# ผลของ EMS ต่อการตอบสนองต่อความเครียดเกลือของข้าวขาวดอกมะลิ 105

# Effect of EMS on salt-stress response in rice KDML 105

นฤมล ประครองรักษ์ (Narumon Prakrongrak)* ดร. มณฑิรา มณฑาทอง (Dr. Monthira Monthatong)**

## บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ ethyl methanesulfonate (EMS) ที่ความเข้มข้น 0.5%, 0.7% และ 0.8% เวลา 14, 16, 18 และ 20 ชั่วโมง ต่อการตอบสนองต่อความเครียดเกลือของข้าวขาวดอกมะลิ 105 เปรียบเทียบกับข้าวที่ไม่ได้รับ EMS โดยภายหลังจากแช่เมล็ดข้าวเปลือกในสารละลาย EMS แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 นำเมล็ดไปปลูกในสารละลายอาหารเป็นเวลา 7 วัน แล้วเติมเกลือเข้มข้น 100 mM และชุดที่ 2 นำเมล็ดไปปลูกในสารละลายอาหารที่มีเกลือเข้มข้น 100 mM ตั้งแต่วันแรก เก็บผลเมื่อต้นข้าวทั้ง 2 ชุดมีอายุครบ 21 วัน พบว่าอัตราการงอกต่ำลงเมื่อความเข้มข้นของ EMS เพิ่มมากขึ้นและอัตราการรอดชีวิตเมื่ออายุ 21 วัน ลดลงเหลือ 4 - 10% เมื่อศึกษาแบบแผนโปรตีนในต้นอ่อนของข้าวทั้ง 2 ชุดการทดลอง พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงแบบแผนโปรตีนของข้าวที่ได้รับ EMS ความเข้มข้นและเวลาที่ต่างกัน และไม่มีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนระหว่าง 2 ชุดการทดลอง และในการศึกษารูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 40 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ S36 และ S38 ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยไพรเมอร์ S36 มีค่า polymorphism เท่ากับ 66.66% และไพรเมอร์ S38 มีค่า polymorphism เท่ากับ 60%

## ABSTRACT

The experiments were performed to study the effect of ethyl methanesulfonate (EMS) on rice KDML 105 response to salt stress. The rice seeds were pretreated with 0.5%, 0.7% and 0.8% EMS for 14, 16, 18 and 20 hrs. The mutagenized and wild-type seeds were divided into two experimental sets. In the first experimental set, seeds were grown in hydroponic solution for 7 days before adding 100 mM NaCl. In the second set, seeds were abruptly transferred to 100 mM NaCl added hydroponic solution. The results showed that the percentages of seed germination were declined significantly as EMS dose increased. In addition, the seedling survival rates were decreased to 4-10% related to EMS concentration. The protein pattern of 21 days seedling was changed in different EMS treatment but not significant between two experimental sets. Genetic variations were investigated by RAPD technique. Two of forty screened deca-nucleotide primers (S36 and S38) presented the polymorphism of DNA bandings. The percentages of polymorphism were 66.67% and 60% derived from primer S36 and S38 respectively.

**คำสำคัญ :** ethyl methanesulfonate ความเครียดเกลือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105

**Key Words :** EMS, salt-stress, KDML105

---

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

## บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และยังเป็นอาหารหลักของประชากรจำนวนหนึ่งในสามของโลก (Khush, 1997) ประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งออกข้าวเป็นอันดับหนึ่งของโลก โดยมีการส่งออกร้อยละ 0.37 ของผลผลิตข้าวรวมของประเทศ จากสถิติการส่งออกข้าวหอมมะลิในปี พ.ศ. 2533 มีปริมาณการส่งออก 0.702 ล้านตัน และเพิ่มขึ้นเป็น 1.457 ล้านตัน ในปี พ.ศ. 2539 (Slayton, 1997 อ้างถึงใน วันชัย, 2541) และในปี พ.ศ. 2550 ส่งออกทั้งสิ้น 2.43 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่า 37,020 ล้านบาท (ส่วนส่งเสริมการผลิตข้าว, 2550) แต่เนื่องจากปัญหาในการปลูกข้าวของเกษตรกรได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาดินเค็มเป็นอีกปัญหาหลักของการปลูกข้าวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทำให้การเพาะปลูกพืชได้ผลผลิตต่ำกว่าปกติ ทั้งนี้ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ดินเค็มประมาณหนึ่งในสามของพื้นที่ทั้งภาคคือ 17.8 ล้านไร่ และ พื้นที่มีศักยภาพในการแพร่เกลืออีก 19.4 ล้านไร่ พื้นที่ดินเค็มมักเกิดในที่ลุ่มมีน้ำท่วมในฤดูฝน ส่วนใหญ่จึงเป็นนาข้าว (พิชัย, 2540)

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการกลายพันธุ์ เป็นการปรับปรุงพันธุ์ที่ยังนิยมใช้อยู่ในปัจจุบันไม่ว่าจะเป็นการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีต่างๆ เช่น รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา และรังสีนิวตรอนหรือการใช้สารเคมี ได้แก่ ethyl methanesulfonate (EMS) ซึ่งมีคุณสมบัติก่อกลายพันธุ์ได้ดีในพืช และเป็นสารเคมีที่นิยมใช้มากที่สุด ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มของพวกแอลคิเลติง เอเจนท์ (alkylating agent) เช่น diethyl sulfate (DES) และ ethyl methanesulfonate (EMS) ซึ่ง EMS มีหมู่เอทิล (ethyl group) คือ $C_2H_5$ ซึ่งจะถูกถ่ายให้กับโมเลกุลของดีเอ็นเอในปฏิกิริยาแอลคิเลชัน (alkylation) ทำให้เกิดการขาดหายไปของเบสและการเปลี่ยนชนิดของเบส โดย EMS สามารถเข้าทำปฏิกิริยาแอลคิเลชันกับเบสพิวรีนและไพริมิดีน รวมทั้งหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอด้วย แต่ปฏิกิริยาแอลคิเลชันจะเกิดรุนแรงกับเบสกัวนีน (G) ภายหลังจากการเข้าทำปฏิกิริยาแล้วกลายเป็น $O^6$- ethylguanine ซึ่งจะเข้าคู่กับเบสไทมีน (T) แทนที่จะเป็นไซโตซีน (C) (Green et al., 2003) โดยส่วนใหญ่ EMS จะชักนำให้มีการเปลี่ยนแปลงของเบสไซโตซีนไปเป็นไทมีน ซึ่งเกิด substitution จาก C/G ไปเป็น T/A ในขณะที่ methyl methanesulfonate จะทำให้เกิด transversion จาก T/A ไปเป็น G/C และเกิด transition จาก A/T ไปเป็น G/C (Green, 2003; Krieg, 1963; Kovalchuk et al., 2000) ใน *Arabidopsis* ที่ถูกชักนำด้วย EMS พบว่าทำให้เกิด stop codon 5% และเกิด missense 65% และยังพบว่า EMS ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่กระจายตลอดทั้งจีโนมของ *Arabidopsis* (Green et al., 2003) จากการชักนำให้พืชกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีพบว่าไม่เพียงแต่เกิดการกลายพันธุ์โดยสูญเสียหน้าที่ (loss of function) หรือมีหน้าที่เพิ่มขึ้นเท่านั้น (gain of function) แต่ยังทำให้เข้าใจถึงบทบาทของกรดอะมิโนที่มีความจำเพาะในโปรตีนที่ทำหน้าที่ต่างๆ จากการศึกษาของ Wongsawad et al. (2005) ได้มีการใช้ EMS เพื่อชักนำกลายพันธุ์ในข้าวโดยมีการแช่เมล็ดข้าวใน EMS 0.9 % เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อนำไปปลูกพบว่าต้นข้าวมีสีเขียวเข้มและใบยาวขึ้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ด้วย EMS เพื่อให้เกิดการกลายโดยตอบสนองต่อความเครียดเกลือได้เพิ่มขึ้น และศึกษาการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมหลังจากได้รับ EMS ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ RAPD

## อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

*1. เมล็ดพันธุ์ การให้สาร EMS การปลูกข้าว และการให้เกลือโซเดียมคลอไรด์*

เมล็ดพันธุ์ข้าวที่ใช้ คือสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จากศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดขอนแก่น ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวด้วย ethanol 70 % เป็นเวลา 10 นาที นำเมล็ดข้าวแช่น้ำเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปแช่ในสารละลาย EMS ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5%, 0.7% และ 0.8% เป็นเวลา 14, 16, 18 และ 20 ชั่วโมง โดยใช้ 200 เมล็ดต่อการทดลอง จากนั้นนำไปปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตร Yoshida (1976) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารเป็นเวลา 7 วันแล้วจึงเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 100 mM จากนั้นปลูกต่อไปจนกระทั่งต้นข้าวอายุครบ 21 วัน ชุดที่ 2 ปลูกข้าวในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 mM ตั้งแต่วันแรกจนกระทั่งต้นข้าวอายุ 21 วัน เก็บตัวอย่างต้นอ่อนและนำไปเก็บที่ตู้แช่แข็ง-80 °C

*2. การศึกษาแบบแผนโปรตีนด้วยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*

นำต้นอ่อนของข้าวมาบดในไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นผงแป้ง แล้วละลายใน extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH8, 10 mM NaCl, 1% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM DTT) ปริมาตร 1000 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที เก็บเฉพาะสารละลายส่วนบนนำไปวัดปริมาณโปรตีน และเก็บส่วนที่เหลือไว้ที่ตู้แช่แข็ง -80 °C ศึกษาแบบแผนโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (12% separating gel และ 4% stacking gel) ตามวิธีการของ Laemmli (1970) โดยใช้โปรตีนตัวอย่างละ 5 µg ใส่ลงในช่องเจลของ SDS-PAGE พร้อมกับใส่ standard molecular weight marker (intron biotechnology) จากนั้นแยกโปรตีนด้วยเครื่อง electrophoresis (Hoefer) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 35 mA ย้อมโปรตีนด้วย coomassies blue R-250 0.125% ในเมทานอล 40% และกรดอะซิติก 10%

*3. การศึกษาแบบแผนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD*

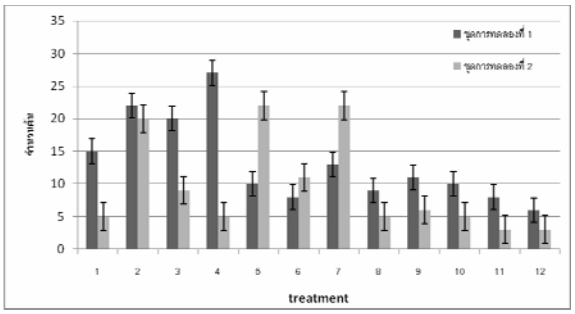
สกัดดีเอ็นเอจากต้นอ่อนของข้าว ด้วย extraction buffer (1M Tris, 0.5M EDTA, 10%SDS, 0.1% β-mercaptoethanol) ปริมาตร 700 µl แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 2 รอบ จากนั้นนำสารละลายส่วนบนมาเติม isopropanol alcohol ที่เย็นจัด ตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol 76% ที่มี ammonium acetate ความเข้มข้น 10 mM และละลายดีเอ็นเอใน TE buffer และเติม RNase A ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยใช้ Agarose gel 0.8% และหาปริมาณดีเอ็นเอโดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ศึกษาแบบแผนดีเอ็นเอด้วยวิธี RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 40 ไพรเมอร์ (S1 ถึง S40) ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 25 mM $MgCl_2$, 1x buffer, 200 µM dNTP, 4 µM primer, 50 ng/µl ของ genomic DNA และ 1.0 unit ของ *Taq* DNA polymerase ทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอโดยมี PCR profile คือ initial denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนการ denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที, annealing ที่ 37 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และขั้นตอน final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นนำผลผลิตของปฏิกิริยา PCR มาทำการตรวจสอบขนาดโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis

## ผลการวิจัย

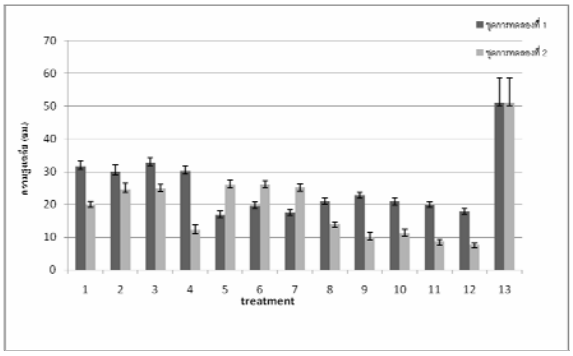
*ผลของEMS ต่อการงอกและอัตราการรอดชีวิต*

หลังจากนำเมล็ดข้าวที่ได้รับ EMS ในความเข้มข้นและเวลาที่แตกต่างกันไปปลูก ตรวจสอบลักษณะทาง

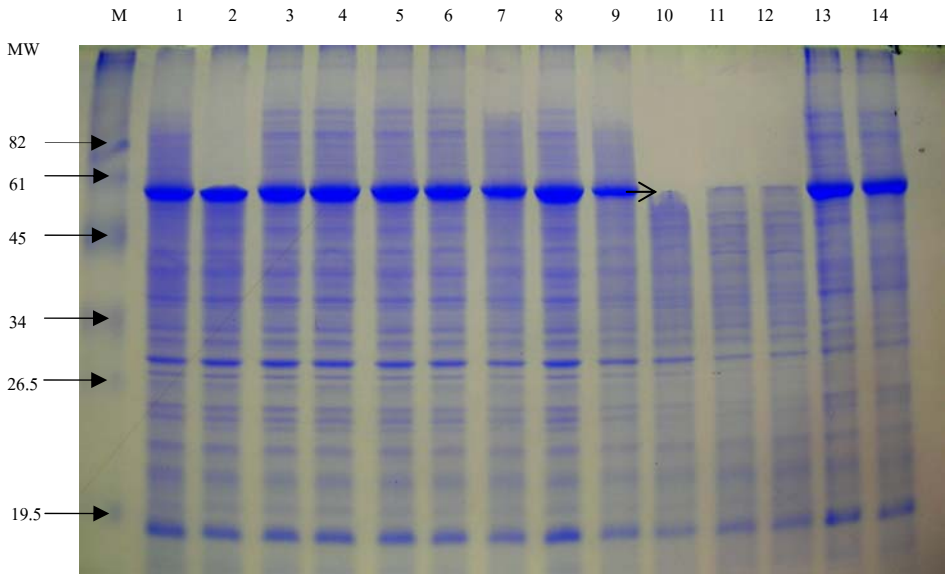
สัณฐานวิทยาและอัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าพบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของข้าวในชุดที่ 1 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารเป็นเวลา 7 วัน ต้นกล้าที่ได้รับ EMS มีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้ากว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับ EMS ลำต้นตั้งตรง ใบและสีของใบมีรูปร่างปกติ ที่ความเข้มข้นของ EMS 0.5% มีอัตราการรอดชีวิตสูง คือ 84.13% โดยที่ EMS 0.5% ระยะเวลาการแช่เมล็ด 14 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด คือ 89% การให้ EMS ที่เข้มข้นและเวลาที่ต่างกันมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 50% ยกเว้น EMS 0.7% เวลา 20 ชั่วโมง และ EMS 0.8% เวลา 20 ชั่วโมง ความสูงเฉลี่ยพบว่าที่ความเข้มข้นของ EMS 0.5% มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด รองลงมาคือ EMS 0.7% และ EMS 0.8% ตามลำดับ และเมื่อให้เกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 mM จนกระทั่งต้นข้าวมีอายุ 21 วัน พบว่าต้นข้าวใบม้วนงอ ปลายใบเหี่ยวและอัตราการรอดชีวิตลดลงไปอย่างมาก โดยที่ EMS 0.5% มีอัตราการรอดชีวิต 10.5% EMS 0.7% มีอัตราการรอดชีวิต 5% และ EMS 0.8% มีอัตราการรอดชีวิต 4.4% โดยการทดลองที่มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด 13.5% คือ EMS 0.5% ระยะเวลาการแช่เมล็ด 20 ชั่วโมง ส่วนความสูงเฉลี่ยที่อายุ 21 วันพบว่าที่ความเข้มข้นของ EMS 0.5% มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด คือ 31.25 ซม. ในชุดที่ 2 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 100 mM อายุของต้นข้าว 7 วัน ต้นข้าวมีลักษณะลำต้นเตี้ย ใบสั้นปลายใบม้วนงอเล็กน้อย และพบว่า EMS 0.5% มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า EMS 0.7% และ EMS 0.8% โดยที่ EMS 0.5% ระยะเวลาการแช่เมล็ด 14 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด คือ 71% ส่วน EMS 0.8% เวลา 20 ชั่วโมงมีอัตราการรอดชีวิตต่ำที่สุด ความสูงเฉลี่ยของต้นข้าวที่ความเข้มข้นของ EMS 0.5% เวลา 16 ชั่วโมง มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด คือ 13 ซม. ส่วน EMS 0.8% ระยะเวลาการแช่เมล็ด 20 ชั่วโมง มีความสูงเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 1 ซม. และเมื่อต้นข้าวมีอายุ 21 วัน พบว่าอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด 11% คือ EMS 0.7% เวลา 14 และ 18 ชั่วโมง ส่วนความสูงเฉลี่ยของต้นข้าวพบว่าที่ EMS 0.7% ระยะการแช่เมล็ด 14 ชั่วโมงมีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการงอกและความสูงเฉลี่ยในชุดที่ 1 และชุดที่ 2 พบว่าในแต่ละการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 1 และ 2)




**ภาพที่ 1** เปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของข้าวอายุ 21 วัน ชุดการทดลองที่ 1 = เติม 100 mM NaCl หลังจากต้นข้าวงอก 7 วัน ชุดการทดลองที่ 2 = เติม 100 mM NaCl ในวันแรกที่ปลูก (1, 2, 3, 4 = ได้รับ EMS 0.5% เป็นเวลา 14, 16, 18 และ 20 ชม. ตามลำดับ 5, 6, 7, 8 = ได้รับ EMS 0.7% เป็นเวลา 14, 16, 18 และ 20 ชม. ตามลำดับ 9, 10, 11, 12 = ได้รับ EMS 0.8% เป็นเวลา 14, 16, 18 และ 20 ชม. ตามลำดับ)




**ภาพที่ 2** เปรียบเทียบความสูงเฉลี่ยของข้าวอายุ 21 วัน ชุดการทดลองที่ 1 = เติม 100 mM NaCl หลังจากต้นข้าวงอก 7 วัน ชุดการทดลองที่ 2 = เติม 100 mM NaCl ในวันแรกที่ปลูก (1, 2, 3, 4 = ได้รับ EMS 0.5% เป็นเวลา 14, 16, 18 และ 20 ชม. ตามลำดับ 5, 6, 7, 8 = ได้รับ EMS 0.7% เป็นเวลา 14, 16, 18 และ 20 ชม. ตามลำดับ 9, 10, 11, 12 = ได้รับ EMS 0.8% เป็นเวลา 14, 16, 18 และ 20 ชม. ตามลำดับ 13 = ไม่ได้รับ EMS)



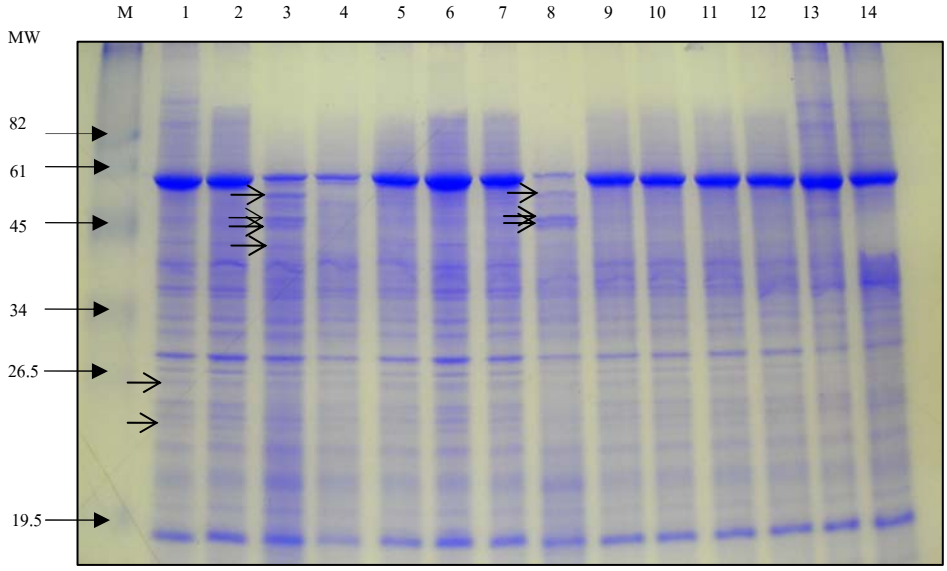

**ภาพที่ 3** แบบแผนโปรตีนของข้าวชุดการทดลองที่ 1 อายุ 21 วัน

1, 2, 3, 4 = ได้รับ EMS 0.5% เป็นเวลา 14, 16, 18 และ 20 ชม. ตามลำดับ

5, 6, 7, 8 = ได้รับ EMS 0.7% เป็นเวลา 14, 16, 18 และ 20 ชม. ตามลำดับ

9, 10, 11, 12 = ได้รับ EMS 0.8% เป็นเวลา 14, 16, 18 และ 20 ชม. ตามลำดับ

13 = ไม่ได้รับ EMS และ 14 = ข้าวที่ไม่ได้รับ EMS ที่ปลูกใน NaCl




**ภาพที่ 4** แบบแผนโปรตีนของข้าวชุดการทดลองที่ 2 อายุ 21 วัน

1, 2, 3, 4 = ได้รับ EMS 0.5% เป็นเวลา 14, 16, 18 และ 20 ชม. ตามลำดับ

5, 6, 7, 8 = ได้รับ EMS 0.7% เป็นเวลา 14, 16, 18 และ 20 ชม. ตามลำดับ

9, 10, 11, 12 = ได้รับ EMS 0.8% เป็นเวลา 14, 16, 18 และ 20 ชม. ตามลำดับ

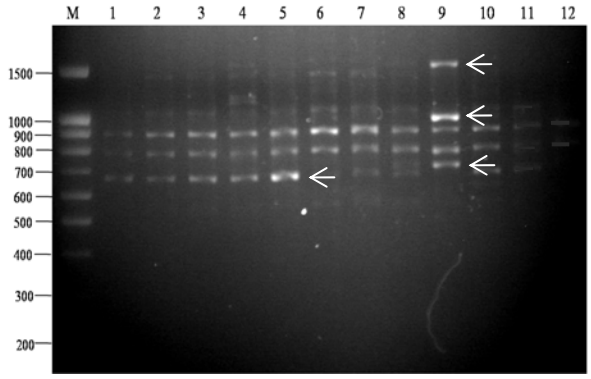
13 = ไม่ได้รับ EMS และ 14 = ข้าวที่ไม่ได้รับ EMS ที่ปลูกใน NaCl

*ผลของ EMS และการให้เกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อแบบแผนโปรตีน*

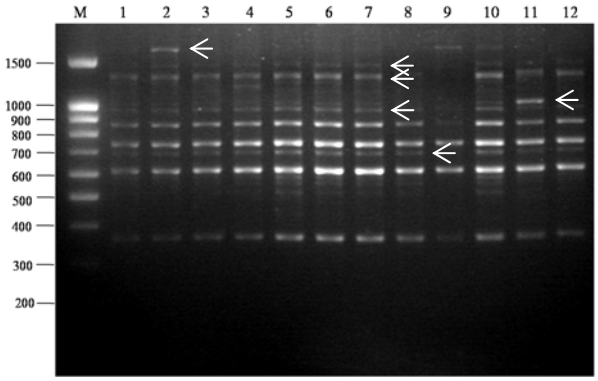
จากการศึกษาแบบแผนโปรตีนของ ข้าวชุดที่ 1 อายุ 7 วัน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงแบบแผนโปรตีนของต้นข้าวที่ของโปรตีนในช่วงประมาณ 39.2-51.5 KDa ส่วนในข้าวที่อายุ 21 วัน (ภาพที่ 3) พบว่าข้าวที่ได้รับ EMS 0.5% เวลา 16 ได้รับ EMS 0.8% เวลา 18 และ 20 ชั่วโมง มีการลดลงของโปรตีนขนาดประมาณ 57.07 KDa และมีการขาดหายไปชั่วโมง 0.8% เวลา 16, 18 และ 20 ชั่วโมง มีการหายไปของโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า 61 KDa และแบบแผนโปรตีนของข้าวชุดที่ 2 อายุ 7 วันพบว่าโปรตีนขนาด 57.07 KDa, 28.67 KDa และ 18.10 KDa มีแนวโน้มว่าจะมีปริมาณลดลงตามความเข้มข้นของ EMS ที่เพิ่มขึ้นและใน EMS 0.5% เวลา 18 ชั่วโมง พบโปรตีนขนาด 57.07 KDa มีปริมาณลดลง แต่โปรตีนขนาด 46.91 KDa มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวที่ไม่ได้รับ EMS (wildtype) และยังพบโปรตีนขนาด 42.83 KDa และขนาด 37.87 KDa ซึ่งไม่พบในการทดลองอื่น ส่วนแบบแผนโปรตีนของข้าวอายุ 21 วัน (ภาพที่ 4) พบโปรตีนขนาด 26.43 KDa และ 22.49 KDa ในทุกการทดลองยกเว้น wildtype และ EMS 0.7% เวลา 20 ชั่วโมง พบว่าโปรตีนขนาด 53.23 KDa และ 46.96 KDa มีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก wildtype และพบโปรตีนขนาด 46.17 KDa ที่ไม่ พบใน wildtype นอกจากนี้ยังพบโปรตีนขนาด 42.26 KDa ที่พบเฉพาะใน EMS 0.5% ระยะการแช่เมล็ด 18 ชั่วโมง เท่านั้น

*ผลของ EMS และการให้เกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อแบบแผนดีเอ็นเอ*

จากการศึกษาแบบแผนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ในแต่ละความเข้มข้นของ EMS ทั้งชุดที่ 1 และชุดที่ 2 โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 40 ไพรเมอร์ พบว่ามีเพียง 2 ไพรเมอร์ คือ S36 และ S38 เท่านั้นที่มีแถบของดีเอ็นเอแตกต่างกันและแตกต่างจาก wildtype เมื่อนำทั้ง 2 ไพรเมอร์มาทดสอบกับข้าวในชุดการทดลองที่ 2 อายุ 21 วัน พบว่า ไพรเมอร์




**ภาพที่ 5** แบบแผน RAPD ของข้าวชุดการทดลองที่ 2 อายุ 21 วัน เมื่อใช้ไพรเมอร์ S36 (1, 2, 3, 4 = ได้รับ EMS 0.5% เป็นเวลา 14, 16, 18 และ 20 ชม. ตามลำดับ 5, 6, 7, 8 = ได้รับ EMS 0.7% เป็นเวลา 14, 16, 18 และ 20 ชม. ตามลำดับ 9, 10, 11 = ได้รับ EMS 0.8% เป็นเวลา 14, 16 และ 20 ชม. ตามลำดับ 12 = ไม่ได้รับ EMS)




**ภาพที่ 6** แบบแผน RAPD ของข้าวชุดการทดลองที่ 2 อายุ 21 วัน เมื่อใช้ไพรเมอร์ S38 (1, 2, 3, 4 = ได้รับ EMS 0.5% เป็นเวลา 14, 16, 18 และ 20 ชม. ตามลำดับ 5, 6, 7, 8 = ได้รับ EMS 0.7% เป็นเวลา 14, 16, 18 และ 20 ชม. ตามลำดับ 9, 10, 11 = ได้รับ EMS 0.8% เป็นเวลา 14, 16 และ 20 ชม. ตามลำดับ 12 = ไม่ได้รับ EMS)

S36 (AGCCAGCGAA) (ภาพที่ 5) พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 6 แถบ เป็น monomorphic band 2 แถบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 795 และ 907 bp เป็น polymorphic band 4 แถบ มีขนาดประมาณ 672, 738, 1035 และ 1582 bp โดยมีค่าหลากสภาวะรูปแบบ (polymorphism) เท่ากับ 66.67% ตัวอย่างที่ให้ EMS ความเข้มข้น 0.8% เวลา 14 ชั่วโมง มีความแตกต่างทาง

พันธุกรรมมากที่สุดโดยพบแถบดีเอ็นเอขนาด 738, 1035 และ 1582 bp ซึ่งไม่พบในการทดลองอื่นรวมทั้ง wildtype ส่วนไพรเมอร์ S38 (AGGTGACCGT) (ภาพที่ 6) พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 10 แถบ เป็น monomorphic band 4 แถบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 365, 620, 737 และ 869 bp เป็น polymorphic band 6 แถบ มีขนาดประมาณ 691, 991, 1053, 1345, 1500 และ 1679 bp มีค่า polymorphism เท่ากับ 60% ตัวอย่างที่ให้ EMS ความเข้มข้น 0.8% เวลา 14 ชั่วโมงมีความแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นมากที่สุด โดยยังพบดีเอ็นเอขนาด 1679 bp เฉพาะใน EMS 0.8% เวลา 14 ชั่วโมง และ EMS 0.5% เวลา 16 ชั่วโมง

## สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

EMS ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นมีผลทำให้อัตราการงอกต่ำลง รวมถึงการเจริญเติบโตของต้นกล้าต่ำลงด้วย โดยปลายใบจะเริ่มเหี่ยวและตายลง จากการเพิ่มการกลายพันธุ์ใน *Petunia x hybrida* Vilm. ที่ความเข้มข้นของ EMS ต่ำจนถึงปานกลาง (0.05-0.15%) จะเพิ่มอัตราการงอกเพียงเล็กน้อย และที่ EMS ความเข้มข้นสูงสุด (0.25%) อัตราการรอดชีวิตจะลดลงเหลือ 28.5% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Berenschot et al, 2008) Wongsawad (2005) ได้ทำการเพิ่มการกลายพันธุ์ของข้าว โดยใช้ EMS แช่เมล็ดข้าวก่อนนำไปปลูก พบว่า EMS 0.9% นาน 18 ชั่วโมง สามารถชักนำการกลายพันธุ์ของข้าวได้ โดยได้ต้นข้าวที่มีสีเขียวเข้ม และใบยาว หลังจากปลูกในนาข้าว แต่เนื่องจากการทดลองนี้ได้ทำการปลูกข้าวเพียง 21 วัน การเจริญเติบโตของข้าวจึงยังไม่ชัดเจนนัก

จากการศึกษาแบบแผนโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในระดับโปรตีนของข้าวที่ต่างการทดลอง และไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนระหว่างข้าวต่างชุดการทดลอง โดยพบว่าข้าวที่ได้รับการแช่เมล็ดใน EMS ความเข้มข้นต่ำจะยังคงรักษาโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลใหญ่ไว้ได้ แต่ในระดับความเข้มข้นของ EMS สูงจะมีการหายไปของโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ซึ่งอาจเกิดจากการที่โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่สลายเป็นโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของเอ็นไซม์โปรติเอส (protease) ที่มีกิจกรรมเพิ่มมากขึ้นเมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียด และเนื่องจากพืชต้องการเพิ่มการกระจายตัว ของสารภายในเซลล์เพื่อลดค่าศักย์ออสโมซิส และการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโมเลกุลเพื่อนำไปใช้ในส่วนอื่นที่สำคัญมากกว่าในขณะที่อยู่ในสภาวะเครียด (Echevarria et al., 1995)

ผลจากการศึกษาแบบแผนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 40 ไพรเมอร์ มีเพียง 2 ไพรเมอร์เท่านั้นที่ให้ผลแตกต่างเมื่อทดสอบกับตัวอย่างจำนวน 12 ตัวอย่าง โดยไพรเมอร์ S36 สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นได้ 6 แถบ พบว่าเป็นแถบ polymorphic 4 แถบ คิดเป็น 66.66% และมีค่า heterozygosity เท่ากับ 0.7144 ส่วนไพรเมอร์ S38 สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นได้ 10 แถบ พบว่าเป็น polymorphic 6 แถบ คิดเป็น 60% และมีค่า heterozygosity เท่ากับ 0.8911 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD ให้ผลไม่แตกต่างกันในข้าวที่ได้รับ EMS และข้าวปกตินั้น เป็นผลมาจากการที่ EMS ทำให้เกิดการกลายแบบการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบส ดังนั้น ดีเอ็นเอจึงยังคงมีความยาวเท่าเดิม

ในการใช้รังสีหรือสารเคมีชักนำให้พืชกลายพันธุ์สามารถเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้ง่าย ทำให้ได้จีโนไทป์ใหม่ๆ ออกมา และนำไปใช้เป็นพันธุ์ใหม่ได้โดยตรง ระยะเวลาในการสร้างพันธุ์ใหม่ค่อนข้างสั้นจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ปรับปรุงและผลิตพันธุ์พืชที่มีลักษณะตามต้องการ เช่น มีความทนทานต่อความเค็ม

## ข้อเสนอแนะ

1. ควรปลูกให้ถึงระยะเก็บเกี่ยวเพื่อคัดเลือกเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่กลายพันธุ์และสามารถทนต่อความเครียดเกลือ

2. ควรศึกษาถึงระดับของลำดับยีนหรือโปรตีน เพื่อให้เข้าใจถึงบทบาทหน้าที่ของยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงไปต่อความสามารถในการทนต่อความเครียดเกลือ

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์

## เอกสารอ้างอิง

พิชัย วิชัยดิษฐ์. 2540. การอ่านและการใช้แผนที่ดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. เอกสารคู่มือเจ้าหน้าที่ของรัฐเรื่องดินเค็ม กรมพัฒนาที่ดิน 1: 174 -176.

วันชัย หิรัญยูปกรณ์. 2541. ข้าว. วารสารข่าวศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี 10(4): 3-6.

ส่วนส่งเสริมการผลิตข้าว สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร. 2550. สถิติข้อมูลการผลิตข้าว แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/statistic/export. 13 ธันวาคม 2550.

Berenschot, S.A., Zucchi, I.M., Tulmann-Neto, A. and Quecini, V. 2008. Mutagenesis in *Petunia x hybrida* Vilm. and isolation of a novel morphological mutant. Brazilian Journal Plant Physiology. 20(2): 95-103.

Echevarria, I., Reynaldo, I. and Mainardi, S. 1995. Some aspects of nitrogen metabolism in rice seeds germinating at two NaCl concentrations. Cultivos Tropicales 16(1) : 43-45.

Green, E.A., Codomo, C.A., and Taylor, N.E. 2003. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reversr-genetic screen in *Arabidposis*. Genetics 164: 731-740.

Krieg, D.R. 1963. ethyl methanesulfonate-induced reversion of bacteriophage T4*r*II mutants. Genetics 48: 561-580.

Khush, G.S. 1997. Conservation of rice genetic resources: the role of the International Rice Genebank at IRRI. Plant Molecular Biology 35: 25-34.

Kovalchuk, I., Kovalchuk, O. and Hohn, B. 2000. Genome-wide variation of the somatic mutation frequency in transgenic plants. EMBO Journal 19: 4431-4438.

Laemmli. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 229: 239-251.

Wongsawad, P., Wongsawad, C., Mahadtanapuk, S., Kantawong, S., Chariyavidhawat, P. and Paratasilpin, T. 2005. Mutation in rice using Ethyl Methanesulphonate. 31st congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology 18-20 October.

Yoshida, S. 1976. Routine procedures for growing rice plants in culture solution. In: Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA (eds) Laboratory manual for physiological studies of rice. International Rice Research Institute Manila, Philippines, pp 61–66.