รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. **ชุดโครงการวิจัย** : แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. **โครงการวิจัย** : เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อวิจัยพัฒนาพืชและจุลินทรีย์ในสภาวะโลกร้อน

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การถ่ายยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนที่ทนต่อสภาวะเครียดในพืชต้นแบบ

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Transformation and Expression of Gene for Abiotic Stress Tolerances in Model Plants

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางสาวอรุโณทัย ซาววา	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวสุภาวดี ง้อเหรียญ	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายพยุงศักดิ์ รวยอารี	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. **บทคัดย่อ** :

ยีน *SINA3* เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม E3 ubiquitin ligase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดของพืช โดยการควบคุมการเปลี่ยนแปลงกระบวนการถอดรหัส (responsive transcription factors) ที่จำเป็นสำหรับการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะเครียดและการควบคุมกิจกรรมของโปรตีนต่างๆ สำหรับนำไปใช้ภายในเซลล์พืช งานวิจัยนี้ได้ได้นำเอายีน *SINA3* มาศึกษาการแสดงออกของยีน โดยการถ่ายยีนเข้าพืชต้นแบบยาสูบ เพื่อศึกษาผลของการถ่ายยีนและตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทนต่อสภาวะเครียดในยาสูบ โดยนำยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *SINA3* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ สภาวะขาดน้ำโดยเติม Polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) ลงในอาหารที่ความเข้มข้น 0, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และสภาวะเครียดเกลือเกิดจากการเติม sodium chloride (NaCl) ลงในอาหาร ความเข้มข้น 0, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยเพาะเลี้ยงยาสูบปกติบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 และ NaCl

ระดับความเข้มข้นเดียวกันเป็นชุดควบคุม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน พบว่าต้นยาสูบที่มียีน SINA3 ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับต้นยาสูบชุดควบคุม ทั้งน้ำหนักสด ความสูงของต้น และจำนวนใบ แสดงว่ายีน SINA3 ที่ถ่ายฝากเข้าสู่ยาสูบ แบบ over expression นั้น ไม่สามารถทนทานต่อสภาวะเครียดเกลือและสภาวะขาดน้ำได้

คำสำคัญ : ยีน *SINA3*, สภาวะเครียดเกลือ, สภาวะขาดน้ำ

Abstract

SINA3 genes is an E3 ubiquitin ligase enzyme that plays a critical role in regulating plant responses to abiotic stresses such as drought, temperature fluctuations, high salinity, radiation and nutrient deprivation adversely affect growth, development and productivity. In this study, the SINA3 gene was constructed into a plant expression vector and transformed into *Nicotiana tabacum*. Transgenic tobaccos were grown in MS medium. Drought was induced by adding Polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) to the culture medium at concentrations of 0, 10, 15, 20 and 25 % (w/v), while salinity was induced by adding sodium chloride (NaCl) to the medium at concentrations of 0, 1, 1.5, 2, 2.5 and 3 % (w/v). The plant growth parameters were analyzed after 30 days in culture. Differentiation fresh weight, number of leaves and shoot length of the transgenic plants were similar to those of wild-type plants. The result showed that overexpression of *SINA3* gene do not tolerant to salt and drought stresses in transgenic tobacco.

Key word: *SINA3* genes, salt stresses, drought stresses

6. คำนำ :

สภาวะโลกร้อนหรือโกลบบอลวอร์มมิ่ง (Global warming) ได้ทำให้เกิดความผกผันของอากาศทั่วโลก ส่งผลกระทบต่างๆ นานา ด้านผลกระทบที่มีต่อการเจริญเติบโตของพืชมีสองส่วนหลัก คือ ผลกระทบโดยตรงจากการที่อุณหภูมิมีแนวโน้มสูงขึ้น ซึ่งสามารถวัดผลกระทบในเชิงวิทยาศาสตร์ได้ค่อนข้างชัดเจน นักวิชาการด้านพืชได้ให้ความเห็นว่าแม้ว่าอุณหภูมิเฉลี่ยทั้งปีจะไม่ได้สูง ขึ้นมาก แต่สำหรับพืชนั้นความผันผวนของอุณหภูมิเพียงไม่กี่นาที ที่เกิดขึ้นในช่วงใดช่วงหนึ่งของการเจริญเติบโตจะทำให้ผลผลิตลดลงได้ ความเสียหายในภาคการเกษตรที่เกิดจากอุณหภูมิผันผวนนั้น ไม่ได้เกิดจากสภาพอากาศที่ร้อนขึ้นเท่านั้น แต่อุณหภูมิกลางคืนที่เย็นมากขึ้นก็จะสร้างความเสียหายได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น ข้าวมีโอกาสเป็นหมันสูงถ้าอากาศหนาวเย็น ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลกระทบดังกล่าวส่งผลให้พืชเกิดสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่เราเรียกว่าสภาวะแวดล้อมอชีวนะ (abiotic stress) ยกตัวอย่างเช่นการ ขาดน้ำของพืช ดินเค็ม เป็นต้น

ปัจจัยสภาวะแวดล้อมอชีวนะ (abiotic stress) เป็นปัจจัยที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชและผลผลิตของพืชอย่างมาก เพื่อความอยู่รอดของพืชเองหรือเพื่อตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมนี้ พืชต้องอาศัยกลไกและกลยุทธ์การปรับตัวที่ซับซ้อน เช่น การเจริญเติบโตหรือพัฒนาการของเซลล์ สัณฐานวิทยา สรีรวิทยา หรือชีวเคมี ลักษณะความทนทานดังกล่าว เกี่ยวข้องกับกลไกการปรับตัวที่หลากหลาย เช่น การปรับสภาพแรงดันออสโมติกหรือวิถีการสังเคราะห์หรือสลายแรงดันออสโมติก วิถีเอสโอเอส (SOS) หรือวิถีโปรตีนไคเนสที่พึ่งพาแคลเซียมหรือซีดีพีเค (CDPK) เป็นต้น (Tarczynsk et al., 1993; Sanchez-Barrena et al., 2005) อีกทั้ง การศึกษาพบการทำงานของยีนเพื่อตอบสนองหรือถูกควบคุมขณะเติบโตในสภาพแวดล้อมอชีวนะ และชีวนะ (biotic stress) มีความเชื่อมโยงที่สัมพันธ์หรือเกี่ยวข้องกัน (Kunkel et al., 2002) เช่น กลุ่มยีนประเภททรานส์คริปชันนัล แฟกเตอร์ พลาสมาเมมเบรนโปรตีน และกลุ่มยีนอื่นๆ เป็นต้น

SINA และ *SINAT* เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม E3 ubiquitin ligases เป็นโปรตีน Ubiquitination ที่มีกลไกสำคัญในการควบคุมหน้าที่ของเซลล์ เช่น การเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ วัฏจักรเซลล์ การตอบสนองต่อความเครียด และ การตายของเซลล์ โปรตีน SINA จะมีส่วนด้าน N-terminal RING (Really Interesting New Gene) ที่สามารถไปจับกับส่วน C-terminal ของโปรตีนเป้าหมาย โดยส่วน RING ของ E3 จะทำปฏิสัมพันธ์กันกับโปรตีน E2 ubiquitin-conjugation เพื่อส่งถ่าย ubiquitin ไปยังโปรตีนที่ต้องการ โดย E3 จะจดจำและเชื่อมต่อเข้าหาโปรตีนเป้าหมายที่ทำหน้าที่เฉพาะอย่างแม่นยำ เป็นการควบคุมการแสดงออกของโปรตีนภายหลังการแปลรหัส (Post-translational protein regulation)(Peralta et al., 2013) โปรตีน SINA หรือ E3 ubiquitin ligases มีการศึกษาในสัตว์และมนุษย์มาก่อน แล้วค่อยศึกษาในพืชโดยเริ่มต้นเปรียบเทียบโปรตีนดังกล่าวกับพืช พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมาก เมื่อศึกษายีนดังกล่าวในต้นอะราบิดอบซิส พบว่า ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนแบบยับยั้งการสร้างโปรตีน SINA หรือ E3 ubiquitin ligases โดยวิธีการกลายพันธุ์ มีความต้านทานต่อเชื้อ *Pseudomonas syringae* ลดลง แต่ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนแบบ over expression จะมีความต้านทานต่อเชื้อ *Pseudomonas syringae* เพิ่มขึ้น (Kim et al. ,2006) นอกจากนี้มีการทดลองเกี่ยวกับการสร้างปมของต้นอะราบิดอบซิสภายหลังจากการฝากถ่ายเชื้อไรโซเบียม โดยเปรียบเทียบต้นปกติ กับต้นที่ได้รับการถ่ายฝากยีน 35s: SINAT5DN พบว่า ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีการสร้างปมมากกว่า ลำต้นยาวกว่า ขนาดใบใหญ่กว่า และมีจำนวนรากที่มากกว่าต้นปกติ (Den Herder et al., 2008)

จากปัญหาการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภูมิอากาศต่างๆ ที่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช ทำให้นักวิจัยเริ่มตระหนักถึงปัญหาดังกล่าว จึงเริ่มศึกษาค้นหาลักษณะทางพันธุกรรมของพืช ที่สามารถทนต่อสภาวะการเปลี่ยนแปลงทางด้านปัจจัยสภาวะแวดล้อมอชีวนะ ซึ่งข่าววงการวิจัยพืช ได้รายงานในวารสารวิชาการ Science ว่าค้นพบยีนที่ช่วยให้พืชทนต่อสภาพแวดล้อมที่เลวร้าย รวมทั้งความแห้งแล้งและความร้อน Peter McCourt หนึ่งในคณะวิจัยซึ่งเป็นศาสตราจารย์ทางด้านเซลล์และชีววิทยาเชิงระบบ กล่าวว่า "พืชมีระบบฮอร์โมนที่ช่วยให้มันปรับตัวกับความเครียดต่างๆ ได้ หากเราสามารถควบคุมฮอร์โมนเหล่านี้ ก็จะทำให้เราสามารถปกป้องพืชผลทางการเกษตรต่างๆ จากภาวะโลกร้อนได้"

การค้นพบครั้งนี้จึงมีความสำคัญต่ออนาคตในการพัฒนาพืชที่มีความทนทานต่อภาวะ โลกร้อนได้ อันที่จริง สิ่งที่นักวิจัยค้นพบในรายงานนี้ ก็เป็นเพียงกุญแจดอกหนึ่งในการไขปริศนาว่าพืชปรับตัวอย่างไรต่อสภาพแวดล้อม ที่รุนแรง กลไกในการปรับตัวของพืชนั้นมีความซับซ้อนมากและยังต้องการการวิจัยขั้นพื้นฐาน (Basic Research) อีกสักระยะเวลาหนึ่ง จนกว่าเราจะสามารถพัฒนาพืชเกษตรทนร้อนได้ (Park *et. Al.,* 2009) จะเห็นได้ว่าฮอร์โมนที่สร้างจากพืชนั้นเป็นสิ่งหนึ่งที่พืชสร้างขึ้นมาจากรหัสพันธุกรรมที่อยู่บนโครโมโซมของมันอยู่แล้ว จึงเป็นแรงกระตุ้นให้นักวิทยาศาสตร์พยายามค้นหายีนที่จะช่วยให้พืชทนต่อภาวะเครียดต่างๆ ที่เกิดขึ้นในปัจจุบัน เพื่อให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ดีในสภาพอากาศเปลี่ยนแปลงในปัจจุบันได้ ดังนั้น การทดลองนี้ได้นำเอายีน *SINA3* ที่ค้นหามาจากการทดลอง การโคลนยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง มาศึกษาการแสดงออกของยีน โดยการถ่ายยีนเข้าพืชต้นแบบยาสูบ เพื่อศึกษาผลของการถ่ายยีนและตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทนต่อสภาวะเครียดในพืชต้นแบบ

7. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

1. ชุดยีน *SINA3* จากงานวิจัยก่อนหน้า
2. ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์และตรวจวิเคราะห์ยีน *SINA3* ได้แก่ SINA3 (forward) และSINA3 (reverse)
3. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker
4. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit) ของ Fermentas
5. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems)
6. อุปกรณ์การอ่านภาพ และบันทึกผล ได้แก่ Gel documentation พร้อมเครื่องพิมพ์
7. เชื้อแบคทีเรีย *Agrobecterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105
8. เครื่อง Spectrophotometer สำหรับใช้วัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.)
9. เมล็ดยาสูบ (*Nicotiana tabacum*)
10. ไมโครปิเปตขนาด P1,000 P200 P100 และ P2 ไมโครลิตร

- วิธีการ

1. **การเคลื่อนย้ายชุดยีน *SINA3* เข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ด้วยวิธี electroporation**

1.1 การเตรียม competent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens*

เลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ในอาหารเหลว 2YT ที่ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว 2YT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่า นาน 2-3 ชั่วโมง จนได้ค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.2-0.3 แช่เชื้อไว้บนน้ำแข็งนาน 15-30 นาที จากนั้นตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 3500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% glycerol ทีแช่เย็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็งต่อเป็นเวลา 10 นาที นำไปตกตะกอนและละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% glycerol ทีแช่เย็นปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปตกตะกอนและละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% glycerol ทีแช่เย็นปริมาตร 2 มิลลิลิตร แบ่ง competent cell ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บเซลล์ที่ได้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

1.2 การเคลื่อนย้ายชุดยีน *SINA3* เข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens*

นำ competent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens* จาก -80 องศาเซลเซียส มาละลายในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำพลาสมิดทีมียีน *SINA3* ปริมาตร 2 ไมโครลิตร มาใส่ลงในหลอด competent cell ผสมให้เข้ากันเบาๆ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนผสมมาใส่ลงใน cuvette แช่เย็นในน้ำแข็ง นาน 30 นาที เคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี electroporation (BTX ECM600) ตามสภาวะดังนี้

Cuvette Gap	0.2	cm
Voltage	1.4	kV
Capacitor	25.0	μF
Resistor	360.0	Ω
Time Constant	8-9	msec

หลังจาก pulse แล้ว เติมอาหารเหลว 2YT ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทันที แล้วย้ายส่วนผสมลงในหลอดเลี้ยงเชื้อเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่า นาน 1 ชั่วโมง ตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เทอาหารเหลวทิ้ง แล้วเติมอาหารเหลวใหม่ลงไป 100 ไมโครลิตร แบ่งมา 50 ไมโครลิตร เพื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง 2YT ที่เติมกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน นำโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรวจสอบยีน *SINA3* ด้วยเทคนิค PCR

1.3 การตรวจสอบโคลนที่มี ยีน *SINA3* จากเซลล์ *A. tumefaciens* ด้วยเทคนิค PCR

ตรวจสอบโคโลนีของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก โดยใช้ไพรเมอร์ SINA3 (forward) **5'-**ATGGAGCTGGACAGCATCGAGTGCATGTCCTAC-**3'** และ SINA3 (reverse) **5'-** TCAGCTGAA CAAATTGGGAATGCAGGCTCCTG-**3'** โดยเตรียมปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ดังต่อไปนี้

dH2O	32.1	ไมโครลิตร
5X buffer	10.0	ไมโครลิตร

1 mM dNTPs	4.0	ไมโครลิตร
10 μM forward primer	1.0	ไมโครลิตร
10 μM reward primer	1.0	ไมโครลิตร
DMSO	1.5	ไมโครลิตร
Phusion DNA Polymerase	0.4	ไมโครลิตร

ใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ มาจุ่มลงในปฏิกิริยา PCR โดยใช้เครื่อง GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยกำหนดรอบการทำปฏิกิริยาดังนี้

เริ่มต้นปฏิกิริยาที่ :

98 °C	30	วินาที

ตามด้วยโปรแกรมดังต่อไปนี้ จำนวน 35 รอบ

98 °C	30	วินาที
55 °C	30	วินาที
72 °C	60	วินาที

ปิดท้ายปฏิกิริยาที่ :

72 °C	7	นาที
4 °C	α	

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้ว นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาตรวจวิเคราะห์ด้วย 0.8 % agarose gel

2. การถ่ายยีนในยาสูบ

2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อยาสูบสำหรับการถ่ายยีน

ฟอกเมล็ดยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) โดยใช้คลอร็อกซ์ความเข้มข้น 10% ผสม 0.5% Tween-20 2-3 หยด นำไปเขย่าเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ใน คลอร็อกซ์ 5% ผสม 0.5% Tween-20 ประมาณ 2-3 หยดเขย่าเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาแล้วล้างคลอร็อกซ์ออก ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดยาสูบไปเพาะในอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ขวดละ 15-20 เมล็ด เมื่อเมล็ดเริ่มงอกจนมีใบชนกัน จะทำการย้ายขวดโดยเลี้ยงเป็นต้นเดี่ยวๆ ในอาหารสูตรเดิม หลังจากเพาะเลี้ยงอยู่นานประมาณ 3-4 สัปดาห์ ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส จะได้ต้นยาสูบที่สมบูรณ์ มีความสูงประมาณ 2-3 เซนติเมตร พร้อมที่จะนำใบมาใช้สำหรับการถ่ายยีน

2.2 การเตรียมเชื้อ *A. tumefaciens*

เลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* ที่มียีนเป้าหมายบนอาหารแข็ง 2YT ที่เติมกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน ย้ายโคโลยีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2YT ที่เติมกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28

องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง นำมาวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 1.6-2.0 จากนั้นนำเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เท อาหารเหลวทิ้ง เติมอาหารเหลว MS ลงไปปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าจนเซลล์ทั้งหมดแขวนลอยอยู่ในอาหาร เจือจางเซลล์แบคทีเรียในอัตรา 1 ต่อ 1 ด้วยอาหารเหลว MS 5 มิลลิลิตร ที่มีสาร acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์

2.3 การถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อยาสูบด้วยวิธี Leaf disc

ตัดชิ้นส่วนของใบให้ติดเส้นกลางใบขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร นำมาผสมกับสารแขวนลอยเชื้อจากข้อ 2.2 นาน 10 นาที ซับเนื้อเยื่อบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ แล้วย้ายเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง บนอาหารสูตร MS ที่เติมกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 1 เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์ ย้ายเนื้อเยื่อที่สามารถเจริญได ในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะคัดเลือก มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารสูตรเดิมที่ไม่มีสารปฏิชีวนะคัดเลือก เพาะเลี้ยงให้พัฒนาเป็นต้นโดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ นำต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมาตรวจสอบยีนด้วยวิธี PCR

2.4 การคัดเลือกและการตรวจสอบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน

ใช้ไพรเมอร์ SINA3 (forward) และ SINA3 (reverse) ในการตรวจสอบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน โดยบดใบยาสูบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มิลลิเมตร ในปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ดังต่อไปนี้

dH2O	7.0	ไมโครลิตร
2x PCR master mix	10.0	ไมโครลิตร
10 μM forward primer	1.0	ไมโครลิตร
10 μM reward primer	1.0	ไมโครลิตร

ใช้เครื่อง GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยกำหนดรอบการทำปฏิกิริยาดังนี้

เริ่มต้นปฏิกิริยาที่ :

98 °C	5	นาที

ตามด้วยโปรแกรมดังต่อไปนี้ จำนวน 35 รอบ

98 °C	5	วินาที
55 °C	5	วินาที
72 °C	20	วินาที

ปิดท้ายปฏิกิริยาที่ :

72 °C	7	นาที
4 °C	α	

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้ว นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาตรวจวิเคราะห์ด้วย 0.8 % agarose gel

2.5 การเพิ่มปริมาณต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน

ตัดลำต้นของยาสูบให้มีส่วนตาข้าง ขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร ย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS หลังจากนั้นนำขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อวางบนชั้นในห้องเพาะเลี้ยง ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

3. **ทดสอบระดับการทนสภาวะเครียดของต้นยาสูบบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl และ Polyethylene glycol (PEG) 6000**

ทดสอบระดับการทนสภาวะเครียดของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *SINA3* วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Random Design; CRD) โดยนำต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *SINA3* อายุประมาณ 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ความเข้มข้น 0, 1.0, 1.5, 2.0 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG 6000 ที่ความเข้มข้น 0, 10.0, 15.0, 20.0 และ 25.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ระดับความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ โดยเพาะเลี้ยงยาสูบปกติบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl และ PEG6000 ระดับความเข้มข้นเดียวกัน เป็นชุดควบคุม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน บันทึกผลการทดลอง

- เวลาและสถานที่

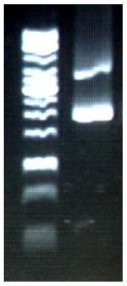
ระยะเวลาทำการทดลอง	ตุลาคม 2557 - กันยายน 2558 (1 ปี)
สถานที่ทำการทดลอง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

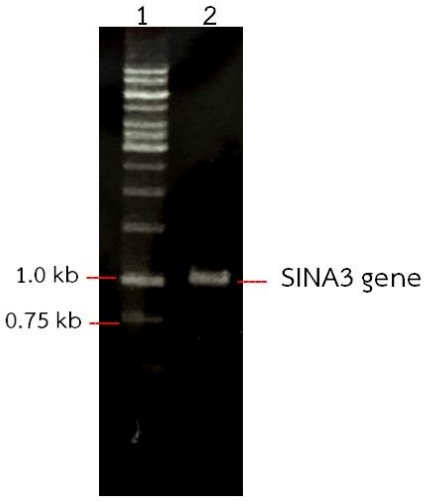
1. **การเคลื่อนย้ายชุดยีน *SINA3* เข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ด้วยวิธี electroporation**

นำพลาสมิดสายผสมที่มียีน *SINA3* (ภาพที่ 1) ถ่ายเข้าสู่ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ด้วย วิธี electroporation คัดเลือกเซลล์ *A. tumefaciens* ที่ได้รับพลาสมิดสายผสมที่มียีน *SINA3* บนอาหารสูตร 2YT ที่ผสมกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สุ่มโคลนมาตรวจสอบยีนด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SINAT3 (forward) และ SINAT3 (reverse) ได้ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *SINA3* ขนาด 1.0 กิโลเบส (ภาพที่ 2) ซึ่งมีขนาดของยีนถูกต้องตรงตามที่รายงานไว้ คือยีน *SINA3* มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ 1.026 กิโลเบส

1 2



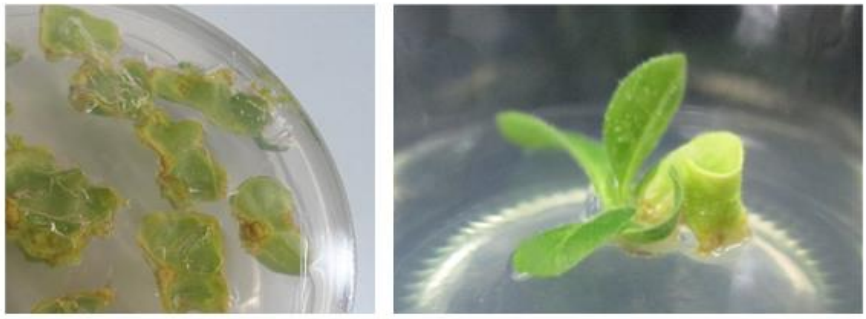
ภาพที่ 1 เจลอิเล็คโตรโฟริซิสแสดงแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดสายผสมที่มียีน *SINA3* (lane 2) เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ;Fermentas (lane 1)



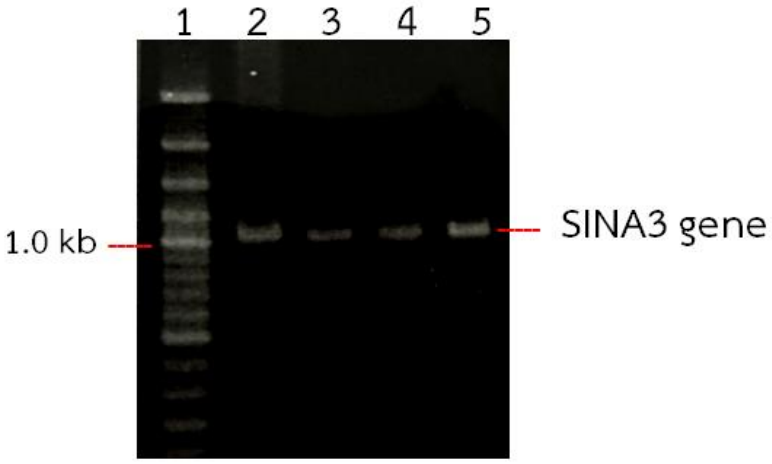
ภาพที่ 2 เจลอิเล็คโตรโฟริซิสแสดงแถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ของยีน *SINA3* จากเซลล์ *A. tumefaciens* ที่ได้รับพลาสมิดสายผสม (lane 2) เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder; Fermentas (lane 1)

2. **การถ่ายยีน *SINA3* เข้าสู่เนื้อเยื่อยาสูบด้วยวิธี Leaf disc**

หลังจากเลี้ยง *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิดสายผสม จนมีค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 2 นำไปถ่ายเข้าสู่ยาสูบใบกลางและคัดเลือกเนื้อเยื่อยาสูบบนอาหารสูตร MS ที่เติมกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เวลาคัดเลือกนาน 15 วัน เนื้อเยื่อยาสูบเริ่มพัฒนาเป็นแคลลัส เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกต่ออีกเป็นเวลา 45 วัน เนื้อเยื่อยาสูบจึงพัฒนาเป็นต้น (ภาพที่ 3) จึงนำมาตรวจสอบยีน *SINA3* ด้วยเทคนิค PCR พบว่า มีต้นยาสูบจำนวน 4 ต้น ที่ตรวจพบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส (ภาพที่ 4) ซึ่งตรงกับขนาดของยีน *SINA3* จึงนำยาสูบทั้ง 4 ต้น เพิ่มปริมาณเพื่อทดสอบการทนเค็มและทนแล้งต่อไป



ภาพที่ 3 การเกิดแคลลัสและต้นของใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *SINA3* หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 60 วัน

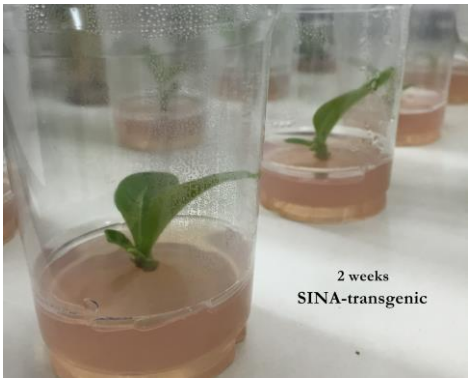


ภาพที่ 4 เจลอิเล็คโตรโฟริซิสแสดงแถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ของยีน *SINA3* จากต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 1 2 3 และ 4 (lane 2 3 4 และ 5 ตามลำดับ) เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA Ladder; Fermentas (lane 1)

3. **ทดสอบระดับการทนสภาวะเครียดของต้นยาสูบบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl และ PEG 6000**

นำต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* อายุประมาณ 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 5) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ทดสอบสภาวะเครียดเกลือของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* โดยอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการนำไฟฟ้า เท่ากับ 6.2, 22, 29, 36.3, 44.6 และ 50.3 มิลลิเดซิซิเมนต่อเซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป จัดเป็นอาหารที่ให้ความเค็มจัด เนื่องจากมีการการนำไฟฟ้ามากกว่า 15 มิลลิเดซิซิเมนต่อเซนติเมตร ตามการจำแนกความเค็มที่มีผลกระทบต่อพืชของ **FAO (**1976**)** (ตารางที่ 2) หลังจากเพาะเลี้ยง

ยาสูบ เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ต้นยาสูบชุดควบคุมและยาสูบที่มียีน *SINA3* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NaCl ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป ใบยาสูบมีสีเหลืองซีด และต้นยาสูบหยุดการเจริญเติบโตหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NaCl นาน 14 วัน เมื่อเทียบกับต้นยาสูบชุดควบคุมและยาสูบที่มียีน *SINA3* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม NaCl ยังคงมีการเจริญเติบโต โดยมีความสูงและจำนวนใบสีเขียวที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shi *et.al.* (2015) ทดสอบสภาวะเครียดเกลือในต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ที่ได้รับการถ่ายยีน *Lycopene* β*-cyclase* เพื่อให้มีการเจริญเติบโตและต้านทานต่อสภาวะเครียด พบว่า ต้นยาสูบปกติเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดเกลือ จะแสดงอาการใบเหลืองซีดและชะงักการเจริญเติบโตเช่นเดียวกัน



ภาพที่ 5 ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *SINA3* อายุ 2 สัปดาห์ ที่ทำการขยายชิ้นส่วนเพื่อทดสอบการทนสภาวะเครียด

ตารางที่ 1 ค่าการนำไฟฟ้าของอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ความเข้มข้นระดับต่างๆ

ปริมาณ NaCl (% w/v)	ค่าการนำไฟฟ้า (mS/cm)
0	6.2

1.0	22.0
1.5	29.0
2.0	36.3
2.5	44.6
3.0	50.3

ตารางที่ 2 การจำแนกระดับความเค็มที่มีผลกระทบต่อพืช (FAO, 1976)

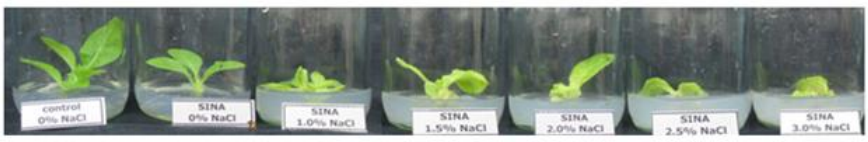
ค่าการนำไฟฟ้า (mS/cm)	**ระดับความเค็ม**	**การตอบสนองของพืช**
น้อยกว่า 2	ไม่เค็ม	ไม่มีผลกระทบต่อพืช
2-4	เค็มน้อย	มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชไม่ทนเค็ม
4-8	เค็มปานกลาง	มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด
8-15	เค็มมาก	พืชทนเค็มสามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้
มากกว่า 15	เค็มจัด	พืชทนเค็มสูงสามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ 4) พบว่า ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จะพบว่าน้ำหนักสดของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักสดเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน โดยมีน้ำหนักสดอยู่ในช่วง 1.22-1.94 กรัม ซึ่งแตกต่างจากต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ จะมีน้ำหนักสดเฉลี่ยน้อยกว่า อยู่ในช่วง 0.84 – 1.06 กรัม เมื่อวิเคราะห์ความสูงของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีความสูงเฉลี่ย อยู่ในช่วง 3.5 – 5.30 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม NaCl โดยมีความสูงเฉลี่ย เท่ากับ 8.50 และ 5.90 เซนติเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ เมื่อวิเคราะห์จำนวนใบของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีลักษณะเช่นเดียวกับความสูงของต้นยาสูบ คือ ต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม NaCl มีจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากับ 6.80 และ 5.80 ใบ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนใบเฉลี่ยอยู่ในช่วง 2-9.20 ใบ

หลังจากเพาะเลี้ยงต้นยาสูบบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 ความเข้มข้นระดับ 0, 10, 15, 20 และ 25 % (w/v) เป็นเวลา 7 วัน พบว่าต้นยาสูบชุดควบคุมและยาสูบที่มียีน *SINA3* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG6000 ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป ต้นยาสูบมีลักษณะแคระแกร็น และเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม สูตรเดิม นาน 14 วัน ต้นยาสูบชุดควบคุมและยาสูบที่มียีน *SINA3* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG6000 ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป หยุดการเจริญเติบโต แต่ยังคงมีใบสีเขียว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Almansouri *et.al* (2001). พบว่าเมื่อข้าวสาลีอยู่ในสภาวะขาดน้ำ จะมีความยาวของลำต้นน้อยลง เช่นเดียวกับรายงานของ OKÇU et al. (2005) พบว่า PEG6000 มีผลต่องอกและการยืดของยอดถั่วลันเตา

เมื่อวิเคราะห์ผลจากข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ 6) พบว่า ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสด ความสูงของต้น และจำนวนใบของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป มีความแตกต่างจากต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม PEG6000 โดยน้ำหนักสดเฉลี่ยของต้นยาสูบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 อยู่ในช่วง 0.37–0.74 กรัม เมื่อเทียบกับต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม PEG6000 มีน้ำหนักสดเฉลี่ย เท่ากับ 1.94 และ 1.22 กรัม ตามลำดับ ส่วนความสูงเฉลี่ยของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม PEG6000 มีความสูงเฉลี่ย เท่ากับ 8.50 และ 5.90 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ความสูงเฉลี่ยของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 อยู่ในช่วง 2.38–4.24 เซนติเมตร เช่นเดียวกับจำนวนใบเฉลี่ยของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม PEG6000 มีจำนวนใบเท่ากับ 6.80 และ 5.80 ใบ ตามลำดับ โดยที่จำนวนใบเฉลี่ยของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 อยู่ในช่วง 2.40–5.00 ใบ

ตารางที่ 3 ลักษณะของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ความเข้มข้นระดับ 0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (w/v) เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 30 วัน เทียบกับต้นยาสูบปกติที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม NaCl

จำนวนวันหลังเติม NaCl	ยาสูบชุดควบคุม	ยาสูบที่มียีน SINA3 บนอาหาร MS ที่เติม NaCl (% w/v)					
		0	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
7							

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสด ความสูงของต้น และจำนวนใบของยาสูบที่มียีน *SINA3* และยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วัน

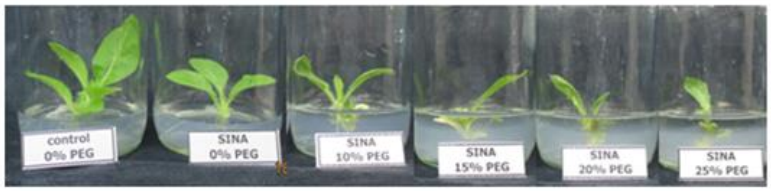
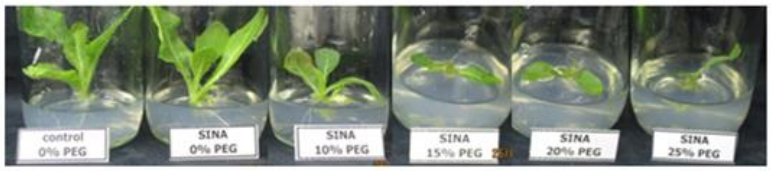
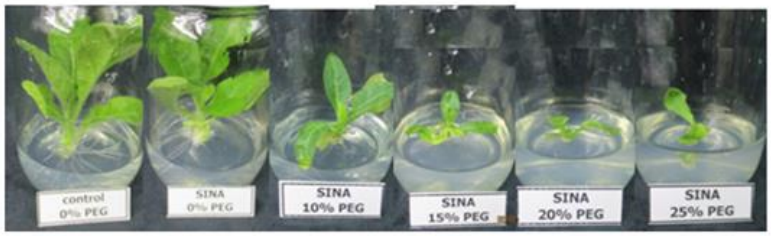
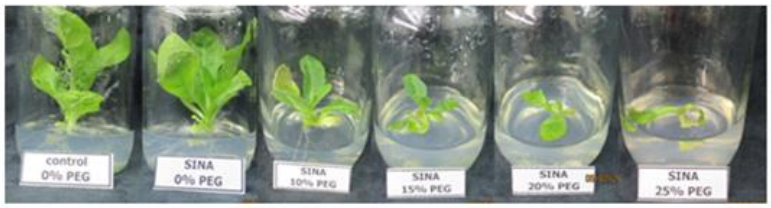
ความเข้มข้นของ NaCl (%)	**ค่าเฉลี่ย**		
	น้ำหนักสด (g)	**ความสูง (cm)**	**จำนวนใบ (ใบ)**
ยาสูบชุดควบคุม			
MS+NaCl 0	1.22 abc[1/]	5.90 b[1/]	5.80 bc[1/]
MS+NaCl 1	0.91 c	4.70 bcd	4.20 cd
MS+NaCl 1.5	1.33 abc	5.04 bcd	4.00 cde
MS+NaCl 2	0.98 bc	4.78 bcd	3.00 de
MS+NaCl 2.5	0.92 c	3.50 d	2.00 de
MS+NaCl 3	0.84 c	3.80 cd	2.20 de
ยาสูบที่มียีน *SINA3*			
MS+NaCl 0	1.94 a	8.50 a	6.80 b
MS+NaCl 1	1.81 ab	5.28 bc	9.20 a
MS+NaCl 1.5	1.80 ab	5.30 bc	4.00 cde
MS+NaCl 2	0.93 c	3.94 cd	3.00 de
MS+NaCl 2.5	0.99 bc	3.96 cd	2.60 de
MS+NaCl 3	1.06 bc	3.90 cd	2.40 de
F test	*	**	**
C.V. (%)	46.79	23.26	34.20

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan’s Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 5 ลักษณะของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 ความเข้มข้นระดับ 0, 10, 15, 20 และ 25 % (w/v) เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 30 วัน เทียบกับต้นยาสูบปกติที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม PEG6000

จำนวนวันหลังเติม PEG6000	ยาสูบชุดควบคุม	ยาสูบที่มียีน SINA3 บนอาหาร MS ที่เติม PEG6000 (% w/v)				
		0	10	15	20	25
7						
14						
21						
30						

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสด ความสูงของต้น และ จำนวนใบของยาสูบที่มียีน *SINA3* และยาสูบชุดควบคุมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วัน

ความเข้มข้นของ PEG (%)	**ค่าเฉลี่ย**		
	น้ำหนักสด (g)	**ความสูง (cm)**	**จำนวนใบ (ใบ)**
ยาสูบชุดควบคุม			
MS+PEG 0 %	1.22 b[1/]	5.90 b[1/]	5.80 ab[1/]
MS+PEG 10 %	0.68 c	3.96 cd	5.00 abc
MS+PEG 15 %	0.37 c	3.20 cde	4.60 bcd
MS+PEG 20 %	0.52 c	2.38 e	4.00 bcde
MS+PEG 25 %	0.51 c	3.30 cde	2.40 e
ยาสูบที่มียีน *SINA3*			
MS+PEG 0 %	1.94 a	8.50 a	6.80 a
MS+PEG 10 %	0.74 c	4.24 c	4.20 bcde
MS+PEG 15 %	0.58 c	2.60 de	3.60 cde
MS+PEG 20 %	0.55 c	3.60 cde	3.60 cde
MS+PEG 25 %	0.51 c	3.18 cde	2.80 de
F test	**	**	**
C.V. (%)	46.05	24.06	32.20

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan’s Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

จากการทดลองนี้ได้นำเอายีน *SINA3* ถ่ายฝากยีนเข้าพืชต้นแบบยาสูบ เพื่อศึกษาผลของการแสดงออกของยีนที่ทนต่อสภาวะเครียดเกลือและสภาวะขาดน้ำ โดยนำชุดยีนที่มียีน *SINA3* เข้าสู่แบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ได้ และถ่ายฝากยีน *SINA3* เข้าสู่เนื้อเยื่อยาสูบ ด้วยวิธี Leaf disc คัดเลือกต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* ได้ จำนวน 4 ต้น เพิ่มปริมาณและนำมาทดสอบสภาวะเครียดเกลือและสภาวะขาดน้ำโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl และ PEG6000 นั้น พบว่าต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับต้นยาสูบชุดควบคุม ทั้งน้ำหนักสด ความสูงของต้น และจำนวนใบ แสดงว่าต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *SINA3* ไม่สามารถทนทานต่อสภาวะเครียดเกลือและสภาวะขาดน้ำได้ ซึ่งอาจเกิดจากการทำงานของโปรตีน SINA มีทั้งส่งเสริมและยับยั้งหน้าที่ของโปรตีนชนิดอื่นภายในเซลล์ จากการศึกษาการควบคุมการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในข้าว โดยตั้งชื่อโปรตีนในกลุ่ม E3 ubiquitin ligases ว่า OsDIS1 (for *Oryza sitiva* Drought-induced SINA protein 1) พบว่าข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *OsDIS1* แบบ over expression จะทำให้ความทนแล้งของข้าวลดลง แต่เมื่อยับยั้งการทำงานของยีน *OsDIS1* ด้วยเทคเนิค RNAi ทำให้ข้าวมีความทนแล้งเพิ่มขึ้น (Ning (1) et al., 2011) ต่อมาพบว่าการ over expression ยีน *OsDIS1* ในข้าวแล้วส่งเสริมให้ทนแล้งลดลงนั้น เกิดจากโปรตีน OsDIS1 ทำปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน OsNek6 ซึ่งยีน *Nek6* เป็นยีนที่ตอบสนองต่อความเค็มและสภาวะ osmotic stress โปรตีน OsNek6 จะขัดขวางไม่ให้ OsDIS1 ทำงานกับ ubiquitinates จึงทำให้ข้าวไม่ทนต่อสภาวะขาดน้ำ แต่เมื่อ OsDIS1 ทำปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน OsSKIPa ซึ่งจะขัดขวางการทำงานของ 26s proteasome ทำให้โปรตีน OsDIS1 ทำงานร่วมกับ ubiquitinates โดยตรง จึงทำให้ข้าวเกิดการทนแล้งขึ้นมาได้ (Ning (2) et al., 2011)

จากงานวิจัยนี้ จะพบว่ายีน *SINA3* ที่ถ่ายฝากเข้าสู่ยาสูบ แบบ over expression นั้น ยังไม่สามารถทำให้ยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนมีความต้านทานต่อสภาวะเครียดได้ ดังนั้น ในการศึกษายีน *SINA3* ต่อไป อาจต้องใช้เทคนิค RNAi ร่วมกับการการถ่ายยีนแบบ over expression เพื่อศึกษาความทนทานต่อสภาวะเครียดของพืชนั้นๆ ต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

จากงานวิจัยครั้งนี้มีข้อมูลพื้นฐานสำหรับความทนทานต่อสภาวะเครียดเกลือและสภาวะขาดน้ำของต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) โดยเมื่อเพาะเลี้ยงยาสูบใบกลางบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl 1 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป เป็นเวลา 7 วัน ต้นยาสูบจะเริ่มมีใบสีเหลืองซีด และหยุดการเจริญเติบโต ภายในเวลา 14 วัน ส่วนต้นยาสูบใบกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป มีผลต่อการเจริญเติบโตและการยืดยาวของลำต้น ภายใน 7 วัน

11. เอกสารอ้างอิง

Almansouri , M., J.-M. Kinet and S. Lutts. .2001. Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (Triticum durum Desf.). Plant and Soil, 231:243-254

Den Herder G., A. D. Keyser, R. D. Rycke, S. Rombauts, W. V. d. Velde, M R. Clemente, C Verplancke, P Mergaert, E Kondorosi, M Holsters, and S. Goormachtig. 2008. Seven in Absentia Proteins Affect Plant Growth and Nodulation in *Medicago truncatula*. Plant Physiology. pp. 369-382.

FAO. 1976. Prognosis of salinity and alkalinity. FAO Soil Bulletin 31. FAO, Rome.

Kim Y., B. Ham, K. Paek, C. Park and N.Chua. 2006. An Arabidopsis homologue of human seven-in-absentia-interacting protein is involved in pathogen resistance. Mol. Cells, Vol. 21, No. 3, pp. 389-394.

Kunkel, B.N. and Brooks, D.M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. Curr Opin Plant Biol 5: 325-331

Ning Y.(1), C. Jantasuriyarat, Q. Zhao, H. Zhang, S. Chen, J. Liu, L. Liu, S. Tang, C. H. Park, X. Wang, X. Liu, L. Dai, Q. Xie, and G. Wang. 2011. The SINA E3 Ligase OsDIS1 Negatively Regulates Drought Response in Rice. Plant Physiology. pp. 242–255.

Ning Y.(2), Q. Xie and G.Wang. 2011. OsDIS1-mediated stress response pathway in rice. Plant Signaling & Behavior 6:11. pp. 1684-1686.

OKÇU, G., M. D. Kaya and M. Atak. 2005. Effects of Salt and Drought Stresses on Germination and Seedling Growth of Pea (Pisum sativum L.). Turkish journal of agriculture and forestry, 29: 237-242.

Park .S.Y, P. Fung, N. Nishimura, D.R. Jensen, Hi. Fujii, Y. Zhao, S. Lumba, J. Santiago, A. Rodrigues, T.F. Chow, S. E. Alfred, D. Bonetta, R. Finkelstein, N. J. Provart, D. Desveaux, P.L. Rodriguez, P. McCourt, J.Zhu, J.I. Schroeder, B.F. Volkman, and S.R. Cutler. 2009. Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. Science; (DOI: 10.1126/science.1173041)

Peralta D. A., A. Araya., C. F. Nardi, M. V. Busi and D. F. Gomez-Casati. 2013. Characterization of the Arabidopsis thaliana E3 Ubiquitin-Ligase AtSINAL7 and Identification of the Ubiquitination Sites. PLOS ONE www.plosone.org. Volume 8, Issue 8, e73104.

Sanchez-Barrena, M.J. Martinez-Ripoll, M., Zhu, J.K. Albert, A. (2005). The structure of the *Arabidopsis thaliana* SOS3: molecular mechanism of sensing calcium for salt stress response. Journal of Molecular Biology 345, 1253-1264.

Shi, Y.., J. Guo, W. Zhang, L. Jin, P. Liu, X. Chen, F. Li, P. Wei, Z. Li, W. Li, C. Wei, Q. Zheng, Q. Chen, J. Zhang, F. Lin, L. Qu, J. H. Snyder and R. Wang. 2015. Cloning of

the *Lycopene* β*-cyclase* Gene in *Nicotiana tabacum*and Its Overexpression Confers Salt and Drought Tolerance. *International journal of molecular sciences 16:* 30438-30457.

Tarczynsk, M.C. Jensen, R.G., and Bohhert, H.J. (1993). Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. Science 259: 508-510.