

การโคลนบางส่วนและการแสดงออกของยีน *myo-inositol 1-phosphate synthase (MIPS)*
ในอ้อยพันธุ์ป่าและอ้อยปลูกภายใต้สภาพเลียนแบบดินเค็มโซเดียม
Partial Cloning and Expression of *myo-inositol 1-phosphate synthase (MIPS)* Gene in Wild
and Cultivated Sugarcane under Mimic Sodic Saline Soil

ชนากานต์ ลักษณะ^{1*} และ สอนธิชัย จันทร์เปรม^{2,3}
Chanakan Laksana^{1*} and Sontichai Chanprame^{2,3}

บทคัดย่อ

ดินเค็มโซเดียมเป็นดินที่มีความเข้มข้นของเกลือและด่างที่มากเกินไปจนเป็นอันตรายต่อพืช ทำให้เกิดผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะอ้อยซึ่งตามธรรมชาติจัดว่าเป็นพืชที่ไม่ทนเค็ม เมื่อปลูกอ้อยในพื้นที่ที่เป็นดินเค็มโซเดียม อ้อยย่อมมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ โดยจะมีการแสดงออกของยีนหลายชนิด ยีน *myo-inositol 1-phosphate synthase (MIPS)* เป็นยีนอีกชนิดที่จะมีการแสดงออกเมื่อพืชเจริญเติบโตในดินเค็มโซเดียม โดยงานทดลอง นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนบางส่วนของยีน *MIPS* การจำแนกยีนเบื้องต้น และตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าว ในอ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก (KPS 94-13) ที่ได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็มโซเดียม โดยปลูกต้นอ้อยทั้งสองชนิดในสารละลาย 1/10 Hoagland ที่เติม NaCl 200 mM และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายให้เป็น 8 เป็นเวลา 0 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าการแสดงออกของยีน *MIPS* ในรากอ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูกมีการแสดงออกของยีนสูงสุดที่ 24 และ 48 ชั่วโมง หลังได้รับสภาพเครียด ตามลำดับ ส่วนในใบของอ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูกมีการแสดงออกของยีน *MIPS* สูงสุดที่ 72 ชั่วโมง และพบว่าในรากมีการแสดงออก ของยีนสูงกว่าในใบ และเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่รากและที่ใบระหว่างอ้อยทั้ง 2 ชนิด พบว่า อ้อยพันธุ์ป่า มีการแสดงออกของยีนนี้สูงกว่าอ้อยปลูกในทุกช่วงเวลาที่ได้รับสภาพเครียดเลียนแบบดินเค็มโซเดียม

คำสำคัญ : อ้อย ดินเค็มโซเดียม การแสดงออกของยีน เรียลไทม์ พี ซี อาร์

Abstract

Sodic saline soil is the soil containing high concentration of salts with high pH. It is harmful and affects to the plant growth. Sugarcane is naturally salt sensitive plant which is affected by sodic saline soil. When the plant is grown in such soil condition, *myo-inositol 1-phosphate synthase (MIPS)* gene will be induced to express. The objectives of this experiment were to partial clone, preliminary characterization of *MIPS* gene and to examine the expression levels of *MIPS* gene in wild and cultivated sugarcane (KPS 94-13) plants subjected to mimic sodic saline soil condition. Both types of sugarcane plants were grown in 1/10 Hoagland nutrient solution containing 200 mM NaCl at pH 8 for 0, 12, 24, 48 and 72 hr. The expression of the gene was determined using real-time PCR. It was found that the expressions of *MIPS* gene in root of wild and cultivated sugarcane were highest at 24 and 48 hr after receiving stress condition, respectively. Expressions of the gene in leaves of both sugarcane species were highest at 72 hr. It was also found that the expressions of the gene in root were higher than those in leaves. When the expressions of the gene in root and leaf of both sugarcane species

¹ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว จ.สระแก้ว 27160

² ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

³ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

* Corresponding authors : chanakanl@buu.ac.th

were compared it was indicated that the expressions of the gene in wild sugarcane were higher than those of cultivated sugarcane at all time course of stress that mimics to sodic saline soil condition.

Keywords: sugarcane, sodic saline soil, gene expression, real-time PCR

คำนำ

อ้อยเป็นพืชอุตสาหกรรมที่เข้าสู่กระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล อุตสาหกรรมผลิตกระดาษ และอุตสาหกรรมผลิตปุ๋ย เป็นต้น อ้อยจึงเป็นพืชไร่เศรษฐกิจที่สำคัญของไทยชนิดหนึ่ง พื้นที่ปลูกอ้อยทั้งประเทศในปีการผลิต 2558/2559 มีประมาณ 11.01 ล้านไร่ ผลผลิตเฉลี่ย 9.15 ตันต่อไร่ พื้นที่ปลูกอ้อยของไทยกระจายอยู่ในภาคต่างๆ โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือตอนล่างและภาคตะวันออกของประเทศไทย (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2559) ปัญหาประการหนึ่งในการปลูกอ้อยคือ อ้อยเป็นพืชที่ไม่ทนต่อดินเค็ม (Abdul *et al.*, 1997) ซึ่งในบางพื้นที่ของภาคเหนือตอนล่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางตอนบน จะมีปัญหาดินเค็มและดินตกร่วมกัน เรียกว่าดินเค็มโซดิก ทำให้เกิดปัญหาอ้อยให้ผลผลิตต่อไร่ลดลง (Cha-um *et al.*, 2009) ดินเค็มโซดิกเป็นดินที่มีเกลือละลายน้ำได้สูงโดยเฉพาะเกลือโซเดียม และมีค่าความเป็นกรด-ด่างของดินต่ำกว่าหรือเท่ากับ 8.5 (Hinrich *et al.*, 2001) ดินเค็มโซดิกจึงส่งผลกระทบต่ออ้อยคือ ทำให้อ้อยมีอาการโซเดียมและคลอรีนเป็นพิษ บริเวณยอดอ้อย ขอบใบอ้อย เป็นแผลแห้งเกรียม ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์และพื้นที่ในการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลง และค่าความเป็นกรด-ด่างของดินที่สูงส่งผลให้ธาตุอาหารพืชบางชนิดตกตะกอน พืชนำไปใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโตได้น้อย จึงแสดงอาการขาดธาตุอาหารบางชนิดร่วมด้วย ทำให้อ้อยที่ปลูกในบริเวณที่มีปัญหาดินเค็มโซดิกอ่อนแอ เจริญเติบโตได้ไม่ดีส่งผลให้ผลผลิตลดลง (Fu *et al.*, 2008)

Myo-inositol 1-phosphate synthase (MIPS) เป็นเอนไซม์ ที่พบได้ทั้งใน พืช สัตว์ และ เชื้อรา ส่วนใหญ่พบในพืชชั้นสูง เอนไซม์ MIPS เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน glucose 6-phosphate เป็น myo-inositol-1-phosphate หลังจากนั้นถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ชนิดที่สอง คือ myo-inositol-monophosphatase (MIP) ซึ่งเอนไซม์ MIP จะสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาดีฟอสโฟไรเลชัน (dephosphorylation) ทำให้หมู่ฟอสเฟตถูกปลดปล่อย ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนขนส่งที่ใช้ตอบสนองต่อสภาพเครียด และมีบทบาทสำคัญในการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ (phospholipids) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวของกลีเซอรอล (glycerol) 1 โมเลกุล กรดไขมัน (fatty acid) 2 โมเลกุล และกรดฟอสฟอริก 1 โมเลกุล นอกจากนั้นยังทำหน้าที่ส่งสัญญาณการแลกเปลี่ยนและจัดเก็บออกซิน (auxin) การสังเคราะห์ phytic acid และสารสำคัญในกลุ่มน้ำตาล inositol คือ myo-inositol จะถูกสังเคราะห์เมื่อพืชได้รับภาวะเครียด Hegeman *et al.* (2001) รายงานว่า พบเอนไซม์ MIPS ในเมล็ดถั่วเหลืองในช่วงการพัฒนาของเมล็ดและระยะการสร้างใบเลี้ยง (cotyledonary) เพราะในระยะเวลาเจริญนี้เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาล glucose-6-phosphate เพื่อเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์ MIPS ตอบสนองต่ออุณหภูมิสูง (Khurana *et al.*, 2012) สภาพความแล้ง (Abreu and Francisco, 2007; Gajjeraman *et al.*, 2011) และความเค็ม (Chatterjee *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011) เพื่อปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์โดยการทำให้เกิดการสะสม myo-inositol ในสารละลายภายในเซลล์ เพื่อช่วยในการควบคุมแรงดันออสโมติกของเซลล์

ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนบางส่วนของยีน MIPS และจำแนกเบื้องต้น รวมทั้งตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวในอ้อย 2 ชนิดคืออ้อยพันธุ์ปลูก (KPS 94-13) และอ้อยพันธุ์ป่า ที่ได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิก ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน และระดับการแสดงออกของยีนเมื่อนำไปรวมกับข้อมูลทางด้านสรีรวิทยาของอ้อยที่มีต่อสภาพแวดล้อมดังกล่าวที่จะศึกษาต่อไปในอนาคต จะทำให้สามารถเข้าใจกลไกการตอบสนองของอ้อยที่มีต่อสภาพดินเค็มโซดิกได้ดียิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การโคลนบางส่วนของยีน *MIPS* ในอ้อย

การเตรียมต้นกล้าอ้อย นำท่อนพันธุ์อ้อยพันธุ์ป่า (*Saccharum spontaneum* L.) และพันธุ์ปลูก (*S. officinarum* L.) คือพันธุ์กำแพงแสน 94-13 (KPS 94-13) มาตัดให้เป็นท่อนยาวประมาณ 5 เซนติเมตร โดยแต่ละท่อนมีตาเพียง 1 ตาเท่านั้น จากนั้นนำมาเพาะให้งอกเป็นต้นกล้าในวัสดุปลูกที่ประกอบด้วย ขี้เถ้าแกลบผสมกับทรายในอัตราส่วน 1:1 เพาะลงในถุงดำที่ใช้สำหรับปลูกพืชขนาด 15 x 20 เซนติเมตร ดูแลให้น้ำและปุ๋ยตามความเหมาะสมให้อ้อยสามารถเจริญเติบโตได้ดี จนกระทั่งอ้อยอายุประมาณ 2 เดือน

การสกัด total RNA จากใบและรากอ้อย นำใบอ่อนและรากอ่อนจากต้นอ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูกมาสกัด total RNA ตามวิธีของ Laksana and Chanprame (2015) กำจัด genomic DNA ออกจากตัวอย่าง total RNA ด้วยเอนไซม์ DNase I ความเข้มข้น 1 U/ μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำ total RNA ที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นโดยการทำเจลอเล็กโทรโฟรีซิสด้วย 1.5% denaturing formaldehyde อะกาโรส ใน 0.5X MOPs buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

การสังเคราะห์ first-strand cDNA จาก total RNA นำ total RNA ปริมาตร 5 μ l (1 μ g/ μ l) ผสมกับ 100 μ M oligo (dT)₂₀ ปริมาตร 1 μ l 10 mM dNTP mix ปริมาตร 1 μ l แล้วปรับปริมาตรด้วย DEPC-dH₂O จนครบปริมาตร 12.5 μ l ในหลอดทดลองขนาด 0.5 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที และบ่มต่อที่ 4 °C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติม 5X reaction buffer ปริมาตร 4 μ l RiboLock RNase inhibitor (Fermentas, Lithuania) ปริมาตร 1 μ l 10 mM dNTP mix ปริมาตร 2 μ l Revert Aid M-MuLVRT (Fermentas, Lithuania) ปริมาตร 1 μ l แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและบ่มต่อที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที และนำไปแช่ในน้ำแข็ง

การออกแบบไพรเมอร์ชนิด degenerate ที่จำเพาะกับบางส่วนของยีน *MIPS* ออกแบบไพรเมอร์ชนิด degenerate โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ของยีน *MIPS* ที่ปรากฏในฐานข้อมูลสาธารณะ GenBank ดังนี้ accession number AF056325 (*Hordeum vulgare*), AF412340 (*Porteresia coarctata*), GU441843 (*Spartina alterniflora*), AF056326 (*Zea mays*), AB012107 (*Oryza sativa japonica*), AF120148 (*Triticum aestivum*), AB059557 (*Avena sativa*) และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *Actin* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์จาก accession number NM 001136991 (*Zea mays*), AY742219 (*Saccharum officinarum*), XM 003569070 (*Brachypodium distachyon*), GU290546 (*Zoysia japonica*) ออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Genetyx เวอร์ชัน 5.0 และ GeneDoc เวอร์ชัน 2.6.0.2 (Table 1)

Table 1 Specific and degenerated primers for amplification of partial *Actin* and *MIPS* gene.

Genes	Primers
<i>Actin</i>	Forward : 5'CATGCCATCCTTCGATTGG 3'
	Reverse : 5'CACATCTGCTGGAAGGTGC 3'
<i>MIPS</i>	Forward: 5'- ATGTTTCATCGAGAGCTTCCG -3'
	Reverse: 5'- ATG GGMAGGAGGCTCTTGAA -3'

การสังเคราะห์ DNA คู่สมจาก first-strand cDNA ด้วยปฏิกิริยา PCR ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย first-strand cDNA ปริมาตร 2 μ l 1 mM dNTP ปริมาตร 1 μ l *Taq* DNA polymerase 0.2 μ l (5 U/ μ l) 10X reaction buffer ปริมาตร 2 μ l 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 4 μ l 5 mM forward และ reverse ของไพรเมอร์สำหรับยีน *Actin* หรือ ยีน *MIPS* (Table 1) ปริมาตร 0.5 μ l โดยใช้โปรแกรมในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ preliminary denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C 3 นาที denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 °C 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 72 °C 1 นาที ทำซ้ำโปรแกรม denaturing ถึง extension จำนวน 30 รอบ แล้วตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 5 นาที ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน 0.8% อะกาโรส ใน 0.5X TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นตัดชิ้นส่วนเจลที่มีแถบ DNA ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR บน 0.8% อะกาโรสมาทำให้บริสุทธิ์โดยปฏิบัติตามคำแนะนำ และวิธีใช้ของชุด Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System (Promega, USA)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่ง DNA คู่สมผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1st BASE (First BASE Laboratories, Selangor DarulEhsan, Malaysia) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MIPS* และ *Actin* ที่มีการรายงานในฐานข้อมูลสากลด้วยโปรแกรม BLAST จากเว็บไซต์ <http://blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi> และ ทำ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม clustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) และ Phylo dendron (<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html>)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน MIPS เมื่ออ้อยได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็มชนิดเป็นระยะเวลาต่าง ๆ

การเตรียมกล้ำอ้อย การสกัด total RNA จากใบและรากอ้อย และการการสังเคราะห์ first-strand cDNA การเตรียมต้นกล้ำอ้อยปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น จนกระทั่งอ้อยอายุประมาณ 2 เดือน ปรับสภาพต้นอ้อยก่อนการทดลองโดยการย้ายต้นอ้อยมาเลี้ยงในแบบ hydroponic ที่ใช้สารละลายธาตุอาหาร 1/10 Hoagland นาน 7 วัน จากนั้นเริ่มทำการทดลองโดยย้ายต้นอ้อยลงเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารสูตรเดิมที่เพิ่ม NaCl ความเข้มข้น 200 mM (pH ของสารละลาย 8.0) เป็นเวลา 0 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง ส่วนการสกัด total RNA และการสังเคราะห์ first-strand cDNA ก็ปฏิบัติตามวิธีที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นเช่นกัน

การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน Actin และยีน MIPS สำหรับทำ real-time PCR โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากการทดลองข้างต้น มาออกแบบไพรเมอร์สำหรับการทำ real-time PCR โดยใช้โปรแกรม primer3 (<http://simgene.com/Primer3>).

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *Actin* สำหรับการทำ real-time PCR คือ
Forward 5'-GAGAGGGGTTACTCCTTC-3' และ Reverse 5'-CTCTTTTCAACTGAGGAGCT-3'

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *MIPS* สำหรับการทำ real-time PCR คือ
Forward 5'-GCACAACACCTGTGAGGACT-3' และ Reverse 5'-TGAGGTAGCTCAGGATGGTG-3'

การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน MIPS โดยใช้เทคนิค real-time PCR เทียบกับระดับการแสดงออกของยีนอ้างอิงคือยีน *Actin* ปฏิกิริยาประกอบด้วย first-strand cDNA ปริมาตร 1 μ l (300 ng/ μ l) 2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix (Bioline, Singapore) ปริมาตร 5 μ l 10 μ M forward และ reverse ของไพรเมอร์สำหรับยีน *Actin* หรือ forward และ reverse ของไพรเมอร์สำหรับยีน *MIPS* อย่างละ 0.4 μ l แล้วนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนแบบ real-time PCR ด้วยเครื่อง Mastercycler® ep realplex4 บริษัท Eppendorf

ประเทศเยอรมันนี้ ตั้งโปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา PCR ดังนี้ denature อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 15 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 °C เป็นเวลา 15 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 20 วินาที จำนวน 45 รอบ

ผลการทดลองและวิจารณ์

การโคลนบางส่วนของยีน *MIPS* ในอ้อย

การสกัด total RNA จากใบและรากอ้อย ในการสกัด total RNA จากรากและใบอ่อนของอ้อยทั้งพันธุ์ป่า และพันธุ์ปลูก (KPS 94-13) พบว่า ความเข้มข้นของ total RNA ที่ได้มีความเข้มข้นประมาณ 2,000 – 3,000 ng/μl และเมื่อนำไปตรวจสอบคุณภาพ พบว่า total RNA ที่แยกมาได้มีคุณภาพดี (Figure 1) มีความบริสุทธิ์สูง โดยมีค่า A260/280 และ A260/230 อยู่ในช่วง 1.8-2.0

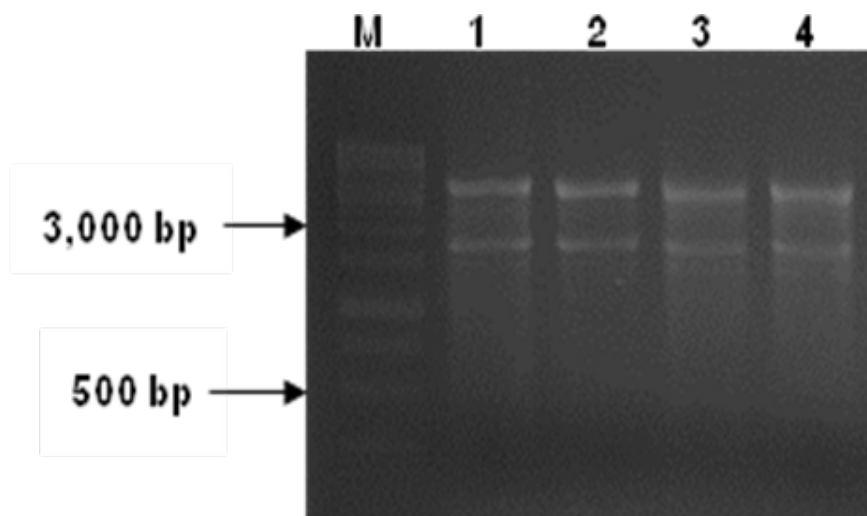


Figure 1 Total RNA from leaves and root of wild and cultivated sugarcane (KPS 94-13) M: 1 kb DNA ladder (Fermentas, Lithuania), 1-2: total RNA derived from leaves and root of wild sugarcane, 3-4: total RNA derived from leaves and root of cultivated sugarcane

การสังเคราะห์ DNA คู่สมจาก first-strand cDNA ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ที่จำเพาะกับยีน *MIPS* และ *Actin* การสังเคราะห์ DNA คู่สมจาก first-strand cDNA ที่ได้จาก mRNA ของใบอ่อนและรากของอ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *Actin* และไพรเมอร์ชนิด degenerated primer ของยีน *MIPS* ด้วยเทคนิค PCR และวิเคราะห์ขนาด DNA ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน 0.8% อะกาโรส พบว่า DNA คู่สมที่สังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ของยีน *Actin* เกิดแถบ DNA ขนาดประมาณ 550 คู่เบส *MIPS* และไพรเมอร์ของยีน *MIPS* เกิดแถบ DNA ขนาดประมาณ 400 คู่เบส (Figure 2)

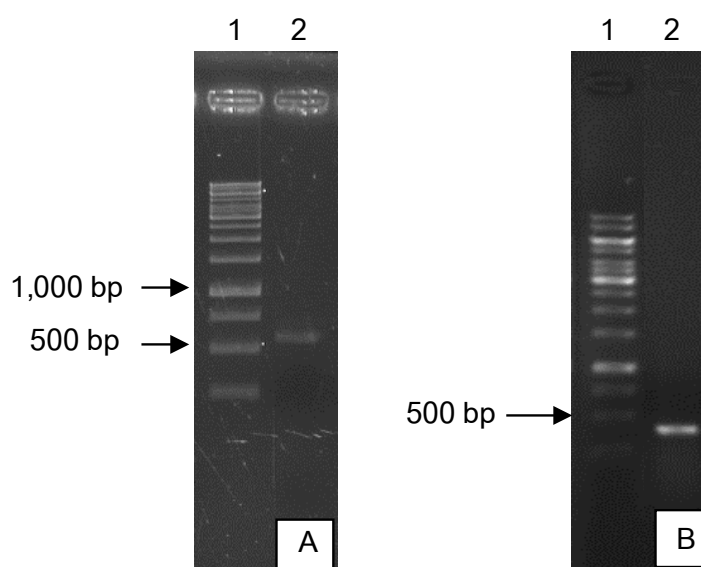


Figure 2 Amplification of partial *Actin* gene (A) and *MIPS* gene (B) from cultivated sugarcane Lane 1: 1 kb DNA ladder (Fermentas, Lithuania), Lane 2: PCR product of *Actin* (A) and *MIPS* (B) gene

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ นำแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็น degenerated primer ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีขนาด 414 bp ทั้งพันธุ์ป่า และพันธุ์ปลูก (KPS 93-14) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 พันธุ์มาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ในฐานข้อมูลสาธารณะโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BLASTN ในฐานข้อมูล NCBI ลำดับนิวคลีโอไทด์นี้มีความเหมือนกับยีน *MIPS* ในพืชหลายชนิด เช่น ข้าวโพด (EU961709.1) ข้าวป่า (XM_006651061.2) *Brassica juncea* (EU371115.1) *Spartina alterniflora* (GU441843.1) และข้าวสาลี (AF542968.1) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของอ้อยทั้ง 2 ชนิดมาเปรียบเทียบกับพบว่ามี 2 ตำแหน่งที่แตกต่างกัน และ 2 ตำแหน่งนี้เมื่อเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนพบว่าไม่มีความแตกต่างกันในอ้อยทั้ง 2 ชนิด (ข้อมูลไม่ได้แสดง)(Figure 3) และถ้าสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ครบทั้งยีนแล้วนำมาเปรียบเทียบกันเพื่อหาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโน ความแตกต่างเหล่านี้ อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับความสามารถในการแสดงออกของยีน *MIPS* และความสามารถในการทนต่อสภาพเครียดที่เกิดจากดินเค็มโซดิกก็เป็นได้ ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป และถ้าในบริเวณดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องจริงก็จะสามารถออกแบบไพรเมอร์ และพัฒนาขึ้นมาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด gene targeted marker เพื่อใช้คัดเลือกลักษณะทนทานดินเค็มหรือดินเค็มโซดิกในอ้อยได้

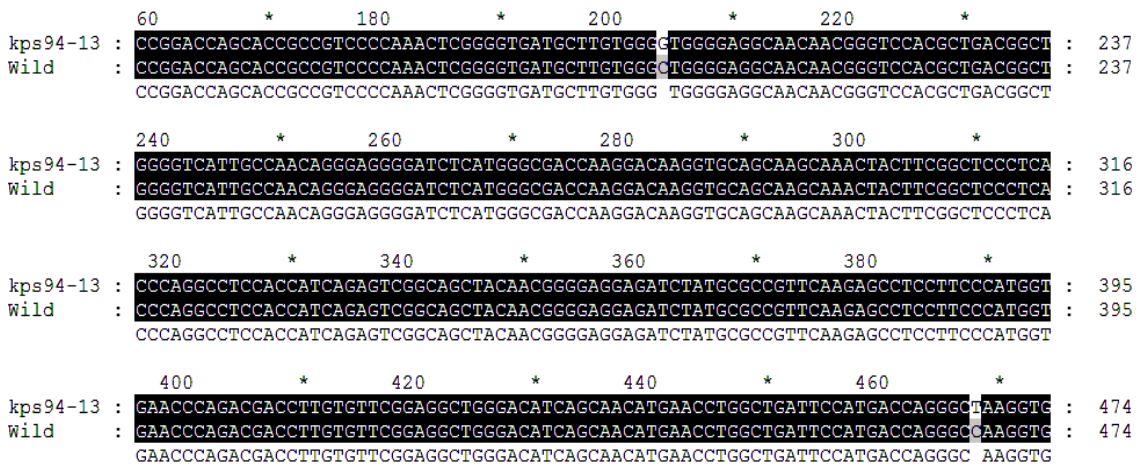


Figure 3 Comparison of partial MIPS gene between wild sugarcane and cultivated sugarcane (KPS 94-13)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MIPS มาวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับยีน MIPS ที่รายงานในพืชชนิดต่างๆ คือ ข้าวโพด (EU961709.1) ข้าวป่า (XM_006651061.2) *Brassica juncea* (EU371115.1) *Spartina alterniflora* (GU441843.1) และข้าวสาลี (AF542968.1) จากนั้นสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่า ยีน MIPS ของอ้อยอยู่ในกลุ่มเดียวกับยีน MIPS ของข้าวโพด (Figure 4)

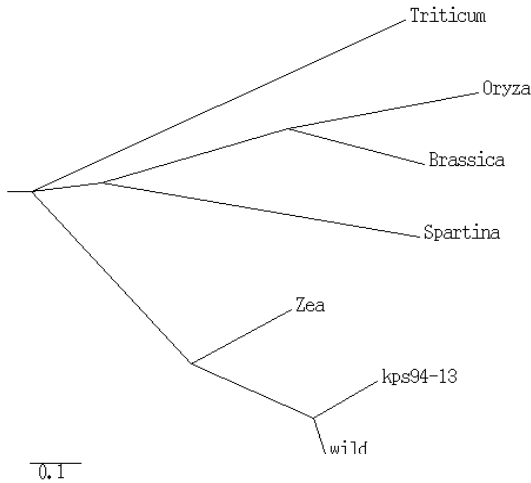


Figure 4 Phylogenetic tree of partial MIPS gene of wild and cultivated sugarcane (KPS 94-13)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน MIPS เมื่ออ้อยได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิกเป็นระยะเวลาต่าง ๆ ศึกษาการแสดงออกของยีน MIPS ในรากและใบของอ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก (KPS 94-13) ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่เพิ่ม NaCl 200 mM และปรับ pH ของสารละลายเท่ากับ 8.0 โดยใช้เทคนิค real-time PCR โดยมียีน *Actin* เป็นยีนอ้างอิง เมื่ออ้อยได้รับสภาพเค็มเป็นเวลา 0 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า มีการกระตุ้นการแสดงออกของยีน MIPS ในอ้อยทั้ง 2 ชนิด เช่นเดียวกับพืชอีกหลายชนิดที่พบว่า เมื่อพืชได้รับสภาวะเค็มจะมีการกระตุ้นการแสดงออกของยีนนี้ เช่น กวี่ (Cui *et al.*, 2013) ยาสูบ (Majee *et al.* 2004) ข้าว และ *Brassica juncea*

(Chatterjee *et al.* 2006) ซึ่งเมื่อพืชได้รับสภาพเครียดจากความเค็ม พืชจะมีกลไกป้องกันตัวเองจากอันตรายที่จะเกิดจากความเค็มอย่างน้อย 2 กระบวนการคือ กลไกการขับเกลือส่วนเกินมาไว้ที่ผิวของใบโดยผ่านกระบวนการ ion exclusion หรือการกระจายเกลือไปเก็บไว้ตามส่วนต่าง ๆ ของพืช (Bradley and Morris, 1991) และ การปรับลดค่าแรงดันออสโมติก โดยการสร้างสาร osmolytes เพื่อลดการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ (Cavaliere, 1983) ระดับการแสดงออกของยีน *MIPS* ในรากของอ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก มีค่าการแสดงออกสูงสุดที่ 24 และ 48 ชั่วโมง คือ 14.1 และ 5.83 ตามลำดับ (Figure 5A) ระดับการแสดงออกของยีน *MIPS* ในใบของอ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก มีค่าการแสดงออกสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง หลังได้รับสภาพเครียดเป็น 13.6 และ 3.15 ตามลำดับ (Figure 5B)

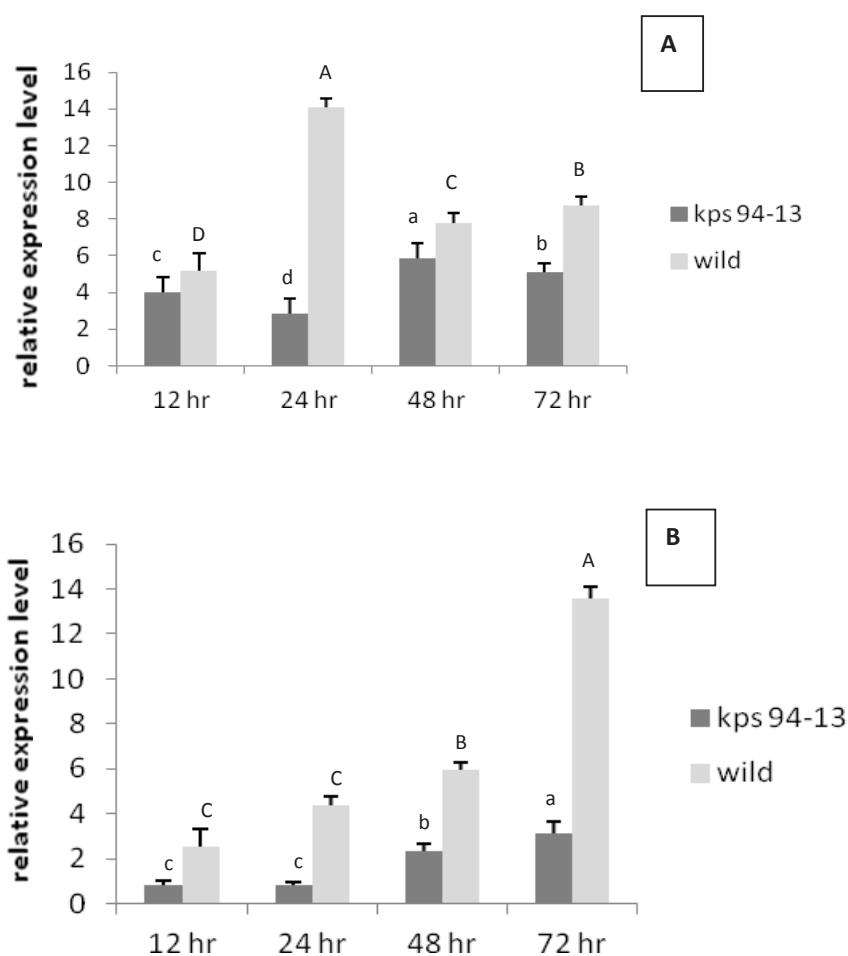


Figure 5 The relative transcription level of *MIPS* in root (A) and leaves (B) of wild and cultivated sugarcane under mimic sodic saline soil. The same letter on the solid boxes of the same sugarcane species are not significantly different at $p < 0.05$.

ระดับการแสดงออกของยีน *MIPS* ในใบของอ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูกมีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึง 72 ชั่วโมง และมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับการแสดงออกในระยะเวลาที่ได้รับสภาพเครียดที่สั้นกว่า ส่วนในรากของอ้อยพันธุ์ป่ามีการแสดงออกของยีนสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง และแตกต่างทางสถิติ

เมื่อเทียบกับระยะเวลาอื่นๆ เช่นเดียวกับพันธุ์ปลูกมีการแสดงออกสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นการแสดงออกของยีนจะลดลง เมื่อได้รับความเครียดพืชจะสังเคราะห์เอนไซม์ MIPS มากขึ้น เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ myo-inositol มากขึ้นภายในเซลล์ เพื่อรักษาแรงดันเต่งภายในเซลล์ได้ (Chatterjee *et al.*, 2006) หลังจากนั้นการแสดงออกของยีนจะลดลงเพราะสารประกอบภายในเซลล์ที่สร้างขึ้น คือ myo-inositol มีเพียงพอที่จะช่วยปรับสมดุลน้ำภายในเซลล์ ทำให้พืชรักษาสภาพการเจริญได้ตามปกติ การแสดงออกของยีนจึงลดลง การตอบสนองต่อความเค็มที่เลียนแบบดินเค็มชนิดของอ้อยทั้ง 2 ชนิด จะแตกต่างกันทั้งในแง่ของระดับการแสดงออกของยีน และระยะเวลาที่ตอบสนอง แม้ในอ้อยพันธุ์ปลูกที่ใช้ในการทดลองนี้จะได้ชื่อว่าเป็นพันธุ์ทนแล้ง (บุศรินทร์, 2557) แต่มีแนวโน้มการแสดงออกของยีนที่ในระดับที่ต่ำกว่าพันธุ์ป่า เช่นเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่รากกับที่ใบของอ้อยทั้ง 2 ชนิด พบว่าอ้อยพันธุ์ป่ามีการแสดงออกของยีนสูงกว่าพันธุ์ปลูกทั้งในรากและใบ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในพันธุ์ป่าซึ่งปกติขึ้นอยู่ตามธรรมชาติในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันมาก มีความสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่า อ้อยพันธุ์ป่ามีลักษณะทนแล้งได้ดี มีความแข็งแรงกว่า อันเป็นลักษณะของพืชพันธุ์ป่า จึงทำให้การแสดงออกของยีน MIPS ของอ้อยพันธุ์ป่าโดยเฉพาะที่รากมีมากกว่าและแสดงออกสูงสุดในเวลาที่สั้นกว่าอ้อยพันธุ์ปลูก และการแสดงออกของยีนนี้ที่รากของทั้งอ้อยพันธุ์ป่าและอ้อยพันธุ์ปลูกจะสูงกว่าในใบ ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากรากเป็นส่วนที่สัมผัสกับสภาพเครียดก่อนส่วนอื่นของพืช และจำเป็นต้องลดการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์รากให้มากที่สุดจึงต้องมีการสังเคราะห์ osmolyte ออกมามาก การศึกษาการแสดงออกของยีนนี้เมื่อพืชเจริญเติบโตในดินเค็มชนิดนั้นๆ ยังไม่มีการรายงานในพืชชนิดอื่นๆ แต่มีการศึกษาว่าความเป็นต่างนั้นมีผลต่อการแสดงออกของยีน เนื่องจากความเป็นต่างนั้นจะมีผลทำให้พืชสามารถนำเกลือเข้าสู่เซลล์พืชได้มากขึ้นกว่าปกติ (Xu and Tuyen, 2012) ดังนั้นเพื่อยืนยันว่าความเป็นต่างของดินมีผลต่อการแสดงออกของยีน MIPS จะต้องมีการทดลองเพิ่มเติมโดยปลูกอ้อยในสภาพเลียนแบบดินเค็มเพียงอย่างเดียว แล้วนำระดับการแสดงออกของยีน MIPS มาเปรียบเทียบที่ปลูกในสภาพเลียนแบบดินเค็มชนิดต่อไป นอกจากนี้ การตอบสนองของพืชต่อความแห้งแล้ง ความหนาว และอุณหภูมิที่สูง จะมีความคล้ายคลึงกับการตอบสนองต่อความเค็ม (Nakamura *et al.*, 2001) จึงมีความเป็นไปได้ว่าพืชอาจใช้ยีนเดียวกันตอบสนองต่อความเครียดหลายชนิด ซึ่งต้องศึกษาต่อไปว่ายีน MIPS มีผลต่อลักษณะเครียดต่างๆ ตามที่กล่าวมาหรือไม่

สรุป

การโคลนบางส่วนของยีน MIPS ในอ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก (KPS 94-13) ได้ 414 bp เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสาธารณะพบว่ามีความเหมือนกับยีน MIPS ในพืชหลายชนิด และสภาพเลียนแบบดินเค็มชนิดที่สามารถกระตุ้นให้ยีน MIPS ในอ้อยพันธุ์ป่าและอ้อยพันธุ์ปลูกแสดงออกได้ โดยการแสดงออกของยีน MIPS ในรากของอ้อยมีการแสดงออกมากกว่าที่ใบ และการแสดงออกของยีน MIPS ทั้งที่รากและที่ใบของอ้อยพันธุ์ป่ามีระดับการแสดงออกสูงกว่าที่รากและที่ใบของอ้อยพันธุ์ปลูก เมื่อตรวจสอบโดยวิธี real-time PCR ระดับการแสดงออกของยีนนี้อาจเกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนทานต่อสภาพดินเค็มชนิดของอ้อย ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาหาความสัมพันธ์ดังกล่าว และอาจนำไปสู่การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ช่วยคัดเลือกลักษณะทนทานได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย และ คุณจิรพร เหลียวตระกูล ที่ช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- บุศริน อิ่มอินทร์ 2557: การโคลนบางส่วนของยีน *Betaine Aldehyde Dehydrogenase* และ *Myo-Inositol 1-Phosphate Synthase* ที่เกี่ยวข้องตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำ. วิทยานพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- สำนักงานคณะกรรมการวิจัยและน้ำตาตทราย. 2559. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อยปีการผลิต 2558/59. แหล่งข้อมูล: <http://www.ocsb.go.th/upload/OCSBActivity/fileupload/8071-2689.pdf>. สืบค้นเมื่อ 4 ต.ค. 2559
- Abdul, W.L., A. Rao and E. Rasul. 1997. Identification of salt tolerance traits in sugarcane lines. *Field Crops Res.* 54: 9-17.
- Abreu, E.F.M. and J.L.A. Francisco. 2007. Isolation and characterization of a myo-inositol-1-phosphate synthase gene from yellow passion fruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) expressed during seed development and environmental stress. *Ann. Bot.* 99: 285-292.
- Bradley, P.M. and J.T. Morris. 1991. Relative importance of ion exclusion, secretion and accumulation in *Spartina alterniflora* Loisel. *J. Exp. Bot.*, 42: 1525–1532.
- Cavaleri, A.J. 1983. Proline and glycinebetaine accumulation by *Spartina alterniflora* Loisel in response to NaCl and nitrogen in a controlled environment. *Oecologia* 57 : 20–24.
- Cha-um, S., K. Supaibulwattana and C. Kirdmanee. 2009. Comparative effects of salt stress and extreme pH stress combined on glycine betaine accumulation, photosynthetic and growth characters of two rice genotypes. *Rice Sci.* 16: 274-182.
- Chatterjee, A.D., L. Goswami, S. Maitra, K.G. Dastidar, S. Ray and A.L. Majumder. 2006. Introgression of a novel salt tolerant L-myoinositol myoinositol-1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka (PcINO1) confers salt tolerance to evolutionary diverse organisms. *FEBS Lett.* 580:3980–3988.
- Cui, M., D. Liang and F. Ma. 2013. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding kiwifruit L-myoinositol-1-phosphate synthase, a key gene of inositol formation. *Mol Biol Rep.* 40(1):697-705.
- Gajjeraman, P., P.G. Kavar., M.C. Pagariya and D.T. Prasad. 2011. Identification of water deficit stress upregulated genes in sugarcane. *Environ. Exp. Bot.* 36: 29-38.
- Hegeman, C.E., L.L. Good and E.A. Grabau. 2001. Expression of D-myoinositol-3-phosphate synthase in soybean. Implications for phytic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* 125: 1941-1948.
- Fu, Y., Z.W. Liang, Z.C. Wang and C. Yang. 2008. Relationship between diurnal changes of net photosynthetic rate and influencing factors in rice under saline sodic stress. *Rice Sci.* 15: 119-124
- Hinrich, L.B., B.L. McNeal and G.E.O. Cornor. 2001. *Soil Chemistry*. 3rded. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Khurana, N., C. Harsh and K. Paramjit. 2012. Expression analysis of a heat-inducible, myo-inositol-1-phosphate synthase (MIPS) gene from wheat and the alternatively spliced variants of rice and Arabidopsis. *Plant Cell Rep.* 31: 237-251.
- Laksana, C. and S. Chanprame. 2015. A simple and rapid method for RNA extraction from young and mature leaf of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *J. ISSAAS.* 21(1): 96-106.
- Majee, M., S. Maitra, K.G. Dastidar, S. Pattnaik, A. Chatterjee and N.C. Hait. 2004. A novel salt-tolerant L-myoinositol-1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a halophytic wild rice. *J. Biol. Chem.* 279: 28539-28552.
- Nakamura, T., M. Nomura, H. Mori, A.T. Jagendorf, A. Ueda and T. Takabe. 2001. An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant Cell Physiol.* 42: 1088-1092.
- Wang, Y., J. Huang, C.B. Gou, X. Dai, F. Chen and W. Wei. 2011. Cloning and characterization of a differentially expressed cDNA encoding myo-inositol-1-phosphate synthase involved in response to abiotic stress in *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 106: 269-277.
- Xu, D. and D. Duc Tuyen. 2012. Genetic studies on saline and sodic tolerances in soy bean. *Breed. Sci.* 61: 556-565.