

รูปแบบการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein ในข้าวท่าพะเยาระยะต้นกล้าภายใต้สภาวะแล้ง Expression Pattern of Heat Shock Protein Genes in Khao Kum Phayao (*Oryza sativa* L.) in the Seedling Stage under Drought Stress

สุภาพร ภัสสร*

คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ตำบลแม่กา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 56000

Supaporn Passorn*

School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Mae ka, Muang, Phayao 56000

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสภาวะแล้งจำลองต่อการเจริญของข้าวท่าพะเยาและการแสดงออกของยีน heat shock proteins (HSPs) โดยนำต้นกล้าอายุ 7 วัน เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ในสภาวะแล้งจำลองที่เติม PEG6000 ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ และที่ไม่เติม PEG6000 (ชุดควบคุม) เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 21 วัน เก็บตัวอย่างในระยะเวลาต่าง ๆ โดยวัดความสูงต้นและความยาวราก พบว่าความสูงของต้นกล้าข้าวท่าในสภาวะแล้งน้อยกว่าชุดควบคุม ในขณะที่มีความยาวของรากมากกว่า การวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของกลุ่มยีน HSP90s (HSP50.2, HSP74.8 และ HSP80.2) กลุ่มยีน HSP70s (HSP23.7, HSP58.7 และ HSP71.1) และกลุ่มยีน small HSPs (HSP17.0, HSP24.1 และ HSP26.7) ตรวจสอบโดยวิธี semi-quantitative RT-PCR (sqRT-PCR) แสดงให้เห็นว่าต้นกล้าข้าวท่าพะเยามีการแสดงออกของยีน HSPs หลายรูปแบบ โดยยีน HSP58.7 ถูกกระตุ้นการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนในสภาวะแล้งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ยีน HSP74.8 และ HSP80.2 มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอโดยไม่ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในสภาวะแล้ง และยีน HSP17.0 และ HSP71.1 แสดงออกเพิ่มขึ้นตามอายุของต้นกล้าซึ่งไม่ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในสภาวะแล้ง และผลจากสภาวะแล้งเปลี่ยนแปลงระยะการแสดงออกของยีนโดยเร่งช่วงเวลาการแสดงออกสูงสุดให้เกิดเร็วขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ประกอบด้วยยีน HSP23.7 HSP24.1 HSP26.7 และ HSP50.2

คำสำคัญ : สภาวะแล้ง; ฮีทช็อกโปรตีน; ข้าวท่าพะเยา

Abstract

Study of the drought stress effect on growth and expression of heat shock proteins in Khao Kum Phayao (*Oryza sativa* L.). Rice seedlings were germinated and grown for 7 days. Then 7-day old seedlings were continually grown in liquid Hoagland medium supplemented with 5 and 10 % (w/v) of PEG6000 to simulate drought stress and in Hoagland solution without PEG6000 (control) for a total of 21 days. The seedling growths were determined by the length of root and stem. The result showed that stem length in drought stress was shorter than control. While root length was longer compared to control. The pattern of gene expression of HSP90s (*HSP50.2*, *HSP74.8* and *HSP80.2*), HSP70s (*HSP23.7*, *HSP58.7* and *HSP71.1*) and small HSPs (*HSP17.0*, *HSP24.1* and *HSP26.7*) were analyzed using semi-quantitative RT-PCR (sqRT-PCR) method. The HSPs expressions in seedling were exhibited in different expression patterns. The *HSP58.7* expression was significantly induced in drought stress compared to the control. The *HSP74.8* and *HSP80.2* were constitutively expressed in drought condition and control. Moreover, *HSP17.0* and *HSP71.1* increasingly expressed following the period of seedling growth. The expression of both genes were independent of drought effect. Last group of HSPs as *HSP23.7*, *HSP24.1*, *HSP26.7* and *HSP50.2* showed that the effect of drought stress altered the pattern of gene expression by accelerating time of the maximum gene expression to be faster than control.

Keywords: drought stress; heat shock protein; Khao Kum Phayao

1. บทนำ

จังหวัดพะเยาเป็นแหล่งปลูกข้าวที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากมาย รวมทั้งข้าวเหนียวดำ (black rice) ที่รู้จักกันในชื่อ “ข้าวกำพะเยา” เป็นข้าวเหนียวดำพันธุ์พื้นเมืองที่ไวต่อช่วงแสง ลักษณะลำต้นเป็นสีม่วง เมล็ดข้าวกล้องและเยื่อหุ้มเมล็ดมีสีม่วง เมล็ดค่อนข้างสั้นและป้อมกว่าข้าวเหนียวดำพันธุ์อื่น [1] ข้าวกำเริ่มเป็นที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลายเนื่องจากมีประโยชน์ต่อผู้บริโภค เช่น ช่วยในการหมุนเวียนกระแสโลหิต ลดคอเลสเตอรอลในเส้นเลือดและยับยั้งและป้องกันการเกิดเซลล์มะเร็ง [2,3] ข้าวกำจึงเป็นข้าวที่มีค่าควรแก่การอนุรักษ์และขยายพันธุ์ปลูกต่อไป อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันสภาวะอากาศที่เปลี่ยนแปลงของโลกที่เกิดจากปรากฏการณ์เรือนกระจก ทำให้มักเกิดฤดูกาลที่เปลี่ยนแปลง เกิดภัยพิบัติบ่อยครั้ง

รวมทั้งภาวะภัยแล้ง เป็นปัจจัยที่จะส่งผลกระทบต่อพืชผลทางการเกษตร โดยเฉพาะผลผลิตข้าวซึ่งเป็นสินค้าส่งออกสำคัญของประเทศไทย จึงนำไปสู่การศึกษาวิจัยกลไกการตอบสนองของข้าวที่มีต่อภาวะแล้ง โดยอาศัยกระบวนการตอบสนองของเซลล์ต่อภาวะแล้งในระดับโมเลกุล ตัวอย่าง เช่น กลุ่มฮีตช็อกโปรตีน (heat shock proteins, HSPs) ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด จัดอยู่ในกลุ่ม stress protein มีบทบาทสำคัญในการคงสภาพโปรตีนภายในเซลล์ให้ทำหน้าที่ได้ตามปกติ (chaperone) และเคลื่อนย้ายโปรตีนไปสู่ส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ โดยเซลล์สิ่งมีชีวิตจะสังเคราะห์ HSPs ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเกิดความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ปัจจุบันค้นพบ HSP จำนวนมากมายและได้จัดแบ่งเป็นกลุ่มย่อย โดยใช้ขนาดของโปรตีนเป็นเกณฑ์ ดังนั้น กลุ่ม HSP60s

HSP70s HSP90s HSP100/Clp และ small HSPs [4,5] HSP มีผลต่อการเพิ่มความสามารถในการทนร้อนและแล้งในพืชชนิดต่าง ๆ เช่น การศึกษาโดยอาศัยเทคนิคในการส่งถ่ายยีน *HSP17.7* ในข้าว ทำให้ข้าวสามารถทนต่อความร้อนแล้งและแสง UVB ได้ [6] การศึกษา HSPs ในข้าวโดย Sarkar และคณะ [7] ในภาวะความเครียดอุณหภูมิ ความแห้งของอากาศ และความดันออสโมติก โดยใช้ microarray และ RT-PCR รายงานว่ากลุ่มยีน HSP มีรูปแบบการแสดงออกแตกต่างกันในการตอบสนองต่อความเครียดแต่ละชนิด และระยะการเจริญของข้าวที่ต่างกัน เช่น small HSP พบการแสดงออกมากในเมล็ดข้าว จากข้อมูลทั้งหมดข้างต้นแสดงให้เห็นความทนทานที่ได้รับจากการกระตุ้นด้วยภาวะแล้งทำให้เกิดการปรับตัวของพืชโดย HSPs มีบทบาทสำคัญอย่างมากในกลไกเหล่านี้ การศึกษาครั้งนี้เพื่อทำให้ทราบข้อมูลของรูปแบบการแสดงออกยีน HSPs ในข้าวกล้าพะเยา ที่ตอบสนองต่อความเครียดจากสภาวะแล้ง โดยศึกษาในข้าวระยะต้นกล้า (seedling stage) เป็นระยะจากข้าวงอกจนกระทั่งถึงข้าวมีใบประมาณ 4-5 ใบ ใช้ระยะเวลาประมาณ 21 วัน เพาะเลี้ยงกล้าข้าวในสภาวะความเครียดที่เกิดจากการขาดน้ำโดยใช้ polyethylene glycol (PEG) มีผลทำให้ลด osmotic potential ใน

สารละลายที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ จากนั้นนำกล้าข้าวที่ผ่านสภาวะความเครียดที่ระยะเวลาต่าง ๆ มาตรวจวัดปริมาณการแสดงออกของกลุ่มยีน HSPs 9 ชนิด ตามที่คัดแยกได้จากงานวิจัยของ Zou และคณะ (8) โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มของยีน HSP90s (*HSP50.2*, *HSP74.8* และ *HSP80.2*) กลุ่มของยีน HSP70s (*HSP23.7*, *HSP58.7* และ *HSP71.1*) และกลุ่มของยีน small HSPs (*HSP17.0*, *HSP24.1* และ *HSP26.7*) งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลรูปแบบการแสดงออกของยีนกลุ่ม HSPs ในต้นกล้าข้าวเหนียวดำก่ำพะเยาเพาะเลี้ยงในสภาวะแล้งจำลอง ซึ่งอาจนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์ข้าวกล้าเพื่อให้ได้ข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีคุณภาพดีหรือทนทานต่อสภาพแห้งแล้งได้ในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

2.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวกล้าพะเยา ในอาหารเหลว Hoagland ที่มีระดับความเข้มข้นของ polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) ต่างกัน

นำเมล็ดข้าวพันธุ์กล้าพะเยาที่ผ่านการแช่น้ำ 1 คืน มาบ่มในที่ชื้นเพื่อให้ข้าวงอก เป็นเวลา 3 วัน จนสังเกตเห็นมีปมสีขาวงอกออกมาจากเมล็ด แล้วปลูกลง



(A)



(B)

รูปที่ 1 (A) การงอกของเมล็ดข้าวกล้าพะเยา และ (B) การเพาะเลี้ยงต้นกล้าข้าวในอาหารเหลว Hoagland

ในฟองน้ำที่ดัดแปลงเพื่อเพาะต้นกล้า จนต้นกล้ามีอายุ 7 วัน และความสูงประมาณ 3-4 เซนติเมตร ย้ายต้นกล้าชำปลูกลงในกล่องพลาสติกที่เจาะรูสำหรับปลูกต้นข้าว โดยกล่องมีความกว้าง x ยาว 13x13 เซนติเมตร สูง 9 เซนติเมตร และติดเทปกาวยึดรอบกล่องเพื่อป้องกันรากจากแสง ดังแสดงในรูปที่ 1

นำต้นกล้าชำย้ายลงเพาะเลี้ยงในกล่องพลาสติกที่บรรจุอาหารเหลว Hoagland เต็มสาร

ละลาย PEG6000 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ นำต้นกล้าชำวางภายใต้ภาวะแสงขาวตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้อง เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 1 สัปดาห์ ติดตามการเจริญโดยวัดความยาวรากและความสูงต้นกล้าชำ ลักษณะของใบ ทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ จำนวน 5 ซ้ำต่อหน่วยการทดลอง

ตารางที่ 1 รายละเอียดไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	Annealing Temperature (°C)	ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR (base pairs)
HSP17.0	Forward	GGTCACATCGCCAATTCAC	58	384
	Reverse	GGTGCCACTTGTCTGTTCTT		
HSP26.7	Forward	AGGTGAGGATGCGTTTCG	58	353
	Reverse	CGCTCACAGGCTCACATCC		
HSP58.7	Forward	TCAACCTCCCCTTTATTACTGC	58	206
	Reverse	AACCTTTGGCACCCCTCGT		
HSP71.1	Forward	GCGAACGGCATCCTGAAC	58	556
	Reverse	ATTCGGTCTAAAACGAACG		
HSP74.8	Forward	CGAGCAGTTCGAGTACCAGG	58	465
	Reverse	TCAGCCATAGCTTCCCATAC		
HSP24.1	Forward	TTCCAGGTCAACGTCGAGT	58	282
	Reverse	GCACGGTTCTTCCGCTTCA		
HSP23.7	Forward	GCACGATGTTTCATCCTTGTT	58	378
	Reverse	GGACCTTGATGGTGTTTGT		
HSP50.2	Forward	GCTACCCTATCTCCCTGAATG	58	228
	Reverse	CCTCTTTAGCTTCCTCGTTCT		
HSP80.2	Forward	CGACGACGAGCAGTATGT	58	464
	Reverse	CCAGATGTTCTCCAGT		
Actin	Forward	CTTCAACACCCCTGCTATG	58	358
	Reverse	TCCATCAGGAAGCTCGTAG		

ที่มา : Zou และคณะ (8)

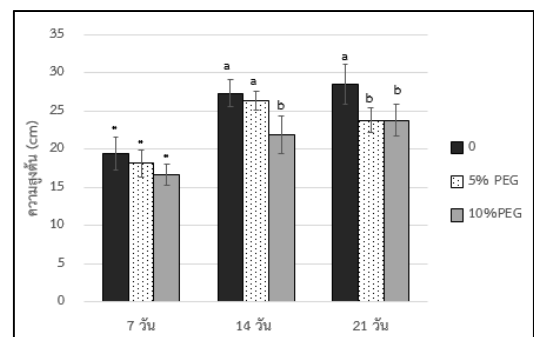
2.2 วิเคราะห์การแสดงออกของยีน HSPs ในข้าวกล้าเพาะระยะต้นกล้า (seedling stage) โดยเทคนิค semi quantitative RT-PCR (sqRT-PCR)

เพาะเลี้ยงต้นกล้าตามวิธีที่ระบุไว้ตามข้อ 2.1 โดยนำกล้าข้าวที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Hoagland ที่เติมสารละลาย PEG6000 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาสั้นที่ 1, 6 และ 24 ชั่วโมง และในระยะยาว 7, 14 และ 21 วัน นำมาสกัด total RNA ด้วย TRIzol® reagent (Invitrogen, USA) และตรวจสอบปริมาณของ total RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วจึงนำ total RNA จำนวน 3 ไมโครกรัม มาใช้สร้าง first-strand cDNA (reverse transcription, RT) โดยใช้ M-MLV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, USA) ร่วมกับ oligo (dT) primer และนำ first-strand cDNA ที่ได้ไปเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมาย (PCR) โดยใช้ DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ปฏิกริยาประกอบด้วย 2x DreamTaq Green PCR Master Mix และไพรเมอร์ที่จำเพาะ (specific primer) ต่อยีน HSPs ทั้ง 9 ชนิด และยีนแอกติน (actin) ซึ่งใช้เป็น housekeeping gene ไพรเมอร์ทั้งหมดออกแบบโดย Zou และคณะ (2009) โดยทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ อุณหภูมิ annealing ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ และขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ แสดงในตารางที่ 1 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย อิเล็กโทรโฟเรซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอด้วย gel documentation system โดยใช้โปรแกรม Gene Tools (USA) แสดงผลระดับการแสดงออกของยีน relative expression level คำนวณจากอัตราส่วน (expression ratio) ของความเข้มแถบดีเอ็นเอเป้าหมายต่อความเข้มของแถบดีเอ็นเอ

แอกติน จำนวน 3 ซ้ำต่อหน่วยการทดลอง การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม statistics package for the social sciences (SPSS)

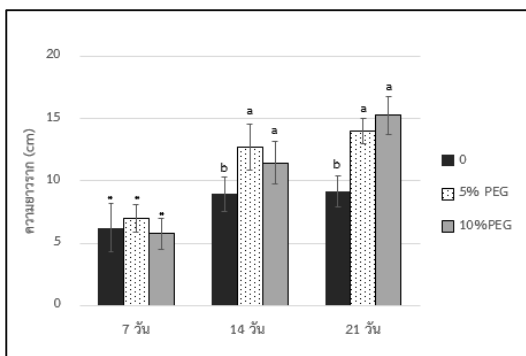
3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวกล้าเพาะ ในอาหารเหลว Hoagland ที่มีระดับความเข้มข้นของ PEG6000 แตกต่างกัน



รูปที่ 2 ความสูงของต้นกล้าข้าวกล้าเพาะเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ไม่เติม PEG6000 (0) และที่เติม PEG6000 ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7, 14 และ 21 วิเคราะห์ค่าแตกต่างทางสถิติโดยใช้วิธี DMRT เครื่องหมาย * แสดงค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

การเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวกล้าเพาะเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ไม่เติม PEG6000 (0) และเติม PEG6000 ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 21 วัน เก็บตัวอย่างเพื่อวัดความยาวรากและความสูงต้นกล้าข้าวทุก ๆ 7 วัน พบว่าในวันที่ 7 และ 14 การเจริญเติบโตของต้นกล้าเป็นปกติ ไม่พบการเหี่ยวหรือการห่อม้วนของใบลำต้นและใบมีสีเขียวอมม่วง และในสัปดาห์ที่ 2 ลำต้นของกล้าข้าวเริ่มยืดยาวออก และพบลักษณะ



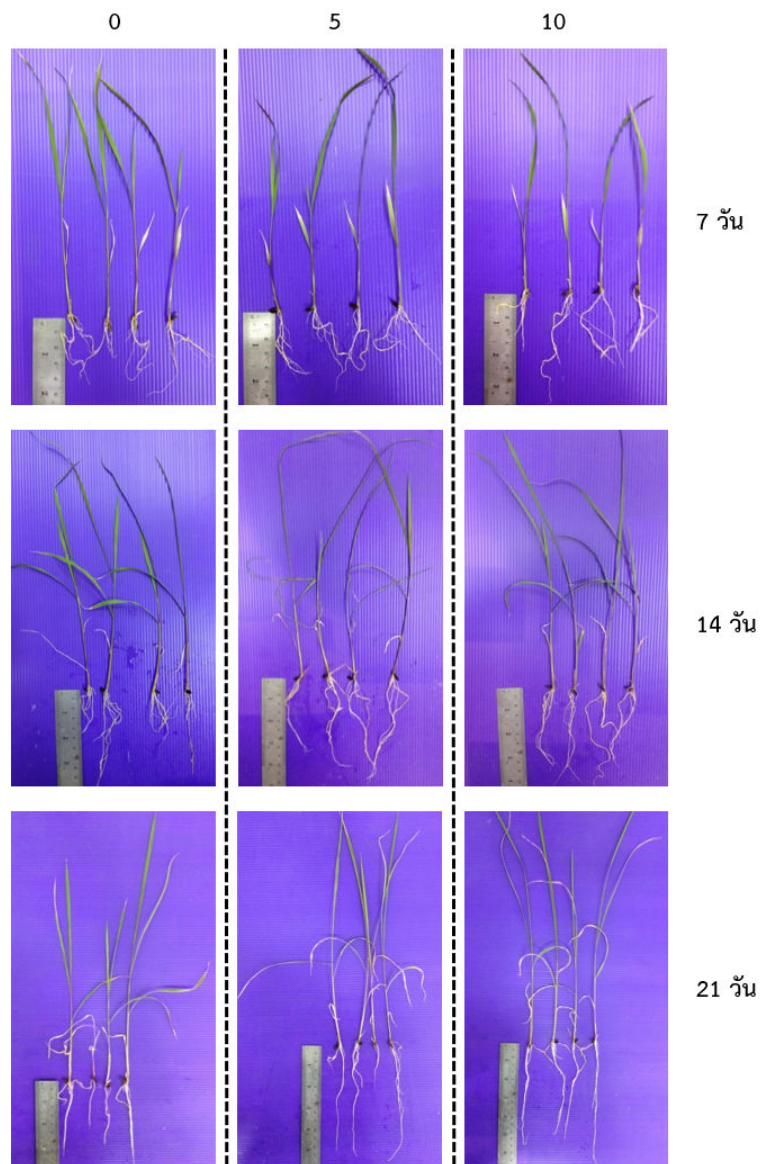
รูปที่ 3 ความยาวรากต้นกล้าข้าวก่ำพะเยาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ไม่เติม PEG6000 (0) และที่เติม PEG6000 ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7, 14 และ 21 วิเคราะห์ค่าแตกต่างทางสถิติโดยใช้วิธี DMRT เครื่องหมาย * แสดงค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

บริเวณปลายใบหงิกงอเล็กน้อยในสภาวะการเลี้ยงที่เติม PEG6000 ในอาหาร จากการสังเกตการเจริญเติบโตวันที่ 21 ในอาหารสูตร Hoagland เติม PEG 6000 ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปลายใบมีลักษณะเหี่ยว หงิกงอเล็กน้อย และเริ่มมีสีเหลือง มีการห่อม้วนของใบ นอกจากนี้สภาวะแล้งมีผลต่อการเจริญของต้นกล้าโดยทำให้ความสูงของต้นกล้ามีแนวโน้มลดลง จากการติดตามการเจริญจากความสูงของต้นกล้าข้าวในวันที่ 21 ในชุดทดลองที่เติม PEG 6000 ทั้งสองความเข้มข้น มีค่าความสูงเฉลี่ยใกล้เคียงกันเท่ากับ 23.8 ± 2.4 เซนติเมตร ส่วนชุดควบคุมที่ไม่เติม PEG6000 มีความสูงเฉลี่ยที่ 28.5 ± 2.42 เซนติเมตร (รูปที่ 2) ส่วนความยาวของรากในชุดทดลองที่เติม PEG6000 มีความยาวรากมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 อย่างไรก็ตาม ความยาวเฉลี่ยของรากต้นกล้าข้าวที่เพิ่มขึ้นในชุดที่เติม PEG6000 ความเข้มข้น 5 และ 10

เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยในสัปดาห์สุดท้ายความยาวเฉลี่ยของรากเท่ากับ 13.9 ± 1.0 และ 15.2 ± 1.5 เซนติเมตร ซึ่งเทียบกับความยาวเฉลี่ยรากในชุดควบคุม เท่ากับ 9.1 ± 1.2 เซนติเมตร (รูปที่ 3 และ 4)

สภาวะแล้งจากสาร PEG6000 เกิดขึ้นเนื่องจากสารไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของพืชได้ จึงทำให้ปิดกั้นการดูดซึมน้ำเข้าสู่ลำต้นของพืช ทำให้พืชขาดน้ำและอยู่ในสภาวะแล้ง จึงมีผลต่อการเจริญเติบโตของกล้าข้าวก่ำพะเยาในชุดการทดลองอาหารเหลว Hoagland ที่เติมสารละลาย PEG6000 ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เจริญค่อนข้างช้ากว่าในชุดควบคุมที่ไม่มีสารละลาย PEG6000 โดยเปรียบเทียบจากความสูงของต้นกล้าข้าว เนื่องจากน้ำเป็นส่วนสำคัญในการควบคุมกระบวนการเมตาโบลิซึมต่าง ๆ ของพืช และการคงรูปร่างของเซลล์พืช โดยการควบคุมของปากใบพืชผ่านทางระบบท่อลำเลียง เมื่อเกิดการคายน้ำเนื่องจากความแตกต่างระหว่างค่า water potential ระหว่างอากาศกับพืช และทำให้ค่า water potential ของใบลดลง ดังนั้นในสภาวะแล้งทำให้พืชไม่สามารถดึงน้ำขึ้นมาได้จึงทำให้การเจริญเติบโตของพืชลดลง (9) ทำให้เกิดการตอบสนองหลายลักษณะ เช่น มีการม้วนตัวของใบ การปิดปากใบและการปรับค่าออสโมติกของพืช ซึ่งลักษณะการห่อม้วนของใบและปลายใบมีสีเหลืองหงิกงอ สามารถสังเกตได้ในใบของต้นกล้าข้าวก่ำพะเยาที่เลี้ยงในสภาวะแล้งจากการใช้ PEG6000 ในครั้งนี้เช่นกัน สอดคล้องกับการเกิดขึ้นในใบแก้วที่พบว่าการขาดน้ำมีผลต่ออัตราการขยายพื้นที่ใบในแก้ว โดยการขาดน้ำจะส่งผลต่อใบแก้วทำให้จำนวนเซลล์ และขนาดของเซลล์ลดลง [10]

ส่วนการเจริญของรากพบว่าสภาวะแล้งทำให้รากของต้นกล้าข้าวก่ำพะเยามีความยาวมากกว่าสภาวะปกติ พบเช่นเดียวกับรายงานของ Madabula



รูปที่ 4 การเจริญของรากต้นกล้าข้าวท่าพะเยา เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ไม่เติม PEG6000 (0) และที่เติม PEG6000 ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7, 14 และ 21

และคณะ [11] ศึกษาลักษณะความทนแล้งของข้าวพันธุ์ที่ปลูกในประเทศบราซิล จำนวน 8 พันธุ์ โดยทดลองในข้าวระยะต้นกล้าอายุ 14 วัน นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี PEG6000 ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ และวัดการเจริญของต้นกล้าจากความยาวยอดและราก น้ำหนักแห้งของยอดและ

ราก ผลการศึกษาพบว่ากล้าข้าวทั้ง 8 พันธุ์ เมื่อเจริญในสภาวะแล้งที่เกิดจากสาร PEG6000 ทำให้ความยาวและน้ำหนักแห้งของยอดลดลง แต่ในทางกลับกันความยาวและน้ำหนักแห้งของรากเพิ่มมากขึ้น ในระดับที่แตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ ส่งผลให้อัตราส่วนของน้ำหนักแห้งรากต่อน้ำหนักแห้งยอดเพิ่มมากขึ้นใน

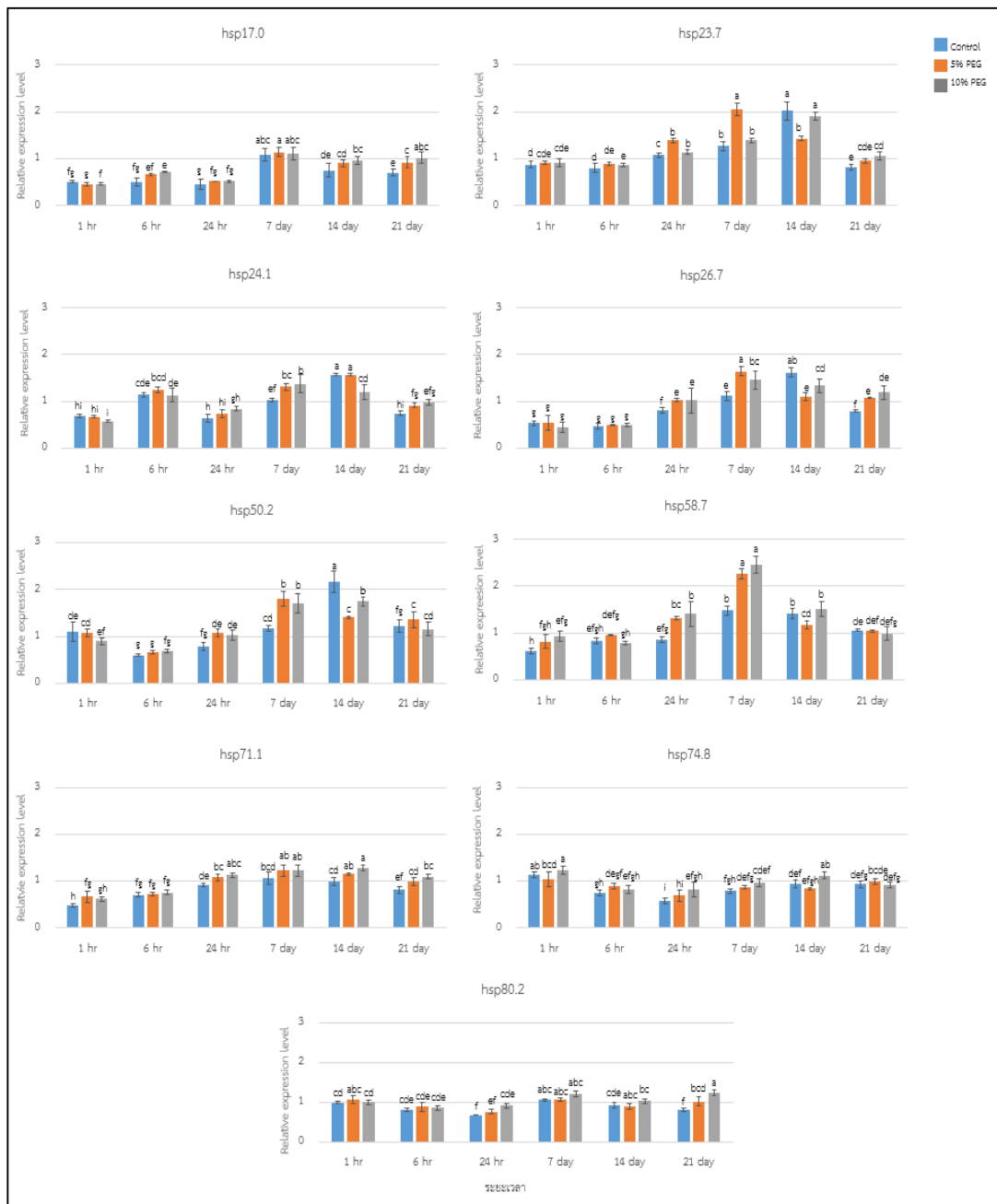
สภาวะความเครียด และยังสอดคล้องกับการศึกษาในข้าวพันธุ์ กข 15 และ กข 53 แสดงลักษณะการปรับตัวจากสภาวะการขาดน้ำ โดยการเพิ่มปริมาณรากที่ส่งผลให้น้ำหนักแห้งรากมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับระดับน้ำลดลง ซึ่งแตกต่างจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และหอมสุพรรณบุรี มีแนวโน้มลดลงเมื่อระดับการให้น้ำลดลง จึงแสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของรากต่อสภาวะการขาดน้ำมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและพันธุ์ของข้าว [12] ความยาวของรากเพิ่มขึ้นร่วมกับขนาดของรากแก้วเล็กลงเป็นการปรับตัวของพืชทำให้สามารถหยั่งลึกลงไปในดินเพื่อหาน้ำใต้ดินเพื่อความอยู่รอดในสภาวะแล้ง [13] กลไกในการตอบสนองของข้าวที่มีต่อสภาวะแล้งเกิดขึ้นได้หลายแบบที่ส่งผลต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว [14] เช่น การทนทานแล้ง (drought tolerance) โดยการปิดปากใบ การม้วนใบ การสร้างฮอร์โมน ABA (abscisic acid) เพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะขาดน้ำ การหนีแล้ง (drought escape) ทำให้ข้าวสามารถสุกเร็วขึ้น หรือขยายระยะเวลาในการออกดอกซึ่งพบในการเพาะปลูกข้าวบนพื้นที่สูงในอินเดียและบังคลาเทศ [15] ในการศึกษาครั้งนี้ทำให้เห็นว่าข้าวเก่าพะเยามีกลไกตอบสนองต่อสภาวะแล้งอย่างหนึ่ง คือ กลไกการเลี่ยงแล้ง (drought avoidance) เกิดจากการมีรากที่ยืดยาวขึ้นเพื่อปรับระบบการดูดน้ำของรากให้ดีขึ้น ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของสภาวะแล้งต่อการเจริญในข้าวเก่าพะเยาระยะอื่น ๆ เพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงกลไกการตอบสนองต่อสภาวะแล้งในข้าวเก่าพะเยาและปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวเหนียวดำของประเทศได้ในอนาคต

3.2 รูปแบบการแสดงออกของกลุ่มยีน heat shock protein ในสภาวะแล้งของข้าวเก่าพะเยาระยะต้นกล้า

การศึกษาครั้งนี้ได้เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *HSPs* โดยวิธี sqRT-PCR ในกล้าข้าวเก่า

พะเยาที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Hoagland ไม่เติม PEG6000 (control) และเติมสารละลาย PEG6000 ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาสั้น 1, 6 และ 24 ชั่วโมง และระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้ไพรเมอร์ *HSPs* ทั้งหมด 9 คู่ คือ *HSP17.0*, *HSP23.7*, *HSP24.1*, *HSP26.7*, *HSP50.2*, *HSP58.7*, *HSP71.7*, *HSP74.8* และ *HSP80.2* ศึกษาการแสดงออกของยีนแบบ comparative quantification เป็นการเปรียบเทียบ target template ในการทดลองครั้งนี้ คือ ยีน *HSPs* กับ reference gene คือ ยีน actin จากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนแสดงให้เห็นว่ายีน *HSPs* แต่ละชนิดมีการแสดงออกที่แตกต่างกัน (รูปที่ 5) โดยการแสดงออกของยีนในกลุ่ม small *HSPs* ประกอบด้วย *HSP17.0*, *HSP24.1* และ *HSP26.7* พบว่าการแสดงออกของยีน *HSP17.0* และ *HSP24.1* เพิ่มขึ้นตามอายุการเจริญของต้นกล้า และมีแนวโน้มลดลงเมื่ออายุของต้นกล้าเพิ่มขึ้น โดยยีน *HSP17.0* มีการแสดงออกสูงอย่างชัดเจนภายในวันที่ 7 และลดลงในวันที่ 14 และ 21 รูปแบบการแสดงออกของยีนเกิดขึ้นในลักษณะเดียวกันทั้งชุดควบคุมและชุดที่เติม PEG6000 ในขณะที่การแสดงออกของยีน *HSP24.1* และ *HSP26.7* ในช่วงวันที่ 7 ของสภาวะที่เติม PEG 6000 มีการแสดงออกของยีนสูงกว่าชุดควบคุมที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยยีนทั้งสองมีการแสดงออกสูงสุดในวันที่ 14 ในชุดควบคุม ดังนั้นสภาวะแล้งอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของยีน small *HSPs* บางชนิดโดยเร่งช่วงการแสดงออกสูงสุดให้เกิดเร็วขึ้นในระยะต้นกล้าของข้าวเก่าพะเยา

ส่วนรูปแบบการแสดงออกของยีนกลุ่ม *HSP70s* มีความแตกต่างกันทั้ง 3 ชนิด โดยพบว่ายีน *HSP71.1* มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างจากยีนใน



รูปที่ 5 การแสดงออกของยีน HSPs ทั้งหมด 9 ยีน คือ HSP17.0, HSP23.7, HSP24.1, HSP26.7, HSP50.2, HSP58.7, HSP71.7, HSP74.8 และ HSP80.2 เปรียบเทียบกับยีน *actin* จากต้นกล้าข้าวท่าพะเยา เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ไม่เติม PEG 6000 (control) และที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาสั้นที่ 1, 6 และ 24 ชั่วโมง และในระยะ 7, 14 และ 21 วัน ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันเหนือแถบแสดงความคาดเคลื่อนแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DMRT ($p < 0.05$)

กลุ่มเดียวกัน โดยการแสดงออกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงระยะ 24 ชั่วโมง และค่อนข้างคงที่ไปจนถึงวันที่ 14 ต่อมาลดลงเล็กน้อยในช่วงท้ายของการทดลอง รูปแบบการแสดงออกนี้พบได้ทั้งในชุดควบคุมและชุดที่เติม PEG6000 ในส่วนการแสดงออกของยีน *HSP58.7* จะเพิ่มสูงขึ้นในสถานะเดิม PEG6000 ในชั่วโมงที่ 24 ทั้งสองความเข้มข้น และลดลงมาใกล้เคียงกับการแสดงออกของชุดควบคุมในระยะเวลาต่อมาในวันที่ 14 และการแสดงออกของยีน *HSP23.7* ถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้นด้วย PEG6000 ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์และชุดควบคุมที่ระยะเวลา 7 วัน และหลังจากนั้นจะลดลง ในส่วนรูปแบบการแสดงออกของกลุ่มของยีน *HSP90s* พบว่ายีน *HSP74.8* และ *HSP80.2* มีการแสดงออกของยีนที่ค่อนข้างคงที่ตลอดช่วงระยะเวลาในการทดลอง มีเพียงยีน *HSP50.2* ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่ออายุของต้นกล้าข้าวเพิ่มขึ้น และสภาวะแล้งเร่งการแสดงออกของยีนสูงสุดให้เกิดขึ้นเร็วกว่าชุดควบคุม เช่นเดียวกับที่พบใน *HSP23.7*, *HSP24.1* และ *HSP26.7*

ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน *HSPs* แต่ละชนิดในข้าวกำแพงะยะต้นกล้าตอบสนองต่อสภาวะแล้งที่เกิดจากสาร PEG6000 แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Zou และคณะ [8] ศึกษาการแสดงออกของยีน *HSPs* ทั้ง 9 ชนิดนี้ ในระยะต้นกล้าข้าว (*Oryza sativa* L., ssp. *japonica*) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 1/2MS จนถึงอายุ 3 สัปดาห์ จากนั้นเติม PEG6000 ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทำให้เกิดสภาวะแล้ง ติดตามการแสดงออกของยีนที่ระยะเวลา 5, 15, 45 นาที และ 1.5, 3, 5, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า มีเพียงยีนที่เป็นสมาชิกของกลุ่ม small *HSPs* (*HSP24.1*) และยีน *HSP90s* (*HSP80.2*) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสภาวะแล้งจาก

PEG6000 การแสดงออกของยีน *HSPs* ในลักษณะนี้ยังพบได้ในพืชชนิดอื่น เช่น ต้นยาสูบมีการลักษณะการตอบสนองต่อสภาวะแล้งแตกต่างกันในกลุ่มยีน *HSP70s* โดยยีน *NtHSP70-1* จะถูกกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกเมื่ออยู่ในสภาพขาดน้ำเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ในขณะที่ไม่มีผลต่อการแสดงออกในยีน *NtHSP70-3* [16] หรือการแสดงออกของ small *HSPs* ที่มีจำนวนมากและมีความแตกต่างกัน ในบางพืชพบมากกว่า 30 ชนิด โดยส่วนใหญ่จะถูกกระตุ้นการแสดงออกด้วยสภาวะเครียด แต่ก็มีบางชนิดที่มีการแสดงออกแบบต่อเนื่อง (constitutive expression) [17]

ถึงแม้ว่าการแสดงออกของยีน *HSPs* จะมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับประเภทและระดับความเครียดที่ต่างกัน ซึ่ง *HSPs* ทำหน้าที่ในการช่วยรักษาสภาพของโปรตีนอื่น ๆ เพื่อให้สามารถทำงานได้อย่างปกติ [18] อย่างไรก็ตาม จากการทดลองครั้งนี้พบว่าความเข้มข้นของ PEG6000 ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลต่อการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *HSPs* ไม่แตกต่างกันมากนัก อาจเนื่องจากความเข้มข้นของ PEG6000 ไม่สูงมากพอที่จะสร้างสภาวะแล้งที่ส่งผลกระทบต่อต้นกล้าข้าวกำแพงะยา ทำให้ยังไม่เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *HSPs* ให้เพิ่มสูงขึ้นได้ทุกยีนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังเช่นในรายงานวิจัยของ Ye และคณะ (19) ได้ศึกษาโปรตีนโอมิกส์จากใบของข้าว IRAT109 ระยะต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะแล้ง พบว่ามีการตอบสนองของกลุ่มโปรตีน *HSPs* จำนวน 9 โปรตีน ประกอบด้วยกลุ่ม *HSPs* family จำนวน 2 ยีน (*OsHsp18.03* และ *OsHsp24.15*) *HSP70* family จำนวน 4 ยีน (*OsHsp71.10*, *OsHsp71.18*, *OsHsp72.57* และ *OsHsp72.90*) *HSP 90* family จำนวน 2 ยีน (*OsHsp85.88* และ *OsHsp93.04*) และ *HSP100*

family จำนวน 1 ยีน (*OsHsp108.9*) และเมื่อเพาะเลี้ยงกล้าข้าวระยะ trefoil- stage ในอาหารเหลว Hoagland ที่เติม PEG6000 ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นติดตามการแสดงออกของยีนที่ระยะเวลา 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง และการแสดงออกของยีนหลังจากหยุดสภาวะแล้ง 24 ชั่วโมง พบว่าการแสดงออกของยีนทั้ง 9 ยีน มีรูปแบบการแสดงออกเหมือนกันโดยถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนให้เพิ่มขึ้นเมื่อเกิดสภาวะแล้ง โดยมีการแสดงออกสูงสุดในระดับที่แตกต่างกันภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง และจะลดลงอย่างชัดเจนหลังจากออกจากสภาวะความแล้งภายใน 24 ชั่วโมง (recovery) ดังนั้นจากข้อมูลที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าถ้าระดับของสภาวะแล้งรุนแรงมากพอจะทำให้ HSPs ถูกกระตุ้นการแสดงออกให้สูงขึ้นอย่างรวดเร็วและชัดเจน

4. สรุปผลการวิจัย

การเจริญของรากข้าวท่าพะเยาในระยะต้นกล้ามีกลไกตอบสนองต่อสภาวะแล้ง โดยการปรับตัวทำให้ความยาวของรากเพิ่มขึ้น ผลสภาวะแล้งต่อการแสดงออกของยีน HSPs ในต้นกล้าข้าวท่าพะเยามีหลากหลายรูปแบบที่แตกต่างตามระยะเวลาของการเจริญ การศึกษครั้งนี้สามารถสรุปรูปแบบการแสดงออกของยีน HSPs ในข้าวท่าพะเยาระยะต้นกล้าที่เจริญในสภาวะแล้งสามารถสรุปรวมได้ทั้งสิ้น 4 รูปแบบ ดังนี้ กลุ่มที่ 1 มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในข้าวท่าพะเยาระยะต้นกล้า โดยไม่ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในสภาวะแล้ง ประกอบด้วยยีน *HSP74.8* และ *HSP80.2* กลุ่มที่ 2 การแสดงออกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามอายุของต้นกล้าจนถึงวันที่ 14 ต่อมาลดลงในช่วงท้ายของการทดลอง โดยการแสดงออกของยีนไม่ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในสภาวะแล้ง ประกอบด้วยยีน *HSP17.0* และ

HSP71.1 กลุ่มที่ 3 การแสดงออกเพิ่มขึ้นในสภาวะแล้งคือ ยีน *HSP58.7* และกลุ่มที่ 4 รูปแบบการแสดงออกของยีนมีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากสภาวะแล้งโดยเร่งช่วงเวลาการแสดงออกสูงสุดให้เกิดเร็วขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ประกอบด้วยยีน *HSP23.7*, *HSP24.1*, *HSP26.7* และ *HSP50.2* จากข้อสรุปที่กล่าวมานั้นเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการศึกษาสภาวะแล้งที่มีผลต่อข้าวเหนียวดำพันธุ์พื้นเมืองของจังหวัดพะเยา ซึ่งการพัฒนาเพื่อให้สามารถนำข้าวท่าพะเยาไปใช้ประโยชน์ให้ได้สูงสุด ยังคงต้องอาศัยการวิจัยเพิ่มพูนองค์ความรู้หลายด้าน เช่น คุณประโยชน์ทางโภชนาการ ด้านคุณค่าทางด้านพันธุศาสตร์ ด้านผลผลิตข้าวในปัจจุบันที่ต้องอยู่ในสภาพความแปรปรวนของสิ่งแวดล้อมสูง โดยเฉพาะในพื้นที่ปลูกที่อาศัยน้ำฝนตามธรรมชาติ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลกระทบของสภาวะแล้งต่อการเจริญในข้าวท่าพะเยาระยะอื่น ๆ โดยเพิ่มการติดตามปัจจัยที่เกี่ยวข้องทั้งทางสรีระวิทยาของข้าวและปริมาณผลผลิต รวมไปถึงกลไกการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ที่มีผลจากสภาวะแล้ง เพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงกลไกการตอบสนองต่อสภาวะแล้งในข้าวท่าพะเยา และสามารถนำข้อมูลไปใช้ในการส่งเสริมปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวเหนียวดำของประเทศได้ในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยพะเยา ประจำปี 2555 ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย

6. รายการอ้างอิง

- [1] กรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์, 2554, ประกาศโฆษณาการรับขึ้นทะเบียนสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์-ข้าวท่าล้านนา, เลขที่ประกาศ 44, 20 ตุลาคม 2554.

- [2] Yao, S.L., Xu, Y., Zhang, Y.Y. and Lu, Y.H., 2013, Black rice and anthocyanins induce inhibition of cholesterol absorption *in vitro*, Food Funct. 4: 1602-1608.
- [3] Hudson, E.A., Dinh, P.A., Kokubun, T., Simmonds, M.S.J. and Gescher, A., 2000, Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 9: 1163-1170.
- [4] Efeoglu, B., 2009, Heat shock proteins and heat shock response in plants, G.U. J. Sci. 22: 67-75.
- [5] Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A., 2004, Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response, Trends Plant Sci. 9: 244-251.
- [6] Murakami, T., Matsuba, S., Funatsuki, H., Kawaguchi, K., Saruyama, H., Tanida, M. and Sato, Y., 2004, Over-expression of small heat shock protein, sHSP17.7 confers both heat tolerance and UV-B resistance to rice plant, Mol. Breed. 13: 165-175.
- [7] Sarkar, N.K., Kim Y.K. and Grover, A., 2009, Rice sHSP genes: Genomic organization and expression profiling under stress and development, BMC Genomics 10: 393.
- [8] Zou, J., Liu, A., Chen, X., Zhou, X., Gao, G., Wang, W. and Zhang, X., 2009, Expression analysis of nine rice heat shock protein genes under abiotic stresses and ABA treatment, J. Plant Physiol. 166: 851-861.
- [9] Jaleel, C.A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H.J., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R., 2009, Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition, Int. J. Agric. Biol. 11: 100-105.
- [10] Lecoeur, J., Wery, J., Turc, O. and Tardieu, F., 1995, Expansion of pea leaves subjected to short water deficit: cell number and cell size are sensitive to stress at different periods of leaf development, J Exp. Bot. 46: 1093-1101.
- [11] Madabula, F.P., Santos, R.S.D., Machado, N., Pegoraro, C., Kruger, M.M., Maia, L.C.D., Sausa, R.O.D. and Oliveira, A.C.D., 2016, Rice genotypes for drought tolerance: morphological and transcriptional evaluation of auxin-related genes, Bragantia, Campinas 75: 428-434.
- [12] อรประภา อนุกุลประเสริฐ, 2559, ผลของการขาดน้ำต่อการเจริญเติบโตและองค์ประกอบผลผลิตของข้าวหอม 6 พันธุ์, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 24(3): 443-455.
- [13] Pace, P.F., Cralle, H.T., El-Halawany, S.H.M., Cothren, J.T. and Senseman, S.A., 1999, Drought-induced changes in shoot and root growth of young cotton plants, J. Cotton Sci. 3: 183-187.
- [14] Dwivedi, S.D.K., Dwivedi, Husain, R., Gyanendra, K, Yadav, G., Kumar, G., Singh, S.O.N., Yikram, N. and Khan, N.A., 2017,

- Physiological, morphological and molecular mechanisms for drought tolerance in rice, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6: 4160-4173.
- [15] Bernier, J., Atlin, G.N., Serraj, R., Kumar, A. and Spaner, D., 2008, Breeding upland rice for drought resistance, *J. Sci. Food Agric.* 88: 927-939.
- [16] Cho, E.K. and Hong, C.B., 2004, Molecular cloning and expression pattern analyses of heat shock protein 70 genes from *Nicotiana tabacum*, *J. Plant Biol.* 47: 149-159.
- [17] Waters, E.R., 2013, The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs, *J. Exp. Bot.* 64: 391-403.
- [18] Al-Whaibi, M.H., 2011, Plant heat-shock protein: A mini review, *J. King Saud. Univ. Sci.* 23: 139-150.
- [19] Ye, S.F., Yu, S.W., Shu, L.B., Wu, J.H., Wu, A.Z. and Luo, L.J., 2012, Expression profile analysis of 9 heat shock protein genes throughout the life cycle and under abiotic stress in rice, *Chin. Sci. Bull.* 57: 336-343.