

ผลของระดับความเครียดในสภาพเลียนแบบดินเค็มโซเดียมที่มีต่อลักษณะทางสรีรวิทยา บางประการ รูปแบบ และระดับการแสดงออกของยีน *DREB2* จากอ้อยในยาสูบ ดัดแปลงพันธุกรรม

Effects of stress levels in mimic sodic saline soil on certain physiological characters, pattern and expression levels of *DREB2* gene form sugarcane in transgenic tobacco

ชนากานต์ ลักษณะ¹, สุวรรณรัตน์ แสงรุจิธรรม^{2,3} และ สอนิชัย จันทร์เปรม^{2,3,4*}

Chanakan Laksana¹, Suwannarat Savaengruijitham^{2,3} and Sontichai Chanprame^{2,3,4*}

¹ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว จ.สระแก้ว 27160

¹ Faculty of Agricultural Technology, Burapha University Sa Kaeo Campus, Sa Kaeo 27160

² ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

² Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

³ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

³ Center of Excellence on Agricultural Biotechnology, (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900

⁴ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

⁴ Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen Campus, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

บทคัดย่อ: ดินเค็มโซเดียมเป็นดินที่มีปริมาณโซเดียมที่แลกเปลี่ยนได้และ pH สูง พืชจึงเจริญเติบโตได้น้อยลง เมื่อพืชได้รับสภาพดินเค็มโซเดียมต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องจะมีการแสดงออกในรูปแบบและระดับที่แตกต่างกัน โดยระดับการแสดงออกของยีนจะถูกควบคุมด้วยกลุ่มของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ transcription factors อีกที่หนึ่ง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ (Ψ_t) และค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบ ($\Psi\pi$) รวมทั้งรูปแบบและระดับการแสดงออกของยีน *SsDREB2* ที่แยกได้จากอ้อยป่า (*Saccharum spontaneum*) และยีน *SoDREB2* ที่แยกได้จากอ้อยลูกผสมระหว่างอ้อยป่าและอ้อยพันธุ์ปลูก (*S. officinarum*) และถ่ายเข้าสู่ยาสูบ โดยปลูกยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมดังกล่าวในสภาวะเลียนแบบดินเค็มโซเดียม พบว่า ยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมสามารถทนทานต่อสภาพเครียดดังกล่าวได้มากกว่ายาสูบปกติ โดยยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมสามารถรักษาพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบให้สูงกว่าและค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบให้อยู่ในระดับต่ำกว่าเมื่อเทียบกับยาสูบปกติ ส่วนรูปแบบการแสดงออกของยีนนี้พบว่าสภาพเลียนแบบดินเค็มโซเดียมสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนดังกล่าวให้สูงขึ้นได้ถึงระดับสูงสุดแล้วจึงลดลง โดยความเข้มข้นของ NaCl 200 mM กระตุ้นการแสดงออกของยีนได้มากกว่าความเข้มข้นของเกลือที่ต่ำกว่า และพบว่าที่ NaCl 100 mM ระดับการแสดงออกของยีนที่รากจะสูงกว่าที่ใบ ในขณะที่ NaCl 200 mM ระดับการแสดงออกของยีนนี้ที่ใบจะสูงกว่าที่ราก

คำสำคัญ: transcription factor; สภาวะดินเค็มโซเดียม; สารละลายธาตุอาหาร

ABSTRACT: Saline sodic soil is a soil with high exchangeable sodium and high pH. It is harmful to the plants and results of less growth. When the plants have been grown in saline sodic soil, the responsible genes will express with difference patterns and levels. The expression levels of the genes are controlled by a group of transcription factor gene. The objective of this study was to determine the leaf total water potential (Ψ_t) and osmotic potential ($\Psi\pi$), including the pattern and expression level of *SsDREB2* which was isolated from wild sugarcane (*Saccharum*

* Corresponding author: agrstc@ku.ac.th

spontaneum) and *SoDREB2* which was isolated from interspecific sugarcane hybrid and transformed into tobacco. The transgenic tobacco plants were subjected to mimic saline sodic soil condition. It was found that the transgenic tobacco plants were more tolerate to such condition than the non-transgenic tobacco. The transgenic plants were able to maintain higher leaf total water potential and lower osmotic potential than the non-transgenic one. The stress condition could up-regulate the expression of the gene to the highest level and decreased later on. The 200 mM NaCl resulted of higher expression level of the gene than the lower concentration of the NaCl. It was also found that at 100 mM NaCl, the expression of the gene in roots was higher than that in leaves. While at 200 mM NaCl, the expression of the gene in leaves was higher than that in the roots.

Keywords: transcription factor; saline sodic soil; nutrient solution

บทนำ

FAO คาดการณ์ว่าความต้องการบริโภคน้ำตาลทั่วโลกในปี 2028 อาจจะมีปริมาณสูงถึง 203 ล้านตัน โดยประเทศไทยจะเป็นผู้ผลิตอันดับ 3 ของโลกรองจากบราซิลและอินเดีย (OECD/FAO, 2019) สำหรับประเทศไทยนั้นอ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจและตลาดแรงงานของประเทศมีพื้นที่ปลูกทั้งภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออก ยกเว้นภาคใต้ซึ่งมีฝนตกชุกไม่เหมาะแก่การปลูกอ้อย ดังนั้นอ้อยจึงเป็นพืชอีกชนิดที่สำคัญของประเทศไทย โดยพื้นที่ที่ปลูกอ้อยทั้งประเทศในปีการผลิต 2561/2562 มีประมาณ 12.23 ล้านไร่ โดยมีผลผลิตเฉลี่ย 10.75 ตันต่อไร่ (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2562) ซึ่งถือว่าต่ำเพราะศักยภาพของพันธุ์อ้อยที่ปรับปรุงและส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกที่สามารถให้ผลผลิตได้มากกว่า 15 ตันต่อไร่ ซึ่งสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตของอ้อยต่ำคือปัญหาดินเค็มและดินเค็มโซดิก โดยพื้นที่ดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่เป็นดินเค็มน้อยและปานกลางที่ใช้เป็นพื้นที่ปลูกอ้อยกระจายอยู่ในเกือบทุกจังหวัด (ชยันต, 2556) ทำให้อ้อยซึ่งเป็นพืชที่ไม่ทนต่อสภาพความเค็มให้ผลผลิตที่ลดลง (อรุณี, 2540) พื้นที่ดินเค็มและดินเค็มโซดิกจะส่งผลกระทบต่อผลผลิตอ้อยเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเกิดภาวะแห้งแล้งจะยิ่งทำให้ผลกระทบจากดินเค็มและดินเค็มโซดิกเพิ่มมากขึ้นด้วย ภาวะความเค็มและความแห้งแล้งจะทำให้ดินมีความเข้มข้นของเกลือในระดับสูง จะทำให้สมดุลของไอออนต่าง ๆ เปลี่ยนแปลงไป เช่น สมดุลของ Na^+ , K^+ , Ca^{2+} และ Cl^- ที่มีผลต่อแรงดันออสโมติกทำให้เกิดเป็นพิษต่อเซลล์ (Chung *et al.* 2012) และถ้าเป็นดินเค็มโซดิกจะมีค่าการนำไฟฟ้าของดินที่สกัดจากดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (ECe) มากกว่า 2 เดซิซีเมนต่อเมตร ค่าอัตราส่วนการดูดซับโซเดียม (SAR) มากกว่า 13 ค่าร้อยละของโซเดียมที่แลกเปลี่ยนได้ (ESP) มากกว่า 15% pH สูงถึง 8.5 (Maas and Hoffmam, 1977) พืชที่ได้รับผลกระทบจากความเค็มหรือเค็มโซดิกจะแสดงอาการคล้ายกับการที่พืชขาดน้ำ เช่น ชะงักการเจริญเติบโต ใบห่อลงเพื่อลดการคายน้ำทางปากใบและเหี่ยว สีของใบพืชซีเข้มเนื่องจากใบมีคลอโรฟิลล์มาก และมีสารเคลือบใบ (cuticle) หนาเพื่อลดการสูญเสียน้ำ ในบางครั้งอาจพบอาการปลายใบไหม้ (tip burn) เกิดจุดประ (mottles) บนใบ ใบม้วนและใบเหลืองเนื่องจากขาดคลอโรฟิลล์ ใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ปลายใบและขอบใบแห้ง และตายในที่สุด (Sarkar *et al.*, 2019) โดยทั่วไปอ้อยปลูกสามารถทนความเค็มได้เพียงประมาณ 1.7 เดซิซีเมนต่อเมตร ซึ่งจัดว่าเป็นพืชที่ไม่ทนเค็ม (moderately sensitive) (Ayers and Westcott, 1989) ดังนั้นเมื่อปลูกอ้อยในสภาพดินเค็มจะมีอาการไหม้ที่ปลายยอด ใบต่างเหลือง ผลผลิต จำนวนใบ การขยายตัวของใบและขนาดของใบลดลง จำนวนลำต่อน้อย มีข้อถี่ และปล้องสั้นกว่าอ้อยที่ปลูกในสภาพปกติ (Abdul *et al.*, 1997)

เมื่อพืชได้รับสภาวะที่ไม่เหมาะสมและทำให้เกิดความเครียด พืชจะมีการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดเหล่านั้น การตอบสนองต่อสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ จะถูกควบคุมด้วยยีนชนิดต่าง ๆ รวมทั้ง transcription factor (TF), *cis*-acting elements (Zhu, 2001) *DREB* (dehydration responsive element binding) เป็นยีนในกลุ่ม transcription factor ที่จะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเมื่อพืชได้รับสภาวะเครียดที่เกิดจากความหนาวเย็น ความแห้งแล้ง และความเค็ม (Wang *et al.*, 2019) transcription factor เป็นโปรตีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีน โดยจะเข้าจับเส้นดีเอ็นเอที่มีรหัสจำเพาะได้ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน ซึ่งทำให้สามารถควบคุมการทำงานของยีนอื่น ๆ ได้เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ในพืชนั้นมีมากกว่า 2,000 ยีนที่สามารถแปรรหัสเป็น transcription factor ได้ (Hong, 2016) โปรตีน DREB เป็น transcription factor อีกชนิดที่ควบคุมการทำงานของยีนที่แสดงออกในสภาวะเครียด โปรตีน DREB จัดอยู่ใน AP2/ERF family Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki (2009) พบว่า ในพืชมียีน *DREB* สองชนิด คือ ยีน *DREB1* สำหรับควบคุมการแสดงออกของยีนที่ใช้ตอบสนองต่อความหนาวเย็น และยีน *DREB2* สำหรับควบคุมการ

แสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดออกโมติก (osmotic stress responsive gene) เช่น การขาดน้ำ ความเค็ม และความร้อน โดยโปรตีนที่ยีน *DREB* สังเคราะห์ขึ้นจะเข้าไปจับกับส่วนที่เป็น *cis*-element ที่เรียกว่า dehydration-responsive element/*C*-repeat (*DRE/CRT*) ที่อยู่ในส่วนของโปรโมเตอร์หลังจากนั้นจึงเริ่มการถอดรหัส (Lata and Prasad, 2011) ทำให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะเครียดแสดงออก และมีผลทำให้พืชทนทานต่อสภาวะเครียดดังกล่าวได้ ในอ้อยนั้นพบว่ามียีนที่เป็น transcription factor กลุ่ม *DREB2* เช่นกัน โดย Chanprame et al. (2019) ได้แยกยีน *SsDREB2* จากอ้อยป่า และ *SoDREB2* จากอ้อยลูกผสมระหว่างชนิด โดยพบว่ากรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 152 มีความแตกต่างกัน และยังพบอีกว่ายีนทั้งสองถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกมากขึ้นเมื่ออ้อยได้รับสภาวะเครียดจากความเค็ม ได้มีการสร้างพืชตัดแปลงพันธุกรรมโดยถ่ายยีน *DREB2* จากพืชชนิดต่าง ๆ เข้าสู่พืชเศรษฐกิจแล้วมีผลทำให้พืชชนิดนั้นทนทานต่อสภาวะแล้งหรือเค็มได้ดีขึ้น เช่น *Populus* ทนเค็ม (Lu et al., 2014; Guo et al., 2019) ถั่วเหลืองทนเค็ม (Zhang et al., 2013) ข้าวทนแล้ง (Ravikumar et al., 2014) เป็นต้น การค้นหา การแยก และการโคลนยีนที่พืชใช้ตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมเป็นต้นทางของการใช้ประโยชน์จากยีนดังกล่าว เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้มากขึ้น ผลจากการวิจัยจำนวนมากชี้ให้เห็นว่าพืชที่ได้รับยีนในกลุ่ม *DREB2* จะทนทานต่อดินเค็มหรือความแห้งแล้งได้ดีขึ้น แต่ยังไม่มียางานการตอบสนองของยีนดังกล่าวต่อสภาวะดินเค็มชนิดใหม่พืชตัดแปลงพันธุกรรม ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการตอบสนองทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวกับความสามารถในการเก็บรักษาน้ำภายในเซลล์ ได้แก่ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ (Ψ_t) และค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบ ($\Psi\pi$) รวมทั้งการตรวจสอบรูปแบบและระดับการแสดงออกของยีน *DREB2* ที่ได้จากอ้อยในยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็มชนิดใหม่

วิธีการศึกษา

การเตรียมต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม

นำต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่เพิ่มจำนวนโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเป็นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *SsDREB2* จากอ้อยพันธุ์ป่า 1 สายต้น (ให้ชื่อรหัสเป็น WT8) และยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *SoDREB2* จากอ้อยลูกผสมระหว่างชนิดที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างอ้อยพันธุ์ปลูก (พันธุ์ชัยนาท 1) และอ้อยพันธุ์ป่า จำนวน 2 สายต้น (ให้ชื่อรหัสเป็น B2 และ B3) โดยยีนดังกล่าวถูกควบคุมการแสดงออกด้วยโปรโมเตอร์ 35s *CaMV* และต้นยาสูบที่ไม่ได้ตัดแปลงพันธุกรรม (ต้นควบคุม) อย่างละ 36 ต้น โดยใช้สำหรับการตรวจสอบทางอณูชีววิทยาอย่างละ 3 ต้น (3 ซ้ำ \times 3 ความเข้มข้นของ NaCl \times 4 ระยะเวลาเก็บข้อมูล) และสำหรับบันทึกภาพตลอดการทดลองอย่างละ 1 ต้น และอีกอย่างละ 36 ต้นสำหรับการตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยา นำออกปลูกแบบไฮโดรโปนิกในสารละลายธาตุอาหาร 1/10 Hoagland ปรับค่า pH เป็น 8.5 ด้วย NaOH และเติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0, 100 และ 200 mM (เลียนแบบสภาพดินเค็มชนิดใหม่ที่ระดับความเค็มต่าง ๆ) และเก็บตัวอย่างใบและรากในวันที่ 0, 1, 3 และ 5 หลังจากได้รับ NaCl เพื่อนำมาสกัด total RNA แล้วสังเคราะห์ RNA เป็น first strand cDNA สำหรับใช้ในการตรวจสอบผลการแสดงออกของยีน *SsDREB2* และ *SoDREB2* ด้วยเทคนิค real-time PCR และสังเกตและจดบันทึกลักษณะอาการต้นยาสูบหลังได้รับ NaCl ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในวันที่ 1, 3, 5, 10, 15 และ 20 วัน

การวัดค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ (Ψ_t) และการคำนวณค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบ ($\Psi\pi$)

ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ (Ψ_t) วัดจากใบที่เจริญเติบโตเต็มที่โดยใช้เครื่องวัดความดัน (pressure chamber บริษัท Soil Moisture Equipment ประเทศสหรัฐอเมริกา) และวัดค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำ (mmol kg^{-1}) ด้วยเครื่องออสโมมิเตอร์ (osmometer รุ่น Vapro 5520 บริษัท Wescor ประเทศสหรัฐอเมริกา) นำค่าความเข้มข้นของตัวถูกละลายมาคำนวณเป็นค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบตามสมการของ van't Hoff คือ $\Psi\pi = -RTC_i$ โดยกำหนดให้อุณหภูมิของสารละลายตัวอย่างเท่ากับ 25 °C. เสมอ ดังนั้นค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบ ($\Psi\pi$) = $-2.5C_i$

การสกัด total RNA จากใบและรากของต้นยาสูบ

นำตัวอย่างใบและรากยาสูบที่หนักประมาณ 0.5 ก. ที่เก็บจากยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมและยาสูบปกติที่ได้รับสภาวะเลียนแบบดินเค็มชนิดที่ระดับและระยะเวลาต่าง ๆ มาสกัด total RNA ตามวิธีของ Laksana and Chanprame (2015) กำจัด genomic DNA ออกจากตัวอย่าง total RNA ด้วยเอนไซม์ DNase I ความเข้มข้น 1 ยูนิต/ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำ total RNA ที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นโดยการทำเจลอีเล็กโทรโฟรีซิสด้วย 1.5% denaturing formaldehyde agarose ใน 0.5X MOPs buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

การสังเคราะห์ first-strand cDNA จาก total RNA

นำ total RNA ที่ได้จากการสกัดปริมาณ 5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) ผสมกับ 100 µM oligo (dT)₂₀ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10 mM dNTP mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย DEPC-dH₂O จนครบปริมาตร 12.5 ไมโครลิตรในหลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที และบ่มต่อที่ 4 °C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติม 5X reaction buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร RiboLock RNase inhibitor (Fermentas, Lithuania) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10 mM dNTP mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร Revert Aid M-MuLVRT (Fermentas, Lithuania) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที และนำไปแช่ในน้ำแข็ง นำ first strand cDNA ไปตรวจสอบคุณภาพโดยการทำ PCR กับยีน *NtEef-1a* (*Nicotiana tabacum* elongation factor-1 alpha)

การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *SsDREB2* และ *SoDREB2* ในยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็มชนิดด้วยเทคนิค real-time PCR

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *SsDREB2* และ *SoDREB2* ในยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็มชนิดที่ระดับและระยะเวลาต่าง ๆ โดยใช้ระดับการแสดงออกของยีน *NtEef-1a* (Accession number NM_001326165.1) เป็นยีนอ้างอิง (reference gene) ในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย first-strand cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (300 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2X SensiFAST SYBR No-ROX Mix (Boline, Singapore) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 10 µM forward และ reverse ของไพรเมอร์สำหรับยีน *NtEef-1a* หรือ forward และ reverse ของไพรเมอร์สำหรับยีน *DREB2* ของอ้อย อย่างละ 0.4 ไมโครลิตร (ทั้ง 2 ยีนใช้ไพรเมอร์คู่เดียวกัน) และปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 10 ไมโครลิตร โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *NtEef-1a* สำหรับการทำ real-time PCR คือ Forward 5'-TGAGATGCACCACGAAGCTC-3' และ Reverse 5'-CCAACATTGTCCAGGAAGTG-3' และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *DREB2* (Accession number KX280721.1) สำหรับการทำให้ real-time PCR คือ Forward 5'-GCTCCTTCCTACTGCTGTG-3' และ Reverse 5'-CACTAGATGCCAGCAACGAA-3' นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนแบบ real-time PCR ด้วยเครื่อง CTX96 Touch Real Time PCR บริษัท BIORAD โดยตั้งโปรแกรมสำหรับปฏิกิริยาดังนี้ denature อุณหภูมิ 95 °C 15 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 °C 15 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 °C 20 วินาที โดยทำปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ ในแต่ละช่วงเวลาและระดับความเค็มเลียนแบบดินเค็มชนิด (treatment) ใช้ cDNA จากยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมแต่ละสายต้นจำนวน 3 ต้น (biological replication) และแต่ละ treatment ทำปฏิกิริยา 3 ซ้ำ (technical replication)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มีจำนวน 3 ซ้ำ นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANONA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's multiple range test) ที่ระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า $P < 0.05$ ด้วยโปรแกรม R (version 3.4.3) (R Core Team, 2013)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ลักษณะทางสัณฐานของต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *SsDREB2* และ *SoDREB2* เมื่อได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิก

ลักษณะสัณฐานของต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *SsDREB2* จากอ้อยพันธุ์ป่า (WT8) และ ยีน *SoDREB2* จากอ้อยลูกผสมระหว่างชนิด (B2 และ B3) และยาสูบที่ไม่ได้ตัดแปลงพันธุกรรม (ต้นควบคุม) เมื่อปลูกแบบไฮโดรโปนิกส์ในสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิก พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl 100 mM ต้นยาสูบที่เป็นต้นควบคุมเริ่มแสดงอาการเหี่ยวในวันที่ 3 และใบอ่อนที่ยอดเริ่มเหลือง ส่วนยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม WT8 มีลักษณะปกติ ในขณะที่ยาสูบ B2 และ B3 มีอาการใบเหลืองเล็กน้อยเมื่อเทียบกับวันที่ 0 เมื่อยาสูบทุกต้นได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิกยาวนานขึ้นก็แสดงอาการเหี่ยวมากขึ้น โดยยาสูบต้นควบคุมแห้งตายในวันที่ 10 หลังได้รับสภาวะเครียด ส่วนต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม WT8 ตายในวันที่ 20 ในขณะที่ยาสูบ B2 และ B3 ยังไม่ตายแต่มีอาการใบเหลืองและปลายใบไหม้ (Figure 1) ส่วนต้นยาสูบที่ได้รับสารละลายธาตุอาหารที่เติม NaCl ความเข้มข้น 200 mM ยาสูบต้นควบคุมและ WT8 แสดงอาการเหี่ยวตั้งแต่วันที่ 1 หลังได้รับ NaCl และแสดงอาการเหี่ยวมากขึ้นเรื่อยๆ และยาสูบทั้ง 2 ต้นตายในวันที่ 5 ส่วนยาสูบ B2 และ B3 ยังคงมีชีวิตอยู่ แต่หลังจากวันที่ 10 เป็นต้นไปไม่มีต้นยาสูบที่รอดชีวิต (Figure 2)

การที่ยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *SsDREB2* และ *SoDREB2* แสดงความทนทานต่อสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิกได้ดีกว่ายาสูบปกติแสดงว่ายีน *DREB2* ของอ้อยทั้ง 2 ชนิดที่ถ่ายเข้าสู่ยาสูบมีบทบาทเพิ่มความสามารถในการทนทานต่อสภาพดังกล่าวของพืชได้ ก่อนหน้านี้ Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki (2009) พบว่า ยีน *DREB2* เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนที่พืชใช้ตอบสนองต่อความเครียดออสโมติกที่เกิดจากสภาวะการขาดน้ำและความเค็ม มีผลทำให้พืชทนทานต่อสภาวะดังกล่าวได้ดีขึ้น เช่นเดียวกับ Yao et al. (2016) ที่แยกยีน *DREB* จาก *Sophora moorcroftiana* ได้ 4 ยีน คือ *SmDREB1*, *SmDREB2*, *SmDREB3* และ *SmDREB4* โดยพบว่า สภาวะเครียดที่เกิดจากความเค็ม ความหนาวเย็น และความแห้งแล้งจะกระตุ้นให้ *SmDREB2* และ *SmDREB4* แสดงออก การศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับ Zhang et al. (2015) ที่ถ่ายยีน *DREB* จาก *Suaeda salsa* ซึ่งเป็นพืชตระกูลเดียวกับชะครามเข้าสู่ยาสูบ มีผลทำให้ยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมทนทานต่อความเค็มได้ดีขึ้น และยังทำให้การแสดงออกของยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมแสดงออกได้มากขึ้นด้วย Wang et al. (2017) ได้ถ่ายยีน *CsDREB* ที่แยกได้จาก *Camellia sinensis* เข้าสู่ *Arabidopsis thaliana* มีผลให้พืชทนทานต่อความเครียดที่เกิดจากความเค็มและความแห้งแล้ง เช่นเดียวกับ Nguyen et al. (2019) ที่ถ่ายยีน *GmDREB6* เข้าสู่ถั่วเหลืองแล้วมีผลทำให้ถั่วเหลืองตัดแปลงพันธุกรรมสามารถสร้างและสะสม proline ได้มากขึ้น และถั่วเหลืองดังกล่าวทนทานต่อทั้งความเค็มและความแห้งแล้งได้มากขึ้นด้วย ส่วนการทดลองในครั้งนี้ก็ได้ผลทำนองเดียวกันคือยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมโดยเฉพาะสายต้นที่ได้รับยีน *SoDREB2* ที่ได้รับ NaCl 100 mM รอดชีวิตอยู่ได้มากกว่า 20 วัน ในขณะที่ต้นควบคุมตายไปตั้งแต่วันที่ 10 หลังได้รับ NaCl ส่วนที่ NaCl 200 mM ยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมก็ยังสามารถรอดชีวิตได้นานการต้นควบคุมเช่นกัน แม้ว่าจะตายหลังจาก 10 วันที่ได้รับ NaCl ก็ตาม ทั้งนี้เพราะความเข้มข้นของ NaCl ระดับดังกล่าวสูงเกินไปนั่นเอง โดย NaCl 200 mM เป็นความเข้มข้นของเกลือที่มากกว่า 1% เทียบเท่ากับดินเค็มมาก ซึ่งมีเฉพาะพืชชอบเกลือ เช่น ชะคราม แสม ที่สามารถเจริญเติบโตได้ (สำนักงานคณะกรรมการพิเศษเพื่อประสานงานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ, 2555)

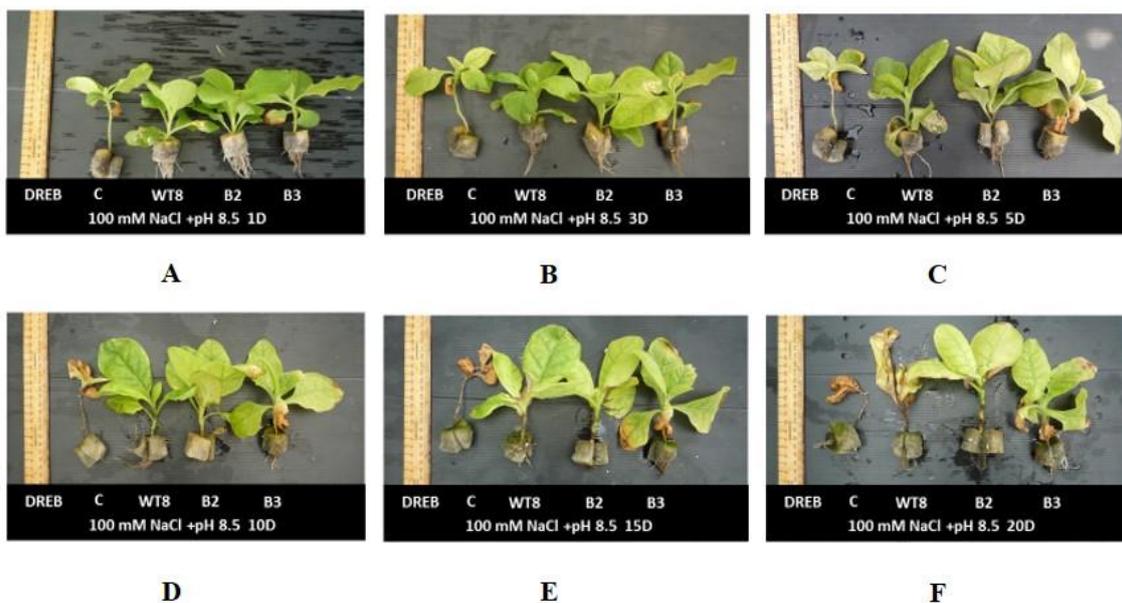


Figure 1 Transgenic tobacco plants containing *SsDREB2* from wild sugarcane (WT8), *SoDREB* from interspecific hybrid (B2 and B3) and non-transformed tobacco (C) after receiving mimic saline sodic stress with 100 mM NaCl for 1 (A), 3 (B), 5 (C), 10 (D), 15 (E) and 20 (F) days

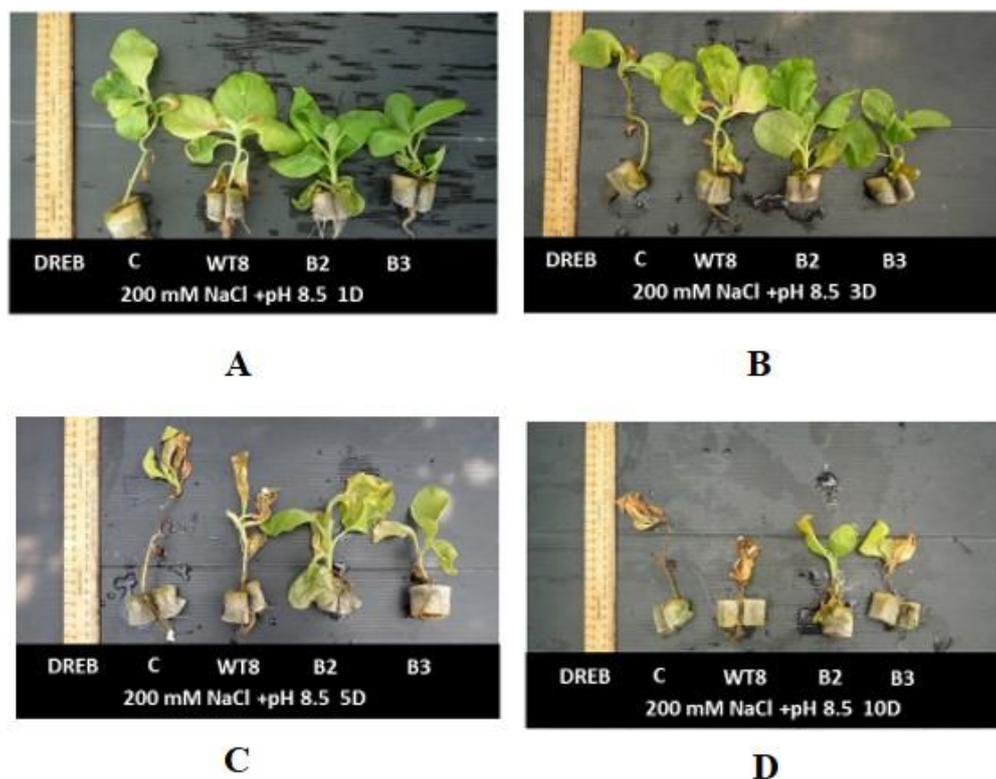


Figure 2 Transgenic tobacco plants containing *SsDREB2* from wild sugarcane (WT8), *SoDREB* from interspecific hybrid (B2 and B3) and non-transformed tobacco (C) after receiving mimic saline sodic stress with 200 mM NaCl for 1 (A), 3 (B), 5 (C) and 10 (D) days

ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ (Ψ_t) และค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบ ($\Psi\pi$)

เมื่อเปรียบเทียบค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ (Ψ_t) ของยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมกับยาสูบปกติในวันที่ 0 พบว่าค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบของยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมมีค่าต่ำกว่ายาสูบปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทั้งสองระดับความเข้มข้นของเกลือ NaCl และเมื่อระยะเวลาได้รับเกลือยาวนานขึ้น ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบของยาสูบปกติลดต่ำลงอย่างมากและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมในทั้งสองความเข้มข้นของเกลือ NaCl และเมื่อเปรียบเทียบค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบของยาสูบทั้งสองชนิดที่ได้รับเกลือ NaCl 100 mM กับ 200 mM ในแต่ละวันที่ได้รับเกลือ พบว่า เกลือ NaCl 200 mM มีผลทำให้ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบลดลงต่ำกว่าเกลือที่ 100 mM (Figure 3)

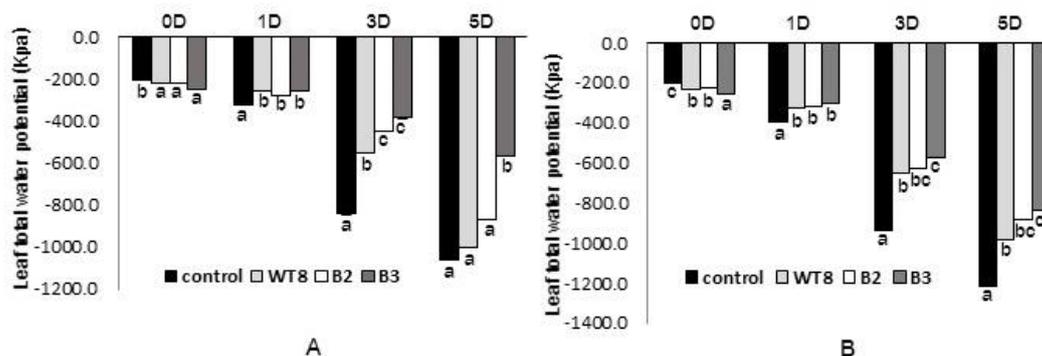


Figure 3 Leaf total water potential (Ψ_t) of non-transformed and transgenic tobacco lines transformed with *SsDREB2* (WT8) and *SoDREB2* (B2, B3) subjected to 100 mM NaCl (A) and 200 mM NaCl (B) for 5 days. The same letters in the boxes (means \pm SD) of each day indicate non-significant difference at $p < 0.05$ according to DMRT

ในทางกลับกันค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบ ($\Psi\pi$) ของยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมเมื่อได้รับเกลือ NaCl จะมีค่าลดต่ำลงมากกว่ายาสูบปกติและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะเมื่อระยะเวลาที่ได้รับสภาวะเครียดยาวนานขึ้น และเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ NaCl จาก 100 mM เป็น 200 mM และเมื่อเปรียบเทียบค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบของยาสูบทั้งสองชนิดที่ได้รับเกลือ NaCl 100 mM กับ 200 mM พบว่า ที่ 200 mM มีแนวโน้มทำให้ค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบ ณ วันต่าง ๆ มีค่าต่ำกว่าที่ 100 mM (Figure 4)

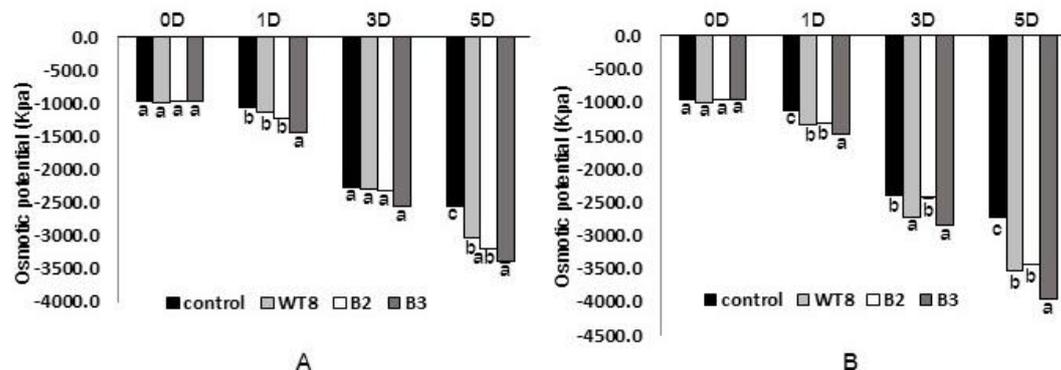


Figure 4 The osmotic potential ($\Psi\pi$) of non-transformed and transgenic tobacco lines transformed with *SsDREB2* (WT8) and *SoDREB2* (B2, B3) subjected to 100 mM NaCl (A) and 200 mM NaCl (B) for 5 days. The same letters in the boxes (means \pm SD) of each day indicate non-significant difference at $p < 0.05$ according to DMRT)

ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ (Ψ_t) เป็นค่าที่บอกถึงดุลของน้ำในใบว่า ณ ขณะนั้นพืชมีอัตราการนำน้ำเข้าทันกับอัตราการสูญเสียน้ำหรือไม่ ค่าพลังงานศักย์รวมที่ต่ำ (ค่าติดลบมาก) แสดงว่าใบพืชเสียน้ำไปมากกว่าที่ได้น้ำมาทดแทน โดยค่า Ψ_t มีความสัมพันธ์อย่างมากกับปริมาณน้ำในใบพืช (Asemota and Conaire, 2010) เมื่อยาสูบได้รับสภาวะเครียดจากเกลือ NaCl ใบของยาสูบปกติมีค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบต่ำกว่ายาสูบดัดแปลงพันธุกรรม แสดงว่าใบยาสูบปกติมีการสูญเสียน้ำในใบมากกว่าน้ำที่รากดูดเข้ามาทดแทน และทำให้ปริมาณน้ำในใบมีน้อยกว่าในใบยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม Ma et al. (2011) พบว่า ในสภาพที่พืชขาดน้ำและได้รับเกลือ NaCl จะยิ่งทำให้ค่า Ψ_t ของใบพืชนั้นลดต่ำลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ แต่อย่างไรก็ตามค่า Ψ_t ณ วันที่ 0 ของยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมจะต่ำกว่ายาสูบปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องมาจากยีน *DREB2* จากอ้อยทั้ง 2 ชนิดที่ถ่ายเข้าสู่ยาสูบถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ชนิด 35s CaMV ซึ่งเป็น constitutive promoter (Odell et al., 1985) ทำให้ยีน *DREB2* มีการแสดงออกตลอดเวลา ทำให้เกิดการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและสะสมสาร osmolite ต่าง ๆ ภายในเซลล์ ทำให้ค่า Ψ_t ของยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมมีค่าเริ่มต้นที่ต่ำกว่ายาสูบปกติ ส่วนค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบ ($\Psi\pi$) เป็นค่าที่บอกถึงความเข้มข้นของน้ำในเซลล์ ค่าพลังงานความเข้มข้นที่ต่ำ (มีค่าติดลบมาก) หมายถึงมีน้ำในความเข้มข้นที่ต่ำ (หรือความเข้มข้นของตัวละลายในเซลล์มีมาก) ในยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมค่า $\Psi\pi$ มีค่าที่ต่ำกว่าในยาสูบปกติโดยเฉพาะเมื่อได้รับ NaCl ในความเข้มข้นที่มากขึ้นหรือยาวนานขึ้น Gonzalez et al. (2012) กล่าวว่าพืชที่สามารถทนทานต่อสภาพขาดน้ำได้ดีเกิดจากการที่พืชนั้นสามารถลดค่า $\Psi\pi$ ลงได้มากเพื่อลดการสูญเสียน้ำและรักษาค่า Ψ_t ให้สูงไว้ได้ ซึ่งยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมในการทดลองนี้ก็แสดงลักษณะดังกล่าวเช่นกัน ทั้งค่า $\Psi\pi$ ที่ลดลงมากและค่า Ψ_t ที่สูงในยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมเมื่อเทียบกับยาสูบปกติเมื่อได้รับเกลือ NaCl ซึ่งชี้ให้เห็นว่ายีน *DREB2* ของอ้อย โดยเฉพาะยีน *SoDREB2* ทำให้อยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมทนทานต่อสภาพเปลี่ยนแปลงดินเค็มโซดิกได้มากขึ้น

การตรวจสอบรูปแบบและระดับการแสดงออกของยีน *DREB2* ในยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับสภาพเปลี่ยนแปลงดินเค็มโซดิกด้วยเทคนิค real-time PCR

การตรวจสอบรูปแบบและระดับการแสดงออกของยีน *DREB2* ในใบและรากของยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *SsDREB2* จากอ้อยพันธุ์ป่า และ *SoDREB2* จากอ้อยพันธุ์ลูกผสมระหว่างชนิดที่ได้รับสภาพเปลี่ยนแปลงดินเค็มโซดิก โดยใช้ยีน *NtEef-1a* เป็นยีนอ้างอิง พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *DREB2* ในใบยาสูบที่ได้รับยีนดังกล่าวจากอ้อยลูกผสมระหว่างชนิด (B3) ที่เพาะเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่เติม NaCl 100 mM มีระดับการแสดงออกสูงสุดที่ 1 วัน ประมาณ 335 เท่าเมื่อเทียบกับการแสดงออกของยีนในสภาพปกติ (วันที่ 0) และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการแสดงออกของยีน *DREB2* ในยาสูบ WT8 และ B3 การแสดงออกของยีนในต้น B3 ค่อยๆ ลดลงในวันที่ 3 และ 5 ในขณะที่ยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม B2 และ WT8 มีการแสดงออกยีน *DREB2* สูงสุดในวันที่ 3 และลดลงในวันที่ 5 และเมื่อเทียบการแสดงออกของยีนในต้น B3 กับยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมต้นอื่นๆ ที่ได้รับสภาวะเครียดเป็นระยะเวลาเท่า ๆ กัน พบว่า การแสดงออกของยีน *SoDREB2* ในต้น B3 สูงกว่าและแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (Figure 5A)

ที่ความเข้มข้นของ NaCl 200 mM พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *DREB2* ในใบของต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 3 ต้น มีรูปแบบของการแสดงออกของยีนคล้ายกันคือ มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 และสูงสุดในวันที่ 3 แล้วลดลงในวันที่ 5 หลังจากได้รับสภาพเครียด แต่ระดับการแสดงออกของยีนในต้น B2 สูงกว่า WT8 และ B3 และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกวันที่มีการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ระดับการแสดงออกของยีนในต้น B2 ซึ่งสูงที่สุดในวันที่ 3 นั้นจะสูงกว่าการแสดงออกของยีนดังกล่าวในต้นเดียวกันในวันที่ 0 ประมาณ 7 เท่า (Figure 5B)

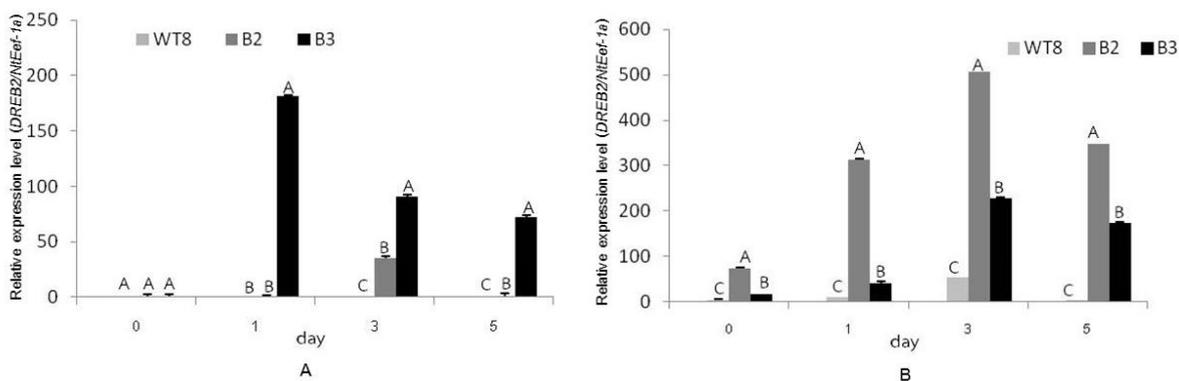


Figure 5 Expression pattern and relative expression level of *DREB2* in leaves of transgenic tobacco subjected to mimic saline sodic soil with 100 mM NaCl (A) and 200 mM NaCl (B) for 0-5 days. Different letters on the boxes indicate significant difference between genotype under the same period of stress at $p < 0.05$ according to DMRT (means \pm SD, $n=27$ at each day of stress)

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *DREB2* ในรากของยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม พบว่ามีการแสดงออกเช่นกัน โดยที่ 100 mM NaCl รูปแบบการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในต้น B2 และ B3 แตกต่างกันคือ ต้น B2 มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 และสูงสุดในวันที่ 1 จากนั้นลดลงและต่ำสุดในวันที่ 5 หลังได้รับสภาวะเครียด ส่วน B3 นั้นระดับการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับ NaCl และสูงสุดในวันที่ 5 หลังได้รับสภาวะเครียด โดยสูงกว่าวันที่ 0 ประมาณ 10 เท่า และระดับการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในรากของต้น B3 สูงกว่าต้น B2 และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ยกเว้นวันที่ 1 วันหลังได้รับสภาวะเครียดที่ระดับการแสดงออกของยีนที่รากของต้น B2 สูงกว่า B3 และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) ส่วนการแสดงออกของยีนในต้น WT8 พบว่ามีต่ำมากและค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาที่ทดลอง (Figure 6A) การแสดงออกของยีนในรากของต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับ NaCl 200 mM พบว่า การแสดงออกของยีนในรากของต้น B3 สูงสุดในวันที่ 1 หลังได้รับ NaCl โดยสูงกว่าวันที่ 0 ประมาณ 13 เท่า จากนั้นระดับการแสดงออกของยีนจึงลดลง ส่วนการแสดงออกของยีนในต้น B2 และ WT8 มีรูปแบบการแสดงออกที่คล้ายคลึงกันคือการแสดงออกจะเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับ NaCl ที่ยาวนานขึ้น แต่ระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นจะไม่มากนักและค่อนข้างคงที่ (Figure 6B)

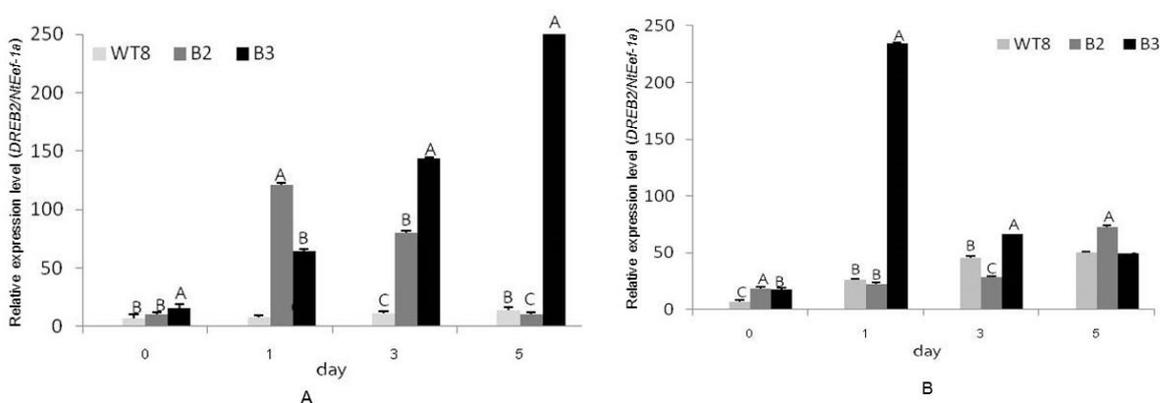


Figure 6 Expression pattern and relative expression level of *DREB2* in roots of transgenic tobacco subjected to mimic saline sodic soil with 100 mM NaCl (A) and 200 mM NaCl (B) for 0-5 days. Different letters on the boxes indicate significant difference between genotype under the same period of stress at $p < 0.05$ according to DMRT (means \pm SD, $n=27$ at each day of stress)

จากผลการทดลองจะเห็นว่าสภาวะเครียดที่เกิดจากสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิกสามารถกระตุ้นให้ยีน *DREB2* จากอ้อยมีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นจากสภาพปกติ และมีการแสดงออกอยู่ในระดับสูง เช่นเดียวกับ Arenhart et al. (2013) ที่พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *ASR5* ซึ่งเป็น transcription factor ของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทนทานต่อพิษของ Al ในข้าวจะเพิ่มขึ้นในพันธุ์ที่ทนทานต่อ Al ในขณะที่พันธุ์ที่อ่อนแอระดับการแสดงออกจะไม่เปลี่ยนแปลง ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อพิจารณาาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานของยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมเมื่อได้รับสภาวะเลียนแบบดินเค็มโซดิกแล้ว สามารถทนทานต่อสภาวะดังกล่าวได้ดีกว่ากว่าต้นที่ไม่ได้ตัดแปลงพันธุกรรม เนื่องจากยีนในกลุ่ม *DREB2* เป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ transcription factor ที่มีผลต่อการกระตุ้นการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ที่พืชใช้ตอบสนองต่อสภาวะเครียดชนิดต่าง ๆ โดยการกระตุ้นในลักษณะนี้พบได้ในพืชต่าง ๆ เช่น ในข้าว โดยในข้าวที่ได้รับสภาพเครียดจาก Al จะมีผลทำให้ยีน *ASR5* สังเคราะห์ transcription factor ชนิด ASR5 เข้าไปเกาะที่บริเวณโปรโมเตอร์และกระตุ้นการแสดงออกของยีนมากถึง 104 ยีน โดยเฉพาะยีน *STAR1* ซึ่งควบคุมการสร้างโปรตีน ABC transporter สำหรับลักษณะทนทานต่อพิษของ Al (Arenhart et al., 2014) ในกรณีของอ้อยนั้นยีนที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อความเค็มมีหลายยีน เช่น salt overly sensitive 1 (*SOS1*) (Kaewjiw et al., 2018) ยีนสังเคราะห์ proline (pyrroline-5-carboxylate synthetase; *P5CS*), ion homeostasis หรือ Na^+/K^+ antiporter (*NHX1*) (ธนวรรณ และคณะ, 2562; Poonsawat et al., 2015) เป็นต้น จึงอาจเป็นไปได้ว่ายีน *DREB2* จะควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในอ้อยเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามข้อสันนิษฐานนี้จำเป็นต้องได้รับการตรวจสอบอีกที โดยการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวในอ้อยหรือพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *DREB2* ในสภาพปกติเทียบกับสภาพที่ได้รับเกลือ

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *SsDREB2* ที่ได้จากอ้อยป่ามีการแสดงออกในระดับค่อนข้างต่ำ หรือแม้แต่ในยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม B2 และ B3 ที่มียีน *SoDREB2* ยีนเดียวกันจากอ้อยลูกผสมระหว่าง แต่มีระดับการแสดงออกของยีนต่างกัน ซึ่งอาจเกิดจากปรากฏการณ์ที่เรียกว่า position effects คือการที่ chromatin ของ host (ในที่นี้คือจีโนมของยาสูบ) ที่อยู่ล้อมรอบยีนที่ถ่ายเข้าไป (ในที่นี้คือ *SsDREB2* และ *SoDREB2*) มีผลยับยั้งหรือส่งเสริมการแสดงออกของยีนที่ถ่ายเข้าไป (Markstein et al., 2008) เนื่องจากไม่สามารถกำหนดตำแหน่งที่ยีนจะสอดแทรกเข้าสู่จีโนมของพืชในตำแหน่งที่แน่นอนได้ การแสดงออกของยีนเดียวกันในพืชตัดแปลงพันธุกรรมต่างต้นกันจึงอาจไม่เท่ากัน Raghavendrarao et al. (2017) พบว่ายีนที่ถ่ายเข้าไปในพืชจะแทรกในตำแหน่งต่างกันบนโครโมโซมเนื่องจากการแทรกแบบสุ่ม ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนได้ไม่เท่ากัน และ Abhyankar et al. (2005) รายงานว่าตำแหน่งของการแทรกตัวของยีนที่ถ่ายเข้าสู่พืชนั้นมีผลต่อลักษณะทางสัณฐาน และการแสดงออกของยีนเช่นกัน

การศึกษานี้จึงยังไม่สามารถชี้ชัดลงไปได้ว่ายีน *SsDREB2* จากอ้อยป่าหรือ *SoDREB2* จากอ้อยลูกผสมระหว่างชนิดมีประสิทธิภาพในการเพิ่มความทนทานต่อดินเค็มโซดิกได้มากกว่ากัน แม้ว่าจากข้อมูลลักษณะสัณฐานและระดับการแสดงออกของยีนจะชี้ไปในทางที่ยีน *SoDREB2* จากอ้อยลูกผสมระหว่างชนิดจะให้ผลดีกว่าก็ตาม นอกจากนี้ยังพบว่ารูปแบบการแสดงออกของยีน *DREB2* มักจะเพิ่มขึ้นจนถึงระดับสูงสุดแล้วค่อย ๆ ลดลง ซึ่งสาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากยีน *DREB2* สังเคราะห์โปรตีน DREB ที่มีผลกระตุ้นการทำงานของยีนต่าง ๆ ที่ยาสูบใช้ตอบสนองต่อความเค็ม และเมื่อยาสูบสามารถปรับสภาพตัวเองเพื่อต่อสู้กับสภาวะไม่เหมาะสมดังกล่าวได้ดีขึ้นความต้องการโปรตีน DREB เพื่อใช้กระตุ้นการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องก็จะลดน้อยลง ทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *DREB2* ค่อย ๆ ลดลงในที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนที่ใบกับที่รากที่ความเข้มข้นของ NaCl ระดับเดียวกัน พบว่า ที่ NaCl 100 mM ระดับการแสดงออกของยีนที่รากจะสูงกว่าที่ใบ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl เป็น 200 mM พบว่า ระดับการแสดงออกของยีนนี้ที่ใบกลับสูงกว่าที่ราก ซึ่งขัดแย้งกับ Ren et al. (2019) ที่พบว่าการแสดงออกของยีน *AmDREB* ในต้น *Ammopiptanthus mongolicus* ที่ขึ้นได้ในทะเลทรายมีระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวที่ใบสูงกว่าที่รากเมื่ออยู่ในสภาพธรรมชาติ (ระดับความเค็มต่ำ) แต่เมื่อเพิ่มระดับความเค็มให้สูงขึ้นการแสดงออกของยีนนี้ที่รากจะสูงกว่าที่ใบ การศึกษานี้ทำกับยีน *DREB2* จากอ้อยซึ่งเป็นพืชที่ไม่ทนเค็ม จึงอาจมีรูปแบบการตอบสนองของยีนต่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมแตกต่างกันไปจากพืชทะเลทรายข้างต้น แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีน *DREB* มีผลต่อการแสดงออกของยีนอื่นที่เกี่ยวข้องอีกเป็นจำนวนมาก เมื่อยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมได้รับ NaCl เพิ่มขึ้นจาก 100 mM เป็น 200 mM พืชจำเป็นต้องมีกลไกที่ใช้เคลื่อนย้าย Na^+ ที่สะสมอยู่เป็นจำนวนมากที่รากไปสู่อวัยวะอื่นเช่นที่ใบ

เพื่อลดความเป็นพิษของ Na^+ ในเซลล์ที่ราก ซึ่งการเคลื่อนย้าย Na^+ ต้องอาศัยการทำงานของยีนบางยีน เช่น *SOS1* (Yue et al., 2012) ซึ่งการแสดงออกของยีนนี้ที่สูงขึ้นจะทำให้การเคลื่อนย้าย Na^+ มีประสิทธิภาพสูงขึ้นด้วย ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าต้องมีการกระตุ้นให้การแสดงออกของยีน *DREB2* ที่ใบสูงขึ้นก่อน เพื่อให้โปรตีน DREB ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนอื่นๆ เช่นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้าย Na^+ ทำให้ความเข้มข้นของ Na^+ ที่รากลดลง

สรุป

สารละลายธาตุอาหาร 1/10 Hoagland ปรับค่า pH เป็น 8.5 และเติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 200 mM สามารถใช้แทนสภาพดินเค็มโซดิกได้ และในสภาพดังกล่าวทำให้ยาสูดตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *SsDREB2* และ *ScDREB2* ทนทานต่อความเค็มได้มากขึ้นโดยสามารถรักษาค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ (Ψ_t) ให้สูงกว่าและค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบ (Ψ_{π}) ให้อยู่ในระดับต่ำกว่าเมื่อเทียบกับยาสูดปกติ และสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิกยังสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *DREB2* ทั้งสองชนิดในยาสูดตัดแปลงพันธุกรรมให้สูงขึ้นได้ โดยรูปแบบการแสดงออกของยีนในยาสูดตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับ NaCl 100 และ 200 mM จะคล้ายคลึงกัน คือมีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นในระยะแรก ๆ จากนั้นจึงค่อย ๆ ลดลง แต่ระดับการแสดงออกของยีนในยาสูดตัดแปลงพันธุกรรมต่างสายต้นกันจะไม่เท่ากัน อาจเป็นผลมาจาก position effect และที่ระดับเกลือสูง ๆ การแสดงออกของยีนที่ใบจะสูงกว่าที่ราก จากผลการทดลองนี้จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนทานต่อดินเค็มหรือดินเค็มโซดิกได้ โดยการถ่ายยีนที่เป็น transcription factor กลุ่ม *DREB2* เข้าสู่พืชเศรษฐกิจ แต่ก็จำเป็นต้องมีการสร้างพืชตัดแปลงพันธุกรรมให้ได้สายต้นจำนวนมาก จากนั้นจึงคัดเลือกเอาเฉพาะต้นที่ทนทาน และมีลักษณะสัญญาณตามที่ต้องการมากที่สุดอีกทีหนึ่ง นอกจากนี้หากสามารถพิสูจน์ได้ว่าระดับการแสดงออกของยีน *DREB2* ในพืช มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความสามารถในการทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมโดยเฉพาะดินเค็มหรือเค็มโซดิก ก็จะสามารถใช้ระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวเป็นเกณฑ์หนึ่งที่ใช้คัดเลือกพืชที่ทนทานได้

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ของคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว สัญญาเลขที่ 1/2563

เอกสารอ้างอิง

- ชัยนาม ดิสถาพร. 2556. แนวทางการวางระบบการพัฒนาพื้นที่ดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. เอกสารวิชาการสำนักงานพัฒนาที่ดิน เขต 3 กรมพัฒนาที่ดิน.
- ธนวรรณ พรหมชลินิล, ชนาภานต์ ลักษณะ และ สนธิชัย จันทร์เปรม. 2562. ยีน *NHX1* ในอ้อยพันธุ์ KPS94-13 และอ้อยป่า และรูปแบบการแสดงออกในสภาวะเลียนแบบดินเค็ม. วารสารวิชาการเกษตร. 37: 165-176.
- สำนักงานคณะกรรมการพิเศษเพื่อประสานงานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ. 2555. คู่มือการจัดการดินเค็มเพื่อปลูกข้าว. มูฟแมนท์ เจน ทรี จำกัด.
- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2562. รายงานพื้นที่ ปลูกอ้อยปีการผลิต 2561/62. แหล่งข้อมูล: <http://www.ocsb.go.th/upload/journal/fileupload/923-9040.pdf>. ค้นเมื่อ 29 ธันวาคม 2562.
- อรุณี ยูวณิยม. 2540. การจัดการแก้ไขดินเค็ม. กลุ่มวิจัยและพัฒนาการจัดการดินเค็ม สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- Abdul, W.L., A. Rao, and E. Rasul. 1997. Identification of salt tolerance traits in sugarcane lines. Field Crops Research. 54: 9-17.

- Abhyankar, G., V.D. Reddy, C.C. Giri, K.V. Rao, V.V.S. Lakshmi, S. Prabhakar, M. Vairamani, B.S. Thippeswamy, and P.S. Bhattacharya. 2005. Amplified fragment length polymorphism and metabolomic profile of hairy root of *Psoralea corylifolia* L. *Phytochemistry*. 66: 2441-2457.
- Arenhart, R.A., J.C.D Lima, M. Pedron, F.E.L. Carvalho, J.A.G.D. Silveira, S.B. Rosa, A. Caverzan, C.M.B. Andrade, M. Schünemann, R. Margis, and M. Margis-pinhoiro. 2013. Involvement of *ASR* genes in aluminum tolerance mechanisms in rice. *Plant, Cell & Environment*. 36: 52-67.
- Arenhart, R.A., Y. Bai, L.F.V. de Oliveira, L.B. Neto, M. Schunemann, F.S. Maraschin, J. Mariath, A. Silverio, G. Sachetto-Martins, R. Margis, Z-Y. Wang, and M. Margis-Pinhoiro. 2014. New insights into aluminum tolerance in rice: The *ASR5* protein binds the *STAR1* promoter and other aluminum-responsive genes. *Molecular Plant*. 7: 709–721.
- Asemota, O., and B. Conaire. 2010. Identification of moisture stress tolerant oil palm genotypes. *African Journal of Agricultural Research*. 5: 3116-3121.
- Ayers, R.S., and D.W. Westcott. 1989. Water quality for agriculture. *FAO Irrigation and Drainage Paper*, No. 29 (rev. 1).
- Chanprame, S., T. Promkhlilnil, S. Suwanno, and C. Laksana. 2019. Isolation, characterization and expression of transcription factor *ScDREB2* from wild, commercial and interspecific hybrid sugarcane in salinity condition. *Plant Biotechnology*. 46: 97-105.
- Chung, E., K. Kim, and J.H. Lee. 2012. Molecular cloning and characterization of a soybean *GmMBY184* induce by abiotic stress. *Journal of Plant Biotechnology*. 39:175-181.
- Gonzalez, A., W. Tezara, E. Rengifo, and A. Herrera. 2012. Ecophysiological responses to drought and salinity in the cosmopolitan invader *Nicotiana glauca*. *Brazilian Journal of Plant physiology*. 24: 213-222.
- Guo, Q., N. Lu, Y. Sun, W. Lv, Z. Luo, H. Zhang, Q. Ji, Q. Yang, S. Chen, W. Zhang, and Y. Li. 2019. Heterologous expression of the DREB transcription factor *AhDREB* in *Populus tomentosa* Carrière confers tolerance to salt without growth reduction under greenhouse conditions. *Forests*. 10: 214.
- Hong, J.C. 2016. *General Aspects of Plant Transcription Factor Families*, Elsevier Inc.
- Kaewjiw, N., C. Laksana, and S. Chanprame. 2018. Cloning and identification of salt overly sensitive (*SOS1*) gene of sugarcane. *International Journal of Agriculture and Biology*. 20: 1569-1574.
- Laksana, C., and S. Chanprame. 2015. A simple and rapid method for RNA extraction from young and mature leaf of oil palm (*Elaeis guineensis* jacq.). *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Science*. 21: 96-106.
- Lata, C., and M. Prasad. 2011. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*. 62: 4731-4748.
- Lu, N., B. Wei, Y. Sun, X. Liu, S. Chen, W. Zhang, Y. Zhang, and Y. Li. 2014. Field supervisory test of DREB-transgenic *populus*: Salt tolerance, long-term gene stability and horizontal gene transfer. *Forests*. 5: 1106-1121.
- Maas, E.V., and G.J. Hoffman. 1977. Crop salt tolerance – current assessment. *Journal of Irrigation and Drainage Division*. 103: 115-134.
- Ma, Q., L-J. Yue, J-L. Zhang, G-Q. Wu, A-K. Bao, and S-M. Wang. 2011. Sodium chloride improves photosynthesis and water status in the succulent xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum*. *Tree Physiology*. 32: 4-13.
- Markstein, M., C. Pitsouli, C. Villalta, S.E. Celniker, and N. Perrimon. 2008. Exploiting position effects and the gypsy retrovirus insulator to engineer precisely expressed transgenes. *Nature Genetics*. 40: 476-483.

- Nguyen, Q.H., L.T. KimVu, L.T.N. Nguyen, N.T.T. Pham, Y.T.H. Nguyen, S. Le, and M.H. Chu. 2019. Overexpression of the *GmDREB6* gene enhances proline accumulation and salt tolerance in genetically modified soybean plants. *Scientific Reports*. 9: 19663.
- Odell, J.T., F. Nagy, and N.H. Chua. 1985. Identification of DNA-sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus-35s promoter. *Nature*. 313: 810–812.
- OECD/FAO. 2019. OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028. OECD Publishing, Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Poonsawat, W., C. Theerawitaya, T. Suwan, C. Mongkolsiriwatana, T. Samphumphuang, S. Cha-um, and C. Kirdmanee. 2015. Regulation of some salt defense-related genes in relation to physiological and biochemical changes in three sugarcane genotypes subjected to salt stress. *Protoplasma*. 252: 231-43.
- Raghavendrarao, S., A. KumarMoola, R. Kumari, and B. Diana. 2017. A review on advanced methods in plant gene targeting. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 15: 317-321.
- Ravikumar, G., P. Manimaran, S.R. Voleti, D. Subrahmanyam, R.M. Sundaram, K.C. Bansal, B.C. Viraktamath, and S.M. Balachandran. 2014. Stress-inducible expression of *AtDREB1A* transcription factor greatly improves drought stress tolerance in transgenic indica rice. *Transgenic Research*. 23: 421–439.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ren, M., Z. Wang, M. Xue, X. Wang, F. Zhang, Y. Zhang, W. Zhang, and M. Wang. 2019. Constitutive expression of an A-5 subgroup member in the DREB transcription factor subfamily from *Ammopiptanthus mongolicus* enhanced abiotic stress tolerance and anthocyanin accumulation in transgenic *Arabidopsis*. *PLoS ONE*. 14: e0224296.
- Sarkar, T., R. Thankappan, G.P. Mishra, and B.D. Nawade. 2019. Advances in the development and use of *DREB* for improved abiotic stress tolerance in transgenic crop plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 25: 1323–1334.
- Wang, G., X. Xua, H. Wang, Q. Liua, X. Yanga, L. Liaoa, and G. Caib. 2019. A tomato transcription factor, *SIDREB3* enhances the tolerance to chilling in transgenic tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*. 142: 254-262.
- Wang, M., J. Zhuang, Z. Zou, Q. Li, H. Xin, and X. Li. 2017. Overexpression of a *Camellia sinensis* DREB transcription factor gene (*CsDREB*) increases salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Biology*. 60: 452-461.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and K. Shinozaki. 2009. DREB regulons in abiotic-stress-responsive gene expression in plants. P. 15-28. In: T. Yamada and G. Spangenberg (eds). *Molecular Breeding of Forage and Turf*. Springer.
- Yao, W., Y. Fu, Y. Zhang, and H. Li. 2016. Cloning of four DREB genes from Tibetan *Sophora moorcroftiana* and analysis of their expression during abiotic stress. *Journal of Forestry Research*. 27: 675-683.
- Yue, Y., M. Zhang, J. Zhang, L. Duan, and Z. Li. 2012. *SOS1* gene overexpression increased salt tolerance in transgenic tobacco by maintaining a higher K^+/Na^+ ratio. *Journal of Plant Physiology*. 169: 255-261.
- Zhang, X., X. Liu, L. Wu, G. Yu, X. Wang, and H. Ma. 2015. The *SsDREB* transcription factor from the succulent halophyte *Suaeda salsa* enhances biotic stress tolerance in transgenic tobacco. *International Journal of Genomics*. 5: 1-13.
- Zhang, X-X, Y-j Tang, Q-B Ma, C-Y Yang, Y-H Mu, H-C Suo, L-H Luo, and H. Nian. 2013. *OsDREB2A*, a rice transcription factor, significantly affects salt tolerance in transgenic soybean. *PLoS ONE*. 8: e83011.
- Zhu, J.K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Science*. 6: 66–71.