAL	355
Cynodon_dactylon	NGVKTVISGTVVSEGKEQGVMDMLPMSPRCASSCNSSEAG-DEIIKYPSKTDVLTVLLLAL	357
Triticum_aestivum	DGLKTVISGTVVSKNEQAVDMLLPTSSSKTSLCNSNLK-SKIVKYPSTNDVLTVLLLAL	356
Oryza_sativa	DGPKTVVGTAVSGVNEQVSDMLPISTLETSSVCNSNSS-NEVVKYPSRTDILTLLLAL	356
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Glycine_max	PSTTWAGITDEQLLAEIHDLVSIENLPTLLQEEVLHLRRQLHLLKRCQDEKGVDELDGAPL	412
Pyrus_betulifolia	PPGTWSGIKDEKLSKEISNLVSTANLPTLLQEEVLHLRRQLHLLKRCQEDRVDDDLGSP	411
Arabidopsis_thaliana	PPQTWSGIKDQALMHMKQLISMASLPTLLQEEVLHLRRQLQLLKRCQENKEEDDLAAPA	399
Brassica_juncea	PPQTWSGIKDQALMQEMKQLISMASLPTMLQEEVLHLRRQLQLLKRCQENKEEDFAAPA	399
Lactuca_sativa	PPHTWSGIKDEALLHQINGLVSTETLPILLQEEIMHLRGQLHVLKRCQDVEEEDLSAPS	404
Nelumbo_nucifera	PPRTWSGIKEEKLKQEISSLVSTESLPLLLQEEVLHLRRQLKFLRRCQDKEVIDGLSTPS	418
Typha_latifolia	PPRTWLDIEDKSLLAIEIQGLVSTENLPDVLQHEVLHLRRQDFLKRCKNNEVDDDPILPP	417
Allium_sativum	FTNSWFDISNKKLLDEIRALVSFQNLDPVLQEEVLHLRRQLMFLKCKDKEVDGVDLLPS	417
Phragmites_australis	HPNTWLGKDEKLKAEFQALVSTDNLDPVLKQEIHLRRQLVYL--CKAEEAGSHVPPSH	413
Cynodon_dactylon	HPSTWLGKDESLLKAEFQALVSTDNLPEVLKQEIHLRRQLCYLKSCKEECEDPVPPSH	417
Triticum_aestivum	QPNTWLGKIDENVKAEFQSLVSTDNLDPDLKQEIHLRRQLHYLAGCKGQEAQC-EPPSP	415
Oryza_sativa	HPSTWVGKDERLKAEFQSLISTDILHDDLKREILHLRRQLHYVRSCKEEYDGPVPPSH	416
	: * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	C	
Glycine_max	S----	413
Pyrus_betulifolia	A----	412
Arabidopsis_thaliana	Y----	400
Brassica_juncea	F----	400
Lactuca_sativa	V----	405
Nelumbo_nucifera	VS---	420
Typha_latifolia	HSQPF	422
Allium_sativum	ISMV-	421
Phragmites_australis	-----	
Cynodon_dactylon	-----	
Triticum_aestivum	-----	
Oryza_sativa	-----	

ภาพที่ 19 (ต่อ)

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวมาทำศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีนจากการวิเคราะห์ด้วย phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA 4.0 (ภาพที่ 20) พบว่า phytochelatase จากข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ phytochelatase ที่พบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ได้แก่ ข้าวสาลี (accession Q9SWW5), อ้อเล็ก (accession AFU06381) และหญ้าแพรก (accession AAO13810) และยังจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ ธูปฤาษี (*Typha latifolia* accession AAG22095) และ กระเทียม (accession AAO13809) ซึ่งอยู่ในกลุ่มของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ในขณะที่แยกออกจากกลุ่มพืชใบเลี้ยงคู่ ได้แก่ อะราบิโดฟซิส (accession AAD16046), ผักกาดเขียว (accession CAC37692), ถั่วเหลือง (accession NP001235576), birch-leaved Pear (accession AEY68568), ผักกาดหอม (*Lactuca sativa* accession AAU93349) และ บัวหลวง (accession BAN08523)



ภาพที่ 20 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของ phytochelatase ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับพืชชนิดอื่นๆ 11 ชนิด (วิเคราะห์ด้วย neighbor-joining method, ทำซ้ำทั้งหมด 1000 ครั้ง)

phytochelatase เป็นเอนไซม์หนึ่งที่มีความสำคัญต่อการลดความเป็นพิษของโลหะหนักต่างๆรวมทั้งสารหนูในเซลล์พืช โดยมีหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน phytochelatin ซึ่งจะเข้าจับกับสารหนูที่อยู่ในรูปของอาร์เซไนต์ แล้วนำสารประกอบนี้เข้าสู่แวคิวโอลเพื่อลดความเป็นพิษต่อเซลล์ (Waqar *et al.*, 2009)

เมื่อพิจารณาความเหมือนและต่างของลำดับกรดอะมิโนของ phytochelatase ที่ได้จากรากของข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับพืชอีก 11 ชนิด พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความต่างกันบริเวณปลาย C-terminal ของ phytochelatase และพบลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ CysCysXXXCysXXCys (ภาพที่ 19) ซึ่งตรงกับรายงานของ Chang *et al.* (2012) ที่ได้ศึกษาใน phytochelatase ใน birch-leaf pear (*Pyrus betulaefolia* Bunge) พบว่าในบริเวณ C-terminal ของ Birch-leaf pear นั้นมีความแตกต่างกับ phytochelatase ในพืชชนิดอื่น แต่พบว่ามี motif ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์เป็น Cys³⁶⁹Cys³⁷⁰GlnGluThrCys³⁷⁴ValLysCys³⁷⁷ นอกจากนี้ Vestergaard *et al.* (2008) รายงานว่า motif ซึ่งอยู่บริเวณ C-terminal นี้มีความสำคัญต่อการทำงานของ phytochelatase โดยจะเป็นบริเวณที่ตรวจจับกับโลหะหนักแคดเมียมแล้วส่งโลหะหนักไปยังบริเวณอนุรักษ์ของ N-terminal และยังช่วยในการรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์อีกด้วย (Ruotolo *et al.*, 2004)

ลำดับกรดอะมิโนของ phytochelatase ที่ได้จากรากของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และพืชชนิดต่างๆ พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ซิสเตอีนและซิสเตอีนสองตัวที่อยู่ติดกันหลายตำแหน่ง (Cys-Cys) (ภาพที่ 19) กรดอะมิโนซิสเตอีนเหล่านี้มีความสำคัญต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับโลหะหนัก (Maier *et al.*, 2003) โดยอาร์เซไนต์สามารถจับกับกรดอะมิโนซิสเตอีนของ phytochelatase บริเวณหมู่ sulphhydryl (-SH) (Delnomdedieu *et al.*, 1994)

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโปรตีน phytochelatase ด้วย phylogenetic tree พบว่า phytochelatase จากข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีความใกล้ชิดกับที่พบใน ข้าวสาลี, อ้อยเล็กและหญ้าแพรก ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และแยกออกจากพืชใบเลี้ยงคู่บางชนิด ได้แก่ ผักกาดเขียวและอะราบิโดฟซิส ผลจากการศึกษาในอะราบิโดฟซิสสายพันธุ์กลาย cad1-3 (cadmium sensitive) ซึ่งไม่มีการแสดงออกของ phytochelatase พบว่าพืชที่เป็นสายพันธุ์กลายนี้มีความสามารถทนต่อสารหนูได้ไม่ดีเท่ากับต้นที่เป็น wild type แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ phytochelatase ที่ทำให้พืชสามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารหนู (Ha *et al.*, 1999)

4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative real-time PCR

4.1 การออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ quantitative real-time PCR

นำลำดับเบสที่ได้จากการโคลนยีนทั้งสองมาออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน โดย *arsenate reductase* คือ ไพรเมอร์ forward AR1_F และไพรเมอร์ reverse AR430_R ซึ่งให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 430 คู่เบส ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *phytochelatinsynthase* คือ ไพรเมอร์ forward PCS_F(RT) และไพรเมอร์ reverse PCS_R(RT) ซึ่งให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 146 คู่เบส (ตารางที่ 7) ไพรเมอร์ forward eEF-1a_F และ reverse eEF-1a_R ถูกใช้ในการสังเคราะห์ยีน *eukaryotic elongation factor 1-alpha* (*eEF-1a*) ซึ่งเป็น housekeeping gene ที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด (Mukesh *et al.*, 2006) เป็นยีนมาตรฐานในการทดลองครั้งนี้ โดยให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 103 คู่เบส

ตารางที่ 7 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative real-time PCR

Primer	Sequence	Tm (°C)
AR1_F	5'ATGGCGCGGAGCGTGTCTGTAC3'	67.2
AR430_R	5'CAGGAAGCGAGTAGAGTTACAAC3'	60.6
PCS_F(RT)	5'CAGCCTCTGTGTGCTGTCAA3'	59.3
PCS_R(RT)	5'TGAAACCGCTGTGCCTGTAA3'	57.3
eEF-1a_F	5'TTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT3'	59.3
eEF-1a_R	5'GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA3'	59.7

4.2 การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนในรากข้าว

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์รากของข้าว 4 สายพันธุ์ (ภาพที่ 5) จำนวน 5 ไมโครกรัม มาสร้างคิเอ็นเอสายแรก โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด reverse ที่จำเพาะต่อปลาย 3' ของยีน *arsenate reductase*, *phytochelatinsynthase* และ *eukaryotic elongation factor 1-alpha* ได้แก่ AR430_R, PCS_R(RT), RACE(T) และ eEF-1a_R

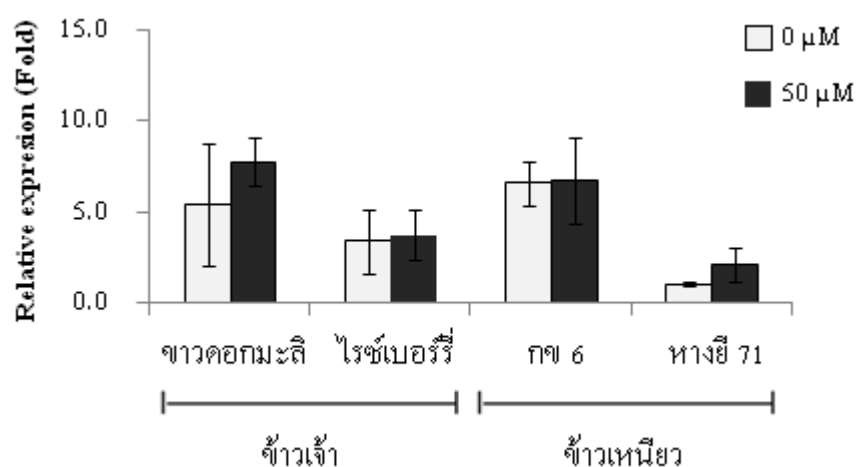
4.2.1 การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *arsenate reductase*

ผล melting curve ของยีนเป้าหมายและยีนมาตรฐานมีขนาดเท่ากันในทุกตัวอย่าง (ภาพผนวกที่ 5 (ค)) โดยค่า T_m ของยีน *arsenate reductase* เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส และยีน *eukaryotic elongation factor 1-alpha* เท่ากับ 81 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าผลผลิตพีซีอาร์ถูกต้องในทุกตัวอย่างที่ตรวจสอบ ผลการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *arsenate reductase* ด้วยค่า C_t (ตารางผนวกที่ 2) พบว่าการแสดงออกของยีน *arsenate reductase* ของข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์มีความแตกต่างกัน

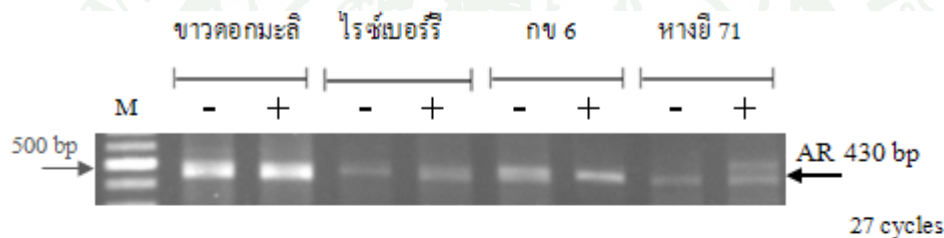
เมื่อนำค่า relative expression ratio ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) (ตารางผนวกที่ 2) มาแสดงเป็นกราฟแท่ง (ภาพที่ 21 (ก)) พบว่าการแสดงออกของยีน *arsenate reductase* ในข้าว 4 สายพันธุ์ที่ไม่ได้รับสารหนู (0 μM) มีความแตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกสูงสุด คือ ข้าวเหนียว กข 6 โดยมีค่า relative expression ratio เท่ากับ 6.5453 และเพิ่มเป็น 0.17 เท่า (6.7194) เมื่อได้รับสารหนู (50 μM) รองลงมาคือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีค่าเท่ากับ 5.3519 และเพิ่มเป็น 2.3 เท่า (7.7342) เมื่อได้รับสารหนู พันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ มีค่าเท่ากับ 3.3471 และเพิ่มขึ้นเป็น 0.31 เท่า (3.6652) เมื่อได้รับสารหนู และมีการแสดงออกน้อยที่สุดในข้าวเหนียวพันธุ์หางยี 71 คือ 1.0019 และเพิ่มเป็น 1.02 เท่า (2.0301) เมื่อได้รับสารหนู (ตารางผนวกที่ 3) จากผลการทดลองจะเห็นว่าสารหนูมีผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของ *arsenate reductase* ในข้าวขาวดอกมะลิ 105, ข้าวเหนียวหางยี 71 และไรซ์เบอร์รี่ ตามลำดับ ในขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6

การแสดงออกของยีน *arsenate reductase* ที่แตกต่างกันในข้าวแต่ละสายพันธุ์ที่ได้รับและไม่ได้รับสารหนู แสดงด้วยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (RT-PCR) ฌรตอนที่ 27 เมื่อตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอของยีน *arsenate reductase* เปรียบเทียบกับยีน *eukaryotic elongation factor 1-alpha* ในข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ภาพที่ 21(ข), (ง)) พบว่าผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกัน

(ก)



(ข)



(ค)



(ง)



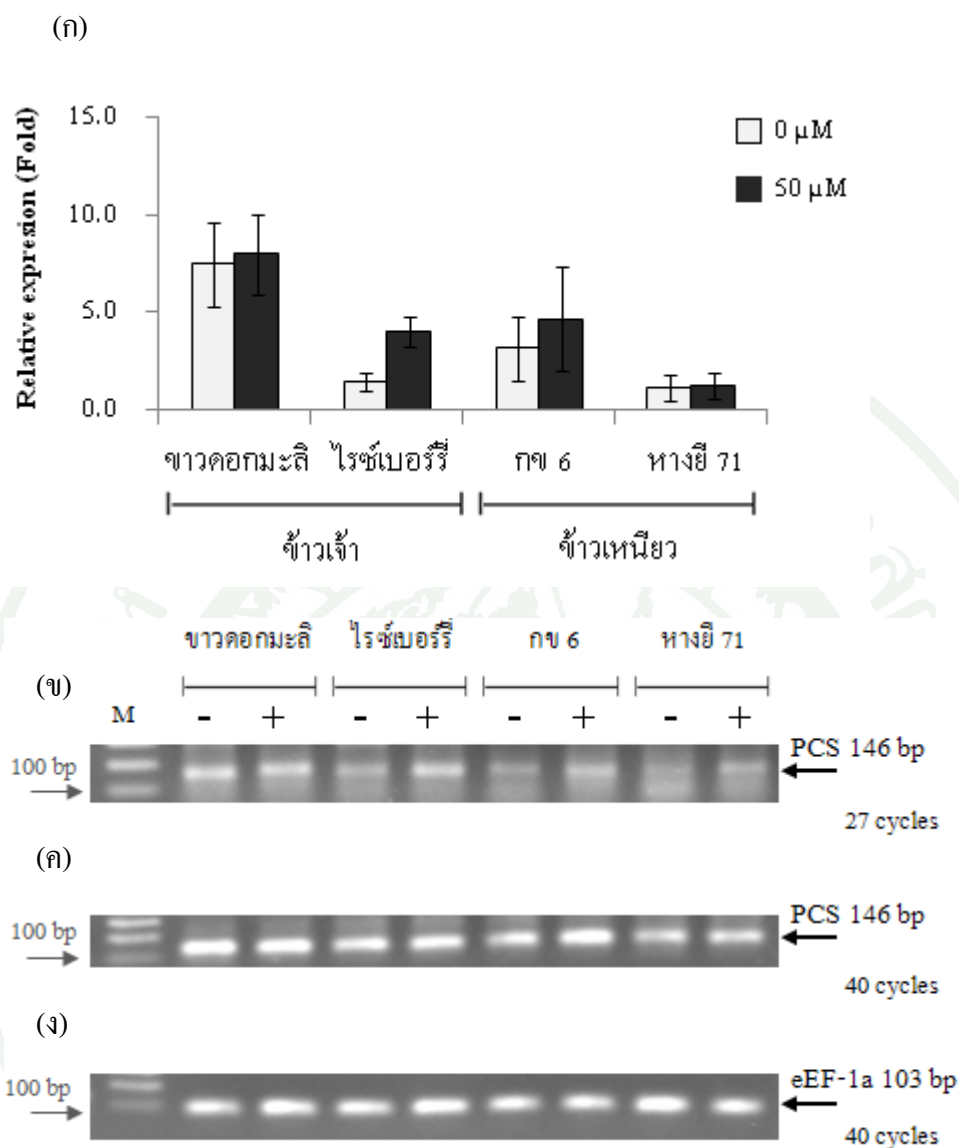
ภาพที่ 21 ระดับการแสดงออกของยีน *arsenate reductase* ในรากข้าว 4 สายพันธุ์ที่ได้รับ (50 μM) และไม่ได้รับสารหนู (0 μM) ตรวจสอบด้วยวิธี qPCR (ก) กราฟแท่งแสดงระดับการแสดงออกของยีน *arsenate reductase* (ข) ปริมาณดีเอ็นเอของยีน *arsenate reductase* ที่สังเคราะห์ด้วย RT-PCR จำนวน 27 รอบ (ค) ปริมาณดีเอ็นเอของยีน *arsenate reductase* ที่ได้จากการทำ qPCR จำนวน 40 รอบ (ง) ปริมาณดีเอ็นเอของยีน *eukaryotic elongation factor 1-alpha* ที่ได้จากการทำ RT-PCR จำนวน 27 รอบ – คือ ตัวอย่างที่ไม่ได้รับสารหนู และ + คือ ตัวอย่างที่ได้รับสารหนู

4.2.2 การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *phytochelatase synthase*

ผล melting curve ของยีนเป้าหมายและยีนมาตรฐานมีขนาดเท่ากันในทุกตัวอย่าง (ภาพผนวกที่ 6 (ค)) โดยค่า Tm ของยีน *phytochelatase synthase* และยีน *eukaryotic elongation factor 1-alpha* เท่ากับ 81 องศาเซลเซียส ในทุกตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบ ผลการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *phytochelatase synthase* ด้วยค่า Ct (ตารางผนวกที่ 4) พบว่าการแสดงออกของยีน *phytochelatase synthase* ของข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์มีความแตกต่างกัน

เมื่อนำค่า relative expression ratio (ตารางผนวกที่ 4) มาแสดงเป็นกราฟแท่ง (ภาพที่ 22 (ก)) พบว่าการแสดงออกของยีน *phytochelatase synthase* ในข้าว 4 สายพันธุ์ที่ไม่ได้รับสารหนู มีความแตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกสูงสุด คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยมีค่า relative expression ratio เท่ากับ 7.4632 และเพิ่มเป็น 0.49 เท่า (7.9559) เมื่อได้รับสารหนู รองลงมาคือข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มีค่าเท่ากับ 3.1417 และเพิ่มเป็น 1.4 เท่า (4.6285) เมื่อได้รับสารหนู พันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ มีค่าเท่ากับ 1.4345 และเพิ่มขึ้นเป็น 2.55 เท่า (3.9923) เมื่อได้รับสารหนู และมีการแสดงออกน้อยที่สุดในข้าวเหนียวพันธุ์หางยี 71 เท่ากับ 1.1085 และเพิ่มเป็น 0.12 เท่า (1.2304) เมื่อได้รับสารหนู (ตารางผนวกที่ 5) จากผลการทดลองจะเห็นว่าสารหนูมีผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของยีน *phytochelatase synthase* ในข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่, ข้าวเหนียว กข 6 และข้าวขาวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบความเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนในข้าวเหนียวพันธุ์หางยี 71

การแสดงออกของยีน *phytochelatase synthase* ที่แตกต่างกันในข้าวแต่ละสายพันธุ์ที่ได้รับและไม่ได้รับสารหนู แสดงด้วยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (RT-PCR) ณ รอบที่ 27 ผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาด้วยวิธี qPCR เมื่อตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอของยีน *phytochelatase synthase* เปรียบเทียบกับยีน *eukaryotic elongation factor 1-alpha* ในข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ภาพที่ 22 (ข), (ง))



ภาพที่ 22 ระดับการแสดงออกของยีน *phytochelatin synthase* ในรากข้าว 4 สายพันธุ์ที่ได้รับ (50 μ M) และไม่ได้รับสารหนู (0 μ M) ตรวจสอบด้วยวิธี qPCR (ก) กราฟแท่งแสดงระดับการแสดงออกของยีน *phytochelatin synthase* (ข) ปริมาณดีเอ็นเอของยีน *phytochelatin synthase* ที่สังเคราะห์ด้วย RT-PCR จำนวน 27 รอบ (ค) ปริมาณดีเอ็นเอของยีน *phytochelatin synthase* ที่ได้จากการทำ qPCR จำนวน 40 รอบ (ง) ปริมาณดีเอ็นเอของยีน *eukaryotic elongation factor 1-alpha* ที่ได้จากการทำ RT-PCR จำนวน 27 รอบ – คือ ตัวอย่างที่ไม่ได้รับสารหนู และ + คือ ตัวอย่างที่ได้รับสารหนู

ตารางที่ 8 ระดับการแสดงออกของยีน *arsenate reductase* และ *phytochelatin synthase* ในรากข้าว 4 สายพันธุ์ ที่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนเท่า (X) เมื่อได้รับสารหนู ($50 \mu\text{M}$) นาน 1 สัปดาห์

	ข้าวดอกมะลิ 105	ไรซ์เบอร์รี่	กข 6	หางยี 71
Arsenate reductase	2.30 X	0.31 X	0.17 X	1.02 X
Phytochelatin synthase	0.49 X	2.55 X	1.40 X	0.12 X

* ความสูงของลูกศรแสดงจำนวนเท่า (X) ระดับการแสดงออกของยีน

รากเป็นอวัยวะส่วนแรกที่ได้รับสารหนูและมีการสะสมของสารหนูมากกว่าบริเวณอื่น (Abedin *et al.*, 2002) ดังนั้น เมื่อพืชได้รับสารหนูจึงมักมีการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสารหนูในเซลล์รากสูงกว่าเนื้อเยื่อในบริเวณอื่น (Chang *et al.*, 2012) การแสดงออกของ *arsenate reductase* และ *phytochelatin synthase* ที่เกิดขึ้นในเซลล์รากจะช่วยลดปริมาณสารหนูที่จะเคลื่อนที่ขึ้นไปสู่ยอดและเข้าไปสะสมในเมล็ดข้าว เนื่องจาก สารหนูจะถูกเปลี่ยนรูปและนำเข้าไปสะสมในแวคิวโอลภายในเซลล์รากอย่างรวดเร็ว (Zhao *et al.*, 2008) จากผลการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายีน *arsenate reductase* และ *phytochelatin synthase* ในรากข้าวมีการแสดงออกอยู่ก่อนแล้ว แม้ว่าจะยังไม่ได้รับสารหนูและหลังจากที่ได้รับสารหนูความเข้มข้น $50 \mu\text{M}$ นาน 1 สัปดาห์ การแสดงออกของยีน *arsenate reductase* สูงขึ้นเป็น 2.3, 1.02 และ 0.3 เท่า ในรากข้าวข้าวดอกมะลิ 105 ข้าวเหนียวหางยี 71 และ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ตามลำดับ สำหรับข้าวเหนียว กข 6 การแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลงน้อยมากเพียง 0.17 เท่า สำหรับการแสดงออกของยีน *phytochelatin synthase* หลังจากที่ได้รับสารหนูพบว่าการแสดงออกสูงขึ้นเป็น 2.5, 1.4 และ 0.4 เท่า ในรากข้าวไรซ์เบอร์รี่, ข้าวเหนียว กข 6 และ ข้าวข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ สำหรับข้าวเหนียวหางยี 71 พบว่าการเปลี่ยนแปลงน้อยมากคือ 0.12 เท่า (ตารางที่ 8)

การแสดงออกของยีน *arsenate reductase* ในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และ ยีน *phytochelatin synthase* ในข้าวเหนียวพันธุ์หางยี 71 ที่เปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อยเมื่อได้รับสารหนู สอดคล้องกับงานวิจัยของ Norton *et al.*, 2008 ที่ได้ทำการศึกษา transcriptome analysis โดยใช้เทคนิค microarray ในข้าวสองสายพันธุ์คือ bala ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อสารหนู (arsenic tolerant) และ azucena ที่ไวต่อสารหนู (arsenic sensitive) เพื่อศึกษาการตอบสนองต่อสารหนูในรากของข้าว

ทั้งสองสายพันธุ์ ที่ได้รับสารหนูเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า มีการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสารหนูเป็นจำนวนมาก แต่กลับไม่พบการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในยีน *arsenate reductase* และ *phytochelatase synthase* ผลจากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chakrabarty *et al.*, 2009 ซึ่งได้ใช้เทคนิค microarray เพื่อศึกษา transcriptome analysis ในข้าวที่ได้รับสารหนูเช่นเดียวกันและพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ในเซลล์เป็นจำนวนมาก เช่น การสังเคราะห์แสง, เจริญเติบโต และการขนส่งสาร เป็นต้น โดยบางยีนมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่บางยีนมีการแสดงออกลดลง และกล่าวว่าการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกน้อยมากในยีน *arsenate reductase* และ *phytochelatase synthase* ซึ่งคิดจากที่คาดการณ์เอาไว้ว่ายีนทั้งสองน่าจะมีการแสดงออกสูงขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสารหนู งานวิจัยของ Chang *et al.* (2012) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *phytochelatase synthase* (*PbPCS1*) โดยใช้เทคนิค quantitative real-time PCR ใน birch-leaf Pear ที่ได้รับโลหะหนักต่างๆ ได้แก่ CdSO_4 (20 μM), ZnSO_4 (20 μM) และ CuSO_4 (20 μM) จากการศึกษาพบว่า การแสดงออกของยีน *PbPCS1* สูงขึ้น 4.34, 0.26, และ 2.82 เท่า เมื่อได้รับ CdSO_4 , ZnSO_4 และ CuSO_4 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการแสดงออกในใบ ลำต้นและราก พบว่ามีการแสดงออกในบริเวณรากสูงที่สุด อย่างไรก็ตามงานวิจัยของ Rai *et al.*, 2011 ซึ่งได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่ตอบสนองต่อสารหนูด้วยเทคนิค semiquantitative RT-PCR ในข้าว 4 สายพันธุ์ ได้แก่ triguna, IR-36, PNR-519 และ IET-4786 พบว่าการแสดงออกของยีนต่างๆ รวมทั้ง *phytochelatase synthase* มีความแตกต่างในข้าวแต่ละสายพันธุ์โดยมีการแสดงออกของยีน *phytochelatase synthase* สูงขึ้น ในข้าวพันธุ์ Triguna และ IR-36 และมีการแสดงออกลดลง ในข้าวสองสายพันธุ์ที่เหลือ คือ PNR-519 และ IET-4786 แสดงว่าการแสดงออกของยีนดังกล่าวมีรูปแบบการแสดงออกเมื่อได้รับหนูแตกต่างกันไป ในข้าวแต่ละสายพันธุ์

จากการสรุปผลการทดลองในตารางที่ 8 จะเห็นว่า ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวเหนียวพันธุ์หางยี 71 มีการแสดงออกของยีน *arsenate reductase* สูง แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนโครงสร้างของสารหนูจากอาร์เซเนตเป็นอาร์เซไนต์ ในข้าวทั้งสองสายพันธุ์เกิดขึ้นมากกว่าในข้าวไรซ์เบอร์รี่ และข้าวเหนียว กข 6 ทำให้สารหนูในรูปอาร์เซไนต์ซึ่งมีความเป็นพิษต่อพืชมีมากกว่า ในขณะที่เดียวกันทั้งข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ และข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มีการแสดงออกของยีน *phytochelatase synthase* เพิ่มขึ้นสูง เพื่อลดความเป็นพิษของสารหนูอาร์เซไนต์ในเซลล์ โดยการรวมตัวกันระหว่างโปรตีน phytochelatin และสารหนูอาร์เซไนต์ แล้วพาสารหนูเข้าสู่แวคิวโอล ส่งผลให้ต้นข้าวสามารถทนต่อสภาวะที่ปนเปื้อนสารหนูได้ดีและคาดว่าขบวนการลดความเป็นพิษของสารหนูน่าจะมีผลต่อการสะสมสารหนูที่เหลือในเมล็ดข้าว

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การโคลนยีน *arsenate reductase* ที่ตอบสนองต่อสารหนูจากรากของข้าวขาวดอกมะลิ 105 พบว่า *arsenate reductase* นั้นจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิดทั้งยังพบบริเวณอนุรักษ HisCys(X)₃Arg ซึ่งมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์

2. การโคลนบางส่วนยีน *phytochelatin synthase* จากรากของข้าวขาวดอกมะลิ 105 พบว่าลำดับกรดอะมิโนในบริเวณนี้มีความแตกต่างกันในบริเวณปลาย 3' ซึ่งกำหนดการสร้างสายโพลีเปปไทด์ในส่วนปลาย C-terminal ระหว่าง *phytochelatin synthase* ของพืชหลายชนิด และยังพบกรดอะมิโนส่วนอนุรักษ CysCys(X)₃Cys(X)₂Cys บริเวณปลาย C-terminal ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการจับกับโลหะหนักและสารหนู

3. เมื่อให้สารหนู (50 μ M) แก่ข้าว 4 สายพันธุ์และศึกษาการแสดงออกของยีน *arsenate reductase* และ *phytochelatin synthase* ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR พบว่ามีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ พบว่าการแสดงออกของยีน *arsenate reductase* สูงขึ้นหลังจากที่ได้รับสารหนูในรากข้าวเจ้าขาวดอกมะลิ 105 ข้าวเหนียวหางยี 71 และข้าวเจ้าไรซ์เบอร์รี่ ตามลำดับ สำหรับข้าวเหนียว กข 6 การแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลงไปน้อยมาก ในขณะที่การแสดงออกของยีน *phytochelatin synthase* หลังจากที่ได้รับสารหนูเพิ่มสูงขึ้น ในรากข้าวเจ้าไรซ์เบอร์รี่ ข้าวเหนียว กข 6 ข้าวเจ้าขาวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ และมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในข้าวเหนียวหางยี 71

ข้อเสนอแนะ

ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *arsenate reductase* และ *phytochelatin synthase* ควบคู่กับยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการลดความเป็นพิษของสารหนูอื่นๆ ในข้าวไทยสายพันธุ์ต่างๆ เพิ่มมากขึ้น เพื่อเก็บรวบรวมไว้เป็นข้อมูลสำหรับนำไปต่อยอดในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่ทนต่อสารหนูในอนาคต

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กฤษณา ชุติมา. 2550. สารหนู. สารานุกรมไทยฉบับราชบัณฑิตยสถาน เล่ม 27 (2550): 17605-17609.
- กรกัญญา อักษรเนียม และ ปานทิพย์ ชันวิชัย. 2556. การปลูกข้าวไรซ์เบอร์รี่ให้เป็นยา. *อู่ข้าว* 1(12): 12-16.
- กรมการข้าวสำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. 2556. องค์ความรู้เรื่องข้าว. พันธุ์ข้าว. แหล่งที่มา: <http://www.brrd.in.th/rkb/varieties/index.php-file=content.php&id=19.htm>, 1 พฤศจิกายน 2556.
- กรมควบคุมมลพิษ. 2541. รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการสำรวจและวิเคราะห์เพื่อจัดทำแผนปฏิบัติการการฟื้นฟูสภาพการปนเปื้อนของสารหนูที่ อำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช. กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม.
- กรมควบคุมมลพิษ. 2547. มาตรฐานคุณภาพดิน. พระราชบัญญัติ กฎหมายและมาตรฐานการควบคุมมลพิษ. แหล่งที่มา: http://www.pcd.go.th/info_serv/reg_std_soil01.html, http://www.pcd.go.th/info_serv/reg_std_soil01.html, 27 พฤษภาคม 2557.
- ปราณีต จิระสุทัศน์. 2531. ข้าว. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เปรม ฌ สงขลา. 2556. โฉมหน้าการค้าข้าวโลก. *อู่ข้าว* 1(12): 17.
- วาสนา ผลารักษ์. 2523. ข้าว. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.
- มูลนิธิข้าวไทยในพระบรมราชูปถัมภ์. 2556. รู้เรื่องข้าว. จุดกำเนิดและประวัติข้าวไทย. แหล่งที่มา: http://www.thairice.org/html/aboutrice/about_rice1.htm, 7 พฤศจิกายน 2556.
- สำนักงานวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน. 2553. สรุปผลการวิเคราะห์ฐานข้อมูลโลหะหนักในดินเกษตรกรรม. ระบบฐานข้อมูลโลหะหนักและการสะสมของกัมมันตรังสีในดินเกษตรกรรมของประเทศไทย. แหล่งที่มา: http://osd101.idd.go.th/heavymetal/Rpt_HeavyMetal.asp, 27 พฤษภาคม 2557.

ศูนย์ข้อมูลพิษวิทยา. 2545. อาการพิษอันตรายและความเป็นพิษของสารหนู. แหล่งที่มา: http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_toxic/a_txR_search.asp?info_id=121, 9 ธันวาคม 2556.

Abedin, M.J. and A.A. Meharg. 2002. Relative toxicity of arsenite and arsenate on germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Soil**. 243: 57-66.

Abedin, M.J., M.S. Cresser, A.A. Meharg and J. Feldmann. 2002. Arsenic accumulation and metabolism in rice (*Oryza sativa* L.). **Environ. Sci. Technol.** 36: 962-968.

Bhattacharjee, H. and B.P. Rosen. 2007. Arsenic metabolism in prokaryotic and eukaryotic microbes. **Environ. Sci. Technol.** 7: 371-406.

Bienert, G.P., M. Thorsen, M.D. Schüssler, H.R. Nilsson, A. Wagner, M.J. Tamás and T.P. Jahn. 2008. A subgroup of plant aquaporins facilitate the bidirectional diffusion of $\text{As}(\text{OH})_3$ and $\text{Sb}(\text{OH})_3$ across membranes. **BMC Plant Biol.** 6: 26.

Boyle, R.W. and I.R. Jonasson. 1973. The geochemistry of arsenic and its use as an indicator element in geochemical prospecting. **J. Geochem. Explor.** 2: 251-296.

Brown, T.A. 1998. **Molecular Biology, LABfax 1. Recombinant DNA**. Academic Press California.

Bucher, M. 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. **New Phytol.** 173: 11-26.

Buschmann, J., M. Berg, C. Stengel and M.L. Sampson. 2007. Arsenic and manganese contamination of drinking water resources in Cambodia: coincidence of risk areas with relief topography. **Environ. Sci. Technol.** 41: 2146-2152.

Braz, J. 2005. Phytochelatins. **Plant Physiol.** 17: 65-78.

Chakrabarty, D., P.K. Trivedi, P. Misra, M. Tiwari, M. Shri, D. Shukla, S. Kumar, A. Rai, A. Pandey, D. Nigam, R.D. Tripathi and R. Tuli. 2009. Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings. **Chemosphere.** 74: 688-702.

- Chang, Y.H., H. Li, Y. Cong, J. Lin and B.L. Sheng. 2012. Characterization and expression of a phytochelatase gene in birch-leaf pear (*Pyrus betulaefolia* Bunge). **Plant Mol. Biol.** 30: 1329-1337.
- Clemens, S., E.J. Kim, D. Neumann and J.I. Schroeder. 1999. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatase synthases from plants and yeast. **EMBO J.** 18: 3325-3333.
- Cobbett, C.S. 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. **Plant Physiol.** 123: 825-832.
- Cobbett, C. and P. Goldsbrough. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. **Annu. Rev. Plant Biol.** 53: 159-182.
- Cullen, R.W. and K.J. Reimer. 1989. Arsenic speciation in the environment. **Rev. J. Chem.** 89: 713-764.
- Dallagnol, L.J., F.A. Rodrigues and M.V.B. Mielli. 2009. Defective active silicon uptake affects some components of rice resistance to brown spot. **Phytopathology.** 99: 116-121.
- Delnomdedieu, M., M.M. Basti, J.D. Otvos and D.J. Thomas. 1994. Reduction and binding of arsenate and dimethylarsinate by glutathione a magnetic resonance study. **Chem. Biol. Interact.** 90: 139-155.
- Dey, S., D.X. Dou and B.P. Rosen. 1994. ATP-dependent arsenite transport in everted membrane vesicles of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** 269: 25442-25446.
- Dhankher, O.P., Y.J. Li, B.P. Rosen, J. Shi, D. Salt, J.F. Senecoff, N.A. Shasti and R.B. Meagher. 2002. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and gamma-glutamylcysteine synthetase expression. **Nat. Biotechnol.** 20: 1140-1145.
- Dhankher, O.P., N.A. Shasti, B.P. Rosen, M. Fuhrmann and R.B. Meagher. 2003. Increased cadmium tolerance and accumulation by plants expressing bacterial arsenate reductase. **New Phytol.** 149: 431-441.

- Dhankher, O.P., B.P. Rosen, E.C. McKinney and R.B. Meagher. 2006. Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase, ACR2. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 103: 5413-5418.
- Duan, G.L., Y.J. Zhu, Y.P. Tong, C. Cai and R. Kneer . 2005. Characterization of arsenate reductase in the extract of roots and fronds of Chinese brake fern, an arsenic hyperaccumulator. **Plant Physiol.** 138: 461-469.
- Duan, G.L., Y. Hu, W.J. Liu, R. Kneer, F.J. Zhao and Y.G. Zhu. 2011. Evidence for a role of phytochelatins in regulating arsenic accumulation in rice grain. **Environ. Exp. Bot.** 71: 416-421.
- Ellis, D.R., L. Gumaelius, E. Indriolo, I.J. Pickering, J.A. Banks and D.E. Salt. 2006. A novel arsenate reductase from the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata*. **Plant Physiol.** 141: 1544-1554.
- Gasic, K. and S.S. Korban. 2007. Expression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in Indian mustard (*Brassica juncea*) plants enhances tolerance for Cd and Zn. **Planta.** 225: 1277-1285.
- Ghosh, M., J. Shen and B.P. Rosen. 1999. Pathways of As (III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 96: 5001-5006.
- Guo, J., X. Dai, W. Xu, and M. Ma. 2008. Overexpressing GSH1 and AsPCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. **Chemosphere.** 72: 1020-1026.
- Ha, S., A.P. Smith, R. Howden, W.M. Dietrich, S. Bugg, M.J. O'Connell, P.B. Goldsbrough and C.S. Cobbett. 1999. *Phytochelatin synthase* genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Plant Cell.** 11: 1153-1163.
- Hartley-Whitaker, J., G. Ainsworth and A.A. Meharg. 2001. Copper and arsenate induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. **Plant Cell Environ.** 24: 713-722.

- He, Z., J. Li, H. Zhang and M. Ma. 2005. Different effects of calcium and lanthanum on the expression of *phytochelatin synthase* gene and cadmium absorption in *Lactuca sativa*. **Plant Sci. Lett.** 168: 309-318.
- Heiss, S., A. Wachter, J. Bogs, C. Cobbett and T. Rausch. 2003. Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. **J. Exp. Bot.** 54: 1833-1839.
- Hindmarsh, J.T. 2000. Arsenic, its clinical and environmental significance. **J. Trace Elem. Med. Bio.** 13: 165-172.
- Jain, C. and I. Ali. 2000. Arsenic: Occurrence, toxicity and speciation techniques. **Water Res.** 34: 4304-4312.
- Kamel, A.A. 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. **Afr. J. Biotechnol.** 2: 91-95.
- Leardkamolkarn, V., W. Thongthep, P. Suttarporn, R. Kongkachuichai, S. Wongpornchai and A. Wanavijitr. 2011. Chemopreventive properties of the bran extracted from a newly-developed Thai rice: The Riceberry. **Food Chem.** 125: 978-985.
- Li, Z.S., Y.P. Lu, R.G. Zhen, M. Szczypka, D.J. Thiele and P.A. Rea. 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis (glutathionato)cadmium. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 94: 42-47.
- Li, Y.J., O.P. Dhankher, L. Carreira, D. Lee, A. Chen, J.I. Schroeder, R.S. Balish and R.B. Meagher. 2004. Overexpression of phytochelatin synthase in *Arabidopsis* leads to enhanced arsenic tolerance and cadmium hypersensitivity. **Plant Cell Physiol.** 45: 1787-1797.
- Li, Y.J., O.P. Dankher, L. Carreira, A.P. Smith and R.B. Meagher. 2006. The shoot-specific expression of gamma-glutamylcysteine synthetase directs the long-distance transport of thiol-peptides to roots conferring tolerance to mercury and arsenic. **Plant Physiol.** 141: 288-298.

- Li, R.Y., Y. Ago, W.J. Liu, N. Mitani, J. Feldmann, S.P. McGrath, J.F. Ma and F.J. Zhao. 2009. The rice aquaporin Lsi1 mediates uptake of methylated arsenic species. **Plant Physiol.** 20: 71-80.
- Liu, Z.J., E. Boles and B.P. Rosen. 2004. Arsenic trioxide uptake by hexose permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** 279:17312-17318.
- Liu, W.J., Y.G. Zhu, Y. Hu, P.N. Williams, A.G. Gault, A.A. Meharg, J.M. Charnock and F.A. Smith. 2006. Arsenic sequestration in iron plaque, its accumulation and speciation in mature rice plants (*Oryza sativa* L.). **Environ. Sci. Technol.** 40: 5730-5736.
- Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods.** 25: 402-408.
- Lombi, E., F.J. Zhao, M. Fuhrmann, L.Q. Ma and S.P. McGrath. 2002. Arsenic distribution and speciation in the fronds of the hyperaccumulator *Pteris vittata*. **New Phytol.** 156: 195-203.
- Ma, J.F. and N. Yamaji. 2006. Silicon uptake and accumulation in higher plants. **Trends Plant Sci.** 11: 392-397.
- Ma, J.F., N. Yamaji and N. Mitani. 2008. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 105: 9931-9935.
- Maier, T., C. Yu, G. Küllertz and S. Clemens. 2003. Localization and functional characterization of metal-binding sites in phytochelatin synthases. **Planta.** 218: 300-308.
- May, M.J., T. Vernoux, C. Leaver, M. Montagu and D. Inze. 1998. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. **J. Exp. Bot.** 49: 649-667.
- Meharg, A.A. 1994. Integrated tolerance mechanisms-constitutive and adaptive plant-responses to elevated metal concentrations in the environment. **Plant Cell Environ.** 17: 989-993.

- Meharg, A. 2004. Arsenic in rice—understanding a new disaster for South-East Asia. **Trends Plant Sci.** 9: 415-417.
- Meharg, A.A., G. Sun, P.N. Williams, E. Adomako, C. Deacon and Y.G. Zhu. 2008. Inorganic arsenic levels in baby rice are of concern. **Environ. Pollut.** 152: 746-749.
- Mendoza-Cózatl, D.G., E. Butko, F. Springer, J.W. Torpey, E.A. Komives, J. Kehr, J.I. Schroeder. 2008. Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. **Plant J.** 54: 249-259.
- Messens, J. and S. Silver. 2006. Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. **J. Mol. Biol.** 362: 1-17.
- Mihucz, V.G., E. Tatar, I. Virag, E. Cseh, F. Fodor and G. Zaray. 2005. Arsenic speciation in xylem sap of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Anal. Biochem.** 383: 461-466.
- Mitani, N., N. Yamaji and J.F. Ma. 2008. Characterization of substrate specificity of a rice silicon transporter, Lsi1. **Pflugs Arch.** 456: 679-686.
- Mudge, S.R., A.L. Rae and E. Diatloff. 2002. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in Arabidopsis. **Plant J.** 31: 341-353.
- Mukesh, J., A. Nijhawan, K.T. Akhilesh, P. Jitendra and Khurana. 2006. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 345: 646-651.
- Mukhopadhyay, R., J. Shi and B.P. Rosen. 2000. Purification and characterization of Acr2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. **J. Biol. Chem.** 275: 21149-21157.

- Mukhopadhyay, R. and B.P. Rosen. 2001. The phosphatase C(X)₃R motif is required for catalytic activity of the *Saccharomyces cerevisiae* Acr2p arsenate reductase. **J. Biol. Chem.** 276: 34738-34742.
- Mukhopadhyay, R. and B.P. Rosen. 2002. Arsenate reductase in prokaryotes and eukaryotes. **Environ. health persp.** 110: 745-748.
- Nocito, F.F., C. Lancilli, B. Crema, P. Fourcroy, J. Davidian and G.A. Sacchi, 2006. Heavy metal stress and sulphate uptake in maize roots. **Plant Physiol.** 141: 1138-1148.
- Norton, G.J., M. Nigar, P.N. Williams, T. Dasgupta, A.A. Meharg and H.P. Adam. 2008. Rice-arsenate interactions in hydroponics: a three-gene model for tolerance. **J. Exp. Bot.** 59: 2277-2284.
- Pickering, I.J., R.C. Prince, M.J. George, R.D. Smith, G.N. George and D.E. Salt. 2000. Reduction and coordination of arsenic in Indian mustard. **Plant Physiol.** 122:1171-1177.
- Quaghebeur, M. and Z. Rengel. 2003. The distribution of arsenate and arsenite in shoots and roots of *Holcus lanatus* is influenced by arsenic tolerance and arsenate and phosphate supply. **Plant Physiol.** 132: 1600-1609.
- Quaghebeur, M. and Z. Rengel. 2004. Arsenic uptake, translocation and speciation in *pho1* and *pho2* mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.** 20: 280-286.
- Raab, A., H. Schat, A.A. Meharg and J. Feldmann. 2005. Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic-phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations. **New Phytol.** 168: 551-558.
- Raab, A., S.H. Wright, M. Jaspars, A.A. Meharg and J. Feldmann. 2007. Pentavalent arsenic can bind to biomolecules. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** 46: 2594-2597.

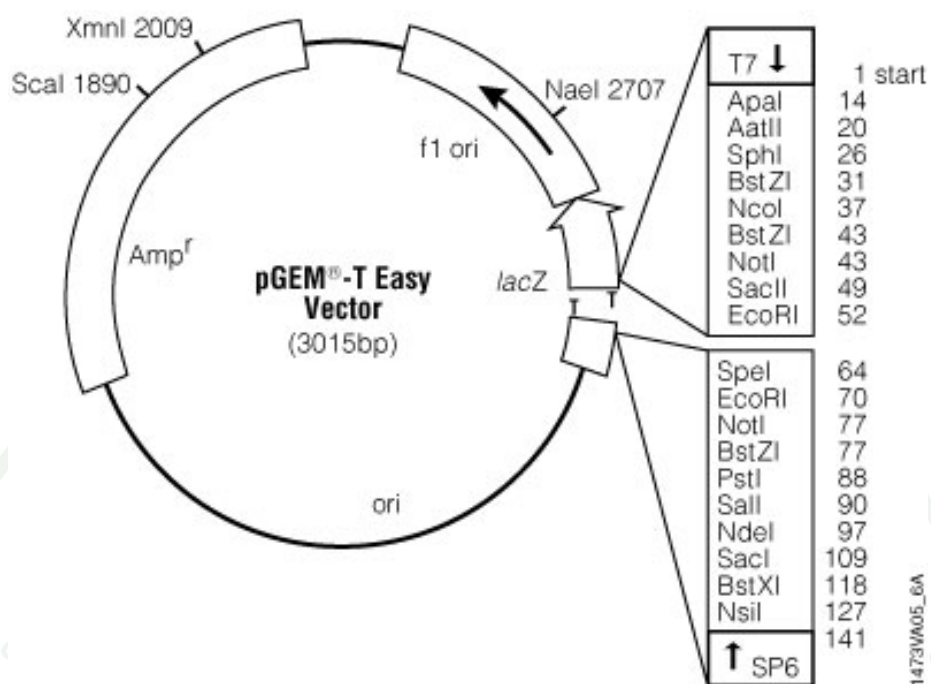
- Rahmana M., H. Hasegawaa, M.M. Rahmanb, M.A. Miahc and A. Tasmind. 2007. Arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.): Human exposure through food chain. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 69: 317-324.
- Rai, A., P. Tripathi, S. Dwivedi, S. Dubey, M. Shri, S. Kumar, P. K. Tripathi, R. Dave, A. Kumar, R. Singh, B. Adhikari, M. Bag, R.D. Tripathi, P.K. Trivedi, D. Chakrabarty and R. Tuli. Arsenic tolerances in rice (*Oryza sativa*) have a predominant role in transcriptional regulation of a set of genes including sulphur assimilation pathway and antioxidant system. **Chemosphere**. 82: 986-995.
- Ramos, J., L. Naya, M. Gay, J. Abian and M. Becana. 2008. Functional characterization of an unusual phytochelatase, LjPCS3, of *Lotus japonicus*. **Plant Physiol.** 148: 536-545.
- Ruotolo, R., A. Peracchi, A. Bolchi, G. Infusini, A. Amoresano and S. Ottonello. 2004. Domain organization of phytochelatase. **J. Biol. Chem.** 279: 14686-14693.
- Sambrook, J., F.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schat, H., M. Llugany, R. Vooijs, J.H. Whitaker and P.M. Bleeker. 2002. The role of phytochelates in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. **J. Exp. Bot.** 53: 2381-2392.
- Sharma, A.D., P.K. Gill and P. Singh. 2003. RNA isolation from plant tissue rich in polysaccharides. **Anal. Biochem.** 314: 319-321.
- Sharma, S.S. and K. Dietz. 2008. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. **Trends Plant Sci.** 14: 43-50.
- Shin, H., H.S. Shin, G.R. Dewbre and M.J. Harrison. 2004. Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. **Plant J.** 39: 629-642.

- Smith, E., I. Kempsonb and A.L. Juhasza. 2009. Localization and speciation of arsenic and trace elements in rice tissues. **Chemosphere**. 76: 529-535.
- Sneller, F.E.C., L.M. Heerwaarden, F.J.L. Kraaijeveld-Smit, W.M.T. Bookum, P.L.M. Koevoets, H. Schat and J.A.C. Verkleij. 1999. Toxicity of arsenate in *Silene vulgaris*, accumulation and degradation of arsenate-induced phytochelatins. **New Phytol**. 144: 223-232.
- Somenahally, A.C., E.B. Hollister, W. Yan, J.T. Gentry and R.H. Loeppert. 2011. Water management impacts on arsenic speciation and iron-reducing bacteria in contrasting rice-rhizosphere compartments. **Environ. Sci. Technol**. 45: 8328-8335.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Mol. Biol. Evol**. 24: 1596-1599.
- Tuli, R., D. Chakrabarty, P.K. Trivedi and R.D. Tripathi. 2010. Recent advances in arsenic accumulation and metabolism in rice. **Mol. Breed**. 26: 307-323.
- Vatamaniuk, O.K., S. Mari, Y.P. Lu and P.A. Rea. 1999. AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstitution. **Proc. Nat Acad. Sci. U.S.A.** 96: 7110-7115.
- Vestergaard, M., S. Matsumoto, S. Nishikori, K. Shiraki, K. Hirata and M. Takagi. 2008. Chelation of cadmium ions by phytochelatin synthase: role of the cysteine-rich C-terminal. **Anal Sci**. 24: 277-281.
- Wargar, A., S.V. Isayenkov, F.J.M. Maathuis and F.J. Zhao. 2009. Arsenite transport in plants. **Experientia**. 66: 2329-2339.
- Williams, P.N., A.H. Price and A. Raab. 2005. Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure. **Environ. Sci. Technol**. 39: 5531-5540.
- Williams, P.N., A. Raab and J. Feldmann. 2007. High levels of arsenic in South Central US rice grain: consequences for human dietary exposure. **Environ. Sci. Technol**. 152: 746-749.

- Wojas, S., S. Clemens, A. Sklodowska and D.M. Antosiewicz. 2009. Arsenic response of AtPCS1- and CePCS-expressing plants-effects of external As(V) concentration on As-accumulation pattern and NPT metabolism. **J. Plant Physiol.** 167: 169-175.
- World Health Organization. 1981. **“Arsenic.” Environmental Health Criteria.** 224.
- World Health Organization. 2003. **Arsenic in Drinking-water.** 6.
- Wysocki, R., P. Bobrowicz and S. Ulaszewski. 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. **J. Biol. Chem.** 272: 30061-30066.
- Xu, X.Y., S.P. McGrath and F.J. Zhao. 2007. Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots. **New Phytol.** 176: 590-599.
- Xu, X.Y., S.P. McGrath, A. Meharg and F.J. Zhao. 2008. Growing rice aerobically markedly decreases arsenic accumulation. **Environ. Sci. Technol.** 42: 5574-5579.
- Zhao, F.J., J.F. Ma, A. Meharg and S.P. McGrath. 2008. Arsenic uptake and metabolism in plants. **New phytol.** 181: 777-789.
- Zhou, Y., N. Messier, M. Ouellette, B.P. Rosen and R. Mukhopadhyay. 2004. Leishmania major LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug Pentostam. **J. Biol. Chem.** 279: 37445-37451.



ภาคผนวก



ภาพผนวกที่ 1 แผนที่ยีนของพลาสมิด pGEM-T easy

ที่มา: Brown (1998)

Arsenate reductase

535#AR1_F

EER94555Sorghum_bicolor	ATGGCGCGGAGCGTGTCTGTCGTACGTTTCGGCGGCGGAAGCTGGTGTCATGGC	50
AFW88260Zea_mays	ATGGCGCGGAGCGTATCGTACGTTTCGGCGGCGGAAGCTGGTATCCATGGC	50
XM004983711Setaria_italica	ATGGCGCGGAGCGTGTCTGTCGTACGTTTCGGCGGCGGAAGCTGGTGTCATGGC	50
AAK200610ryza_sativa_Japonica	ATGGCGCGGAGCGTGTCTGTCGTACGTTTCGGCGGCGGAAGCTGGTGTCATGGC	50
EER94555Sorghum_bicolor	GCGAGGCAATCCCCGCCTCGCCATCATCGACGTCAGGGATGAGGAGAGGA	100
AFW88260Zea_mays	GCGAGGCAATCCCCGCCTCGCCATCATCGACGTCAGGGATGAGGAGAGGA	100
XM004983711Setaria_italica	GCGAGGCAATCCCCGCCTCGCCATCATCGACGTCAGGGATGAGGAGAGGA	100
AAK200610ryza_sativa_Japonica	GCGAGGCAATCCCCGCCTCGCCATCATCGACGTCAGGGATGAGGAGAGGA	100
EER94555Sorghum_bicolor	GCTACCAAGGCGCACATCGCGGGTTCGCACCACTTCGCCAGCGGCAGCTTC	150
AFW88260Zea_mays	GCTACCAAGGCTCACATCGCGGGTTCGCACCACTTCGCCAGCGGCAGCTTC	150
XM004983711Setaria_italica	GCTACCAAGGCGCACATCGCGGGTTCGCACCACTTCGCCAGCGGCAGCTTC	150
AAK200610ryza_sativa_Japonica	GCTACCAAGGCGCACATCGCGGGTTCGCACCACTTCGCCAGCGGCAGCTTC	150
EER94555Sorghum_bicolor	GAGGCGCGGATGCCGAGCTCGCGCGGCGGCCAGCGGAAAGGACACCCT	200
AFW88260Zea_mays	GAGGCGCGGATGCCGAGCTGGTGGGCGCGGCCAGCGGAAAGGACACCCT	200
XM004983711Setaria_italica	GCGGCGCGGATGCCGAGCTGGTGGGCGCGGCCAGCGGAAAGGACACCCT	200
AAK200610ryza_sativa_Japonica	GCGGCGCGGCTGCCGAGCTCGCGCGTGGCACCAGGACACAGGACACCCT	200
EER94555Sorghum_bicolor	CGTTTTCCACTGCGCGCTGAGCCAGGTGCGAGGTCCAACCTGTGCTCGGA	250
AFW88260Zea_mays	CGTTTTCCACTGCGCGCTGAGCCAGGTACGAGGTCCAACCTGTGCTCGGA	250
XM004983711Setaria_italica	CGTCTTCCACTGCGCGCTGAGCCAGGTGCGAGGTCCACATGTGCTCGGA	250
AAK200610ryza_sativa_Japonica	CGTCTTCCACTGCGCGCTGAGCCAGGTGCGAGGTCCAACCTGTGCTCGGA	250
EER94555Sorghum_bicolor	TGTTCTCAGATTATCTATCGGAGACCAAGGAGGATTAGGGATAAAGAAC	300
AFW88260Zea_mays	TGTTCTCAGACTATCTATCGGAGACCAAGGAGGATTAGGGATAAAGAAC	300
XM004983711Setaria_italica	TGTTCTTTGACTATCTATCGGAGACCAAGGAGGATTAGGAGATAAAGAAC	300
AAK200610ryza_sativa_Japonica	TGTTCTCCGACTATCTATCTGAGACCAAGGAAGAATCAGGAACAAAGAAC	300
EER94555Sorghum_bicolor	ATCATGGTACTGGAGCTCGGGTTTAACGGATGGGAGGTTTCGGGCGAGCC	350
AFW88260Zea_mays	ATCATGGTACTGGAGCTCGGGTTTAACGGATGGGAGGTTTCAGGCGAGCC	350
XM004983711Setaria_italica	ATCATGGTACTGGAGCTCGGGTTTAACGGATGGGAGGTTTCAGGCGAGCC	350
AAK200610ryza_sativa_Japonica	ATCATGGTACTGGAGCTCGGGTTTAACGGATGGGAGGTTTCAGGCGAGCC	350
EER94555Sorghum_bicolor	TGTCTGCCGCTGCACGGACGCTCCTTGCAAAGGGACGTCCTGTAA----	396
AFW88260Zea_mays	TGTCTGCAGCTGCACCGACGCTCATTGCAAAGGGACGTCCTGTAA----	396
XM004983711Setaria_italica	TGTTTGCCGCTGCACCGACGCTCCTTGCAAAGGGACGTCCTCATGA----	396
AAK200610ryza_sativa_Japonica	CGTTTGCCGCTGCACCGACGCTCCTTGCAAAGGGACATGCTCACCTGAAG	400
EER94555Sorghum_bicolor	-----	
AFW88260Zea_mays	-----	
XM004983711Setaria_italica	-----	
AAK200610ryza_sativa_Japonica	AACCTGAGTTGTAA	414

541#ARend_R

ภาพผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ multiple alignment ของยีน *arsenate reductase* จาก sequence ที่มี
 ในฐานข้อมูล โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน ตำแหน่งของ
 ไพริมอร์แสดงในกรอบสี่เหลี่ยม

XP002467557Sorghum_bicolor	MARSVSYVSAAKLVSMARGNPRLAIIDVRDEERSYQAHGSHHFASGSF	50
C5WTH4Sorghum_bicolor	MARSVSYVSAAKLVSMARGNPRLAIIDVRDEERSYQAHGSHHFASGSF	50
NP001144297Zea_mays	MARSVSYVSAAKLVSMARGNPRLAIIDVRDEERSYQAHGSHHFASGSF	50
B6TQK1Zea_mays	MARSVSYVSAAKLVSMARGNPRLAIIDVRDEERSYQAHGSHHFASGSF	50
K4AGK1Setaria_italica	MARSVSYVSAAKLVSMARGNPRLAIIDVRDEERSYQAHGSHHFASGSF	50
M0WIP5Hordeum_vulgare	MARSVSYVSAAKLVSMARGN - RVAVIDVRDEERSYQAHGSHHFASGSF	49
I1QVM3Oryza_glaberrima	MARSVSYVSAAKLLAMARGNPRLAIIDVRDEERSYQAHGSHHFSSRSF	50
	*****.:***** *.:*****.*****.* **	
XP002467557Sorghum_bicolor	EARMPELARAASGKDTLVFHCALSQVRGPTCARMFSDYLSETKEDSGIKN	100
C5WTH4Sorghum_bicolor	EARMPELARAASGKDTLVFHCALSQVRGPTCARMFSDYLSETKEDSGIKN	100
NP001144297Zea_mays	EARMPELVRAASGKDTLVFHCALSQVRGPTCARMFSDYLSETKEDSGIKN	100
B6TQK1Zea_mays	EARMPELVRAASGKDTLVFHCALSQVRGPTCARMFSDYLSETKEDSGIKN	100
K4AGK1Setaria_italica	AARMPELVQAASGKDTLVFHCALSQVRGPTCARMFFDYLSETKEDSEIKN	100
M0WIP5Hordeum_vulgare	AARMPELVRAATSGKDTLVFHCALSQVRGPSCARMFSDYLSKEDSGIKN	99
I1QVM3Oryza_glaberrima	AARLPELARATGDKDTLVFHCALSKVRGPSCARMFSDYLSETKEESGTKN	100
	*.:***.:*.:...*:*****.*.:**.* **	
XP002467557Sorghum_bicolor	IMVLELGFNGWEGSGQPVCRCTDAPCKGTCC-----	131
C5WTH4Sorghum_bicolor	IMVLELGFNGWEGSGQPVCRCTDAPCKGTCC-----	131
NP001144297Zea_mays	IMVLERGFNGWEGSGQPVCSCTDAHCKGTCS-----	131
B6TQK1Zea_mays	IMVLERGFNGWEGSGQPVCSCTDAHCKGTCS-----	131
K4AGK1Setaria_italica	IMVLELGFNGWEGSGQPVCRCTDAPCKGTCS-----	131
M0WIP5Hordeum_vulgare	IMVLERGYNGWEISGQPVCHCKDAPCKGTCS-----	130
I1QVM3Oryza_glaberrima	IMVLERGFNGWELSGQPVCRCTDAPCKGTCSPEEPEL	137
	***** *.:*** ***** *.:** *****.	

541#ARend_R

ภาพผนวกที่ 2 (ต่อ)

EAY980530ryza_sativaIndica	GAAAGCTTCTCGGCCAGACTGGAACAGGGGCATTTCTCGCCGATTGGCGGCT	750
EEE637340ryza_sativaJaponica	GAAGCTTCTCGGCCAGACTGGAACAGGGGCATTTCTCGCCGATTGGCGGCT	550
AA0133490ryza_sativa	GAAGCTTCTCGGCCAGACTGGAACAGGGGCATTTCTCGCCGATTGGCGGCT	550
AF093752Triticum_aestivum	GAGCCCCCTTCAAGCAGACTGGGACTGGCCATTTCTCACCATCGCCGGGT	505
AY553634Cynodon_dactylon	GAAGCTTTACAGCAGACTGGAACAGGGGCATTTCTCCCAATCGTGCGT	511
	** * . * . ***** ** *	
EAY980530ryza_sativaIndica	ACCATGCTGGGCAGGACATGGCGCTGATCCTGGATGTCGCTCGCTTCAA	600
EEE637340ryza_sativaJaponica	ACCATGCTGGGCAGGACATGGCGCTGATCCTGGATGTCGCTCGCTTCAA	600
AA0133490ryza_sativa	ACCATGCTGGGCAGGACATGGCGCTGATCCTGGATGTCGCTCGCTTCAA	600
AF093752Triticum_aestivum	ATCATGCCGAGAAAACATGGCGCTCATCTGGATGTTGCGCGCTTCAA	555
AY553634Cynodon_dactylon	ACCACGCCGAGCAGGATATGGCGCTTATCTTGGATGGTGCCCGATTCAAG	561
	** * * ***** ** *	
EAY980530ryza_sativaIndica	TACCCTCCTCATTGGATTCCGCTGCCGCTTCTTTGGGAAGCCATGAACAC	650
EEE637340ryza_sativaJaponica	TACCCTCCTCATTGGATTCCGCTGCCGCTTCTTTGGGAAGCCATGAACAC	650
AA0133490ryza_sativa	TACCCTCCTCATTGGATTCCGCTGCCGCTTCTTTGGGAAGCCATGAACAC	650
AF093752Triticum_aestivum	TACCCTCCTCATTGGATTCCATGACGCTTCTGGGATGCCATGAACAC	605
AY553634Cynodon_dactylon	TACCCTCCACATTGGGTCCACTGCCACTTCTTAGGAAGCCATTATAC	611
	***** , ***** . *** . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
	537#PCS679 F	
EAY980530ryza_sativaIndica	GATTGATGAAGCAACTGGGCTTCTCAGGGGTTTCATGCTTATCTCAA	700
EEE637340ryza_sativaJaponica	GATTGATGAAGCAACTGGGCTTCTCAGGGGTTTCATGCTTATCTCAA	700
AA0133490ryza_sativa	GATTGATGAAGCAACTGGGCTTCTCAGGGGTTTCATGCTTATCTCAA	700
AF093752Triticum_aestivum	GACTGATGAAGCAACTGGGCTTCTCAGGGGTTTCATGCTTATCTCAA	655
AY553634Cynodon_dactylon	GACTGATGAAGCAACTGGGCTTCTCAGGGGTTTCATGCTTATCTCAA	661
	** * * * * ***** ** *	
	538#PCS698 R	
EAY980530ryza_sativaIndica	ATACTGAAGCTCCTTTATTGATCCGTGCAGTGAATTCGAGGATGAAAGC	750
EEE637340ryza_sativaJaponica	ATACTGAAGCTCCTTTATTGATCCGTGCAGTGAATTCGAGGATGAAAGC	750
AA0133490ryza_sativa	ATACTGAAGCTCCTTTATTGATCCGTGCAGTGAATTCGAGGATGAAAGC	744
AF093752Triticum_aestivum	GCAGTTGAGCTCCTTTATGCTCTACACAGTGAATTCGCGCCATGGAAGT	705
AY553634Cynodon_dactylon	ACACTGACGCTCCTTCGTTACTGTACACAGTGAATTCGAGGAGGAAAGC	711
	* * . ***** . * . * . ***** . *	
EAY980530ryza_sativaIndica	TGGCAAAGCATGGCAAAGTATTGCATAGAAGTTGTCCCAATCTTTTGAG	800
EEE637340ryza_sativaJaponica	TGGCAAAGCATGGCAAAGTATTGCATAGAAGTTGTCCCAATCTTTTGAG	800
AA0133490ryza_sativa	TGCCAATGCTTGG-----TGAATCAAAATTT-----	770
AF093752Triticum_aestivum	TGGAAAGCATGGCAAAGTATTGTGTGAAGATTGTCCCAATCTACTGAA	755
AY553634Cynodon_dactylon	TGGAAAGCATGGCAAAGTATTTTATTGAAGATTGTCCCAATATTTTGGA	761
	** . *: : * : * :	
EAY980530ryza_sativaIndica	GGATAACAGCGTAGACAATGTCTTAACAATCTTTCCCCTTTAGTGAATC	850
EEE637340ryza_sativaJaponica	GGATAACAGCGTAGACAATGTCTTAACAATCTTTCCCCTTTAGTGAATC	850
AA0133490ryza_sativa	-----GAATC	775
AF093752Triticum_aestivum	GGATGAGAGTCTAGACAATGTTACAACACTTCTGTCCCGCTAGTGAAT	805
AY553634Cynodon_dactylon	GATTGAGAGTCTAGGCAATGTTCCAACACTTGTCCCGCTAGTTACTA	811
	. . :	
EAY980530ryza_sativaIndica	ATCTTCTCCCAATGCTGGAAATTTTATCAAAATGGGTTCATTGAAGTTAGG	900
EEE637340ryza_sativaJaponica	ATCTTCTCCCAATGCTGGAAATTTTATCAAAATGGGTTCATTGAAGTTAGG	900
AA0133490ryza_sativa	ATCTTCTCCCAATGCTGGAAATTTTATCAAAATGGGTTCATTGAAGTTAGG	825
AF093752Triticum_aestivum	CTCTCCCAAGCAATGCTGGAGATTGATCAAAATGTGTCATTGAAGTTAGG	855
AY553634Cynodon_dactylon	CTCTTCAAGCCAACTGCTGAGCTTGTACAAATGGGTGTTGAAGTTAGG	861
	. *** . : . ***** . * * * * * * * * * * *	
EAY980530ryza_sativaIndica	AGACAAGAGGAAGGAGGATCCAGCCCAAGTAAAGAGGCTAACGAAATGCC	950
EEE637340ryza_sativaJaponica	AGACAAGAGGAAGGAGGATCCAGCCCAAGTAAAGAGGCTAACGAAATGCC	950
AA0133490ryza_sativa	AGACAAGAGGAAGGAGGATCCAGCCCAAGTAAAGAGGCTAACGAAATGCC	875
AF093752Triticum_aestivum	AGAAAGAGGAAGGTTGAATCAAGCTTGAGTAAAGAGGAGAAAGAAAGGCT	905
AY553634Cynodon_dactylon	AGAAGAGAGGAAGGTGGGTCAAGCTTAAGCGTAAAAAAAAAAAA---	907
	*** . ***** . * * * * * * * . * . * . * . * . *	
EAY980530ryza_sativaIndica	TTTTCTGAAGGAAAAGATCCTACAGCAATCCGTGATACTAAGCTTTTTTC	1000
EEE637340ryza_sativaJaponica	TTTTCTGAAGGAAAAGTCTACAGCAATCCGTGATACTAAGCTTTTTTC	1000
AA0133490ryza_sativa	TTTTCTGAAGGAAAAGGTTCAAGCAATCCGTGATACTAAGCTTTTTTC	925
AF093752Triticum_aestivum	TTTTTTGAAGGAAAAGTATTACAGCAATCCGTGATACTGATCTTTTCA	955
AY553634Cynodon_dactylon	-----AAAAAAAAAAAAAA--	922
	* . * . * . . . : *	
EAY980530ryza_sativaIndica	-----	
EEE637340ryza_sativaJaponica	-----	
AA0133490ryza_sativa	AGCTGGTCCACAACTGCAATGTTCTAAGCAGCCCTGTTGAGTTGCTCG	975
AF093752Triticum_aestivum	GAGTAGTCCACGAACCTGCAATATCCCAAGGGCTATGTGGTAGTTGCTCG	1005

ภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

EAY980530ryza_sativaIndica EEE637340ryza_sativaJaponica AA0133490ryza_sativa AF093752Triticum_aestivum AY553634Cynodon_dactylon	----- ----- TCTTTAACGGACGAAGATTCCATTT----- 1000 TCTTCAAGTGATGAAGATTGCTTGCCGAGATTGCAGCCACTGTGTGCTG 1055 -----
EAY980530ryza_sativaIndica EEE637340ryza_sativaJaponica AA0133490ryza_sativa AF093752Triticum_aestivum AY553634Cynodon_dactylon	----- ----- ----- TCAAGGAGCTGCATTCTATCTGGTAACCTTGTATCTAGAGATGGGTTCT 1105 -----
EAY980530ryza_sativaIndica EEE637340ryza_sativaJaponica AA0133490ryza_sativa AF093752Triticum_aestivum AY553634Cynodon_dactylon	----- ----- ----- GCTGCCGAGAAACATGTATCAAATGTATAGAAGCAAATGGTGATGGACTA 1155 -----
EAY980530ryza_sativaIndica EEE637340ryza_sativaJaponica AA0133490ryza_sativa AF093752Triticum_aestivum AY553634Cynodon_dactylon	----- ----- ----- AAGACTGTTATCTCAGGAACCGTGGTATCTAAAGGGAATGAACAGGCTGT 1205 -----
EAY980530ryza_sativaIndica EEE637340ryza_sativaJaponica AA0133490ryza_sativa AF093752Triticum_aestivum AY553634Cynodon_dactylon	----- ----- ----- TGATTTGCTTTTACCAACATCTCGTCAAAACAAGCTTATGCAATTCAA 1255 -----
EAY980530ryza_sativaIndica EEE637340ryza_sativaJaponica AA0133490ryza_sativa AF093752Triticum_aestivum AY553634Cynodon_dactylon	----- ----- ----- ACTTGAAGAGCAAGATTGTCAAGTATCCATCAAGCACAGATGTTCTAACT 1305 -----
EAY980530ryza_sativaIndica EEE637340ryza_sativaJaponica AA0133490ryza_sativa AF093752Triticum_aestivum AY553634Cynodon_dactylon	----- ----- ----- GTCCTACTGCTGGTTTTACAGCCTAACACATGGCTTGGCATAAAAGACGA 1355 -----
EAY980530ryza_sativaIndica EEE637340ryza_sativaJaponica AA0133490ryza_sativa AF093752Triticum_aestivum AY553634Cynodon_dactylon	----- ----- ----- GAACGTGAAAGCTGAATTTCAAGTCTTGTTTCAACAGACAATCTTCTCTG 1405 -----
EAY980530ryza_sativaIndica EEE637340ryza_sativaJaponica AA0133490ryza_sativa AF093752Triticum_aestivum AY553634Cynodon_dactylon	----- ----- ----- ATCTTCTTAAACAGGAGATACTGCATCTAAGGCGGAGCTCCATTATTTG 1455 -----
EAY980530ryza_sativaIndica EEE637340ryza_sativaJaponica AA0133490ryza_sativa AF093752Triticum_aestivum AY553634Cynodon_dactylon	----- ----- ----- GCTGGTTGTAAAGACAGGAGGCATGTCAAGAGCTCCATCCCCTTAGGG 1505 -----
EAY980530ryza_sativaIndica EEE637340ryza_sativaJaponica AA0133490ryza_sativa AF093752Triticum_aestivum AY553634Cynodon_dactylon	----- ----- ----- ACGCTGCTGCGACAATCTGCTCACTTGTTAGGAGATAAGGCCCTTGGAG 1555 -----

ภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

```

EAY980530ryza_sativaIndica -----
EEE637340ryza_sativaJaponica -----
AA0133490ryza_sativa -----
AF093752Triticum_aestivum ATCCACGAGCATACTATCGAGGCAAAATATATGATTCAATAACAGAC 1605
AY553634Cynodon_dactylon -----

```

```

EAY980530ryza_sativaIndica -----
EEE637340ryza_sativaJaponica -----
AA0133490ryza_sativa -----
AF093752Triticum_aestivum TTACTTCGTGAGGTAGGAGGACATACTAAGGATCAAAGTAATAGGATTTT 1655
AY553634Cynodon_dactylon -----

```

```

EAY980530ryza_sativaIndica -----
EEE637340ryza_sativaJaponica -----
AA0133490ryza_sativa -----
AF093752Triticum_aestivum GAGAGAGTATTGGAGCCAAGATAGCTGGTAACATCCTGGTTACCGGTCTC 1705
AY553634Cynodon_dactylon -----

```

```

EAY980530ryza_sativaIndica -----
EEE637340ryza_sativaJaponica -----
AA0133490ryza_sativa -----
AF093752Triticum_aestivum TTTTGGTTCACATATATGTAAATCTTTGCGTTTATATTATTTCTTC 1755
AY553634Cynodon_dactylon -----

```

```

EAY980530ryza_sativaIndica -----
EEE637340ryza_sativaJaponica -----
AA0133490ryza_sativa -----
AF093752Triticum_aestivum GACTATGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1796
AY553634Cynodon_dactylon -----

```

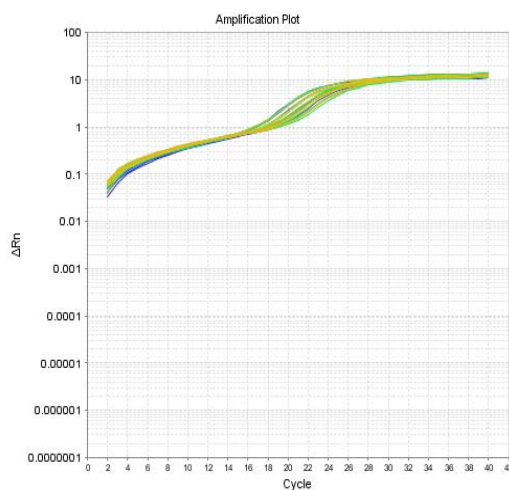
ภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

TCCATGCTCGACTGCTGCGAGCCCCTCGACAAGGTGAAGGCGGAGGGCAT
 CACCTTCGCCAAACTCGCCTGCCTCGCGCACTGCGCCGGTGCCAATGTCC
 GCTCCTTCCGCGCCGACCAGTCCACCATCCACGACTTCCGCCACCATCTC
 GTCCGCTCTGCCTCCTCCCAGGACTGCCATCTCATCGCATCCTACCACAG
 GAAGCCTTTCAAACAGACTGGAACCGGCCATTTCTCTCCAATCGGCGACT
 ACCATGCCGGCCAAGACATGGCGCTTATCCTGGATGTGCCCCGCTTCAAA
 TACCCTCCTCACTGGGTTCCACTCCCACCTGCTTTGGGAAGCCATGAATAC
 AACTGATGACGCGACTGGTCTACTCAGGGGGTTCATGCTTATCTCAAGGC
 ACTCTGCAGCTCCTTCATTGCTCTACACAGTGAGTTGCAGAGATGAAAGC
 TGAAAAAGCATGGCGAAGTATTGCATGGAAGATGTACCCGATCTTCTTAA
 GGATGAGAGTGTAGACAATGTTCCAGCACTTCTGTCCCGCTTAGTGAAAT
 CCTTCCTGCCAATGCTGGAAATTTGATCAAATGGGTTATTGAAGTTAGG
 AGACAAGAGGAAGGAGGATCAGGATTAAGCAAAGAGGAGGAAGAAAGGCT
 TATTTTGAAGGAAATGATACTACAGCAAGTCCGTGATACTGAGCTTTTTA
 GATTAGTCCGTGAACGCAATTCATAAGCAGCCATGTTGTAGTTGCTCA
 TATTCAAGTGATGATGATTCTTTACCTGGATTGCAGCCTCTGTGTGCTG
 TCAAGGGGCCGATTGCTAACAGGGAATCTTTCATCAAAAGATGGGTTCT
 GCTGCAGAGAACTTGCTTCAAATGTGTACAAGTGGATGGTGATGGGCCT
 AAGACTGTGCTTACAGGCACAGCGGTTTCAGGAGTCAATGAACAAAGTGT
 TGATATGCTTCTACCGATATCCACATTGGAAACAAGCGTGTGCAATTCAA
 ATTCAAGCAACGAGGTTGTCAAATATCCATCTAGAACAGATATTTAACT
 GTTCTATTGCTGGCTTTACATCCTAGCACATGGGTGGGCATTAAAGACGA
 GAGGCTGAAAGCTGAATTCCAGAGTCTTATTTCAACAGACATTCTTCATG
 ATGATCTTAAACGAGAGATATTACATCTAAGACGGCAACTCCATTATGTG
 AGGTCCTGTAAAGAGGAGGAATATGGAGATCCTGTGCCACAATCCCATTA
 ACAATGATGCAATCGCGCAGTTGGTTACCCTGGAGATGCAAAAAAAGG
 GGTAGAGGAGGAACCTACATACTCCGTATTACCTTTGTTTCGAGTGAGGA
 CTTCTCATTTTTGAGACACCTGACCTGAGACGGATCCGTGTAGACATGTT
 CATGTTTCATCACCTGTGGTCGTTTCTCTTGGTAGTGACAACCTGACAATA
 GCGGGGAGGCACCGCTAATTGTGCGGGTGGTGTCTTGCAAAAGTTCTCA
 AATAACGCAATGGCGGATTATTTTACCTTTATATTAAAAAAATTTGA
 AAGGGCATTAGGGGGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACGATT
 CCATCCGGTAATCCAATTCCTGGGCGCCAGGGGGCGGGAGATGGAGTCGG
 CCATTCCCCTTAAGGGGGGATAAATACTGGGCGGTTTAAAGCTGGTGGGA
 AACAGGGGTCCATAAACCTTGGAACCCTTCCCCCTGGGTAAAGAAAGCCCA
 AGCTCCACTTCCCTTAGAGAGCCTGGGGGAAAACCGGGGTGGACGGGGCA
 AACCACCTCTCTTTCCTTCTACCTGGCCTAACCAAAAAAAAAAAATTT
 CAGTTAAGGAAAGGAAAAAATATAA

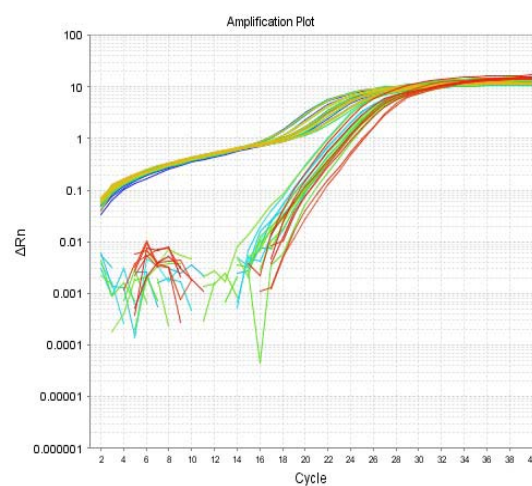
ภาพผนวกที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *phytochelatase* จากผลผลิตพีชีอาร์บริเวณกลางยีน
 (ขีดเส้นใต้) และ บริเวณปลาย 3' ตัวหนาแสดงส่วนที่เป็น stop codon (TAA) และ
 poly A signal (ATTAAA) บริเวณที่ซ้อนทับกันแสดงในกรอบสี่เหลี่ยม

arsenate reductase

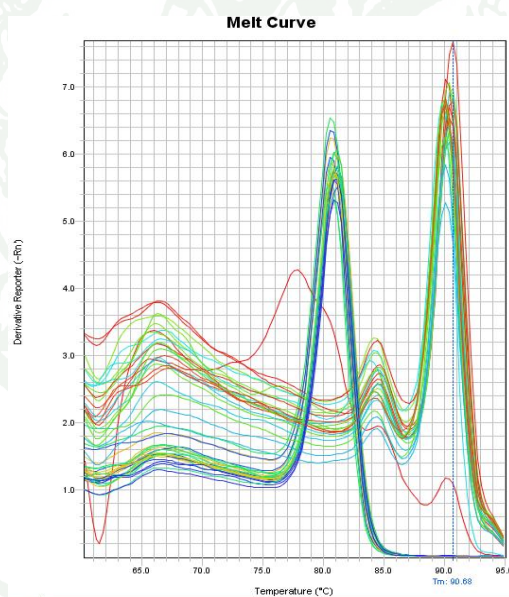
(ก)



(ข)



(ค)

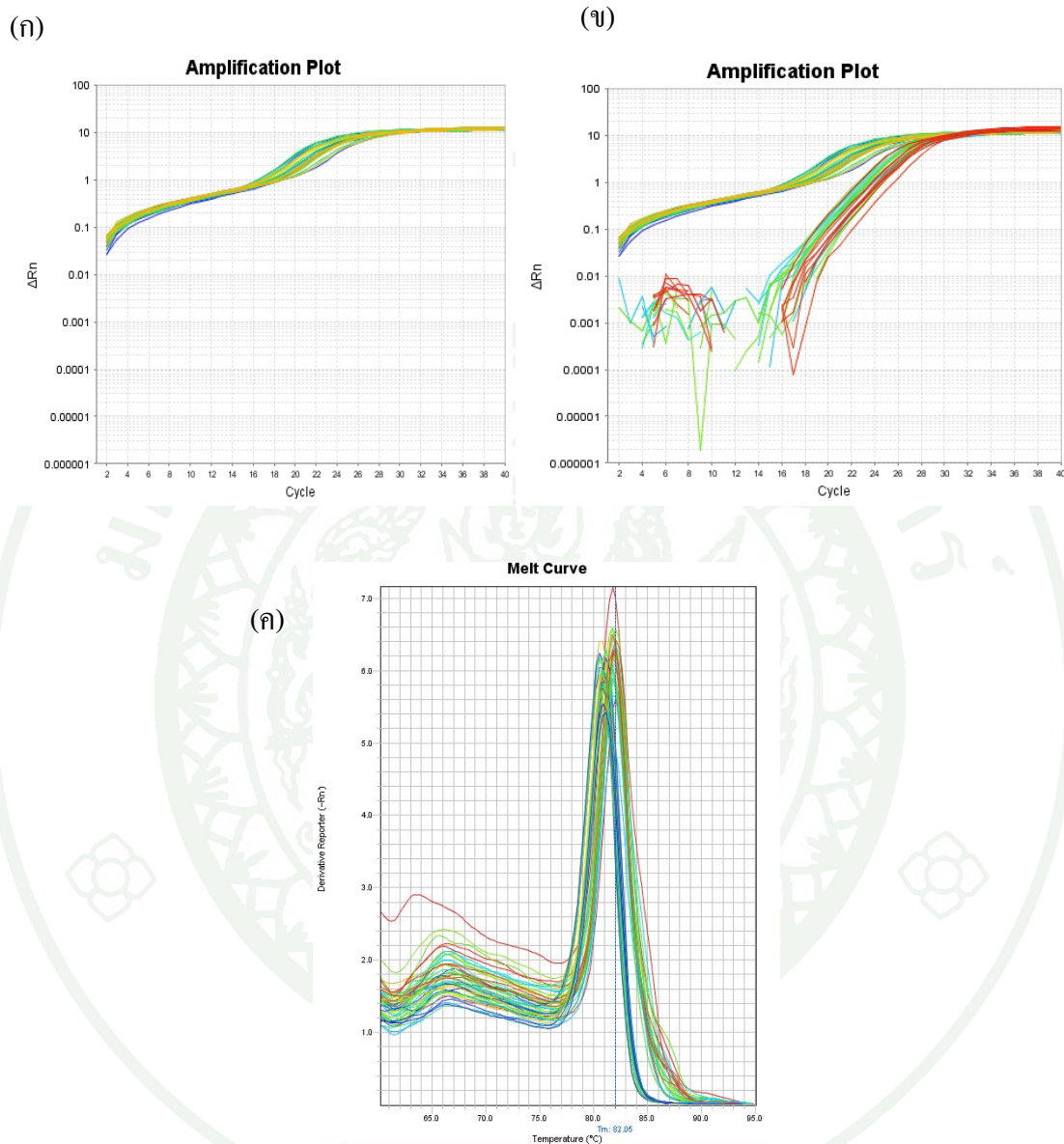


ภาพผนวกที่ 5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *arsenate reductase* ด้วยวิธี quantitative Real-time PCR

(ก) amplification plot ของยีน *eukaryotic elongation factor 1-alpha*

(ข) amplification plot ของยีน *arsenate reductase* และ *eukaryotic elongation factor 1-alpha*

(ค) melting curve

phytocheltin synthase

ภาพผนวกที่ 6 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *phytocheltin synthase* ด้วยวิธี quantitative real-time PCR

(ก) amplification plot ของยีน *eukaryotic elongation factor 1-alpha*

(ข) amplification plot ของยีน *phytocheltin synthase* และ *eukaryotic elongation factor 1-alpha*

(ค) melting curve

ตารางผนวกที่ 1 สรุปผลการวิเคราะห์ฐานข้อมูลโลหะหนักในดินเกษตรกรรมที่ใช้ปลูกข้าว

รหัสตัวอย่าง	ส่ง	พิกัดทางภูมิศาสตร์		As	Cd	Cu	Pb	Zn
	ตัวอย่าง	X	Y					
(mg/kg)								
5301011014	28มค53	696733	1565085	13.315	0.550	85.80	18.050	46.600
5301011204	28มค53	639299	1546944	10.610	0.500	24.950	22.700	61.600
5301011205	28มค53	639974	1546503	10.870	0.500	28.750	21.300	53.750
5301011306	28มค53	704104	1560736	9.240	0.450	39.250	17.450	46.650
5301011307	28มค53	704167	1562802	10.995	0.500	44.350	19.100	42.350
5301011308	28มค53	704367	1563080	9.225	0.400	34.500	17.650	32.200
5301011309	28มค53	704394	1563149	10.215	0.450	28.800	18.500	34.850
5301011311	28มค53	704335	1567722	10.920	0.500	31.100	17.050	45.350
5301011312	28มค53	699700	1576826	10.525	0.500	30.550	13.400	38.650
5301011313	28มค53	699129	1575020	11.655	0.500	28.700	16.400	40.000
5301011315	28มค53	696961	1564406	8.785	0.400	53.050	16.350	42.950
5301011316	28มค53	689643	1561484	6.940	0.350	21.250	17.100	45.050
5301017317	28มค53	623179	1558104	16.175	0.650	23.700	27.200	70.700
5301017318	28มค53	623036	1559124	12.770	0.550	25.200	24.600	66.350
5301017322	28มค53	621773	1551381	17.895	0.700	24.850	24.850	73.800
5301033016	3ธค52	188573	1674271	3.959	0.200	8.200	8.700	24.150
5301033017	3ธค52	178965	1692542	2.603	0.150	3.950	5.550	11.450
5301033023	3ธค52	208379	1732483	1.429	0.150	5.650	5.050	13.800
5301033024	3ธค52	235997	1680991	4.232	0.250	10.800	11.800	29.800
5301033026	9ธค52	267735	1681010	1.225	0.100	2.850	3.400	7.500
5301033029	9ธค52	244414	1689257	3.347	0.200	12.800	11.450	58.250
5301033030	9ธค52	225754	1686611	3.310	0.150	7.850	7.700	24.100
5301033125	3ธค52	275636	1659914	1.104	0.100	2.800	3.450	10.300
5301033127	9ธค52	280115	1658260	2.725	0.150	5.900	5.950	17.350
5301033128	9ธค52	267784	1670163	5.335	0.250	6.550	7.500	20.250
5301033618	3ธค52	503189	1718122	4.618	0.250	8.300	7.900	23.250
5301033619	3ธค52	809794	1747091	3.439	0.200	7.850	7.550	23.100
5301033620	3ธค52	179202	1748556	0.653	0.100	2.750	5.100	5.850
5301033621	3ธค52	204177	1757876	5.087	0.250	7.850	7.850	17.650
5301033622	3ธค52	203925	1744006	5.360	0.300	13.700	13.050	47.350

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ส่ง	พิกัดทางภูมิศาสตร์		As	Cd	Cu	Pb	Zn
	ตัวอย่าง	X	Y					
(mg/kg)								
5301043422	11มีค53	502120	1683822	2.013	0.200	1.900	3.000	4.950
5301043423	11มีค53	525211	1680429	1.432	0.050	1.400	2.050	7.650
5301043424	11มีค53	533556	1676099	0.981	0.050	1.700	3.350	7.800
5301043425	11มีค53	499233	1683311	2.219	0.100	3.100	4.700	5.350
5301043529	30มีค53	423392	1722447	1.285	0.050	1.700	2.300	3.000
5301043530	30มีค53	423480	1721902	1.227	0.100	3.500	3.650	6.950
5301043531	30มีค53	423490	1721836	2.537	0.100	5.100	5.550	12.150
5301043726	12มีค53	468155	1753290	2.121	0.100	3.550	6.250	9.750
5301043727	12มีค53	493561	1758101	1.749	0.100	0.850	4.000	10.000
5301043728	12มีค53	463692	1734744	2.869	0.150	5.500	7.750	19.400
5301044503	2กพ53	389391	1721839	3.015	0.200	5.000	14.300	23.850
5301044507	13มีค53	368174	1784818					
5301044819	18กพ53	473797	1888168	9.685	0.500	15.800	14.850	47.000
5301044820	21มีค53	443360	1873065	1.676	0.100	3.150	4.550	8.450
5301044821	21มีค53	441415	1871591	0.776	0.050	1.100	1.800	4.650
5301053921	24 มีย53	860366	1870363	4.422	0.300	12.600	21.400	36.600
5301053922	7กค53	862497	1866123	4.414	0.250	17.900	11.550	31.700
5301054038	7กย53	247154	1762547	4.446	0.300	11.350	15.450	46.450
5301054039	5กย53	228346	1854181	2.363	0.200	9.050	16.100	28.150
5301054040	5กย53	247842	1815031	1.773	0.150	7.750	13.600	22.300
5301054141	10เมษ53	231013	1957689	0	0.050	6.100	6.500	13.500
5301054345	17กย53	265683	1979569	6.026	0.300	7.700	17.400	20.900
5301054346	17กย53	265715	1979705	3.401	0.200	9.450	10.850	29.400
5301054409	18กพ53	310514	1792876					
5301054410	18กพ53	312359	1790999					
5301054601	7 พค 53	336996	1814142					
5301054602	7 พค 53	337066	1814063					
5301065001	1มีค53	494963	2100224					
5301065002	1มีค53	494963	2100336					
5301065003	1มีค53	495674	2099503					
5301065004	1มีค53	495376	2098533					

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ส่ง	พิกัดทางภูมิศาสตร์		As	Cd	Cu	Pb	Zn
	ตัวอย่าง	X	Y					
(mg/kg)								
5301075412	5ธค52	629318	2008849	2.835	0.150	9.650	5.900	17.750
5301075413	5ธค52	631929	2022093	6.130	0.250	13.300	8.800	26.850
5301075501	27พย52	649912	2084456	5.875	0.300	12.200	9.850	38.000
5301075514	5ธค52	676440	2050409	7.410	0.250	14.550	10.450	33.050
5301075515	5ธค52	684370	2066240	6.975	0.300	12.900	8.100	35.250
5301075602	27พย52	634433	2092502	7.080	0.300	10.950	8.000	32.900
5301075603	27พย52	633438	2113144	7.040	0.300	15.150	8.000	40.750
5301075604	27พย52	586541	2137714	6.335	0.250	11.900	13.250	36.550
5301075611	2ธค52	592709	2116443	8.900	0.350	17.100	8.800	33.600
5301075705	27พย52	574941	2161985	14.270	0.600	16.850	11.200	40.550
5301075706	25พย52	591484	2218112	4.611	0.150	9.200	32.100	25.600
5301075707	25พย52	595348	2233753	15.715	0.700	22.350	33.300	51.550
5301075708	29พย52	610578	2238074	10.540	0.400	16.650	21.700	38.250
5301075709	29พย52	616627	2228389	3.431	0.100	13.800	12.250	36.000
5301075710	30พย52	595038	2257353	15.115	0.550	24.900	27.400	50.800
5301075742	9พค 53	554264	2126279	26.745	1.100	35.550	17.950	51.550
5301075745	10พค 53	580784	2155283	7.925	0.350	17.000	15.250	40.050
5301084207	26พย52	757498	1953650	6.150	0.300	26.400	12.750	55.450
5301084208	26พย52	757683	1954509	12.665	0.700	48.500	17.800	22.900
5301084209	26พย52	758646	1955380	3.773	0.200	18.000	5.050	25.950
5301086601	26พย52	671115	1814301	4.548	0.350	20.450	11.850	46.850
5301086602	26พย52	666295	1808252	7.165	0.500	19.700	9.000	50.550
5301086603	26พย52	664650	1808150	5.860	0.700	15.800	17.000	48.100
5301086604	26พย52	667913	1807754	3.657	0.250	23.400	5.150	32.100
5301086605	26พย52	664526	1809474	3.485	0.200	26.550	5.150	30.300
5301086606	26พย52	668065	1769986	3.365	0.150	21.900	2.450	21.100
5301086611	5มีค53	675053	1786901	2.840	0.100	4.550	1.900	7.950
5301086612	5มีค53	657134	1785216	3.821	0.150	8.400	7.050	28.050
5301086613	5มีค53	657153	1771363	2.836	0.100	4.950	2.150	7.700
5301086614	5มีค53	657380	1772858	3.205	0.300	28.000	18.650	42.950
5301086615	5มีค53	651541	1800042	2.764	0.100	4.700	1.950	7.900

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ส่ง	พิกัดทางภูมิศาสตร์		As	Cd	Cu	Pb	Zn
	ตัวอย่าง	X	Y					
(mg/kg)								
5301086710	24กพ52	730522	1820930	7.825	0.800	40.200	14.450	34.500
5301096006	15มค53	619905	1745380	13.225	0.650	17.350	15.750	54.850
5301096010	25มค53	603733	1743814	7.425	0.250	11.350	10.250	27.050
5301096034	2มีค53	642735	1747550	9.540	0.500	17.800	12.600	47.450
5301096129	4มีค53	608032	1712345	3.662	0.150	6.900	8.600	16.150
5301096146	27เมษ53	603431	1714109	4.769	0.150	5.900	8.050	19.400
5301096147	27เมษ53	610148	1699333	5.015	0.200	8.750	15.150	29.400
5301096204	4มค53	567875	1781047	5.190	0.200	10.000	12.200	32.200
5301096215	26มค53	555323	1761496	5.710	0.150	5.100	7.550	14.700
5301096223	27มค53	534726	1840839	10.330	0.555	13.650	12.650	46.500
5301096342	18มีค53	527690	1845333	9.280	0.450	9.800	8.550	40.950
5301096343	18มีค53	527365	1846432	9.745	0.500	12.850	14.450	40.400
5301096344	18มีค53	526192	1847947	5.580	0.300	14.850	11.250	46.000
5301096426	18กพ53	570044	1901483	5.700	0.300	9.550	6.200	22.550
5301096435	16มีค53	615473	1876253	10.210	0.550	22.350	15.500	65.750
5301096436	16มีค53	594968	1881938	9.345	0.500	20.350	13.750	56.600
5301107003	23มีค53	576422	1498805	7.120	0.350	6.050	25.700	8.650
5301107004	23มีค53	575812	1498998	4.797	0.250	5.150	22.150	12.500
5301107005	23มีค53	575842	1499120	6.575	0.450	6.350	38.350	13.450
5301107006	23มีค53	576493	1498991	11.575	0.550	6.250	34.450	6.500
5301107007	23มีค53	575772	1499866	11.500	0.550	14.100	22.550	24.900
5301107008	23มีค53	576000	1499772	14.455	0.700	9.300	24.250	22.600
5301107009	23มีค53	576377	1499907	5.155	0.250	5.900	18.300	11.450
5301107010	23มีค53	576255	1499848	5.190	0.250	6.000	18.700	12.600
5301107012	23มีค53	575919	1499848	9.645	0.450	8.150	23.750	16.950
5301107013	23มีค53	581064	1497689	5.260	0.250	7.550	9.050	9.300
5301107014	23มีค53	584912	1493065	5.785	0.300	9.850	7.850	36.100
5301107015	23มีค53	585157	1492938	2.748	0.100	8.200	5.750	19.300
5301107111	23มีค53	548954	1552819	13.510	0.600	8.100	9.100	16.400
5301107601	23มีค53	609668	1439976	15.260	0.700	12.600	22.250	39.800
5301118031	19กพ53	557695	944565	7.650	0.300	2.600	4.250	6.050

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ส่ง	พิกัดทางภูมิศาสตร์		As	Cd	Cu	Pb	Zn
	ตัวอย่าง	X	Y					
(mg/kg)								
5301118032	19กพ53	557980	944168	4.855	0.200	2.250	4.550	5.900
5301118033	19กพ53	541277	930646	12.670	0.650	8.900	11.400	14.300
5301118046	19กพ53	588005	928308	7.010	0.300	3.450	6.650	7.750
5301118048	19กพ53	589907	927019	10.015	0.450	19.950	8.350	26.350
5301118049	16กพ53	601670	921959	18.885	0.750	3.650	8.200	8.900
5301118050	19กพ53	600015	923787	16.110	0.650	3.350	6.200	8.500
5301118105	18มค53	485252	940522	12.135	0.500	5.200	6.100	12.650
5301118115	20มค53	503374	888593	11.380	0.600	12.600	22.050	49.300
5301118127	25มค53	492667	889665	12.125	0.500	4.450	12.550	9.050
5301118128	25มค53	492700	889600	23.855	0.550	2.900	12.400	4.600
5301118222	8กพ53	418897	924779					
5301118426	9มค53	541567	960043	6.660	0.250	4.600	13.350	21.450
5301118430	13กพ53	541443	959104	7.650	0.300	2.600	4.250	6.050
5301118436	13กพ53	535623	961458	4.447	0.300	7.550	11.500	22.600
5301129045	24มีค53	653965	076770	6.555	0.100	1.650	6.450	5.400
5301129048	24กพ53	794210	0653180	4.341	0.200	2.600	16.650	13.950
5301129049	24กพ53	794450	0653830	7.250	0.150	4.550	27.600	19.800
5301129050	24กพ53	681039	0788313	5.475	0.150	3.850	21.300	12.800
5301129102	9กพ53	618813	0751543	12.215	0.350	6.850	32.600	30.150
5301129204	9กพ53	572596	0832679	0.243	0.000	1.000	4.300	4.000
5301129206	9กพ53	576844	0834601	3.156	0.050	4.300	10.800	13.050
5301129208	9กพ53	576115	0837646	10.675	0.300	17.200	26.000	51.000
5301129213	9กพ53	561545	0826467	2.754	0.000	5.500	7.550	17.800
5301129318	9กพ53	605279	0867735	6.155	0.150	9.200	22.100	28.800
5301129440	17กพ53	785887	0748558	4.114	0.050	9.450	19.850	19.100
5301129441	17กพ53	785818	0748694	6.330	0.150	17.450	21.650	25.350
5301129629	11กพ53	804923	0692854	4.322	0.000	2.300	16.850	11.950
5301129652	24กพ53	817723	0707677	5.525	0.100	5.200	29.200	20.450
ค่าเฉลี่ย				6.93432	0.314	12.9687	12.9695	27.3322

ตารางผนวกที่ 2 ข้อมูลการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *arsenate reductase*

Sample (As mM)	Target	Tm (°C)	Ct SYBR	Mean Ct	Ct Mean Calibrator	2^{-DDCT}	Mean Fold change	S.D.
ข้าวดอกมะลิ105*	AR	90	24.94837	23.9173	24.75089	2.6402	5.3519	3.379
ข้าวดอกมะลิ105*	AR	90	23.92006		24.75089	4.2778		
ข้าวดอกมะลิ105*	AR	90	22.88365		24.75089	9.1377		
ข้าวดอกมะลิ105*	eEF-1a	81	20.97064	20.7687	24.75089			
ข้าวดอกมะลิ105*	eEF-1a	81	20.63854		24.75089			
ข้าวดอกมะลิ105*	eEF-1a	81	20.69709		24.75089			
ข้าวดอกมะลิ105**	AR	90	23.15804	23.2708	24.75089	9.1689	7.7342	1.300
ข้าวดอกมะลิ105**	AR	90	23.32725		24.75089	7.4008		
ข้าวดอกมะลิ105**	AR	90	23.32725		24.75089	6.6330		
ข้าวดอกมะลิ105**	eEF-1a	81	20.97641	20.8304	24.75089			
ข้าวดอกมะลิ105**	eEF-1a	81	20.83654		24.75089			
ข้าวดอกมะลิ105**	eEF-1a	81	20.67852		24.75089			
ไรซ์เบอร์รี่*	AR	90	22.5456	22.7424	24.75089	3.7363	3.3471	1.803
ไรซ์เบอร์รี่*	AR	90	22.21614		24.75089	4.9237		
ไรซ์เบอร์รี่*	AR	90	23.46565		24.75089	1.3812		
ไรซ์เบอร์รี่*	eEF-1a	81	19.06883	18.9198	24.75089			
ไรซ์เบอร์รี่*	eEF-1a	81	19.13748		24.75089			
ไรซ์เบอร์รี่*	eEF-1a	81	18.55316		24.75089			
ไรซ์เบอร์รี่**	AR	90	24.36938	24.0189	24.75089	3.2702	3.6652	1.383
ไรซ์เบอร์รี่**	AR	90	24.0702		24.75089	2.5222		
ไรซ์เบอร์รี่**	AR	90	23.61728		24.75089	5.2031		
ไรซ์เบอร์รี่**	eEF-1a	81	20.70038	20.4483	24.75089			
ไรซ์เบอร์รี่**	eEF-1a	81	20.02651		24.75089			
ไรซ์เบอร์รี่**	eEF-1a	81	20.61825		24.75089			
กข 6*	AR	90	23.93494	23.6994	24.75089	6.3583	6.5453	1.257
กข 6*	AR	90	23.92176		24.75089	5.3915		
กข 6*	AR	90	23.24177		24.75089	7.8862		
กข 6*	eEF-1a	81	21.22519	21.0139	24.75089			
กข 6*	eEF-1a	81	20.97406		24.75089			
กข 6*	eEF-1a	81	20.8427		24.75089			

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

Sample (As mM)	Target	Tm (°C)	Ct SYBR	Mean Ct	Ct Mean Calibrator	2^{-DDCT}	Mean Fold change	S.D.
กข 6**	AR	90	25.27222	24.3099	24.75089	4.1139	6.7194	2.353
กข 6**	AR	90	23.62354		24.75089	8.6923		
กข 6**	AR	90	24.03411		24.75089	7.3522		
กข 6**	eEF-1a	81	21.93432	21.6110	24.75089			
กข 6**	eEF-1a	81	21.36488		24.75089			
กข 6**	eEF-1a	81	21.5339		24.75089			
หางยี่ 71*	AR	90	25.35052	24.7508	24.75089	1.0557	1.0019	0.074
หางยี่ 71*	AR	90	24.54058		24.75089	0.9163		
หางยี่ 71*	AR	90	24.36158		24.75089	1.0338		
หางยี่ 71*	eEF-1a	81	20.05038	19.3725	24.75089			
หางยี่ 71*	eEF-1a	81	19.03602		24.75089			
หางยี่ 71*	eEF-1a	81	19.03109		24.75089			
หางยี่ 71**	AR	90	23.9818	24.0744	24.75089	2.5117	2.0301	0.916
หางยี่ 71**	AR	90	24.46001		24.75089	0.9733		
หางยี่ 71**	AR	90	23.78145		24.75089	2.6053		
หางยี่ 71**	eEF-1a	81	19.93209	19.5864	24.75089			
หางยี่ 71**	eEF-1a	81	19.04263		24.75089			
หางยี่ 71**	eEF-1a	81	19.78452		24.75089			

* ตัวอย่างที่ไม่ได้รับสารหนู (0 μ M)

** ตัวอย่างที่ได้รับสารหนู (50 μ M)

ตารางผนวกที่ 3 ระดับการแสดงออกของยีน *arsenate reductase* (relative expression ratio) ในรากข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ได้รับและไม่ได้รับสารหนู

พันธุ์ข้าว	relative expression ratio ($2^{-\Delta\Delta_{CT}}$)	
	control (0 μ M)	arsenic treated (50 μ M)
ขาวดอกมะลิ 105	5.3519	7.7342
ไรซ์เบอร์รี่	3.3471	3.6652
กข 6	6.5453	6.7194
หางยี 71	1.0019	2.0301

ตารางผนวกที่ 4 ข้อมูลการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *phytochelatase*

Sample (As mM)	Target	Tm (°C)	Ct SYBR	Mean Ct	Ct Mean Calibrator	2^{-DDCT}	Mean Fold change	S.D.
ข้าวดอกมะลิ105*	PCS	81	23.77225	23.9503	25.69878	8.6006	7.4632	2.168
ข้าวดอกมะลิ105*	PCS	81	23.68054		25.69878	8.8263		
ข้าวดอกมะลิ105*	PCS	81	24.3984		25.69878	4.9629		
ข้าวดอกมะลิ105*	eEF-1a	81	20.54511	20.4713	25.69878			
ข้าวดอกมะลิ105*	eEF-1a	81	20.49077		25.69878			
ข้าวดอกมะลิ105*	eEF-1a	81	20.37801		25.69878			
ข้าวดอกมะลิ105**	PCS	81	25.74165	25.2732	25.69878	5.8563	7.9559	2.053
ข้าวดอกมะลิ105**	PCS	81	24.9434		25.69878	8.0507		
ข้าวดอกมะลิ105**	PCS	81	25.13475		25.69878	9.9607		
ข้าวดอกมะลิ105**	eEF-1a	81	21.96007	21.9001	25.69878			
ข้าวดอกมะลิ105**	eEF-1a	81	21.62094		25.69878			
ข้าวดอกมะลิ105**	eEF-1a	81	22.11943		25.69878			
ไรซ์เบอร์รี่*	PCS	81	25.2729	24.5213	25.69878	1.0786	1.4345	0.490
ไรซ์เบอร์รี่*	PCS	81	24.42563		25.69878	1.2316		
ไรซ์เบอร์รี่*	PCS	81	23.86558		25.69878	1.9935		
ไรซ์เบอร์รี่*	eEF-1a	81	19.05044	18.6581	25.69878			
ไรซ์เบอร์รี่*	eEF-1a	81	18.39458		25.69878			
ไรซ์เบอร์รี่*	eEF-1a	81	18.5293		25.69878			
ไรซ์เบอร์รี่**	PCS	81	24.89111	24.4233	25.69878	3.4395	3.9923	0.803
ไรซ์เบอร์รี่**	PCS	81	24.28307		25.69878	3.6232		
ไรซ์เบอร์รี่**	PCS	81	24.09576		25.69878	4.9142		
ไรซ์เบอร์รี่**	eEF-1a	81	20.34174	20.0705	25.69878			
ไรซ์เบอร์รี่**	eEF-1a	81	19.80878		25.69878			
ไรซ์เบอร์รี่**	eEF-1a	81	20.06115		25.69878			
กข 6*	PCS	81	25.53927	25.3158	25.69878	2.7279	3.1417	1.643
กข 6*	PCS	81	25.5574		25.69878	1.7451		
กข 6*	PCS	81	24.85101		25.69878	4.9521		
กข 6*	eEF-1a	81	20.65549	20.5040	25.69878			
กข 6*	eEF-1a	81	20.02913		25.69878			
กข 6*	eEF-1a	81	20.82748		25.69878			

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

Sample (As mM)	Target	Tm (°C)	Ct SYBR	Mean Ct	Ct Mean Calibrator	2^{-DDCT}	Mean Fold change	S.D.
กข 6**	AR	90	25.27222	24.3099	24.75089	4.1139	6.7194	2.353
กข 6**	AR	90	23.62354		24.75089	8.6923		
กข 6**	AR	90	24.03411		24.75089	7.3522		
กข 6**	eEF-1a	81	21.93432	21.6110	24.75089			
กข 6**	eEF-1a	81	21.36488		24.75089			
กข 6**	eEF-1a	81	21.5339		24.75089			
หางยี่ 71*	AR	90	25.35052	24.7508	24.75089	1.0557	1.0019	0.074
หางยี่ 71*	AR	90	24.54058		24.75089	0.9163		
หางยี่ 71*	AR	90	24.36158		24.75089	1.0338		
หางยี่ 71*	eEF-1a	81	20.05038	19.3725	24.75089			
หางยี่ 71*	eEF-1a	81	19.03602		24.75089			
หางยี่ 71*	eEF-1a	81	19.03109		24.75089			
หางยี่ 71**	AR	90	23.9818	24.0744	24.75089	2.5117	2.0301	0.916
หางยี่ 71**	AR	90	24.46001		24.75089	0.9733		
หางยี่ 71**	AR	90	23.78145		24.75089	2.6053		
หางยี่ 71**	eEF-1a	81	19.93209	19.5864	24.75089			
หางยี่ 71**	eEF-1a	81	19.04263		24.75089			
หางยี่ 71**	eEF-1a	81	19.78452		24.75089			

* ตัวอย่างที่ไม่ได้รับสารหนู (0 μ M)

** ตัวอย่างที่ได้รับสารหนู (50 μ M)

ตารางผนวกที่ 5 ระดับการแสดงออกของยีน *phytochelatase* (relative expression ratio) ในรากข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ได้รับและไม่ได้รับสารหนู

พันธุ์ข้าว	relative expression ratio ($2^{-\Delta\Delta_{CT}}$)	
	control (0 μ M)	arsenic treated (50 μ M)
ขาวดอกมะลิ 105	7.4632	7.9559
ไรซ์เบอร์รี่	1.4345	3.9923
กข 6	3.1417	4.6285
หางยี 71	1.1085	1.2304

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวปรวรัตน์ ปฏิพิพัฒน์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	7 พฤศจิกายน พ.ศ. 2531
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (พ.ศ. 2554)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-
ผลงานนำเสนอ	ตีพิมพ์ในวารสาร Thai Journal of Genetics Vol 7, No 1, 2014 (เมษายน) เรื่อง การโคลนยีน <i>Arsenate reductase</i> และ <i>Phytochelatins synthase</i> ที่ตอบสนองต่อสารหนูใน ข้าวขาวดอกมะลิ 105