



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (การปรับปรุงพันธุ์พืช)

ปริญญา

การปรับปรุงพันธุ์พืช

เกษตร กำแพงแสน

สาขา

คณะ

เรื่อง การโคลนบางส่วนของยีน Betaine Aldehyde Dehydrogenase และ Myo - Inositol 1 - Phosphate Synthase ที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำ
Partial Cloning of Betaine Aldehyde Dehydrogenase and Myo - Inositol 1 - Phosphate Synthase Genes for Water Deficit Response in Sugarcane

นามผู้วิจัย นางสาวบุศริน อิ่มอินทร์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักวิทยา

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันท์เปรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์นงลักษณ์ เทียนเสรี, Ph.D.)

รักษาราชการแทน
ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สิรินทร์พร สิ้นธุวนิชย์, Dr.Agr)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่

เดือน

พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลนบางส่วนของยีน Betaine Aldehyde Dehydrogenase และ Myo - Inositol 1 - Phosphate Synthase ที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำ

Partial Cloning of Betaine Aldehyde Dehydrogenase and Myo - Inositol 1 - Phosphate Synthase Genes for Water Deficit Response in Sugarcane

โดย

นางสาวนุศริน อิ่มอินทร์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การปรับปรุงพันธุ์พืช)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บุศริน อิ่มอินทร์ 2557: การโคลนบางส่วนของยีน BetaineAldehyde Dehydrogenase และ Myo - Inositol 1 - Phosphate Synthase ที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาการปรับปรุงพันธุ์พืช คณะเกษตรกำแพงแสน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันท์เปรม, Ph.D. 71 หน้า

การหาบางส่วนของยีน โดยออกแบบไพรเมอร์ชนิด degenerate ที่จำเพาะกับยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*) และ myo -inositol 1- phosphate synthase (*MIPS*) เมื่อทำปฏิกิริยา PCR กับ first stranded cDNA เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 327 คู่เบส และ 402 คู่เบส เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับยีน *BADH* ในข้าวโพด ข้าวฟ่าง หนุ่ย และ ข้าว 96 93 90 และ 86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับยีน *MIPS* ในข้าวโพด ข้าว ข้าวสาลี และหนุ่ย 96 90 90 และ 89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การหาบางส่วนของยีน โดยออกแบบไพรเมอร์ชนิด degenerate ที่จำเพาะกับยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*) และ myo -inositol 1- phosphate synthase (*MIPS*) เมื่อทำปฏิกิริยา PCR กับ first stranded cDNA เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 327 คู่เบส และ 402 คู่เบส เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับยีน *BADH* ในข้าวโพด ข้าวฟ่าง หนุ่ย และ ข้าว 96 93 90 และ 86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับยีน *MIPS* ในข้าวโพด ข้าว ข้าวสาลี และหนุ่ย 96 90 90 และ 89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่คาดว่าจะเป็ยีน *BADH* โดยใช้เทคนิค real-time PCR พบว่า ในใบและรากอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ที่ได้รับ PEG ที่ระดับความเข้มข้น 28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีนมากที่สุด ในขณะที่ใบอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ที่ได้รับ PEG ที่ระดับความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และรากที่ระดับความเข้มข้น 28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงมีการแสดงออกของยีนมากที่สุด ส่วนยีน *MIPS* พบว่าที่ใบและรากของอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ที่ได้รับ PEG ที่ระดับความเข้มข้น 28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีนมากที่สุด ในขณะที่ใบอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ที่ได้รับ PEG ที่ระดับความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และรากที่ได้รับ PEG ระดับความเข้มข้น 28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงมีการแสดงออกของยีน *MIPS* สูงสุด

Budsarin Imin 2014: Partial Cloning of Betaine Aldehyde Dehydrogenase and Myo-Inositol 1-Phosphate Synthase Genes for Water Deficit Response in Sugarcane. Master of Science (Plant Breeding), Major Field: Plant Breeding, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen. Thesis Advisor: Associate Professor Sontichai Chanprame, Ph.D. 71 pages.

The study of water deficit response of sugarcane cv. Kps 94-13 and Kps 01-11-6 was done. Sugarcane plants were cultured in the medium containing 16 and 28 % PEG for 6, 12, 24, 48, 72, 96 and 120 hrs. It was found that leaf of sugarcane subjected to 28 % PEG were more yellow than leaf in 16 % PEG. At the same PEG concentration and the same duration of stress, sugarcane cv. Kps 94-13 showed less yellow leaf than Kps 01-11-6. The result confirmed that sugarcane cv. Kps 94-13 was more tolerance to water deficit than Kps 01-11-6.

Degenerated primers specific to conserve region of betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*) and myo -inositol 1- phosphate synthase (*MIPS*) were designed and used for PCR with first stranded cDNA template. It resulted the 327 and 402 bp of PCR product. Nucleotide sequences were analyzed and compared to the database. It was found that they were similar to *BADH* gene of corn (90%), sorghum (93%), grass (90%) and rice (86%) and similar to *MIPS* gene of corn (96%), rice (90%), wheat (90%) and grass (89%) respectively.

Real-time PCR was performed to determine the expression levels of putative *BADH* and *MIPS* gene, it was indicated that the highest expression was found in leave and root of Kps 94-13 treated with 28 % PEG for 12 hr while leave and root of Kps 01-11-6 treated with 16 % and 28 % PEG for 12 hr, respectively, showed the highest expression of the gene. For the expression of *MIPS* gene, the results revealed that the leave and root of Kps 94-13 treated with 28 % PEG for 12 hr had the highest expression of the gene. Leave of Kps 01-11-6 treated with 16 % PEG and root of the plant treated with 28 % PEG for 12 hr showed the highest expression of *MIPS* gene.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สนธิชัย จันทน์เปรม ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.นงลักษณ์ เทียนเสรี กรรมการที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำความรู้และข้อคิดต่างๆ ทั้งในเรื่องการเรียนและการค้นคว้าวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสริมศิริ จันทน์เปรม ที่ได้ให้ความเมตตา คำแนะนำและความรู้ ตลอดจนอนุเคราะห์อุปกรณ์ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์ทั้งอุปกรณ์ และสถานที่สำหรับงานวิจัยนี้

ขอบคุณ นางสาวชนากานต์ ลักษณะ ที่ได้ชี้แนะแนวทางในการทำงาน อธิบายการทำงานให้เข้าใจมากยิ่งขึ้น ตลอดจนการใช้ชีวิตในการเรียน

ขอขอบคุณ นางสาวสกุลรัตน์ สุวรรณ โฉม และนางสาววณัญญา ฐิติผล ที่ได้คำปรึกษาและรับฟังปัญหาต่างๆ เป็นกำลังใจให้ทำงานสำเร็จลุล่วงผ่านไปอย่างดี และขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อพืชและการถ่ายยีน A207 ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว ที่คอยเป็นกำลังใจให้คำปรึกษา ให้การส่งเสริมในด้านการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์แก่ข้าพเจ้าด้วยดีเสมอมา

บุศริน อิ่มอินทร์
กรกฎาคม 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	
อุปกรณ์	20
วิธีการ	22
ผลและวิจารณ์	28
สรุป	60
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	61
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	71

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	degenerate ไพรเมอร์ของยีน <i>BADH</i> <i>MIPS</i> และ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน <i>Actin</i>	25
2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับ real-time PCR ที่จำเพาะกับยีน <i>Actin</i> <i>BADH</i> และ <i>MIPS</i>	27
3	การให้คะแนนอาการของไบอ้อยในการทดสอบในสภาพขาดน้ำโดยเติม PEG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	33
4	ค่าเฉลี่ยของคะแนนอาการของไบอ้อยในการทดสอบในสภาพขาดน้ำโดยเติม PEG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	34
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน <i>BADH</i> และ <i>MIPS</i>	39
6	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>BADH</i> ที่สังเคราะห์ได้กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN Version 2.2.25	42
7	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>MIPS</i> ที่สังเคราะห์ได้กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN Version 2.2.25	44

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงการสังเคราะห์ glycine betaine	14
2	แสดงการสังเคราะห์ inositol	17
3	การให้คะแนนแสดงความรู้แรงของลักษณะอาการและการตอบสนองต่อสภาพ ขาดน้ำคะแนน 0-4 ตามลำดับ	23
4	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยสายพันธุ์ Kps 94-13 เพื่อชักนำต้น	28
5	การเพาะเลี้ยงอ้อยสายพันธุ์ Kps 94-13 ในสภาพขาดน้ำในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เติม PEG 16 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ	29
6	การเพาะเลี้ยงอ้อยสายพันธุ์ Kps 94-13 ในสภาพขาดน้ำในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เติม PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ	30
7	การเพาะเลี้ยงอ้อยสายพันธุ์ Kps 01-11-6 ในสภาพขาดน้ำในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เติม PEG 16 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ	31
8	การเพาะเลี้ยงอ้อยสายพันธุ์ Kps 01-11-6 ในสภาพขาดน้ำในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เติม PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ	32
9	แถบอาร์เอ็นเอที่สกัดจากใบและรากอ้อย	37
10	ตรวจสอบหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม สำหรับปฏิกิริยา PCR โดยใช้ first stranded cDNA ของอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ที่ได้รับ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง และไพรเมอร์ของยีน <i>BADH</i> และ ยีน <i>MIPS</i>	38
11	การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน ดีเอ็นเอคู่สมที่ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ จำเพาะ กับยีน <i>BADH</i> และ <i>MIPS</i>	46
12	การสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สมจาก first stranded cDNA ของใบ และรากอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน <i>BADH</i>	47
13	การสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สมจาก first stranded cDNA จากใบและรากอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน <i>BADH</i>	48
14	การสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สมจาก first stranded cDNA ของใบ และรากอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน <i>MIPS</i>	49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	การสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สมจาก first strand cDNA ของใบ และรากอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน <i>MIPS</i>	50
16	ระดับการแสดงออกของยีน betaine aldehyde dehydrogenase ในใบอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ที่ได้รับ PEG 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 6-120 ชั่วโมง	53
17	ระดับการแสดงออกของยีน betaine aldehyde dehydrogenase ในรากอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ที่ได้รับ PEG 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 6-120 ชั่วโมง	53
18	ระดับการแสดงออกของยีน betaine aldehyde dehydrogenase ในใบอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ที่ได้รับ PEG 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 6-120 ชั่วโมง	54
19	ระดับการแสดงออกของยีน betaine aldehyde dehydrogenase ในรากอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ที่ได้รับ PEG 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 6-120 ชั่วโมง	54
20	ระดับการแสดงออกของยีน myo-inositol 1-phosphate synthase ในใบอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ที่ได้รับ PEG 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 6-120 ชั่วโมง	55
21	ระดับการแสดงออกของยีน myo-inositol 1-phosphate synthase ในรากอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ที่ได้รับ PEG 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 6-120 ชั่วโมง	55
22	ระดับการแสดงออกของยีน myo-inositol 1-phosphate synthase ในใบอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ที่ได้รับ PEG 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 6-120 ชั่วโมง	56
23	ระดับการแสดงออกของยีน myo-inositol 1-phosphate synthase ในรากอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ที่ได้รับ PEG 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 6-120 ชั่วโมง	56

การโคลนบางส่วนของยีน Betaine Aldehyde Dehydrogenase และ Myo-Inositol 1-Phosphate Synthase ที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำ

Partial Cloning of Betaine Aldehyde Dehydrogenase and Myo - Inositol 1 - Phosphate Synthase Genes for Water Deficit Response in Sugarcane

คำนำ

อ้อย เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกน้ำตาลในอันดับต้น ๆ ของโลก อ้อยเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในอุตสาหกรรมอ้อย และน้ำตาล คังนั้นอ้อยที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรมนั้นย่อมจะต้องให้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพดี การวิจัยและพัฒนาพันธุ์อ้อยเพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถช่วยเพิ่มผลผลิต ตลอดจนลดต้นทุนการผลิตอ้อย เนื่องจากอ้อยแต่ละพันธุ์มีศักยภาพการให้ผลผลิตและคุณภาพในแต่ละเขตพื้นที่แตกต่างกัน สำหรับการวิจัย และพัฒนาอ้อยพันธุ์ ให้ได้พันธุ์อ้อยที่สามารถปรับตัวและให้ผลผลิตสูงทั้งประเทศเป็นสิ่งที่ทำได้ยาก เนื่องจากต้องใช้เวลาและงบประมาณมาก ความแห้งแล้งเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลกระทบต่อผลผลิต จึงมีแนวคิดการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้ร่วมกับวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐาน

ปัจจุบันมีการใช้เทคโนโลยีชีวภาพมาคัดเลือก ปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อศึกษาพันธุกรรมเพื่อ นำข้อมูลที่ได้มาพัฒนาสายพันธุ์อ้อยให้เหมาะสมกับสภาพภูมิประเทศ การใช้เครื่องหมายโมเลกุล ช่วยการคัดเลือก (marker-assisted selection) ซึ่งไม่ใช่วิธีตัดแปลงพันธุกรรมก็เป็นอีกวิธีที่ใช้ในการคัดเลือกพืชให้ได้ลักษณะที่ต้องการ นอกจากนี้ยังได้มีการคัดเลือกพืชทนแล้งโดยการใช้เทคนิค เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชบนอาหารที่เติมสาร osmoticum บางชนิด เช่น polyethylene glycol (PEG) โดยสารเหล่านี้จะลด osmotic potential ในสารละลายที่อยู่รอบเซลล์ ทำให้เซลล์อยู่ในสภาพขาดน้ำ จากนั้นจะคัดเลือกเซลล์ที่ทนต่อสภาพขาดน้ำแล้วนำมาชักนำให้เป็น ต้นพืชที่สมบูรณ์ แล้วนำต้นที่ได้ไปทดสอบความทนแล้งอีกทีหนึ่ง อย่างไรก็ตามการทดลอง ดังกล่าว จำเป็นต้องใช้เวลาในการพัฒนางานวิจัยเพื่อให้สามารถนำไปใช้ได้จริงในสภาพธรรมชาติ

ในสภาวะเครียดจากการขาดน้ำสามารถชักนำการแสดงออกของยีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้อง ในพืช การบ่งชี้ว่ายีนใดบ้างที่เกี่ยวข้องและมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อสภาวะดังกล่าวของ อ้อยจึงสามารถนำความรู้นี้ไปประยุกต์เพื่อการคัดเลือกอ้อยทนแล้งได้ในอนาคต ในปัจจุบันได้มี

การนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์พืช ทำให้สามารถคัดเลือกต้นที่มีลักษณะ (มีฮีน) ที่ต้องการ ได้ตั้งแต่ระยะที่เป็นต้นกล้า จึงเป็นการประหยัดแรงงาน เงินงบประมาณและเวลาปฏิบัติงานลงอย่างมาก และสามารถลดความแปรปรวนของสภาพแวดล้อมที่อาจมีผลต่อลักษณะที่ต้องการคัดเลือกได้ โดยเฉพาะลักษณะทนแล้งการคัดเลือกในแปลงทดลอง ซึ่งไม่สามารถควบคุมความสม่ำเสมอได้เลย อย่างไรก็ตามในการใช้เทคนิคนี้ต้องอาศัยเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงอย่างใกล้ชิดกับลักษณะที่ต้องการคัดเลือก จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพสูงช่วยในการคัดเลือก



วัตถุประสงค์

เพื่อโคลนบางส่วนของยีนที่ควบคุมการสร้างสาร Betaine Aldehyde Dehydrogenase และ Myo-Inositol 1-Phosphate Synthase ที่แสดงออกเพื่อตอบสนองสภาพขาดน้ำในอ้อย



การตรวจเอกสาร

อ้อย

อ้อย (*Saccharum spp.*) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Gramineae อ้อยเป็นพืชที่มนุษย์รู้จักมาช้านาน ปัจจุบันอ้อยมีความสำคัญด้านอุตสาหกรรมของไทยเป็นอย่างมาก ประเทศไทยสามารถส่งออกผลิตภัณฑ์จากอ้อยในรูปของน้ำตาลดิบ น้ำตาลทราย กากน้ำตาลดิบ ตลอดจนใช้เป็นพืชพลังงานทดแทนเพื่อผลิตเอทานอล ในปีพุทธศักราช 2556 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อยโรงงานถึง 9,487,320 ไร่ (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2556) สามารถให้ผลผลิตน้ำตาล 100,148,689 ตันต่อปี และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในแต่ละปีอ้อยมีมูลค่าทางเศรษฐกิจไม่น้อยกว่า 7 หมื่นล้านบาท เมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตของอ้อยในไทยกับประเทศต่าง ๆ พบว่าบราซิลยังคงเป็นผู้ส่งออกน้ำตาลอันดับหนึ่ง ตามด้วย ไทย อินเดีย และออสเตรเลีย

พื้นที่ปลูกอ้อยของประเทศไทยส่วนใหญ่อาศัยน้ำฝน ผลผลิตอ้อยที่ได้ในแต่ละปีจึงไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับปริมาณและการกระจายของฝนในแต่ละปี (ประเสริฐ, 2542) ปริมาณน้ำจะเกี่ยวข้องกับการใช้ปุ๋ยของอ้อย เพราะถ้ามีน้ำเพียงพอการละลายของปุ๋ยก็จะดีขึ้น พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างเต็มที่ ซึ่งอ้อยมีช่วงการเจริญเติบโตตรงกับช่วงขาดน้ำในฤดูแล้ง (60-150 วัน) จึงเป็นช่วงวิกฤตของความต้องการน้ำของอ้อยจะมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต ลักษณะของ ปากใบ ค่า water potential และผลผลิต สภาพอากาศที่แห้งแล้งต้นฤดูปลูกทำให้บางพื้นที่ประสบปัญหาอ้อยปลูกใหม่และอ้อยต่อแก่ไม่เพียงพอไม่เจริญเติบโต และพืชจะเหนี่ยวนาให้ย่นที่เกี่ยวข้องแสดงออก โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่หนึ่งคือกลุ่มที่ป้องกันและต้านทานต่อความเครียดจากสภาพแวดล้อมที่ทำให้เกิดความเครียด ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการป้องกันเซลล์จากการเสียน้ำ เช่น เอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์สารในกลุ่ม osmoprotectants, late embryogenesis abundant (LEA) protein, antifreeze proteins และ chaperones กลุ่มที่สองคือกลุ่มที่ควบคุมการแสดงออกของยีนและการส่งสัญญาณในการตอบสนองความเครียด ซึ่งประกอบด้วย transcription factor และ protein kinase ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในกระบวนการสันดาปของฟอสโฟอินโนซิไทด์ ซึ่งเป็นไขมันที่ประกอบด้วยฟอสโฟไลปิดและอินโนซิโทล (Inositol) แยกตัวได้เป็นอินโนซิโทลไตรฟอสเฟต (Inositol-1, 4, 5-Triphosphate, IP3) โดย IP3 เป็นสารละลายที่ดีที่พบอยู่ในส่วนของไซโทโซล โดย IP3 เคลื่อนย้ายต่อไปยังเซลล์เมมเบรนของแวคิวโอล (tonoplast) ไปจับกับตัวรับที่บริเวณเมมเบรนของแวคิวโอล และถูกปลดปล่อยออกมาสู่ไซโทโซล ซึ่งเป็นการสลายโมเลกุลของสารอาหารคาร์โบไฮเดรต โดยการสันดาปด้วยออกซิเจน

เพื่อนำพลังงานไปใช้ในกิจกรรมดำเนินชีวิต (Hirt and Shinozaki, 2004)

การตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำของอ้อย

ในสภาพขาดน้ำทำให้ปริมาณน้ำลดลงจนพืชสูญเสียความเต่งของเซลล์หรือเหี่ยว ซึ่งส่งผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยา ได้แก่ การปิดของปากใบ การม้วนใบ การสะท้อนแสงของใบ และการลดพื้นที่ใบ ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำของพืชที่สภาวะขาดน้ำที่รุนแรง Begg (1980) กล่าวถึงการม้วนใบหรือการม้วนใบ เมื่อสภาวะขาดน้ำเกิดขึ้นพืชจะมีการม้วนใบขนานกับทิศทางของแสงที่เรียกว่า ใบตั้ง เกิดจากชั้นอพิเคอร์มิสมิเซลล์ขนาดใหญ่และผนังเซลล์บาง เรียกว่า บัลลิฟอร์มเซลล์ (bulliform cell) ช่วยทำให้ใบม้วนงอลดการคายน้ำของพืช และปรับตัวเพื่อลดอุณหภูมิใบเมื่อพืชมีการสูญเสียน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Johnson *et al.* (1983) ที่พบว่า ใบอ้อยที่ขาดน้ำจะมีขนที่ใบเพิ่มขึ้นเพื่อช่วยสะท้อนแสงเช่นเดียวกับ Begg and Turner (1976) กล่าวว่าทานตะวันทานที่ขาดน้ำจะลดพื้นที่ใบเพื่อที่จะช่วยลดการสูญเสียน้ำ เพราะการสูญเสียน้ำของพืชมีความสัมพันธ์กับพื้นที่ใบ โดยพื้นที่ใบจะลดลงเมื่อศักย์ของน้ำในใบลดลง การขยายตัวของใบเป็นขบวนการทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำเร็วที่สุด (Bradford and Hsiao, 1982)

ดังนั้นน้ำจึงเป็นปัจจัยการผลิตหลักที่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตอ้อย หากอ้อยได้รับน้ำอย่างเพียงพอตลอดช่วงการเจริญเติบโต ผลผลิตอ้อยจะได้ไม่ต่ำกว่า 15 ตันต่อไร่ อ้อยต้องการน้ำเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างน้ำตาล อ้อยที่ขาดน้ำจะเจริญเติบโตช้า ผลผลิตต่ำและให้ความหวานต่ำ พื้นที่เพาะปลูกอ้อยส่วนใหญ่อยู่ในเขตอาศัยน้ำฝนเป็นหลัก มีเพียงส่วนน้อยที่อยู่ในเขตชลประทาน อ้อยต้องการน้ำเพื่อการเจริญเติบโตตลอดปีประมาณ 1,500 มิลลิเมตร (เรวัต, 2551) ความต้องการน้ำและการตอบสนองต่อการให้น้ำของอ้อยจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อการผลิตอ้อยให้ได้ผลผลิตสูงตลอดระยะเวลาการเจริญเติบโต ความต้องการน้ำของอ้อยจะขึ้นกับสภาพภูมิอากาศและช่วงระยะการเจริญเติบโต โดยแบ่งระยะความต้องการน้ำของอ้อยไว้ 4 ระยะ คือ

1. ระยะตั้งตัว (0-30 วัน) เป็นระยะที่อ้อยเริ่มงอกจนมีใบจริงและเป็นต้นอ่อน ระยะนี้อ้อยต้องการน้ำในปริมาณไม่มาก เพราะรากอ้อยมีขนาดเล็กและการคายน้ำต่ำ และความชื้นในดินดีพอเหมาะกับการงอก เพราะความชื้นในดินน้อยเกินไปตาอ้อยจะไม่งอกหรืองอกแล้วก็อาจจะเหี่ยวเฉาและถ้าความชื้นสูงเกินไปตาอ้อยเน่า

2. ระยะเจริญเติบโตทางลำต้น (31-170 วัน) ระยะนี้รากอ้อยเริ่มแพร่กระจายออกไปทั้งในแนวดิ่งและแนวระดับเป็นระยะที่อ้อยกำลังแตกกอและสร้างปล้องเป็นช่วงที่อ้อยต้องการน้ำมาก ถ้าอ้อยได้รับน้ำในปริมาณที่เพียงพอในระยะนี้ จะทำให้อ้อยมีจำนวนลำต้อกอมาก ปล้องยาว ทำให้อ้อยมีลำยาว และผลผลิตสูง การให้น้ำจึงต้องให้บ่อยครั้ง

3. ระยะสร้างน้ำตาลหรือช่วงสร้างผลผลิต (171-295 วัน) ปริมาณการใช้น้ำและอัตราการคายน้ำต่ำ พื้นที่ใบอ้อยที่ใช้ประโยชน์ได้จะลดลง มีผลต่อการตอบสนองต่อแสงแดดลดลงเช่นกัน

4. ระยะสุกแก่ (296-330 วัน) เป็นช่วงที่อ้อยต้องการน้ำน้อย และในช่วงก่อนเก็บเกี่ยว ๕-8 สัปดาห์ ควรหยุดให้น้ำ เพื่อลดปริมาณน้ำในลำต้นอ้อยซึ่งอยู่ในระยะการสร้างน้ำตาล (เรวัต 2551)

การตอบสนองของพืชในสภาพขาดน้ำ

การเกิดความเครียดในสภาพขาดน้ำ มักจะเกิดจากความแห้งแล้ง เนื่องจากพืชมีการคายน้ำมากกว่าปกติ นอกจากนั้นอาจเกิดจากพืชไม่สามารถควบน้ำไปใช้ได้เนื่องจากอากาศหนาวเย็น และดินมีสารละลายเกลือที่เข้มข้นสูง (salt stress) หรือระบบรากได้รับอันตราย ถึงแม้พืชจะอยู่ในดินที่มีความชื้นในขณะที่พืชได้รับน้ำมากเกินไปทำให้ปริมาณออกซิเจนที่พืชได้รับลดลง ส่งผลให้การหายใจ การดูดธาตุอาหารพืชและกิจกรรมต่าง ๆ ของรากลดลง (นพพร, 2543)

1. กลไกการตอบสนองในสภาพขาดน้ำ

สภาวะขาดน้ำ (water deficit) เป็นความเครียดซึ่งเกิดขึ้นในพืชเกือบตลอดเวลา และเป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและปริมาณผลผลิตพืช สภาวะขาดน้ำอาจเกิดได้หลายสาเหตุ เช่น สภาพแล้ง สภาพดินเค็ม และสภาพอุณหภูมิต่ำ ซึ่งสภาพที่กล่าวมานั้นจะทำให้พืชไม่สามารถควบน้ำเข้าสู่เซลล์พืชได้ ทำให้พืชมีการเปลี่ยนแปลงเพื่อปรับตัวให้เจริญเติบโตต่อไปได้ เช่น การปิดปากใบของพืชเพื่อลดการคายน้ำ การสังเคราะห์ฮอร์โมน เช่น กรดแอบซีสิก (abscisic acid, ABA) และการสะสมตัวถูกละลาย เช่น โพรลีน น้ำตาลแอลกอฮอล์ เพื่อรักษาสมดุลภายในเซลล์ และทำให้เกิดการออสโมซิสของน้ำกลับเข้ามาในเซลล์ให้มากขึ้น เพื่อชะลอการลดของแรงดันเต่งไม่ให้แรงดันเต่งลดลง เป็นการรักษาภาวะสมดุลเอาไว้ การทนแล้ง (drought tolerance) เป็นความสามารถของพืชที่จะมีชีวิตรอดได้ เมื่อพืชแต่ละชนิดที่อยู่ในสภาพแล้งจะมีกลไกการทำงานเพื่อให้พืชนั้นๆ สามารถอยู่รอดได้นั้นจะแตกต่างกันไป (ชุมพล, 2549) ความสามารถในการต้านทานความแห้งแล้ง แบ่งได้ดังนี้คือ

1.1 drought escape

เป็นความสามารถของพืชที่ทำให้พืชเจริญครบวงจรได้รวดเร็วขึ้นเมื่อพืชได้รับผลกระทบจากสภาวะขาดน้ำ จะมีการให้ผลผลิตเร็วขึ้น Steven (2011) รายงานในต้นยาสูบเมื่อเข้าสภาพแล้ง พบว่าจะมีการออกดอกเร็วกว่าในสภาพปกติ และลดจำนวนใบเพื่อลดการคายน้ำ หลบหลีกเลี่ยงให้ต้นพืชไม่ได้รับผลกระทบในสภาวะขาดน้ำ หรืออาจจะขยายระยะเวลาของการออกดอกออกไป จากนั้นเมื่อพืชได้รับน้ำภายหลังจากช่วงแล้งไป ก็จะฟื้นตัวออกดอก และให้ผลผลิตได้

1.2 drought avoidance

เป็นลักษณะของพืชที่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ ด้วยการลดความสูญเสียภายในต้นพืช เมื่อประสบกับสภาวะความแห้งแล้ง ด้วยกลไกต่าง ๆ เช่น การม้วนของใบ การควบคุมการปิดปากใบให้เร็ว เช่น alfalfa (*Medicago sativa*) มีระบบรากที่ลึกไปถึงชั้นดินที่มีน้ำอยู่ หรือในพืชกลุ่มกระบองเพชร ที่มีใบที่ลดรูปเป็นหนาม ส่วนพืชอื่น ๆ อาจจะมีใบอวบน้ำ ชั้นคิวติเคิลหนาขึ้น การมีไข (wax) เคลือบใบ และมีขนที่ผิวใบเพื่อลดการคายน้ำ ซึ่งพืชที่มีลักษณะเหล่านี้จะสามารถรักษาแรงเต่งของเซลล์ และสามารถรักษาปริมาณน้ำภายในเซลล์ไว้ได้ (อัญชลี, 2556)

1.3 drought tolerance

กลไกที่พืชตอบสนองต่อการขาดน้ำ โดยภายในต้นพืชขาดน้ำที่เข้าขั้นวิกฤต พืชจะมีกลไกที่ทำให้ศักย์ของน้ำ (water potential) ในพืชลดลง โดยพืชจะสร้างสารหรือมีการสะสมสารตัวถูกละลาย (solute accumulation) เพื่อปรับระดับความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์ ซึ่งสารเหล่านี้จะไปลด ค่า osmotic potential ภายในเซลล์ ส่งผลให้พืชสามารถดูดน้ำเข้าสู่เซลล์ได้ เซลล์จึงเต่งทำให้ลดสภาวะที่จะเกิดระดับน้ำวิกฤตที่จะทำให้พืชตายได้ (Farooq *et al.*, 2009)

2. การตอบสนองในเชิงสรีรวิทยาและชีวเคมี

เมื่อพืชเกิดความเครียดจากการขาดน้ำจะมีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิต ซึ่งผลกระทบที่เกิดขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ระยะการเจริญเติบโต และระดับความรุนแรงที่เกิดจากความเครียดจากการขาดน้ำ พืชแต่ละชนิดจะมีกิจกรรม และกระบวนการต่าง ๆ ของพืชต่างกัน (เฉลิมพล, 2542; ศรีสม, 2549; Nilsen and Orcutt, 1996)

2.1 การเจริญเติบโตทางลำต้น ใบ และผลผลิต

เมื่อเซลล์อยู่ในสภาพขาดน้ำแรงดันเต่งภายในเซลล์ลดลงทำให้การแบ่งเซลล์ และการขยายตัวของเซลล์ลดลง ส่งผลให้เซลล์มีขนาดเล็กกว่าปกติ เมื่อเซลล์มีขนาดเล็กทำให้รูปแบบการเจริญของพืชทั้งต้นผิดปกติโดยขึ้นอยู่กับระยะเจริญเติบโตของพืช เช่น ถ้าพืชขาดน้ำช่วงที่มีการแบ่งเซลล์ และขยายตัวของเซลล์จะทำให้พื้นที่ใบลดลง ส่งผลให้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่จะเข้ามาน้อยลงเนื่องจากใบมีขนาดเล็ก ถ้าแรงดันเต่งภายในเซลล์ลดลงในขณะที่พืชสร้างดอกก็จะทำให้จำนวนดอกลดลงหรือถ้าเกิดขึ้นในระยะผสมเกสรจะมีผลทำให้ไม่มีการผสมเกสรส่งผลต่อกระบวนการสืบพันธุ์ และถ้าขาดน้ำในช่วงที่ผลเจริญเต็มที่การสะสมน้ำหนักเมล็ดจะลดลงทำให้ผลผลิตลดลง (อาทิตยา และ จักรี, 2553)

2.2 การสังเคราะห์แสง

การที่ปากใบปิดหรือลดขนาดลง เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำทำให้การดูดซึมเข้าของคาร์บอนไดออกไซด์ลดลง ทำให้การสังเคราะห์แสงลดลง นอกจากนี้ถ้าปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้นจะไปกระตุ้นให้เกิด photorespiration โดยกระบวนการนี้ทำให้ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงลดลง เนื่องจากมีการนำ RuBP ซึ่งเป็น carbon receptor ในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ มาใช้ในกระบวนการ photorespiration และกระบวนการนี้ไม่มีการสร้างพลังงาน ATP (Chaves *et al.*, 2009)

2.3 การปรับแรงดันออสโมติก

การดูดน้ำในพืชจะถูกขับเคลื่อนโดยความต่างศักย์ของน้ำ (water potential) จากรากไปสู่ส่วนเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืช ศักย์ของน้ำจะสูงสุดที่ราก (ส่วนเนื้อเยื่อเจริญจะมีศักย์ของน้ำต่ำที่สุด) น้ำเข้าไปสู่เซลล์ที่กำลังเจริญเติบโตทำให้เซลล์เกิดแรงดันเต่งมีผลให้ผนังเซลล์ขยายขนาด เมื่อพืชเกิดความเครียดจากการขาดน้ำก็จะเพิ่มความต่างศักย์ของน้ำ ในเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโต โดยการปรับค่าศักย์ออสโมซิส (osmotic potential) ในแต่ละจุด ซึ่งกระบวนการนี้เกิดจากการสะสมสารละลายในเซลล์ ซึ่งจะทำให้ค่าศักย์ออสโมซิสต่ำลง และช่วยรักษาความเต่งของทั้งยอด และราก ในขณะที่เกิดการขาดน้ำ (Ludlow and Muchow, 1990)

2.4 การสังเคราะห์โปรตีน

ภายใต้สภาพการขาดน้ำในเนื้อเยื่อจะลดการสังเคราะห์โปรตีน โดยการสังเคราะห์โปรตีนจะเกิดขึ้นพร้อมกับการสลายของ polysome ในสภาพที่ขาดน้ำมาก การสลายของ polysome จะลดลงมากในเนื้อเยื่อที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ส่วนเนื้อเยื่อที่มีอายุมากจะมีการเปลี่ยนแปลงของ polysome น้อย (Nguyen and Joshi, 1992)

2.5 ฮอร์โมนพืช

สภาพเครียดจากการขาดน้ำจะมีผลทำให้มีฮอร์โมนพืชมีการเปลี่ยนแปลง ส่งผลต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาของพืช เช่น กรดแอบซิวติก (abscisic acid, ABA) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดหนึ่งของพืชเมื่อพืชอยู่ภายใต้สภาวะความเครียด เช่น สภาวะแล้ง จะมีปริมาณกรดแอบซิวติกเพิ่มสูงขึ้น โดยมีผลทำให้พืชปิดปากใบเพื่อลดการคายน้ำ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ากรดแอบซิวติกมีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนบางชนิด ซึ่งทำให้พืชสามารถปรับตัวให้อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อไปได้ระยะหนึ่ง (Chandler and Robertson, 1994) สำหรับกรดอินโดลอะซีติก (indoleacetic acid, IAA) จะมีปริมาณลดลง มีผลทำให้เกิดการแก่และร่วงของใบซึ่งทำให้พื้นที่ใบลดลง (ปริยาภรณ์ และคณะ, 2549) เช่นเดียวกับ ไซโตไคนิน (cytokinins, CK) ที่ช่วยชะลอการแก่และร่วงของใบ แต่เมื่อพืชขาดน้ำจะมีผลทำให้การสร้างในรากมีปริมาณลดลงซึ่งจะมีผลต่อการปิดของปากใบ เพราะการปิดเปิดของปากใบขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของ ABA และ CK เมื่ออัตราส่วนนี้มีค่าสูงขึ้นจะส่งผลให้มีการปิดของปากใบ นอกจากนี้พบว่าสภาวะขาดน้ำของพืชมีผลชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ ethylene ซึ่งทำให้เกิดการแก่และร่วงของใบเร็วขึ้น ส่วนในจิบเบอเรลลิน (gibberellins, GA) พบว่าสภาวะขาดน้ำของพืชมีผลทำให้ปฏิกิริยาของ GA ในใบพืชลดลง (ชุมพล, 2549)

2.6 การสะสมสารออสโมไลต์ (osmolytes)

การตอบสนองความเครียดจากการขาดน้ำโดยการผลิตและสะสมสารที่อยู่ในกลุ่มของ osmoprotective compounds ซึ่งเป็นที่รู้จักในชื่อ compatible solutes เป็นโมเลกุลของสารอินทรีย์ ขนาดเล็กที่ไม่มีพิษต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม ประกอบด้วย proline, glycine betaine, polyols, sugar alcohols และ soluble sugars โดยสารเหล่านี้จะช่วยรักษาสภาพโปรตีนและโครงสร้างของเซลล์ และยังสามารถเพิ่มแรงดันออสโมติกในเซลล์ glycine betaine และ trehalose ซึ่งทำหน้าที่รักษาโครงสร้างจตุรภูมิและเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อพืชอยู่ในสภาวะที่มีความเครียดจากการ

ขาดน้ำจะมีกลไกควบคุม osmotic pressure ของเซลล์ให้เหมาะสมโดยการสะสมสารออสโมไลต์ เช่นเดียวกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส และฟรุกโตสสามารถปลดปล่อยจากแป้ง และ ฟรุกโตส เพื่อใช้ในการตอบสนองต่อความเครียด และเมื่อความเครียดหายไปน้ำตาลเหล่านี้ก็จะสามารถกลับคืนสู่รูปเดิมโดยกระบวนการรีโพลีเมอไรส์ (Chen and Norio, 2002) สารออสโมไลต์ ที่สำคัญได้แก่

2.6.1 Proline

Proline คือกรดอะมิโนชนิดหนึ่ง ถูกสร้างขึ้นมาจากกรดกลูตามิก โดยทั่วไป พืชจะมีการสะสม โพรลีนอยู่แล้ว แต่มีอยู่ในระดับต่ำ (Gzik, 1996) เมื่อพืชได้รับสภาพขาดน้ำจะส่งผลให้น้ำในพืชลดลง พืชจะมีการลดความต่างศักย์ของน้ำเพื่อช่วยให้เกิดความต่างศักย์ของน้ำระหว่างดินกับพืช เมื่อน้ำในดินลดน้อยลงจนถึงจุดที่พืชดึงไปใช้ได้้น้อยมาก พืชจะมีการปิดปากใบเพื่อลดการคายน้ำ (สายันท์, 2537) พืชจะมีการรักษาศักย์ของน้ำ พืชจะมีกระบวนการปรับแรงดันออสโมติกภายในเซลล์และมีการสะสมสารบางชนิดในรูปของสารละลายเช่น โพรลีน ไกลซีนบีเทน กรดอินทรีย์ และน้ำตาล ภายในไซโตพลาสซึม (Hore *et al.*, 1998) และ Chang and Dandeker (1995) รายงานว่าภายใต้สภาพที่เซลล์ถูกทำลายหรือได้รับอันตราย มีการสะสมปริมาณ โพรลีนที่สูง ซึ่งเป็นการสะสมสารประกอบไนโตรเจน (Barnett and Naylor, 1966) และคาร์บอน ไว้ภายในเซลล์ ซึ่งพืชจะได้นำไปใช้ในการเจริญเติบโตหลังจากฟื้นจากสภาพขาดน้ำ และพบว่าโพรลีนยังช่วยป้องกันการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์ และรักษาไม่ให้โปรตีนเสื่อมสภาพในระหว่างที่พืชได้รับสภาพแห้งแล้ง (Ain-Lhont *et al.*, 2000) กระบวนการสร้างโพรลีน เริ่มต้นจากสาร glutamate โดยมีเอนไซม์ γ -glutamyl kinase และ glutamyl-semialdehyde dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์คู่แรกของกระบวนการ จากปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้จะได้สาร γ -glutamyl-semialdehyde ต่อจากนั้นเกิดกระบวนการ dehydration โดยไม่มีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้องผลของปฏิกิริยาจะได้ pyrroline-5-carboxylate จากนั้นก็เกิดปฏิกิริยา reduction โดยใช้เอนไซม์ pyrroline-5-carboxylate reductase จากปฏิกิริยานี้จะได้สาร โพรลีน โดยที่บางส่วนจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการสร้างโปรตีน บางส่วนเคลื่อนย้ายเข้าสู่ท่อลำเลียงอาหาร (Hanson and Hitz, 1982)

2.6.2 glycine betaine

glycine betaine เป็นสารประกอบแอมโมเนียม พบว่ามีการสะสมในพืชหลายชนิด นอกจากนั้นยังพบใน แบคทีเรีย และ สาหร่าย ซึ่งในพืชแต่ละชนิดจะพบชนิดของสารที่

แตกต่างกันไป (Andre and Takabe, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะความเครียดต่างรูปแบบกัน ส่งผลให้มีการสะสมสารต่างชนิดกันด้วย เช่น alanine betaine พบสะสมในพืชที่เจริญอยู่ในสภาพดินเค็ม choline-o-sulfate พบสะสมในพืชที่เจริญอยู่ในสภาพดินที่มีซัลเฟต proline betaine พบสะสมในพืชที่เจริญอยู่ในสภาพแล้ง สารที่สำคัญในกลุ่มนี้คือ glycine betaine จะมีการตอบสนองเมื่อได้รับความเครียดจากความแล้ง ความเค็ม glycine betaine ทำหน้าที่ปกป้องพืชโดยการเปลี่ยนแปลงสารประกอบออสโมไลต์ ซึ่งจะช่วยรักษาสมดุลของน้ำระหว่างเซลล์พืชกับสภาพแวดล้อมภายนอก เพื่อรักษาเสถียรภาพของเซลล์ (Fitzgerald *et al.*, 2008)

2.6.3 Trehalose

Trehalose จัดอยู่ในกลุ่มน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ในพืชสังเคราะห์มาจาก UDP-glucose โดยการเร่งปฏิกิริยาจากเอนไซม์ trehalose-6-phosphate synthase (TPS) เป็น glucose-6-phosphate หลังจากนั้นถูกเอนไซม์ trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP) เร่งปฏิกิริยาได้เป็น Trehalose Alan *et al.* (2003) ได้รายงานการพบ trehalose ในยีสต์และพืชบางชนิด ซึ่งทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณหรือควบคุมการเผาผลาญภายในเซลล์ป้องกันโปรตีนและเยื่อหุ้มเซลล์ที่ได้รับสภาพความเครียดจากความแห้งแล้ง (Kaushik and Baht, 2003) จากการศึกษาของ Goddijin and Dun (1999) พบว่าในสิ่งมีชีวิตที่เจริญเติบโตอยู่ในสภาวะเครียดต่าง ๆ (abiotic stress) จะมีการสะสมน้ำตาล trehalose เพิ่มมากขึ้นซึ่งเป็นสารในกลุ่ม osmolyte ที่ทำหน้าที่ช่วยในการป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ และโปรตีนในเซลล์ต่อสภาวะเครียด ที่เป็นสาเหตุให้เกิดการขาดน้ำ และลดการตกตะกอนของโปรตีนที่เสียหายในพืชที่มีท่อลำเลียง (vascular plant)

2.6.4 Myo-inositol

myo-inositol เป็นสารในกลุ่ม osmoprotectant คือ น้ำตาลโพลีออล เช่น กลีเซอริน แมนนิทอล ซอลบิทอล และซูโครส ซึ่งถูกสังเคราะห์มาจาก D-glucose-6-P ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในการสร้างเนื้อเยื่อเมมเบรนรวมทั้งการส่งสัญญาณในการป้องกันเซลล์พืชจากสภาวะเครียด เมตาบอลิซึมของพืชซึ่งเป็นปฏิกิริยาการย่อยกลูโคส และเป็นแหล่งของคาร์บอนในช่วงแรกของกระบวนการงอก (Rathinasabapathi, 2000; Karner *et al.*, 2004) ปฏิกิริยา isomerization และ methylation ของ myo - inositol ได้อินุพันซ์ต่างๆ เช่น O-methyl inositol, sequeoyitol, bornesitol, pinitol และ ononitol ใช้เป็น signal transduction ของเซลล์พืช (Gillaspy, 2011) และทำหน้าที่ส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับฟอสเฟตที่ทำหน้าที่ควบคุมยีนและเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเผาผลาญ

ธาตุอาหาร ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องในการรักษาเสถียรภาพของเซลล์ในการป้องกันความเสียหายของเนื้อเยื่อและเอนไซม์ เพื่อเพิ่มความทนทานในพืชหลายชนิดที่ได้รับความเครียด

การคัดเลือกพืชที่ทนทานต่อสภาพแล้ง

การคัดเลือกพืชที่ทนทานต่อสภาพแล้งภายใต้สภาพธรรมชาติ เป็นกระบวนการที่ใช้เวลานาน และขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ เพราะฉะนั้นจึงมีการพัฒนากระบวนการคัดเลือกพืชที่ทนแล้งภายใต้สภาวะที่สามารถควบคุมได้ (Georgieva *et al.*, 2004) เช่น อาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ ซึ่งสามารถทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือกลุ่มเซลล์บนอาหารที่เติมสารออสโมติกัมบางชนิด เช่น โพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) น้ำตาลแมนนิทอล (mannitol) ซูโครส (sucrose) และกลูโคส (glucose) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะไปลด osmotic potential ของสารละลายที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ทำให้เซลล์ อยู่ในสภาพที่ขาดน้ำ (Bressan *et al.*, 1981) PEG ถูกนำมาใช้เพื่อทำให้เกิดภาวะเครียดจากการขาดน้ำมากกว่าสารละลายอื่น ๆ เพราะเป็นสารเหนียวเมื่อละลายน้ำไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่มีพิษต่อคน และสัตว์รวมทั้งไม่ดูดซึมเข้าไปในเซลล์พืช (Satvir *et al.*, 1998) ในขณะที่ซอร์บิทอล และแมนนิทอลสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์พืช และยังทำให้ค่า osmotic potential ของเซลล์ลดลง เช่น การศึกษาความแตกต่างของสารที่ใช้ชักนำให้เกิดความเครียดจากการขาดน้ำระหว่าง PEG และซอร์บิทอล ที่ -1.5 MPa ในข้าว (*Oryza sativa* c.v. Taichung Native 1) พบว่า PEG สามารถชักนำให้ใบข้าวเกิดความเครียดจากการขาดน้ำได้มากกว่าซอร์บิทอล (Hsu and Kao, 2003) และการเปรียบเทียบผลของแมนนิทอล และ PEG ที่ -0.8 และ -1.8 MPa ต่อการเจริญเติบโตของผักเบี้ยทะเล (*Sesuvium portulacastrum*) พบว่า PEG มีผลทำให้การเจริญเติบโตของผักเบี้ยทะเลลดลงมากกว่าแมนนิทอลอย่างมีนัยสำคัญ (Slama *et al.*, 2007) การใช้ PEG ชักนำให้เกิดภาวะเครียดจากการขาดน้ำกับต้นพืช เพื่อทดสอบและคัดเลือกพืชทนแล้งในห้องปฏิบัติการ เช่น การคัดเลือกพันธุ์ข้าวทนแล้งจากแคลลัส ที่ชักนำจากเมล็ด ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9 ไมโครโมลาร์ และ PEG 6000 ความเข้มข้น 100 และ 200 กรัมต่อลิตร โดยพิจารณาการงอก การชักนำให้เกิดแคลลัส และการเกิดต้นใหม่พบว่าพันธุ์ข้าว C 14-8 เป็นพันธุ์ที่สามารถทนแล้งได้ดีที่สุด

การตอบสนองระดับยีน

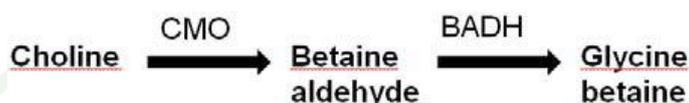
การตอบสนองระดับยีนเมื่อพืชได้รับความเครียดจากการขาดน้ำ จะส่งผลกระทบต่อทั้งในระดับเซลล์และกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น ทำให้อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลง

การเกิดสารอนุมูลอิสระหรือสารประกอบออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยา (reactive oxygen species) ซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิเดชันอย่างรุนแรง ทำให้โมเลกุลของสารต่าง ๆ ถูกทำลาย เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน เยื่อหุ้มเซลล์ รวมทั้งโครงสร้างของเซลล์พืช ทำให้เซลล์พืชตายได้ (Farooq *et al.*, 2009) เป็นต้นเหตุทำให้อัตราการเจริญเติบโตและผลผลิตลดลง (Cushman and Bohnert, 2000) เกิดการสร้างกลไกอย่างหนึ่งที่เกิดขึ้นคือการสร้างสารประกอบไนโตรเจน และคาร์โบไฮเดรต ที่ละลายน้ำได้เพิ่มมากขึ้น (Hanson and Hitz, 1982) ในเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงให้เป็นน้ำตาล ซึ่งทำให้เกิดการสะสมสารละลายเพื่อรักษาความดันน้ำในเซลล์ (solute accumulation) โดยการปรับแรงดันออสโมซิส (osmosis) ลดค่าความต่างศักย์ภายในเซลล์ ทำให้เกิดการออสโมซิสของน้ำกลับเข้ามาในเซลล์เพื่อชะลอการลดลงของแรงดันเต่งทำให้เซลล์รักษาสภาพ การตอบสนองความเครียดนี้จะผลิตสาร ในกลุ่ม osmoprotectant ในกลุ่มน้ำตาล polyols เช่น glycine betaine ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์จะมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ choline monooxygenase (CMO) และ betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) ซึ่งยีน *BADH* มีรายงานการศึกษาในสภาพเครียดต่าง ๆ เช่น ภาวะแล้ง ความเค็ม รวมทั้งในสภาพที่อากาศเย็น (Wood *et al.*, 1996; Sakamoto *et al.*, 1998; Oishi and Ebina, 2005) ในขณะที่ myo-inositol ซึ่งอยู่ในกลุ่มน้ำตาล polyols เมื่อพืชเกิดภาวะเครียดจากการขาดน้ำอัตราการสังเคราะห์แสงลดลง การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ลดลงทำให้พืชมีการสลายแป้งที่ถูกเก็บอยู่ที่ คลอโรพลาสต์ส่งผลให้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เป็นอนุพันธ์ของแป้งเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการปกป้องเซลล์ไม่ให้ถูกทำลาย ส่วนเอนไซม์ที่สังเคราะห์ myo-inositol คือ myo-inositol 1-phosphate synthase (MIPS) ซึ่งมีการศึกษาการแสดงออกของยีน *MIPS* ในสภาพการตอบสนองต่อการขาดน้ำในเสาวรส (Chatterjee *et al.*, 2006) รวมทั้งการถ่ายยีนเข้าในยาสูบเพื่อศึกษาการตอบสนองความเค็ม (Holmstrom *et al.*, 1994)

1. Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BADH)

BADH จัดเป็นเอนไซม์ที่เฉพาะเจาะจงกับสารตั้งต้นในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส (oxidoreductase) เป็นปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชันรีดักชัน (oxidation-reduction) เช่น เอนไซม์ในปฏิกิริยาการหายใจระดับเซลล์ ซึ่งมีการดึงอิเล็กตรอนและไฮโดรเจนไอออนจากสาร คือ เอนไซม์ ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) การสังเคราะห์จากออกซิเดชัน choline ใน chloroplast โดยเอนไซม์ choline monooxygenase ได้เป็น betaine aldehyde และออกซิโดซ์ด้วยเอนไซม์ betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) ได้เป็น glycine betaine จะเห็นได้ว่าการสะสม glycine betaine นั้นเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ ในพืชโดยทั่วไป พบว่ามีการแสดงออกยีนที่แตกต่างไปขึ้นอยู่กับเนื้อเยื่อ Weretilnyk and Hanson (1990) รายงานว่ายีน *BADH* ถูกพบครั้งแรกในคลอโรพลาสต์ ของผักโขม นอกจากนี้ยังพบยีนชนิดนี้ในต้น *Avicennia marina* ซึ่งเป็นพืชในแถบ

ป่าชายเลน (Liu *et al.*, 2010) ในข้าวสามารถ พบ *BADH1* และ *BADH2* ในส่วนของ peroxisomes เช่นเดียวกับในข้าวบาเลย์ ที่พบ *BADH1* และ *BADH2* การสะสม glycine betaine ของพืชเมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียดจากความแล้ง และความเค็ม glycine betaine ทำหน้าที่ปกป้องพืชโดยการเปลี่ยนแปลงสารประกอบออสโมไลต์ ซึ่งจะช่วยรักษาสมดุลของน้ำระหว่างเซลล์พืชกับสภาพแวดล้อมภายนอกเพื่อรักษาเสถียรภาพของเซลล์



ภาพที่ 1 แสดงการสังเคราะห์ glycine betaine

ที่มา: Liu *et al.* (2010)

Oishi and Ebina (2005) ได้ทำการโคลนยีน *BADH1* จากหญ้า *Zoysia tenuifolia* ที่ปลูกในสภาวะเค็ม เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการสังเคราะห์ยีน *BADH1* พบว่ามีนิวคลีโอไทด์จำนวน 1,892 คู่เบส และสามารถถอดรหัสไปเป็นกรดอะมิโนได้ 507 ตัว ซึ่งกรดอะมิโนที่ได้มีความเหมือน *BADH1* ในข้าวถึง 88 เปอร์เซ็นต์ Wood *et al.* (1996) ศึกษาการตอบสนองของข้าวฟ่าง ในสภาวะแห้งแล้ง พบว่า มีการสะสม glycine betaine มากขึ้นและได้ศึกษาระดับของเอนไซม์ BADH พบว่าระดับของเอนไซม์ BADH เพิ่มขึ้น 3 เท่า เมื่อปลูกข้าวฟ่างในสภาพขาดน้ำ Nakamura *et al.* (2001) ศึกษาในข้าวบาเลย์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะแล้ง พบว่าการตอบสนองต่อความเครียดจากความแห้งแล้ง และอุณหภูมิที่สูง มีความคล้ายคลึงกับความเค็ม Legaria *et al.* (1998) และ Meng *et al.* (2001) รายงานว่า *Amaranthus tricolor* ที่ปลูกในสภาวะอุณหภูมิสูงจะส่งผลให้ความเข้มข้นของโปรตีน BADH สูงขึ้น

Weigel *et al.* (1986) ศึกษาผลของความเครียดจากเกลือในผักโขม พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ BADH เพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่า หลังจากการได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติ Elizabeth and Hanson (1990) ศึกษาใน *BADH* ในผักโขมที่ปลูกในสภาวะเค็มโดยการทำให้ RNA blot analysis พบว่ามีการแสดงออกของยีน *BADH* สูงสุด เมื่อเทียบกับต้นปกติ Liu *et al.* (2010) ศึกษาการแสดงออกของยีน *BADH* ในข้าว *Ophiopogon japonicus* และหาความสัมพันธ์ของยีน *BADH* โดยการโคลนยีน และถ่ายยีนนี้เข้าสู่สาบพบว่าเป็นต้นสาบที่ได้รับการถ่ายยีน *BADH* มีการแสดงออกมากกว่าต้นปกติที่ไม่ได้ถ่ายยีน 2-2.5 เท่า

มีอัตราการรอด 60-80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้น ศยามล และคณะ (2554) ศึกษาการแสดงออกของ ยีนในต้นยูคาลิปตัสในสภาวะเค็ม พบว่ามีสะสมของสาร glycine betaine สูงขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับ ปริมาณเอนไซม์ BADH ในยูคาลิปตัสที่สูงขึ้นด้วย

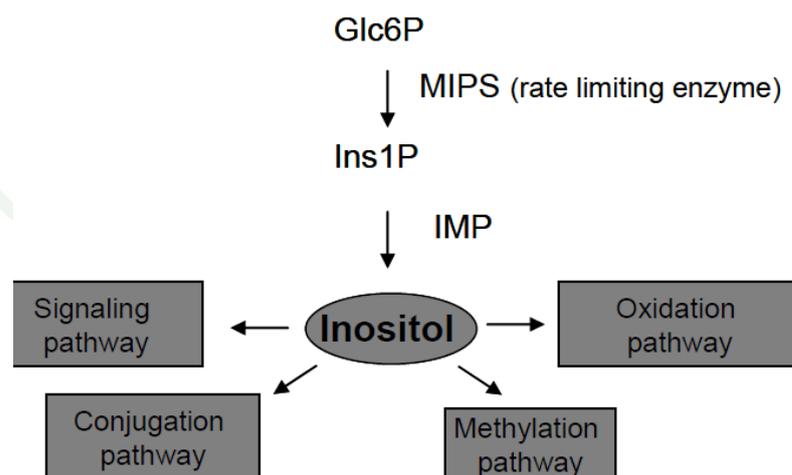
Sakamoto *et al.* (1998) ได้ศึกษายีนที่ตอบสนองต่อความเย็นในพืช โดยมีการทดสอบ ในข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่มีความสามารถในการสร้าง glycine betaine ได้รับยีนที่ควบคุมการ สร้าง choline oxidase จากแบคทีเรียในดินทำให้หลังจากข้าวได้รับอุณหภูมิที่ต่ำ ข้าวมีแนวโน้มการ สังเคราะห์ glycine betaine สูงขึ้นแสดงให้เห็นว่า glycine betaine เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการ เพิ่มประสิทธิภาพความทนทานในพืชที่ตัดต่อพันธุกรรม Naidu *et al.* (1991) ศึกษาปริมาณสาร glycine betaine, glutamine, proline, 4-aminobutyric acid, alanine, aspartic acid, asparagine, glycine, valine และ threonine ในข้าวสาลีที่ปลูกในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเทคนิค HPLC พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของสารทุกชนิดที่ทำการศึกษา Zhang *et al.* (2010) ได้มีการศึกษายีน BADH ใน ข้าวสาลี โดยเปรียบเทียบพันธุ์ป่า พันธุ์ปลูก และพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีน BADH โดยปลูกพืชทั้ง 3 ชนิดในสารละลาย Hoagland ที่ได้รับอุณหภูมิ 0 และ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้น ให้ได้รับอุณหภูมิปกติเป็นเวลา 2 วัน และนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่าระดับการแสดงออก ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง glycine betaine ในต้นถ่ายยีนทั้งก่อนและหลังจากได้รับความเย็น และอุณหภูมิปกติมีปริมาณของสาร glycine betaine มากกว่าในสายพันธุ์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าระดับการแสดงออกของ glycine betaine มีผลช่วยเพิ่มความต้านทานความหนาว เย็นในพืช

Nakamura *et al.* (1997) ได้โคลนบางส่วนของยีน BADH ในข้าว (*Oryza saliva*) พบว่า ยีนนี้ มีความเหมือนกับยีน BADH ในข้าวบาเลย์ 78 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบการแสดงออกของ ยีนนี้โดยการถ่ายยีนเข้าในยาสูบเมื่อยาสูบนี้ได้รับสภาพเค็ม พบว่ามีการแสดงออกของยีน BADH ใน peroxisomes เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ Holmstrom *et al.* (1994) รายงานว่ายาสูบที่ถ่ายยีน BADH และปลูกทดสอบในสภาพเกลือ มีปฏิกริยาของเอนไซม์ BADH ใน chloroplasts และ cytosol พบว่า ปริมาณการสะสม glycine betaine สอดคล้องกับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น

Hibino *et al.* (2001) ศึกษาการแสดงออกของยีน BADH ใน *Avicennia marina* ด้วย เทคนิค real-time PCR โดยการนำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความ เข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ พบว่าการแสดงออกของยีน BADH ในใบมากกว่าราก สอดคล้องการรายงาน Li *et al.* (2003) ที่ได้ศึกษาด้าน *Suaeda liaotungensis* ที่ปลูกในสภาวะเค็ม ก็พบว่ามีระดับการสะสม เอนไซม์ BADH สูงเช่นกัน

2. Myo-inositol 1-phosphate synthase (MIPS)

Myo-inositol 1-phosphate synthase (MIPS) เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ทั้ง พืช สัตว์ และ เชื้อรา ส่วนใหญ่พบในพืชชั้นสูง เอนไซม์ MIPS เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน glucose 6-phosphate เป็น myo-inositol-1-phosphate หลังจากนั้น ถูกออกซิไดซ์ ด้วยเอนไซม์ชนิดที่สอง คือ myo-inositol -monophosphatase (MIP) ซึ่งเอนไซม์ MIP จะสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาดีฟอสโฟริเลชัน (dephosphorylation) ทำให้หมู่ฟอสเฟตถูกปลดปล่อย ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ โปรตีนชนิด stress-related molecules มีบทบาท สำคัญในการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ (phospholipids) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวของกลีเซอรอล (glycerol) 1 โมเลกุล กรดไขมัน (fatty acid) 2 โมเลกุล และ กรดฟอสฟอริก 1 โมเลกุล (phospholipids) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ส่งสัญญาณการแลกเปลี่ยนและ จัดเก็บออกซิน (auxin) การสังเคราะห์ phytic acid และสารสำคัญในกลุ่มน้ำตาล inositol คือ myo-inositol จะถูกสังเคราะห์เมื่อพืชได้รับสถานะเครียด Hegeman *et al.* (2001) รายงานว่า พบเอนไซม์ MIPS ในเมล็ดถั่วเหลืองในช่วงการพัฒนามีเซลล์ และระยะการสร้างใบเลี้ยง (cotyledonary) เพราะในระยะการเจริญนี้เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาล glucose-6-phosphate เพื่อเป็น แหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์ MIPS ตอบสนองต่อสภาวะความ แล้ง และความเค็ม เพื่อปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์โดยการทำให้เกิดการสะสม myo-inositol ในสารละลาย เพื่อช่วยในการควบคุมแรงดันออสโมติก



ภาพที่ 2 แสดงการสังเคราะห์ inositol

ที่มา: Majee *et al.* (2004)

การขาดน้ำของพืชเป็นผลมาจากความชื้นในดินที่ลดลงและอุณหภูมิของโลกที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ผลผลิตลดลงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้พืชมีการปรับตัวให้มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ทนต่อสภาพแล้ง Gajjeraman *et al.* (2011) ศึกษาอ้อยที่ปลูกในสภาพขาดน้ำแล้วทำการสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อทำ library พบว่ามียีนที่มีการแสดงออกในสภาวะแล้ง และพบว่ามีการแสดงออกของยีน myo-inositol 1-phosphate synthase ซึ่งสังเคราะห์ D-glucose-6-phosphate ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณในการสังเคราะห์กรดไขมัน เพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโต กระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ รวมทั้งทำให้ฮอร์โมนสมดุลและการสร้างผนังเซลล์จากสภาวะเครียดจากสภาวะแล้ง

Khurana *et al.* (2012) โคลนยีน *MIPS* ในข้าวสาลีด้วยเทคนิค RACE PCR ได้ยีนขนาด 1,530 คู่เบส จากการกระตุ้นด้วยอุณหภูมิสูง และตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า *MIPS1* จะแสดงออกตลอดเวลา ส่วน *MIPS2* จะแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้น นอกจากนั้นยังพบว่ามีแสดงออกในใบมากกว่าราก การวัดปริมาณสารสำคัญที่เอนไซม์ *MIPS* สร้างคือ myo-inositol ในสภาพที่อุณหภูมิสูงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 และ 30 นาที และเพิ่มเป็น 2 4 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาการได้รับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นปริมาณ myo-inositol สูงขึ้นและมีการแสดงออกสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง

Chatterjee *et al.* (2006) ศึกษายีน *MIPS* ในหญ้า *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka ทดสอบความสามารถในการทนเค็มด้วยการถ่ายยีนนี้เข้าสู่ข้าวและยาสูบ จากผลการทดลองสามารถยืนยันได้ว่าพืชที่ได้รับยีน *MIPS* สามารถทนเค็มได้ Abreu and Francisco (2007) ได้โคลนยีน *MIPS* จากต้นอ่อนของเสาวรส ในสภาวะหนาวเย็นและแห้งแล้ง พบว่าสามารถโคลนยีน *MIPS1* ได้ในสายพันธุ์ *Passiflora edulis*, *P. eichleriana*, *P. caerulea*, *P. nitida* และ *P. coccinea* พบว่า *MIPS1* มีการแสดงออกที่อวูล ละอองเรณู และใบ

Wang *et al.* (2011) ได้ศึกษาในสบูดำที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS โดยให้พืชรับสภาพความเครียดจากสารต่าง ๆ ดังนี้ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ และการเติม ABA ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่ามีการแสดงออกของยีน *MIPS* สูง เมื่อสบูดำได้รับ ABA รองลงมาคือ ความเค็ม สภาพขาดน้ำ และอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

real-time PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) จัดเป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณกรดนิวคลีอิกจากตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ที่มีความไวสูง เทคนิค real-time PCR มีความแตกต่างจากเทคนิค PCR คือ การตรวจสอบติดตามจากการติดฉลากสารเรืองแสง (fluorescence reporters) ทำให้สามารถตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาในแต่ละรอบของการทำ PCR ได้จริง ณ เวลานั้น ๆ ทำให้สามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นจากสิ่งส่งตรวจ และวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นได้ทันที และ real-time PCR ทำในระบบปิดทำให้สามารถป้องกันการปนเปื้อนซึ่งเป็นปัญหาหลักของการทำ PCR ปกติ ที่จะทำการตรวจ PCR product หลังจากปฏิกิริยาการเพิ่มขยายสิ้นสุดแล้ว นอกจากนี้เทคนิค PCR แบบดั้งเดิม ยังมีข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้อยู่หลายประการ เช่น ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ การตรวจวิเคราะห์ผลของ PCR แบบดั้งเดิม ซึ่งต้องใช้เวลามากหลายชั่วโมง ส่วนใหญ่จะทำการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งใช้เวลานาน จากข้อจำกัดดังกล่าวทำให้มีการพัฒนาเทคนิค real-time PCR ทำให้สามารถแก้ไขข้อจำกัดต่าง ๆ ที่ได้กล่าวมาข้างต้นได้ จุดเด่น คือ ความไวในการตรวจสอบ ความแม่นยำ และวิธีทำสะดวกไม่ยุ่งยาก ทำให้มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย เทคนิค real-time PCR สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย ได้แก่ การตรวจสอบการกลายพันธุ์ การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ (วิระพงษ์, 2551)

งานวิจัยที่นำเทคนิค real-time PCR มาการประยุกต์ ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง เช่น การตรวจวินิจฉัยโรค สายพันธุ์พืชด้านทานโรค สุจริตน์ และคณะ (2554) ทดสอบการประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่เกิดโรคใบขาว ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยการนำดีเอ็นเอที่ได้จากใบที่มีอาการใบขาวต่างกัน ใบที่มีอาการขาว ใบที่แสดงอาการขาวและเขียว มาตรวจหาความแตกต่าง พบว่าผลได้จากการวิเคราะห์ด้วย real-time PCR สามารถตรวจหาเชื้อได้ดีกว่าเทคนิค PCR ปกติ รวมทั้งสามารถตรวจหาเชื้อและจำนวนของเชื้อไฟโตพลาสมา ที่มีปริมาณน้อยมากได้ ปิยะศักดิ์ (2555) กล่าวถึงการพัฒนาเทคนิค real-time PCR เพื่อใช้ในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์แปรรูปจากพืชและสัตว์ที่ได้รับการดัดแปลงยีน (GMOs) โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปมาจากถั่วเหลืองและข้าวโพด เทคนิคในการตรวจสอบให้มีประสิทธิภาพความแม่นยำสูง ตรวจสอบโดยยีนที่ได้รับการดัดแปลงจะประกอบด้วย 3 ส่วนที่สำคัญ คือ transgene promoter และ terminator ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงชิ้นส่วนวัตถุดิบ และผลิตภัณฑ์แปรรูปว่ามีการปลอมปนของ GMOs เพื่อให้ทราบเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน นอกจากนี้ในงานในด้านปรับปรุงพันธุ์พืชได้นำเทคนิค real-time PCR มาใช้เพื่อช่วยคัดเลือกลักษณะที่ต้องการเพื่อลดเวลาในการปลูกทดสอบคัดเลือกลักษณะทางฟีโนไทป์เพียงด้านเดียว กุหลาบ และ ประสาน (2548) ศึกษาการแสดงออกของยีน *CAD* ที่ใช้ในการสร้างเนื้อ

ไม่ยางพารา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ และลดระยะเวลาในการพัฒนาสายพันธุ์ยางพารา เช่นเดียวกัน Majee *et al.* (2004) ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR เพื่อดูการแสดงออกของยีน *MIPS1* และ *MIPS2* ในต้นถั่วที่ได้รับสภาวะขาดน้ำ ความร้อน ความเย็น และความเค็ม คัดเลือกลักษณะทนทานจากสภาพความเครียดต่าง ๆ วิเคราะห์การแสดงออกของยีน *MIPS* ในเชิงปริมาณได้



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

พืชทดลองคือ อ้อยสายพันธุ์ Kps 94-13 และ Kps 01-11-06

2. วัสดุและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและการตรวจสอบการแสดงออกของยีน

- 2.1 เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ ปีกเกอร์ กระบอกตวง
- 2.2 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- 2.3 ตู้อบ (hot air oven)
- 2.4 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH- meter)
- 2.5 เครื่องชั่งสาร (balance)
- 2.6 เตาไมโครเวฟ (microwave)
- 2.7 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air flow cabinet)
- 2.8 มีดผ่าตัด
- 2.9 ชั้นวางขวดเนื้อเยื่อ
- 2.10 โกร่งบดตัวอย่าง
- 2.11 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) และเครื่องกวนตะกอน (vortex[®])
- 2.12 เครื่อง Thermal Cycler สำหรับทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)
- 2.13 ชุดเครื่องมือ gel documentation system พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพเจล
- 2.14 ชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส
- 2.15 เครื่อง real time Mastercycler[®] ep realplex.
- 2.16 เครื่อง NanoDrop รุ่น 8000

3. สารเคมี

- 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)
- 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอและ สังเคราะห์ first stranded cDNA จากพืช
- 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Actin* *BADH* และ *MIPS* โดยวิธี PCR
- 3.4 สารเคมีที่ใช้ในการทำ real-time PCR

4. ไพรมเมอร์สำหรับตรวจสอบยีน *Actin* *BADH* และ *MIPS* และไพรมเมอร์สำหรับทำ real-time PCR

5. โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล

5.1 โปรแกรมฐานข้อมูลสำหรับหาลำดับเบสของยีนหรือสายดีเอ็นเอที่สนใจจาก website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/>

5.2 โปรแกรมสำหรับการออกแบบไพรมเมอร์และเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างสายดีเอ็นเอที่สนใจกับฐานข้อมูลคือ โปรแกรม clustal W จาก website <http://www.ebi.ac.uk/clustal W/>

5.3 โปรแกรมสำหรับการออกแบบไพรมเมอร์ real-time PCR คือ GenScript Real time PCR (TaqMan) Primer Design (<http://www.genscript.com>)

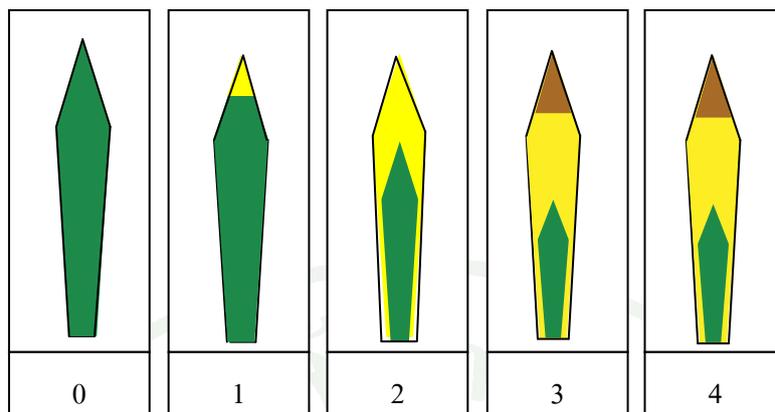
วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการให้สภาพขาดน้ำ

นำส่วนใบม้วนที่อยู่ด้านในสุดของอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส จากนั้นย้ายแคลลัสลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำต้น โดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแคลลัสพัฒนาเป็นต้นแล้วจึงย้ายต้นอ้อยลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำราก โดยเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ จนต้นอ้อยมีอายุ 2 เดือน ในส่วนอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-06 ได้รับความอนุเคราะห์จากฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลองในสภาพปลอดเชื้อชักนำต้นที่มีอายุ 2 เดือน

2. การศึกษาการแสดงออกของใบอ้อยเมื่ออยู่ในสภาวะขาดน้ำ

การให้สภาพขาดน้ำกับต้นอ้อยในสภาพปลอดเชื้อทำโดยย้ายต้นอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ ที่มีอายุ 2 เดือน เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เติม polyethylene glycol 6,000 (PEG) ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ control 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ใช้แผนการทดลอง factorial in CRD โดยทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ ในแต่ละระดับความเข้มข้น เพื่อดูการแสดงอาการและการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำของใบอ้อย โดยสังเกตและจดบันทึก เป็นเวลา 6 12 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS Version 21 และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี DMRT



ภาพที่ 3 การให้คะแนนแสดงความรุนแรงของลักษณะอาการและการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำของใบอ้อย คะแนน 0-4 ตามลำดับ

คะแนน 0 = ใบอ้อยมีสีเขียวปกติ

คะแนน 1 = ใบอ้อยเริ่มปรากฏสีเหลืองหรือแห้งที่ปลายใบเล็กน้อย

คะแนน 2 = ใบอ้อยปรากฏสีเหลืองที่แผ่นใบ

คะแนน 3 = ใบอ้อยปรากฏสีเหลืองที่แผ่นใบ และเกิดการแห้งที่ปลายใบ

คะแนน 4 = ใบอ้อยปรากฏสีเหลือง และเกิดการแห้งเหี่ยวที่ปลายใบในทุกใบ

2. การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบและรากอ้อย

สกัดอาร์เอ็นเอ ตามวิธีของ Laksana (2012) นำตัวอย่างใบอ้อยและราก มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ และบดให้ละเอียดเป็นผงในไนโตรเจนเหลว ย้ายตัวอย่างใส่ในหลอด ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม RNA extraction buffer (CTAB 2 เปอร์เซ็นต์ PVP 2 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ โมลาร์ EDTA 25 มิลลิโมลาร์ pH 8 Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์ pH 8 และ dH₂O) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติม mercaptoethanal 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยกลับหลอดไปมา เติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายใสส่วนบนมาใส่หลอดใหม่ เติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น นำสารละลายใสส่วนบนมาใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol 98 เปอร์เซ็นต์ 400 ไมโครลิตร เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบา ๆ บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง ตะกอนอาร์เอ็นเอจะอยู่ด้านล่างล้างตะกอนด้วย

ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง ตะกอนอาร์เอ็นเอจะอยู่ด้านล่าง ตากตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการทำลายเอนไซม์ RNase ด้วย DEPC การตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของอาร์เอ็นเอรวมโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล ใน 0.5 X MOPs buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที และวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น A260/280 และ A260/230 นาโนเมตร โดยเครื่อง NanoDrop รุ่น 8000

3. การกำจัดจีโนมิกดีเอ็นเอออกจากตัวอย่างอาร์เอ็นเอรวม

กำจัดจีโนมิกดีเอ็นเอออกจากตัวอย่างโดยนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ 1 ไมโครกรัม เติม DNase I (บริษัท Fermentas) ความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติม 10 X reaction buffer DNase I ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม EDTA ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็ง 1 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNase I และตรวจสอบการกำจัดจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ใน 1.5 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล ใน 0.5 X MOPs buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที

4. การทำ first stranded cDNA

นำอาร์เอ็นเอรวมมาสังเคราะห์เป็น first stranded cDNA โดยนำอาร์เอ็นเอรวมความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ Oligo (dT)₂₂ primer ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ DEPC-treated water 0.5 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วเติมสารละลายต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ 5 x reaction buffer RT ปริมาตร 4 ไมโครลิตร RiboLock RNase Inhibitor ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ Revert Aid M-MuLV RT ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปแช่ในน้ำแข็ง และเติม RNaseH ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร แล้ววัดความเข้มข้นของ first stranded cDNA ที่สังเคราะห์ด้วยการวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่นแสง A260/280 และ A260/230 นาโนเมตร โดยเครื่อง NanoDrop รุ่น 8000

5. การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ชนิด degenerate ที่จำเพาะกับส่วนของยีน betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนอนุรักษ์ของยีน *BADH* จาก Accession number XM_003574447.1 (*Brachypodium*), AB183716.1 (*Leymus chinensis*), EU770322.1 (*Oryza sativa indica*), AY050316.1 (*Triticum aestivum*), NM_001112311.1 (*Zea mays*), AB161705.1 (*Zoysia tenuifolia*), U12195.1 (*Sorghum bicolor*) และยีน myo-inositol 1-phosphate synthase (*MIPS*) จาก 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* Accession number NM 001136991 (*Zea mays*), AY742219 (*Saccharum officinarum*), XM 003569070 (*Brachypodium distachyon*), GU290546 (*Zoysia japonica*) ที่ปรากฏในฐานข้อมูล GenBank ออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม clustal W จาก website (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW/>) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ degenerate ไพรเมอร์ ของยีน *BADH MIPS* และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *Actin*

ยีน	ไพรเมอร์(คู่)	ไพรเมอร์
<i>Actin</i>	1	Forward : 5' CATGCCATCCTTCGATTGG 3'
		Reverse : 5' CACATCTGCTGGAAGGTGC 3'
<i>BADH</i>	1	Forward : 5' ATGGGACATGGAYGATGT -3'
		Reverse : 5' TTTTKCCACCAAGTTCCA -3'
	2	Forward : 5' TTGGA ACTATCCTCTCYTGAT -3'
		Reverse : 5' AGAGTCCAYTCAACAGCTTT -3'
<i>MIPS</i>	1	Forward : 5' ATGTT CATCGAGAGCTTCCG -3'
		Reverse : 5' ATG GGMAGGAGGCTCTTGAA -3'
	2	Forward : 5' TGCTGGAATHAAGCCACCT 3'
		Reverse : 5' TGAGGTAGCTCAGGATGGT 3'

6. ตรวจสอบหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม สำหรับปฏิกิริยา PCR โดยใช้ first stranded cDNA เป็นแม่แบบ

นำ first stranded cDNA รวม 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) กับไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้และตั้งโปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา PCR ดังนี้ อุณหภูมิ annealing ในช่วง 50 องศาเซลเซียสถึง 64 องศาเซลเซียส โดยกำหนดให้แต่ละปฏิกิริยามีอุณหภูมิแตกต่างกัน 2 องศาเซลเซียส โดยมีโปรแกรม PCR ดังนี้ pre-denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที annealing ในช่วงอุณหภูมิ 54-64 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำโปรแกรม denature ถึง extension จำนวน 35 รอบ แล้วตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตรวจสอบผลโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วย 1.0 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล ในสารละลาย 0.5 X TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมเจดด้วย ethidium bromide ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและ คัดเลือกอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR ทำปฏิกิริยา PCR ใหม่อีกครั้ง โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่เลือกไว้ จากนั้นส่งผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา (PCR product) ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท 1st BASE (ประเทศมาเลเซีย) แล้วนำลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน *BADH* และ *MIPS* โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BLASTN ในฐานข้อมูล NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

7. ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR

ศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *BADH* *MIPS* และ *Actin* ด้วย เทคนิค real-time PCR โดยออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ โดยใช้โปรแกรม GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design (<http://www.genscript.com>) (ตารางที่ 2) วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยเครื่อง Mastercycler[®] ep realplex บริษัท Eppendorf (Thailand) ชุด SensiFAST[™] SYBR[®] No-ROX Kit บริษัท BIOLIN โดยการเติม 2X SensiFAST SYBR No-ROX Mix ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วเติม forward primer และ reverse primer ความเข้มข้นชนิดละ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรชนิดละ 0.4 ไมโครลิตร เติม first stranded cDNA ความเข้มข้น 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเติม DEPC-treated water ปริมาตร 3.2 ไมโครลิตร ตั้งโปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา PCR ดังนี้ denature อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที จำนวน 45 รอบ

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับ real-time PCR ที่จำเพาะกับยีน *Actin* *BADH* และ *MIPS*

ยีน	Annealing temperature (°C)	ไพรเมอร์	ขนาด คู่เบส
<i>Actin</i>	58	Forward 5' CGTTGTCGGAATGGCCCAGACC 3'	120
		Reverse 5' CGTAGGTCTGAATATTCCGGTCC 3'	
<i>BADH</i>	58	Forward 5' TTGAACATTGTGACAGGATTAGG 3'	120
		Reverse 5' AGTTCAGCGTAACAGGCTT 3'	
<i>MIPS</i>	58	Forward 5' GCACAACACCTGTGAGGACT-3	120
		Reverse 5' TGAGGTAGCTCAGGATGGTG 3'	

8. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและถ่ายยีน และห้องปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุล ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

9. ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง

เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2553 ถึง เดือนเมษายน พ.ศ. 2557

ผลและวิจารณ์

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการให้สภาพขาดน้ำ

นำใบม้วนของอ้อยที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสและย้ายลงเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำต้น เมื่อต้นพัฒนาสมบูรณ์แล้วย้ายต้นอ้อยลงในอาหารชักนำราก ซึ่งจะเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ จนมีอายุ 2 เดือนจึงนำไปใช้ในการทดลอง การได้รับสภาพขาดน้ำในสภาพปลอดเชื้อทำได้โดยย้ายต้นอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เติม polyethylene glycol 6,000 (PEG) ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 16 เปอร์เซ็นต์ และ 28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 12 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยสายพันธุ์ Kps 94-13 เพื่อชักนำต้น

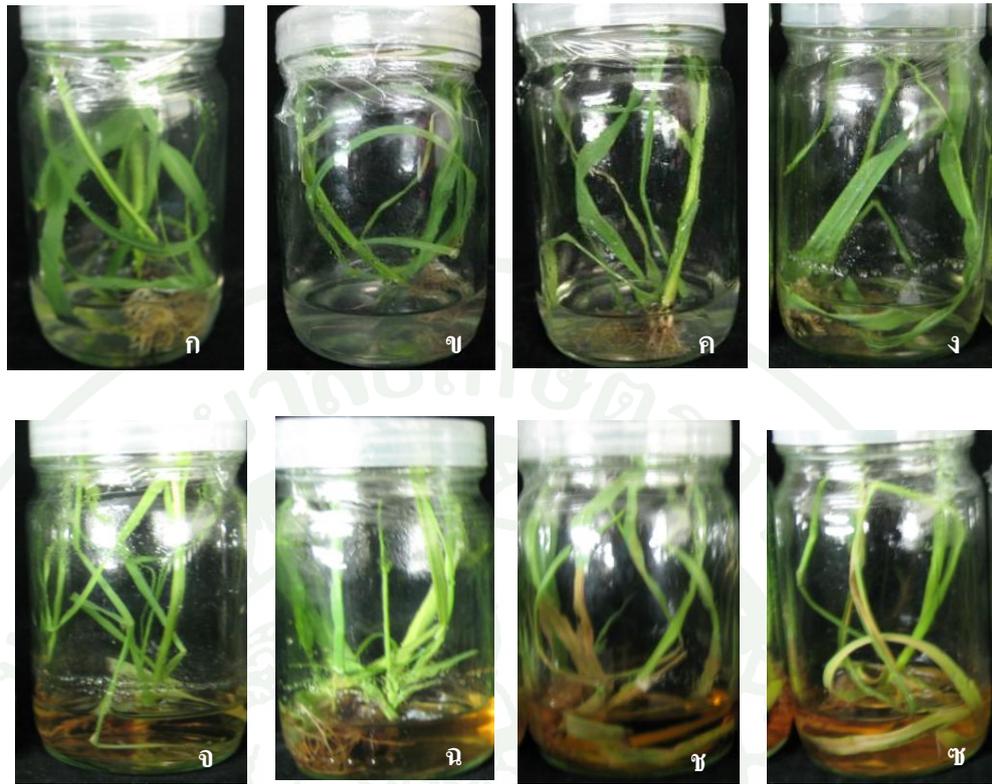
(ก) ใบม้วนอ่อนสำหรับชักนำแคลลัส (ข) การชักนำยอดรวม (ค) การชักนำต้น (ง) การชักนำราก ในอาหารเหลว



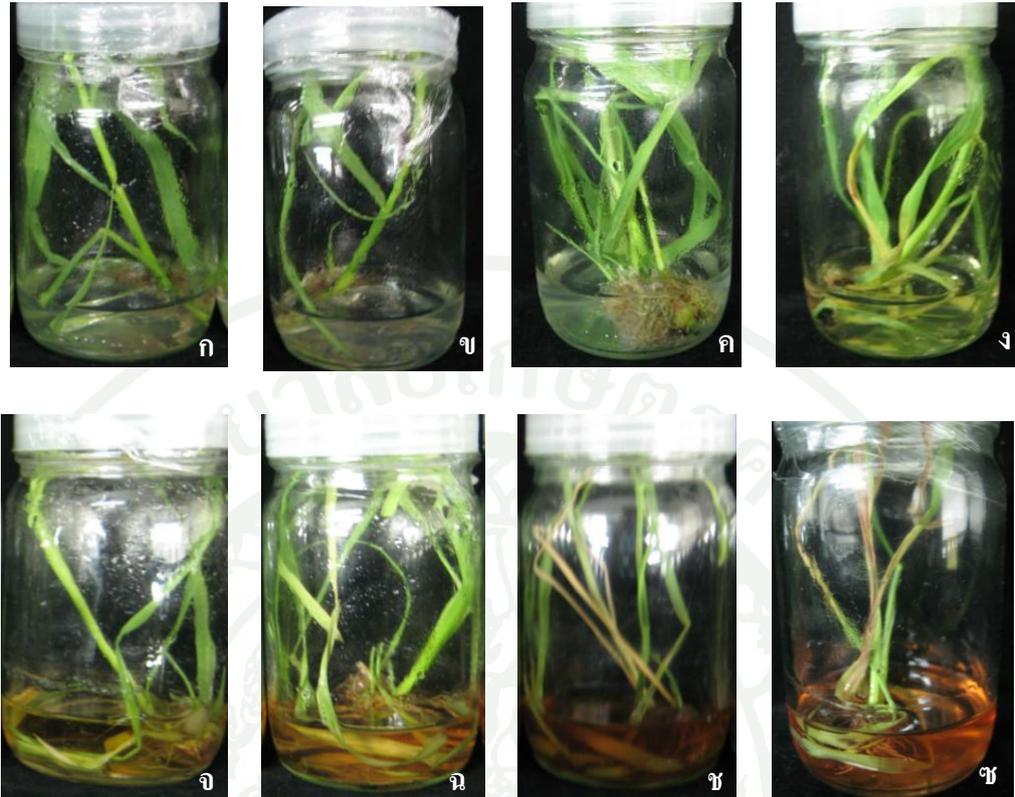
ภาพที่ 5 การเพาะเลี้ยงอ้อยสายพันธุ์ Kps 94-13 ในสภาพขาดน้ำในอาหารเหลวสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม PEG 16 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ดังนี้ (ก) ต้นปกติที่ไม่ได้เติม PEG (ข) 6 ชั่วโมง (ค) 12 ชั่วโมง (ง) 24 ชั่วโมง (จ) 48 ชั่วโมง (ฉ) 72 ชั่วโมง (ช) 96 ชั่วโมง (ช) 120 ชั่วโมง



ภาพที่ 6 การเพาะเลี้ยงอ้อยสายพันธุ์ Kps 94-13 ในสภาพขาดน้ำในอาหารเหลวสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม PEG 28 เปอร์เซนต์ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ดังนี้ (ก) ต้นปกติที่ไม่ได้เติม PEG (ข) 6 ชั่วโมง (ค) 12 ชั่วโมง (ง) 24 ชั่วโมง (จ) 48 ชั่วโมง (ฉ) 72 ชั่วโมง (ช) 96 ชั่วโมง (ซ) 120 ชั่วโมง



ภาพที่ 7 การเพาะเลี้ยงอ้อยสายพันธุ์ Kps 01-11-6 ในสภาพขาดน้ำในอาหารเหลวสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม PEG 16 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ดังนี้ (ก) ต้นปกติที่ไม่ได้เติม PEG (ข) 6 ชั่วโมง (ค) 12 ชั่วโมง (ง) 24 ชั่วโมง (จ) 48 ชั่วโมง (ฉ) 72 ชั่วโมง (ช) 96 ชั่วโมง (ซ) 120 ชั่วโมง



ภาพที่ 8 การเพาะเลี้ยงอ้อยสายพันธุ์ Kps 01-11-6 ในสภาพขาดน้ำในอาหารเหลวสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม PEG 28 เปอร์เซนต์ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ดังนี้ (ก) ต้นปกติที่ไม่ได้เติม PEG (ข) 6 ชั่วโมง (ค) 12 ชั่วโมง (ง) 24 ชั่วโมง (จ) 48 ชั่วโมง (ฉ) 72 ชั่วโมง (ช) 96 ชั่วโมง (ซ) 120 ชั่วโมง

ตารางที่ 3 การให้คะแนนอาการของใบอ้อยในการทดสอบในสภาพขาดน้ำโดยเติม PEG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

พันธุ์	PEG (เปอร์เซ็นต์)	ค่าเฉลี่ยคะแนนอาการของใบอ้อยในสภาพขาดน้ำ						
		ระยะเวลาที่ได้รับ PEG (ชั่วโมง)						
Kps 94-13		6	12	24	48	72	96	120
	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	16	0.0	0.0	1.0	2.0	2.0	2.0	3.5
	28	0.0	0.0	1.0	2.0	2.0	2.0	3.5
Kps 01-11-6	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	16	0.0	0.0	1.0	3.0	2.0	3.0	3.8
	28	0.0	0.1	1.0	2.0	4.0	4.0	4.0

คะแนน 0-4 ตามลำดับ

คะแนน 0 = ใบอ้อยมีสีเขียวปกติ

คะแนน 1 = ใบอ้อยเริ่มปรากฏสีเหลืองหรือแห้งที่ปลายใบเล็กน้อย

คะแนน 2 = ใบอ้อยปรากฏสีเหลืองที่แผ่นใบ

คะแนน 3 = ใบอ้อยปรากฏสีเหลืองที่แผ่นใบ และเกิดการแห้งที่ปลายใบ

คะแนน 4 = ใบอ้อยปรากฏสีเหลือง และเกิดการแห้งเหี่ยวที่ปลายใบในทุกใบ

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยของคะแนนอาการของใบอ้อยในการทดสอบในสภาพขาดน้ำโดยเติม PEG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

ปัจจัยที่ทดสอบ		ค่าเฉลี่ยคะแนนของใบอ้อยในการทดสอบในสภาพขาดน้ำ
พันธุ์อ้อย	Kps 94-13	1.05 ^b
	Kps 01-11-6	1.32 ^a
PEG (เปอร์เซ็นต์)	0	0.00 ^c
	16	1.63 ^b
	28	1.93 ^a
เวลา (ชั่วโมง)	6	0.00 ^c
	12	0.33 ^d
	24	0.58 ^d
	48	1.26 ^c
	72	1.75 ^b
	96	1.96 ^b
	120	2.42 ^a

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละปัจจัยที่ทดสอบ มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความน่าจะเป็นไปได้ 0.05 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

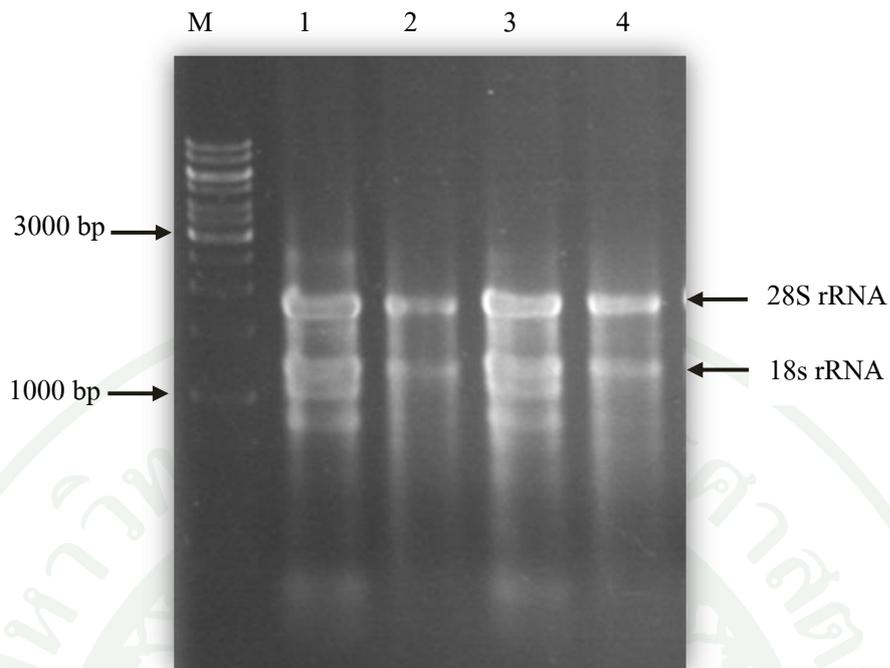
ผลการศึกษาในอ้อยเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำในสภาพปลอดเชื้อทำโดยย้ายต้นอ้อยทั้ง 2 พันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม polyethylene glycol 6,000 (PEG) ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 16 เปอร์เซ็นต์ และ 28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 12 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง โดยให้คะแนนโดยการสังเกตและจดบันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลงของใบ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในใบอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 (ภาพที่ 5 และ 6) ใบอ้อยแสดงลักษณะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและแห้งน้อยกว่าอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 (ภาพที่ 7 และ 8) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของ PEG ที่ 28 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้ใบอ้อยเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีเหลืองและแห้งมากกว่า PEG ความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งระยะเวลาพบว่า 120 ชั่วโมง มีผลให้ใบอ้อยเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแห้งรุนแรงสูงสุดรองลงมาคือ 96 72 48 24 12 และ 6 ชั่วโมง ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติ และพบว่าอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 เมื่อได้รับ PEG ทั้ง 2 ระดับ มีความทนทานต่อสภาพขาดน้ำได้ดีกว่าอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3 และ 4)

จากผลการวิเคราะห์ค่าสถิติเบื้องต้นในใบอ้อยที่แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงของใบอ้อย พันธุ์ Kps 94-13 และพันธุ์ 01-11-6 ที่เพาะเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่เติม PEG ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 16 เปอร์เซ็นต์ และ 28 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าความแตกต่างของ PEG ความเข้มข้นทั้ง 2 ระดับ สายพันธุ์อ้อย และระยะเวลาของต้นอ้อยที่อยู่ในสภาพขาดน้ำมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของลักษณะใบอ้อย คือ มีสีเหลือง และแห้ง สอดคล้องกับพันธุ์ที่ทนทานซึ่งมีความสามารถในการปรับตัวให้สามารถอยู่ได้ในสภาพขาดน้ำคือ อ้อยพันธุ์ Kps 94-13 และนอกจากการเปลี่ยนแปลงในใบแล้ว พบว่าลักษณะของรากฝอยมีจำนวนมากรวมทั้งมีแผ่นใบขนาดใหญ่ จึงสามารถทนทานต่อสภาพการขาดน้ำซึ่งแตกต่างจากในอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ที่มีลักษณะของรากขนาดเล็ก และจำนวนของรากน้อยกว่า รวมทั้งลักษณะแผ่นใบบางกว่าพันธุ์ Kps 94-13 และระดับความเข้มข้นของ PEG 6,000 ที่ 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้ทดสอบสภาพการขาดน้ำในอ้อยทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น PEG ที่ 28 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกระดับความทนทานต่อสภาพการขาดน้ำได้ ซึ่ง PEG ที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงนั้นมีผลต่อค่าออสโมติกโพเทนเชียล (osmotic potential) ของสารละลายที่อยู่รอบเซลล์ โดยทำให้เซลล์อยู่ในสภาพขาดน้ำ การคัดเลือกพืชทนแล้งโดยใช้ PEG เหมาะสมมากกว่าสารละลายอื่นเพราะไม่เป็นพิษ ต่อเนื้อเยื่อพืช Manoj และ Deshpande (2007) ศึกษาการใช้ PEG คัดเลือกลักษณะทางฟีโนไทป์ของมะเขือเทศ 16 สายพันธุ์ โดยบ่มเมล็ดมะเขือเทศและนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารละลาย PEG ความเข้มข้น 0 20 40 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 30 วัน โดยวัดขนาดความยาวรากและลำต้น พบว่า ที่ความเข้มข้น PEG 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกลักษณะมะเขือเทศพันธุ์ Hybrid 3 ซึ่งมีลักษณะพันธุ์ทนแล้งได้ แต่ระดับ PEG ความเข้มข้น ที่ 40 และ 60 เปอร์เซ็นต์ สูงเกินไปทำให้อัตราการเจริญเติบโตของใบ และรากมีการเจริญเติบโตลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเพราะ รากของต้นอ้อยไม่สามารถดึงน้ำในอาหารเพาะเลี้ยงไปใช้ได้ เนื่องจากค่าความเข้มข้นในสารละลายภายนอกเซลล์มีความต่างศักย์ต่ำในขณะที่ต้นอ้อยที่มีค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบสูงกว่า น้ำภายในเซลล์จึงถูกดึงออกมาภายนอกเซลล์เพื่อปรับค่าความต่างศักย์ของน้ำในใบให้มีค่าเท่ากัน ที่ 72-120 ชั่วโมง พบว่าสีของอาหารเพาะเลี้ยงเปลี่ยนสีเข้มขึ้น การเปลี่ยนสีของอาหารเพาะเลี้ยงลักษณะดังกล่าว วิไลลักษณ์ และ กิริยา (ม.ป.ป.) ได้รายงานว่ามีฟีนอลิกสารกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compound) ออกมาจากบริเวณที่มีบาดแผล หรือเซลล์เสียหายอันเกิดจากการสูญเสียภายในเซลล์ ในภาวะเครียดจากการขาดน้ำพืชจะสร้างสารประกอบอินทรีย์ละลายปนอยู่ในเซลล์ ซึ่งมีผลทำให้ความเข้มข้นของน้ำภายในเซลล์จะมีค่าลดลง จากตัวถูกละลายแทรกอยู่นั้นคือ ค่า osmotic potential ของสารละลายภายในเซลล์จึงต่ำลง และค่าจะแตกต่างกันขึ้นกับชิ้นส่วนของพืช ชนิดพืช ฤดูกาล และสภาพแวดล้อม Farooq *et al.* (2009) รายงานกลไกที่พืชตอบสนองต่อการขาดน้ำว่า พืชจะทำให้ศักย์ของน้ำ (water potential) ในพืชลดลง โดยพืชจะสะสมตัวถูกละลาย (solute accumulation)

เพื่อปรับระดับความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์ ซึ่งสารเหล่านี้จะลดค่าศักย์ออสโมติก (osmotic potential) ภายในเซลล์ส่งผลให้พืชสามารถดึงน้ำเข้าสู่เซลล์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับระดับการตอบสนองต่อภาวะเครียดของอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาพแล้งสามารถรักษาสมดุลของน้ำในใบได้ดีกว่าพันธุ์ Kps 01-11-6 ซึ่งอ่อนแอต่อสภาพแล้ง วราภรณ์ และคณะ (2556) ทดสอบเสถียรภาพของพันธุ์อ้อยกับความ สัมพันธ์กับสภาพแวดล้อมพบว่าอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 สามารถปลูกในสภาพแล้งได้ดีแต่อ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ซึ่งมีลักษณะไม่ทนแล้งสอดคล้องกับ กนิษฐา และคณะ (2555) ที่เปรียบเทียบมาตรฐานพันธุ์อ้อยเพื่อผลผลิตและคุณภาพอ้อย ในอ้อยปลูก จาก 7 สายพันธุ์ พบว่า อ้อย Kps 94-13 เป็นพันธุ์ตรวจสอบให้ผลผลิตน้ำตาลสูงสุดที่ 2.42 ตันต่อไร่ และเป็นพันธุ์ที่สามารถปลูกได้ดีในเขตพื้นที่ส่งเสริมของ โรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาลซึ่งมีสภาพเป็นดินทราย โดยมีข้อเด่นทั้งในเรื่องผลผลิตอ้อยและคุณภาพความหวาน โดยเฉพาะในเรื่อง การเจริญเติบโตเร็ว ทนแล้ง และมีลักษณะทางการเกษตรที่ดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ ดังนั้นผลการเปลี่ยนแปลงลักษณะใบ และรากในอ้อย เมื่อเติมสาร PEG ที่ความเข้มข้น 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ จึงช่วยคัดเลือกลักษณะทนแล้งของอ้อยได้ ดังนั้นจากข้อมูลการคัดเลือกลักษณะทนแล้งจากการเติม PEG จึงถือว่าเป็นการศึกษาเบื้องต้นสำหรับการคัดเลือกลักษณะทนแล้งในอ้อยต่อไป โดยการพัฒนา การคัดเลือกลักษณะทนแล้งนั้นจำเป็นต้องใช้พันธุ์ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมีความหลายหลายมากขึ้น รวมทั้งทดลองปลูกในแปลงในสภาพธรรมชาติแต่สามารถควบคุมน้ำได้ เพื่อเปรียบเทียบลักษณะความทนทานต่อสภาพขาดน้ำที่ศึกษาในห้องปฏิบัติการกับที่คัดเลือกในสภาพแปลงว่าจะสามารถนำมาใช้ได้จริงหรือไม่ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

5. การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบและรากอ้อย

ในการสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบและรากอ้อยที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม PEG ความเข้มข้น 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์ที่ 6 12 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง ตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของอาร์เอ็นเอรวมโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วย 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล ใน 0.5 X MOPs buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที และการวัดค่าการดูดกลืนแสง absorbance โดยเครื่อง NanoDrop ที่ความยาวคลื่นแสง A260/280 และ A260/230 นาโนเมตร อยู่ใน ช่วง 1.8-2.0 ความเข้มข้นประมาณ 1,000-2,000 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าอาร์เอ็นเอที่แยกได้มีคุณภาพดี มีความบริสุทธิ์สูง (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 แลบบาร์เอ็นเอที่สกัดจากใบและรากอ้อย

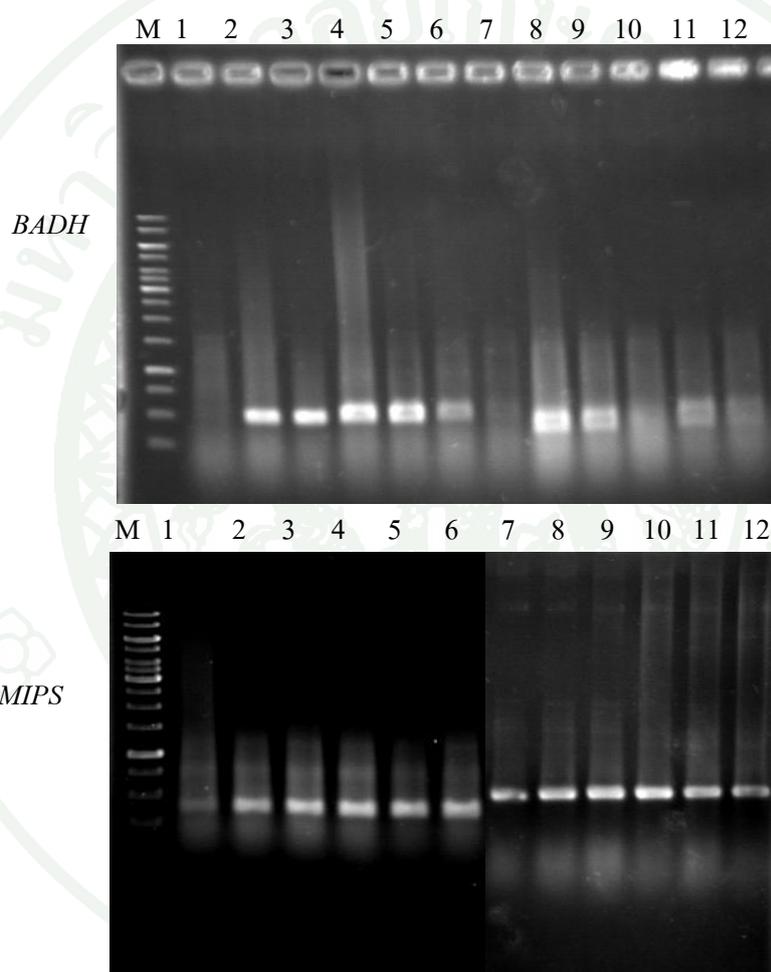
Lane M 1 kb ladder marker (บริษัท Fermentas)

Lane 1-2 RNA ของใบและรากอ้อยพันธุ์ Kps 94-13

Lane 3-4 RNA ของใบและรากอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6

6. ตรวจสอบหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม สำหรับปฏิกิริยา PCR โดยใช้ first stranded cDNA เป็นแม่แบบ

นำ first stranded cDNA ของอ้อยสายพันธุ์ Kps 94-13 ที่ได้รับ PEG 28 เปอร์เซนต์ นาน 48 ชั่วโมงรวม 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) กับ ไพรเมอร์ degenerate ที่ออกแบบไว้ผลการทำปฏิกิริยาแสดงดังใน ภาพที่ 10



ภาพที่ 10 ตรวจสอบหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม สำหรับปฏิกิริยา PCR โดยใช้ first stranded cDNA ของอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ที่ได้รับ PEG 28 เปอร์เซนต์ นาน 48 ชั่วโมง และไพรเมอร์ของยีน *BADH* และ ยีน *MIPS*

Lane M 1 kb ladder marker (บริษัท Fermentas)

Lane 1-6 ไพรเมอร์คู่ที่ 1 อุณหภูมิ 54 56 58 60 62 และ 64 องศาเซลเซียส

Lane 7-12 ไพรเมอร์คู่ที่ 2 อุณหภูมิ 54 56 58 60 62 และ 64 องศาเซลเซียส

จากการตรวจสอบหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมจาก degenerate ไพรมเมอร์ ของยีน *BADH* และ *MIPS* ที่ออกแบบโดยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชหลายชนิด จากฐานข้อมูล GenBank โดยนำ first stranded cDNA ของอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 จากใบ ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 28 เปอร์เซ็นต์ ที่ 48 ชั่วโมง มาทดสอบ พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอเมื่อใช้ไพรมเมอร์คู่ที่ 1 ของยีน *BADH* ขนาดประมาณ 300 คู่เบส และอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR คือ 56 องศาเซลเซียส และเมื่อใช้ไพรมเมอร์คู่ที่ 2 ของยีน *MIPS* เกิดแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 400 คู่เบส และอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR คือ 60 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 5) แต่เนื่องจากยังไม่ทราบแน่ชัดว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR นี้เป็นยีนที่ต้องการหรือไม่ จึงส่งผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่คาดว่าจะเป็ยีน *BADH* และ *MIPS* ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยบริษัท 1st BASE (ประเทศมาเลเซีย) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน *BADH* และ *MIPS* โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BLASTN ในฐานข้อมูล NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรมเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *BADH* และ *MIPS*

ยีน	Annealing temperature (C°)	ไพรมเมอร์
<i>BADH</i>	56	Forward : 5'- ATGGGACATGGAYGATGT -3'
		Reverse : 5'- TTTTKCCACCAAGTTCCA -3'
<i>MIPS</i>	60	Forward : 5' TGCTGGAATHAAGCCACCT 3'
		Reverse : 5' TGAGGTAGCTCAGGATGGT 3'

จากการส่งตัวอย่างดีเอ็นเอคู่สมที่ได้จากการเพิ่มปริมาณกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *BADH* และ *MIPS* ที่วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอคู่สมมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

ดีเอ็นเอคู่สมที่เกิดจากไพรเมอร์ของยีน *BADH* ในอ้อยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

TTGGAGCTGCTGGTTGTACTGCTGTGCTAAAGCCATCCAGAATTGGCTTCTGTGACTT
GCTTAGAGCTTGCTGATATCTGTAAAGAAGTCGGTCTTCCTTCTGGTGTCTTGAACAT
TGTGACAGGATTAGGTCCGGATGCTGGTGCTCCTTTGTCAGCGCACCCAGATGTTGAC
AAGGTCGCTTTTACTGGGAGTTTTGAAACTGGTAAGAAGATTATGGCAGCTGCAGCT
CCTATGGTCAAGCCTGTTACGCTGGAAGCTGGTGGAAAAAGTCCTATAGTAGTATTTG
ATGATGTTGACATTGACAAAGCTGTTGAATGGACTCTA

ดีเอ็นเอคู่สมที่เกิดจากไพรเมอร์ของยีน *MIPS* ในอ้อยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

GTGGACTAACCCCTTTGGGTAACAACGATGGCATGAACCTGTCTGCCCTCAAACAT
TCAGGTCCAAGGAGATCTCCAAGAGCAATGTGGTGGATGACATGGTCTCAAGCAATG
CTATCCTCTATGAGCCCGGCGAGCATCCCGATCATGTTGTTGTCATCAAGTATGTGCC
GTATGTGGGAGACAGTAAGAGGGCTATGGATGAGTACACCTCCGAGATCTTCATGGG
CGGCAAGAACACCATCGTGCTGCACAACACCTGTGAGGACTCACTACTCGCCGCACC
TATCATCCTTGATCTGGTGCTCCTGGCTGAGCTCAGCACCAGGATCCAGCTAAAAGCT
GAGGGAGAGGACAAGTTCCACTCCTTCCACCCGGTGGCCACCATCCTGAGCTACCTC
A

7. การตรวจสอบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ได้จากฐานข้อมูล

การตรวจสอบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม BLAST จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ที่ใช้ในการค้นหาและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการป้อนข้อมูลให้โปรแกรมพบว่า ดีเอ็นเอคู่สมของอ้อยขนาด 327 นิวคลีโอไทด์ มีความเหมือนกับยีน *BADH* และดีเอ็นเอคู่สมของอ้อยขนาด 402 นิวคลีโอไทด์ มีความเหมือนกับยีน *MIPS* พบว่าบางส่วนของยีน *BADH* และ *MIPS* มีลำดับความคล้ายคลึงกับยีนทั้ง 2 ในพืชหลายชนิด (ตารางที่ 6 และ 7)

โดยพบว่ายีน *BADH* มีความเหมือนกับพืชหลายชนิดจากฐานข้อมูลเช่น ใน AY587278.1 (*Zea mays*), SBU12195 (*Sorghum bicolor*), AB161709.1 (*Zoysia tenuifolia*) และ EU770324.1 (*Oryza sativa japonica*) 96 93 90 และ 86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยีน *MIPS* ใน AF056326.1 (*Zea mays*), AB012107.1 (*Oryza sativa japonica*), AF542968.1 (*Triticum aestivum*) และ XM_003558559.1 (*Brachypodium distachyon*) 96 90 90 และ 89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับโดยการทดลองนี้ใช้ยีน *Actin* ซึ่งเป็นยีนอ้างอิงเพื่อใช้ตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้ว่ามีคุณภาพเพียงพอ

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *BADH* ที่สังเคราะห์ได้จากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN Version 2.2.25

Accession number	Description	Length	Strand	Identities	Score (bits)	E value
AY587278.1	<i>Zea mays</i> betaine aldehyde dehydrogenase mRNA, complete cds	1762	Plus/Plus	307/321 (96%)	513 (568)	5e-142
SBU12195	<i>Sorghum bicolor</i> clone BADH1 betaine aldehyde dehydrogenase mRNA,partial cds	1377	Plus/Plus	302/325 (93%)	461 (510)	3e-126
AB161709.1	<i>Zoysia tenuifolia</i> mRNA for betaine aldehyde dehydrogenase, partial cds, clone:1	1213	Plus/Plus	290/321 (90%)	435 (482)	1e-118
AB161702.1	<i>Zoysia tenuifolia</i> mRNA for betaine aldehyde dehydrogenase, complete cds, clone:2	1802	Plus/Plus	289/321 (90%)	432 (478)	1e-117
AB161705.1	<i>Zoysia tenuifolia</i> mRNA for betaine aldehyde dehydrogenase, complete cds, clone:7	1744	Plus/Plus	286/321 (89%)	417 (462)	3e-113
XM_003574447.1	<i>Brachypodium distachyon</i> betaine aldehyde dehydrogenase 1, chloroplastic-like, mRNA complete cds	1675	Plus/Plus	281/322 (87%)	392 (434)	1e-105
DQ497618.1	<i>Leymus chinensis</i> betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) mRNA,partial cds	678	Plus/Plus	277/322 (86%)	374 (414)	3e-100
EU770324.1	<i>Oryza sativa Japonica</i> betaine aldehyde dehydrogenase (badh2) mRNA, complete cds	1505	Plus/Plus	276/321 (86%)	372 (412)	1e-99

ตารางที่ 6 (ต่อ) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *BADH* ที่สังเคราะห์ได้จากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN Version 2.2.25

Accession number	Description	Length	Strand	Identities	Score (bits)	E value
DQ288724.1	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. vulgare betaine aldehyde dehydrogenase mRNA, partial cds	728	Plus/Plus	276/322 (86%)	370 (410)	4e-99
DQ288724.1	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. vulgare betaine aldehyde dehydrogenase mRNA, partial cds	728	Plus/Plus	276/322 (86%)	370 (410)	4e-99
AY050316.1	<i>Triticum aestivum</i> betaine-aldehyde dehydrogenase (BADH) mRNA, complete cds	1726	Plus/Plus	273/322 (85%)	356 (394)	8e-95
FJ595952.1	<i>Spinacia oleracea</i> betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) mRNA, complete cds	1494	Plus/Plus	252/319 (79%)	269 (298)	9e-69
M31480	Spinach betaine-aldehyde dehydrogenase (BADH) mRNA, complete cds	1797	Plus/Plus	252/319(79%)	269bits(298)	1e-68
DQ011151	<i>Chrysanthemum lavandulifolium</i> betaine aldehydedehydrogenase (BADH1) mRNA	1821	Plus/Plus	252/322(78%)	262 bits(290)	1e-66
AB333793	<i>Glycine max</i> peroxisomal betaine-aldehyde dehydrogenase (BADH2), mRNA	1512	Plus/Plus	249/318(78%)	259 bits(286)	2e-65
EF174190	<i>Jatropha curcas</i> betaine-aldehyde dehydrogenase (BADH) mRNA, complete cds	1769	Plus/Plus	244/319(76%)	233 bits(258)	7e-58

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MIPS ที่สังเคราะห์ได้จากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN Version 2.2.25

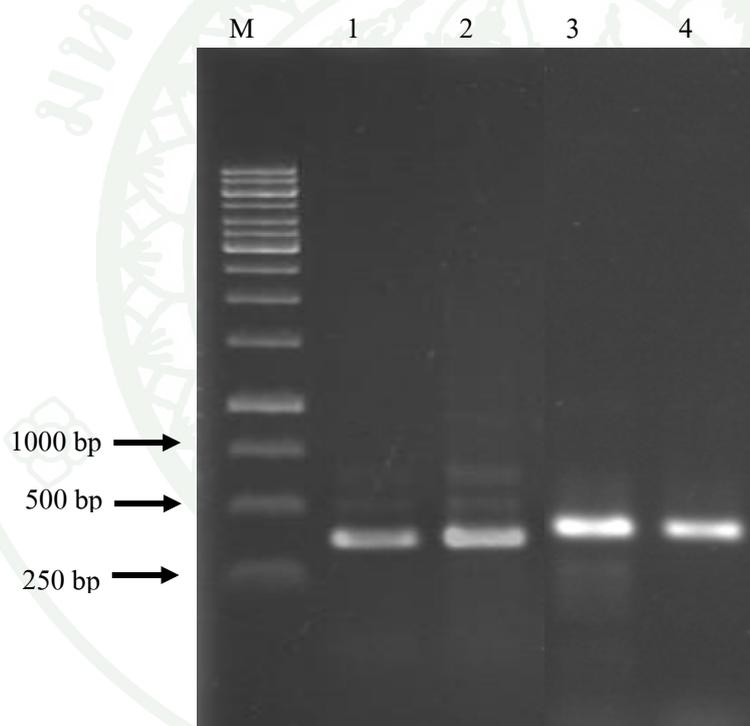
Accession number	Description	Length	Strand	Identities	Score (bits)	E value
AF056326.1	<i>Zea mays</i> myo-inositol 1-phosphate synthase mRNA, complete cds	1665	Plus/Plus	373/388 (96%)	632 (700)	9e-178
AY323824.1	<i>Xerophyta viscosa</i> myo-inositol-1-phosphate synthase INO1 mRNA, complete cds	1533	Plus/Plus	350/388 (90%)	529 (586)	8e-147
AB012107.1	<i>Oryza sativa Japonica</i> Group RINO1 mRNA for myo-inositol phosphate synthase, complete cds	1868	Plus/Plus	349/388 (90%)	524 (580)	3e-145
AF542968.1	<i>Triticum aestivum</i> myo-inositol 1-phosphate synthase-like mRNA, partial sequence	819	Plus/Plus	347/387 (90%)	518 (574)	1e-143
GU441843.1	<i>Spartina alterniflora</i> L-myoinositol 1-phosphate synthase (INO1) mRNA, complete	1533	Plus/Plus	347/388 (89%)	515 (570)	2e-142
XM_003558559.1	<i>Brachypodium distachyon</i> inositol-3-phosphate synthase-like (LOC100842175), mRNA	1935	Plus/Plus	344/387 (89%)	504 (558)	3e-139
JN609219.1	<i>Triticum aestivum</i> cultivar CPAN 1676 myo-inositol -1-phosphate synthase (MIPS2) mRNA, complete cds	1907	Plus/Plus	495 bits (548)	495 (548)	2e-136
AB059557.2	<i>Avena sativa</i> MIP mRNA for myo-inositol-1-phosphate synthase, complete cds	1936	Plus/Plus	341/387 (88%)	491 bits (544)	2e-135

ตารางที่ 7 (ต่อ)) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MIPS* ที่สังเคราะห์ได้จากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN Version 2.2.25

Accession number	Description	Length	Strand	Identities	Score (bits)	E value
AF056325.1	<i>Hordeum vulgare</i> myo-inositol 1-phosphate synthase mRNA, complete cds	2152	Plus/Plus	339/387 (88%)	482 bits (534)	1e-132
Q037841.1	<i>Hevea brasiliensis</i> myo-inositol-1 phosphate synthase (MIPS) mRNA, complete cds	1950	Plus/Plus	327/387 (84%)	428 bits (474)	2e-116
AB009881.1	<i>Nicotiana tabacum</i> mRNA for myo-inositol 1-phosphate synthase, complete cds	1959	Plus/Plus	324/390 (83%)	407 bits (450)	6e-110
BT001931.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> clone C105378 putative myo-inositol-1-phosphate synthase (At4g39800) mRNA, complete cds	1567	Plus/Plus	318/388 (82%)	385 bits (426)	2e-103
FJ823976	<i>Ricinus communis</i> myo-inositol-1-phosphate synthase (MIPS) mRNA, complete cds	1669	Plus/Plus	324/392(83%)	401 bits(444)	3e-108
FJ415168	<i>Gossypium hirsutum</i> clone Spot14 Myo-inositol-1-phosphate synthase mRNA, complete cds	1881	Plus/Plus	326/387(84%)	423 bits(468)	9e-115
U32511	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> myo-inositol-1-phosphate synthase mRNA, complete cds	2053	Plus/Plus	327/388(84%)	425 bits(470)	2e-115

8. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สมจาก first stranded cDNA ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *BADH* และ *MIPS*

จากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สมจาก first stranded cDNA ที่ได้จาก mRNA ของใบและรากอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่ได้รับสภาพขาดน้ำโดยการเติม PEG 6,000 ลงในอาหารเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 28 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้ยีน *BADH*, *MIPS* และ *Actin* ด้วยเทคนิค PCR และวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วย 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล พบว่าตัวอย่างที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สมด้วยไพรเมอร์ของยีน *BADH* เกิดแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 327 คู่เบส และไพรเมอร์ของยีน *MIPS* เกิดแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 402 คู่เบส (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน ดีเอ็นเอคู่สมที่ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *BADH* และ *MIPS*

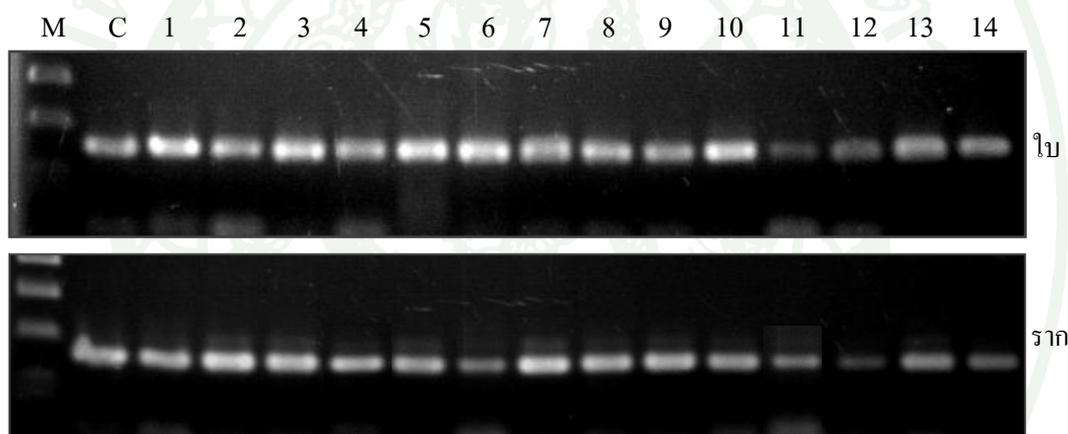
Lane M 1 kb ladder marker (บริษัท Fermentas)

Lane 1-2 ดีเอ็นเอคู่สมจาก first stranded cDNA ของใบและรากอ้อยตามลำดับยีน *BADH*

Lane 3-4 ดีเอ็นเอคู่สมจาก first stranded cDNA ของใบและรากอ้อยตามลำดับยีน *MIPS*

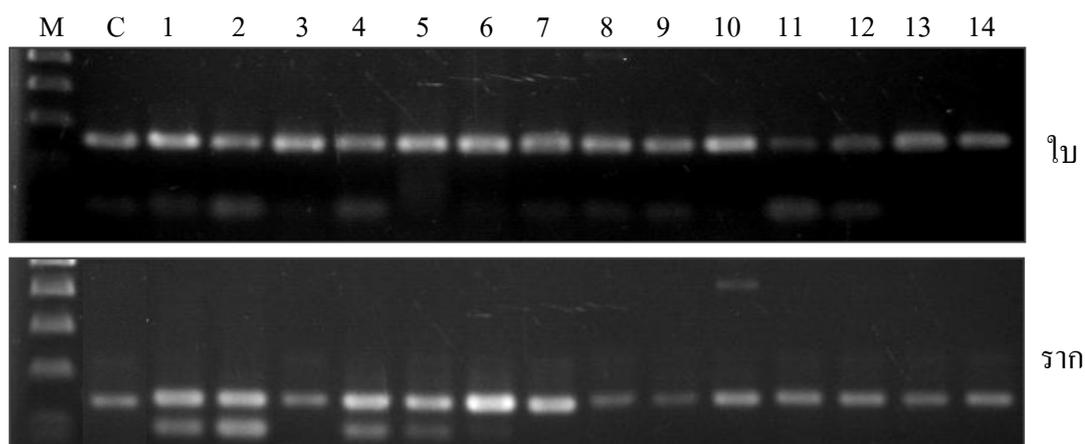
9. ศึกษาการแสดงออกของยีน *BADH* และ *MIPS* ด้วยเทคนิค real-time PCR

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ทำโดยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *BADH* และยีน *MIPS* สำหรับทำ real-time PCR ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ (ตารางที่ 2) ใช้ดีเอ็นเอกลุ่มจาก first stranded cDNA ที่ได้จาก mRNA จากใบและรากอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 และ Kps 01-11-6 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเหลว MS ที่ได้รับสภาพขาดน้ำโดยการเติม PEG 6,000 ลงในอาหารเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 6 12 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมงเป็นแม่แบบวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอด้วยการทำโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วย 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล พบว่า ตัวอย่างที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอกลุ่มด้วยไพรเมอร์ของยีน *BADH* และ *MIPS* เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 120 คู่เบส (ภาพที่ 12 13 14 และ 15)



ภาพที่ 12 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอกลุ่มจาก first stranded cDNA ของใบและรากอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *BADH*

- Lane M = 100 pb ladder marker (บริษัท Fermentas)
- Lane C = ต้นปลูกที่ไม่ได้เติม PEG
- Lane 1-2 = 6 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ
- Lane 3-4 = 12 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ
- Lane 5-6 = 24 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ
- Lane 7-8 = 48 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ
- Lane 9-10 = 72 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ
- Lane 11-12 = 96 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ
- Lane 13-14 = 120 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 13 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สมจากfirst stranded cDNA จากใบและรากอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *BADH*

Lane M = 100 pb ladder marker (บริษัท Fermentas)

Lane C = ต้นปลูกที่ไม่ได้เติมPEG

Lane 1-2 = 6 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Lane 3-4 = 12 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

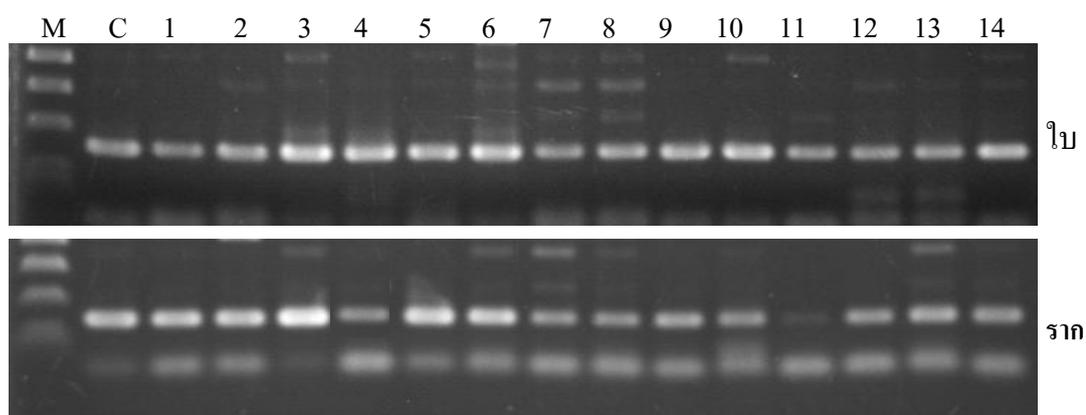
Lane 5-6 = 24 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Lane 7-8 = 48 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Lane 9-10 = 72 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Lane 11-12 = 96 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Lane 13-14 = 120 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 14 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สมจาก firsted stranded cDNA จากใบและรากอ้อยพันธุ์ Kps

94-13 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *MIPS*

Lane M = 100 pb ladder marker (บริษัท Fermentas)

Lane C = ต้นปลูกที่ไม่ได้เติมPEG

Lane 1-2 = 6 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Lane 3-4 = 12 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

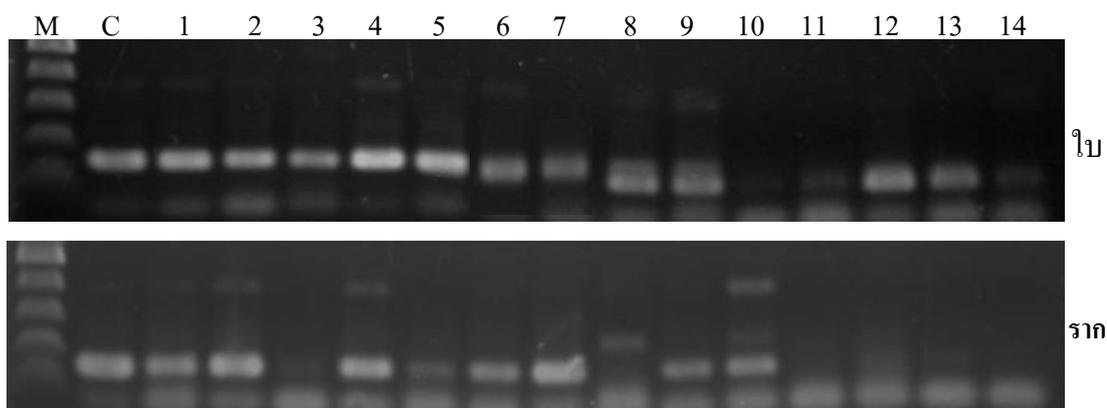
Lane 5-6 = 24 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Lane 7-8 = 48 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Lane 9-10 = 72 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Lane 11-12 = 96 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Lane 13-14 = 120 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 15 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สมจาก first strand cDNA ของใบและรากอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *MIPS*

Lane M = 100 pb ladder marker (บริษัท Fermentas)

Lane C = ต้นปลูกที่ไม่ได้เติมPEG

Lane 1-2 = 6 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Lane 3-4 = 12 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Lane 5-6 = 24 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Lane 7-8 = 48 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Lane 9-10 = 72 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Lane 11-12 = 96 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Lane 13-14 = 120 ชั่วโมง PEG 16 เปอร์เซ็นต์ และ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การแสดงออกของยีนเป็นการถ่ายทอดข้อมูลทางรหัสพันธุกรรมที่บรรจุอยู่ในดีเอ็นเอไปยัง mRNA แล้วแปลรหัสไปเป็นโปรตีน ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกเซลล์จะต้องมีข้อมูลทางพันธุกรรม ในระหว่างการเจริญเติบโตและการพัฒนาการต่าง ๆ แต่ละเซลล์จะมีกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านี้แตกต่างกัน การควบคุมการแสดงออกของยีนแบ่งเป็นสองขั้นตอนคือ ขั้นตอนระหว่างกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรม (transcription) โดยเป็นการควบคุมการสังเคราะห์ mRNA ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสาย mRNA จะถูกกำหนดโดยลำดับของนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอแม่แบบ และขั้นตอนการแปลรหัสพันธุกรรม(translation) เป็นขั้นตอนการแปลรหัสเพื่อสังเคราะห์โปรตีนโพลีเปปไทด์ หรือโปรตีน การแสดงออกของยีนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนหรือเอนไซม์ เพื่อตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมหนึ่ง ๆ การแสดงออกของยีนจึงมีผลต่อปริมาณโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นด้วย เมื่อเซลล์ต้องการโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่งมากขึ้นจึงต้องมีกระบวนการถอดรหัสจากแม่พิมพ์ดีเอ็นเอให้เป็นอาร์เอ็นเอมากขึ้นตามไปด้วย

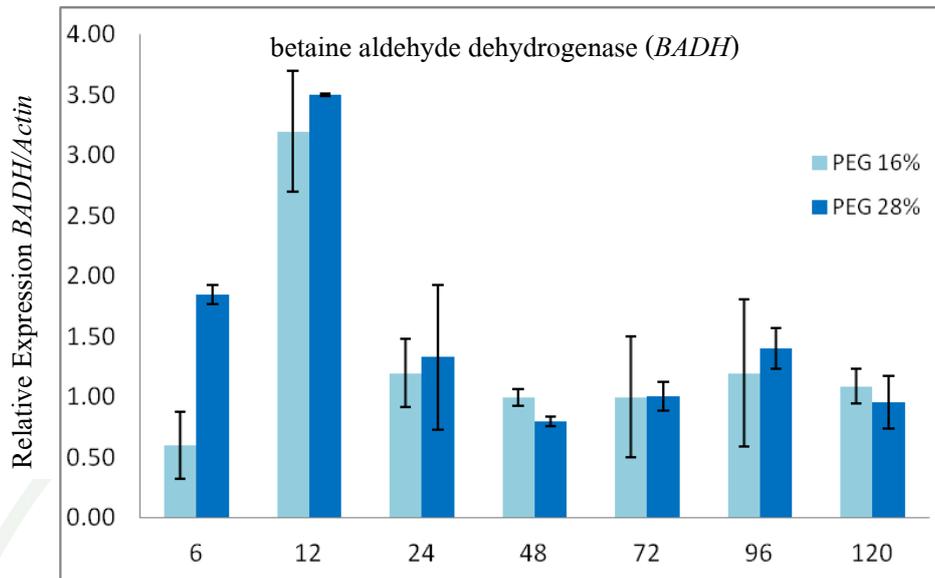
จากการศึกษาการแสดงออกของยีนภายใต้สภาวะเครียดจากการขาดน้ำ โดยการเติม PEG ลงในอาหารเพาะเลี้ยงที่ช่วงเวลาต่าง ๆ โดยยีนที่ศึกษาคือ *BADH* และ *MIPS* ซึ่งเมื่อตรวจผลของดีเอ็นเอ ที่ได้จากการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น first stranded cDNA ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนทั้งสองแล้วตรวจผล อิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วย 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล แสดงแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏพบ ยีน *BADH* ในอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 และ Kps 01-11-6 ที่ใบ และราก ในขณะที่ยีน *MIPS* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอในอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 และ Kps 01-11-6 ที่ใบ และราก เช่นเดียวกัน จากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏนั้นยังไม่สามารถวิเคราะห์ระดับการแสดงออกยีนดังกล่าวได้ ดังนั้นจึงมีการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนในการศึกษาครั้งนี้ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ผลการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณของยีน ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (SYBR Green) เทียบกับระดับการแสดงออกของยีน *Actin* พบว่ายีน *BADH* จากใบอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ที่เพาะเลี้ยง ในอาหารที่เติม PEG ความเข้มข้นที่ 16 เปอร์เซ็นต์มีการแสดงออกสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง ลดลงที่ 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่อ้อยที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 28 เปอร์เซ็นต์ ยีน *BADH* มีการแสดง ออกของยีน สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง จากนั้นการแสดงออกของยีนค่อย ๆ ลดลง ระยะเวลาที่ 24 48 72 96 และต่ำสุดที่ 120 ชั่วโมง เช่นกัน (ภาพที่ 16) ในขณะที่รากที่ได้รับ PEG ที่ความเข้มข้น 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์ยีน *BADH* มีการแสดงออกสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นการแสดงออกของยีนจะลดลง ที่ 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 17)

ในอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 พบว่าการ แสดงออกของยีน *BADH* ในใบที่ได้รับ PEG ความเข้มข้นที่ 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์มีการแสดงออกสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง จากนั้นการแสดงออกจะลดลง ที่ 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ การแสดงออกของยีนในรากพบว่าการแสดงออกของ

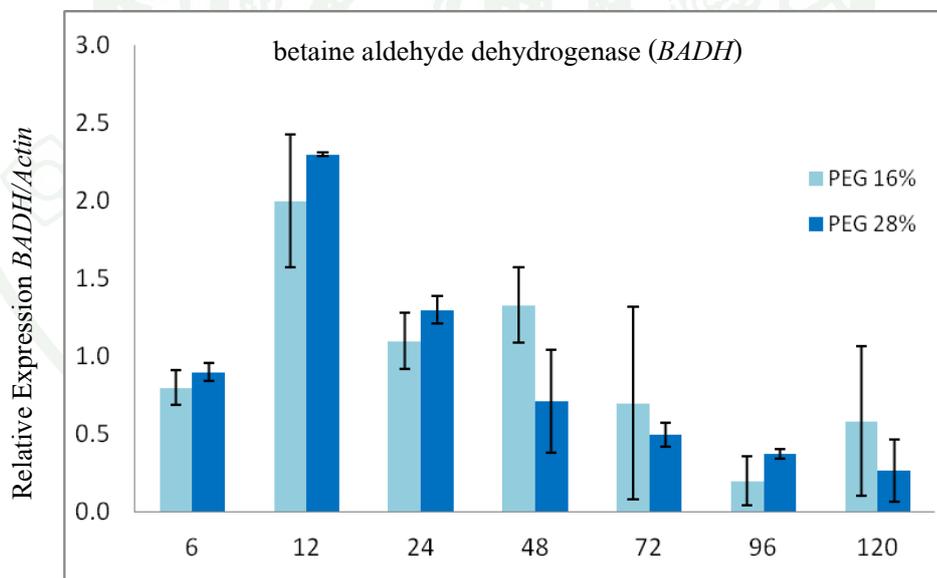
ยีน *BADH* ที่ได้รับ 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์ มีการแสดงออกที่ 12 ชั่วโมง สูงสุดและลดลงใน ชั่วโมงที่ 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง (ภาพที่ 18 และ 19)

เมื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *MIPS* ในใบอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 พบว่าการแสดงออกของยีนในต้นที่ได้รับ PEG ความเข้มข้นที่ 16 เปอร์เซ็นต์มีการแสดงออกสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง จากนั้นมีการแสดงออกของยีนจะลดระดับลงที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง และต่ำสุดที่ 96 และ 120 ชั่วโมง และที่ PEG ความเข้มข้น 28 เปอร์เซ็นต์ยีน *MIPS* มีการแสดงออกสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง คิดเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นของ PEG ที่ 16 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นการแสดงออกของยีนค่อย ๆ ลดลงที่ 24 48 และต่ำสุดที่ 72 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ที่ 96 และ 120 ชั่วโมง (ภาพที่ 20) ในรากอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ยีน *MIPS* มีการแสดงออกสูงสุดที่ 6 ชั่วโมง และลดระดับลงต่ำสุดที่ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นที่ 72 96 และ 120 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ในขณะที่ PEG ความเข้มข้น 28 เปอร์เซ็นต์ระดับการแสดงออกสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง จากนั้นมีการแสดงออกจะลดลง และต่ำสุดที่ 48 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นที่ 72 96 และ 120 ชั่วโมง (ภาพที่ 21)

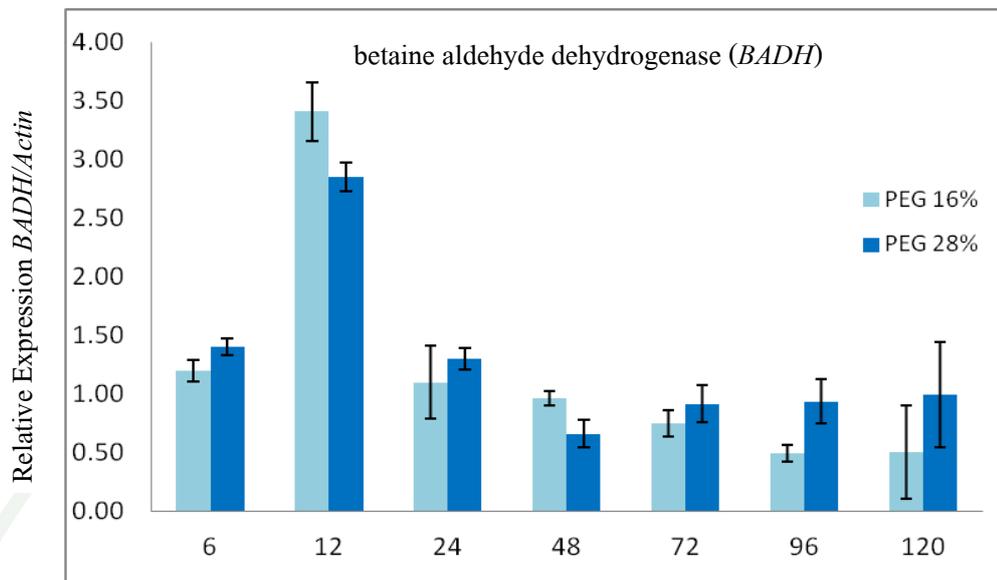
ในใบอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์พบว่ายีน *MIPS* มีการแสดงออก มากสุดที่ 12 ชั่วโมง จากนั้นลดระดับลงมาที่ 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ 72 ชั่วโมง และลดลงต่ำสุดที่ 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่ PEG ความเข้มข้น 28 เปอร์เซ็นต์สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง เป็น 2 เท่า ของความเข้มข้นที่ PEG ความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นการแสดงออกจะลดลงที่ 24 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นที่ 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นที่ 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่าลดลงต่ำสุด (ภาพที่ 22) ในรากอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์พบว่ายีน *MIPS* มีการแสดงออก มากสุดที่ 12 ชั่วโมง และลดระดับลง มาที่ 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ 72 ชั่วโมง และลดลงต่ำสุดที่ 120 ชั่วโมง ในขณะที่ PEG ความเข้มข้น 28 เปอร์เซ็นต์ระดับการแสดงออก สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง จากนั้นลดลงที่ 24 ชั่วโมง และหลังจากนั้นเพิ่มขึ้นที่ 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นที่ 96 และ 120 ชั่วโมง ลดลงต่ำสุด (ภาพที่ 23)



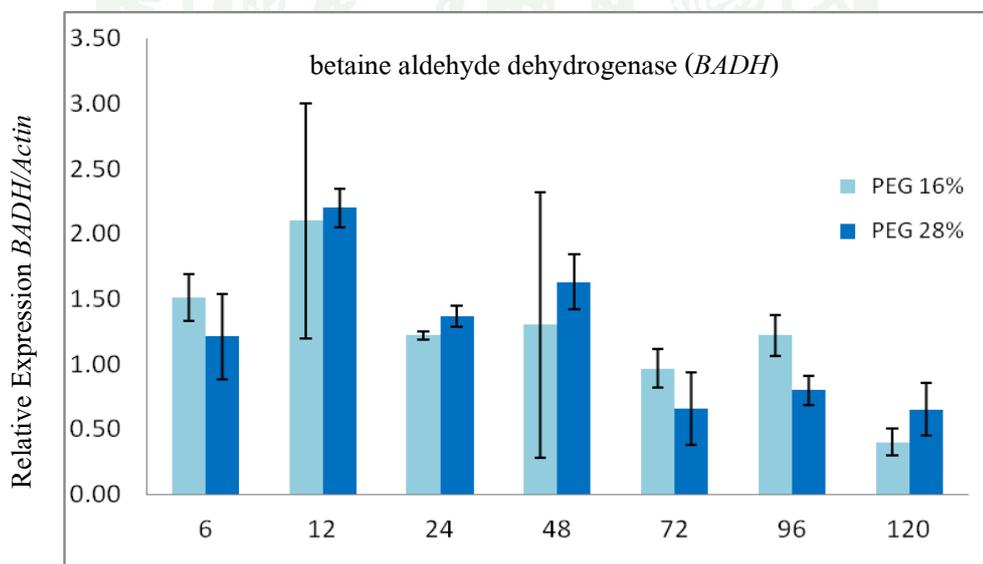
ภาพที่ 16 ระดับการแสดงออกของยีน betaine aldehyde dehydrogenase ในใบอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ที่ได้รับ PEG 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6-120 ชั่วโมง



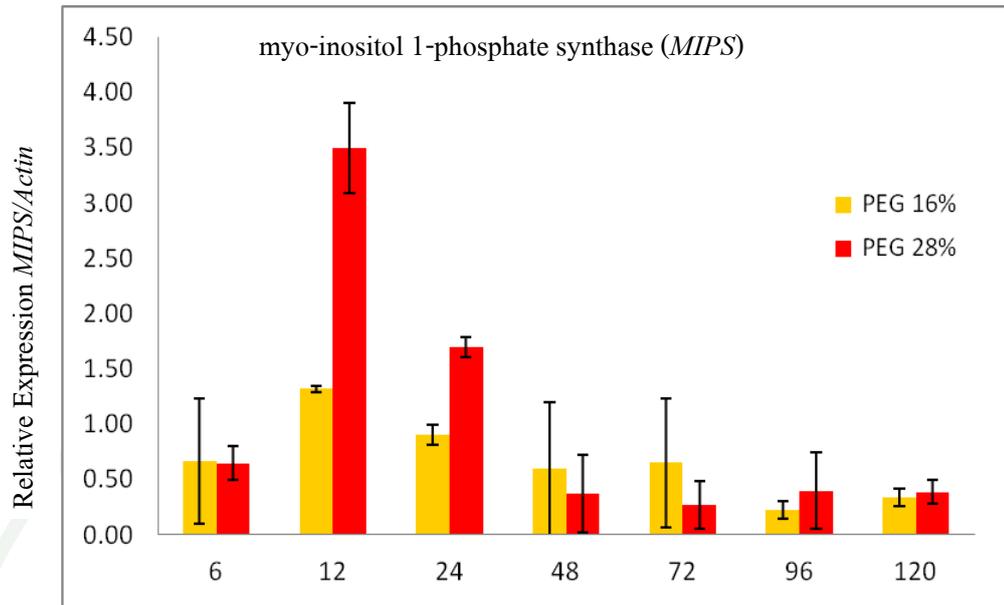
ภาพที่ 17 ระดับการแสดงออกของยีน betaine aldehyde dehydrogenase ในรากอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ที่ได้รับ PEG 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6-120 ชั่วโมง



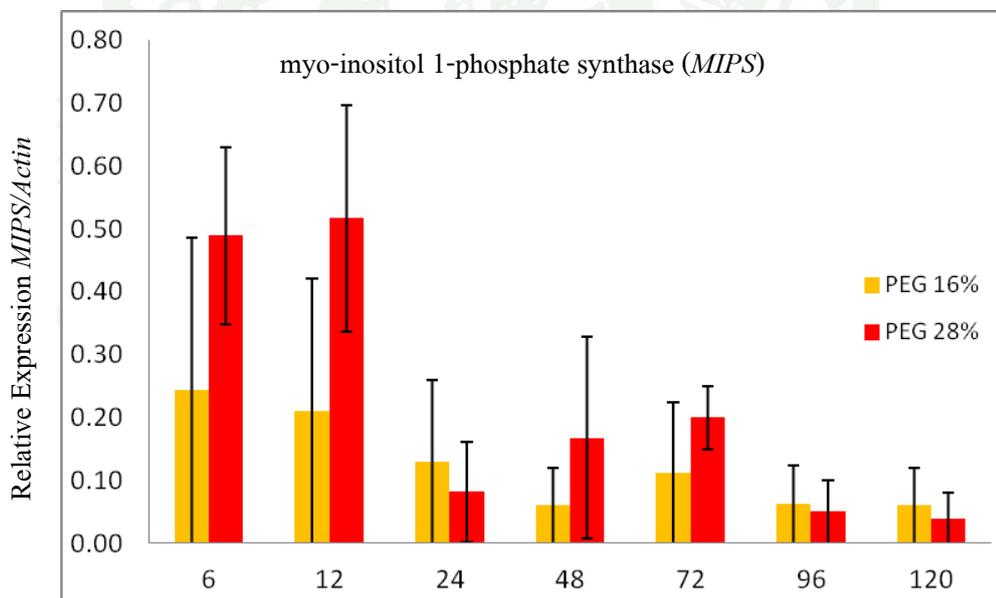
ภาพที่ 19 ระดับการแสดงออกของยีน betaine aldehyde dehydrogenase ในใบอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ที่ได้รับ PEG 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6-120 ชั่วโมง



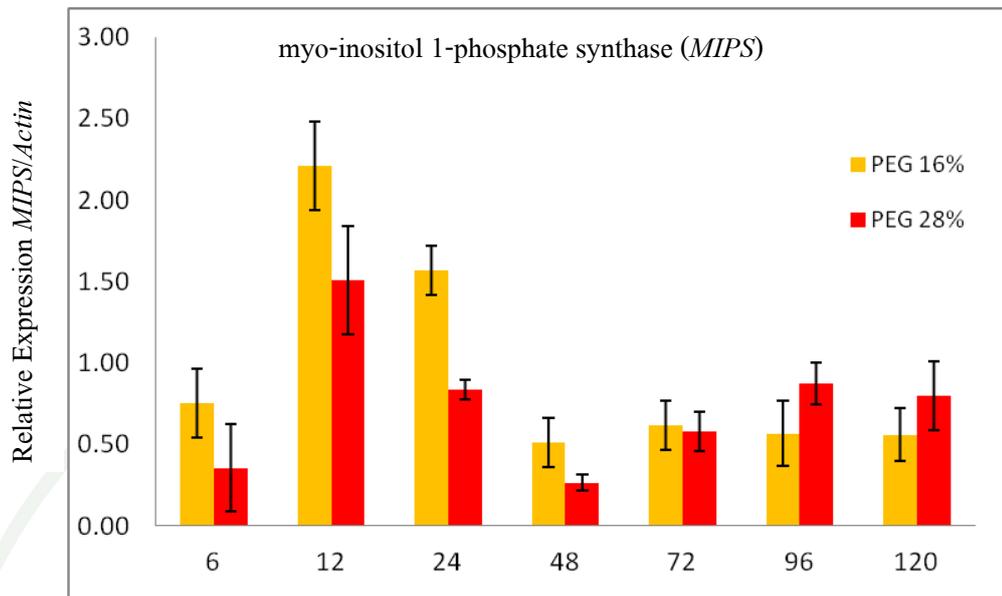
ภาพที่ 19 ระดับการแสดงออกของยีน betaine aldehyde dehydrogenase ในรากอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ที่ได้รับ PEG 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6-120 ชั่วโมง



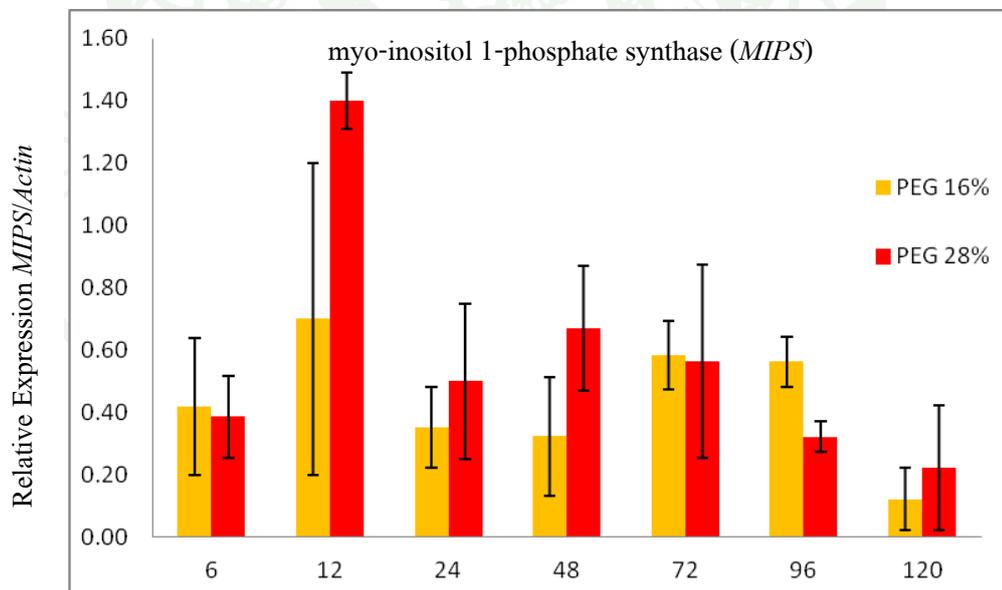
ภาพที่ 20 ระดับการแสดงออกของยีน myo-inositol 1-phosphate synthase ในใบอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ที่ได้รับ PEG 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6-120 ชั่วโมง



ภาพที่ 21 ระดับการแสดงออกของยีน myo-inositol 1-phosphate synthase ในรากอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ที่ได้รับ PEG 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6-120 ชั่วโมง



ภาพที่ 22 ระดับการแสดงออกของยีน myo-inositol 1-phosphate synthase ในใบ อ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ที่ได้รับ PEG 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6-120 ชั่วโมง



ภาพที่ 23 ระดับการแสดงออกของยีน myo-inositol 1-phosphate synthase ในรากอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ที่ได้รับ PEG 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6-120 ชั่วโมง

การศึกษาแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR ซึ่งสามารถวิเคราะห์ระดับการ แสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอจาก first stranded cDNA ในอ้อยทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ได้รับสภาพ ขาดน้ำโดยเติม PEG 2 ระดับ ความเข้มข้นที่ 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์ และในระยะเวลาที่ 6 12 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง ทำให้สามารถทราบระดับการแสดงออกของยีน *BADH* ซึ่งพบว่าในอ้อย พันธุ์ Kps 94-13 ซึ่งมีการแสดงออกของยีนที่ใบและรากสูงสุด ที่ระดับความเข้มข้นของ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ที่ 12 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกมากกว่า PEG ระดับความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีความทนแล้งได้ดี ในขณะที่พันธุ์ Kps 01-11-6 พบว่าในใบมีการ แสดงออกของยีนสูง ที่ระดับความเข้มข้น PEG 16 เปอร์เซ็นต์ ที่ 12 ชั่วโมง และรากมีการแสดง ออกของยีนสูงที่ 12 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นของ PEG 28 เปอร์เซ็นต์

ซึ่งจากผลการศึกษาการแสดงออกของยีนทำให้ทราบว่าในอ้อยทั้ง 2 สายพันธุ์ พบลักษณะ การเปลี่ยนแปลงของใบ และรากแสดงอาการเหี่ยว ใบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ปลายใบเปลี่ยนเป็นสี น้ำตาลแห้ง รากเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีน้ำตาลซึ่งในพันธุ์อ้อย Kps 94-13 ซึ่งทนทานต่อสภาพการ ขาดน้ำปรากฏลักษณะน้อยกว่าพันธุ์ไม่ทนแล้ง และระดับการแสดงออกของยีนซึ่งมีการแสดงออก ของ mRNA ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ที่ทำหน้าที่ในการคัดลอกรหัสจากบริเวณสายดีเอ็นเอเพื่อนำไป สังเคราะห์โปรตีนหรือเอนไซม์ต่าง ๆ ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยการสร้างสารประกอบทางเคมีทำ ให้เกิดการเพิ่มปริมาณของ compatible solutes คือ glycine betaine และ myo-inositol เพื่อทำให้พืช มีกระบวนการชีวเคมีได้อย่างปกติ จากสภาพขาดน้ำทำให้พืชสูญเสียความเต่งของเซลล์ ส่งผลให้ เกิดการปิดของปากใบ การม้วนใบ และการลดพื้นที่ใบ ทำให้การเจริญโตลดลง และตายในที่สุด (ศิริลักษณ์, 2553) เพื่อปรับสมดุลของสารละลายภายในเซลล์กับภายนอกเซลล์ ซึ่งสามารถพบได้ ทั้งในสภาพปกติ และมีสะสมเพิ่มขึ้นหลังจากพืชได้รับสภาพเครียด โดยยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ สารดังกล่าวคือ ยีน *BADH* และ *MIPS* ซึ่งการศึกษา *BADH* มีรายงานพบในคลอโรพลาสต์ของ ผักโขม (Weretilnyk and Hanson, 1990) พืชแถบป่าชายเลนที่ได้รับสภาพความเค็มจากน้ำทะเล *Avicennia marina* (Liu et al., 2010) และนอกจากนั้นในข้าวสามารถพบในส่วนของ peroxisomes ได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นการแสดงออกของยีน *BADH* จากการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นไปได้ที่ตรวจสอบ พบระดับการแสดงออกของยีนหลังจากได้รับสภาพขาดน้ำที่เติม PEG ลงในอาหารเพาะเลี้ยง โดยที่ ระดับการขาดน้ำรุนแรง (PEG 28 เปอร์เซ็นต์) สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งรูปแบบการแสดงออกยีนนั้น Gisele et al. (2013) รายงานว่าเมื่ออ้อยขาดน้ำจะมีการส่งสัญญาณ ภายในเซลล์เพื่อให้ยีนที่ควบคุมการตอบสนองต่อสภาพเครียด เช่น โปรตีนไคเนส (kinases) การสลายหมู่ฟอสเฟต (phosphatases) และ โปรตีนคัลมอดูลิน (calmodulin, CaM) เป็นโปรตีนที่ไม่ มีแอกทิวิตี (activity) ในตัวเองทำงานโดยจับ และควบคุมการทำงานของโปรตีนเป้าหมายชนิด

ต่าง ๆ ภายในเซลล์ โดยเมื่อ CaM จับกับแคลเซียมไอออนจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้สามารถกระตุ้นโปรตีนเป้าหมาย เพื่อส่งผ่านสัญญาณต่อไปเป็นลำดับ จนกระทั่งถึงการแสดงออกของยีนที่สำคัญต่อการปรับตัวของพืช เพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ในระดับเซลล์อย่างเหมาะสม สอดคล้องกับ Fitzgerald *et al.* (1990) ที่พบว่าเมื่อพืชได้รับความเครียดเอนไซม์ BADH จะทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส (oxidoreductase) ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการหายใจระดับเซลล์ เพื่อใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึมจากสารตั้งต้นคือ โคลีน (choline) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ Nakamura *et al.* (2001) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน BADH ในข้าวบาเลย์ ซึ่งเอนไซม์ BADH เป็นเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์ glycine betaine โดยจำแนกออกเป็น BADH1 และ BADH2 โดย BADH1 จะทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณในไมโครบอดี (microbodies) ซึ่งมีหน้าที่ในกระบวนการเมทาบอลิซึม เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน ในขณะที่ BADH2 จะพบมากในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่คลอโรพลาสต์ (chloroplast) ซึ่งรูปแบบการแสดงออกแสดงออกของยีนทั้ง 2 ชนิด จะแตกต่างกันคือ BADH1 มีการแสดงออกมากในรากมากกว่าใบเมื่อได้รับสภาพเครียดจากเกลือ และ ABA ในขณะที่ BADH2 มีการแสดงออกสูงในใบเมื่อได้รับสภาพ ความแล้ง PEG ความเค็ม และ ABA จากผลการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน BADH ในครั้งนี้พบว่าการแสดงออกสูงที่ 12 ชั่วโมง หลังจากได้รับสภาพขาดน้ำ สอดคล้องกับ shiro *et al.* (2009) ศึกษาการแสดงออกของยีน BADH1 และ BADH2 ด้วยเทคนิค real-time PCR ในข้าว โดยการเติมออกซิเจนหลังจากข้าวได้รับสภาพน้ำท่วมขัง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยระดับการแสดงออกของยีน BADH1 เริ่มที่ 30 นาทีแรก และพบว่าการแสดงออกสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง ในขณะที่การแสดงออกของยีน BADH 2 ที่ 30 นาที มีการแสดงออกของยีนในระดับต่ำ และที่ 12 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีนสูงสุด และลดลงที่ 24 ชั่วโมง ดังนั้นการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนในครั้งนี้จึงควรเพิ่มระยะเวลาในการทดสอบการแสดงออกของยีน BADH ที่ ชั่วโมงแรกของการได้รับสภาพขาดน้ำ เพราะรูปแบบการแสดงออกของยีนในใบ และรากใกล้เคียงกัน รวมทั้งการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน BADH การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน BADH1 และ BADH 2 ซึ่งจะมีการตอบสนองในสภาพความเครียดที่แตกต่างกัน

การแสดงออกของยีน MIPS พบว่าในอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 มีการแสดงออกที่ใบและรากสูงสุด ระดับความเข้มข้นของ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ ที่ 12 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกมากกว่า PEG ระดับความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 เป็นพันธุ์ที่มีความทนแล้งได้ดี ในขณะที่พันธุ์ Kps 01-11-6 พบว่าในใบมีการแสดงออกของยีนสูง ที่ระดับความเข้มข้น PEG 16 เปอร์เซ็นต์ ที่ 12 ชั่วโมง และรากมีการแสดงออกของยีนสูงที่ 12 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้น PEG 28 เปอร์เซ็นต์

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *MIPS* สอดคล้องกับรายงาน Hegeman *et al.* (2001) ที่พบว่ายีน *MIPS* มีการแสดงออกในระยะใบเลี้ยง (cotyledonary) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาล glucose-6-phosphate ซึ่งนำไปใช้สร้าง cell wall และ Wang *et al.* (2011) นำเมล็ดสบู่ดำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS แล้วให้ได้รับสภาพความเครียดจากเติม PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ และ โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าการแสดงออกของยีน *MIPS* ในใบมากกว่าราก และเมล็ด ซึ่งในสภาวะปกติพืชจะมีการแสดงออกของยีน *MIPS* อยู่ก่อนแล้ว เมื่อได้รับความเครียดจากการขาดน้ำ เอนไซม์ *MIPS* จะสร้างสาร myo-inositol มากขึ้นภายในเซลล์ เพื่อรักษาแรงดันเต่งภายในเซลล์ได้ สามารถดึงน้ำจากภายนอกเซลล์มาใช้ได้ เป็นเหตุผลในการสนับสนุนการแสดงออกของยีน *MIPS* และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการได้รับ PEG นานมากขึ้น แต่พบว่าการแสดงออกของยีนลดลงเพราะสารประกอบภายในเซลล์จากเอนไซม์ *MIPS* ที่สร้างขึ้น คือ myo-inositol สามารถช่วยปรับสมดุลน้ำภายในเซลล์ ทำให้พืชรักษาสภาพการเจริญได้ตามปกติ แต่เมื่อการขาดน้ำเข้าสู่ขั้นวิกฤต พืชไม่สามารถทนต่อสภาพขาดน้ำขั้นรุนแรงได้ สารประกอบภายในเซลล์รวมทั้งเอนไซม์จะเสื่อมสภาพ เพราะในเวลา 72-120 ชั่วโมง พบว่าสารละลายอาหารมีการเปลี่ยนสีเข้มขึ้น เนื่องจากน้ำถูกดึงออกจากเซลล์ของรากและเซลล์เริ่มตายจึงมีการปลดปล่อยสารต่าง ๆ ภายในเซลล์รวมทั้งสารประกอบฟีนอลด้วย ทำให้สารละลายอาหารเปลี่ยนสี ดังนั้นจากการศึกษาการแสดงออกของยีน *BADH* และ *MIPS* ในอ้อยสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบการศึกษา ของอ้อยที่ได้รับสภาพขาดน้ำในสภาพต่าง ๆ และอาจใช้ในการคัดเลือกลักษณะทนแล้งของอ้อยเบื้องต้นได้

สรุป

การตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 และ Kps 01-11-6 โดยการเติม PEG ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 16 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเพาะเลี้ยงต้นอ้อย ที่ระยะเวลาต่าง ๆ 7 ระดับ คือ 6 12 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง พบการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำ ที่ PEG 28 เปอร์เซ็นต์ โดยแสดงอาการใบเหลืองและรากมีสีน้ำตาลอย่างชัดเจน พันธุ์ที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำได้ดีคืออ้อยพันธุ์ Kps 94-13 พันธุ์ และ พันธุ์อ้อยที่ไม่ทนทานคือ Kps 01-11-6

การหาบางส่วนของยีน *BADH* และ *MIPS* ในอ้อย โดยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ ยีนดังกล่าว พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 327 คู่เบส และ 402 คู่เบส และมีความเหมือนกับยีน *BADH* ในพืชหลายชนิด เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง หนุ่ย และ ข้าว 96 93 90 และ 86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยีน *MIPS* มีความเหมือนใน ข้าวโพด ข้าว ข้าวสาลี และหนุ่ย 96 90 90 และ 89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่คาดว่าจะเป็ยีน *BADH* และ *MIPS* โดยใช้ เทคนิค real-time PCR พบว่าการแสดงออกของยีน *BADH* ในใบและรากอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ที่ได้รับ PEG ที่ระดับความเข้มข้น 28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีนมากที่สุด ในขณะที่ใบอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ที่ได้รับ PEG ที่ระดับความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และรากที่ระดับความเข้มข้น 28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงมีการแสดงออกของยีนมากที่สุด และการแสดงออกของยีน *MIPS* ในใบและรากของอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ที่ได้รับ PEG ที่ระดับความเข้มข้น 28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีนมากที่สุด ในขณะที่ในใบอ้อยพันธุ์ Kps 01-11-6 ที่ได้รับ PEG ที่ระดับความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และรากที่ได้รับ PEG ระดับความเข้มข้น 28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีน *MIPS* สูงสุด และการแสดงออกของยีน *BADH* และ *MIPS* ในใบมากกว่าในราก

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กนิษฐา สำราญ, นนทิชา เกิดสุข และ อรรถสิทธิ์ บุญธรรม. 2555. การเปรียบเทียบมาตรฐานพันธุ์ อ้อยเพื่อผลผลิตและคุณภาพอ้อย: อ้อยปลูก. การประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9.

กุหลาบ คงทอง และ ประสาน สืบสุข. 2548. การวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีน **cinnamyl-alcoholdehydrogenase (CAD)**. กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนา เทคโนโลยีชีวภาพ.

เฉลิมพล แซมเพชร. 2535. **สรุปรายการการผลิตพืชไร่**. สำนักพิมพ์ โอเอส พรินต์เฮาส์, กรุงเทพฯ.

ชุมพล คุณวาสี. 2549. การตอบสนองและการควบคุมภายในพืช. **เอกสารประกอบการสอนวิชาชีววิทยา**. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

นพพร สาย้มพล. 2543. **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประเสริฐ นัตถวชิระวงษ์. 2542. **อ้อย: พืชเศรษฐกิจ**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปรียาภรณ์ ต่อวงศ์, วิทยา สาธรวีระพงษ์ และ สาวณี สาธรวีระพงษ์. 2549. ผลของสภาวะความเครียดขาดน้ำต่อสัณฐานวิทยาและการออกดอกของส้มเปลือกอ่อนพันธุ์ฮันนี่. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44: สาขาพืช, กรุงเทพฯ.

ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ. 2555. รายงานผลการตรวจสอบพืชจีเอ็มของประเทศไทย 2554-2555. ห้องปฏิบัติการทรานเจนิกเทคโนโลยีในพืชและไบโอเซ็นเซอร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

เรวัต เลิศฤทัยโยธิน. 2551. **คู่มือการขยายพันธุ์อ้อย**. พิมพ์ครั้งที่ 3. ศูนย์วิจัยและพัฒนาอ้อยและน้ำตาล, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- วารสารเคมี แอ้มเอ, เรวัต เลิศฤทัยโยธิน และ อภิวิชญ์ ทรงกระสินธุ์. 2556. การจัดกลุ่มสถานที่ทดสอบพันธุ์อ้อยโดยวิธีอินโทรไปบวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์กับสภาพแวดล้อม. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี . 2: 11-24.
- วีระพงษ์ ลุดิตานนท์. 2551. **พื้นฐาน Real Time Polymerase Chain Reaction**. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- วิไลลักษณ์ ชินะจิตร และ กิริยา สังข์ทองวิเศษ. มปป. **เอกสารประกอบการสอนวิชา 134101 หลักการผลิตพืช**. พิษฐาน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- ศยามล สิทธิสาร, ปุณทริกา หะริณสูตร, สมชัย พรบันลือลาภ และ สุริยันต์ ชะอุ่ม. 2554. **การสะสมของไกลซีนบีเทนและกิจกรรมของเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสในยูคาลิปตัส**. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ศิริลักษณ์ นามวงษ์. 2553. **ศักยภาพของแบคทีเรียทนเค็ม และ แบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง ทางเทคโนโลยีชีวภาพ**. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา.
- ศรีสม สุวรรณวงศ์. 2549. **สรีรวิทยาของพืช**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล, ชีรวิภา วงศ์วรรณ์, ปิยะดา ชีระกุลพิสุทธิ์, ทักษิณา ศันสยะวิชัย, สุนี ศรีสิงห์, นิลุบล ทวีกุล, นฤทัย วรสถิตย์ และ รังสี เจริญสถาพร. 2554. **วิธีประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยด้วยเทคนิคพีซีอาร์**. ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น, ขอนแก่น.
- สายันท์ สดุดี. 2537. **สภาวะขาดน้ำในการผลิตพืช**. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล. 2556. **รายงานพื้นที่ปลูกอ้อย 2555/2556**. วารสารวิชาการ, กรุงเทพฯ.

- อัญชลี นิลสุวรรณ. 2556. ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาวะอากาศต่อพืชอาหาร. สาขาวิชา
ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร, กรุงเทพฯ.
- อาทิตย์ ขอดใจ และ จักรี เส้นทอง. 2553. ผลของการขาดน้ำในระยะการเจริญเติบโตและผลผลิตของ
ถั่วเหลือง. ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์,
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- 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.
- Ain-Lhont, F., F.A. Zunzunegui, M.C. Diaz Barradas, R. Tirado, A. Clavijio and F.C. Novo.
2000. Comparison of proline accumulation into mediterranean shrubs subjected to
natural and experimental water deficit. **Plant Soil** 230: 175-183.
- Alan, D.E., Y.T. Pan, I. Pastuszak and D. Carroll. 2003. New insights on trehalose: a
multifunctional molecule. **Glycobiology** 13: 17-27.
- Andre, T.J. and T. Takabe. 2001. Inducers of glycinebetaine synthesis in barley. **Plant Physiol.**
127: 1828-1835.
- Barnett, N.M. and A.W. Naylor. 1966. Amino acid and protein metabolism in bermudagrass
during water stress. **Plant Physiol.** 41: 1222-1230
- Begg, J.E. and N.C. Turner. 1976. Crop water deficits. **Adv. Agron.** 28: 161-217.
- Begg, J.E. 1980. **Morphological adaptations of leaves to water stress**, pp 33-42. New
York Wiley.

- Bradford, K.J. and T.C. Hsiao. 1982. Physiological responses to moderate water stress. *In* : O.L. Lange et. al., eds., **Encyclopedia of Plant Physiology**, New Series. Springer Verlag, Berlin. pp. 264-324.
- Bressan, R.A., P.M. Hasegawa and A.K. Handa. 1981. Resistance of cultured higher plant cells to polyethylene glycol-induced water stress. **Plan. Sci. Letters**. 21: 23-30.
- Chandler, P.M. and M. Robertson. 1994. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. **Ann. Rev. Plant Physiol**. 45: 113-141.
- Chang, H.H. and A.M. Dendeker. 1995. Regulation of proline accumulation in response to drought and heat stress in cotton. **African Crop Sci**. 8: 92-58.
- Chatterjee, A.D., G. Lily, M. Susmita, G.D. Krishnarup, R. Sudipta and L.M. Arun. 2006. Introgression of a novel salt-tolerant L-myo-inositol 1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka (PcINO1) confers salt tolerance to evolutionary diverse organisms. **FEBS Letters**. 580: 3980-3988.
- Chaves, M.M., J. Flexas and C. Pinheiro. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Ann. Bot**. 103: 551-560.
- Chen, T.H.H. and M. Norio. 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. **Curr. Opinion Plant Biol**. 5: 250-257.
- Cushman, J. and H.J. Bohnert. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. **Curr. Opinion Plant Biol**. 3: 117-124.
- Elizabeth, A.W. and A.A. Hanson. 1990. Molecular cloning of a plant betaine aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 87: 2745-2749.

- Farooq, M., A. Wahid, N. Kobayashi, D. Fujita and S.M.A. Basra. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agron. Sustain. Dev.** 29: 185-212.
- Fitzgerald, T.L., D.L.E. Waters and R.J. Henry. 2008. Betaine aldehyde dehydrogenase in plants. **Plant Biol.** 12: 549-587.
- Gajjerman, P., P.G. Kwar., M.C. Pagariya and D.T. Prasad. 2011. Identification of water deficit stress upregulated genes in sugarcane. **Environ. Exp. Bot.** 36: 29-38.
- Georgieva, M., D. Djilianov, T. Konstantinova and D. Parvanova. 2004. Screening of bulgarian raspberry cultivars and elites for osmotic tolerance in vitro. **Biotechnol. & Biotechnol. Eq.** 18: 95-98.
- Gillaspy, G.E. 2011. The cellular language of myo-inositol signaling. **New Phytologist.** 192: 823-839.
- Gisele, C.D., F.A. Rodrigues, P.G. Roberto, C.B. Neto, S.C. Franca and S.M. Zingaretti. 2013. Osmoprotection in sugarcane under water deficit conditions. **Plant Stress.** 7: 1-7.
- Goddijn, O.J.M. and K.V. Dun. 1999. Trehalose metabolism in plants. **TIBS.** 4: 315-319.
- Gzik, A. 1996. Accumulation of proline and pattern of amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt stress. **Environ. Exp. Bot.** 36: 29-38.
- Hanson, A.D. and W.D. Hitz. 1982. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. **Plant Physiol.** 33: 163-203.
- Hegeman, C.E., L.L. Good and E.A. Grabau. 2001. Expression of D-myo-inositol-3-phosphate synthase in soybean. Implications for phytic acid biosynthesis. **Plant Physiol.** 125: 1941-1948.

- Hibino, T., Y.L. Ming, Y. Kawamitsu, N. Uehara, N. Matsuda, Y. Tanaka, H. Ishikawa, S. Baba, T. Takabe, K. Wada, T. Ishii and T. Takabe. 2001. Molecular cloning and functional characterization of two kinds of betaine-aldehyde dehydrogenase in betaine-accumulating mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. **Plant Mol. Biol.** 45: 353-363.
- Hirt, H. and K. Shinozaki. 2004. **Plant Responses to Abiotic Stress**. Springer Verlag, Berlin. pp. 1-8.
- Holmstrom, K.O., B. Welin, A. Mandal, I. Kristiansdottir, T.H. Teeri, T. Lamark, A.R. Strom and E.T. Palva. 1994. Production of the *Escherichia coli* glycinebetaine aldehyde dehydrogenase, an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in transgenic plants. **Plant J.** 6: 749-758.
- Hore, P.D., W.A. Cress and J.V. Staden. 1998. Dissecting the role of osmolyte accumulation during stress. **Plant Cell Environ.** 21: 535-553.
- Hsu, S.Y. and C.H. Kao. 2003. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regul.** 39: 83-90.
- Johnson, D.A., R.A. Richards and N.C. Turner. 1983. Yield water relations and surface reflectances of near isogenic wheat lines differing in glaucousness. **Crop Sci.** 23: 318-325.
- Karner, U., P. Thomas, R. Victor, A.J. David, L.H. Cliff and R. Andreas. 2004. Myo-Inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds. **J. Exp. Bot.** 55: 1981-1987.
- Kaushik, J.K. and R. Baht. 2003. Why is trehalose an exceptional protein stabilizer. **Biol. Chem.** 29: 26458-26465.

- 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 . 2011. **Simple and Rapid RNA Extraction from Young and Mature Leave of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. Special Problem. Kasetsart university. 27p.
- Legaria, J., R. Rajsbaum, R.A.M. Clares, N.V. Sepulveda, J. Simpson and G. Iturriaga, 1998. Molecular characterization of two genes encoding betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth. Expression in leaves under short-term exposure to osmotic stress or abscisic acid. **Gene** 218: 69-76.
- Li, Q.L, L.D. Wei, R.G.X. Rong, S. Qiao and A.L. Jia. 2003 Molecular cloning and characterization of betain aldehyde dehydrogenase from *Suaeda liaotungensis* and its use in improved tolerance to salinity in transgenic tobacco. **Biotechnology Letters.** 25: 1431-1436.
- Liu, J., H. Zenga, X. Li, L. Xu, Y. Wang, W. Tang and L. Han. 2010. Isolation and characterization of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in *Ophiopogon japonicas*. **Open Biotech. J.** 4: 18-25.
- Ludlow, M. M. and R.C. Muchow. 1990. A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. **Adv. Agron.** 43: 107-153.
- Majee, M., S. Maitra, K.G. Dastidar, S. Pattnaik, A. Chatterjee and N.C. Hait. 2004. A novel salt-tolerant L-myo-inositol-1- phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a halophytic wild rice. **J. Biol. Chem.** 279: 28539-28552.
- Manoj, K. and U. Deshpande. 2007. In *vitro* screening of tomato genotypes for drought resistance using polyethylene glycol. **Afri. Biotec.** 6: 691-696.

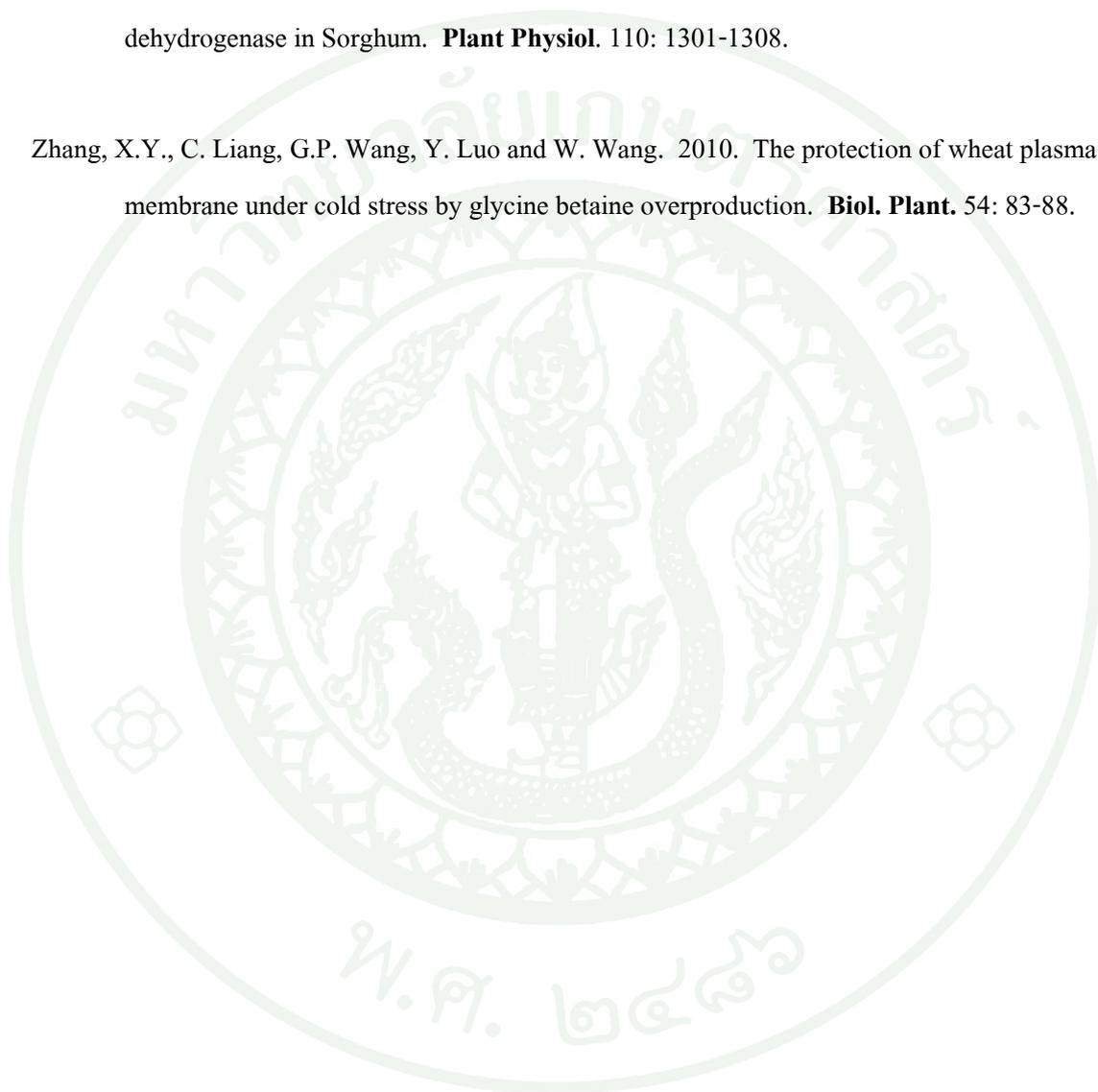
- Meng, Y.L., Y.M. Wang, B. Zhang and N. Nii. 2001. Isolation of a choline monooxygenase cDNA clone from *Amaranthus tricolor* and its expressions under stress conditions. **Cell Res.** 11: 187-193.
- Murashige, T and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant.** 15: 473-497.
- Naidu, B.P., L.G. Paleg, D. Aspinall, A.C. Jennings and G.P. Jones. 1991. Amino acid and glycine betaine accumulation in cold-stressed wheat seedlings. **Phytochemistry** 30: 407-409.
- Nakamura, T., S. Yokota, Y. Muramoto, K. Tsutsui, Y. Oguri, K. Fukui and T. Takabe. 1997. Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. **Plant J.** 11: 1115-1120.
- 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.
- Nguyen, H.T. and P.C. Joshi. 1992. Molecular strategies for the genetic dissection of water and high temperature stress adaptation in cereal crops. **Paper presented at The International Symposium on The Adaptation of Food Crops to Temperature and Water Stress.** Taiwan.13-18 August.
- Nilsen, E.T. and D.M. Orcutt. 1996. **Physiology of Plants Under Stress. Abiotic Factors.** John Willey & Sons Inc., USA.
- Oishi, H. and M. Ebina. 2005. Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia*. **Plant Physiol.** 162: 1077-1086.
- Rathinasabapathi, B. 2000. Metabolic engineering for stress tolerance: installing osmoprotectant synthesis. **Ann. Bot.** 86: 709-716.

- Sakamoto, A., Alia and N. Murata. 1998. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. **Plant Mol. Biol.** 38: 1011-1019.
- Satvir, K., A.K. Gupta and N. Kaur. 1998. Gibberellic acid and kinetin partially reverse the effect of water stress on germination and seedling growth in chickpea. **Plant Growth Regul.** 25: 29-33.
- Shiro, M., Y. Yokota, T. Fujiwara, N. Mori b and T. Takabe. 2009. OsBADH1 is possibly involved in acetaldehyde oxidation in rice plant peroxisomes. **FEBS Lett.** 583: 3625-3629.
- Slama, I., T. Ghnaya, K. Hessini, D. Messedi, A. Savoure and C. Abdelly. 2007. Comparative study of the effects of mannitol and PEG osmotic stress on growth and solute accumulation in *Sesuvium portulacastrum*. **Environ. Experi. Bot.** 61: 10-17.
- Steven, J. F. 2011. Plasticity and evolution in drought avoidance and escape in the annual plant *Brassica rapa*. **New Phytologist.** 190: 249-257.
- Wang, Y.M., M.Y. Ling and N. Naosuke. 2004. Changes in glycine betaine and related enzyme contents in *Amaranthus tricolor* under salt stress. **Plant Physiol. Plant Mol.** 30: 496-502.
- 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.
- Weigel, P., E.A. Weretilnyk and A.D. Hanson. 1986. Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. **Plant Physiol.** 82: 753-759.

Weretilnyk, E.A. and A.D. Hanson. 1990. Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 87: 2745-2749.

Wood, A.J., H. Saneoka, D. Rhodes, R.J. Joly and P.B. Goldsbrough. 1996. Betaine aldehyde dehydrogenase in Sorghum. **Plant Physiol.** 110: 1301-1308.

Zhang, X.Y., C. Liang, G.P. Wang, Y. Luo and W. Wang. 2010. The protection of wheat plasma membrane under cold stress by glycine betaine overproduction. **Biol. Plant.** 54: 83-88.



ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ - นามสกุล	นางสาวบุศริน อิ่มอินทร์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 16 เมษายน 2526
สถานที่เกิด	จังหวัดเพชรบูรณ์
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (พืชศาสตร์) มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	งานวิจัยเรื่องการบ่งชี้ยีนที่ควบคุมการสร้าง betaine aldehyde dehydrogenase ที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำ
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-