

# การแสดงออกของยีน *TPS1* และ *TPS2* และค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบในอ้อยสองพันธุ์ภายใต้สภาพขาดน้ำ

## *TPS1* and *TPS2* gene expression and leaf water potential in two sugarcane varieties under water stress

ศรุตะ มานิต<sup>1,2</sup> และ นงลักษณ์ เทียนเสรี<sup>3\*</sup>

Saruta Manitkul<sup>1,2</sup> and Nongluk Teinseree<sup>3\*</sup>

**บทคัดย่อ:** สภาพขาดน้ำจัดเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลผลิตในพืชลดลง กลไกหนึ่งที่พืชใช้เพื่อปรับตัวต่อสภาพขาดน้ำคือการสะสมสาร osmoprotectant เพื่อรักษาสมดุลของน้ำภายในเซลล์ ยีน trehalose-6-phosphate synthase (*TPS*) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลส ซึ่งเป็นหนึ่งในสารที่ช่วยให้พืชทนต่อสภาพเครียดจากสิ่งแวดล้อมได้ เพื่อศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาและการแสดงออกของยีน *TPS1* และ *TPS2* ในอ้อยภายใต้สภาพขาดน้ำ ได้จำลองสภาพเครียดจากการขาดน้ำให้กับอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 และพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 16% polyethylene glycol (PEG) 6000 เป็นระยะเวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่าอ้อยทั้งสองพันธุ์มีค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบและค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำลดต่ำลง โดยในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 สามารถรักษาค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบได้ดีกว่าพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 เมื่อได้รับสภาพขาดน้ำยาวนานขึ้น ศึกษาการแสดงออกของยีน *TPS1* และ *TPS2* ในใบอ้อยโดยใช้เทคนิค qRT-PCR หลังได้รับสภาพขาดน้ำเป็นเวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่ายีนทั้งสองนี้มีการแสดงออกในใบอ้อยทั้งในสภาพควบคุมและสภาพขาดน้ำ รูปแบบการแสดงออกของยีนในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์แตกต่างกัน ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ยีน *TPS1* และ *TPS2* มีระดับการแสดงออกสูงขึ้นเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำยาวนานขึ้น โดยมีการแสดงออกสูงกว่าในสภาพควบคุม และสูงกว่าในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6

**คำสำคัญ:** อ้อย, น้ำตาลทรีฮาโลส, กลุ่มยีน *TPS*, แล้ง

**ABSTRACT:** Water deficit is considered one of the most important factors limiting growth

Received December 12, 2018

Accepted June 12, 2019

<sup>1</sup> ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University Kamphaeng Saen C. campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

<sup>2</sup> ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

<sup>3</sup> ภาควิชาพืชไร่ นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

\* Corresponding author: agrnlt@ku.ac.th

rates and crop productivity. The accumulation of osmoprotectants enables the plants to grow under water stress conditions by maintaining cell water balance. Trehalose-6-phosphate synthase (*TPS*) genes play crucial roles in trehalose metabolism and involved in abiotic stress tolerance mechanism in plants. To study the physiological response and expression of *TPS1* and *TPS2* in two sugarcane varieties, the experiments were conducted with KPS 94-13 and KPS 01-11-6 which cultured in vitro and subjected to water deficit stress by addition of 16 % polyethylene glycol (PEG) 6000 in the MS medium for 24, 48, 72, 96 and 120 hrs. Water stress caused the reduction in the total leaf water potential and osmotic potential in both sugarcane varieties. The KPS 94-13 showed significantly less declines in the total leaf water potential than KPS 01-11-6 correlated with the increase in the duration of stress. Expression of *TPS1* and *TPS2* genes were compared in two sugarcane varieties after treated with 16 % PEG 6000 for 24, 48, 72, 96 and 120 hr., using qRT-PCR. The result showed that *TPS1* and *TPS2* genes expressed in both stress and non-stress conditions. The variability in gene expression profiles in different varieties of sugarcane were detected. The extent of expression of *TPS1* and *TPS2* genes in KPS 94-13 were observed initially and gradually increased under long-term exposure to stress. In KPS 94-13, the *TPS1* and *TPS2* expression were up-regulated and showed higher levels than control and KPS 01-11-6.

**Keywords:** *Saccharum* spp., trehalose, trehalose-6-phosphate synthase, drought

## บทนำ

อ้อย (*Saccharum* spp.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทยและของโลก เนื่องจากเป็นวัตถุดิบสำคัญในอุตสาหกรรมน้ำตาล พื้นที่เพาะปลูกอ้อยในประเทศไทยกระจายอยู่ในภาคต่างๆ และมากกว่า 80% อยู่นอกเขตพื้นที่ชลประทาน การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ และความแปรปรวนของปริมาณฝน ก่อให้เกิดสภาวะแห้งทั้งช่วงและปัญหาภัยแล้งรุนแรงและยาวนานมากขึ้นทุกปี (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2560) การขาดน้ำส่งผลกระทบต่ออ้อยตั้งแต่การงอกจนถึงการให้ผลผลิต และส่งผลกระทบต่อ การสังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้การเจริญเติบโต การสร้าง และสะสมน้ำตาลลดลง ส่งผลให้ผลผลิตต่อไร่ลดลงด้วย โดยเฉพาะในระยะแตกกอและระยะย่างปล้อง ซึ่งเป็นระยะที่ไวต่อการขาดน้ำมากที่สุด (Ramesh, 2000; Endres et al, 2010; Zingeretti et al, 2012) หนึ่งในกลไกสำคัญที่มีงานวิจัยรองรับในหลายพืช คือการสร้างและสะสมสาร osmoprotectant ภายในเซลล์พืช เพื่อให้ในการควบคุมแรงดัน osmotic ของน้ำภายในเซลล์และป้องกันไม่ให้เซลล์สูญเสียน้ำมากเกินไปจนส่งผลกระทบต่อ

กระบวนการ metabolism ต่างๆของเซลล์ ซึ่งจะถูกควบคุมด้วยกลุ่มยีนในกระบวนการสร้างสาร osmoprotectant แต่ละชนิด กลุ่มยีน trehalose-6-phosphate synthase (*TPS*) เป็นกลุ่มยีนที่ทำงานในกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสในพืช โดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเฮนไซม์ trehalose-6-phosphate synthase (*TPS*) โดยเอนไซม์ *TPS* จะทำการสลายน้ำตาลตั้งต้นคือ UDP-glucose และ glucose-6-phosphate ให้กลายเป็น trehalose-6-phosphate (*T6P*) จากนั้นเอนไซม์ trehalose-6-phosphate phosphatase (*TPP*) จะเปลี่ยน *T6P* ไปเป็นน้ำตาลทรีฮาโลส (Godijn and Dun, 1999) ในแบคทีเรียและยีสต์ พบว่าน้ำตาลทรีฮาโลสทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและถูกสังเคราะห์ออกมาเมื่อได้รับสภาพเครียดต่างๆ เช่น เค็ม หรือ อุณหภูมิสูง แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลชนิดนี้ทำหน้าที่เป็น osmoprotectant ชนิดที่ในพืชพบว่าในสภาพปกติจะมีน้ำตาลทรีฮาโลสสะสมอยู่น้อยและจะมีการสะสมเพิ่มมากขึ้นเมื่อพืชได้รับสภาพเครียด และยังพบว่าในพืชที่มีการสะสมน้ำตาลทรีฮาโลสเพิ่มมากขึ้นสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆได้ เช่น สภาพขาดน้ำ เค็ม อุณหภูมิสูงหรือต่ำ ซึ่งให้น้ำตาลทรีฮาโลสทำหน้าที่เป็น

สาร osmoprotectant ในพืชได้เช่นกัน (Hounsa et al, 1998; Goddijn and Dun, 1999; Garg et al, 2002)

จากการวิเคราะห์จีโนมของพืชหลายชนิดพบว่ายีน TPS ในพืชแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ class I TPS และ class II TPS จำนวนของยีนในแต่ละกลุ่มแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด เช่น class I TPS ใน Arabidopsis พบ 4 ยีน ในข้าวพบ 1 ยีน และในข้าวสาลีพบ 3 ยีน ขณะที่ใน class II TPS ใน Arabidopsis พบ 7 ยีน พบในข้าว 10 ยีน และพบในข้าวสาลี 9 ยีน (Leyman et.al., 2001; Lunn, 2007; Zang et al, 2010; Yang et al. 2012; Xie et al, 2015) ขณะที่ในอ้อยมีรายงานเกี่ยวกับยีน TPS แล้ว 2 ยีนคือ TPS1 และ TPS2 โดยยีน TPS1 จัดอยู่ใน class I TPS และ TPS2 จัดอยู่ในกลุ่ม class II TPS (Junior et al., 2013) ซึ่งยีนแต่ละตัว มีรูปแบบและระดับการแสดงออกแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดเนื้อเยื่อ พันธุ์พืช และตามระดับและชนิดของสภาพเครียดที่ได้รับ

ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน TPS1 และ TPS2 และการตอบสนองทางสรีรวิทยาในอ้อยสองพันธุ์ที่ทนแล้งได้ต่างกันภายใต้สภาพขาดน้ำ ข้อมูลรูปแบบและระดับการแสดงออกของยีนเมื่อนำไปรวมกับข้อมูลทางด้านสรีรวิทยา จะทำให้เห็นภาพการทำงานของยีนในกลุ่มยีน TPS มากยิ่งขึ้น และพัฒนาเป็นเครื่องมือช่วยในการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนต่อสภาพแล้งต่อไป

## วิธีการศึกษา

### การสร้างสภาพขาดน้ำแก่อ้อย

นำต้นอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ซึ่งมีลักษณะทนแล้ง และพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 ซึ่งเป็นพันธุ์ไม่ทนแล้ง ที่มีใบและรากสมบูรณ์ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และจำลองสภาวะขาดน้ำโดยการเติม Polyethylene Glycol (PEG) 6000 ที่ระดับความเข้มข้นความเข้มข้น 16% (W/V) ทำให้ค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในอาหารเหลวสูตร MS

( $\Psi_{\pi \text{ solution}}$ ) มีค่าประมาณ -1000 kPa โดยให้ต้นอ้อยอยู่ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG 6000 16% เป็นระยะเวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD จำนวน 4 ซ้ำ ทรีทเมนต์ประกอบด้วยการรวมกันของ 2 ปัจจัยคือ สภาพการขาดน้ำ 2 สภาวะ และพันธุ์อ้อย 2 พันธุ์ บันทึกลักษณะทางสรีรวิทยา ได้แก่ ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ (total leaf water potential;  $\Psi_l$ ) ด้วยเครื่องวัดความดัน (pressure chamber) โดยวัดผลจากใบตำแหน่งที่ 3 นับจากยอดในแต่ละช่วงเวลาที่ได้รับสภาพขาดน้ำ จากนั้นนำใบที่เข้วัดค่า  $\Psi_l$  ไปวัดค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบ (osmotic potential;  $\Psi_{\pi}$ ) โดยใช้เครื่องออสโมมิเตอร์ (osmometer รุ่น Vapro 5520)

### การสกัดอาร์เอ็นเอรวม และการสังเคราะห์ first strand cDNA

สกัดตัวอย่างอาร์เอ็นเอรวมจากใบอ่อนของอ้อยที่ได้รับสภาพขาดน้ำในแต่ละระยะเวลา และใบอ้อยที่อยู่ในสภาพควบคุม โดยใช้ชุดสำเร็จรูป GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, US) นำอาร์เอ็นเอรวมที่ได้มาสังเคราะห์ first strand cDNA ด้วยเทคนิค reverse transcription-PCR ด้วยชุด Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, US) โดยกำหนดรอบในการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

### การแสดงออกของยีน TPS1 และ TPS2 ในอ้อยภายใต้สภาพขาดน้ำ

ออกแบบคู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน TPS ในอ้อย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล NCBI ในการออกแบบคู่ไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) ได้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน TPS1 และยีน TPS2 (Table 1) นำ first strand cDNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวนเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน TPS1 และ TPS2 ในอ้อยทั้งสองสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบกับยีนอ้างอิง Actin

ด้วยเทคนิค quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) ใช้ตัวอย่างจากอ้อยแต่ละพันธุ์ที่ได้รับสภาพขาดน้ำ ระยะเวลาละ 3 ต้น (3 biological replicates) โดยใช้ชุด SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (BIOLINE, Canada) และคู่มือโปรแกรมที่จำเพาะต่อยีน ด้วยเครื่อง Mastercycler® ep realplex (Eppendorf, Thailand) ทำซ้ำ 3 รอบ (3 technical replicates) กำหนดรอบสำหรับปฏิกิริยา 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 วิเคราะห์ระดับการแสดงออกจากราคา relative expression โดยใช้สูตรการคำนวณแบบ  $2^{-\Delta\Delta CT}$  โดย  $\Delta\Delta CT = (C_T \text{ target gene} - C_T \text{ reference gene})_{\text{treatment}} - (C_T \text{ target gene} - C_T \text{ reference gene})_{\text{control}}$  ตามวิธีการของ Livak and Schmittgen (2001)

Table 1 Primers sequences used for Real-time PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer	Note
<i>TPS1</i>	AGGTCACCATCGAATGGCAG	CCGACGAACTCAGCAGGTAA	For real-time PCR
<i>TPS2</i>	AGCAGCTGAGGCATGGAAAA	CGCCACCACCCTAAATCCAA	For real-time PCR
<i>Actin</i>	CGTTGTCGGAATGGCCAGACC	CGTAGGTCTGAATATCCGGTCC	Reference gene

#### ผลการศึกษาและวิจารณ์

#### การเปลี่ยนแปลงค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบอ้อยภายใต้สภาพขาดน้ำ

สภาพเครียดจากการขาดน้ำมีผลให้ค่า  $\Psi_t$  ในใบอ้อยทั้งสองพันธุ์ มีค่าต่ำกว่าในสภาพควบคุม โดยการลดลงของค่า  $\Psi_t$  มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 มีค่า  $\Psi_t$  ลดลงเร็วกว่าและต่ำกว่าพันธุ์กำแพงแสน 94-13 และมีค่า  $\Psi_t$  ต่ำกว่าในสภาพควบคุมอย่างชัดเจนในทุกระยะเวลาที่ขาดน้ำ ความแตกต่างของค่า  $\Psi_t$  ที่ชัดเจนระหว่างอ้อยทั้งสองพันธุ์ตรวจพบตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกหลังได้รับสภาพขาดน้ำเป็นต้นไป ระดับของค่า  $\Psi_t$  ที่ลดลงแตกต่างกันอย่างมาก แสดงว่าอ้อยพันธุ์ทนแล้งและพันธุ์อ่อนแอ มีการตอบสนองโดยแสดงออกทางใบที่ระดับต่างกัน (Figure 1A) สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่า  $\Psi_{\pi}$  ในใบอ้อย มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงในทิศทางเดียวกันกับค่า  $\Psi_t$  กล่าวคือหลังได้รับสภาพเครียดจากการขาดน้ำ ค่า  $\Psi_{\pi}$  ของอ้อยทั้งสองพันธุ์มีค่าลดลงต่ำกว่าในสภาพควบคุมในทุกระยะเวลาที่ขาดน้ำ การเปลี่ยนแปลงค่า  $\Psi_{\pi}$  ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีการปรับลดค่า  $\Psi_{\pi}$  ลงเร็วกว่าพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 โดยอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีค่า  $\Psi_{\pi}$  เฉลี่ยอยู่ที่

-558 kPa ในสภาพควบคุม ลดลงเป็น -932 kPa ภายใน 48 ชั่วโมงหลังได้รับสภาพขาดน้ำ จากนั้นค่า  $\Psi_{\pi}$  ค่อนข้างคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 120 ขณะที่ใบอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 ค่า  $\Psi_{\pi}$  มีการลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดช่วงเวลาที่ขาดน้ำ อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างของค่า  $\Psi_{\pi}$  ระหว่างพันธุ์อ้อยทั้งสอง (Figure 1B) ผลที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Meideiros et al., (2013) ซึ่งเปรียบเทียบการตอบสนองของอ้อยสองสายพันธุ์ที่ได้รับสภาพขาดน้ำ และได้สรุปว่าอ้อยพันธุ์ RB962962 ทนแล้งได้ดีกว่าอ้อยพันธุ์ RB867515 เนื่องจากพันธุ์ RB962962 สามารถรักษาค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบ ค่าน้ำไหลปากใบ และอัตราสังเคราะห์แสงสุทธิไว้ได้สูงกว่า และมีผลให้สามารถฟื้นตัวได้เร็วกว่าพันธุ์ RB867515 เมื่อได้รับน้ำอีกครั้ง

โดยทั่วไปการปรับตัวของพืชต่อสภาพเครียดจากการขาดน้ำเกิดได้จากหลายกลไก เช่น การเปิดปิดปากใบ เพื่อลดการสูญเสียน้ำในช่วงแรก ซึ่งเป็นการตอบสนองแรกและเป็นมาตรการชั่วคราว และการสร้างและสะสมสาร osmoprotectant เพื่อปรับแรงดันออสโมติก (osmotic adjustment) ช่วยรักษาแรงเต่งของเซลล์ (นวัตน์, 2558) ค่า  $\Psi_t$  ที่ติดลบมากขึ้นในอ้อยทั้งสองพันธุ์นี้แสดงให้เห็นว่า

อ้อยมีการอัตราการสูญเสียน้ำมากขึ้นเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำยาวนานขึ้น ขณะที่ค่า  $\Psi_{\pi}$  ในใบอ้อยทั้งสองพันธุ์ลดลงมากขึ้นเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำยาวนานขึ้นเช่นกัน ค่า  $\Psi_{\pi}$  ที่ลดลงสะท้อนถึงความเข้มข้นของตัวถูกละลายในสารละลายในเซลล์ที่สูงขึ้น เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงพลังงานศักย์ของน้ำในใบอ้อยเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำ พบว่าในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ซึ่งเป็นพันธุ์ทนแล้งมีค่า  $\Psi_{\pi}$  ที่ลดลงน้อยกว่า และค่า  $\Psi_{\pi}$  ซึ่งปรับค่าลดลงเร็วกว่าอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 ซึ่งไม่ทนแล้ง

ส่งผลให้อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีแรงดันเต่งในเซลล์สูงกว่าพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการรักษาน้ำในเซลล์ กล่าวได้ว่าสภาวะขาดน้ำมีผลกระตุ้นให้เกิดกลไกการปรับแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ ซึ่งอาจเกิดจากกลไกการสร้างและสะสมสารในกลุ่ม osmoprotectant เช่น โพรลีน ไกลซีนเบตาอิน และ ทรีฮาโลส เพื่อการรักษาน้ำในเซลล์และช่วยรักษาโครงสร้างเซลล์เมื่อได้รับสภาพขาดน้ำ (Bielsa et al., 2018)

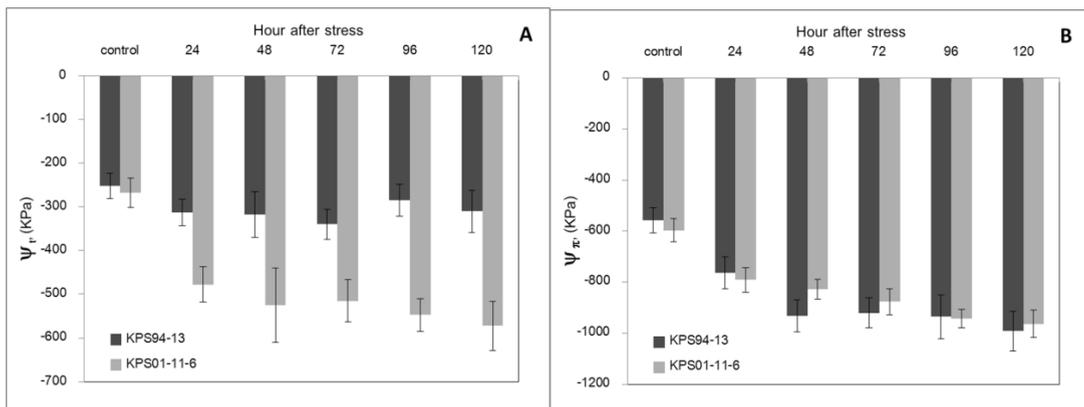


Figure 1 Change in total leaf water potential (A) and osmotic potential (B) in 2 sugarcane varieties (KPS 94-13 and KPS 01-11-6) under water deficit stress subjected to 16% PEG 6000 for 24, 48, 72, 96 and 120 hours. Error bars represent of standard error of the mean.

**การแสดงออกของยีน *TPS1* และยีน *TPS2* ในอ้อยภายใต้สภาพขาดน้ำ**

จากการออกแบบคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *TPS1* และ *TPS2* ในอ้อย และตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ดังกล่าว พบว่าได้ขึ้นดีเอ็นเอของยีน *TPS1* ขนาด 226 คู่เบส และขึ้นดีเอ็นเอของยีน *TPS2* ขนาด 158 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BlastN พบว่า ยีน *TPS1* ในอ้อยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน OsTPS1 ในข้าว (HM050424) และยีน *TPS1* (predicted) ในข้าวฟ่าง (XM\_021447682.1) ที่ 82.73% และ 98.48 % ตามลำดับ ขณะที่ยีน *TPS2* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน OsTPS6 ในข้าว

(HM050434) และ *TPS7* (predicted) ในข้าวฟ่าง (XM\_002440036.2) ที่ 90.26% และ 98.10% ตามลำดับ เมื่อนำคู่ไพรเมอร์ดังกล่าวมาใช้ศึกษาการแสดงออกของยีน *TPS1* และ *TPS2* ในอ้อยภายใต้สภาพขาดน้ำพบว่า ยีน *TPS1* มีการแสดงออกในใบอ้อยทั้งสองพันธุ์ แต่มีรูปแบบและระดับการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างพันธุ์ โดยในพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ซึ่งเป็นพันธุ์ทนแล้งมีระดับการแสดงออกของยีน *TPS1* สูงกว่าในสภาพควบคุมในทุกๆระยะเวลาที่ได้รับสภาพขาดน้ำ และเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในช่วง 48 - 120 ชั่วโมงหลังจากได้รับสภาพขาดน้ำ ระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำยาวนานขึ้น โดยมีระดับการแสดงออกสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 หลังจากได้รับสภาพขาดน้ำ

คิดเป็น 4.09 เท่าของสภาพควบคุม ขณะที่ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 ซึ่งไม่ทนแล้ง มีระดับการแสดงออกของยีน *TPS1* ไม่แตกต่างจากในสภาพควบคุม แต่เมื่อได้รับสภาพขาดน้ำยาวนานขึ้นในช่วง 120 ชั่วโมงที่ตรวจพบระดับการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น คิดเป็น 2.82 เท่าของสภาพควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 นั้น มีระดับการแสดงออกของยีน *TPS1* ต่ำกว่าในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 โดยตรวจพบอย่างชัดเจนในช่วง 72 – 96 ชั่วโมงหลังได้รับสภาพขาดน้ำ (Figure 2 A)

ในส่วนของการแสดงออกของยีน *TPS2* ในใบอ้อย พันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสภาพขาดน้ำที่รุนแรงขึ้น โดยมีระดับการแสดงออกของ

ยีนสูงกว่าในสภาพควบคุมอย่างมีนัยสำคัญในช่วง 48 – 96 ชั่วโมงหลังได้รับสภาพขาดน้ำ ระดับการแสดงออกสูงสุดพบในช่วง 96 ชั่วโมงที่คิดเป็น 4.58 เท่าของสภาพควบคุม ขณะที่ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 กลับพบว่า มีระดับการแสดงออกของยีน *TPS2* ต่ำกว่าในสภาพควบคุม อย่างไรก็ตามเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบระดับการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น คิดเป็น 1.3 เท่าเมื่อเทียบกับสภาพควบคุม จากนั้นระดับการแสดงออกของยีน *TPS2* กลับลดลงต่ำกว่าสภาพควบคุมอีกครั้ง และเมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนในระหว่างพันธุ์อ้อย พบว่าอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีระดับการแสดงออกของยีน *TPS2* สูงกว่าในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 (Figure 2 B)

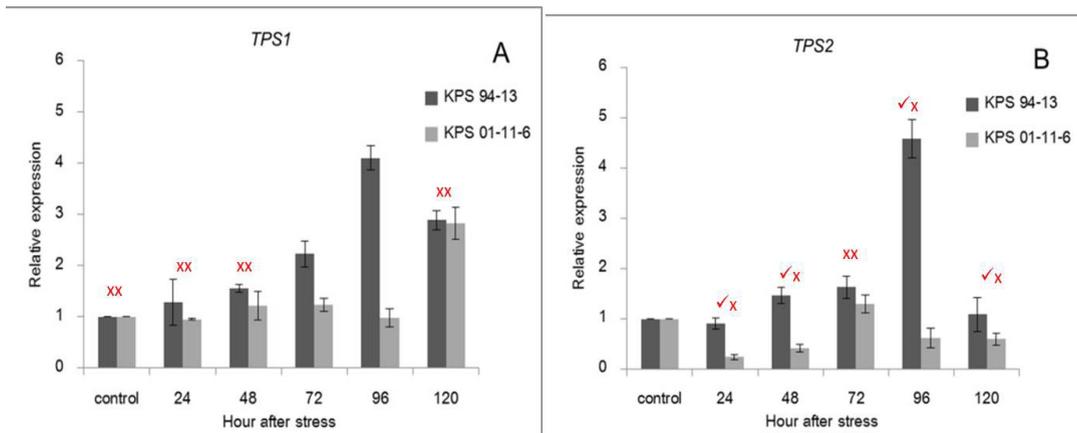


Figure 2 The relative expression level of TPS1 (A) and TPS2 gene (B) in leaves of 2 sugarcane varieties (KPS 94-13 and KPS 01-11-6) under water deficit stress subjected to 16% PEG 6000 for 24, 48, 72, 96 and 120 hours.. Error bars represent of standard error of the mean.

เมื่อพืชได้รับสภาพขาดน้ำ พืชจะมีกลไกในการป้องกันตัวโดยการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะเครียด 3 กลุ่ม ได้แก่ ยีนที่ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณกระตุ้นการทำงานของยีนอื่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันเซลล์จากการขาดน้ำ และยีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงน้ำและไอออนต่างๆ (Ciarmiello et al., 2011) ยีนในกลุ่ม TPS เป็นยีนกลุ่มหนึ่งที่มีรายงานว่ามีการตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำในพืช จากการศึกษาของ Garg et al. (2002) ซึ่งศึกษาในข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนนี้ที่

เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลส คือ ยีน OtsA (*TPS*) และ OtsB (*TPP*) จาก *Escherichia coli* และกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสภาพเครียดจากการขาดน้ำและความเค็ม พบว่าในช่วงที่มีการแสดงออกของยีน *TPS* และ *TPP* มีการสะสมน้ำตาลทรีฮาโลสเพิ่มขึ้น 3 – 10 เท่า มีอัตราการสังเคราะห์แสงสูงกว่า และสามารถทนเค็มได้ดีกว่าข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ขณะที่ใน *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีน *TPS* จากยีสต์ พบว่า ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีการ

สะสมน้ำตาลทรีฮาโลสเพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำและสภาพเค็ม และพบว่าเมื่อได้รับการรอดชีวิตสูงกว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มของน้ำตาลทรีฮาโลสในเซลล์เกี่ยวข้องกับลักษณะทนแล้งและเค็มในพืช (Miranda et al. 2007)

ยีน *TPS* ในพืชเป็นกลุ่มยีนที่ประกอบด้วยยีนจำนวนหลายยีน โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ class I *TPS* และ class II *TPS* ยีน *TPS1* ในอ้อยจัดอยู่ใน class I *TPS* ซึ่งเป็นยีนกลุ่มหลักในการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสและเกี่ยวข้องกับกลไกการทนต่อสภาพเครียดจากสภาพแวดล้อมในพืช จากการศึกษาของ Li et al. (2011) ที่ถ่ายยีนใน class I *TPS* คือยีน *OsTPS1* ในข้าวและกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นด้วย Actin1 promoter พบว่าข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนและกระตุ้นการแสดงออกของยีน *OsTPS1* ทนต่อสภาพขาดน้ำจาก PEG สภาพเค็ม และอุณหภูมิต่ำได้มากกว่าข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ขณะที่ยีน *TPS2* ในอ้อยจัดอยู่ใน class II *TPS* มีรายงานว่ายีนในกลุ่ม class II *TPS* บางยีน เช่น ยีน *AtTPS6* ใน Arabidopsis ช่วยให้ทนต่อสภาพขาดน้ำได้ (Chary et al. 2008) ยีน *AtTPS5* ซึ่งจัดเป็น class II *TPS* ใน Arabidopsis ทำหน้าที่เป็น co-activator ร่วมกับ MBF1c ซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยให้ Arabidopsis ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ และยังพบว่าใน Arabidopsis ที่มีกรกลายของยีน *AtTPS5* อ่อนแอต่ออุณหภูมิสูง สันนิษฐานว่าการทำหน้าที่เป็น Signaling molecule หรือทำงานร่วมกับโปรตีนชนิดอื่นอาจเป็นหนึ่งในกลไกของยีนใน class II *TPS* ที่ช่วยให้พืชทนต่อสภาวะเครียดได้ (Suzuki et al., 2008) และการทดลองของ Li et al., (2011) พบว่าเมื่อกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนใน class II *TPS* บางยีนในข้าวได้แก่ *OsTPS2*, *OsTPS5*, *OsTPS8* และ *OsTPS9* เพิ่มขึ้น สามารถช่วยให้ข้าวทนต่อสภาพเค็มและอุณหภูมิต่ำได้เช่นกัน

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ายีน *TPS1* และยีน *TPS2* ในอ้อยทั้งสองสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำ โดยอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีระดับการแสดงออกของทั้งสองยีนเพิ่มสูงกว่าในสภาพควบคุม ขณะที่ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-4 มีการแสดงออกของยีน *TPS2* ต่ำกว่าสภาพควบคุม และต่ำกว่าในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13

รูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกันของยีนในกลุ่ม *TPS* ระหว่างอ้อยสองสายพันธุ์สอดคล้องกับการศึกษาของ Junior et al. (2013) ในอ้อยสองสายพันธุ์ที่ได้รับสภาพแล้ง พบว่ายีน *TPS1* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในอ้อยสายพันธุ์ SP90-1638 ซึ่งเป็นพันธุ์ทนแล้ง และมีระดับการแสดงออกลดลงต่ำกว่าในสภาพควบคุมในอ้อยพันธุ์ SP83-2847 ซึ่งไม่ทนแล้ง ขณะที่ยีน *TPS2* มีการแสดงออกต่ำกว่าสภาพควบคุมในอ้อยทั้งสองพันธุ์ ในการศึกษาของ Vantini et al. (2015) ในอ้อยสองสายพันธุ์ที่ได้รับสภาพขาดน้ำ พบว่าในอ้อยพันธุ์ RB867515 ซึ่งเป็นพันธุ์ทนแล้ง มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างน้ำตาลทรีฮาโลสสูงกว่าในอ้อยพันธุ์ SP8655 ซึ่งไม่ทนแล้ง และในการศึกษาการแสดงออกของยีนในกลุ่ม *TPS* ในข้าวสาลีสองสายพันธุ์ที่ได้รับอุณหภูมิต่ำที่ -20 องศาเซลเซียส พบว่ายีน *TaTPS1*, *TaTPS2* ซึ่งเป็นยีนใน class I *TPS* และยีน *TaTPS4* และ *TaTPS12* ซึ่งเป็นยีนใน class II *TPS* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในรากและลำต้นของข้าวสาลีพันธุ์ Dongnongdongmai ซึ่งเป็นพันธุ์ทนอุณหภูมิต่ำ ขณะที่ในพันธุ์ Jinmai 22 ซึ่งไม่ทนอุณหภูมิต่ำ มีการแสดงออกของทุกยีนดังกล่าวในรากและลำต้นต่ำกว่าในพันธุ์ Dongnongdongmai (Xie et al., 2015) ระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของกลุ่มยีน *TPS* ในสายพันธุ์ที่ทนต่อสภาพเครียดนี้ชี้ให้เห็นความเกี่ยวข้องของยีนในกลุ่มยีน *TPS* ในกลไกที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อสภาพเครียดต่างๆ ถึงแม้ในปัจจุบันกลไกการทำงานของยีนในกลุ่ม *TPS* ในกระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมยังอยู่ระหว่างการศึกษา แต่ผลจากการวิจัยในหลากหลายพืชภายใต้สภาพเครียดแบบต่างๆ ยืนยันได้ชัดเจนถึงบทบาทของยีนยีนนี้ในการช่วยให้พืชสามารถทนต่อสภาพเครียดได้ โดยอาจทำงานผ่านหลายกระบวนการ เช่น การทำหน้าที่เป็นสาร osmoprotectant ของน้ำตาลทรีฮาโลส ซึ่งช่วยการปรับค่าแรงดันออสโมติกภายในเซลล์เมื่อได้รับสภาพขาดน้ำ การทำหน้าที่เป็น Signaling molecules ของน้ำตาล *T6P* ที่ได้จากการทำงานของยีน *TPS* โดย *T6P* ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ SnF-Related Kinase 1 (SnRK1) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยแบ่ง และกระตุ้นการทำงานของ ADP-glucose pyrophosphorylase

(ADPase) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครส ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้น ซึ่งน้ำตาลซูโครสจัดเป็นสาร osmoprotectant ที่ใช้ปรับแรงดันออสโมติกอีกชนิดหนึ่งที่พืชสะสมเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำ และปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นนี้ยังสอดคล้องกับระดับการเพิ่มของน้ำตาลทรีฮาโลสด้วย (Pramanik and Imai, 2005; Ponnu et al. 2011; Figueroa and Lunn, 2016) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ายีน TPS1 และ TPS2 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ซึ่งแสดงความสามารถในการรักษาค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำ นับเป็นอีกหนึ่งผลงานที่ยืนยันถึงบทบาทของกลุ่มยีน TPS ในการช่วยให้อ้อยทนต่อสภาพขาดน้ำได้

### สรุป

ภายใต้สภาพเครียดจากการขาดน้ำ อ้อยทั้งสองพันธุ์มีค่า  $\Psi_t$  และ  $\Psi\pi$  ลดลงต่ำกว่าในสภาพควบคุม และอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 94-13 ซึ่งเป็นพันธุ์ทนแล้งมีค่า  $\Psi_t$  สูงกว่า และมีการปรับลดค่า  $\Psi\pi$  เร็วกว่าอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 ซึ่งไม่ทนแล้ง การแสดงออกของยีนในกลุ่ม TPS มีระดับและรูปแบบการแสดงออกแตกต่างกัน โดยในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 มีการแสดงออกของยีน TPS1 ไม่แตกต่างจากสภาพควบคุม และมีการแสดงออกของยีน TPS2 ต่ำกว่าในสภาพควบคุม ขณะที่ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีการแสดงออกของยีน TPS1 และ TPS2 สูงกว่าในสภาพควบคุม และสูงกว่าในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6

### เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กองยุทธศาสตร์และแผนงาน สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย กระทรวงอุตสาหกรรม. 2560. รายงานการผลิตอ้อยของประเทศไทยประจำปีการผลิต 2560/61. แหล่งข้อมูล: <http://www.ocsb.go.th/upload/journal/fileupload/923-3254.pdf>. ค้นเมื่อ 1 กุมภาพันธ์ 2562.
- นวิรัตน์ อุดมประเสริฐ. 2558. สรีรวิทยาของพืชภายใต้สภาวะเครียด. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- Bielsal B., Hewitt S., Reyes-Chin-Wo S., Dhingra A. and Rubio-Cabetas M. J. 2018. Identification of water use efficiency related genes in 'Garnem' almond-peach rootstock using time-course transcriptome analysis. Plos one. 13: 1-24.
- Chary S.N., Hicks G.R., Choi Y.G., Carter D. and Raikhel N.V. 2008. Trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase regulates cell shape and plant architecture in Arabidopsis. Plant Physiol. 146: 97 – 107.
- Ciarmiello L., Woodrow P., Fuggi A., Pontecorvo G. and Carillo P. 2011. Plant genes for abiotic stress. P. 283 - 308. In: A. Shanker. Abiotic Stress in Plants – Mechanisms and Adaptations. InTech.
- Endres L., Silva J. V., Ferreira V. M. and

- Barbosa G. V. S. 2010. Photosynthesis and water relations in Brazilian sugarcane. *The Open Agriculture Journal*. 4: 31 – 37.
- Figuroa C. M. and Lunn J. E. 2016. A tale of two sugars: trehalose-6-phosphate and sucrose. *Plant Physiol*. 172: 7 – 27.
- Garg A.H., Kim J., Owens T.G., Ranwala A.P., Chol Y. D., Kochlan and Wu R.J., 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *PNAS*. 99(25): 15898 – 15903.
- Goddijn O.J.M. and Dun K.V. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Sci*. 4: 315 – 319.
- Hounsa C. G., Brandt E. V., Thevelein J., Hohman S. and Prior B. A. 1998. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology*. 144: 671 – 680.
- Junior N.N., Nicolau M.S.A.P., Mantovanini L.J. and Zingaretti S.M. 2013. Expression analysis of two genes coding for trehalose-6-phosphate synthase (TPS), in sugarcane (*Saccharum* spp.) under water stress. *AJPS*. 4: 91 – 99.
- Leyman, B., P. van Dijck and J.M. Thevelein. 2001. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trend Plant Sci*. 6: 510 – 513.
- Lunn, J.E. 2007. Gene families and evolution of trehalose metabolism in plants. *Funct Plant Biol*. 34: 550 – 563.
- Li H. W., Zang B. S., Dwng X. W. and Wang X. P. 2011. Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene OsTPS1 enhances abiotic stress tolerance in rice. *Planta* 234: 1007 – 1018.
- Livak. K.J. and Schmittgen. T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25: 402 – 408.
- Miranda J.A., Avonce N., Suarez R., Thevelein J.M., Dijick P.V. and Iturriaga G. 2007. A bifunctional *TPS-TPP* enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 226: 1411 – 1421.
- Pramanik M. H. R. and Imai R. 2005. Functional identification of a trehalose-6-phosphate phosphatase gene that is involved in transient induction of trehalose biosynthesis during chilling stress in rice. *Plant Mol Bio*. 58: 751 – 762.
- Ponnu J., Wahl V. and Markus Schmid. 2011. Trehalose-6-phosphate: connecting plant metabolism and development. *Front. Plant Sci*. 4(2): 70.
- Ramesh P. 2000. Effect of different levels of drought during the formative phase on

- growth parameters and its relationship with dry matter accumulation in sugarcane. *J Agron Crop Sci.* 185(2): 83 – 89.
- Suzuki N., Bajad S., Shuman J. Shulaev V. and Mittler R. 2008. The transcriptional co-activator MBF1c is a key regulator of thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Biol Chem* 283: 9269 – 9275.
- Vantini J. S., Dedemo G. C., Jovino D. F., Fonseca L. F. S., Tezza R. I. D., Mutton M. A., Ferro J. A. and Ferro M. I. T, 2015. Differential gene expression in drought-tolerant sugarcane roots. *Genet Mol Res.* 14(2): 196 – 207.
- Xie D. W., Wang X. N., Fu L. S., Sun J., Zheng W. and Li Z. F. 2015. Identification of the trehalose-6-phosphate synthase gene family in winter wheat and expression analysis under conditions of freezing stress. *J Genet.* 94(1): 55 – 65.
- Yang H. L., Liu Y. J., Wang C. L. and Zeng Q. Y. 2012. Molecular evolution of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family in *Populus*, *Arabidopsis* and rice. *PLOS ONE.* 7. 8: e42438.
- Zang B., Li H., Li W., Deng X. W. and Wang X., 2010. Analysis of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family suggests the formation of TPS complexes in rice. *Plant Mol Bio.* 76: 507 – 522.