บทที่ 4
ผลและอภิปรายผลการวิจัย

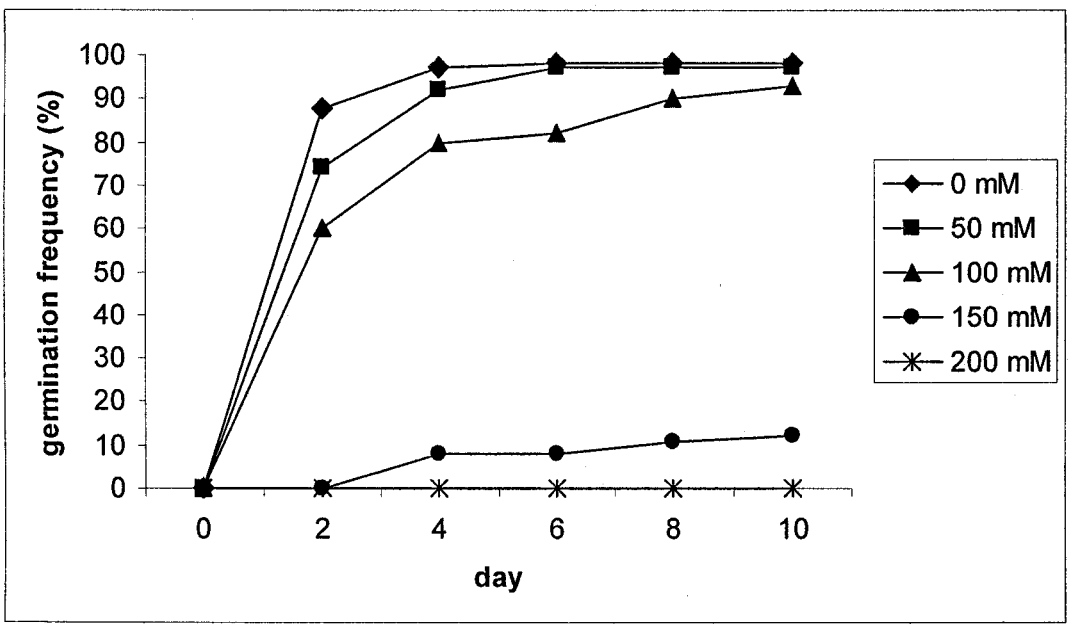
1. ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการงอกและการเจริญของข้าว

ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อความถี่ในการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ KDML 105 แสดงดังตารางที่ 11 และภาพที่ 8 ความถี่ในการงอกจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 150 mM ทำให้ความถี่ในการงอกของข้าวลดลง 8 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวที่ไม่ได้รับความเครียด (โซเดียมคลอไรด์ 0 mM) ยิ่งไปกว่านั้นที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 200 mM พบว่าเมล็ดข้าวไม่สามารถงอกได้ ซึ่งผลที่ได้ให้ผลคล้ายคลึงกับการทดลอง Botia et al. (1998) Cuartero, Fernández-Muñoz (1999) Zapata et al. (2003, 2004) ซึ่งรายงานเกี่ยวกับความเครียดเนื่องจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีผลทำให้การงอกของเมล็ดพืชเกิดช้าลงและทำให้ความถี่ในการงอกลดลงในพืชชนิดต่างๆ

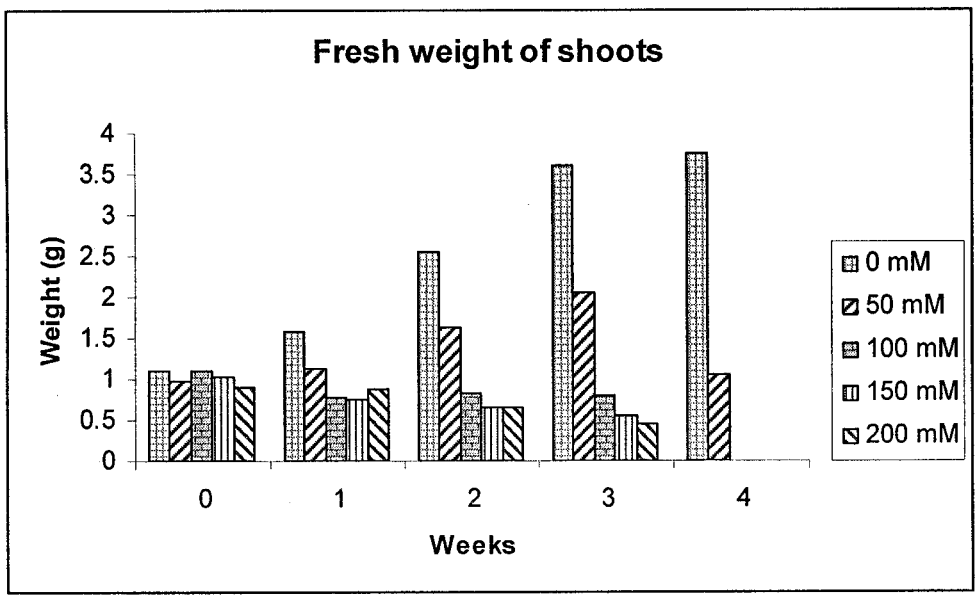
ความเครียดเนื่องจากเกลือไม่เพียงมีผลต่อการงอกเท่านั้นแต่ยังมีผลต่อการเจริญของต้นกล้าอีกด้วย ภาพที่ 9-12 แสดงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งในส่วนยอดและรากของต้นกล้าข้าวที่ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายธาตุอาหารซึ่งจะลดลงประมาณ 4 เท่า และ 2 เท่า ในน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของยอดและรากของต้นข้าวตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่สูงกว่า 100 mM เมื่อทำการทดลองนาน 3 สัปดาห์ ยิ่งไปกว่านั้นต้นกล้าข้าวที่ได้รับความเครียดเนื่องจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100-200 mM นาน 4 สัปดาห์ จะไม่สามารถเจริญได้ ภาพที่ 13-16 แสดงลักษณะของต้นกล้าข้าวที่เปลี่ยนแปลงไปภายหลังจากการได้รับความเครียดเนื่องจากเกลือเป็นเวลานาน 3, 5, 7 และ 9 วัน จากภาพพบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่สูงขึ้นมีผลทำให้ต้นข้าวแคระแกร็น (ใบมีขนาดเล็ก ลำต้นและรากสั้น) ใบข้าวม้วนงอ ใบข้าวแห้งและมีรอยไหม้ ผลที่ได้ให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Ponnamperuma (1984) และ Taniyama (1993) โดยพบว่าการเจริญของข้าวลดลงและเกลือมีความเป็นพิษต่อต้นข้าวเมื่อเพาะต้นข้าวภายใต้สภาวะที่มีการให้เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูง Silva et al. (2003) รายงานถึงความเครียดเนื่องจากความเค็มที่สูงมากจะไปยับยั้งการเจริญของพืช เนื่องจากเกิดความไม่สมดุลของน้ำในพืชและยังเป็นการเพิ่มปริมาณสารอนินทรีย์ในส่วนต่างๆของพืชอีกด้วยโดยจะเพิ่มการสะสมของปริมาณ Na^+ และ Cl^- ลักษณะอาการของต้นกล้าข้าวที่พบในการทดลองครั้งนี้ให้ผลใกล้เคียงกับการรายงานของ Artitya (2000) ซึ่งพบว่าความเค็มมีผลทำให้ใบข้าวเกิดการม้วนงอและใบข้าวจะเปลี่ยนสีจากสีเขียวไปเป็นสีน้ำตาลอ่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่สูงกว่า 100 mM

ตารางที่ 11 ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อความถี่ในการงอกของข้าว

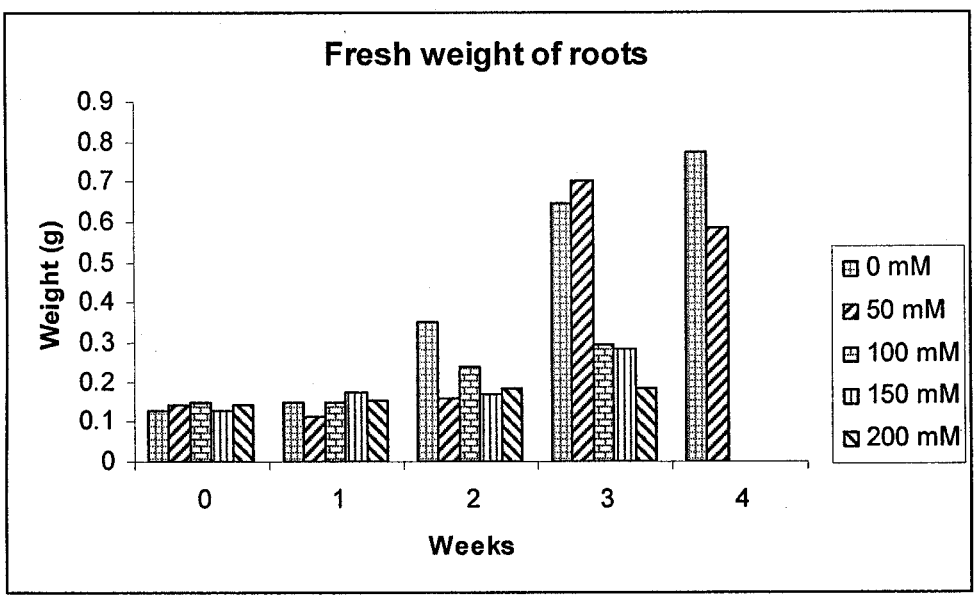
NaCl (mM)	% Germination					
	0-d	2-d	4-d	6-d	8-d	10-d
0	0	88	97	98	98	98
50	0	74	92	97	97	97
100	0	60	80	82	90	93
150	0	0	8	8	11	12
200	0	0	0	0	0	0



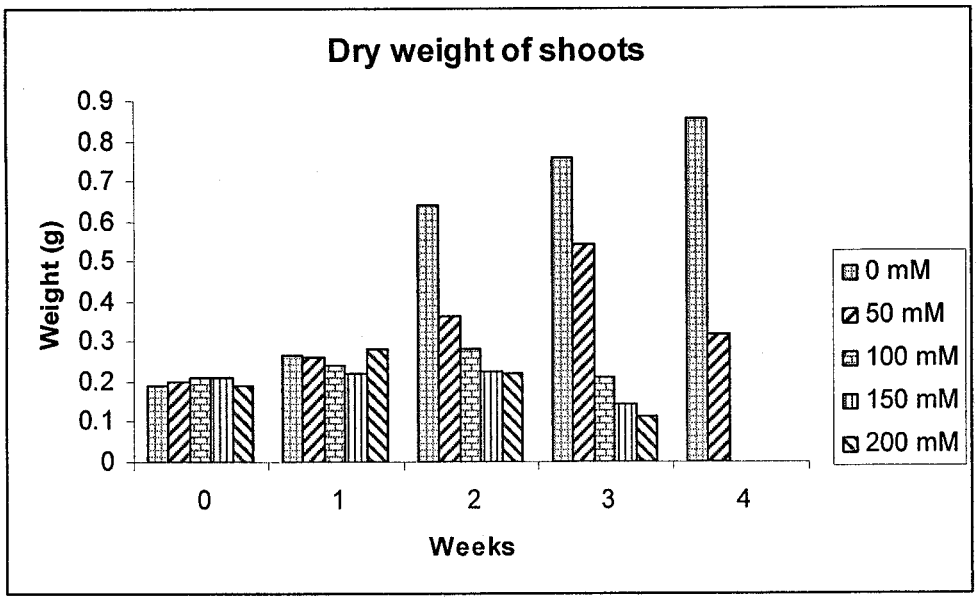
ภาพที่ 8 ผลของความเค็มที่มีต่อความถี่ในการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105



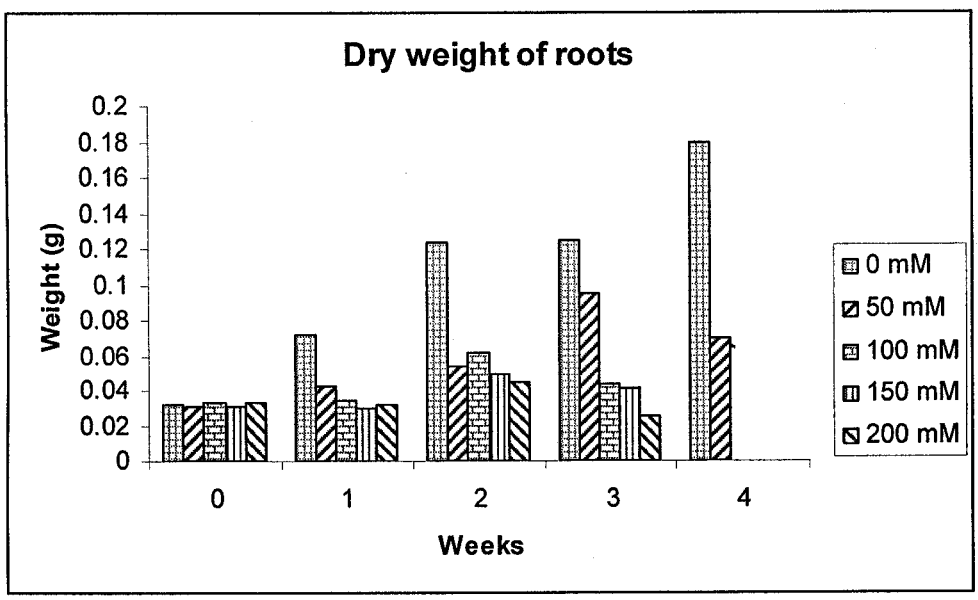
ภาพที่ 9 ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว (โดยการชั่งน้ำหนักสดของยอดของต้นข้าว) ภายหลังจากการให้เกลือที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ กัน



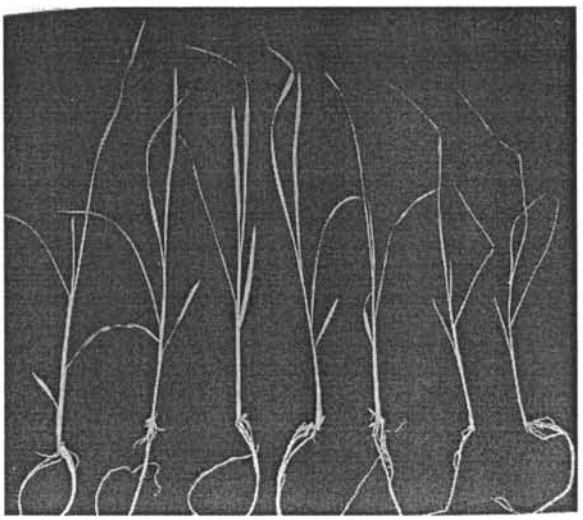
ภาพที่ 10 ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว (โดยการชั่งน้ำหนักสดของรากของต้นข้าว) ภายหลังจากการให้เกลือที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ กัน



ภาพที่ 11 ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว (โดยการชั่งน้ำหนักแห้งของยอดของต้นข้าว) ภายหลังจากการให้เกลือที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ กัน

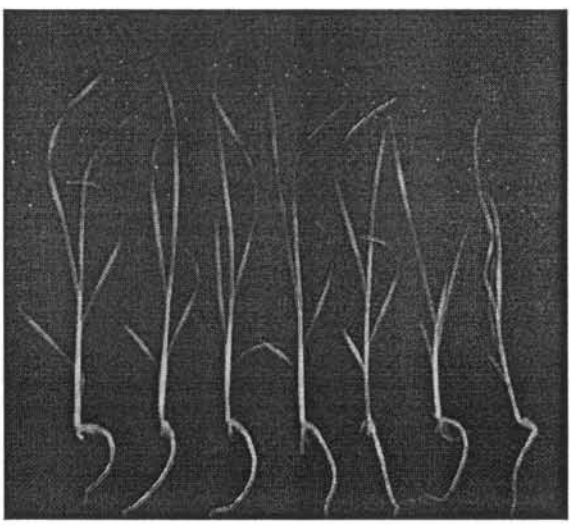


ภาพที่ 12 ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว (โดยการชั่งน้ำหนักแห้งของรากของต้นข้าว) ภายหลังจากการให้เกลือที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ กัน



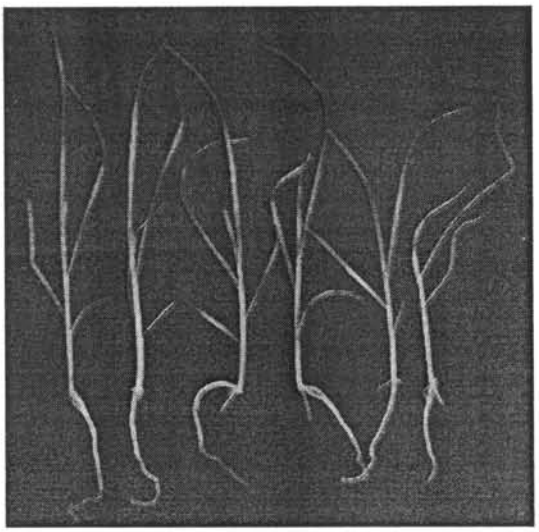
NaCl (mM) 0 25 50 75 100 150 200

ภาพที่ 13 ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อลักษณะของต้นกล้าข้าวภายหลังจากการเพาะในสารละลายธาตุอาหาร นาน 19 วัน และให้เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 25, 50, 75, 100, 150 และ 200 mM เป็นเวลา 3 วัน ตามลำดับ



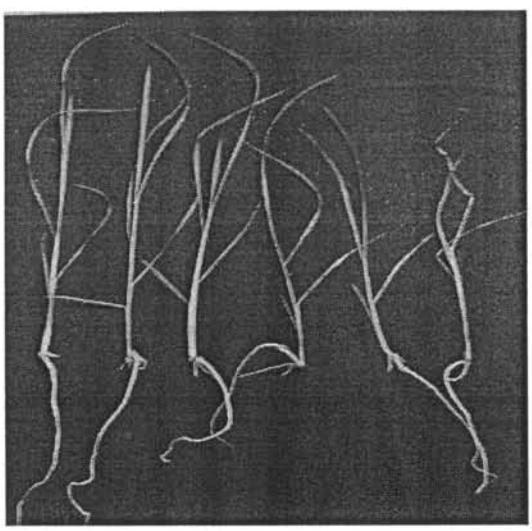
NaCl (mM) 0 25 50 75 100 150 200

ภาพที่ 14 ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อลักษณะของต้นกล้าข้าวภายหลังจากการเพาะในสารละลายธาตุอาหาร นาน 19 วัน และให้เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 25, 50, 75, 100, 150 และ 200 mM เป็นเวลา 5 วัน ตามลำดับ



NaCl (mM) 0 25 50 75 100 150

ภาพที่ 15 ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อลักษณะของต้นกล้าข้าวภายหลังจากการเพาะในสารละลายธาตุอาหาร นาน 19 วัน และให้เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 25, 50, 75, 100, 150 และ 200 mM เป็นเวลา 7 วัน ตามลำดับ



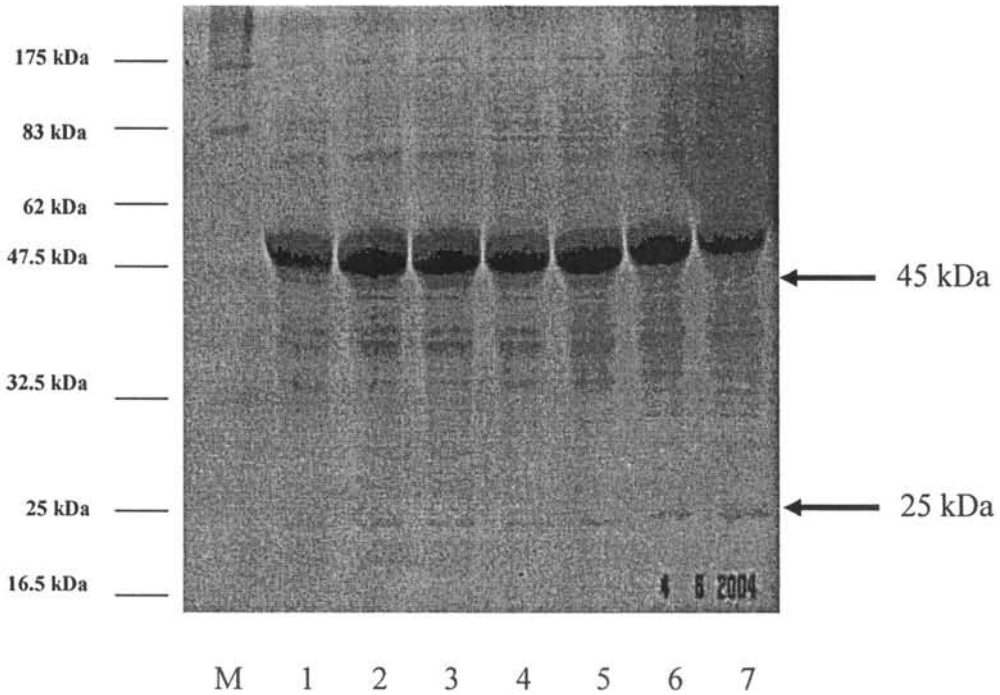
NaCl (mM) 0 25 50 75 100 150

ภาพที่ 16 ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อลักษณะของต้นกล้าข้าวภายหลังจากการเพาะในสารละลายธาตุอาหาร นาน 19 วัน และให้เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 25, 50, 75, 100, 150 และ 200 mM เป็นเวลา 9 วัน ตามลำดับ

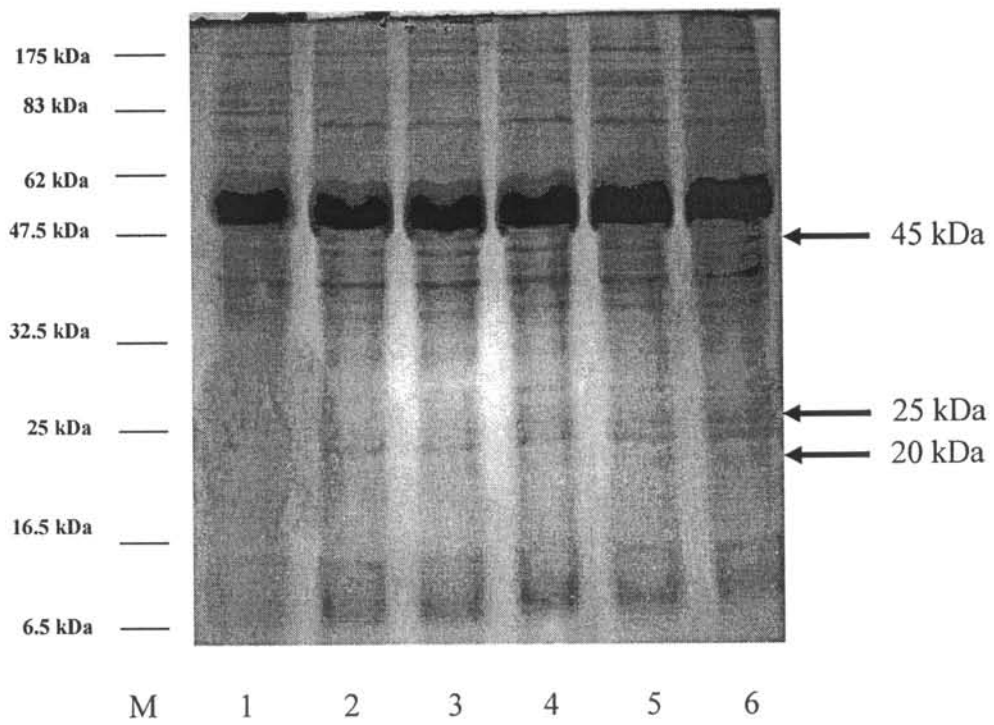
2. ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการสังเคราะห์โปรตีน

ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการสังเคราะห์โปรตีนในต้นกล้าข้าวแสดงดังภาพที่ 17-20 โปรตีนที่สกัดมาจากใบของต้นกล้าข้าวภายหลังจากการให้เกลือที่เวลาต่างๆกัน จะนำมาศึกษาแบบแผนของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS electrophoresis ใน 12% acrylamide gel ผลจากการวิเคราะห์แบบแผนของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่ามีการสังเคราะห์ polypeptide ที่หลากหลาย ในจำนวนนี้มีอย่างน้อย 1 polypeptide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 kDa ปรากฏอยู่ในตัวอย่างของทุกสภาวะที่ทำการทดสอบ การสังเคราะห์ polypeptide ชนิดนี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ จากนั้นทำการตัด polypeptide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 kDa นี้ไปวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N

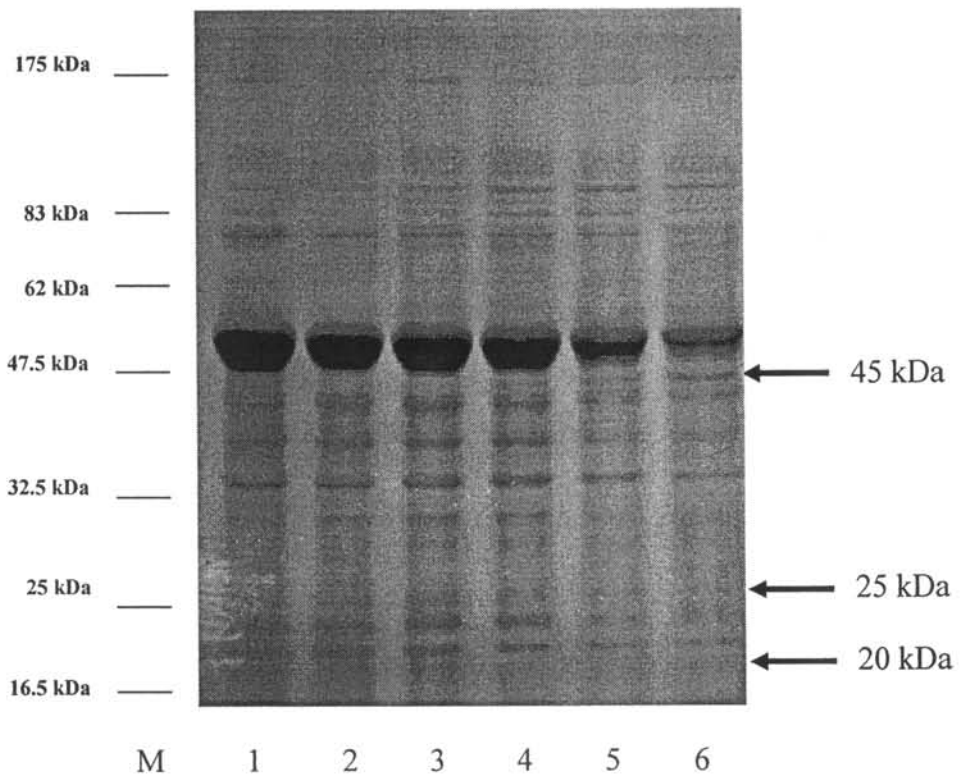
Chourey et al. (2003) ศึกษาผลของความเค็มที่มีต่อการสะสมโปรตีนในระหว่างการเจริญที่ให้ความเค็มกับต้นอ่อนของข้าวสายพันธุ์ Bura Rata ซึ่งมีแถบโปรตีน 6 แถบ จากส่วนยอดหรือ SSPs (salt stress-induced proteins) ปรากฏเด่นชัดประกอบด้วยแถบที่มีขนาด 18.5, 22, 23, 26, 40 และ 46 kDa เมื่อให้ความเครียดเนื่องจากความเค็มเป็นเวลานาน 14 วัน จากแบบแผนโปรตีนที่ได้ 4 แถบใน 6 แถบนี้ประกอบด้วย แถบที่มีขนาด 23, 26, 40 และ 46 kDa สามารถบ่งชี้ได้ว่าเป็น LEA-proteins ในขณะที่อีก 2 แถบที่เหลือไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นโปรตีนชนิดใด Chen et al. (2003) ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อการสังเคราะห์โปรตีนในข้าวสาลี พบว่ามี 1 polypeptide ที่มีขนาดเท่ากับ 43.5 kDa ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ขึ้นภายหลังจากการให้ความเครียดเนื่องจากความเค็ม polypeptide ชนิดนี้เป็นรหัสสำหรับ glycogen synthase kinase-shaggy kinase (*TaGSK1*) และมีค่า pI เท่ากับ 8.66 จากผลที่ได้ทำให้ทราบว่ายีน *TaGSK1* มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดของเกลือในส่วนของ signal transduction



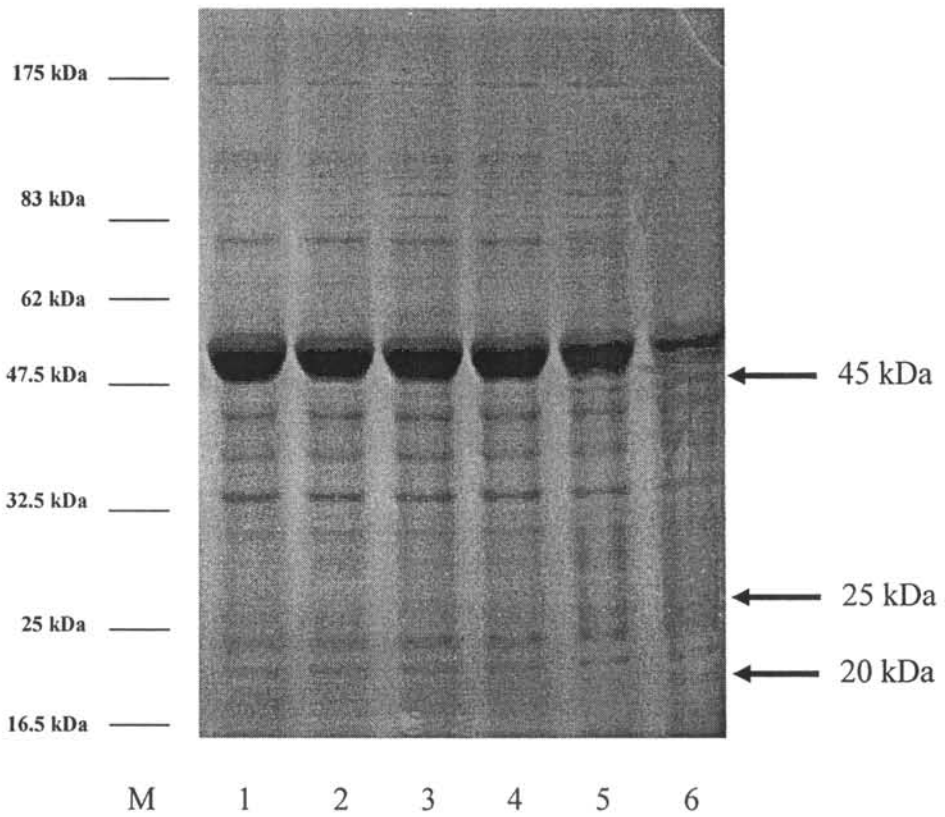
ภาพที่ 17 การวิเคราะห์เปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในต้นกล้าข้าวภายหลังจากการให้เกลือโซเดียมคลอไรด์นาน 3 วัน โดยใช้เทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis Lane M, โปรตีนมาตรฐาน; lane 1, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 0 mM; lane 2, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 25 mM; lane 3, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 50 mM; lane 4, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 75 mM; lane 5, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 100 mM; lane 6, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 200 mM ตามลำดับ



ภาพที่ 18 การวิเคราะห์เปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในต้นกล้าข้าวภายหลังจากการให้เกลือโซเดียมคลอไรด์นาน 5 วัน โดยใช้เทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis Lane M, โปรตีนมาตรฐาน; lane 1, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 0 mM; lane 2, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 25 mM; lane 3, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 50 mM; lane 4, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 75 mM; lane 5, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 100 mM; lane 6, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 200 mM ตามลำดับ



ภาพที่ 19 การวิเคราะห์เปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในต้นกล้าข้าวภายหลังจากการให้เกลือโซเดียมคลอไรด์นาน 7 วัน โดยใช้เทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis Lane M, โปรตีนมาตรฐาน; lane 1, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 0 mM; lane 2, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 25 mM; lane 3, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 50 mM; lane 4, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 75 mM; lane 5, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 100 mM; lane 6, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 200 mM ตามลำดับ



ภาพที่ 20 การวิเคราะห์เปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในต้นกล้าข้าวภายหลังจากการให้เกลือโซเดียมคลอไรด์นาน 9 วัน โดยใช้เทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis Lane M, โปรตีนมาตรฐาน; lane 1, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 0 mM; lane 2, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 25 mM; lane 3, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 50 mM; lane 4, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 75 mM; lane 5, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 100 mM; lane 6, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 200 mM ตามลำดับ

จากการหาลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของ polypeptide ขนาด 45 kDa สามารถแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ดังนี้คือ VSDGSNGRDH และนำไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล ผลการเปรียบเทียบพบว่ามีความคล้ายคลึงอย่างมากกับ polypeptide WRKY protein ในกลุ่มข้าว โดยมีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน เท่ากับ 83% เมื่อเทียบกับ WRKY transcription factor 6 (WRKY6) ของข้าวในกลุ่ม japonica มีรายงานการวิจัยพบว่า WRKY protein เป็น transcription factors ที่มีการค้นพบขึ้นมาใหม่ ที่มีความเกี่ยวข้องกับพืชอีกหลายชนิด (Zhang, Wang, 2005) ยีน *WRKY* อาจจะมีจุดเริ่มต้นมาจากสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต (Ülker, Somssich, 2004) และเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางกายภาพต่อความเครียดจากปัจจัยที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต (Alexandrova, Conger, 2002; Borrone et al., 2004; Wu et al., 2005; Zhang, Wang, 2005)

2.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (oligonucleotide primers)

ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะจากลำดับดีเอ็นเอในส่วนอนุรักษ์ (Conserved region) ของ WRKY transcription factor โดยอาศัยข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล ไพรเมอร์ที่ได้จะนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนตอบสนองต่อความเครียดเนื่องจากความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 รายละเอียดของลำดับไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของยีนโปรตีนตอบสนองต่อความเครียดเนื่องจากความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

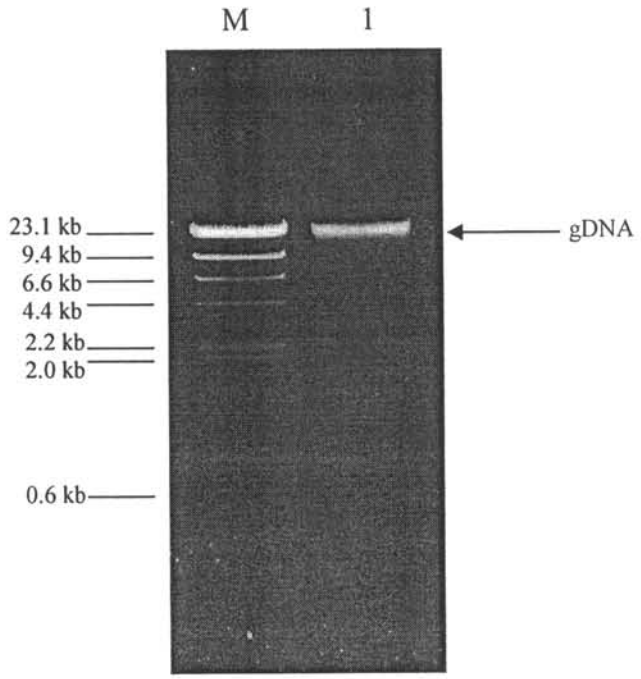
ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาด (เบส)	Tm (^{o}C)
TRFOS1	CAGAATTCGGCCRTCSTGYSSARST	25	64
TRFOS2	ACAAGCTTTGGMWCTTSTYGCTGMT	25	59

โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' (ส่วนที่ขีดเส้นใต้) ของไพรเมอร์ทั้งสองเส้นเป็นตำแหน่งจดจำ (Recognition site) สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Eco*RI และ *Hin*dIII ในขณะที่ R = A/G, S = G/C, Y = C/T, M = A/C และ W = A/T

3. การแยกและศึกษาคุณลักษณะบางประการของยีนควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนตอบสนองต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

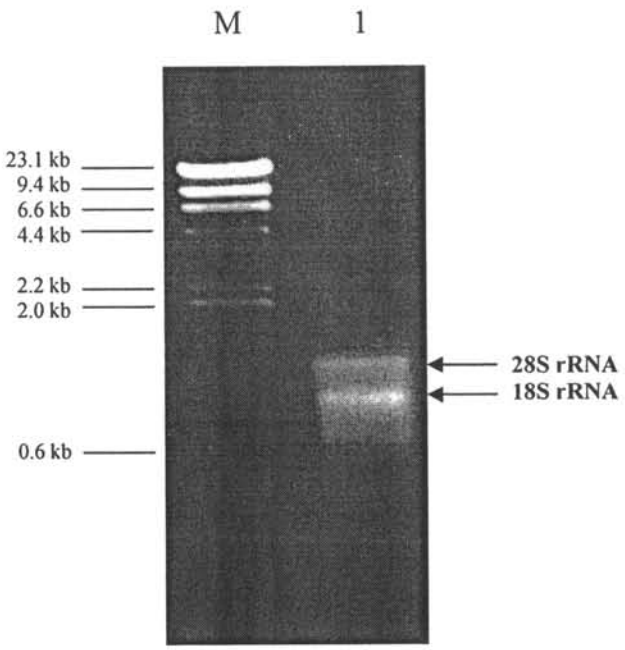
3.1 การแยกสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจากใบข้าว

แยกสกัดดีเอ็นเอรวมจากใบข้าวโดยดัดแปลงวิธีการของ Tugeon et al. (1987) ภายหลังจากการแยกขนาดโดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสใน 1.0% agarose gel และย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 14 kb ดังภาพที่ 21 และมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.39 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร มีค่าอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ OD260 และ OD280 เท่ากับ 1.7 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้มีความบริสุทธิ์สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค southern hybridization ได้ การแยกสกัดอาร์เอ็นเอทำได้โดยใช้ชุดสำเร็จรูป RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) ภายหลังจากการผ่านการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสใน 1.0% agarose gel และย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ จากผลการทดลองที่ได้จะสังเกตเห็นแถบของ 28s rRNA และ 18s rRNA (ภาพที่ 22) อาร์เอ็นเอที่แยกสกัดได้จะนำไปใช้ในการศึกษาถึงการแสดงออกของยีนโปรตีนตอบสนองต่อความเค็มด้วยเทคนิค RT-PCR ต่อไป



ภาพที่ 21 แถบ genomic DNA ที่แยกสกัดได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

Lane M, ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ*Hin*dIII Lane 1, genomic DNA ที่แยกสกัดได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

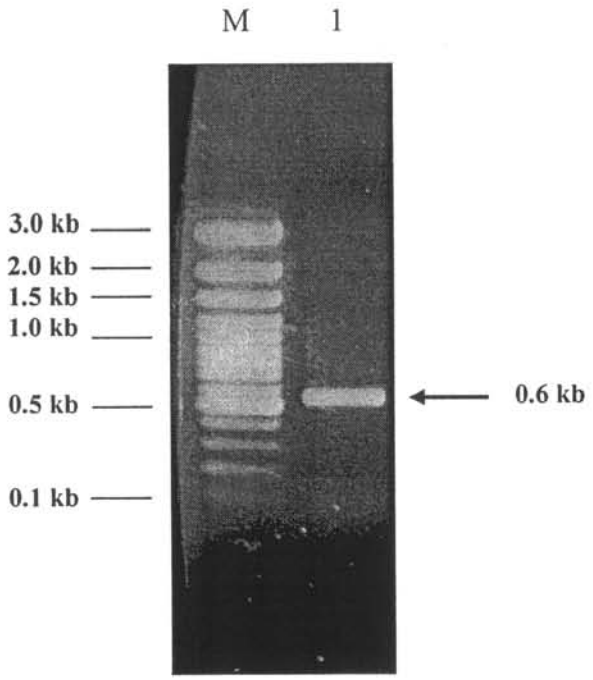


ภาพที่ 22 แถบอาร์เอ็นเอที่แยกสกัดได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

Lane M, ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ*Hin*dIII Lane 1, อาร์เอ็นเอที่แยกสกัดได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แถบของ 28s rRNA และ 18s rRNA ตำแหน่งดังที่ลูกศรชี้

3.2 การเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีนโปรตีนตอบสนองต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

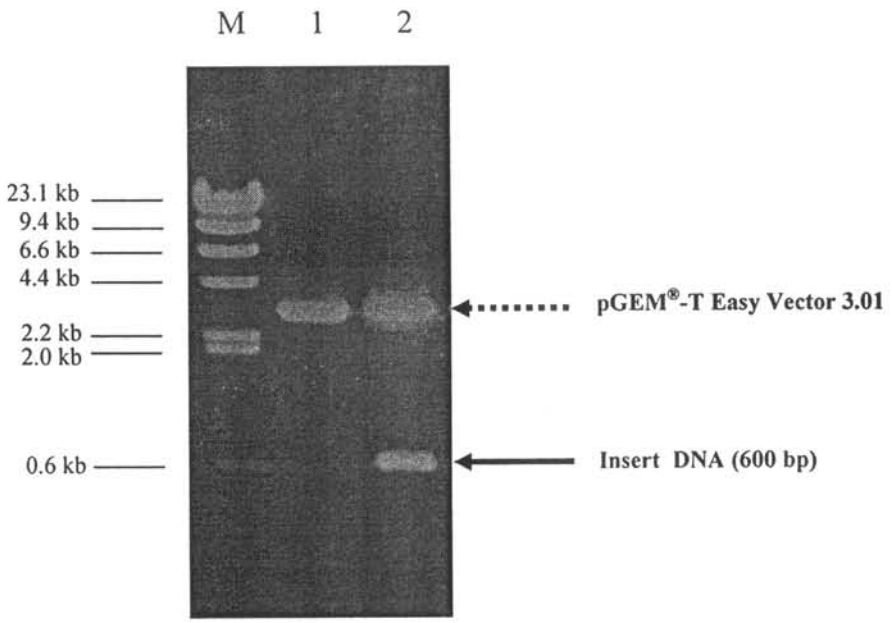
นำ genomic DNA ที่แยกสกัดได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ในการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีนควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนตอบสนองต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ TRFOS1 และ TRFOS2 ซึ่งสังเคราะห์จากลำดับดีเอ็นเอในส่วนอนุรักษ์ (Conserved region) ของยีน *WRKY transcription factor* ภายหลังจากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสโดยใช้ 1% agarose gel พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 600 bp (ภาพที่ 23) ทำให้ชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้ชุดแยกสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIA quick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Germany)



ภาพที่ 23 แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีนควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนตอบสนองต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ TRFOS1 และ TRFOS2 Lane M, ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Lane 1, ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 0.6 kb (แสดงตำแหน่งตามลูกศร)

3.3 การโคลนชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

เชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (600 bp) เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy Vector โดยใช้ชุดสำเร็จรูป QIAGEN PCR Cloning Kit (QIAGEN, German) นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5α โดยใช้ชุดสำเร็จรูป TransformAid™ Bacterial Transformation System (Fermentas, USA) และคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่รับเอาพลาสมิดลูกผสมซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเชื่อมต่ออยู่โดยอาศัยเทคนิค Blue/White selection จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คาดว่าน่าจะรับชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าไปในเซลล์ด้วยวิธี rapid alkaline lysis ผลจากการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำให้เลือกพลาสมิดที่คาดว่าน่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายได้ 1 โคลน ซึ่งพบว่าโคลนนี้มีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 600 bp ให้ชื่อว่า pKD4 จากนั้นนำเอาพลาสมิดดังกล่าวไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ภาพที่ 24 แสดงผลการตัดพลาสมิดจากโคลน pKD4 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI



ภาพที่ 24 แถบพลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากโคลน pKD4 ภายหลังจากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI Lane M, ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ*Hin*dIII Lane 1, ผลการตัดดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy Vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI Lane 2, ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากโคลน pKD4 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ตำแหน่งของดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy Vector และชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายแสดงดังลูกศรเส้นประและลูกศรทึบตามลำดับ

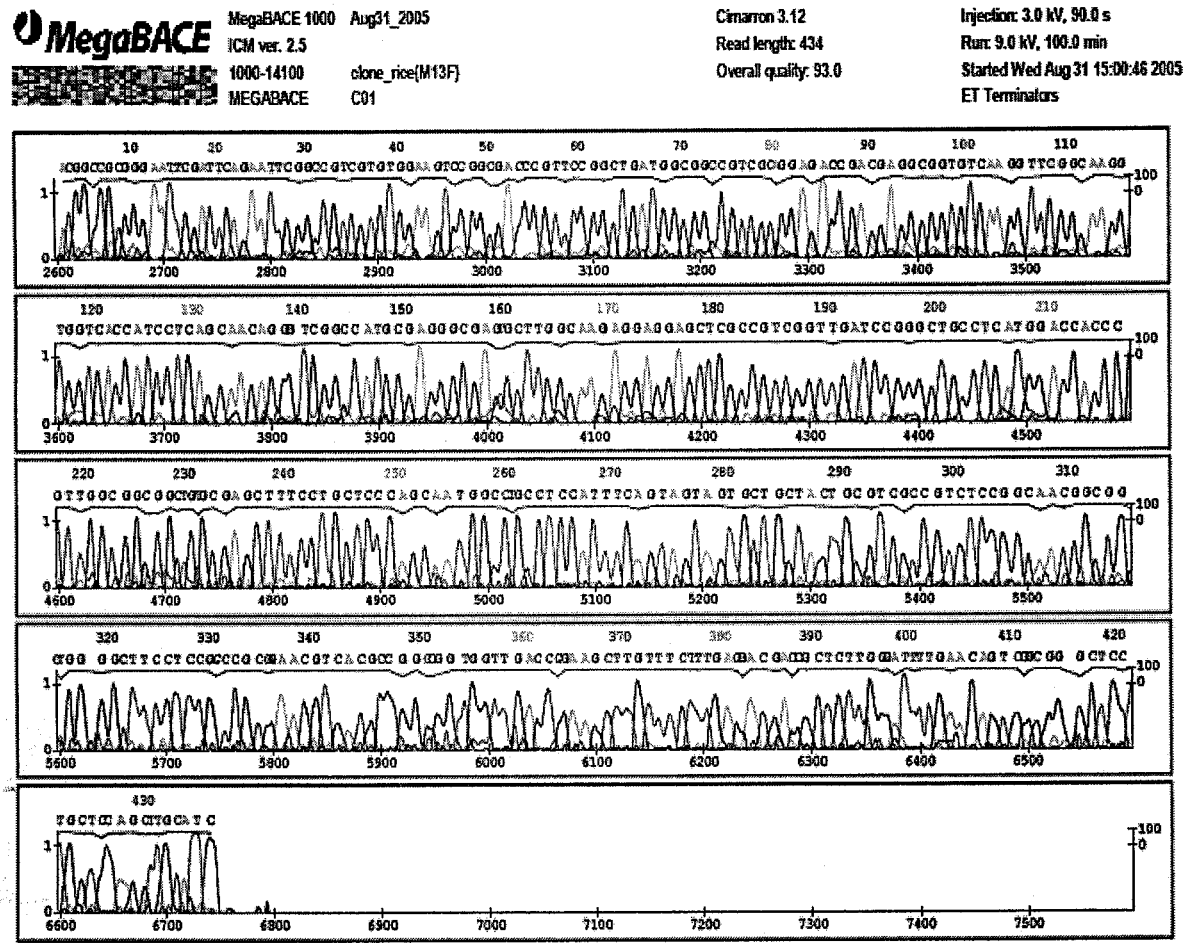
3.4 การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลน pKD4

วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลน pKD4 โดยใช้เครื่อง MegaBACE 1000 automated DNA sequencer (Pharmacia Biotech, Sweden) และใช้ universal primer 2 ชนิด คือ forward primer (5'-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3') และ reverse primer (5'-CAGGAAACAGCTTGAC-3') จากผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความยาวทั้งสิ้น 560-bp ภาพที่ 25 และ 26 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการใช้ forward primer และ reverse primer ตามลำดับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และตำแหน่งของไพรเมอร์จำเพาะ TRFOS1 และ TRFOS2 แสดงดังภาพที่ 27

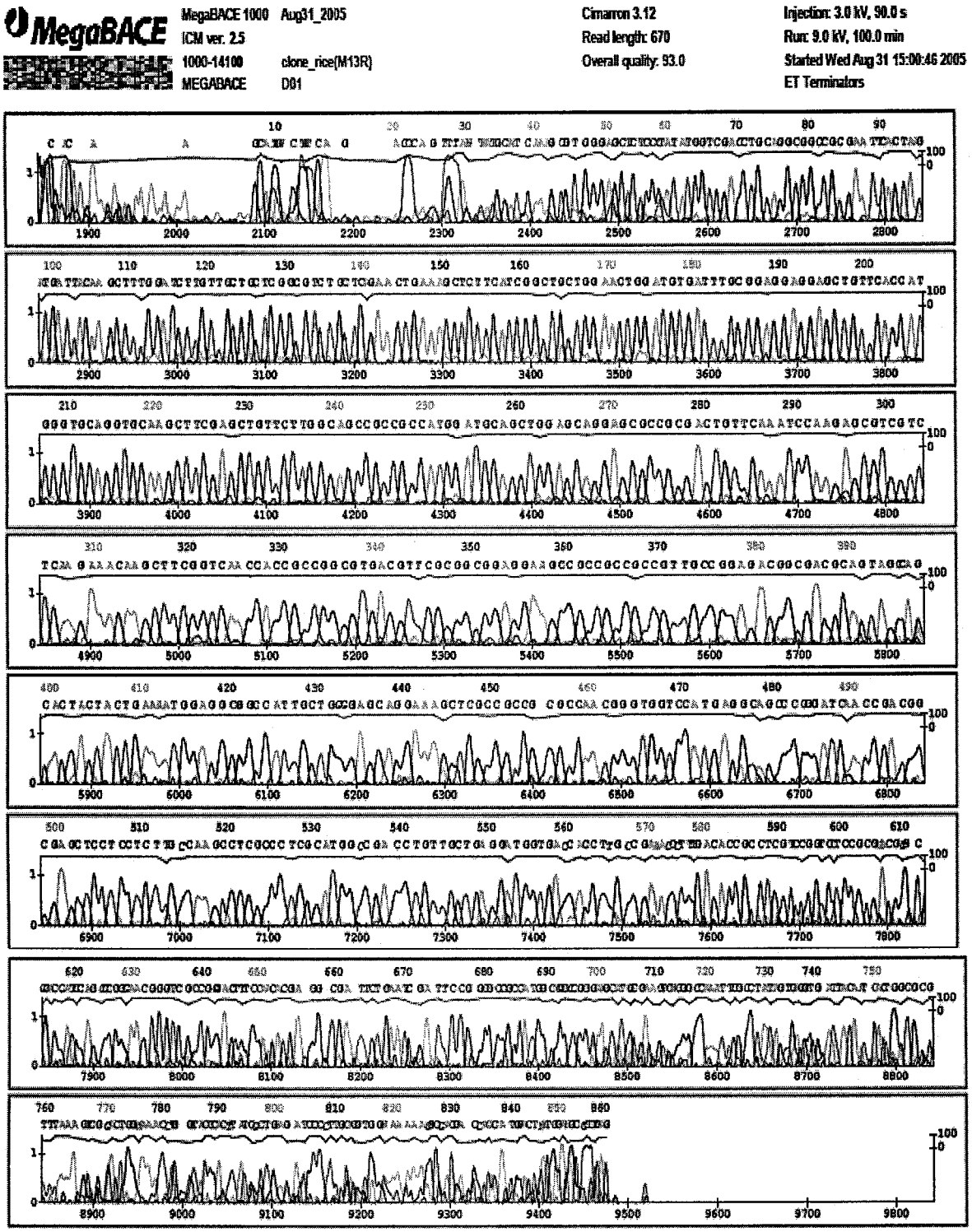
จากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ฐานข้อมูล GenBank (NCBI) พบว่ามีความเหมือนกับยีน *WRKY transcription factor 6* (*WRKY6*) เท่ากับ 96% ในกลุ่มของข้าว japonica จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เป็นดีเอ็นเอเป้าหมายในโคลน pKD4 ที่มีขนาดเท่ากับ 600 bp นั้น เป็นบางส่วนของยีน *WRKY* ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอตรวจติดตามยีนดังกล่าวด้วยเทคนิค Southern hybridization ได้ต่อไป

3.5 การตรวจติดตามการสังเคราะห์ยีนโปรตีนตอบสนองความเครียดเนื่องจากความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิค southern blot hybridization

นำ genomic DNA ที่แยกสกัดจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มาตัดแบบ single digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด คือ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Pst*I และ *Xba*I จากนั้นนำไปแยกขนาดด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส ผ่าน 0.7% agarose gel แสดงดังภาพที่ 28 โดยใช้ชิ้น ดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับ 0.6 kb จากข้างต้นเป็นดีเอ็นตรวจติดตาม ในภาพที่ 29 แสดงแถบปฏิกิริยาภายหลังจากการทำ hybridization โดยดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI, *Pst*I และ *Xba*I มีแถบปฏิกิริยาเกิดขึ้น 1 แถบ ในขณะที่ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII จะพบแถบปฏิกิริยาเกิดขึ้น 2 แถบ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ายีน *WRKY* ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิมี 1-2 copy



ภาพที่ 25 โครมาโตแกรมและลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 600 bp จากโคลน pKD4 เมื่อใช้ universal forward primer แต่ละจุด (peak) ใช้แทนนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด ประกอบด้วย A (สีเขียว), C (สีฟ้า), G (สีดำ) และ T (สีแดง)



ภาพที่ 26 โครมาโตแกรมและลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 600 bp จากโคลน pKD4 เมื่อใช้ universal reverse primer แต่ละจุด (peak) ใช้แทนนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด ประกอบด้วย A (สีเขียว), C (สีฟ้า), G (สีดำ) และ T (สีแดง)

TRFOS1

AGAATTCGGC CGTCGTGTGG AAGTCCGGCG ACCCGTTCCG GCTGATGGCG 50

GCCGTCGCAG GAGACCGACG AGGCGGTGTC AAGGTTCGGC AAGGTGGTCA 100

CCATCCTCAG CAACAGGGTC GGCCATGCGA GGGCGAGTGC TTGGCAAGAG 150

GAGGAGCTCG CCGTCGGTTG ATCCGGGCTG CCTCATGGAC CACCCGTTGG 200

CGGCGGCTGT GCGAGCTTTC CTGCTCCCAG CAATGGCCTG CCTCCATTTC 250

AGTAGTAGTG CTGCTACTGC GTCGCCGTCT CCGGCAACGG CGGCTGGGGC 300

TTCCTCCGGC CGCGGAACGT CACGCCGGCC GGTGGTTGAC CGGAAGCTTG 350

TTTCTTTGAG ACGACGCTCT TGGATTTGAA CAGTCGCGGC GCTCCTGCTC 400

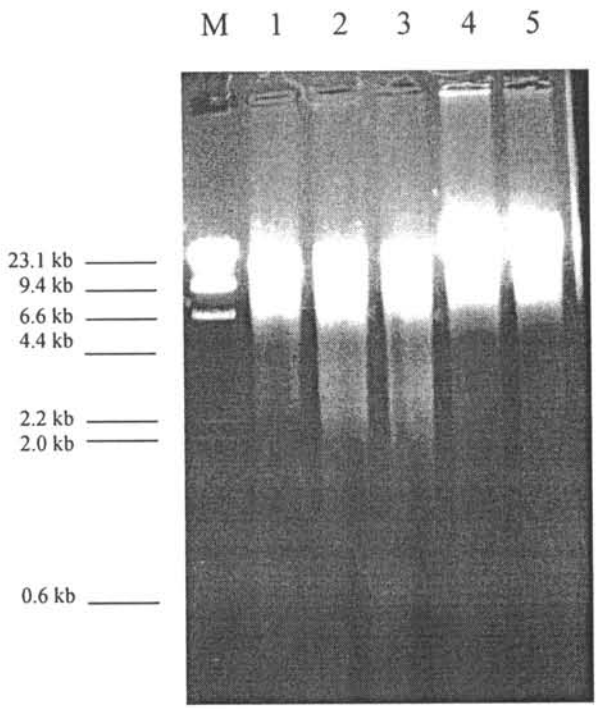
CAGCTGCATC CATGGCGGCG GCTGCCAAGA ACAGCTCGAA GCTTGCACCT 450

GCACCCATGG TGAACAGCTC CTCCTCCGCA AATCACATCC AGTTCCAGCA 500

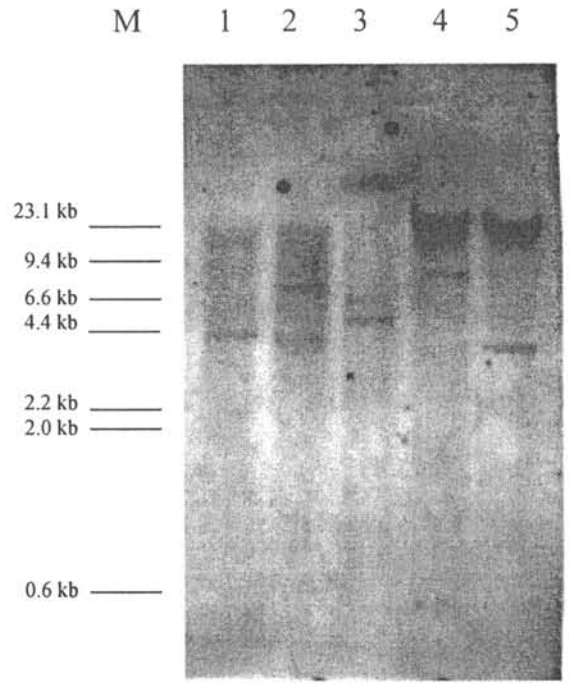
GCCGATGAAG AGCTTTCAGT TCTGAGCAGA CGCCGAGCAG CAACAAGATC 550

CAAAGCTTGT TRFOS2 560

ภาพที่ 27 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 0.6-kb ในโคลน pKD4 และตำแหน่งของไพรเมอร์ TRFOS1 และ TRFOS2



ภาพที่ 28 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิภายหลังจากการตัดแบบ single digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Lane M, ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ*Hin*dIII Lane 1, genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI Lane 2, genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI Lane 3, genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII Lane 4, genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I Lane 5, genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I



ภาพที่ 29 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิที่เกิดปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่น (hybridization pattern) กับดีเอ็นเอตรวจติดตามภายหลังจากการตัดแบบ single digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Lane M, ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ*Hin*dIII Lane 1, genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI Lane 2, genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI Lane 3, genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII Lane 4, genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I Lane 5, genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I

3.6 การโคลนและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *WRKY* ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ภายหลังจากวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 0.6-kb แล้วพบว่ามีความเหมือนกับยีน *WRKY transcription factor* ของข้าวที่มีรายงานในฐานข้อมูลแล้วนั้นทางผู้วิจัยได้สังเคราะห์ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบมาจากส่วน 5' และ 3' coding regions ของยีนดังกล่าวเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *WRKY* ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ไพรเมอร์จำเพาะดังกล่าวได้แก่ Os WRKY4 และ Os WRKY5 รายละเอียดของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะแสดงในตารางที่ 13 ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1.5-kb (ภาพที่ 30) ทำการสกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ให้

บริสุทธิ์และเชื่อมต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy Vector และถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5α ตามวิธีที่ได้อธิบายในส่วนของวัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษาวิจัย ทำการคัดเลือกโคโลนีโดยใช้เทคนิค blue/white selection พบว่าสามารถเลือกโคลนที่คาดว่าน่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายได้ทั้งหมด 11 โคโลนี (ภาพที่ 31) ภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำการเลือกโคลนที่น่าสนใจมา 1 โคลนและให้ชื่อว่า pKDSS5 ภาพที่ 32 แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอของโคลน pKDSS5 (Lane4) ภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน pKDSS5 โดยใช้เครื่อง MegaBACE 1000 automated DNA sequencer (Pharmacia Biotech, Sweden) พบว่าส่วนของ open reading frame สำหรับยีน *WRKY* มีความยาวทั้งสิ้นเท่ากับ 1,552 นิวคลีโอไทด์ ลำดับนิวคลีโอไทด์จากจุดเริ่มต้น ATG จนถึงจุดสิ้นสุด TGA แสดงดังภาพที่ 33 ซึ่งสามารถถอดรหัสได้เป็นกรดอะมิโนทั้งสิ้น 380 ตัว ดังภาพที่ 34 ค่าคาดคะเนน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่วิเคราะห์ได้มีค่าประมาณ 39,870.57 Daและมีค่าคาดคะเน pI ประมาณ 9.74

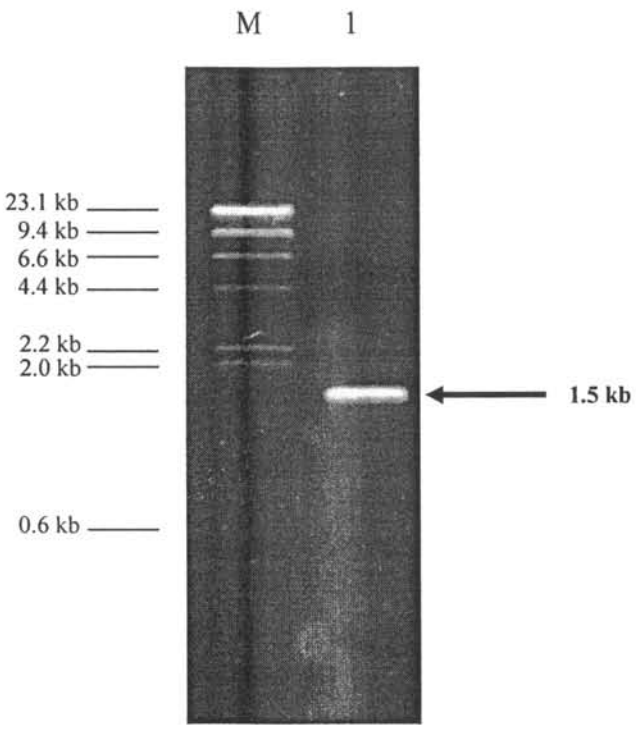
มีงานวิจัยอีกมากที่ศึกษาเกี่ยวกับยีนที่เป็นรหัสของ transcription factor proteins ในพืชหลายๆ ชนิด เช่น Shen et al. (2003) รายงานว่ายีน *TαDREB1* ในข้าวสาลีถูกเหนี่ยวนำให้มีการสร้างขึ้นเมื่อมีอุณหภูมิต่ำ ความเค็ม และสภาวะขาดน้ำ สามารถคาดคะเนน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้เท่ากับ 30.3 kDa Wang et al. (2003) พบว่ายีน *OsbHLH1* ที่เป็นรหัสสำหรับ polypeptide สามารถคาดคะเนน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้เท่ากับ 42 kDa สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้างขึ้นในส่วนของรากของต้นกล้าข้าวในสภาวะที่ได้รับความเครียดเนื่องจากความเย็นแต่ไม่ใช่ความเครียดเนื่องจากเกลือ NaCl การให้สาร PEG และการให้สาร ABA

Lee et al. (2004) ศึกษาการแสดงออกของยีน Dehydration 1 ในข้าว (*OsDhn1*) ที่เป็นรหัสสำหรับโปรตีนที่สามารถคำนวณค่าน้ำหนักโมเลกุลได้ 31 kDa และมีค่า pI เท่ากับ 5.79 ซึ่งยีนนี้จะถูกเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนขึ้นโดยความเครียดเนื่องจากการขาดน้ำ อย่างไรก็ตามยีนชนิดนี้จะมีการแสดงออกเพียงชั่วคราวเท่านั้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเครียดเนื่องจากความเย็นหรือความเค็ม Gu et al. (2005) ทำการแยก dual-specificity protein kinase ซึ่งเป็นรหัสสำหรับ Ser/Thr/Tyr kinase จากข้าวให้ชื่อว่า *OsDPK1* (*Oryza sativa* Dual-specificity Protein Kinase), *OsDPK2, OsDPK3* และ *OsDPK4* โปรตีนชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 45.9, 46.8, 47.6 และ 46.5 kDa ตามลำดับ จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนดังกล่าวพบว่าระดับการถอดรหัส (transcription levels) ของยีน *OsDPK1-3* ถูกเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ขึ้นมาอย่างมีนัยสำคัญโดยการกระตุ้นจาก ABA ความเข้มข้นของเกลือในระดับสูง การขาดน้ำหรือเมื่อพืชมีอาการเหี่ยว จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ายีนที่ได้กล่าวมานี้อาจจะเป็นยีนที่เป็น family ใหม่ในข้าวที่เป็นรหัสสำหรับ dual-specificity protein kinase ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของพืชต่อความเครียดเนื่องจากปัจจัยที่ไม่มีและมีชีวิต

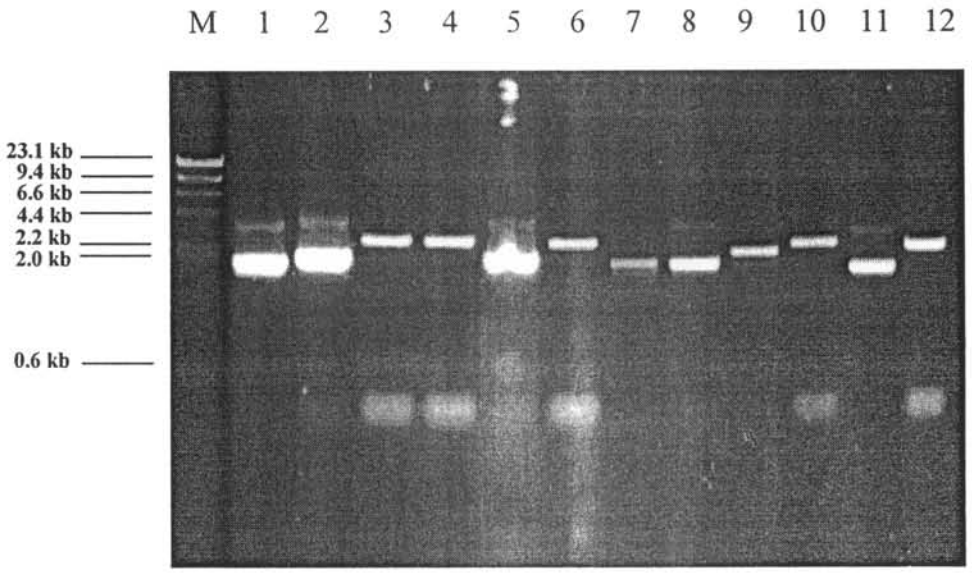
ตารางที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *WRKY* ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาด (เบส)	Tm (^{o}C)
Os WRKY4	CAGGATCCATGGATGGGTGGAGGA	25	80
Os WRKY5	ACGAATTCTCAGGTCTGGGGATTAG	25	74

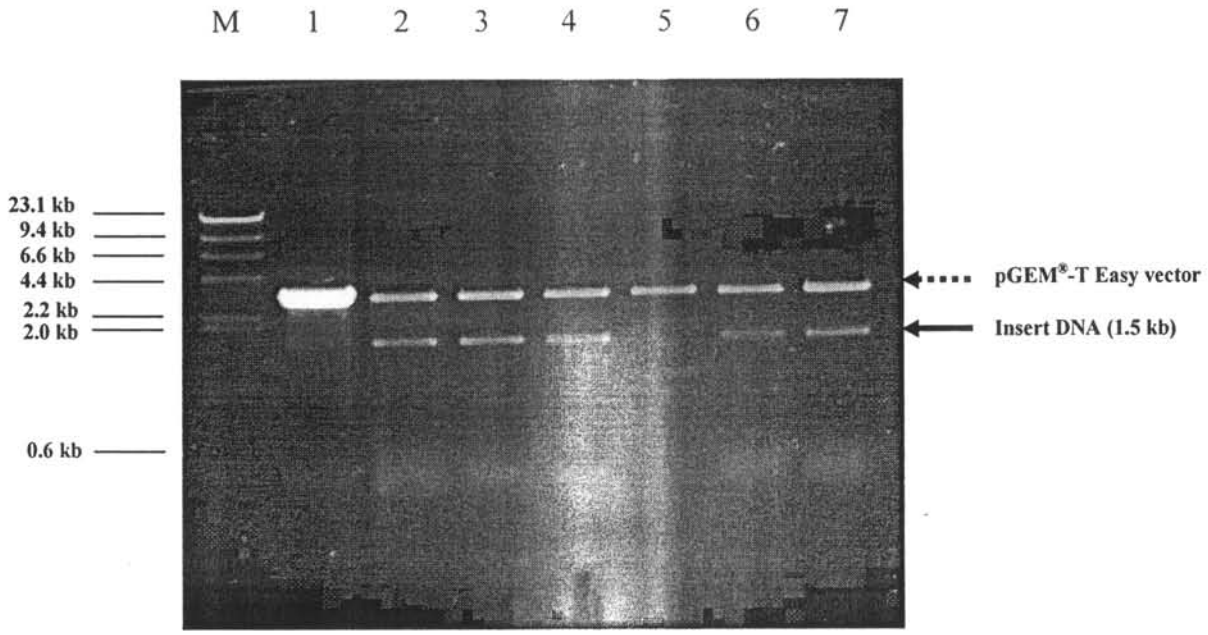
ส่วนที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณที่ตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (GAATTC) และ *Bam*HI (GGATCC) ที่ตำแหน่งปลาย 5'



ภาพที่ 30 แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ Os WRKY4 และ Os WRKY5 Lane M, ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ*Hin*dIII Lane 1, ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 1.5kb

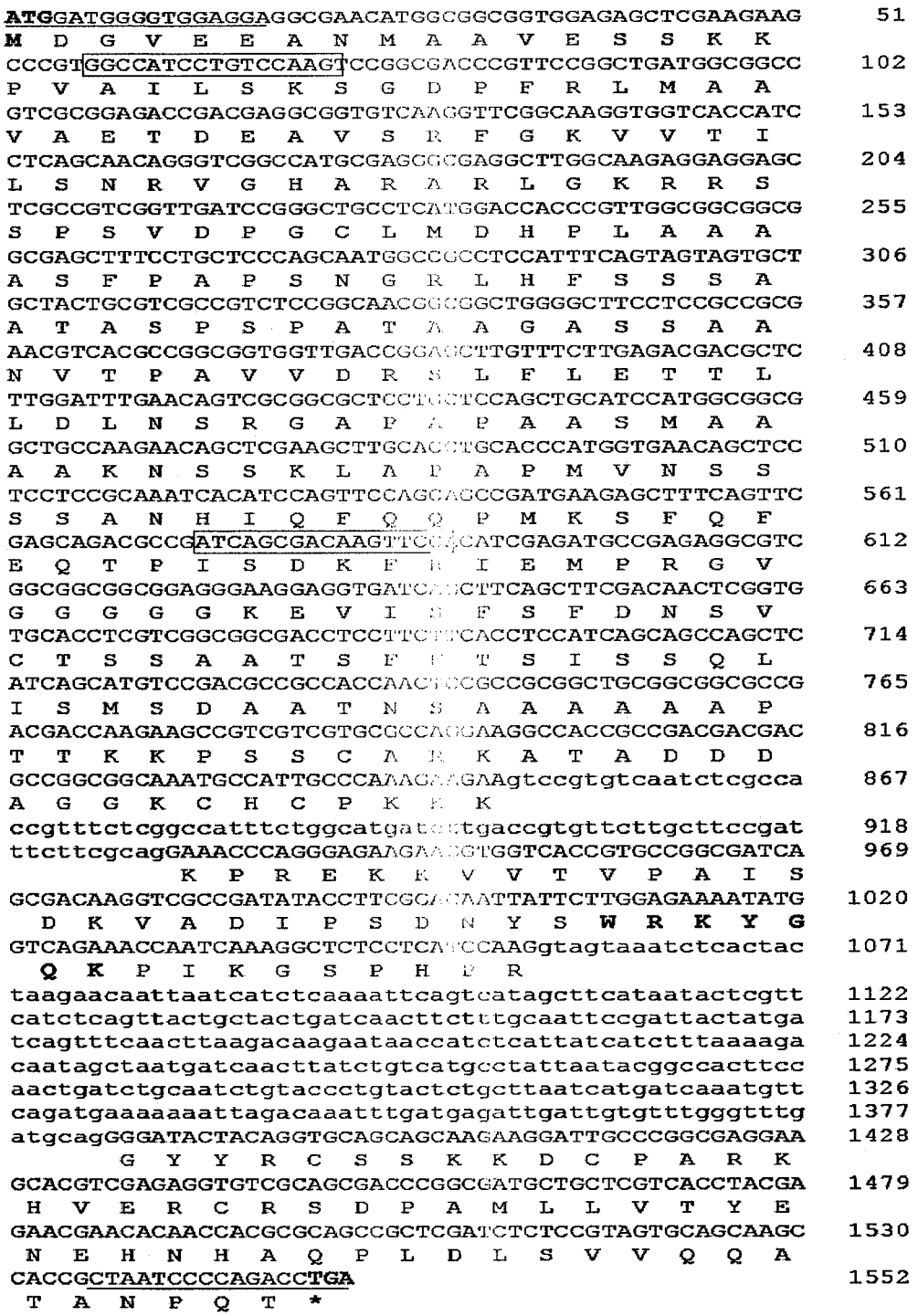


ภาพที่ 31 แถบพลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากโคโลนีสีขาวซึ่งคาดว่าน่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่บนโมเลกุลของพลาสมิด Lane M, ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ*Hin*dIII Lane 1, ดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy Vector Lane 2-12, พลาสมิดดีเอ็นเอซึ่งคาดว่าน่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่บนโมเลกุลของพลาสมิด



ภาพที่ 32 แถบพลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากโคโลนีสีขาวภายหลังจากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI Lane M, ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ*Hin*dIII Lane 1, ดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy Vector Lane 2-7, พลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากโคโลนีสีขาว (positive clone) ภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (โคลนที่ 2, 3, 5, 8, 9, และ 11 ตามลำดับ)

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *WRKY* ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบตำแหน่งของ *WRKY* domain 1 ตำแหน่ง (ภาพที่ 35) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *WRKY transcription factors 6* ในข้าวกลุ่ม japonica (Xie et al., 2005) โดยทั่วไป *WRKY* family จะมีโปรตีนที่เป็นส่วนอนุรักษ์ของ *WRKY* domain เพียง 1 หรือ 2 domain โดยอาศัยส่วนของ hallmark heptapeptide WRKYGQK ที่ปลาย N และโครงสร้าง zinc-finger ที่แตกต่างจากลักษณะของ zinc-finger อื่นๆที่ทราบกันแล้ว ซึ่งจะมี potential zinc ligands (C-X_{4-5}-C-X_{22-23}-H-X_1-H) เป็นตัวแบ่งแยก (Eulgem et al., 2000) ยีน *WRKY* จากข้าวและ *Arabidopsis* ถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มพร้อมกับ subgroup อื่นๆ (Eulgem et al, 2000; Wu et al., 2005) โปรตีน *WRKY* ประกอบด้วย *WRKY* domain 2 แห่ง ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 (group I) ในขณะที่โปรตีนส่วนใหญ่จะมี *WRKY* domain 1 แห่ง และจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 (group II) (Eulgem et al., 2000)



ภาพที่ 33 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ *WRKY transcription factors 6* ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กรอบสี่เหลี่ยมแทนตำแหน่งของไพรเมอร์ TRFOS1 และ TRFOS2 ตามลำดับ ขีดเส้นใต้แทนตำแหน่งของไพรเมอร์ Os WRKY4 และ Os WRKY5

```
MDGVEEANMA AVESSKKPVA ILSKSGDPFR LMAAVAETDE AVSRFGKVVT 50
ILSNRVGHAR ARLGKRRSSP SVDPGCLMDH PLAAAASFPA PSNGRLHFSS 100
SAATASPSPA TAAGASSAAN VTPAVVDRSL FLETTLLDLN SRGAPAPAAS 150
MAAAAKNSSK LAPAPMVNSS SSANHIQFQQ PMKSFQFEQT PISDKFHIEM 200
PRGVGGGGGK EVISFSFDNS VCTSSAATSF FTSISSQLIS MSDAATNSAA 250
AAAAPTTKKP SSCARKATAD DDAGGKCHCP KKKKPREKKV VTVPAISDKV 300
ADIPSDNYSW RKYGQKPIKG SPHPRGYYRC SSKKDCPARK HVERCRSDPA 350
MLLVTYENEH NHAQPLDLSV VQQATANPQT                       380
```

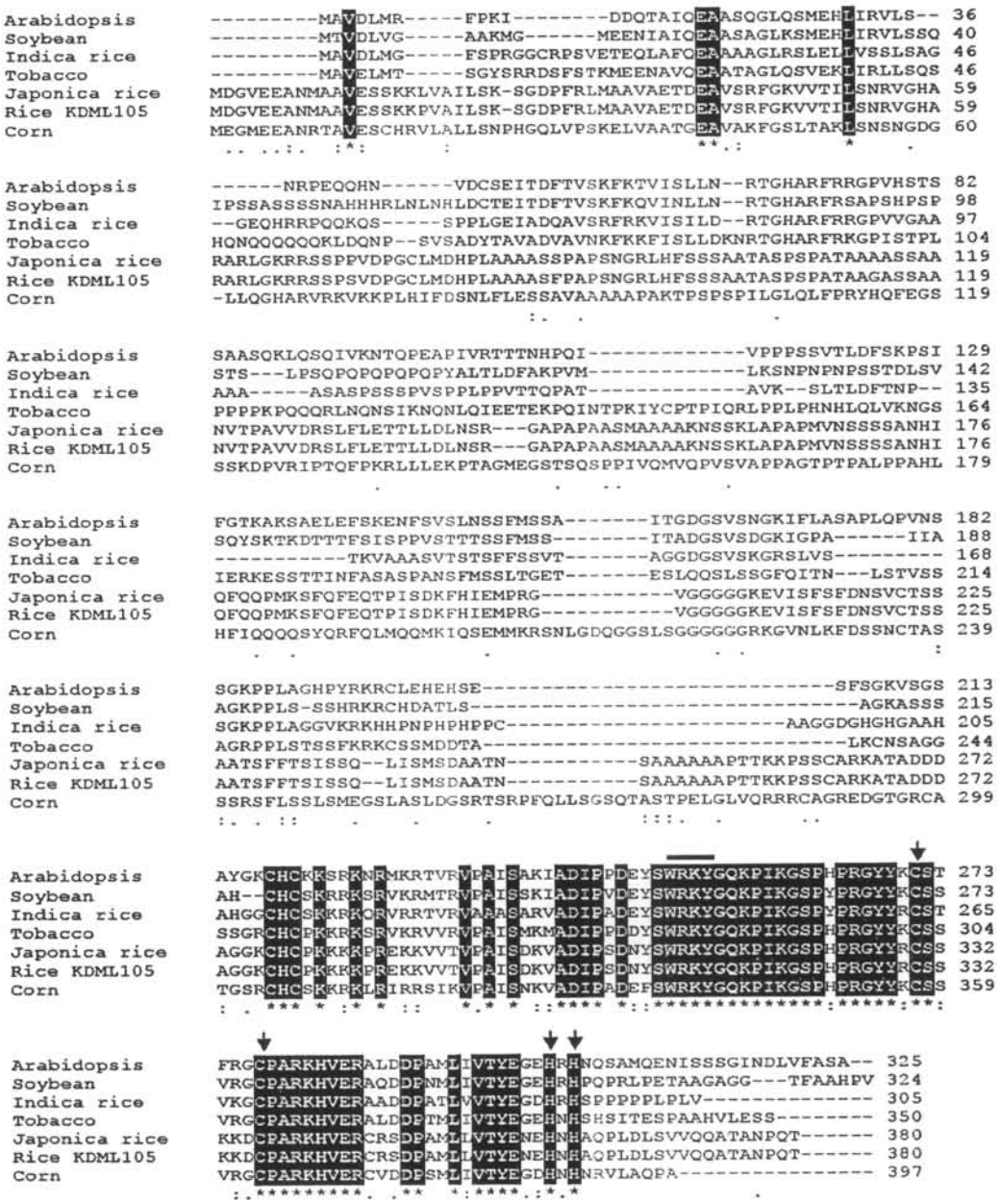
ภาพที่ 34 ลำดับกรดอะมิโนของยีน *WRKY* ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ภาพที่ 35 แผนที่แสดง *WRKY* domain ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTP)

ลำดับกรดอะมิโนของ *WRKY* gene-encoded polypeptide ที่วิเคราะห์ได้ ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่อนำไปเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนและคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *WRKY* ข้าวกลุ่มอื่น พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีน *WRKY transcription factors 6* ในข้าวกลุ่ม japonica คิดเป็น 98% คล้ายคลึงกับยีน *WRKY transcription factors 11* ใน *Arabidopsis thaliana* คิดเป็น 72% คล้ายคลึงกับยีน *WRKY65* ในถั่วเหลือง (*Glycine max*) คิดเป็น 70% คล้ายคลึงกับยีน *WRKY1* ในข้าวโพด (*Zea mays*) คิดเป็น 69% คล้ายคลึงกับยีน*WRKY transcription factors NtEIG-D48* ในต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) คิดเป็น 67% และมีความคล้ายคลึงกับยีน *WRKY transcription factors 44* ในข้าวกลุ่ม indica (ตารางที่ 14 และ ภาพที่ 36)

ตารางที่ 14 การเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนระหว่าง *WRKY transcription factors 6* จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับ WRKY transcription factor สิ่งมีชีวิตอื่น

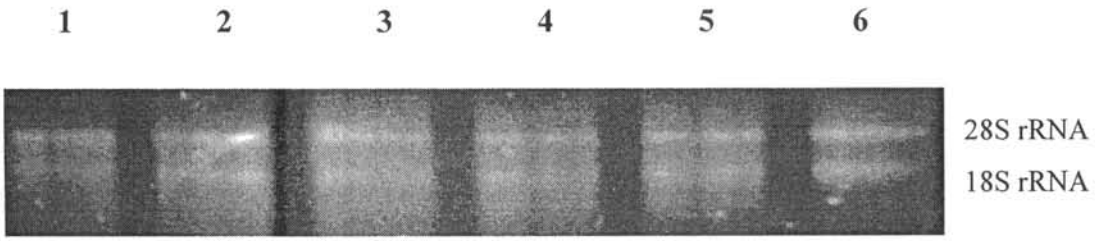
Organisms	% identity	% similarity
Rice [*O. sativa* (japonica cultivar-group)], *WRKY transcription factor 6*	98	98
Arabidopsis thaliana, *WRKY transcription factor 11*	72	80
Soybean (*Glycine max*), *WRKY65*	70	82
Corn (*Zea mays*), *WRKY1*	69	83
Tobacco (*Nicotiana tabacum*), *WRKY transcription factor NtEIG-D48*	67	79
Rice [*O. sativa* (indica cultivar-group)], *WRKY transcription factor 44*	67	78



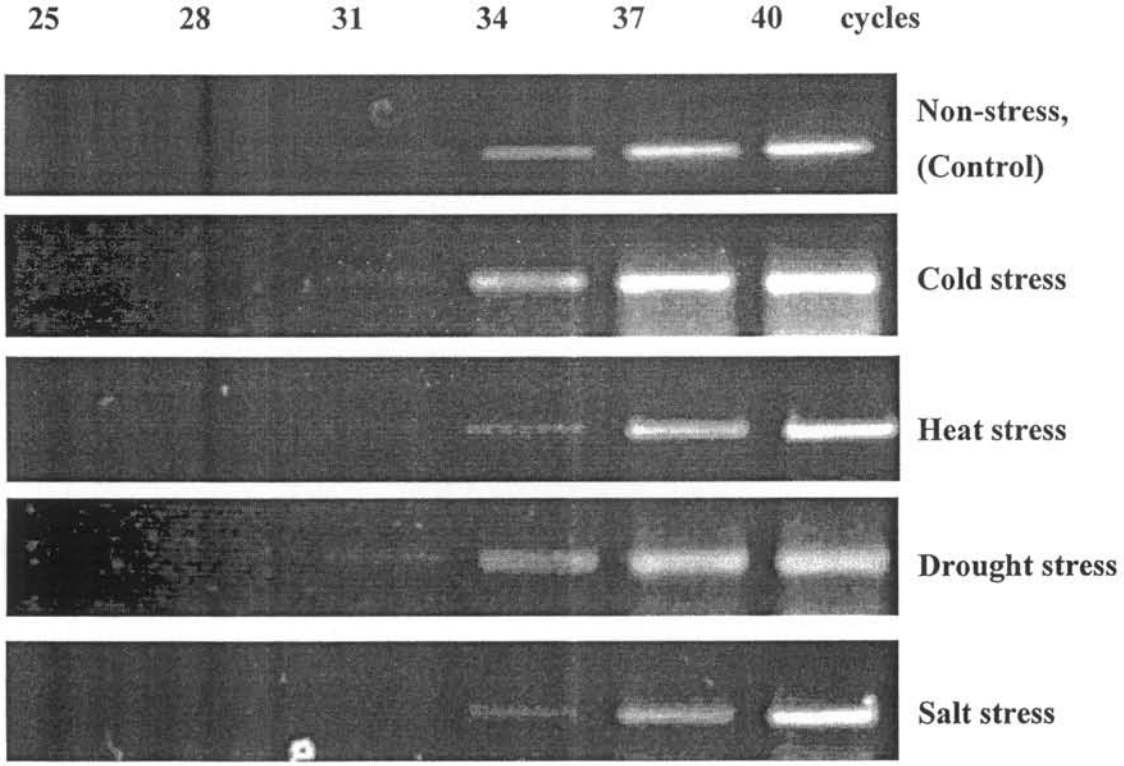
ภาพที่ 36 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน (Multiple alignment) ระหว่าง *WRKY transcription factors* ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับโปรตีนที่เกี่ยวข้องการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน *WRKY transcription factors* ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยเทียบกับ *A. thaliana* ถั่วเหลือง (*G. max*) ต้นยาสูบ (*N. tabacum*) ข้าวกลุ่ม indica ข้าวโพด (*Z. mays*) บริเวณสีดำเป็นส่วนอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโน ส่วนของ WRKY อยู่ใต้เส้น; ลำดับกรดอะมิโนของ zinc ligand แทนด้วยลูกศร วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CLUSTAL W version 1.82

4. การศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีนตอบสนองต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ภายใต้สภาวะความเครียดต่าง ๆ ด้วยเทคนิค RT-PCR

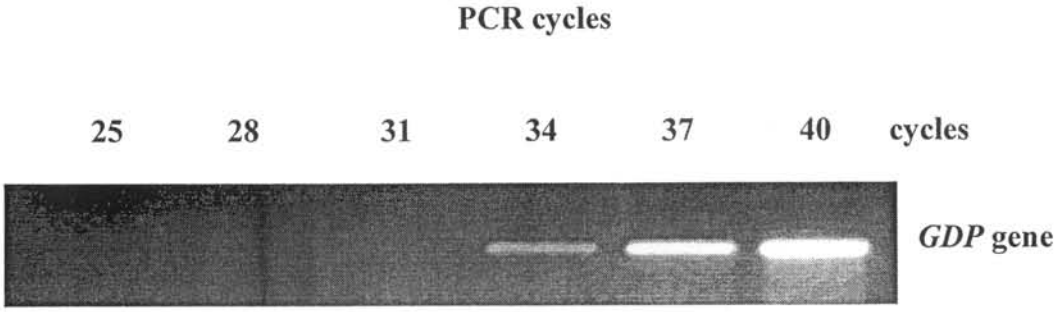
Seki et al. (2002) ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน WRKY และพบว่าโปรตีนดังกล่าวนี้สามารถชักนำให้มีการแสดงออกได้ภายใต้สภาวะต่างๆ เช่น การขาดน้ำ ความเค็ม ความเย็น และความร้อน ดังนั้นจึงได้ทดสอบการแสดงออกของยีนดังกล่าวนี้ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ภายใต้สภาวะความเครียดต่างๆ ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้อาร์เอ็นเอที่สกัดจากต้นกล้าข้าวที่ได้รับความเครียดต่างๆ ดังนี้คือ สภาวะความเครียดเนื่องจากความเย็น (Wang et at. 2003) ความเครียดเนื่องจากความร้อน (Igarashi et al., 1997) ความเครียดเนื่องจากการขาดน้ำ (Shen et al., 2003) และความเครียดเนื่องจากความเค็ม ใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยาโดยใช้ชุดสำเร็จรูป One Step RT-PCR Kit (QIAGEN, Germany) และใช้ไพรเมอร์จำเพาะ TRFOS1 และ TRFOS2 เปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่แต่ละรอบของการทำพีซีอาร์ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงระดับการแสดงออกของยีน *WRKY* ที่เกิดขึ้น แสดงดังภาพที่ 37 ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (1.0% agarose gel) และย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์แสดงดังภาพที่ 38 ใช้ระดับการแสดงออกของยีน *Lentinus polychrous GDP* เป็นชุดควบคุมสำหรับการทำเทคนิค RT-PCR (ภาพที่ 39) ผลจากการทำ RT-PCR พบแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *WRKY* ขนาด 600 bp เกิดขึ้นในทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบ อย่างไรก็ตามเมื่อข้าวได้รับความเครียดเนื่องจากความเย็นและความเครียดเนื่องจากการขาดน้ำจะมีระดับการแสดงออกของยีนที่มากกว่าเมื่อเทียบกับข้าวที่ได้รับความเครียดเนื่องจากความร้อนและความเครียดเนื่องจากความเค็ม (ภาพที่ 38) จากผลการทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นว่ายีน *WRKY* ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีการแสดงออกของยีนมากที่สุดเมื่อข้าวได้รับความเครียดเนื่องจากความเย็นและความเครียดเนื่องจากการขาดน้ำ จากผลที่ได้น่าจะสรุปได้ว่ายีน *WRKY transcription factors* อาจจะมีส่วนเกี่ยวของกับการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมเมื่อพืชได้รับความเครียดต่างๆ ดังที่มีรายงานก่อนหน้านั้น (Euigem et al., 2000) ยิ่งไปกว่านั้นผลที่ได้ยังแสดงให้เห็นว่าการเหนี่ยวนำให้มีระดับการแสดงออกของยีน *WRKY* จะถูกควบคุมที่ระดับการถอดรหัส



ภาพที่ 35 ผลการปรับความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดจากใบข้าวที่สภาวะความเครียดต่างๆ Lane 1, อาร์เอ็นเอที่สกัดจากระยะ mid-log ของ *L. polychrous* Lane 2, อาร์เอ็นเอที่สกัดจากใบข้าวที่ไม่ได้รับความเครียด (ชุดควบคุม) Lane 3, ความเครียดเนื่องจากความเย็น Lane 4, ความเครียดเนื่องจากความร้อน Lane 5, ความเครียดเนื่องจากการขาดน้ำ และ Lane 6, ความเครียดเนื่องจากความเค็ม



ภาพที่ 38 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *WRKY* ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่สภาวะความเครียดต่างกัน ด้วยเทคนิค RT-PCR กับไพรเมอร์จำเพาะ TRFOS1 และ TRFOS2 แถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาด 600 bp ตัวเลขด้านบนแทนรอบของการทำพีซีอาร์



ภาพที่ 39 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน*L. polychrous* glyceroldehyde-3-phosphase dehydrogenase อาร์เอ็นเอที่ได้สกัดจากระยะ mid-log ของ *L. polychrous* โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ GDP-1 และ GDP-4 อธิบายในวิธีการดำเนินการวิจัย