สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญรูปภาพ	ช
สารบัญตาราง	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1 บทนำ	1
2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	5
3 ขอบเขตของการศึกษาวิจัย	5
4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
1. ลักษณะทางพฤษศาสตร์ของข้าว	7
2. ความหมายของความเครียด	15
3. ความเครียดเนื่องจากความเค็ม	15
4. ผลกระทบของความเครียดเนื่องจากความเค็มที่มีต่อพืช	22
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	37
1. วัสดุการทดลอง	37
1.1 เมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ	37
1.2 เชื้อจุลินทรีย์	37
1.3 ดีเอ็นเอพาหะ	37
1.4 เอนไซม์	37
1.5 โปรตีนมาตรฐาน (Protein marker) และช่วงของแถบโปรตีนมาตรฐาน	38
1.6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker)	39
1.7 ชุดสำเร็จรูป	39
2. วิธีดำเนินการวิจัย	39
2.1 สภาวะในการเพาะเมล็ดข้าวและการให้เกลือ	39

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

		หน้า
2.2	การแยกสกัดโปรตีนและการศึกษาแบบแผนของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	40
2.3	การถ่ายแผ่นโปรตีนลงสู่แผ่นเมมเบรน	41
2.4	การแยกและศึกษาคุณลักษณะบางประการของโปรตีนตอบสนองความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105)	41
2.5	การเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีนควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนตอบสนองความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	42
2.6	การโคลนชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์	44
2.7	ดีเอ็นเอตรวจตาม (DNA probe)	45
2.8	เทคนิคการทำ Southern blotting	46
2.9	การไฮบริไดซ์กรดนิวคลีอิก (Nucleic acid hybridization)	46
2.10	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	46
2.11	การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนโดยการทำ primer walking	47
2.12	การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์	47
2.13	การศึกษาการแสดงออกของยีนควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนตอบสนองความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ภายใต้สภาวะความเครียดต่างๆ	48

บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย 51

1. ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการงอกและการเจริญของข้าว 51
2. ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการสังเคราะห์โปรตีน 57
   - 2.1 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ 62
3. การแยกและศึกษาคุณลักษณะบางประการของยีนควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนตอบสนองต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 62
   - 3.1 การแยกสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจากใบข้าว 62
   - 3.2 การเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีนโปรตีนตอบสนองต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ 64
   - 3.3 การโคลนชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 65
   - 3.4 การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลน pKD4 66
   - 3.5 การตรวจติดตามการสังเคราะห์ยีนโปรตีนตอบสนองความเครียดเนื่องจากความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization 66

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
4. การศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีนตอบสนองความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ภายใต้สภาวะความเครียดต่างๆ ด้วยเทคนิค RT-PCR	80
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	83
1. ผลของความเครียดเนื่องจากความเค็มที่มีต่อความถี่ในการงอกและการเจริญของข้าว	83
2. ผลของความเครียดเนื่องจากความเค็มที่มีต่อการสังเคราะห์โปรตีน	83
3. คุณลักษณะทางโมเลกุลของยีน WRKY ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	83
4. การแสดงออกของยีน WRKY ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	83
5. การประยุกต์ใช้งานวิจัยในอนาคต	84
เอกสารอ้างอิง	85
ภาคผนวก	99
ภาคผนวก ก	100
ภาคผนวก ข	103
ภาคผนวก ค	105
ภาคผนวก ง	107
ภาคผนวก จ	112
ภาคผนวก ฉ	115
ภาคผนวก ช	120
ภาคผนวก ซ	129
ภาคผนวก ฌ	133
ภาคผนวก ญ	135

สารบัญรูปภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ลักษณะของเมล็ดข้าวตัดตามขวาง	9
ภาพที่ 2	ส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าที่งอกภายใต้สภาวะที่มืด	10
ภาพที่ 3	ส่วนต่าง ๆ ของลำต้นและหน่อของต้นข้าว	11
ภาพที่ 4	ส่วนต่าง ๆ ของช่อดอกและดอกข้าว	12
ภาพที่ 5	ขั้นการเจริญเติบโตในระยะเวลา 120 วัน ของพันธุ์ข้าวในเขตร้อน	13
ภาพที่ 6	แผ่นที่ยีนของดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-Teasy vector	38
ภาพที่ 7	แผนผังแสดงการทดลองทั้งหมด	50
ภาพที่ 8	ผลของความเค็มที่มีต่อความถี่ในการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	52
ภาพที่ 9	ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว (โดยการชั่งน้ำหนักสดของยอดต้นข้าว) ภายหลังจากการให้เกลือที่ความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ กัน	53
ภาพที่ 10	ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว (โดยการชั่งน้ำหนักสดของรากต้นข้าว) ภายหลังจากการให้เกลือที่ความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ กัน	53
ภาพที่ 11	ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว (โดยการชั่งน้ำหนักแห้งของยอดต้นข้าว) ภายหลังจากการให้เกลือที่ความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ กัน	54
ภาพที่ 12	ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว (โดยการชั่งน้ำหนักแห้งของรากต้นข้าว) ภายหลังจากการให้เกลือที่ความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ กัน	54
ภาพที่ 13	ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว ภายหลังจากการเพาะในสารละลายธาตุอาหารนาน 19 วัน และให้เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 25, 50, 75, 100, 150 และ 200 mM เป็นเวลา 3 วัน	55
ภาพที่ 14	ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว ภายหลังจากการเพาะในสารละลายธาตุอาหารนาน 19 วัน และให้เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 25, 50, 75, 100, 150 และ 200 mM เป็นเวลา 5 วัน	55
ภาพที่ 15	ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว ภายหลังจากการเพาะในสารละลายธาตุอาหารนาน 19 วัน และให้เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 25, 50, 75, 100, 150 และ 200 mM เป็นเวลา 7 วัน	56

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 16	ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อการเจริญของต้นกล้าข้าวภายหลังจากการเพาะในสารละลายธาตุอาหารนาน 19 วัน และให้เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 25, 50, 75, 100, 150 และ 200 mM เป็นเวลา 9 วัน	56
ภาพที่ 17	การวิเคราะห์เปรียบเทียบแบบแผนของโปรตีนในต้นกล้าข้าวภายหลังจากการให้เกลือโซเดียมคลอไรด์นาน 3 วัน โดยใช้เทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis	58
ภาพที่ 18	การวิเคราะห์เปรียบเทียบแบบแผนของโปรตีนในต้นกล้าข้าวภายหลังจากการให้เกลือโซเดียมคลอไรด์นาน 5 วัน โดยใช้เทคนิค SDS-polyacrylamide gel Electrophoresis	59
ภาพที่ 19	การวิเคราะห์เปรียบเทียบแบบแผนของโปรตีนในต้นกล้าข้าวภายหลังจากการให้เกลือโซเดียมคลอไรด์นาน 7 วัน โดยใช้เทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis	60
ภาพที่ 20	การวิเคราะห์เปรียบเทียบแบบแผนของโปรตีนในต้นกล้าข้าวภายหลังจากการให้เกลือโซเดียมคลอไรด์นาน 9 วัน โดยใช้เทคนิค SDS-polyacrylamide gel Electrophoresis	61
ภาพที่ 21	แถบ genomic DNA ที่แยกสกัดได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	63
ภาพที่ 22	แถบอาร์เอ็นเอที่แยกสกัดได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	63
ภาพที่ 23	แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีนควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนตอบสนองต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ TRFOS1 และ TRFOS2	64
ภาพที่ 24	แถบพลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากโคลน pKD4 ภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI	65
ภาพที่ 25	โครมาโตแกรมและลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 600 pb จากโคลน pKD4 เมื่อใช้ universal forward primer	67
ภาพที่ 26	โครมาโตแกรมและลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 600 pb จากโคลน pKD4 เมื่อใช้ universal reverse primer	68
ภาพที่ 27	ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 0.6-kb ในโคลน pKD4 และตำแหน่งของไพรเมอร์ TRFOS1 และ TRFOS2	69
ภาพที่ 28	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิภายหลังจากการตัดแบบ single digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	70

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 29	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิเกิดปฏิกิริยาไฮบริไดซ์เซชั่น (hybridization pattern) กับดีเอ็นเอตรวจติดตามภายหลังจากการตัดแบบ single digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	71
ภาพที่ 30	แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้ไพรเมอร์ OsWRKY4 และ OsWRKY5	73
ภาพที่ 31	แถบพลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากโคโลนีสีขาวซึ่งคาดว่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่บนโมเลกุลของพลาสมิด	74
ภาพที่ 32	แถบพลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากโคโลนีสีขาวภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI	75
ภาพที่ 33	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ WRKY transcriptional factor 6 ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	76
ภาพที่ 34	ลำดับกรดอะมิโนของยีน WRKY ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	77
ภาพที่ 35	แผนที่แสดง WRKY domain ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	77
ภาพที่ 36	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน (multiple alignment) ระหว่าง WRKY Transcriptional factors ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับโปรตีนที่เกี่ยวข้อง	79
ภาพที่ 37	ผลการปรับความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่แยกสกัดจากใบข้าวที่สภาวะความเครียดต่างๆ	81
ภาพที่ 38	ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน WRKY ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ที่สภาวะความเครียดต่างกันด้วยเทคนิค RT-PCR	81
ภาพที่ 39	ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *L. polychrous* glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase	82
ภาพที่ 40	กราฟมาตรฐานของโปรตีนด้วยวิธี Bradford โดยใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน	128

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ปริมาณและมูลค่าการส่งออกข้าวของประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2540-2544	1
ตารางที่ 2	พื้นที่ปลูกข้าวนาปีในประเทศไทย ปริมาณผลผลิตและปริมาณผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ในปี พ.ศ. 2540-2542	2
ตารางที่ 3	ลักษณะความแตกต่างของข้าว indica, japonica และ javanica	8
ตารางที่ 4	การจำแนกระดับความเค็มที่มีผลต่อพืช	16
	Cytochrome P450 gene จากต้นไข่เน่ากับสิ่งมีชีวิตอื่น	
ตารางที่ 5	ค่าการนำไฟฟ้าในสารละลายดิน (EC) ในสารละลายดินบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 20 °C	18
ตารางที่ 6	การประมาณการณ์โดยรวมของการเกิดดินเค็มโดยมีสาเหตุมาจากการกระมนุษย์ในพื้นที่ชลประมาณของโลก	20
ตารางที่ 7	ชนิดของโปรตีนที่เกิดขึ้นเมื่อได้รับความเครียดเนื่องจากความเค็มในพืชชนิดต่างๆ	28
ตารางที่ 8	ชนิดของเอนไซม์และตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ	37
ตารางที่ 9	รายชื่อชุดสำเร็จรูปที่ใช้ในการทดลอง	39
ตารางที่ 10	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของยีนโปรตีนตอบสนองความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	43
ตารางที่ 11	ผลของความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีต่อความถี่ในการงอกของข้าว	52
ตารางที่ 12	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของยีนโปรตีนตอบสนองต่อความเครียดเนื่องจากความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	62
ตารางที่ 13	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน WRKY ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	73
ตารางที่ 14	การเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนในระหว่าง WRKY transcriptional factor 6 จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับ WRKY transcriptional factor สิ่งมีชีวิตอื่น	78
ตารางที่ 15	การเตรียมสต็อกสารละลายธาตุอาหาร	106
ตารางที่ 16	การเตรียม dilutes albumin (BSA) standard	127