



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาลักษณะสมบัติของยีนชนิดใหม่ที่ตอบสนอง
ต่อความเค็มในข้าว (*Oryza sativa* L.)

โดย ศุภจิตรา ชัชวาลย์

มิถุนายน 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาลักษณะสมบัติของยีนชนิดใหม่ที่ตอบสนอง
ต่อความเค็มในข้าว (*Oryza sativa* L.)

ศุภจิตรา ชัชวาลย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

ยีนนิวคลีโอลินในข้าว *OsNUC1* พบว่ามีการแสดงออกแตกต่างกันในข้าวพันธุ์ไม่ต้านทานความเค็ม และสายพันธุ์ที่ต้านทานความเค็มขณะที่ข้าวได้รับภาวะเค็ม เมื่อได้รับภาวะเค็มในช่วง 6 วันพบว่าสายพันธุ์ทนเค็มมีการแสดงออกสูงกว่าพันธุ์ไม่ทนเค็ม ลักษณะเฉพาะของโปรตีนนิวคลีโอลินนี้คือประกอบด้วย RNA recognition motifs (RRMs) จำนวน 2 โมทิฟ และ Glycine- and Arginine-rich (GAR) repeat ในการศึกษาบทบาทของโมทิฟดังกล่าว ยีนที่เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์โปรตีนนิวคลีโอลินในบริเวณที่มีโมทิฟทั้งสองและถูกควบคุมด้วย 35SCaMV promoter ได้ถูกถ่ายเข้าสู่ *Arabidopsis* ในภาวะปกติต้น *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีนมีการเติบโตสูงกว่าพันธุ์ wild type และเมื่อเติบโตในภาวะเค็ม *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีนก็มีอัตราการเติบโตสูงกว่า ดังนั้น จึงเสนอว่า RNA recognition motifs (RRMs) จำนวน 2 โมทิฟ และ Glycine- and Arginine-rich (GAR) repeat ของนิวคลีโอลินมีบทบาทสำคัญต่อการต้านทานภาวะเค็มในพืช

Abstract

Rice *nucleolin* gene, *OsNUC1*, was found to be differentially expressed in two pairs of salt-sensitive and salt-resistant rice lines during salt stress conditions. During salt stress condition up to six days, the salt resistant lines exhibited a higher level of gene expression. The unique feature of the rice nucleolin-like protein encoded by *OsNUC1* is the existence of two RNA recognition motifs (RRMs) and a Glycine- and Arginine-rich (GAR) repeat. To determine the role of these elements, a partial *OsNUC1* cDNA encoding the two RRM motifs and the GAR repeat was constitutively expressed under the 35SCaMV promoter in *Arabidopsis thaliana* L. In normal conditions, the resulting transgenic plants showed a higher growth rate than the controls. We propose that the RRM motifs and the GAR repeat of *OsNUC1* play important roles in plant growth, and contribute to the salt-stress tolerance character, which defines a new role of *nucleolin* in plants.

สรุปโครงการ (Executive Summary)

1. ชื่อโครงการ

ภาษาไทย การศึกษาลักษณะสมบัติของยีนชนิดใหม่ที่ตอบสนองต่อความเค็มในข้าว (*Oryza sativa* L.)
ภาษาอังกฤษ Characterization of the novel salt-responsive gene in rice (*Oryza sativa* L.)

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ชื่อหัวหน้าโครงการ

(ภาษาไทย) ศุภจิตรา ชัชวาลย์ (ภาษาอังกฤษ) Supachitra Chadchawan

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-2185485

โทรสาร 02-2528979

e-mail s_chadchawan@hotmail.com

ที่อยู่ 44 ซอยรัชดาภิเษก 62 ถนนรัชดาภิเษก บางซื่อ กทม. 10330

โทรศัพท์ 02-9101234

3. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย Plant physiology and plant molecular biology

Keywords ของข้อเสนอโครงการ rice, *Oryza sativa* L., salt stress, salt tolerance

5. ระยะเวลาดำเนินงาน 3 ปี

6. ได้เสนอโครงการนี้ หรือโครงการที่มีส่วนเหมือนกับเรื่องนี้บางส่วน เพื่อขอทุนต่อแหล่งทุน อื่นที่ใดบ้าง

☒ ไม่ได้เสนอต่อแหล่งทุนอื่น

☐ เสนอต่อ _____

7. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

ปัญหาด้านข้อจำกัดทางกายภาพของสิ่งแวดล้อม เช่น ความแห้งแล้ง อุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม การขาดธาตุอาหาร ตลอดจนพื้นที่ดินเค็มล้วนแต่เป็นปัญหาทำให้ผลผลิตทางการเกษตรลดต่ำลง ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดดังกล่าวมีผลต่อการสร้างอาหารและการเจริญเติบโตของพืช

ข้าว (*Oryza sativa* L.) ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศจัดเป็นพืชทนเค็มได้ปานกลางซึ่งข้าวพันธุ์ต่าง ๆ นั้นมีความสามารถในการทนเค็มได้แตกต่างกัน และพื้นที่นาบางส่วนของประเทศก็เป็นพื้นที่ดินเค็ม ซึ่งเป็นข้อจำกัดทำให้ข้าวที่ปลูกในบริเวณดังกล่าวมีผลผลิตต่ำ

วิธีการหนึ่งสำหรับการพัฒนาพันธุ์พืช นอกเหนือจากการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์แล้วคัดเลือกโดยใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่ปรากฏ ยังสามารถพัฒนาพันธุ์โดยใช้ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกในระดับโมเลกุลมาช่วยอีกทางหนึ่ง

การคัดเลือกข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123TC171 โดยอาศัยการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง และคัดเลือกลักษณะทนเค็มมาอีก 7 ชั่วโมง (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) ทำให้ได้ข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่มีความสามารถทนเค็ม และทนแล้งได้ดีกว่าข้าวพันธุ์เดิมและสามารถยืนยันการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกิดระหว่างข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123TC171 และ ข้าวเหลืองประทิว 123 (LPT123) พันธุ์เดิม (Thikart et al., 2005) การค้นหายีนที่มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปที่ทำให้ข้าวสายพันธุ์ LPT123TC171 มีความต้านทานต่อความเค็มได้ดีขึ้น จะนำไปสู่การนำยีนต้านทานความเค็มไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์ข้าวทนเค็มต่อไปในอนาคต ตลอดจนอาจนำไปประยุกต์ใช้กับพืชชนิดอื่นๆ หากเป็น conserved gene ในพืชชนิดต่างๆ

จากการใช้เทคนิค Differential display ทำให้สามารถคัดแยกยีนที่ข้าว LPT123 และ LPT123TC171 มีการแสดงออกต่างกันภายหลังได้รับภาวะเค็มหลายยีน (สมพร มณีประสพสุข, 2547) โดยมียีนหนึ่งเป็นยีนที่ยังไม่เคยมีผู้รายงานถึงสมบัติที่เกี่ยวข้องกับภาวะเค็ม หรือความต้านทานความเค็ม งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาลักษณะของยีนดังกล่าวว่ามีการแสดงออกอย่างไรเมื่อได้รับภาวะเค็ม มีการแสดงออกในข้าวพันธุ์ทนเค็มและไม่ทนเค็มเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร ตลอดจนมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนเค็มของพืชหรือไม่ อย่างไร ความรู้ความเข้าใจนี้อาจใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาพันธุ์ข้าวทนเค็มต่อไปได้ในอนาคต

8. วัตถุประสงค์

1. ศึกษาลักษณะของยีนใหม่ DQ012289 จากฐานข้อมูลสากล และทำนายบทบาทของยีนดังกล่าวจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์
2. ศึกษา gene organization และเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน DQ012289 ในข้าวที่มีความทนเค็มแตกต่างกัน เมื่อปลูกในภาวะปกติ และ ในภาวะเค็ม
3. ตรวจสอบผลของ Abscissic acid (ABA) ที่มีต่อการแสดงออกของยีน DQ012289
4. ศึกษาบทบาทของ DQ012289 ต่อความสามารถในการต้านทานความเค็มในพืช

9. ระเบียบวิธีวิจัย

9.1 การศึกษาลักษณะสมบัติของยีนที่มี Homology กับ *DQ012289* จากการศึกษาทาง Bioinformatics

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *DQ012289* กับฐานข้อมูลสากล เพื่อ retrieve ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA (full length cDNA) แล้วนำไปวิเคราะห์เพื่อหา conserved region กับยีนอื่น ตลอดจนการทำนาย protein motif ที่สำคัญที่ปรากฏ

9.2 การศึกษา organization ของยีน *DQ012289* ในข้าว (*Oryza sativa* L.)

ศึกษา organization ของยีน *DQ012289* ในข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ / สายพันธุ์ต่างๆ ของไทยที่มีความสามารถในการต้านทานต่อความเค็มต่างกัน อย่างน้อย 4 พันธุ์ / สายพันธุ์ โดยวิธี Southern blot hybridization

9.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน *DQ012289* ในข้าวในระยะต้นกล้า เมื่อเติบโตในภาวะเค็ม

9.3.1 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *DQ012289* ในใบข้าวที่ได้รับความเค็มในระยะสั้นในข้าวที่ความต้านทานความเค็มต่างกัน

ทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *DQ012289* ในกล้าข้าวอย่างน้อย 4 พันธุ์ / สายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อความเค็มแตกต่างกัน เช่น LPT123 LPT123TC171 KDML105 และ FL530 (ข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่พัฒนาจาก KDML105 โดยหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม) ที่มีอายุประมาณ 2-3 สัปดาห์ และได้รับความเค็มโดยการเติม 0.5% NaCl ลงในสารละลายธาตุอาหาร WP1 สูตรดัดแปลง (Thikart et al., 2005; สมพร มณีประสพสุข, 2547) แล้วทำการเก็บเนื้อเยื่อใบเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี northern blot analysis ภายหลังได้รับความเค็มเป็นเวลา 0 นาที 15 นาที 1 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง 6 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง

9.3.2 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *DQ012289* ในใบข้าวที่ได้รับความเค็มในระยะยาวในข้าวที่ความต้านทานความเค็มต่างกัน

ทำการเตรียมตัวอย่างพืชและเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *DQ012289* เช่นเดียวกับที่ระบุไว้ในข้อ 9.3.1 แต่ทำการเก็บเนื้อเยื่อใบภายหลังให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

9.4 การศึกษาผลของ ABA ที่มีต่อการแสดงออกของ *DQ012289* ในเนื้อเยื่อใบข้าว

9.4.1 ศึกษาผลของ exogenous ABA ที่มีต่อการแสดงออกของ *DQ012289* ในเนื้อเยื่อใบข้าว

เตรียมตัวอย่างกล้าข้าว LPT123 และ LPT123TC171 ดังที่ระบุในข้อ 9.3.1 ฉีดพ่น ABA ที่ความเข้มข้น 100 μ M ในช่วงเช้าและทำการตรวจวัดการแสดงออกของยีนทั้งในระยะสั้น และในระยะยาวดังที่ระบุไว้ในข้อ 9.3 รวมทั้งเปรียบเทียบการแสดงออกในกล้าข้าวที่ไม่ได้รับภาวะเค็มด้วย

9.4.2 ศึกษาผลของ ABA inhibitor- abamine (Han et al., 2004) ที่มีต่อการแสดงออกของ *DQ012289* ในเนื้อเยื่อใบข้าว

9.4.2.1 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ abamine ที่สามารถยับยั้งการสร้าง ABA ในข้าว ภายหลังได้รับภาวะเค็ม โดยการให้ abamine ความเข้มข้น 50 100 และ 200 μM เมื่อกล้าข้าวอยู่ใน ภาวะเค็มตั้งข้างต้น แล้วตรวจวัดปริมาณ ABA ที่สร้างขึ้น เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับ abamine ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

9.4.2.2 ศึกษาการแสดงออกของ *DQ012289* ในเนื้อเยื่อใบข้าวของกล้าข้าวที่ได้รับภาวะเค็ม และฉีดพ่น abamine ในความเข้มข้นที่ได้ทราบจากการทดลองในข้อ 8.4.2.1 ทำการเก็บเนื้อเยื่อใบข้าว หลังจากได้รับความเค็ม และ abamine ในช่วงระยะสั้น และ ระยะยาวตามที่ระบุไว้ข้างต้น

9.5 การตรวจสอบบทบาทของยีนที่ encode ให้ *DQ012289* ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการต้านทาน ความเค็ม

ทำการตรวจสอบโดยการทำ overexpression ของยีนในพืชต้นแบบ เช่น *Arabidopsis* หรือ ยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.) โดยมีขั้นตอนดังนี้

9.5.1 สร้าง expression vector ของยีนดังกล่าวโดยใช้ full-length cDNA ของ *DQ012289* ใน pJim19

9.5.2 ถ่าย recombinant DNA ที่สร้างในข้อ 9.5.1 เข้าสู่ *Agrobacterium* เพื่อใช้ในการถ่ายยีน เข้าสู่พืช

9.5.3 ถ่ายยีนดังกล่าวเข้าสู่พืชต้นแบบ เช่น *Arabidopsis* (Clough and Bent, 1998) แล้วพัฒนา จนเป็นต้นที่สมบูรณ์

9.5.4 คัดเลือกต้นที่เป็น independent transgenic lines ไม่น้อยกว่า 5 สายพันธุ์ และตรวจสอบ การแสดงออกของ *DQ012289* โดยวิธี real-time PCR คัดเลือกต้นที่มีการแสดงออกของยีนสูง อย่าง น้อย 3 สายพันธุ์เพื่อการศึกษาในขั้นต่อไป

9.5.6 นำต้นที่คัดเลือกไว้มาตรวจสอบความสามารถในการต้านทานต่อความเค็ม โดย เปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

9.6 สรุปผลการทดลองและเขียนรายงาน

10. จำนวนโครงการที่ผู้วิจัยกำลังดำเนินการอยู่

10.1 ชื่อโครงการ:กลไกการตอบสนองต่อความเค็มโดยอาศัย ABA ในข้าว (*Oryza sativa* L.)

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี (ขอขยายเวลาอีก 6 เดือน)

ตั้งแต่ ธันวาคม พ.ศ. 2547 ถึง พฤศจิกายน พ.ศ. 2549

แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

งบประมาณที่ได้รับ 1,750,000.- บาท

สถานะของหัวหน้าโครงการ ☒ หัวหน้าโครงการ

☐ ผู้ร่วมโครงการ

เวลาที่ใช้ทำวิจัยในโครงการนี้ที่ชั่วโมงต่อสัปดาห์

8

ชั่วโมงต่อสัปดาห์

10.2 ชื่อโครงการ: การผลิตสารเร่งการเจริญและเพิ่มผลผลิตกล้วยไม้โคโตะซาน O-80 และกำหนดแผนการใช้โคโตะซาน O-80 ในกระบวนการผลิตกล้วยไม้ในประเทศไทยอย่างครบวงจร

ระยะเวลาของโครงการ 2 ปี

ตั้งแต่ 28 กันยายน พ.ศ. 2549 ถึง 28 กันยายน พ.ศ. 2551

แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน)

งบประมาณที่ได้รับ 14,160,000 บาท

สถานะของหัวหน้าโครงการ ☐ หัวหน้าโครงการ

☒ ผู้ร่วมโครงการ

เวลาที่ใช้ทำวิจัยในโครงการนี้กี่ชั่วโมงต่อสัปดาห์

5

ชั่วโมงต่อสัปดาห์

11. ความเชื่อมโยงกับต่างประเทศ

11.1 Prof.Dr.Tadao Asami จาก RIKEN Japan ที่ทำงานปัจจุบัน คือ University of Tokyo เป็นผู้
อนุเคราะห์ ABA inhibitor - abamine ใช้ในการยับยั้งการสร้าง ABA ในพืช เพื่อพิสูจน์กลไกการทำงานของ
ยีนดังกล่าวว่าผ่านการควบคุมของ ABA หรือไม่

11.2 Prof.Dr. Hongya Gu จาก มหาวิทยาลัยปักกิ่ง (Institute of Life Science, Pekking University)

12. สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษายีนของข้าวที่คาดว่าน่าจะสมบัติเป็นยีนต้านทานความเค็ม ซึ่งได้มาจากคัด
แยกยีนโดยวิธี differential display ซึ่งเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่าเป็น
ยีนในกลุ่ม Nucleolin จึงได้กำหนดชื่อเป็น *OsNUC1* ซึ่งมีการแสดงออกในราก ใบ ดอก และฝัก *OsNUC1*
เป็นยีนที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มในข้าว เป็น gene family ขนาดเล็ก ประกอบด้วยยีน *OsNUC1* และ *OsNUC2*
ในการศึกษารุ่นนี้เป็นการศึกษายีน *OsNUC1* เป็นหลัก ซึ่งพบว่าความเค็มชักนำให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นใน
ข้าวทั้ง 4 พันธุ์ / สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ทนเค็มทั้ง LPT123-TC171 และ FL-530 มีการแสดงออกของยีนที่สูง
กว่าพันธุ์ที่ไม่ทนเค็ม เมื่อทำการถ่ายยีนดังกล่าวเข้าสู่ Arabidopsis 2 โครงสร้างคือ โครงสร้างที่เป็น full-length
cDNA และโครงสร้างที่เป็น partial cDNA clone ที่ขาด N-terminal serine acidic motif พบว่า Arabidopsis ที่
มีโครงสร้างของยีนแบบ full-length ไม่สามารถคัดเลือกด้วย kanamycin ได้ ในขณะที่ partial cDNA clone
สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มี kanamycin ได้ เมื่อนำ transgenic Arabidopsis ที่คัดเลือกได้ไปเลี้ยงใน
ภาวะเค็มพบว่าการเติบโตได้ดีกว่า wild type แสดงให้เห็นว่า ยีนนี้น่าจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการ
ต้านทานความเค็มในพืช

บทนำ

ข้อจำกัดทางกายภาพของสิ่งแวดล้อม เช่น ความแห้งแล้ง อุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม การขาดธาตุอาหาร ตลอดจนพื้นที่ดินเค็มล้วนแต่เป็นปัญหาทำให้ผลผลิตทางการเกษตรลดลง ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดดังกล่าวมีผลต่อการสร้างอาหารและการเจริญเติบโตของพืช

ข้าว (*Oryza sativa* L.) ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศจัดเป็นพืชทนเค็มได้ปานกลางซึ่งข้าวพันธุ์ต่าง ๆ นั้นมีความสามารถในการทนเค็มได้แตกต่างกัน และพื้นที่นาบางส่วนของประเทศก็เป็นพื้นที่ดินเค็ม ซึ่งเป็นข้อจำกัดทำให้ข้าวที่ปลูกในบริเวณดังกล่าวมีผลผลิตต่ำ

วิธีการหนึ่งสำหรับการพัฒนาพันธุ์พืช นอกเหนือจากการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์แล้วคัดเลือกโดยใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่ปรากฏ ยังสามารถพัฒนาพันธุ์โดยใช้ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกในระดับโมเลกุลมาช่วยอีกทางหนึ่ง

การคัดเลือกข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123TC171 โดยอาศัยการเกิด somaclonal variation ในหลอดทดลอง และคัดเลือกลักษณะทนเค็มมาอีก 7 ชั่วโมง (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) ทำให้ได้ข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่มีความสามารถทนเค็ม และทนแล้งได้ดีกว่าข้าวพันธุ์เดิมและสามารถยืนยันการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกิดระหว่างข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123TC171 และ ข้าวเหลืองประทิว 123 (LPT123) พันธุ์เดิม (Thikart et al., 2005) การค้นหายีนที่มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปที่ทำให้ข้าวสายพันธุ์ LPT123TC171 มีความต้านทานต่อความเค็มได้ดีขึ้น จะนำไปสู่การนำยีนต้านทานความเค็มไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์ข้าวทนเค็มต่อไปในอนาคต ตลอดจนอาจนำไปประยุกต์ใช้กับพืชชนิดอื่นๆ หากเป็น conserved gene ในพืชชนิดต่างๆ

จากการใช้เทคนิค Differential display ทำให้สามารถคัดแยกยีนที่ข้าว LPT123 และ LPT123TC171 มีการแสดงออกต่างกันภายหลังได้รับภาวะเค็มหลายยีน (สมพร มณีประสพสุข, 2547) โดยมียีนหนึ่งเป็นยีนที่ยังไม่เคยมีผู้รายงานถึงสมบัติที่เกี่ยวข้องกับภาวะเค็ม หรือความต้านทานความเค็ม งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาลักษณะของยีนดังกล่าวว่ามีการแสดงออกอย่างไรเมื่อได้รับภาวะเค็ม มีการแสดงออกในข้าวพันธุ์ทนเค็มและไม่ทนเค็มเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร ตลอดจนมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนเค็มของพืชหรือไม่ อย่างไร ความรู้ความเข้าใจนี้อาจใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาพันธุ์ข้าวทนเค็มต่อไปได้ในอนาคต

องค์ความรู้ที่เกี่ยวข้อง

ภาวะเค็มต่อการแสดงออกของยีน

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

จากการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 (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 (Hura และคณะ, 2004) อย่างไรก็ตามยังมียีนที่ตอบสนองต่อความเครียดอีกหลายยีนที่ทำงานผ่านทาง ABA-independent pathway เช่น ยีน *OsDREB* เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสของ DNA พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในข้าวหลังจากได้รับภาวะเค็มและอุณหภูมิต่ำ (Ito และคณะ, 2006) ดังนั้นการหาความสัมพันธ์ของยีนกับ ABA จะช่วยให้เข้าใจกระบวนการการตอบสนองต่อความเค็มยิ่งขึ้น

2. นิวคลีโอลิน

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

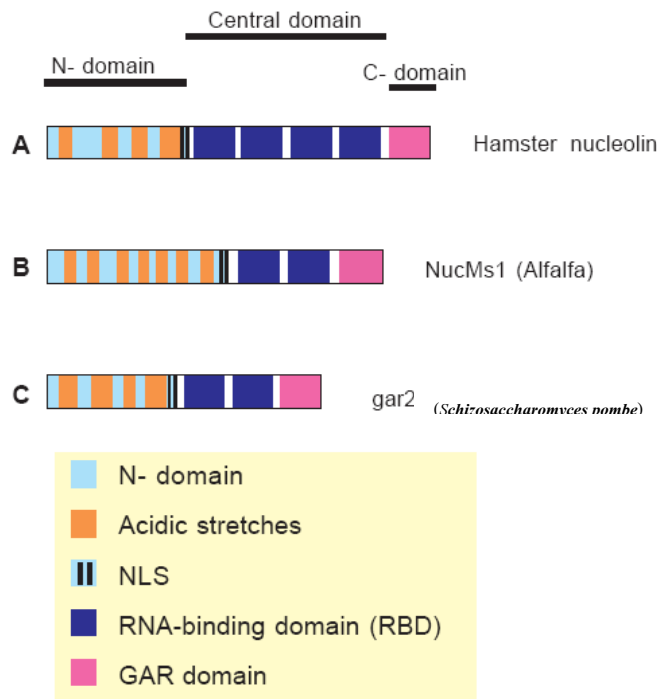
small nucleolar RNAs (snoRNAs) จำเป็นต่อกระบวนการการสร้าง 28S, 18S, and 5.8S rRNA การลดการแสดงออก snoRNAs โดยเทคนิค antisense แสดงให้เห็นว่าโปรตีนนี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับ chaperone ในกระบวนการสร้าง pre-rRNA และการที่พบส่วนของ U20 snoRNA ใน intron 11 ของยีนนิวคลีโอลินในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สอดคล้องกับงานวิจัยอื่น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

การสร้างไรโบโซม (ribosome biogenesis) เป็นกระบวนการหนึ่งในการสร้าง ribonucleo-particle เกี่ยวข้องกับ complex rRNA maturation กระบวนการนี้สำคัญในการดำรงชีวิตของเซลล์ ซึ่งเกิดขึ้นในนิวคลีโอลัส (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 NG,NG-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 และไก่มี 4 ซ้ำ nucleolin-like protein จากถั่ว (pea) และ Arabidopsis มี 7 ซ้ำ และใน alfalfa มี 9 ซ้ำ จะเห็นว่า nucleolin-like proteins ในพืชมีจำนวนซ้ำมากกว่า แต่เป็นส่วนสั้น ๆ เมื่อเทียบกับในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น มีความยาวประมาณ 10 ถึง 20 กรดอะมิโน จากโครงสร้างที่ประกอบด้วย lysine และ proline residues ทำให้ในส่วนนี้มีประจุเป็นลบและแตกต่างกัน ดังนั้นการหามวลโมเลกุลจาก SDS-PAGE จึงได้ค่าที่แตกต่างกับการประมาณโดยคำนวณจากน้ำหนักกรดอะมิโน การเคลื่อนที่ของโปรตีนเหล่านี้ใน 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 KRKKEMAKQAAPEAKKQK ในนิวคลีโอตินของคน KKRKSEDAEEEEDEESSNKKQK ในยีสต์ (NSR1) KKGKRQAEIEIKKVSAAKKQK ในถั่ว และ KKGKRNAEDEIEKAVSAKKQK ในข้าว (OsNUC1) แต่ยังไม่พบ signal sequence ที่กำหนดให้นิวคลีโอตินเคลื่อนที่ไปยังนิวคลีโอไลต์ จึงสันนิษฐานว่าการที่นิวคลีโอตินมีการสะสมในนิวคลีโอไลต์ เป็นผลมาจากการที่นิวคลีโอตินจับอย่างจำเพาะกับส่วนประกอบของนิวคลีโอไลต์อื่น ๆ โดยเฉพาะ rDNA rRNA และโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้าง nucleolar matrix (Schmidt-Zachmann และ Nigg, 1993)

2.2. Central Domain

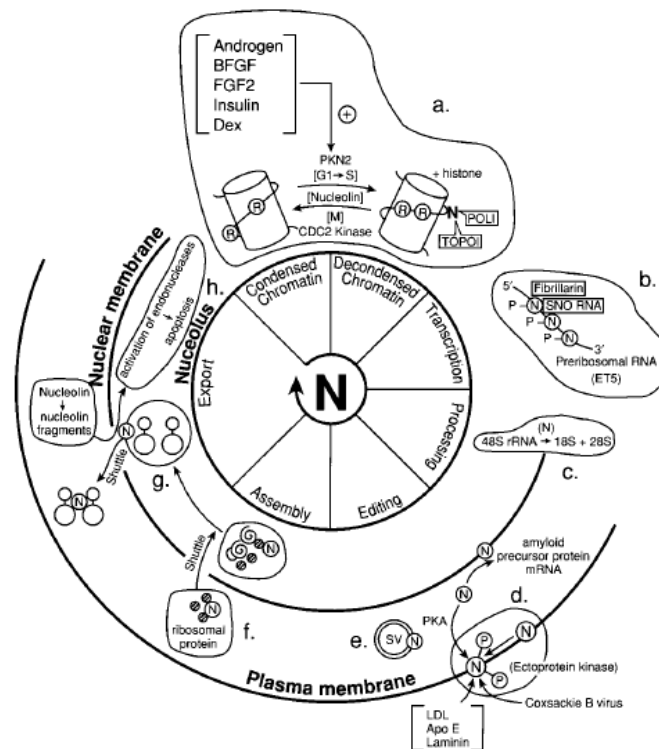
บริเวณนี้เป็นส่วนของ RNA recognition motifs (RRM) หรือ consensus RNA-binding domain (CS-RBD) ซึ่งจะถูกรักษาไว้ในหลายสิ่งมีชีวิต เกี่ยวข้องในกระบวนการ package ของ heterogeneous RNA, pre-mRNA splicing และเป็นส่วนประกอบของ pre-ribosomes เกี่ยวข้องกับการสร้าง poly(A) tail และ maturation การควบคุมการแปลรหัส และ mRNA stability โดยส่วนมาก RRM มักจะมีกรดอะมิโน 80 ถึง 90 ชนิด (Query และคณะ, 1989) ซึ่งในข้าวพบ RRM-1 2 ส่วน คือ LFVGNLPYNVEQEQVKQFFQEAGEVVDIRFSTFEDGNFRGFGHVEFATAEAAKK ALELAGHDLMGRPVR และ IFIKGFDTSLDIHQIRNSLEEHFGSCGEITRVSIPRDYETGASKG MAYMDFADNGSLSKAYELNGSDLGYSYLY 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 NG,NG-dimethylarginine residues ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงบน arginine ใน GAR domain โดยเอนไซม์ methyltransferase ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ไม่จำเป็นต่อความจำเพาะระหว่าง GAR domain กับ RNA หรือโปรตีนเสมอไป แต่จะช่วยให้เกิด interaction ระหว่างนิวคลีโอตินกับ RNA-binding domain (RBD) ได้ดีขึ้น เมื่อมีการจับของ GAR domain กับ RBD อย่างน้อย 1 แห่ง จะทำให้มีการสะสมในนิวคลีโอไลต์ นอกจากนี้ GAR domain ยังเป็นส่วนที่เกิด protein-protein interaction อีกด้วย (Bogre และคณะ, 1996)

หน้าที่ของนิวคลีโอลิน

จากโครงสร้างของนิวคลีโอลิน จะเห็นว่าประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ที่สามารถจับกับ DNA, RNA และ โปรตีนได้ ซึ่งให้เห็นวาทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องในการควบคุมกิจกรรมภายในเซลล์ แสดงดังรูปที่ 2 ซึ่งเป็น ภาพรวมบทบาทหน้าที่ของนิวคลีโอลินในการควบคุม cell cycle และ ribosome biogenesis ในสัตว์เลี้ยงลูก ด้วยนม



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 สำหรับใน พืชยังมีไม่มากนัก จากการศึกษาในฐานข้อมูลของ NCBI พบว่ามียีนที่คล้ายกับ นิวคลีโอลินในพืชหลายชนิด ดังตารางที่ 1

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

ตารางที่ 1 ตัวอย่างยีนนิวคลีโอลินในพืชชนิดต่าง ๆ

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

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 แสดงให้เห็นว่าคาร์โบไฮเดรตสามารถควบคุม *de novo* ribosome biogenesis ได้ การศึกษาพืชกลุ่ม ribonucleoprotein gene mutant ทำให้รู้ว่าอัตราในการสร้างไรโบโซมมีผลต่อการเจริญและโครงสร้างของพืชด้วย จากการยับยั้งยีน *AtNUC-L1* ทำให้การแสดงออกของ sugar-induced ribonucleoprotein gene ลดลง แสดงว่า *AtNUC-L1* เกี่ยวข้องในการแสดงออกของ sugar-induced ribonucleoprotein gene

Pontvianne และคณะ (2007) ศึกษา ยีนนิวคลีโอลินใน *Arabidopsis* (*AtNUC-L1* และ *AtNUC-L2*) พบว่านิวคลีโอลินเกี่ยวข้องในระยะแรกของการสร้างไรโบโซม มีการแสดงออกของยีน *AtNUC-L1* ทั่วไปในภาวะปกติ การขัดขวางการทำงานของยีนนี้ทำให้เกิดผลรุนแรงต่อการเจริญและการพัฒนาของพืช และการขาดโปรตีนนี้ในพืช *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 ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นงานแรก ที่ศึกษาการขัดขวาง nucleolin-like protein ในยูคาริโอตชั้นสูง และบทบาทใหม่ ๆ สำหรับนิวคลีโอลินในโครงสร้างของนิวคลีโอลัส และ rDNA chromatin organization

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาลักษณะสมบัติของยีนที่มี Homology กับ *DQ012289* จากการศึกษาทาง

Bioinformatics

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *DQ012289* กับฐานข้อมูลสากล เพื่อ retrieve ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA (full length cDNA) แล้วนำไปวิเคราะห์เพื่อหา conserved region กับยีนอื่น ตลอดจนการทำนาย protein motif ที่สำคัญที่ปรากฏ

2. การศึกษา organization ของยีน *DQ012289* ในข้าว (*Oryza sativa* L.)

ศึกษา organization ของยีน *DQ012289* ในข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ / สายพันธุ์ต่างๆ ของไทยที่มีความสามารถในการต้านทานต่อความเค็มต่างกัน อย่างน้อย 4 พันธุ์ / สายพันธุ์ โดยวิธี Southern blot hybridization

3. การศึกษาการแสดงออกของยีน *DQ012289* ในข้าวในระยะต้นกล้า เมื่อเติบโตในภาวะเค็ม

3.1 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *DQ012289* ในใบข้าวที่ได้รับความเค็มในระยะสั้นในข้าวที่ความต้านทานความเค็มต่างกัน

ทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *DQ012289* ในกล้าข้าวอย่างน้อย 4 พันธุ์ / สายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อความเค็มแตกต่างกัน เช่น LPT123 LPT123TC171 KDML105 และ FL530 (ข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่พัฒนาจาก KDML105 โดยหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม) ที่มีอายุประมาณ 2-3 สัปดาห์ และได้รับความเค็มโดยการเติม 0.5% NaCl ลงในสารละลายธาตุอาหาร WP1 สูตรดัดแปลง (Thikart et al., 2005; สมพร มณีประสพสุข, 2547) แล้วทำการเก็บเนื้อเยื่อใบเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี northern blot analysis ภายหลังได้รับความเค็มเป็นเวลา 0 นาที 15 นาที 1 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง 6 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง

3.2 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *DQ012289* ในใบข้าวที่ได้รับความเค็มในระยะยาวในข้าวที่ความต้านทานความเค็มต่างกัน

ทำการเตรียมตัวอย่างพืชและเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *DQ012289* เช่นเดียวกับที่ระบุไว้ในข้อ 3.1 แต่ทำการเก็บเนื้อเยื่อใบภายหลังให้ภาวะเค็มเป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

4. การศึกษาผลของ ABA ที่มีต่อการแสดงออกของ *DQ012289* ในเนื้อเยื่อใบข้าว

4.1 ศึกษาผลของ exogenous ABA ที่มีต่อการแสดงออกของ *DQ012289* ในเนื้อเยื่อใบข้าว

เตรียมตัวอย่างกล้าข้าว LPT123 และ LPT123TC171 ดังที่ระบุในข้อ 9.3.1 ฉีดพ่น ABA ที่ความเข้มข้น 100 μ M ในช่วงเช้าและทำการตรวจวัดการแสดงออกของยีนทั้งในระยะสั้น และในระยะยาวดังที่ระบุไว้ในข้อ 9.3 รวมทั้งเปรียบเทียบการแสดงออกในกล้าข้าวที่ไม่ได้รับภาวะเค็มด้วย

4.2 ศึกษาผลของ ABA inhibitor- abamine (Han et al., 2004) ที่มีต่อการแสดงออกของ *DQ012289* ในเนื้อเยื่อใบข้าว

4.2.1 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ abamine ที่สามารถยับยั้งการสร้าง ABA ในข้าว ภายหลังได้รับความเค็ม โดยการให้ abamine ความเข้มข้น 50 100 และ 200 μ M เมื่อกล้าข้าวอยู่ใน ภาวะเค็มตั้งข้างต้น แล้วตรวจวัดปริมาณ ABA ที่สร้างขึ้น เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับ abamine ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

4.2.2 ศึกษาการแสดงออกของ *DQ012289* ในเนื้อเยื่อใบข้าวของกล้าข้าวที่ได้รับความเค็ม และ ฉีดพ่น abamine ในความเข้มข้นที่ได้ทราบจากการทดลองในข้อ 8.4.2.1 ทำการเก็บเนื้อเยื่อใบข้าว หลังจากได้รับความเค็ม และ abamine ในช่วงระยะสั้น และ ระยะยาวตามที่ระบุไว้ข้างต้น

5. การตรวจสอบบทบาทของยีนที่ encode ให้ *DQ012289* ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการ ด้านทานความเค็ม

ทำการตรวจสอบโดยการทำ over-expression ของยีนในพืชต้นแบบ เช่น *Arabidopsis* หรือ ยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.) โดยมีขั้นตอนดังนี้

5.1 สร้าง expression vector ของยีนดังกล่าวโดยใช้ full-length cDNA (AK103466) และ partial cDNA (AK063918) เข้าใน pJim19 ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ 35S *CaMV* promoter

5.2 ถ่าย recombinant DNA ที่สร้างในข้อ 9.5.1 เข้าสู่ *Agrobacterium* เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช

5.3 ถ่ายยีนดังกล่าวเข้าสู่ *Arabidopsis* (Clough and Bent, 1998) โดยวิธีของ Bechtold and Pelletier (1998)

5.4 คัดเลือกต้นที่เป็น independent transgenic lines ซึ่งมีระดับการแสดงออกของยีน 3 ระดับ

5.5 นำต้นที่คัดเลือกไว้มาตรวจสอบความสามารถในการต้านทานต่อความเค็ม โดยเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

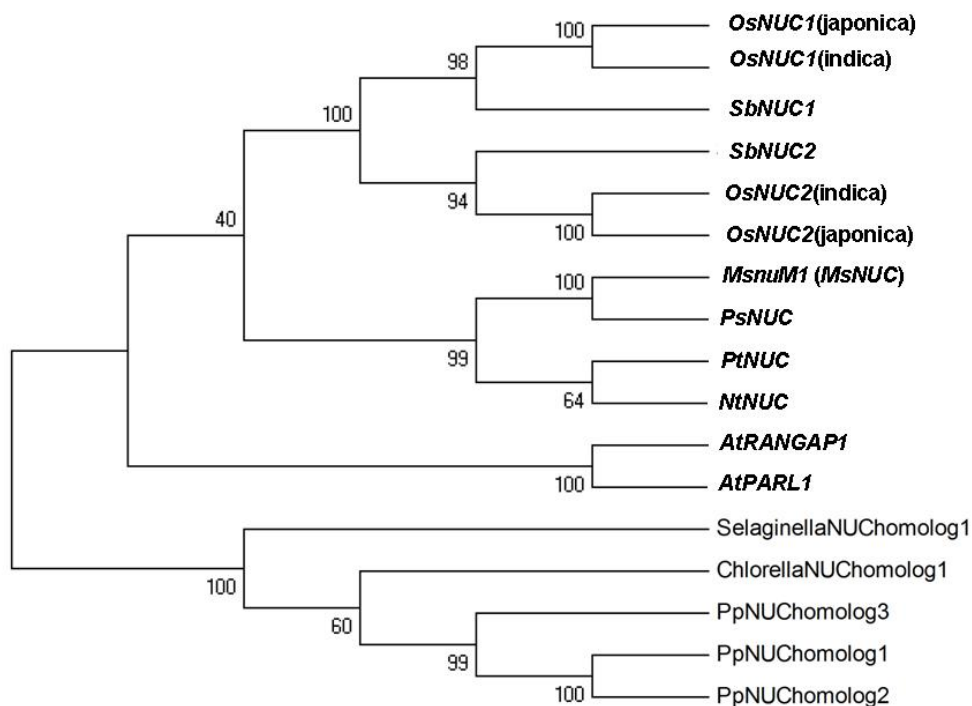
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การศึกษาลักษณะสมบัติของยีนที่มี Homology กับ *DQ012289* จากการศึกษาทาง Bioinformatics

DQ012289 เป็นส่วนหนึ่งของยีน accession no. AK103446 ในข้าว japonica พบว่าเป็น gene family ขนาดเล็ก ของยีนกลุ่ม *Nucleolin* ประกอบด้วยยีน 2 ยีน คือ *OsNUC1* และ *OsNUC2*

เมื่อทำการ translate ได้โปรตีนที่ประกอบด้วย 707 กรดอะมิโน ประกอบด้วย 3 domain คือ acidic-serine rich region อยู่ทางด้าน N- terminal ส่วนกลางประกอบด้วย RNA recognition motif (RRM) 2 ตำแหน่ง อยู่ในตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 450-525 และ 550-625 RRM นี้ และส่วนปลาย เป็น glycine-arginine rich region โปรตีนนี้ conserved ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด แต่ไม่พบใน prokaryote และ virus เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนกลุ่มนี้ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ แสดงดังรูปที่ 3

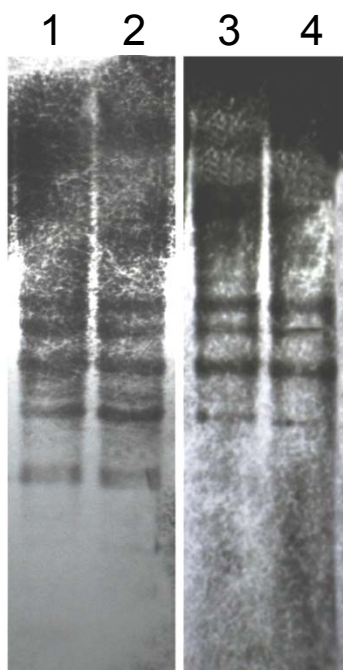
OsNUC1 อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 4 ของข้าว บริเวณ putative promoter พบ cis-element ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อ ABA และ การขาดน้ำ ได้แก่ ABRE-like sequence ACGT sequence DRE2CORE ZMRAB17 MYBCORE และ MYCCONSensusAT เป็นต้น นอกจากนี้ ยังพบ cis-element ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมด้วยฮอร์โมนพืช เช่น WRKY71OS ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อ Gibberellin เป็นต้น



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโปรตีนนิวคลีโอลินในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ

2. การศึกษา organization ของยีน *DQ012289* ในข้าว (*Oryza sativa* L.)

จากข้อมูลทาง bioinformatics พบว่า *OsNUC* gene family ประกอบด้วย 2 ยีน ดังกล่าวข้างต้นเมื่อ ยืนยันผลการทดลองด้วย Southern blot ได้ผลดังรูปที่ 4 เนื่องจากการทำ hybridization ได้ใช้ full-length cDNA เป็น probe ซึ่งยีนนี้มี *Bam*HI เป็น internal restriction site ทำให้ปรากฏแถบของ DNA มากกว่า 2 แถบ แต่อย่างไรก็ดี ข้าวทั้ง 4 พันธุ์ / สายพันธุ์ มีรูปแบบคล้ายคลึงกัน



รูปที่ 4 Genomic Southern blot ของข้าว KDML105 (1), FL530-IL (2), LPT123 (3), และ LPT123-TC171 (4) เมื่อใช้ full-length cDNA ของ *OsNUC1* เป็น probe

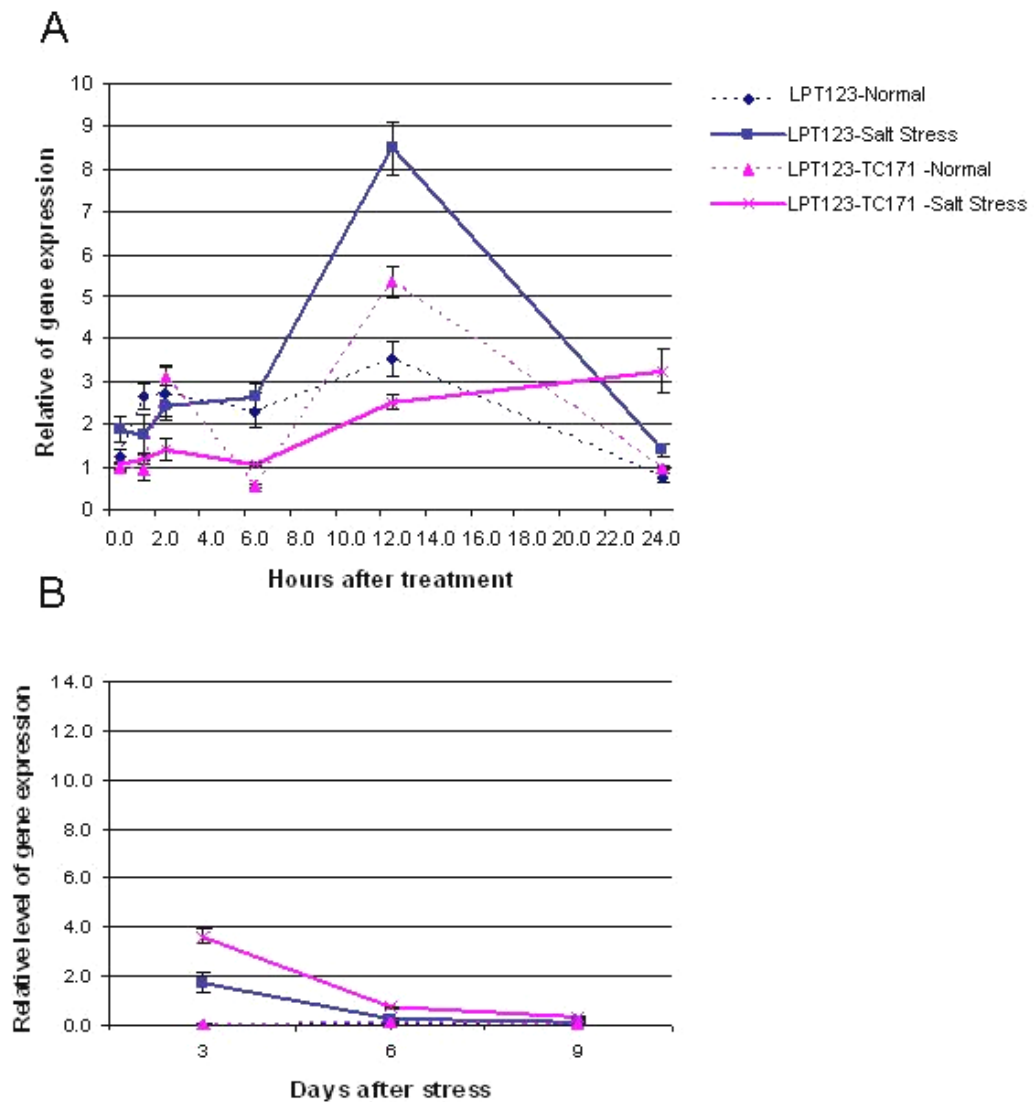
3. การศึกษาการแสดงออกของยีน *DQ012289* ในข้าวในระยะต้นกล้า เมื่อเติบโตในภาวะเค็ม

การแสดงออกของยีน *DQ012289* ในข้าว LPT123 & LPT123-TC171

เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *DQ012289* ในข้าวพันธุ์ LPT123 (พันธุ์ไม่ทนเค็ม) และข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่มี genetic background เดียวกัน คือข้าวสายพันธุ์ LPT123-TC171 ในชุดควบคุมไม่แตกต่างกันมากนัก ภายหลังได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 0.5 1 2 6 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า ความเค็มมีผลชักนำให้ข้าว LPT123 มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นมากกว่าในใบข้าวพันธุ์เดียวกันที่อยู่ในภาวะปกติมากกว่า 2 เท่า และการแสดงออกของยีนดังกล่าวลดลงใกล้เคียงกับต้นที่อยู่ในภาวะปกติเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (รูปที่ 5 A) สำหรับพันธุ์ทนเค็ม การชักนำให้มีแสดงออกของ *DQ012289* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนหลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 3 6 และ 9 วันพบว่า การแสดงออกของ *DQ012289* ในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีการแสดงออกสูงกว่า การแสดงออกในข้าว LPT123 อย่างชัดเจนในวันที่ 3 หลังจากได้รับภาวะเค็ม และการแสดงออกของยีนนี้ก็ลดลงหลังจาก 3 วัน โดยเฉพาะใน

ข้าว LPT123 ที่มีระดับการแสดงอยู่ในระดับเดียวกับชุดควบคุมที่อยู่ในภาวะปกติภายใน 6 วัน ส่วนข้าวพันธุ์เดิมมีระดับการแสดงออกอยู่ในภาวะปกติภายหลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน (รูปที่ 5 B)

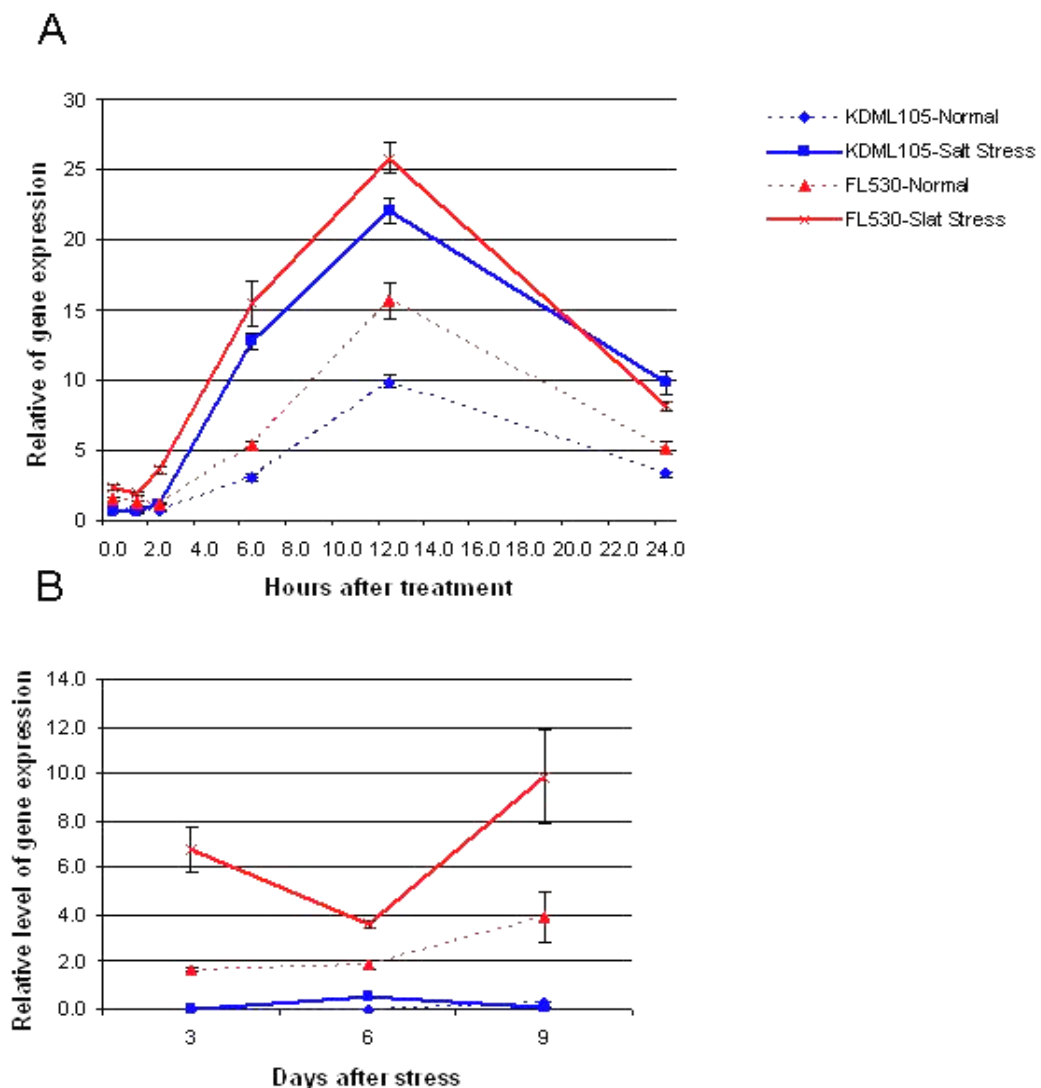


รูปที่ 5 ผลของภาวะเค็มที่มีต่อการแสดงออกของยีน *DQ012289* ในช่วงเริ่มต้น (A) และในช่วง 3-9 วัน (B) ของข้าว LPT123 และ LPT123-TC171

การแสดงออกของยีน *DQ012289* ในข้าว KDML105 & FL530

เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *DQ012289* ในข้าวพันธุ์ KDML105 (พันธุ์ไม่ทนเค็ม) และข้าวสายพันธุ์ทนเค็มที่มี genetic background เดียวกัน คือข้าวสายพันธุ์ FL530 ในชุดควบคุมพบว่า ในภาวะปกติ ข้าว FL530 มีการแสดงออกของยีนนี้สูงกว่าในข้าว KDML105 ภายหลังได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 0.5 1 2 6 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า ความเค็มมีผลชักนำให้ มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นมากกว่าในใบข้าวพันธุ์เดียวกันอย่างชัดเจน โดยพบการแสดงออกสูงสุดหลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ภายหลังได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การแสดงออกของยีนลดลงแต่ยังคงมีระดับสูงกว่าระดับการแสดงออกของยีนในข้าวที่อยู่ในภาวะปกติ (รูปที่ 6 A)

เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนหลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 3 6 และ 9 วันพบว่า การแสดงออกของ *DQ012289* ในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม FL530 ที่ได้รับภาวะเค็มยังคงมีระดับการแสดงออกที่สูงกว่าต้นที่เติบโตในภาวะปกติตลอดระยะเวลาที่ศึกษา คือ 3-9 วัน ในขณะที่ในข้าว KDML105 ระดับการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้ลดลงเข้าสู่ภาวะปกติแล้ว (รูปที่ 6 B)



รูปที่ 6 ผลของภาวะเค็มที่มีต่อการแสดงออกของยีน *DQ012289* ในช่วงเริ่มต้น (A) และในช่วง 3-9 วัน (B) ของข้าว KDML105 และ ข้าว FL530

4. การศึกษาผลของ ABA ที่มีต่อการแสดงออกของ *DQ012289* ในเนื้อเยื่อใบข้าว

4.1 ศึกษาผลของ exogenous ABA ที่มีต่อการแสดงออกของ *DQ012289* ในเนื้อเยื่อใบข้าว

การแสดงออกของ *DQ012289* ในข้าวพันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ LPT123-TC171

ในภาวะปกติ การแสดงออกของ *DQ012289* ในข้าวทั้งสองพันธุ์ / สายพันธุ์ที่ทำการศึกษาไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อได้รับภาวะเค็ม จะพบว่าระดับการแสดงออกของ *DQ012289* สูงขึ้นอย่างชัดเจนในวันที่ 3 หลังจากได้รับภาวะเค็มและค่อยๆ ลดลงในวันที่ 6-9 ในข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็ม (LPT123) ระดับการแสดงออกของยีนนี้จะใกล้เคียงกับระดับที่ข้าวเจริญในภาวะปกติตั้งแต่วันที่ 6 ส่วนในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) จะสามารถรักษาระดับการแสดงออกที่สูงกว่าในภาวะปกติ

เมื่อทำการให้ 100 μ M ABA แก่กล้าข้าวที่เจริญในภาวะเค็ม ไม่พบว่า ABA สามารถชักนำให้การแสดงออกของ *DQ012289* เพิ่มขึ้นกว่าเดิมได้ในข้าวทั้งสองพันธุ์ / สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของ *DQ012289* ลดลงอีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับที่ได้รับเฉพาะภาวะเค็มเพียงอย่างเดียว (รูปที่ 7) อย่างไรก็ตาม การลดลงของระดับการแสดงออกของ *DQ012289* อาจไม่ได้มาจากการให้ ABA โดยตรงแต่มาจากการได้รับการพ่นสารละลายซึ่งจะมีส่วนช่วยในการลดระดับของภาวะเครียดที่เกิดขึ้นได้



รูปที่ 7 การแสดงออกของ *DQ012289* ในกล้าข้าวพันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ LPT123-TC171

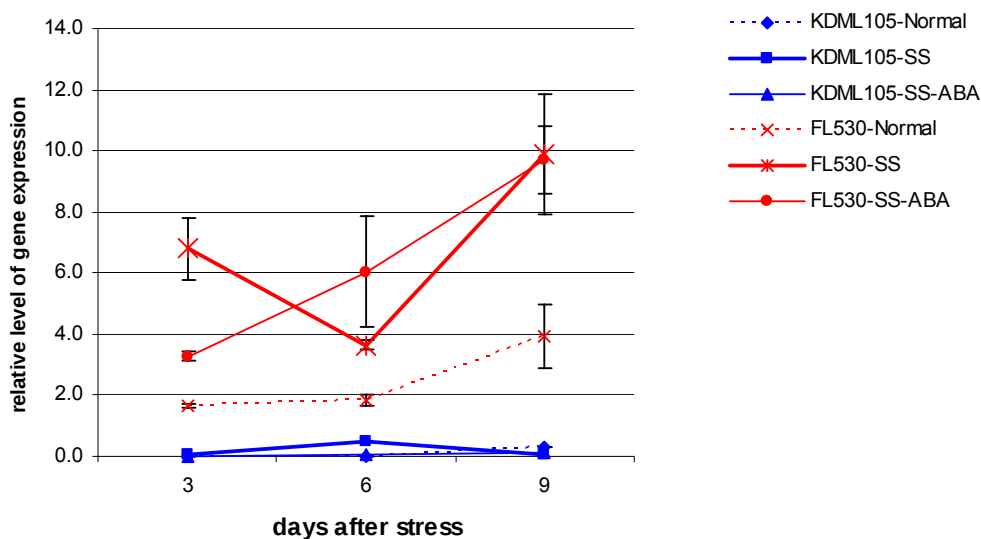
อายุ 3 สัปดาห์ เมื่อเติบโตในภาวะปกติ(Normal) ภาวะเค็ม (SS) และภาวะเค็มที่ได้รับ 100 μ M ABA (SS-ABA)

การแสดงออกของ *DQ012289* ในข้าวพันธุ์ KDML105 และสายพันธุ์ FL530

ในภาวะปกติ การแสดงออกของ *DQ012289* ในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม FL530 สูงกว่าการแสดงออกในข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็ม KDML105 อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม เมื่อได้รับภาวะเค็มการแสดงออกของ *DQ012289* เพิ่มขึ้นในข้าวทั้งสองพันธุ์ / สายพันธุ์ แต่จะเห็นชัดเจนกว่าในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม ซึ่งลักษณะเช่นนี้สอดคล้องกับในปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นในข้าวที่มี genetic background ของ LPT123 ด้วย

เมื่อให้ 100 μ M ABA แก่กล้าข้าวที่เติบโตในภาวะเค็ม ก็พบว่า ABA ไม่มีผลในการส่งเสริมให้ *DQ012289* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (รูปที่ 8)

ABA-induced gene expression in salt-stress condition



รูปที่ 8 การแสดงออกของ *DQ012289* ในกล้าข้าวพันธุ์ KDML105 และสายพันธุ์ FL530

อายุ 3 สัปดาห์ เมื่อเติบโตในภาวะปกติ(Normal) ภาวะเค็ม (SS) และภาวะเค็มที่ได้รับ 100 μ M ABA (SS-ABA)

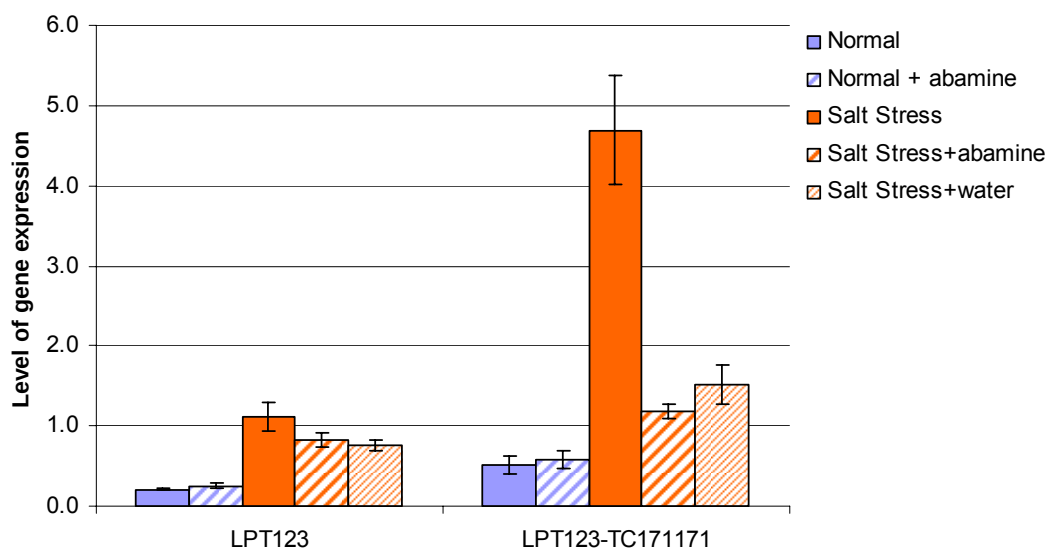
4.2 ศึกษาผลของ ABA inhibitor- abamine (Han et al., 2004) ที่มีต่อการแสดงออกของ *DQ012289* ในเนื้อเยื่อใบข้าว

ในการศึกษาผลของ ABA inhibitor คือ abamine-SG เมื่อทำการฉีดพ่นในข้าวที่เติบโตในภาวะเค็มพบว่า ข้าวจะมีอาการเหี่ยวมาก และไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้เกินกว่า 2 วัน ทั้งนี้เนื่องจาก abamine –SG ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ ABA ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่ทำหน้าที่ควบคุมการปิดของปากใบ ในภาวะเครียด ทำให้พืชสูญเสียน้ำมากกว่าปกติ ดังนั้นในการศึกษาผลของการยับยั้งการทำงานผ่าน ABA โดยใช้ abamine-SG นี้ จึงทำการศึกษาเพียง 1-2 วันหลังจากได้รับภาวะเค็มเท่านั้น

การแสดงออกของ *DQ012289* ในข้าวพันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ LPT123-TC171

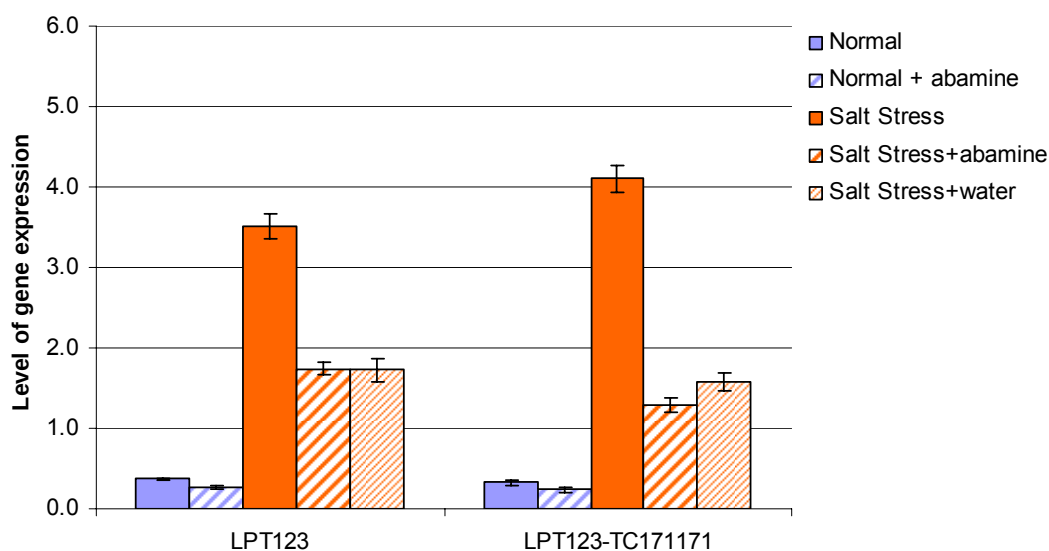
การให้ abamine-SG กับกล้าข้าวที่เจริญในภาวะปกติไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ *DQ012289* ในกล้าข้าวพันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ LPT123-TC171 และเมื่อกล้าข้าวเจริญในภาวะเค็ม ซึ่งเป็นภาวะที่ชักนำให้ *DQ012289* มีการแสดงออกมากขึ้น ก็ให้ผลการทดลองสอดคล้องการทดลองก่อนหน้านี้ คือ หลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 1-2 วัน ภาวะเค็มชักนำให้ *DQ012289* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น เมื่อให้ abamine-SG พบว่า การแสดงออกของ *DQ012289* ลดลงอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบการแสดงออกดังกล่าวโดยการฉีดพ่นเฉพาะตัวทำละลายไม่มี abamine-SG ก็ให้ผลไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 9-10) จึงสรุปได้ว่าการแสดงออกของ *DQ012289* ที่ลดลง อาจไม่ได้เนื่องจากการสร้าง ABA ที่ลดลง แต่มาจากผลของการฉีดพ่นที่อาจลดความรุนแรงของภาวะเครียดที่พืชได้รับมากกว่า

Abamine-SG effects on *OsNUC1* expression (day1)



รูปที่ 9 การแสดงออกของ *DQ012289* ในกล้าข้าวพันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ LPT123-TC171 อายุ 3 สัปดาห์ เมื่อเติบโตในภาวะปกติ(Normal) ภาวะปกติที่ได้รับ abamine-SG (Normal + abamine) ภาวะเค็ม (Salt Stress) และภาวะเค็มที่ได้รับ abamine-SG (Salt Stress + abamine) เป็นเวลา 1 วัน

Abamine-SG effects on *OsNUC1* expression (day2)



รูปที่ 10 การแสดงออกของ *DQ012289* ในกล้าข้าวพันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ LPT123-TC171 อายุ 3 สัปดาห์ เมื่อเติบโตในภาวะปกติ(Normal) ภาวะปกติที่ได้รับ abamine-SG (Normal + abamine) ภาวะเค็ม (Salt Stress) และภาวะเค็มที่ได้รับ abamine-SG (Salt Stress + abamine) เป็นเวลา 2 วัน

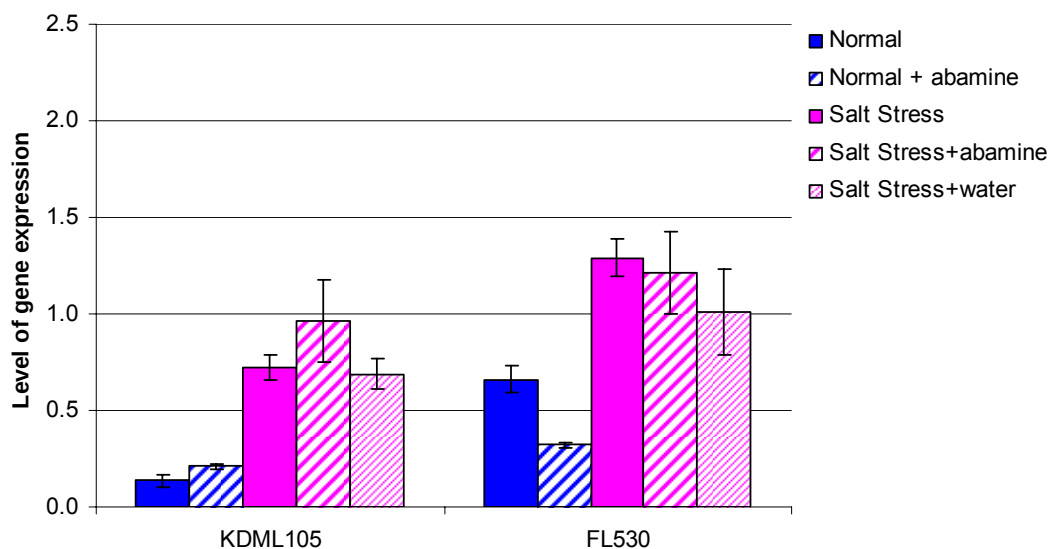
การแสดงออกของ DQ012289 ในข้าวพันธุ์ KDML105 และสายพันธุ์ FL530

ผลของ abamine-SG ในข้าวพันธุ์ KDML105 และ สายพันธุ์ FL530 ก็ให้ผลในทำนองเดียวกันกับที่ปรากฏในข้าวที่มี genetic background เป็น LPT123 กล่าวคือ การฉีดพ่น abamine-SG ไม่ได้มีผลโดยตรงต่อการยับยั้งการแสดงออกของ DQ012289 แต่ด้วยการฉีดพ่นน่าจะมีผลลดความรุนแรงของภาวะเครียดและไปมีผลต่อการลดการแสดงออกของ DQ012289 ซึ่งผลนี้ในข้าวที่มี genetic background เป็น KDML105 นี้เห็นชัดเจนหลังจากได้รับ treatment เป็นเวลา 2 วัน (รูปที่ 11-12)

จากผลการทดลองในข้าวทั้งสอง genetic background โดยการให้ ABA และ ABA inhibitor จะเห็นว่า การแสดงออกของ DQ012289 สามารถชักนำโดยภาวะเครียดจากความเค็มได้ แต่ไม่เกี่ยวข้องกับ ABA dependent pathway

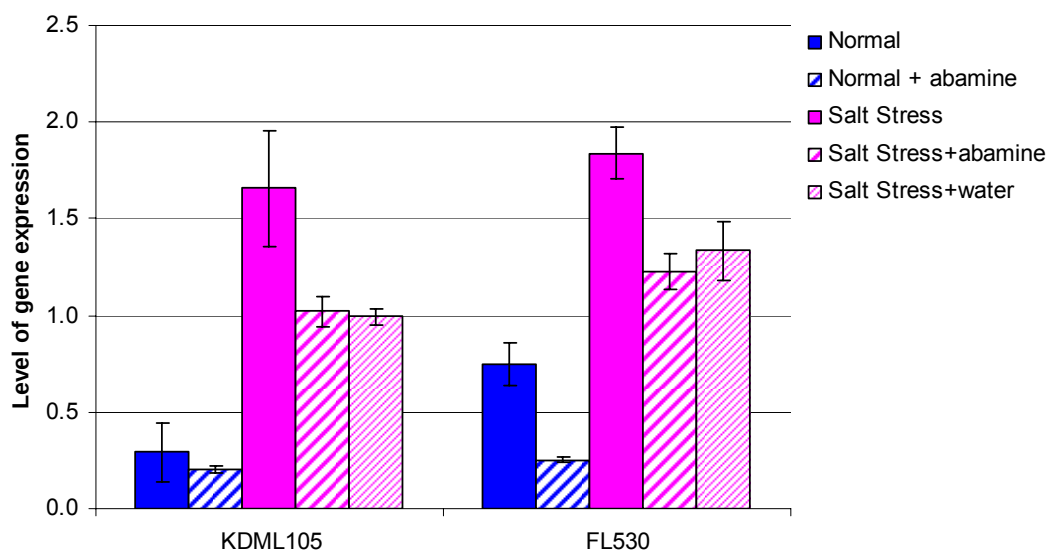
นอกจากนี้ ข้าวสายพันธุ์ทนเค็มทั้งสองสายพันธุ์ที่นำมาศึกษานี้ก็มีการแสดงออกของยีนนี้ในระดับที่สูงกว่า ข้าวที่ไม่ทนเค็ม จึงเป็นที่น่าสนใจว่า ยีนดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนเค็มของข้าวหรือ พืชอื่นหรือไม่ อย่างไร

Abamine-SG effects on *OsNUC1* expression (day1)



รูปที่ 11 การแสดงออกของ *DQ012289* ในกล้าข้าวพันธุ์ KDML105 และสายพันธุ์ FL530 อายุ 3 สัปดาห์ เมื่อเติบโตในภาวะปกติ(Normal) ภาวะปกติที่ได้รับ abamine-SG (Normal + abamine) ภาวะเค็ม (Salt Stress) และภาวะเค็มที่ได้รับ abamine-SG (Salt Stress + abamine) เป็นเวลา 1 วัน

Abamine-SG effects on *OsNUC1* expression (day2)

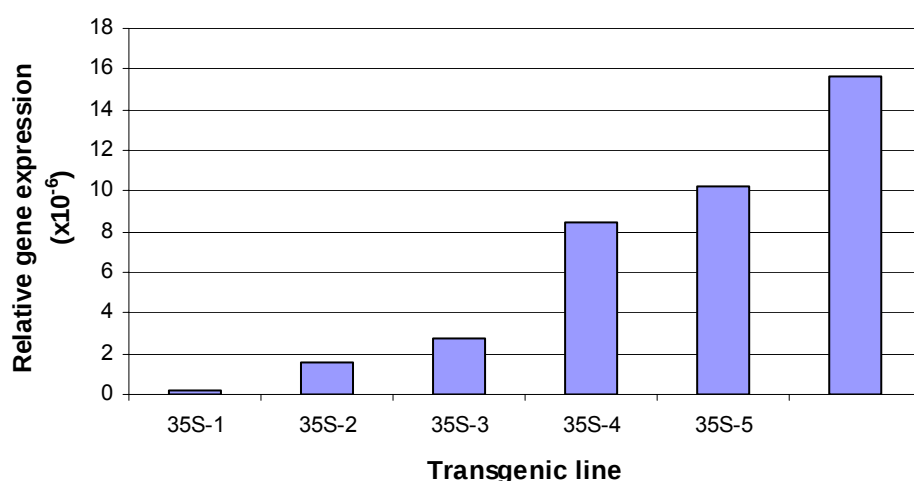


รูปที่ 12 การแสดงออกของ *DQ012289* ในกล้าข้าวพันธุ์ KDML105 และสายพันธุ์ FL530 อายุ 3 สัปดาห์ เมื่อเติบโตในภาวะปกติ(Normal) ภาวะปกติที่ได้รับ abamine-SG (Normal + abamine) ภาวะเค็ม (Salt Stress) และภาวะเค็มที่ได้รับ abamine-SG (Salt Stress + abamine) เป็นเวลา 2 วัน

5. การตรวจสอบบทบาทของยีนที่ encode ให้ *DQ012289* ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการต้านทานความเค็ม

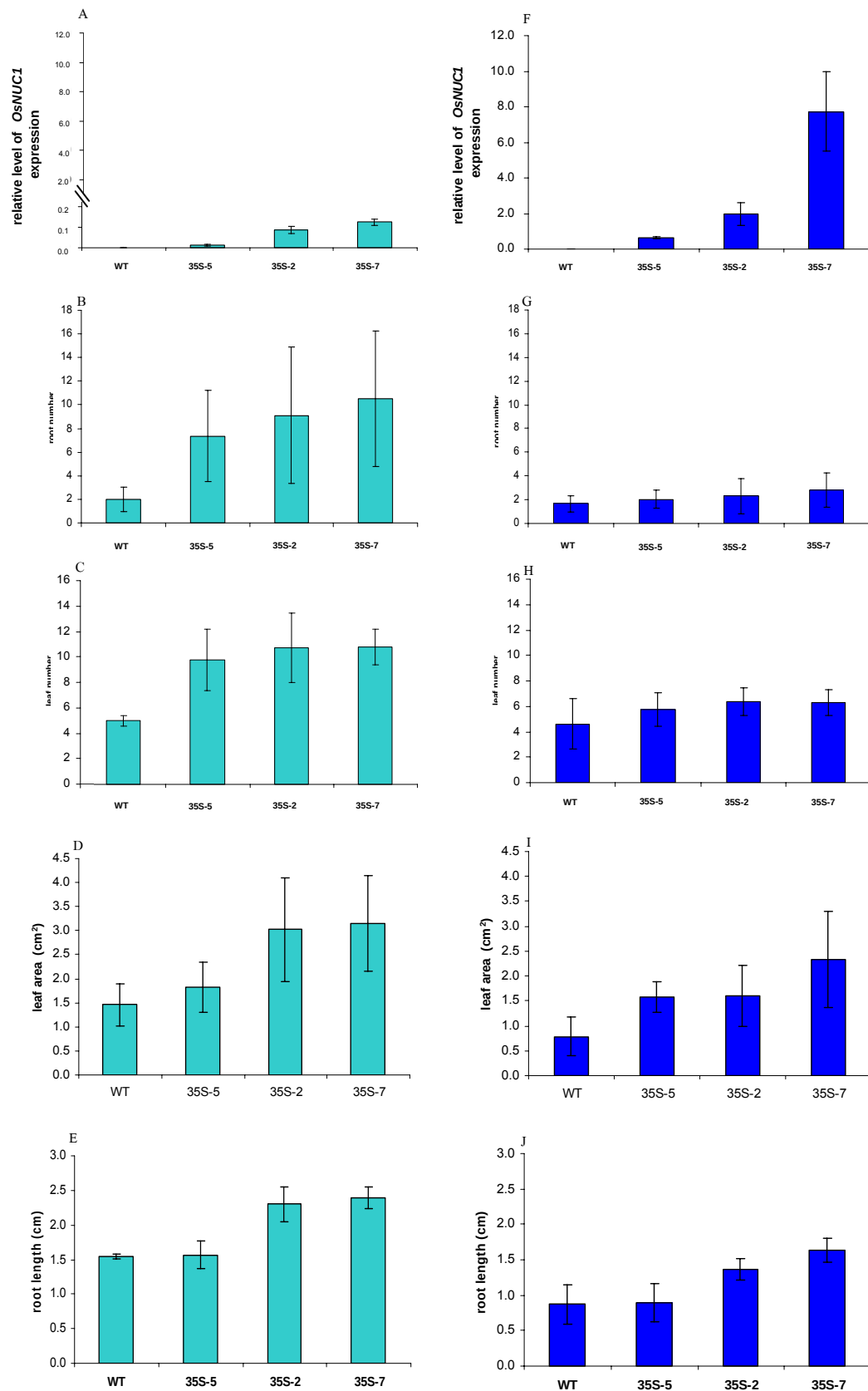
เมื่อทำการถ่าย full-length *OsNUC1* ที่ควบคุมด้วย 35SCaMV promoter พบว่าไม่สามารถเติบโตในอาหารที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ kanamycin ได้ ในขณะที่ต้น *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีน partial cDNA *OsNUC1* ที่ควบคุมด้วย 35SCaMV promoter สามารถเติบโตได้เป็นปกติ จึงทำการศึกษาความสามารถในการต้านทานความเค็มใน *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีน partial cDNA *OsNUC1* ต่อไป

เมื่อให้ transgenic *Arabidopsis* T₀ ผสมตัวเองและนำเมล็ดรุ่น T₁ มาเพาะบน Kanamycin plate ได้คัดเลือก line ที่มี T₁ segregation ของต้นที่ต้านทาน kanamycin : ต้นที่ไม่ต้านทาน kanamycin ในอัตราส่วน 3:1 ไว้จำนวน 6 line เพื่อนำมาตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ดังผลการทดลองในรูปที่ 11 ซึ่ง segregation ดังกล่าวแสดงถึงการมี single insertion ของส่วนของยีนที่ถ่ายเข้าสู่ *Arabidopsis* จากนั้น จึงคัดเลือก transgenic *Arabidopsis* จำนวน 3 line ที่มีระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ต่างกัน ได้แก่ 35S-2, 35S-5, และ 35S-7 เพื่อศึกษาลักษณะทาง Morphology เมื่อเติบโตในภาวะปกติ (MS medium) และในภาวะเค็ม (MS medium ที่มีการเติม 0.5% NaCl) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 การตรวจสอบเบื้องต้นของระดับการแสดงออกของยีน *DQ012289* ใน Transgenic *Arabidopsis* ที่คาดว่ามีการแสดงออกของ *OsNUC1* ซึ่งควบคุมด้วย 35SCaMV promoter

ระดับการแสดงออกของ *DQ012289* ใน 35S-2, 35S-5, และ 35S-7 พบว่า 35S-5 มีการแสดงออกต่ำที่สุดในขณะที่ 35S-7 มีการแสดงออกสูงที่สุดในภาวะปกติ (รูปที่ 14) และในภาวะเค็ม การแสดงออกของ *OsNUC1* เพิ่มขึ้นในทั้ง 3 line ที่ทำการศึกษา (รูปที่ 14 F) overexpression ของ *OsNUC1* มีผลทำให้ เมื่อเจริญใน MS medium *Arabidopsis* มีจำนวนใบ จำนวนราก พื้นที่ใบ และความยาวรากมากกว่า wild type และเมื่อเติบโตในภาวะเค็ม (MS medium ที่เติม 0.5% NaCl) พบว่า มีจำนวนใบ และจำนวนรากของ transgenic line ทั้ง 3 ไม่แตกต่างกับ wild type อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 14 G และ H) แต่ 35S-2 และ 35S-7 ซึ่งมีการแสดงออกของ *OsNUC1* ในระดับที่สูงกว่า 35S-5 มีพื้นที่ใบ และความยาวรากมากกว่า wild type (รูปที่ 14 I และ J) ลักษณะเช่นนี้แสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของ *DQ012289* มีผลต่อการเติบโต และเพิ่มความสามารถในการทนเค็มของพืชได้



รูปที่ 14 การเติบโตของ wild type *Arabidopsis* และ transgenic *Arabidopsis* 35S-2, 35S-5, และ 35S-7 ใน MS medium (B-E) และใน MS medium ที่เติบ 0.5% NaCl (G-J) ระดับการแสดงออกของ *OsNUC1* แสดงในภาพ A และ F

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาพบว่า *OsNUC1* เป็นยีนที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มในข้าว เป็น gene family ขนาดเล็ก ประกอบด้วยยีน *OsNUC1* และ *OsNUC2* ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษายีน *OsNUC1* เป็นหลัก ซึ่งพบว่าความเค็มชักนำให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในข้าวทั้ง 4 พันธุ์ / สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ทนเค็มทั้ง LPT123-TC171 และ FL-530 มีการแสดงออกของยีนที่สูงกว่าพันธุ์ที่ไม่ทนเค็ม เมื่อทำการถ่ายยีนดังกล่าวเข้าสู่ *Arabidopsis* 2 โครงสร้างคือ โครงสร้างที่เป็น full-length cDNA และโครงสร้างที่เป็น partial cDNA clone ที่ขาด N-terminal serine acidic motif พบว่า *Arabidopsis* ที่มีโครงสร้างของยีนแบบ full-length ไม่สามารถคัดเลือกด้วย kanamycin ได้ ในขณะที่ partial cDNA clone สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มี kanamycin ได้ เมื่อนำ transgenic *Arabidopsis* ที่คัดเลือกได้ไปเลี้ยงในภาวะเค็มพบว่ามีการเติบโตได้ดีกว่า wild type แสดงให้เห็นว่า ยีนนี้จะมามีบทบาทสำคัญในกระบวนการต้านทานความเค็มในพืช

เอกสารอ้างอิง

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

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 Agriculture and Forestry*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 14: 368-382.
- สมพร มณีประสพสุข. 2547. การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในข้าว *Oryza sativa* L. พันธุ์เหลืองประทิว 123 สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ทนเค็มในภาวะเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทฉบับที่ ๓ สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. Sripinyowanich, S., Maneeprasopsuk, S., Buabucha, T., Qu, L.-J., Gu, H., Chadchawan, S. 2009. Overexpression of *OsNUC1*, a novel salt-stress responsive gene, increases growth and salt tolerance in transgenic Arabidopsis. Plant Biology 2009: Saturday, July 18 - Wednesday July 22, 2009 - Honolulu, Hawaii.
2. Chamnanmanoontham, N. and Chadchawan, S. 2008. Early expression of the novel salt-responsive gene in rice (*Oryza sativa* L.) and its function in transgenic tobacco. 13th Biological Sciences Graduate Congress. 15 – 17 December 2008, National University of Singapore.
3. Sripinyowanich, S., Maneeprasopsuk, S., Chamnanmanoontham, N., Udomchalothorn, T., Buaboocha, T., Qu, L.-J., Gu, H., and Chadchawan, S. 2010. Overexpression of partial *OsNUC1*, a novel salt-responsive gene, increases growth and salt tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Physiology*. (submitted).