

ความสามารถในการยืดปล้องและการแสดงออกของยีน SK2 ในข้าวป่าสามัญภายใต้สภาพน้ำลึก

Internode Elongation Ability and SK2 Gene Expression in Common Wild Rice Under Deep Water

ปฐมภรณ์ มาสุต¹ ศันสนีย์ จำจด^{1, 2} และ ต่อนภา พุสดี^{1*}

Patamaporn Masud¹, Sansanee Jamjod^{1, 2} and Tonapa Pusadee^{1*}

¹สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

¹Department of plant and soil sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²ศูนย์วิจัยข้าวล้านนา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

²Lanna Rice Research Center, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author: Email: tonapha.p@cmu.ac.th

(Received: 28 December 2018; Accepted: 29 March 2019)

Abstract: Common wild rice is an important genetic resource since its adaptability to inappropriate environments such as floods or drought conditions. The objective of this study was to evaluate the internode elongation ability and the expression of SK2 gene of common wild rice of Lamphun (WLP), Chiang Mai (WCM) and Roi Et (WRE) and Surin (WSR). The experiment was conducted in randomized complete block design (RCBD) with 3 replications. At sixty days old seeding, wild rice plants were submerged in the cement pot with water level up to 90% of the wild rice plant height in the deep water treatment for 14 day. Internode elongation ability were determined by recording of culm length, number of node and internode length. The results showed that the highest culm length, the highest number of node (3 nodes) and the highest internode elongation at internode 2, 3 and 4 (11.0, 7.6 and 2.9 cm, respectively). Considering the expression levels of SK2 gene, the WLP illustrated the highest expression level. Positive correlations between culm length, internode elongation and the expression of SK2 were found. Taken together, the results of this study showed that SK2 gene is involved in response to deep water by internode elongation. The present research can be used as a basic information in selecting common wild rice germplasm for deep water rice breeding program.

Keywords: Common wild rice, deep water condition, internode elongation, SK2 gene expression

บทคัดย่อ: ข้าวป่าสามัญเป็นแหล่งพันธุกรรมที่มีความสำคัญ เนื่องจากมีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น น้ำท่วม หรือแห้งแล้ง เป็นต้น ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสามารถในการยืดปล้องและการแสดงออกของยีน *SK2* ในข้าวปาลำพูน (WLP) และข้าวป่าเชียงใหม่ (WCM) ข้าวป่าร้อยเอ็ด (WRE) และข้าวป่าสุรินทร์ (WSR) ภายใต้สภาพน้ำลึก โดยวางแผนการทดลองแบบ randomize complete block design จำนวน 3 ซ้ำ นำข้าวป่าอายุ 60 วันหลังเพาะเมล็ด ย้ายลงบ่อซีเมนต์ที่มีปริมาณน้ำท่วมสูง 90% ของความสูงต้นข้าว เป็นเวลา 14 วัน บันทึกความสามารถในการยืดปล้อง โดยวัดความยาวต้น จำนวนข้อ และความยาวปล้อง หลังให้สภาพน้ำลึกครบ 14 วัน พบว่าข้าวปาลำพูนมีความยาวต้นที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยมากที่สุด มีจำนวนข้อมากที่สุด (3 ข้อ) และมีความยาวปล้องในปล้องที่ 2, 3 และ 4 เฉลี่ยมากที่สุด (11.0, 7.6 และ 2.9 เซนติเมตร ตามลำดับ) เมื่อพิจารณาระดับการแสดงออกของยีน *SK2* พบว่าข้าวปาลำพูนมีระดับการแสดงออกของยีนมากที่สุด พบความสัมพันธ์ในเชิงบวกระหว่างความยาว และการยืดปล้องกับการแสดงออกของยีน *SK2* เมื่อนำข้อมูลมาเชื่อมโยงกันแล้วจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ยีน *SK2* เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาพน้ำลึกโดยการยืดปล้อง งานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกพันธุกรรมของข้าวป่าสามัญเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวน้ำลึกต่อไป

คำสำคัญ: ข้าวป่าสามัญ สภาพน้ำลึก การยืดปล้อง การแสดงออกของยีน *SK2*

คำนำ

น้ำท่วมเป็นปัญหาที่ร้ายแรงในพื้นที่ลุ่มแม่น้ำของทวีปเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยมีพื้นที่ปลูกข้าวที่ได้รับผลกระทบประมาณ 15 ล้านไร่ สภาพน้ำท่วมขังเป็นเวลานานหลายสัปดาห์ถึงหลายเดือนส่งผลให้ข้าวมีผลผลิตลดลง (Singh *et al.*, 2017) ข้าวเป็นพืชกึ่งพืชน้ำ (semiaquatic species) มีการปรับตัวได้ดีเมื่อมีปริมาณน้ำในสภาพแวดล้อมที่มากเกินไป (Choi, 2011) โดยข้าวมีการปรับตัวเนื่องจากปัญหาน้ำท่วมขัง 2 รูปแบบ รูปแบบแรก คือ น้ำท่วมลึก (deep water floods) เป็นเวลานาน และน้ำท่วมแบบฉับพลัน (flash floods) ซึ่งเกิดขึ้นในระยะเวลาสั้น ๆ (Nagai *et al.*, 2010) ในสภาพน้ำลึกเป็นเวลานาน ข้าวที่ไม่ทนน้ำลึกจะจมน้ำ และตายเมื่อออกซิเจนถูกนำออกไปจนหมด ส่วนข้าวทนน้ำลึกนั้นเมื่อเจอกับสภาพน้ำลึกจะมีการยืดใบ และปล้องอย่างรวดเร็ว การยืดปล้องช่วยให้ใบบนสุดของข้าวสามารถโผล่พ้นผิวน้ำเพื่อแลกเปลี่ยนแก๊สได้ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในส่วนของปล้องให้กลวง การยืดปล้องของข้าวน้ำลึกนี้จะไม่เกิดขึ้นเมื่อปลูกในสภาพปกติ ลักษณะพิเศษนี้จะแสดงออกมาเฉพาะในกรณีที่เกิดน้ำท่วมลึกเท่านั้น (Hattori *et al.*, 2011) ในทางตรงกันข้ามกับข้าวทนน้ำท่วมแบบฉับพลัน ข้าวจะแสดงการหยุดนิ่ง

และอยู่รอดในน้ำได้ 1-2 สัปดาห์ โดยหลีกเลี่ยงการใช้พลังงานในการเจริญเติบโต เมื่อปริมาณน้ำลดลงข้าวทนน้ำท่วมจะสามารถกลับมาเจริญเติบโตได้อีกครั้ง (Nagai *et al.*, 2010)

จากการศึกษาของ Hattori *et al.* (2009) พบว่าลักษณะการตอบสนองต่อน้ำลึกนั้น ถูกควบคุมด้วยลักษณะทางปริมาณ (QTLs) พบ 3 QTLs บนโครโมโซมแท่งที่ 1, 3 และ 12 ในการศึกษาดังกล่าวได้ระบุว่า ยีนที่เกี่ยวข้องกับการยืดปล้องภายใต้สภาพน้ำลึกนั้นคือ ยีนในกลุ่มของโปรตีน ethylene response factor ได้แก่ ยีน *SNORKEL2* (*SK2*) ซึ่งยังมีการระบุเพิ่มเติมว่ายีน *SK2* ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 12 โดยมีกลไกที่เกี่ยวข้องกับการยืดปล้อง (mechanism of internode elongation) ในสภาพน้ำท่วม ข้าวอยู่ในสภาพที่มีความเครียด (stress) เนื่องจากขาดออกซิเจน พบว่ามีความเกี่ยวข้องกันฮอร์โมนพืช (phytohormones) 3 ชนิด ได้แก่ ethylene, gibberellin และ abscisic acid ซึ่ง Choi (2011) ได้อธิบายถึงกระบวนการที่ทำให้ข้าวเกิดการยืดข้อปล้องได้เมื่อข้าวมีสภาพเครียดเนื่องจากน้ำลึก คือข้าวจะอยู่ในสภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) หรือ สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anoxia) ทั้ง 2 สภาวะมีผลทำให้มีปริมาณ CO_2 เพิ่มขึ้น ต่อมา ethylene จะส่งสัญญาณกระตุ้นให้ยีน *SK1* และ *SK2* ทำงานที่บริเวณเนื้อเยื่อเจริญส่วนเหนือ

ปล้อง (intercalary meristem) ทำให้ส่วนของปล้องยึดตัวอย่างรวดเร็วเพื่อให้ไหลพ้นน้ำได้

ข้าวป่าสามัญ (common wild rice, *Oryza rufipogon* Griff.) เป็นแหล่งความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่สำคัญสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าว และเป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูกเอเชีย (*Oryza sativa* L.) (Vaughan, 1994) แบ่งข้าวป่าสามัญตามลักษณะถิ่นที่อยู่อาศัย (habitat) ได้ 2 ชนิด คือ ชนิดข้ามปี (perennial type) และชนิดปีเดียว (annual type) ข้าวป่าทั้ง 2 ชนิด มีการเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน (Mohapatra *et al.*, 2011) ซึ่ง Morishima *et al.* (1984) รายงานว่าข้าวป่าข้ามปีจะพบในบริเวณที่มีน้ำขัง เป็นแอ่งน้ำ มักมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อใหม่ ที่บริเวณส่วนของข้อ (node) ส่วนข้าวป่าปีเดียวพบบริเวณพื้นที่ค่อนข้างแห้งแล้งหรือมีระดับน้ำตื้น สามารถงอกและมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วหลังจากได้รับความชื้นจากน้ำฝนในช่วงก่อนสิ้นสุดฤดูร้อน

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพันธุกรรมของข้าวป่าสามัญที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการยึดปล้อง และการแสดงออกของยีน SK2 ในสภาพน้ำลึก เพื่อเข้าใจกลไกในการทนต่อสภาพน้ำลึกของข้าวป่า รวมถึงสามารถนำข้าวป่ามาใช้เป็นแหล่งความหลากหลายทางพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวน้ำลึกต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การประเมินความสามารถในการยึดปล้องของข้าวป่าในสภาพน้ำลึก

นำตัวอย่างข้าวป่าที่เก็บมาจากแหล่งที่อยู่อาศัยในธรรมชาติ จำนวน 4 ประชากร แบ่งเป็น ชนิดข้ามปี 2 ประชากร และ ชนิดปีเดียว 2 ประชากร (Table 1) ทำลายการพักตัว (break dormancy) เพื่อให้ตัวอย่างข้าวป่า

สามารถงอกพร้อมกัน เพาะตัวอย่างเมล็ดข้าวป่าบนกระดาษเพาะเมล็ด เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นย้ายปลูกลงกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร กระถางละ 1 ต้น วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ต้นต่อประชากรข้าวป่า 1 ประชากร เป็นเวลา 50 วัน จากนั้นย้ายข้าวป่าลงในบ่อซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 เซนติเมตร สูง 80 เซนติเมตร เพื่อทดสอบความสามารถในการยึดปล้อง โดยระดับน้ำในวันที่ 0 สูงประมาณ 90% ของความสูงต้นของข้าวป่า จากนั้นเพิ่มระดับน้ำครั้งละ 5 เซนติเมตร ทุก ๆ 2 วัน จนถึงสิ้นสุดการทดลอง บันทึกข้อมูลความยาวต้น จำนวนข้อ และความยาวปล้องในวันที่ 0, 7 และ 14 หลังให้สภาพน้ำลึก (Figure 1)

การประเมินการแสดงออกของยีน SNORKEL2 (SK2) ที่เกี่ยวข้องกับการยึดปล้องของข้าวป่า

การสกัด RNA

เก็บตัวอย่างส่วนของลำต้น (culm) ข้าวป่า หลังให้สภาพน้ำลึกเป็นเวลา 14 วัน สกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อในส่วนข้อและปล้อง บดด้วยไนโตรเจนเหลว ให้ละเอียด แล้วนำมาสกัดด้วย PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, USA) นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

การกำจัดดีเอ็นเอออกโดยการ Treat DNase I

กำจัดดีเอ็นเอออกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วย DNase I (Thermo scientific, Lithuania EU) โดยมีส่วนผสมในปฏิกิริยาดังนี้ อาร์เอ็นเอในปริมาณ 1 ไมโครกรัม, 1 unit เอนไซม์ DNase I 1 ไมโครลิตร,

Table 1. Accession name, location and types of 4 common wild rice populations

No.	Accession name	Location	Types
1	WCM	San Sai district, Chiang Mai province	Perennial
2	WLP	Mueang district, Lamphun province	Perennial
3	WRE	Mueang district, Roi Et province	Annual
4	WSR	Sikhorphum district, Surin province	Annual

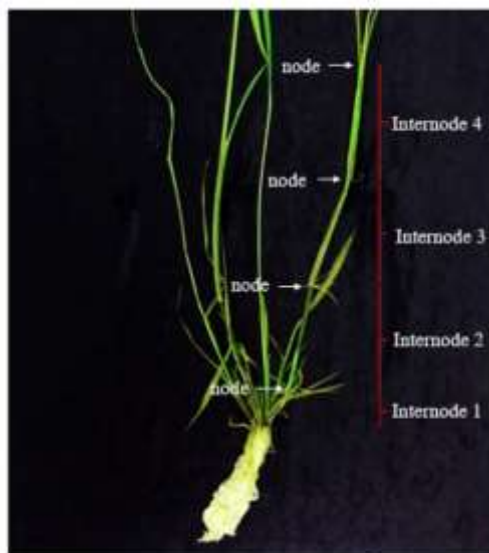


Figure 1. Position of node and internode of common wild rice

10X buffer 2 ไมโครลิตร และเติม DEPC-water เพื่อปรับปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร จากนั้นนำส่วนผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม 50 mM EDTA 1 ไมโครลิตร และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อจบปฏิกิริยานำมาลดอุณหภูมิบนน้ำแข็งประมาณ 2 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำอาร์เอ็นเอเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) สายแรก

สังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอโดยการทำปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ด้วยการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase โดยใช้ดีเอ็นเอ primer ที่เป็น Oligo dT primer เป็นตัวตั้งต้นในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายแรก (first strand cDNA) ในทิศทาง 5' → 3' ด้วย Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo scientific, Lithuania EU) โดยมีส่วนผสมในปฏิกิริยาดังนี้ อาร์เอ็นเอ 30 ไมโครลิตร, 5X RT Buffer 10 ไมโครลิตร, Oligo (dT)₁₈ 1 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 1 ไมโครลิตร, Ribosafe RNase Inhibitor 1 ไมโครลิตร, Tetro Reverse Transcriptase (200u/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร, DEPC-water 6 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยา

ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมสารแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำมาลดความร้อนบนน้ำแข็งประมาณ 2 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่อไป

ประเมินการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR analysis

โดยใช้ ยีน *Actin1* (housekeeping gene) (forward primer: 5'GACTCTGGTGGTGGTGCAGC 3', reverse primer: 5'GGCTGGAAGAGGACCTCAGG 3') เปรียบเทียบกับ ยีน *SK2* (forward primer: 5'CACTGGAGGCAACG-AATG 3', reverse primer: 5'TAAAGGACCAGAGGCAGC 3') ปฏิกิริยา semi-quantitative RT-PCR ปริมาตรสุทธิประมาณ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA 1 ไมโครลิตร, deionized water 8 ไมโครลิตร, (10X) buffer + KCl 1 ไมโครลิตร, MgCl₂ 0.75 ไมโครลิตร, forward primer 0.1 ไมโครลิตร, reverse primer 0.1 ไมโครลิตร, (25 mM) dNTP 0.08 ไมโครลิตร Tag DNA Polymerase 0.08 ไมโครลิตร และ DMSO 0.3 ไมโครลิตร ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม FlexCycle2 (Analytik Jena, Germany) โดย

กำหนดเงื่อนไขอุณหภูมิและเวลา 3 ขั้นตอน ดังนี้ ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 45 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที ทำซ้ำจำนวน 40 รอบ และขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา นำผลิตภัณฑ์มาตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis จากนั้นนำ agarose gel ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยเครื่อง BLook LED transilluminator (GeneDirex, Inc., Taiwan) บันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล

การวิเคราะห์ข้อมูล

วัดระดับการแสดงออกของยีนโดยการวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ semi-quantitative RT-PCR ด้วยโปรแกรม Image J (Schneider *et al.*, 2012) โดยวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนแบบ relative โดยใช้ระดับการแสดงออกของยีน *Actin1* ในการปรับค่า (normalization) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ RCBD เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยการวิเคราะห์ค่า LSD (least significant difference)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ความยาวต้น (culm length)

ภายหลังจากให้สภาพน้ำลึกในบ่อซีเมนต์เป็นเวลา 14 วัน พบความแตกต่างของความยาวต้นของข้าวป่าสามัญญาทั้ง 4 ประชากรที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (Figure 2) โดยวันที่ 7 หลังให้สภาพน้ำลึกพบว่าข้าวป่าสามัญญาทุกประชากรมีความยาวต้นเพิ่มขึ้นโดยข้าวปลำพูน (WLP) มีความยาวเพิ่มขึ้นมากที่สุดเท่ากับ 28.5 เซนติเมตร ส่วนข้าวป่าเชียงใหม่ (WCM) ข้าวป่าร้อยเอ็ด (WRE) และข้าวป่าสุรินทร์ (WSR) มีความยาวเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันเท่ากับ 17.9, 17.4 และ 16.9 เซนติเมตร ตามลำดับ สำหรับวันที่ 14 หลังให้สภาพน้ำลึกพบว่าข้าวป่าทุกประชากรมีความยาวต้นเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกัน ($P<0.05$)

หลังจากให้สภาพน้ำลึกในบ่อซีเมนต์เป็นเวลา 14 วัน พบความแตกต่างของการตอบสนองต่อสภาพน้ำลึกระหว่างข้าวป่าชนิดข้ามปีและชนิดปีเดียว โดยข้าวปลำพูน (WLP) มีความสามารถในการเพิ่มความยาวต้นในสภาพน้ำลึกที่ 7 วันแรกมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Okishio *et al.* (2014) ได้ทดสอบความสามารถ

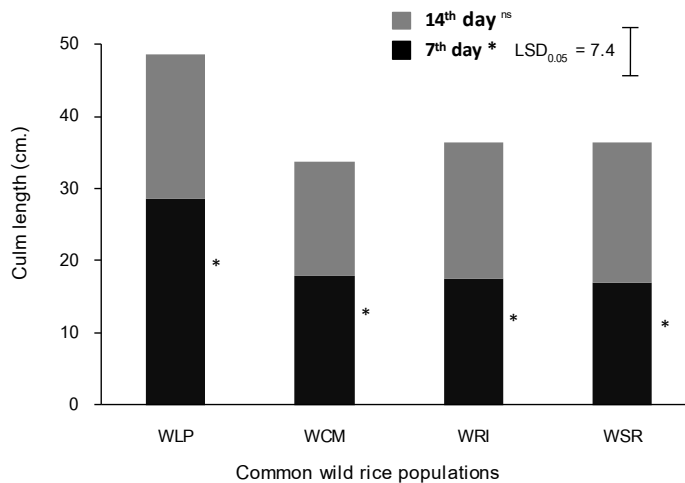


Figure 2. Culm length of 4 common wild rice populations on 7th day (■) and 14th day (■) after deep water treatment

^{ns} indicates not significant difference at $P<0.05$

* indicates significant difference at $P<0.05$

ในการยืดตัวในประชากรข้าวป่าจากกลุ่มแม่น้ำอะเมซอน (*Oryza grandiglumis*) คือ W0613 กับ RS8-H และข้าวปลูกพันธุ์ T442-57 กับ HA II พบว่าหลังสิ้นสุดการทดลองครบ 58 วัน ข้าวป่าทั้งสองประชากรสามารถยืดตัวได้ดีใกล้เคียงกับข้าวปลูกน้ำลึกพันธุ์ HAI1 ที่มีความสูง 240 เซนติเมตร และประชากรข้าวป่า W0613 และ RS8-H มีความสูงเป็น 245 และ 230 เซนติเมตร ตามลำดับ ในการทดลองของ Punyalue (2006) เรื่องการประเมินลักษณะประชากรข้าวป่าสามัญจากแหล่งปลูกข้าวของประเทศไทย ได้รายงานถึงลักษณะของประชากรข้าวป่าชนิดข้ามปี คือ ข้าวปาลำพูนและข้าวป่าเชียงใหม่ ซึ่งถิ่นที่อยู่อาศัยอยู่ในบริเวณริมคลองที่มีระดับน้ำค่อนข้างลึก ทำให้มีการปรับตัวเนื่องจากระดับน้ำที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ที่ข้าวปาลำพูน มีการตอบสนองได้ดีต่อการจำลองสภาพน้ำลึก

จำนวนข้อ (number of node)

ข้อปรากฏให้เห็นที่ข้อมูได้หลังจากข้าวป่าอยู่ในสภาพน้ำลึกมากกว่า 7 วัน พบความแตกต่างของจำนวนข้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Figure 3) โดยข้าวป่าชนิดข้ามปีทั้งสองประชากร คือ ข้าวปาลำพูน (WLP) และข้าวป่าเชียงใหม่ (WCM) มีจำนวนข้อมากกว่าข้าวป่าชนิดปีเดียว คือ ข้าวปาร้อยเอ็ด (WRE) และข้าวป่าสุรินทร์ (WSR) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างประชากรข้าวป่าชนิดข้ามปี พบความแตกต่างของจำนวนข้อ โดยข้าวปาลำพูน (WLP) มีจำนวนข้อมากที่สุด เฉลี่ยเท่ากับ 3 ข้อ มากกว่าข้าวป่าเชียงใหม่ (WCM) ที่มีจำนวนข้อเฉลี่ยเท่ากับ 2 ข้อ ส่วนในข้าวป่าชนิดปีเดียวไม่มีความแตกต่าง

ระหว่างชนิด ทั้งข้าวปาร้อยเอ็ด (WRE) และข้าวป่าสุรินทร์ (WSR) มีจำนวนข้อเฉลี่ยเท่ากับ 1 ข้อ

ความยาวปล้อง (internode length)

หลังให้สภาพน้ำลึกเป็นเวลา 14 วัน พบข้าวป่ามีความยาวปล้องเพิ่มขึ้นจำนวน 4 ปล้อง (Figure 4) โดยไม่พบความแตกต่างของความยาวปล้องที่เพิ่มขึ้นในปล้องที่ 1 ระหว่างข้าวป่า 4 ประชากร แต่พบความแตกต่างของความยาวปล้องที่เพิ่มขึ้นระหว่างประชากรข้าวป่าในปล้องที่ 2, 3 และ 4

ปล้องที่ 2 พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.001$) โดยข้าวปาลำพูน (WLP) มีความยาวปล้องเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 11.0 เซนติเมตร ข้าวป่าเชียงใหม่ (WCM) 6.2 เซนติเมตร และประชากรข้าวปาร้อยเอ็ด (WRE) กับข้าวป่าสุรินทร์ (WSR) มีความยาวปล้องเฉลี่ยน้อยที่สุดเท่ากับ 1.7 และ 3.0 เซนติเมตร ตามลำดับ

ปล้องที่ 3 พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.001$) โดยข้าวปาลำพูน (WLP) มีความยาวปล้องเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 7.6 เซนติเมตร ส่วนข้าวป่าเชียงใหม่ (WCM) เฉลี่ยเท่ากับ 2.3 เซนติเมตร และข้าวปาร้อยเอ็ด (WRE) เฉลี่ยเท่ากับ 0.4 เซนติเมตร แต่ไม่ปรากฏปล้องที่ 3 ในข้าวป่าสุรินทร์ (WSR)

ปล้องที่ 4 พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) โดยปล้องที่ 4 ปรากฏปล้องเฉพาะในข้าวป่าชนิดข้ามปี คือข้าวปาลำพูน (WLP) และข้าวป่าเชียงใหม่ (WCM) โดยมีค่าเฉลี่ยความยาวปล้องเท่ากับ 2.9 และ 0.8 เซนติเมตร ตามลำดับ

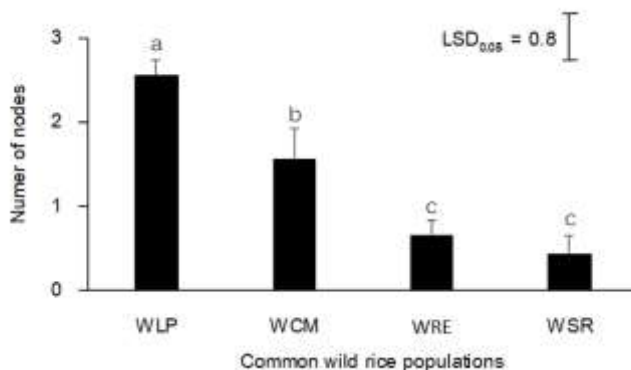


Figure 3. Number of nodes at 14th day after deep water treatment of 4 common wild rice populations

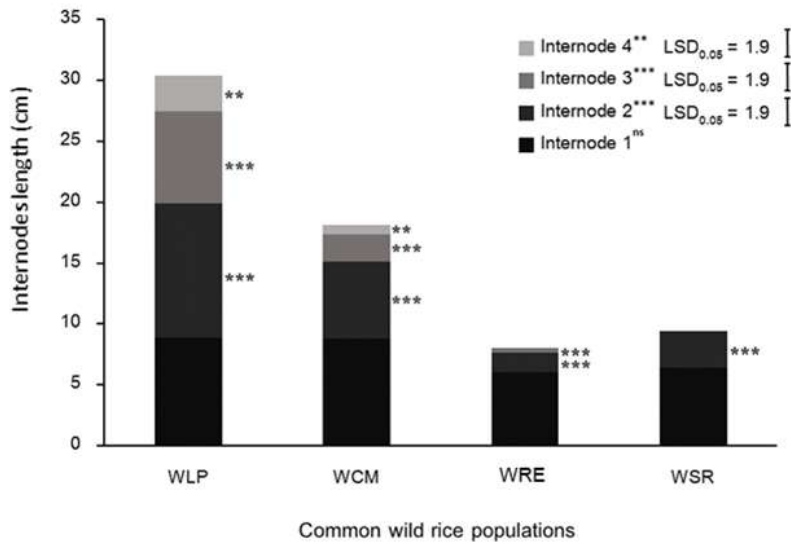


Figure 4. Internode length of internode number 1, 2, 3 and 4 at 14th day after deep water treatment of 4 common wild rice populations

^{ns} indicates not significant

** indicates significant different at $P < 0.01$

*** indicates significant different at $P < 0.001$

อย่างไรก็ตาม หลังให้สภาพน้ำลึกเป็นเวลา 14 วัน ข้าวป่าสามัญทั้ง 4 ประชากร มีการตอบสนองโดยการยืดปล้องเพื่อให้สามารถเจริญเติบโตให้พ้นจากระดับน้ำที่เสี่ยงต่อการมีชีวิตรอด ซึ่งในปล้องที่ 2 ของข้าวป่าสามัญทุกประชากรจะมีความยาวปล้องเพิ่มขึ้นมากที่สุด และข้าวป่าลำพูน (WLP) จะมีความยาวปล้องเพิ่มขึ้นมากกว่าประชากรอื่นทั้งในปล้องที่ 2, 3 และ 4 ส่วนปล้องที่ 1 พบว่าข้าวป่าแต่ละชนิดมีความยาวปล้องเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกัน

จากการศึกษาลักษณะจำนวนข้อและความยาวปล้องพบว่าข้าวป่าชนิดข้ามปี ได้แก่ ข้าวป่าลำพูน และข้าวป่าเชียงใหม่ มีจำนวนข้อและความยาวปล้องมากกว่าข้าวป่าชนิดปีเดียว ได้แก่ ข้าวป่าร้อยเอ็ด และข้าวป่าสุรินทร์ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Kihara *et al.* (1962) และ Anandan *et al.* (2015) รายงานว่าในพื้นที่ที่มีน้ำท่วมขัง ข้าวมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนข้อและปล้องอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับสภาพที่ไม่มีน้ำท่วมขัง ความสามารถในการเพิ่มความยาวปล้อง ได้มากหรือน้อยก็ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของข้าวประชากรนั้น ๆ ด้วย และยังกล่าวอีกว่า การยืดตัวของข้าว

ในสภาพน้ำลึกนี้สามารถยืดได้ดีที่สุดใน 3 ปล้องแรกนับจากโคนต้น

การแสดงออกของยีน SK2

การแสดงออกของยีน SK2 จากเนื้อเยื่อปล้องของข้าวป่าแต่ละประชากรภายหลังจากให้สภาพน้ำลึกเปรียบเทียบกับ การแสดงออกของยีน *Actin1* (housekeeping gene) (Figure 5) พบว่าข้าวป่าทั้ง 4 ตัวอย่างมีระดับการแสดงออกของยีน SK2 ที่แตกต่างกัน โดยข้าวป่าชนิดข้ามปี (WLP และ WCM) มีการแสดงออกของยีน SK2 มากกว่าข้าวป่าชนิดปีเดียว (WRE และ WSR) เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละประชากร พบว่ามีข้าวป่าเพียง 3 ประชากรจากทั้งหมด 4 ประชากร ที่มีการแสดงออกของยีน SK2 ซึ่งข้าวป่าลำพูน (WLP) มีระดับการแสดงออกของยีนมากที่สุดมีค่า relative สูงที่สุด คือ 0.85 และไม่พบว่ามี การแสดงออกของยีน SK2 ในข้าวป่าสุรินทร์ (WSR)

ผลจากการศึกษาพบว่าหลังให้สภาพน้ำลึกเป็นเวลา 14 วัน พบการแสดงออกของยีน SK2 ในข้าวป่าลำพูน ข้าวป่าเชียงใหม่ และ ข้าวป่าร้อยเอ็ด แต่ไม่พบ

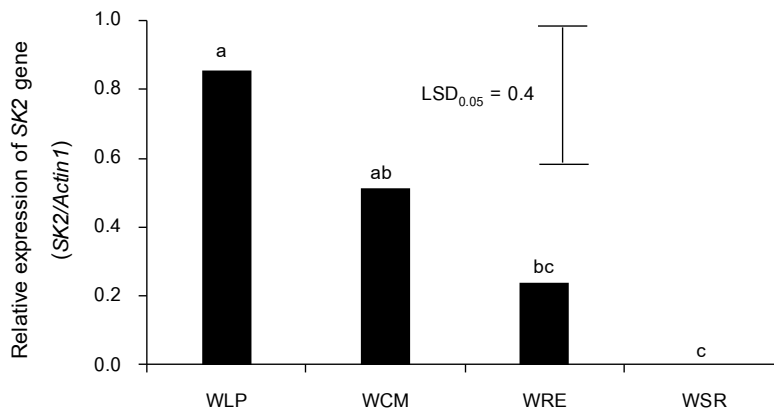


Figure 5. Relative expression of SK2 gene in 4 common wild rice populations at 14th day after deep water treatment using semi-quantitative RT-PCR analysis

การแสดงออกของยีน SK2 ในข้าวป่าสุรินทร์ ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในทางเดียวกันกับ Hattori *et al.* (2009) ได้ระบุการแสดงออกของยีน SK2 ที่เกี่ยวข้องกับการยืดปล้อง โดยทดลองในตัวอย่างข้าวป่านิดข้ามปี (W0120) และชนิดปีเดียว (W0106) พบยีน SK1 และ SK2 ในตัวอย่างของข้าวป่านิดข้ามปี (*Oryza rufipogon* Griff: W0120) โดยมีการตอบสนองต่อสภาพน้ำลึกอย่างรวดเร็ว แต่ในข้าวป่านิดปีเดียว (*Oryza nivara*: W0106) พบแค้ยีน SK1 และมีการตอบสนองเพียงเล็กน้อย จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน SK2 นั้นมีการแสดงออกได้ดีในข้าวป่านิดข้ามปีมากกว่าชนิดปีเดียว อาจเนื่องมาจากมีปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อมและการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดของประชากรข้าวป่าแต่ละชนิด การทำงานของยีน SK2 เป็นตัวกำหนดความสามารถในการยืดปล้องของข้าว

ความสัมพันธ์ของลักษณะความยาวต้น จำนวนข้อ และความยาวปล้อง กับระดับการแสดงออกของยีน SK2

พบความสัมพันธ์ในเชิงบวกระหว่างลักษณะความยาวต้นของข้าวป่าที่ให้สภาพน้ำลึกเป็นเวลา 7 วัน กับระดับการแสดงออกของยีน SK2 ของข้าวป่าทั้ง 4 ประชากร ($r^2 = 0.513^{**}$) (Figure 6a) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะความยาวต้นของข้าวป่าที่ให้สภาพน้ำลึกเป็นเวลา 14 วัน กับระดับการแสดงออกของยีน SK2 ของข้าวป่าทั้ง 4 ประชากร ($r^2 = 0.006^{ns}$)

(Figure 6b) ส่วนจำนวนข้อภายหลังจากที่ให้สภาพน้ำลึกเป็นเวลา 14 วัน พบความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับระดับการแสดงออกของยีน SK2 ของข้าวป่าทั้ง 4 ประชากร ($r^2 = 0.72^{***}$) (ข้อมูลไม่ได้แสดง) สำหรับลักษณะความยาวปล้องหลังให้สภาพน้ำลึกเป็นเวลา 14 วันพบความสัมพันธ์ในเชิงบวกในปล้องที่ 2 (Figure 7b) และปล้องที่ 3 (Figure 7c) กับระดับการแสดงออกของยีน SK2 ของข้าวป่าทั้ง 4 ประชากร ($r^2 = 0.715^{***}$ และ 0.675^{**} ตามลำดับ) และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะความยาวปล้องในปล้องที่ 1 (Figure 7a) และปล้องที่ 4 (Figure 7d) ของข้าวป่าที่ให้สภาพน้ำลึกเป็นเวลา 14 วันกับระดับการแสดงออกของยีน SK2 ของข้าวป่าทั้ง 4 ประชากร ซึ่งความสัมพันธ์ในเชิงบวกนี้มีความสอดคล้องคล้อยกับงานวิจัยของ Hattori *et al.* (2009) ที่วิเคราะห์ Grain-of-function ของยีน SK2 โดยโคลนยีน SK2 เข้าในข้าวปลูกพันธุ์ไม่ทนน้ำท่วม Taichung 65 (T65) และให้สภาพน้ำลึกเปรียบเทียบกับสภาพน้ำปกติเป็นเวลา 7 วัน พบว่าข้าวปลูกพันธุ์ไม่ทนน้ำท่วม Taichung 65 (T65) ที่ได้รับการโคลนยีน SK2 มีความยาวปล้องเพิ่มขึ้นได้มากที่สุด 19.5 เซนติเมตรเมื่อเทียบกับสภาพปกติ จากงานทดลองที่กล่าวมานี้สามารถยืนยันได้ว่า ยีน SK2 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการยืดปล้องเพื่อตอบสนองต่อสภาพน้ำลึก ซึ่งเมื่อยีนมีการแสดงออกมากจะเป็นตัวกำหนดความสามารถในการยืดปล้องของประชากรข้าวป่าทั้ง 4 ประชากรได้

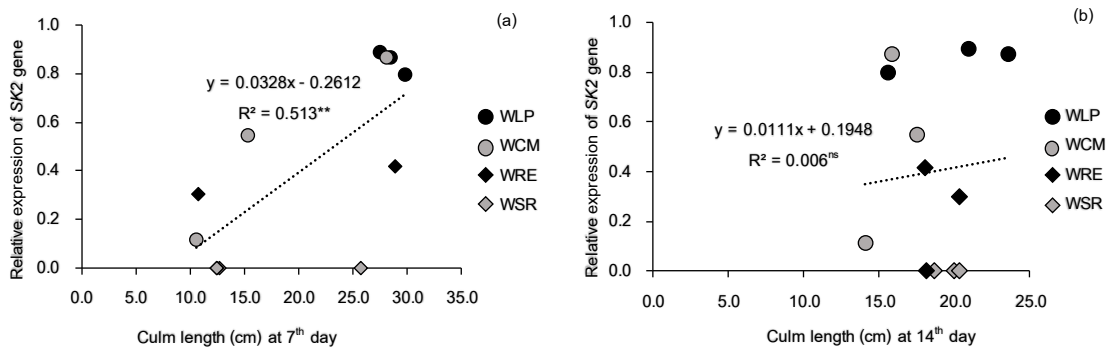


Figure 6. Correlation between culm length (cm) at 7th day (a) and 14th day (b) after deep water treatment with the level of SK2 gene expression of 4 common wild rice populations

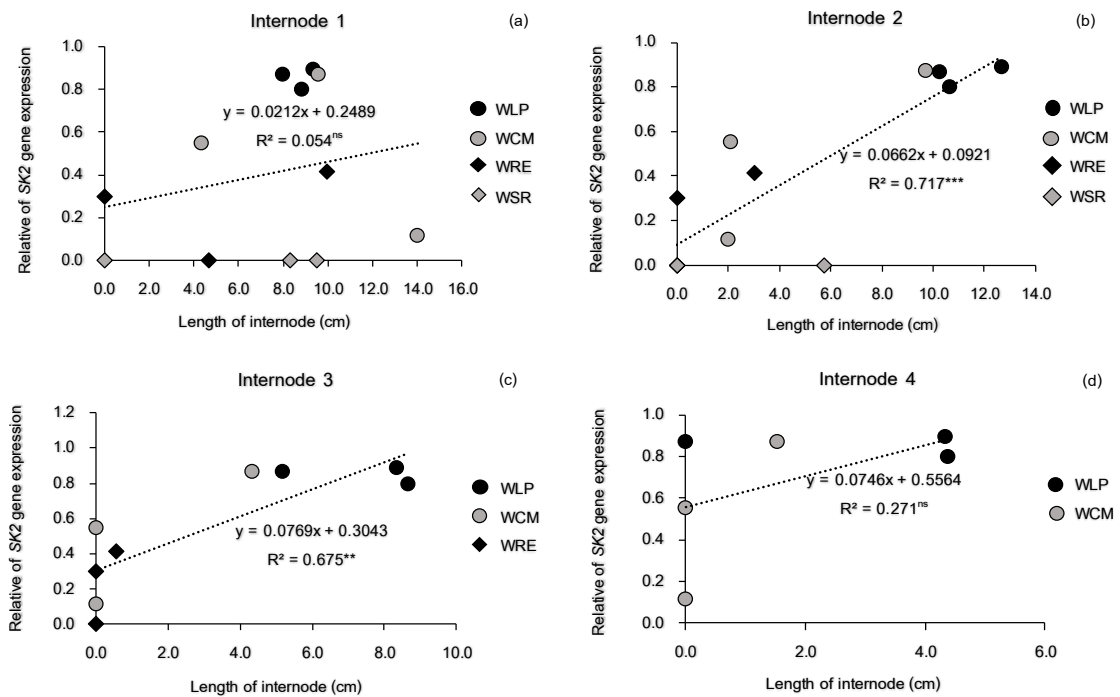


Figure 7. Correlation between internode length (cm): internode 1 (a), internode 2 (b), internode 3 (c) and internode 4 (d) after deep water treatment for 14 day with the level of SK2 gene expression of 4 common wild rice populations

สรุป

จากการศึกษาความสามารถในการแสดงออกของข้าวป่าสามัญที่สภาพน้ำลึก พบว่าข้าวป่าสามัญทั้ง 4 ประชากร มีการตอบสนองต่อสภาพน้ำลึก ทำให้ลักษณะที่แสดงออกได้แก่ ลักษณะความยาวต้น ความยาวปล้อง และจำนวนข้อ มีการตอบสนองที่ทำให้มีการแสดงออกแตกต่างกัน โดยพบว่าข้าวปาลำพูนมีความสามารถในการยืดปล้องและการแสดงออกของยีน *SK2* สูงที่สุด ทั้งนี้หากต้องการปรับปรุงพันธุ์ข้าวปลูกที่มีความสามารถทนต่อสภาพที่ถูกน้ำท่วมขังหรือทนต่อสภาพน้ำลึกให้มีศักยภาพมากยิ่งขึ้น ข้าวปาลำพูนจึงเป็นตัวเลือกหนึ่งที่เหมาะสมต่อการนำไปเป็นแหล่งพันธุกรรม (genetic resource) เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป และถ้าต้องการทดสอบสภาพน้ำลึกเพื่อวัดความสามารถในการยืดปล้องของข้าวพันธุ์นั้น เวลาที่เหมาะสมในการทดสอบ 7 วัน ก็สามารถทำได้ แต่ถ้าหากต้องการทดสอบการตอบสนองของลักษณะอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่นการเพิ่มขึ้นของจำนวนข้อและความยาวปล้องในแต่ละปล้อง ควรใช้เวลาในการทดสอบอย่างน้อย 14 วัน จึงจะเพียงพอต่อการเก็บข้อมูลทำการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณงบประมาณในการวิจัย จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (TRG5780091) สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

Anandan, A., S.K. Pradhan, S.K. Das, L. Behera and G. Sangeetha. 2015. Differential responses of rice genotypes and physiological mechanism under prolonged deepwater flooding. *Field Crops Research* 172: 153-163.

- Choi, D. 2011. Molecular events underlying coordinated hormone action in submergence escape response of deepwater rice. *Journal of Plant Biology* 54(6): 365-372.
- Hattori, Y., K. Nagai and M. Ashikari. 2011. Rice growth adapting to deepwater. *Current Opinion in Plant Biology* 14(1): 100-105.
- Hattori, Y., K. Nagai, S. Furukawa, X.J. Song, R. Kawano, H. Sakakibara and M. Ashikari. 2009. The ethylene response factors *SNORKEL1* and *SNORKEL2* allow rice to adapt to deep water. *Nature* 460(7258) : 1026-1030.
- Kihara, H., T.C. Katayama and K. Tsunewaki. 1962. Floating habit of 10 strains of wild and cultivated rice. *Japanese Journal of Genetics* 37(1): 1-9.
- Mohapatra, P.K., B.B. Panda and E. Kariali. 2011. Plasticity of tiller dynamics in wild rice *Oryza rufipogon* Griff.: A strategy for resilience in suboptimal environments. *International Journal of Agronomy*, Article ID 543237, doi: 10.1155/2011/543237.
- Morishima, H., Y. Sano and H. I. Oka. 1984. Differentiation of perennial and annual types due to habitat conditions in the wild rice *Oryza perennis*. *Plant Systematics and Evolution* 144(2): 119-135.
- Nagai, K., Y. Hattori and M. Ashikari. 2010. Stunt or elongate? Two opposite strategies by which rice adapts to floods. *Journal of Plant Research* 123(3): 303-309.
- Okishio, T., D. Sasayama, T. Hirano, M. Akimoto, K. Itoh and T. Azuma. 2014. Growth promotion and inhibition of the Amazonian wild rice species *Oryza grandiglumis* to survive flooding. *Planta* 240(3): 459-469.

- Punyalue, A. 2006. Characterization of common wild rice populations from main rice growing regions of Thailand. M.S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 76 p. (in Thai)
- Schneider, C. A., W.S. Rasband and K.W. Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature Methods 9(7): 671-675.
- Singh, A., E.M. Septiningsih, H.S. Balyan, N.K. Singh and V. Rai. 2017. Genetics, physiological mechanisms and breeding of flood-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) . Plant and Cell Physiology 58(2): 185-197.
- Vaughan, D. A. 1994. The Wild Relatives of Rice: A Genetic Resources Handbook. International Rice Research Institute, Los Baños. 148 p.
-