

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

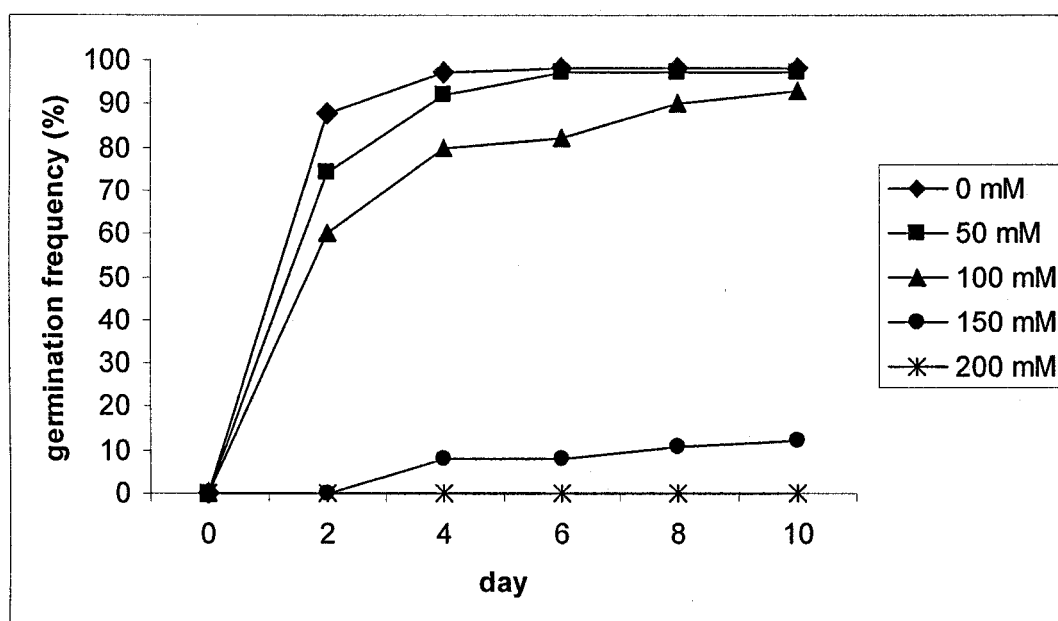
1. ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการงอกและการเจริญของข้าว

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

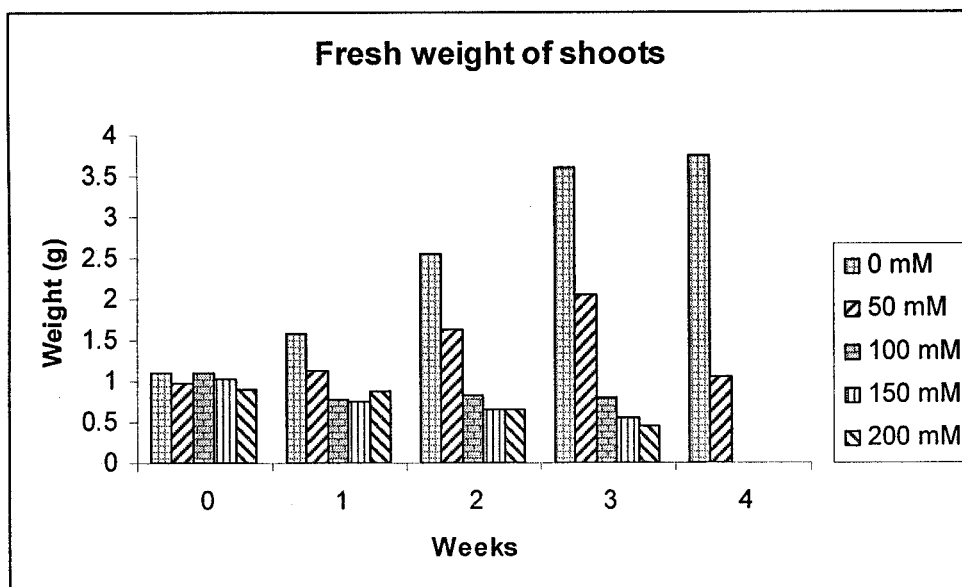
ความเครียดเนื่องจากเกลือไม่เพียงมีผลต่อการงอกเท่านั้นแต่ยังมีผลต่อการเจริญของต้นกล้าอีกด้วย ภาพที่ 9-12 แสดงน้ำหนักรากและน้ำหนักแห้งในส่วนยอดและรากของต้นกล้าข้าวที่ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายธาตุอาหารซึ่งจะลดลงประมาณ 4 เท่า และ 2 เท่า ในน้ำหนักรากและน้ำหนักแห้งของยอดและรากของต้นข้าวตามลำดับ 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 Ponnampetuma (1984) และ Taniyama (1993) โดยพบว่าการเจริญของข้าวลดลงและเกลือมีความเป็นพิษต่อต้นข้าวเมื่อเพาะต้นข้าวภายใต้สภาวะที่มีการให้เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูง Silva et al. (2003) รายงานถึงความเครียดเนื่องจากความเค็มที่สูงมากจะไปยับยั้งการเจริญของพืช เนื่องจากเกิดความไม่สมดุลของน้ำในพืชและยังเป็นการเพิ่มปริมาณสารอินทรีย์ในส่วนต่างๆของพืชอีกด้วยโดยจะเพิ่มการสะสมของปริมาณ Na^+ และ Cl^- ลักษณะอาการของต้นกล้าข้าวที่พบในการทดลองครั้งนี้ให้ผลใกล้เคียงกับการรายงานของ Artitya (2000) ซึ่งพบว่าความเค็มมีผลทำให้ใบข้าวเกิดการม้วนงอและใบข้าวจะเปลี่ยนสีจากสีเขียวไปเป็นสีน้ำตาลอ่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่สูงกว่า 100 mM

ตารางที่ 11 ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อความถี่ในการงอกของข้าว

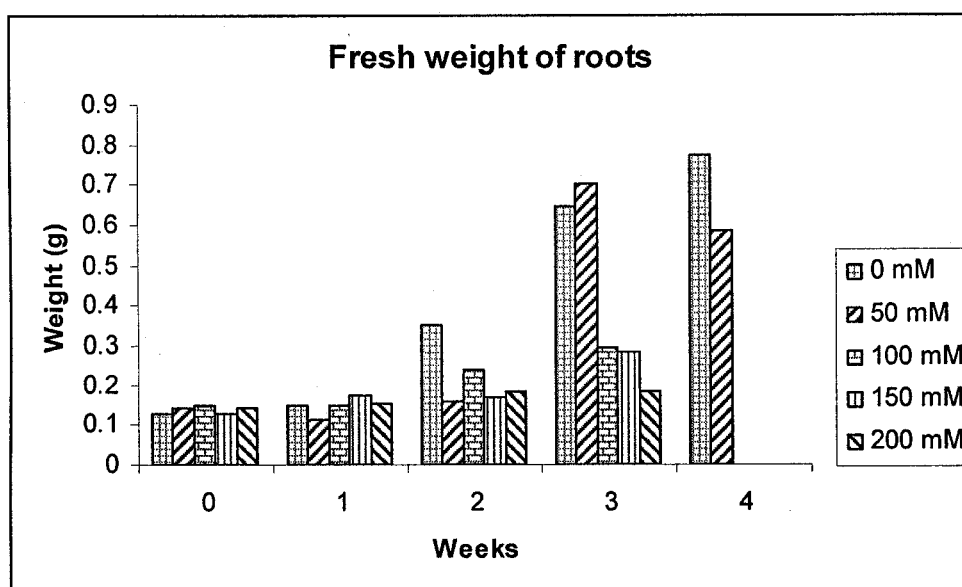
NaCl (mM)	% Germination					
	0-d	2-d	4-d	6-d	8-d	10-d
0	0	88	97	98	98	98
50	0	74	92	97	97	97
100	0	60	80	82	90	93
150	0	0	8	8	11	12
200	0	0	0	0	0	0



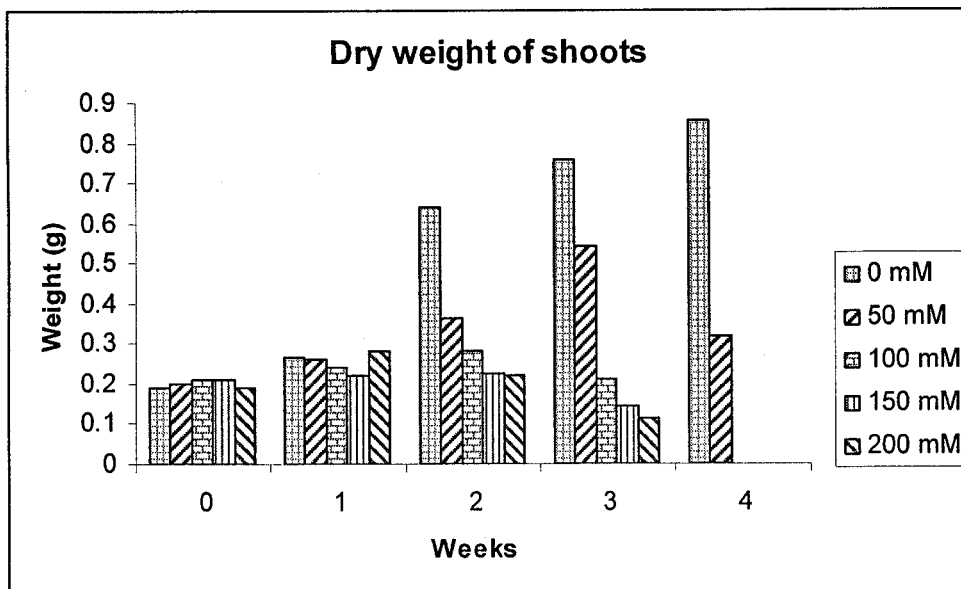
ภาพที่ 8 ผลของความเค็มที่มีต่อความถี่ในการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105



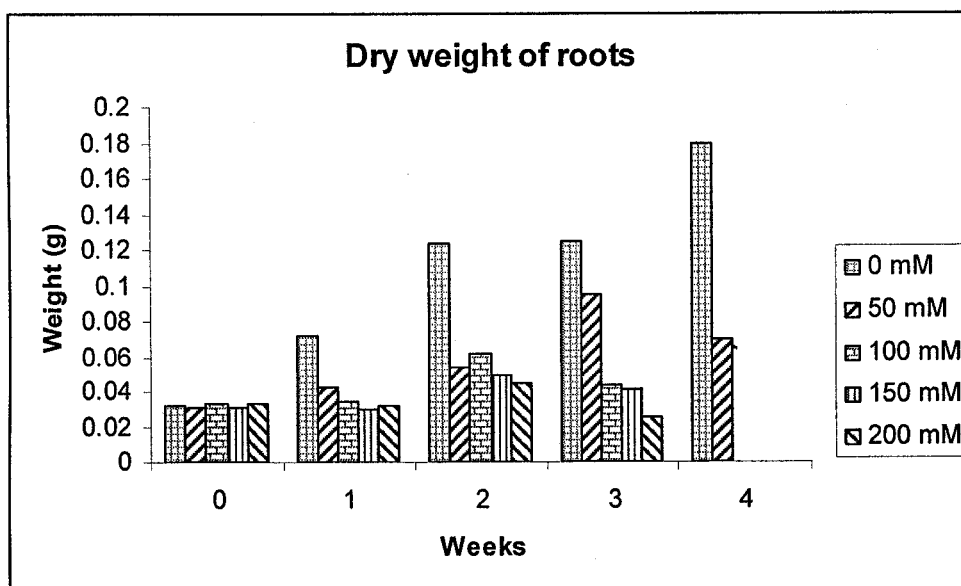
ภาพที่ 9 ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว (โดยการชั่งน้ำหนักสดของยอดของต้นข้าว) ภายหลังจากการให้เกลือที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ กัน



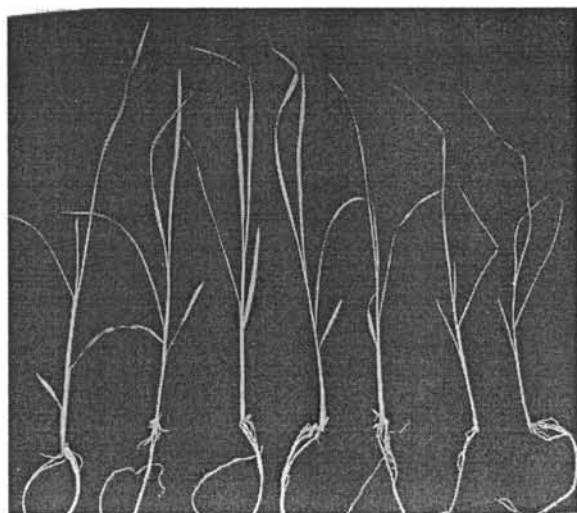
ภาพที่ 10 ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว (โดยการชั่งน้ำหนักสดของรากของต้นข้าว) ภายหลังจากการให้เกลือที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ กัน



ภาพที่ 11 ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว (โดยการชั่งน้ำหนักแห้งของยอดของต้นข้าว) ภายหลังจากการให้เกลือที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ กัน

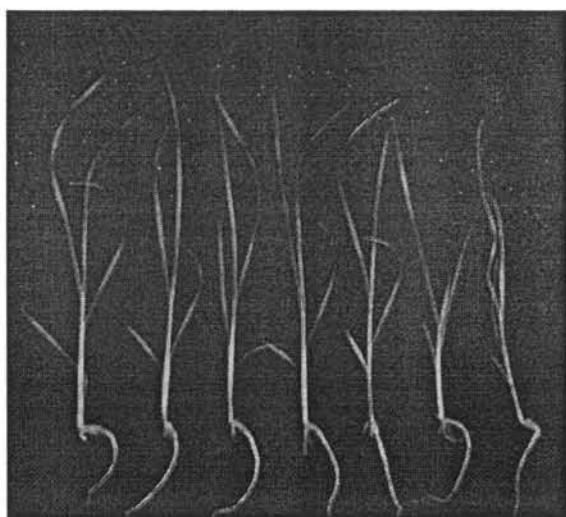


ภาพที่ 12 ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว (โดยการชั่งน้ำหนักแห้งของรากของต้นข้าว) ภายหลังจากการให้เกลือที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ กัน



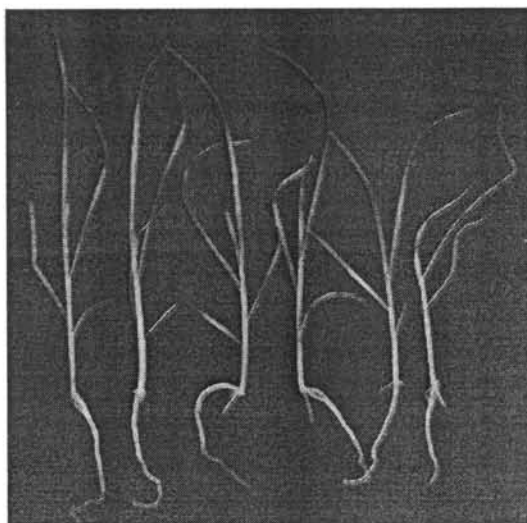
NaCl (mM) 0 25 50 75 100 150 200

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



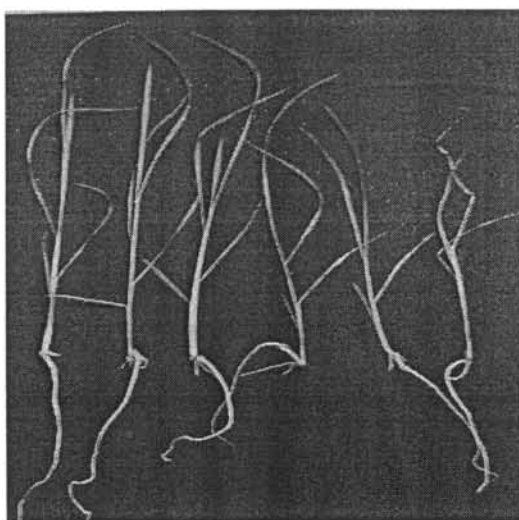
NaCl (mM) 0 25 50 75 100 150 200

ภาพที่ 14 ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อลักษณะของต้นกล้าข้าวหลังจากการเพาะในสารละลายธาตุอาหาร 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



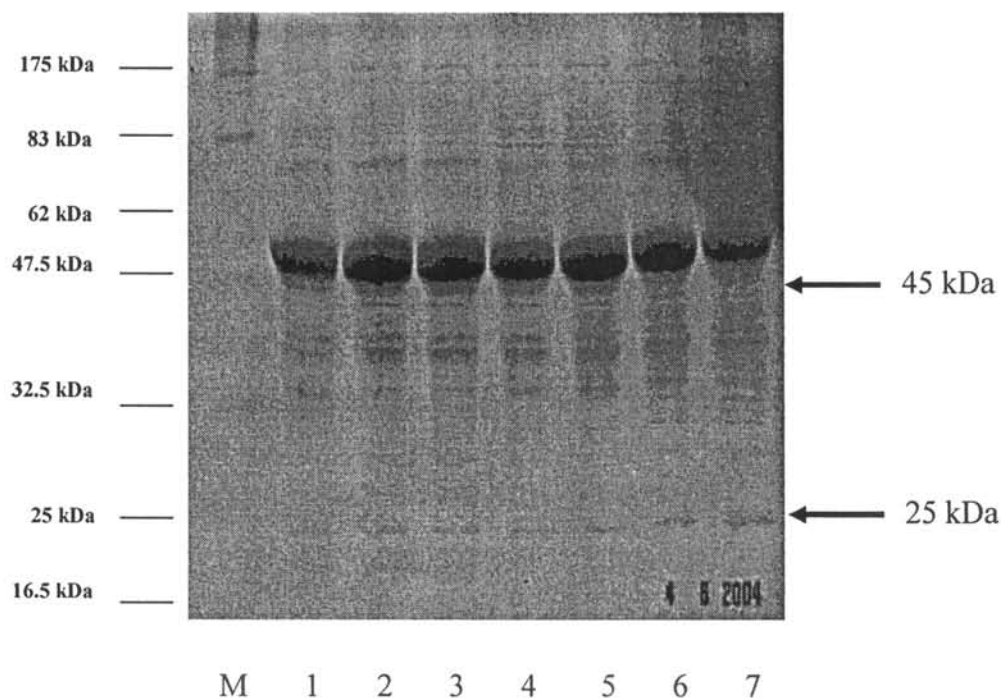
NaCl (mM) 0 25 50 75 100 150

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

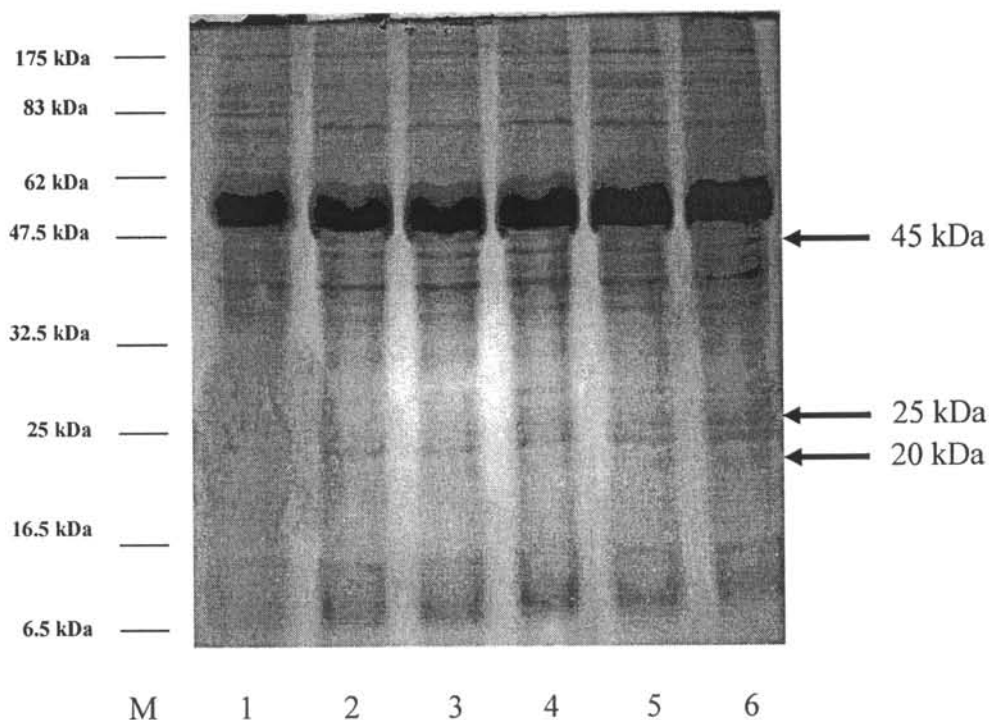
2. ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการสังเคราะห์โปรตีน

ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการสังเคราะห์โปรตีนในต้นกล้าข้าวแสดงดังภาพที่ 17-20 โปรตีนที่สกัดมาจากใบของต้นกล้าข้าวภายหลังจากการให้เกลือที่เวลาต่างๆกันจะนำมาศึกษาแบบแผนของโปรตีนด้วยเทคนิค 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

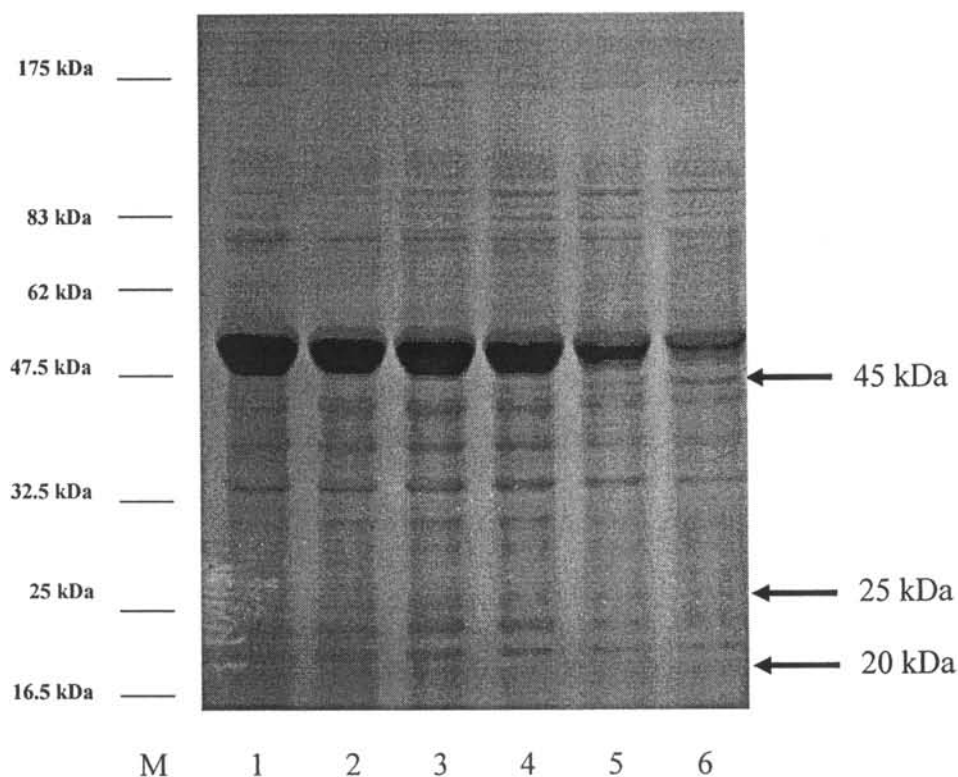
Chourey et al. (2003) ศึกษาผลของความเค็มที่มีต่อการสะสมโปรตีนในระหว่างการพัฒนาเจริญที่ให้ความเค็มกับต้นอ่อนของข้าวสายพันธุ์ Bura Rata ซึ่งมีแถบโปรตีน 6 แถบ จากส่วนยอดหรือ SSPs (salt stress-induced proteins) ปรากฏเด่นชัดประกอบด้วยแถบที่มีขนาด 18.5, 22, 23, 26, 40 และ 46 kDa เมื่อให้ความเครียดเนื่องจากความเค็มเป็นเวลานาน 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 จากผลที่ได้ทำให้ทราบว่าใน *TaGSK1* มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดของเกลือในส่วนของ signal transduction



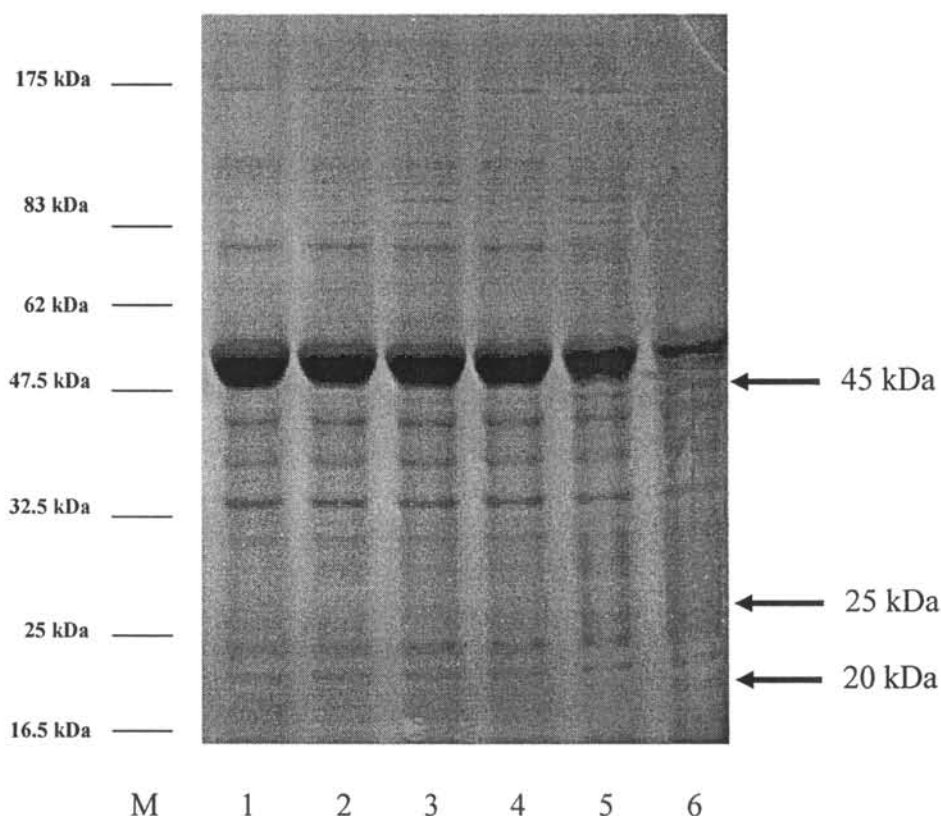
ภาพที่ 17 การวิเคราะห์เปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในต้นกล้าข้าวหลังจากการให้เกลือโซเดียมคลอไรด์นาน 3 วัน โดยใช้เทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis Lane M, โปรตีนมาตรฐาน; lane 1, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 0 mM; lane 2, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 25 mM; lane 3, ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 50 mM; lane 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 การวิเคราะห์เปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในต้นกล้าข้าวภายหลังจากการให้เกลื่อโซเดียมคลอไรด์นาน 7 วัน โดยใช้เทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis Lane M, โปรตีนมาตรฐาน; lane 1, ความเข้มข้นของเกลื่อเท่ากับ 0 mM; lane 2, ความเข้มข้นของเกลื่อเท่ากับ 25 mM; lane 3, ความเข้มข้นของเกลื่อเท่ากับ 50 mM; lane 4, ความเข้มข้นของเกลื่อเท่ากับ 75 mM; lane 5, ความเข้มข้นของเกลื่อเท่ากับ 100 mM; lane 6, ความเข้มข้นของเกลื่อเท่ากับ 200 mM ตามลำดับ



ภาพที่ 20 การวิเคราะห์เปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในต้นกล้าข้าวภายหลังจากการให้เกลือ โซเดียมคลอไรด์นาน 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 (Ulker, 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

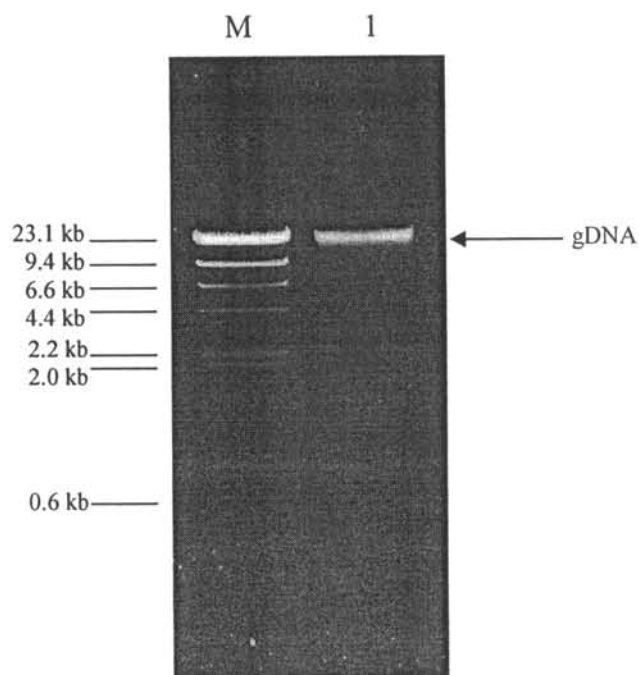
ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาด (เบส)	Tm (°C)
TRFOS1	CAGAATTCGGCCRTCTGYSSARST	25	64
TRFOS2	ACAAGCTTTGGMWCTTSTYGCTGMT	25	59

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

3. การแยกและศึกษาคุณลักษณะบางประการของยีนควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนตอบสนองต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

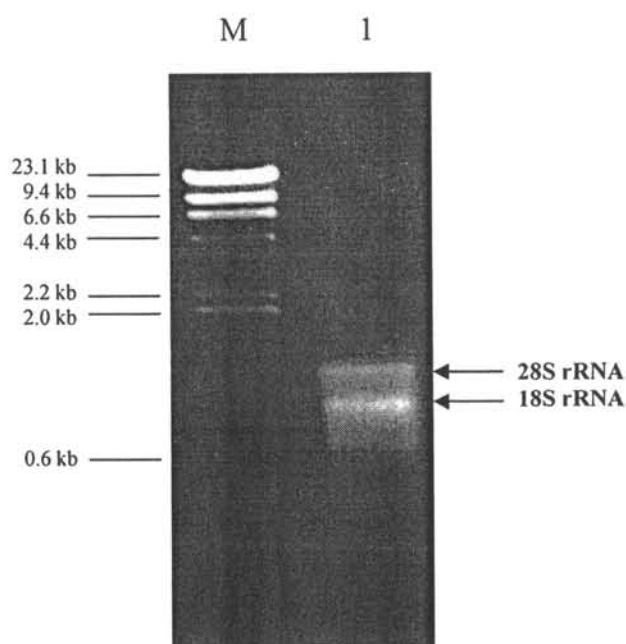
3.1 การแยกสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจากใบข้าว

แยกสกัดดีเอ็นเอรวมจากใบข้าวโดยดัดแปลงวิธีการของ Tugeon et al. (1987) ภายหลังจากการแยกขนาดโดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 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) ภายหลังจากการผ่านการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 1.0% agarose gel และย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ จากผลการทดลองที่ได้จะสังเกตเห็นแถบของ 28s rRNA และ 18s rRNA (ภาพที่ 22) อาร์เอ็นเอที่แยกสกัดได้จะนำไปใช้ในการศึกษาถึงการแสดงออกของยีนโปรตีนตอบสนองต่อความเค็มด้วยเทคนิค RT-PCR ต่อไป



ภาพที่ 21 แอเบ genomic DNA ที่แยกสกัดได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

Lane M, ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ HindIII Lane 1, genomic DNA ที่แยกสกัดได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

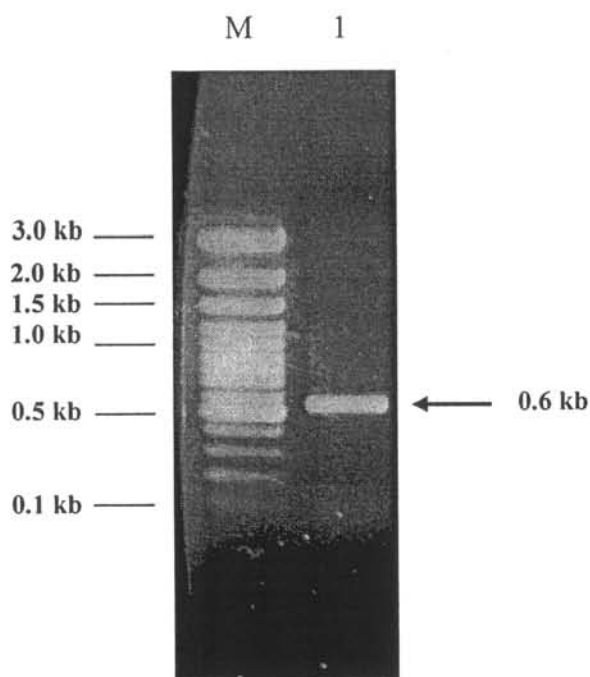


ภาพที่ 22 แอเบอาร์เอ็นเอที่แยกสกัดได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

Lane M, ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ HindIII Lane 1, อาร์เอ็นเอที่แยกสกัดได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แอเบของ 28s rRNA และ 18s rRNA ตำแหน่งดังที่ลูกศรชี้

3.2 การเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีนโปรตีนตอบสนองต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

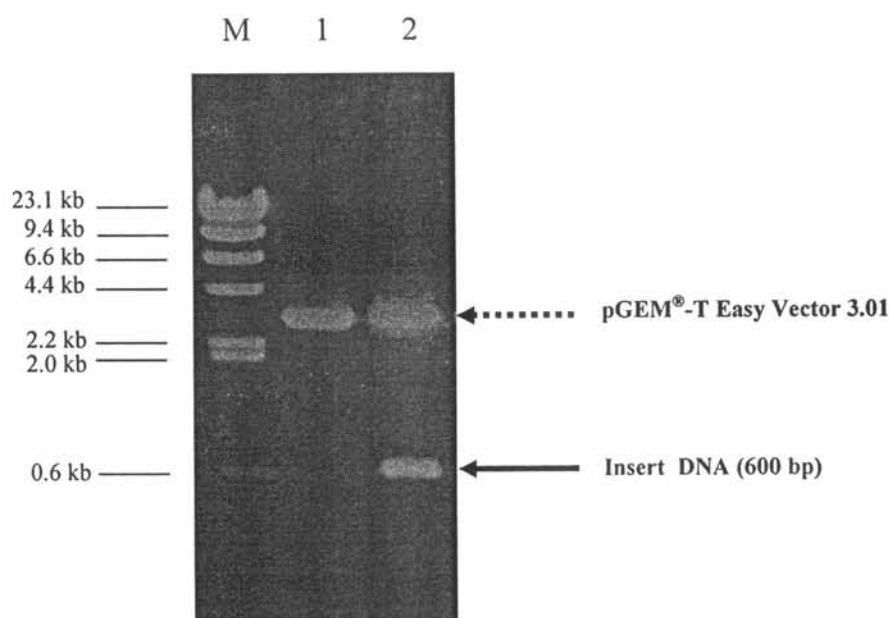
นำ genomic DNA ที่แยกสกัดได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ในการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีนควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนตอบสนองต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ TRFOS1 และ TRFOS2 ซึ่งสังเคราะห์จากลำดับดีเอ็นเอในส่วนอนุรักษ์ (Conserved region) ของยีน *WRKY transcription factor* ภายหลังจากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้ 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

เชื่อมต่อกับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (600 bp) เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pGEM[®]-T Easy Vector โดยใช้ชุดสำเร็จรูป QIAGEN PCR Cloning Kit (QIAGEN, German) นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α โดยใช้ชุดสำเร็จรูป TransformAid[™] Bacterial Transformation System (Fermentas, USA) และคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่รับเอาพลาสมิดลูกผสมซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเชื่อมต่อกันโดยอาศัยเทคนิค Blue/White selection จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คาดว่าจะนำชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าไปในเซลล์ด้วยวิธี rapid alkaline lysis ผลจากการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำให้เลือกพลาสมิดที่คาดว่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายได้ 1 โคลน ซึ่งพบว่าโคลนนี้มีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 600 bp ให้ชื่อว่า pKD4 จากนั้นนำพลาสมิดดังกล่าวไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ภาพที่ 24 แสดงผลการตัดพลาสมิดจากโคลน pKD4 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*



ภาพที่ 24 แถบพลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากโคลน pKD4 ภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* Lane M, ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ HindIII Lane 1, ผลการตัดดีเอ็นเอพาหะ pGEM[®]-T Easy Vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* Lane 2, ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากโคลน pKD4 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 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, *Hind*III, *Pst*I และ *Xba*I จากนั้นนำไปแยกขนาดด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส ผ่าน 0.7% agarose gel แสดงดังภาพที่ 28 โดยใช้ชิ้น ดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับ 0.6 kb จากข้างต้นเป็นดีเอ็นเอตรวจติดตาม ในภาพที่ 29 แสดงแถบปฏิกิริยาภายหลังจากการทำ hybridization โดยดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI, *Pst*I และ *Xba*I มีแถบปฏิกิริยาเกิดขึ้น 1 แถบ ในขณะที่ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hind*III จะพบแถบปฏิกิริยาเกิดขึ้น 2 แถบ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ายีน *WRKY* ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิมี 1-2 copy



MegaBACE 1000 Aug31_2005

ICM ver. 2.5

1000-14100

MEGABACE

clone_rice(M13F)

C01

Cimarron 3.12

Read length: 434

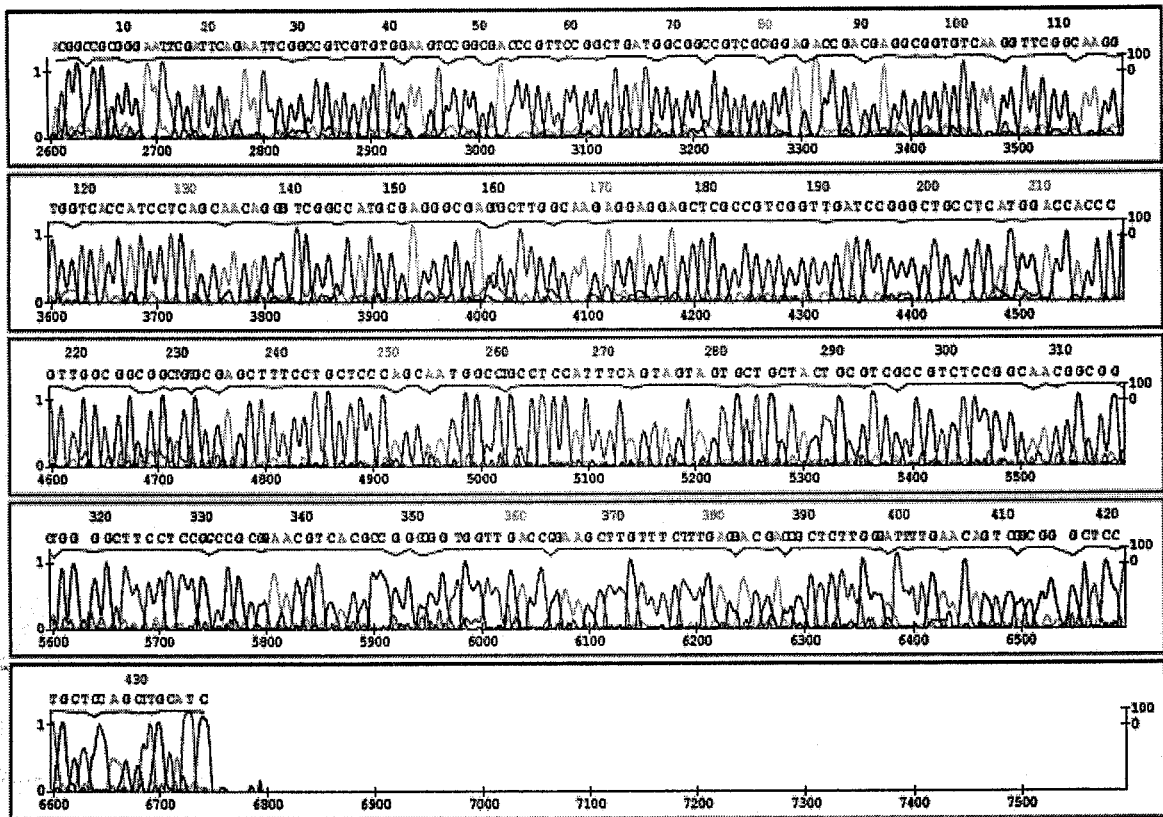
Overall quality: 93.0

Injection: 3.0 kV, 90.0 s

Run: 9.0 kV, 100.0 min

Started Wed Aug 31 15:00:46 2005

ET Terminators



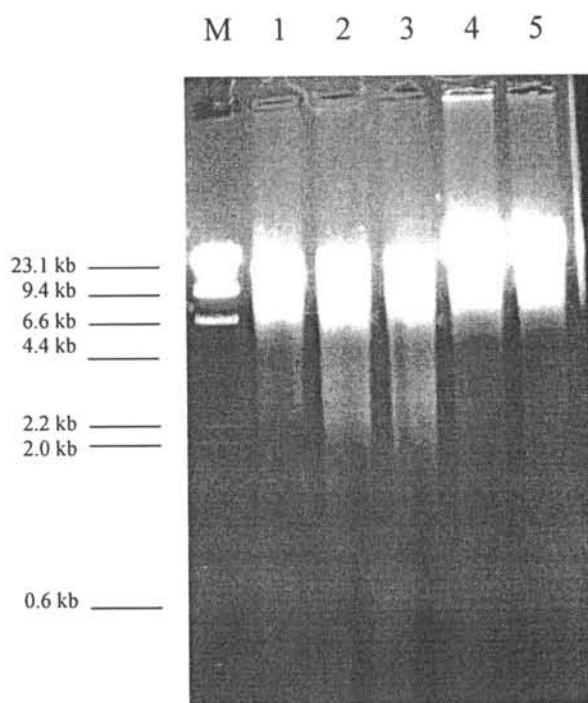
ภาพที่ 25 โครมาโดแกรมและลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 600 bp จากโคลน pKD4 เมื่อใช้ universal forward primer แต่ละจุด (peak) ใช้แทนนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด ประกอบด้วย A (สีเขียว), C (สีฟ้า), G (สีดำ) และ T (สีแดง)

TRFOS1

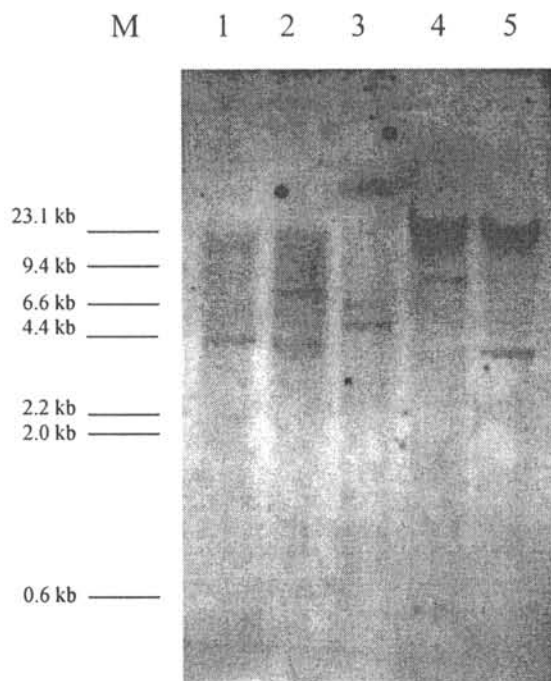
AGAATTCGGC CGTCGTGTGG AAGTCCGGCG ACCCGTTCCG GCTGATGGCG 50
 GCCGTCGCAG GAGACCGACG AGGCGGTGTC AAGGTTCCGC AAGGTGGTCA 100
 CCATCCTCAG CAACAGGGTC GGCCATGCGA GGGCGAGTGC TTGGCAAGAG 150
 GAGGAGCTCG CCGTCGGTTG ATCCGGGCTG CCTCATGGAC CACCCGTTGG 200
 CGGCGGCTGT GCGAGCTTTC CTGCTCCCAG CAATGGCCTG CCTCCATTTC 250
 AGTAGTAGTG CTGCTACTGC GTCGCCGTCT CCGGCAACGG CGGCTGGGGC 300
 TTCCTCCGGC CGCGGAACGT CACGCCGGCC GGTGGTTGAC CGGAAGCTTG 350
 TTTCTTTGAG ACGACGCTCT TGGATTTGAA CAGTCGCGGC GCTCCTGCTC 400
 CAGCTGCATC CATGGCGGCG GCTGCCAAGA ACAGCTCGAA GCTTGACACCT 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 HindIII Lane 1, genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI Lane 2, genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI Lane 3, genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III Lane 4, genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I Lane 5, genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I



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

3.6 การโคลนและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *WRKY* ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ภายหลังจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 0.6-kb แล้วพบว่ามีความเหมือนกับยีน *WRKY* transcription factor ของข้าวที่มีรายงานในฐานข้อมูลแล้วนั้นทางผู้วิจัยได้สังเคราะห์ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบมาจากส่วน 5' และ 3' coding regions ของยีนดังกล่าวเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *WRKY* ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ไพรเมอร์จำเพาะดังกล่าวได้แก่ Os *WRKY*4 และ Os *WRKY*5 รายละเอียดของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะแสดงในตารางที่ 13 ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1.5-kb (ภาพที่ 30) ทำการสกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ให้

บริสุทธิ์และเชื่อมต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pGEM[®]-T Easy Vector และถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5 α ตามวิธีที่ได้อธิบายในส่วนของวัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษาวิจัย ทำการคัดเลือกโคลนีโดยใช้เทคนิค blue/white selection พบว่าสามารถเลือกโคลนที่คาดว่าจะมีชั้นดีเอ็นเอเป้าหมายได้ทั้งหมด 11 โคลนี (ภาพที่ 31) ภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำการเลือกโคลนที่น่าสนใจมา 1 โคลนและให้ชื่อว่า pKDSS5 ภาพที่ 32 แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอของโคลน pKDSS5 (Lane4) ภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

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 Da และมีค่าคาดคะเน pI ประมาณ 9.74

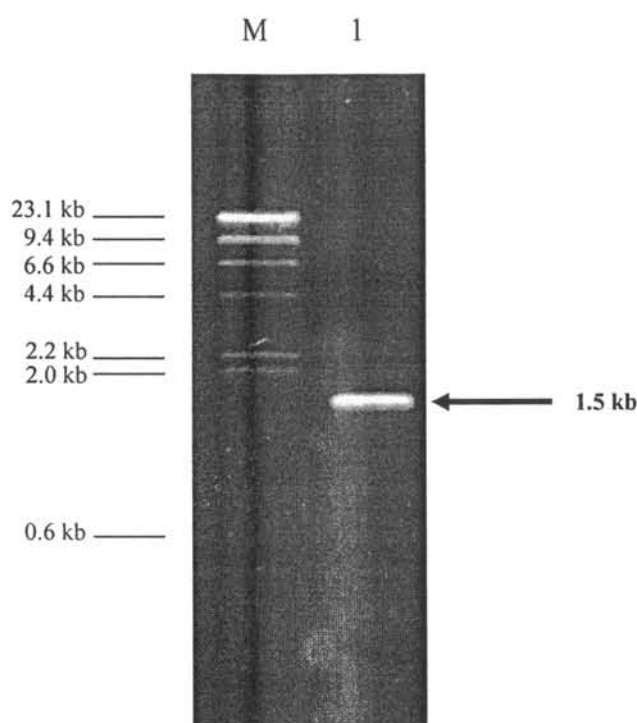
มีงานวิจัยอีกมากที่ศึกษาเกี่ยวกับยีนที่เป็นรหัสของ transcription factor proteins ในพืชหลายๆ ชนิด เช่น Shen et al. (2003) รายงานว่ายีน *TCDREB1* ในข้าวสาลีถูกเหนี่ยวนำให้มีการสร้างขึ้นเมื่อมีอุณหภูมิต่ำ ความเค็ม และสภาวะขาดน้ำ สามารถคาดคะเนน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้เท่ากับ 30.3 kDa Wang et al. (2003) พบว่ายีน *OsbHLH1* ที่เป็รรหัสสำหรับ polypeptide สามารถคาดคะเนน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้เท่ากับ 42 kDa สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้างขึ้นในส่วนของรากของต้นกล้าข้าวในสภาวะที่ได้รับความเครียดเนื่องจากความเย็นแต่ไม่ใช่ความเครียดเนื่องจากเกลือ NaCl การให้สาร PEG และการให้สาร ABA

Lee et al. (2004) ศึกษาการแสดงออกของยีน Dehydration 1 ในข้าว (*OsDhn1*) ที่เป็รรหัสสำหรับโปรตีนที่สามารถคำนวณค่าน้ำหนักโมเลกุลได้ 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

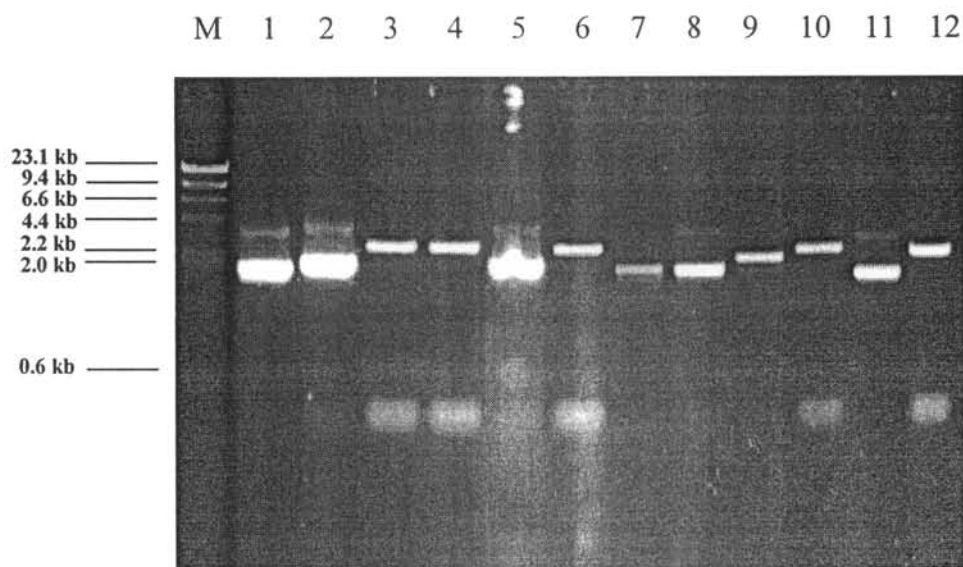
ตารางที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *WRKY* ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

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

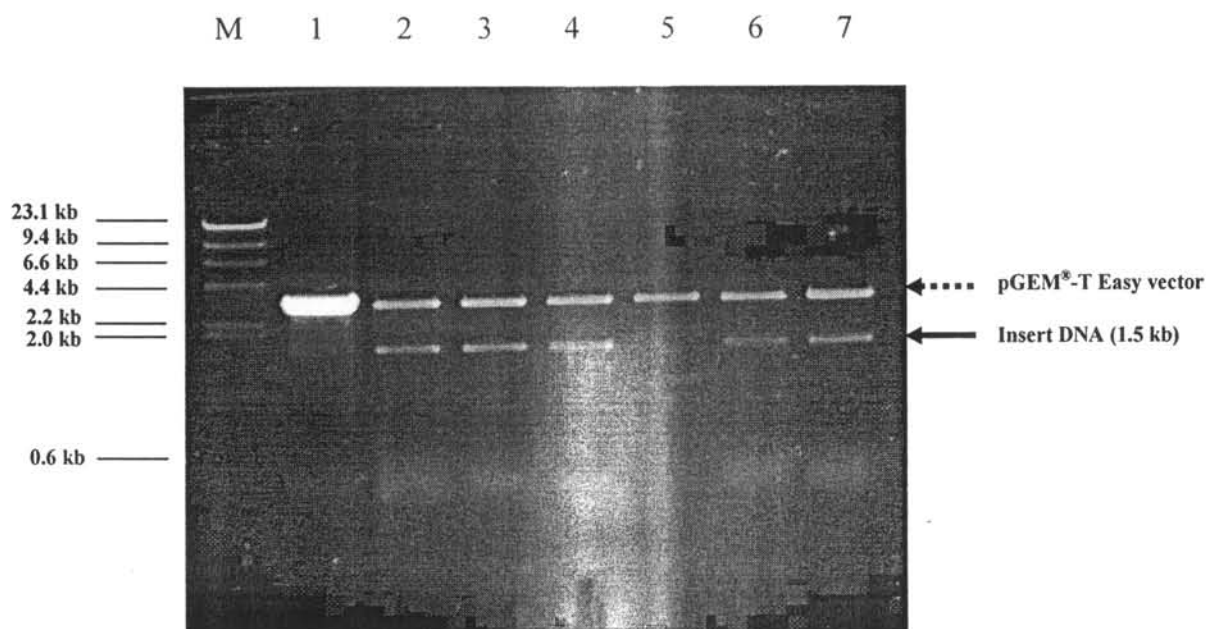
ส่วนที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณที่ตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (GAATTC) และ *BamHI* (GGATCC) ที่ตำแหน่งปลาย 5'



ภาพที่ 30 แอมป์ลิฟิเคชันของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้หลังจากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอจาก ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ Os WRKY4 และ Os WRKY5 Lane M, ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ HindIII Lane 1, ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 1.5kb



ภาพที่ 31 แอมพลิฟิเคชันดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากโคลนีสีขาวซึ่งคาดว่าจะมีชั้นดีเอ็นเอ เป้าหมายอยู่บนโมเลกุลของพลาสมิด Lane M, ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ HindIII Lane 1, ดีเอ็นเอพาหะ pGEM[®]-T Easy Vector Lane 2-12, พลาสมิดดีเอ็นเอซึ่งคาดว่าจะมีชั้นดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่บนโมเลกุลของพลาสมิด



ภาพที่ 32 แถบพลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากโคลนีสีขาวภายหลังจากการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* Lane M, ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ HindIII Lane 1, ดีเอ็นเอ พาหะ pGEM[®]-T Easy Vector Lane 2-7, พลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จาก โคลนีสีขาว (positive clone) ภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (โคลน ที่ 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-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₃-H-X₁-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)

<u>ATGGATGGGGTGGAGGAGGCGAACATGGCGCGGTGGAGAGCTCGAAGAAG</u>	51
M D G V E E A N M A A V E S S K K	
CCCGTGGCCATCCTGTCCAAGTCGGCGACCCGTTCCGGCTGATGGCGGCC	102
P V A I L S K S G D P F R L M A A	
GTCGCGGAGACCGACGAGGCGGTGTCAAGGTTTCGGCAAGGTGGTCACCATC	153
V A E T D E A V S R F G K V V T I	
CTCAGCAACAGGGTCGGCCATGCGAGCGCGAGGCTTGGCAAGAGGAGAGC	204
L S N R V G H A R A R L G K R R S	
TCGCCGTGGTTGATCCGGGCTGCCTCATGGACCACCCGTTGGCGGCGGCG	255
S P S V D P G C L M D H P L A A A	
GCGAGCTTTCCTGCTCCAGCAATGGCCGCTCCATTTCAGTAGTAGTGCT	306
A S F P A P S N G P R L H F S S S A	
GCTACTGCGTCGCGCTCTCCGGCAACCGCGGCTGGGGCTTCCCTCCGCCGCG	357
A T A S P S P A T A A G A S S A A	
AACGTCACGCCGGCGGTGGTTGACCGGAGCTTGTTTCTTGAGACGACGCTC	408
N V T P A V V D R S L F L E T T L	
TTGGATTGAAACAGTCGCGGCGCTCCTTCCAGCTGCATCCATGGCGGCG	459
L D L N S R G A P A P A A S M A A	
GCTGCCAAGAACAGCTCGAAGCTTGCACTGCACCCATGGTGAACAGCTCC	510
A A K N S S K L A P A P M V N S S	
TCCTCCGCAAAATCACATCCAGTTCCAGCAGCCGATGAAGAGCTTTCAGTTC	561
S S A N H I Q F Q Q P M K S F Q F	
GAGCAGACCCGATCAGCGACAAGTTCCGATCGAGATGCCGAGAGGCGTC	612
E Q T P I S D K F R I E M P R G V	
GGCGGCGGCGGAGGGAAGGAGGTGATCAGCTTCAGCTTCGACAACCTCGGTG	663
G G G G G K E V I S F S F D N S V	
TGCACCTCGTCGGCGGCGACCTCCTTCTCCACCTCCATCAGCAGCCAGCTC	714
C T S S A A T S F F T S I S S Q L	
ATCAGCATGTCCGACGCCGCCACCAACTCCGCCGCGGCTGCGGCGGCGCCG	765
I S M S D A A T N S A A A A A A P	
ACGACCAAGAAGCCGTCGTGTCGCCGAGGAAGGCCACCGCCGACGACGAC	816
T T K K P S S C A R K A T A D D D	
GCCGCGGCGAAATGCCATTGCCCAAAGAGAGtccgtgtcaatctcgcca	867
A G G K C P K K K	
ccgtttctcggccatttctggcatgatctgaccgtgttcttctgcttccgat	918
ttcttcgcagGAAACCCAGGGAGAGAAAGTGGTCCACCGTGCCGGCGATCA	969
K P R E K K V V T V P A I S	
GCGACAAGGTCGCCGATATACCTTCGCAAAATTATTCTTGAGAAAATATG	1020
D K V A D I P S D N Y S W R K Y G	
GTCAGAAACCAATCAAAGGCTCTCCTCATCCAAAGgtagtaaatactcactac	1071
Q K P I K G S P H P R	
taagaacaattaatcatctcaaaattcagtcatagcttcataataactcggt	1122
catctcagttactgctactgatcaacttctttgcaattccgattactatga	1173
tcagtttcaacttaagacaagaataaaccatctcattatcatctttaaaga	1224
caatagctaatgatcaacttatctgtcatgctattaataacggccacttcc	1275
aactgatctgcaatctgtaccctgtactctgcttaatacatgatcaaatgtt	1326
cagatgaaaaaattagacaaatttgatgagattgattgtgtttgggtttg	1377
atgcagGGGATACTACAGGTGCAGCAGCAAGAAGGATTGCCCCGGCGAGGAA	1428
G Y Y R C S S K K D C P A R K	
GCACGTCGAGAGGTGTGCGAGCGACCCGGCGATGCTGCTCGTCACCTACGA	1479
H V E R C R S D P A M L L V T Y E	
GAACGAACACAACCACGCGCAGCCGCTCGATCTCTCCGTAGTGCAGCAAGC	1530
N E H N H A Q P L D L S V V Q Q A	
CACCGCTAATCCCCAGACCTGA	1552
T A N P Q T *	

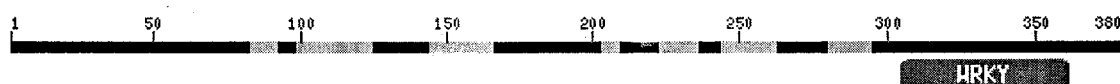
ภาพที่ 33 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ *WRKY transcription factors* 6 ที่แยก
ได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กรอบสี่เหลี่ยมแทนตำแหน่งของไพรเมอร์
TRFOS1 และ TRFOS2 ตามลำดับ ขีดเส้นใต้แทนตำแหน่งของไพรเมอร์ Os
WRKY4 และ Os WRKY5

```

MDGVVEANMA AVESKKPVA ILSKSGDPFR LMAAVAETDE AVSRFGKVVT 50
ILSNRVGHAR ARLGKRRSSP SVDPGCLMDH PLAAAASFPA PSNGRLHFSS 100
SAATASPSA TAAGASSAAN VTPAVVDRSL FLETTLLDLN SRGAPAPAAS 150
MAAAAKNSSK LAPAPMVNSS SSANHIQFQQ PMKSFQFEQT PISDKFHIEM 200
PRGVGGGGGK EVISFSFDNS VCTSSAATSF FTSISSQLIS MSDAATNSAA 250
AAAAPTTHKP SSCARKATAD DDAGGKCHCP KKKKPREKKV VTPAISDKV 300
ADIPSDNYSW RYGGQKPIKG SPHPRGYRC 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 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับเซตความเหมือนและคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *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

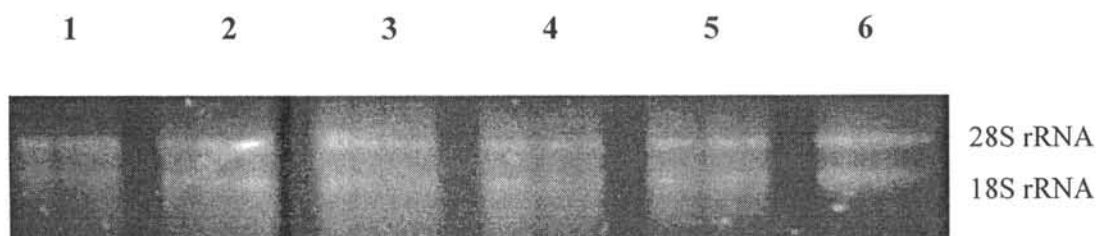
Organisms	% identity	% similarity
Rice [<i>O. sativa</i> (japonica cultivar-group)], <i>WRKY transcription factor 6</i>	98	98
<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>WRKY transcription factor 11</i>	72	80
Soybean (<i>Glycine max</i>), <i>WRKY65</i>	70	82
Corn (<i>Zea mays</i>), <i>WRKY1</i>	69	83
Tobacco (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

Arabidopsis	-----MAVDLMR-----FPKI-----DDQTAIQEASQGLQSMELIRVLS--	36
Soybean	-----MTVDLVG-----AAKMG-----MEENIAIQEASAGLKSMEHIRVLSQ	40
Indica rice	-----MAVDLMG-----FSPRGGCRPSVETEQLAFCEAAAGLRSLELIVSSLSAG	46
Tobacco	-----MAVELMT-----SGYSRRDSFSTKMEENAVQERATAGLOSVEKIRLLSQS	46
Japonica rice	MDGVVEANMAAVESSKKLVAILSK-SGDPFRLMAAVAETDEAVSRFGKVVTILSNRVGHA	59
Rice KDML105	MDGVVEANMAAVESSKKLVAILSK-SGDPFRLMAAVAETDEAVSRFGKVVTILSNRVGHA	59
Corn	MEGMEANRTAVESCHRVLLLSNPHGQLVPSKELVAATGEAVAKFGSLTAKISNSNGDG	60
Arabidopsis	-----NRPEQOHN-----VDCSEITDFTVSKFKTVISLLN--RTGHARFRRGFVHSTS	82
Soybean	IPSSASSSSNAHHRLNHLNLDCTEITDFTVSKFKQVINLLN--RTGHARFRSAPSHSP	98
Indica rice	-----GEOHRRPQOKQS-----SPLGEIADQAVSRFRKVISILD--RTGHARFRRGFVVGAA	97
Tobacco	HQNQQQQQOKLDQNP--SVSADYTAVADVAVNKFKKFISSLDNRTGHARFRKGPISTPL	104
Japonica rice	RARLGKRRSSPVDPGCLMDHPLAAAASSPAPSNRGLHFSSSAATASPPATAAAASSAA	119
Rice KDML105	RARLGKRRSSPVDPGCLMDHPLAAAASSPAPSNRGLHFSSSAATASPPATAAGASSAA	119
Corn	-LLQGHARVRVKKPLHIFDSNLFLESSAVAAAAPAKTPSPSPILGLQLFPYHQFEFS	119
Arabidopsis	SAASOKLQSQIVKNTQPEAPIVTRTTNHPQI-----VPPPSVTLDTSKPSI	129
Soybean	STS--LPSQPOPOPOPOPYALTLDFAKPM-----LKSNNPNPNSSTDLSV	142
Indica rice	AAA-----ASAPSSSPVSPPLPPTTQPAT-----AVK--SLTLDTNP--	135
Tobacco	PPPPKPPQQRLNQNISKONLQIEETEKQINTPKIYCPTPIQLPLPLPHNLQLVKNGS	164
Japonica rice	NVTPAVVDRSLFLETTLLDLNSR---GAPAPAASMAAAKNSKLPAPMVNSSSSANHI	176
Rice KDML105	NVTPAVVDRSLFLETTLLDLNSR---GAPAPAASMAAAKNSKLPAPMVNSSSSANHI	176
Corn	SSKDPVRIPTQFPKRLLEKPTAGMEGSTSQSPPIVQMVPVSVAPPAGTPTPALPPAHL	179
Arabidopsis	FGTKAKSAELEFSKENFSVSLNSSFMSA-----ITGDGSVSNKGIFLASAPLOPVNS	182
Soybean	SOYSKTKDTTTFSSISPPVSTTTSSFMSS-----ITADGSVSDGKIGPA-----ITA	188
Indica rice	-----TKVAAASVTSTSFSSVT-----AGDGSVSKGRSLVS-----	168
Tobacco	IERKESSTTFINFAASAPNSFMSSLTGET-----ESLQOQSLSSGFQITN--LSTVSS	214
Japonica rice	QFQQPMKSFQFEQTPISDKFHIEMPRG-----VGGGGGKEVISFSFDNSVCTSS	225
Rice KDML105	QFQQPMKSFQFEQTPISDKFHIEMPRG-----VGGGGGKEVISFSFDNSVCTSS	225
Corn	HFIQQQSYQRFQLMQQMKIQSEMMKRSNLGDQGGSLSGGGGGGGRKGVNLKFDSSNCTAS	239
Arabidopsis	SGKPPLAGHPYRKRRCLEHEHSE-----SFGSKVSGS	213
Soybean	AGKPPLS--SSHRKRCHDATLS-----AGKASSS	215
Indica rice	SGKPPLAGGVKRRKHHNPNPHPPPC-----AAGGDGHHGHAH	205
Tobacco	AGRPPLSTSSFKRKCSMDDTA-----LKCNSAGG	244
Japonica rice	AATSFFTSISSQ--LISMSDAATN-----SAAAAAAPTTKKPPSSCARKATADDD	272
Rice KDML105	AATSFFTSISSQ--LISMSDAATN-----SAAAAAAPTTKKPPSSCARKATADDD	272
Corn	SSRSFLSSLMEGSLASLDGSRTRPFQLLSGSQTASTPELGLVQRRRCAGREDGTGRCA	299
Arabidopsis	AYGKCHCKKSRKMRMKTVRVPAISAKIADIPDEYSWRKYGOKPIKGSPPRGGYKCS	273
Soybean	AH--CHCSKRRKSRVVRMTRVPAISSKIADIPDEYSWRKYGOKPIKGSPPRGGYKCS	273
Indica rice	AHGGCHCSKRRKSRVVRMTRVPAISARVADIPADEYSWRKYGOKPIKGSPPRGGYKCS	265
Tobacco	SSGRCHCPKKKSRVVRVVPVPAISMKMADIPDDYSWRKYGOKPIKGSPPRGGYKCS	304
Japonica rice	AGGKCHCPKKKPREKKVVTVPAISDKVADIPSDNYSWRKYGOKPIKGSPPRGGYKCS	332
Rice KDML105	AGGKCHCPKKKPREKKVVTVPAISDKVADIPSDNYSWRKYGOKPIKGSPPRGGYKCS	332
Corn	TGSRCHCSKRRKLRIRRSIKVPAISNKVADIPADEFSWRKYGOKPIKGSPPRGGYKCS	359
Arabidopsis	FRGCPARKHVERALDDPAMLIIVTYEGEHRHNSAMQENISSGINDLVFASA--	325
Soybean	VRGCPARKHVERAQDDENMLIVTYEGEHRHPQRLPETAAGAGG--TFAAHFV	324
Indica rice	VKGCPARKHVERAADDPATLVVTYEGDHRSPPPPLPLV-----	305
Tobacco	VRGCPARKHVERALDDPAMLIIVTYEGEHRHNSHSITESPAHVLESS-----	350
Japonica rice	KKDCPARKHVERCRSDPAMLIIVTYENBNHNAOPLDLVSVQOATANPQT-----	380
Rice KDML105	KKDCPARKHVERCRSDPAMLIIVTYENBNHNAOPLDLVSVQOATANPQT-----	380
Corn	VRGCPARKHVERCVDDESMLIIVTYEGEHRHNRVLAQFA-----	397

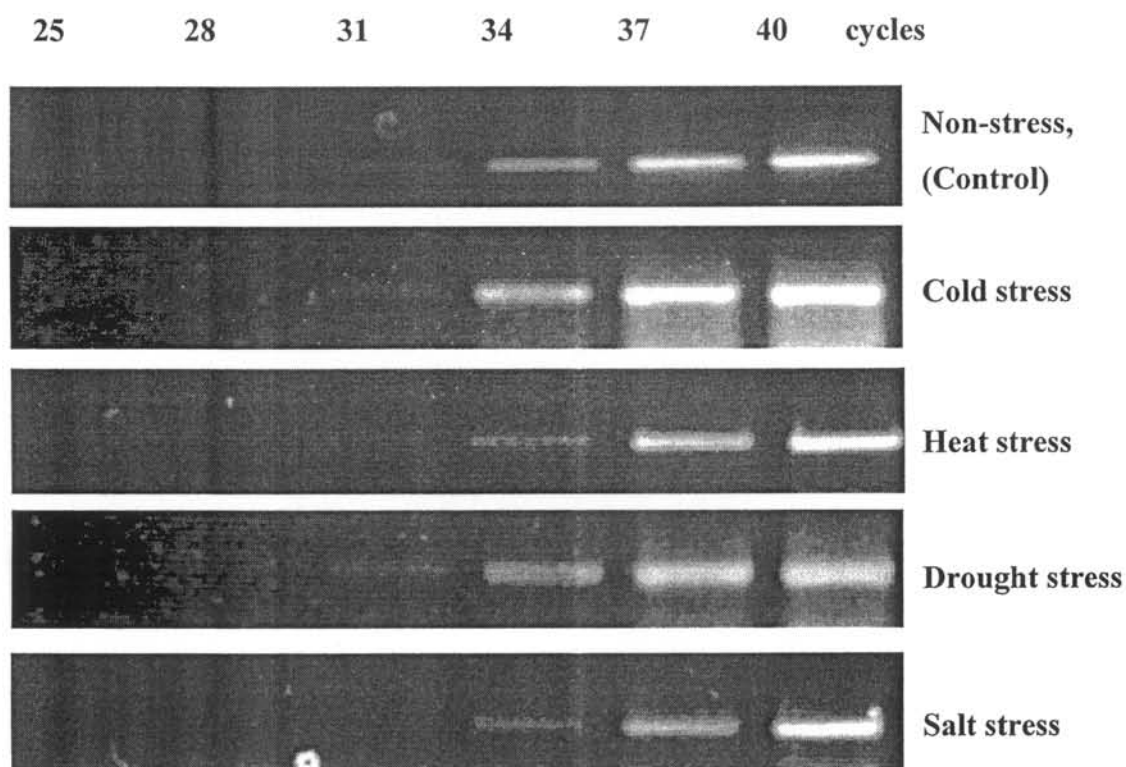
ภาพที่ 36 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน (Multiple alignment) ระหว่าง WRKY transcription factors ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 กับโปรตีนที่เกี่ยวข้องการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน WRKY transcription factors ในข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 โดยเทียบกับ A. thaliana ถั่วเหลือง (G. max) ต้นยาสูบ (N. tabacum) ข้าวกลุ่ม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

4. การศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีนตอบสนองต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 ภายใต้สภาวะความเครียดต่าง ๆ ด้วยเทคนิค RT-PCR

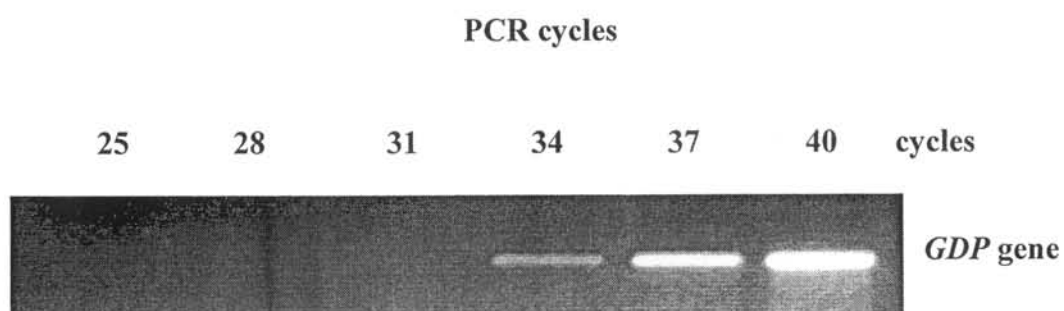
Seki et al. (2002) ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน WRKY และพบว่าโปรตีนดังกล่าวนี้สามารถชักนำให้มีการแสดงออกได้ภายใต้สภาวะต่างๆ เช่น การขาดน้ำ ความเค็ม ความเย็นและความร้อน ดังนั้นจึงได้ทดสอบการแสดงออกของยีนดังกล่าวนี้ในข้าวพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 ภายใต้สภาวะความเครียดต่างๆ ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้อาร์เอ็นเอที่สกัดจากต้นกล้าข้าวที่ได้รับการความเครียดต่างๆ ดังนี้คือ สภาวะความเครียดเนื่องจากความเย็น (Wang et al. 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 อย่างไรก็ตามเมื่อข้าวได้รับความเครียดเนื่องจากความเย็นและความเครียดเนื่องจากการขาดน้ำจะมีระดับการแสดงออกของยีนที่มากกว่าเมื่อเทียบกับข้าวที่ได้รับการความเครียดเนื่องจากความร้อนและความเครียดเนื่องจากความเค็ม (ภาพที่ 38) จากผลการทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นว่ายีน *WRKY* ในข้าวพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 มีการแสดงออกของยีนมากที่สุดเมื่อข้าวได้รับความเครียดเนื่องจากความเย็นและความเครียดเนื่องจากการขาดน้ำ จากผลที่ได้น่าจะสรุปได้ว่ายีน *WRKY transcription factors* อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมเมื่อพืชได้รับความเครียดต่างๆ ดังที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (Eugem 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-phosphate dehydrogenase อาร์เอ็นเอที่ได้สกัดจากระยะ mid-log ของ *L. polychrous* โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ GDP-1 และ GDP-4 อธิบายในวิธีการดำเนินการวิจัย