

ผลของความเค็มในดินต่ออัตราส่วนโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในข้าว *Oryza sativa* L. พื้นที่
เมืองไทยและการเชื่อมโยงทั่วจีโนมเพื่อการทำนายยีนที่เกี่ยวกับการสะสมโซเดียมและโพแทสเซียม
ไอออน



นางสาวณัฐยานันต์ ดันตภิรมย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SOIL SALINITY EFFECTS ON Na⁺/K⁺ RATIOS IN LOCAL THAI RICE *Oryza sativa* L. AND GE
NOME-
WIDE ASSOCIATION FOR PREDICTION OF GENES INVOLVING IN Na⁺ AND K⁺ ACCUMULA
TION

Miss Nattaya Tantipirom



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Botany

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของความเค็มในดินต่ออัตราส่วนโซเดียมและ
โพแทสเซียมไอออนในข้าว *Oryza sativa* L. พื้นเมืองไทย
และการเชื่อมโยงทั่วจีโนมเพื่อการทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับ
สะสมโซเดียมและโพแทสเซียมไอออน

โดย

นางสาวณัฐธยาน์ ตันติภิรมย์

สาขาวิชา

พฤกษศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

อาจารย์ ดร.มนนัทธ์ พงษ์พานิช

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวงนิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกวรรณ เสรีภาพ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ ดร.มนนัทธ์ พงษ์พานิช)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชลี ใจดี)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร. สมทรง โชติชื่น)

ณัฐธยาน์ ตันติภิรมย์ : ผลของความเค็มในดินต่ออัตราส่วนโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในข้าว *Oryza sativa* L. พื้นเมืองไทยและการเชื่อมโยงทั่วจีโนมเพื่อการทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสะสมโซเดียมและโพแทสเซียมไอออน (SOIL SALINITY EFFECTS ON Na⁺/K⁺ RATIOS IN LOCAL THAI RICE *Oryza sativa* L. AND GENOME-WIDE ASSOCIATION FOR PREDICTION OF GENES INVOLVING IN Na⁺ AND K⁺ ACCUMULATION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร.มนนัท์ พงษ์พานิช, 109 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณโซเดียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในส่วนใบของข้าวพื้นเมืองไทยและข้าวปรับปรุงพันธุ์จำนวน 80 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ภาวะปกติและภาวะเครียดจากความเค็มที่ระดับ 9 เดซิซีเมนต์เป็นเวลา 6 และ 9 วัน ผลการศึกษาพบว่าปริมาณโซเดียมไอออนในข้าวเกือบทุกพันธุ์มีค่าสูงขึ้น ในขณะที่โพแทสเซียมไอออนมีปริมาณลดลง และพบว่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนมีค่าสูงขึ้นเมื่อข้าวอยู่ในภาวะเครียดจากความเค็มในข้าวเกือบทุกพันธุ์ ยกเว้นข้าวบางพันธุ์ที่มีปริมาณโพแทสเซียมไอออนเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับภาวะเค็ม เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมไอออนกับพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องและค่าการเจริญของข้าวที่ได้รับภาวะเค็มในระดับเดียวกันพบว่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนเป็นพารามิเตอร์ที่มีความสัมพันธ์กับค่าการเติบโตมากที่สุด นำข้อมูลการสะสมไอออนในเนื้อเยื่อส่วนต้นมาศึกษาการเชื่อมโยงทั่วจีโนมกับฐานข้อมูลสนิปส์ของข้าวทั้ง 80 พันธุ์/สายพันธุ์ เพื่อหาดำแหน่งสนิปส์ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในข้าว ผลการระบุยีนในจีโนมพบสนิปส์ที่มีความเชื่อมโยงกับพารามิเตอร์เหล่านี้้อย่างมีนัยสำคัญ จำนวน 59 สนิปส์ ที่อยู่ในตำแหน่งยีนเป้าหมายที่มีหน้าที่ต่างๆ ในเซลล์ เมื่อเลือกยีนเป้าหมายจำนวน 3 ยีนที่ตำแหน่ง LOC_Os01g12540.2 LOC_Os01g12650.1 และ LOC_Os06g48810.1 มาศึกษาระดับการแสดงออกในข้าวระยะกล้า 4 พันธุ์ที่ภาวะปกติและภาวะเครียดจากความเค็มเป็นเวลา 3 และ 6 วัน พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน LOC_Os01g12540.2 ในภาวะควบคุมและภาวะเครียดจากความเค็มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ยีน LOC_Os01g12650.1 และ LOC_Os06g48810.1 มีระดับการแสดงออกสูงขึ้นเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน ซึ่งจะต้องศึกษาหน้าที่ของยีนเหล่านี้ต่อการตอบสนองของพืชในภาวะเครียดจากความเค็มต่อไป

ภาควิชา	พฤกษศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2559	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5671955023 : MAJOR BOTANY

KEYWORDS: LOCAL THAI RICE / SALT TOLERANT / GENOME-WIDE ASSOCIATION / SODIUM ION / POTASSIUM ION / SODIUM POTASSIUM RATIO

NATTAYA TANTIPIROM: SOIL SALINITY EFFECTS ON Na^+/K^+ RATIOS IN LOCAL THAI RICE *Oryza sativa* L. AND GENOME-WIDE ASSOCIATION FOR PREDICTION OF GENES INVOLVING IN Na^+ AND K^+ ACCUMULATION. ADVISOR: ASSOC. PROF. SUPACHITRA CHADCHAWAN, Ph.D., CO-ADVISOR: MONNAT PONGPANICH, Ph.D., 109 pp.

This study aims to determine sodium ion (Na^+) content, potassium ion (K^+) content, and sodium potassium ratio (Na^+/K^+) in leaf tissue of 80 local and improved Thai rice varieties/lines under control and salt stress conditions was at 9 dS/m for 6 and 9 days. The results showed an increase of Na^+ content, decrease of K^+ and increase of Na^+/K^+ in all cultivars after salt treatment except in some cultivars which showed an increase of K^+ content after salt treatment. The determination of correlation between ion accumulation and growth parameters showed that Na^+/K^+ was the parameter which was correlated to most number of growth parameters. Ion accumulation data were used to perform an association analysis with the SNPs of 80 rice cultivars to find the SNPs which associated with Na^+ and K^+ accumulation in rice. The association results revealed 59 significant SNPs which located in different candidate genes in the cell. Three selected candidate genes including LOC_Os01g12540.2, LOC_Os01g12650.1 and LOC_Os06g48810.1 were selected to determine the expression level in 4 rice cultivars under control and salt stress conditions. Expression level of LOC_Os01g12540.2 in both control and salt stress condition were not significantly different after 3 and 6 days while expression level of LOC_Os01g12650.1 and LOC_Os48810.1 increased in all cultivars when exposed to salinity for 6 days, these genes should be studied for the role in salt stress response in the future.

Department: Botany

Student's Signature

Field of Study: Botany

Advisor's Signature

Academic Year: 2016

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์ และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์ ดร. มนันทน์ พงษ์พานิช ที่มีส่วนทำให้เกิดหัวข้อวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ขึ้น รวมทั้งให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ตลอดระยะเวลาที่ทำงานวิจัย รวมถึงช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ อีกทั้งยังให้กำลังใจและความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดมา

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อธิพงษ์ บัวบุชา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ อิ่มยิ้ม อาจารย์ ดร. วราลักษณ์ เกษตรานันท์ และ Professor Dr. Luca Comai ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ผลการทดลองจนวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกวรรณ เสรีภาพ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร. อัญชลี ใจดี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

กราบขอบพระคุณ ดร. สมทรง โชติชื่น ที่ให้ความกรุณาอนุเคราะห์จัดหาเมล็ดพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยสำหรับใช้ในการทำวิจัย และ ดร. ดวงใจ สุริยาอรุณโรจน์ ที่ให้ความกรุณาอำนวยความสะดวกในการทดลอง ณ ศูนย์วิจัยข้าวนครราชสีมา กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว จังหวัดนครราชสีมา

ขอบคุณอาจารย์และนิสิตทุกคนในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านสิ่งแวดล้อมและสรีรวิทยาของพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านสำหรับความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) (รหัสโครงการ 2555NRCT512302) ภายใต้โครงการวิทยาศาสตร์เชิงโอมิกส์เพื่อการศึกษาลักษณะการทนทานความเค็มในข้าวไทย

ขอขอบคุณโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) สำหรับทุนการศึกษาและเงินทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนเป็นอย่างดีตลอดการทำวิทยานิพนธ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร.....	12
1. ข้าวและข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย.....	12
1.1 ข้าวนาสวน (lowland rice).....	12
1.2 ข้าวขึ้นน้ำ (floating rice).....	12
1.3 ข้าวน้ำลึก (deepwater rice).....	13
1.4 ข้าวไร่ (upland rice).....	13
1.5 ข้าวนาที่สูง (highland rice).....	13
2. ดินเค็มและปัญหาดินเค็ม.....	13
3. การตอบสนองทางสรีรวิทยาของพืชต่อความเครียดจากความเค็ม.....	14
3.1 ภาวะเครียดออสโมติก (osmotic stress).....	14
3.2 ภาวะเครียดจากไอออน (ionic stress).....	15
4. โซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในพืช.....	15

5. การศึกษาการเชื่อมโยงทั้งจีโนม (genome-wide association study)	17
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง	20
1. พืชทดลอง	20
1.1 พืชทดลองที่ใช้ในการศึกษาปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในข้าว	20
1.2 พืชทดลองที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน	20
2. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ทำการทดลองในการศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาของพืช	20
2.1 วัสดุอุปกรณ์ในการปลูกพืช	20
2.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้วัดปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออน	20
3. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ทำการทดลองในการศึกษาการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ การถอดรหัส	21
3.1 วัสดุอุปกรณ์ในการปลูกพืช	21
3.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ	21
3.3 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในอิเล็กโตรโฟรีซิส	22
3.4 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ใน real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)	22
4. สารเคมีที่ใช้ทำการทดลอง	23
4.1 สารเคมีที่ใช้ในการปลูกพืช	23
4.2 สารเคมีที่ใช้ในการวัดปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออน	23
4.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ	23
4.4 สารเคมีที่ใช้ในอิเล็กโตรโฟรีซิส	24
4.5 สารเคมีที่ใช้ใน real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)	24
5. โปรแกรมที่ใช้ในการศึกษา	24
6. การศึกษาผลของความเค็มในดินที่มีต่อปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในระยะกล้า ของข้าวพื้นเมืองไทย	24

7. การหาความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่าง Na^+ / K^+ กับค่าดัชนีเสถียรภาพ (Stability index)	27
8. การทำนายตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนเค็มของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยในระยะกล้า โดยใช้เทคนิค genome-wide association	27
8.1 Genotyping	27
8.2 SNPs calling	27
8.3 Population substructure study	28
8.4 Genome-wide association study	28
8.5 Gene Prediction	28
9. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่ได้จาก genome-wide association study ในข้าวระยะกล้าที่ได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม	29
บทที่ 4 ผลการทดลอง	32
1. การศึกษาผลของความเค็มในดินที่มีต่อปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในระยะกล้าของข้าวพื้นเมืองไทย	32
2. การหาความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่าง Na^+ / K^+ กับค่าดัชนีเสถียรภาพ (stability index)	38
3. การทำนายตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนเค็มของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยในระยะกล้า โดยใช้เทคนิค genome-wide association	41
3.1 การศึกษา population substructure ด้วย Principal Component Analysis (PCA)	41
3.2 การศึกษาการเชื่อมโยงทั้งจีโนมกับลักษณะการสะสมโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในข้าวพื้นเมืองไทย	42
4. ระดับการแสดงออกของยีนที่ได้จาก genome-wide association study ในข้าวระยะกล้าที่ได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม	59

4.1 การเลือกยีนที่จะนำมาศึกษาในระดับการแสดงออกของยีนในข้าวระยะกล้าที่ได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม.....	59
4.2 ระดับการแสดงออกของยีนทั้งสามยีนในข้าวระยะกล้าที่ได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม.....	60
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง.....	63
1. ผลของความเค็มในดินที่มีต่อปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในระยะกล้าของข้าว.....	63
พื้นที่เมืองไทย.....	63
2. ความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่าง Na^+/K^+ กับ Stability index.....	68
3. ตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนเค็มของข้าวพันธุ์พื้นที่เมืองไทยในระยะกล้า โดยใช้เทคนิค genome-wide association.....	69
4. ระดับการแสดงออกของยีนที่ได้จาก genome-wide association study ในข้าวระยะกล้าที่ได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม.....	74
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	78
รายการอ้างอิง.....	80
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	109

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ลำดับและรายชื่อพันธุ์/สายพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา.....	25
ตารางที่ 2 ค่า correlation coefficient (A) และระดับนัยสำคัญทางสถิติ (B) จากการหาความสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมไอออน กับพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ.....	40
ตารางที่ 3 ตำแหน่งของสนิปส์ที่มีความเชื่อมโยงกับปริมาณโซเดียมไอออนในข้าวระยะกล้าที่ปลูกในภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน	45
ตารางที่ 4 ตำแหน่งของสนิปส์ที่มีความเชื่อมโยงกับปริมาณโซเดียมไอออนในข้าวระยะกล้าที่ปลูกในภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน	46
ตารางที่ 5 ตำแหน่งของสนิปส์ที่มีความเชื่อมโยงกับอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในข้าวระยะกล้าที่ปลูกในภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน.....	53
ตารางที่ 6 ตำแหน่งของสนิปส์ที่มีความเชื่อมโยงกับปริมาณโซเดียมไอออนในข้าวระยะกล้าที่ปลูกในภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน	55
ตารางที่ 7 สรุปตำแหน่งของสนิปส์ที่มีความเชื่อมโยงกับพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมไอออนในข้าวระยะกล้าที่ปลูกในภาวะเค็ม	56

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 แผนภาพแสดงการทำงานของ SOS signaling pathway ในการควบคุมปริมาณโซเดียมไอออนในเซลล์พืชที่อยู่ในภาวะเครียดจากความเค็ม..... 17

ภาพที่ 2 ปริมาณโซเดียมไอออนในเนื้อเยื่อส่วนต้นของข้าว 80 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ปลูกในภาวะปกติ และภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน (A) และ 9 วัน (B).....35

ภาพที่ 3 ปริมาณโพแทสเซียมไอออนในเนื้อเยื่อส่วนต้นของข้าว 80 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ปลูกในภาวะปกติและภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน (A) และ 9 วัน (B)36

ภาพที่ 4 อัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในเนื้อเยื่อส่วนต้นของข้าว 80 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ปลูกในภาวะปกติและภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน (A) และ 9 วัน (B) 37

ภาพที่ 5 population substructure ของประชากรข้าวพื้นเมืองไทยและข้าวปรับปรุงพันธุ์ จำนวน 80 พันธุ์บน eigenvector 1 และ eigenvector 2.....41

ภาพที่ 6 Manhattan plot ของปริมาณโซเดียมไอออนในส่วนใบของข้าวเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน43

ภาพที่ 7 Manhattan plot ของปริมาณโซเดียมไอออนในส่วนใบของข้าวเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน43

ภาพที่ 8 quantile-quantile plot ของปริมาณโซเดียมไอออนในวันที่ 6 (A) และ 9 (B) หลังได้รับภาวะเค็ม 44

ภาพที่ 9 Manhattan plot ของปริมาณโพแทสเซียมไอออนในส่วนใบของข้าวเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน.....47

ภาพที่ 10 Manhattan plot ของปริมาณโพแทสเซียมไอออนในส่วนใบของข้าวเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน.....48

ภาพที่ 11 quantile-quantile plot ของปริมาณโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 6 (A) และ 9 (B) หลังได้รับภาวะเค็ม49

ภาพที่ 12 Manhattan plot ของอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในส่วนใบของข้าวเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน50

ภาพที่ 13 Manhattan plot ของอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในส่วนใบของข้าวเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน	51
ภาพที่ 14 quantile-quantile plot ของอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 6 (A) และ 9 (B) หลังได้รับภาวะเค็ม	52
ภาพที่ 15 ตำแหน่งสนิปส์ของยีนที่เลือกใช้ในการศึกษาระดับการแสดงออกบนแผนภาพ Manhattan plot ที่แสดงความสัมพันธ์กับพีโนไทป์ต่างๆ ได้แก่ ปริมาณโซเดียมไอออนในวันที่ 6 (A) และ 9 (B) หลังได้รับภาวะเค็ม และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 6 (C) และ 9 (D) หลังได้รับภาวะเค็ม	60
ภาพที่ 16 การแสดงออกของยีน LOC_Os01g12540.2 ในข้าวระยะกล้าที่ปลูกในภาวะปกติ (C) และภาวะเครียดจากความเค็ม (S) เป็นเวลา 3 และ 6 วัน	61
ภาพที่ 17 การแสดงออกของยีน LOC_Os01g12650.1 ในข้าวระยะกล้าที่ปลูกในภาวะปกติ (C) และภาวะเครียดจากความเค็ม (S) เป็นเวลา 3 และ 6 วัน	62
ภาพที่ 18 การแสดงออกของยีน LOC_Os06g48810.1 ในข้าวระยะกล้าที่ปลูกในภาวะปกติ (C) และภาวะเครียดจากความเค็ม (S) เป็นเวลา 3 และ 6 วัน	62
ภาพที่ 19 การทำงานของ transporter ที่เกี่ยวข้องกับการส่งโซเดียมไอออนเข้าและออกจากเซลล์	67

บทที่ 1 บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชอาหารที่สำคัญของคนไทย และประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งออกข้าวเป็นอันดับต้นๆ ของโลก (FAO, 2015) เนื่องจากข้าวเป็นพืชที่ไวต่อความเค็ม (salt-susceptible) ภาวะดินเค็มจึงเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตของข้าวต่ำลง โดยเฉพาะพื้นที่นาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่มีดินเค็มกระจายอยู่มาก (Asch และคณะ, 2000; ดวงใจ สุริยาอรุณโรจน์, 2546) ความเค็มในดินส่งผลกระทบต่อสรีรวิทยาและเมแทบอลิซึมของพืช โดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย และปริมาณน้ำในเซลล์ลดลง (Siringam, 2011) นอกจากนี้ภาวะเครียดจากความเค็มยังลดอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง อัตราการหายใจ อัตราการงอกของเมล็ด อัตราการอยู่รอด รวมถึงส่งผลกระทบต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช ทำให้พืชที่ได้รับภาวะเครียดจากความเค็มมีการเจริญเติบโตและผลผลิตลดลง (Jouyban, 2012) นักปรับปรุงพันธุ์จึงต้องการปรับปรุงให้ข้าวมีความทนต่อความเค็มมากยิ่งขึ้น

ความทนเค็ม คือ ความสามารถของพืชในการเจริญจนครบวงจรชีวิตได้ในภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง (Parida และ Das, 2005) พืชที่ทนเค็มจะสามารถรักษาน้ำหนัก เมแทบอลิซึม และให้ผลผลิตเมื่ออยู่ในภาวะเครียดจากความเค็ม ในภาวะเค็ม พืชพันธุ์ทนเค็มจะมีความสูงของต้น และน้ำหนักแห้งมากกว่าพันธุ์ที่ไม่ทนเค็ม (Bhowmik และคณะ, 2009) นอกจากนี้ยังพบว่าในภาวะเค็ม ข้าวพันธุ์ทนเค็มสามารถรักษาผลผลิตจาก photosystem II ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงให้อยู่ในระดับเดียวกับในภาวะปกติได้อีกด้วย (Moradi และ Ismail, 2007)

นอกจากการศึกษาจากลักษณะทางสรีรวิทยาต่าง ๆ ของข้าว เช่น น้ำหนัก ความยาว และอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงที่ตอบสนองต่อภาวะเครียดจากความเค็มแล้ว ปริมาณไอออนที่สำคัญในต้นและราก ได้แก่ โซเดียมและโพแทสเซียมไอออนยังเป็นอีกลักษณะหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของพืชต่อภาวะเครียดจากความเค็ม โดยมีการศึกษาปริมาณไอออนต่าง ๆ โดยเฉพาะโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในพืชหลายชนิด เช่น turfgrass (Torello และ Rice, 1986) มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) (Alhagdow และคณะ, 1999) และข้าว (Asch และคณะ, 2000) เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของโซเดียมไอออนจะกีดกันการดูดโพแทสเซียมไอออนเข้าสู่เซลล์ จึงพบว่าเมื่อได้รับภาวะเค็มพืชเหล่านี้จะมีปริมาณโซเดียมไอออนเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณโพแทสเซียมไอออนจะลดลง ส่งผลให้ค่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่อยู่ในภาวะปกติ ปริมาณของโซเดียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในเนื้อเยื่อสามารถใช้ในการบ่งบอกความทนเค็มของข้าวแต่ละพันธุ์ได้ (Siringam, 2011)

ในข้าวพบว่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับภาวะเค็ม และข้าวแต่ละพันธุ์จะมีความสามารถในการสะสมไอออนที่แตกต่างกัน ข้าวพันธุ์ทนเค็มจะสามารถลดการสะสมของโซเดียมไอออนไม่ให้มีปริมาณมากเกินไป ในขณะที่รักษาปริมาณของโพแทสเซียมไอออนไว้ได้ จึงทำให้มีอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนต่ำ ทำให้ผลผลิตในข้าวพันธุ์ทนเค็มลดลงไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อื่น ๆ (Morales และคณะ, 2012) แต่การศึกษาลักษณะการสะสมของไอออนเหล่านี้ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยยังมีไม่มากนัก

ข้อมูลลักษณะการสะสมไอออนในข้าวพื้นเมืองไทยหลาย ๆ พันธุ์ สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาความเชื่อมโยงกับข้อมูลสไนป์ของข้าว เพื่อหาตำแหน่งบนจีโนมข้าวที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนความเค็ม ด้วยเทคนิค genome wide association study (GWAS) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีการศึกษาในหลายสาขาวิชา โดยเริ่มแรกนิยมใช้ศึกษาในทางการแพทย์ โดยการหา candidate gene บนจีโนมของมนุษย์ที่เกี่ยวข้องกับอาการของโรคต่าง ๆ ต่อมาในภายหลังยังมีการนำเทคนิค GWAS ไปใช้ในการศึกษาหา candidate gene ในพืชหลายชนิด เช่น *Arabidopsis thaliana* L. ข้าวโพด ถั่วเหลือง บาร์เลย์ และข้าวสาลี (Ogura และ Busch, 2015) รวมทั้งข้าว (*Oryza sativa* L.) ก็เป็นพืชที่มีการใช้เทคนิคนี้ในงานวิจัยหลายเรื่อง เช่น การระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะเวลาการออกดอกและผลผลิตของเมล็ดข้าว (Huang และคณะ, 2012) ยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อไอออนในข้าว (Ueda และคณะ, 2014) และยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนเค็มในระยะออกดอกในข้าว (Kumar และคณะ, 2015) เป็นต้น ในการใช้ GWAS เพื่อหา ยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนเค็มนั้นจะเป็นประโยชน์และสามารถนำ candidate gene ที่ได้จากการวิเคราะห์ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นดินเค็มได้ในอนาคต

ในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาค้นหาผลของความเค็มในดินที่มีต่อปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนส่วนต้นของข้าวพื้นเมืองไทยระยะกล้า จำนวน 80 พันธุ์/สายพันธุ์ และใช้เทคนิคการเชื่อมโยงทั้งจีโนม (GWAS) โดยนำข้อมูลสไนป์ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมมาใช้ในการค้นหาตำแหน่งบนจีโนมของข้าวที่สัมพันธ์กับลักษณะการสะสมโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนเพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไทย และนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาค้นหาผลของความเค็มในดินที่มีต่อปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในใบของข้าวพื้นเมืองไทยและข้าวปรับปรุงพันธุ์ในระยะกล้า จำนวน 80 พันธุ์/สายพันธุ์ พร้อมทั้งศึกษาการเชื่อมโยงทั้งจีโนมกับลักษณะการสะสมโซเดียมและโพแทสเซียมไอออน และตรวจสอบการแสดงออกของ candidate gene ที่ได้จำนวน 3 ยีนในข้าวที่เจริญในภาวะปกติและภาวะเค็ม

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาผลของความเค็มในดินที่มีต่อปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในส่วนใบของข้าว 80 พันธุ์/สายพันธุ์ ในระยะกล้า
2. หาความสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมไอออน และพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของข้าวระยะกล้าในภาวะเครียดจากความเค็ม
3. ศึกษาการเชื่อมโยงทั้งจีโนมกับฟีนไทป์ปริมาณโซเดียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในข้าวที่ได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 และ 9 วัน
4. ศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่ได้จากการศึกษาการเชื่อมโยงทั้งจีโนม จำนวน 3 ยีน ในข้าวที่ได้รับภาวะเค็ม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นข้อมูลการตอบสนองทางสรีรวิทยาในด้านการสะสมโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยเมื่ออยู่ในภาวะเครียดจากความเค็ม
2. ยีนที่ได้จากการศึกษาการเชื่อมโยงทั้งจีโนมอาจเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับความทนต่อความเค็มของข้าว และสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้สามารถทนต่อภาวะเค็มได้ในอนาคต



บทที่ 2 ตรวจเอกสาร

1. ข้าวและข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชอาหารที่มีการปลูกมากเป็นอันดับสองรองจากข้าวโพด ผู้คนส่วนใหญ่ในทวีปเอเชียนิยมบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก โดยเฉพาะในประเทศไทยที่ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเป็นอันดับหนึ่ง โดยมีการส่งออกข้าวมากเป็นอันดับที่ 6 ของโลก (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2560) พื้นที่กว่าร้อยละ 57 ของพื้นที่ทั้งหมดในประเทศไทยนั้นถูกใช้เป็นพื้นที่ในการปลูกข้าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ชาญพิทยา ฉิมพาลี, 2556)

ประเทศไทยเป็นแหล่งทรัพยากรพันธุ์ข้าวที่สำคัญ โดยเฉพาะพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยที่นับเป็นแหล่งพันธุกรรมที่ดี และมีความหลากหลายด้านพันธุกรรม (genetic diversity) สูง ข้าวพื้นเมืองของไทยได้มีการพัฒนามาอย่างยาวนานจนกระทั่งมีการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศ เมื่อมีพันธุ์ข้าวเฉพาะในแต่ละท้องถิ่น ความหลากหลายของพันธุ์ข้าวก็เริ่มเกิดขึ้น นอกจากนี้ข้าวแต่ละพันธุ์ยังมีคุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะ ดังนั้นลักษณะดีบางอย่างในพันธุ์ข้าวพื้นเมืองจึงเป็นฐานพันธุกรรมที่มีประโยชน์อย่างยิ่งและเหมาะที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะตามต้องการในอนาคต นอกจากนี้ยังมีข้าวไทยปรับปรุงพันธุ์ เช่น พันธุ์ กข6 กข10 กข51 เป็นต้น ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ให้มีผลผลิตเพิ่มขึ้นและทนต่อสภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงปัจจุบัน เพื่อช่วยลดต้นทุนในการผลิตและเพิ่มความสามารถในการแข่งขันของข้าวไทยในตลาดโลก เมื่อแบ่งตามชนิดของการปลูก สามารถแบ่งข้าวได้เป็น 5 ประเภท (กองวิจัยและพัฒนาข้าว, 2559) ได้แก่

1.1 ข้าวนาสวน (lowland rice)

เป็นข้าวที่ปลูกในนาที่มีน้ำขัง หรือกักเก็บน้ำได้ที่ความลึกไม่เกิน 50 เซนติเมตร ปลูกได้ทั้งปักดำ หรือหว่านเมล็ด ข้าวนาสวนแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ ข้าวนาสวนน่าน้ำฝน (rainfed lowland rice) และข้าวนาสวนนาชลประทาน (irrigated lowland rice) ข้าวนาสวนนิยมปลูกกันมากแทบทุกภาคในประเทศไทย โดยคิดเป็นพื้นที่ประมาณร้อยละ 80 ของพื้นที่เพาะปลูกในประเทศ

1.2 ข้าวขึ้นน้ำ (floating rice)

เป็นข้าวที่ปลูกในนาที่มีน้ำท่วมขังในระดับความลึกประมาณ 1-5 เมตร นานเป็นเวลา 1 เดือนขึ้นไป พื้นที่ปลูกเหล่านี้เป็นพื้นที่ที่ไม่สามารถรักษาระดับน้ำได้ มักปลูกโดยวิธีการหว่านเมล็ด ข้าวชนิดนี้จะมีลักษณะพิเศษ โดยจะมีปล้องที่ยืดยาวเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่มีน้ำท่วมขัง (internode elongation ability) และมีการแตกแขนงของรากบนผิวดิน (upper nodal tillering and rooting ability) นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการอยู่รอดในขณะที่ยังจมใต้น้ำ (submerge

tolerance ability) เมื่อถึงระยะออกรวง ข้าวขึ้นน้ำจะสามารถชูรวงให้อยู่เหนือระดับน้ำได้ (kneeing ability) ข้าวขึ้นน้ำมักพบในแถบจังหวัดพระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี ลพบุรี พิจิตร อ่างทอง ชัยนาท และสิงห์บุรี

1.3 ข้าวน้ำลึก (deepwater rice)

ข้าวที่ปลูกในพื้นที่น้ำลึก ระดับน้ำในนามากกว่า 50 เซนติเมตร แต่ไม่เกิน 100 เซนติเมตร และน้ำท่วมขังในแปลงนานอย่างน้อย 1 เดือน ลักษณะประจำพันธุ์ที่สำคัญของข้าวชนิดนี้คือ ความสามารถทนน้ำท่วมหรือจมอยู่ใต้น้ำได้อย่างน้อย 7-10 วัน หลังจากน้ำลดแล้วสามารถฟื้นตัวได้ดี พัฒนาการเจริญเติบโตจนถึงเก็บเกี่ยวได้ตามปกติ

1.4 ข้าวไร่ (upland rice)

เป็นข้าวที่ปลูกในที่ราบ ที่ลาดชัน หรือบริเวณไหล่เขาที่ไม่มีน้ำท่วมขัง และไม่มีการทำคันนาเพื่อกักเก็บน้ำ ดังนั้นจึงต้องอาศัยน้ำฝน และน้ำค้างเป็นหลัก นิยมปลูกกันมากในบริเวณพื้นที่ไหล่เขาทางภาคเหนือ ภาคใต้ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย คิดเป็นเนื้อที่เพาะปลูกประมาณร้อยละ 10 ของพื้นที่เพาะปลูกในประเทศ ข้าวไร่จะมีอายุเก็บเกี่ยวที่สั้น แตกกอน้อย มักมีรากลึก และมีขนาดใหญ่

1.5 ข้าวนาที่สูง (highland rice)

เป็นข้าวที่ปลูกในนาที่มีน้ำขังบนที่สูงตั้งแต่ 700 เมตรเหนือระดับน้ำทะเลขึ้นไป มีวิธีการปลูกได้ 2 แบบ คือ นาดำ (transplanting) และนาหว่าน (direct seeding) พันธุ์ข้าวนาที่สูงจะมีความสามารถในการทนทานอากาศหนาวเย็นได้ดี

2. ดินเค็มและปัญหาดินเค็ม

ดินเค็ม (saline soil) คือดินที่มีเกลือละลายอยู่ในปริมาณมากจนส่งผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของพืช พิจารณาจากค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายดิน (electrical conductivity, EC) เนื่องจากเกลือในดินสามารถแตกตัวให้อิออนบวกและลบที่ส่งผลให้ค่า EC ของดินสูงขึ้น ดินเค็มจะมีค่า EC มากกว่า 4 เดซิซีเมนต่อเมตร (dS/m) เกลือที่พบในดินเค็ม ได้แก่ เกลือคลอไรด์และซัลเฟตของโซเดียม แคลเซียม และแมกนีเซียม โดยส่วนมากจะพบเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เนื่องจากเป็นเกลือที่ละลายน้ำได้ง่ายจึงสามารถแพร่กระจายและทำให้เกิดดินเค็มได้ในหลายพื้นที่ (Munns และ Tester, 2008)

ปัญหาดินเค็มเกิดขึ้นได้ทั่วไป ในพื้นที่แห้งแล้ง (arid or semiarid) ที่มีปริมาณฝนตกไม่เพียงพอที่จะสามารถชะล้างเกลือออกจากดินได้ รวมทั้งอัตราการระเหยน้ำออกจากดินที่สูงกว่าอัตราของฝนที่ตกลงมากก็เป็นอีกสาเหตุของดินเค็ม นอกจากนี้ พื้นที่ชุ่มชื้นมีฝนมาก (humid region) จะมีการ

ชะเกลือที่ผิวดินเมื่อฝนตกและเกลือจะกลับมาอยู่ในดินชั้นบนเมื่อฝนแล้งก็ส่งผลให้เกิดดินเค็ม เช่นเดียวกัน เกลือในดินนั้นมีที่มาจากหลายแหล่ง ได้แก่ เกลือจากทะเล (marine source) เกลือจากหินแร่ (lithogenic source) และเกลือที่มาจากกิจกรรมของมนุษย์ (anthropogenic source) เมื่อเกลือเกิดการแพร่กระจายและสะสมที่ผิวดิน จะส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชที่ปลูกในบริเวณนั้น พื้นที่ดินเค็มในประเทศไทยพบได้ในภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และพื้นที่ชายทะเล ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ดินเค็มกว่า 1 ใน 3 ของพื้นที่ทั้งภาค คิดเป็นพื้นที่ 17.8 ล้านไร่ โดยมักเกิดปัญหาดินเค็มในบริเวณนาข้าวที่เป็นที่ลุ่มและมีน้ำขังในฤดูฝน เนื่องจากเมื่อถึงฤดูแล้งเกลือที่ถูกชะลงไปใต้ผิวดินจะกลับมาอยู่ที่ดินชั้นบนจนสามารถสังเกตเห็นคราบเกลือบนผิวดินเป็นหย่อม นอกจากนี้ยังมีพื้นที่มีศักยภาพในการแพร่เกลืออีก 19.4 ล้านไร่ ที่ส่งผลให้เกิดดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเช่นเดียวกัน (อรุณี ยูวะนิยม, 2546)

3. การตอบสนองทางสรีรวิทยาของพืชต่อความเครียดจากความเค็ม

ดินเค็มเป็นอุปสรรคสำคัญในการปลูกข้าว ในภาวะที่สารละลายดินมีความเข้มข้นของเกลือสูง จะส่งผลให้ความดันออสโมติกสูงและเริ่มมีผลกระทบต่อส่วนรากเป็นอันดับแรก รากจะไม่สามารถนำน้ำเข้าสู่เซลล์ได้ ทำให้การเติบโตของพืชไม่เป็นไปตามปกติ ในพืชแต่ละชนิดมีการจัดการต่อผลกระทบจากเกลือในดินได้แตกต่างกัน พืชทนเค็ม คือพืชที่สามารถเจริญจนครบวงจรชีวิตในดินที่มีความเค็มได้ พืชทนเค็มบางชนิดมีกลไกในการขจัดเอาโซเดียมไอออนออกจากเซลล์ หรือนำไอออนที่เป็นพิษไปเก็บในออร์แกเนลล์ เช่น แวกิวโอล เพื่อไม่ให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ บางชนิดมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่สามารถทนต่อภาวะที่มีโซเดียมไอออนในเซลล์สูง และทำให้พืชสามารถเจริญได้ตามปกติ บางชนิดมีอวัยวะพิเศษที่ช่วยขับเกลือออกทางส่วนใบที่เรียกว่า salt gland ในขณะที่บางชนิดมีการควบคุมการคายน้ำผ่านการควบคุมเซลล์คุมบริเวณปากใบในขณะที่พืชเจริญอยู่ในดินเค็ม (Jouyban, 2012)

พืชที่ได้รับเกลือในปริมาณมากเกินไป หรือไม่มีกลไกในการจัดการไอออนปริมาณมากในเซลล์ จะได้รับผลกระทบจากภาวะเครียดต่อความเค็ม ทำให้การงอกและการเจริญเติบโตของพืชลดลง จนอาจตายไปในที่สุด ผลกระทบที่เกิดขึ้นในพืชมีสาเหตุดังนี้

3.1 ภาวะเครียดออสโมติก (osmotic stress)

เนื่องจากความเข้มข้นของเกลือในดินทำให้สารละลายในดินมีแรงดันออสโมติกสูงกว่า สารละลายในต้นพืช รากพืชจึงไม่สามารถดูดน้ำในดินได้เนื่องจากการเคลื่อนที่ของน้ำจะเคลื่อนที่จากบริเวณที่มี water potential ต่ำไปยังบริเวณที่มี water potential สูง ดังนั้นการงอกและการเจริญเติบโตของพืชจึงไม่เป็นปกติ ภาวะเครียดออสโมติกจะเกิดขึ้นเป็นอันดับแรกเมื่อพืชได้รับภาวะเค็มในระดับหนึ่ง และส่งผลกระทบต่ออัตราการเจริญของส่วนใบได้ทันที โดยลดอัตราการแผ่ของใบอ่อนและการเปิดปิดของปากใบที่เจริญแล้ว

3.2 ภาวะเครียดจากไอออน (ionic stress)

ภาวะเครียดจากไอออนจะเกิดขึ้นช้ากว่าภาวะเครียดออสโมติก ในสภาวะที่เกลือมีความเข้มข้นสูงมาก หรือพืชไม่มีความทนต่อความเค็ม ไอออนที่ถูกดูดเข้าไปสะสมในเซลล์พืชจนมีความเข้มข้นสูงมากเกินไป โดยเฉพาะโซเดียมไอออนจะส่งผลกระทบต่อมากในส่วนใบของพืช เริ่มจากใบแก่จะมีอาการไหม้ตั้งแต่บริเวณขอบใบ และค่อยๆ ตายไปในที่สุด เมื่ออัตราการตายของใบแก่สูงกว่าอัตราการสร้างใบใหม่ ความสามารถในการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชจึงลดลง ทำให้พืชไม่สามารถสร้างคาร์โบไฮเดรตเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตได้ เป็นผลให้อัตราการเจริญเติบโตของพืชลดลงในที่สุด (Munns และ Tester, 2008)

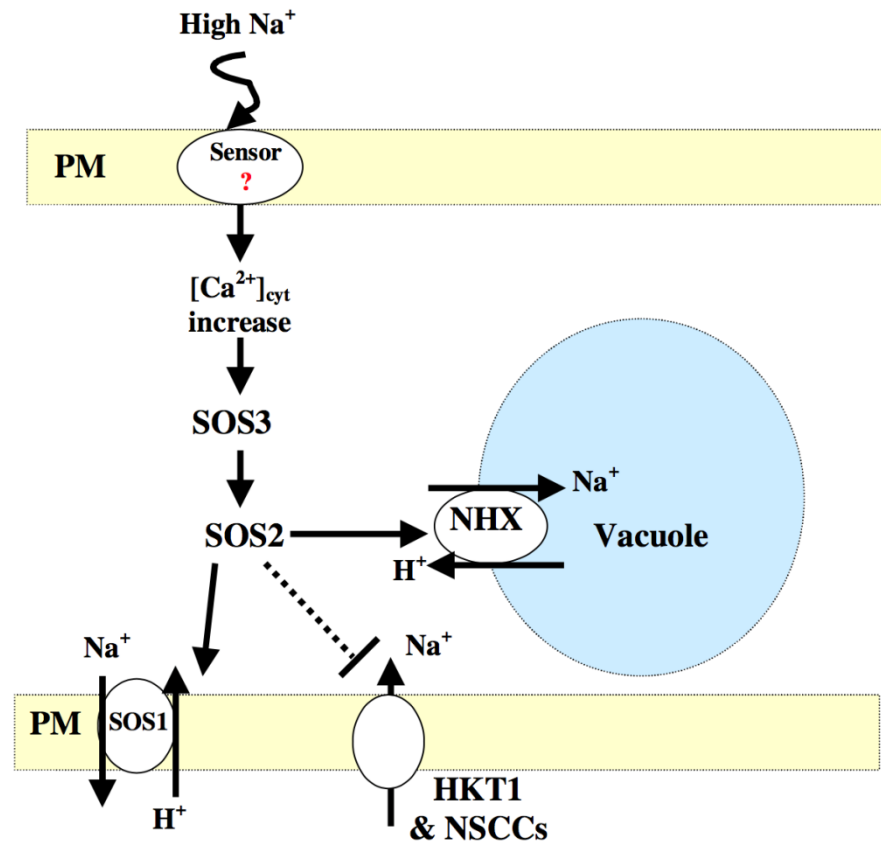
นอกจากนี้ภาวะเครียดจากความเค็ม โดยเฉพาะความเครียดออสโมติกจะกระตุ้นการสร้างกรดแอบไซซิก (ABA) ซึ่งเป็นตัวส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตภายในเซลล์ ABA ที่ถูกสร้างขึ้นจะถูกส่งไปยังเซลล์คุมและทำให้ปากใบปิด การปิดของปากใบจะส่งผลให้การสังเคราะห์ด้วยแสงลดลง และก่อให้เกิดภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ตามมา

4. โซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในพืช

ผลกระทบจากความเค็มในดินส่วนใหญ่มักมีสาเหตุจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ประกอบด้วยโซเดียมไอออน (Na^+) และคลอไรด์ไอออน (Cl^-) โดยปกติพืชจะใช้ประโยชน์จากโซเดียมไอออนในการช่วยรักษาความเต่งของเซลล์ขณะเจริญอยู่ในภาวะที่แห้งแล้ง แต่หากสะสมในปริมาณมากเกินไป โซเดียมไอออนจะเป็นไอออนหลักที่เป็นอันตรายต่อพืชส่วนใหญ่และสามารถเกิดการสะสมจนถึงจุดที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ได้เร็วกว่าคลอไรด์ไอออน ความเสียหายจากโซเดียมไอออนเกิดจากปริมาณไอออนที่สะสมในเนื้อเยื่อใบที่มากเกินไปจนกระทั่งส่งผลให้เกิดกระบวนการตาย (necrosis) ตั้งแต่ปลาย และขอบของใบแก่ เมื่อส่วนใบของพืชไม่สามารถสร้างอาหารได้ตามปกติ การเจริญและผลผลิตของพืชจะลดลงตามลำดับ ความเค็มนั้นสามารถก่อให้เกิดทั้งความเครียดจากไอออน (ionic stress) และความเครียดออสโมติก (osmotic stress) (Tester และ Davenport, 2003) ในขณะที่โพแทสเซียมไอออนเป็นไอออนบวกที่มีความสำคัญต่อพืช โดยเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นและมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์กว่า 50 ชนิด ดังนั้นพืชจึงต้องรักษาระดับของโพแทสเซียมไอออนในเซลล์ไว้ประมาณ 100-200 มิลลิโมลาร์เพื่อให้เพียงพอต่อการทำงานของเซลล์ ดังนั้นจึงพบ K^+ -transporter อยู่มากมาย แต่เมื่อพืชเจริญอยู่ในภาวะเค็ม โซเดียมไอออนจะแย่งโพแทสเซียมไอออนในการจับกับ transporter เพื่อเข้าสู่เซลล์ เนื่องจากลักษณะโครงสร้างอะตอมของธาตุทั้งสองชนิดนี้มีความคล้ายกัน จนเมื่อระดับของโซเดียมไอออนในไซโทซอลสูงขึ้น จะไปแย่งโพแทสเซียมไอออนในการจับกับบริเวณ active site ของเอนไซม์ ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเมแทบอลิซึมในเซลล์ นอกจากนี้โซเดียมไอออนที่มีความเข้มข้นสูงยังสามารถไปแทนที่แคลเซียมไอออนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ permeability ของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนไปจนโพแทสเซียมไอออนรั่วไหลออกจากเซลล์ได้ เมื่อเกิดความไม่สมดุลของโซเดียมและโพแทสเซียมในไซโทซอล สมดุลการทำงานของเอนไซม์ในเซลล์ก็จะเปลี่ยนไปเช่นเดียวกัน ผลกระทบเหล่านี้อาจชักนำให้เกิดความเครียดทุติยภูมิ เช่น ความเครียดจากการเกิดออกซิเดชัน ไปจนถึงขั้นยับยั้งการเจริญเติบโต และทำให้พืชตายได้ในที่สุด (Kader, 2006)

โดยปกติโซเดียมไอออนในสารละลายดินจะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่เซลล์ทางส่วนรากแบบไม่ใช้พลังงาน และผ่านเข้าสู่เซลล์อื่น ๆ ทาง apoplast และ symplast จากนั้นโซเดียมไอออนที่มีปริมาณมากเกินไปจะถูกส่งผ่านทางไซเล็มจนไปสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อส่วนใบในที่สุด พืชที่เกิดขึ้นมักจะส่งผลโดยตรงที่ส่วนใบ โซเดียมไอออนที่ถูกส่งขึ้นมาจะยังคงสะสมอยู่ในใบเรื่อยๆ เนื่องจากการส่งไอออนกลับไปยังรากนั้นสามารถทำได้ในปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณไอออนที่ส่งจากรากขึ้นมาไปยังใบ (Munns และ Tester, 2008)

มีการศึกษาเกี่ยวกับ transporter ที่นำโซเดียมไอออนเข้าสู่เซลล์พืช พบว่าในพืชส่วนใหญ่โซเดียมไอออนจะเคลื่อนที่แบบไม่ใช้พลังงานผ่านทาง non-selective cation channels (NSCCs) และยังพบว่าโซเดียมไอออนยังผ่านเข้าสู่เซลล์พืชบางชนิดโดยอาศัย high-affinity potassium transporters (HKTs) อีกด้วย โดยพบ 9 homologue ของ HKT (OsHKT1-9) ในข้าว โดยโปรตีนเหล่านี้ทำหน้าที่ในการขนส่งไอออนในบริเวณและเนื้อเยื่อต่างๆ กัน ในเซลล์ หลังจากที่โซเดียมไอออนเข้าสู่เซลล์ได้แล้ว เซลล์จะมีการรับรู้และส่งสัญญาณผ่าน Salt-Overly-Sensitive (SOS) pathway เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการนำโซเดียมไอออนเข้าสู่เซลล์ให้ลดลง และขับเอาโซเดียมไอออนไปเก็บในแวคิวโอลเพื่อลดปริมาณในไซโทซอล ให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ SOS1 เป็น Na^+/H^+ antiporter ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ ทำหน้าที่กำจัดโซเดียมไอออนออกจากเซลล์เมื่ออยู่ในภาวะเค็ม มักพบอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณปลายราก ในขณะที่ SOS2 และ SOS3 เป็น complex ที่มีหน้าที่ส่งสัญญาณต่อไปยัง SOS1 บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และ Na^+/H^+ antiporter (NHX) บริเวณเยื่อหุ้มแวคิวโอล (tonoplast) พร้อมกับลดหรือระงับการทำงานของ NSCCs และ HKTs บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อลดการนำ โซเดียมไอออนเข้าสู่เซลล์ Kader (2006) พบว่ากลไกสำคัญในการรักษาระดับโซเดียมไอออนให้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของข้าวพันธุ์ Pokkali ที่เป็นพันธุ์ทนเค็ม คือการนำไปเก็บในแวคิวโอลเป็นหลักเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ BRRI Dhan29 ที่เป็นพันธุ์ไม่ทนเค็ม จะมีกลไกเหล่านี้น้อยกว่าพันธุ์ Pokkali



ภาพที่ 1 แผนภาพแสดงการทำงานของ SOS signaling pathway ในการควบคุมปริมาณโซเดียมไอออนในเซลล์พืชที่อยู่ในภาวะเครียดจากความเค็ม

5. การศึกษาการเชื่อมโยงทั้งจีโนม (genome-wide association study)

ลักษณะการทนเค็มเป็นพีนไทป์ที่มีการควบคุมด้วยยีนหลายยีน (polygenic traits) ที่ผ่านมานักวิจัยนิยมใช้เทคนิค Quantitative Trait Loci (QTL) mapping ในการค้นหาตำแหน่งของยีนบนโครโมโซมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทนเค็มในพืช โดยมีการผสมแบบ bi-parental population มาใช้ในการทำแผนที่ยีน ซึ่ง QTL ที่ได้มาจะจำเพาะกับประชากรที่นำมาใช้ในการผสมเท่านั้น นอกจากนี้ตำแหน่งของยีนยังระบุได้อย่างคร่าว ๆ โดยไม่ได้ระบุอย่างละเอียดถึงในระดับนิวคลีโอไทด์ (Resende และคณะ, 2014)

ปัจจุบันเทคโนโลยีการหาลำดับเบสอย่าง next generation sequencing (NGS) ได้ถูกพัฒนาขึ้น ทำให้เราสามารถหาความแปรผันทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น นักวิจัยได้มีการนำ Single Nucleotide Polymorphism (SNP) ที่เป็นความแปรผันทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตที่เกิดตามธรรมชาติจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เบสเพียงหนึ่งตำแหน่ง ณ ตำแหน่งเดียวกันในโครโมโซมมาใช้ โดยการเปลี่ยนแปลงเพียงหนึ่งตำแหน่งนี้อาจส่งผลต่อการทำงานของยีน หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของโปรตีนได้ ผลการเปลี่ยนแปลงจะเกิดมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับตำแหน่งของสปีส์บนโครโมโซม (กนกวรรณ จารุกัจฉ และ วรัญญา จตุ

พรประเสริฐ, 2550) ปัจจุบันสถิติมีการนำมาใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมในการค้นหาตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่สนใจ จนกระทั่งเกิดการศึกษากการเชื่อมโยงทั้งจีโนม (GWAS) ขึ้น โดยเป็นเทคนิคทางสถิติที่ใช้ในการหาตำแหน่งบนจีโนมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะฟีโนไทป์ที่สำคัญในสิ่งมีชีวิต มีข้อดีคือไม่ต้องสร้างลูกผสม และข้อมูลจีโนมที่ได้มาจะสามารถนำไปใช้ในการหาตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับฟีโนไทป์อื่นในกลุ่มสิ่งมีชีวิตอื่นที่ใช้ศึกษาได้อีก นอกจากนี้เทคนิคนี้ยังช่วยให้หาตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับฟีโนไทป์ที่ควบคุมด้วยยีนหลายยีนได้ง่ายขึ้นโดยเฉพาะลักษณะการทนเค็มในพืช (Fan และคณะ, 2016; Zeng และคณะ, 2017)

หลักการของการศึกษากการเชื่อมโยงทั้งจีโนมนั้นเป็นการวิเคราะห์ว่าสถิติที่เกิดขึ้นนั้นเกี่ยวข้องกับการเกิดฟีโนไทป์ที่สนใจหรือไม่ โดยอาศัยการคำนวณทางสถิติเพื่อหาว่าจีโนไทป์และฟีโนไทป์มีความสัมพันธ์กันอย่างไรบ้างหรือไม่ ซึ่งมีหลายโปรแกรมที่ช่วยคำนวณค่าทางสถิติ อาทิ เช่น โปรแกรม GEMMA (Zhou และ Stephens, 2012) เป็นโปรแกรมที่ใช้คำนวณหาความสัมพันธ์นี้มีหลักการสำคัญคือการทดสอบสมมติฐานด้วยวิธีทางสถิติต่าง ๆ เช่น Wald, Likelihood ratio หรือ score เป็นต้น โดย H_0 คือ สถิติไม่มีผลต่อฟีโนไทป์ จากการทดสอบทางสถิติจะทำให้ได้ค่า p-value ที่จะนำมาใช้ในการตัดสินใจว่าสถิติที่ทดสอบนั้นมีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์หรือไม่ โดยกำหนดค่า p-value cutoff สำหรับสถิติทั้งหมดที่นำมาทดสอบขึ้นจากการคำนวณด้วย multiple testing correction ซึ่งประกอบด้วย 4 วิธี ได้แก่ (1) Bonferroni correction (2) Bonferroni step-down (Holm) correction (3) Westfall and young permutation และ (4) Benjamini & Hochberg False Discovery Rate เรียงตามลำดับความ stringent จากมากไปน้อย เพื่อให้ได้สถิติที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับฟีโนไทป์จริง ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ Bonferroni correction ในการคำนวณค่า p-value cutoff ด้วยการนำค่า significant level (0.05)หารด้วยจำนวนสถิติทั้งหมดที่นำมาทดสอบ ดังนั้นสถิติที่มีค่า p-value ต่ำกว่าค่า cutoff จะถือว่าเป็นสถิติที่มีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคการศึกษากการเชื่อมโยงทั้งจีโนมไปใช้ประโยชน์ในหลายสาขาวิชา โดยเริ่มแรกนิยมใช้ศึกษาในทางการแพทย์ หลังจากโครงการศึกษาจีโนมของมนุษย์เสร็จสิ้น ก็มีการค้นพบสถิติเป็นจำนวนมากในจีโนมของมนุษย์ จึงได้มีการใช้เทคนิคการเชื่อมโยงทั้งจีโนมเพื่อหา candidate gene บนจีโนมของมนุษย์ที่เกี่ยวข้องกับอาการของโรคต่าง ๆ เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer disease) (Chauhan และคณะ, 2015) โรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary heart disease) (Hoed และคณะ, 2015) โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) (Ray-Jones และคณะ, 2016) โรคหอบหืด (asthma) (Moffatt และคณะ, 2007) และโรคจิตเภท (Schizophrenia) (Valiente และคณะ, 2011) เป็นต้น นอกจากการศึกษาในมนุษย์แล้ว เทคนิค GWAS ยังถูกนำไปใช้ในการศึกษาหา candidate gene ในพืชอีกด้วย ซึ่งพบการศึกษาในพืชหลายชนิด เช่น *Arabidopsis thaliana* L., ข้าวโพด (*Zea mays* L.), ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill), ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* L.), และ ข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) (Ogura และ Busch, 2015) รวมทั้งข้าว (*Oryza sativa* L.) ก็เป็นพืชที่มีการศึกษาเช่นกัน (Kumar และคณะ, 2015; Al-Tamimi และคณะ, 2016) การศึกษาการตอบสนองของพืชที่แตกต่างกันต่อทริทเมนต์ เช่น ภาวะเครียดทางกายภาพและชีวภาพ ก็ช่วยให้สามารถค้นหายีนที่อยู่บริเวณใกล้เคียงกับ loci ที่ควบคุมลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อ

ภาวะเครียดได้ (Han และ Huang, 2013) โดยมีงานวิจัยที่ได้ใช้เทคนิคการศึกษาการเชื่อมโยงทั้งจีโนมเพื่อหาตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อโอโซนในข้าว 328 พันธุ์ ผลการศึกษาพบ candidate gene ทั้งหมด 195 ยีน โดยพบยีน *RING* และ *EREBP* ที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ และการตอบสนองต่อภาวะเครียด (Ueda และคณะ, 2014) สำหรับการหา ยีนที่ควบคุมลักษณะทนเค็มนั้นก็มีการใช้เทคนิคนี้เช่นกัน โดย Kumar และคณะ ได้หาความสัมพันธ์ของสนิปส์ในข้าว 220 พันธุ์ กับลักษณะทางสรีรวิทยาของข้าวในระยะออกดอกที่อยู่ในภาวะควบคุม และภาวะเค็มจำนวน 12 ลักษณะ และจากผลการศึกษาพบ 44 ยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะผลผลิตทางการเกษตร และ 20 ยีนที่เกี่ยวข้องกับค่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออน และ 1 ใน 20 ยีนนั้นคือยีน *Saltol* บนโครโมโซมที่ 1 ซึ่งเป็นยีนที่มีรายงานมากมายที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อภาวะเค็มของข้าวในระยะกล้า (Kumar และคณะ, 2015)



บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง

1. พืชทดลอง

1.1 พืชทดลองที่ใช้ในการศึกษาปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในข้าว

ในการศึกษานี้ใช้ข้าวพื้นเมืองไทยและข้าวปรับปรุงพันธุ์จำนวน 78 พันธุ์/สายพันธุ์ และใช้พันธุ์มาตรฐานทนเค็ม (Pokkali) และพันธุ์มาตรฐานไม่ทนเค็ม (IR29) รวมเป็นทั้งหมด 80 พันธุ์/สายพันธุ์ ในการเปรียบเทียบ ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติ ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว หมายเลขพันธุ์ข้าวที่ใช้ทดลองแสดงในตารางที่ 1

1.2 พืชทดลองที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน

ใช้ข้าวในการศึกษาทั้งหมด 4 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพื้นเมืองไทย 2 พันธุ์ที่มีค่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมต่ำที่สุดและสูงที่สุดจากการศึกษาปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออน และข้าวพื้นเมืองไทย 1 พันธุ์ที่แสดงค่าการเจริญเติบโตได้ดีจากผลการศึกษาค่าการเจริญของนพคุณ คุณผลวัฒนา (2558) โดยใช้พันธุ์มาตรฐานทนเค็ม (Pokkali) ในการเปรียบเทียบ

2. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ทำการทดลองในการศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาของพืช

2.1 วัสดุอุปกรณ์ในการปลูกพืช

- ดินร่วนปนทรายจากพื้นที่ศูนย์วิจัยข้าวนครราชสีมา กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว
- กระถางปลูกพลาสติกสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว
- กระบะพลาสติกขนาด กว้าง×ยาว×สูง เท่ากับ 40×54×14 เซนติเมตร
- ตะกร้าพลาสติกขนาด กว้าง×ยาว×สูง เท่ากับ 27×37×13 เซนติเมตร
- สายยาง
- ถังน้ำพลาสติก
- เครื่องวัดการนำไฟฟ้า (digital conductivity meter) (SevenCompact™ Conductivity S230, Mettler Toledo, Switzerland)

2.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้วัดปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออน

- ตู้อบตัวอย่าง (hot air oven) (FED240, BINDER, USA)

- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่งของหน่วยกรัม (ML204/01, Mettler Toledo, Switzerland)
- เตาเผาความร้อนสูง (muffle furnace)
- เตาให้ความร้อน (hot plate)
- ตู้ดูดควัน (fume hood)
- เบ้าเคลือบและฝา (porcelain crucible)
- ปากคืบ
- ปีกเกอร์
- plastuer pipette
- ปิเปตต์แก้วขนาด 1 มิลลิลิตร
- หลอดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 16x100 มิลลิเมตร (ปริมาตร 15 มิลลิลิตร)
- inductively couple plasma-optical emission spectrometer (ICP-OES)
- กระบอกฉีดยา
- ฟิลเตอร์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร

3. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ทำการทดลองในการศึกษาการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับการถอดรหัส

3.1 วัสดุอุปกรณ์ในการปลูกพืช

- ดินร่วนปนทรายจากพื้นที่ศูนย์วิจัยข้าวนครราชสีมา กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว
- กระถางปลูกพลาสติกสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว
- กระบะพลาสติกขนาด กว้าง×ยาว×สูง เท่ากับ 40×54×14 เซนติเมตร
- ตะกร้าพลาสติกขนาด กว้าง×ยาว×สูง เท่ากับ 27×37×13 เซนติเมตร
- ถาดหลุมสำหรับปลูกขนาด กว้าง×ยาว×สูง เท่ากับ
- ฟองน้ำสำหรับปลูก
- สายยาง และถังน้ำพลาสติก
- เครื่องวัดการนำไฟฟ้า (digital conductivity meter) (SevenCompact™ Conductivity S230, Mettler Toledo, Switzerland)

3.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ

- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่างอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (deep freezer)
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่างอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Freezer)
- เครื่องวัด pH

- เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (Nanodrop, Thermo Scientific, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge, Universal 2R, Hettich, Germany)
- microcentrifuge tube
- ไมโครปิเปตต์ (Gilson, France)
- pipette tips ขนาด 10 100 และ 1000 ไมโครลิตร
- เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixture)
- อะลูมิเนียมฟอยล์
- โกร่งบด
- ซ้อนตักสาร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- กระติกใส่ไนโตรเจนเหลว
- กระบอกใส่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเอทิลแอลกอฮอล์
- ถุงมือ
- หน้ากากอนามัย
- นาฬิกาจับเวลา

3.3 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในอิเล็กโตรโฟรีซิส

- gel electrophoresis system (MiniRun GE-100, Hangzhou BIOER Technology Co., Ltd., China)
- Gel Doc™ 2000 และ UV trans illuminator (Bio-Rad, USA)
- เต้าอบไมโครเวฟ

3.4 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ใน real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

- iCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่างอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (deep freeze)
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่างอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (freeze)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge, Universal 32R, Hettich, Germany)
- microcentrifuge tube
- ไมโครปิเปต (Gilson, France)
- เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixture)

4. สารเคมีที่ใช้ทำการทดลอง

4.1 สารเคมีที่ใช้ในการปลูกพืช

- สารละลายธาตุอาหารสูตร WP (ภาคผนวก ข)
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Srichand United Dispensary Co., Ltd., New Zealand)

4.2 สารเคมีที่ใช้ในการวัดปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออน

- น้ำบริสุทธิ์สูง (Milli-Q water)
- กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl)

4.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ

- ไนโตรเจนเหลว
- RNA extraction buffer (การเตรียมตั้งภาคผนวก ข)
- phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) (v/v) (การเตรียมตั้งภาคผนวก ข)
- absolute ethanol (Liquid Distillery Organization Excise Dept., Thailand)
- diethyl pyrocarbonate (DEPC) (Sigma-Aldrich Co., USA)
- DEPC-treated Water (การเตรียมตั้งภาคผนวก ข)
- chloroform (Merck, Germany)
- sodium acetate (CH_3COONa) (Sigma-Aldrich Co., USA)
- 2-Mercaptoethanol (Merck, Germany)
- ethyl alcohol (C_2H_6O) (Merck, Germany)
- Tris pH 8.0
- ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
- 0.5% Sodium dodecyl sulfate (SDS)
- 0.1 M NaCl
- isopropanol
- DNase I, RNase-free (Thermo Scientific™, USA)
- iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, USA)

4.4 สารเคมีที่ใช้ในอิเล็กโทรโฟรีซิส

- agarose (Research Organics, USA)
- 5X TBE buffer (Tris Borate EDTA) (การเตรียมดั่งภาคผนวก ข)
- RedSafe nucleic acid staining solution (Chembio, UK)
- DNA/RNA loading dye (การเตรียมดั่งภาคผนวก ข)

4.5 สารเคมีที่ใช้ใน real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

- QPCR Green Master Mix LRox, 2x (Biotechrabbit, Germany)
- DEPC-treated water (การเตรียมดั่งภาคผนวก ข)

5. โปรแกรมที่ใช้ในการศึกษา

- ICP Expert (Agilent, USA)
- SPSS version 22.0 (IBM, USA)
- JMP version 20 (SAS corporate, USA)
- EIGENSOFT version 5.0.2 (Patterson และคณะ, 2006; Price และคณะ, 2006)
- Integrative Genomics Viewer (IGV2.3.10)
(<http://www.broadinstitute.org/igv>)
- MSU genome rice database (<http://rice.plantbiology.msu.edu>)
- QTL annotation rice online database (<http://qtaro.abr.affrc.go.jp>)
- Nanodrop 2000/2000c (Thermo Scientific, USA)
- CFX Manager™ (Bio-Rad, USA)
- GEMMA (Zoubarov และคณะ, 2012)

6. การศึกษาผลของความเค็มในดินที่มีต่อปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในระยะกล้าของข้าวพื้นเมืองไทย

6.1 วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) จำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น เพื่อเปรียบเทียบปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในข้าวไทยและข้าวพันธุ์ปรับปรุงจำนวน 78 พันธุ์/สายพันธุ์ และพันธุ์มาตรฐานทนและไม่ทนเค็มจำนวน 2 พันธุ์ คือ Pokkali และ IR29 ตามลำดับ

6.2 เตรียมต้นกล้าข้าวโดยแช่เมล็ดในภาชนะที่เติมน้ำกลั่นเล็กน้อยเป็นเวลา 5 วัน จนต้นข้าวมีความสูงประมาณ 6-10 เซนติเมตร

6.3 ย้ายต้นข้าวลงในกระถางพลาสติกที่บรรจุดินหนัก 800 กรัม จนข้าวมีอายุ 2 สัปดาห์

6.4 แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดควบคุมที่ให้น้ำปกติ และชุดที่ได้รับภาวะเค็มโดยให้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 115 มิลลิโมลาร์ เพื่อให้ดินมีค่าการนำไฟฟ้าประมาณ 8-9 เดซิซีเมนต่อเมตร เก็บผลการทดลองโดยเก็บตัวอย่างส่วนต้นของข้าวทั้ง 2 ชุดการทดลองในวันที่ 6 และ 9 หลังได้รับภาวะเค็ม

6.5 นำตัวอย่างข้าวไปอบแห้งในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

6.6 หาปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในตัวอย่างใบข้าวด้วยวิธี dry ashing method (Momayezi และคณะ, 2012) โดยมีวิธีการดังนี้

6.6.1 ใช้ส่วนใบแห้งหนัก 0.01 กรัม เเผาในเตา muffle furnace ที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงจนเป็นเถ้า ย่อยเถ้าที่ได้โดยต้มในกรดไนตริกเข้มข้นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำกลับไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงอีกครั้ง จากนั้นละลายตัวอย่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วละลายด้วยน้ำบริสุทธิ์สูง (milli-Q) จนได้ปริมาตรของสารละลายทั้งหมด 10 มิลลิลิตร บรรจุตัวอย่างใส่ในหลอดพลาสติกที่สะอาดเพื่อเตรียมนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไอออน

6.6.2 วิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนด้วยเครื่อง Inductively Couple Plasma-Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) ณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำค่าปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนที่ได้มาคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างโซเดียมและโพแทสเซียมไอออน

6.6.3 วิเคราะห์ผลทางสถิติ ด้วยโปรแกรม SPSS โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณโซเดียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และอัตราส่วนโซเดียมและโพแทสเซียมไอออน ด้วยวิธี Analysis of Covariance (ANCOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 1 ลำดับและรายชื่อพันธุ์/สายพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับ	GS No.	ชื่อพันธุ์	ลำดับ	GS No.	ชื่อพันธุ์	ลำดับ	GS No.	ชื่อพันธุ์
6	6152	ขาวแก้ว	133	3023	น้ำสะกุง 19	175	7303	เหลืองนวล
21	23595	บือขอมมี	135	3031	บุญมา	177	13201	เกวียนหัก
22	574	พวงทอง	148	3770	ขาวเสมอ	179	9362	ขาวพวง

27	12160	ดอกข่า	150	3808	ชาวตาเจือ	180	9742	เจ้าปลีขาว
30	12560	ขาวคด	151	3810	ขาวแดงโม	182	12266	พวงนาค
31	12507	แจกัน	153	3999	กข17	183	12270	ชาวตาเจือ
40	19877	ชาวบ้านโกชน์	154	4000	กข19	185	14154	เหลืองโบลด
41	21695	ตาบาน	155	4490	กำเพ็อง	186	14155	เหลืองโบลด
44	21708	ขี้ตมขาว	156	4790	กข10	187	15833	น้ำสะกุก 19
48	22783	ขี้ตมพัน	157	4791	กข21	188	16235	หันตรา 60
51	22850	แดงนา	158	4793	กข25	189	162	ชุมแพ 60
53	23233	พวงหางนาค	159	5211	จำปาทอง	190	16240	สุพรรณบุรี 60
57	2042	ข้อมะกอก	160	5533	ชาวหลวง	192	20712	ชัยนาท1
60	12492	เจ้ารากแห้ง	161	5545	ตาเจือ	193	20864	พलयงมปราจีนบุรี
65	3241	ปลาเซ็ง	162	5551	เหลืองควายล้า	194	21240	เหนียวดำหลาย
68	5681	เหลืองประทิว	163	5625	ข้าวฮ้าว	197	21628	กข12
86	22379	นาขวัญ	164	5678	เศรษฐี	199	21964	เฉียงพัทลุง
98	23232	ขี้ตมกลาง	165	6230	ลอยหารวง	200	22492	สุน
101		Pokkali	166	6440	หลวงประทาน	201	22653	แก่นจันทร์
102		IR29	167	6442	คันทนา	202	23303	ลูกแดงปัตตานี
104	7282	ชาวหลวง	168	6448	เหลืองเตี้ย	204	23406	ปราจีนบุรี 1
105	3151	นางนวล	169	6810	เหลืองแก้ว	205	24533	กข31
107	4001	ชีวมัจฉ	170	7025	ลายหมาก	152	3979	เล็กนก
109	868	เหลืองประทิว 123	171	7125	กข27	198	21963	ลูกแดงปัตตานี
110	15101	สังข์หยด	172	7258	เหลืองควายล้า	181	9956	ช่อลูง
112	63	เหนียวสันป่าตอง	173	7288	สามรวง	208		UBN02123-50R-B-3
132	2963	พวงเงิน	174	7293	เหลืองปลาгим			

7. การหาความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่าง Na^+/K^+ กับค่าดัชนีเสถียรภาพ (Stability index)

หาความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างค่าปริมาณโซเดียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนกับค่าพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของข้าว และดัชนีเสถียรภาพ (Stability index: SI) ของพารามิเตอร์เหล่านี้ (Bienvenido, 1993) โดยคำนวณได้จากสูตร

$$Y_s/Y_p$$

เมื่อ Y_s คือ ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากค่าที่พืชเจริญเติบโตในภาวะเครียดจากความเค็ม

Y_p คือ ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากค่าที่พืชเจริญเติบโตในภาวะปกติ

โดยใช้ข้อมูลจาก นพคุณ คุณผลวัฒนา (2558) ได้แก่ น้ำหนักสดส่วนต้นและราก น้ำหนักแห้งส่วนต้นและราก ดัชนีความเสียหายจากความเค็ม (Salt Injury Score) และเสถียรภาพเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell Membrane Stability) ด้วยโปรแกรม JMP9 (SAS Corporate) จากนั้นสร้าง scatter plot ระหว่างพารามิเตอร์ที่มีความสัมพันธ์กัน พร้อมทั้งหาค่า correlation coefficient ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2010

8. การทำนายตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนเค็มของข้าวพันธุ์

พื้นเมืองไทยในระยะกล้า โดยใช้เทคนิค genome-wide association

8.1 Genotyping

ทำการศึกษาด้วยเทคนิค exome sequencing โดยสกัดดีเอ็นเอและสร้าง genomic library ของข้าวแต่ละพันธุ์ จากนั้นทำการ hybridize กับ capture probe ที่ออกแบบจาก 5 exon แรกของทุกยีนในจีโนมข้าว และจากโปรโมเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะเค็ม ชิ้นส่วน DNA ที่จับกับ probe จะนำมาหาลำดับเบสด้วยเครื่อง Illumina genome analyzer (งานวิจัยในส่วนนี้ดำเนินการตามความร่วมมือกับ UC Davis Genome Center, USA)

8.2 SNPs calling

8.2.1 นำ raw read ที่ได้จากการหาลำดับเบสมา align กับ reference genome ของข้าวจากฐานข้อมูล (MSU rice genome annotation project) ด้วย Burrows-Wheeler Aligner software (BWA version 0.7.10) (Li และ Durbin, 2009)

8.2.2 Call variants ของข้าวแต่ละพันธุ์โดยใช้ Genome Analysis Toolkit (GATK) (McKenna และคณะ, 2010) เพื่อรวบรวม SNPs ของประชากรข้าวที่ทำการศึกษา

8.2.3 คัดกรอง SNPs ที่ได้มาตามเงื่อนไขดังนี้

- สำหรับ homozygous SNP จะต้องมีการอ่านจีโนมไทป์นั้นอย่างน้อย 6 ครั้ง ถ้าพบว่าอย่างน้อย 10 พันธุ์เป็น homozygous SNPs แล้วพันธุ์ที่เหลือสามารถเรียก SNP นั้นได้ถ้ามีการอ่านจีโนมไทป์นั้นอย่างน้อย 3 ครั้ง
- สำหรับ heterozygous SNP จะต้องมีการอ่านจีโนมไทป์แต่ละแบบอย่างน้อย 5 ครั้ง แต่ละแบบต้องพบไม่น้อยกว่า 20 % ของทั้งหมด

8.3 Population substructure study

ทำการศึกษา population substructure ของจีโนมข้าว โดยใช้โปรแกรม EIGENSOFT version 6.0.1 (Patterson และคณะ, 2006; Price และคณะ, 2006) เพื่อนำข้อมูลไปใช้ในการเลือกโมเดลที่จะใช้ในการศึกษาการเชื่อมโยงทั่วจีโนมต่อไป

8.4 Genome-wide association study

ศึกษาการเชื่อมโยงของฟีโนไทป์ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนความเค็ม ได้แก่ ปริมาณโซเดียมไอออน ปริมาณโพแทสเซียมไอออน และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออน ในส่วนใบของข้าวที่ได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 และ 9 วัน กับข้อมูลสนิปส์ที่ได้จากข้อ 8.2 ด้วยโปรแกรม GEMMA (Zoubarov และคณะ, 2012) ผลของการเชื่อมโยงจะแสดงในรูปของ Manhattan plot ที่สร้างขึ้นโดยใช้ 'qq man' R package (Turner, 2014)

8.5 Gene Prediction

8.5.1 Threshold determination

เลือกยีนที่มีค่า p-value ต่ำกว่าค่า threshold จากการทำ multiple testing correction โดยใช้วิธี Bonferroni ที่คำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{the significant cut-off} = \frac{\alpha}{n}$$

เมื่อ α คือ โอกาสที่จะปฏิเสธสมมติฐานหลักทั้งที่สมมติฐานหลักเป็นจริง โดยเลือกค่า 0.05 และ n คือจำนวนสนิปส์ที่ใช้ในการศึกษา

8.5.2 Gene determination

นำตำแหน่งของ significant SNPs ที่ได้ ไปค้นหาว่าตรงกับตำแหน่งของยีนใดในจีโนมข้าว ด้วยโปรแกรม Integrative Genomics Viewer (IGV2.3.10) (<http://www.broadinstitute.org/igv>) จากนั้นนำตำแหน่งของยีนไปค้นหาในฐานข้อมูล (MSU Rice Genome Annotation Project) เพื่อรวบรวมข้อมูลหน้าที่ของยีนในแต่ละตำแหน่ง

9. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่ได้จาก genome-wide association study ในข้าวระยะกล้าที่ได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม

เลือกข้าว 4 พันธุ์ โดยพิจารณาจากค่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในภาวะเค็มของข้าว และจากการทำ cluster analysis ด้วยโปรแกรม JMP9 โดยพิจารณาค่าพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของข้าวทั้ง 80 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ น้ำหนักสดและแห้งส่วนต้น น้ำหนักสดและแห้งส่วนราก ดัชนีความเสียหายจากความเค็ม (Salt Injury Score) เสถียรภาพเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell Membrane Stability) ซึ่งได้พันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษาดังนี้

- ข้าวพันธุ์มาตรฐานทนเค็ม คือ Pokkali
- ข้าวไทยที่มีค่า Na^+/K^+ สูง คือ กำแพง
- ข้าวไทยที่มีค่า Na^+/K^+ ต่ำ คือ ลายหมาก
- ข้าวไทยที่มีค่าการเจริญที่ดีในภาวะเค็ม คือ เหลืองแก้ว

เลือกยีนที่ได้จากการศึกษาความเชื่อมโยงทั้งจีโนม จำนวน 3 ยีน ได้แก่ยีนที่พบอยู่ใน QTL ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนเค็มในข้าวจากฐานข้อมูล QTL annotation rice online database (<http://qtaro.abr.affrc.go.jp>) พบว่ามีจำนวน 2 ยีน ได้แก่ LOC_Os01g12540.2 และ LOC_Os01g12650.1 ที่มี QTL ของลักษณะการทนเค็มในข้าว และเลือกอีกหนึ่งยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการขนส่งไอออน ได้แก่ LOC_Os06g48810.1 มาศึกษาการแสดงออกในข้าวที่ปลูกในภาวะปกติและภาวะเค็มโดยด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

9.1 เพาะเมล็ดข้าวทั้ง 4 พันธุ์เป็นจำนวน 2 ชุด ในภาชนะที่เติมน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 วัน

9.1.1 ข้าวชุดแรกย้ายปลูกต้นกล้าข้าวลงในกระถางพลาสติกที่มีดินจากอำเภอพิมาย จังหวัดนครราชสีมา จนต้นข้าวมีอายุ 2 สัปดาห์จึงให้ภาวะเค็มแก่ต้นข้าว โดยให้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 115 มิลลิโมลาร์ ที่ทำให้มีความเค็มในระดับ 9 เดซิซีเมนต์ เก็บตัวอย่างใบของข้าวทั้งในภาวะปกติและภาวะเค็มในวันที่ 0 3 และ 6 หลังได้รับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ โดยแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที

9.1.2 ข้าวชุดที่สองนำไปหุ้มด้วยฟองน้ำและปลูกลงในถาดหลุมพลาสติกที่แช่อยู่ในกระบะพลาสติกที่บรรจุสารละลายอาหารสูตร 1/2 WP จนต้นข้าวมีอายุ 2 สัปดาห์จึงให้ภาวะเค็มแก่ต้นข้าว โดยให้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 85 มิลลิโมลาร์ในอาหารสูตร WP เก็บตัวอย่างรากของข้าวทั้งในภาวะปกติและภาวะเค็มในวันที่ 0 3 และ 6 หลังได้รับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ โดยแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที

9.1.3 เก็บตัวอย่างใบและรากไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปสกัด RNA ต่อไป

9.2 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative RT-PCR

9.2.1 ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เลือกมาทำการศึกษาเบื้องต้นในฐานข้อมูล และออกแบบ primer ของทั้ง 3 ยีน

9.2.2 สกัด total RNA ของตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชทั้งส่วนใบและราก ในวันที่ 0 3 และ 6 หลังได้รับภาวะเค็มตามวิธีของ Box และคณะ (2011) (ภาคผนวก ข)

9.2.3 วัดปริมาณ RNA จากสารละลายที่สกัดได้ ด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (Nanodrop) โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วย gel electrophoresis system (MiniRun GE-100, Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd) โดยใช้ 0.8% agarose gel ในสารละลาย 0.5x TBE และย้อมแถบ RNA ด้วย Redsafe nucleic acid staining solution (Chembio, UK) จากนั้นตรวจสอบด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายรูปเจล (Gel Doc™ 2000, Bio-Rad, California, USA)

9.2.4 กำจัด DNA ออกจากตัวอย่าง RNA ที่สกัดได้ด้วยเอนไซม์ DNase I (Thermo Scientific, USA) จากนั้นวัดปริมาณและตรวจสอบคุณภาพของ RNA ตามวิธีในข้อ 9.2.3

9.2.5 แปลง mRNA ให้เป็น cDNA ด้วยการทำให้ reverse transcription (RT)-PCR โดยใช้ iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, USA) (ภาคผนวก ข)

9.2.6 ออกแบบ primer สำหรับ candidate gene เพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ด้วย Primer3 software (Untergasser และคณะ, 2012)

9.2.6.1 primer สำหรับยีน LOC_Os01g12540 มีลำดับเบสดังนี้

(F) 5'- AAACCCGCTGATGTGTTCCCT-3'

(R) 5'- GGAGGTGGTAGCCAAGCAAT-3'

9.2.6.2 primer สำหรับยีน LOC_Os01g12650 มีลำดับเบสดังนี้

(F) 5'- GGCAGGCTTAACAAGGGACT-3'

(R) 5'- GGCAGGCTTAACAAGGGACT-3'

9.2.6.3 primer สำหรับยีน LOC_Os06g48810 มีลำดับเบสดังนี้

(F) 5'- ATGGCAGTGAACGCAAGG-3'

(R) 5'- GTGCAAATGTTGTCGATGGTG-3'

9.2.7 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนทั้งสามด้วยวิธี quantitative RT-PCR ในซ้ำทั้ง 4 พันธุ์ ในภาวะปกติและภาวะเค็มที่ช่วงเวลา 0 3 และ 6 วันหลังได้รับภาวะเค็ม โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำต่อพันธุ์

9.2.8 คำนวณการแสดงออกของยีนโดยเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่ศึกษากับการแสดงออกของยีนที่ใช้เป็นตัวควบคุม (relative quantification) ได้แก่ยีน *EF1 α* ที่ใช้เป็น internal control ในงานวิจัยนี้ หากค่าการแสดงออกของยีนด้วยวิธี ddCT method (Pfaffl, 2001) โดย normalize ระดับการแสดงออกของยีนที่เลือกกับระดับการแสดงออกของยีน *EF-1 α* ดังสมการ

$$R = \frac{(E_{target})\Delta CP_{target}(control - sample)}{(E_{ref})\Delta CP_{target}(control - sample)}$$

โดยที่ R	คือ relative expression ratio
E_{target}	คือ $10^{-1/slope}$ ของยีนที่ศึกษา
E_{ref}	คือ $10^{-1/slope}$ ของยีน $EF1\alpha$
$\Delta CP_{target}(control-sample)$	คือ ผลต่างระหว่างค่า CP (cross-over point) (หรือค่า Ct; threshold cycle) ของยีนที่ศึกษา เมื่อเปรียบเทียบกับค่า CP ของตัวอย่าง control
$\Delta CP_{ref}(control-sample)$	คือ ผลต่างระหว่างค่า CP ของยีน $EF1\alpha$ เมื่อเปรียบเทียบกับค่า CP ของตัวอย่าง control

9.2.9 วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรม SPSS version 22.0 (IBM, USA)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การศึกษาผลของความเค็มในดินที่มีต่อปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในระยะกล้าของข้าวพื้นเมืองไทย

จากการศึกษาพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญที่ตอบสนองต่อภาวะเครียดจากความเค็มในข้าวพื้นเมืองไทยระยะกล้า (นพคุณ คุณผลวัฒนา, 2558) พบว่า ค่าพารามิเตอร์ของข้าวที่ปลูกในภาวะปกติและในภาวะเครียดจากความเค็มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็ม และเนื่องจากการตอบสนองของข้าวในการเจริญเติบโตนั้นจะเกิดขึ้นได้หลังจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไอออนในเนื้อเยื่อ ดังนั้นในการศึกษานี้ทำการวิเคราะห์ปริมาณไอออนที่สะสมในเนื้อเยื่อส่วนต้นในวันที่ 6 และ 9 หลังได้รับภาวะเค็ม ซึ่งเป็นระยะก่อน และระยะที่ข้าวจะแสดงความแตกต่างของการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญเมื่อได้รับภาวะเครียดจากความเค็มเปรียบเทียบกับภาวะปกติ

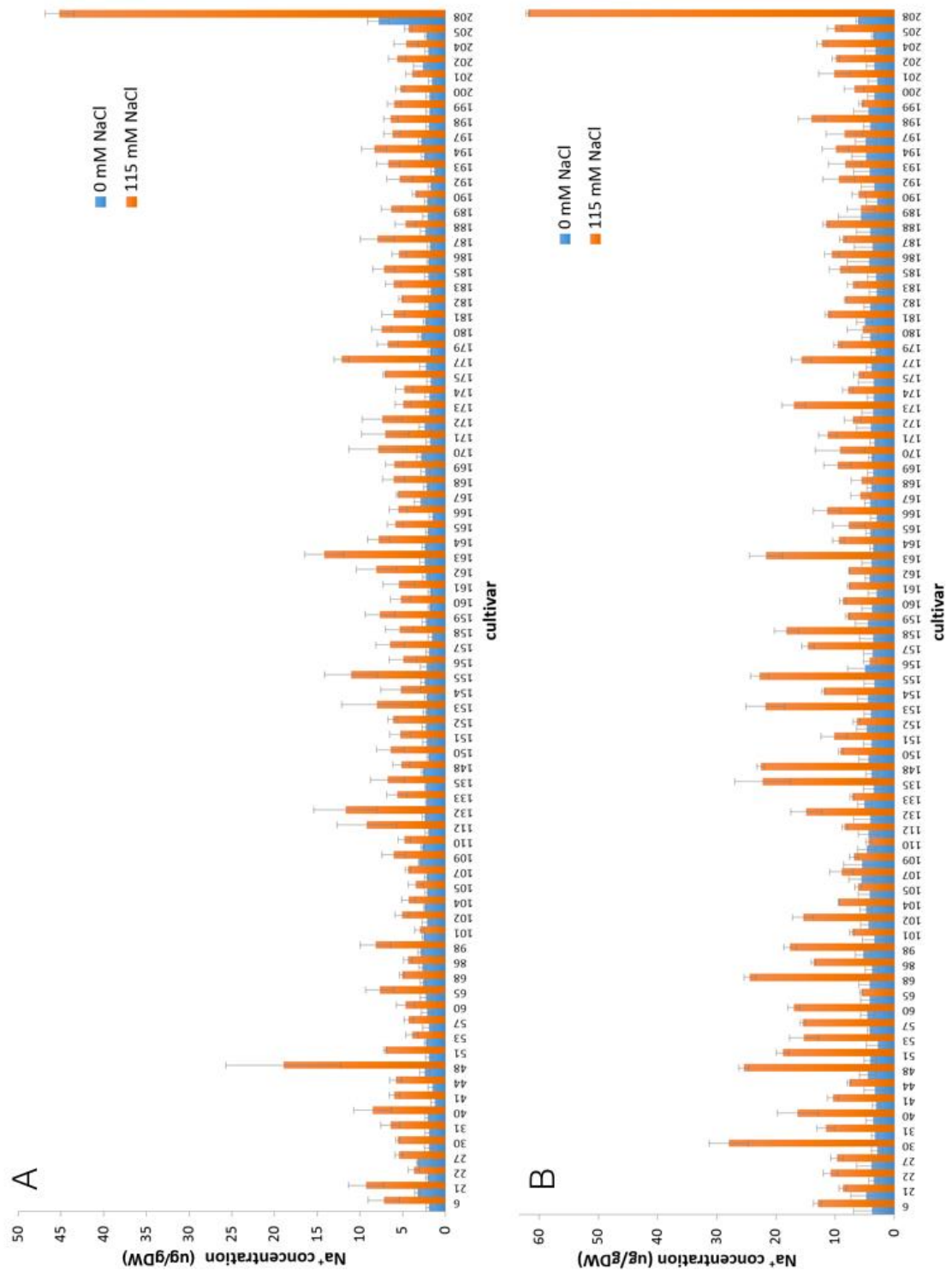
ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาปริมาณไอออน ได้แก่ โซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในเนื้อเยื่อส่วนต้นของตัวอย่างข้าวทั้ง 80 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยมีข้าวพันธุ์มาตรฐานทนและไม่ทนต่อภาวะเค็ม ได้แก่ Pokkali และ IR29 ตามลำดับ ที่ปลูกในภาวะปกติและภาวะเครียดจากความเค็มเป็นเวลา 6 และ 9 วัน จากการใช้ Analysis of Covariance (ANCOVA) ในการทดสอบความแตกต่างของปริมาณไอออนในส่วนใบของข้าวทั้ง 80 พันธุ์/สายพันธุ์ พบว่ามีเพียงสองพารามิเตอร์ที่สามารถทดสอบด้วยวิธีนี้ได้ คือ ค่า log ของปริมาณโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 9 และค่า log ของอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็ม จากการใช้สถิติทดสอบความแตกต่างกันของ variance ในข้อมูลในข้าวทั้ง 80 พันธุ์/สายพันธุ์ (Levene's test) พบว่า variance ของสองพารามิเตอร์นี้ในข้าวทุกพันธุ์/สายพันธุ์ไม่แตกต่างกันโดยให้ค่า p-value ที่สูงกว่าระดับนัยสำคัญ (0.05) ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 1 และ 3 (ภาคผนวก ก) จึงสามารถนำมาใช้ในการทดสอบได้เมื่อทำการทดสอบโดยควบคุมตัวแปรร่วม หรือ covariance ซึ่งในที่นี้ได้แก่ปริมาณโพแทสเซียมไอออน และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในภาวะปกติ ผลการทดสอบพบว่าตัวแปรร่วมไม่มีผลต่อค่าปริมาณโพแทสเซียมไอออนในส่วนใบของข้าวที่ได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน (ตารางภาคผนวกที่ 2) ดังนั้นจึงสามารถวิเคราะห์ความแตกต่างในข้าวแต่ละพันธุ์ด้วย ANOVA ได้ ในขณะที่การทดสอบตัวแปรร่วมของค่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็มพบว่าตัวแปรร่วมมีผลต่อค่าพารามิเตอร์นี้ แต่เมื่อหักอิทธิพลของตัวแปรร่วมแล้วพบว่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในข้าวทั้ง 80 พันธุ์/สายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ 4) (ภาคผนวก ก) ซึ่งผลการทดสอบ ANOVA ก่อนตัดเอาตัวแปรร่วมออกก็พบว่าค่า log ของอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน (ตารางภาคผนวกที่ 5)

ในขณะที่ variance ของพารามิเตอร์ที่เหลือ คือ ปริมาณโซเดียมไอออนวันที่ 6 และ 9 ปริมาณโพแทสเซียมไอออนวันที่ 6 และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนวันที่ 6 นั้นมีค่าแตกต่างกันในข้าวทุกพันธุ์/สายพันธุ์ แม้จะทำการแปลงข้อมูลแล้วก็ตาม จึงทำการวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย ANOVA รวมทั้งนำพารามิเตอร์ที่ทดสอบด้วย ANCOVA ได้แก่ ปริมาณโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 9 และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็มที่ไม่ผ่านการแปลงข้อมูลมาวิเคราะห์หาความแตกต่างด้วย ANOVA ด้วย สำหรับปริมาณโซเดียมไอออนที่สะสมในส่วนใบของข้าวทั้ง 80 พันธุ์/สายพันธุ์ เมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วันนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณโซเดียมไอออนในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็ม ในขณะที่ปริมาณโพแทสเซียมไอออนในส่วนใบของข้าวทั้ง 80 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ได้รับความเค็มทั้ง 6 และ 9 วันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสำหรับอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็มในข้าว 80 พันธุ์นั้นพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน แต่เมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน ค่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในข้าวทั้ง 80 พันธุ์/สายพันธุ์ (ตารางภาคผนวกที่ 12) จากผลการทดลองพบว่าข้าวที่ปลูกในภาวะเค็มทุกพันธุ์/สายพันธุ์ มีปริมาณโซเดียมไอออนในเนื้อเยื่อส่วนต้นสูงชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณโซเดียมไอออนในข้าวพันธุ์/สายพันธุ์ เดียวกันที่ปลูกในภาวะปกติ โดยในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็ม ข้าวพันธุ์ Pokkali ซึ่งเป็นพันธุ์มาตรฐานทนเค็มเป็นพันธุ์ที่มีปริมาณโซเดียมไอออนเพิ่มขึ้นน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณโซเดียมไอออนในภาวะปกติ โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้น 1.1804 เท่า ในขณะที่ข้าวพันธุ์ขี้ตมพัน (หมายเลข 48) มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณโซเดียมไอออนสูงที่สุดถึง 7 เท่า จากค่าปริมาณโซเดียมไอออนในภาวะควบคุม และข้าวสายพันธุ์ UBN02123-50R-B-3 (หมายเลข 208) เป็นสายพันธุ์ที่มีค่าปริมาณโซเดียมไอออนสูงที่สุดถึง 45.1867 $\mu\text{g/gDW}$ หลังได้รับภาวะเค็ม (ภาพที่ 2A) เช่นเดียวกันกับในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็ม ข้าวสายพันธุ์ UBN02123-50R-B-3 ยังคงมีปริมาณโซเดียมไอออนสูงที่สุดเท่ากับ 61.8925 $\mu\text{g/gDW}$ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณโซเดียมไอออนในข้าวที่ปลูกในภาวะปกติพบว่า ข้าวพันธุ์ที่มีปริมาณโซเดียมไอออนเพิ่มขึ้นมากที่สุดได้แก่พันธุ์ขาวคด (หมายเลข 30) กำแพง (หมายเลข 155) และบุญมา (หมายเลข 135) ซึ่งมีค่าสูงชันจากภาวะปกติถึง 9.4797 6.6110 และ 6.3151 เท่าตามลำดับ ในขณะที่ข้าวเกือบทุกพันธุ์/สายพันธุ์ มีปริมาณโซเดียมไอออนสูงชันเมื่อได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม แต่ยังมีข้าวบางพันธุ์ที่มีปริมาณโซเดียมไอออนลดลงในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็ม ได้แก่พันธุ์สังข์หยด (หมายเลข 110) กข10 (หมายเลข 156) และชุมแพ 60 (หมายเลข 189) (ภาพที่ 2B)

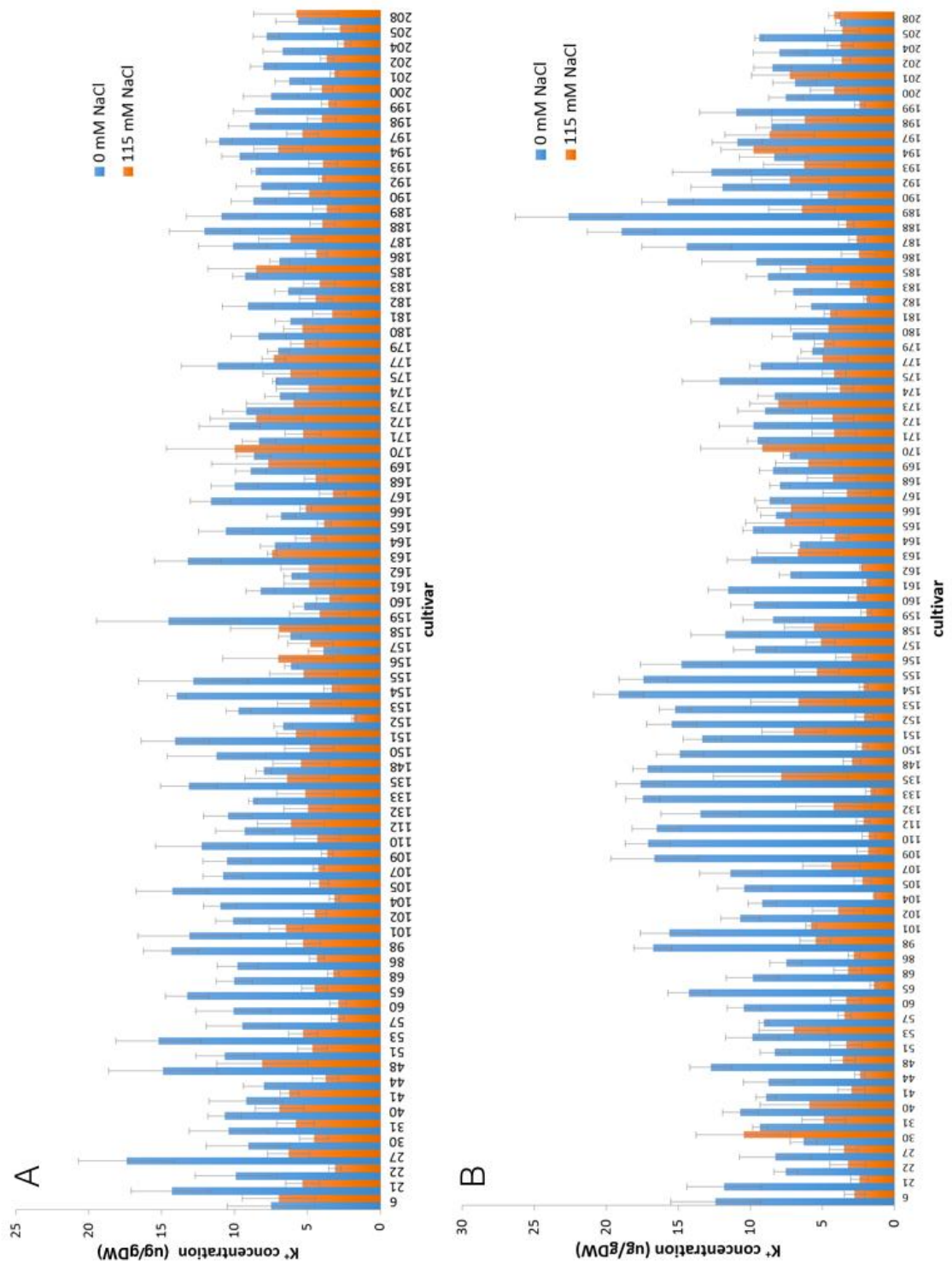
ในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็ม พบว่าปริมาณโพแทสเซียมไอออนในเนื้อเยื่อส่วนต้นของข้าวแต่ละพันธุ์/สายพันธุ์ ที่ปลูกในภาวะปกติมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อได้รับภาวะเค็ม พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณโพแทสเซียมไอออนในข้าวแต่ละพันธุ์/สายพันธุ์ แต่พบว่าหลังจากข้าวได้รับภาวะเค็มแล้ว ปริมาณโพแทสเซียมไอออนในเนื้อเยื่อส่วนต้นของข้าวเกือบทุกพันธุ์/สายพันธุ์ มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณโพแทสเซียมไอออนในข้าวที่ปลูกในภาวะปกติ (ภาพที่ 3A) โดยข้าวพันธุ์ กข19 เป็นพันธุ์ที่มีปริมาณโพแทสเซียมไอออนลดลงมากที่สุดถึง 4.1823 เท่าจากปริมาณโพแทสเซียมไอออนในภาวะปกติเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์อื่นที่ศึกษา แต่

อย่างไรก็ตามพบว่าข้าวบางพันธุ์มีปริมาณโพแทสเซียมไอออนเพิ่มขึ้นจากภาวะปกติหลังได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม ได้แก่ พันธุ์ กข10 (หมายเลข 156) กข21 (หมายเลข 157) กข25 (หมายเลข 158) และสายพันธุ์ UBN02123-50R-B-3 (หมายเลข 208) ส่วนในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเครียดจากความเค็มพบว่าปริมาณโพแทสเซียมไอออนมีค่าลดลงในข้าวเกือบทุกพันธุ์เช่นเดียวกับในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็ม (ภาพที่ 3B) โดยข้าวพันธุ์น้ำสะกุก 19 (หมายเลข 133) เป็นพันธุ์ที่มีปริมาณโพแทสเซียมไอออนลดลงมากที่สุดถึง 10.3828 เท่าจากปริมาณโพแทสเซียมไอออนในภาวะปกติ และยังคงมีข้าวบางพันธุ์ที่มีปริมาณโพแทสเซียมไอออนเพิ่มขึ้นจากภาวะปกติ ได้แก่ ข้าวพันธุ์ขาวคด (หมายเลข 30) ลายหมาก (หมายเลข 170) เหนียวดำหลาย (หมายเลข 194) แก่นจันทร์ (หมายเลข 201) และสายพันธุ์ UBN02123-50R-B-3 (หมายเลข 208)

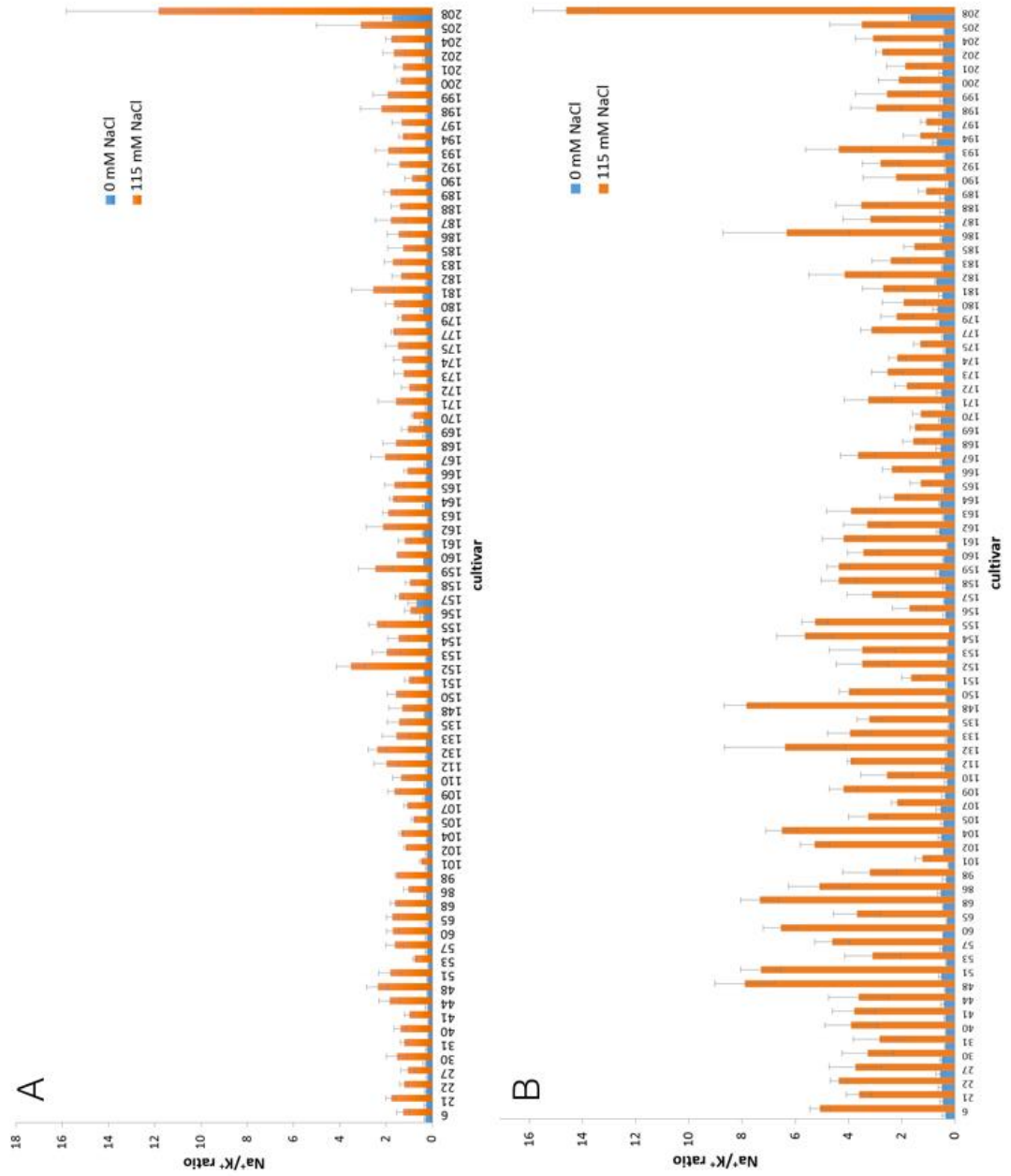
เมื่อนำค่าปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนมาคำนวณเป็นอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนพบว่าในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็ม อัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนของข้าวทั้ง 80 พันธุ์/สายพันธุ์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในข้าวที่ปลูกในภาวะปกติและภาวะเครียดจากความเค็ม (ภาพที่ 4) โดยในภาวะเค็มค่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในข้าวทุกพันธุ์มีค่าสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับค่าอัตราส่วนในภาวะปกติ และอัตราส่วนของข้าวทุกพันธุ์ในภาวะปกติจะมีค่าต่ำกว่า 1 ในขณะที่อัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในข้าวเกือบทุกพันธุ์ที่ได้รับภาวะเค็มจะมีค่าสูงกว่า 1 ยกเว้นพันธุ์ Pokkali (หมายเลข 101) พวงหางนาค (หมายเลข 53) นางนวล (หมายเลข 105) กข10 (หมายเลข 152) กข25 (หมายเลข 158) ลายหมาก (หมายเลข 170) และสุพรรณบุรี 60 (หมายเลข 190) ที่มีค่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนเท่ากับ 0.4766 0.7532 0.8038 0.9443 0.9639 0.8262 และ 0.8832 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในภาวะเค็มกับภาวะปกติ พบว่าข้าวพันธุ์ที่มีอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนเพิ่มขึ้นสูงสุด ได้แก่ ข้าวพันธุ์ จำปาทอง (หมายเลข 159) พลายงามปราจีนบุรี (หมายเลข 193) ขี้ตมพัน (หมายเลข 48) และกำแพง (หมายเลข 155) ที่มีอัตราส่วนเพิ่มขึ้น 12.9423 12.5125 12.1400 และ 11.3897 เท่าจากอัตราส่วนในภาวะปกติตามลำดับ สำหรับอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็มของข้าวทั้ง 80 พันธุ์/สายพันธุ์ มีค่าเพิ่มขึ้นจากอัตราส่วนในภาวะปกติเช่นเดียวกันกับในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็ม โดยอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนของข้าวทุกพันธุ์/สายพันธุ์ในภาวะปกติมีค่าน้อยกว่า 1 ในขณะที่อัตราส่วนในภาวะเค็มของข้าวทุกพันธุ์/สายพันธุ์ มีค่าสูงกว่า 1 (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 2 ปริมาณโซเดียมไอออนในเนื้อเยื่อส่วนต้นของข้าว 80 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ปลูกในภาวะปกติ และภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน (A) และ 9 วัน (B)



ภาพที่ 3 ปริมาณโพแทสเซียมไอออนในเนื้อเยื่อส่วนต้นของข้าว 80 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ปลูกในภาวะปกติและภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน (A) และ 9 วัน (B)



ภาพที่ 4 อัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในเนื้อเยื่อส่วนต้นของข้าว 80 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ปลูกในภาวะปกติและภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน (A) และ 9 วัน (B)

2. การหาความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่าง Na^+/K^+ กับค่าดัชนีเสถียรภาพ (stability index)

ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมไอออน ได้แก่ ปริมาณโซเดียมไอออน ปริมาณโพแทสเซียมไอออน และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในภาวะเค็มกับพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของข้าวที่อยู่ในภาวะเค็มโดยใช้ข้อมูลจากวิทยานิพนธ์ของนพคุณ คุณผลวัฒนา (นพคุณ คุณผลวัฒนา, 2558) ที่เก็บผลการทดลองจากข้าวพันธุ์เดียวกันที่ได้รับภาวะเค็มในระดับเดียวกัน ได้แก่ น้ำหนักสดและแห้งส่วนต้น น้ำหนักสดและแห้งส่วนราก ดัชนีความเสียหายจากความเค็ม (salt injury score) และเสถียรภาพเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane stability) โดยใช้ค่าพารามิเตอร์เหล่านี้ทั้งในรูปแบบค่าปกติที่ได้จากการเก็บผลการทดลองโดยตรงและค่า stability index ที่ได้จากการคำนวณจากค่าพารามิเตอร์ในภาวะเค็มหารด้วยค่าพารามิเตอร์ในภาวะปกติ จากผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม JMP9 (SAS Corporate) พบว่าพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตมีความสัมพันธ์กับปริมาณโซเดียมไอออน และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออน ในขณะที่ไม่พบความสัมพันธ์กับค่าปริมาณโพแทสเซียมไอออนเลย โดยตารางที่ 2 แสดงถึงค่า correlation coefficient ระหว่างพารามิเตอร์ต่างๆ ทั้งในรูปของค่าเดิมและค่า stability index จากผลการศึกษาความสัมพันธ์พบว่าค่าปริมาณโซเดียมไอออนในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็ม มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าดัชนีความเสียหายจากความเค็ม (SIS) ในวันที่ 6 และ 9 โดยมีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 0.5584 และ 0.5708 ตามลำดับ ในขณะที่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับค่าเสถียรภาพเยื่อหุ้มเซลล์ (CMS) หลังได้รับภาวะเค็ม 12 วัน โดยมีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ -0.4334 ในขณะที่ค่าปริมาณโซเดียมไอออนในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็มมีความสัมพันธ์เชิงลบกับเสถียรภาพเยื่อหุ้มเซลล์หลังได้รับภาวะเค็ม 12 วันทั้งในรูปแบบของค่าปกติและค่า stability index โดยมีค่าความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันเท่ากับ -0.3737 และ -0.3655 ตามลำดับ สำหรับอัตราส่วนโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็มเป็นพารามิเตอร์ที่มีความสัมพันธ์กับพารามิเตอร์เกี่ยวกับการเจริญเป็นจำนวนมากที่สุด โดยพบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวกกับดัชนีความเสียหายจากความเค็มในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็ม ที่มีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 0.4583 และมีความสัมพันธ์เชิงลบกับน้ำหนักสดส่วนต้นในวันที่ 6 9 และ 12 ด้วยค่าความสัมพันธ์เท่ากับ -0.4632 -0.5727 และ -0.5223 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์เชิงลบกับน้ำหนักสดส่วนรากในวันที่ 6 9 และ 12 เช่นกัน ด้วยค่าความสัมพันธ์เท่ากับ -0.5464 -0.4913 และ -0.5427 ตามลำดับ ในขณะที่น้ำหนักแห้งส่วนต้นในวันที่ 6 9 และ 12 หลังได้รับภาวะเค็มมีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ -0.4541 -0.5789 และ -0.5525 ตามลำดับ โดยพารามิเตอร์ที่มีค่าความสัมพันธ์สูงที่สุด ได้แก่ น้ำหนักแห้งส่วนรากในวันที่ 12 หลังได้รับภาวะเค็ม โดยมีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ -0.5902 สำหรับอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็มมีเพียงความสัมพันธ์เชิงลบกับน้ำหนักแห้งส่วนต้นหลังได้รับภาวะเค็ม 6 วันเท่านั้น และมีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ -0.4384 และเมื่อคำนวณค่าพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมไอออนเหล่านี้ให้อยู่ในรูป stability index พบว่ามีเพียงค่า stability index ของปริมาณโซเดียมในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็มเท่านั้นที่มีความสัมพันธ์กับ

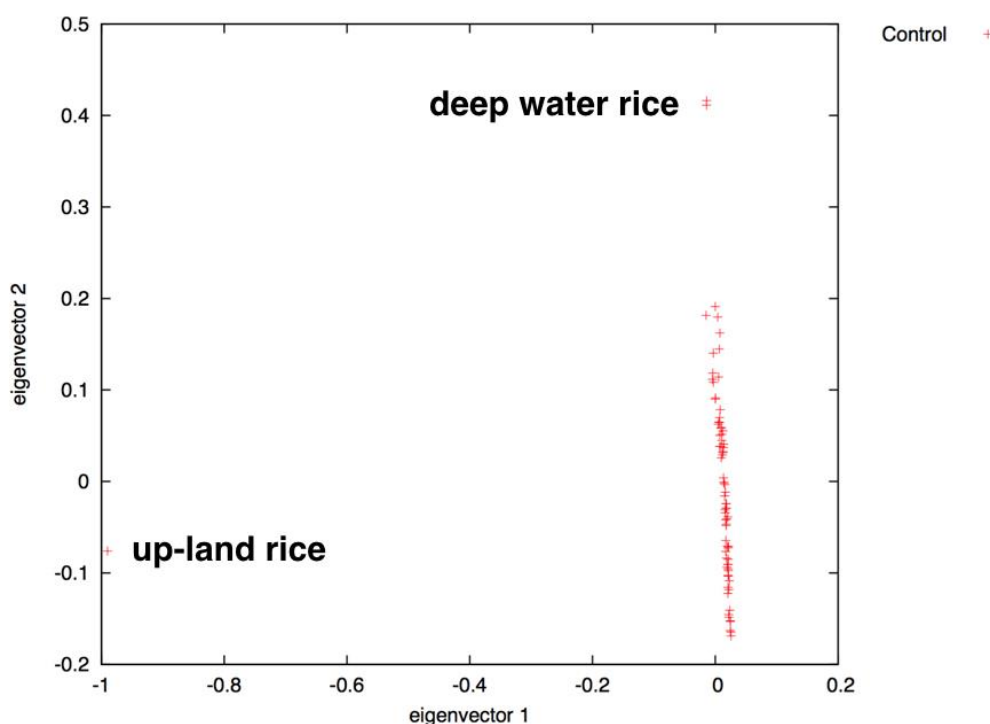
พารามิเตอร์ที่เกี่ยวกับการเจริญ ได้แก่ ค่าดัชนีความเสียหายจากความเค็มในวันที่ 6 และ 9 หลังได้รับ
ภาวะเค็ม โดยมีความสัมพันธ์เชิงบวกเป็นค่าเท่ากับ 0.4731 และ 0.5082 ตามลำดับ



3. การทำนายตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนเค็มของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยในระยะกล้า โดยใช้เทคนิค genome-wide association

3.1 การศึกษา population substructure ด้วย Principal Component Analysis (PCA)

การเลือกโมเดลในการศึกษาความเชื่อมโยงทั้งจีโนมนั้นต้องทำการศึกษา population substructure ของสนิปส์ที่ได้จากประชากรข้าวที่ใช้ศึกษา ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ข้าวพื้นเมืองไทยและข้าวปรับปรุงพันธุ์จำนวน 80 พันธุ์/สายพันธุ์ (นพคุณ คุณผลวัฒนา, 2558) และนำสนิปส์ที่ได้จำนวน 77,063 ตำแหน่งมาใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างของกลุ่มประชากรด้วยโปรแกรม EIGENSOFT version 6.0.1 (Patterson และคณะ, 2006; Price และคณะ, 2006) จากผลการวิเคราะห์พบว่าสามารถแบ่งประชากรออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ข้าวนาสวน (lowland rice) ข้าวไร่ (upland rice) และข้าวขึ้นน้ำ (deepwater rice) (ภาพที่ 5) จากการแบ่งกลุ่มของประชากร จึงเลือกใช้ Multivariate Mixed Model ในการศึกษาการเชื่อมโยงทั้งจีโนมด้วยโปรแกรม GEMMA ต่อไป



ภาพที่ 5 population substructure ของประชากรข้าวพื้นเมืองไทยและข้าวปรับปรุงพันธุ์ จำนวน 80 พันธุ์บน eigenvector 1 และ eigenvector 2

3.2 การศึกษาการเชื่อมโยงทั้งจีโนมกับลักษณะการสะสมโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในข้าวพื้นเมืองไทย

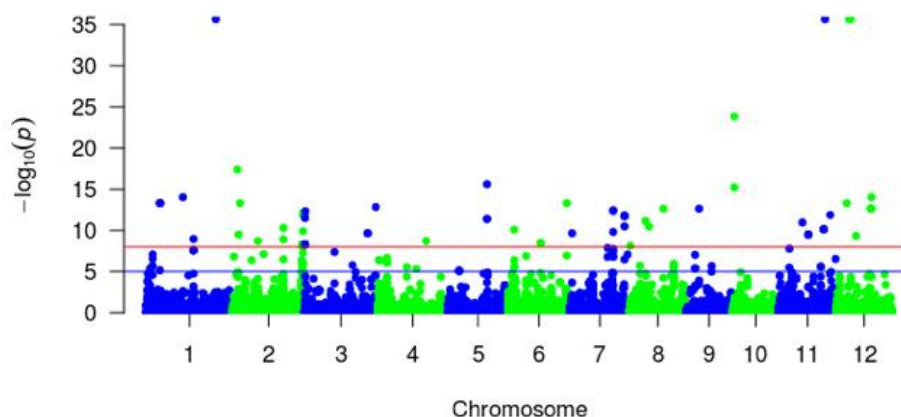
ในการศึกษานี้หาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ซึ่งได้แก่สไนป์ส จำนวน 77,063 ตำแหน่ง และฟีโนไทป์ ได้แก่ ปริมาณโซเดียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในข้าวที่ได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 และ 9 วัน นอกจากการวิเคราะห์การเชื่อมโยงทั้งจีโนมแล้ว การวิเคราะห์ความเหมาะสมของฟีโนไทป์ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์การเชื่อมโยงทั้งจีโนมก็มีความสำคัญ เพื่อไม่ให้เกิดค่า false positive ซึ่งอาจทำให้ได้รับผลการศึกษาที่ไม่เป็นความจริงได้ โดยการวิเคราะห์ฟีโนไทป์อาศัยหลักการของ quantile-quantile plot หรือ q-q plot ที่เป็นการสร้างกราฟระหว่างค่า p-value ที่คาดหวัง (expected p-value) และค่า p-value จริงจากการวิเคราะห์การเชื่อมโยงด้วยข้อมูลฟีโนไทป์ที่สนใจ (observed p-value) เนื่องจากการวิเคราะห์ความเชื่อมโยงนั้นต้องควบคุมตัวแปรร่วม หรือ confounder ที่อาจทำให้ได้ผลการเชื่อมโยงที่ผิดได้ q-q plot จึงเป็นกราฟที่บ่งบอกว่าในการวิเคราะห์ความเชื่อมโยงนั้นมี confounder อยู่หรือไม่ หากค่า p-value มีการกระจายตัวปกติตามเส้น uniform นั้นแสดงว่ามีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมแล้ว แต่หากการกระจายตัวไม่เป็นไปตามเส้น uniform นั้นหมายความว่ามีความ confounder ซึ่งควรปรับเปลี่ยนการวิเคราะห์ใหม่เพื่อไม่ให้มี confounder เกิดขึ้น

จากการทำ association analysis โดยหาความเชื่อมโยงระหว่างสไนป์สกับพารามิเตอร์ทั้งสามด้วยโปรแกรม GEMMA ทำให้ได้ค่า p-value ของการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างสไนป์สแต่ละตำแหน่งในจีโนมกับค่าพารามิเตอร์นั้น และสามารถแสดงผลเพื่อให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ในลักษณะของแผนภาพที่เรียกว่า Manhattan Plot โดยเป็นการแสดงค่า $-\log_{10}(P)$ บนแกน y กับตำแหน่งของสไนป์สบนโครโมโซมทั้ง 12 โครโมโซมของข้าวบนแกน x ซึ่งเกณฑ์ในการเลือกว่าสไนป์สใดมีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์อย่างมีนัยสำคัญนั้นอาศัยหลักการของ multiple testing correction (วิธี Bonferroni correction) ที่คำนวณได้จากการนำค่า significant p-value (0.05) หารด้วยจำนวนสไนป์สของข้าวทั้ง 80 พันธุ์/สายพันธุ์ ซึ่งได้ค่าเท่ากับ 10^{-7} ดังนั้นสไนป์สใดที่มีค่า $-\log_{10}(P)$ สูงกว่า 7 จึงเป็นสไนป์สที่มีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.2.1 ความเชื่อมโยงระหว่างสไนป์สกับปริมาณโซเดียมไอออน

3.2.1.1 ปริมาณโซเดียมไอออนเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน

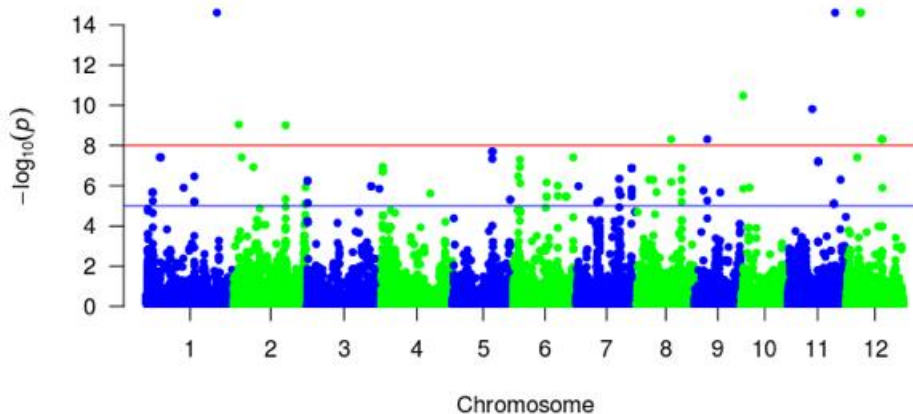
จากการทำ association ระหว่างสไนป์สกับค่าปริมาณโซเดียมไอออนในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็มพบ significant SNPs ที่มีค่า $-\log_{10}(P)$ ตั้งแต่ 7 จนถึง 36 กระจายอยู่ในโครโมโซมที่ 1 ถึง 12 ดังแสดงใน Manhattan plot (ภาพที่ 6) พบว่าสไนป์สอยู่ในตำแหน่งของยีน จำนวน 34 ยีน ดังแสดงในตารางที่ 3



ภาพที่ 6 Manhattan plot ของปริมาณโซเดียมไอออนในส่วนใบของข้าวเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน

3.2.1.2 ปริมาณโซเดียมไอออนเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน

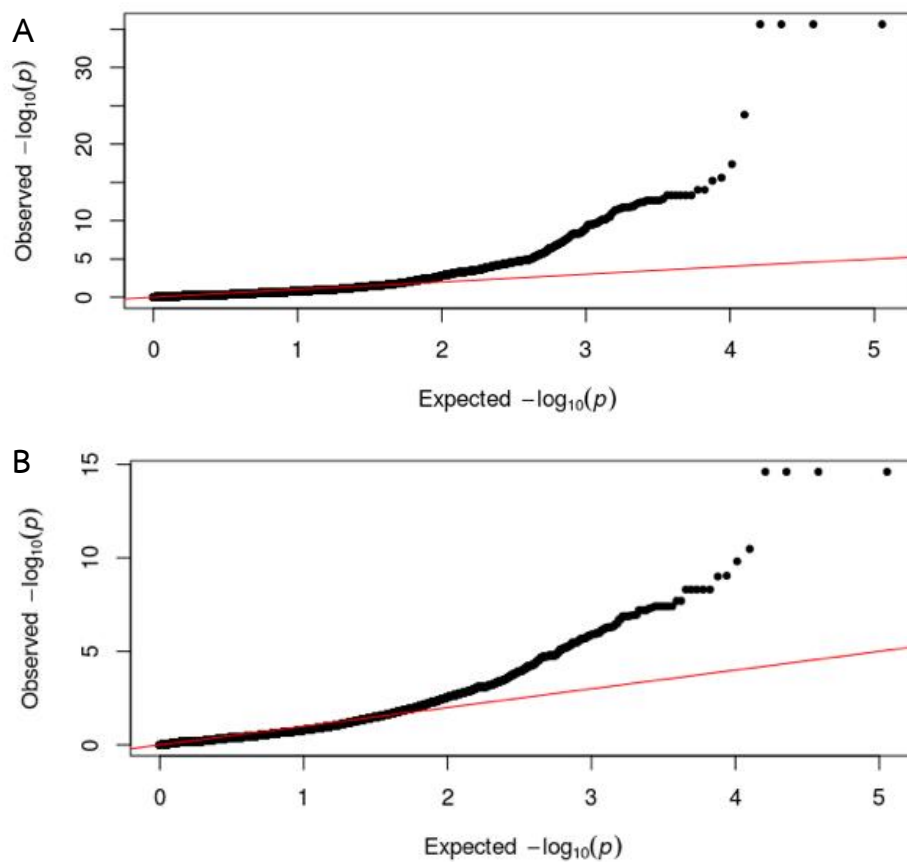
จากการทำ association ระหว่างสนิปส์กับค่าปริมาณโซเดียมไอออนในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็มพบ significant SNPs ที่มีค่า $-\log_{10}(P)$ ตั้งแต่ 7 จนถึง 35 กระจายอยู่ในโครโมโซมที่ 1 ถึง 12 ดังแสดงใน Manhattan plot (ภาพที่ 7) พบว่าสนิปส์อยู่ในตำแหน่งของยีน จำนวน 34 ยีน ดังแสดงในตารางที่ 4



ภาพที่ 7 Manhattan plot ของปริมาณโซเดียมไอออนในส่วนใบของข้าวเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน

3.2.1.3 quantile-quantile plot

ในการทำ association ได้ผลของ q-q plot ของพารามิเตอร์ปริมาณโซเดียมไอออนเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 และ 9 วัน ดังภาพที่ 8A และ 8B ตามลำดับ จะเห็นว่า q-q plot ทั้งสองมีการกระจายตัวแบบ uniform (เส้นสีแดงคือแนวของ uniform distribution) และมีบางบริเวณที่ค่า observed p-value สูงกว่า expected p-value มาก ซึ่งเป็นบริเวณของสนิปส์ที่มีค่า $-\log_{10}(P)$ สูงกว่าค่า significant cut-off ใน Manhattan plot โดยสนิปส์ที่มีค่าสูงกว่าเส้น cut-off นั้นพบตั้งแต่ในโครโมโซมที่ 1-12 ของข้าว



ภาพที่ 8 quantile-quantile plot ของปริมาณโซเดียมไอออนในวันที่ 6 (A) และ 9 (B) หลังได้รับภาวะเค็ม

ตารางที่ 3 ตำแหน่งของสโนิปส์ที่มีความเชื่อมโยงกับปริมาณโซเดียมไอออนในข้าวระยะกล้าที่ปลูกใน
ภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน

Trait	Chr	position	Log(P)	ref	alt	Locus	Annotation
Na ⁺ day6	1	34769930	5.94E-36	G	C	LOC_Os01g60110.1	E2F-related protein, putative, expressed
		18365898	4.89E-15	T	C	LOC_Os01g33350.1	zinc-binding protein, putative, expressed
		6900271	2.44E-14	C	T	LOC_Os01g12540.2	GTPase of unknown function domain containing protein, putative, expressed
		6969721	2.44E-14	G	A	LOC_Os01g12650.1	reticulon domain containing protein, putative, expressed
		6973283	2.44E-14	T	C	LOC_Os01g12660.1	AAA-type ATPase family protein, putative, expressed
		23632353	5.23E-07	A	T	LOC_Os01g41750.1	expressed protein
	2	2320436	2.78E-18	G	A	LOC_Os02g38380.1	transposon protein, putative, unclassified, expressed
		3697396	2.44E-14	G	A	LOC_Os02g07190.1	expressed protein
		25349420	1.42E-10	C	G	LOC_Os02g42150.2	OsWAK14 - OsWAK receptor-like protein kinase, expressed
		12652206	6.92E-10	G	A	LOC_Os02g21320.1	expressed protein
	3	35674231	7.01E-14	A	T	LOC_Os03g63110.1	prefoldin, putative, expressed
		454855	2.23E-13	A	G	LOC_Os03g01720.1	protein binding protein, putative, expressed
		271735	1.26E-12	T	C	LOC_Os03g01360.1	expressed protein
		31550631	4.29E-10	G	A	LOC_Os03g55460.1	expressed protein
		31686422	4.29E-10	C	G	LOC_Os03g55645.1	expressed protein
	5	19412122	2.73E-14	A	G	LOC_Os05g33100.1	endo-1,3;1,4-beta-D-glucanase precursor, putative, expressed
	6	29539842	2.44E-14	A	T	LOC_Os06g48810.1	OsHKT2;1 - Na ⁺ transporter, expressed
		3242594	1.07E-10	A	C	LOC_Os06g06860.1	MLA1, putative, expressed
	7	27144178	7.77E-13	G	A	LOC_Os07g45490.1	expressed protein
		21516748	1.38E-11	G	A	LOC_Os07g35960.1	expressed protein
		926708	4.29E-10	C	T	LOC_Os07g02570.1	NB-ARC domain containing protein, expressed
	8	16914481	1.10E-13	C	T	LOC_Os08g27759.1	expressed protein
		8020252	2.13E-10	G	A	LOC_Os08g13469.1	expressed protein
	9	6332259	1.10E-13	G	A	LOC_Os09g11380.1	expressed protein
	10	1023521	1.52E-24	C	T	LOC_Os10g02644.1	hypothetical protein
	11	23175746	5.94E-36	G	A	LOC_Os11g38920.2	HVA22, putative, expressed
		25807179	6.08E-13	G	A	LOC_Os11g42850.1	expressed protein
		11864234	1.41E-10	G	C	LOC_Os11g20480.1	expressed protein
		14775595	8.04E-10	A	G	LOC_Os11g25900.1	hAT dimerisation domain containing protein, putative
	12	6912259	5.94E-36	T	C	LOC_Os12g12560.1	NADP-dependent oxidoreductase, putative, expressed
		17420950	4.89E-15	C	A	LOC_Os12g29350.1	ATP binding protein, putative, expressed
		5048597	2.44E-14	C	T	LOC_Os12g09590.1	leafbladeless1, putative, expressed
17071124		1.10E-13	G	A	LOC_Os12g28880.1	LTPL110 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor, putative, expressed	
9689490		1.71E-10	C	G	LOC_Os12g16890.1	PROLM28 - Prolamin precursor, expressed	

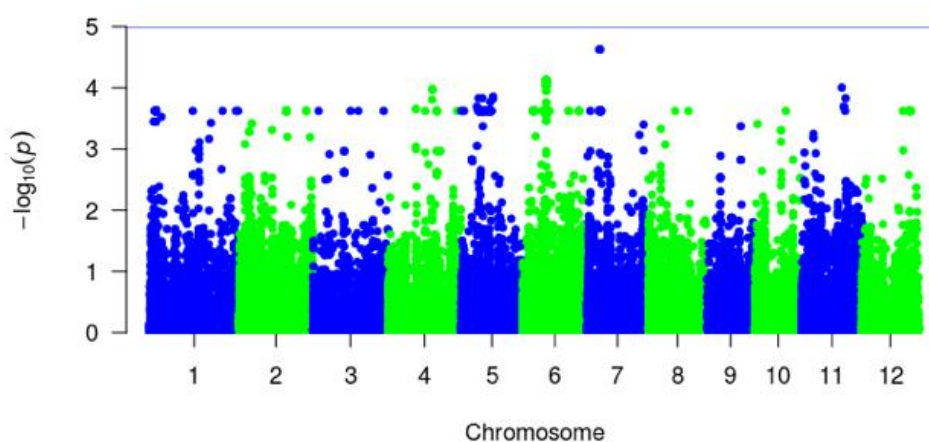
ตารางที่ 4 ตำแหน่งของสไนป์ที่มีความเชื่อมโยงกับปริมาณโซเดียมไอออนในข้าวระยะกล้าที่ปลูกใน
ภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน

Trait	Chr	position	Log(P)	ref	alt	Locus	Annotation
Na ⁺ day9	1	34769930	5.94E-36	G	C	LOC_Os01g60110.1	E2F-related protein, putative, expressed
		18365898	4.89E-15	T	C	LOC_Os01g33350.1	zinc-binding protein, putative, expressed
		6900271	2.44E-14	C	T	LOC_Os01g12540.2	GTPase of unknown function domain containing protein, putative, expressed
		6969721	2.44E-14	G	A	LOC_Os01g12650.1	reticulon domain containing protein, putative, expressed
		6973283	2.44E-14	T	C	LOC_Os01g12660.1	AAA-type ATPase family protein, putative, expressed
		23632353	5.23E-07	A	T	LOC_Os01g41750.1	expressed protein
	2	9450252	1.86E-07	C	G	LOC_Os02g16544.1	expressed protein
		2320436	2.78E-18	G	A	LOC_Os02g38380.1	transposon protein, putative, unclassified, expressed
		3697396	2.44E-14	G	A	LOC_Os02g07190.1	expressed protein
		25349420	1.42E-10	C	G	LOC_Os02g42150.2	OsWAK14 - OsWAK receptor-like protein kinase, expressed
	3	35674231	7.01E-14	A	T	LOC_Os03g63110.1	prefoldin, putative, expressed
		271735	1.26E-12	T	C	LOC_Os03g01360.1	expressed protein
	4	946536	1.77E-07	C	G	LOC_Os04g02550.1	expressed protein
		923565	3.08E-07	T	A	LOC_Os04g02520.1	Leucine Rich Repeat family protein, expressed
	5	19412122	2.73E-14	A	G	LOC_Os05g33100.1	endo-1,3;1,4-beta-D-glucanase precursor, putative, expressed
	6	29539842	2.44E-14	A	T	LOC_Os06g48810.1	OsHKT2;1 - Na ⁺ transporter, expressed
		3242594	1.07E-10	A	C	LOC_Os06g06860.1	MLA1, putative, expressed
		2473056	5.13E-07	T	A	LOC_Os06g05470.1	expressed protein
		16442154	3.06E-09	A	G	LOC_Os06g28840.1	expressed protein
	7	27144178	7.77E-13	G	A	LOC_Os07g45490.1	expressed protein
		21516748	1.38E-11	G	A	LOC_Os07g35960.1	expressed protein
	8	16914481	1.10E-13	C	T	LOC_Os08g27759.1	expressed protein
		8020252	2.13E-10	G	A	LOC_Os08g13469.1	expressed protein
	9	6332259	1.10E-13	G	A	LOC_Os09g11380.1	expressed protein
		4401343	1.63E-07	G	A	LOC_Os09g08440.1	nodulin MtN3 family protein, putative, expressed
	10	1023521	1.52E-24	C	T	LOC_Os10g02644.1	hypothetical protein
	11	23175746	5.94E-36	G	A	LOC_Os11g38920.2	HVA22, putative, expressed
		25807179	6.08E-13	G	A	LOC_Os11g42850.1	expressed protein
		11864234	1.41E-10	G	C	LOC_Os11g20480.1	expressed protein
		14775595	8.04E-10	A	G	LOC_Os11g25900.1	hAT dimerisation domain containing protein, putative

3.2.2 ความเชื่อมโยงระหว่างสניปส์กับปริมาณโพแทสเซียมไอออน

3.2.2.1 ปริมาณโพแทสเซียมไอออนเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน

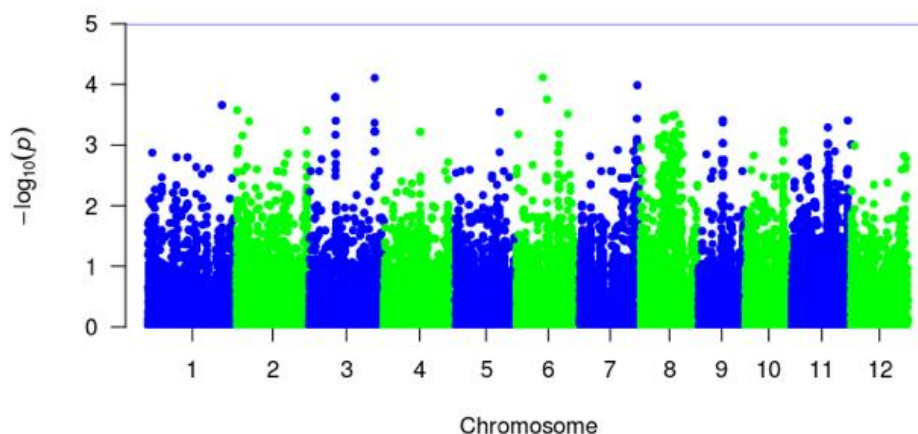
จากการทำ association กับปริมาณโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็มพบว่าไม่มีส니ปส์ใดที่มีค่า $-\log_{10}(P)$ สูงกว่าค่า significant cut-off เลย โดยสนิปส์ทั้งหมดมีค่า $-\log_{10}(P)$ น้อยกว่า 7 ดังแสดงใน Manhattan plot (ภาพที่ 9) ดังนั้นจึงไม่พบสนิปส์ที่สัมพันธ์กับพารามิเตอร์นี้



ภาพที่ 9 Manhattan plot ของปริมาณโพแทสเซียมไอออนในส่วนใบของข้าวเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน

3.2.2.2 ปริมาณโพแทสเซียมไอออนเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน

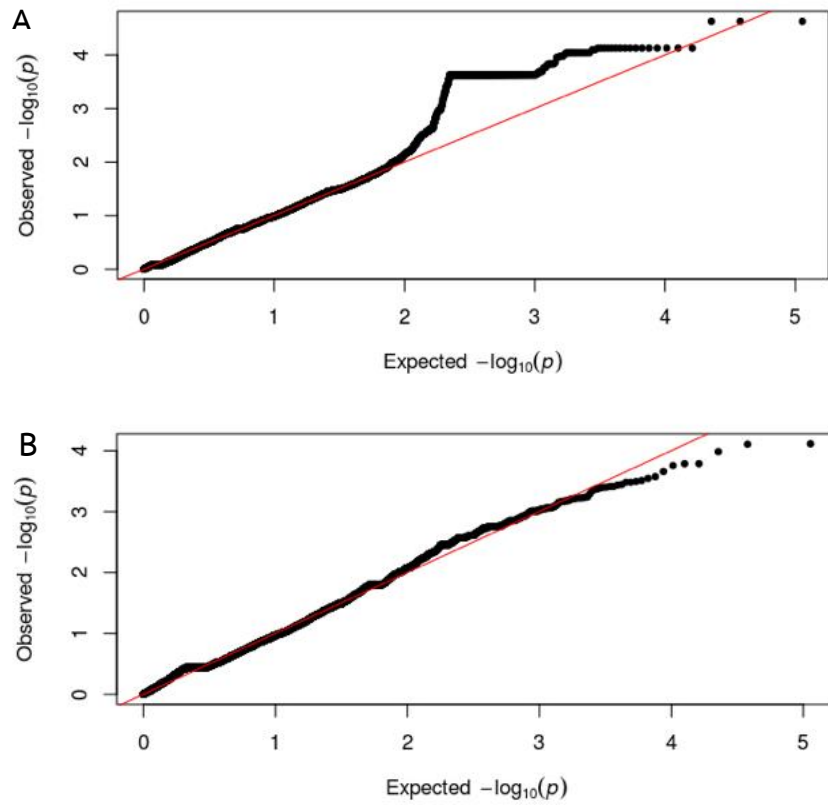
เมื่อทำ association โดยใช้ค่าปริมาณโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็มพบว่าไม่มีสนิปส์ที่มีค่า $-\log_{10}(P)$ สูงกว่าค่า significant cut-off เลย และสนิปส์ทั้งหมดยังมีค่า $-\log_{10}(P)$ ไม่เกิน 7 เช่นเดียวกันกับการใช้ค่าปริมาณโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 6 ในการหาความเชื่อมโยงดังแสดงใน Manhattan plot (ภาพที่ 10) ดังนั้นจึงไม่พบสนิปส์ที่สัมพันธ์กับพารามิเตอร์นี้เช่นเดียวกัน



ภาพที่ 10 Manhattan plot ของปริมาณโพแทสเซียมไอออนในส่วนใบของข้าวเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน

3.2.2.3 quantile-quantile plot

q-q plot ของปริมาณโพแทสเซียมไอออนนั้นมีค่า $-\log_{10}(P)$ ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับพารามิเตอร์อื่นๆ โดยการกระจายตัวของค่า p-value ทั้งใน q-q plot ของปริมาณโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 6 และ 9 หลังได้รับภาวะเค็มนั้นไม่เป็นปกติ โดยค่า p-value นั้นไม่กระจายตัวตามเส้น uniform ดังแสดงในภาพที่ 11A และ 11B แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์การเชื่อมโยงในพารามิเตอร์นี้ยังไม่เหมาะสม ทำให้มี confounder อยู่ในการวิเคราะห์ ซึ่งอาจทำให้ได้ผลการเชื่อมโยงที่ผิดพลาดได้ ดังแสดงใน Manhattan plot ของค่าโพแทสเซียมไอออนหลังได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 และ 9 วันที่ไม่พบ significant snps เลย ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากการวิเคราะห์ที่ยังไม่เหมาะสม โดยในการวิเคราะห์การเชื่อมโยงในงานวิจัยนี้ได้ใช้ mixed linear model ในการวิเคราะห์ ดังนั้นอาจต้องปรับใช้ model ใหม่เพื่อไม่ให้เกิด confounder ในข้อมูลได้

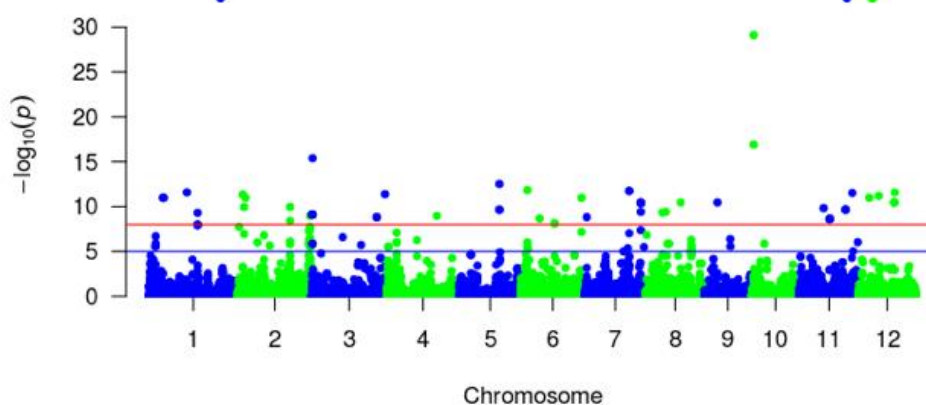


ภาพที่ 11 quantile-quantile plot ของปริมาณโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 6 (A) และ 9 (B) หลังได้รับภาวะเค็ม

3.2.3 ความเชื่อมโยงระหว่างสลิปส์กับอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออน

3.2.3.1 อัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนหลังได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน

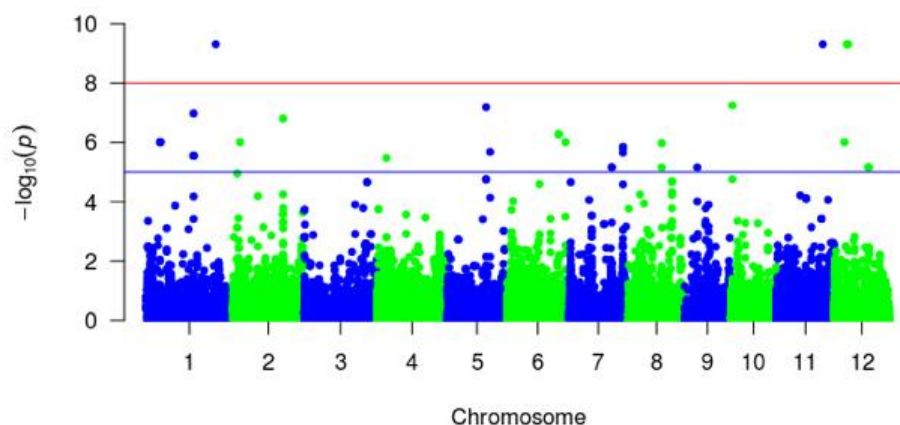
จากการทำ association ระหว่างสลิปส์กับค่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็ม พบ significant SNPs จำนวน 48 สลิปส์ (ตารางที่ 5) ซึ่งเป็นจำนวนมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้พารามิเตอร์อื่นในการหาความเชื่อมโยง โดยสลิปส์เหล่านี้มีค่า $-\log_{10}(P)$ ตั้งแต่ 7 จนถึง 36 กระจายอยู่ในโครโมโซมที่ 1 ถึง 12 ดังแสดงใน Manhattan plot (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 Manhattan plot ของอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในส่วนใบของข้าวเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน

3.2.3.2 อัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนหลังได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน

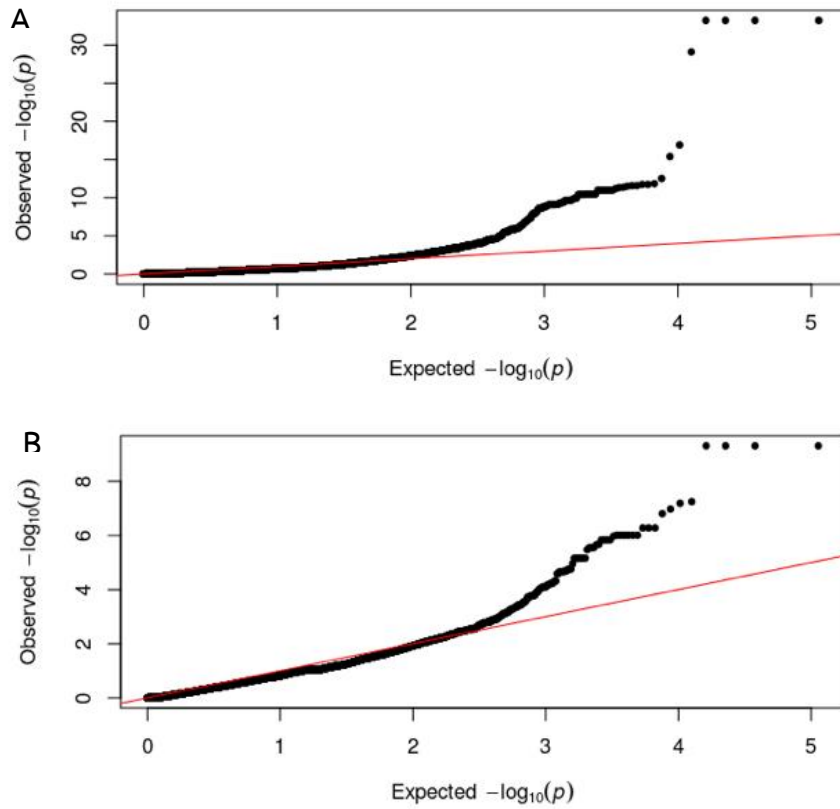
จากการทำ association ระหว่างสลิปส์กับค่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็มพบ significant SNPs ที่มีค่า $-\log_{10}(P)$ ตั้งแต่ 7 จนถึง 36 กระจายอยู่ในโครโมโซมที่ 1 ถึง 12 ดังแสดงใน Manhattan plot (ภาพที่ 13) และพบว่าสลิปส์อยู่ในตำแหน่งของยีน จำนวน 34 ยีน ดังแสดงในตารางที่ 6



ภาพที่ 13 Manhattan plot ของอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในส่วนใบของข้าวเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน

3.2.3.3 quantile-quantile plot

q-q plot ของอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนทั้งในวันที่ 6 และ 9 (ภาพที่ 12) มีลักษณะเดียวกันกับ q-q plot ของปริมาณโซเดียมไอออน ที่มีการกระจายตัวของ observed p-value เป็นแบบ uniform และพบบริเวณที่มีค่า observed p-value สูงกว่า expected p-value ซึ่งเป็นบริเวณที่สนิปส์มีค่า $-\log_{10}(P)$ สูงกว่า significant cut-off ดังแสดงใน Manhattan plot โดยการกระจายตัวที่เป็นปกติของค่า p-value แสดงถึงการวิเคราะห์ความเชื่อมโยงที่เหมาะสม และไม่มี confounder ในข้อมูล



ภาพที่ 14 quantile-quantile plot ของอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 6 (A) และ 9 (B) หลังได้รับภาวะเค็ม

ตารางที่ 5 ตำแหน่งของสลิปส์ที่มีความเชื่อมโยงกับอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในข้าว
ระยะกล้าที่ปลูกในภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน

Trait	Chr	position	Log(P)	ref	alt	Locus	Annotation
Na ⁺ /K ⁺ day6	1	34769930	5.94E-36	G	C	LOC_Os01g60110.1	E2F-related protein, putative, expressed
		6900271	2.44E-14	C	T	LOC_Os01g12540.2	GTPase of unknown function domain containing protein, putative, expressed
		6969721	2.44E-14	G	A	LOC_Os01g12650.1	reticulon domain containing protein, putative, expressed
		6973283	2.44E-14	T	C	LOC_Os01g12660.1	AAA-type ATPase family protein, putative, expressed
		23632353	5.23E-07	A	T	LOC_Os01g41750.1	expressed protein
	2	550105	7.45E-08	C	A	LOC_Os02g01990.1	CCT motif family protein, expressed
		2953738	2.59E-07	A	C	LOC_Os02g05940.1	phytosulfokine receptor precursor, putative, expressed
		2320436	2.78E-18	G	A	LOC_Os02g38380.1	transposon protein, putative, unclassified, expressed
		3697396	2.44E-14	G	A	LOC_Os02g07190.1	expressed protein
		25349420	1.42E-10	C	G	LOC_Os02g42150.2	OsWAK14 - OsWAK receptor-like protein kinase, expressed
		34620453	1.46E-09	C	T	LOC_Os02g56530.1	ankyrin repeat domain containing protein, expressed
	3	350305	2.85E-11	C	T	LOC_Os03g01550.1	expressed protein
		363102	2.85E-11	T	G	LOC_Os03g01580.2	expressed protein
		15071923	6.61E-09	G	A	LOC_Os03g26360.1	expressed protein
		295897	2.85E-11	T	G	LOC_Os03g01420.1	expressed protein
		35674231	7.01E-14	A	T	LOC_Os03g63110.1	prefoldin, putative, expressed
		454855	2.23E-13	A	G	LOC_Os03g01720.1	protein binding protein, putative, expressed
		271735	1.26E-12	T	C	LOC_Os03g01360.1	expressed protein
		31550631	4.29E-10	G	A	LOC_Os03g55460.1	expressed protein
		31686422	4.29E-10	C	G	LOC_Os03g55645.1	expressed protein
	4	24427164	1.97E-09	G	T	LOC_Os04g41189.1	expressed protein
		4876626	1.27E-07	T	A	LOC_Os04g08828.1	cytochrome P450, putative, expressed
		14795350	8.39E-07	G	A	LOC_Os04g25510.1	hypothetical protein
	5	19412122	2.73E-14	A	G	LOC_Os05g33100.1	endo-1,3;1,4-beta-D-glucanase precursor, putative, expressed
	6	29539842	2.44E-14	A	T	LOC_Os06g48810.1	OsHKT2;1 - Na ⁺ transporter, expressed
		3242594	1.07E-10	A	C	LOC_Os06g06860.1	MLA1, putative, expressed
		16442154	3.06E-09	A	G	LOC_Os06g28840.1	expressed protein
		9186770	7.37E-09	G	A	LOC_Os06g16140.1	expressed protein
	7	27144178	7.77E-13	G	A	LOC_Os07g45490.1	expressed protein
	7	27136459	7.11E-08	G	A	LOC_Os07g45480.1	expressed protein
		21516748	1.38E-11	G	A	LOC_Os07g35960.1	expressed protein
		926708	4.29E-10	C	T	LOC_Os07g02570.1	NB-ARC domain containing protein, expressed
	8	16914481	1.10E-13	C	T	LOC_Os08g27759.1	expressed protein
		8020252	2.13E-10	G	A	LOC_Os08g13469.1	expressed protein

Trait	Chr	position	Log(P)	ref	alt	Locus	Annotation
		22044217	7.76E-07	T	A	LOC_Os08g35000.5	ARID/BRIGHT DNA-binding domain containing protein, expressed
	9	6332259	1.10E-13	G	A	LOC_Os09g11380.1	expressed protein
		12593126	6.35E-07	A	C	LOC_Os09g20920.1	expressed protein
	10	1023521	1.52E-24	C	T	LOC_Os10g02644.1	hypothetical protein
	11	23175746	5.94E-36	G	A	LOC_Os11g38920.2	HVA22, putative, expressed
		25807179	6.08E-13	G	A	LOC_Os11g42850.1	expressed protein
		11864234	1.41E-10	G	C	LOC_Os11g20480.1	expressed protein
		14775595	8.04E-10	A	G	LOC_Os11g25900.1	hAT dimerisation domain containing protein, putative
		22525186	4.22E-10	G	A	LOC_Os11g37990.1	chloroplastic group IIA intron splicing facilitator CRS1, chloroplast precursor, putative, expressed
		22534738	4.22E-10	C	G	LOC_Os11g38000.1	NB-ARC domain containing protein, expressed
	12	6912259	5.94E-36	T	C	LOC_Os12g12560.1	NADP-dependent oxidoreductase, putative, expressed
		5048597	2.44E-14	C	T	LOC_Os12g09590.1	leafbladeless1, putative, expressed
		17071124	1.10E-13	G	A	LOC_Os12g28880.1	LTPL110 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor, putative, expressed
		9689490	1.71E-10	C	G	LOC_Os12g16890.1	PROLM28 - Prolamin precursor, expressed

จากการคัดเลือกสลิปส์ที่มีค่า p-value ต่ำกว่าค่า significant cut-off (10^{-7}) ในทุกพารามิเตอร์แล้วรวมจะได้สลิปส์ที่มีความเชื่อมโยงกับฟีโนไทป์อย่างมีนัยสำคัญทั้งหมด จำนวน 59 สลิปส์ พบว่าสลิปส์เหล่านี้กระจายอยู่บนโครโมโซมที่ 1 จนถึงโครโมโซมที่ 12 โดยสลิปส์ส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับปริมาณโซเดียมไอออน และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออน ในขณะที่ไม่พบสลิปส์ที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณโพแทสเซียมไอออนเลย และบางสลิปส์มีความสัมพันธ์กับพารามิเตอร์เดียว ในขณะที่บางสลิปส์มีความสัมพันธ์กับหลายพารามิเตอร์ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 ตำแหน่งของสไนป์ส์ที่มีความเชื่อมโยงกับปริมาณโซเดียมไอออนในข้าวระยะกล้าที่ปลูกใน
ภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน

Trait	Chr	position	Log(P)	ref	alt	Locus	Annotation
Na ⁺ /K ⁺ day9	1	34769930	5.94E-36	G	C	LOC_Os01g60110.1	E2F-related protein, putative, expressed
		6900271	2.44E-14	C	T	LOC_Os01g12540.2	GTPase of unknown function domain containing protein, putative, expressed
		6969721	2.44E-14	G	A	LOC_Os01g12650.1	reticulum domain containing protein, putative, expressed
		6973283	2.44E-14	T	C	LOC_Os01g12660.1	AAA-type ATPase family protein, putative, expressed
		23632353	5.23E-07	A	T	LOC_Os01g41750.1	expressed protein
	2	2320436	2.78E-18	G	A	LOC_Os02g38380.1	transposon protein, putative, unclassified, expressed
		3697396	2.44E-14	G	A	LOC_Os02g07190.1	expressed protein
		25349420	1.42E-10	C	G	LOC_Os02g42150.2	OsWAK14 - OsWAK receptor-like protein kinase, expressed
		12652206	6.92E-10	G	A	LOC_Os02g21320.1	expressed protein
	3	31550631	4.29E-10	G	A	LOC_Os03g55460.1	expressed protein
		31686422	4.29E-10	C	G	LOC_Os03g55645.1	expressed protein
	4	4876626	1.27E-07	T	A	LOC_Os04g08828.1	cytochrome P450, putative, expressed
	5	19412122	2.73E-14	A	G	LOC_Os05g33100.1	endo-1,3;1,4-beta-D-glucanase precursor, putative, expressed
		21474166	3.05E-06	G	C	LOC_Os05g36210.1	expressed protein
	6	29539842	2.44E-14	A	T	LOC_Os06g48810.1	OsHKT2;1 - Na ⁺ transporter, expressed
		16442154	3.06E-09	A	G	LOC_Os06g28840.1	expressed protein
		26069121	8.04E-07	G	A	LOC_Os06g43360.1	expressed protein
	7	27144178	7.77E-13	G	A	LOC_Os07g45490.1	expressed protein
		27136459	7.11E-08	G	A	LOC_Os07g45480.1	expressed protein
		21516748	1.38E-11	G	A	LOC_Os07g35960.1	expressed protein
		926708	4.29E-10	C	T	LOC_Os07g02570.1	NB-ARC domain containing protein, expressed
	8	16914481	1.10E-13	C	T	LOC_Os08g27759.1	expressed protein
		22044217	7.76E-07	T	A	LOC_Os08g35000.5	ARID/BRIGHT DNA-binding domain containing protein, expressed
	9	6332259	1.10E-13	G	A	LOC_Os09g11380.1	expressed protein
		12593126	6.35E-07	A	C	LOC_Os09g20920.1	expressed protein
		6003109	7.45E-05	T	C	LOC_Os09g10300.1	Skp1 family, dimerisation domain containing protein, expressed
	10	1023521	1.52E-24	C	T	LOC_Os10g02644.1	hypothetical protein
	11	23175746	5.94E-36	G	A	LOC_Os11g38920.2	HVA22, putative, expressed
		25807179	6.08E-13	G	A	LOC_Os11g42850.1	expressed protein
		11864234	1.41E-10	G	C	LOC_Os11g20480.1	expressed protein
		14775595	8.04E-10	A	G	LOC_Os11g25900.1	hAT dimerisation domain containing protein, putative
	12	6912259	5.94E-36	T	C	LOC_Os12g12560.1	NADP-dependent oxidoreductase, putative, expressed
		5048597	2.44E-14	C	T	LOC_Os12g09590.1	leafbladeless1, putative, expressed
		17071124	1.10E-13	G	A	LOC_Os12g28880.1	LTPL110 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor, putative, expressed

ตารางที่ 7 สรุปตำแหน่งของสนิปส์ที่มีความเชื่อมโยงกับพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมไอออน
ในข้าวระยะกล้าที่ปลูกในภาวะเค็ม

Trait	Chr	position	Log(P)	ref	alt	Locus	Annotation
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9	1	34769930	5.94E-36	G	C	LOC_Os01g60110.1	E2F-related protein, putative, expressed
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9		18365898	4.89E-15	T	C	LOC_Os01g33350.1	zinc-binding protein, putative, expressed
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		6900271	2.44E-14	C	T	LOC_Os01g12540.2	GTPase of unknown function domain containing protein, putative, expressed
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		6969721	2.44E-14	G	A	LOC_Os01g12650.1	reticulon domain containing protein, putative, expressed
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		6973283	2.44E-14	T	C	LOC_Os01g12660.1	AAA-type ATPase family protein, putative, expressed
Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		23632353	5.23E-07	A	T	LOC_Os01g41750.1	expressed protein
Na ⁺ /K ⁺ day6		550105	7.45E-08	C	A	LOC_Os02g01990.1	CCT motif family protein, expressed
Na ⁺ /K ⁺ day6	2	2953738	2.59E-07	A	C	LOC_Os02g05940.1	phytosulfokine receptor precursor, putative, expressed
Na ⁺ day9		9450252	1.86E-07	C	G	LOC_Os02g16544.1	expressed protein
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		2320436	2.78E-18	G	A	LOC_Os02g38380.1	transposon protein, putative, unclassified, expressed
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		3697396	2.44E-14	G	A	LOC_Os02g07190.1	expressed protein
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		25349420	1.42E-10	C	G	LOC_Os02g42150.2	OsWAK14 - OsWAK receptor-like protein kinase, expressed
Na ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		12652206	6.92E-10	G	A	LOC_Os02g21320.1	expressed protein
Na ⁺ /K ⁺ day6		34620453	1.46E-09	C	T	LOC_Os02g56530.1	ankyrin repeat domain containing protein, expressed
Na ⁺ /K ⁺ day6		3	350305	2.85E-11	C	T	LOC_Os03g01550.1
Na ⁺ /K ⁺ day6	363102		2.85E-11	T	G	LOC_Os03g01580.2	expressed protein
Na ⁺ /K ⁺ day6	15071923		6.61E-09	G	A	LOC_Os03g26360.1	expressed protein

Trait	Chr	position	Log(P)	ref	alt	Locus	Annotation
Na ⁺ /K ⁺ day6	3	295897	2.85E-11	T	G	LOC_Os03g01420.1	expressed protein
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6		35674231	7.01E-14	A	T	LOC_Os03g63110.1	prefoldin, putative, expressed
Na ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day6		454855	2.23E-13	A	G	LOC_Os03g01720.1	protein binding protein, putative, expressed
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		271735	1.26E-12	T	C	LOC_Os03g01360.1	expressed protein
Na ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		31550631	4.29E-10	G	A	LOC_Os03g55460.1	expressed protein
Na ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		31686422	4.29E-10	C	G	LOC_Os03g55645.1	expressed protein
Na ⁺ day9	4	946536	1.77E-07	C	G	LOC_Os04g02550.1	expressed protein
Na ⁺ day9		923565	3.08E-07	T	A	LOC_Os04g02520.1	Leucine Rich Repeat family protein, expressed
Na ⁺ /K ⁺ day6		24427164	1.97E-09	G	T	LOC_Os04g41189.1	expressed protein
Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		4876626	1.27E-07	T	A	LOC_Os04g08828.1	cytochrome P450, putative, expressed
Na ⁺ /K ⁺ day6		14795350	8.39E-07	G	A	LOC_Os04g25510.1	hypothetical protein
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9	5	19412122	2.73E-14	A	G	LOC_Os05g33100.1	endo-1,3;1,4-beta-D-glucanase precursor, putative, expressed
Na ⁺ /K ⁺ day9		21474166	3.05E-06	G	C	LOC_Os05g36210.1	expressed protein
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9	6	29539842	2.44E-14	A	T	LOC_Os06g48810.1	OsHKT2;1 - Na ⁺ transporter, expressed
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6		3242594	1.07E-10	A	C	LOC_Os06g06860.1	MLA1, putative, expressed
Na ⁺ day9		2473056	5.13E-07	T	A	LOC_Os06g05470.1	expressed protein
Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		16442154	3.06E-09	A	G	LOC_Os06g28840.1	expressed protein
Na ⁺ /K ⁺ day6		9186770	7.37E-09	G	A	LOC_Os06g16140.1	expressed protein
Na ⁺ /K ⁺ day9		26069121	8.04E-07	G	A	LOC_Os06g43360.1	expressed protein
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9	7	27144178	7.77E-13	G	A	LOC_Os07g45490.1	expressed protein
Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		27136459	7.11E-08	G	A	LOC_Os07g45480.1	expressed protein

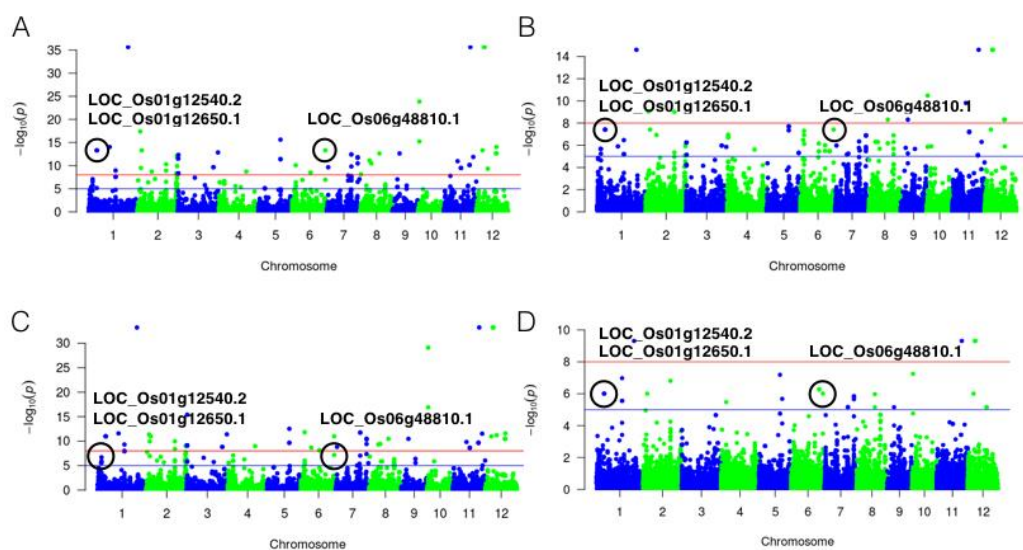
Trait	Chr	position	Log(P)	ref	alt	Locus	Annotation
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9	7	21516748	1.38E-11	G	A	LOC_Os07g35960.1	expressed protein
Na ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		926708	4.29E-10	C	T	LOC_Os07g02570.1	NB-ARC domain containing protein, expressed
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9	8	16914481	1.10E-13	C	T	LOC_Os08g27759.1	expressed protein
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6		8020252	2.13E-10	G	A	LOC_Os08g13469.1	expressed protein
Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		22044217	7.76E-07	T	A	LOC_Os08g35000.5	ARID/BRIGHT DNA-binding domain containing protein, expressed
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9	9	6332259	1.10E-13	G	A	LOC_Os09g11380.1	expressed protein
Na ⁺ day9		4401343	1.63E-07	G	A	LOC_Os09g08440.1	nodulin MtN3 family protein, putative, expressed
Na ⁺ /K ⁺ day6		12593126	6.35E-07	A	C	LOC_Os09g20920.1	expressed protein
Na ⁺ /K ⁺ day9		6003109	7.45E-05	T	C	LOC_Os09g10300.1	Skp1 family, dimerisation domain containing protein, expressed
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9	10	1023521	1.52E-24	C	T	LOC_Os10g02644.1	hypothetical protein
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9	11	23175746	5.94E-36	G	A	LOC_Os11g38920.2	HVA22, putative, expressed
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		25807179	6.08E-13	G	A	LOC_Os11g42850.1	expressed protein
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9		11864234	1.41E-10	G	C	LOC_Os11g20480.1	expressed protein
Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9							
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		14775595	8.04E-10	A	G	LOC_Os11g25900.1	hAT dimerisation domain containing protein, putative
Na ⁺ /K ⁺ day6	22525186	4.22E-10	G	A	LOC_Os11g37990.1	chloroplastic group IIA intron splicing facilitator CRS1, chloroplast precursor, putative, expressed	

Trait	Chr	position	Log(P)	ref	alt	Locus	Annotation
Na ⁺ /K ⁺ day6	11	22534738	4.22E-10	C	G	LOC_Os11g38000.1	NB-ARC domain containing protein, expressed
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9	12	6912259	5.94E-36	T	C	LOC_Os12g12560.1	NADP-dependent oxidoreductase, putative, expressed
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9		17420950	4.89E-15	C	A	LOC_Os12g29350.1	ATP binding protein, putative, expressed
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		5048597	2.44E-14	C	T	LOC_Os12g09590.1	leafbladeless1, putative, expressed
Na ⁺ day6 Na ⁺ day9 Na ⁺ /K ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day9		17071124	1.10E-13	G	A	LOC_Os12g28880.1	LTPL110 - Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor, putative, expressed
Na ⁺ day6 Na ⁺ /K ⁺ day6		9689490	1.71E-10	C	G	LOC_Os12g16890.1	PROLM28 - Prolamin precursor, expressed

4. ระดับการแสดงออกของยีนที่ได้จาก genome-wide association study ในข้าวระยะกล้าที่ได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม

4.1 การเลือกยีนที่จะนำมาศึกษาการระดับการแสดงออกของยีนในข้าวระยะกล้าที่ได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม

จากผลการศึกษาความเชื่อมโยงทั่วจีโนมของพารามิเตอร์ทั้งสามพารามิเตอร์ ได้แก่ ปริมาณโซเดียมไอออน ปริมาณโพแทสเซียมไอออน และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในข้าวที่ได้รับภาวะเค็มในข้อ 3 ทำให้ได้สนิปส์ที่มีตำแหน่งตรงกับยีนทั้งหมด 59 ยีน (ตารางที่ 3) จากนั้นเลือกเพียง 3 ยีน มาศึกษาการระดับการแสดงออกในข้าวระยะกล้าที่ได้รับภาวะเค็ม โดยนำตำแหน่งของแต่ละยีนไปค้นหา QTL ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนเค็มในฐานข้อมูล QTL Annotation Rice Online Database (Q-TARO) พบว่ามี 2 ยีนที่ตรงกับตำแหน่ง QTL ที่เกี่ยวข้องกับความทนเค็ม ได้แก่ LOC_Os01g12540.2 (GTPase of unknown function domain containing protein) และ LOC_Os01g12650.1 (reticulon domain containing protein) และเลือกอีก 1 ยีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเข้าออกของไอออนในเซลล์ ได้แก่ LOC_Os06g48810.1 (OsHKT2;1 - Na⁺ transporter) จากการศึกษาความเชื่อมโยงทั่วจีโนมพบว่าทั้งสามยีนที่เลือกข้างต้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณโซเดียมไอออนและอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนทั้งในวันที่ 6 และ 9 หลังได้รับภาวะเค็ม โดยแสดงตำแหน่งสนิปส์ของยีนทั้งสามที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับฟีโนไทป์ดังกล่าวใน Manhattan plot (ภาพที่ 15) การศึกษาการระดับการแสดงออกของยีนทั้งสามในระดับ transcription ทำในข้าว 4 พันธุ์ ได้แก่ Pokkali ลายหมาก เหลืองแก้ว และกำเพ็ญ ที่ปลูกในภาวะปกติ และภาวะเค็มโดยให้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 3 และ 6 วัน

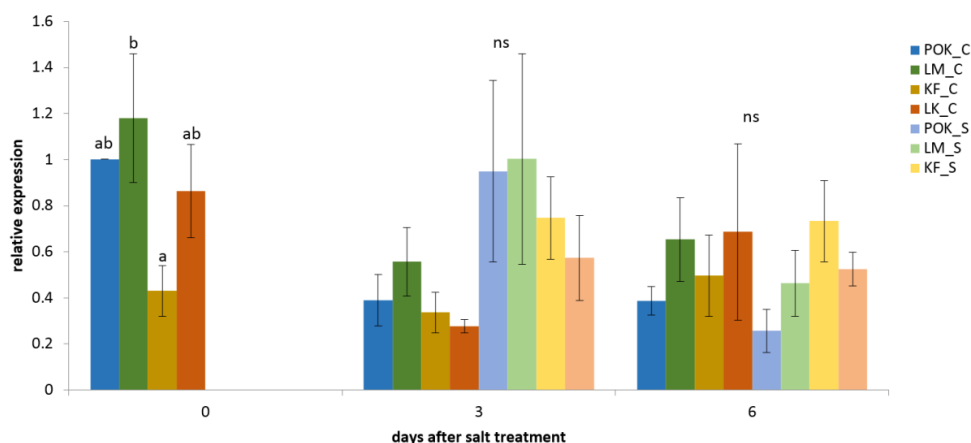


ภาพที่ 15 ตำแหน่งสนิปส์ของยีนที่เลือกใช้ในการศึกษาระดับการแสดงออกบนแผนภาพ

Manhattan plot ที่แสดงความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ต่างๆ ได้แก่ ปริมาณโซเดียมไอออนในวันที่ 6 (A) และ 9 (B) หลังได้รับภาวะเค็ม และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 6 (C) และ 9 (D) หลังได้รับภาวะเค็ม

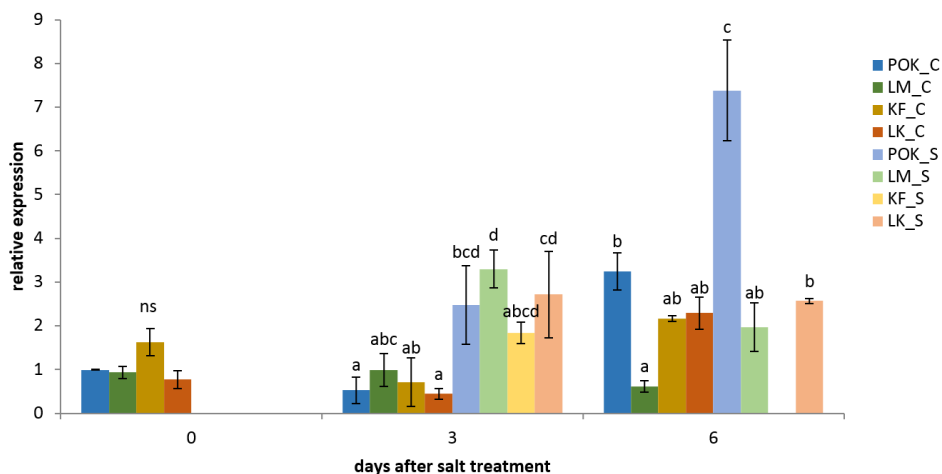
4.2 ระดับการแสดงออกของยีนทั้งสามยีนในข้าวระยะกล้าที่ได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม

จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน GTPase of unknown function domain containing protein ที่ตำแหน่ง LOC_Os01g12540.2 พบว่าในวันที่ 0 ที่ยังไม่มีการให้ภาวะเค็มกับข้าว ข้าวทั้ง 4 พันธุ์มีระดับการแสดงออกของยีนนี้ที่แตกต่างกันเล็กน้อย โดยข้าวพันธุ์ Pokkali ปลายหมาก และเหลืองแก้ว มีระดับการแสดงออกใกล้เคียงกัน ได้แก่ 1.18 และ 0.86 ตามลำดับ โดยพันธุ์ที่มีระดับการแสดงออกสูงที่สุดคือ ปลายหมาก ในขณะที่ข้าวพันธุ์กำแพงเมืองมีระดับการแสดงออกต่ำที่สุดเท่ากับ 0.43 เมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 3 วัน พบว่าระดับการแสดงออกของยีนนี้ในข้าวที่ได้รับภาวะเค็มสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับภาวะปกติ แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเช่นเดียวกันกับระดับการแสดงออกของยีนในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็มที่พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 16)



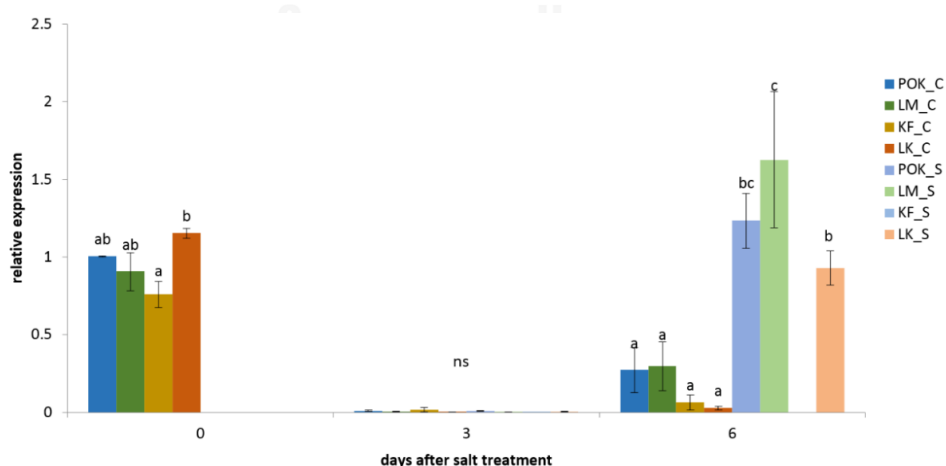
ภาพที่ 16 การแสดงออกของยีน LOC_Os01g12540.2 ในข้าวระยะกล้าที่ปลูกในภาวะปกติ (C) และภาวะเครียดจากความเค็ม (S) เป็นเวลา 3 และ 6 วัน

ผลการแสดงออกของยีน reticulon domain containing protein ที่ตำแหน่ง LOC_Os01g12650.1 ในวันที่ 0 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของระดับการแสดงออกของยีนนี้ในข้าวทั้ง 4 พันธุ์ แต่จะพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อข้าวได้รับภาวะเครียดจากความเค็มทั้ง 3 และ 6 วัน โดยในวันที่ 3 หลังได้รับภาวะเค็มพบว่าระดับการแสดงออกของยีนในข้าวชุดที่ได้รับภาวะเค็มสูงกว่าในภาวะปกติ และข้าวพันธุ์ลายหมากมีการแสดงออกของยีนสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอีก 3 พันธุ์ทั้งในภาวะปกติและภาวะเค็ม นอกจากนี้ยังพบว่าข้าวพันธุ์กำเพ็ญมีการแสดงออกของยีนในระดับต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวอีก 3 พันธุ์ในชุดที่ได้รับภาวะเค็ม ส่วนในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็มพบว่าข้าวพันธุ์ Pokkali ที่ได้รับภาวะเค็มมีระดับการแสดงออกของยีนสูงมากที่สุดถึง 7.38 ± 1.15 ในขณะที่ข้าวพันธุ์ลายหมากในภาวะปกติมีระดับการแสดงออกต่ำที่สุดเท่ากับ 0.62 ± 0.13 แต่ไม่มีข้อมูลของข้าวพันธุ์กำเพ็ญเนื่องจากข้าวพันธุ์นี้ตายในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็ม



ภาพที่ 17 การแสดงออกของยีน LOC_Os01g12650.1 ในข้าวระยะกล้าที่ปลูกในภาวะปกติ (C) และภาวะเครียดจากความเค็ม (S) เป็นเวลา 3 และ 6 วัน

ระดับการแสดงออกของยีน OsHKT2;1 - Na⁺ transporter ที่ตำแหน่ง LOC_Os06g48810.1 ในวันที่ 0 พบว่าข้าวทั้ง 4 พันธุ์ มีระดับการแสดงออกของยีนนี้ที่ใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับกับในวันที่ 3 ที่ระดับการแสดงออกของยีนนี้ในข้าวทุกพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และข้าวในภาวะปกติวันที่ 6 ก็ยังคงมีการแสดงออกของยีนนี้ในระดับใกล้เคียงกัน แต่ขณะเดียวกัน ข้าวชุดที่ได้รับภาวะเค็มในวันที่ 6 มีระดับการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพันธุ์ที่มีระดับการแสดงออกสูงที่สุด ได้แก่ พันธุ์ลายหมาก ในขณะที่ข้าวพันธุ์ Pokkali และเหลืองแก้ว มีระดับการแสดงออกที่ใกล้เคียงกัน ส่วนข้าวพันธุ์กำแพงเตี้ยเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน ทำให้ไม่มีข้อมูลการแสดงออกของยีนนี้ในข้าวที่ได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน



ภาพที่ 18 การแสดงออกของยีน LOC_Os06g48810.1 ในข้าวระยะกล้าที่ปลูกในภาวะปกติ (C) และภาวะเครียดจากความเค็ม (S) เป็นเวลา 3 และ 6 วัน

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

1. ผลของความเค็มในดินที่มีต่อปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในระยะกล้าของข้าว

พื้นเมืองไทย

จากผลการศึกษาปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในเนื้อเยื่อส่วนต้นของข้าวพื้นเมืองไทยและข้าวปรับปรุงพันธุ์ทั้ง 80 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ปลูกในภาวะปกติ และภาวะเค็มในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 115 มิลลิโมลาร์ ที่ทำให้ดินมีความเค็มอยู่ในระดับ 9 เดซิซีเมนต่อเมตร ซึ่งเป็นความเค็มระดับสูง พบว่าข้าวแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกันของปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนตั้งแต่ในภาวะปกติ แต่เมื่อได้รับภาวะเค็มปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนในเนื้อเยื่อส่วนต้นของข้าวทุกพันธุ์มีค่าเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม โดยข้าวทั้ง 80 พันธุ์/สายพันธุ์ มีปริมาณโซเดียมไอออนเพิ่มสูงขึ้นจากภาวะปกติ โดยระดับการเพิ่มสูงขึ้นจะแตกต่างกันไปในแต่ละพันธุ์ ข้าวพันธุ์ที่มีปริมาณโซเดียมไอออนเพิ่มสูงขึ้นมากหลังจากได้รับภาวะเค็ม ได้แก่ พันธุ์ขี้ตมพัน (หมายเลข 48) ในวันที่ 6 และ ขาวคด (หมายเลข 30) กำเพ็อง (หมายเลข 155) และบุญมา (หมายเลข 135) ในวันที่ 9 หลังจากได้รับภาวะเค็ม ในขณะที่ข้าวพันธุ์ Pokkali ซึ่งเป็นพันธุ์มาตรฐานทนเค็มมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณโซเดียมไอออนต่ำที่สุดในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็ม ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์ UBNO2123-50R-B-3 มีปริมาณโซเดียมไอออนสูงที่สุดเมื่อได้รับภาวะเค็มทั้ง 6 และ 9 วัน เนื่องจากสายพันธุ์ UBNO2123-50R-B-3 เป็นข้าวที่ปลูกในชุดการทดลองที่แตกต่างจากอีก 79 พันธุ์ที่เหลือ และสภาพภูมิอากาศขณะที่เก็บผลการทดลองในชุดการทดลองทั้งสองมีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลต่อปริมาณโซเดียมไอออนที่เข้าสู่ต้นพืชได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน การเพิ่มขึ้นของปริมาณโซเดียมไอออนนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาในบาร์เล่ย์ (Yousufinia และคณะ, 2013) และข้าวพันธุ์อื่นๆ (Morales และคณะ, 2012; Hakim และคณะ, 2014) ปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนที่วิเคราะห์ได้นั้นสอดคล้องกับในงานวิจัยอื่นโดยเปรียบเทียบจากข้าวพันธุ์มาตรฐาน คือ Pokkali และ IR29 เช่น ในงานวิจัยของ Ninsuwan และคณะ (2013) ที่ให้ภาวะเค็มแก่ข้าวด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 103 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 10 วัน พบว่าข้าวพันธุ์ Pokkali มีปริมาณโซเดียมไอออนในภาวะปกติและภาวะเค็มเท่ากับ 2 และ 14.4 ug/gDW ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับในงานวิจัยนี้ที่พบว่าปริมาณโซเดียมไอออนของข้าวพันธุ์ Pokkali ในภาวะปกติและภาวะเค็มในวันที่ 9 มีค่าเท่ากับ 3.4 และ 7.2 ug/gDW ตามลำดับ ในขณะที่ข้าวพันธุ์ IR29 มีปริมาณโซเดียมไอออนในภาวะปกติและภาวะเค็ม เท่ากับ 5 และ 23.5 ug/gDW ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับในงานวิจัยนี้ที่ข้าวพันธุ์ IR29 มีปริมาณโซเดียมไอออนในภาวะปกติและภาวะเค็มเท่ากับ 4.4 และ 15.4 ug/gDW ตามลำดับ

ในขณะเดียวกันจากผลการทดลองพบว่าเมื่อข้าวได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 และ 9 วัน ปริมาณโพแทสเซียมไอออนในเนื้อเยื่อส่วนต้นของข้าวเกือบทุกพันธุ์มีค่าลดลงจากปริมาณโพแทสเซียมไอออนในภาวะปกติ ข้าวพันธุ์ กข19 และ น้ำสะกุก 19 เป็นข้าวพันธุ์ที่มีปริมาณ

โพแทสเซียมไอออนลดลงมากที่สุดในวันที่ 6 และ 9 หลังได้รับภาวะเค็มเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อื่นๆ ที่ทำการศึกษา การลดลงของปริมาณโพแทสเซียมไอออนในเนื้อเยื่อส่วนต้นของข้าวเมื่อได้รับภาวะเค็มนั้นสอดคล้องกับในงานวิจัยที่ได้ศึกษาปริมาณโพแทสเซียมไอออนในบาร์เลย์ (Yousufinia และคณะ, 2013) มันฝรั่ง (Jaarsma และคณะ, 2013) และข้าว (Hakim และคณะ, 2014) ที่พบว่าปริมาณโพแทสเซียมไอออนลดลงเมื่อได้รับภาวะเค็ม สำหรับอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออน (Na^+/K^+ ratio) นั้นเป็นพารามิเตอร์ที่พิจารณาทั้งปริมาณของโซเดียมไอออน และโพแทสเซียมไอออนควบคู่กันไป จึงสามารถนำไปใช้ในการพิจารณาความสามารถในการทนต่อภาวะเค็มของข้าวได้และมีการนำไปใช้กันอย่างแพร่หลาย ข้าวพันธุ์ที่มีค่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนที่ต่ำหมายความว่าพันธุ์ที่มีกลไกการจัดการไอออนได้ดีเมื่อพืชเจริญอยู่ในสภาพดินเค็ม โดยอาจมีการปรับการนำโซเดียมไอออนในดินเข้าสู่เซลล์ รวมถึงการรักษาสมดุลของโพแทสเซียมไอออนอีกด้วย (ดวงใจ สุริยาอรุณโรจน์, 2546) ผลการทดลองพบว่าเมื่อได้รับภาวะเค็ม ข้าวเกือบทุกพันธุ์จะมีอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับค่าอัตราส่วนในภาวะปกติ และมีค่าสูงกว่า 1 ซึ่งหมายความว่าโซเดียมไอออนมีปริมาณสูงกว่าโพแทสเซียมไอออน โดยข้าวพันธุ์ที่มีอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนสูงขึ้นมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์อื่นที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ จำปาทอง (หมายเลข 159) พลายงามปราจีนบุรี (หมายเลข 193) ชั้ตมพัน (หมายเลข 48) และกำเพ็อง (หมายเลข 155) โดยจะเห็นว่าข้าวพันธุ์ชั้ตมพัน และกำเพ็อง เป็นพันธุ์ที่มีโซเดียมไอออนเพิ่มสูงขึ้นมากที่สุดหลังได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 และ 9 วันตามลำดับ การเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับในงานวิจัยของ Dionisio-Sese และ Tobita ที่ใช้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ต่ำกว่าในการศึกษา (60 และ 120 มิลลิโมลาร์) พบว่าข้าวเกือบทุกพันธุ์ยังคงมีอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมเพิ่มขึ้นในภาวะเค็ม เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในภาวะปกติ (Dionisio-Sese และ Tobita, 2000)

ในภาวะที่ดินมีความเข้มข้นของเกลือสูง ปริมาณโซเดียมไอออนในสารละลายดินจึงมีความเข้มข้นสูงตามไปด้วย ดังนั้นโซเดียมไอออนจึงผ่านเข้าสู่รากได้ทาง non-selective cation channels (NSCC) และ Na^+ transporter บางชนิด เช่น high-affinity K^+ transporter (HKT) เมื่อโซเดียมไอออนในเซลล์รากมีปริมาณมากเกินไปจะถูกส่งผ่านทาง apoplast ไปยังไซเล็มและส่งต่อไปยังเนื้อเยื่อส่วนใบในที่สุด เมื่อโซเดียมไอออนที่สะสมในส่วนใบมีปริมาณที่สูงเกินไปจนถึงระดับที่เป็นพิษต่อเซลล์ จะก่อให้เกิด ionic stress ที่ส่งผลให้ใบแก่ของพืชตาย และหากอัตราการสร้างใบใหม่ลดลง ในขณะที่ใบแก่ตายไปเรื่อยๆ จะส่งผลกระทบต่อ การสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชจนกระทั่งพืชไม่สามารถสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตได้เพียงพอต่อความต้องการในการสร้างใบ สุดท้ายอัตราการเจริญเติบโตของพืชจึงลดลงในที่สุด

นอกจากนี้ผลจากการที่มีโซเดียมไอออนสูงบริเวณรากก็จะเกิด osmotic stress ที่ส่งผลให้อัตราการเจริญของส่วนต้นลดลงทันทีที่พืชรับรู้ได้ถึงภาวะเครียดจากความเค็ม ซึ่งผลกระทบนี้จะส่งผลกระทบต่อพืชก่อนที่จะเกิด ionic stress (Munns และ Tester, 2008) ทั้งนี้โพแทสเซียมไอออนก็เป็นธาตุอาหารหลักของพืชที่สำคัญในกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น การทำงานของเอนไซม์ การสร้างแรงดันของเซลล์ ควบคุมการเปิดปิดของปากใบ รวมถึงควบคุมสมดุลของแรงดันออสโมติก (Shabala,

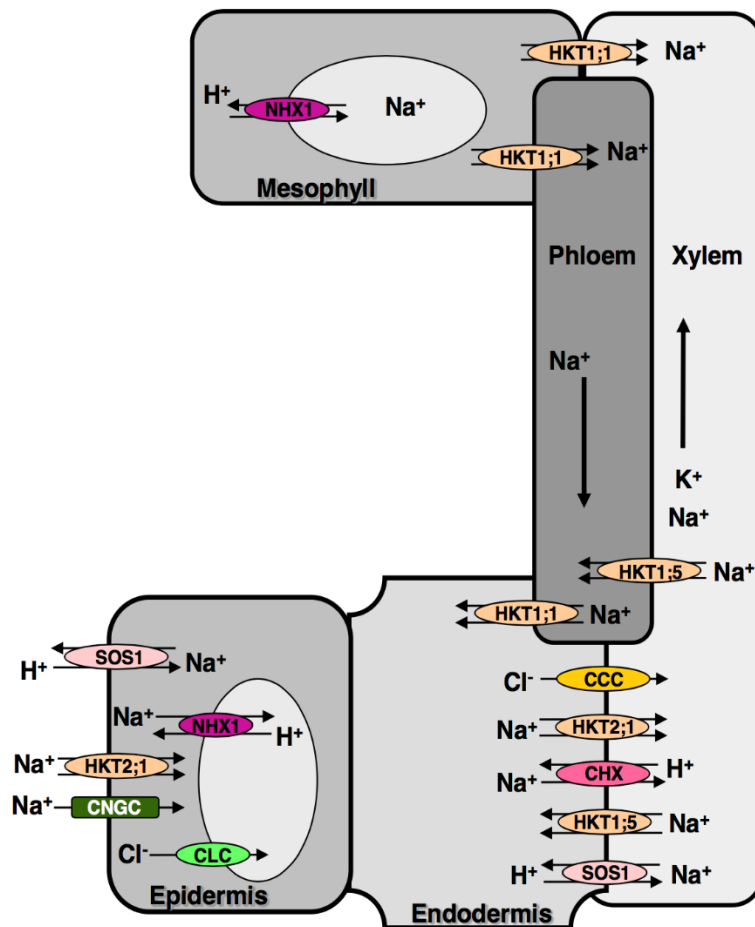
2003) แต่เมื่อพืชเจริญอยู่ในภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง ปริมาณโซเดียมไอออนที่สูงจะส่งผลกระทบต่อการนำเข้าของแร่ธาตุที่จำเป็นโดยแย่งจับกับ transporter ที่ทำหน้าที่นำเอาไอออนบวกจากดินเข้าสู่เซลล์ราก โดยเฉพาะ transporter ที่นำเข้าโพแทสเซียมไอออน เช่น Potassium uptake permease (KUP) และ High Affinity K (HAK) เป็นต้น (Grabov, 2007) ดังนั้นเซลล์จึงไม่สามารถรักษาระดับของโพแทสเซียมไอออนไว้ได้เมื่อมีปริมาณของโซเดียมไอออนสูงมากจนเกินไป

แต่ในการศึกษานี้พบว่าข้าวบางพันธุ์ที่มีลักษณะการสะสมไอออนที่แตกต่างออกไปจากข้าวส่วนใหญ่ที่ใช้ในการศึกษา โดยพบว่าปริมาณของโซเดียมไอออนลดลงในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็ม เช่น พันธุ์สังข์หยด (หมายเลข 110) กข10 (หมายเลข 156) และชุมแพ 60 (หมายเลข 189) แสดงให้เห็นว่าข้าวพันธุ์เหล่านี้อาจมีกระบวนการบางอย่างที่ใช้ในการลดปริมาณโซเดียมไอออนที่เข้ามาสู่เนื้อเยื่อส่วนต้น หรือกำจัดโซเดียมไอออนออกจากเนื้อเยื่อส่วนต้นได้เมื่อพืชเจริญอยู่ในภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไอออนสูง ในขณะที่เดียวกันยังมีข้าวบางพันธุ์ที่มีปริมาณโพแทสเซียมไอออนสูงขึ้นเมื่อได้รับภาวะเค็ม ได้แก่ ข้าวพันธุ์ กข10 (หมายเลข 156) กข21 (หมายเลข 157) กข25 (หมายเลข 158) และสายพันธุ์ UBN02123-50R-B-3 (หมายเลข 208) ในวันที่ 6 และข้าวพันธุ์ขาวคุด (หมายเลข 30) ลายหมาก (หมายเลข 170) เหนียวดำหลาย (หมายเลข 194) แก่นจันทร์ (หมายเลข 201) และสายพันธุ์ UBN02123-50R-B-3 (หมายเลข 208) ในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็ม สอดคล้องกับงานวิจัยของ Morales และคณะ ที่ศึกษาปริมาณโพแทสเซียมไอออนในข้าวพื้นเมืองของประเทศเยอรมันจำนวน 2 พันธุ์ พบว่าข้าวพันธุ์ที่ทนเค็มมีปริมาณโพแทสเซียมไอออนเพิ่มขึ้นหลังได้รับภาวะเค็ม ดังนั้นข้าวพันธุ์เหล่านี้น่าจะมีกลไกในการป้องกันไม่ให้อิออนโซเดียมไอออนได้ในขณะได้รับภาวะเค็ม (Morales และคณะ, 2012) โดยหนึ่งในกลไกของข้าวในกระบวนการ osmotic adjustment ก็คือการนำโพแทสเซียมไอออนเข้าสู่เซลล์มากขึ้น (Diédhiou, 2006) มีการศึกษาใน mutant ของข้าวสาธิตพบว่าเมื่อมีปริมาณโพแทสเซียมไอออนสะสมในส่วนใบมาก จะทำให้ต้น mutant มีความทนเค็มสูงกว่าต้น wild type (Rascio และคณะ, 2001) นอกจากนี้ในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็มยังพบว่าข้าวบางพันธุ์ ได้แก่ Pokkali (หมายเลข 101) พวงหางนาค (หมายเลข 53) นางนวล (หมายเลข 105) กข10 (หมายเลข 152) กข25 (หมายเลข 158) ลายหมาก (หมายเลข 170) และสุพรรณบุรี 60 (หมายเลข 190) มีอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนต่ำกว่า 1 อีกด้วย โดยเฉพาะ Pokkali ที่มีอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนต่ำที่สุดถึง 0.4766 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dionisio-Sese and Tobita (2000) ที่พบว่าข้าวพันธุ์ Pokkali ที่ปลูกในอาหารที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 60 และ 120 มิลลิโมลาร์ยังคงมีอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไม่เกิน 0.5 ทั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถของข้าวพันธุ์เหล่านี้ในการจัดการและรักษาสมดุลของไอออนได้ในขณะที่เจริญอยู่ในภาวะเครียดจากความเค็ม และเป็นที่น่าสนใจว่าข้าวพันธุ์ กข10 กข25 และ ลายหมาก เป็นพันธุ์ที่มีปริมาณโพแทสเซียมไอออนสูงขึ้นหลังได้รับภาวะเค็มอีกด้วย นอกจากนี้การศึกษาอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในข้าวแล้ว ยังมีการศึกษาในพืชชนิดอื่นที่ได้รับภาวะเค็ม เช่น ในงานวิจัยที่ศึกษาใน turfgrass พันธุ์ทนและไม่ทนเค็ม พบว่าเมื่อได้รับภาวะเค็ม โดยให้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 170 มิลลิโมลาร์ อัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนของพันธุ์ทนเค็มมีค่าต่ำกว่า 1 ในขณะที่พันธุ์ไม่ทนเค็มมีค่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียม

ไอออนสูงกว่า 1 แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการจำกัดโซเดียมไอออนที่เข้าสู่เซลล์ได้ต่างกัน (Torello และ Rice, 1986)

ความแปรผันทางพันธุกรรมส่งผลให้ข้าวแต่ละพันธุ์มีความสามารถในการจัดการกับโซเดียมไอออนที่เข้าสู่เซลล์เมื่อพืชอยู่ในภาวะเครียดจากความเค็มและมีความสามารถในการทนต่อความเค็มในดินได้แตกต่างกัน ข้าวพันธุ์ทนเค็มจะมีความสามารถในการจัดการกับโซเดียมไอออนในไซโทซอลเพื่อไม่ให้มีปริมาณมากเกินไปจนแย่งจับบริเวณ active site ของเอนไซม์ต่าง ๆ ทำให้เอนไซม์เหล่านั้นทำงานผิดปกติ และสูญเสียประสิทธิภาพไปได้ กระบวนการจัดการไอออนจะเกิดขึ้นตั้งแต่เซลล์บริเวณรากที่สัมผัสกับเกลือโดยตรง เมื่อเซลล์รากรับรู้ถึงปริมาณโซเดียมไอออนที่เพิ่มขึ้นจากภายนอกจะต้องมีกระบวนการเพื่อป้องกันตัวเองรวมทั้งส่งสัญญาณไปยังส่วนต้นให้เปลี่ยนแปลงกลไกบางอย่างเพื่อรับมือกับภาวะเค็มที่กำลังเกิดขึ้น โดยเริ่มต้นจากการรับรู้ถึงโซเดียมไอออนรอบเซลล์ราก ทำให้แคลเซียมไอออนในไซโทซอลเพิ่มขึ้น และเป็นสัญญาณให้โปรตีนที่มีชื่อว่า SOS3 เกิดการจับกับ SOS2 และไปกระตุ้นการทำงานของ SOS1 ที่เป็น Na^+/H^+ antiporter บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์โดยกระบวนการ phosphorylation ดังนั้นโซเดียมไอออนจึงถูกขับออกจากเซลล์ในที่สุด

แต่อย่างไรก็ตามโซเดียมไอออนที่ยังคงเหลืออยู่ในเซลล์รากสามารถถูกกำจัดได้โดยนำไปเก็บไว้ในแวคิวโอลหรือส่งไปยังส่วนต้น การขับเอาโซเดียมไอออนไปเก็บในแวคิวโอลนั้นทำได้โดยอาศัย transporter ที่อยู่บนเยื่อหุ้มแวคิวโอล (โทโนพลาสต์) ที่มีชื่อว่า NHX1 โดยเป็น Na^+/H^+ antiporter ที่ทำงานร่วมกับ Vacuolar H^+ -translocating pyrophosphatase หรือ AVP1 ที่อยู่บนโทโนพลาสต์ โดยใช้พลังงานปั๊มโปรตอนเข้าไปยังแวคิวโอลเพื่อให้เกิด H^+ gradient ที่ใช้ในการขนส่งโซเดียมไอออนจากไซโทซอลผ่านโทโนพลาสต์ไปยังแวคิวโอลเพื่อให้ปริมาณโซเดียมไอออนในไซโทซอลมีปริมาณต่ำลง (Diédhiou, 2006) โดย Kader and Lindberg (2005) พบว่าข้าวพันธุ์ทนเค็ม (Pokkali) จะอาศัย Na^+/H^+ antiporter ที่อยู่บนโทโนพลาสต์ในการนำโซเดียมไอออนในไซโทซอลเข้าไปเก็บในแวคิวโอลเป็นหลักเมื่ออยู่ในภาวะเค็ม ทำให้ควบคุมการนำโซเดียมไอออนเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าพันธุ์ไม่ทนเค็ม (BRRI Dhan29) โดยเฉพาะการจัดการโซเดียมไอออนในบริเวณรากที่เป็นบริเวณแรกที่โซเดียมไอออนจากดินจะสามารถเข้ามาสู่เซลล์ พบว่าข้าวพันธุ์ทนเค็มจะมีกลไกในการจำกัดการนำโซเดียมไอออนเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าพันธุ์ไม่ทนเค็ม (Kavitha และคณะ, 2012) เช่นเดียวกันกับการแสดงออกของยีน *OsNHX1* พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งในข้าวพันธุ์ Pokkali และ IR29 ที่เป็นพันธุ์ทนและไม่ทนเค็มตามลำดับ แต่การแสดงออกในพันธุ์ IR29 นั้นลดลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ในพันธุ์ Pokkali ยังคงมีการแสดงออกต่อเนื่องตามเวลาที่ให้ภาวะเค็ม ส่งผลให้พันธุ์ Pokkali สามารถทนต่อภาวะเค็มได้ดีกว่า IR29 (Diédhiou, 2006)



ภาพที่ 19 การทำงานของ transporter ที่เกี่ยวข้องกับการส่งโซเดียมไอออนเข้าและออกจากเซลล์

นอกจากนี้การควบคุมการแสดงออกของ *HKT* gene family ยังเป็นส่วนสำคัญในการจัดการโซเดียมไอออนที่เข้าสู่เซลล์อีกด้วย *HKT1* เป็น low-affinity Na⁺ transporter ที่พบมากในส่วนรากและมีส่วนในการนำโซเดียมไอออนเข้าสู่เซลล์ของข้าวสาลี (Horie และคณะ, 2001) *Arabidopsis* (Uozumi และคณะ, 2000) รวมถึงข้าว ที่พบว่ายีน *OsHKT1* มีการแสดงออกลดลงในข้าวพันธุ์ Pokkali และ IR29 ที่อยู่ในภาวะเครียดจากความเค็ม โดยข้าวพันธุ์ Pokkali ที่เป็นพันธุ์ทนเค็มมีระดับการแสดงออกของยีน *OsHKT1* ลดลงมากกว่า IR29 ที่เป็นพันธุ์ไม่ทนเค็ม แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของการควบคุมระดับโซเดียมไอออนที่เข้าสู่เซลล์ และส่งผลต่อระดับความทนเค็มที่ต่างกัน ข้าวทั้งสองพันธุ์ (Gollmack และคณะ, 2002) ดังนั้นข้าวพันธุ์ที่มีกลไกต่าง ๆ ดังที่ได้กล่าวมานี้ จะมีความสามารถในการควบคุมปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนที่สะสมในเซลล์ได้ดีและเป็นผลให้ข้าวพันธุ์เหล่านี้มีความทนต่อภาวะเค็ม

2. ความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่าง Na^+/K^+ กับ Stability index

จากผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของข้าวกับพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมไอออน ได้แก่ ปริมาณโซเดียมไอออน ปริมาณโพแทสเซียมไอออน และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในเนื้อเยื่อส่วนต้นของข้าวทั้ง 80 พันธุ์/สายพันธุ์ พบว่ามีเพียงปริมาณโซเดียมไอออน และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนที่มีความสัมพันธ์กับพารามิเตอร์ของค่าการเจริญ ในขณะที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญใดๆ กับปริมาณโพแทสเซียมไอออนเลย โดยค่าดัชนีความเสียหายจากความเค็ม หรือ Salt injury score (SIS) นั้นเป็นพารามิเตอร์เดียวที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการสะสม ขณะที่พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญอื่นๆ เช่น เสถียรภาพเยื่อหุ้มเซลล์ หรือ cell membrane stability (CMS) นั้นมีความสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณโซเดียมไอออน และน้ำหนักรากและแห้งส่วนต้นและรากนั้นมีความสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณโซเดียมไอออน

เมื่อความเข้มข้นของเกลือในสารละลายดินสูงจนถึงระดับที่ส่งผลให้เกิดภาวะเครียดต่อความเค็มในพืช โซเดียมไอออนปริมาณมากจะถูกนำเข้าสู่เซลล์บริเวณรากซึ่งก่อให้เกิดภาวะเครียด 2 ระดับในพืช คือ osmotic stress ซึ่งเกิดในทันทีเมื่อสารละลายเกลือบริเวณรอบๆ รากมีความเข้มข้นถึงระดับที่ก่อให้เกิดภาวะเครียดจากความเค็มเป็นเวลาไม่กี่ชั่วโมงจนถึงไม่กี่วัน ความเข้มข้นของโซเดียมไอออนในเซลล์ที่สูงทำให้พืชไม่สามารถรักษาน้ำในเซลล์ไว้ได้ ส่งผลให้อัตราการเจริญของใบลดลง รวมถึงการสร้างใบใหม่ช้าลง ดังนั้นอัตราการเจริญส่วนต้นจึงลดลง ต่อมา ionic stress จะเกิดขึ้นเมื่อพืชได้รับภาวะเครียดจากความเค็มเป็นระยะเวลานานขึ้นจนใบแก่สะสมโซเดียมไอออนในปริมาณมากจนเกิดความเป็นพิษของโซเดียมไอออนภายในเซลล์และทำให้ใบแก่ตาย เมื่ออัตราการตายของใบแก่สูงกว่าอัตราการสร้างใบใหม่ อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อสร้างอาหารให้พืชจึงลดลงตาม ส่งผลให้พืชมีอัตราการเจริญที่ลดลงในที่สุด (Munns และ Tester, 2008) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโซเดียมไอออน หรืออัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออน กับค่าพารามิเตอร์การเจริญต่างๆ ของข้าว ที่พบว่าปริมาณโซเดียมไอออนมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าดัชนีความเสียหายจากความเค็ม โดยเมื่อปริมาณโซเดียมไอออนในส่วนต้นของข้าวมีค่าสูง จะส่งผลให้เกิดความเสียหายจากความเค็มสูงตามไปด้วย ในขณะที่พารามิเตอร์ที่แสดงถึงการเจริญเติบโตของข้าวในภาวะเค็ม เช่น น้ำหนักรากส่วนต้นและราก และน้ำหนักแห้งส่วนต้นและรากจะลดลงเมื่อข้าวมีโซเดียมไอออนปริมาณมากในส่วนต้น ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hakim และคณะ (2014) ที่พบว่าเมื่อให้ภาวะเค็มกับข้าวในระดับที่เพิ่มขึ้น ปริมาณโซเดียมไอออนในส่วนต้นของข้าวทุกพันธุ์ที่ศึกษามีค่าเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่เดียวกันน้ำหนักแห้งส่วนต้นและรากของข้าวทุกพันธุ์ลดลง นอกจากนี้การตายของเซลล์ยังส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ ทำให้พบความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างปริมาณโซเดียมไอออนกับเสถียรภาพเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lutts and Bouharmont (1996) ที่พบว่าเมื่อได้รับภาวะเค็ม การรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ในข้าวทุกพันธุ์ที่ศึกษามีค่าสูงขึ้น โดยข้าวพันธุ์ที่ทนเค็มน้อยกว่าจะมีค่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์สูงกว่าพันธุ์ที่ทนเค็มมากกว่า แต่อย่างไรก็ตาม correlation coefficient ของทุกความสัมพันธ์มีค่าค่อนข้างต่ำ โดยค่า coefficient ที่สูงที่สุดเท่ากับ 0.57894 ที่เป็นความสัมพันธ์

ระหว่างอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็ม กับน้ำหนักแห้งส่วนต้นในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็ม

3. ตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนเค็มของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยในระยะกล้า โดยใช้เทคนิค genome-wide association

ความทนเค็มของพืช คือการที่พืชยังสามารถเจริญเติบโต และให้ผลผลิตได้แม้อยู่ในภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง ซึ่งความทนเค็มนั้นเป็นลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนหลายยีน (polygenic trait) (Mishra และคณะ, 1998) มีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาหา ยีนที่ควบคุมลักษณะทางสรีรวิทยาที่สนใจในพืชโดยใช้เทคนิคต่างๆ เช่น การใช้ GWAS ในการหา QTL ที่เกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของสังกะสีและเหล็กในเมล็ดของบาร์เลย์พื้นเมืองของประเทศเอธิโอเปียและเอริเทรีย โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์ ได้แก่ ความเข้มข้นของเหล็กและสังกะสี และน้ำหนัก 50 เมล็ด กับสไนป์จำนวน 7482 สไนป์ พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างความเข้มข้นของสังกะสีและน้ำหนัก 50 เมล็ด กับสไนป์ จำนวน 4 และ 5 สไนป์ตามลำดับ (Mamo และคณะ, 2014) ขณะเดียวกันก็มีการหา ยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางสรีรวิทยาที่สำคัญในข้าวเช่นเดียวกัน มีการใช้เทคนิค GWAS ในการหา ยีนที่ควบคุมลักษณะความทนต่อไอโซนในข้าว โดยใช้ฟีโนไทป์ที่เกี่ยวข้องกับมวลชีวภาพ ชีวเคมี และสรีรวิทยาจำนวน 8 ฟีโนไทป์ และสไนป์จำนวนมากกว่า 30,000 สไนป์ พบสไนป์ที่มีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์อย่างมีนัยสำคัญจำนวน 16 สไนป์ ซึ่งมี 2 สไนป์อยู่ในตำแหน่งของยีน *RING* และ *EREBP* ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ และการตอบสนองต่อภาวะเครียดในข้าว (Ueda และคณะ, 2014)

จากผลการศึกษาความเชื่อมโยงทั้งจีโนมโดยใช้ฟีโนไทป์ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมไอออนในเนื้อเยื่อส่วนต้นของข้าว ได้แก่ ปริมาณโซเดียมไอออน ปริมาณโพแทสเซียมไอออน และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในส่วนต้น กับจีโนไทป์ซึ่งได้แก่สไนป์ จำนวน 77,063 สไนป์ ได้คัดเลือกสไนป์ที่มีความสัมพันธ์กับแต่ละฟีโนไทป์ด้วยค่า p-value cut-off เท่ากับ 10^{-7} ทำให้ได้สไนป์ที่มีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ที่ศึกษา จำนวน 59 สไนป์ โดยพบว่ามีความสัมพันธ์กับค่าปริมาณโซเดียมไอออนและอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนทั้งในวันที่ 6 และ 9 หลังได้รับภาวะเค็ม ในขณะที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างสไนป์กับค่าโพแทสเซียมไอออนทั้งในวันที่ 6 และ 9 หลังได้รับภาวะเค็มเลย แสดงให้เห็นว่าปริมาณโซเดียมไอออนมีผลต่อพืชมากกว่าปริมาณโพแทสเซียมไอออน สไนป์ที่ได้จากการหาความเชื่อมโยงทั้งจีโนมนี้ อยู่ในตำแหน่งของยีนที่แปลรหัสได้เป็น expressed protein และ hypothetical protein จำนวน 27 และ 2 ตำแหน่งตามลำดับ นอกจากนี้พบยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ในเซลล์กระจายอยู่บนโครโมโซมที่ 1 ถึง 12 ของข้าว

ยีนกลุ่มที่มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของโปรตีนอื่น จำนวน 6 ยีน ได้แก่

(1) LOC_Os01g12660.1 (AAA-type ATPase family protein) AAA หรือ ATPase associated with various cellular activities protein เป็นโปรตีนที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมกลไกสำคัญต่างๆ ในเซลล์ เช่น การขนส่งเวสิเคิล การทำลายโปรตีน หรือทำหน้าที่เหมือน chaperone ในการควบคุมการรวมหรือแยกกลุ่มของโปรตีน (Fekih และคณะ,

2015) มีการศึกษา ยีน *SKD1* (suppressor of K⁺ transport growth defect 1) ซึ่งเป็นยีนหนึ่งใน AAA family ใน ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum*) ที่เป็นพืชทนเค็มพบว่า ยีนนี้มีส่วนในการควบคุมไซโตเคมิคัลโอออนส่วนเกินเมื่อพืชอยู่ในภาวะเค็ม นอกจากนี้พบว่า overexpression ของยีนนี้ในยาสูบส่งผลให้ต้นยาสูบมีความทนต่อความเค็มเพิ่มขึ้นอีกด้วย (Xia และคณะ, 2013)

(2) LOC_Os01g33350.1 คือ zinc-binding protein การที่โปรตีนจับกับ Zn จะทำให้โปรตีนนั้นทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา หรือควบคุมการทำงานของโปรตีนเป้าหมาย พบว่าเมื่อให้สารละลายสังกะสีกับแคลล์ของข้าว จะพบ zinc-binding protein ในปริมาณมากและแคลล์มีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับแคลล์ในภาวะควบคุม (Saeki และคณะ, 2000) อย่างไรก็ตามโปรตีน LOC_Os01g33350 ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้อย่างชัดเจน

(3) LOC_Os02g01990.1 (CCT-motif family protein) โปรตีนใน CCT family แบ่งออกเป็น 3 subclass ได้แก่ COL CMF (CCT motif) และ PRR (pseudoresponse regulator) ในโปรตีนเหล่านี้จะประกอบด้วย CCT domain ตำแหน่งของโดเมนนี้อยู่บริเวณผิวของโปรตีนเพื่อทำหน้าที่ในการปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนอื่น (Sun และคณะ, 2001) โดยปกติยีนที่ประกอบด้วย CCT domain มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการออกดอกของข้าว แต่ในงานวิจัยของ Zhang และคณะยังพบยีน CCT ใหม่จำนวน 3 ยีนที่มีหน้าที่ควบคุม heading date ในข้าวอีกด้วย (Zhang และคณะ, 2015)

(4) LOC_Os03g01720.1 (protein binding protein) เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ในการจับกับโปรตีนอื่นซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการบางอย่างในเซลล์ แต่ยังไม่มีการระบุหน้าที่ที่แน่ชัดของโปรตีนนี้

(5) LOC_Os03g63310.1 (prefoldin) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ร่วมกับโปรตีน chaperonin ในไซโทซอล โดยจะจับกับโปรตีนที่สร้างขึ้นใหม่ เช่น actin และ tubulin ในยีสต์ (Vainberg และคณะ, 1998) และ Arabidopsis (Hill และ Hemmingsen, 2001) แล้วส่งให้กับ chaperone เพื่อทำการ fold ให้มีโครงสร้างที่เหมาะสมต่อไป มีการศึกษาในข้าวพบว่า prefoldin สามารถจับกับ CML4 ที่เป็น calmodulin-like protein ได้ และมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (Anantayanon และ Buaboocha, 2013) และ

(6) LOC_Os09g10300.1 (Skp1 family, dimerisation domain containing protein) Skp1 หรือ S-phase kinase-associate protein1 เป็นหนึ่งในองค์ประกอบของ SCF ubiquitin ligase ที่มีหน้าที่จับกับ F-box ในการรวมโครงสร้าง SCF และควบคุมการย่อยสลายโปรตีน พบว่าโครงสร้าง SCF ใน Arabidopsis สามารถควบคุมการตอบสนองของพืชต่อฮอร์โมนออกซิน และกรดจัสโมนิกได้ (Kong และคณะ, 2004)

ยีนที่แปลรหัสให้โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ จำนวน 3 ยีน ได้แก่

(1) LOC_Os04g08828.1 (Cytochrome P450) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ และสลายโมเลกุลต่างๆ ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ในพืชพบว่าเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ลิกนิน สารป้องกันรังสียูวี เม็ดสี สารประกอบในกระบวนการป้องกันตัวของเซลล์ กรด

ไขมัน ฮอริโมน และโมเลกุลที่เกี่ยวกับการส่งสัญญาณในเซลล์ นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายสารประกอบที่เป็นพิษต่อเซลล์อีกด้วย (Schuler และ Werch-Reichhart, 2003)

(2) LOC_Os05g33100.1 (endo-1,3; 1,4-beta-D-glucanase precursor) เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการสลายพันธะไกลโคซิดิก แบบ β 1-3 หรือ 1-4 ใน D-glucan ซึ่งเป็นโพลีแซ็กคาไรด์สายตรงที่พบมากในผนังเซลล์ของเอนโดสเปิร์มของพืชอาหารต่างๆ เช่น บาร์เลย์ ข้าว เป็นต้น และ

(3) LOC_Os12g12560.1 (NADP-dependent oxidoreductase) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการส่งอิเล็กตรอนจากโมเลกุลที่เป็นตัวให้ไปยังโมเลกุลที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน มีหน้าที่หลากหลายในกระบวนการทางสรีรวิทยา เช่น การบีบโปรตอน ควบคุมช่องไอออน ดูดซึมแร่ธาตุ ส่งสัญญาณภายในเซลล์ และควบคุมการเจริญเติบโต (Lüthje และคณะ, 1997) พบว่าเอนไซม์นี้ในข้าวมีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการเจริญของข้าวที่ถูกกระตุ้นด้วยออกซิน (Oguchi และคณะ, 2004)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับ transposon จำนวน 2 ยีน ได้แก่ LOC_Os02g38380.1 (Transposon protein) และ LOC_Os11g25900.1 (hAT dimerization domain containing protein) hAT เป็น Transposable element ที่มีหน้าที่เปลี่ยนตำแหน่งของดีเอ็นเอ มีโดเมนสำคัญที่ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนประมาณ 50 ตัวอยู่บริเวณปลาย C โดเมนนี้มีความเป็น dimerization ที่จะทำหน้าที่ในการจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย (Rubin และคณะ, 2001)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์จำนวน 2 ยีน ได้แก่ LOC_Os01g12540.2 (GTPase of unknown function domain containing protein) และ LOC_Os02g05940.1 (Phytosulfokine receptor precursor) เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ โดย Phytosulfokine หรือ PSK เป็นโปรตีนที่เป็นโปรตีนส่งสัญญาณใน secretory pathway มีความสำคัญในการส่งเสริมการเจริญ และการพัฒนาของเซลล์ นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการปรับตัวของพืชต่อภาวะเครียดทางกายภาพและชีวภาพ ในการส่งสัญญาณ PSK จะจับกับตัวรับซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ใน receptor-like kinase (RLKs) และแทรกอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อได้รับสัญญาณจะมีเป้าหมายไปยัง secretory pathway โดยผ่านการควบคุมของ calmodulin (Sauter, 2015) พบว่ายีน *AtPSKR* ซึ่งเป็นตัวรับของ PSK ใน *Arabidopsis thaliana* มีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อของต้น แต่มีระดับการแสดงออกที่ค่อนข้างต่ำ

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะเครียด 1 ยีน ได้แก่ LOC_Os11g38920.2 (HVA22) เป็นโปรตีนที่ถูกกระตุ้นได้ด้วยกรดแอบไซซิกและภาวะเครียดในพืช เช่น ภาวะแล้ง ภาวะหนาวเย็น และภาวะเค็ม โดยถูกพบครั้งแรกใน aleurone cell ของบาร์เลย์ และมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นของเมล็ด (Guo และ David Ho, 2008) ขณะที่ในข้าวพบว่า HVA22 ทำงานร่วมกับ ABA-response complex (ABRC) ในกระบวนการตอบสนองต่อความเครียดจากภาวะขาดน้ำ (Su และคณะ, 1998)

ยีนอื่นๆ ที่ทำหน้าที่ต่าง ๆ ในเซลล์ จำนวน 8 ยีน ได้แก่

(1) LOC_Os01g60110.1 (E2F-related protein) E2F เป็น transcription factor ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมวัฏจักรของเซลล์ในช่วง G1 จนถึง S phase ในพืชและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยสามารถจัดเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ทำหน้าที่เป็น activator และกลุ่มที่เป็น repressor โดยปกติ E2F จะจับกับ E2F dimerization partner (DP) เพื่อทำหน้าที่เป็น transcription factor และทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนในพืชชั้นสูง มีการศึกษาการแสดงออกของ E2F/DP ใน *Medicago truncatula* พบว่ามีการแสดงออกทั้งในเนื้อเยื่อส่วนต้นและราก โดยอาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมวัฏจักรของเซลล์ และเมื่อให้ภาวะเค็มพบว่าระดับการแสดงออกของ E2F/DP เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการควบคุมวัฏจักรของเซลล์นั้นถูกรบกวนโดยภาวะเครียดจากความเค็ม (Ma และคณะ, 2014)

(2) LOC_Os01g12560 (reticulon domain containing protein) เป็นโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม

(3) LOC_Os06g48810 (HKT2;1 – Na⁺ transporter) เป็นโปรตีนขนส่งโซเดียมไอออนเข้าสู่เซลล์บริเวณราก

(4) LOC_Os08g35000.5 (ARID/BRIGHT DNA-binding domain containing protein) ARID หรือ AT-rich interaction domain หรืออีกชื่อหนึ่งคือ BRIGHT เป็นโดเมนที่มีโครงสร้างแบบ helix-turn-helix สามารถจับกับดีเอ็นเอตรงบริเวณที่มีเบส A และ T สูง พบได้ทั้งในรา พืช และสัตว์ โดเมนนี้มีความเกี่ยวข้องกับหลายกระบวนการที่สำคัญในเซลล์ เช่น การพัฒนาของออบริโอ และการควบคุมวัฏจักรของเซลล์ (Wilsker และคณะ, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าโดเมนนี้เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลล์สเปิร์มในการปฏิสนธิของ *Arabidopsis thaliana* อีกด้วย (Zheng และคณะ, 2014)

(5) LOC_Os11g37990.1 (Chloroplastic group IIA intron splicing factor CRS1) เกี่ยวข้องกับการตัด intron โดย CRS1 (chloroplast RNA splicing1) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการตัด groupII intron ใน subgroup IIA ที่เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถตัดตัวเองได้ (Ostersetzer และคณะ, 2005)

(6) LOC_Os12g29350.1 (ATP-binding protein)

(7) LOC_Os12g09590.1 (leafbladeless1 หรือ *bl1*) เป็นยีนที่พบครั้งแรกในข้าวโพด มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการพัฒนาของใบ ควบคุมเซลล์ในเนื้อเยื่อเจริญ และกำหนดชนิดของเซลล์บริเวณหลังใบ เมื่อยีนนี้ไม่ทำงานจะทำให้เซลล์ที่เจริญถูกกำหนดให้เป็นเซลล์บริเวณท้องใบ ส่งผลให้การเจริญของใบผิดปกติ โดยใบจะมีลักษณะคล้ายเส้นด้าย (Timmermans และคณะ, 1998) และ

(8) LOC_Os12g16890 (PROLM28 – prolamin precursor) prolamin เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เก็บสะสมโดยเฉพาะไนโตรเจน พบมากบริเวณเอนโดสเปิร์มของเมล็ดธัญพืช นอกจากนี้ยังมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเปลือกแข็งหุ้มเมล็ดซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของธัญพืชอีกด้วย แต่โปรตีนชนิดนี้จะพบได้ในปริมาณน้อยในข้าวและข้าวโอ๊ตเมื่อเปรียบเทียบกับธัญพืชอื่นๆ เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี เป็นต้น (Holding, 2014)

ในขณะที่เดียวกันยังพบยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคในพืช จำนวน 7 ยีน ประกอบด้วยยีนที่ก่อให้เกิดโรคในพืช 1 ยีน และยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านเชื้อโรคในพืช 6 ยีน ได้แก่

(1) LOC_Os09g08440.1 (Nodulin MtN3 family protein) nodulin ถูกกระตุ้นโดย *Rhizobium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่กระตุ้นให้พืชตระกูลถั่วสร้างปมราก แต่ในขณะที่เดียวกันยังพบ nodulin-like protein ในพืชที่ไม่สามารถสร้างปมรากได้ เช่น *Arabidopsis* ข้าว และข้าวโพด เป็นต้น ยีนนี้ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งสาร และยีน *MtN3* เป็นยีนหนึ่งที่ถูกกระตุ้นโดยเชื้อแบคทีเรียในปมรากของต้น *Medicago trunculata* พบว่ายีนนี้ใน *Arabidopsis* มีหน้าที่ควบคุมการขนส่งน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุคโตส รวมถึงการขนส่งทองแดงและอะลูมิเนียมอีกด้วย ในข้าว *MtN3* เป็นเป้าหมายของโปรตีนที่ชื่อว่า TALs (transcription activator-like) ที่อยู่ในเชื้อ *Xanthomonas* ที่จะไปกระตุ้นกระบวนการถอดรหัสของ *Mtn3* ในขณะที่พืชกำลังติดเชื้อและเกิดโรคในระยะแรก (Denancé และคณะ, 2014) และนอกจากนี้ยังพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคพืชเป็นจำนวน 6 ยีน ได้แก่

(2) LOC_Os02g42150.2 (OsWAK14 – OsWAK receptor-like kinase) WAK หรือ wall-associated kinase เป็นโปรตีนในกลุ่ม receptor-like kinase ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์และมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานเชื้อราและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในพืชหลายชนิด โดยในข้าวมีหน้าที่ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ (*Magnaporthe oryzae*) (Cayrol และคณะ, 2016; Delteil และคณะ, 2016)

(3) LOC_Os02g56530.1 (Ankyrin repeat domain containing protein) เป็นโปรตีนที่พบบนเยื่อหุ้มเซลล์ มีหน้าที่ควบคุมกระบวนการต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ในข้าว (*Magnaporthe oryzae*) โดยผ่านทางกลไกการส่งสัญญาณด้วย salicylic acid และ jasmonic acid (Mou และคณะ, 2013)

(4) LOC_Os04g02520.1 (Leucine rich repeat family protein) Leucine rich repeat หรือ LRR เป็นตำแหน่งที่พบในโปรตีนกว่า 14,000 ชนิดในฐานข้อมูลของสิ่งมีชีวิตต่างๆ โดยพบโปรตีนที่มี LRR ในข้าวจำนวนกว่า 1,400 ชนิด โปรตีนที่มี LRR มักจะเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับลิแกนด์ และโปรตีนกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการตอบสนองต่อโรคของพืช (Matsushima และ Miyashita, 2012)

(5) LOC_Os0s06g06860 (MLA1) มีโครงสร้างเป็น coiled-coil ที่ปลาย N ขณะที่ส่วนกลางเป็นโดเมนที่สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ได้ และที่ปลาย C เป็น leucine-rich repeat พบว่า MLA1 ทำงานร่วมกับ RAR1 ซึ่งเป็น R-gene มีส่วนช่วยในกระบวนการต้านทานต่อเชื้อราโรคแป้งในบาร์เลย์ ได้ (Zhou และคณะ, 2001; Jones และ Takemoto, 2004)

(6) LOC_Os07g02570 และ LOC_Os11g38000 (NB-ARC domain containing protein) เป็นโปรตีนที่มีโดเมนที่สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วนกลางของโครงสร้างโปรตีน ซึ่งมีประโยชน์ในการจดจำต่อเชื้อโรคเรียกว่า NB-ARC domain แบ่งออกได้เป็น 3 โดเมนย่อย ได้แก่ NB-ARC1 และ ARC2 โดเมนนี้ทำหน้าที่เหมือนกับเอนไซม์ ATPase และเมื่อทำงานจะส่งผลควบคุมการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคพืช (Tameling และคณะ, 2006; Ooijen และคณะ, 2008)

(7) LOC_Os12g28880 (LTP110 - protease inhibitor/seed storage/LTP family protein precursor) LTP หรือ lipid transfer protein เป็นกลุ่มโปรตีนที่พบในเนื้อเยื่อของพืชชั้นสูง มีหน้าที่ในการส่งฟอสโฟลิพิด และกรดไขมันระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ ในข้าวพบว่ายีนนี้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานต่อเชื้อรา เช่น *Pyricularia oryzae* และ *Xanthomonas oryzae* เป็นต้น (Ge และคณะ, 2003)

จากผลการศึกษาพบว่ามียีนที่มีความสัมพันธ์ทั้งกับปริมาณโซเดียมไอออน และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนทั้งใน 6 และ 9 วันหลังได้รับภาวะเค็ม แสดงให้เห็นว่าลักษณะฟีโนไทป์ทั้งสองนี้ค่อนข้างเหมาะสมในการนำมาใช้หา ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะเค็มในข้าว เพื่อยืนยันความเกี่ยวข้องของยีนที่ได้กับลักษณะความทนเค็ม ทั้งนี้จะต้องศึกษาต่อใน *Arabidopsis* mutant เพื่อยืนยันหน้าที่และการทำงานของยีนเหล่านี้ในข้าวต่อไป ซึ่งหากได้ยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับความทนเค็มในข้าวจริงก็จะสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ข้าวทนเค็มได้ในอนาคต

4. ระดับการแสดงออกของยีนที่ได้จาก genome-wide association study ในข้าวระยะกล้าที่ได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม

ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่ได้จากการศึกษาการเชื่อมโยงทั้งจีโนมจำนวน 3 ยีนในข้าวระยะกล้า คัดเลือกพันธุ์ข้าวที่นำมาใช้ในการศึกษา โดยเลือกพันธุ์มาตรฐานทนและไม่ทนเค็ม ได้แก่ Pokkali และ IR29 ตามลำดับ และพันธุ์ที่มีค่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมต่ำที่สุดและสูงที่สุด ได้แก่ พันธุ์ลายหมาก และกำเพ็ญ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์การจัดหมวดหมู่ด้วย Cluster Analysis โดยใช้พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของข้าวจำนวน 80 พันธุ์/สายพันธุ์ จากข้อมูลของ นพคุณ คุณผลวัฒนา (2558) ได้แก่ น้ำหนักสดส่วนต้นและราก น้ำหนักแห้งส่วนต้นและราก เสถียรภาพเยื่อหุ้มเซลล์ และดัชนีความเสียหายจากความเค็ม พบว่าข้าวพันธุ์ที่มีค่าพารามิเตอร์ต่างๆ อยู่ในระดับที่ดี ได้แก่ พันธุ์เหลืองแก้ว ซึ่งเมื่อพิจารณาอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนของข้าวพันธุ์นี้พบว่ามีค่าอัตราส่วนที่สูงกว่าพันธุ์ลายหมาก และ Pokkali แต่มีค่าต่ำกว่าพันธุ์ IR29 ดังนั้นจึงเลือกข้าวที่ใช้ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนจำนวน 4 พันธุ์ ประกอบด้วย Pokkali ลายหมาก กำเพ็ญ และเหลืองแก้ว

สำหรับยีนแรกที่ศึกษาระดับการแสดงออกได้แก่ GTPase of unknown function domain containing protein ในตำแหน่ง LOC_Os01g12540.2 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบว่ามี QTL ที่เกี่ยวข้องกับความทนเค็มในฐานข้อมูล Q-TARO โดย GTPase เป็นโปรตีนที่มีหลายขนาด พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ มีจำนวนมากกว่า 100 ชนิด เมื่อนำมาวิเคราะห์จัดกลุ่มด้วย phylogenetic tree พบว่ากลุ่มที่มีขนาดเล็กหรือ small GTPase มีความสัมพันธ์มีความเป็น homology กันมากเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ small GTPase ในพืชมีหน้าที่เป็น molecular switch ในการควบคุมกระบวนการทางสรีรวิทยาต่างๆ ของพืช เช่น การเจริญของเอ็มบริโอ การพักตัวของเมล็ด การเจริญของพืช การงอกของรากแขนง เป็นต้น (Li และคณะ, 2001) ROPs เป็นกลุ่มของ small GTPase ที่นิยมนำมาศึกษา เนื่องจากมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการส่งสัญญาณของพืช (signal transduction) ในการตอบสนองต่อสิ่งเร้าภายนอก Luo และคณะ (2006) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *OsRacB* ที่เป็น small

guanosine triphosphate (GTP)-binding protein ในภาวะเค็มพบว่ามีการแสดงออกของยีนที่สูงขึ้น และโปรโมเตอร์ของยีนนี้ถูกกระตุ้นให้ทำงานได้ด้วยความเค็ม และยังพบว่า overexpression ของยีน *OsRacB* ในยาสูบและข้าว ส่งผลให้พืชทั้งสองมีลักษณะที่ทนต่อภาวะเค็มมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ Wang และคณะ (2013) ได้ศึกษา ยีน *MfARL1* ซึ่งเป็น GTPase ที่ได้จากต้น *Medicago falcate* ใน Arabidopsis พบว่าต้น transgenic มีอัตราการอยู่รอดสูงกว่าต้น wild type ในภาวะเครียดจากความเค็ม นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมในเนื้อเยื่อส่วนต้นของ transgenic มีค่าต่ำกว่าต้น wild type แสดงให้เห็นว่าต้น transgenic มีการจัดการไอออนได้ดีกว่าต้น wild type เมื่ออยู่ในภาวะเค็ม และเมื่อพิจารณาอัตราการแสดงออกของยีน *AtHKT1* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการนำโซเดียมไอออนเข้าสู่เซลล์ พบว่าอัตราการแสดงออกของยีนนี้ในต้น transgenic ต่ำกว่าต้น wild type เมื่ออยู่ในภาวะเครียดจากความเค็ม แสดงให้เห็นว่าการทำงานของ GTPase อาจส่งผลต่อการนำโซเดียมไอออนเข้าสู่เซลล์ ซึ่งมีผลให้พืชมีความทนต่อภาวะเค็มมากขึ้น ดังนั้นจึงสรุปว่ายีนนี้น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับความสามารถ เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองพบว่าในภาวะปกติ ข้าวทั้ง 4 พันธุ์มีอัตราการแสดงออกที่แตกต่างกัน แต่เมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 3 วัน อัตราการแสดงออกของยีนนี้ในข้าวทุกพันธุ์มีแนวโน้มสูงขึ้นแต่ก็ยังไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่วันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างอัตราการแสดงออกในภาวะปกติและภาวะเค็มเช่นเดียวกัน แต่เนื่องจาก ยีน *OsRacB* และ *MfARL1* ที่กล่าวข้างต้นยังไม่ใช่ยีนเดียวกับที่ศึกษา การศึกษาการแสดงออกของยีนในงานวิจัยนี้จึงอาจได้ผลการทดลองที่แตกต่างจากในงานวิจัยข้างต้น ดังนั้นยีนนี้อาจยังไม่มีการทำงาน และส่งผลต่อกลไกในการทนต่อความเค็มในข้าวทุกพันธุ์ในช่วงระยะเวลาที่ศึกษา หรือการควบคุมการทำงานของยีนนี้ ไม่ได้เป็นการควบคุมในระดับ transcription

สำหรับยีน reticulon domain containing protein ที่อยู่ในตำแหน่ง LOC_Os01g12650.1 เป็นอีกยีนที่พบ QTL ที่เกี่ยวกับความทนเค็มในฐานข้อมูล Q-TARO และมีการแสดงออกในส่วนราก จากผลการศึกษาพบว่าข้าวทั้ง 4 พันธุ์ มีอัตราการแสดงออกของยีนนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 0 ที่ยังไม่ได้รับภาวะเค็ม แต่ในวันที่ 3 หลังได้รับภาวะเค็มพบว่าอัตราการแสดงออกของยีนในข้าวทุกพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในภาวะปกติข้าวทุกพันธุ์มีการแสดงออกของยีนนี้ในระดับใกล้เคียงกัน และข้าวพันธุ์ลายหมากซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีค่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนต่ำ มีอัตราการแสดงออกสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอีก 3 พันธุ์ที่เหลือ เมื่อได้รับภาวะเครียดจากความเค็มพบว่าข้าวทุกพันธุ์มีอัตราการแสดงออกของยีนนี้เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการแสดงออกในภาวะปกติ โดยข้าวพันธุ์ลายหมากยังคงมีอัตราการแสดงออกที่สูงที่สุด ในขณะที่ข้าวพันธุ์กำแพงที่เป็นพันธุ์ที่มีค่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมสูง มีอัตราการแสดงออกของยีนที่ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์อื่นที่ใช้ศึกษา ต่อมาเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน พบว่าข้าวทุกพันธุ์มีอัตราการแสดงออกของยีนสูงขึ้นในภาวะเค็ม เมื่อเทียบกับอัตราการแสดงออกของยีนนี้ในภาวะปกติ โดยข้าวพันธุ์ลายหมากเป็นพันธุ์ที่มีอัตราการแสดงออกที่ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับพันธุ์ที่เหลือในภาวะปกติและในภาวะเครียดจากความเค็ม แต่เมื่อเปรียบเทียบกับในภาวะปกติพบว่ามีการแสดงออกสูงขึ้นมาก ซึ่งข้าวพันธุ์ลายหมากเป็นพันธุ์ที่สามารถรักษาอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมให้อยู่ในระดับที่ต่ำได้ดีที่สุดในขณะที่ข้าวพันธุ์ Pokkali มีอัตราการแสดงออกของยีน

นี้สูงที่สุด ซึ่งอาจเนื่องมาจาก Pokkali เป็นพันธุ์ที่สามารถปรับตัวต่อภาวะเค็มได้ดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ จึงเพิ่มการแสดงออกของยีนนี้ให้มากขึ้น reticulon เป็นโปรตีนที่พบในสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต โดยจะแทรกอยู่บนเยื่อหุ้ม (Integral membrane protein) ส่วนมากพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับร่างแหเอนโดพลาสมิก นอกจากนี้ยังมีความเกี่ยวข้องกับเยื่อหุ้มเซลล์ และกอลจิคอมเพล็กซ์อีกด้วย reticulon ถูกพบครั้งแรกบนเยื่อหุ้มของร่างแหเอนโดพลาสมิกในเซลล์ประสาทของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โปรตีนชนิดนี้ทุกตัวจะมีบริเวณที่มีลำดับเหมือนกันเรียกว่า Reticulon Homology Domain (RHD) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการคงตัวของเยื่อหุ้มร่างแหเอนโดพลาสมิก ในสิ่งมีชีวิตจำพวกที่ไม่มีกระดูกสันหลัง พบ reticulon-like protein (RTNL) เป็นจำนวน 6 subfamily โปรตีนชนิดนี้ในพืชจะเรียกชื่อว่า RTNLB โดย Marmagne และคณะ (2004) พบ RTNLB 2 ชนิดอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ *Arabidopsis thaliana* ได้แก่ *RTNLB1* และ *RTNLB6* แต่ในทางกลับกัน Nziengui และคณะ (2007) ได้ศึกษา *RTNLB2* และ *RTNLB4* ใน *Arabidopsis thaliana* และพบว่าโปรตีนทั้งสองไม่ได้อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ แต่พบว่าอยู่บริเวณเยื่อหุ้มของร่างแหเอนโดพลาสมิกบริเวณที่เป็น ER tubule ซึ่งมีลักษณะเป็น polygonal network อาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสังเคราะห์ไขมัน ในขณะที่ *RTNLB4* ยังถูกพบอยู่บริเวณ cisternae อีกด้วย ทั้งนี้ยังไม่พบการศึกษาหน้าที่ของ reticulon ในข้าว หรือในภาวะเครียดจากความเค็มจึงยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่นอน อย่างไรก็ตาม มีความเป็นไปได้ที่โปรตีนนี้ จะมีความเกี่ยวข้องกับความทนเค็มของข้าว เนื่องจากพบระดับการแสดงออกที่สูงในข้าวพันธุ์ที่มี อัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมต่ำ ได้แก่ พันธุ์ลายหมาก และข้าวพันธุ์มาตรฐานทนเค็ม ได้แก่ พันธุ์ Pokkali ยีนนี้จึงเป็นยีนที่ควรศึกษาในเชิงหน้าที่ของยีนต่อไป

High-affinity K^+ transport หรือ HKT เป็น transporter ที่ค้นพบครั้งแรกในข้าวสาลี มีหน้าที่ในการลำเลียงโพแทสเซียมไอออนเข้าสู่เซลล์ ต่อมาถูกพบในพืชชนิดอื่นและพบว่าสามารถลำเลียงได้ทั้งโซเดียมและโพแทสเซียมไอออน (symporter) หรือลำเลียงโซเดียมไอออนเพียงอย่างเดียว (uniporter) HKT ถูกแบ่งออกเป็น 2 subfamily ได้แก่ HKT1 และ HKT2 ตามความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน และ selectivity ต่อโซเดียมและโพแทสเซียมไอออน (Horie และคณะ, 2001) OsHKT2;1 เป็น transporter ที่พบบนเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณชั้นคอร์เท็กซ์ และเอนโดเดอริสของเนื้อเยื่อส่วนราก (Almeida และคณะ, 2013) ทำหน้าที่ในการนำโซเดียมไอออนจากด้านนอกเซลล์เข้าสู่เซลล์บริเวณรากในภาวะที่พืชขาดโพแทสเซียมไอออน โดยโซเดียมไอออนจะช่วยในการรักษาสมดุลของประจุ รวมถึงสมดุลของน้ำและแร่ธาตุในเซลล์ ส่งผลให้พืชสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ (Miyamoto และคณะ, 2015) พบว่า mutation ของยีนนี้ในข้าวส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้น wild type รวมทั้งปริมาณโซเดียมไอออนในส่วนรากของต้น mutant ยังอยู่ในระดับต่ำกว่าต้น wild type อีกด้วย จากผลการศึกษาพบว่าข้าวทั้ง 4 พันธุ์มีระดับการแสดงออกของยีน *HKT2;1* ในเนื้อเยื่อส่วนรากแตกต่างกันเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 0 ที่ไม่ได้รับภาวะเค็ม แต่เมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 3 วันพบว่าระดับการแสดงออกในข้าวทุกพันธุ์ลดลงจนอยู่ในระดับต่ำมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Horie และคณะ (2007) ที่เมื่อให้ภาวะเค็มกับข้าวด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นเพียง 30 มิลลิโมลาร์ พบว่าการแสดงออกของยีน *HKT2;1* มีระดับลดลงทันทีแสดงถึงกลไกการทำงานเพื่อให้มีการปรับลดการนำ Na^+ เข้าสู่เซลล์ ขณะเดียวกันอัตราการนำโซเดียมไอออนเข้าสู่เซลล์ก็ลดลงด้วยเช่นกัน จนกระทั่ง 6 วันหลังได้รับภาวะเค็ม พบว่าระดับการ

แสดงออกของข้าวทุกพันธุ์เพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะพันธุ์สายหมากที่มีระดับการแสดงออกสูงที่สุด แต่อย่างไรก็ดี ปริมาณของ Na^+ / K^+ ในข้าวพันธุ์สายหมากจัดอยู่ในกลุ่มที่มีระดับต่ำ จึงเป็นไปได้ว่าการทำงานของ HKT2;1 นี้เป็นเพียงกลไกหนึ่งที่ส่งผลต่อ ปริมาณของ Na^+ / K^+ ในข้าว ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียง Na^+ และ K^+ จึงควรมีการศึกษาต่อไปในอนาคต



บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. ผลของความเค็มในดินต่อปริมาณโซเดียมไอออน โพลีแซ็กคาไรด์ และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพลีแซ็กคาไรด์

ข้าวไทยทั้ง 80 พันธุ์/สายพันธุ์ มีความสามารถในการสะสมโซเดียมและโพลีแซ็กคาไรด์ในในระดับที่ต่างกัน ส่งผลให้ตอบสนองต่อภาวะเค็มได้ต่างกัน

1.1 เมื่อได้รับภาวะเค็มทั้ง 6 และ 9 วัน โซเดียมไอออนในส่วนของข้าวทั้ง 80 พันธุ์/สายพันธุ์ มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณโซเดียมไอออนในภาวะปกติ

1.2 ปริมาณโพลีแซ็กคาไรด์ในส่วนของข้าวเกือบทุกพันธุ์/สายพันธุ์ที่ได้รับภาวะเค็มทั้ง 6 และ 9 วัน มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณโพลีแซ็กคาไรด์ในภาวะปกติ ยกเว้นในบางพันธุ์ที่มีปริมาณโพลีแซ็กคาไรด์ในส่วนของใบเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับภาวะเค็ม

1.2 อัตราส่วนโซเดียมต่อโพลีแซ็กคาไรด์ในข้าวทั้ง 80 พันธุ์/สายพันธุ์ มีค่าเพิ่มขึ้นในภาวะเค็มเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนโซเดียมต่อโพลีแซ็กคาไรด์ในภาวะปกติ

2. ความสัมพันธ์ระหว่างการสะสมโซเดียมและโพลีแซ็กคาไรด์กับค่าการเจริญเติบโต

ปริมาณโซเดียมไอออน และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพลีแซ็กคาไรด์ในข้าวพันธุ์/สายพันธุ์ที่ศึกษามีความสัมพันธ์กับค่าดัชนีความเสียหายจากความเค็ม น้ำหนักสดส่วนต้น น้ำหนักแห้งส่วนต้น น้ำหนักสดส่วนราก และน้ำหนักแห้งส่วนรากหลังจากได้รับภาวะเค็ม ในขณะที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโพลีแซ็กคาไรด์กับพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตในการศึกษานี้

3. ผลการศึกษาการเชื่อมโยงทั่วจีโนมเพื่อทำนายตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนเค็มของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย

จากการหาการเชื่อมโยงระหว่างฟีโนไทป์การสะสมไอออนในข้าวทั้ง 80 พันธุ์/สายพันธุ์ กับ SNP จำนวน 77,063 SNP ด้วยเทคนิค genome-wide association พบ SNP ที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณโซเดียมไอออน และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพลีแซ็กคาไรด์ในวันที่ 6 และ 9 หลังได้รับภาวะเค็มอย่างมีนัยสำคัญจำนวน 59 SNP ที่อยู่ในตำแหน่งยีนเป้าหมายที่มีหน้าที่ต่างๆ ภายในเซลล์

4. ระดับการแสดงออกของยีนที่ได้จาก genome-wide association study ในข้าวระยะกล้าที่ได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม

การศึกษา ระดับการแสดงออกของยีน GTPase of unknown function domain containing protein ที่ตำแหน่ง LOC_Os01g12540.2 พบว่าข้าวทั้ง 4 พันธุ์มีระดับการแสดงออกที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้งในภาวะปกติและภาวะเค็มเป็นเวลา 3 และ 6 วัน

ระดับการแสดงออกของยีน reticulon domain containing protein ที่ตำแหน่ง LOC_Os01g12650.1 ในข้าวทั้ง 4 พันธุ์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 และ 9 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกในภาวะปกติ โดยข้าวพันธุ์ที่มีอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนต่ำ ได้แก่พันธุ์ Pokkali และลายหมาก เป็นพันธุ์ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นมากเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ที่เหลือในการศึกษา

ระดับการแสดงออกของยีน HKT2;1 – Na⁺ transporter ที่ตำแหน่ง LOC_Os06g48810.1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจนอยู่ในระดับต่ำมากในวันที่ 3 หลังได้รับภาวะเค็ม และในวันที่ 6 พบว่าระดับการแสดงออกของยีนนี้ในข้าวทุกพันธุ์ ยกเว้นพันธุ์กำเพ็ญ มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกในภาวะปกติ



รายการอ้างอิง

- Al-Tamimi, N., et al. 2016. Salinity tolerance loci revealed in rice using high-throughput non-invasive phenotyping. **Nature Communication** 7: 1-11.
- Alhagdow, M. M., Barthakur, N. N. and Donnelly, D. J. 1999. Salinity stress and sodium-potassium interactions in micropropagated potatoes. **Potato Research** 42: 73-78.
- Almeida, P., Katschnig, D. and de Boer, A. H. 2013. HKT transporters—state of the art. **International Journal of Molecular Sciences** 14: 20359-20385.
- Anantayanon, J. and Buaboocha, T. 2013. Interaction studies of a prefoldin with calmodulin and CML proteins from rice (*Oryza sativa* L.). **Thai Journal of Genetics** 6: 36-39.
- Asch, F., Dingkuhn, M., Dörffling, K. and Miezan, K. 2000. Leaf K/Na ratio predicts salinity induced yield loss in irrigated rice. **Euphytica** 113: 109.
- Bhowmik, S. K., et al. 2009. Phenotypic and genotypic screening of rice genotypes at seedling stage for salt tolerance. **Global Journal of Biotechnology and Biochemistry** 4: 126-131.
- Bienvenido, O. J. 1993. Rice in human food and nutrition. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Box, M. S., Coustham, V., Dean, C. and Mylne, J. S. 2011. Protocol: a simple phenol-based method for 96-well extraction of high quality RNA from *Arabidopsis*. **Plant Methods** 7: 7-9.
- Cayrol, B., Delteil, A., Gobbato, E., Kroj, T. and Morel, J.-B. 2016. Three wall-associated kinases required for rice basal immunity form protein complexes in the plasma membrane. **Plant Signaling & Behavior** 11: e1149676.
- Chauhan, G., et al. 2015. Association of Alzheimer's disease GWAS loci with MRI markers of brain aging. **Neurobiology of Aging** 36: 1765.e1767-1765.e1716.
- Delteil, A., et al. 2016. Several wall-associated kinases participate positively and negatively in basal defense against rice blast fungus. **BMC Plant Biology** 16: 17.
- Denancé, N., Szurek, B. and Noël, L. D. 2014. Emerging functions of nodulin-like proteins in non-nodulating plant species. **Plant and Cell Physiology** 55: 469-474.
- Diédhiou, C. J. 2006. Mechanisms of salt tolerance : sodium, chloride and potassium homeostasis in two rice lines with different tolerance to salinity stress. Doctoral dissertation Faculty of Biology University of Bielefeld.
- Dionisio-Sese, M. L. and Tobita, S. 2000. Effects of salinity on sodium content and

photosynthetic responses of rice seedlings differing in salt tolerance. **Journal of Plant Physiology** 157: 54-58.

- Fan, Y., et al. 2016. Genome-wide association study reveals a new QTL for salinity tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Frontiers in Plant Science** 7.
- FAO. 2015. Round up. **Rice Market Monitor** 17: 1-30.
- Fekih, R., et al. 2015. The rice (*Oryza sativa* L.) lesion mimic resembling, which encodes an AAA-type ATPase, is implicated in defense response. **Molecular Genetics and Genomics** 290: 611-622.
- Ge, X., et al. 2003. Resistance function of rice lipid transfer protein LTP110. **Journal of biochemistry and molecular biology** 36: 603-607.
- Golldack, D., et al. 2002. Characterization of a HKT-type transporter in rice as a general alkali cation transporter. **The Plant Journal** 31: 529-542.
- Grabov, A. 2007. Plant KT/KUP/HAK potassium transporters: single family. **Annals of Botany** 99: 1035-1041.
- Guo, W. J. and David Ho, T. H. 2008. An abscisic acid-induced protein, HVA22, inhibits gibberellin-mediated programmed cell death in cereal aleurone cells. **Plant Physiology** 147: 1710-1722.
- Hakim, M. A., et al. 2014. The effect of salinity on growth, ion accumulation and yield of rice varieties **Journal of Animal & Plant Sciences** 3: 874-886.
- Han, B. and Huang, X. 2013. Sequencing-based genome-wide association study in rice. **Current Opinion in Plant Biology** 16: 133-138.
- Hill, J. E. and Hemmingsen, S. M. 2001. *Arabidopsis thaliana* type I and II chaperonins. **Cell Stress & Chaperones** 6: 190-200.
- Hoed, M., et al. 2015. GWAS-identified loci for coronary heart disease are associated with intima-media thickness and plaque presence at the carotid artery bulb. **Atherosclerosis** 239: 304-310.
- Holding, D. R. 2014. Recent advances in the study of prolamin storage protein organization and function. **Frontiers in Plant Science** 5: 276-284.
- Horie, T., et al. 2007. Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na⁺ influx component into K⁺-starved roots for growth. **The EMBO Journal** 26: 3003-3014.
- Horie, T., et al. 2001. Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. **Plant J** 27: 129-138.
- Huang, X., et al. 2012. Genome-wide association study of flowering time and grain yield traits in a worldwide collection of rice germplasm. **Nat Genet** 44: 32-39.
- Jaarsma, R., de Vries, R. S. M. and de Boer, A. H. 2013. Effect of salt stress on growth,

Na⁺ accumulation and proline metabolism in potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. **PLOS ONE** 8: e60183.

- Jones, D. A. and Takemoto, D. 2004. Plant innate immunity – direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. **Current Opinion in Immunology** 16: 48-62.
- Jouyban, Z. 2012. The effects of salt stress on plant growth. **Technical Journal of Engineering and Applied Sciences** 2: 7-10.
- Kader, M. A. 2006. Salt stress in rice: adaptive mechanisms for cytosolic sodium homeostasis. **Acta Universitatis Agriculturae Sueciae** 57: 1-27.
- Kader, M. A. and Lindberg, S. 2005. Uptake of sodium in protoplasts of salt-sensitive and salt-tolerant cultivars of rice, *Oryza sativa* L. determined by the fluorescent dye SBFI. **Journal of Experimental Botany** 56: 3149-3158.
- Kavitha, P. G., Miller, A. J., Mathew, M. K. and Maathuis, F. J. M. 2012. Rice cultivars with differing salt tolerance contain similar cation channels in their root cells. **Journal of Experimental Botany** 63: 3289-3296.
- Kong, H., Leebens-Mack, J., Ni, W., dePamphilis, C. W. and Ma, H. 2004. Highly heterogeneous rates of evolution in the *SKP1* gene family in plants and animals: functional and evolutionary implications. **Molecular Biology and Evolution** 21: 117-128.
- Kumar, V., et al. 2015. Genome-wide association mapping of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa*). **DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes** 22: 133-145.
- Li, H. and Durbin, R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics** 25: 1754-1760.
- Li, H., Shen, J.-J., Zheng, Z.-L., Lin, Y. and Yang, Z. 2001. The Rop GTPase switch controls multiple developmental processes in *Arabidopsis*. **Plant Physiology** 126: 670-684.
- Luo, M., Gu, S.-H., Zhao, S.-H., Zhang, F. and Wu, N.-H. 2006. Rice GTPase OsRacB: potential accessory factor in plant salt-stress signaling. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica** 38: 393-402.
- Lüthje, S., Döring, O., Heuer, S., Lüthen, H. and Böttger, M. 1997. Oxidoreductases in plant plasma membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes** 1331: 81-102.
- Lutts, J. M. K. and Bouharmont, J. 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice

(*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. **Annals of Botany** 78: 389-398.

- Ma, T. Y., Li, Z. W., Zhang, S. Y., Liang, G. T. and Guo, J. 2014. Identification and expression analysis of the *E2 F/DP* genes under salt stress in *Medicago truncatula*. **Genes & Genomics** 36: 819-828.
- Mamo, B. E., Barber, B. L. and Steffenson, B. J. 2014. Genome-wide association mapping of zinc and iron concentration in barley landraces from Ethiopia and Eritrea. **Journal of Cereal Science** 60: 497-506.
- Marmagne, A., et al. 2004. Identification of new intrinsic proteins in *Arabidopsis* plasma membrane proteome. **Molecular & Cellular Proteomics** 3: 675-691.
- Matsushima, N. and Miyashita, H. 2012. Leucine-rich repeat (LRR) domains containing intervening motifs in plants. **Biomolecules** 2: 288-311.
- McKenna, A., et al. 2010. The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Research** 20: 1297-1303.
- Mishra, B., Singh, R. K. and Jetly, V. 1998. Inheritance pattern of salinity tolerance in rice. **Journal of Genetics and Breeding** 52: 325-331.
- Miyamoto, T., et al. 2015. Expression level of the sodium transporter gene *OsHKT2;1* determines sodium accumulation of rice cultivars under potassium-deficient conditions. **Soil Science and Plant Nutrition** 61: 481-492.
- Moffatt, M. F., et al. 2007. Genetic variants regulating *ORMDL3* expression contribute to the risk of childhood asthma. **Nature** 448: 470-473.
- Momayezi, M. R., Zaharah, A. R. and Hanafi, M. M. 2012. The effects of cation ratios on root lamella suberization in rice (*Oryza sativa* L.) with contrasting salt tolerance. **International Journal of Agronomy** 2012: 1-8.
- Moradi, F. and Ismail, A. M. 2007. Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. **Annals of Botany** 99: 1161-1173.
- Morales, G. S., et al. 2012. Growth, photosynthetic activity, and potassium and sodium concentration in rice plants under salt stress. **Acta Scientiarum. Agronomy** 34: 317-324.
- Mou, S., et al. 2013. Functional analysis and expressional characterization of rice ankyrin repeat-containing protein, OsPIANK1, in basal defense against *Magnaporthe oryzae* attack. **PLOS ONE** 8: e59699.

- Munns, R. and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology** 59: 651-658.
- Ninsuwan, U., Pornsirikarn, P., Jundee, N. and Puima, N. 2013. Identification of salt tolerance in Thai indigenous rice on the basis of the Na/K ratio and salt stress responses. **Asian Journal of Plant Sciences** 12: 247-251.
- Nziengui, H., et al. 2007. Reticulon-like proteins in *Arabidopsis thaliana*: structural organization and ER localization. **FEBS Letters** 581: 3356-3362.
- Oguchi, K., Tanaka, N., Komatsu, S. and Akao, S. 2004. Characterization of NADPH-dependent oxidoreductase induced by auxin in rice. **Physiologia Plantarum** 121: 124-131.
- Ogura, T. and Busch, W. 2015. From phenotypes to causal sequences: using genome wide association studies to dissect the sequence basis for variation of plant development. **Current Opinion in Plant Biology** 23: 98-108.
- Ooijen, V. G., et al. 2008. Structure–function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins. **Journal of Experimental Botany** 59: 1383-1397.
- Ostersetzer, O., Cooke, A. M., Watkins, K. P. and Barkan, A. 2005. CRS1, a chloroplast group II intron splicing factor, promotes intron folding through specific interactions with two intron domains. **The Plant Cell** 17: 241-255.
- Parida, A. K. and Das, A. B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 60: 324-349.
- Patterson, N., Price, A. L. and Reich, D. 2006. Population structure and eigenanalysis. **PLoS Genetics** 2: e190.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research** 29: e45.
- Price, A. L., et al. 2006. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. **Nature Genetics** 38: 904-909.
- Rascio, A., et al. 2001. Enhanced osmotolerance of a wheat mutant selected for potassium accumulation. **Plant Science** 160: 441-448.
- Ray-Jones, H., Eyre, S., Barton, A. and Warren, R. B. 2016. One SNP at a time: moving beyond GWAS in psoriasis. **Journal of Investigative Dermatology** 136: 567-573.
- Resende, M. D. V. d., Silva, F. F. e., Junior, M. F. R. R. and Azevedo, C. F. 2014. Biotechnology and plant breeding. USA: Academic Press.
- Rubin, E., Lithwick, G. and Levy, A. A. 2001. Structure and evolution of the hAT

- transposon superfamily. **Genetics** 158: 949-957.
- Saeki, Y., Yasukouchi, A., Nagatomo, Y. and Takaki, H. 2000. Distinctive expression of a zinc-binding protein in rice callus grown in medium with high zinc concentration. **Soil Science and Plant Nutrition** 46: 209-216.
- Sauter, M. 2015. Phytosulfokine peptide signaling. **Journal of Experimental Botany** 66: 5161-5169.
- Schuler, M. A. and Werch-Reichhart, D. 2003. Functional genomics of P450s. **Annual Review of Plant Biology** 54: 629-667.
- Shabala, S. 2003. Regulation of potassium transport in leaves: from molecular to tissue level. **Annals of Botany** 92: 627-634.
- Siringam, K. 2011. Salt stress induced ion accumulation, ion homeostasis, membrane injury and sugar contents in salt-sensitive rice (*Oryza sativa* L. spp. indica) roots under isoosmotic conditions. **African Journal of Biotechnology** 10: 1340-1346.
- Su, J., Shen, Q., David Ho, T.-H. and Wu, R. 1998. Dehydration-stress-regulated transgene expression in stably transformed rice plants. **Plant Physiology** 117: 913-922.
- Sun, C.-W., Chen, L.-J., Lin, L.-C. and Li, H.-m. 2001. Leaf-specific upregulation of chloroplast translocon genes by a CCT motif-containing protein, *CIA2*. **The Plant Cell** 13: 2053-2062.
- Tameling, W. I. L., et al. 2006. Mutations in the NB-ARC domain of I-2 that impair ATP hydrolysis cause autoactivation. **Plant Physiology** 140: 1233-1245.
- Tester, M. and Davenport, R. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. **Annals of Botany** 91: 503-527.
- Timmermans, M. C., Schultes, N. P., Jankovsky, J. P. and Nelson, T. 1998. *Leafbladeless1* is required for dorsoventrality of lateral organs in maize. **Development** 125: 2813-2823.
- Torello, W. A. and Rice, L. A. 1986. Effects of NaCl stress on proline and cation accumulation in salt sensitive and tolerant turfgrasses. **Plant and Soil** 93: 241-247.
- Turner, S. D. 2014. qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. **bioRxiv**.
- Ueda, Y., et al. 2014. Genetic dissection of ozone tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) by a genome-wide association study. **Journal of Experimental Botany** 66: 293-306.
- Untergasser, A., et al. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research** 40: e115.
- Uozumi, N., et al. 2000. The Arabidopsis *HKT1* gene homolog mediates inward Na⁺

- currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **Plant Physiology** 122: 1249-1260.
- Vainberg, I. E., et al. 1998. Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. **Cell** 93: 863-873.
- Valiente, A., Lafuente, A. and Bernardo, M. 2011. Systematic review of the genome wide association studies (GWAS) in schizophrenia. **Revista de Psiquiatría y Salud Mental (English Edition)** 4: 218-227.
- Wang, T.-Z., Xia, X.-Z., Zhao, M.-G., Tian, Q.-Y. and Zhang, W.-H. 2013. Expression of a *Medicago falcata* small GTPase gene, *MfARL1* enhanced tolerance to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry** 63: 227-235.
- Wilsker, D., Patsialou, A., Dallas, P. B. and Moran, E. 2002. ARID proteins: a diverse family of DNA binding proteins implicated in the control of cell growth, differentiation, and development. **Cell Growth Differ** 13: 95-106.
- Xia, Z., et al. 2013. The maize AAA-Type protein SKD1 confers enhanced salt and drought stress tolerance in transgenic tobacco by interacting with lyst-interacting protein 5. **PLOS ONE** 8: e69787.
- Yousufinia, M., Ghasemian, A., Safalian, O. and Asadi, A. 2013. The effect of NaCl on the growth and Na⁺ and K⁺ content of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. **Annals of Biological Research** 4: 80-85.
- Zeng, A., et al. 2017. Genome-wide association study (GWAS) of salt tolerance in worldwide soybean germplasm lines. **Molecular Breeding** 37: 30-44.
- Zhang, L., et al. 2015. Three CCT domain-containing genes were identified to regulate heading date by candidate gene-based association mapping and transformation in rice. **Scientific Reports** 5: 7663-7674.
- Zheng, B., He, H., Zheng, Y., Wu, W. and McCormick, S. 2014. An ARID domain-containing protein within nuclear bodies is required for sperm cell formation in *Arabidopsis thaliana*. **PLOS Genetics** 10: e1004421.
- Zhou, F., et al. 2001. Cell-autonomous expression of barley *Mla1* confers race-specific resistance to the powdery mildew fungus via a *Rar1*-independent signaling pathway. **The Plant Cell** 13: 337-350.
- Zhou, X. and Stephens, M. 2012. Genome-wide efficient mixed model analysis for association studies. **Nature genetics** 44: 821-824.
- Zoubarev, A., et al. 2012. Gemma: a resource for the reuse, sharing and meta-analysis of expression profiling data. **Bioinformatics** 28: 2272-2273.
- กนกวรรณ จารุกัจฉ และ วรัญญา จตุพรประเสริฐ. 2550. สนิป: ความรู้พื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้. **Thai Pharmaceutical and Health Science Journal** 2: 166-174.

กองวิจัยและพัฒนาข้าว. องค์ความรู้เรื่องข้าว. [ออนไลน์]. 2559. แหล่งที่มา:

<http://www.brrd.in.th/rkb/>

ชาญพิทยา ฉิมพาลี. สถิติและแนวโน้มพื้นที่ปลูกข้าวของประเทศไทย. [ออนไลน์]. 2556. แหล่งที่มา:

[http://www.thairice.org/doc_dl/seminar-29Oct13/3-powerpoint\(K.Chanpitaya\).pdf](http://www.thairice.org/doc_dl/seminar-29Oct13/3-powerpoint(K.Chanpitaya).pdf)

ดวงใจ สุริยาอรุณโรจน์. 2546. การคัดพันธุ์ข้าวจากลักษณะทางสรีระที่เป็นผลจากการทนต่อสภาพความเค็มเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นพคุณ คุณผลวัฒนา. 2558. การประเมินความสามารถทนเค็มของต้นกล้าข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยและการเชื่อมโยงทั้งจีโนมกับลักษณะทนเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. World rice production consumption and ending stocks.

[ออนไลน์]. 2560. แหล่งที่มา:

http://www.thairiceexporters.or.th/world%20rice%20prod_cons_ends.htm

อรุณี ยูวะนิยม. การจัดการแก้ไขดินเค็มในประเทศไทย. [ออนไลน์]. 2546. แหล่งที่มา:

http://www.ldd.go.th/Lddwebsite/web_ord/Technical/pdf/P_Technical03001_5.pdf



ภาคผนวก ก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1. ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของปริมาณโซเดียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออน

– Analysis of Covariance

- ค่า log ของปริมาณโพแทสเซียมไอออนในข้าวที่ได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน จากการทดสอบความคงที่ของ variance ด้วย Levene's test พบว่าค่า p-value สูงกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนด (0.05) ดังตารางที่ 8 หมายความว่า variance มีความคงที่ สามารถนำไปทดสอบต่อได้ จากนั้นทำการทดสอบว่าตัวแปรพร้อมมีอิทธิพลต่อตัวแปรตามซึ่งก็คือปริมาณโพแทสเซียมไอออนในข้าวที่ได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วันหรือไม่ จากตารางที่ 9 พบว่าค่า p-value ของค่าตัวแปรตาม (cov K) สูงกว่าระดับนัยสำคัญ จึงหมายความว่าตัวแปรพร้อมไม่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม

ตารางภาคผนวกที่ 1 การทดสอบความคงที่ของ variance ของปริมาณโพแทสเซียมไอออนในข้าวที่ได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: logkd9

F	df1	df2	Sig.
1.051	78	232	.382

ตารางภาคผนวกที่ 2 การทดสอบอิทธิพลของตัวแปรพร้อมต่อปริมาณโพแทสเซียมไอออนในข้าวที่ได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	15.975 ^a	157	.102	.715	.981
Intercept	3.402	1	3.402	23.912	.000
cul	8.995	78	.115	.810	.849
cov_K	.002	1	.002	.015	.904
cul * cov_K	8.812	78	.113	.794	.871
Error	21.769	153	.142		
Total	130.269	311			
Corrected Total	37.744	310			

a. R Squared = .423 (Adjusted R Squared = -.169)

2. ค่า log ของอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในข้าวที่ได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน

จากการทดสอบด้วย Levene's test พบว่าค่า p-value สูงกว่าระดับนัยสำคัญเช่นเดียวกัน แสดงว่าสามารถใช้ค่านี้ในการวิเคราะห์ได้ (ตารางภาคผนวกที่ 3) เมื่อทดสอบอิทธิพลของตัวแปรร่วมที่มีต่อตัวแปรตามคืออัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน พบว่าค่า p-value ของตัวแปรร่วมซึ่งได้แก่ค่าอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในภาวะปกติ (cov NaK) ต่ำกว่าระดับนัยสำคัญ หมายความว่าตัวแปรร่วมมีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม (ตารางภาคผนวกที่ 4) จากนั้นทำการวิเคราะห์โดยตัดเอาผลของตัวแปรร่วมออก ค่า p-value (cul) สูงกว่าระดับนัยสำคัญ (ตารางภาคผนวกที่ 6) หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่า log ของอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในข้าว 80 พันธุ์/สายพันธุ์ ซึ่งผลการทดสอบ ANOVA ก่อนตัดเอาตัวแปรร่วมออกก็พบว่าค่า log ของอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน (ตารางภาคผนวกที่ 5)

ตารางภาคผนวกที่ 3 การทดสอบความคงที่ของ variance ของปริมาณโพแทสเซียมไอออนในข้าวที่ได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: lognakd9

F	df1	df2	Sig.
.977	78	234	.537

ตารางภาคผนวกที่ 4 การทดสอบอิทธิพลของตัวแปรร่วมต่อปริมาณโพแทสเซียมไอออนในข้าวที่ได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วัน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	17.826 ^a	157	.114	.807	.909
Intercept	.792	1	.792	5.630	.019
cul	7.891	78	.101	.719	.947
cov_NaK	.996	1	.996	7.079	.009
cul * cov_NaK	8.462	78	.108	.771	.899
Error	21.799	155	.141		
Total	97.537	313			
Corrected Total	39.625	312			

a. R Squared = .450 (Adjusted R Squared = -.107)

ตารางภาคผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ ANOVA ก่อนหักอิทธิพลของตัวแปรร่วมออกจากค่าตัวแปรตาม

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.923	78	.089	.667	.981
Within Groups	31.552	237	.133		
Total	38.474	315			

ตารางภาคผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ ANOVA หลังทำการหักอิทธิพลของตัวแปรร่วมออกจากค่าตัวแปรตาม

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	9.364 ^a	79	.119	.913	.678
Intercept	9.924	1	9.924	76.409	.000
cov_NaK	.069	1	.069	.530	.468
cul	9.318	78	.119	.920	.662
Error	30.261	233	.130		
Total	97.537	313			
Corrected Total	39.625	312			

a. R Squared = .236 (Adjusted R Squared = -.023)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

— ผลการวิเคราะห์ ANOVA

ตารางภาคผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ ANOVA ของปริมาณโซเดียมไอออนในส่วนใบของข้าวที่ได้รับภาวะเค็ม 6 วัน

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2258.986	78	28.961	1.280	.082
Within Groups	5361.975	237	22.624		
Total	7620.961	315			

ตารางภาคผนวกที่ 8 การวิเคราะห์ ANOVA ของปริมาณโซเดียมไอออนในส่วนใบของข้าวที่ได้รับ
ภาวะเค็ม 9 วัน

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16492.749	79	208.769	1.912	.000
Within Groups	25884.246	237	109.216		
Total	42376.995	316			

ตารางภาคผนวกที่ 9 การวิเคราะห์ ANOVA ของปริมาณโพแทสเซียมไอออนในส่วนใบของข้าวที่
ได้รับภาวะเค็ม 6 วัน

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7312843.906	78	93754.409	.991	.508
Within Groups	22240391.300	235	94639.963		
Total	29553235.206	313			

ตารางภาคผนวกที่ 10 การวิเคราะห์ ANOVA ของปริมาณโพแทสเซียมไอออนในส่วนใบของข้าวที่
ได้รับภาวะเค็ม 9 วัน

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	847.209	79	10.724	.534	.999
Within Groups	4820.639	240	20.086		
Total	5667.849	319			

ตารางภาคผนวกที่ 11 การวิเคราะห์ ANOVA ของอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในส่วน
ใบของข้าวที่ได้รับภาวะเค็ม 6 วัน

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	68.014	78	.872	.983	.525
Within Groups	208.526	235	.887		
Total	276.540	313			

ตารางภาคผนวกที่ 12 การวิเคราะห์ ANOVA ของอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในส่วน
ใบของข้าวที่ได้รับภาวะเค็ม 9 วัน

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1046.034	79	13.241	1.345	.046
Within Groups	2342.788	238	9.844		
Total	3388.822	317			

ตารางภาคผนวกที่ 13 การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณโซเดียมไอออนเมื่อได้รับ
ภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วันด้วย Duncan's multiple range test (DMRT)

cul	N	Subset				
		1	2	3	4	5
168	4	5.547000				
101	4	5.615750				
199	4	6.049250	6.049250			
190	4	6.076500	6.076500			
105	4	6.118000	6.118000			
152	4	6.603500	6.603500	6.603500		
200	4	6.794250	6.794250	6.794250		
150	4	7.334250	7.334250	7.334250		
44	4	7.659000	7.659000	7.659000		
65	4	7.667250	7.667250	7.667250		
182	4	7.694000	7.694000	7.694000		
174	4	7.865250	7.865250	7.865250		
185	4	7.963500	7.963500	7.963500		
156	4	8.090000	8.090000	8.090000		
205	4	8.259250	8.259250	8.259250		
193	4	8.299750	8.299750	8.299750		
104	4	8.491000	8.491000	8.491000		
132	4	8.794150	8.794150	8.794150		
166	4	9.010750	9.010750	9.010750	9.010750	
102	4	9.300550	9.300550	9.300550	9.300550	
161	4	9.337500	9.337500	9.337500	9.337500	
187	4	9.400250	9.400250	9.400250	9.400250	
192	4	9.426250	9.426250	9.426250	9.426250	
172	4	9.458750	9.458750	9.458750	9.458750	

188	4	9.508750	9.508750	9.508750	9.508750
179	4	9.582500	9.582500	9.582500	9.582500
159	4	9.957750	9.957750	9.957750	9.957750
133	4	10.231750	10.231750	10.231750	10.231750
110	4	10.599000	10.599000	10.599000	10.599000
22	4	10.786750	10.786750	10.786750	10.786750
180	4	11.088000	11.088000	11.088000	11.088000
21	4	11.208500	11.208500	11.208500	11.208500
165	4	11.855750	11.855750	11.855750	11.855750
175	4	12.045750	12.045750	12.045750	12.045750
162	4	12.138250	12.138250	12.138250	12.138250
151	4	12.223750	12.223750	12.223750	12.223750
170	4	12.229500	12.229500	12.229500	12.229500
107	3	12.279000	12.279000	12.279000	12.279000
167	4	12.400250	12.400250	12.400250	12.400250
57	4	12.408250	12.408250	12.408250	12.408250
157	4	12.411500	12.411500	12.411500	12.411500
189	4	12.542750	12.542750	12.542750	12.542750
183	4	12.851750	12.851750	12.851750	12.851750
204	4	13.072500	13.072500	13.072500	13.072500
86	4	13.676500	13.676500	13.676500	13.676500
31	4	13.776000	13.776000	13.776000	13.776000
173	4	13.792500	13.792500	13.792500	13.792500
27	4	13.942250	13.942250	13.942250	13.942250
169	4	13.946250	13.946250	13.946250	13.946250
160	4	14.475000	14.475000	14.475000	14.475000
60	4	14.481250	14.481250	14.481250	14.481250
171	4	14.915500	14.915500	14.915500	14.915500
109	4	14.958500	14.958500	14.958500	14.958500
158	4	15.202500	15.202500	15.202500	15.202500
53	4	15.255000	15.255000	15.255000	15.255000
164	4	15.277750	15.277750	15.277750	15.277750
186	4	15.355750	15.355750	15.355750	15.355750
154	4	15.472000	15.472000	15.472000	15.472000
201	4	15.562750	15.562750	15.562750	15.562750
177	4	15.726000	15.726000	15.726000	15.726000
197	4	15.867500	15.867500	15.867500	15.867500
181	4	15.922500	15.922500	15.922500	15.922500
198	4	15.983500	15.983500	15.983500	15.983500
6	4	16.075500	16.075500	16.075500	16.075500
51	4	16.107750	16.107750	16.107750	16.107750

194	4	16.324000	16.324000	16.324000	16.324000	
135	4	16.968475	16.968475	16.968475	16.968475	
153	4	17.258250	17.258250	17.258250	17.258250	
163	4	17.441750	17.441750	17.441750	17.441750	
98	4	17.635750	17.635750	17.635750	17.635750	
155	4	17.869750	17.869750	17.869750	17.869750	
41	4	18.226750	18.226750	18.226750	18.226750	
68	4	20.595500	20.595500	20.595500	20.595500	
148	4	21.533000	21.533000	21.533000	21.533000	
202	4	22.667000	22.667000	22.667000	22.667000	
40	4	23.183500	23.183500	23.183500	23.183500	
112	3		24.950000	24.950000	24.950000	
48	4			25.435000	25.435000	
30	3				28.000000	
208	4					61.892500
Sig.		.072	.053	.054	.051	1.000



ตารางภาคผนวกที่ 14 การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียม
ไอออนเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 9 วันด้วย Duncan's multiple range test (DMRT)

cul	N	Subset			
		1	2	3	4
101	4	1.032531			
168	4	1.551273	1.551273		
175	4	1.575347	1.575347		
172	4	1.763925	1.763925		
200	4	2.012480	2.012480		
199	4	2.076552	2.076552		
180	4	2.160983	2.160983	2.160983	
174	4	2.165156	2.165156	2.165156	
166	4	2.200873	2.200873	2.200873	
169	4	2.205240	2.205240	2.205240	
190	4	2.211211	2.211211	2.211211	
173	4	2.391663	2.391663	2.391663	
110	4	2.457882	2.457882	2.457882	
151	4	2.513612	2.513612	2.513612	
187	4	2.557653	2.557653	2.557653	
107	3	2.573864	2.573864	2.573864	
135	4	2.677839	2.677839	2.677839	
157	4	2.698949	2.698949	2.698949	
188	4	2.709109	2.709109	2.709109	
194	4	2.718197	2.718197	2.718197	
189	4	2.720189	2.720189	2.720189	
185	4	2.758780	2.758780	2.758780	
192	4	2.792523	2.792523	2.792523	
197	4	2.863377	2.863377	2.863377	
170	4	2.950225	2.950225	2.950225	
156	4	2.968821	2.968821	2.968821	
98	4	2.997429	2.997429	2.997429	
205	4	3.011790	3.011790	3.011790	
165	4	3.087432	3.087432	3.087432	
53	4	3.090505	3.090505	3.090505	
177	4	3.138189	3.138189	3.138189	
132	4	3.213582	3.213582	3.213582	
201	4	3.213803	3.213803	3.213803	
153	4	3.229047	3.229047	3.229047	
133	4	3.230172	3.230172	3.230172	

105	4	3.263839	3.263839	3.263839
182	4	3.283758	3.283758	3.283758
150	4	3.360949	3.360949	3.360949
27	4	3.381450	3.381450	3.381450
171	4	3.508597	3.508597	3.508597
163	4	3.523609	3.523609	3.523609
159	4	3.557251	3.557251	3.557251
161	4	3.592236	3.592236	3.592236
160	4	3.605148	3.605148	3.605148
44	4	3.618826	3.618826	3.618826
162	4	3.721448	3.721448	3.721448
102	4	3.801323	3.801323	3.801323
109	4	3.816666	3.816666	3.816666
167	4	3.848064	3.848064	3.848064
112	3	3.938291	3.938291	3.938291
158	4	3.954836	3.954836	3.954836
57	4	4.021879	4.021879	4.021879
31	4	4.197838	4.197838	4.197838
179	4	4.309445	4.309445	4.309445
148	4	4.349427	4.349427	4.349427
193	4	4.367735	4.367735	4.367735
6	4	4.370637	4.370637	4.370637
22	4	4.374597	4.374597	4.374597
164	4	4.525848	4.525848	4.525848
86	4	4.617543	4.617543	4.617543
154	4	4.686173	4.686173	4.686173
30	4	4.706841	4.706841	4.706841
202	4	4.740918	4.740918	4.740918
181	4	4.865528	4.865528	4.865528
183	4	5.010808	5.010808	5.010808
104	4	5.060940	5.060940	5.060940
60	4	5.061120	5.061120	5.061120
21	4	5.065404	5.065404	5.065404
155	4	5.200698	5.200698	5.200698
40	4	5.214066	5.214066	5.214066
41	4	5.454688	5.454688	5.454688
68	4	5.660072	5.660072	5.660072
204	4	5.785017	5.785017	5.785017
198	4	6.047110	6.047110	6.047110
51	4	6.230998	6.230998	6.230998
152	4	6.292647	6.292647	6.292647

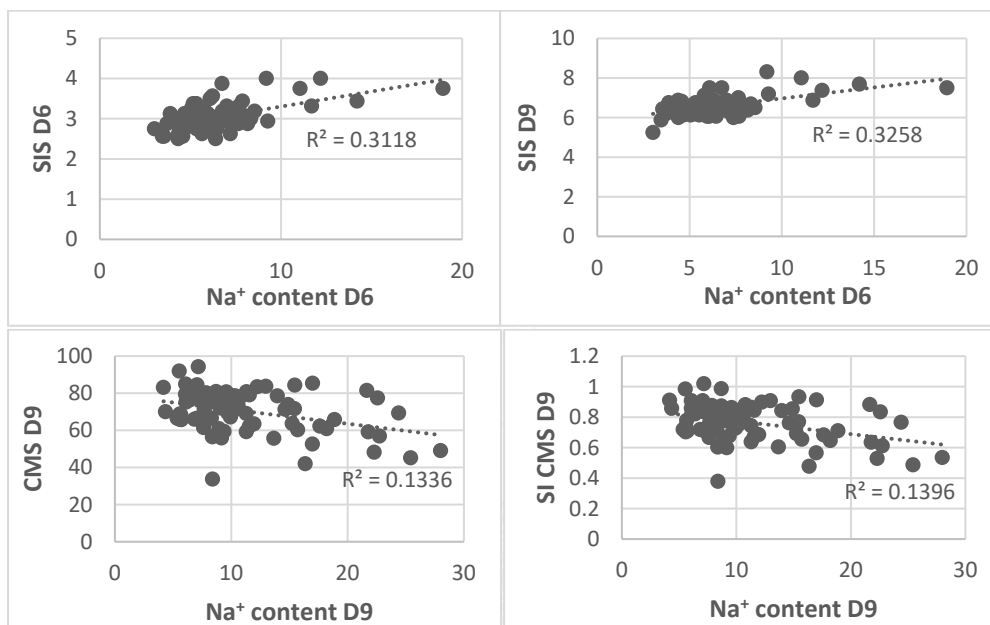
65	4	6.513206	6.513206	6.513206	
186	4		7.212809	7.212809	
48	4			7.902620	
208	4				14.615205
Sig.		.062	.054	.050	1.000



2. แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมไอออนกับพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของข้าวระยะกล้า

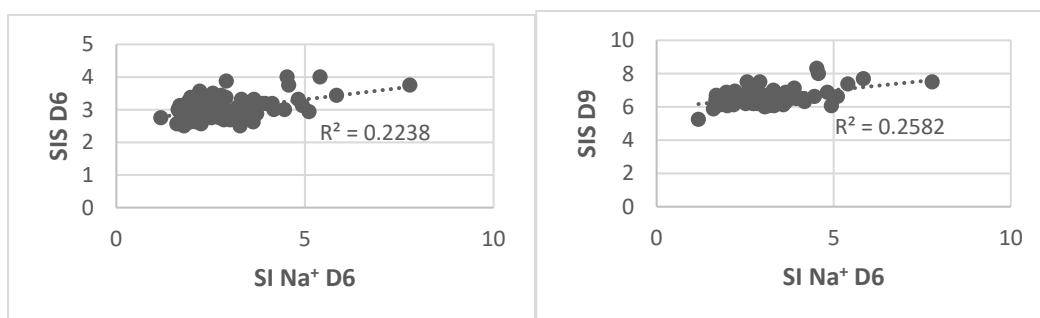
— ความสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์การเจริญกับปริมาณโซเดียมไอออนในข้าว

1. ความสัมพันธ์กับปริมาณโซเดียมไอออนในวันที่ 6 และ 9 หลังได้รับภาวะเค็ม



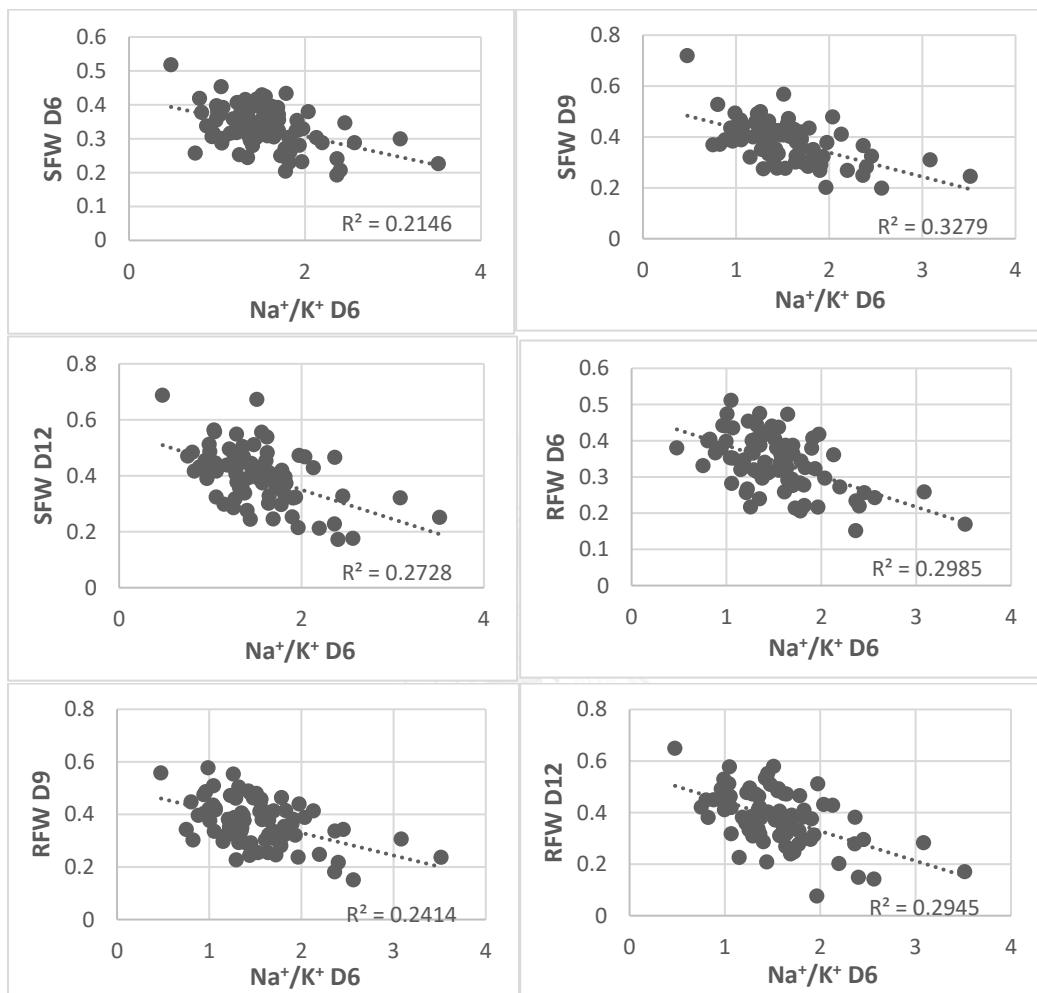
ภาพภาคผนวกที่ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโซเดียมไอออนในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็มกับค่าดัชนีความเสียหายจากความเค็มในวันที่ 6 (A) และ 9 (B) และความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโซเดียมไอออนในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็มกับเสถียรภาพเยื่อหุ้มเซลล์ในวันที่ 9 (C) และค่า stability index ของเสถียรภาพเยื่อหุ้มเซลล์ในวันที่ 9 หลังได้รับภาวะเค็ม (D)

2. ความสัมพันธ์กับค่า stability index ของปริมาณโซเดียมไอออนในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็ม

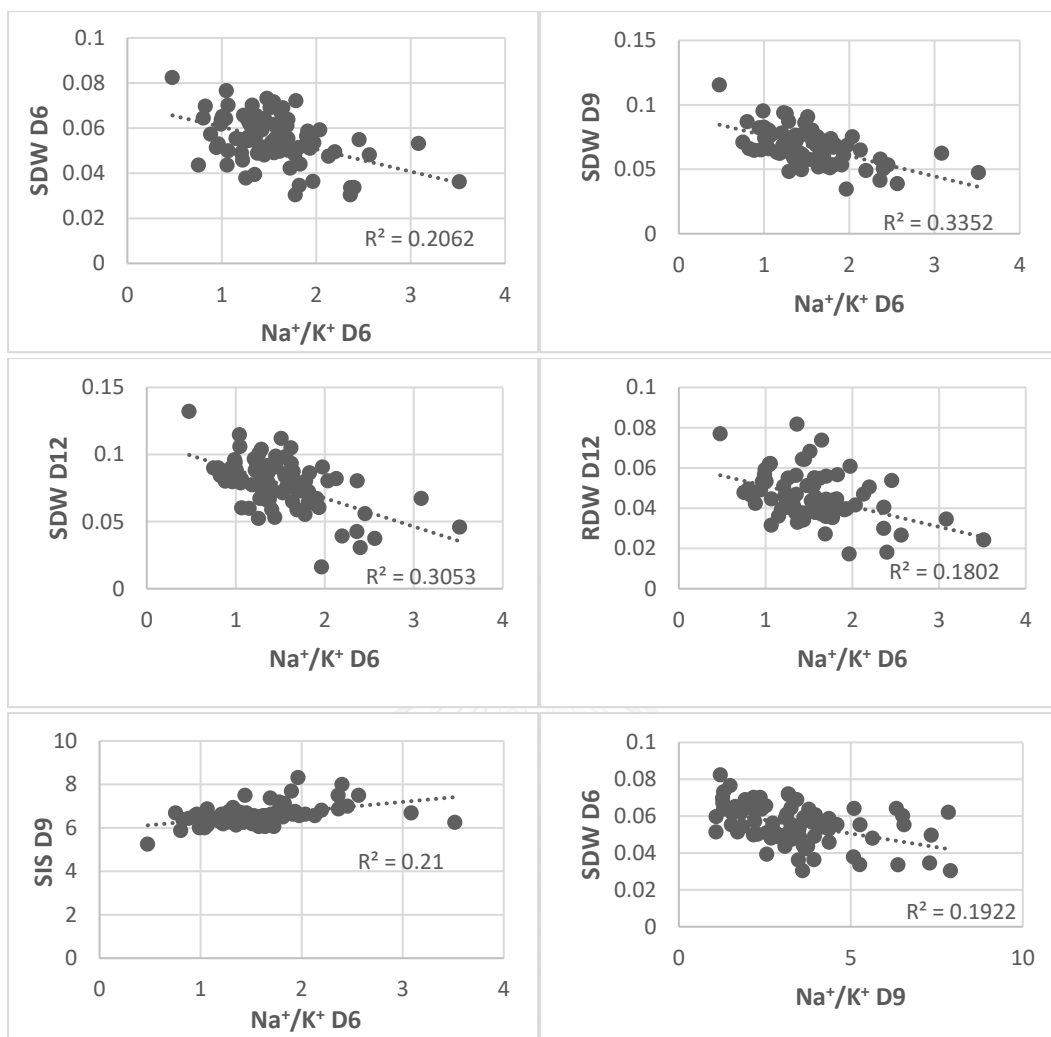


ภาพภาคผนวกที่ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า stability index ของปริมาณโซเดียมไอออนในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็มกับดัชนีความเสียหายจากความเค็มในวันที่ 6 (A) และ 9 (B)

- ความสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์การเจริญกับอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในข้าว



ภาพภาคผนวกที่ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็มกับน้ำหนักสดส่วนต้นในวันที่ 6 9 และ 12 (A-C) และน้ำหนักสดส่วนรากในวันที่ 6 9 และ 12 (D-F)



ภาพภาคผนวกที่ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็มกับน้ำหนักแห้งส่วนต้นในวันที่ 6 9 และ 12 (A-C) น้ำหนักแห้งส่วนรากในวันที่ 12 (D) และดัชนีความเสียหายจากความเค็มในวันที่ 9 (E) หลังได้รับภาวะเค็ม และความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนโซเดียมต่อโพแทสเซียมไอออนในวันที่ 9 กับน้ำหนักแห้งส่วนต้นในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็ม (F)

3. ขั้นตอนการศึกษาการเชื่อมโยงทั้งจีโนม

– การเตรียมข้อมูลฟีโนไทป์

จัดเรียงข้อมูลของแต่ละฟีโนไทป์ตามหมายเลขพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการหา snip และใส่ข้อมูลเป็น -9 หากพันธุ์ใดไม่มีข้อมูล จากนั้นแปลงไฟล์ให้อยู่ในรูปแบบ .txt (tab delimited)

– การ call SNPs

1. นำ raw reads ที่ได้จากการทำ exome sequencing มาเทียบบน reference genome ด้วยโปรแกรม Burrow Wheeler Aligner (BWA) (Li และ Durbin, 2009) จะได้ไฟล์นามสกุล .sam
2. ทำการ mark duplicate ด้วยเครื่องมือที่ชื่อว่า PICARD (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) จะทำให้ได้ไฟล์นามสกุล .bam
3. จัดเรียงไฟล์นามสกุล .bam ด้วยเครื่องมือที่ชื่อว่า samtools (Li และ Durbin, 2009)
4. จัดการกับตำแหน่งที่เป็น insertion และ deletion ในลำดับเบสเพื่อไม่ให้เกิดการ alignment ที่ผิดพลาด จากนั้น call variants ด้วย Genome Analysis Toolkit (GATK) (McKenna และคณะ, 2010) จะได้ไฟล์ snip ที่อยู่ในนามสกุล .vcf ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการหาความเชื่อมโยงกับฟีโนไทป์ต่อไป

– การวิเคราะห์ความเชื่อมโยงทั้งจีโนม

1. แปลงไฟล์ snip ให้อยู่ในรูปแบบตาราง
2. คัดกรอง snip ตามเกณฑ์ต่างๆ เช่น คัดเอา multiallelic SNPs และ snip ที่ missing เกิน 20% ออก
3. สร้าง ped file ที่มีข้อมูล snip และจีโนไทป์
4. สร้างไฟล์หัวตารางที่มีนามสกุล .map แล้วรวมกับไฟล์ snip จนได้ไฟล์นามสกุล .bed
5. ใช้โปรแกรม GEMMA (Zoubarov และคณะ, 2012) ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างแต่ละ snip กับค่าฟีโนไทป์ ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้สามารถนำไปเปิดดูข้อมูลค่า p-value ของ snip แต่ละตำแหน่งได้ด้วยโปรแกรม Microsoft excel
6. สร้าง quantile-quantile plot (Q-Q plot) และ Manhattan plot ด้วยโปรแกรม R โดยใช้ 'qqman' package (Turner, 2014) ซึ่งสามารถนำออกมาในรูปแบบของไฟล์ภาพนามสกุล .tiff ได้

— การเลือกสนิปส์ที่มีความเชื่อมโยงกับฟีโนไทป์อย่างมีนัยสำคัญ

1. เปิดไฟล์ผลการหาความเชื่อมโยงที่มีตำแหน่งสนิปส์และค่า p-value ของแต่ละพารามิเตอร์ ในโปรแกรม Microsoft excel แล้วเลือกเอาเฉพาะสนิปส์ที่มีค่า p-value ต่ำกว่าค่า cutoff (10^{-7})
2. นำตำแหน่งของสนิปส์ที่เลือกไปค้นหาว่าตรงกับตำแหน่งของยีนใดในจีโนมของข้าวด้วยโปรแกรม Integrative Genomics Viewer (IGV2.3.10) (<http://www.broadinstitute.org/igv>) จนได้ตำแหน่ง locus ของยีน
3. นำตำแหน่งของยีนที่ได้ไปค้นหาในฐานข้อมูล MSU Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu>) แล้วค้นหาหน้าที่ของยีน และความเกี่ยวข้องกับความทนเค็มในข้าวหรือพืชชนิดอื่นๆ





ภาคผนวก ข

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4. สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของสารละลายอาหารสูตร WP 1 ลิตร

- KNO_3 0.58 กรัม
- CaSO_4 0.5 กรัม
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.45 กรัม
- Triple superphosphate 0.25 กรัม
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 กรัม
- Urate 0.06 กรัม
- สารละลาย Fe-EDTA 2.5 mg/ml 2 มิลลิลิตร

5. สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของ RNA extraction buffer

- 0.1M Tris pH 8.0
- 5 mM EDTA pH 8.0
- 0.1M NaCl
- 0.5% SDS
- 1% 2-mercaptoethanol (เติมก่อนใช้งาน)

6. การเตรียม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1)(v/v)

- ละลาย phenol ในขวดโดยใช้ water bath ที่ตั้งอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส แล้วเติม hydroxyquinoline จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1%
- เติม 1M Tris HCl pH 8.0 เท่ากับปริมาตรของ phenol ในขวด คนให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้จน phenol และ Tris แยกชั้นออกจากกัน จากนั้นแยก phenol ออกจากสารละลาย Tris โดยใช้กรวยแยก
- เติม 1M Tris HCl pH 8.0 อีกครั้ง คนให้เข้ากัน แล้วแยก phenol ออกตามวิธีในข้อ 5.2
- ทำซ้ำเรื่อยๆ จน phenol มีค่า pH มากกว่า 7.8 โดยเติม Tris HCl ที่ความเข้มข้นลดลง เป็น 0.5 และ 0.1M ตามลำดับ
- เตรียม Chloroform : isoamylalcohol ในอัตราส่วน 24:1 โดยผสม chloroform 10 มิลลิลิตร เข้ากับ isoamylalcohol 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา
- นำ phenol ที่เตรียมได้จากข้อ 5.4 มาผสมกับ chloroform : isoamylalcohol ในข้อ 5.5 ด้วยอัตราส่วน 1:1
- เทสารละลาย phenol : chloroform : isoamylalcohol ปริมาตร 500 มิลลิลิตรเก็บในขวดสีชา และฉาบผิวของสารละลายด้วย 0.1M Tris แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

7. สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในการเตรียม DEPC treated water

- 0.1% (v/v) DEPC
- Sterile water

8. สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในการเตรียม 5x TBE buffer (Tris borate EDTA)

- Tris base 54 กรัม
- Boric acid 27.5 กรัม
- 0.5M EDTA (pH 8.0) 20 มิลลิลิตร

9. DNA/RNA loading dye

- 30% (v/v) glycerol in water
- 0.25% (w/v) bromophenol blue
- 0.25% (w/v) xylene cyanol

10. การสกัด total RNA ตามวิธีของ Box และคณะ (2011)

- เตรียม RNA extraction buffer แล้วแช่ใน waterbath เพื่อให้มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
- บดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วนำใส่หลอด microcentrifuge ที่เย็นจัด
- เติม RNA extraction buffer ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ใส่ตัวอย่าง แล้วพลิกหลอดไปมา
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 10-15 นาที แล้วดูดเอาส่วนสารละลายใส่ในหลอด microcentrifuge ใหม่
- เติม phenol : chloroform : isoamylalcohol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที
- เตรียม isopropanol 240 ไมโครลิตร ผสมกับ sodium acetate (pH 5.2) 30 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดใหม่
- ดูดเอาส่วนของสารละลายที่ได้จากข้อ 9.5 ไม่เกิน 300 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่เตรียมไว้ในข้อ 9.6 ผสมสารละลายให้เข้ากันอย่างช้าๆ แล้วนำหลอดสารละลายไปเก็บในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาทีเพื่อให้กรดนิวคลีอิกตกตะกอน
- นำหลอดสารละลายออกจากตู้แช่ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดเอาส่วนสารละลายทิ้งไป

- ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างตะกอนซ้ำอีก 1 รอบ
- รอให้สารละลายในหลอดแห้งจนเหลือแต่ตะกอน แล้วละลายตะกอนด้วย DEPC-treated water

11. การกำจัด DNA ออกจากตัวอย่าง RNA ที่สกัดได้ด้วยเอนไซม์ DNase I

- สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยากำจัด DNA ได้แก่
 - Total RNA 5 ไมโครกรัม
 - DNaseI buffer 3 ไมโครลิตร
 - DNase (RNase-free) 1 ไมโครลิตร
 - DEPC-treated water ไม่เกิน 50 ไมโครลิตร
- ผสมสารเคมีข้างต้น แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที
- จากนั้นเติม DEPC-treated water ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ phenol : chloroform : isoamylalcohol ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที
- ดูดส่วนสารละลายใสหลอดใหม่ แล้วเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 1/10 เท่าของส่วนสารละลาย และเติม isopropanol ปริมาตร 6/10 เท่าของส่วนสารละลาย เก็บในตู้แช่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน
- นำออกมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที
- ดูดเอาส่วนสารละลายทิ้งไป แล้วล้างส่วนตะกอนด้วย 80% ethanol ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จำนวนสองรอบ
- รอให้สารละลายในหลอดแห้งจนเหลือแต่ตะกอน แล้วละลายตะกอนด้วย DEPC-treated water

12. การแปลง mRNA ให้เป็น cDNA ด้วยการทำให้ reverse transcription (RT)-PCR

- สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาการสร้าง cDNA สายแรกประกอบด้วย
 - 5X iScript reverse transcription supermix 4 ไมโครลิตร
 - RNA template (500 นาโนกรัม) 1 ไมโครลิตร
 - DEPC-treated water 15 ไมโครลิตร
- ผสมสารเคมีข้างต้น แล้วทำปฏิกิริยาโดยใช้เวลาในการ priming 5 นาทีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

- จากนั้นทำปฏิกิริยา reverse transcription เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส
- และทำปฏิกิริยา reverse transcription inactivation เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส จะได้สาย cDNA ที่เป็นแม่แบบในการทำ quantitative RT-PCR ต่อไป

13. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วย quantitative RT-PCR

- นำสาย cDNA ที่สร้างได้มาใช้เป็นแม่แบบในการทำ quantitative RT-PCR ด้วยเครื่อง iCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) โดยใช้โปรแกรมที่ออกแบบจำเพาะต่อยีนอ้างอิง (*EF1 α*) หรือยีนที่ต้องการตรวจสอบระดับการแสดงออกในปฏิกิริยา ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย

QPCR Green Master Mix LRox, 2x (Biotechrabbit, Germany)	5 μ l
5 μ M Forward primer	0.5 μ l
5 μ M Reverse primer	0.5 μ l
Sterile water	3 μ l
cDNA	1 μ l

- เริ่มต้นปฏิกิริยาโดยใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นทำ PCR จำนวน 39 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วยอุณหภูมิและเวลาดังนี้
 - แยกสาย cDNA ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที
 - จับคู่ primer กับสาย cDNA ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
 - ทำปฏิกิริยาเพื่อวิเคราะห์หาค่า melting curve ที่อุณหภูมิช่วง 70-90 องศาเซลเซียสโดยเพิ่มอุณหภูมิขึ้นครั้งละ 0.5 องศาเซลเซียสนาน 5 วินาที
- เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนที่สนใจกับยีนที่ใช้เป็น control ได้แก่ ยีน *EF1 α* โดยใช้ค่าความชันจากกราฟมาตรฐานในการคำนวณการแสดงออกสัมพัทธ์ (relative quantification)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวณัฐธยาน์ ตันติภิรมย์ เกิดวันที่ 3 เมษายน พ.ศ. 2534 ที่จังหวัดสงขลา สำเร็จ การศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในปีการศึกษา 2555 และเข้าศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ ในภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2556

การนำเสนอผลงาน

- นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในหัวข้อเรื่อง Salinity effects on Na⁺:K⁺ ratios in local Thai rice *Oryza sativa* L. ที่งานประชุม International Congress on Chemical, Biological and Environmental Sciences 2015 ระหว่างวันที่ 7-9 พฤษภาคม 2558 ที่เมือง เกียวโต ประเทศญี่ปุ่น

- นำเสนอผลงานแบบบรรยายในหัวข้อเรื่อง ผลของความเค็มในดินที่มีต่ออัตราส่วน โขเดียมและโพแทสเซียมไอออนในข้าวพื้นเมืองไทย ที่งานประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 9 ระหว่างวันที่ 3-5 มิถุนายน 2558 ณ โรงแรมแอมบาสเดอร์ สุขุมวิท กรุงเทพมหานคร

การตีพิมพ์บทความทางวิชาการ

Tantipiom, N., Khunpolwatana, N., Imyim, A., Buaboocha, T., Pongpanich, M. and Chadchawan, S. 2015. Salinity effects Na⁺:K⁺ ratios in local Thai rice *Oryza sativa* L. ICCBES 2015: 617-629.