การประเมินลักษณะทนแล้งใน chromosome substitution lines (CSSL) ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในระยะไม่สืบพันธุ์

The Evaluation of Some Drought Stress Tolerance Phenotypes in Chromosome Substitution Lines (CSSL) of Khao Dok Mali 105 Rice (*Oryza sativa* L. 'Khao Dok Mali 105') at Vegetative Stage

บุญธิดา โฆษิตทรัพย์[1], **นับทอง จรุงวงศ์เสถียร**[1], **นพวิชญพงศ์ เครือสาร**[1], **พนิตา ชุติมานุกูล**[1], **ฝนทิพย์ หนูทอง**[1], **ปิยาภรณ์ มนต์ขลัง**[1], **วราลักษณ์ เกษตรานันท์**[1], **ศักดิ์ชัย เสือขำ**[2], **โจนาลิซา เซี่ยงหลิว**[2] **และ ศุภจิตรา ชัชวาลย์**[1]*

Boonthida Kositsup[1], Nubtong Jarungwongsatean[1], Nopwichayapong Khrueasan [1], Panita Chutimanukul[1], Fonthip Noothong[1], Piyaporn Monkhlang[1], Waraluk Kasettranun[1], Sakchai Suakham[2], Jonaliza L.Siengliw[2], Supachitra Chadchawan[1]*

[1]*หน่วยปฏิบัติการวิจัยสิ่งแวดล้อมและสรีรวิทยาของพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330;* [2]*หน่วยค้นหาและใช้ประโยชน์จากยีนข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140*

[1]*Environment and Plant Physiology Research Unit, Dept. of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330;* [2]*Rice Gene Discovery Unit, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakorn Pathom 73140*

**Corresponding author: s_chadchawan@hotmail.com; Supachitra.C@chula.ac.th*

บทคัดย่อ

การประเมินลักษณะความคงเขียวและค่าคลอโรฟิลล์ฟลูออเรสเซนส์ในระยะไม่สืบพันธุ์ของข้าวสายพันธุ์ที่มียีนทนแล้งจากโครโมโซมต่างๆ โดยมีพื้นฐานทางพันธุกรรมเป็นข้าวขาวดอกมะลิ 105 ร่วมกับสายพันธุ์พ่อแม่ที่เป็น double haploid line เมื่อได้รับภาวะแล้งในระยะไม่สืบพันธุ์พบว่า ลักษณะความคงเขียวเมื่อได้รับความแล้งน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับยีนทนแล้งจากโครโมโซมที่ 3 และ 4 ส่วนความสามารถในการรักษาประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสง 2 เกี่ยวข้องกับยีนทนแล้งบนโครโมโซมที่ 1, 3, 4 และ 9 อย่างไรก็ดีข้าวในระยะไม่สืบพันธุ์นี้แสดงความสามารถในการปรับการทำงานของระบบแสง 2 ต่อความเครียดจากความแล้งได้ดี

ABSTRACT

The evaluation of stay green phenotype and chlorophyll fluorescence parameter during drought stress at vegetative stage was performed on chromosome substitution lines (CSSL) of Khao Dok Mali105 (KDML105) rice (*Oryza sativa* L. 'KDML105') and their parental double haploid lines, DH212 and DH103. The data suggested that stay green phenotype for drought response at vegetative stage located on chromosome 3 and 4, while the ability to maintain photosystem II efficiency, determined by chlorophyll fluorescence value was suggested to locate on chromosome 1, 3, 4 and 9. However, rice plant at vegetative stage showed the good ability to adapt photosystem function to drought stress.

คำสำคัญ: ข้าว, ความแล้ง, ลักษณะความคงเขียว, คลอโรฟิลล์ฟลูออเรสเซนส์

Keywords: rice, drought, stay green phenotype, chlorophyll fluorescence

บทนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจลำดับต้น ๆ ของประเทศ อย่างไรก็ดี การให้ผลผลิตต่อไร่ของข้าวในการผลิตข้าวของประเทศไทยต่ำกว่าประเทศอื่น ๆ ทั้งนี้ส่วนหนึ่งเนื่องมาจากพืชที่ปลูกข้าวบางพื้นที่จำเป็นต้องพึ่งพาน้ำฝนเป็นหลัก ซึ่งทำให้มีโอกาสกระทบกับความแล้ง ซึ่งส่งผลต่อการให้ผลผลิตของพืช (Bray et al., 2000)

ดังนั้น หน่วยค้นหาและใช้ประโยชน์จากยีนข้าว จึงได้มีโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิทนแล้ง (ดร.ธีรยุทธ ตู้จินดา และคณะ, 2554) และได้สร้าง chromosome substitution lines (CSSL) ที่มีพันธุกรรมพื้นฐานใกล้เคียงกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 (Kanjoo, 2011) โดยแต่ละสายพันธุ์ของ CSSL จะมียีนทนแล้งที่มาจาก double haploid line ทนแล้ง (DH212 หรือ DH103) เพียงบริเวณใดบริเวณหนึ่ง

งานวิจัยในครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินลักษณะการทนแล้งทางสรีรวิทยาบางประการที่เกี่ยวข้องกับยีนทนแล้งจากโครโมโซมใดของข้าว โดยเลือกวิธีการที่จะศึกษาได้ง่ายไม่ซับซ้อน ได้แก่ ลักษณะสีเขียวภายนอกของต้น ซึ่งประเมินโดยการให้คะแนน และ ค่า chlorophyll fluorescence ซึ่งเป็นค่าที่ทำการวัดได้ง่าย และแสดงถึงประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสง 2 (photosystem II) (Li et al., 2013) CSSL ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ ประกอบด้วยข้าว CSSL จำนวน 20 สายพันธุ์ และสายพันธุ์พ่อแม่ คือ KDML105 และ double haploid line DH212 และ DH103 ดังมีรายละเอียดดังตารางที่ 1

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พืชทดลองและการปลูก

พืชทดลองประกอบด้วยข้าว CSSL และข้าว double haploid line โดยมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1 ทำการปลูกข้าวในกระบอก PVC ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 15 เซนติเมตร บรรจุดินหนัก 10 กิโลกรัม ปลูกในโรงเรือนที่มีหลังคาคลุม เมื่อข้าวอายุ 30 วัน งดให้น้ำแล้วทำการเก็บข้อมูลทุก 7 วัน ได้แก่ วันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน

2 การวางแผนการทดลองและการใช้สถิติ

วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCB) 4 วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน transform ข้อมูลความคงเขียวก่อนนำไปวิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Duncan's multiple range test (DMRT)

3. การวัดค่า chlorophyll fluorescence (Fv/Fm)

วัดค่า chlorophyll fluorescence (F_v/F_m) ระหว่างเวลา 11.30 – 13.30 น. โดยใช้เครื่อง PAR-FluorPen FP 100-MAX-LM-D (PSI, Czech Republic) ตามวิธีการที่บริษัทแนะนำ

4. การวัดค่าความคงเขียว

วัดค่าความเขียวโดยการให้คะแนนจากการสังเกตความเขียวของต้นทั้งต้น โดยหากมีความเขียว 100% ให้ค่าคะแนนความคงเขียวเท่ากับ 1 เมื่อมีเนื้อเยื่อสีเขียวลดลงทุก 20% จะมีคะแนนความคงเขียวเพิ่มขึ้น 1 คะแนน จนเมื่อต้นไม่มีความเขียวเลยจะได้คะแนนเท่ากับ 5 คะแนน

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลของความแล้งที่มีต่อค่าความคงเขียวของข้าว

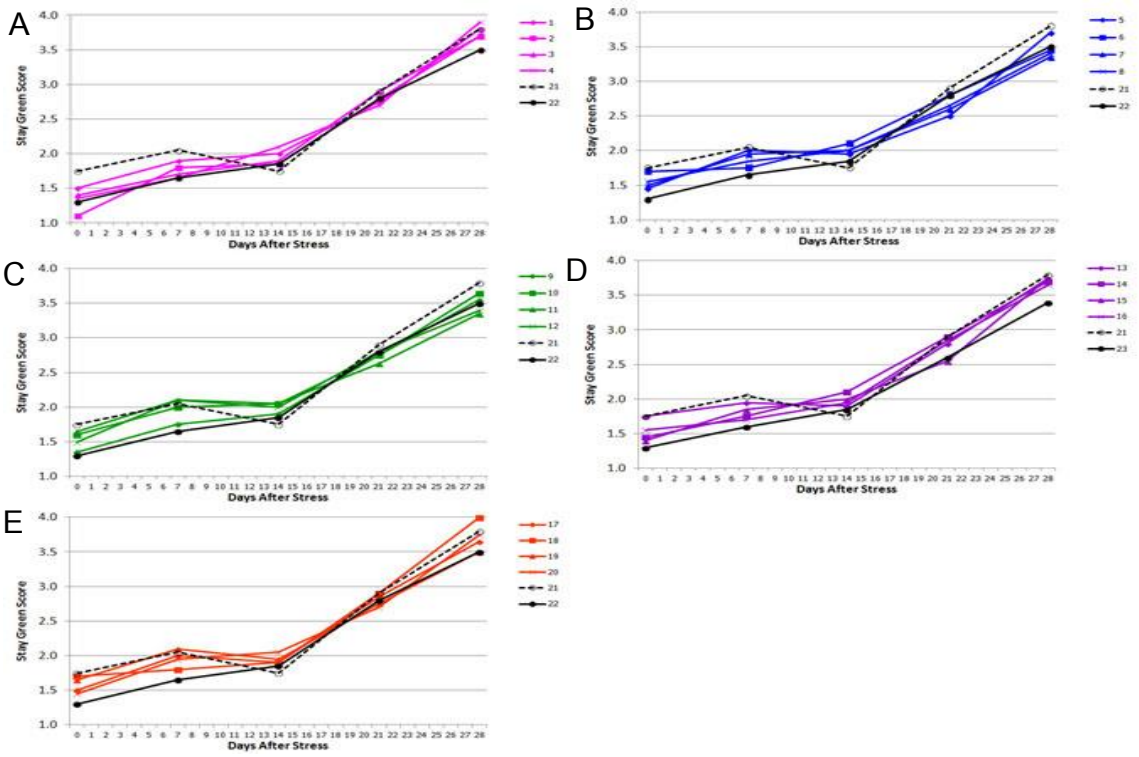
เมื่อเริ่มการทดลองข้าว KDML105 มีค่าความคงเขียวสูงกว่าข้าว double haploid line ทั้งสองสายพันธุ์ และเมื่อได้รับความแล้งเป็นเวลา 7 วัน double haploid line ก็ยังมีค่าความคงเขียวน้อยกว่า 2 ในขณะที่ข้าว KDML105 มีค่าความคงเขียวเท่ากับ 2 หลังจาก 14 วันที่งดการให้น้ำ ค่าความคงเขียวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่ง CSSL ก็มีการตอบสนองในทำนองเดียวกัน (รูปที่ 1)

ตารางที่ 1 ชื่อและข้อมูลเบื้องต้นของสายพันธุ์/พันธุ์ข้าวต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษา

Entry	Pedigree	Marker used for MAS	Chromosome substitution	Remark
1	RGD05164-11-MAS39	RM212 – RM3362	CCSL chrom 1	Donor DH212
2	RGD05164-11-MAS25	RM212 – RM3362	CCSL chrom 1	Donor DH212
3	RGD05164-11-MAS10	RM212 – RM3362	CCSL chrom 1	Donor DH212
4	RGD05164-11-MAS18	RM212 – RM3362	CCSL chrom 1	Donor DH212
5	RGD05169-2-MAS12	RM3413 – RM3807	CCSL chrom 3	Donor DH212
6	RGD05162-3-MAS56	RM3413 – RM3807	CCSL chrom 3	Donor DH212
7	RGD05162-3-MAS44	RM3413 – RM3807	CCSL chrom 3	Donor DH212
8	RGD05162-8-MAS41	RM3413 – RM3807	CCSL chrom 3	Donor DH212
9	RGD05131-4-MAS39	RM142-RM559	CCSL chrom 4	Donor DH212
10	RGD05131-6-MAS5	RM142-RM559	CCSL chrom 4	Donor DH212
11	RGD05128-10-MAS12	RM142-RM559	CCSL chrom 4	Donor DH212
12	RGD05128-4-MAS40-MAS11	RM142-RM559	CCSL chrom 4	Donor DH212
13	RGD06063-69-MAS24	RM5353-RM3480	CCSL chrom 8	Donor DH103
14	RGD06064-6-MAS52	RM5353-RM3480	CCSL chrom 8	Donor DH103
15	RGD06064-6-MAS16-MAS2	RM5353-RM3480	CCSL chrom 8	Donor DH103
16	RGD06064-26-MAS45-MAS8	RM5353-RM3480	CCSL chrom 8	Donor DH103
17	RGD05160-6-MAS29	RM242-RM205	CCSL chrom 9	Donor DH212
18	RGD05157-5-MAS8	RM242-RM205	CCSL chrom 9	Donor DH212
19	RGD05159-4-MAS56	RM242-RM205	CCSL chrom 9	Donor DH212
20	RGD05159-4-MAS52-MAS4	RM242-RM205	CCSL chrom 9	Donor DH212
21	KDML105		Parent	
22	DH103		Parent	
23	DH212		Parent	

เมื่องดการให้น้ำเป็นเวลา 28 วัน ค่าความคงเขียวเฉลี่ยของข้าว KDML105 มีค่าประมาณ 3.8 ในขณะที่ข้าว double haploid มีค่าน้อยกว่า 3.5 ข้าว CSSL ที่มียีนทนแล้งจากโครโมโซมที่ 1 8 และ 9 มีค่าความคงเขียวใกล้เคียงกับข้าว KDML105 ซึ่งมากกว่าค่าความคงเขียวของข้าว double haploid แต่ CSSL ที่มียีนทนแล้งจากโครโมโซมที่ 4 ทุกสายพันธุ์ (รูปที่ 1 C) และ CSSL ที่มียีนทนแล้งจากโครโมโซมที่ 3 จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ RGD05131-4-MAS39 RGD05128-10-MAS12 และ RGD05128-4-MAS40-MAS11(รูปที่ 1 B) มีค่าความคงเขียวใกล้เคียงกับ double haploid parent line และมีค่าต่ำกว่า KDML105 ซึ่งแสดงว่า CSSL เหล่านี้สามารถรักษาความเขียวในภาวะแล้งได้ดีกว่า KDML105

การใช้ลักษณะค่าความคงเขียวนี้พบว่ามีความสัมพันธ์กับความทนความแล้งในข้าวฟ่าง (Tuinstra et al., 1997; Xu et al., 2000) การศึกษาในครั้งนี้พบว่า ยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการคงความเขียวน่าจะอยู่บนโครโมโซมที่ 3 และ 4 มากกว่าโครโมโซมอื่นๆ



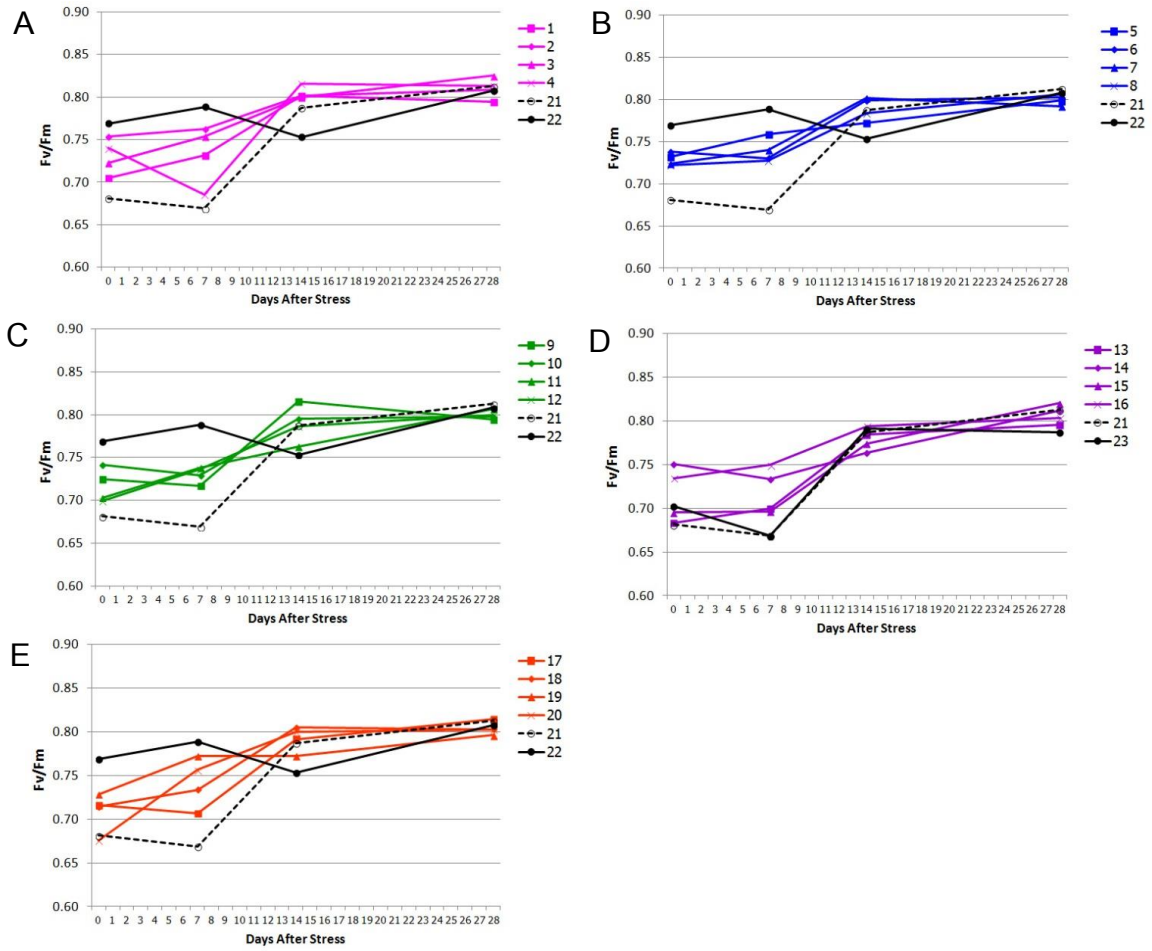
รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของค่า Stay Green Score เมื่องดการให้น้ำแก่ต้นข้าวเมื่ออายุ 30 วัน แสดง stay green score ของข้าว CSSL ที่มียีนทนแล้งจากโครโมโซมที่ 1 = (A), 3 = (B), 4 = (C), 8 = (D) และ 9 = (E) โดยหมายเลขของสายพันธุ์ข้าวที่แสดงเป็นไปตามข้อมูลที่ระบุไว้ในตารางที่ 1

2. **ผลของความแล้งที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของ** chlorophyll fluorescence (Fv/Fm)

จากผลการทดลองจะเห็นว่า เมื่อเริ่มทดลอง F_v/F_m ของข้าว KDML105 มีค่าต่ำกว่า ข้าว double haploid line และมีค่าต่ำกว่า 0.8 เมื่อพืชมีค่า F_v/F_m ต่ำกว่า 0.8 นั้น แสดงว่าพืชอยู่ในภาวะเครียดด้วยสาเหตุใดสาเหตุหนึ่ง ขณะที่เริ่มการทดลอง การเปลี่ยนแปลงของ F_v/F_m สามารถเกิดได้ทั้งจากปัจจัยทางกายภาพ เช่น ความร้อน หรือความแล้ง (Li et al., 2013; Lu et al., 2013) ตลอดจนปัจจัยทางชีวภาพ เช่น โรคต่าง ๆ เป็นต้น (Bahuguna et al., 2012) จากลักษณะดังกล่าวแสดงว่าเมื่อเริ่มการทดลอง พืชทดลองอาจมีปัจจัยความเครียดจากสาเหตุอื่นรวมอยู่ด้วย อย่างไรก็ดี เมื่อพิจารณาค่าความเขียว (รูปที่ 1) ที่เวลา 7 วันหลังการงดให้น้ำเป็นต้นไป จะพบว่ามีค่าความคงเขียวเพิ่มขึ้น ซึ่งจะน่าสะท้อนความเครียดที่เกิดจากการงดให้น้ำทีเพิ่มขึ้น

สำหรับข้าว CSSL พบว่า จะมีค่า F_v/F_m สูงกว่าข้าว KDML105 แต่ต่ำกว่า DH212 หลังจากได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 7 วัน และเมื่อได้รับภาวะแล้งเป็นเวลา 14 วัน ค่า F_v/F_m ของ CSSL ที่มียีนทนแล้งจากโครโมโซมที่ 1, 3, 4 และ 9 มีค่าใกล้เคียง 0.8 ซึ่งแสดงความสามารถในการปรับตัวเข้าสู่สภาวะปกติได้ดีกว่าข้าว KDML105 ลักษณะเช่นนี้แสดงให้เห็นว่า CSSL ที่ได้รับยีนทนแล้งจากโครโมโซมที่ 1, 3, 4 และ 9 อาจมีบทบาทต่อการรักษาประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสง 2 ด้วย

อย่างไรก็ดี เมื่อเวลา ผ่านไปพบว่าค่า F_v/F_m นี้กลับเข้าใกล้ 0.8 ซึ่งแสดงภาวะปกติของการทำงานของระบบแสง แสดงว่า ข้าวในระยะ vegetative นี้สามารถปรับประสิทธิภาพของระบบการสังเคราะห์ด้วยแสงได้ในระดับหนึ่ง อย่างไรก็ดี ค่า F_v/F_m นี้ก็ไม่อาจสะท้อนการทำงานของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงทั้งหมดได้ จากการศึกษาใน turf grass (*Stenotaphrum secundatum* [Walt.] Kuntze) พบว่า ความแล้งมีผลต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงและการเติบโตมากกว่ามีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงของ F_v/F_m (Lu et al., 2013)



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของค่า F_v/F_m เมื่องดการให้น้ำแก่ต้นข้าวเมื่ออายุ 30 วัน ของข้าว CSSL ที่มียีนทนแล้งจากโครโมโซมที่ 1 = (A), 3 = (B), 4 = (C), 8 = (D) และ 9 = (E) โดยหมายเลขของสายพันธุ์ข้าวที่แสดงเป็นไปตามข้อมูลที่ระบุไว้ในตารางที่ 1

สรุปผลการทดลอง

ลักษณะความคงเขียวของข้าวในระยะ vegetative น่าจะเกี่ยวข้องกับยีนทนแล้งบนโครโมโซมที่ 3 และ 4 มากกว่าโครโมโซมอื่น ๆ ส่วนค่า chlorophyll fluorescence นั้นอาจมีผลกระทบจากปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ และข้าวในระยะนี้สามารถปรับตัวต่อภาวะแล้งได้ และมีค่า chlorophyll fluorescence สูงขึ้นใกล้เคียงกับภาวะปกติ การประเมินโดยใช้ความทนแล้งโดยใช้ค่า chlorophyll fluorescence ในระยะ vegetative นี้จำเป็นต้องใช้ด้วยความระมัดระวังในการแปลผล

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก สวทช. รหัสโครงการ P-12-01480 ค่าเดินทางเพื่อเก็บข้อมูลบางส่วนได้รับการสนับสนุนจากโครงการสร้างเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

ธีรยุทธ ตู้จินดา, Jonaliza L. Siangliw, กาญจนา ปัญญาแวว, ไวพจน์ กันจู รายงานการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรม ฉบับสมบูรณ์ Development of single QTL near isogenic lines (NILs) of KDML105 for drought tolerance สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 2554. 109หน้า

Bahuguna RN, Joshi R, Shukla A, …, Kumar J. Thiamine primed defense provides reliable alternative to systemic fungicide carbendazim against sheath blight disease in rice (*Oryza sativa* L.). Pl Physiol Biochem 2012; 57: 159-167.

Bray E Plant responses to water deficit. Trends Plant Sci. 2000; 2:48–54

Kanjoo, V. 2011. Development of chromosome segment substitution lines related to drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). Doctor of Philosophy (Agricultural Biotechnology) Thesis. Interdisciplinary Graduate Program. Kasetsart University.

Lanceras JC, Pantuwan G, Jongdee B, Toojinda T. Quantitative Trait Loci Associated with Drought Tolerance at Reproductive Stage in Rice. Plant Physiol. 2004; 135: 384–399.

Li GL, Wu HX, Sun YQ, Zhang SY. Response of Chlorophyll Fluorescence Parameters to Drought Stress in Sugar Beet Seedlings. Russ. J Plant Physiol. 2013, 60: 337–342

Lu H, Jessup KE, Xue Q, Cherry RH 2013. Morphological and Physiological Responses of St. Augustine Grass Cultivars to Different Levels of Soil Moisture. J Crop Improve. 2013; 27:291–308.

Tuinstra MR, Grote EM, Goldsbrough PB, Ejeta G. 1997. Genetic analysis of post-flowering drought tolerance and components of grain development in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Mol Breed. 1997; 3: 439–448,

Xu W, Subudhi PK, Crasta OR, .., Nguyen HT. Molecular mapping of QTLs conferring stay-green in grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) Genome. 2000; 43: 461–469.