การแสดงออกในระยะแรกของยีนใหม่ที่ตอบสนองต่อความเค็มในข้าว *Oryza sativa* L. หลังจากได้รับภาวะเครียดจากความเค็มและภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ

นางสาวนนทลี ชำนัญมนูญธรรม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EARLY EXPRESSSION OF THE NOVEL SALT-RESPONSIVE GENE IN RICE

Oryza sativa L. AFTER SALT AND VARIOUS ABIOTIC STRESSES

Miss Nontalee Chamnanmanoontham

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแสดงออกในระยะแรกของยีนใหม่ที่ตอบสนองต่อความเค็มในข้าว *Oryza sativa* L. หลังจากได้รับภาวะเครียดจากความเค็มและภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ
โดย	นางสาวนนทลี ชำนัญมนูญธรรม
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

………………………………………….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……………………………………… ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญ-หลง)

……………………………………… อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

……………………………………… กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ยุพิน จินตภากร)

……………………………………… กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.รักชนก โคโต)

นนทลี ชำนัญมนูญธร รม: การแสดงออกในระยะแรกของยีนใหม่ที่ตอบสนองต่อความเค็มในข้าว *Oryza sativa* L. หลังจากได้รับภาวะเครียดจากความเค็มและภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ (EARLY EXPRESSION OF THE NOVEL SALT-RESPONSIVE GENE IN RICE *Oryza sativa* L. AFTER SALT AND VARIOUS ABIOTIC STRESSES) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์, 82 หน้า

นิวคลีโอลิน (nucleolin) เป็น multifunctional protein ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการสร้างไรโบโซม พบมากบริเวณนิวคลีโอลัส ผลการศึกษาพบว่ายีนนิวคลีโอลิน (*OsNUC1*) ในข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็ม คือ พันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และพันธุ์ขาวดอกมะลิ (KDML105) และข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม คือ สายพันธุ์เหลืองประทิว 123-TC171 (LPT123-TC171) และ FL530-introgression line (FL530-IL) มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังจากได้รับภาวะเค็มภายใน 24 ชั่วโมง โดยมีระดับการแสดงออกสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง ชี้นำว่ายีนนี้น่าจะมีการแสดงออกแบบ circadian rhythm เมื่อศึกษาอิทธิพลของกรดแอบไซซิก (ABA) ต่อการแสดงออกของยีน พบว่าเมื่อให้ ABA และ anti-ABA (abamineSG) จากภายนอกแก่ข้าวทั้งในภาวะปกติและภาวะเค็ม ไม่มีผลต่อการควบคุมการแสดงออก ของยีน ชี้ให้เห็น ว่าการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ถูกควบคุมผ่านทาง ABA-independent pathway นอกจากนี้หลังจากให้ภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ คือ ภาวะแล้ง ภาวะเครียดจากโลหะหนัก และภาวะเครียดจากอุณหภูมิต่ำแก่ข้าวสายพันธุ์ LPT123-TC171 พบว่ายีนนี้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังจากได้รับความเครียดจาก 100 μM $CuSO_4$ 100 μM $CdCl_2$ หรือภาวะแล้ง ในการศึกษาบทบาทของ RNA recognition motif (RRM) และ glycine-arginine rich (GAR) domain ของนิวคลีโอลินต่อความสามารถในการทนต่อโลหะหนักโดยนำ Arabidopsis ที่ได้รับการถ่าย cDNA บางส่วนของนิวคลีโอลินที่สร้าง RRM และ GAR domain ภายใต้การควบคุมของ *CaMV35S* promoter มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม 25 50 และ 75 μM $CuSO_4$ หรือ 50 75 และ 100 μM $CdCl_2$ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีนมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากกว่าพันธุ์ปกติในทุกชุดการทดลอง ยกเว้นในอาหารสูตร MS ที่มีการเติม 100 μM $CdCl_2$ น้ำหนักแห้งของทั้งพืชที่ได้รับการถ่ายยีนและพืชพันธุ์ปกติ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สาขาวิชา…เทคโนโลยีชีวภาพ… ลายมือชื่อนิสิต...

ปีการศึกษา….......2552…......... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก............................

5172326023: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: RICE/ NUCLEOLIN/ SALT STRESS/ HEAVY METAL STRESS

NONTALEE CHAMNANMANOONTHAM: EARLY EXPRESSION OF THE NOVEL SALT-RESPONSIVE GENE IN RICE *Oryza sativa* L. AFTER SALT AND VARIOUS ABIOTIC STRESSES. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SUPACHITRA CHADCHAWAN, Ph.D., 82 pp.

Nucleolin is a multifunctional protein involving in metabolism of cells especially ribosome biogenesis. It mainly presents in the nucleolus. In this study, we investigated the Rice *nucleolin* (*OsNUC1*) gene expression in 4 rice cultivars/lines, which were salt-sensitive lines (LPT123 and KDML105) and salt-tolerance lines (LPT123-TC171 and FL530-IL). It was found that this gene was up-regulated after salt stress within 24 hours and was moderately higher until reaching a peak at 12 hours after salt stress. These characters suggest circadian rhythm expression pattern. To study the effects of abscisic acid (ABA) on *OsNUC1* gene expression, exogenous ABA and anti-ABA (abamineSG) application does not regulate gene expression pattern. This suggested that *OsNUC1* gene expression was regulated via ABA-independent pathway. Moreover, under various abiotic stresses, *OsNUC1* gene expression in LPT123-TC171 rice line was up-regulated after stress with 100 µM $CuSO_4$, 100 µM $CdCl_2$ or drought. To investigate the influence of RNA recognition motif (RRM) and glycine-arginine rich (GAR) domain of rice nucleolin on heavy metal tolerance ability, transgenic Arabidopsis plants, containing partial *OsNUC1* cDNA encoding RRM and GAR domain under *CaMV35S* promoter were used. It was found that transgenic Arabidopsis had a significant higher fresh weight and dry weight when grew in MS medium or MS medium containing 25, 50, 75 µM $CuSO_4$ or 50, 75 µM $CdCl_2$ for two weeks. However, growing in MS medium supplemented with 100 µM $CdCl_2$, the transgenic lines showed the higher fresh weight than wild type, but the dry weights of both transgenic lines and wild type plant were not statistically different.

Field of study:.....Biotechnology.... Student's Signature...

Academic Year:..........2009............ Advisor's Signature...

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร .ศุภจิตรา ชัชวาลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำต่าง ๆ ในการแก้ไขปัญหาอันเป็น ประโยชน์ยิ่งตลอดการทำวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร .ปรีดา บุญ -หลง ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. ยุพิน จินตภากร และ อาจารย์ ดร . รักชนก โคโต กรรมการสอบ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร .อัญชลี ทัศนาขจร หน่วยวิจัยอณูชีววิทยาและจีโนมกุ้ง ภาควิชาชีวเคมี ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเครื่องมือ iCycler™ Thermal Cycler ที่ใช้ในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ธีรยุทธ ตู้จินดา หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเมล็ดข้าวสายพันธุ์ FL530-introgression line ที่ใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” ที่มอบเงินทุนสำหรับการทำวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณฐปนา บางยี่ขัน คุณศิริพร ศรีภิญโญวณิชย์ และทุกท่านในหน่วยปฏิบัติการวิจัยสิ่งแวดล้อมและสรีรวิทยาของพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการ คำแนะนำ และกำลังใจในการทำวิจัยโดยตลอด

ขอขอบคุณทุกท่านในภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่สนับสนุนในทุก ๆ ด้าน ตลอดจนความห่วงใยและเป็นกำลังใจให้เสมอมา จนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ
กิตติกรรมประกาศ .... ฉ
สารบัญ .... ช
สารบัญตาราง.. ฌ
สารบัญรูปภาพ .... ฎ
อักษรย่อ .... ฐ

บทที่

1. บทนำ.. 1
2. ตรวจเอกสาร.. 3
    1. ภาวะเค็มต่อการแสดงออกของยีน 3
    2. นิวคลีโอลิน 4
        โครงสร้างของนิวคลีโอลิน 5
        หน้าที่ของนิวคลีโอลิน 8
3. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง.. 11
    พืชทดลอง.. 11
    สถานที่ปลูกพืชทดลอง.. 11
    อุปกรณ์การศึกษา 11
    สารเคมี.. 14
    วิธีการทดลอง.. 16
4. ผลการทดลอง 21
    1. ศึกษาการแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่มีความสามารถในการทนเค็มแตกต่างกัน.. 21
    2. ศึกษาอิทธิพลของกรดแอบไซซิกต่อการแสดงออกของยีน *OsNUC1* 25
        2.1. การแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่ได้รับกรดแอบไซซิก (ABA) จากภายนอกในภาวะปกติและภาวะเค็ม 25

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

2.2. การแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่ได้รับ ABA inhibitor (abamineSG) จากภายนอกในภาวะปกติและภาวะเค็ม.......................... 32

3. ศึกษาการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่ได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ.......................... 39

4. ศึกษาความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดจากโลหะหนักของ *Arabidopsis thaliana* L. ที่ได้รับการถ่ายยีน partial *OsNUC1* 41

5. อภิปรายผลการทดลอง 51

1. ศึกษาการแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่มีความสามารถในการทนเค็มแตกต่างกัน.......................... 51

2. ศึกษาอิทธิพลของกรดแอบไซซิกต่อการแสดงออกของยีน *OsNUC1* 53

2.1. การแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่ได้รับกรดแอบไซซิก (ABA) จากภายนอกในภาวะปกติและภาวะเค็ม 53

2.2. การแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่ได้รับ ABA inhibitor (abamineSG) จากภายนอกในภาวะปกติและภาวะเค็ม.......................... 54

3. ศึกษาการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่ได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ.......................... 55

4. ศึกษาความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดจากโลหะหนักของ *Arabidopsis thaliana* L. ที่ได้รับการถ่ายยีน partial *OsNUC1* 56

6. สรุปผลการทดลอง.......................... 59

รายการอ้างอิง.......................... 62

ภาคผนวก.......................... 69

ภาคผนวก ก 70

ภาคผนวก ข 73

ภาคผนวก ค 77

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 82

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ตัวอย่างยีนนิวคลีโอลินในพืชชนิดต่าง ๆ 9

2 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวพันธุ์/สายพันธุ์ LPT123 LPT123-TC171 KDML105 และ FL530-IL ที่ระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 24

3 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวพันธุ์/สายพันธุ์ LPT123 LPT123-TC171 KDML105 และ FL530-IL ที่ระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากได้รับ ABA จากภายนอก ในภาวะปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 28

4 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวพันธุ์/สายพันธุ์ LPT123 LPT123-TC171 KDML105 และ FL530-IL ที่ระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากได้รับ ABA จากภายนอก ในภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 31

5 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวพันธุ์/สายพันธุ์ LPT123 LPT123-TC171 KDML105 และ FL530-IL ที่ระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากได้รับ abamineSG จากภายนอกในภาวะปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 35

6 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวพันธุ์/สายพันธุ์ LPT123 LPT123-TC171 KDML105 และ FL530-IL ที่ระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากได้รับ abamineSG จากภายนอกในภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 38

7 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ที่ได้จากการวัด band intensity ด้วยโปรแกรม Quality One ในข้าวสายพันธุ์ LPT123-TC171 หลังจากได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วยวิธี RT-PCR 40

8 น้ำหนักสดของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน 43

9 น้ำหนักแห้งของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน 44

10 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS 45

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

11 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS 46

12 น้ำหนักสดของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน 47

13 น้ำหนักแห้งของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน 48

14 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS 49

15 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS 50

16 ส่วนจดจำบน putative indica *OsNUC1* promoter 52

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1	ส่วนประกอบสำคัญของนิวคลีโอลิน และ nucleolin-like protein	5
2	หน้าที่ของนิวคลีโอลินในการควบคุม cell cycle และ ribosome biogenesis	8
3	ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123 (ก) LPT123-TC171 (ข) หลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	22
4	ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว KDML105 (ก) และ FL530-IL (ข) หลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	23
5	ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123 (ก) LPT123-TC171 (ข) หลังจากได้รับ ABA จากภายนอกในภาวะปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	26
6	ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว KDML105 (ก) และ FL530-IL (ข) หลังจากได้รับ ABA จากภายนอกในภาวะปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	27
7	ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123 (ก) LPT123-TC171 (ข) หลังจากได้รับ ABA จากภายนอกในภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	29
8	ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว KDML105 (ก) และ FL530-IL (ข) หลังจากได้รับ ABA จากภายนอกในภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	30
9	ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123 (ก) LPT123-TC171 (ข) หลังจากได้รับ abamineSG จากภายนอกในภาวะปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	33
10	ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว KDML105 (ก) และ FL530-IL (ข) หลังจากได้รับ abamineSG จากภายนอกในภาวะปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	34
11	ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123 (ก) LPT123-TC171 (ข) หลังจากได้รับ abamineSG จากภายนอกในภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	36
12	ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว KDML105 (ก) และ FL530-IL (ข) หลังจากได้รับ abamineSG จากภายนอกในภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	37
13	การแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123-TC171 หลังจากได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	39
14	ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123-TC171 หลังจากได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วยวิธี RT-PCR	40
15	น้ำหนักสดของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน	43

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ หน้า

16 น้ำหนักแห้งของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน 44
17 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS 45
18 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS 46
19 น้ำหนักสดของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน 47
20 น้ำหนักแห้งของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน 48
21 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS........ 49
22 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS........ 50

อักษรย่อ

µl	ไมโครลิตร
ml	มิลลิลิตร
ng	นาโนกรัม
µM	ไมโครโมลาร์
mM	มิลลิโมลาร์
100 µM ABA	สารละลาย ABA ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์
100 µM abamineSG	สารละลาย abamineSG ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์
25 µM $CuSO_4$	สารละลาย $CuSO_4$ ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์
50 µM $CuSO_4$	สารละลาย $CuSO_4$ ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์
75 µM $CuSO_4$	สารละลาย $CuSO_4$ ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์
50 µM $CdCl_2$	สารละลาย $CdCl_2$ ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์
75 µM $CdCl_2$	สารละลาย $CdCl_2$ ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์
100 µM $CdCl_2$	สารละลาย $CdCl_2$ ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ภาวะเค็มเป็นปัจจัยทางกายภาพอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิต คาดว่าในอีก 25 ปีข้างหน้าจะสูญเสียพื้นที่การเกษตรถึง 30% (Wang และคณะ, 2003) ปัญหานี้มีผลต่อการปลูกพืชสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย เช่น ข้าว (*Oryza sativa*) ข้าวโพด (*Zea mays*) ถั่วเหลือง (*Glycine max*) เป็นต้น (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิยา, 2535)

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย มีมูลค่าการส่งออกเป็นอันดับหนึ่งของโลก (FAO Rice Market Monitor, 2009) ดังนั้นจึงมีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีผลผลิตต่อไร่สูง มีความต้านทานต่อโรคหรือแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญ และทนต่อสภาวะแวดล้อมที่มีปัญหา เช่น ภาวะน้ำท่วม ภาวะแล้ง และภาวะเค็ม เป็นต้น

จากงานวิจัยที่ผ่านมามีการค้นพบยีนใหม่ที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มในข้าว ได้แก่ *OsD1B 18-18 (OsNUC1)* (สมพร มณีประสพสุข, 2547) เป็นยีนในกลุ่มของ nucleolar protein ที่ยังไม่มีการศึกษาบทบาทหน้าที่ต่อการทนเค็มของพืช ดังนั้นการศึกษายีนกลุ่มนี้จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ทำให้เข้าใจกลไกการปรับตัวของพืชเมื่ออยู่ในภาวะเค็ม

กรดแอบไซซิก (ABA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่มีบทบาทสำคัญเมื่อพืชอยู่ในภาวะเครียด (He และ Li, 2008) โดย ABA ทำหน้าที่เป็นสารสื่อสัญญาณกระตุ้นให้ยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดมีการแสดงออกมากขึ้นโดยผ่าน ABA-dependent pathway เช่น ยีน *OsP5CS1* และ *OsP5CS2* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง proline ในข้าว (Hura และคณะ, 2004; Sripinyowanich และคณะ, 2010) และยีน protein kinase *SnRK2* เกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายทอดสัญญาณในภาวะเครียดออสโมติก (Kobayashi และคณะ, 2004) เป็นต้น อย่างไรก็ดียังมียีนที่ตอบสนองต่อความเครียดอีกหลายยีนที่ทำงานผ่านทาง ABA-independent pathway เช่น ยีน *OsDREB* เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสของ DNA มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อข้าวได้รับภาวะเค็มและอุณหภูมิต่ำ (Ito และคณะ, 2006) การหาความสัมพันธ์ของยีนกับ ABA จะช่วยทำให้เข้าใจกระบวนการการตอบสนองต่อความเค็มมากขึ้น

กระบวนการการสร้าง ABA ในพืช (ABA biosynthesis pathway) จะมีเอนไซม์ควบคุมปฏิกิริยาที่สำคัญ คือ 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) ซึ่งเอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งโดย abamineSG ทำให้ไม่สามารถสร้าง ABA ในพืชได้ โดยที่ความเข้มข้น 100 µM จะยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ ABA ใน Arabidopsis ได้ถึง 77% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Kitahata และคณะ, 2006) ส่วนในข้าวเมื่อใช้ abamineSG ความเข้มข้น 50 µM จะยับยั้งการสร้าง ABA ในใบได้ถึง 62% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Sripinyowanich และคณะ, 2010) นอกจากนี้ยังมีผลทำให้ยีนที่ตอบสนองต่อ ABA ถูกยับยั้งไปด้วย จึงเลือกใช้ abamineSG เป็นส่วนหนึ่งในการศึกษาอิทธิพลของ ABA ต่อการแสดงออกของยีน *OsNUC1*

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกในระยะแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่มีความสามารถในการทนเค็มแตกต่างกัน จะทำให้ทราบการตอบสนองของยีนนี้ในภาวะเค็มและความสัมพันธ์กับ ABA ตลอดจนการตอบสนองต่อภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกในช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่มีความสามารถในการทนเค็มแตกต่างกัน และอิทธิพลของกรดแอบไซซิกต่อการแสดงออกของยีน รวมถึงการแสดงออกของยีนหลังจากได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้รูปแบบการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่มีความสามารถในการทนเค็มแตกต่างกัน และการตอบสนองของยีนนี้ต่อภาวะเครียดทางกายภาพอื่น ๆ นำไปสู่ความรู้ความเข้าใจกลไกการตอบสนองของพืชเมื่อได้รับภาวะเครียด

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาการแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่มีความสามารถในการทนเค็มแตกต่างกัน
2. ศึกษาอิทธิพลของกรดแอบไซซิกต่อการแสดงออกของยีน *OsNUC1*
3. ศึกษาการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่ได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ
4. ศึกษาความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดจากโลหะหนักของ *Arabidopsis thaliana* L. ที่ได้รับการถ่ายยีน partial *OsNUC1*

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

1. *ภาวะเค็มต่อการแสดงออกของยีน*

ภาวะเค็มเป็นปัจจัยทางกายภาพที่ส่งผลต่อเมแทบอลิซึมภายในพืช ลักษณะทางสรีรวิทยาภายนอก ซึ่งส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช รวมทั้ง ปริมาณและคุณภาพของผลผลิต (Mansour และ Salama, 2004) พืชที่ได้รับภาวะเค็มจำเป็นต้องมีกลไกการปรับตัวเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ โดยกลไกการปรับตัวนี้เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน

จากการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) กับยีนในข้าวทนเค็มสายพันธุ์เหลืองประทิว123-TC171 (LPT123-TC171) ภายใต้ภาวะเค็มโดยใช้เทคนิค differential display ค้นพบชิ้นส่วนของยีน *OsD1B18-18* ซึ่งมีความคล้ายกับยีน *OsNUC1* หรือ นิวคลีโอลิน โดยการแสดงออกของยีนดังกล่าวในข้าวทั้งสองพันธุ์ /สายพันธุ์มีรูปแบบแตกต่างกัน คือ ในข้าวพันธุ์ LPT123 ไม่พบการแสดงออกของยีนในภาวะปกติ แต่มีการแสดงออกของยีนสูงขึ้นหลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับในข้าวสายพันธุ์ LPT123-TC171 พบการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในภาวะปกติและสูงขึ้นหลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (สมพร มณีประสพสุข, 2547) แต่ยังไม่พบการรายงานการแสดงออกในระยะแรกของยีนนิวคลีโอลินในข้าวในภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ

กรดแอบไซซิก (ABA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่มีบทบาทสำคัญเมื่อพืชอยู่ในภาวะเครียด (He และ Li, 2008) โดย ABA ทำหน้าที่เป็นสารสื่อสัญญาณให้ยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดมีการแสดงออกมากขึ้นโดยผ่านทาง ABA-dependent pathway ตัวอย่างเช่น ยีน *OsP5CS1* และ *OsP5CS2* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง proline ในข้าว (Sripinyowanich และคณะ, 2010; Hura และคณะ, 2004) อย่างไรก็ดียังมียีนที่ตอบสนองต่อความเครียดอีกหลายยีนที่ทำงานผ่านทาง ABA-independent pathway เช่น ยีน *OsDREB* เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสของ DNA พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในข้าวหลังจากได้รับภาวะเค็มและอุณหภูมิต่ำ (Ito และคณะ, 2006) ดังนั้นการหาความสัมพันธ์ของยีนกับ ABA จะช่วยทำให้เข้าใจกระบวนการการตอบสนองต่อความเค็มยิ่งขึ้น

2. นิวคลีโอลิน

นิวคลีโอลิน (nucleolin) เป็นโปรตีนที่สำคัญในยูคาริโอต เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการสร้างไรโบโซม นิวคลีโอลิน ค้นพบครั้งแรกใน Chinese hamster ovary (CHO) cells โดย Orrick และคณะ (1973) ในช่วงแรกจะเรียกว่า C23 ซึ่งเป็นการเรียกตามตำแหน่งบน two-dimensional gel โดยพบนิวคลีโอลินมากถึง 10% ของโปรตีนทั้งหมดที่พบในนิวคลีโอลัส มีน้ำหนักประมาณ 100 - 110 kDa แต่ในงานวิจัยของ Lapeyre และคณะ (1987) ทำการโคลน cDNA ของยีนนิวคลีโอลินจากแฮมสเตอร์ พบว่าได้โปรตีนที่ประกอบด้วย 713 กรดอะมิโน คาดคะเนน้ำหนักได้เท่ากับ 77 kDa ซึ่งข้อขัดแย้งนี้ภายหลังเชื่อว่ามีสาเหตุมาจากส่วนประกอบของกรดอะมิโนในบริเวณ N-terminal domain ของนิวคลีโอลิน

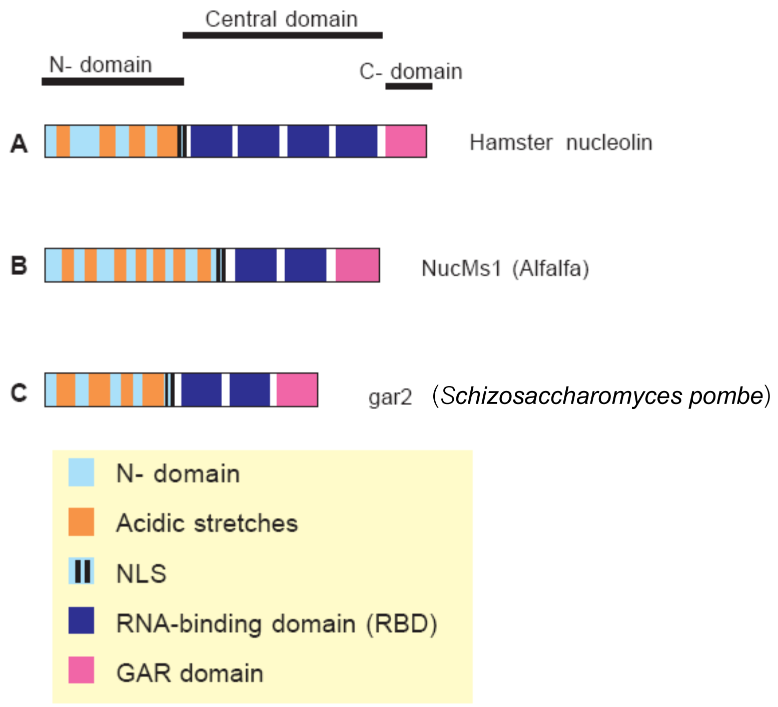
small nucleolar RNAs (snoRNAs) จำเป็นต่อกระบวนการการสร้าง 28S, 18S, and 5.8S rRNA การลดการแสดงออก snoRNAs โดยเทคนิค antisense แสดงให้เห็นว่าโปรตีนนี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับ chaperone ในกระบวนการสร้าง pre-rRNA และการที่พบส่วนของ U20 snoRNA ใน intron 11 ของยีนนิวคลีโอลินในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่ระบุว่าหน้าที่ของนิวคลีโอลินเกี่ยวข้องกับการสร้างไรโบโซม (Srivastava และคณะ, 1990)

การสร้างไรโบโซม (ribosome biogenesis) เป็นกระบวนการหนึ่งในการสร้าง ribonucleo-particle เกี่ยวข้องกับ complex rRNA maturation กระบวนการนี้สำคัญในการดำรงชีวิตของเซลล์ ซึ่ง เกิดขึ้นในนิวคลีโอลัส (Eichler และ Craig, 1994) เริ่มต้นที่การสร้าง ribosomal RNAs (5.8S, 18S, และ 28S) โดยเอนไซม์ RNA polymerase I ซึ่งการถอดรหัสนี้จะมีความสัมพันธ์กับโปรตีน 2 ประเภท คือ ribosomal protein ซึ่งพบใน mature cytoplasmic ribosome และกลุ่มของโปรตีนซึ่งหนึ่งในนั้นคือนิวคลีโอลิน เกาะอยู่กับ preribosome ในนิวคลีโอลัส

ภายในนิวคลีโอลัส (nucleolus) ประกอบด้วย pre-ribosome และโปรตีนที่ทำหน้าที่เฉพาะ เช่น RNA polymerase I, protein kinases, phosphatases, methylases และ nucleases ส่วนกระบวนการต่าง ๆ ที่เกิดในนิวคลีโอลัส ได้แก่ ribosomal RNA (rRNA) transcription, rRNA modification, rRNA maturation หรือ rRNA รวมกับ ribosomal protein เรียกว่า pre-ribosomal particles ซึ่งจะเกิดเพียงชั่วคราว จากนั้นส่งออกสู่ cytoplasm เพื่อเป็น mature ribosome ต่อไป

โครงสร้างของนิวคลีโอลิน

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่ามี domain ที่สำคัญอยู่ 3 ส่วนแสดงดังรูปที่ 1 ได้แก่ N-terminal domain ประกอบด้วย acidic region กระจายอยู่และมี phosphorylation site Central domain ประกอบด้วย RNA-binding domain เรียกว่า RBD หรือ RRM domain C-terminal domain ประกอบด้วย N^G,N^G-dimethylarginines เรียกว่า GAR หรือ RGG domain ซึ่งมี glycine และ arginine residues เป็นจำนวนมาก (Lischwe และคณะ, 1982)



รูปที่ 1 ส่วนประกอบสำคัญของนิวคลีโอลิน และ nucleolin-like protein (Ginisty และคณะ, 1999)

2.1. N-Terminal Domain

ส่วนนี้ประกอบด้วย acidic sequence ซ้ำกันหลายอันกระจายตัวอยู่ ซึ่งจำนวนซ้ำจะแตกต่างกันตามชนิดของสิ่งมีชีวิต เช่น หนู คน และไก่ มี 4 ซ้ำ nucleolin-like protein จากถั่ว (pea) และ Arabidopsis มี 7 ซ้ำ และใน alfalfa มี 9 ซ้ำ จะเห็นว่า nucleolin-like proteins ในพืชมีจำนวนซ้ำมากกว่า แต่ เป็นส่วนสั้น ๆ เมื่อเทียบกับในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น มีความยาวประมาณ 10 ถึง 20 กรดอะมิโน จากโครงสร้างที่ประกอบด้วย lysine และ proline residues ทำให้ในส่วนนี้มีประจุเป็นลบและแตกต่างกัน ดังนั้นการหามวลโมเลกุลจาก SDS-PAGE จึงได้ค่าที่แตกต่างกับการประมาณโดยคำนวณจากน้ำหนักกรดอะมิโน การเคลื่อนที่ของโปรตีน เหล่านี้ใน SDS-PAGE จะช้ากว่าปกติ ทำให้ได้มวลโมเลกุลมากขึ้น ตัวอย่างเช่น ในยีสต์คำนวณมวลโมเลกุลจากลำดับกรดอะมิโนได้เท่ากับ 44 kDa แต่จาก SDS-PAGE ได้เท่ากับ 67 kDa (Lee และคณะ, 1991)

ส่วนปลายของ N-terminal domain พบว่ามีส่วน bipartite NLS motifs และจดจำ monopartite NLS motifs ชนิด SV-40 ซึ่งหน้าที่ของ bipartite NLS จะเป็นตัวกำหนดให้โปรตีนเคลื่อนที่ไปยังนิวเคลียส ตัวอย่างเช่น <u>KRKK</u>EMAKQAAPEA<u>KKQK</u> ในนิวคลีโอลินของคน <u>KKRK</u>SEDAEEEEDEESSN<u>KKQK</u> ในยีสต์ (NSR1) <u>KKGK</u>RQAEEEIKKVSA<u>KKQK</u> ในถั่ว และ <u>KKGK</u>RNAEDEIEKAVSA<u>KKQK</u> ในข้าว (OsNUC1) แต่ว่าไม่พบ signal sequence ที่กำหนดให้นิวคลีโอลินเคลื่อนที่ไปยังนิวคลีโอลัส จึงสันนิษฐานว่าการ ที่นิวคลีโอลินมีการสะสมในนิวคลีโอลัสเป็นผลมาจากการที่นิวคลีโอลินจับอย่างจำเพาะกับส่วนประกอบของนิวคลีโอลัสอื่น ๆ โดยเฉพาะ rDNA rRNA และโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้าง nucleolar matrix (Schmidt-Zachmann และ Nigg, 1993)

2.2. Central Domain

บริเวณนี้เป็นส่วนของ RNA recognition motifs (RRM) หรือ consensus RNA-binding domain (CS-RBD) ซึ่งจะถูกอนุรักษ์ไว้ในหลายสิ่งมีชีวิต เกี่ยวข้องในกระบวนการ package ของ heterogeneous RNA, pre-mRNA splicing และเป็นส่วนประกอบของ pre-ribosomes เกี่ยวข้องกับการสร้าง poly(A) tail และ maturation การควบคุมการแปลรหัส และ mRNA stability โดยส่วนมาก RRM มักจะมีกรดอะมิโน 80 ถึง 90 ชนิด (Query และคณะ, 1989) ซึ่งในข้าวพบ RRM-1 2 ส่วน คือ LFVGNLPYNVEQEQVKQFFQEAGEVVDIRFSTFEDGNFRGFGHVEFATAEAAKK ALELAGHDLMGRPVR และ IFIKGFDTSLDIHQIRNSLEEHFGSCGEITRVSIPRDYETGASKG MAYMDFADNGSLSKAYELNGSDLGGYSLY ซึ่ง RRM จะจับอย่างจำเพาะกับโครงสร้าง short

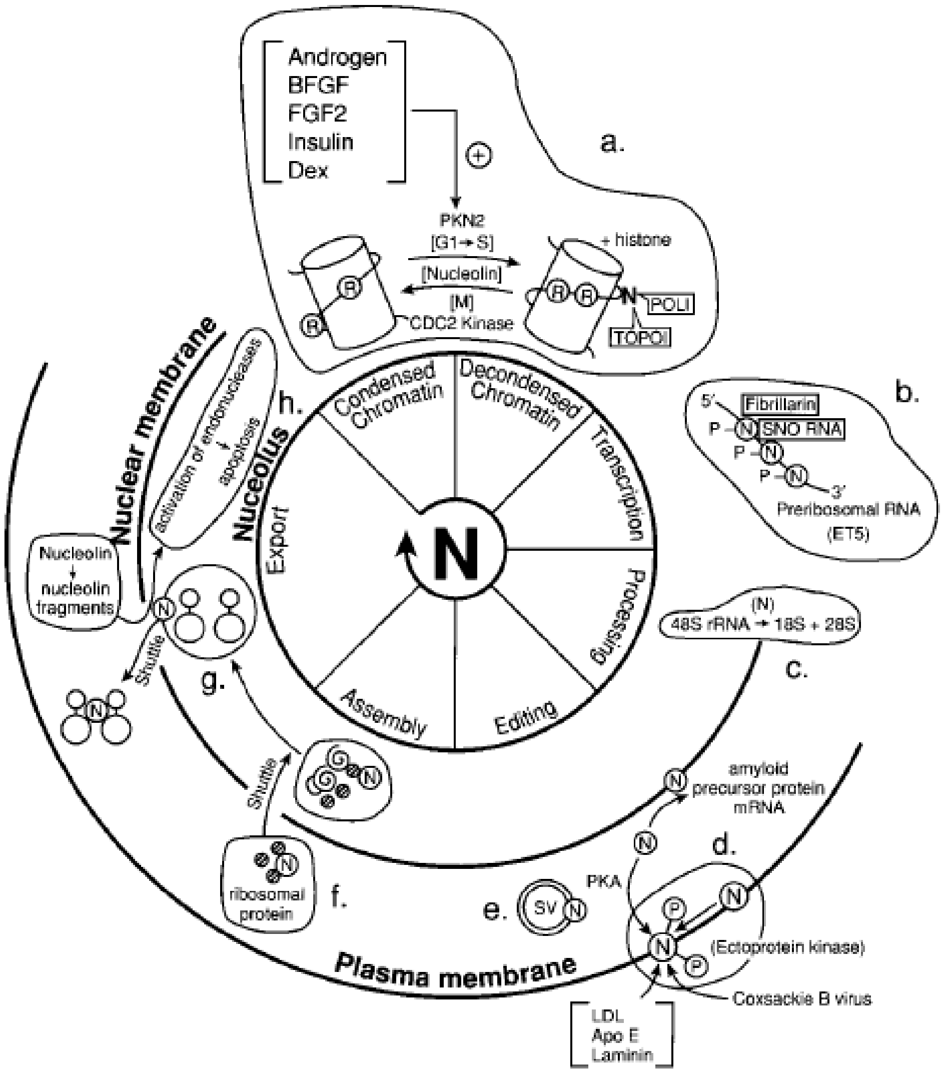
RNA stem-loop ของ 18S และ 28S ribosomal สลับกันระหว่าง hydrophilic และ hydrophobic segments และเหมือนกับโปรตีนของ spliceosomes บางส่วน

2.3. C-Terminal Domain

C-terminal domain ประกอบด้วยส่วนของ glycine-arginine-rich (GAR) ทั่วไปเรียกว่า RGG domain นอกจากนี้ยังพบว่ามี phenylalanine และ N^G,N^G-dimethylarginine residues ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงบน arginine ใน GAR domain โดยเอนไซม์ methyltransferase ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ไม่จำเป็นต่อความจำเพาะระหว่าง GAR domain กับ RNA หรือโปรตีนเสมอไป แต่จะช่วยให้เกิด interaction ระหว่างนิวคลีโอลินกับ RNA-binding domain (RBD) ได้ดีขึ้น เมื่อมีการจับของ GAR domain กับ RBD อย่างน้อย 1 แห่ง จะทำให้มีการสะสมใน นิวคลีโอลัส นอกจากนี้ GAR domain ยังเป็นส่วนที่เกิด protein-protein interaction อีกด้วย (Bogre และคณะ, 1996)

หน้าที่ของนิวคลีโอลิน

จากโครงสร้างของนิวคลีโอลิน จะเห็นว่าประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ที่สามารถจับกับ DNA, RNA และโปรตีนได้ ชี้ให้เห็นว่าบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้อง ในการควบคุมกิจกรรมภายในเซลล์ แสดงดังรูปที่ 2 ซึ่งเป็นภาพรวมบทบาทหน้าที่ของนิวคลีโอลินในการควบคุม cell cycle และ ribosome biogenesis ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม



รูปที่ 2 หน้าที่ของนิวคลีโอลินในการควบคุม cell cycle และ ribosome biogenesis

a.) Chromatin condensation and decondensation b.) Nucleolin and pre-RNA c.) Maturation of 48S RNA d.) Cell surface functions e.) Secretory vesicle expression f.) Shuttling activities g.) Export activities h.) Cell death and apoptosis (Srivastava และ Pollard, 1999)

การศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่ของนิวคลีโอลินโดยส่วนมากจะเป็นการศึกษาในสัตว์ คน และยีสต์ สำ หรับในพืชยังมีไม่มากนัก จากการศึกษาในฐานข้อมูลของ NCBI พบว่ามียีนที่คล้ายกับนิวคลีโอลินในพืชหลายชนิด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างยีนนิวคลีโอลินในพืชชนิดต่าง ๆ

Accession No.	Organism	**ชื่อ**	**จำนวนเบส**
L43510	*Pisum sativum* (Pea)	putative nucleolin	2188 bp
AB087677	*Nicotiana tabacum* (Tobacco)	*NNF1*	2156 bp
AY644645	*Oryza sativa* (indica cultivar-group)	putative nucleolin	2039 bp
X88845	*Medicago sativa* (Alfalfa)	*NucMs1*	2255 bp
AK103446	*Oryza sativa* (Japonica group)	putative nucleolin	2447 bp
NM_103785	*Arabidopsis thaliana*	*AtNuc-L1*	1966 bp

นิวคลีโอลินในพืชค้นพบครั้งแรกใน เซลล์รากหัวหอมใหญ่ พบว่าทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการคลายตัวของโครมาติน rDNA transcription และในระยะแรกของการสร้าง pre-rRNA โดยจะพบนิวคลีโอลินร่วมกับส่วนประกอบอื่นของนิวคลีโอลัสระหว่างการเกิด mitosis และระยะหลังในการแบ่งตัวของ daughter cell nucleoli แสดงว่าการสร้างไรโบโซมจะเริ่มหลังจากการเกิด mitosis ในระดับ transcription และในขณะสร้าง pre-rRNA (Medina และคณะ, 1995)

Kojima และคณะ (2007) ศึกษาผลของน้ำตาลต่อการแสดงออกของยีนนิวคลีโอลินใน Arabidopsis พบว่า sucrose หรือ glucose สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *AtNUC-L1* ได้ เนื่องจาก sucrose จะเพิ่มการแสดงออกของยีนที่สร้าง C/D และ H/AC small nucleolar ribonucleoprotein subunit และ ribosomal protein แต่ non-metabolizable mannitol หรือ 2-deoxyglucose ไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนได้ และการให้ 10 mM glucose แก่ sugar-starved cells สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *AtNUC-L1* ทำให้เซลล์กลับสู่การเจริญปกติ แสดงให้เห็นว่า คาร์โบไฮเดรตสามารถควบคุม *de novo* ribosome biogenesis ได้ การศึกษาพืชกลุ่ม ribonucleoprotein gene mutant ทำให้รู้ว่าอัตราในการสร้างไรโบโซมมีผลต่อ

การเจริญและโครงสร้างของพืชด้วย จากการยับยั้งยีน *AtNUC-L1* ทำให้การแสดงออกของ sugar-induced ribonucleoprotein gene ลดลง แสดงว่า *AtNUC-L1* เกี่ยวข้องในการแสดงออกของ sugar-induced ribonucleoprotein gene

Pontvianne และคณะ (2007) ศึกษายีนนิวคลีโอลินใน Arabidopsis (*AtNUC-L1* และ *AtNUC-L2*) พบว่านิวคลีโอลินเกี่ยวข้องในระยะแรกของการสร้างไรโบโซม มีการแสดงออกของยีน *AtNUC-L1* ทั่วไปในภาวะปกติ การขัดขวางการทำงานของยีนนี้ทำให้เกิดผลรุนแรงต่อการเจริญและการพัฒนาของพืช และการขาดโปรตีนนี้ใน พืช *Atnuc-L1* mutant จะชักนำให้เกิด nucleolar disorganization การคลายตัวของนิวคลีโอลัส (nucleolus organizer region decondensation) และมีผลต่อการสะสมระดับของ pre-rRNA precursor นอกจากนี้ใน *Atnuc-L1* mutant พบว่ายีน *AtNUC-L2* ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออก จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ายีน *AtNUC-L2* เป็นตัวช่วยเหลือเมื่อขาดโปรตีน AtNUC-L1 บางส่วนหรือทั้งหมด ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นงานแรกที่ศึกษาการขัดขวาง nucleolin-like protein ในยูคาริโอตชั้นสูง และบทบาทใหม่ ๆ สำหรับนิวคลีโอลินในโครงสร้างของนิวคลีโอลัส และ rDNA chromatin organization

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

พืชทดลอง

เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123)

เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์เหลืองประทิว123 สายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171)

เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ105 (KDML105)

เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) สายพันธุ์ FL530-introgression line (FL530-IL) (ข้าวสายพันธุ์ทนเค็มซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์ ดร.ธีรยุทธ ตู้จินดา)

เมล็ด *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia สายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่ผ่านการถ่ายยีน partial *OsNUC1* ซึ่งประกอบด้วย RNA-recognition motif (RRM) และ GAR domain 3 สายพันธุ์ คือ 35S-2 35S-5 และ 35S-7 (Sripinyowanich และคณะ, 2009)

สถานที่ปลูกพืชทดลอง

โรงเรือนปฏิบัติการวิจัยข้าว หน่วยปฏิบัติการวิจัยสิ่งแวดล้อมและสรีรวิทยาของพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์การศึกษา

1. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกข้าว**
   - กระบะพลาสติก
   - ทราย
   - ขวดแก้ว
   - ขวดสเปรย์สำหรับพ่นสารเคมี

2. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างพืช**
   - อลูมิเนียมฟอยล์
   - กรรไกร
   - เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
   - ภาชนะใส่ไนโตรเจนเหลว

3. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด RNA**
   - โกร่งบด
   - อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
   - dry bath incubator (MD-01N-220, Taiwan)
   - microcentrifuge (Sorvall Biofuge Pico, Germany)
   - refrigerated centrifuge (Universal 32R, Hettich, Germany)
   - ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง (deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส (New Brunswick Scientific Co.,Inc, Belgium)
   - ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Sanyo, Thailand)
   - spectrophotometer (Agilent 8453E UV-Visible Spectroscopy System, Germany)
   - gel electrophoresis system (MiniRun GE-100, Hangzhou Bioer Technology Co.,ltd)
   - เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายรูปเจล (Gel Doc™ 2000, Bio-Rad, California, USA)
   - micropipette (Gilson, France)
   - microcentrifuge tube

4. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)**
   - iCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad, California, USA)
   - dry bath incubator (MD-01N-220, Taiwan)
   - microcentrifuge (Sorvall Biofuge Pico, Germany)
   - refrigerated centrifuge (Universal 32R, Hettich, Germany)
   - ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Sanyo, Thailand)
   - gel electrophoresis system (MiniRun GE-100, Hangzhou Bioer Technology Co.,ltd)
   - spectrophotometer (Agilent 8453E UV-Visible Spectroscopy System, Germany)
   - vortex mixer (Labnet, USA)
   - 96-well plate (Bio-Rad, California, USA)

- micropipette (Gilson, France)
- microcentrifuge tube

5. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี** reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)
   - เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (Peltier Thermal Cycler รุ่น PTC-100™, USA)
   - microcentrifuge (Sorvall Biofuge Pico, Germany)
   - gel electrophoresis system (MiniRun GE-100, Hangzhou Bioer Technology Co.,ltd)
   - vortex mixer (Labnet, USA)
   - micropipette (Gilson, France)
   - microcentrifuge tube

6. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดจากโลหะหนักของ** *Arabidopsis thaliana* L. **ที่ได้รับการถ่ายยีน** partial *OsNUC1*
   - vortex mixer (Labnet, USA)
   - micropipette (Gilson, France)
   - microcentrifuge tube
   - glass Petridish
   - เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

<u>สารเคมี</u>

1. **สารเคมีที่ใช้ในการปลูกข้าว**
    - สารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP no.2 (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) (ภาคผนวก ก)
    - NaCl (Merck, Germany)
    - (±) Abscisic acid (ABA) (Sigma)
    - NCED inhibitor (anti-ABA : abamineSG) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Tadao Asami, RIKEN, 2-1 Hirosawa,Wako, Saitama 351-0198, Japan

2. **สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA**
    - RNA Extraction Buffer (ภาคผนวก ก)
    - phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) (V/V)
    - ethyl alcohol
    - $LiCl_2$ (Fluka)
    - DEPC-treated TE Buffer (ภาคผนวก ก)
    - agarose (USB Corporation, Ohio, USA)
    - 5X TBE (ภาคผนวก ก)
    - RNA loading dye (ภาคผนวก ก)
    - ethidium bromide (Promega)

3. **สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)**
    - Cloned DNase I (RNase-free) (Takara Bio Inc., Japan)
    - M-MLV Reverse Transcriptase (Promega)
    - iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA)
    - phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) (V/V)
    - ethyl alcohol
    - sodium acetate (Sigma)
    - DEPC-treated TE Buffer (ภาคผนวก ก)

4. **สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)**
   - FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Applied Science, Germany)
   - 5X TBE
   - agarose (USB Corporation, Ohio, USA)
   - DNA loading dye (ภาคผนวก ก)
   - ethidium bromide (Promega)

5. **สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดจากโลหะหนักของ *Arabidopsis thaliana* L. ที่ได้รับการถ่ายยีน partial *OsNUC1***
   - Clorox® (Spain)
   - MS medium (Sigma)
   - $CuSO_4$ (Fluka)
   - $CdCl_2$ (Sigma)

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. **ศึกษาการแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่มีความสามารถในการทนเค็มแตกต่างกัน**

   1.1 เพาะเมล็ดข้าว 4 พันธุ์/สายพันธุ์เป็นพันธุ์ไม่ทนเค็มและสายพันธุ์ทนเค็ม ทำการเปรียบเทียบ 2 ชุด คือ พันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) กับสายพันธุ์เหลืองประทิว 123-TC171 (LPT123-TC171) และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) กับสายพันธุ์ FL530 โดยนำเมล็ดข้าวแช่น้ำ 1 คืน แล้วนำมาเพาะบนทรายเป็นเวลา 7 วัน

   1.2 คัดเลือกต้นกล้าที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ย้ายปลูกในขวดแก้วที่มีสารละลายธาตุ อาหาร WP No.2 (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) (ภาคผนวก ก) ขวดละ 10 ต้น เป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารทุกสัปดาห์ วางในโรงเรือนทดลองที่ได้รับแสงตามธรรมชาติ และเติมน้ำทุกวันเพื่อควบคุมระดับของสารละลายให้อยู่ในระดับเดียวกับเมื่อเริ่มต้นการทดลอง

   1.3 ย้ายต้นกล้าลงปลูกในขวดแก้วที่มีสารละลายธาตุอาหาร WP No.2 แบ่งเป็นชุดการทดลอง ดังนี้

      - สารละลายธาตุอาหาร WP No.2
      - สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 + 0.5% NaCl (w/v)

   1.4 เก็บตัวอย่างพืชที่ 0 0.5 1 2 6 12 และ 24 ชั่วโมงภายหลังการย้ายปลูกในข้อ 1.3 โดยตัดใบข้าวใส่ในอลูมิเนียมฟอยล์ห่อละ 0.1 กรัม แช่ในไนโตรเจนเหลวแล้วนำไปเก็บที่ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่างอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะสกัด total RNA ในขั้นต่อไป

   1.5 สกัด total RNA จากใบข้าวจากข้อ 1.4 ด้วยวิธี Hot phenol ดัดแปลงจากวิธี Hot phenol ของ Thikart และคณะ (2005) (ภาคผนวก ข)

   1.6 วัดความเข้มข้นของสารละลายที่สกัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพื่อคำนวณปริมาณ RNA

   1.7 ตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วย 0.8% agarose gel (w/v) ในสารละลาย 0.5x TBE โดยใช้ gel electrophoresis system (MiniRun GE-100, Hangzhou Bioer Technology Co.,ltd) ย้อมแถบ RNA ด้วย ethidium bromide นำไปตรวจสอบด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV และบันทึกภาพ (Gel Doc^{TM} 2000, Bio-Rad, California, USA)

   1.8 กำจัด DNA ออกจาก RNA ด้วยเอนไซม์ DNase I (Takara) ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ (ภาคผนวก ข) คำนวณปริมาณและตรวจสอบคุณภาพ RNA ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 1.6 และ 1.7

1.9 สร้าง cDNA สายแรก ด้วยการทำ reverse transcription โดยใช้เอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase (Promega) ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ (ภาคผนวก ข)

1.10 นำ cDNA ที่ได้จากข้อ 1.9 มาใช้เป็นแม่แบบในการทำ real-time PCR ด้วยเครื่อง iCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad) โดยใช้เอนไซม์ iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ (ภาคผนวก ข)

primer สำหรับยีน *OsActin* มีลำดับเบสดังนี้

OsAct (F) 5'- AGC TAT CGT CCA CAG GAA -3'

OsAct (R) 5'- ACC GGA GCT AAT CAG AGT -3'

primer สำหรับยีน *OsNUC1* มีลำดับเบสดังนี้

OsNUC1 (F) 5'- ATG GAT CTG ACC TCG GTG GA -3'

OsNUC1 (R) 5'- GTC TTC CTC CTC TCC CAC TG -3'

1.11 นำผลที่ได้จากข้อ 1.10 มาคำนวณหาค่าการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ด้วยวิธี $\Delta\Delta$CT method (Pfaffl, 2001) โดยใช้สูตร

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{target})^{\Delta CTtarget}}{(E_{ref})^{\Delta CTref}}$$

E_{target} คือ $10^{1/slope}$ ของยีน *OsNUC1*

E_{ref} คือ $10^{1/slope}$ ของยีน *actin*

ΔCT_{target} คือ $CT_{control\text{-}treatment}$ ของยีน *OsNUC1*

ΔCT_{ref} คือ $CT_{control\text{-}treatment}$ ของยีน *actin*

จากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟแสดงผลการแสดงออกของยีนในช่วงเวลาต่าง ๆ โดยให้ชั่วโมงที่ 0 เป็นจุดเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 0

2. ศึกษาอิทธิพลของกรดแอบไซซิกต่อการแสดงออกของยีน *OsNUC1*

2.1 การแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่ได้รับกรดแอบไซซิก (ABA) (ภาคผนวก ข) จากภายนอกในภาวะปกติและภาวะเค็ม

2.1.1 เพาะเมล็ดข้าว 4 พันธุ์/สายพันธุ์ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 1.1

2.1.2 นำต้นข้าวจากข้อ 2.1.1 มาปลูกในสารละลายธาตุอาหาร WP No.2 โดยแบ่งเป็นชุดการทดลองดังนี้

<u>อิทธิพลของ ABA ในภาวะปกติ</u>

- สารละลายธาตุอาหาร WP No.2
- สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 + 0 µM ABA

- สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 + 100 μM ABA

<u>อิทธิพลของ ABA ในภาวะเค็ม</u>

- สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 + 0.5% NaCl
- สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 + 0.5% NaCl + 0 μM ABA
- สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 + 0.5% NaCl + 100 μM ABA

จากนั้นเก็บตัวอย่างพืชที่ 0 0.5 1 2 6 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปสกัด total RNA คำนวณปริมาณและตรวจสอบคุณภาพ RNA โดยวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 1.5 ถึง 1.7

2.1.3 กำจัด DNA ออกจาก RNA ในข้อ 2.1.2 ด้วยเอนไซม์ DNase I และแปลงให้เป็น cDNA จากนั้นนำไปทำ real-time PCR และคำนวณหาค่าการแสดงออกของยีน ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 1.8 ถึง 1.11

2.2 การแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่ได้รับ ABA inhibitor (abamineSG) (ภาคผนวก ข) จากภายนอกในภาวะปกติและภาวะเค็ม

2.2.1 เพาะเมล็ดข้าว 4 พันธุ์/สายพันธุ์ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 1.1

2.2.2 นำต้นข้าวจากข้อ 2.2.1. มาปลูกในสารละลายธาตุอาหาร WP No.2 โดยแบ่งเป็นชุดการทดลองดังนี้

<u>อิทธิพลของ abamineSG ในภาวะปกติ</u>

- สารละลายธาตุอาหาร WP No.2
- สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 + 0 μM abamineSG
- สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 + 100 μM abamineSG

<u>อิทธิพลของ abamineSG ในภาวะเค็ม</u>

- สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 + 0.5% NaCl
- สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 + 0.5% NaCl + 0 μM abamineSG
- สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 + 0.5% NaCl + 100 μM abamineSG

จากนั้นเก็บตัวอย่างพืชที่ 0 0.5 1 2 6 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปสกัด RNA คำนวณปริมาณและตรวจสอบคุณภาพ RNA ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 1.5 ถึง 1.7

2.2.3 กำจัด DNA ออกจาก total RNA ในข้อ 2.2.2. ด้วยเอนไซม์ DNase I และแปลงให้เป็น cDNA จากนั้นนำไปทำ real-time PCR และคำนวณหาค่าการแสดงออกของยีน ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 1.8 ถึง 1.11

3. **ศึกษาการแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่ได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ**

3.1 เพาะเมล็ดข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123-TC171 (LPT123-TC171) ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 1.1

3.2 นำต้นข้าวจากข้อ 3.1. มาปลูกในสารละลายธาตุอาหาร WP No.2 โดยแบ่งเป็นชุดการทดลองดังนี้

- สารละลายธาตุอาหาร WP No.2
- สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 + 20% PEG6000
- สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 + 100 μM $CuSO_4$
- สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 + 100 μM $CdCl_2$
- สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 ปลูกที่ 4 องศาเซลเซียส

จากนั้นเก็บตัวอย่างพืชที่ 0 0.5 1 2 6 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปสกัด total RNA คำนวณปริมาณและตรวจสอบคุณภาพ RNA ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 1.5. ถึง 1.7.

3.3 กำจัด DNA ออกจาก RNA ในข้อ 3.2 ด้วยเอนไซม์ DNase I และแปลงให้เป็น cDNA ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 1.8 และ 1.9

3.4 นำ cDNA ที่ได้จากข้อ 3.3. มาใช้เป็นแม่แบบในการทำ PCR

primer สำหรับยีน *OsActin* มีลำดับเบสดังนี้

Forward primer: OsAct (F1) 5’- CTG CCG AGC GGG AAA TTG TC -3'

Reverse primer: OsAct (R1) 5’- CTG GCG GAG CGA CAA CCT TG -3'

primer สำหรับยีน *OsNUC1* มีลำดับเบสดังนี้

Forward primer: OsNUC1 (F) 5'- ATG GAT CTG ACC TCG GTG GA -3'

Reverse primer: OsNUC1 (R1) 5'- GCT CTG CTT GAA CGG TGT AC -3'

สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR 20 μl ประกอบด้วย

Reverse transcription reaction	1 μl
PCR Buffer	1X
Magnesium chloride	2 mM
dNTPs	0.2 μM
Forward primer	0.5 μM
Reverse primer	0.5 μM
FastStart *Taq* DNA polymerase	1 U
น้ำกลั่น ให้มีปริมาตรเป็น	20 μl

นำ PCR product มาแยกขนาดด้วย electrophoresis จากนั้นย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide นำไปตรวจสอบด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV และบันทึกภาพ

3.5 ทำการวัดความเข้มแถบ DNA (band intensity) ด้วยโปรแกรม Quality One (Bio-Rad, California, USA) นำค่า intensity ของยีน *OsNUC1* มาปรับเทียบด้วยค่า intensity ของยีน *OsActin*

3.6 นำค่า intensity ที่ปรับเทียบจากข้อ 3.5 ของแต่ละเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างมาหาร ด้วยค่า intensity ของชั่วโมงที่ 0 สร้างกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนในระยะเวลาต่าง ๆ

4. ศึกษาความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดจากโลหะหนักของ *Arabidopsis thaliana* L. ที่ได้รับการถ่ายยีน partial *OsNUC1*

4.1 เพาะเมล็ด *Arabidopsis thaliana* L. โดยทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วย 30% clorox เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 รอบ รอบละ 5 นาที จากนั้นนำเมล็ดวางบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม 3% (w/v) น้ำตาลทราย (Murashige และ Skoog, 1962) และ 0.8% (w/v) วุ้นผง นำไปวางที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน

4.2 นำพืชจากข้อ 4.1 ย้ายมาปลูกที่ 22 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นย้ายต้นกล้าที่มีขนาดเท่ากันมาวางบนอาหารสูตร MS เช่นเดียวกับที่ระบุในข้อ 4.1 ที่มีการเติม 25 50 และ 75 µM $CuSO_4$ หรือเติม 50 75 และ 100 µM $CdCl_2$ ปลูกที่ 25±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน โดยให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ความเข้ม 35 µmol m^{-2} s^{-1} ระยะเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomize Design (CRD) ทำการทดลองชุดละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น

4.3 เมื่อครบกำหนดนำพืชจากข้อ 4.2 มาทำการชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง บันทึกผล

4.4 คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งอันเนื่องมาจากโลหะหนัก (% weight comparison) โดยใช้สูตร

$$\text{\% weight comparison} = \frac{\text{น้ำหนัก}_{\text{heavy metal stress}} - \text{น้ำหนัก}_{\text{MS medium}}}{\text{น้ำหนัก}_{\text{MS medium}}} \times 100$$

$\text{น้ำหนัก}_{\text{heavy metal stress}}$ คือ น้ำหนักของพืชที่ปลูกในอาหารที่มี $CuSO_4$ หรือ $CdCl_2$

$\text{น้ำหนัก}_{\text{MS medium}}$ คือ น้ำหนักของพืชที่ปลูกในอาหารสูตร MS

4.5 นำค่าที่ได้มาทดสอบทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของพืชทั้ง 4 สายพันธุ์ด้วยวิธี Duncan’s Multiple Range Test (DMRT)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

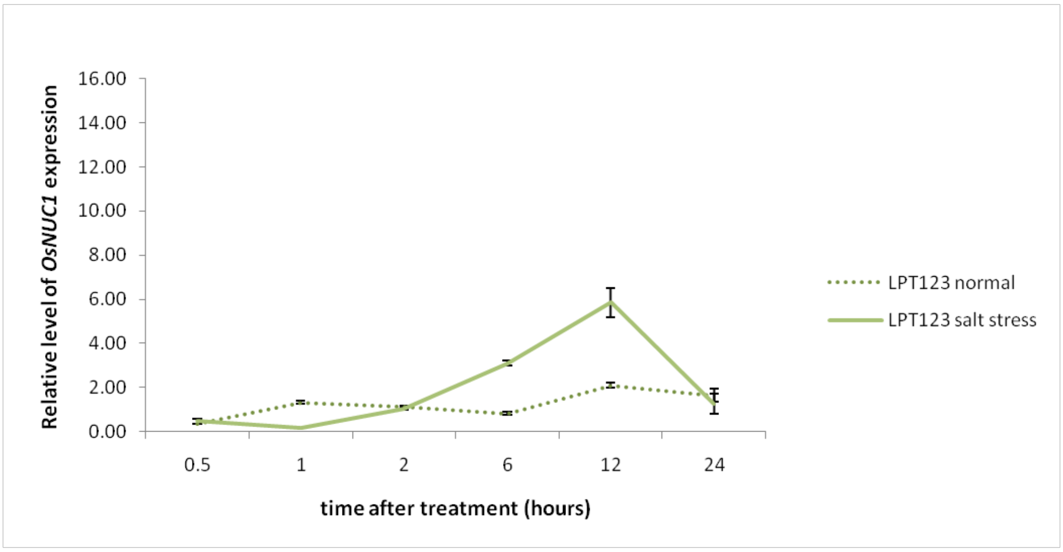
1. ศึกษาการแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่มีความสามารถในการทนเค็มแตกต่างกัน

การแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในภาวะปกติและภาวะเค็ม

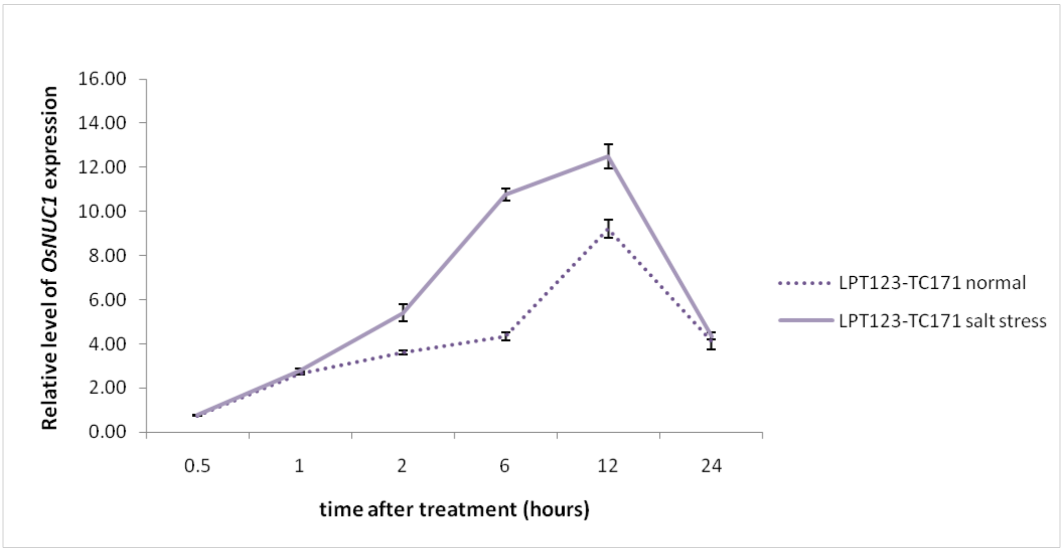
จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวพันธุ์/สายพันธุ์ต่าง ๆ หลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวทั้ง 4 พันธุ์/สายพันธุ์เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับภาวะเค็มเมื่อเปรียบเทียบกับในข้าวที่ปลูกในภาวะปกติ โดยมีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับภาวะเค็ม จนกระทั่งสูงสุดที่ 12 ชั่วโมงและลดลงที่ 24 ชั่วโมง (รูปที่ 3 และ 4, ตารางที่ 2)

เมื่อพิจารณาสายพันธุ์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน (isogenic lines) พบว่าในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีระดับการแสดงออกของยีนมากกว่าในข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็ม LPT123 ทั้งในภาวะปกติและภาวะเค็ม แต่ในอีกคู่สายพันธุ์หนึ่ง ระดับการแสดงออกของยีนในข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็ม KDML105 กลับมีระดับมากกว่าในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม FL530-IL ทั้งในภาวะปกติและภาวะเค็ม

(ก)

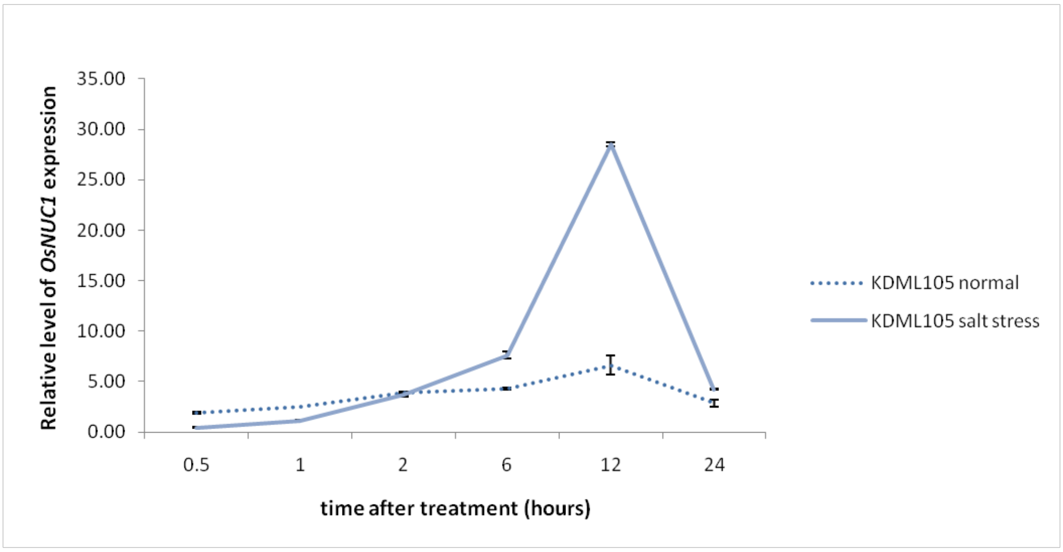


(ข)

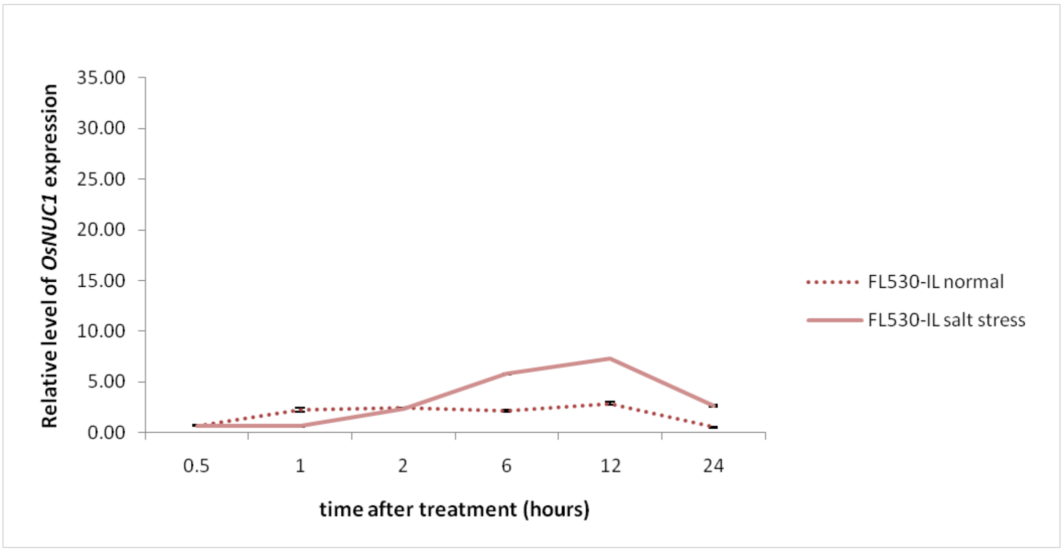


รูปที่ 3 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123 (ก) LPT123-TC171 (ข) หลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (bar=SE)

(ก)



(ข)



รูปที่ 4 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว KDML105 (ก) และ FL530-IL (ข) หลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (bar=SE)

ตารางที่ 2 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวพันธุ์/สายพันธุ์ LPT123 LPT123-TC171 KDML105 และ FL530-IL ที่ระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (mean ± standard error)

พันธุ์/สายพันธุ์	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ± standard error*	
		ภาวะปกติ	ภาวะเค็ม
LPT123	0.5	0.35 ± 0.02[A]	0.46 ± 0.12[AB]
	1	1.31 ± 0.06[CD]	0.18 ± 0.01[A]
	2	1.12 ± 0.05[BC]	1.02 ± 0.02[AB]
	6	0.82 ± 0.06[B]	3.09 ± 0.11[C]
	12	2.10 ± 0.10[E]	5.84 ± 0.64[D]
	24	1.63 ± 0.30[D]	1.27 ± 0.45[B]
LPT123-TC171	0.5	0.75 ± 0.02[A]	0.76 ± 0.02[A]
	1	2.66 ± 0.05[B]	2.81 ± 0.07[B]
	2	3.60 ± 0.01[C]	5.39 ± 0.39[D]
	6	4.36 ± 0.18[C]	10.74 ± 0.27[E]
	12	9.21 ± 0.42[D]	12.50 ± 0.53[F]
	24	4.12 ± 0.38[C]	4.35 ± 0.14[C]
KDML105	0.5	1.88 ± 0.10[A]	0.44 ± 0.02[A]
	1	2.50 ± 0.04[AB]	1.16 ± 0.04[B]
	2	3.85 ± 0.16[BC]	3.72 ± 0.20[C]
	6	4.33 ± 0.09[C]	7.62 ± 0.37[D]
	12	6.63 ± 0.98[D]	28.55 ± 0.19[E]
	24	2.86 ± 0.36[AB]	4.24 ± 0.01[C]
FL530-IL	0.5	0.64 ± 0.00[A]	0.71 ± 0.03[A]
	1	2.25 ± 0.21[B]	0.64 ±0.03[A]
	2	2.48 ± 0.01[B]	2.38 ± 0.06[B]
	6	2.15 ± 0.08[B]	5.81 ± 0.04[D]
	12	2.87 ± 0.13[C]	7.31 ± 0.03[E]
	24	0.54 ± 0.02[A]	2.64 ± 0.08[B]

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)

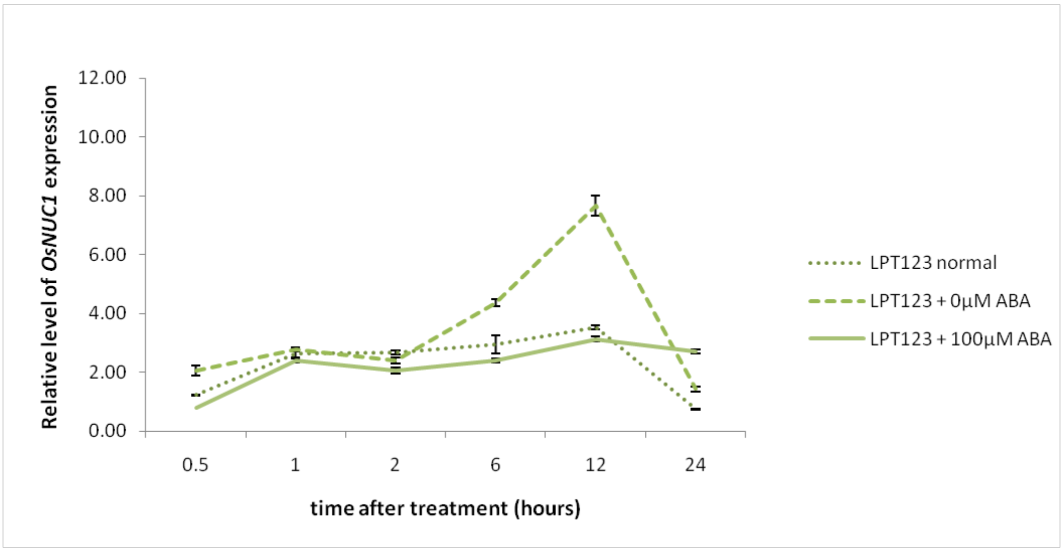
2. ศึกษาอิทธิพลของกรดแอบไซซิกต่อการแสดงออกของยีน *OsNUC1*

2.1. การแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่ได้รับกรดแอบไซซิก (ABA) จากภายนอกในภาวะปกติและภาวะเค็ม

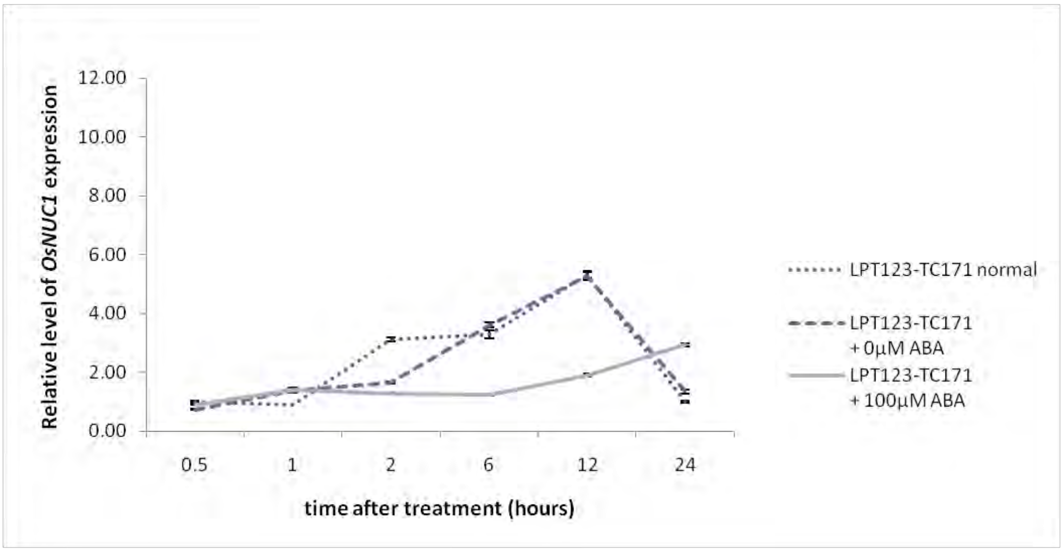
การศึกษาอิทธิพลของ ABA ต่อการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวพบว่า หลังจากได้รับ ABA จากภายนอกในภาวะปกติ ระดับการแสดงออกของยีนในข้าว 2 คู่สายพันธุ์มีรูปแบบการแสดงออกแตกต่างกัน โดยในข้าวพันธุ์ ไม่ทนเค็ม LPT123 มีระดับการแสดงออกลดลงเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างกับ ชุดควบคุมที่ไม่ได้รับ ABA จากภายนอก แต่ในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีระดับการแสดงออกของยีนลดลงอย่างเห็นได้ชัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 5, ตารางที่ 3) ในทางกลับกันระดับการแสดงออกของยีนในข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็ม KDML105 มีระดับเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับ ABA จากภายนอก แต่ ในสายพันธุ์ทนเค็ม FL530-IL มีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 6, ตารางที่ 3)

เมื่อศึกษาอิทธิพลของ ABA ในภาวะเค็มต่อการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน ในข้าวพันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ LPT123-TC171 มีระดับการแสดงออกลดลงในชั่วโมงที่ 6 และ 12 จากนั้นเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 24 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 7, ตารางที่ 4) แต่ในข้าวอีกหนึ่งคู่สายพันธุ์กลับมีรูปแบบที่แตกต่างกัน โดยในข้าวพันธุ์ KDML105 มีระดับการแสดงออกลดลงในชั่วโมงที่ 6 และ 12 ส่วนในข้าวสายพันธุ์ FL530-IL มีระดับการแสดงออกลดลงในชั่วโมงที่ 6 แต่มีการเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 8, ตารางที่ 4)

(ก)

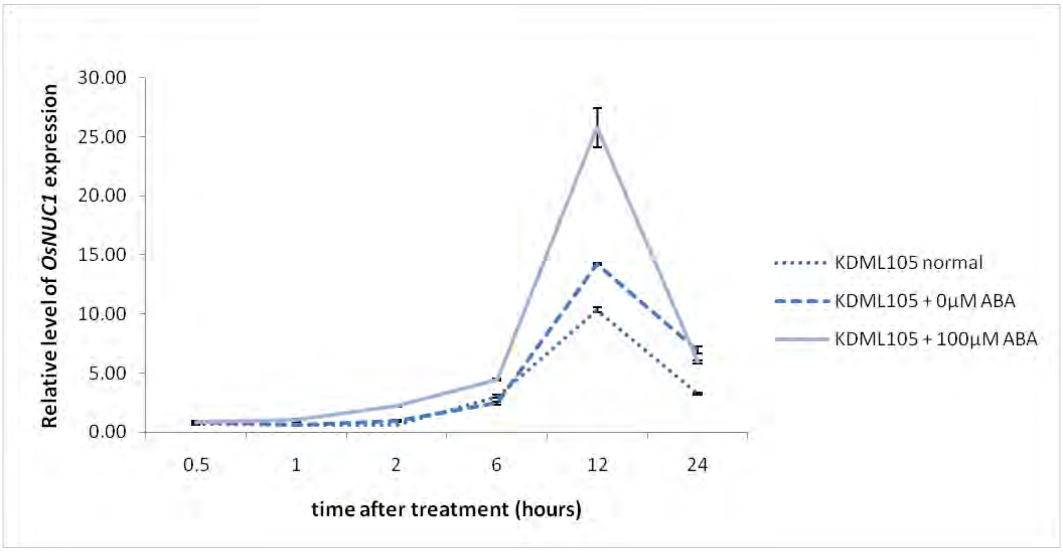


(ข)

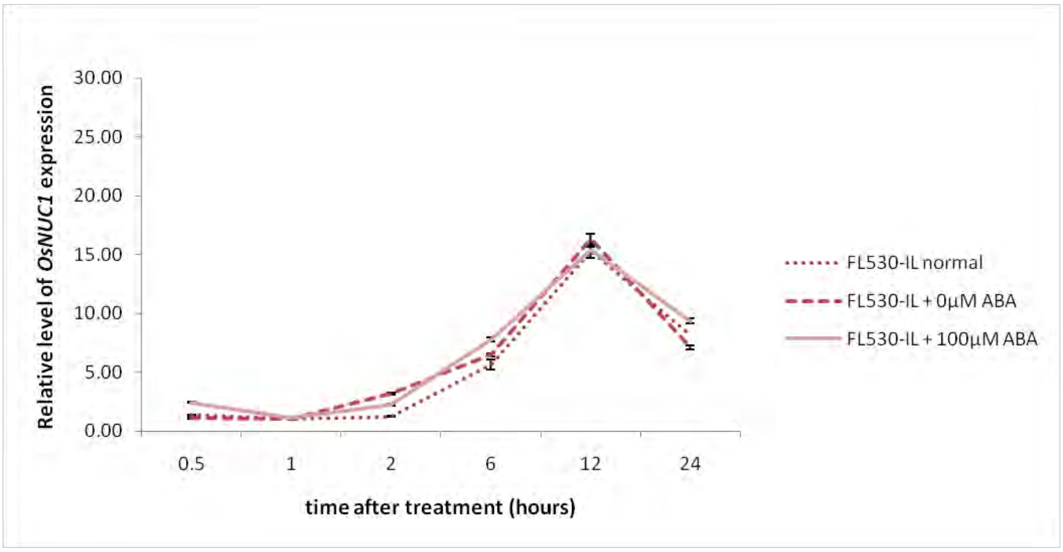


รูปที่ 5 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123 (ก) LPT123-TC171 (ข) หลังจากได้รับ ABA จากภายนอกในภาวะปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (bar=SE)

(ก)



(ข)



รูปที่ 6 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว KDML105 (ก) และ FL530-IL (ข) หลังจากได้รับ ABA จากภายนอกในภาวะปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (bar=SE)

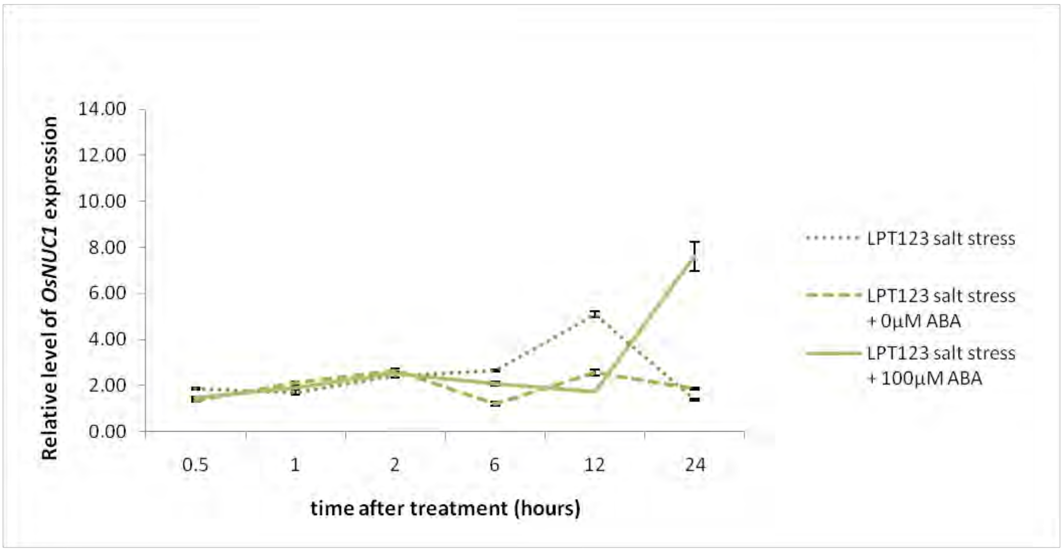
ตารางที่ 3 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวพันธุ์/สายพันธุ์ LPT123 LPT123-TC171 KDML105 และ FL530-IL ที่ระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากได้รับ ABA จากภายนอก ในภาวะปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (mean ± standard error)

พันธุ์/สายพันธุ์	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ± standard error*		
		ภาวะปกติ	0 μM ABA	100 μM ABA
LPT123	0.5	1.23 ± 0.03^{bB}	2.06 ± 0.17^{cB}	0.7832 ± 0.00^{aA}
	1	2.64 ± 0.13^{abC}	2.79 ± 0.06^{bC}	2.4064 ± 0.06^{aC}
	2	2.68 ± 0.06^{bC}	2.42 ± 0.10^{bBC}	2.0689 ± 0.10^{aB}
	6	2.94 ± 0.30^{aC}	4.37 ± 0.11^{bD}	2.4164 ± 0.07^{aC}
	12	3.53 ± 0.08^{aD}	7.66 ± 0.34^{bE}	3.1366 ± 0.07^{aE}
	24	0.75 ± 0.02^{aA}	1.43 ± 0.09^{bA}	2.7037 ± 0.07^{cD}
LPT123-TC171	0.5	1.00 ± 0.05^{aA}	0.74 ± 0.01^{bA}	0.9133 ± 0.03^{aA}
	1	0.91 ± 0.00^{aA}	1.38 ± 0.07^{bB}	1.4050 ± 0.06^{bC}
	2	3.12 ± 0.07^{cB}	1.64 ± 0.03^{bC}	1.2876 ± 0.00^{aB}
	6	3.28 ± 0.14^{bB}	3.62 ± 0.08^{cD}	1.2362 ± 0.03^{aB}
	12	5.32 ± 0.11^{bC}	5.28 ± 0.14^{bE}	1.8937 ± 0.00^{aD}
	24	1.00 ± 0.04^{aA}	1.34 ± 0.06^{bB}	2.9412 ± 0.05^{cE}
KDML105	0.5	0.67 ± 0.09^{aA}	0.85 ± 0.07^{aA}	0.8510 ± 0.03^{aA}
	1	0.59 ± 0.04^{aA}	0.61 ± 0.05^{aA}	0.9944 ± 0.1^{bA}
	2	0.62 ± 0.01^{aA}	0.97 ± 0.07^{bA}	2.2187 ± 0.04^{cA}
	6	3.01 ± 0.11^{bB}	2.46 ± 0.11^{aB}	4.4305 ± 0.11^{cB}
	12	10.35 ± 0.23^{aC}	14.21 ± 0.06^{bD}	25.8048 ± 1.66^{cC}
	24	3.25 ± 0.07^{aB}	6.92 ± 0.29^{cC}	5.9288 ± 0.14^{bB}
FL530-IL	0.5	1.34 ± 0.06^{bA}	1.10 ± 0.04^{aA}	2.4225 ± 0.05^{cC}
	1	1.03 ± 0.04^{aA}	1.10 ± 0.02^{aA}	1.0959 ± 0.12^{aA}
	2	1.22 ± 0.03^{aA}	3.15 ± 0.08^{cB}	2.1963 ± 0.07^{bC}
	6	5.66 ± 0.40^{aB}	6.47 ± 0.15^{aC}	7.7627 ± 0.17^{bB}
	12	15.27 ± 0.59^{aD}	16.36 ± 0.37^{aE}	15.3892 ± 0.29^{aE}
	24	8.11 ± 0.02^{bC}	7.08 ± 0.17^{aD}	9.3583 ± 0.22^{cD}

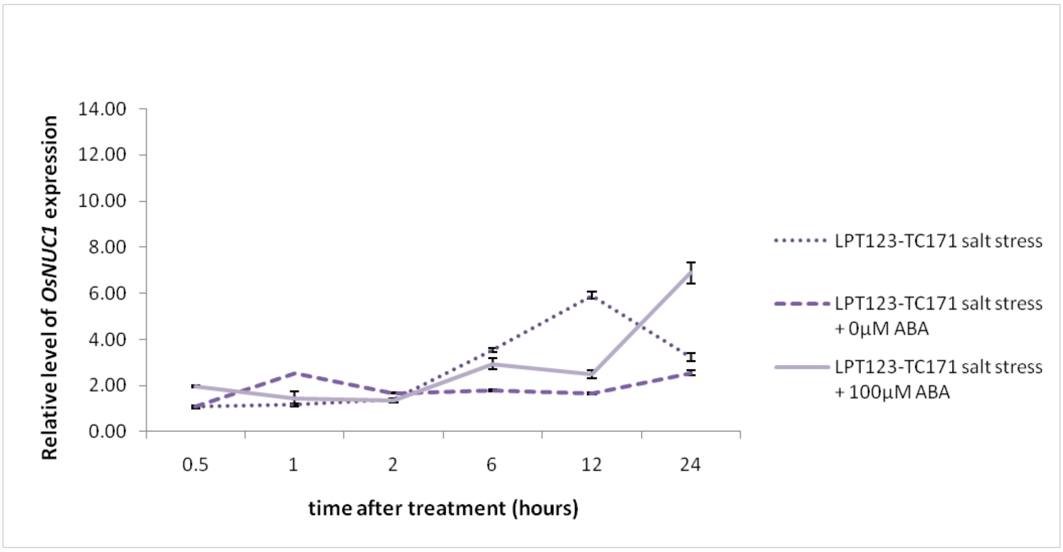
* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05)

(ก)

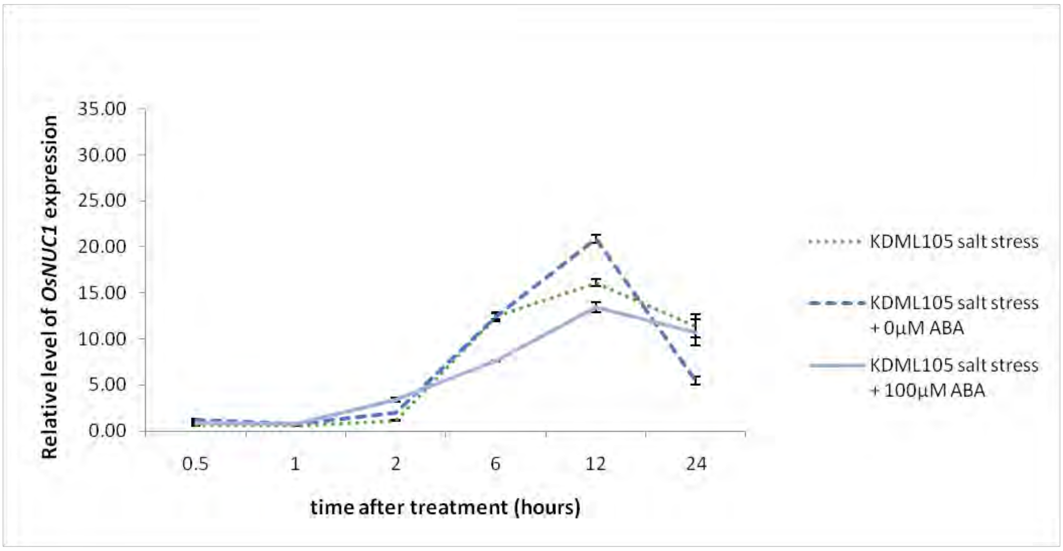


(ข)

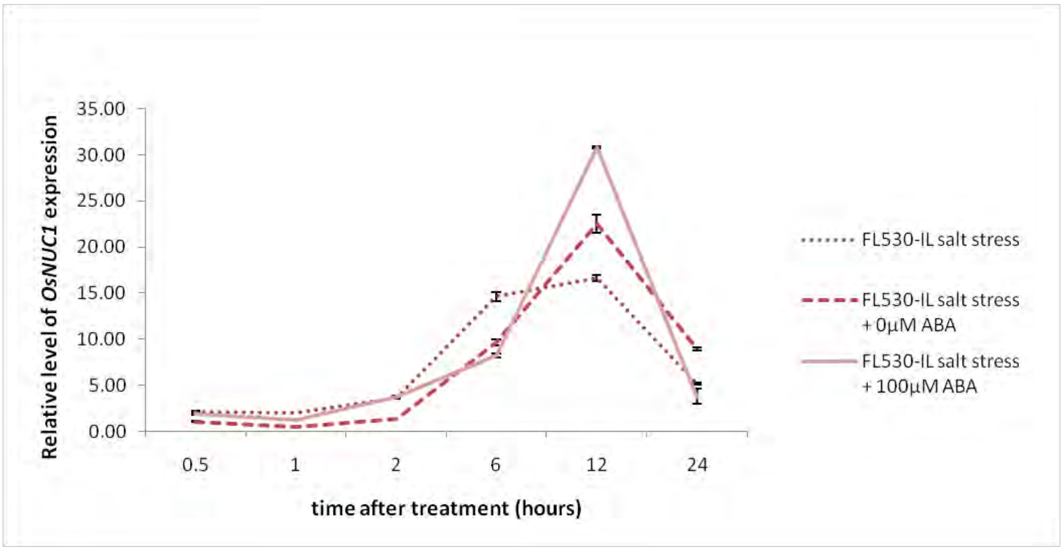


รูปที่ 7 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123 (ก) LPT123-TC171 (ข) หลังจากได้รับ ABA จากภายนอกในภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (bar=SE)

(ก)



(ข)



รูปที่ 8 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว KDML105 (ก) และ FL530-IL (ข) หลังจากได้รับ ABA จากภายนอกในภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (bar=SE)

ตารางที่ 4 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวพันธุ์/สายพันธุ์ LPT123 LPT123-TC171 KDML105 และ FL530-IL ที่ระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากได้รับ ABA จากภายนอกในภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (mean ± standard error)

พันธุ์/สายพันธุ์	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ± standard error*		
		ภาวะเค็ม	0 μM ABA	100 μM ABA
LPT123	0.5	1.86 ± 0.04^{cB}	1.34 ± 0.03^{aA}	1.47 ± 0.03^{bA}
	1	1.71 ± 0.11^{aB}	2.12 ± 0.05^{bB}	1.93 ± 0.07^{abAB}
	2	2.42 ± 0.07^{aC}	2.66 ± 0.10^{aC}	2.53 ± 0.07^{aB}
	6	2.66 ± 0.05^{cC}	1.23 ± 0.09^{aA}	2.09 ± 0.09^{bAB}
	12	5.10 ± 0.13^{cD}	2.56 ± 0.13^{bC}	1.75 ± 0.00^{aAB}
	24	1.39 ± 0.05^{aA}	1.86 ± 0.05^{aB}	7.62 ± 0.63^{bC}
LPT123-TC171	0.5	1.07 ± 0.07^{aA}	1.09 ± 0.05^{aA}	1.95 ± 0.04^{bAB}
	1	1.18 ± 0.03^{aA}	2.52 ± 0.01^{bC}	1.42 ± 0.31^{aA}
	2	1.41 ± 0.00^{aA}	1.68 ± 0.00^{bB}	1.36 ± 0.10^{aA}
	6	3.54 ± 0.09^{cB}	1.80 ± 0.04^{aB}	2.93 ± 0.25^{bC}
	12	5.90 ± 0.15^{cC}	1.67 ± 0.04^{aB}	2.50 ± 0.18^{bBC}
	24	3.23 ± 0.19^{aB}	2.55 ± 0.11^{aC}	6.88 ± 0.46^{bD}
KDML105	0.5	0.61 ± 0.08^{aA}	1.24 ± 0.12^{bAB}	0.86 ± 0.06^{aA}
	1	0.60 ± 0.03^{aA}	0.76 ± 0.09^{aA}	0.80 ± 0.02^{aA}
	2	1.13 ± 0.03^{aA}	1.98 ± 0.01^{bB}	3.36 ± 0.20^{cB}
	6	12.42 ± 0.52^{bB}	12.47 ± 0.34^{bD}	7.61 ± 0.03^{aC}
	12	16.08 ± 0.37^{bC}	20.87 ± 0.47^{cE}	13.43 ± 0.51^{aE}
	24	11.42 ± 1.26^{bB}	5.49 ± 0.41^{aC}	10.73 ± 1.46^{bD}
FL530-IL	0.5	2.15 ± 0.06^{bA}	1.04 ± 0.04^{aA}	1.90 ± 0.15^{bA}
	1	2.01 ± 0.05^{cA}	0.49 ± 0.05^{aA}	1.25 ± 0.02^{bA}
	2	3.69 ± 0.20^{bB}	1.33 ± 0.03^{aA}	3.71 ± 0.09^{bB}
	6	14.66 ± 0.49^{cD}	9.64 ± 0.37^{bB}	8.23 ± 0.17^{aC}
	12	16.63 ± 0.33^{aE}	22.53 ± 0.99^{bC}	30.83 ± 0.08^{cD}
	24	5.15 ± 0.12^{aC}	8.94 ± 0.17^{bB}	3.78 ± 0.84^{aB}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05)

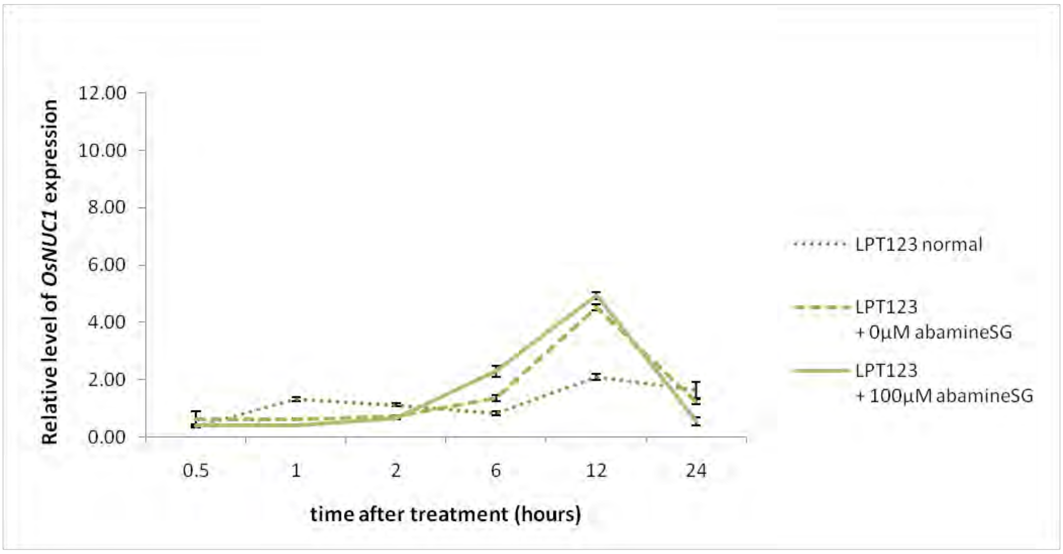
ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05)

2.2. การแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่ได้รับ ABA inhibitor (abamineSG) จากภายนอกในภาวะปกติและภาวะเค็ม

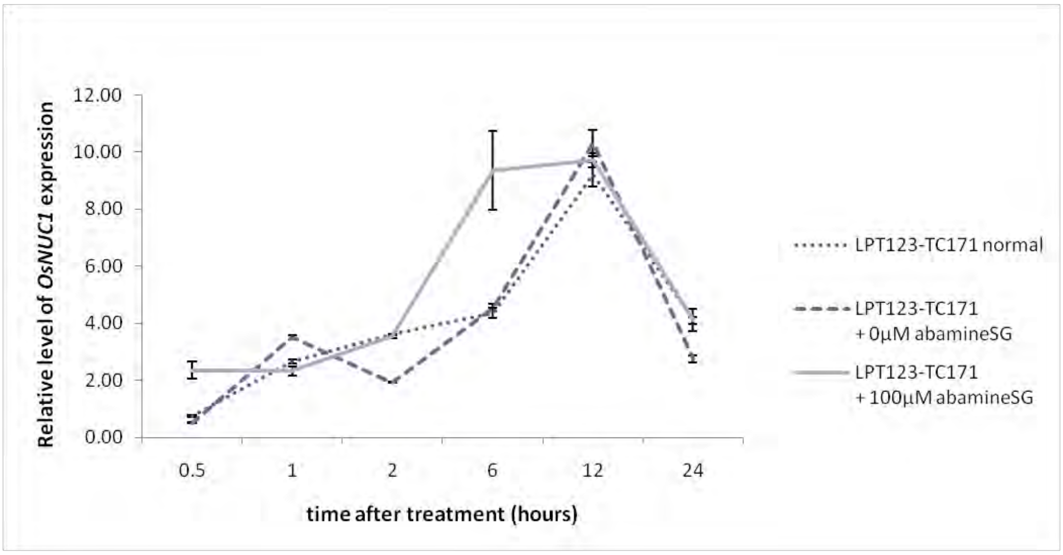
การศึกษาอิทธิพลของ ABA ต่อการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวโดยการให้ abamineSG จากภายนอกเพื่อยับยั้งการสร้าง ABA ภายในเซลล์พบว่า หลังจากได้รับ abamineSG จากภายนอกในภาวะปกติ ระดับการแสดงออกของยีนในข้าว คู่สายพันธุ์ LPT123 และ LPT123-TC171 มีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยในข้าว พันธุ์ LPT123 มีระดับการแสดงออกลดลงที่ 1 และ 2 ชั่วโมง จากนั้นเพิ่มขึ้นที่ 6 ชั่วโมงจนสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง แล้วลดลงอีกครั้งที่ 24 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในสายพันธุ์ LPT123-TC171 มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่ 0.5 และ 6 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งระดับการแสดงออกสูงสุดอยู่ที่ 12 ชั่วโมงแต่ไม่แตกต่างกับชุดควบคุม (รูปที่ 9, ตารางที่ 5) ส่วนในอีกหนึ่งคู่สายพันธุ์ KDML105 และ FL530-IL พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* แตกต่างกัน โดยในข้าวพันธุ์ KDML105 มีระดับการแสดงออกของยีนลดลงที่ 0.5 2 และ 6 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่มีระดับสูงกว่าชุดควบคุมที่ 12 ชั่วโมง แต่ในสายพันธุ์ FL530-IL มีระดับการแสดงออกขึ้นลงในระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่พบการเพิ่มขึ้นที่ 12 ชั่วโมงเหมือนในพันธุ์ KDML105 (รูปที่ 10, ตารางที่ 5)

ในส่วนของภาวะเค็มหลังจากที่ข้าวได้รับ abamineSG จากภายนอกพบว่าระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวทั้ง 4 พันธุ์/สายพันธุ์ส่วนใหญ่แล้วมีระดับการแสดงออกของยีนลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในภาวะเค็ม แต่เมื่อพิจารณาร่วมกับชุดการทดลองที่พ่นตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว จะเห็นได้ว่าการลดลงของการแสดงออกของยีนไม่ได้เป็นผลจาก abamineSG เพราะการพ่นตัวทำละลายมีผลทำให้การแสดงออกของยีน *OsNUC1* ลดลงด้วย (รูปที่ 11 และ 12, ตารางที่ 6)

(ก)

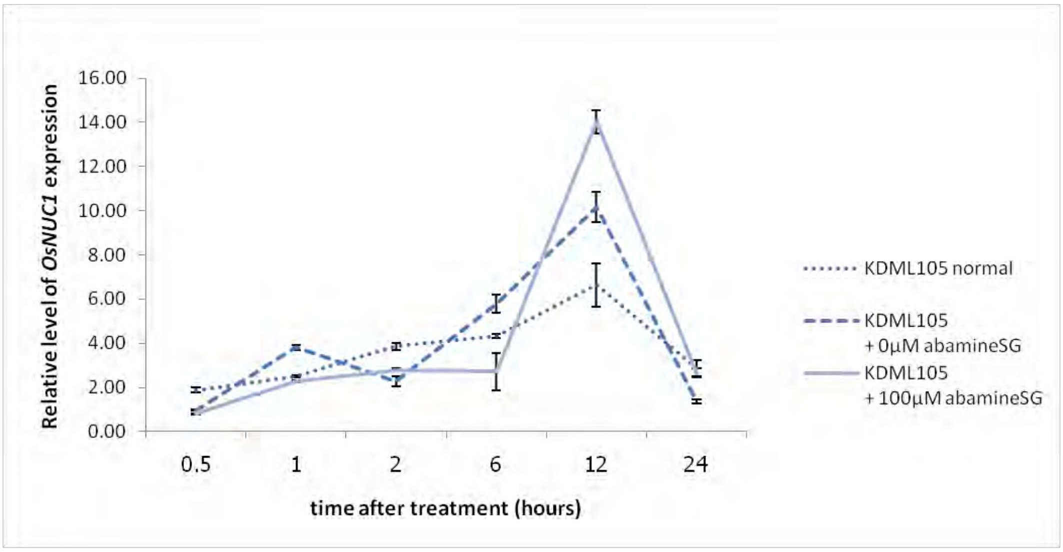


(ข)

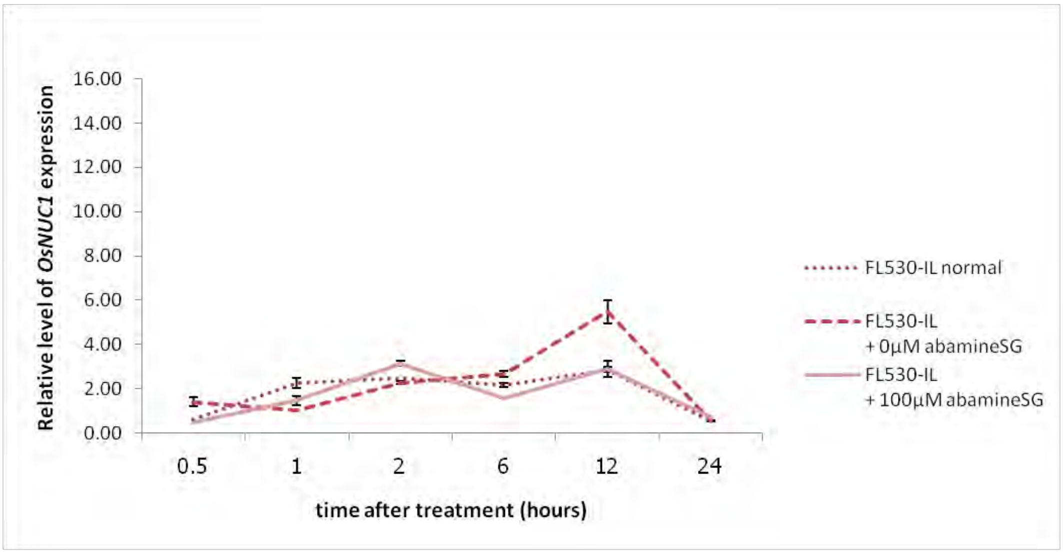


รูปที่ 9 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123 (ก) LPT123-TC171 (ข) หลังจากได้รับ abamineSG จากภายนอกในภาวะปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (bar=SE)

(ก)



(ข)



รูปที่ 10 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว KDML105 (ก) และ FL530-IL (ข) หลังจากได้รับ abamineSG จากภายนอกในภาวะปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (bar=SE)

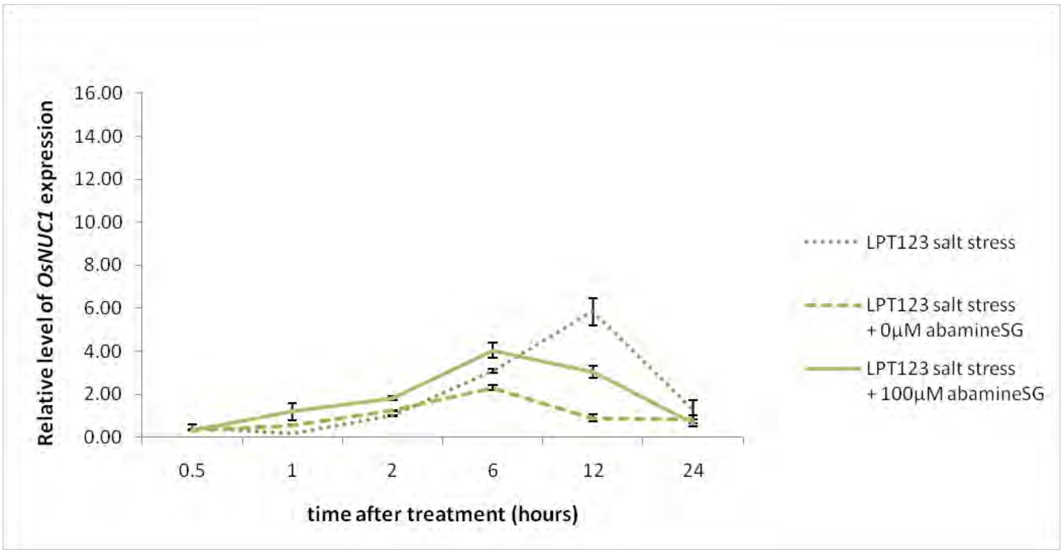
ตารางที่ 5 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวพันธุ์/สายพันธุ์ LPT123 LPT123-TC171 KDML105 และ FL530-IL ที่ระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากได้รับ abamineSG จากภายนอกในภาวะปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (mean ± standard error)

พันธุ์/สายพันธุ์	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ± standard error*		
		ภาวะปกติ	0 µM abamineSG	100 µM abamineSG
LPT123	0.5	0.35 ± 0.02^{aA}	0.62 ± 0.27^{aA}	0.41 ± 0.01^{aA}
	1	1.31 ± 0.06^{cCD}	0.60 ± 0.04^{bA}	0.40 ± 0.02^{aA}
	2	1.12 ± 0.05^{bBC}	0.73 ± 0.02^{aA}	0.64 ± 0.05^{aA}
	6	0.82 ± 0.05^{aB}	1.35 ± 0.10^{bB}	2.29 ± 0.21^{cB}
	12	2.10 ± 0.10^{aE}	4.53 ± 0.11^{bC}	4.94 ± 0.13^{cC}
	24	1.63 ± 0.30^{bD}	1.22 ± 0.08^{bB}	0.54 ± 0.14^{aA}
LPT123-TC171	0.5	0.75 ± 0.02^{aA}	0.51 ± 0.01^{aA}	2.36 ± 0.28^{bA}
	1	2.66 ± 0.05^{aB}	3.51 ± 0.07^{bD}	2.33 ± 0.17^{aA}
	2	3.60 ± 0.01^{bC}	1.93 ± 0.01^{aB}	3.54 ± 0.09^{bA}
	6	4.36 ± 0.18^{aC}	4.55 ± 0.12^{aE}	9.36 ± 1.39^{bB}
	12	9.21 ± 0.42^{aD}	10.30 ± 0.46^{aF}	9.72 ± 0.24^{aB}
	24	4.12 ± 0.38^{bC}	2.76 ± 0.13^{aC}	4.10 ± 0.11^{bA}
KDML105	0.5	1.88 ± 0.10^{bA}	0.96 ± 0.03^{aA}	0.79 ± 0.03^{aA}
	1	2.50 ± 0.04^{aAB}	3.80 ± 0.13^{bC}	2.28 ± 0.05^{aB}
	2	3.85 ± 0.16^{bBC}	2.26 ± 0.23^{aB}	2.79 ± 0.07^{aB}
	6	4.33 ± 0.09^{abC}	5.79 ± 0.40^{bD}	2.72 ± 0.85^{aB}
	12	6.63 ± 0.98^{aD}	10.15 ± 0.69^{bE}	14.02 ± 0.54^{cC}
	24	2.86 ± 0.36^{bAB}	1.36 ± 0.09^{aAB}	2.66 ± 0.20^{bB}
FL530-IL	0.5	0.64 ± 0.00^{aA}	1.41 ± 0.20^{bB}	0.49 ± 0.00^{aA}
	1	2.25 ± 0.21^{bB}	1.03 ± 0.00^{aAB}	1.46 ± 0.22^{aB}
	2	2.48 ± 0.01^{aB}	2.28 ± 0.05^{aC}	3.14 ± 0.11^{bC}
	6	2.15 ± 0.08^{bB}	2.66 ± 0.12^{cC}	1.58 ± 0.03^{aB}
	12	2.87 ± 0.13^{aC}	5.47 ± 0.52^{bD}	2.88 ± 0.37^{aC}
	24	0.54 ± 0.02^{aA}	0.52 ± 0.01^{aA}	0.71 ± 0.01^{bA}

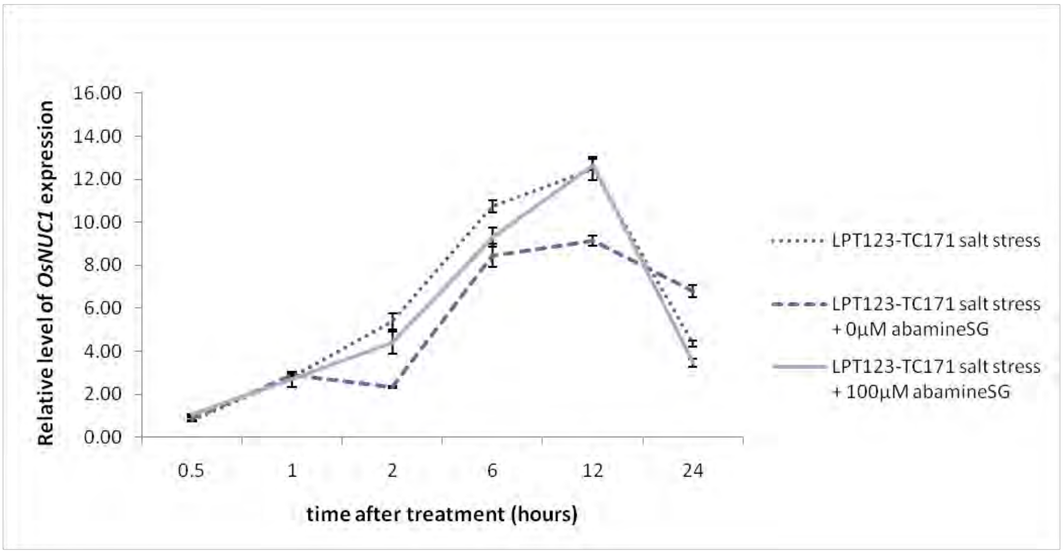
* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05)

(ก)

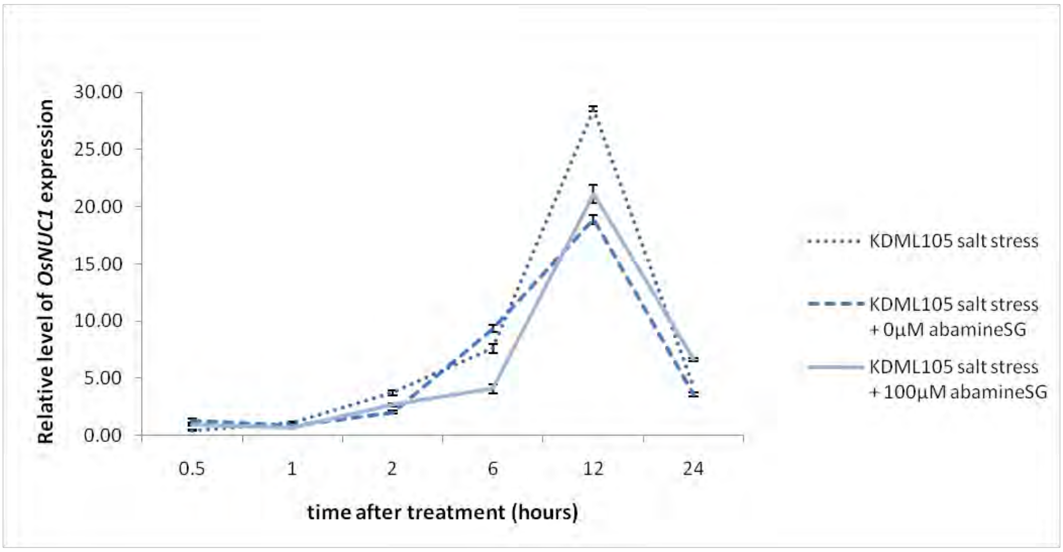


(ข)

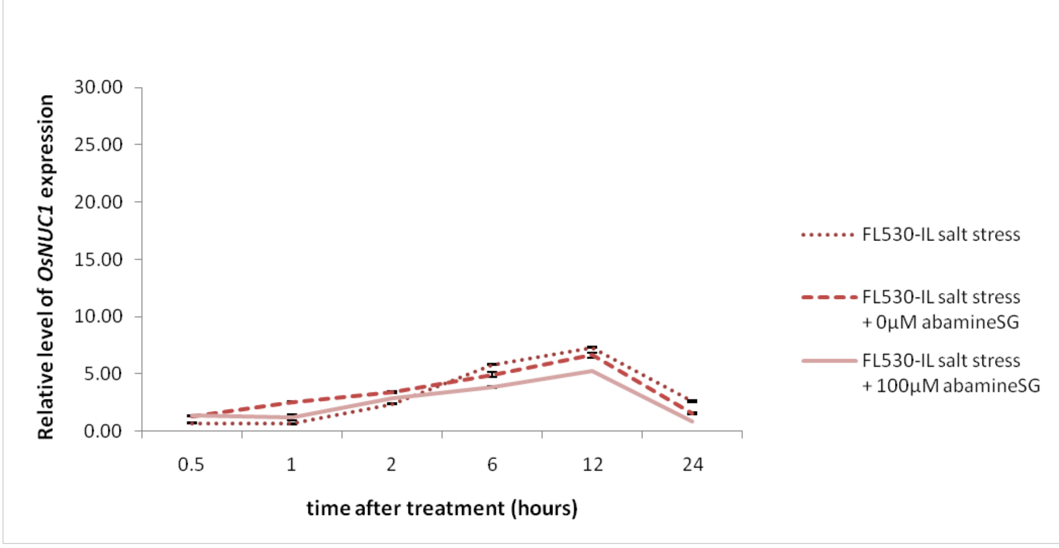


รูปที่ 11 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123 (ก) LPT123-TC171 (ข) หลังจากได้รับ abamineSG จากภายนอกในภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (bar=SE)

(ก)



(ข)



รูปที่ 12 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว KDML105 (ก) และ FL530-IL (ข) หลังจากได้รับ abamineSG จากภายนอกในภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (bar=SE)

ตารางที่ 6 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวพันธุ์/สายพันธุ์ LPT123 LPT123-TC171 KDML105 และ FL530-IL ที่ระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากได้รับ abamineSG จากภายนอกในภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (mean ± standard error)

พันธุ์/สายพันธุ์	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ± standard error*		
		ภาวะเค็ม	0 µM abamineSG	100 µM abamineSG
LPT123	0.5	0.46 ± 0.12^{aAB}	0.33 ± 0.02^{aA}	0.34 ± 0.01^{aA}
	1	0.18 ± 0.01^{aA}	0.57 ± 0.01^{abAB}	1.20 ± 0.41^{bBC}
	2	1.02 ± 0.02^{aAB}	1.24 ± 0.02^{bC}	1.84 ± 0.09^{cC}
	6	3.09 ± 0.10^{bC}	2.31 ± 0.12^{aD}	4.05 ± 0.36^{cE}
	12	5.84 ± 0.64^{cD}	0.89 ± 0.17^{aBC}	3.04 ± 0.26^{bD}
	24	1.27 ± 0.45^{aB}	0.83 ± 0.19^{aB}	0.67 ± 0.15^{aAB}
LPT123-TC171	0.5	0.76 ± 0.02^{aA}	0.87 ± 0.07^{aA}	1.06 ± 0.02^{bA}
	1	2.81 ± 0.07^{aB}	2.90 ± 0.07^{aB}	2.69 ± 0.35^{aB}
	2	5.39 ± 0.39^{bD}	2.33 ± 0.05^{aB}	4.42 ± 0.52^{bC}
	6	10.74 ± 0.27^{bE}	8.46 ± 0.54^{aD}	9.30 ± 0.44^{abD}
	12	12.50 ± 0.53^{bF}	9.15 ± 0.24^{aD}	12.69 ± 0.26^{bE}
	24	4.35 ± 0.14^{bC}	6.80 ± 0.27^{cC}	3.45 ± 0.18^{aBC}
KDML105	0.5	0.44 ± 0.02^{aA}	1.30 ± 0.16^{cA}	0.93 ± 0.08^{bA}
	1	1.16 ± 0.04^{cB}	0.84 ± 0.06^{bA}	0.67 ± 0.02^{aA}
	2	3.72 ± 0.20^{cC}	2.05 ± 0.11^{aB}	2.67 ± 0.12^{bB}
	6	7.62 ± 0.37^{bD}	9.35 ± 0.33^{cD}	4.08 ± 0.36^{aC}
	12	28.55 ± 0.19^{cE}	18.90 ± 0.40^{aE}	21.12 ± 0.80^{bE}
	24	4.24 ± 0.01^{bC}	3.60 ± 0.17^{aC}	6.63 ± 0.16^{cD}
FL530-IL	0.5	0.71 ± 0.03^{aA}	1.31 ± 0.03^{bA}	1.35 ± 0.07^{bB}
	1	0.64 ± 0.03^{aA}	2.57 ± 0.05^{cB}	1.23 ± 0.25^{bB}
	2	2.38 ± 0.07^{aB}	3.39 ± 0.07^{cC}	2.87 ± 0.01^{bC}
	6	5.81 ± 0.04^{cD}	4.94 ± 0.23^{bD}	3.83 ± 0.10^{aD}
	12	7.31 ± 0.03^{cE}	6.63 ± 0.25^{bE}	5.26 ± 0.02^{aE}
	24	2.64 ± 0.08^{cB}	1.56 ± 0.07^{bA}	0.87 ± 0.02^{aA}

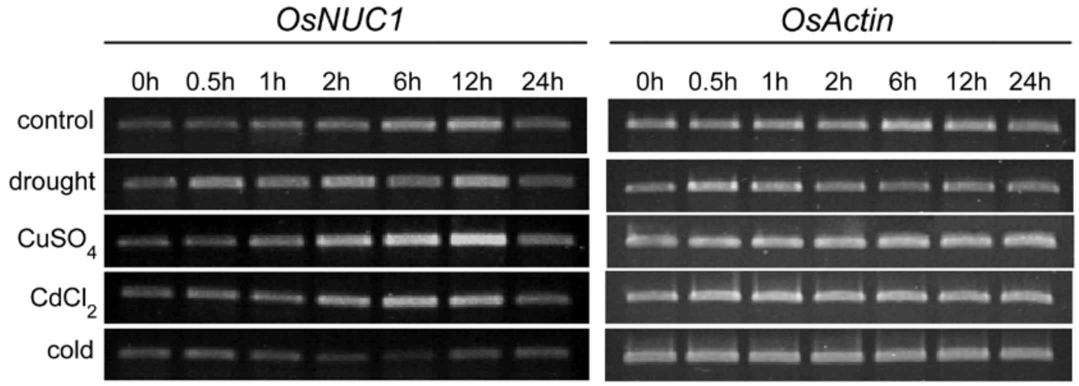
* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)

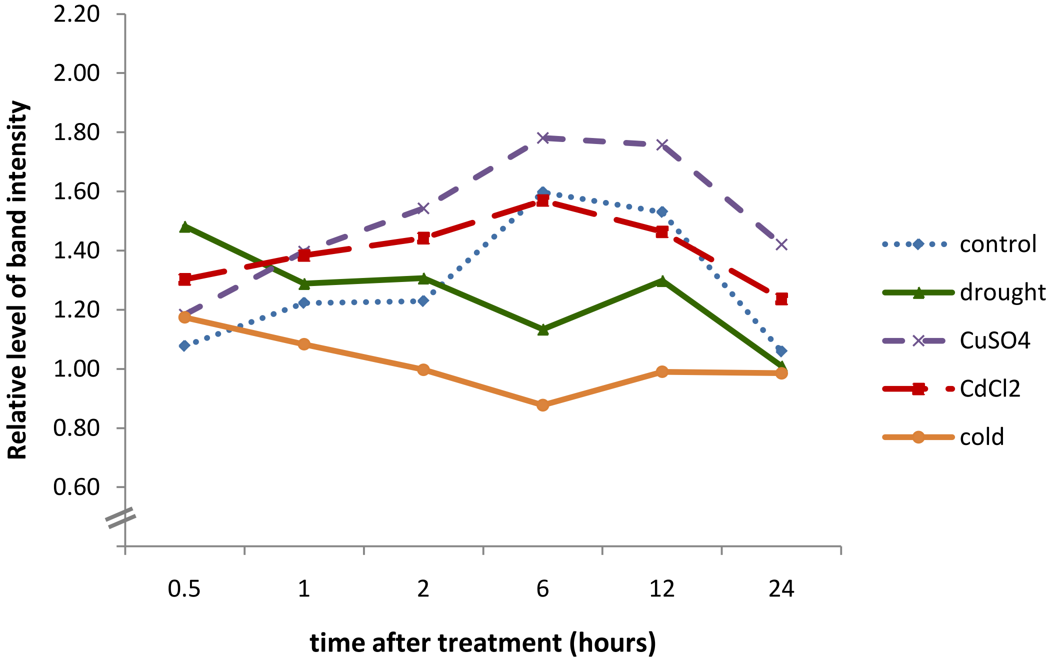
3. ศึกษาการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่ได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ

เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *OsNUC1* โดยใช้เทคนิค RT-PCR ในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ ได้แก่ ภาวะเครียดจากความแล้ง ภาวะเครียดจากโลหะหนัก ($CuSO_4$ และ $CdCl_2$) และภาวะเครียดจากความเย็น พบว่าการแสดงออกของยีนมีการตอบสนองที่แตกต่างกันดังนี้ (รูปที่ 13 และ 14)

ภาวะแล้ง (drought stress) และภาวะเครียดจากโลหะหนัก (heavy metal stress) $CdCl_2$ ชักนำให้ยีน *OsNUC1* แสดงออกเพิ่มขึ้นในช่วงแรกตั้งแต่ 0.5 ถึง 2 ชั่วโมงหลังจากได้รับภาวะเครียด ในขณะที่ $CuSO_4$ ชักนำให้ยีน *OsNUC1* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนหลังจากได้รับภาวะเครียดตลอดระยะเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนภาวะเครียดจากความเย็น (cold stress) มีผลต่อการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ที่แตกต่างจากภาวะเครียดอื่น โดยระดับการแสดงออกของยีนจะลดลงตามเวลาที่ได้รับภาวะเครียดจนต่ำที่สุดที่ 6 ชั่วโมง และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ 12 และ 24 ชั่วโมงแต่ยังคงมีระดับการแสดงออกน้อยกว่าชุดควบคุม



รูปที่ 13 การแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123-TC171 หลังจากได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 14 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123-TC171 หลังจากได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วยวิธี RT-PCR

ตารางที่ 7 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ที่ได้จากการวัด band intensity ด้วยโปรแกรม Quality One ในข้าวสายพันธุ์ LPT123-TC171 หลังจากได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วยวิธี RT-PCR

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ชุดการทดลอง				
	control	drought	$CuSO_4$	$CdCl_2$	cold
0.5	1.08	1.48	1.18	1.30	1.17
1	1.22	1.29	1.40	1.38	1.08
2	1.23	1.31	1.54	1.44	1.00
6	1.60	1.13	1.78	1.57	0.88
12	1.53	1.30	1.76	1.46	0.99
24	1.06	1.01	1.42	1.24	0.99

4. ศึกษาความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดจากโลหะหนักของ *Arabidopsis thaliana* L. ที่ได้รับการถ่ายยีน partial *OsNUC1*

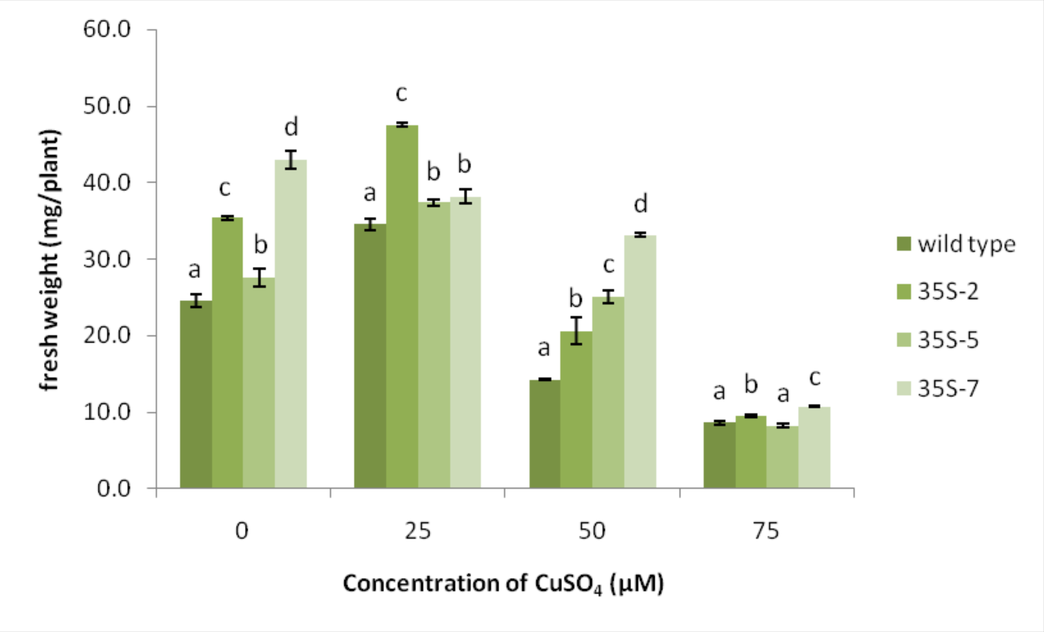
จากผลของการศึกษาการแสดงออกของยีนในภาวะเครียดทางภายภาพต่าง ๆ ในข้อ 3 พบว่ามีการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวสูงขึ้นหลังจากได้รับภาวะเครียดจากโลหะหนักทั้ง 2 ชนิด ดังนั้นจึงนำ Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีน partial *OsNUC1* (Sripinyowanich และคณะ, 2009) มาทดสอบความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดจากโลหะหนัก ($CuSO_4$ และ $CdCl_2$) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผลการทดลองพบว่า ในชุดการทดลองที่มีการเติม $CuSO_4$ ความเข้มข้นต่าง ๆ Arabidopsis พันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีนมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามความเข้มข้นของ $CuSO_4$ ที่เพิ่มขึ้น ยกเว้นในชุดการทดลองที่มี 25 µM $CuSO_4$

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์พบว่า Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีน คือ 35S-2 35S-5 และ 35S-7 มีน้ำหนักสด (รูปที่ 15, ตารางที่ 8) และน้ำหนักแห้ง (รูปที่ 16, ตารางที่ 9) มากกว่าพันธุ์ปกติ (wild type) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกชุดการทดลอง ยกเว้นชุดการทดลองที่มี 75 µM $CuSO_4$ ทั้งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของ 35S-5 ไม่แตกต่างกับพันธุ์ปกติ ส่วนเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง พบว่า $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้น 50 µM ทำให้ Arabidopsis ทุกสายพันธุ์มีน้ำหนักสด (รูปที่ 18, ตารางที่ 11) และน้ำหนักแห้ง (รูปที่ 18, ตารางที่ 11) ต่ำกว่าชุดควบคุมโดย Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีน มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ลดลงน้อยกว่าพันธุ์ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดของ Arabidopsis สายพันธุ์ 35S-2 ที่ไม่แตกต่างจากพันธุ์ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $CuSO_4$ ในความเข้มข้นระดับต่ำ คือ 25 µM มีผลในการลดน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของ Arabidopsis สายพันธุ์ 35S-7 เพียงสายพันธุ์เดียว และที่ $CuSO_4$ ความเข้มข้น 75 µM มีผลต่อ Arabidopsis แต่ละสายพันธุ์ไม่แตกต่างกัน

ในชุดการทดลองที่มีการเติม $CdCl_2$ พบว่าความเข้มข้นของ $CdCl_2$ ที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้น้ำหนักสด (รูปที่ 19, ตารางที่ 12) และน้ำหนักแห้ง (รูปที่ 20, ตารางที่ 13) ของ Arabidopsis ทุกสายพันธุ์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นในชุดการทดลองที่มี 75 µM $CdCl_2$ และชุดการทดลองที่มี 100 µM $CdCl_2$ น้ำหนักแห้งของ Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีนไม่แตกต่างกับสายพันธุ์ปกติ

เมื่อพิจารณาผลของ $CdCl_2$ ต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสด (รูปที่ 21, ตารางที่ 14) และน้ำหนักแห้ง (รูปที่ 22, ตารางที่ 15) พบว่า $CdCl_2$ มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งของ Arabidopsis ทั้ง 4 สายพันธุ์ คือมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้น 50 µM ทำให้พันธุ์ปกติมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งลดลงมากกว่าสายพันธุ์ 35S-5 และ 35S-7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อมีความเข้มข้นสูงขึ้น คือ 75 µM และ 100 µM $CdCl_2$ Arabidopsis สายพันธุ์ 35S-7 กลับมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของน้ำหนักแห้งมากกว่าพันธุ์ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โลหะหนักทั้ง 2 ชนิดมีผลทำให้การเจริญเติบโตของ Arabidopsis ทุกสายพันธุ์ลดลง แต่ Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถทนต่อภาวะเครียดจากโลหะหนักได้มากกว่าพันธุ์ปกติ โดยมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อปลูกในภาวะปกติและในภาวะเครียดจากโลหะหนัก



รูปที่ 15 น้ำหนักสดของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน (bar=SE)

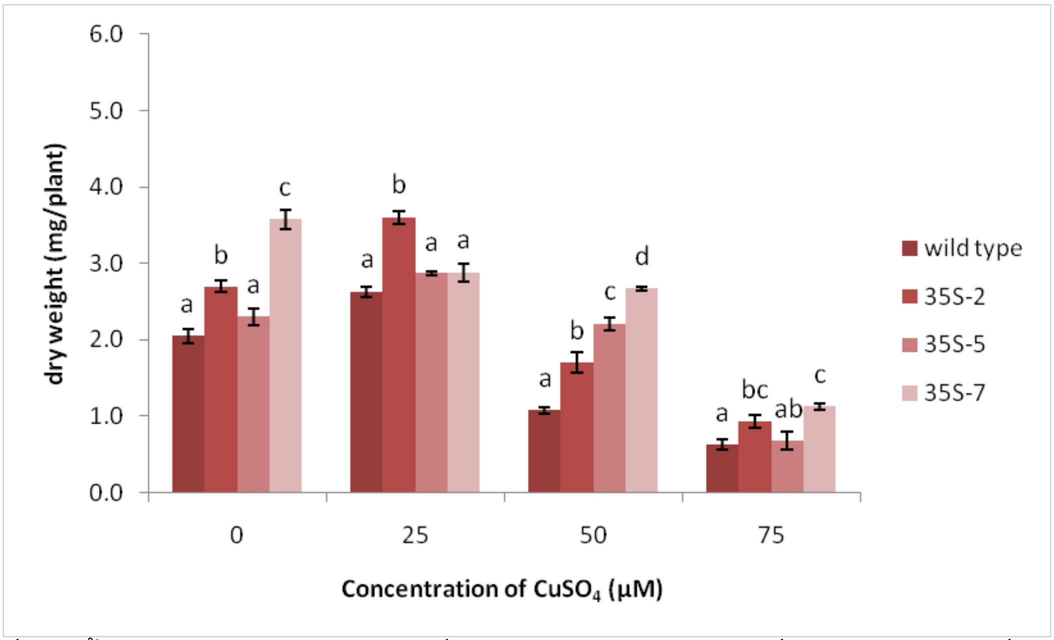
ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05) ทำการเปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้จากการปลูกเลี้ยงในภาวะเดียวกันเท่านั้น

ตารางที่ 8 น้ำหนักสดของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน (mean ± standard error)

ชุดการทดลอง	น้ำหนักสดของ Arabidopsis (มิลลิกรัม) ± standard error*			
	wild type	35S-2	35S-5	35S-7
0 µM $CuSO_4$	24.6 ± 0.9^{aC}	35.4 ± 0.2^{cC}	27.7 ± 1.2^{bC}	43.0 ± 1.2^{dD}
25 µM $CuSO_4$	34.6 ± 0.7^{aD}	47.6 ± 0.3^{cD}	37.4 ± 0.3^{bD}	38.2 ± 0.9^{bC}
50 µM $CuSO_4$	14.3 ± 0.1^{aB}	20.6 ± 1.8^{bB}	25.0 ± 0.8^{cB}	33.2 ± 0.3^{dB}
75 µM $CuSO_4$	8.6 ± 0.2^{aA}	9.6 ± 0.2^{bA}	8.3 ± 0.2^{aA}	10.8 ± 0.1^{cA}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05)



รูปที่ 16 น้ำหนักแห้งของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน (bar=SE)

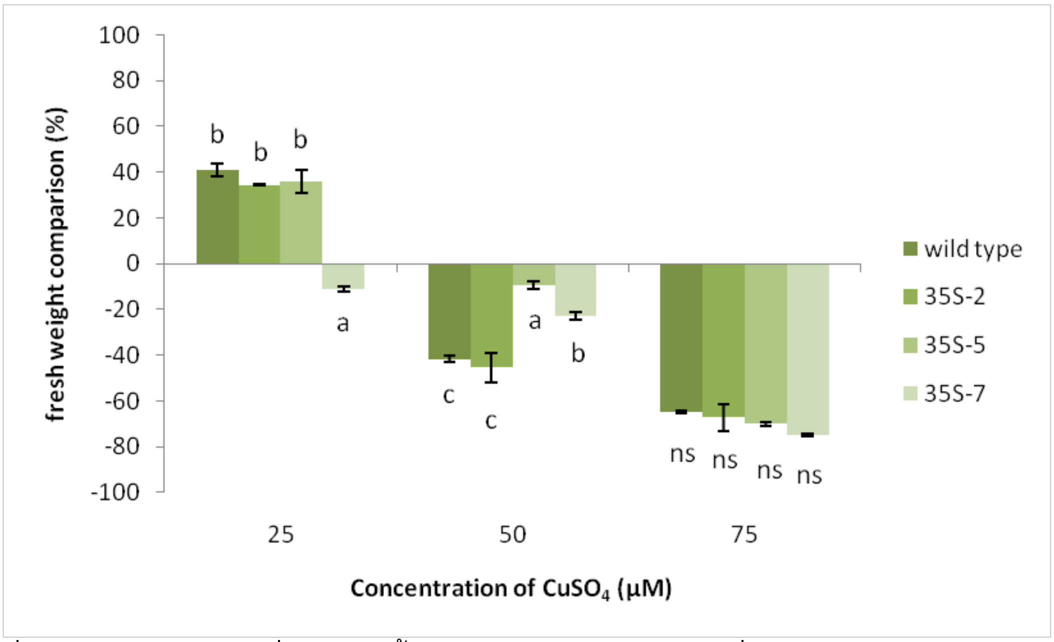
ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05) ทำการเปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้จากการปลูกเลี้ยงในภาวะเดียวกันเท่านั้น

ตารางที่ 9 น้ำหนักแห้งของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน (mean ± standard error)

ชุดการทดลอง	น้ำหนักแห้งของ Arabidopsis (มิลลิกรัม) ± standard error*			
	wild type	35S-2	35S-5	35S-7
0 µM $CuSO_4$	2.1 ± 0.1^{aC}	2.7 ± 0.1^{bC}	2.3 ± 0.1^{aB}	3.6 ± 0.1^{cC}
25 µM $CuSO_4$	2.6 ± 0.1^{aD}	3.6 ± 0.1^{bD}	2.9 ± 0.0^{aC}	2.9 ± 0.1^{aB}
50 µM $CuSO_4$	1.1 ± 0.0^{aB}	1.7 ± 0.1^{bB}	2.2 ± 0.1^{cB}	2.7 ± 0.0^{dB}
75 µM $CuSO_4$	0.6 ± 0.1^{aA}	0.9 ± 0.1^{bcA}	0.7 ± 0.1^{abA}	1.1 ± 0.0^{cA}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05)



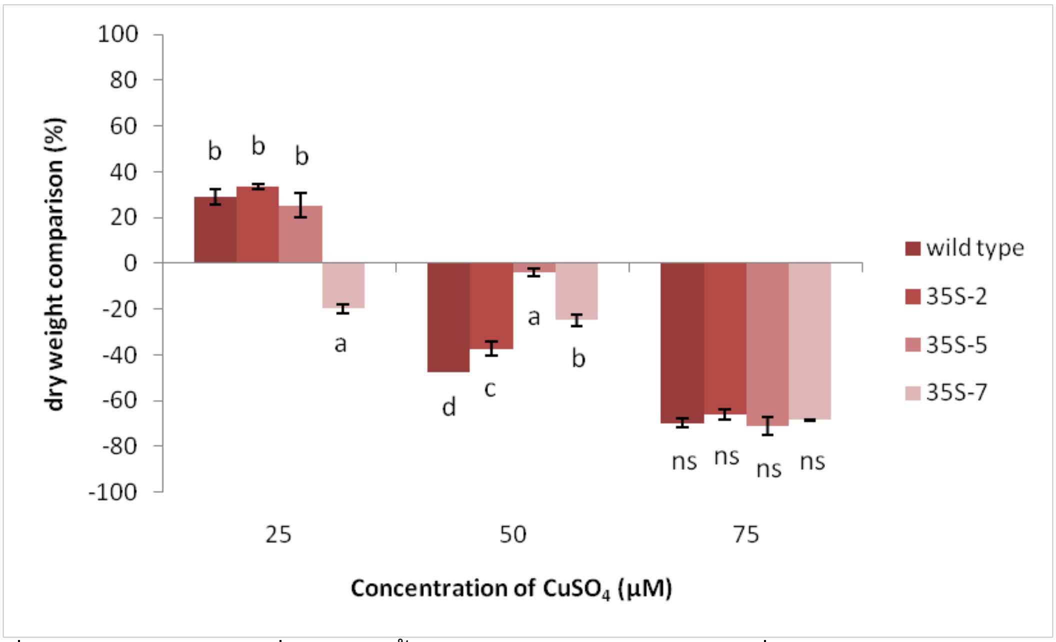
รูปที่ 17 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS (bar=SE)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$) ทำการเปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้จากการปลูกเลี้ยงในภาวะเดียวกันเท่านั้น

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS (mean ± standard error)

ชุดการทดลอง	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดของ Arabidopsis ± standard error*			
	wild type	35S-2	35S-5	35S-7
25 µM $CuSO_4$	40.9 ± 2.9^b	34.4 ± 0.2^b	35.8 ± 5.0^b	-11.1 ± 1.0^a
50 µM $CuSO_4$	-41.7 ± 1.5^c	-45.5 ± 6.5^c	-9.4 ± 1.5^a	-22.8 ± 1.5^b
75 µM $CuSO_4$	-64.9 ± 0.5^a	-67.2 ± 5.7^a	-70.1 ± 0.9^a	-75.0 ± 0.5^a

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)



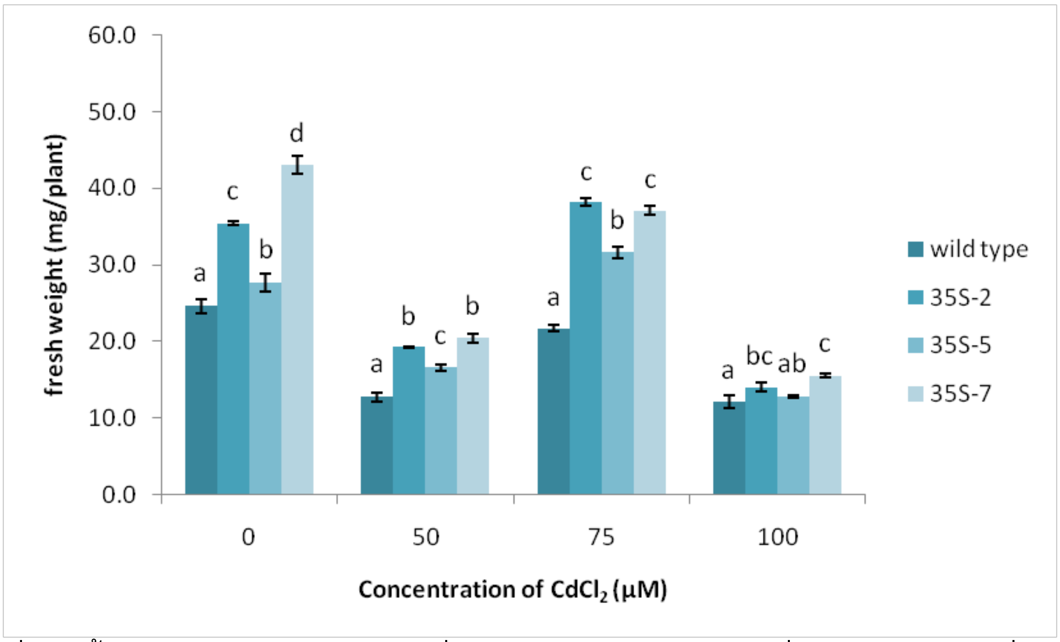
รูปที่ 18 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS (bar=SE)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$) ทำการเปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้จากการปลูกเลี้ยงในภาวะเดียวกันเท่านั้น

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS (mean ± standard error)

ชุดการทดลอง	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งของ Arabidopsis ± standard error*			
	wild type	35S-2	35S-5	35S-7
25 µM $CuSO_4$	28.9 ± 3.3^{b}	33.4 ± 1.0^{b}	25.4 ± 5.2^{b}	-19.8 ± 1.9^{a}
50 µM $CuSO_4$	-47.6 ± 0.1^{d}	37.3 ± 3.1^{c}	-4.2 ± 1.7^{a}	-24.9 ± 2.3^{b}
75 µM $CuSO_4$	-69.7 ± 1.8^{a}	-66.0 ± 2.2^{a}	-71.0 ± 4.0^{a}	-68.5 ± 0.4^{a}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)



รูปที่ 19 น้ำหนักสดของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน (bar=SE)

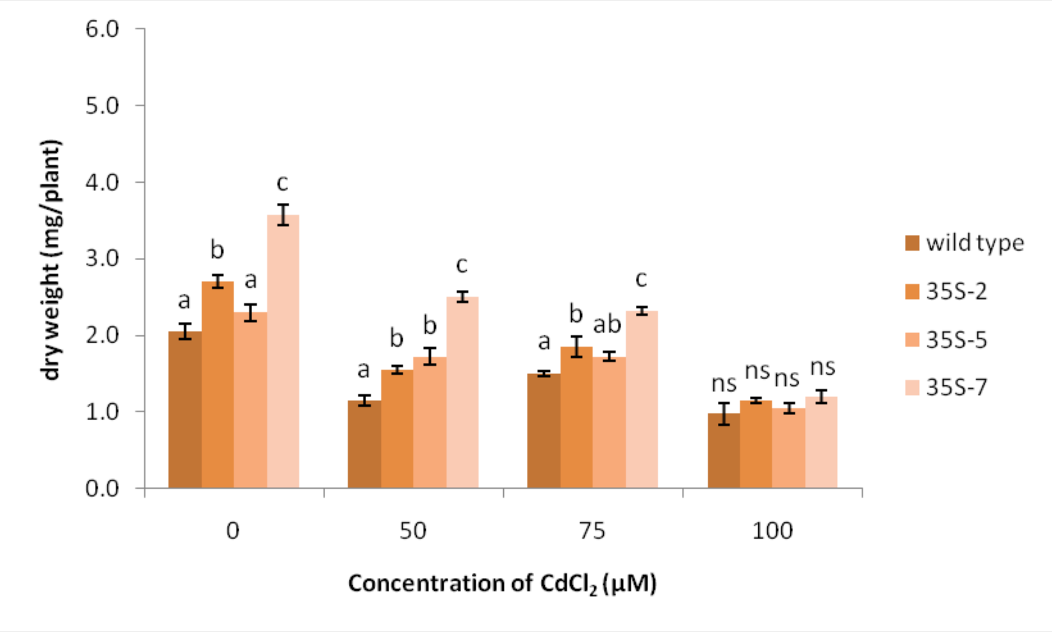
ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05) ทำการเปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้จากการปลูกเลี้ยงในภาวะเดียวกันเท่านั้น

ตารางที่ 12 น้ำหนักสดของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน (mean ± standard error)

ชุดการทดลอง	น้ำหนักสดของ Arabidopsis (มิลลิกรัม) ± standard error*			
	wild type	35S-2	35S-5	35S-7
0 µM $CdCl_2$	24.6 ± 0.9^{aC}	35.4 ± 0.2^{bC}	27.7 ± 1.2^{cC}	43.0 ± 1.2^{dD}
50 µM $CdCl_2$	12.7 ± 0.5^{aA}	19.2 ± 0.2^{cB}	16.6 ± 0.4^{bB}	20.4 ± 0.6^{cB}
75 µM $CdCl_2$	21.7 ± 0.4^{aB}	38.2 ± 0.6^{cD}	31.6 ± 0.7^{bD}	37.1 ± 0.6^{cC}
100 µM $CdCl_2$	12.1 ± 0.8^{aA}	14.0 ± 0.6^{bcA}	12.9 ± 0.2^{abA}	15.5 ± 0.3^{cA}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05)



รูปที่ 20 น้ำหนักแห้งของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน (bar=SE)

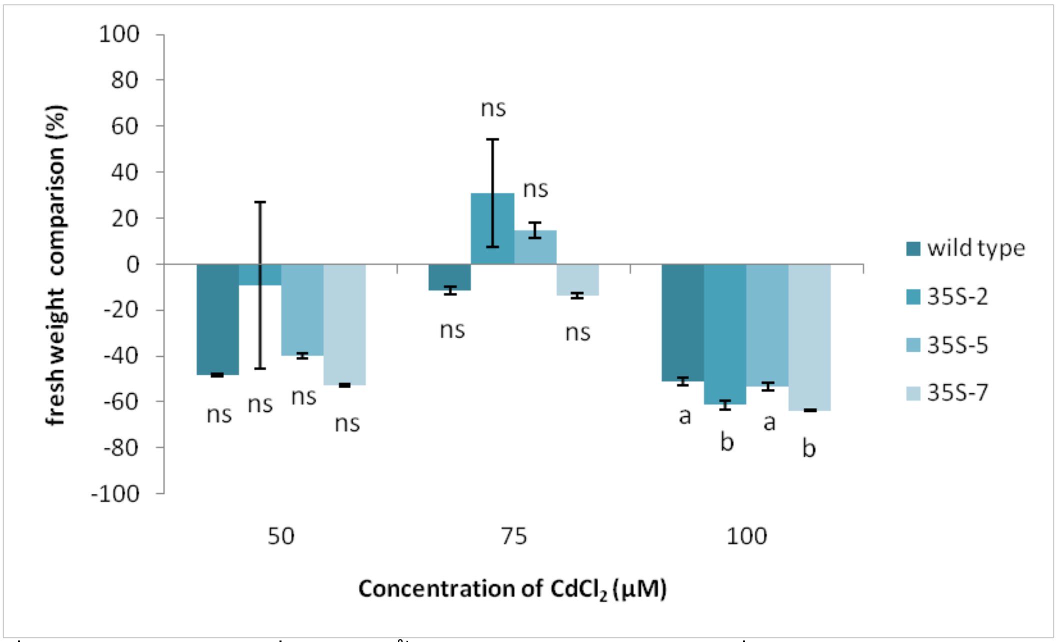
ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05) ทำการเปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้จากการปลูกเลี้ยงในภาวะเดียวกันเท่านั้น

ตารางที่ 13 น้ำหนักแห้งของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน (mean ± standard error)

ชุดการทดลอง	น้ำหนักแห้งของ Arabidopsis (มิลลิกรัม) ± standard error*			
	wild type	35S-2	35S-5	35S-7
0 µM $CdCl_2$	2.1 ± 0.1^{aC}	2.7 ± 0.1^{bD}	2.3 ± 0.1^{aC}	3.6 ± 0.1^{cC}
50 µM $CdCl_2$	1.2 ± 0.1^{aA}	1.6 ± 0.0^{bB}	1.7 ± 0.1^{bB}	2.5 ± 0.1^{cB}
75 µM $CdCl_2$	1.5 ± 0.0^{aB}	1.9 ± 0.1^{bC}	1.7 ± 0.1^{abB}	2.3 ± 0.0^{cB}
100 µM $CdCl_2$	1.0 ± 0.1^{A}	1.2 ± 0.0^{A}	1.1 ± 0.1^{A}	1.2 ± 0.1^{A}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05)



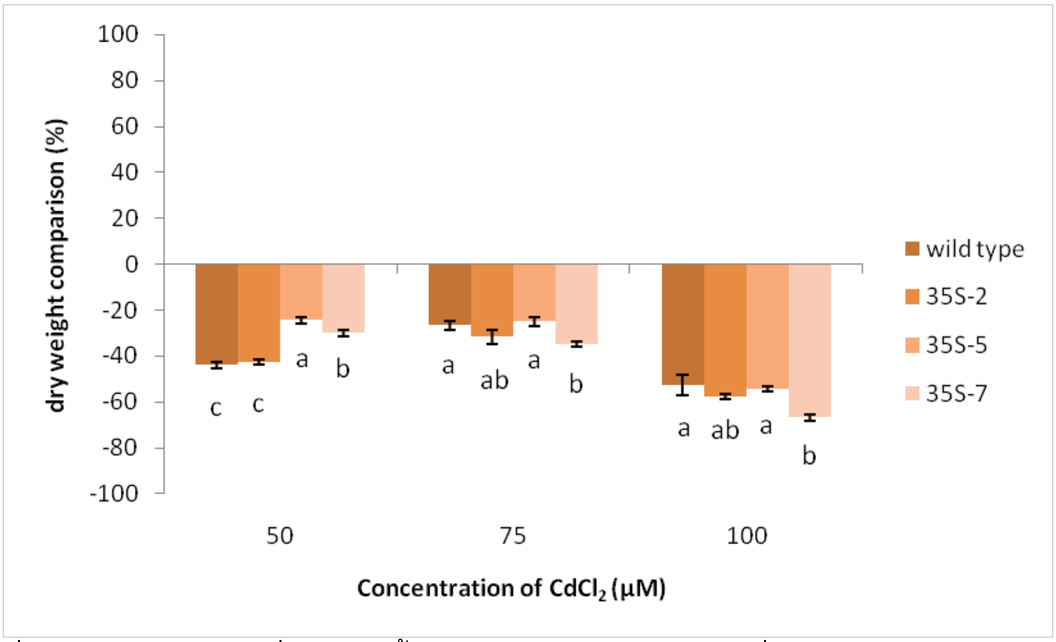
รูปที่ 21 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS (bar=SE)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05) ทำการเปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้จากการปลูกเลี้ยงในภาวะเดียวกันเท่านั้น

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS (mean ± standard error)

ชุดการทดลอง	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดของ Arabidopsis ± standard error*			
	wild type	35S-2	35S-5	35S-7
50 μM $CdCl_2$	-48.3 ± 0.4^a	-9.2 ± 36.4^a	-40.0 ± 1.0^a	-52.6 ± 0.5^a
75 μM $CdCl_2$	-11.4 ± 1.6^a	31.1 ± 23.4^a	14.8 ± 3.3^a	-13.6 ± 1.0^a
100 μM $CdCl_2$	-51.1 ± 1.8^a	-61.3 ± 1.8^b	-53.4 ± 1.6^a	-63.8 ± 0.3^b

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05)



รูปที่ 22 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS (bar=SE)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$) ทำการเปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้จากการปลูกเลี้ยงในภาวะเดียวกันเท่านั้น

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งของ Arabidopsis เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน โดยเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS (mean ± standard error)

ชุดการทดลอง	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งของ Arabidopsis ± standard error*			
	wild type	35S-2	35S-5	35S-7
50 µM $CdCl_2$	-44.0 ± 1.2^{c}	-42.6 ± 1.1^{c}	-24.5 ± 1.3^{a}	-30.0 ± 1.2^{b}
75 µM $CdCl_2$	-26.6 ± 2.0^{a}	-31.7 ± 3.0^{ab}	-24.8 ± 1.9^{a}	-34.8 ± 1.2^{b}
100 µM $CdCl_2$	-52.7 ± 4.4^{a}	-57.7 ± 1.2^{ab}	-54.4 ± 0.9^{a}	-66.8 ± 1.3^{b}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)

บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

1. ศึกษาการแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่มีความสามารถในการทนเค็มแตกต่างกัน

ภาวะเค็มส่งผลกระทบต่อเมแทบอลิซึมภายในพืช ทำให้พืชจำเป็นต้องมีกลไกการปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดได้ พืชที่มีความสามารถในการปรับตัวได้ดีกว่าย่อมเจริญในภาวะเค็มได้ดีกว่า ซึ่งการปรับตัวนี้เป็นผลมาจากการกระตุ้นการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับภาวะต่าง ๆ เช่น ภาวะเครียดจากความเค็ม ความแล้ง อุณหภูมิต่ำ หรือจากโลหะหนัก เป็นต้น

สมพร มณีประสพสุข (2547) เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) กับยีนในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว123-TC171 (LPT123-TC171) ภายใต้ภาวะเค็มโดยใช้เทคนิค differential display พบว่ายีน *OsNUC1* ในข้าวพันธุ์ LPT123 ไม่พบการแสดงออกของยีนในภาวะปกติ แต่มีการแสดงออกของยีนสูงขึ้นหลังจา กได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนในข้าวสายพันธุ์ LPT123-TC171 พบการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในภาวะปกติและสูงขึ้นหลังจากได้รับภาวะเค็ม

ในการศึกษานี้จึงทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน 2 คู่สายพันธุ์พบว่าในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีระดับการแสดงออกของยีนมากกว่าในข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็ม LPT123 แต่ในอีกคู่สายพันธุ์หนึ่งระดับการแสดงออกของยีนในข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็ม KDML105 กลับมีระดับมากกว่าในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม FL530-IL จะเห็นได้ว่าระหว่าง 2 คู่สายพันธุ์มีรูปแบบการตอบสนองในทางตรงกันข้าม อาจจะเป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่สายพันธุ์ ทำให้รูปแบบการแสดงออกของยีนแตกต่างกัน (Walia และคณะ, 2005)

เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในภาวะปกติกับในภาวะเค็มพบว่าในทุกพันธุ์/สายพันธุ์มีระดับการแสดงออกของยีนในภาวะเค็มสูงกว่าในภาวะปกติ แสดงให้เห็นว่ายีน *OsNUC1* เป็นยีนที่ตอบสนองต่อภาวะเค็ม อีกทั้งยังถูกกระตุ้นได้ภายใน 24 ชั่วโมง โดยระดับการแสดงออกสูงสุดอยู่ที่ 12 ชั่วโมง จากจุดนี้ชี้ให้เห็นว่า *OsNUC1* อาจจะมีรูปแบบการแสดงออกแบบ circadian rhythm (Heintzen และคณะ, 1997)

นอกจากนี้ยีนอื่นในกลุ่มของ glycine-rich RNA-binding proteins ซึ่งเป็นกลุ่มที่ใกล้เคียงกับโปรตีน OsNUC1 (glycine-arginine-rich RNA-binding proteins) พบว่ามีรูปแบบการแสดงออกแบบ circadian rhythm เช่นเดียวกัน ตัวอย่างเช่น *AtGRP7 Ccr1* (*Ccr*, cold, circadian rhythm and RNA binding) และ *Ccr2* (Carpenter และคณะ, 1994; Heintzen และคณะ, 1997) โดยลักษณะการแสดงออกของยีนจะค่อย ๆ มีระดับที่สูงขึ้นจนสูงสุดที่ 12 ชั่วโมงจากนั้นจะลดต่ำลง และมีการรายงานว่าบางชนิดมีบทบาทในการทนต่อภาวะเครียด เช่น บทบาทของโปรตีน AtGRP2 ใน Arabidopsis ภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็ม อุณหภูมิต่ำและออสโมติก พบว่า GRP2 มีผลต่อการเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดในภาวะเค็ม เร่งการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นกล้าในภาวะเย็น แต่ไม่ส่งผลต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นกล้าในภาวะเครียดออสโมติก อีกทั้งยังเพิ่มความสามารถในการทนต่อภาวะเย็นและภาวะเยือกแข็งได้ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของ GRP2 กับ ABA และกลูโคส พบว่าทั้ง ABA และกลูโคสไม่มีผลต่อการงอก ชี้ให้เห็นว่า GRP2 ถูกควบคุมผ่านทาง ABA-independent pathway (Kim และคณะ, 2007)

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ putative indica *OsNUC1* promoter (ภาคผนวก ค) โดยใช้ PLACE (Higo และคณะ, 1999) พบว่ามีส่วนจดจำที่เกี่ยวข้องกับภาวะเครียด ฮอร์โมน transcription factors และ circadian rhythm (ตารางที่ 16) ซึ่งการมีของส่วนจดจำบน promoter จะควบคุมให้ยีนตอบสนองต่อสิ่งเร้านั้นได้

ตารางที่ 16 ส่วนจดจำบน putative indica *OsNUC1* promoter

ลำดับเบส	ชนิดของ *cis*-element	Reference
ACGTG	ABA-responsive element (ABRE)	Nakashima และคณะ (2006)
ACCGAGA	dehydration responsive element (DRE)	Kizis และ Pages (2002)
GTAC	copper-responsive element (CuRE)	Quin และ Merchant (1995)
CCGAC	low temperature responsive element (LTRE)	Baker และคณะ (1994)
CAANNNNATC	region necessary for circadian expression	Piechulla และคณะ (1998)
GATAA	conserved sequence upstream of light-regulated genes	Terzaghi และ Cashmore (1995)
CATATG	auxin-responsive element	Xu และคณะ (1997)
WAACCA	MYB recognition site	Abe และคณะ (2003)
TGAC	WRKY recognition site (W box)	Eulgem และคณะ (2000)

2. ศึกษาอิทธิพลของกรดแอบไซซิกต่อการแสดงออกของยีน *OsNUC1*

2.1. การแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่ได้รับกรดแอบไซซิก (ABA) จากภายนอกในภาวะปกติและภาวะเค็ม

จากการให้ ABA จากภายนอกทั้งในภาวะปกติและภาวะเค็ม พบว่าการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวแต่ละพันธุ์/สายพันธุ์มีรูปแบบการแสดงออกที่ไม่แน่นอน โดยที่ในภาวะปกติ ABA สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว KDML105 และ FL530-IL แต่ลดการแสดงออกของยีนในข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 ส่วนในภาวะเค็ม ABA ส่งผลให้ยีนมีการแสดงออกทั้งเพิ่มขึ้นและลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับ ABA นอกจากนี้การที่พ่นตัวทำละลายก็มีผลต่อการแสดงออกของยีนเช่นกัน อาจเป็นผลเนื่องมาจากการควบคุมการทำงานของยีน *OsNUC1* ถูกควบคุมโดยผ่านทาง ABA-independent pathway

จากการวิเคราะห์ส่วนของ promoter จะพบส่วนของ ABA-responsive element (ABRE) ที่ทำให้ยีนตอบสนองต่อ ABA ได้ แต่การมีส่วนจดจำ ABRE เพียงหนึ่งซ้ำไม่เพียงพอต่อการกระตุ้นการแสดงออกของยีนด้วย ABA เนื่องจากกระบวนการนี้ต้องการ ABRE หลายซ้ำ หรือการรวมกันระหว่าง ABRE กับส่วน coupling element (CE) ซึ่งเป็น ABA-responsive complex (ABRC) ที่เล็กที่สุดสำหรับ promoter ของยีนที่ถูกควบคุมด้วย ABA และกลุ่มของ coupling element ที่เคยมีการรายงาน ได้แก่ CE1 CE3 และ DRE (Shen และคณะ, 2004; Gómez-Porras และคณะ, 2007) จะเห็นได้ว่าส่วนของ putative *OsNUC1* promoter พบ ABRE เพียงหนึ่งซ้ำและ DRE เท่านั้น ไม่พบส่วนของ CE3 หรือ CE1 จึงอาจทำให้ ABA ไม่มีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ผ่านทาง ABA-dependent pathway แต่อาจจะถูกกระตุ้นด้วย ABA ในบางภาวะได้

2.2. การแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่ได้รับ ABA inhibitor (abamineSG) จากภายนอกในภาวะปกติและภาวะเค็ม

จากการให้ abamineSG ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NCED ส่งผลให้การสร้าง ABA ในพืชลดลง ใช้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *OsNUC1* กับ ABA (Kitahata และคณะ, 2006) พบว่าหลังจากข้าวได้รับ abamineSG การแสดงออกของยีน *OsNUC1* มีระดับสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับ abamineSG แต่หากเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่พ่นตัวทำละลาย พบว่าการแสดงออกของยีนถูกกระตุ้นโดยตัวทำละลายได้เช่นกัน ดังนั้นแสดงว่าระดับการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นไม่ได้เป็นผลมาจาก abamineSG แต่เป็นผลจากการฉีดพ่นตัวทำละลาย

Sripinyowanich และคณะ (2010) ทำการหาปริมาณ ABA ในข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 พบว่าการให้ abamineSG จากภายนอกสามารถลดปริมาณ ABA ภายในได้ทั้งในภาวะปกติและภาวะเค็ม ซึ่งก่อนหน้านี้มีงานวิจัยอื่นที่ใช้ abamineSG ในการลดประสิทธิภาพการสังเคราะห์ ABA ในพืช ตัวอย่างเช่น Arabidopsis (Kitahata และคณะ, 2006) ผลการทดลองนี้สนับสนุนว่าการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ถูกควบคุมผ่านทาง ABA-independent pathway เนื่องจากเมื่อ ABA ภายในเซลล์ลดลงไม่มีผลทำให้การแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3. ศึกษาการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่ได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123-TC171 หลังจากได้รับภาวะเครียดต่าง ๆ พบว่าภาวะเครียดจากความแล้งและโลหะหนักทั้ง 2 ชนิด คือ คอปเปอร์ ($CuSO_4$) และ แคดเมียม ($CdCl_2$) สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนได้ แต่ภาวะเครียดจากอุณหภูมิต่ำมีผลทำให้การแสดงออกของยีนลดลง

จากการวิเคราะห์ส่วนของ promoter พบส่วนจดจำ dehydration-responsive element (DRE) ซึ่งตอบสนองต่อภาวะแล้ง จากงานวิจัยของ Yamaguchi-Shinozaki และ Shinozaki (1994) พบว่าส่วน DRE เกี่ยวข้องกับการตอบสนองอย่างรวดเร็วของยีน *Rd29A* ในภาวะเครียดจากความแล้งและความเค็ม อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะเครียดจากอุณหภูมิต่ำ

ส่วน copper-responsive element (CuRE) เป็นส่วนจดจำที่ตอบสนองต่อคอปเปอร์ มีการรายงานว่าโปรตีน Cu Response Regulator (CRR1) ใน *Chlamydomonas* ซึ่งเป็น transcription factor ที่ควบคุมการตอบสนองต่อภาวะการขาดคอปเปอร์ โดยบริเวณเป้าหมายของโปรตีน CRR1 จะมีส่วนของ Cu-responsive regulatory element ซึ่งรวมถึง GTAC core motif ทั้ง 2 ส่วนนี้เป็นส่วนที่ต้องการสำหรับกระบวนการที่กระตุ้นด้วย CRR1 ในภาวะที่มีคอปเปอร์ ต่ำ (Burkhead และคณะ, 2009)

นอกจากนี้ยังพบส่วนจดจำ low temperature responsive element (LTRE) ซึ่งตอบสนองต่ออุณหภูมิต่ำ (Dunn และคณะ, 1998) แต่จากการศึกษาการแสดงออกของยีนพบว่า ภาวะเครียดจากอุณหภูมิต่ำทำให้การแสดงออกของยีนลดลงในชั่วโมงที่ 2 และ 6 แทนที่จะมีการแสดงออกมากขึ้น อาจเนื่องมาจากมีการควบคุมอื่น ๆ ที่มีผลต่อการทำงานของยีน

จากการมีส่วนจดจำต่าง ๆ บน promoter ดังที่กล่าวข้างต้นทำให้การแสดงออกของยีน *OsNUC1* สามารถตอบสนองเพิ่มขึ้นต่อภาวะเครียดจากความเค็ม ความแล้ง และโลหะหนัก ส่วนภาวะเครียดจากอุณหภูมิต่ำกลับมีผลลดการแสดงออก แม้ว่าจะพบ LTRE ในบริเวณที่เป็น putative promoter ของ OsNUC1 แสดงว่าในภาวะดังกล่าวอาจมีปัจจัยอื่น ๆ เข้ามาเกี่ยวข้องนอกเหนือจาก *cis*-element LTRE

4. ศึกษาความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดจากโลหะหนักของ *Arabidopsis thaliana* L. ที่ได้รับการถ่ายยีน partial *OsNUC1*

จากการที่ยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123-TC171 มีระดับการแสดงออกมากขึ้นในภาวะเครียดจากโลหะหนัก จึงใช้ Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีน partial *OsNUC1* ภายใต้การควบคุมของ *CaMV35S* promoter ซึ่ง Sripinyowanich และคณะ (2009) พบว่า Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีนนี้มีความสามารถในการทนต่อภาวะเค็ม ในการทดลองนี้จึงนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม 25 50 และ 75 µM $CuSO_4$ หรือ 50 75 และ 100 µM $CdCl_2$ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีน มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากกว่าพันธุ์ปกติในทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นในอาหารสูตร MS ที่มีการเติม 100 µM $CdCl_2$ น้ำหนักแห้งของทั้งพืชที่ได้รับการถ่ายยีนและพืชพันธุ์ปกติไม่มีความแตกต่างกัน

จากการพิจารณาเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง พบว่า Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีน มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งลดลงน้อยกว่าพันธุ์ปกติในชุดการทดลองที่มีการเติม 50 µM $CuSO_4$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งลดลงน้อยกว่าพันธุ์ปกติ ในชุดการทดลองที่มีการเติม 50 µM $CdCl_2$ ส่วนที่ความเข้มข้นสูงขึ้นเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีนมีความสามารถในการรักษาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเมื่อได้รับภาวะเครียดจากโลหะหนักได้ในระดับหนึ่ง แต่เมื่อ ความเข้มข้นของโลหะหนักมากขึ้น ความสามารถในก ารรักษาน้ำหนักจะลดลง ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการที่ส่วนของ RRM และ GAR domain ของโปรตีน OsNUC1 ทำให้กลไกการปรับตัวของพืชมีการเปลี่ยนแปลง เช่น เพิ่มความสามารถในการกำจัด H_2O_2 ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์หลังจากได้รับภาวะเครียด ซึ่ง H_2O_2 ถูกชักนำให้เกิดขึ้นได้จากภาวะเครียดหลายชนิดได้แก่ ภาวะเครียดจากโลหะหนัก ความแล้ง และความเค็ม (Maksymiec, 2007) โดยการกำจัด H_2O_2 ทางหนึ่งคือ การ เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในระบบ antioxidant system ตัวอย่างเช่นในงานวิจัยของ Chamnanmanoontham และคณะ (2010) ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *AtSOS1* แอกทิวิตีของ H^+-ATPase รวมถึง antioxidant enzymes ได้แก่ ascorbate peroxidase (APX) และ guaiacol peroxidase (PX) และปริมาณ H_2O_2 ใน Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีน partial *OsNUC1* หลังจากได้รับภาวะเครียดจากความเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าพืชที่ได้รับการถ่ายยีนมีระดับการแสดงออกของยีน *AtSOS1* และแอกทิวิตีของเอนไซม์ H^+-ATPase เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ปกติ และในส่วนของ antioxidant

enzyme activity พบว่ามีแอกทิวิตีของเอนไซม์ APX สูงขึ้น ในทางกลับกันมี แอกทิวิตีของเอนไซม์ PX ลดลง ซึ่งการที่ แอกทิวิตีของเอนไซม์ APX สูงขึ้นทำให้ปริมาณ H_2O_2 ในพืชที่ได้รับการถ่ายยีนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับในพันธุ์ปกติ จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าหน้าที่ของ RRM motif บน OsNUC1 น่าจะเกี่ยวข้องกับ mRNA stabilization ของยีนที่เกี่ยวข้องใน ion homeostasis และการตอบสนองของ antioxidant system ขณะที่ได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม ซึ่งอาจจะพบลักษณะนี้ในภาวะเครียดจากโลหะหนักได้เช่นเดียวกัน

ยีนที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มยังอาจพบว่ามีการตอบสนองกับภาวะเครียดทางกายภาพอื่น ๆ อีกด้วย ดังเช่น ยีน *aldehyde dehydrogenase* (*AtALDH*) จาก Arabidopsis (Sunkar และคณะ, 2003) ซึ่งเป็นยีนที่ตอบสนองต่อความเครียด โดยมีการแสดงออกมากขึ้นภายใน 8 ชั่วโมงหลังจากได้รับภาวะเค็ม อย่างไรก็ดีภาวะเครียดจาก H_2O_2 (oxidative stress) คอปเปอร์ และ แคดเมียม (heavy metal stress) สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *AtALDH3* ได้เช่นกัน อีกทั้งผู้วิจัยได้ทำการถ่ายยีน *AtALDH3* เข้าสู่ Arabidopsis เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีน พบว่านอกจาก Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีนจะมีความสามารถในการทนต่อภาวะเค็มแล้วยังสามารถทนต่อภาวะเครียดจากความแล้ง ออกซิเดชัน และโลหะหนักได้อีกด้วย

พิษของโลหะหนักต่อพืชมีสาเหตุหลัก 3 ประการ คือ 1. พิษอันเกิดจากโลหะหนักเข้าจับกับโปรตีนบริเวณหมู่ thioyl-, histidyl-, หรือ carboxyl- โดยตรงทำให้มีผลต่อกิจกรรมและหน้าที่ของโปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์ 2. โลหะหนักก่อให้เกิด reactive oxygen species ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ และ 3. โลหะหนักบางชนิดไปเข้าแทนที่การทำงานของไอออนบางชนิด เช่น Cd^{2+} เข้าแทนที่ Ca^{2+} ในการทำงานของ Photosystem II (PSII) reaction center ทำให้เกิดการยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของ PSII โดยแสง (Sharma และ Dietz, 2008) การป้องกันตนเองของพืชจากโลหะหนักมีหลายกระบวนการ ทั้งการกระตุ้นการทำงานของระบบขจัดอนุมูลอิสระ (Schützendübel และ Polle, 2002; Sharma และ Dietz, 2008) การสังเคราะห์ phytochelatin ซึ่งมี glutathione เป็นสารตั้งต้น (Cobbet และ Goldsbrough, 2002) ซึ่ง glutathione ยังมีบทบาทร่วมในระบบการขจัดอนุมูลอิสระอีกด้วย (May และคณะ, 1998) มีการรายงานว่า การเพิ่มการสังเคราะห์ phytochelatin (Zhu และคณะ, 1999) หรือ glutathione (Moontongchoon และคณะ, 2008) ในพืชดัดแปรพันธุกรรมทำให้เพิ่มความต้านทานต่อโลหะหนักแคดเมียมได้ แต่อย่างไรก็ดีกระบวนการสร้าง phytochelatin และการใช้ glutathione ในระบบการจัดอนุมูลอิสระต้องอยู่ในสมดุล มิฉะนั้นก็อาจทำให้เกิด oxidative stress ได้ (Schützendübel และ Polle, 2002; Nocito และคณะ, 2006) นอกจากนี้ในการศึกษาล่าสุดพบว่า การทำงานของ *OXS3* gene จาก *Brassica juncea* อาจมีกลไกการ

ทำงานให้เซลล์ทนทานต่อแคดเมียมโดยการดัดแปรโครมาทินทำให้สามารถปกป้องสาย DNA จากพิษของโลหะหนักหรืออาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ transcription ซึ่งนำไปสู่การแสดงออกของยีนเพื่อใช้ในการปรับตัวต่อโลหะหนัก (Blanvillain และคณะ, 2009) ดังนั้นการที่ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน *OsNUC1* บางส่วนนี้ สามารถต้านทานต่อโลหะหนักได้ดีขึ้น อาจเป็นผลมาจากกระบวนการทำงานอย่างใดอย่างหนึ่งดังกล่าวข้างต้น ซึ่งน่าจะได้มีการศึกษาต่อไปในอนาคต

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

1. ศึกษาการแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่มีความสามารถในการทนเค็มแตกต่างกัน

การแสดงออกของยีน *OsNUC1* มีการตอบสนองต่อภาวะเค็ม ซึ่งระดับการแสดงออกในภาวะเค็มมากกว่าในภาวะปกติในข้าวทุกพันธุ์/สายพันธุ์ และสามารถถูกกระตุ้นได้ภายใน 24 ชั่วโมง โดยระดับการแสดงออกสูงสุดอยู่ที่ 12 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่ามีแนวโน้มว่าอาจจะมีรูปแบบการแสดงออกของยีนเป็นแบบ circadian rhythm แต่ยังต้องทำการศึกษาให้ชัดเจนยิ่งขึ้น

2. ศึกษาอิทธิพลของกรดแอบไซซิกต่อการแสดงออกของยีน *OsNUC1*

2.1. การแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่ได้รับกรดแอบไซซิก (ABA) จากภายนอกในภาวะปกติและภาวะเค็ม

การให้ ABA จากภายนอกทั้งในภาวะปกติและภาวะเค็ม ไม่มีผลควบคุมการแสดงออกของยีน *OsNUC1* เนื่องจากในข้าวแต่ละพันธุ์/สายพันธุ์มีรูปแบบการแสดงออกที่ไม่แน่นอน ABA ส่งผลให้ยีนมีการแสดงออกทั้งเพิ่มขึ้นและลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับ ABA นอกจากนี้การที่พ่นตัวทำละลายก็มีผลต่อการแสดงออกของยีน *OsNUC1* เช่นกัน

2.2. การแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่ได้รับ ABA inhibitor (abamineSG) จากภายนอกในภาวะปกติและภาวะเค็ม

การให้ abamineSG ไม่มีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนทั้งในภาวะปกติและภาวะเค็ม จากผลการทดลองทั้ง 2 ส่วนนี้สนับสนุนว่าการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ถูกควบคุมผ่านทาง ABA-independent pathway

3. ศึกษาการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวที่ได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ

การแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123-TC171 หลังจากได้รับภาวะเครียดจากอุณหภูมิต่ำมีผลทำให้การแสดงออกของยีนลดลง ภาวะเครียดจากความแล้งและจากโลหะหนัก cadmium สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนได้ในช่วงแรกตั้งแต่ 0.5 ถึง 2 ชั่วโมง และภาวะเครียดจากโลหะหนัก copper สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนได้ตลอด 24 ชั่วโมง

4. ศึกษาความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดจากโลหะหนักของ *Arabidopsis thaliana* L. ที่ได้รับการถ่ายยีน partial *OsNUC1*

เมื่อนำ Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีน *OsNUC1* บางส่วนเฉพาะบริเวณ RRM และ GAR domain ภายใต้การควบคุมของ *CaMV35S* promoter มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี 25 50 และ 75 μM $CuSO_4$ หรือ 50 75 และ 100 μM $CdCl_2$ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีน สามารถรักษาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งได้มากกว่าพันธุ์ปกติในทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นในอาหารสูตร MS ที่มีการเติม 100 μM $CdCl_2$ น้ำหนักแห้งของทั้งพืชที่ได้รับการถ่ายยีนและพืชพันธุ์ปกติไม่มีความแตกต่างกัน

ข้อเสนอแนะ

1. ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ต่อเนื่องจนถึงประมาณ 2-3 วัน โดยไม่ให้มีปัจจัยของแสงมาเกี่ยวข้อง โดยปลูกในที่มืดหรือที่มีแสงตลอดเวลาที่ทำการทดลอง เพื่อเป็นการยืนยันการแสดงออกของยีนในรูปแบบ circadian rhythm

2. ควรหาข้อมูลเพิ่มเติม เกี่ยวกับวิธีการเก็บตัวอย่างในการศึกษาการแสดงออกในระยะแรกของยีนหลังจากที่มีการพ่นสารละลาย เนื่องจากการแสดงออกของยีนอาจเป็นผลมาจากการพ่นตัวทำละลายไม่ได้เกิดจากผลของสารนั้นจริง หากไม่มีชุดควบคุมที่พ่นตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว อาจทำให้วิเคราะห์ผลการทดลองผิดพลาดได้

3. ศึกษาอิทธิพลอื่น ๆ ต่อการทำงานของยีน *OsNUC1* เนื่องจากการวิเคราะห์บริเวณ promoter พบส่วนจดจำของฮอร์โมน ABRE DRE CuRE LTRE และ transcription factor ที่เกี่ยวข้องกับภาวะเครียด เป็นที่น่าสนใจเกี่ยวกับการควบคุมการทำงานของยีน เพื่อที่จะทราบถึงกลไกการทำงานของ *OsNUC1* ภายใต้ภาวะเครียดได้มากยิ่งขึ้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2535. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น (พิมพ์ครั้งที่7). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมพร มณีประสพสุข. 2547. การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในข้าว *Oryza sativa* L. พันธุ์เหลืองประทิว 123 สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ทนเค็มในภาวะเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2003. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*. 15: 63-78.

Baker, S.S., Wilhelm, K.S. and Thomashow, M.F. 1994. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has *cis*-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Molecular Biology*. 24: 701-713.

Blanvillain, R., Kim, J.H., Wu, S., Lima, A. and Ow, D.W. 2009. OXIDATIVE STRESS 3 is a chromatin-associated factor involved in tolerance to heavy metals and oxidative stress. *The Plant Journal*. 57: 654-665.

Bogre, L., Jonak, C., Mink, M., Meskiene, I., Traas, J., Ha, D.T., Swoboda, I., Plank, C., Wagner, E., Heberle-Bors, E. and Hirt, H. 1996. Developmental and cell cycle regulation of alfalfa *nucMs1,* a plant homolog of the yeast Nsr1 and mammalian nucleolin. *The Plant Cell*. 8: 417-428.

Burkhead, J.L., Reynolds, K.A., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M. and Pilon, M. 2009. Copper homeostasis. *New Phytologist*. pp. 1-18.

Carpenter, C.D., Kreps, J.A. and Simon, A.E. 1994. Genes encoding glycine-rich *Arabidopsis thaliana* proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiology*. 104: 1015-1025.

Chamnanmanoontham, N., Sripinyowanich, S., Qu, L.-J., Gu, H., Roytrakul, S. and Chadchawan, S. 2010. The role of RRM motif of rice nucleolin in salt tolerance via up-regulation of *Na+/H+ antiporter*, *SOS1* gene expression and H^{+}-ATPase activity. *Plant and Animal Genome XVIII Conference, Town and Country Convention Center, San Diego, CA, USA.* 9-13 January 2010.

Cobbett, C. and Goldsbrough, P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology.* 53: 159-182.

Dunn, M.A., White, A.J., Vural, S. and Hughes, M.A. 1998. Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (*blt*4.9) from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Molecular Biology*. 38: 551–564.

Eichler, D.C. and Craig, N. 1994. Processing of eukaryotic ribosomal RNA. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* 49: 197-239.

Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S. and Somssich, I.E. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Science.* 5:199-206.

FAO Rice Market Monitor. 2009. *Trade and Markets Division Food and Agriculture Organization of the United Nation.* [Online]. Available from: http://www.fao.org/docrep/012/al004e/al004e00.pdf [2010, February]

Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., and Bouvet, P. 1999. Structure and functions of nucleolin. *Journal of Cell Science.* 112: 761-772.

Gómez-Porras, J.L., Riaño-Pachón, D.M., Dreyer, I., Mayer, J.E. and Mueller-Roeber, B. 2007. Genome-wide analysis of ABA-responsive elements ABRE and CE3 reveals divergent patterns in Arabidopsis and rice. *BMC Genomics.* 8: 260.

He, H. and Li, J. 2008. Proteomic analysis of phosphoproteins regulated by abscisic acid in rice leaves. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 371: 883-888.

Heintzen, C., Nater, M., Apel, K. and Staiger, D. 1997. AtGRP7, a nuclear RNA-binding protein as a component of a circadian-regulated negative feedback loop in *Arabidopsis thaliana. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 94: 8515-8520.

Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. and Korenaga, T. 1999. Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Research*. 27: 297-300.

Hura, J., Jung, K.H., Lee, C.H. and Ana, G. 2004. Stress-inducible *OsP5CS2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Science*. 167: 417-426.

Ito, Y., Katsura, K., Maruyama, K., Taji, T., Kobayashi, M., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2006. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant and Cell Physiology*. 47: 141-153.

Kim, J.Y., Park, S.J., Jang, B., Jung, C.-H., Ahn, S.J., Goh, C.-H., Cho, K., Han, O. and Kang, H. 2007. Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *Plant Journal.* 50: 439-451.

Kitahata, N., Han, S.Y., Noji, N., Saito, T., Kobayashi, M., Nakano, T., Kuchitsu, K., Shinozaki, K., Yoshida, S., Matsumoto, S., Tsujimoto, M. and Asamia, T. 2006. A 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase inhibitor for use in the elucidation of abscisic acid action mechanisms. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 14: 5555–5561.

Kizis, D. and Pages, M. 2002. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. *Plant Journal.* 30: 679-689.

Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Minami, H., Kakaya, Y. and Hattori, T. 2004. Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *The Plant Cell*. 16: 1163-1177.

Kojima, H., Suzuki, T., Kato, T., Enomoto, K., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Saez-Vasquez, J., Manuel, E., Nakagawa, T., Ishiguro, S. and Nakamura, K. 2007. Sugar-inducible expression of the *nucleolin-1* gene of *Arabidopsis thaliana* and its role in ribosome synthesis, growth and development. *Plant Journal.* 49: 1053-1063.

Lapeyre, B., Bourbon, H. and Amalric, F. 1987. Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 84: 1472-1476.

Lee, W.C., Xue, Z. and Melese, T. 1991. The *NSR1* gene encodes a protein that specifically binds nuclear localization sequences and has two RNA recognition motifs. *The Journal of Cell Biology*. 113: 1-12.

Lischwe, M.A., Roberts, K.D., Yeoman, L.C. and Busch, H. 1982. Nucleolar specific acidic phosphoprotein C23 is highly methylated. *The Journal of Biological Chemistry*. 257: 14600-14602.

Maksymiec, W. 2007. Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 29:177-187.

Mansour, M.M.F. and Salama, K.H.A. 2004. Cellular basis of salinity tolerance in plants. *Environmental and Experimental Botany.* 52: 113-122.

May, M.J., Vernoux, T., Leaver, C., Montagu, M. and Inze, D. 1998. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany.* 49: 649-667.

Medina, F.J., Cerdido, A. and Fernández-Gómez, M.E. 1995. Components of the nucleolar processing complex (pre-rRNA, fibrillarin and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli*. Experimental Cell Research.* 221: 111-125.

Moontongchoon, P., Chadchawan, S., Leepipatpiboon, N., Akaracharanya, A., Shinmyo, A. and Sano, H. 2008. Cadmium-tolerance of transgenic Ipomoea aquatica expressing serine acetyltransferase and cysteine synthase. *Plant Biotechnology.* 25: 201-203.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.

Nakashima, K., Fujita, Y., Katsura, K., Maruyama, K., Narusaka, Y., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2006. Transcriptional regulation of *ABI3*- and ABA-responsive genes including RD29B and RD29A in seeds, germinating embryos, and seedlings of Arabidopsis. *Plant Molecular Biology.* 60: 51-68.

Nocito, F.F., Lancilli, C., Crema, B., Fourcroy, P., Davidian, J.-C. and Sacchi, G.A. 2006. Heavy metal stress and sulphate uptake in maize roots. *Plant Physiology*. 141: 1138-1148.

Orrick, L.R., Olson, M.O. and Busch, H. 1973. Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 70: 1316-1320.

Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29: 2002-2007.

Piechulla, B., Merforth, N. and Rudolph, B. 1998. Identification of tomato *Lhc* promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Molecular Biology*. 38: 655-662.

Pontvianne, F., Matia, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F.J., Echeverria, M. and Saez-Vasquez, J. 2007. Characterization of *AtNUC-L1* reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of *AtNUC-L2* gene in Arabidopsis. *Molecular Biology of the Cell*. 18: 369-379.

Query, C.C., Bentley, R.C. and Keene, J.D. 1989. A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 SnRNP protein. *Cell*. 57: 89-101.

Quinn, J.M. and Merchant, S. 1995. Two copper-responsive elements associated with the Chlamydomonas *Cyc6* gene function as targets for transcriptional activators. *The Plant Cell*. 7: 623-628.

Schmidt-Zachmann, M.S. and Nigg, E.A. 1993. Protein localization to the nucleolus: a search for targeting domains in nucleolin. *Journal of Cell Science*. 105: 799-806.

Schützendübel, A. and Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*. 53: 1351-1365.

Sharma, S.S. and Dietz, K.-J. 2008. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science*. 14: 43-50.

Shen, Q.J., Casaretto, J.A., Zhang, P. and Ho, T.-H.D. 2004. Functional definition of ABA-response complexes: the promoter units necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Molecular Biology*. 54: 111-124.

Sripinyowanich, S., Klomsakul, P., Boonburapong, B., Bangyeekhun, T., Asami, T., Gu, H., Buaboocha, T. and Chadchawan, S. 2010. Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): The role of *OsP5CS1* and *OsP5CR* gene expression during salt stress. *Environmental and Experimental Botany*. doi:10.1016/j.envexpbot.2010.01.009.

Sripinyowanich, S., Maneeprasopsuk, S., Buabucha, T., Qu, L.-J., Gu, H. and Chadchawan, S. 2009. Overexpression of *OsNUC1*, a novel salt-stress responsive gene, increases growth and salt tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Biology 2009*, Hono Lulu, Hawaii, USA. 18-22 July 2009. pp. 136-137.

Srivastava, M., McBride, O.W., Fleming, P.J., Pollard, H.B., and Burns, A.L. 1990. Genomic organization and chromosomal localization of the human nucleolin gene. *The Journal of Biological Chemistry.* 265: 14922-14931.

Srivastava, M. and Pollard, H.B. 1999. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal.* 13: 1911-1922.

Sunkar, R., Bartels, D. and Kirch, H.-H. 2003. Overexpression of a stress-inducible *aldehyde dehydrogenase* gene *from Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant Journal.* 35: 452-464.

Terzaghi, W.B. and Cashmore, A.R. 1995. Light-regulated transcription. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 46: 445-474.

Thikart, P., Kowanij, D., Seelanan, T., Vajrabhaya, M., Bangyeekhun, T. and Chadchawan, S. 2005. Genetic variation and stress tolerance of somaclonal variegated rice and its original cultivar. *Journal of Scientific Research of Chulalongkorn University*. 30: 63-75.

Vajrabhaya, M. and Vajrabhaya, T. 1991. Somaclonal variation of salt tolerance in rice. In Y. P. S. Bajaj, (ed.). *Biotechnology in Argriculture and Forestry*. Berlin Heidillberg: Spring-Valege. 14: 368-382.

Walia, H., Wilson, C., Condamine, P., Liu, X., Ismail, A.M., Zeng, L., Wanamaker, S.I., Mandal, J., Xu, J. Cui, X. and Close, T.J. 2005. Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage. *Plant Physiology*. 139: 822-835.

Wang, W., Vinocur, B. and Altman, A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*. 218: 1-14.

Xu, N., Hagen, G. and Guilfoyle, T. 1997. Multiple auxin response modules in the soybean *SAUR 15A* promoter. *Plant Science.* 126: 193-201.

Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 1994. A novel *cis*-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell*. 6: 251–264.

Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Tarun, A.S., Weber, S.U., Jouanin, L. and Terry, N. 1999. Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing γ-glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiology*. 121: 1169-1177.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991)

สารเคมี	**ปริมาณสาร** (mg/l)
Macroelements	
Potassium nitrate (KNO_3)	580
Calcium sulfate($CaSO_4$)	500
Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)	450
Triple superphosphate	250
Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$)	100
Microelements	
Di-sodium ethylene diamine tetraacetate (Na_2EDTA) [a]	160
Ferrous sulfate ($FeSO_4.7H_2O$)[a]	120
Manganese sulfate ($MnSO_4.H_2O$)	15
Boric acid (H_3BO_3)	5
Zinc sulfate ($ZnSO_4.7H_2O$)	1.5
Potassium iodide (KI)	1.0
Sodium molybdate (Na_2MoO_4. $2H_2O$)	0.1
Copper sulfate($CuSO_4$. $5H_2O$)	0.05
Cobalt chloride ($CoCl_2$. $6H_2O$)	0.05

[a] **การเตรียม** $FeSO_4$ stock **ความเข้มข้น** 30 g/L (1 **ลิตร**)

1. ชั่ง Na_2EDTA 40 กรัม และ $FeSO_4.7H_2O$ 30 กรัม
2. แยกละลายในน้ำกลั่น 500 ml ทีละตัว ที่อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส
3. ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน แล้วพ่นฟองอากาศประมาณ 3-4 ชั่วโมงจนกระทั่งได้สารละลายใส

สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

สารละลาย	ส่วนประกอบ
RNA Extraction Buffer	100 mM Tris pH 9.0 100 mM NaCl 20 mM EDTA pH 8.0 1% lauryl sarcosinate 0.1% (v/v) β-mercaptoethanol 0.1% DEPC
RNA loading dye and DNA loading dye	50% glycerol 0.25% bromophenol blue 0.25% xylene cyanol FF
5x TBE	54 g Tris-base 27.5 g boric acid 20ml 0.5 M EDTA pH 8.0
DEPC-treated TE buffer	10mM Tris pH 8.0 1mM EDTA 0.1% DEPC
Tris.Cl (pH 8.0)	121.1 g Tris-base distilled water 800 ml conc.HCl 42 ml, adjust pH to 8.0
EDTA (pH 8.0)	186.1 g EDTA distilled water 800 ml 20 g NaOH, adjust pH to 8.0

ภาคผนวก ข

1. วิธีการสกัด RNA ดัดแปลงจากวิธี Hot Phenol ของ Thikart และคณะ (2005)

1.1 บดตัวอย่างใบข้าวที่แช่แข็งกับไนโตรเจนเหลว ในโกร่งบดที่ผ่านการทำลาย RNase แล้ว จากนั้นตักตัวอย่างพืชที่บดเป็นผงละเอียดใส่หลอด microcentrifuge ที่ทำให้เย็นจัดด้วยไนโตรเจนเหลว

1.2 เติม RNA extraction buffer และ phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) (v/v) อย่างละ 500 µl ซึ่งอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พลิกกลับไปกลับมาอย่างรวดเร็ว จากนั้นแช่ในน้ำแข็งทันที

1.3 ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

1.4 ปิเปตสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่ นำมาสกัดซ้ำด้วย phenol: chloroform: isoamyl (25:24:1) (v/v) ปริมาตรเท่ากับสารละลายในหลอด

1.5 ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

1.6 ปิเปตสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่ เติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายในหลอด ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปตกตะกอนที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.7 ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 80% ethanol ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

1.8 ละลายตะกอนใน DEPC-treated TE buffer 160 µl จากนั้นเติม 10 M $LiCl_2$ 40 µl นำไปตกตะกอนที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 18 ชั่วโมง

1.9 ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายชั้นบนทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 80% ethanol ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

1.10 ละลายตะกอนใน DEPC-treated TE buffer 20 µl

2. วิธีการกำจัด DNA ด้วยเอนไซม์ DNase I

2.1 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยากำจัด DNA ประกอบด้วย

Total RNA	20 µg
Cloned DNase I buffer	1X
Cloned DNase I (RNase-free)	10 U
DEPC-treated water	up to 50 µl

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.2 นำสารละลายในข้อ 2.1 มาเติม DEPC-treated water 100 µl จากนั้นเติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) (v/v) 150 µl เขย่าให้เข้ากัน

2.3 ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.4 ปิเปตสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่ เติม 3M sodium acetate ปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของสารละลายในหลอด และ isoamyl alcohol ปริมาตร 0.6 เท่าของสารละลายในหลอด ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปตกตะกอนที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.5 ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายชั้นบนทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 80% ethanol ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2.6 ละลายตะกอนใน DEPC-treated TE buffer 10 µl

3. วิธีการสร้าง cDNA สายแรกด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase

3.1 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการสร้าง cDNA สายแรกประกอบด้วย

DNase-treated RNA	2 µg
M-MLV reaction buffer	1X
RNase-free dNTPs	100 ng
OligodT	100 ng
M-MLV reverse transcriptase	200 U
DEPC-treated water	up to 20 µl

3.2 นำสารละลายไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำ cDNA ที่ได้ไปใช้เป็นแม่แบบในการทำ PCR ต่อไป

4. วิธีการเตรียมสารละลายกรดแอบไซซิก (ABA)

4.1 วิธีการเตรียม stock 1000 µM ABA

ชั่งกรดแอบไซซิกหนัก 5.27 กรัม ละลายด้วย ethanol 500 µl คนให้เข้ากันจนได้สารละลายใส จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปผสมให้เข้ากัน เติม Triton X-100 ปริมาตร 100 µl จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 20 ml

4.2 วิธีการเตรียม working concentration ของสารละลายกรดแอบไซซิก

เจือจาง stock solution ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ stock 1000 µM ABA : น้ำกลั่น ในอัตรา 1:9 ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน

4.3 วิธีการเตรียมสารละลาย 0 µM ABA

ผสม ethanol 500 µl กับน้ำกลั่น 10 ml และเติม Triton X-100 ปริมาตร 100 µl ลงไปคนให้เข้ากันจนได้สารละลายใส จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 20 ml ใช้สำหรับเป็น stock solution หากต้องการเตรียม working solution ใช้วิธีการที่ระบุไว้ในข้อ 4.2 แต่เปลี่ยนมาใช้ stock 0 µM ABA แทน

5. วิธีการเตรียมสารละลาย abamineSG

5.1 วิธีการเตรียม stock 1000 µM abamineSG

ปิเปต 1 M abamineSG (ใน DMSO) 10 µl ผสมกับน้ำกลั่น 5 ml ผสมให้เข้ากัน และเติม Triton X-100 ปริมาตร 100 µl จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 10 ml

5.2 วิธีการเตรียม working concentration ของสารละลาย abamineSG

เจือจาง stock solution ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ stock 1000 µM abamineSG : น้ำกลั่นในอัตรา 1 : 9 ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน

5.3 วิธีการเตรียมสารละลาย 0 µM ABA

เติม DMSO 100 µl ในน้ำกลั่น 9 ml และเติม Triton X-100 ปริมาตร 100 µl ลงไปคนให้เข้ากันจนได้สารละลายใส จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 10 ml ใช้สำหรับเป็น stock solution หากต้องการเตรียม working solution ใช้วิธีการที่ระบุไว้ในข้อ 5.2 แต่เปลี่ยนมาใช้ stock 0 µM abamineSG แทน

ภาคผนวก ค

1. ลำดับเบสของยีน *OsNUC1*

AK103446: full-length japonica *OsNUC1*

```
>gi|32988655|dbj|AK103446.1| Oryza sativa Japonica Group cDNA
clone:J033129G11, full insert sequence

   1 gattacctcc ccgcccgcgc acctcgagcc cccaggtccg cctcgcctct ccgtcgcttg
  61 ccgccgcccg cagtggtcgc cggccgcgcg gggcttcgcc ggtgtcgctt cctcgtttgg
 121 aattaattaa gcaatactta atatgggcaa gtcaagcaag aaatctgctg ttgaagttgc
 181 acctacctct gtctcagtct cagaggggaa atctgggaag aagggaaaga gaaatgcaga
 241 agatgagatt gagaaagctg tgagtgccaa gaaacaaaag actgtacgtg agaaggttgt
 301 gccctcaaag gaggaagcca aaaaagtgaa gaagcagccc ccaccgaaga aggttgagag
 361 cagcagttct gaggaggatt cttcagaatc tgaagaggag gtaaaggccc aaccaaagaa
 421 gactgtccaa ccgaagaagg ctgcacaacc tgctaaagag gagtcaagtg atgatagcag
 481 tgatgatagc tcctcagatg atgagcctgc aaaaaaacct gttgctcgtc caaataaggc
 541 tgcactttct accaacagta gcagcagtga tgatagcagt gatgagagtt tatcagatga
 601 tgaacctgtg aaaaagcctg ctgccccttt gaagaagcca gttgcacttg ctaccaatgg
 661 atcaaaaaag gttgagacag acagcagcag ctctgatagc agctctgatg aggagtctga
 721 tgaggatgat aaaaaaactg ctgctccagt gaagaaacct tcagttgctg ctatacaaaa
 781 gaagacccag gagtctgaca gttctgatag tgactctgat tctgaatcag atgaggatgt
 841 gccgactaaa gcaccagcag tagccaagaa aaaggaagaa tccagtgaaa gctctgattc
 901 tgaaagtgat tcagactctg atgatgaggc tgctgctgtt aaaaaggaag aagaatccag
 961 tgatagctca gacagtgact ctgaatctga gtctgattct gatgaaccag caaaacctac
1021 tattcctgca aaaaggccac tgacaaaaga cacaaagaag ggacaatcca aggatgaatc
1081 tgaagatagt tctgatgaga gttctgagga aagtggtgat gaacctccgc aaaagaagat
1141 taaggattct acaacttctg gtactaccaa gccttcccct aaggctacca agaaagaaat
1201 cagcagtgat gacgaaagtg atgaagatga cagttctgat gaaagctctg atgaggatgt
1261 taagcaaaaa caaactcaag ctaagaagca agcaccagta gcacaagaga gtagcagctc
1321 cgatgaatct tctgaagaag atagtgacat ggaaagtgat gaaccagcaa aaactcccca
1381 aaagaaggaa actgctgtgt ctgttggttc gaataagtct gcgacaaaac cgggacaaga
1441 ggaaccaaaa acgcctgcca gcaaccaaaa tcaagctacc gggtcaaaga ctctttttgt
1501 tggaaattta ccatacaatg tggagcaaga acaagtgaag caatttttcc aggaggcagg
1561 tgaagttgtt gatattcgtt tcagtacctt tgaagatggg aacttcaggg gctttggaca
1621 tgttgaattt gccacagcgg aagctgctaa gaaggcactt gaacttgctg gtcatgacct
1681 gatgggacgg ccggtcaggc ttgacctggc tcgtgagaga ggcgcgtata ctcctggcag
1741 cgggagggac aatagttctt tcaagaagcc tgctcaaagc tcaggaaaca ctatatttat
1801 taaaggcttt gatacttctc ttgacataca ccagatccgg aattcacttg aagaacattt
1861 tggctcgtgt ggagagatta cacgggtttc aattccaaag gattatgaaa ccggtgcaag
1921 caaagggatg gcgtacatgg attttgcgga caacggttcc ttgtcgaaag catacgaact
1981 gaatggatct gacctcggtg gatacagctt gtatgttgat gaagcgaggc ctaggcccga
2041 taacaacaga gagggtggct tcagcggtgg aagagacttt aacagcagtg ggagaggagg
2101 aagacgtggt ggacgtggtg atggtagccg tggacgcggt gaccgtggac gtggtagagg
2161 ctttggtagg ggtgacaggg gccatggtgg acggggtaca ccgttcaagc agagcgctgg
2221 tacacctagt gcaggaaaga agacaacatt cggtgacgac gactagacga acaatttgag
2281 ccgattttgt tctagtactg tagtaatctc catccccccct aatatatgcg attctagtga
2341 gccgtgaatt ggctacctcc ggactgttac attctagccg tgttatgtac tttgttggca
2401 gttgggaccg tgttggtaaa tttgcccgac agatttggca attttgg
```

AK063918: truncated japonica *OsNUC1*

```
>gi|32973936|dbj|AK063918.1| Oryza sativa Japonica Group cDNA
clone:001-123-B06, full insert sequence

   1 cagtagcagc agtgatgata gcagtgatga gagtttatca gatgatgaac ctgtgaaaaa
  61 gcctgctgcc cctttgaaga agccagttgc acttgctacc aatggatcaa aaaaggttga
 121 gacagacagc agcagctctg atagcagctc tgatgaggag tctgatgagg atgataaaaa
 181 aactgctgct ccagtgaaga aaccttcagt tgctgctata caaaagaaga cccaggagtc
 241 tgacagttct gatagtgact ctgattctga atcagatgag gatgtgccga ctaaagcacc
 301 agcagtagcc aagaaaaagg aagaatccag tgaaagctct gattctgaaa gtgattcaga
 361 ctctgatgat gaggctgctg ctgttaaaaa ggaagaagaa tccagtgata gctcagacag
 421 tgactctgaa tctgagtctg attctgatga accagcaaaa cctactattc ctgcaaaaag
 481 gccactgaca aaagacacaa agaagggaca atccaaggat gaatctgaag atagttctga
 541 tgagagttct gaggaaagtg gtgatgaacc tccgcaaaag aagattaagg attctacaac
 601 ttctggtact accaagcctt cccctaaggc taccaagaaa gaaatcagca gtgatgacga
 661 aagtgatgaa gatgacagtt ctgatgaaag ctctgatgag gatgttaagc aaaaacaaac
 721 tcaagctaag aagcaagcac cagtagcaca agagagtagc agctccgatg aatcttctga
 781 agaagatagt gacatggaaa gtgatgaacc agcaaaaact ccccaaaaga aggaaactgc
 841 tgtgtctgtt ggttcgaata agtctgcgac aaaaccggga caagaggaac caaaaacgcc
 901 tgccagcaac caaaatcaag ctaccgggtc aaagactctt tttgttggaa atttaccata
 961 caatgtggag caagaacaag tgaagcaatt tttccaggag gcaggtgaag ttgttgatat
1021 tcgtttcagt acctttgaag atgggaactt caggggcttt ggacatgttg aatttgccac
1081 agcggaagct gctaagaagg cacttgaact tgctggtcat gacctgatgg gacggccggt
1141 caggcttgac ctggctcgtg agagaggcgc gtatactcct ggcagcggga gggacaatag
1201 ttctttcaag aagcctgctc aaagctcagg aaacactata tttattaaag gctttgatac
1261 ttctcttgac atacaccaga tccggaattc acttgaagaa cattttggct cgtgtggaga
1321 gattacacgg gtttcaattc caaaggatta tgaaaccggt gcaagcaaag ggatggcgta
1381 catggatttt gcggacaacg gttccttgtc gaaagcatac gaactgaatg gatctgacct
1441 cggtggatac agcttgtatg ttgatgaagc gaggcctagg cccgataaca acagagaggg
1501 tggcttcagc ggtggaagag actttaacag cagtgggaga ggaggaagac gtggtggacg
1561 tggtgatggt agccgtgggc gcggtgaccg tggacgtggt agaggctttg gtaggggtga
1621 caggggccat ggtggacggg gtacaccgtt caagcagagc gctggtacac ctagtgcagg
1681 aaagaagaca acattcggtg acgacgacta gacgaacaat ttgagccgat tttgttctag
1741 tactgtagta atctccatcc cccctaatat atgcgattct agtgagccgt gaattggcta
1801 cctccggact gttacattct agccgtgtta tgtactttgt tggcagttgg gaccgtgttg
1861 gtaaatttgc ccgacagatt tggcaatttt ggaacctctt gacttcgtaa tcattcttat
1921 cataatatag tgctttgtgg ctt
```

2. ลำดับเบสของ putative indica *OsNUC1* promoter

```
>gi|21741993:154233-155800 Oryza sativa genomic DNA, chromosome 4,
BAC clone: OSJNBa0058K23, complete sequence

CATCGTCGTCATGGTGGCCGAGAGACGAGAATGACGCCCGGGCGGCCGCCGGGACGACGCGAGGGAGGA
GGGAGAAAAAGGCCTTTAACCAGCAGAAGTGGAGGTAAAAAATAGACGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
AGGTCGCCCTTGCTTTATACTGCGGAGAGGCGCCTCACAAAGTCACAATCCGCGGTCCCGACATGTCCGC
CCGCGCGCGGGAACGACGACGACGACGAAGCCATTCTTCCTCGCTACGTCACGTCACCCGTTTGATCGAT
CGCTTGTGGATTTTTTTTTACATTTTAGCCCTTTTTGAAAACTTATTTTATAATTAAATTCTTAAATAAA
CTTATTATGTTAACACCGAGGTTCAATATCTCACCCTCATTCTCCTATAGAAATTAAGGACTTGTTTGGT
TTAGTACCCTACCAATATATTGGTAGTGCTAAACTCTAGGCAATTTTTGGGACTATCAATAGTTTGGTAA
GGTATAATTGTAAATGAGTCTTTTTGGATTTATGCCAATGAGAGCCAAATTTCAAATTGTGGTGAAGAAT
TTTCAAAATTTGTATCAAATTAAGTATAGACATTACCAAACATTTGGCTTTAAACCAAATCATCACATTT
ACTATTTAAACTACCAAAAGATTGGTATGATAACATTTTGGTATCAAACCAAAAAGCCCCTAAGTCACAT
ATGTAAAACTAAGCCAATGTCATTGGCGCCAAAGACACTAGCATAAACGACCTGTCTGAAGAATTTTTTT
ACATTTTAATCCTTTTTATTTTTTTACAAATAGATCCTCAACACCGATTCTCTTAACATTAGTGACGTAG
CTTCTGCGGAAAGGGAGGGTGTCGGTGCCAATATCATTAAGACAGTGACATGAACCTCAACGTCGGGGTC
ACTGACACCGAGAGAAGGGTTCATTTCTTTAATAAATTTTTCAAGAGTCTATTTGTAAAATACTACCTCC
GTCCCATTTTAAATGCGGTTATAGATTTTCGTCTCCAACGCTTGACCGTCCGTTTTATTTGTCAACAAGA
ATGGCAGATGGGGCCCATATGTCAGTGGGTTCCACAATTTTTTCTCGTGCGAATGACAAATGAGTCCCAC
ATATTTTTTTTAAATTCTAATATCACATAAGCGCCACGCCAAACGCCGCATGAGACGAACACCAAGTCAA
CAACGTCACGTCAGCGAAACCATTCTCCAAAACCATCGAGCGAGTCAAATTGCACCGGTTTCAATAGTTC
GGGAGTCGGGATATCCGAATTGTAGATTAGGGATACAAATCATATCCACTCACTTATTAAGGGACCCAAA
GTGAACTTATTCCCCGATGAAACCTACGTGAGGAGGTCCAGCCCGGTCTGGGCCGGCCCAAGCTACAGCC
CACAGACACTGGTGGCCCCGTGGCCTGGCGGCGGGCAGGGACAACCCTAGCAGCAGGTGCCGCCATATAA
AAGGATCGCCCGTGCGGTCTCGCCTCCCCCATTACCTCCCCGCCCGCGCACCTCGAGCCCCCAGGTCCGC
CTCGCCTCTCCGTCGCTTGCCGCCGCCC
```

ACGTG	ABRE-like sequence required for etiolation-induced expression of erd1 (early responsive to dehydration) in Arabidopsis
TGACG	motifs are found in many promoters and are involved in transcriptional activation of several genes by auxin and/or salicylic acid; May be relevant to light regulation
CATATG	sequence found in NDE element in soybean SAUR (Small Auxin-Up RNA) 15A gene promoter; Involved in auxin responsiveness
CGCG	box recognized by AtSR1-6 (Arabidopsis thaliana signal-responsive genes); Multiple CGCG elements are found in promoters of many genes; Ca++/calmodulin binds to all AtSRs
CAANNNNATC	region necessary for circadian expression of tomato Lhc gene
GTAC	is the core of a CuRE (copper-response element) found in Cyc6 and Cpx1 genes in Chlamydomonas; Also involved in oxygen-response of these genes; For CuRE
ACCGAGA	"DRE1" core found in maize rab17 gene promoter; "DRE1" was protected, in in vivo footprinting, by a protein in embryos specifically, but in leaves, was protected when was treated with ABA and drought; rab17 is expressed during late embryogenesis,and is induced by ABA
GATAA	"I box"; "I-box"; conserved sequence upstream of light-regulated genes; Conserved sequence upstream of light-regulated genes of both monocots and dicots
CCGAC	core of low temperature responsive element (LTRE) of cor15a gene in Arabidopsis; A portion of repeat-C (C-repeat), TGGCCGAC, which is repeated twice in cor15a promoter; ABA responsiveness; Involved in cold induction

	of BN115 gene from winter Brassica napus; LTRE; Light signaling mediated by phytochrome is necessary for cold- or drought- induced gene expression through the C/DRE in Arabidopsis
WAACCA	MYB recognition site found in the promoters of the dehydration-responsive gene rd22 and many other genes in Arabidopsis; W=A/T
CANNTG	MYCCONSENSUSAT MYC recognition site found in the promoters of the dehydration-responsive gene rd22 and many other genes in Arabidopsis; Binding site of ATMYC2 (previously known as rd22BP1)
GAGAC	core of sulfur-responsive element (SURE) found in the promoter of SULTR1; 1 high-affinity sulfate transporter gene in Arabidopsis; SURE contains auxin response factor (ARF) binding sequence (GAGACA)
TGAC	"A core of TGAC-containing W-box" of, e.g., *Amy32b* promoter; Binding site of rice WRKY71, a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนนทลี ชำนัญมนูญธรรม เกิ ดวันที่ 2 พฤษภาคม พ .ศ. 2529 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรปริญญาบัญฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551

<u>ทุนวิจัย</u>

- ได้รับทุนวิจัยจาก "ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย" รุ่นที่ 9 (2/2552)

<u>การเสนอผลงาน</u>

- ได้รับทุนจากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ National University of Singapore เพื่อไปเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการ The 13th Biological Sciences Graduate Congress ณ ประเทศสิงคโปร์ในหัวข้อเรื่อง Early expression of the novel salt-responsive gene in rice *(Oryza sativa L.)* and its function in transgenic tobacco
- เข้าร่วมเสนอผลงานวิจัยแบบบรรยายในงานประชุมวิชาการ The 14th Biological Sciences Graduate Congress ณ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในหัวข้อเรื่อง A Potential Role of *OsNUC1* in Salt Tolerance และได้รับรางวัลชมเชย
- ส่งผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์เข้าร่วมเสนอในงานประชุมวิชาการ Plant and Animal Genome XVIII Conference ณ Town and Country Convention Center, San Diego, California ประเทศสหรัฐอเมริกา ในหัวข้อเรื่อง The Role of RRM Motif of Rice Nucleolin in Salt Tolerance via Up-regulation of Na^+/H^+ *antiporter*, *SOS1* gene expression and H^+-ATPase Activity
- ได้รับทุนจากสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อไปเสนอผลงานวิจัยแบบบรรยายในงานประชุมวิชาการ การประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 4 ณ โรงแรมโลตัส ปางสวนแก้ว จังหวัดเชียงใหม่ ในหัวข้อเรื่อง การแสดงออกในระยะแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าว (*Oryza sativa* L.) หลังจากได้รับภาวะเครียดทางกายภาพและบทบาทในการทนต่อภาวะเครียดจากโลหะหนัก