



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

ปริญญา

พันธุ์วิศวกรรม

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การโคลน การหาลำดับเบส และการแสดงออกของยีน SoNHX1 ที่ตอบสนองต่อ
สภาวะทนเค็มจากอ้อย

Molecular Cloning, Sequencing and Expression of the SoNHX1 Gene Responding to
Salt Stress of Sugarcane

นามผู้วิจัย นายภวินท์ พานิชพรพันธุ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สิริภัทร์ พราหมณ์, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พราพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สืบสิงห์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลน การหาลำดับเบส และการแสดงออกของยีน SoNHX1 ที่ตอบสนองต่อสภาวะทน
เค็มจากอ้อย

Molecular Cloning, Sequencing and Expression of the SoNHX1 Gene Responding to Salt Stress
of Sugarcane

โดย

นายภวินท์ พานิชพรพันธุ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)
พ.ศ. 2554

ภวิทย์ พานิชพรพันธุ์ 2554: การโคลน การหาลำดับเบส และการแสดงออกของยีน
SoNHX1 ที่ตอบสนองต่อสภาวะทนเค็มจากอ้อย ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
(พันธุ์วิศวกรรม) สาขาพันธุ์วิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สิริภัทร พรหมณีย์, Ph.D. 93 หน้า

อ้อยเป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลที่มีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศไทย แต่พื้นที่ปลูกอ้อยส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางซึ่งเป็นพื้นที่แพร่กระจายของดินเค็ม ความเค็มเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้การเจริญลดลง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษา ยีน vacuolar Na^+/H^+ antiporter (ยีน SoNHX1) ที่ตอบสนองต่อความเครียดในสภาวะทนเค็มของอ้อย การทดลองใช้อ้อย 4 พันธุ์ คือ K 84-200, KPS 94-13, สุพรรณบุรี 80 และ LK 92-11 พบว่า พันธุ์ LK 92-11 มีอาการตอบสนองต่อเกลือที่ไวมากที่สุด โดยมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรุนแรงหลังจากการทดสอบด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 1.5 และ 2.0% (w/v) โดยมีอาการใบเหลืองอย่างชัดเจน ภายใน 1 สัปดาห์ มีการสะสมโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณที่สูงกว่าพันธุ์อื่น แตกต่างจากในพันธุ์ K 84-200, พันธุ์ KPS 94-13 และพันธุ์ สุพรรณบุรี 80 ซึ่งมีการสะสมโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณที่ต่ำกว่าทั้งในใบและราก โดยพันธุ์ K 84-200 มีการสะสมโซเดียมคลอไรด์น้อยที่สุด และมีการตอบสนองต่อโซเดียมคลอไรด์ช้ากว่าโดยแสดงอาการอย่างรุนแรงเมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 2 ที่ความเข้มข้นเกลือ 2.0% (w/v) ใบอ้อยมีอาการใบเหลืองอย่างชัดเจนทุกต้นทดสอบ และทุกพันธุ์ ซึ่งพืชเกิดอาการใบเหลือง และแห้งตายในที่สุด การแสดงออกของยีน vacuolar Na^+/H^+ antiporter (SoNHX1) ในอ้อยพันธุ์ K84-200 และ พันธุ์ KPS 94-13 พบการแสดงออกที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงคือ 2.0% (w/v) แต่ในการแสดงออกของพันธุ์ LK92-11 และพันธุ์ สุพรรณบุรี 80 นั้นไม่มีการแสดงออกที่ระดับโซเดียมคลอไรด์ 2.0 % (w/v) สอดคล้องกับผลอาการที่แสดงออก และปริมาณการสะสมโซเดียมคลอไรด์ที่มากกว่าพันธุ์ K84-200 และ พันธุ์ KPS 94-13 แสดงให้เห็นว่าพันธุ์ K 84-200 และ พันธุ์ KPS 94-13 ที่มีการแสดงออกของยีน SoNHX1 ได้ในความเข้มข้นของเกลือที่สูง ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งในการป้องกันตัวเองจากสภาวะความเค็มที่ไม่เหมาะสม ทำให้สามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตรอดได้นานกว่าพันธุ์ LK 92-11 และพันธุ์ สุพรรณบุรี 80 ดังนั้นระดับการแสดงออกของยีน SoNHX1 สามารถนำมาใช้บ่งบอกสายพันธุ์อ้อยที่มีความทนเค็มได้ ในการทดลองนี้พันธุ์อ้อยที่ทนเค็มได้ดีคือ พันธุ์ K 84-200 และ พันธุ์ KPS 94-13

Pawin Panichponpun 2011: Molecular Cloning, Sequencing and Expression of the *SoNHX1* Gene Responding to Salt Stress of Sugarcane. Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering , Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Siripatr Prammanee, Ph.D. 93 pages.

Sugarcane is the raw material of sugar mill which is an important for the economic system in Thailand ,but some of the planting area in northeast and central Thailand are saline soil. Salinity is a major stress factor limiting crop production. The aim of this study, is to investigate the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene (*SoNHX1* gene) respond to salinity in sugarcane cultivars. Four cultivar of sugarcane K 84-200, KPS 94-13, Suphanburi 80 and LK 92-11 were studied. The result showed that all of the leaves of sugarcane varieties were yellow and necrosis from the margins inward at NaCl concentration 1.0-2.0% (w/v) .The cultivars LK 92-11 was found to be more sensitive to NaCl than the others. The leaves of cultivars LK 92-11 presented greatly yellow and necrosis after treated with NaCl at 1.5-2.0 % (w/v) concentration in a week and the NaCl accumulation in their tissue was more than the others. While the cultivars K- 84-200 was the lowest and which can be indicated as less NaCl sensitivity. The leaves of cultivars K 84-200 showed yellow symptom after treated with 2.0 % (w/v) concentration of NaCl within two weeks. At NaCl concentration of 2.0 % (w/v) all the cultivars showed yellow leaves symptom and died. The expression of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene (*SoNHX1*)in cultivars K 84-200 and KPS 94-13 were found when the concentration of NaCl increased to 2.0% (w/v) but the expression of cultivars LK 92-11 and Suphanburi 80 were absented at this concentration level, according to the sugarcane leaves symptom and the NaCl accumulation in their tissue was higher than other cultivars. The *SoNHX1* gene in cultivars K 84-200 and KPS 94-13 express in high salinity which is the mechanism of plant to defense themselves from the high salt. The cultivars K- 84-200 and KPS 94-13 can tolerate under high concentration of NaCl more than cultivars LK92-11 and Suphanburi 80. Under salt stress, the high accumulation Na^+ in leaves cause the toxic effect to the plant . The level of *SoNHX1* gene expression can be used to indicate the salt tolerant ability of sugarcane. In this experiment, the sugarcane cultivars K 84-200 and KPS94-13 have higher salt tolerance.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สิริภัทร พรหมณีย์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงสำหรับความกรุณาช่วยเหลือ ให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำในการ
ทำวิจัย ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ซึ่งเป็นผู้ให้เงินทุนสนับสนุน
งานวิจัย และวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาอ้อยและน้ำตาล สถาบันวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม และ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตร
สุพรรณบุรี อ.อุทุมพร จ.สุพรรณบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์พื้นที่อ้อยสำหรับใช้ในงานวิจัย

และท้ายสุดขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา อาจารย์ เพื่อน และพี่น้องๆ ที่ให้กำลังใจใน
การศึกษาเล่าเรียนและการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง

ภวินท์ พานิชพรพันธุ์
กันยายน 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	19
อุปกรณ์	19
วิธีการ	23
ผลและวิจารณ์	32
สรุปผลการทดลอง	88
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	89
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	93

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การให้คะแนนอาการของอ้อยในการทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น ต่างๆ	37
2	การให้คะแนนอาการของอ้อยที่ทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆกันในระยะเวลา 1 สัปดาห์	38
3	การให้คะแนนอาการของอ้อยที่ทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆกันในระยะเวลา 2 สัปดาห์	39
4	ปริมาณธาตุโซเดียมในเนื้อเยื่อใบและรากของอ้อยพันธุ์ K 84-200 KPS 94-13 สุพรรณบุรี 80 และ LK 92-11 ที่ทดสอบในสภาวะความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆ ระยะเวลา 1-2 สัปดาห์	42
5	รายละเอียดฐานข้อมูล GeneBank ที่เหมือนกับลำดับเบสของ clone 10 จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTN version 2.2.25	56
6	รายละเอียดฐานข้อมูล GeneBank ที่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ clone 10 จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTX version 2.2.25	67

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 Signaling pathway การรักษาสมดุลไอออนในเซลล์ของต้น <i>Arabidopsis</i> ภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือ	12
2 ตัวอย่างท่อนพันธุ์อ้อยที่ใช้ศึกษา และ ภาพขณะปลูกกระเพาะงูสี่เหลี่ยม	19
3 การเจริญเติบโตของอ้อยในช่วงสัปดาห์ที่ 1-4	20
4 การให้คะแนนการแสดงอาการและการตอบสนองต่อสภาวะความเค็มของใบอ้อย	23
5 อาการใบเหลืองของอ้อยพันธุ์ K 84-200 ตามระยะเวลาในการทดสอบสารละลายโซเดียมคลอไรด์	33
6 อาการใบเหลืองของอ้อยพันธุ์ KPS 94-13 ตามระยะเวลาในการทดสอบสารละลายโซเดียมคลอไรด์	33
7 อาการใบเหลืองของอ้อยพันธุ์ สุพรรณบุรี 80 ตามระยะเวลาในการทดสอบสารละลายโซเดียมคลอไรด์	34
8 อาการใบเหลืองของอ้อยพันธุ์ LK 92-11 ตามระยะเวลาในการทดสอบสารละลายโซเดียมคลอไรด์	34
9 เปรียบเทียบอาการใบเหลืองของอ้อยพันธุ์ K 84-200, KPS 94-13, สุพรรณบุรี 80 และ LK 92-11 หลังทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ที่ความเข้มข้น 0(control), 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% (w/v) ตามลำดับ	35
10 แสดงปริมาณธาตุโซเดียมในเนื้อเยื่อใบและรากของอ้อย พันธุ์ K84-200, KPS94-13, LK 92-11 และ สุพรรณบุรี 80	43
11 วิเคราะห์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างอ้อยพันธุ์ K 84-200 บน 1% (w/v) Agarose gel	45
12 วิเคราะห์ PCR product จากดีเอ็นเออ้อยพันธุ์ K 84-200 บน 1.5% (w/v) Agarose gel	46
13 วิเคราะห์ผลการสกัด total RNA จากอ้อยพันธุ์ K 84-200 ที่ทดสอบด้วยระดับความเข้มข้นของเกลือต่างๆ บน 1% (w/v) Agarose gel	49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	วิเคราะห์ผล RT-PCR Product ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือต่างๆ บน 1.5% (w/v) Agarose gel	50
15	RT-PCR Product ที่ทำ Gene Clean บน 1% (w/v) Agarose gel	51
16	วิเคราะห์ชิ้น DNA จาก recombinant plasmid ที่ตัดด้วยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> บน 1% (w/v) Agarose gel	52
17	ลำดับเบสของ <i>Sacharum officinarum</i> NHX1 (<i>SoNHX1</i>) ที่ได้จากการโคลน และจัดเรียงลำดับเบสดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม DNAsis version 2.1	53
18	การวิเคราะห์ความเหมือนโดยเปรียบเทียบลำดับเบสของ clone 10 กับ ฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTN 2.2.25	55
19	เปรียบเทียบลำดับเบสดีเอ็นเอของ clone 10 กับ ยีนNHX1 ในพืชต่างๆ	60
20	การวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของ clone 10 (<i>SoNHX1</i>) กับ ยีนNHX1 ในพืชต่างๆ	62
21	เปรียบเทียบลำดับเบสดีเอ็นเอของ clone 10 กับ ยีนNHX1 ใน <i>Zea mays</i>	63
22	การวิเคราะห์ความเหมือนโดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ clone 10 กับ ฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTX 2.2.25	66
23	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ clone 10 กับ ยีนNHX1 ในพืชต่างๆ	80
24	การวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของ clone 10 (<i>SoNHX1</i>) กับ ยีนNHX1 ในพืชต่างๆ	81
25	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ clone 10 กับ ยีนNHX1 ใน <i>Hordeum brevisubulatum</i> Na ⁺ /H ⁺ antiporter	82
26	ออกแบบคู่ไพรเมอร์ <i>SoNHXF1</i> และ <i>SoNHXR1</i> ด้วยโปรแกรม Primer 3	83
27	วิเคราะห์ผลการสกัด total RNA จากใบอ้อยพันธุ์ K 84-200 พันธุ์ KPS 94-13 พันธุ์ สุพรรณบุรี 80 และ พันธุ์ LK 92-11 (ก-ง) ตามลำดับ ที่ทดสอบด้วยสารละลายเกลือระดับความเข้มข้นเข้มข้น 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 % w/v (1-5) ตามลำดับ	85

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- 28 วิเคราะห์ผล RT-PCR product ที่จำเพาะต่อยีน *SoNHX1* จากใบอ้อยพันธุ์ K 84-200 พันธุ์ KPS 94-13 พันธุ์ สุพรรณบุรี 80 และ พันธุ์ LK 92-11 (ก-ง) ตามลำดับ ที่ทดสอบ ด้วยสารละลายเกลือ ระดับความเข้มข้นเข้มข้น 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 % w/v (1-5) ตามลำดับ

86

การโคลน การหาลำดับเบส และการแสดงออกของยีน *SoNHX1* ที่ตอบสนองต่อ
สภาวะทนเค็มจากอ้อย

**Molecular Cloning, Sequencing and Expression of the *SoNHX1* Gene
Responding to Salt Stress of Sugarcane**

คำนำ

ดินเค็มเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นทั่วโลกไม่ว่าจะเป็นพื้นที่แห้งแล้งหรือพื้นที่ชุ่มชื้นทั้งในเขตชลประทานและเขตอาศัยน้ำฝน ดินเค็มมีเกลือที่ละลายได้ปริมาณมากในดิน มีผลกระทบต่อพืช โดยเฉพาะการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชที่ปลูก ทำให้สภาพแวดล้อมเสื่อมโทรม พื้นที่ดินเค็มในประเทศไทยพบใน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 17.81 ล้านไร่ ภาคกลาง 4.5 ล้านไร่ และ พื้นที่ชายทะเล 3.6 ล้านไร่ ปัญหาดินเค็มมีผลกระทบโดยตรงต่อการเกษตร ทำให้การเจริญเติบโตผลผลิต และคุณภาพของพืชและรายได้ของเกษตรกรลดลงส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคมในชุมชน เมื่อความรุนแรงของปัญหามากขึ้นสภาพแวดล้อมที่เสื่อมโทรม เกษตรกรทำมาหากินไม่ได้ ต้องย้ายพื้นที่ทำกินหรืออพยพไปหางานในเมือง ปลดปล่อยพื้นที่รกร้าง (อรุณี, 2546)

การปรับปรุงดินเค็มทำได้หลายวิธี ที่นิยมมากที่สุดได้แก่ การล้างเกลือและระบายเกลือออกจากดินโดยให้ความเค็มลดลงเป็นปกติจนสามารถปลูกพืชได้ แต่การล้างดินต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง และใช้เวลานาน การปลูกพืชทนเค็มจึงเป็นอีกวิธีที่นิยมแพร่หลายโดยไม่จำเป็นต้องมีการล้างเกลือออกจากดิน ดังนั้นการใช้พืชทนเค็มจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่น่าจะเป็นอย่างยิ่ง และงานวิจัยพืชทนเค็มจึงมีความสำคัญ (สมศรี, 2539)

อ้อยเป็นพืชไร่เศรษฐกิจที่มีความสำคัญซึ่งได้รับผลกระทบจากพื้นที่ดินเค็ม เนื่องจากพื้นที่ปลูกอ้อยส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางซึ่งเป็นพื้นที่แพร่กระจายของดินเค็มทำให้ผลผลิตของอ้อยลดลงส่งผลกระทบต่อรายได้และความเป็นอยู่ของเกษตรกร และยังกระทบโดยตรงต่ออุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลและเอทานอลของประเทศด้วย

การปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้มีความสามารถทนเค็มได้นั้นเป็นวิธีที่น่าสนใจ แต่ยังขาดความรู้ และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทนเค็ม เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาขึ้นทนเค็ม และกลไกของการทนเค็มในอ้อยอย่างจริงจัง ซึ่งมีความจำเป็นมากในแง่การนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ และคัดเลือกพันธุ์อ้อยที่มีความสามารถทนเค็มซึ่งปัจจุบันเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมีความก้าวหน้า สามารถนำมาใช้เพื่อการพัฒนาสายพันธุ์พืชให้มีลักษณะตามความต้องการได้โดยใช้เวลาน้อยลง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการโคลนยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดในสภาวะความเค็มของอ้อย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาและเข้าใจกลไกการตอบสนองต่อความเครียดของอ้อยและ การปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้มีลักษณะทนเค็มเพื่อแก้ปัญหาการปลูกพืชในดินเค็มต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของย้อยที่ตอบสนองต่อความเค็มระดับต่างๆ
2. เพื่อโคลน หาลำดับเบส และศึกษาการแสดงออกของยีน *Saccharum officinarum* SoNHX1 ที่ตอบสนองต่อสภาวะทนเค็มจากย้อย

สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม
2. เรือนเพาะชำ ภาควิชาชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์ และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มทำการทดลอง เดือนมกราคม พ.ศ. 2551 สิ้นสุดการทดลอง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2553

การตรวจเอกสาร

1. อ้อย

1.1 ข้อมูลลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของอ้อย

ชื่อสามัญ Sugarcane

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Saccharum officinarum* L.

มีลำดับทางอนุกรมวิธานทางวิทยาศาสตร์ดังนี้

Kingdom	Plantae
Class	Monocotyledones
Order	Glumaceae or Poales
Family	Gramineae or Poaceae
Genus	Saccharum

มีผู้พยายามแยกประเภทอ้อยให้อยู่ในระบบที่ถูกต้องตั้งแต่สมัยของลินเนียส และภายหลังมีผู้แยกพืชที่อยู่ในพวกเดียวกันออกเป็น 6 ชนิด คือ *Saccharum spontaneum*, *Saccharum sinense*, *Saccharum barberi*, *Saccharum robustum*, *Saccharum officinarum* (อ้อยพันธุ์ปลูก) และ *Saccharum edule* (ปรีชา, 2523)

ลักษณะภายนอกของอ้อย

1.1.1 ลำต้น

ลำต้นอ้อยเป็นส่วนสำคัญที่สุดที่ใช้ในการขยายพันธุ์ และสะสมน้ำตาล แบ่งเป็นปล้องๆ(internode) แต่ละปล้องมีข้อ (node) และตา (bud) หนึ่งตาหรือมากกว่า ตานี้จะเจริญขึ้นมาเป็นอ้อยใหม่ (primary shoot) ในเวลาอันควรจะมีลำที่สองเกิดออกมาจากลำแรก และมีลำที่สามเกิดออกมาจากลำที่สอง ตามลำดับ เกิดเป็นกออ้อยต่อไป

ตาอ้อย จะเกิดตรงข้อด้านข้างสลับกัน ข้อของอ้อยตรงส่วนโคน และส่วนยอด จะชิดกันมากปล้องมีขนาดสั้นมาก จนกระทั่งข้อของอ้อยอยู่ชิดติดกัน การที่ข้อของอ้อยในส่วนได้ ดินอยู่ชิดติดกันดังนี้ ทำให้มีผลต่อการแตกกอของอ้อยด้วย ปล้องอ้อยตรงกลางลำมีความยาว ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง ลักษณะ สี การคดงอ และรูปร่างแตกต่างกันไป ปล้องของอ้อยในลำเดียวกันจะมี ขนาดต่างๆกันตามช่วงเวลาที่เกิดเจริญเติบโตขึ้นมา ตามสภาพภูมิอากาศ และปัจจัยในการเติบโต ปล้องอ้อยอาจจะป่อง ตรง หรือคอดก็ได้ ปล้องอ้อยเมื่อนำมาตัดขวางจะมีลักษณะจากกลมไปจนถึง รูปรีคล้ายรูปไข่ เปลือกนอกจะแข็ง ความแข็งแรงของเปลือกนอกของอ้อยแต่ละพันธุ์แตกต่างกันไป คุณลักษณะเกี่ยวกับเปลือกอ้อยมีส่วนสัมพันธ์ต่อการทำลายของหนู และโรคต่างๆ สีของลำอ้อยจะมี สีแตกต่างกันไปตามพันธุ์ และอาจเปลี่ยนไปตามสภาพแวดล้อม สีของลำอ้อยเกิดจากเม็ดสี แอนโทไซยานิน (anthocyanin) และคลอโรฟิลล์ (chlorophyll)

ปล้องอ้อยที่หุ้มด้วยกาบใบจะมีสีจางกว่าส่วนที่กาบใบหลุด และถูกแดดเผา ส่วนยอดอ้อยที่กาบใบหุ้มอยู่นั้นจะมีสีเขียว มีบ่อยครั้งที่ลำอ้อยมีสีเป็นทางลายเขียวสลับเหลือง แดงตลอดลำการต่อกันระหว่างปล้องของอ้อยมีหลายแบบ บางพันธุ์จะดูเป็นลำตรงตลอด บางพันธุ์ จะซิกแซกต่างๆ กันไป โดยทั่วไปนิยมปลูกอ้อยที่มีปล้องยาวตรง และประกอบกับลักษณะอื่นๆอีก จะมีร่องเป็นแนวนูนยาวตามลำปล้องขึ้นไปเรียกว่า ร่องตา (bud groove หรือ bud furrow) ที่ข้อจะมี วงอยู่โดยรอบข้างเรียงเป็นระเบียบ ข้างเรียงสลับกัน เรียกว่า วงราก (rootband) ซึ่งเมื่อตัดปล้องอ้อย นี้ไปปลูกรากจะออกมาจากจุดเหล่านี้เหนือวงรากขึ้นไปจะเป็นวงเจริญ (growth ring) ซึ่งวงนี้จะมีสี แยกไปจากสีปล้องและสีวงราก อ้อยหนึ่งปล้องจะมีตาหนึ่งตา บางปล้องอาจจะไม่มีตาเลย หลายๆ ปล้องติดกันหรือบางปล้องมี 2 ตา ตาอ้อยมีลักษณะแตกต่างกันหลายแบบ เช่น สามเหลี่ยม ยอด แแหลม แบบรูปไข่ แบบรูปไข่ป้าน แบบหัวเหลี่ยม แบบขนมเปียกปูน แบบกลม แบบรูปไข่ยอด แแหลม แบบสี่เหลี่ยม

1.1.2 ใบ

ใบอ้อยเหยียดกางออกจากลำอ้อยสลับกันสองข้างมีน้อยมากที่ใบอ้อยจะเหยียด กางออกจากลำอ้อยทำมุมแก่กันน้อยกว่า 180 องศา เมื่ออ้อยยังเล็กอยู่ใบอ้อยจะมีขนาดเล็กมาก เท่ากับกลีบ หรือเกี๋ยงเล็กๆ เท่านั้น กาบใบจะติดอยู่กับลำปล้องตรงข้อ และโอบรอบปล้องเอาไว้ โดยรอบ กาบใบมีความยาวตั้งแต่หนึ่งนิ้วจนถึงหนึ่งฟุต หรือมากกว่านั้น กาบใบอาจจะเรียบ หรือมี ขนเล็กๆ ปกคลุมอยู่ และขนสั้นๆ เหล่านี้ อาจจะร่วงหล่นหมด หรือติดอยู่เล็กน้อยเมื่อกาบใบแห้ง

อ้อยบางพันธุ์จะมีกาบใบสีค่อนข้างม่วงฉาบเคลือบอยู่บนผิวนอก ส่วนบนของกาบใบจะต่อกับส่วนใบ ตรงจุดที่กาบใบต่อกับใบนี้จะเห็นเป็นรอยต่อมีสีแปลกออกไปจากสีของใบเรียกว่า คอใบ (collar) และตรงรอยต่อนี้ที่ขอบนอกจะมีติ่งยื่นออกมาข้างเดียวหรือทั้งสองข้างเรียกว่าหูใบ (auricle) ถ้าดึงใบอ้อยแฉกออกดูด้านในตรงรอยต่อนี้จะมองเห็นเยื่อบางๆ เป็นรูปคล้ายกระจับเรียกว่าลิ้นใบ เมื่อพิจารณาโดยละเอียดจะพบว่าส่วนของคอใบจะมีรูปลักษณะต่างๆ กันเรียกว่า คิวแลพ (dewlap) ใบที่แก่เต็มที่จะมีคิวแลพคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงรูป

ลักษณะใบอ้อยทั่วไป จะมีรูปไม่ค่อยสมคูลย์ กล่าวคือครึ่งหนึ่งของใบด้านที่กาบใบหุ้มทาบอีกข้างหนึ่งนั้นจะมีขนาดเล็กแคบกว่าด้านตรงข้ามที่แบ่งด้วยเส้นกลางใบ ดังนั้นเมื่อจะเปรียบเทียบคิวแลพ จะต้องถือเอาข้างใดข้างหนึ่งเท่านั้นเป็นเกณฑ์ คิวแลพของอ้อยมีรูปร่างต่างๆ กัน ความยาวของใบอ้อยมีขนาดต่างกัน แต่โดยทั่วไปมักจะอยู่ในราวหนึ่งเมตร ความกว้างของใบจะกว้างที่สุดประมาณ 10 เซนติเมตร ใบอ้อยใบหนึ่งจะมีเนื้อที่ประมาณ 0.05 ตารางเมตร โดยทั่วไปอ้อยที่ไม่ค่อยทิ้งใบมักจะแข็งแรง ให้ผลผลิตสูงกว่าอ้อยที่ทิ้งใบ

1.1.3 ราก

ปุ่มรากที่มีอยู่ตรงข้อจะงอกรากออกมาหาอาหารเพื่อเลี้ยงต้นอ่อน รากนี้เราเรียกว่ารากฐานแรก (Primary root) ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นบางๆ มีกิ่งก้านสาขาเพื่อดูดความชื้น และอาหารมาเลี้ยงต้นใหม่เมื่อต้นอ้อยเติบโตขึ้นรากฐานแรกจะตายไปมีรากใหม่เกิดขึ้นมาจากโคนต้น เรียกว่ารากฐานที่ 2 (Secondary root) รากใหม่นี้มีลักษณะสมบูรณ์และช่วยหาอาหารได้ดีกว่ารากฐานแรกและเจริญเป็นรากถาวรของลำอ้อยต่อไป

ความยาวของรากอ้อยขึ้นอยู่กับลักษณะดิน และการเตรียมดิน ถ้าดินอัดแน่น รากจะเจริญเติบโตไม่ดีเท่าที่ควร ทำให้ดูดน้ำ และอาหาร ได้น้อย ตรงกันข้ามถ้าดินโปร่งร่วนซุย และหน้าดินลึกการแพร่ของรากก็จะไปได้ไกล และลึกด้วย

รากอ้อยออกเป็น 3 ชนิด คือ

(1) รากค้ำยัน เกิดจากโคนอ้อย

(2) ราฝอย มีลักษณะเป็นฝอยบางมีแขนงมาก เกิดอยู่ในดินบนลึกประมาณ 60 ซม. แผ่ขยายโดยรัศมีประมาณ 200 ซม.

(3) รากคิ่ง มีลักษณะคล้ายเส้นเชือกแทงลึกลงไปในดินถึงระดับ 6 เมตร ถ้าดิน
ร่วนซุยดี

1.1.4 ดอก และเมล็ด

ดอกอ้อยมีลักษณะเป็นพุ่มรูปแบบเป็นแบบฉบับของแต่ละพันธุ์ไม่เหมือนกัน
อ้อยประเภทอ้อยมีตระกูล (*Saccharum officinarum* L.) จะมีช่อดอกยาว พวงอ้อยและแฉมจะมีช่อ
ดอกสั้นกว่า สีของช่อดอกก็มีสีต่างๆ กันตั้งแต่ขาวจนกระทั่งน้ำเงินหรือม่วง ในแง่การค้าไม่นิยม
ปลูกอ้อยที่ ออกดอกเนื่องจากอ้อยที่ออกดอกแสดงว่าอ้อยนั้นหยุดเจริญทางด้านเชื้อแล้ว และน้ำตาล
ที่สะสมอยู่ในลำต้นได้ถูกนำไปใช้สร้างช่อดอกบ้าง ความหวานจึงลดลงบ้างเล็กน้อย แต่ในทางพันธุ
ศาสตร์เราจำเป็นต้องใช้อ้อยออกดอกเพื่อการผสมพันธุ์ การบังคับให้อ้อยออกดอกเป็นขั้นตอนใน
การผสมพันธุ์ส่วนการบังคับไม่ให้อ้อยออกดอกก็เป็นวิธีการทางเกษตรกรรมเพื่อให้อ้อยได้ผลผลิตสูง

ช่อดอกหนึ่งๆ มีดอกเล็กๆ จำนวนนับแสนดอก ดอกเล็กๆ จะเกิดเป็นกลุ่มๆ อยู่บน
ก้านดอก ดอกกลุ่มหนึ่งจะมีลักษณะเหมือนกันทุกอย่างเว้นแต่ว่าดอกหนึ่งมีก้านดอกส่วนอีกดอกหนึ่ง
ไม่มีก้านดอกเวลาดอกติดเป็นเมล็ด และแก่จัดก็จะหลุดจากขั้วแล้วปลิวไปตามลมไปด้วยกันเป็นกลุ่มๆ
ดอกอ้อยเล็กๆ แต่ละดอกประกอบด้วย รังไข่ ซึ่งมีช่อกุสรวัด 2 ช่อ กะเปาะกุสรวัด 3 อัน
เปลือก หรือแกลบ 3 อัน (ซึ่งบางพันธุ์ไม่มีครีบ) นอกจากนี้ตรงส่วนแกนของก้านช่อกุสรวัดจะมี
กะเปาะอยู่สองกะเปาะซึ่งจะทำหน้าที่ขยายตัวเพื่อดันให้กะเปาะกุสรวัดผู้ผสมกับเมือกเหนียวที่ยอด
ช่อกุสรวัด จะเกิดการผสมพันธุ์ กันขึ้น และเกิดเมล็ดในเวลาต่อมา

เมล็ดอ้อยมีลักษณะคล้ายเมล็ดข้าวสาลีที่ย่อส่วนลงเล็กน้อยมากจนต้องเพ่งดู จึงจะ
เห็นชัดเจนมีขนาดกว้าง 1.5 มม. ยาว 1 ถึง 1.5 มม. การกระจายของดอกอาศัยลม ถ้าสภาพเหมาะจะ
งอกภายใน 2-8 วัน การออกดอกของอ้อยนั้นมีปัจจัยเกี่ยวข้องอยู่หลายประการ ประการแรกอ้อย
พันธุ์นั้นจะต้องเป็นพันธุ์ที่ออกดอกนอกจากนี้แล้วปัจจัยอื่นๆ เช่น ช่วงแสง อุณหภูมิ ความชื้นใน
ดิน และอากาศ ปุ๋ย ไนโตรเจนเหล่านี้ทำให้อ้อยออกดอกได้ นอกจากนี้ยังมีระดับเส้นรุ้งที่อ้อยขึ้นอยู่
ความสูงจากระดับน้ำทะเล ทิศทางลม และสภาพของดินก็เป็นสาเหตุที่ทำให้อ้อยออกดอกได้ อ้อย
ที่จะออกดอกดีกว่าอ้อยปีแรก

การบานของดอกอ้อย จะค่อยทยอยบานไปเรื่อยๆ ใช้เวลา 5 ถึง 12 วัน จึงบานหมดทุกดอก แม้ว่าดอกอ้อยจะมี พร้อมทั้งสองเพศในดอกเดียวกันแต่มีใช้จะมีประสิทธิภาพในการผสมพันธุ์ติดทุกดอก เราอาจแบ่งพันธุ์อ้อยออกได้ 2 พวก คือพันธุ์ที่มีทั้งเกสรตัวผู้ และเกสรตัวเมียมีความสมบูรณ์ (fertile) กับพันธุ์ที่มีเกสรตัวผู้ไม่สมบูรณ์ แต่มีเกสรตัวเมียสมบูรณ์ (malesterile) พันธุ์อ้อยที่มีเกสรตัวผู้สมบูรณ์ยอมใช้เป็นพ่อพันธุ์ได้หรือผสมตัวเองก็ได้ (self) อ้อยบางพันธุ์ผสมตัวเองไม่ติด (self sterile) แต่มีเกสรตัวผู้สมบูรณ์ ดินฟ้าอากาศมีอิทธิพลต่อการผสมพันธุ์ของดอกอ้อยคือทำให้ผสมติดหรือไม่ติดได้ (ปรีชา, 2523)

1.2 ความสำคัญของอ้อยในเชิงเศรษฐกิจ

อ้อยเป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมอ้อย และน้ำตาลที่มีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศ คือ

1. มีการบริโภคน้ำตาลในประเทศปีละประมาณ 1.6-1.7 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 17,000 – 19,000 ล้านบาท
2. มีการส่งออกน้ำตาลจำหน่ายในตลาดโลกปีละกว่า 3 ล้านตัน นำรายได้เข้าประเทศประมาณ 20,000 – 30,000 ล้านบาทต่อปี ทำให้ไทยมีสถานภาพเป็นผู้ส่งออกน้ำตาลใหญ่เป็นอันดับ 3 ของโลก รองจาก บราซิล สหภาพยุโรป แต่บางปีเป็น อันดับ 4 รอง จาก ออสเตรเลีย มีสัดส่วนตลาดร้อยละ 9.5 ของโลก มีตลาดสำคัญคือ อินโดนีเซีย ญี่ปุ่น และเกาหลีใต้
3. เกษตรกรผู้ปลูกอ้อยจะมีรายได้จากการจำหน่ายอ้อยทั้งหมด ประมาณ 30,000 ล้านบาท คิดเป็นร้อยละ 4 ของรายได้ภาคเกษตรกรรมทั้งหมด
4. เป็นตลาดแรงงานใหญ่ที่เกี่ยวข้องทั้งด้านแรงงานตัดอ้อย และแรงงานในโรงงานน้ำตาล แรงงานในการตัดอ้อยจะมีไม่ต่ำกว่า 600,000 คน ยังไม่รวมแรงงานในการขนส่งอ้อย
5. ความสำคัญด้านพลังงานโดยนำไปผลิตเป็นเอทานอล เพื่อใช้ผสมน้ำมันเบนซินในอัตราส่วน 1:10

ปริมาณการผลิตอ้อยเพิ่มขึ้นทุกปี ในปี 2545/46 มีอ้อยเข้าหีบรวมกัน 74 ล้านตัน ซึ่งพื้นที่ปลูกอ้อยกระจายอยู่ใน 4 ภาคที่มีโรงงานน้ำตาลตั้งอยู่ คาดว่ามีพื้นที่ปลูกอ้อยถึง 6.65 ล้านไร่ (เฉลิมพล, 2547) จากการดำเนินการศึกษาสำรวจพื้นที่ปลูกอ้อยในปีการผลิต 2550 - 2551 โดยอาศัยข้อมูลจากดาวเทียมประกอบกับการเก็บรายละเอียดข้อมูลทางภาคพื้นดิน เพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลว่าด้วยพื้นที่ปลูกอ้อยโดยรวมทั้งประเทศ จำนวน 6,516,376 ไร่ พื้นที่อ้อยส่งโรงงาน 6,228,498 ไร่

ส่วนใหญ่ปลูกมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง อ้อยนับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย สามารถนำมาแปรรูปเป็นน้ำตาลดิบ และน้ำตาลทรายส่งเป็นสินค้าออกเป็นอันดับสองรองจากข้าว ประเทศไทยส่งออกน้ำตาลมากเป็นอันดับ 2 ของโลก การส่งออกน้ำตาลดิบในปี 2552 ส่งออก 2,338,103 ตัน มีมูลค่า 26,082 ล้านบาท และการส่งออกน้ำตาลทรายในปี 2552 ส่งออก 2,694,467 ตัน มีมูลค่า 35,503 ล้านบาท (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล ทราย, 2552) ส่วนเหลือใช้ และผลผลิตจากอ้อยยังสามารถนำมาใช้ทำประโยชน์อื่นๆ อีก เช่น การทำเอ็กกระดาชจากกากอ้อย และการทำอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์โดยใช้ตะกอนน้ำตาลเป็นต้น และปัจจุบันมีการนำกากอ้อยมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลที่ใช้ในการผลิตน้ำมันรถยนต์ชนิดแก๊สโซฮอล์ (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2548)

2. ปัญหาดินเค็มและการแพร่กระจาย

ดินเค็ม (saline soil) หมายถึง ดินที่มีปริมาณเกลือที่ละลายอยู่ในสารละลายดินมากเกินไปจนมีผลกระทบต่อการทำงานของพืช หรืออาจทำให้พืชตายได้ ทั้งนี้เนื่องจากพืชเกิดอาการขาดน้ำ และมีการสะสมไอออนที่เป็นพิษในพืชมากเกินไป นอกจากนี้ยังทำให้เกิดความไม่สมดุลของธาตุอาหารพืชอีกด้วย

ดินเค็มในโลกปัจจุบันแพร่กระจายในทุกทวีป พบว่ามีพื้นที่ดินเค็มในโลก 3.87 ล้านตารางกิโลเมตร ในประเทศไทยพบดินเค็มแพร่กระจายทั่วไปในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และบริเวณชายฝั่งทะเล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีการแพร่กระจายดินเค็มเกือบทุกจังหวัด คิดเป็นพื้นที่ถึง 17.81 ล้านไร่ หรือร้อยละ 17 ของพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นอกจากนี้ยังมีพื้นที่ ที่มีศักยภาพในการแพร่กระจายดินเค็มอีก 19.4 ล้านไร่ รวมแล้วมีพื้นที่เกี่ยวข้องถึง 37 ล้านไร่เฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ดังนั้นการวิจัยพืชทนเค็มจึงมีความสำคัญเพื่อหาพืชที่เหมาะสมและทนเค็มได้สูง (สมศรี, 2539)

วิธีวัดความเค็มของดิน ค่าที่ใช้กำหนดความเข้มข้นของความเค็มจะใช้ค่าการนำไฟฟ้าของดินที่สกัดได้จากดินขณะที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (Electrical conductivity at Saturation extract; ECe) หน่วยเดซิเมนต่อเมตร (dS/m) ที่ 25 °C มาใช้ประเมินปริมาณเกลือ และอิทธิพลของเกลือในดินต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตของพืช ซึ่งดินเค็มจะมีค่า ECe มากกว่า 2 dS/m ขึ้นไป หรือมากกว่า 0.1 % เกลือในดิน การตรวจสอบดินเค็มทำได้โดยการวัดค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity) ของ

สารละลายดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (saturation extract) ที่อุณหภูมิ 25 °C มีค่าสูงกว่า 2 dS/m เกลือที่ละลายน้ำได้ดีมีอยู่หลายชนิดส่วนใหญ่เป็นเกลือของโซเดียม แคลเซียม และโพแทสเซียม อยู่ในรูปของคลอไรด์ ซัลเฟต คาร์บอเนต และไนเตรท ซึ่งค่าที่ได้จากการวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายดินนั้น สามารถนำมาใช้ประเมินปริมาณเกลือ และอิทธิพลของเกลือในดินต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช (สมศรี, 2539)

Joshi and Naik (1980) ทำการศึกษาผลความเค็มที่เกิดจากไอออนของ Na^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} และ Cl^- ต่ออ้อยสายพันธุ์ Co 740 โดยทำการทดสอบอ้อยกับเกลือ 4 ชนิด คือ NaCl , Na_2SO_4 , MgCl_2 , MgSO_4 ซึ่งใช้ค่า Ec เท่ากับ 10 mmhos/cm พบว่า เกลือทุกชนิดจะไปยับยั้งการเจริญเติบโต ทำให้พื้นที่ใบและ การขยายตัวของข้อปล้องของอ้อยลดลง โดยไอออน SO_4^{2-} และ Na^+ มีความเป็นพิษมากกว่าไอออนอื่น โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และการสร้างคลอโรฟิลล์ของอ้อยได้มากกว่าลำดับความเป็นพิษของไอออนต่ออ้อยสายพันธุ์ Co740 เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ SO_4^{2-} , Na^+ , Cl^- และ Mg^{2+}

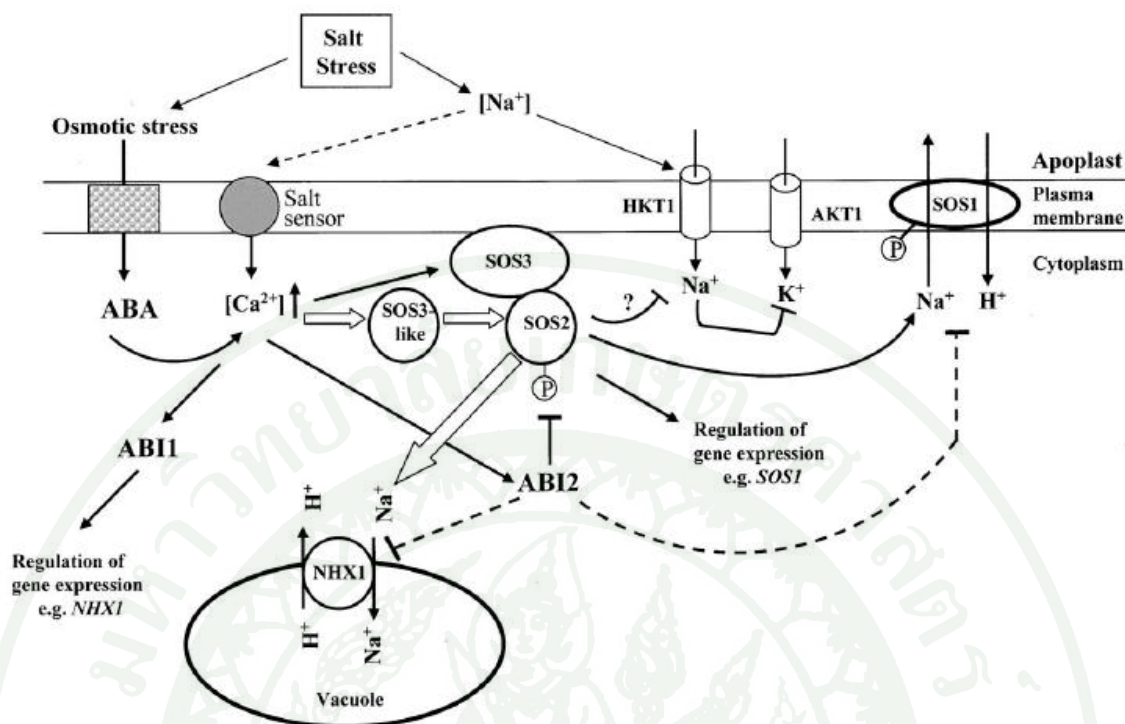
Lingle and Wiegand (1997) รายงานว่า คุณภาพของน้ำอ้อยจะลดลงเมื่อปลูกบนพื้นที่ดินเค็มโดยทำการเก็บเกี่ยวอ้อยจากแปลงที่มีค่า ECe ตั้งแต่ 0.5 - 9.5 dS/m ซึ่งเมื่อค่า ECe มีค่ามากขึ้นค่าความหวาน(Brix) ของอ้อยก็จะลดลง และยังเป็นการเพิ่ม fiber ให้มากขึ้นด้วย ทำให้มีผลเสียในแง่การค้าเป็นอย่างมาก

Frederick *et al.* (2000) ได้ศึกษาผลของเกลือที่มีต่อการเจริญเติบโตของใบอ้อย(ตั้งแต่เริ่มงอกจนร่วง) โดยทดลองให้น้ำที่มีเกลือแก่อ้อยเป็นเวลา 68 วัน ซึ่งจะเริ่มให้น้ำที่มีเกลือเมื่ออ้อยอายุ 60 วัน น้ำที่ให้จะมีค่า ECe อยู่ที่ 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 และ 12.0 dS/m น้ำจะประกอบด้วย NaCl และ CaCl_2 ผสมกันอยู่ พบว่า น้ำหนักแห้ง และพื้นที่ของใบลดลงเมื่อเพิ่มความเค็ม แต่อ้อยพันธุ์ปลูก H69-8235 ที่มีความทนเค็มนั้น มีการลดลงระดับปานกลาง แต่ในเมื่อความเค็มสูงๆนั้น อ้อย H69-8235 จะมีพื้นที่เฉลี่ยต่อใบลดลง ขณะที่พบจำนวนใบเหี่ยวเพิ่มขึ้นอย่างมาก สาเหตุที่เกิดอาการใบเหี่ยวเกิดจากการที่ใบใกล้จะร่วง แต่จำนวนใบที่เกิดใหม่นั้นไม่ได้ลดลง

แต่ในพันธุ์ที่ไม่ทนเกลือ คือพันธุ์ H69-7052 ค่าพื้นที่ใบ และอัตราการเกิดใหม่ของใบ ลดลงอย่างมาก ขณะที่จำนวนการร่วงของใบมีไม่มาก แสดงว่า ความเค็มส่งผลให้เกิดการลดอัตราการคายน้ำในใบอ้อย แต่อ้อยพันธุ์ที่ไม่ทนเค็มจะทำให้การพัฒนา และการเจริญเติบโตของใบอ้อย ลดลง

3. ความเครียดของพืชต่อสภาวะทนเค็ม

สภาวะทนเค็มของพืช คือ ความสามารถของพืชที่สามารถมีการเจริญเติบโตได้ภายใต้สภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูงจนครบวงจรชีวิต พืชที่สามารถจะทนความเค็ม และเติบโตได้ดีเราเรียกว่า halophytes ซึ่งพืชมีการพัฒนากลไกทางชีวเคมี และชีวโมเลกุลเพื่อให้สามารถทนต่อความเครียดจากสภาวะทนเค็มได้ (Parida and Das, 2005) ปริมาณของโซเดียมที่ระดับความเข้มข้นสูงใน cytoplasm จะเป็นพิษต่อทั้งพืช และยีส ซึ่งกระบวนการแยก Na^+ ไปเก็บไว้ใน vacuole เกิดจาก 2 กลไก คือ tonoplast proton pumps ซึ่งเป็นการดึง H^+ เข้ามาเก็บในเซลล์ (H^+ pumps) และ Na^+/H^+ antiporter เป็นการแลกเปลี่ยน Na^+ กับ H^+ โดยขับ Na^+ ออกนอกเซลล์ 2 กลไกนี้ทำให้พืชมีความสามารถในการทนเค็มได้ (Brini *et al.* 2005) ซึ่งการรักษาสมดุลของไอออนใน cytoplasm เกิดจากการทำงานของยีน SOS1 และ NHX1 โดยระดับการแสดงออกของยีน NHX1 ถูกควบคุมโดยโปรตีน ABI1 (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 Signaling pathway การรักษาสมดุลไอออนในเซลล์ของต้น *Arabidopsis* ภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือ

ที่มา: Chinnusamy *et al.* (2005)

3.1 การควบคุมและการกระจายไอออนในสภาวะทนเค็ม

การดูดซึมและการกระจายไอออนมีความสำคัญทั้งในการเจริญตามปกติของพืช และเมื่ออยู่ในสภาวะดินเค็ม เพราะความเครียดต่างๆจะไปรบกวนสมดุลไอออนให้เสียไป แม้แต่พืชที่ทนเค็มก็ไม่สามารถทนเกลือปริมาณมากๆภายใน cytoplasm ได้ พืชจึงต้องมีการขับเกลือเข้าไปเก็บใน vacuole หรือแบ่งกระจายไอออนไปตามเนื้อเยื่อต่างๆ เพื่อให้พืชมี metabolic เป็นปกติ (Readdy *et al.*, 1992) ซึ่งการกำจัดโซเดียม(Na⁺) ออกจาก cytoplasm หรือการแบ่งไปเก็บใน vacuole นั้นเป็นหน้าที่ของ salt-inducible enzyme Na⁺/H⁺ antiporter (Apse *et al.*, 1999)

H⁺ pumps มีอยู่ 2 แบบ คือ vacuole type H⁺-ATPase (V-ATPase) และ vacuole pyrophosphatase (V-PPase) ซึ่งทั้ง 2 แบบมีการทำงานร่วมกันที่ membrane แต่ V-ATPase จะมี

บทบาทในการเป็น H^+ pumps มากกว่าในเซลล์ส่วนใหญ่ V-ATPase นั้นจำเป็น และขาดไม่ได้สำหรับการเติบโตของพืชในสภาวะปกติเพราะจะมีบทบาทในการขนส่งพลังงาน การรักษาสมดุลภายในเซลล์ ภายใต้อิทธิพลจากความเค็ม ความแห้งแล้ง ความหนาวเย็น ความเป็นกรด และโลหะหนักที่อยู่ในดินเซลล์พืชที่อุดรได้จะขึ้นอยู่กับการรักษากิจกรรมของ V-ATPase (Dietz *et al.*, 2001)

3.2 ยีนทนเค็ม

Shi and Zhu (2002) ได้รายงานว่ายีน *Arabidopsis thaliana AtNHX1* ซึ่งแปลรหัสเป็น vacuolar Na^+/H^+ antiporter ซึ่งมีความสำคัญต่อการทนเค็มของพืช และยีน *AtNHX1* จะถูกควบคุมการแสดงออกโดยความเครียดจากเกลือ และ abscisic acid (ABA) ผลจากงานทดลองแสดงให้เห็นถึงการควบคุมแสดงออกของยีน *AtNHX1* เมื่อทดสอบกับ NaCl, KCl หรือ ABA และจากการตรวจสอบการแสดงออกด้วยยีน GUS พบว่ามีการแสดงออกของยีน *AtNHX1* ทุกๆเนื้อเยื่อ ยกเว้นปลายราก (root tip) การแสดงออกของยีน GUS พบอย่างมากที่เซลล์ขนรากทำให้รู้ว่าการแสดงออกของยีน *AtNHX1* มาก และ *AtNHX1* มีบทบาทในการเก็บสะสม Na^+ ใน vacuole ขนาดใหญ่ที่ขนรากด้วย

Fukuda *et al.* (1999) ได้ทำการแยก cDNA clone ของข้าวจนได้ลำดับกรดอะมิโนที่สมบูรณ์ซึ่งมีความคล้ายกันกับ Na^+/H^+ antiporter exchanger ใน *Saccharomyces cerevisiae* คือ NHX1 ลำดับเบสนี้มีขนาดยาว 2330 bp มีบริเวณที่เป็น open reading frame อยู่ 1608 bp และ พบว่าการแสดงออกของยีนนี้เพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ภายใต้ความเครียดจากสภาวะทนเค็ม โดยระดับการแสดงออกของยีนจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมากในยอดมากกว่าในราก ผลของงานทดลองทำให้ได้ยีนใหม่ คือยีน *OsNHX1* ที่มีบทบาทสำคัญในการทนเค็มของข้าว ซึ่งการแสดงออกของยีน *OsNHX1* ที่เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากการสะสมเกลือไว้ในเนื้อเยื่อยอดและเนื้อเยื่อราก ดังนั้นยีน *OsNHX1* จึงมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการแยกเกลือโซเดียมใน cytoplasm นำเข้าไปเก็บใน vacuole ของเนื้อเยื่อทั้งสองชนิด

Zorb *et al.* (2005) ได้ทำการแยกยีน และจำแนกยีน *ZmNHX1-6* ที่เป็น isoforms กันจำนวน 6 ยีน จากข้าวโพด (*Zea mays* L.) ยีนเหล่านี้ถอดรหัสได้กรดอะมิโนความยาว 538 – 545 ตัว และยังคงมีความคล้ายกันกับยีน *Arabidopsis thaliana AtNHX1* อยู่ 78 เปอร์เซ็นต์ คล้ายกับยีน

LeNHX1 ในมะเขือเทศ อยู่ 63 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดสอบโดยเลี้ยงในสภาพที่มีเกลือความเข้มข้น 1 – 100 mM และตรวจสอบวิเคราะห์ด้วย Real-time PCR พบว่า ยีน *ZmNHX* มีการแสดงออกที่ราก แต่ไม่มีการแสดงออกที่ยอด โดยที่ความเข้มข้นเกลือ 100 mM มีการแสดงออกของ *ZmNHX* เพิ่มขึ้นถึง 13 เท่า

Kagami and Suzuki (2005) ได้ทำการแยกยีนจาก กุหลาบ (*Rosa hybrida*) คือ ยีน *RhNHX1* ซึ่งมีความ คล้ายกัน ใน Na^+/H^+ antiporter exchanger ใน *Saccharomyces cerevisiae* คือ NHX1 cDNA นี้มีความยาว 2080 bp มีบริเวณ open reading frame อยู่ 1632 bp ได้โปรตีนความยาว 543 amino acid และยีน *RhNHX1* ยังมีความคล้ายกันกับใน *Arabidopsis thaliana* *AtNHX1* อยู่ 74.1 เปอร์เซ็นต์ การทดลองการแสดงออกของยีน *RhNHX1* ใน yeast สายพันธุ์ *nhx1* mutant พบว่า ทำให้ yeast เจริญเติบโตบนอาหารที่มี hygromycin ได้ ในขณะที่ yeast สายพันธุ์ *nhx1* ปกติโตไม่ได้ นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *RhNHX1* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติม NaCl ทำให้ทราบว่าผลที่ได้จากยีน *RhNHX1* คือ Na^+/H^+ antiporter ในกุหลาบ

Bao-Yan *et al.* (2008) ทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *MsNHX1* ใน Alfalfa (*Medicago sativa*) พบว่า ยีน *MsNHX1* มีการแสดงออกได้เมื่ออยู่ในสภาวะปกติที่ไม่มีความเครียดจากเกลือ และเมื่อทำการทดสอบด้วยสภาวะความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 200 mmol/L เป็นระยะเวลา 0, 3, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง พบการแสดงออกของยีน *MsNHX1* ในใบเมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยมีการแสดงออกของยีน *MsNHX1* มากกว่า control แต่ในราก พบการแสดงออกมากกว่า control เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง การแสดงออกของยีน *MsNHX1* ในใบมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญมากกว่าในราก แสดงให้เห็นว่า ยีน *MsNHX1* มีบทบาทสำคัญในใบมากกว่าในรากเมื่ออยู่ในสภาวะความเค็ม

4. การปรับปรุงพืชทนเค็ม

Ohta *et al.* (2002) ได้ทดลองถ่ายยีนจากพืชทนเค็ม *Atriplex gmelini* คือ ยีน *AgNHX1* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ปลูก ผลที่ได้ทำให้ข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *AgNHX1* มีกิจกรรมของ Na^+/H^+ antiporter สูงกว่าเดิมถึง 8 เท่า สามารถอยู่รอดในสภาวะที่มีเกลือเข้มข้นถึง 300 mM NaCl ได้ 3 วัน ในขณะที่ wild type ทำไม่ได้ นี่แสดงให้เห็นว่า Na^+/H^+ antiporter gene ในข้าวสามารถทำให้พืชทนเค็มได้

ผลิตข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) ได้รับผลกระทบจากดินเค็มเป็นสาเหตุหลักเพราะ Na^+ ทำให้เกิดความเป็นพิษในเซลล์ ดังนั้นเพื่อที่จะเพิ่มผลผลิตของข้าวสาลีที่ปลูกบนดินเค็ม จึงได้มีการทดลองถ่ายยีน Na^+/H^+ antiporter *AtNHX1* จาก *Arabidopsis thaliana* เข้าไปในข้าวสาลี ข้าวสาลีที่ได้รับการถ่ายยีนมีการเพิ่มขึ้นของมวล และการเจริญเติบโต ในสภาพที่มีเกลือ ในแปลงทดลองข้าวสาลีที่ได้รับการถ่ายยีนมีผลผลิตเพิ่มขึ้น ได้จำนวนเมล็ด น้ำหนัก และขนาดของเมล็ด เพิ่มขึ้นในดินเค็มที่มีค่า EC 10.6 และ 13.7 dS/m นอกจากนี้ข้าวสาลีที่ได้รับการถ่ายยีนยังมีการสะสม Na^+ ที่ใบ ในระดับต่ำกว่าข้าวสาลีปกติ แต่มีการสะสม K^+ สูงกว่า ในสภาพที่มีเกลือ 100 และ 150 mM NaCl ผลสรุปแสดงให้เห็นว่าข้าวสาลีที่ทนเค็มมีการเพิ่มระดับการแสดงออกของ ยีน Na^+/H^+ antiporter (Xue *et al.*, 2004)

Wu *et al.* (2005) ได้มีการทดลองถ่ายยีน Na^+/H^+ antiporter *OsNHX1* จากข้าว เข้าไปใน ryegrass โดยใช้ *Agrobacterium* จากนั้นตรวจสอบโดย PCR และ Southern blot ว่าได้รับยีนหรือไม่ ผลจาก ryegrass ที่ได้รับการถ่ายยีนคือ พืชสามารถอยู่รอดในสภาพที่มีเกลือความเข้มข้น 350 mmol/l NaCl ได้ 10 สัปดาห์ ขณะที่ wild-type ดาย ใบของ ryegrass ที่ได้รับการถ่ายยีนมีการสะสม Na^+ , K^+ และ Proline ที่สูงมากกว่า control

Tian *et al.* (2006) ทำการเพิ่มการแสดงออกของยีน a vacuolar Na^+/H^+ antiporter (*AtNHX1*) เพื่อเพิ่มความสามารถในการทนเค็มของ transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) โดยใช้ CaMV35S promotor ซึ่งแสดงออกบนเวกเตอร์ pGreen0229 แล้วถ่ายยีนสู่เซลล์สในระยะ embryonic ด้วยวิธีการใช้ปืนยิงอนุภาค ทำให้ได้ transgenic plant มา 29 ต้น โดยต้น tall fescue ที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเข้มข้นของเกลือสูงถึง 200 mM ขณะที่ต้น tall fescue ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนถูกยับยั้งการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นเกลือ 100 mM

ความเค็มเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดความเครียด ซึ่งจะไปจำกัดปริมาณผลผลิตในพืช เพื่อที่สร้างหญ้าอาหารสัตว์ที่ทนเค็มได้ จึงมีการถ่ายยีนเข้าสู่หญ้า tall fescue ด้วยยีน a vacuolar Na^+/H^+ antiporter (*AtNHX1*) จาก *Arabidopsis thaliana* การเพิ่มการแสดงออกของยีน *AtNHX1* จะนำไปสู่การเพิ่มความทนเค็มให้กับ หญ้า tall fescue ที่ได้รับยีน และถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลาน ทำการวิเคราะห์โดยวิธี DNA gel blot และ การทำ RT-PCR เพื่อยืนยันว่ายีน *AtNHX1* มีการแสดงออกและ ถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูก T_1 และ รุ่นหลาน T_2 ซึ่ง transgenic lines นี้แสดงลักษณะภายนอก และมีผลผลิตไม่ต่างไปจากเดิม โดยพืชที่มียีน *AtNHX1* จะสามารถทนต่อเกลือที่ระดับ

ความเข้มข้น 200mM ได้มากกว่าต้นพืชชุดควบคุม พบว่ารากของพืช transgenic lines นั้นมีปริมาณโซเดียมมากกว่ารากของต้นพืชชุดควบคุม ขณะที่กิจกรรมของ Na^+/H^+ antiporter เพิ่มขึ้นใน tonoplast vesicles จากการศึกษพบว่า การสะสมโซเดียมใน vacuoles ของเซลล์ราก โดย Na^+/H^+ antiporter จะเป็นการลดความเป็นพิษจากเกลือซึ่งส่งผลให้พืชมีความทนเค็ม

หญ้า tall fescue นั้นมีความสำคัญในแง่ของการเป็นหญ้าอาหารสัตว์ในฤดูหนาวและเป็นหญ้าพื้นสนามกีฬา การปรับปรุงให้หญ้านี้มีความสามารถในการทนเค็มนั้นต้องอาศัยเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์มาช่วยเนื่องจากเป็นพืชที่ปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธี conventional breeding ได้ยาก จากการถ่ายยีน AtNHX1 เข้าสู่หญ้า tall fescue ทำให้เราได้หญ้าที่ทนต่อความเค็มได้มากขึ้น มีลักษณะที่เหมือนเดิม และยังถ่ายทอดยีนสู่รุ่นลูกหลานได้อีกด้วย ในการทดลองจึงทำการสร้างหญ้า tall fescue ทนเค็มโดยถ่ายยีน AtNHX1 เข้าไปจากนั้นจึงนำ T_0 ผสม wild type สร้างเป็นลูก T_1 และ T_2 ออกมาซึ่งมีอัตราส่วนการกระจายตัวของยีนใกล้เคียง 1:1

กลไกที่พืชป้องกันตัวจากความเค็มนั้นซับซ้อน แต่มีกลไกหนึ่ง คือ Na^+/H^+ exchanger ที่อยู่บริเวณ vacuolar membrane โดยจะทำหน้าที่ปั๊มไอออน Na^+ เข้ามาเก็บใน vacuole ซึ่งการทำงานจะเกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนปริมาณ proton ทำให้ antiporter ตัวนี้มีประสิทธิภาพในการลดความเป็นพิษจากเกลือใน cytoplasm ได้ การที่ T_2 มีกิจกรรมของ Na^+/H^+ antiporter เพิ่มขึ้นส่งผลให้ T_2 มีประสิทธิภาพในการทนเค็มได้ดีกว่า control ซึ่งพิสูจน์ได้ด้วยการที่เรา Overexpress ยีน AtNHX1 แล้วพบว่าจะทำให้เกิดการเก็บ Na^+ เข้าไปใน vacuole ของเซลล์รากมากขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มความทนเค็ม ในขณะที่ในเซลล์ของใบจะมีการสะสม Na^+ น้อยลงเมื่อเทียบกับ wild type ปริมาณ Na^+ ที่เก็บใน vacuole ในราก จำนวนมากนี้จะส่งผลทำให้การขนส่ง Na^+ ไปที่ใบของพืช transgenic มีน้อยลงจึงลดการเป็นพิษต่อพืชและทำให้พืชอยู่รอดได้ (Xia *et al.*, 2007)

Li *et al.* (2007) ทำ RT-PCR ได้ cDNA ที่มีลำดับเบสขนาด 2133 bp ซึ่งมีความคล้ายกับ ยีน AtNHX1 และ NHE ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ ยีน SsNHX1 ดังนั้นจึงได้มีความพยายามปรับปรุงความสามารถในการทนเค็มของต้น Arabidopsis ด้วยเพิ่มการแสดงออกของยีน SsNHX1 ที่ถ่ายเข้าไปในต้น Arabidopsis ผลคือ สามารถเจริญเติบโตได้อย่างเป็นปกติ และมีวงจรชีวิตที่สมบูรณ์ ภายใต้สภาวะความเข้มข้นเกลือ 200 mM ขณะที่ wild-type มีการเจริญเติบโตที่ช้าและผิดปกติ

Verma *et al.* (2007) ได้ทำการโคลนยีน a vacuolar Na^+/H^+ antiporter จากต้น *Pennisetum glaucum* (PgNHX1) ซึ่งพบว่า เมื่อนำยีน PgNHX1 ที่ได้รับการเพิ่มการแสดงออกมาถ่ายยีนสู่ต้นข้าวด้วยวิธีการใช้ *Agrobacterium* LBA4404 แล้วทำให้ ต้นข้าวมีความสามารถในการทนเค็มเพิ่มสูงขึ้น โดยที่ระดับความเข้มข้นเกลือ 150 mM ต้นข้าวสามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติ มีการติดเมล็ด และมีการพัฒนาระบบรากได้เป็นอย่างดี ในขณะที่ระดับความเข้มข้นเกลือเดียวกัน ต้นข้าว wild-type มีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ

Zhou *et al.* (2007) ทำการศึกษาผลของการถ่ายยีน betaine synthesis (BADH) และ a vacuolar Na^+/H^+ antiporter (NHX1) สู่ต้นยาสูบ (Tobacco) โดยถ่ายยีนทั้งสองแยกกันและร่วมกันทำให้ได้ Transgenic tobacco 3 ชนิด พบว่า ที่สภาวะความเข้มข้นของเกลือ 200 mM ต้น Transgenic tobacco ที่ได้รับยีนถ่ายยีนทั้ง 2 ชนิดร่วมกันมีการสะสม betaine และ Na^+ มากกว่า ต้น wild-type โดย Transgenic tobacco มีกิจกรรมการสังเคราะห์แสง และมีการเพิ่มของแรงดันออสโมติกมากกว่า ต้น wild-type เมื่ออยู่ในสภาวะที่ความเข้มข้นของเกลือเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ Transgenic tobacco ที่ได้รับการถ่ายยีนร่วมกันทั้งสองชนิดยังมีการสะสมน้ำหนักได้มากกว่า Transgenic tobacco ที่ได้รับการถ่ายยีนชนิดเดียว

Bao-Yan *et al.* (2008) ทำการแยก Full length cDNA จากต้น Alfalfa (*Medicago sativa*) หรือ ยีน MsNHX1 โดยการทำให้ RT-PCR พบว่า การแปลรหัสของยีน MsNHX1 ถูกควบคุมในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง นอกจากนี้การแสดงออกของยีน MsNHX1 ในเชื้อยีสนั้นพบว่า ยีน MsNHX1 จะไปควบคุมลักษณะที่ไวต่อเกลือในเชื้อยีส ทำให้เชื้อยีสเจริญเติบโตได้ที่ความเข้มข้นเกลือ 50 mmol/L ซึ่งแสดงให้เห็นว่าของยีน MsNHX1 จากต้น Alfalfa มีการทำงานที่ดี ซึ่งเมื่อทำการถ่ายยีน MsNHX1 สู่ต้น Arabidopsis ก็ทำให้เพิ่มความสามารถในการทนเค็มได้ โดย Transgenic Arabidopsis สามารถงอกและเจริญเติบโตได้ที่ความเข้มข้นเกลือ 200 mmol/L ในขณะที่ wild type ตาย

Liu *et al.* (2010) ทำการศึกษาโดยเพิ่มการแสดงออกของยีน NHX1 ที่มาจากสิ่งมีชีวิต 5 ชนิด คือ ฝ้าย (*GhNHX1*), เชื้อยีส (*ScNHX1*) Arabidopsis (*AtNHX1*), ข้าวสาลี (*TaNHX1*) และ Suaeda salsa (*SsNHX1*) แล้วถ่ายยีนสู่ต้น Arabidopsis พบว่าต้น Transgenic Arabidopsis สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือ 200 mM และ สภาวะที่ขาดน้ำ ขณะที่ wild-type พบอาการใบเหลือง และ มีการเจริญเติบโตที่ไม่ดี ทำให้กิจกรรมการสังเคราะห์แสงของ

Transgenic Arabidopsis ทั้ง 5 ชนิดนี้มีสูงกว่า wild-type นอกจากนี้ใน Transgenic Arabidopsis ยังมีอัตราการคายน้ำต่ำกว่าต้น wild-type อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า Transgenic Arabidopsis มีการสะสม Na^+ และ K^+ ที่ใบมากกว่าใน wild-type แต่ความเป็นพิษที่เกิดจากการสะสมของปริมาณ Na^+ ถูกแก้ไขโดยการแยกไปเก็บไว้ใน vacuole ความสามารถในการทนเค็มของ Transgenic Arabidopsis ถูกถ่ายทอดสู่รุ่นลูกถึงรุ่น T_5 โดยการเพิ่มการแสดงออกของยีน NHX1s จากพืชใบเลี้ยงคู่แสดงความทนเค็มและทนแล้งมากกว่ายีน NHX1 ที่มาจากข้าวสาลี

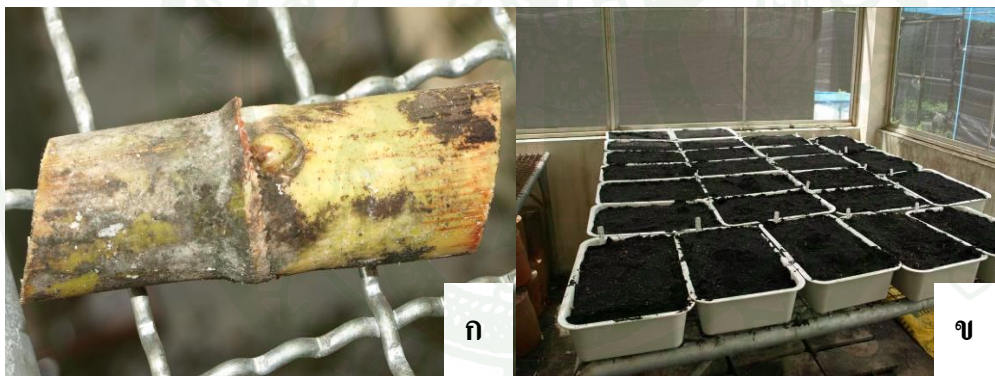


อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืช

อ้อย 4 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ K 84-200 พันธุ์ KPS 94-13 พันธุ์ สุพรรณบุรี 80 และ พันธุ์ LK 92-11 ได้รับตัวอย่างจากศูนย์วิจัย และพัฒนาอ้อยและน้ำตาล สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน นำตัวอย่างท่อนพันธุ์จากแปลงปลูกที่มีอายุ 10 เดือน และมีขนาดสม่ำเสมอ ปราศจากโรคแมลงมาตัดแบ่งท่อน ท่อนละ 1 ตา โดยคัดท่อนพันธุ์ที่มีตา อวบ สมบูรณ์ ปลูกท่อนพันธุ์ในภาชนะปลูกกระบะทรงสี่เหลี่ยม บรรจุด้วยดินผสมเกลบ โดยปลูกอ้อย จำนวน 6 ท่อนต่อ 1 กระบะ และต้องทำการกลบท่อนพันธุ์ไม่ให้ถูกแสงเพื่อการงอกที่ดี



ภาพที่ 2 (ก) ตัวอย่างท่อนพันธุ์อ้อยที่ใช้ศึกษา (ข) ภาชนะปลูกกระบะทรงสี่เหลี่ยม

เมื่อรดน้ำอย่างสม่ำเสมอตาอ้อยจะเริ่มงอกใน 1 สัปดาห์ ดังรูป 3(ก) ตาที่แตกออกมาจะเริ่มยืดยาวในสัปดาห์ที่ 2 ดังรูป 3(ข) จากนั้นอ้อยจะเริ่มแตกใบจริงในสัปดาห์ที่ 3 ดังรูป 3(ค) และเมื่อปลูกจนครบ 4 สัปดาห์ อ้อยจะมีใบจริงครบ 4 ใบ ดังรูป 3(ง)



ภาพที่ 3 การเจริญเติบโตของอ้อยในช่วงสัปดาห์ที่ 1-4 ตามลำดับ (ก-ง)

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

- Automatic pipette (Gilson)
- Balance 40SM200A (Precica)
- Balance BL 610 (Sartorius)
- Centrifuge bench top (Scientific promotion CO,LTD)
- Gel box mini-transilluminator (Bio-RAD)
- Fluor – STM Multilmager (BIO - RAD)
- GeneAmp PCR system No. 2400 (Perkin Elmer)
- High speed centrifuge GS-15R (Beckman)
- Horizontal electrophoresis GNA-100 (Pharmacia Biotech)
- Ice maker (Newton)
- Minitron Incubator shaker (Infors)
- Laminar air (Holten)
- Fume hood (Crumair)
- Liquid nitrogen tank (Tayler-Wharton)
- pH meter and electrode (Beckman)
- Power supply PowerPac 300 (Bio-RAD)
- UV-visible spectrophotometer Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech)

- Waterbath (Memmert)
- Magnetic stirrer (Bec Thai)

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีทั่วไป

- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Merck)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Merck)
- Sodium chloride (NaCl) (Merck)
- Sodium hydroxide (NaOH) (Merck)
- 2 – Mercaptoethanol (SIGMA)
- Disodium salt, dehydrate (Bio Basic Inc.)
- Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris-base) (Merck)
- Polyvinylpyrrolidone (PVP) (Merck)
- Potassium acetate (KCH_3CO_2) (Ajax)
- Bromophenol blue (J.T Baker)
- Xylene cyanol (J.T Baker)
- Glycerol (Pharmacia Biotech)
- Sodium acetate ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) (Ajax)
- Isopropanol (BDH)
- Ethanol (BDH)
- Agarose (Vivantis)
- Diethylpyrocarbonate (DEPC) (Sigma)
- Ampicillin
- X - Gal (5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl - β - D - galactoside) (Bio 101)
- IPTG (Isopropyl β - D - 1 - thiogalactopyranoside) (Bio 101)
- Yeast extract powder (Himedia Laboratories)
- Bacto TM tryptone (Himedia Laboratories)
- Agar (Ajax)

3.2 เอนไซม์และอื่นๆ

- DreamTaq™ DNA Polymerase (Fermentas)
- 100 bp. DNA Marker (Bio-labs)
- Lamda DNA/*Hind*III (Bio-labs)
- Competent cell (*Escherichia coli* JM109) (Promega)
- PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen)
- Aurum™ Total RNA Mini Kit (BIO-RAD)
- Deoxy nucleotide triphosphate (dNTPs) (Promega)
- DNase (Promega)
- Lysozyme (Amresco, Fluka)
- pGEM-T®easy vector (Promega)
- Reverse transcriptase (SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum®*Taq* DNA Polymerase)
- RNase A (Promega)

3.3 ไพรมเมอร์

- ไพรมเมอร์ NHXF1 5' TTCATCTACCTSCTSCCGCCGAT 3'
- ไพรมเมอร์ NHXR1 5' GCAGAAGAACACGGTSAGGATGC 3'
- ไพรมเมอร์ SoNHXF1 5' GCTCCCGCCGATCATATTTA 3'
- ไพรมเมอร์ SoNHXR1 5' GCAGAAGAACACGGTGAGGA 3'

4 โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับการประมวลผล

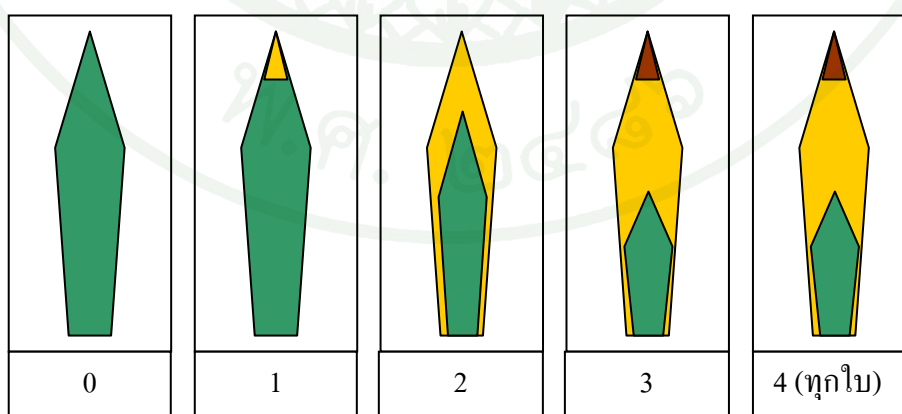
- โปรแกรม Primer 3 version 0.4.0 (<http://www.Frodo.ri.mit.edu/>)
- โปรแกรม NCBI ในการหาฐานข้อมูล (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- โปรแกรม ClustalW multiple sequence alignment version 2.1
(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)
- โปรแกรม DNAsis version 2.1 (Hitachi Software Engineering Co. Ltd.)

วิธีการ

1. การศึกษาการแสดงอาการของอ้อยเมื่ออยู่ในสภาวะความเค็มระดับต่างๆ

การสังเกตและบันทึกอาการของอ้อย

เมื่ออ้อยมีใบ 4 ใบ (อายุประมาณ 4 สัปดาห์) จึงนำอ้อยทั้ง 4 พันธุ์ มาทดสอบกับ สารละลายเกลือ(โซเดียมคลอไรด์) โดยทำการเทสารละลายเกลือจำนวน 1 ลิตร ลงในกระบะ โดยใช้ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 % w/v ตามลำดับ โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น เพื่อดูการแสดงอาการและการตอบสนองต่อสภาวะความเค็ม โดยสังเกต และจดบันทึกการตอบสนองของอ้อยเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์



ภาพที่ 4 การให้คะแนนการแสดงความรุนแรงของลักษณะอาการและการตอบสนองต่อสภาวะความเค็มของใบอ้อย คะแนน 0-4 ตามลำดับ

คะแนน 0 = ใบอ้อยทั้ง 4 ใบ มีสีเขียวปกติ

คะแนน 1 = ใบอ้อยเริ่มปรากฏสีเหลือง หรือแห้งที่ปลายใบเล็กน้อยในบางใบ

คะแนน 2 = ใบอ้อยปรากฏสีเหลืองที่แผ่นใบในบางใบ

คะแนน 3 = ใบอ้อยปรากฏสีเหลือง และเกิดการแห้งเหี่ยวที่ปลายใบ และแผ่นใบในบางใบ

คะแนน 4 = ใบอ้อยปรากฏสีเหลือง และเกิดการแห้งเหี่ยวที่ปลายใบ และแผ่นใบในทุกใบ

หลังจากทดสอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ แล้วจึงทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์โซเดียมในเนื้อเยื่อ และศึกษายีนทนเค็มต่อไป

2. การศึกษาการดูดซับปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในเนื้อเยื่ออ้อยที่อยู่ในสถานะทนเค็ม

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาได้แก่ อ้อยพันธุ์ K 84-200 พันธุ์ KPS 94-13 พันธุ์ สุพรรณบุรี 80 และพันธุ์ LK 92-11 โดยทดสอบอ้อยด้วยสภาวะที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ 0(control), 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 % (w/v) ตามลำดับ เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ แล้วจึงทำการเก็บตัวอย่างอ้อย โดยนำใบ และรากของอ้อยในแต่ละตัวอย่างมาอบแห้ง โดยนำมาวิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อของใบ และราก ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ด้วยวิธี Atomic spectroscopy

3. การศึกษาการแสดงออกของยีนทนเค็ม *SoNHX1* ในอ้อย

3.1 ตรวจสอบหา ยีน NHX1 ใน Genomic DNA ของอ้อย

3.1.1 สกัด Genomic DNA ของอ้อยด้วยวิธี Dellaporta (1983)

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอ้อยพันธุ์ K 84-200 ด้วยวิธีการของ Dellaporta *et al.* (1983) บดตัวอย่างพืช 0.1 g ในไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด นำตัวอย่างที่บดได้ใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 1.5 ml ที่เติม Extraction buffer (100 mM Tris - HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl และ 10 mM 2 - mercaptoethanol) และ 100 μ l ของ 20% SDS (Sodium dodecyl sulfate) ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติม 50 μ l ของ 5 M Potassium acetate บ่มในน้ำแข็งนาน 20 นาที นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (GS – 15R, Beckman) ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดส่วนใสให้หมด

centrifuge ขนาด 1.5 ml และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และนำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว สูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 75 % Ethanol นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตากตะกอนให้แห้งและละลายตะกอนด้วย TE buffer (50 mM Tris – HCl pH 8.0 และ 10 mM EDTA) ปริมาตร 50 μ l เมื่อตะกอนละลายให้นำตัวอย่างไปปั่นใน เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอด centrifuge ขนาด 1.5 ml และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 3M Sodium acetate และ Isopropanol บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างตะกอน ด้วย 75 % Ethanol นำตัวอย่างไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตากตะกอนให้แห้ง และละลายตะกอนด้วย TE buffer (50 mM Tris – HCl pH 8.0 และ 10 mM EDTA) ปริมาตร 50 μ l แยกดีเอ็นเอออกจากอาร์เอ็นเอบ่มด้วย RNase A (Promega) ความเข้มข้น 1 mg/ml ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3.1.2 การวัดความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอ็นเอ

วัดความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอ็นเอจากตัวอย่างอ้อยพันธุ์ K 84-200 โดยการวัดค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech) และวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอบน 1% Agarose gel ด้วยเครื่อง Horizontal electrophoresis GNA 100 (Pharmacia Biotech) ใช้กระแสไฟฟ้า 80 Voltage นาน 50 นาที

3.1.3 การทำปฏิกิริยาและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

การทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้คู่ไพรเมอร์ NHXF1 และ NHXR1 ซึ่งออกแบบจากฐานข้อมูลใน GenBank โดยการทำ Multiple alignment ยีน NHX1 จากพืชอื่น ด้วย โปรแกรม ClustalW multiple sequence alignment version 2.1 โดยใช้ข้อมูล

ลำดับกรดอะมิโนของ *Aeluropus littoralis* (AlNHX, AY825361), *Oryza sativa* (OsNHX1, BAA83337), *Triticum aestivum* (TaNHX1, AAK76738), *Phragmites australis* (PaNHX, BAD95562), *Hordeum vulgare* (HvNHX1, BAC56698), *Atriplex gmelini* (AgNHX1, BAB11940) และ *Arabidopsis thaliana* (AtNHX1, AAD16946) ทำปฏิกิริยา PCR ด้วยชุด DreamTaq™ DNA Polymerase (Fermentas) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 50 µl ซึ่งประกอบด้วย 10X DreamTaq™ Buffer, 2 mM Deoxynucleotide triphosphate, 10 pmol/µl forward primer, 10 pmol/µl reverse primer, 1.25 U Taq DNA polymerase (5 U/µl), ดีเอ็นเอ ต้นแบบที่สกัดจากตัวอย่างอ้อยพันธุ์ K 84-200 ความเข้มข้น 500 นาโนกรัม และเติมน้ำกลั่นหนึ่ง ฆ่าเชื้อ จนครบ ปริมาตรตามที่ต้องการ จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycle Model 2400 (Perkin Elmer) ดังนี้ Pre - denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ และ Denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วย Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที วิเคราะห์ผลที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง Horizontal electrophoresis GNA 100 (Pharmacia Biotech) โดยการทำ gel electrophoresis บน 1.5% Agarose gel กระแสไฟฟ้า 100 Voltage นาน 50 นาที

3.2 ตรวจสอบการแสดงออกและระดับการแสดงออกของยีน NHX1 ในอ้อย

3.2.1 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน NHX1 ในอ้อย

ก. ตัวอย่างอ้อยที่ใช้ในการศึกษา

อ้อยพันธุ์ K 84-200 ที่มีใบ 4 ใบ (อายุ 4 สัปดาห์) นำมาทดสอบกับ สารละลายเกลือ (โซเดียมคลอไรด์) โดยทำการแช่รากอ้อยที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0, 1.0 และ 2.0 % (w/v) ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างใบและรากอ้อย สำหรับ สกัด RNA เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน NHX1 ในอ้อย

ข. การเตรียมตัวอย่าง total RNA ด้วยวิธี PureLink™ Plant RNA Reagent

นำใบ และรากอ้อยพันธุ์ K 84-200 มาชั่งน้ำหนักตัวอย่างละ 0.15 g บดด้วย liquid nitrogen ในโกร่งให้เป็นผงละเอียดคั่วอย่างไ้ส่หลอดที่มี PureLink™ Plant RNA Reagent 0.5 ml บ่ม ณ อุณหภูมิห้อง 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 20,000 x g (12,300 rpm) (Rotor F2402H, Beckman GS-15R) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที คือด่วนใส่หลอดใหม่ เติม 5 M NaCl ปริมาตร 100 µl พลิกหลอดกลับไปมา เติม chloroform ปริมาตร 500 µl 10 นาที บ่ม ณ อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 20,000 x g (12,300 rpm) (Rotor F2402H, Beckman GS-15R) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที คือด่วนใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol 500 µl บ่ม อุณหภูมิห้อง 10 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,770 x g (8,700 rpm) (Rotor F2402H, Beckman GS-15R) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และล้างตะกอนด้วย 70 % (v/v) ethanol 1 ml ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,770 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แล้วเทส่วนใสออก ตากตะกอนให้แห้ง ละลายด้วยน้ำที่ treated ด้วย DEPC ปริมาตร 50 µl กำจัดดีเอ็นเอโดยเติม 0.5 U DNase (1 U/µl) บ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เติม stop buffer 1 µl บ่ม 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และเติม 5 U RNasin (40 U/µl) ตรวจสอบคุณภาพ และความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer และวิเคราะห์ผลบน 1 % (w/v) agarose gel electrophoresis

ก. ศึกษาการแสดงออกของยีน NHX1 ด้วยเทคนิค Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase)

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.2.1 มาทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วย ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน NHX1 คือ ไพรเมอร์ NHXF1 และ NHXR1 โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา RT-PCR ในปริมาตร 50 µl ซึ่งประกอบด้วย 2x Reaction Mix, primer forward และ primer reverse อย่างละ (10 pmol) และ 4 U Platinum® Taq DNA Polymerase (2 U/µl) ใช้สารละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ 1 µg เติมน้ำที่ treated ด้วย DEPC ให้ได้ปริมาตร 50 µl โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler (Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400) ตั้งโปรแกรมให้ initial denature ที่ 60 องศาเซลเซียส 30 นาที และ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส 55 วินาที extension ที่ 68 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 40 รอบ แล้วต่อด้วย extension ที่ 68 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ วิเคราะห์ผลผลิตภัณฑ์ของ RT-PCR บน 1.0 % (w/v) agarose gel

ง. การโคลนผลิตภัณฑ์ RT-PCR

ตัดชิ้นเจลของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน NHX1 ที่ได้จากข้อ 3.2.1ค โดยเลือกแถบที่มีขนาดตรงตามที่ออกแบบไว้ มาทำ gene clean ด้วย PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) วิเคราะห์ผลผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ทำ Gene clean แล้ว บน 1.0 % (w/v) agarose gel จากนั้นการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับพลาสมิด pGEM – T[®] Easy Vector (Promega) โดยนำ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ปริมาตร 3 µl เติม 2X Rapid Ligation Buffer 5 µl, T4 DNA ligase 1 µl และ pGEM – T[®] Easy Vector 1 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และ ใช้เทคนิค heat shock transformation (Sambrook *et al.*, 1989) เพื่อส่งถ่าย recombinant plasmid เข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 (Promega) โดยนำส่วนผสมพลาสมิด pGEM – T[®] Easy Vector (Promega) ปริมาตร 5 µl บ่มรวมกับ competent cell ปริมาตร 50 µl ในหลอด centrifuge ขนาด 1.5 ml แช่ในอ่างน้ำแข็ง นาน 30 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งทันที นาน 2 นาที ก่อนเติมอาหาร LB (10 g/L. Bactotryptone, 15 g/L. Yeast extract powder และ 15 g/L. NaCl) 1 ml นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่อง Minitron Incubator Shaker (Infors, Switzerland) ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง นำเชื้อไปเลี้ยงโดย spread plate บนอาหารแข็ง LA (10 g/L. Bactotryptone, 15 g/L. Yeast extract powder, 15 g/L. NaCl และ 10 g/L. Bactoagar) ที่เติมแอมพิซิลิน 100 µg/µl, 2% X-gal (v/v) (5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl - β -D - galactoside) ใน dimethylformamide 40 µl และ 100 mM IPTG (Isopropyl β -D - 1 - thiogalactopyranoside) 20 µl นำไปบ่มใน Incubator (EHRET) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง

จ. การคัดเลือกโคโลนีที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย

คัดเลือกโคโลนีที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย คือ โคโลนีสีขาวที่สามารถเจริญได้ในอาหารแข็ง LA ที่เติมแอมพิซิลิน นำมาเลี้ยงในอาหาร LB ที่มี 0.2 mg/ml. Ampicilin ทำการบ่มใน Minitron Incubator Shaker (Infors, switzerland) ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 - 18 ชั่วโมง

ฉ. สกัด recombinant plasmid ให้บริสุทธิ์

ดูดเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร LB จากข้อ 3.2.1 จำนวน 1.5 ml มาปั่นเหวี่ยง 3,000 rpm. (Rotor F2402H, Beckman GS-15R) 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายเซลล์ ด้วย lysozyme buffer; solution I [8 % (w/v) glucose, 100 mM.Tris, pH 8.0, 10 mM. EDTA และ 50 µg/ml. lysozyme] 100 µl จากนั้นละลายเซลล์ แล้วเติม solution II [0.1 % (w/v) SDS, 0.2 NaOH] 200 µl บ่ม 37 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วเติม solution III [3.75 M. Potassium acetate, 2 M. Potassium acetate] 200 µl กลับหลอดแช่น้ำแข็ง ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm. 4 องศาเซลเซียส 15 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เติมน้ำ Isopropanol 800 µl ตั้งไว้อุณหภูมิห้อง 5 นาที ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm. 4 องศาเซลเซียส 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70 % (v/v) Ethanol 1 ml. ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm. 4 องศาเซลเซียส 10 นาที ตากตะกอนแล้วละลายด้วย TE buffer 50 µl จากนั้นกำจัดอาร์เอ็นเอโดยเติม 1 mg/ml ของ Rnase A (Promega) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่สกัดได้ โดยการวิเคราะห์บน gel electrophoresis และตรวจสอบว่า recombinant plasmid มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมาย สอดแทรกอยู่ โดยตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (Bio Labs) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี gel electrophoresis

ช. การหาลำดับดีเอ็นเอ โดยวิธี automated sequencing

การหาลำดับเบสของ recombinant plasmid จากการโคลนผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากข้อ 3.2.1 โดยส่งห้องปฏิบัติการ First Base Laboratories ประเทศมาเลเซีย ซึ่งการหาลำดับเบส ด้วยวิธี dye terminator ที่ติดฉลาก nucleotide แล้ว นำมาแยกขนาดโดย gel electrophoresis ใน 12 % (w/v) polyacrylamide gel ตรวจสอบโดยใช้ fluorescence detector อ่านผล gel นำ sequence ที่ได้เปลี่ยนมาอยู่ในรูป Fasta file เพื่อนำลำดับเบสไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับข้อมูลกับฐานข้อมูล NCBI และเปรียบเทียบกับยีน NHX1 จากพืชอื่นที่ทราบลำดับเบสอยู่แล้ว เพื่อยืนยันว่า ผลิตภัณฑ์ RT-PCR เป็นยีนเป้าหมายที่ต้องการ โดยการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ BLASTN 2.2.25 และ ClustalW multiple sequence alignment version 2.1 เปรียบเทียบลำดับเบสจากยีนที่โคลนได้ เพื่อหาความเชื่อมั่นว่า DNA fragment เหมือนกับลำดับเบสที่เคยรายงาน

ซ. ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อยีน NHX1 ในอ้อย

นำลำดับเบสของ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากข้อ 3.2.1ซ มาใช้ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อยีน NHX1 ในอ้อย โดยใช้โปรแกรม Primer 3 version 0.4.0 คือ ไพรเมอร์ SoNHXF1 และ SoNHXR1

3.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพการแสดงออกของยีน NHX1 ในอ้อยพันธุ์ต่างๆ ด้วยวิธี RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

ก. ตัวอย่างอ้อยที่ใช้ในการศึกษา

อ้อยพันธุ์ K 84-200 พันธุ์ KPS 94-13 พันธุ์ สุพรรณบุรี 80 และ พันธุ์ LK 92-11 เมื่ออ้อยมีใบ 4 ใบ (อายุ 4 สัปดาห์) ทำการทดสอบอ้อยด้วยสภาวะที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% (w/v) ตามลำดับ เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ จากนั้นจึงทำการเก็บตัวอย่างใบอ้อย เพื่อสกัด RNA สำหรับศึกษาประสิทธิภาพการแสดงออกของยีน NHX1

ข. การเตรียมตัวอย่าง total RNA ด้วยวิธี Aurum™ Total RNA Mini Kit

นำใบอ้อยข้อ 3.2.2ก ทั้ง 4 พันธุ์ มาชั่งน้ำหนักตัวอย่างละ 60 mg บดด้วย liquid nitrogen ในโกร่งให้เป็นผงละเอียดตัดตัวอย่างใส่หลอด เติม Lysis solution 700 µl พลิกกลับหลอดไปมา 1 นาทีให้ส่วนผสมเข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm 4 องศาเซลเซียส 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ แล้วเติม 70 % (v/v) Ethanol 700 µl พลิกกลับหลอดไปมา 1 นาทีให้ส่วนผสมเข้ากัน ไม่แยกชั้น ดูดส่วนผสมใส่หลอด RNA binding column ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm 4 องศาเซลเซียส 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างด้วย low stringency 700 µl ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm 4 องศาเซลเซียส 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง กำจัดดีเอ็นเอโดยเติม DnaseI solution 80 µl บ่ม 25 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เติม high stringency 700 µl ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm 4 องศาเซลเซียส 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างด้วย low stringency 700 µl อีกครั้ง ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm 4 องศาเซลเซียส 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm 4 องศาเซลเซียส 2 นาที เพื่อกำจัดของเหลวที่ตกค้าง ย้าย RNA binding column สู่หลอดใหม่ ละลาย RNA โดยเติม elute solution 40 µl บนเมมเบรน ของ RNA binding column ที่ทิ้งไว้ 5 นาที ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm 4 องศาเซลเซียส 2 นาที และเติม 5 U RNasin (40 U/µl) ตรวจสอบ

คุณภาพ และความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer และวิเคราะห์ผลบน 1 % (w/v) agarose gel electrophoresis

ค. ศึกษาการแสดงออกของยีน NHX1 ด้วยเทคนิค RT-PCR (SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase

ทำตามวิธีที่อธิบายไว้ในข้อ 3.2.1ค โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน SoNHX1 ในอ้อย คือ SoNHXF1 และ SoNHXR1 จากนั้น วิเคราะห์ผลบน 1 % (w/v) agarose gel

ผลและวิจารณ์

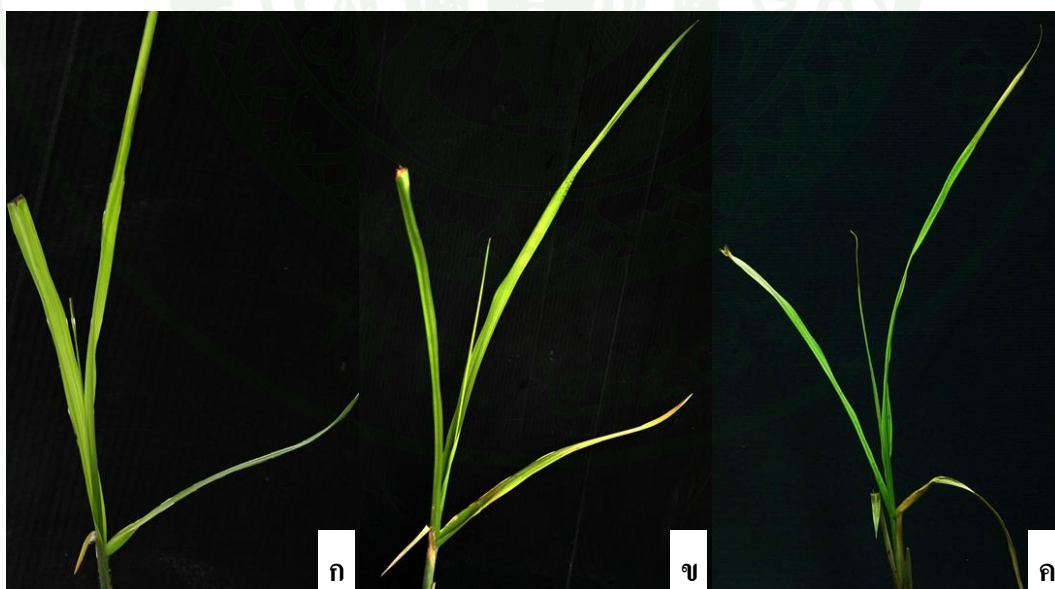
1. การแสดงอาการของอ้อยเมื่ออยู่ในสภาวะความเค็มระดับต่างๆ

พบว่า อ้อยพันธุ์ K 84-200, พันธุ์ KPS 94-13 และ พันธุ์ สุพรรณบุรี 80 ที่ทดสอบด้วยสารละลายเกลือ (โซเดียมคลอไรด์) เริ่มแสดงอาการใบเหลืองเมื่อเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ ทั้งนี้อาการและความรุนแรงจะต่างกันบ้างในทั้ง 3 พันธุ์ เมื่อเวลาผ่านไปอาการใบเหลืองจะค่อยเพิ่มมากขึ้นจนครบสัปดาห์ที่ 2 จะพบอาการใบเหลืองชัดเจน และจะพบอาการใบไหม้อีกด้วย โดยอาการใบเหลืองและใบไหม้จะสังเกตได้มากในตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงมากกว่าความเข้มข้นต่ำ อาการของ ใบเหลืองจะเริ่มเกิดจากปลายใบเข้าหาโคนใบ โดยในตัวอย่างที่ทดสอบด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.0 % (w/v) เมื่อครบ 2 สัปดาห์ อาการใบเหลืองกินจะพื้นที่เป็นครึ่งหนึ่งของใบ และมีอาการแห้งตายที่ปลายใบ หรือ อาจพบอาการใบเหลืองทั้งใบในบางใบได้ (ภาพที่ 5-7)

ส่วนในอ้อยพันธุ์ LK 92-11 ที่ทดสอบด้วยสารละลายเกลือ (โซเดียมคลอไรด์) จะเริ่มแสดงอาการใบเหลืองชัดเจนขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป เพียง 3 วัน และเมื่อเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ พบว่าในทุกใบมีอาการใบเหี่ยวแห้ง (ภาพที่ 8) โดยอาการใบเหลืองจะสังเกตได้ชัดเจนในตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงมากกว่าความเข้มข้นต่ำ อาการของใบเหลืองจะเริ่มจากปลายใบเข้าหาโคนใบ โดยในตัวอย่างที่ความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.0 % (w/v) แสดงอาการใบเหลืองเป็นพื้นที่ครึ่งหนึ่งของใบ และมีอาการแห้งตายเมื่อครบ 1 สัปดาห์ (ภาพที่ 8ค) เปรียบเทียบกับต้นก่อนทดสอบ (ภาพที่ 8ก)



ภาพที่ 5 อาการใบเหลืองของอ้อยพันธุ์ K 84-200 ตามระยะเวลาในการทดสอบสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.0 % (w/v) ก่อนทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (ก) หลังทดสอบ 1 สัปดาห์ (ข) และหลังทดสอบ 2 สัปดาห์ (ค)



ภาพที่ 6 อาการใบเหลืองของอ้อยพันธุ์ KPS 94-13 ตามระยะเวลาในการทดสอบสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.0 % (w/v) ก่อนทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (ก) หลังทดสอบ 1 สัปดาห์ (ข) และหลังทดสอบ 2 สัปดาห์ (ค)



ภาพที่ 7 อาการใบเหลืองของอ้อยพันธุ์ สุพรรณบุรี 80 ตามระยะเวลาในการทดสอบสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.0 % (w/v) ก่อนทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (ก) หลังทดสอบ 1 สัปดาห์ (ข) และ หลังทดสอบ 2 สัปดาห์ (ค)



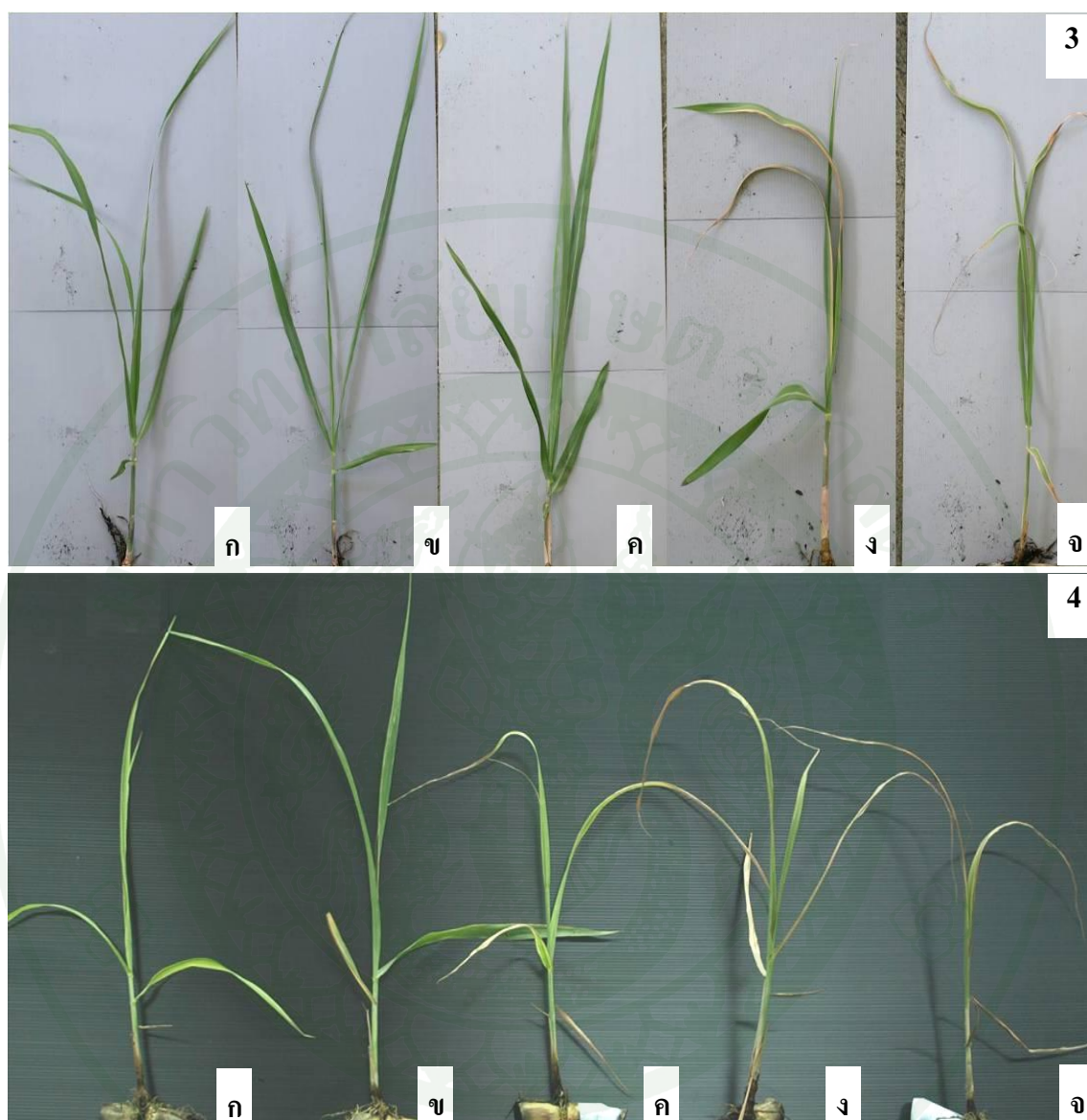
ภาพที่ 8 อาการใบเหลืองของอ้อยพันธุ์ LK 92-11 ตามระยะเวลาในการทดสอบสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.0 % (w/v) ก่อนทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (ก) หลังทดสอบ 3 วัน (ข) และ หลังทดสอบ 1 สัปดาห์ (ค)

เมื่อทดสอบอ้อยทั้ง 4 สายพันธุ์ ในสภาวะความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับ 0(control), 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 % (w/v) ตามลำดับ พบว่า อ้อยมีการตอบสนองต่างกัน เมื่อระดับความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้นอ้อยจะแสดงอาการใบเหลืองมากขึ้นตามลำดับ

และ พบอาการใบไหม้ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.5 และ 2.0 % (ภาพ 9งและ9จ) ขณะที่อ้อยที่ไม่ได้รับสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ไม่พบอาการใบเหลือง เกิดขึ้น (ภาพที่ 9ก) จากนั้นทำการให้คะแนนการตอบสนองของอ้อยต่อสภาวะความเข้มข้นเกลือ โซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆ ดังตารางที่ 1



ภาพที่ 9 เปรียบเทียบอาการใบเหลืองของอ้อยพันธุ์ K 84-200, KPS 94-13, สุพรรณบุรี 80 และ LK 92-11 (1-4) ตามลำดับ หลังทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ที่ความเข้มข้น 0(control), 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% (w/v) ตามลำดับ (ก-จ)



ภาพที่ 9 (ต่อ)

ตารางที่ 1 การให้คะแนนอาการของอ้อยในการทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

พันธุ์อ้อย	ระยะเวลา														
	สัปดาห์ 0					สัปดาห์ 1					สัปดาห์ 2				
	ความเข้มข้นเกลือ(%w/v)					ความเข้มข้นเกลือ(%w/v)					ความเข้มข้นเกลือ(%w/v)				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	0	0.5	1.0	1.5	2.0	0	0.5	1.0	1.5	2.0
K 84-200	0	0	0	0	0	0	1	1	2	3	0	1	2	3	4
KPS 94-13	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	0	2	2	3	3
สุพรรณบุรี 80	0	0	0	0	0	0	1	1	2	3	0	1	2	2	4
LK 92-11	0	0	0	0	0	0	2	3	4	4	-	-	-	-	-

คะแนน 0 = ใบอ้อยทั้ง 4 ใบ มีสีเขียวปกติ

คะแนน 1 = ใบอ้อยเริ่มปรากฏสีเหลืองหรือแห้งที่ปลายใบเล็กน้อยในบางใบ

คะแนน 2 = ใบอ้อยปรากฏสีเหลืองที่แผ่นใบในบางใบ

คะแนน 3 = ใบอ้อยปรากฏสีเหลืองและเกิดการแห้งเหี่ยวที่ปลายใบและแผ่นใบในบางใบ

คะแนน 4 = ใบอ้อยปรากฏสีเหลืองและเกิดการแห้งเหี่ยวที่ปลายใบและแผ่นใบในทุกใบ

จากการนำค่าคะแนนอาการของอ้อยที่ทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่า สัปดาห์ที่ 1 อ้อยพันธุ์ K 84-200 ที่ทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 กับ 1.0 % (w/v) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ขณะที่ตัวอย่างอื่นมีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนอ้อยพันธุ์ KPS 94-13 ที่ทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 กับ 0.5 % (w/v), 0.5 กับ 1.0 % (w/v) และ 1.5 กับ 2.0 % (w/v) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ตัวอย่าง 0 กับ 1.0 % (w/v) มีความแตกต่างกันทางสถิติ อ้อยพันธุ์ สุพรรณบุรี 80 ที่ทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 กับ 1.0 % (w/v) และ 1.5 กับ 2.0 % (w/v) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในอ้อยพันธุ์ LK 92-11 ที่ทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 กับ 1.0 % (w/v) และ 1.5 กับ 2.0 % (w/v) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การให้คะแนนอาการของอ้อยที่ทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น
ต่างๆกันในระยะเวลา 1 สัปดาห์

ความเข้มข้นสารละลาย โซเดียมคลอไรด์ (%w/v)	สายพันธุ์อ้อย			
	K 84-200	KPS 94-13	สุพรรณบุรี 80	LK 92-11
0 %	0.0d ^{1/}	0.0c	0.0c	0.0c
0.5 %	0.7c	0.7bc	1.0b	2.3b
1.0 %	1.0c	1.3b	1.3b	2.7b
1.5 %	2.0b	2.3a	2.3a	3.7a
2.0 %	2.7a	2.3a	2.7a	4.0a
<i>F</i> -test	*	*	*	*

^{1/} = ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรที่ไม่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยเปรียบเทียบแบบ Duncan's new multiple range test ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %

* = แตกต่างทางสถิติ อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ส่วนอาการในสัปดาห์ที่ 2 อ้อยพันธุ์ K 84-200 ที่ทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 กับ 0.5 % (w/v) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ขณะที่ตัวอย่างอื่นมีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนอ้อยพันธุ์ KPS 94-13 ที่ทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 กับ 1.0 % (w/v) และ 1.5 กับ 2.0 % (w/v) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อ้อยพันธุ์ สุพรรณบุรี 80 ที่ทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 กับ 1.0 % (w/v) และ 1.0 กับ 1.5 % (w/v) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ตัวอย่าง 0.5 กับ 1.5 % (w/v) มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การให้คะแนนอาการของอ้อยที่ทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น
ต่างกันในช่วงเวลา 2 สัปดาห์

ความเข้มข้นสารละลาย โซเดียมคลอไรด์ (%w/v)	สายพันธุ์อ้อย			
	K 84-200	KPS 94-13	สุพรรณบุรี 80	LK 92-11
0 %	0.0d ^{1/}	0.0c	0.0d	-
0.5 %	0.7d	1.7b	1.3c	-
1.0 %	1.7c	2.0b	1.7bc	-
1.5 %	2.7b	3.0a	2.3b	-
2.0 %	3.7a	3.3a	3.7a	-
F-test	*	*	*	-

^{1/} = ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรที่ไม่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยเปรียบเทียบแบบ Duncan's new multiple range test ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %

* = แตกต่างทางสถิติ อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

2. การดูดซับปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในเนื้อเยื่ออ้อยที่อยู่ในสภาวะทนเค็ม

เมื่อทดสอบอ้อยพันธุ์ K 84-200 ที่สภาวะความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆ ดังนี้ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% (w/v) ตามลำดับ ระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบปริมาณธาตุโซเดียมทั้งหมดในเนื้อเยื่อใบ และรากของอ้อยพันธุ์ K 84-200 ดังนี้ ปริมาณธาตุโซเดียมในใบเท่ากับ 69, 548, 1221, 1931, 1793 ppm ตามลำดับ ปริมาณธาตุโซเดียมในรากเท่ากับ 1600, 3644, 5806, 5488, 8714 ppm ตามลำดับ ส่วนอ้อยพันธุ์ KPS 94-13 พบปริมาณธาตุโซเดียมในใบเท่ากับ 123, 691, 576, 1306, 3935 ppm ตามลำดับ ปริมาณธาตุโซเดียมในรากเท่ากับ 1550, 5922, 6918, 9519, 12560 ppm ในพันธุ์ สุพรรณบุรี 80 ให้ผลทดสอบดังนี้ ปริมาณธาตุโซเดียมในใบเท่ากับ 108, 1021, 3423, 5026, 16390 ppm ตามลำดับ และ ปริมาณธาตุโซเดียมในรากเท่ากับ 732, 5582, 6040, 7636, 12096 ppm ตามลำดับ ในขณะที่พันธุ์ LK 92-11 ที่สภาวะความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆ ดังนี้ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 % (w/v) ตามลำดับ ระยะเวลา 1 สัปดาห์ พบปริมาณธาตุโซเดียมทั้งหมดในเนื้อเยื่อใบ และรากของอ้อยพันธุ์ LK 92-11 ดังนี้ ปริมาณธาตุโซเดียมในใบเท่ากับ 871, 942, 4139,

8765, 13949 ppm ตามลำดับ ปริมาณธาตุโซเดียมในรากเท่ากับ 2826, 12437, 15569, 18488, 30970 ppm ตามลำดับ (ตารางที่ 2 ,ภาพที่10)

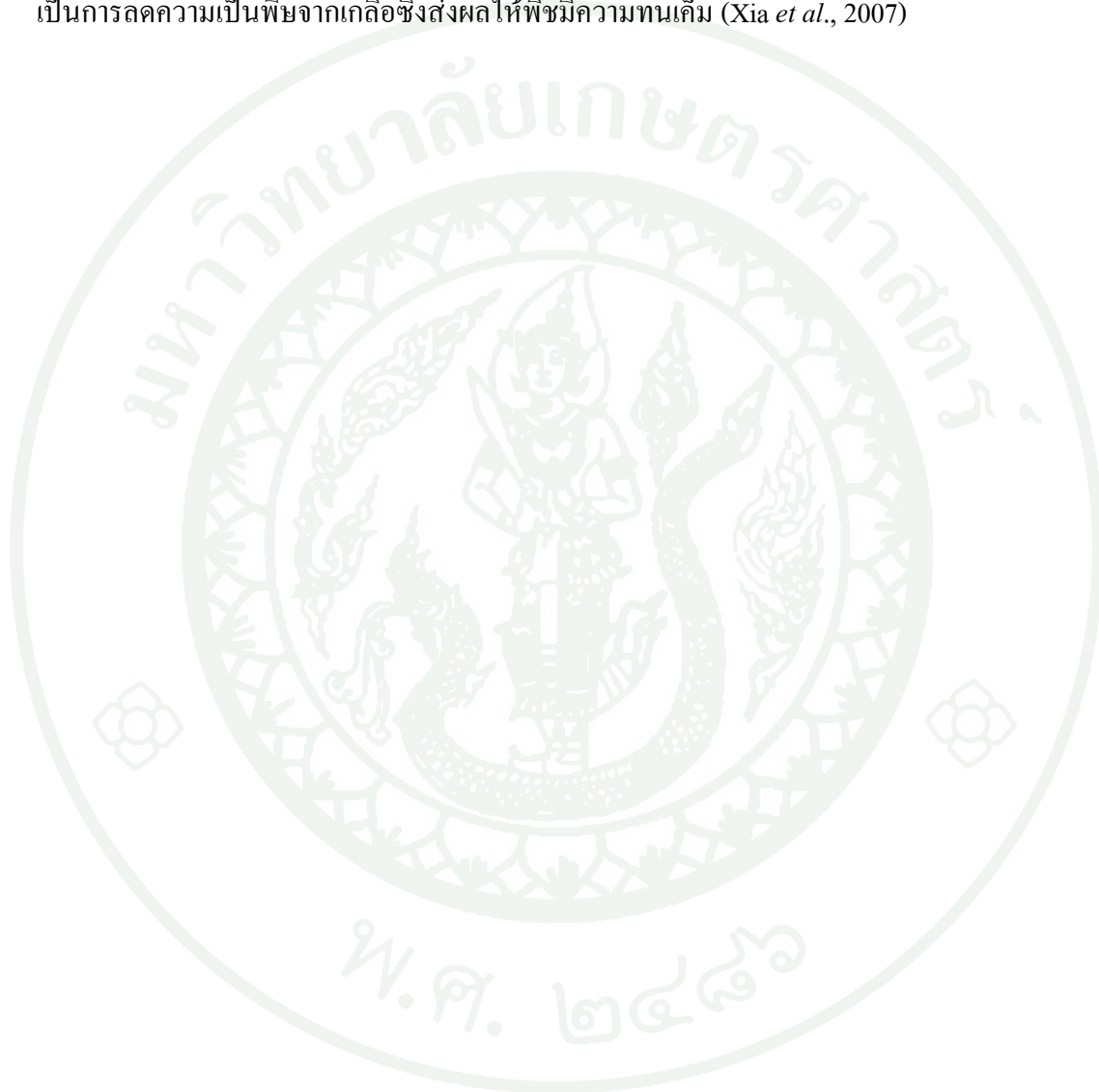
จากการทดสอบ พบว่าปริมาณธาตุโซเดียมที่สะสมในเนื้อเยื่อใบ และราก มีความสอดคล้องกันกับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้ทดสอบ โดยปริมาณการสะสมโซเดียมในเนื้อเยื่อมีมากขึ้นเมื่อใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ทดสอบมีความเข้มข้นสูงขึ้น ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในรากจะมีการสะสมมากกว่าใบของทั้ง 2 พันธุ์ ยกเว้นที่ความเข้มข้นเกลือ 2.0 % (w/v) พันธุ์ สุพรรณบุรี 80 มีการสะสมในใบสูงกว่าราก พบว่าในพันธุ์ สุพรรณบุรี 80 มีการสะสมโซเดียมในเนื้อเยื่อใบที่ความเข้มข้นเกลือ 2.0 % (w/v) มากกว่าพันธุ์อื่นๆ

ปริมาณการสะสมโซเดียมคลอไรด์ในรากจะมีการสะสมมากกว่าใบ ในทั้ง 4 พันธุ์ แต่ในพันธุ์ LK 92-11 มีการสะสมโซเดียมคลอไรด์ในราก และใบในปริมาณที่สูงกว่าพันธุ์อื่นอยู่มาก และมีอาการตอบสนองต่อเกลือมีมากกว่าพันธุ์อื่นๆ จากการให้คะแนน โดยมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรุนแรงหลังจากการทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นเกลือที่ 1.5 และ 2.0 % (w/v) ใบอ้อยมีอาการใบเหลืองอย่างชัดเจน ความเข้มข้นของโซเดียมที่สูงขึ้นจะเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อใบและส่วนต่างๆ ภายใน 1 สัปดาห์ แตกต่างจากในพันธุ์ K 84-200, KPS 94-13 และ สุพรรณบุรี 80 ซึ่งมีการสะสมโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณที่ต่ำกว่าพันธุ์ LK 92-11 อย่างชัดเจนทั้งในใบและราก และมีการตอบสนองต่อโซเดียมคลอไรด์น้อยกว่าพันธุ์ LK 92-11 โดยแสดงอาการอย่างรุนแรงเมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 2 ในความเข้มข้นเกลือที่ 2.0 % (w/v) ใบอ้อยมีอาการใบเหลืองอย่างชัดเจนทุกต้นทดสอบ และทุกพันธุ์

ซึ่งความเข้มข้นของโซเดียมที่สูงขึ้นจะเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อใบและส่วนต่างๆ ของพืชดังจะเห็นได้จากการที่พืชเกิดอาการใบเหลือง และแห้งตายในที่สุด (Frederick *et al.*, 2000) เนื่องจาก Na^+ มีความเป็นพิษมากกว่าไอออนอื่น โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการสร้างคลอโรฟิลล์ของอ้อยได้ (Joshi and Naik, 1980)

กลไกที่พืชป้องกันตัวจากความเค็มนั้นซับซ้อน แต่มีกลไกหนึ่ง คือ Na^+/H^+ exchanger ที่อยู่ในบริเวณ vacuolar membrane โดยจะทำหน้าที่ปั๊มไอออน Na^+ เข้ามาเก็บใน vacuole ซึ่งการทำงานจะเกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนปริมาณ proton ทำให้ antiporter ตัวนี้มีประสิทธิภาพในการลดความเป็นพิษจากเกลือใน cytoplasm ได้ โดยเมื่อทำการ Overexpress ยีน NHX1 พบว่าจะทำให้เกิดการ

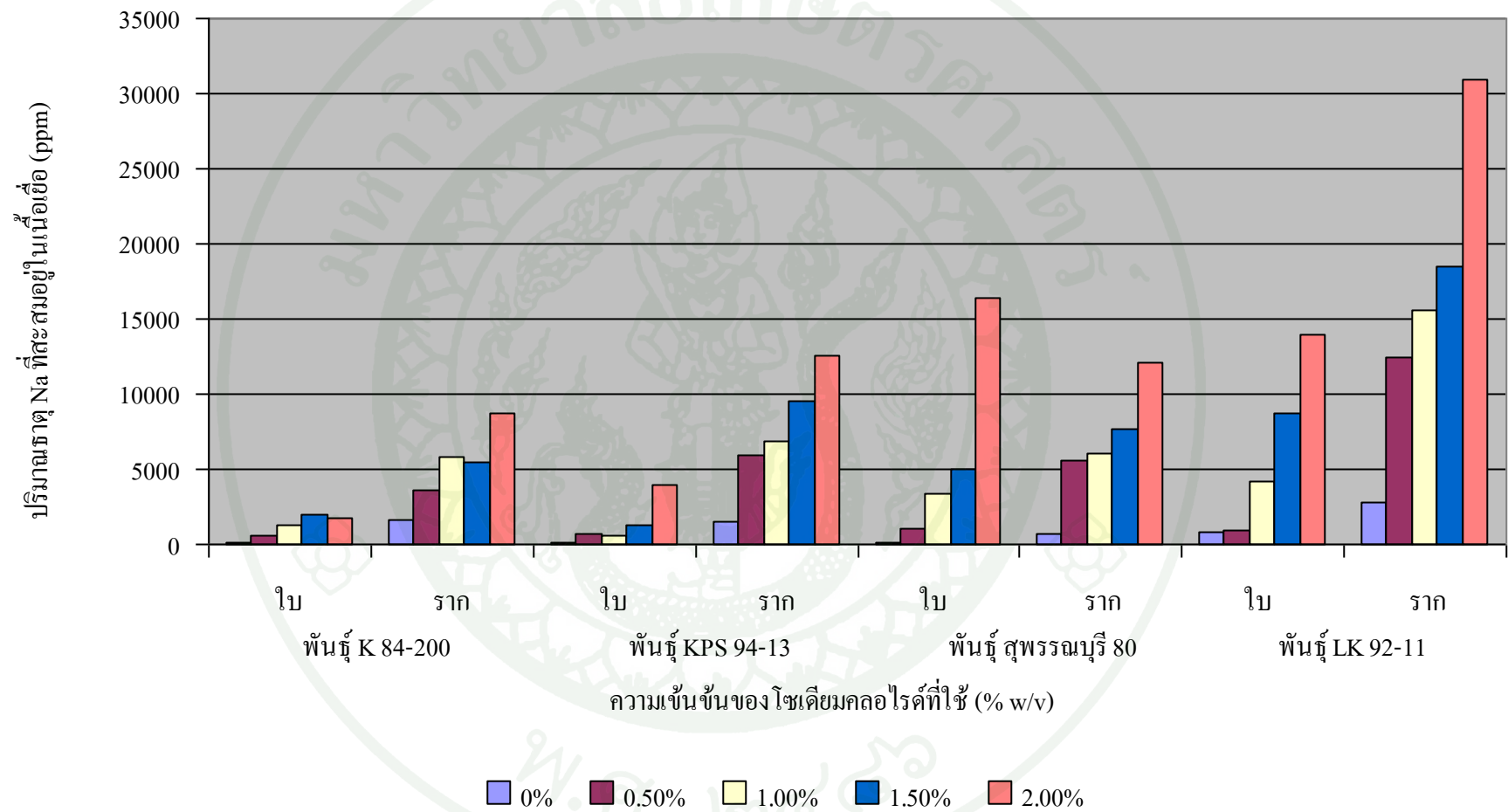
เก็บ Na^+ เข้าไปใน vacuole ของเซลล์รากมากขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มความทนเค็ม ในขณะที่ในเซลล์ของใบจะมีการสะสม Na^+ น้อยลงเมื่อเทียบกับ wild type ปริมาณ Na^+ ที่เก็บใน vacuole ในรากจำนวนมากนี้จะส่งผลทำให้การขนส่ง Na^+ ไปที่ใบของพืช transgenic มีน้อยลงจึงลดการเป็นพิษต่อพืชและทำให้พืชอยู่รอดได้ การสะสมโซเดียมใน vacuoles ของเซลล์ราก โดย Na^+/H^+ antiporter จะเป็นการลดความเป็นพิษจากเกลือซึ่งส่งผลให้พืชมีความทนเค็ม (Xia *et al.*, 2007)



ตารางที่ 4 ปริมาณธาตุโซเดียมในเนื้อเยื่อใบและรากของอ้อยพันธุ์ K 84-200 KPS 94-13 สุพรรณบุรี 80 และ LK 92-11 ที่ทดสอบในสภาวะความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆ ระยะเวลา 1 - 2 สัปดาห์

พันธุ์อ้อย	ปริมาณธาตุ Na ทั้งหมดในเนื้อเยื่อ (ppm)							
	K 84-200		KPS 94-13		สุพรรณบุรี 80		LK 92-11 ^{1/}	
ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้ทดสอบ(%w/v)	ใบ	ราก	ใบ	ราก	ใบ	ราก	ใบ	ราก
0%	69	1600	123	1550	108	732	871	2826
0.5%	548	3644	691	5922	1021	5582	942	12437
1.0%	1221	5806	576	6918	3423	6040	4139	15569
1.5%	1931	5488	1306	9519	5026	7636	8765	18488
2.0%	1793	8714	3935	12560	16390	12096	13949	30970

^{1/} = ตัวอย่างอ้อยพันธุ์ LK 92-11 ทำการทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์



ภาพที่ 10 แสดงปริมาณธาตุโซเดียมในเนื้อเยื่อใบและรากของอ้อย พันธุ์ K84-200, KPS94-13, สุพรรณบุรี 80 และ LK 92-11

จากการทดลองทำให้สามารถตรวจสอบอ้อยพันธุ์ทนเค็มอย่างง่าย ได้ด้วยวิธีการวัดการดูดซึมโซเดียมคลอไรด์ โดยพบว่า อ้อยพันธุ์ K 84-200 มีการดูดซึมเกลือ (ปริมาณโซเดียมคลอไรด์) ไว้ในเนื้อเยื่อ ใบและรากน้อยกว่าอ้อยพันธุ์ LK 92-11 ที่มีการดูดซึมเกลือมาก และเมื่อเปรียบเทียบกับอาการของพืชที่ปลูกในระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ระดับต่างๆ พบว่า พันธุ์ LK 92-11 ซึ่งมีการดูดซึมเกลือมากกว่าอ้อยพันธุ์ K 84-200, KPS 94-13 และ สุพรรณบุรี 80 ไม่สามารถเจริญและมีชีวิตรอดได้ในระดับความเค็มที่สูงขึ้น แสดงให้เห็นว่า พันธุ์ LK 92-11 มีความทนเค็มน้อยกว่า พันธุ์ K 84-200, KPS 94-13 และ สุพรรณบุรี 80 ซึ่งลักษณะอาการที่อ้อยแสดงออกสอดคล้องกับปริมาณเกลือที่ดูดซับไว้ จากการศึกษาทำให้สามารถนำไปใช้เพื่อเป็นวิธีการตรวจสอบความทนเค็มของอ้อยพันธุ์ต่างๆ ได้

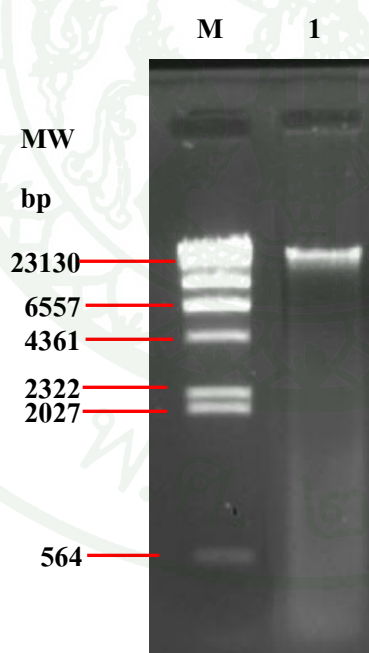
3. การแสดงออกของยีนทนเค็ม

3.1 ยีน NHX1 ใน Genomic DNA ของอ้อย

3.1.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของอ้อยพันธุ์ K 84-200 ด้วยวิธีการของ Dellaporta *et al.* (1983) ดังอธิบายวิธีการในการทดลองข้อ 3.1.1 สามารถสกัดดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นและมีคุณภาพในระดับที่ดี โดยการวิเคราะห์ผลด้วยวิธี gel electrophoresis (ภาพที่ 11)

พบว่าดีเอ็นเอจากตัวอย่างอ้อย มีคุณภาพดีมีความบริสุทธิ์ และไม่เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอมาก ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่สามารถนำไปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป ได้แก่การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยา PCR ได้เป็นอย่างดี ดังแสดงในภาพที่ 12

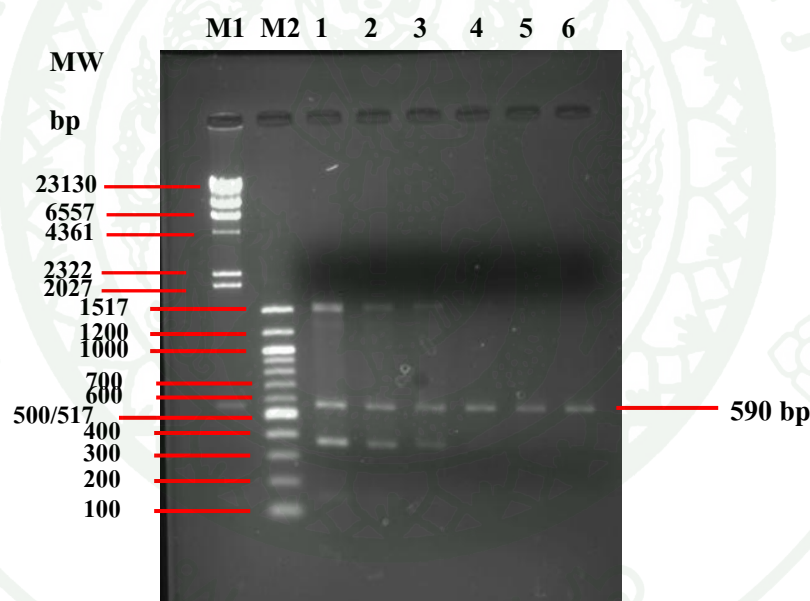


ภาพที่ 11 วิเคราะห์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างอ้อยพันธุ์ K 84-200 บน 1% (w/v) Agarose gel
 Lambda DNA – *Hind*III digest Marker (M) , ดีเอ็นเออ้อยพันธุ์ K 84-200 (1)
 ใช้กระแสไฟฟ้า 100 Voltage นาน 30 นาที ด้วยเครื่อง Electrophoresis

3.1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

การทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย (ตามวิธีการทดลองข้อ 3.1.3) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน NHX1 ได้แก่ ไพรเมอร์ NHXF1 และ NHXR1 ด้วยชุด DreamTaq™ DNA Polymerase (Fermentus)

จากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยอุณหภูมิ Annealing ต่างกันคือ 50, 52, 54, 56, 58 และ 60 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถทราบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ คือ 56 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 12 โดยขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการมีขนาดประมาณ 590 เบส



ภาพที่ 12 วิเคราะห์ PCR product จากดีเอ็นเออ้อยพันธุ์ K 84-200 บน

1.5% (w/v) Agarose gel

Lambda DNA – *Hind*III digest Marker (M1), 100 bp. DNA Ladder Marker (M2)

PCR product ที่เกิดจากไพรเมอร์ NHXF1/NHXR1 ซึ่งใช้อุณหภูมิ Annealing เท่ากับ 50, 52, 54, 56, 58 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (1-6)

ใช้กระแสไฟฟ้า 100 Voltage นาน 50 นาที ด้วยเครื่อง Electrophoresis

3.2 การแสดงออกและระดับการแสดงออกของยีน NHX1 ในอ้อย

3.2.1 การแสดงออกของยีน NHX1 ในอ้อย

ก. การสกัด total RNA

สกัด total RNA จากราก และใบของอ้อยพันธุ์ K 84-200 ที่ได้ทดสอบในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 1.0 และ 2.0 % (w/v) ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วย PureLink™ Plant RNA Reagent (ตามวิธีการทดลองข้อ 3.2.1.2) จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลบน 1 % (w/v) agarose gel ด้วยวิธี gel electrophoresis (ภาพที่ 13) และวัดค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ให้ค่าอัตราส่วนระหว่างค่า A260 และ A280 ของรากอ้อยที่ทดสอบในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 1.0 และ 2.0 % (w/v) เท่ากับ 1.925, 1.935 และ 1.812 ตามลำดับ ใบอ้อยที่ทดสอบในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 1.0 และ 2.0 % (w/v) เท่ากับ 1.972, 2.040 และ 2.062 ตามลำดับ

ข. ศึกษาการแสดงออกของยีน NHX1 จากใบและรากของอ้อยพันธุ์ K 84-200

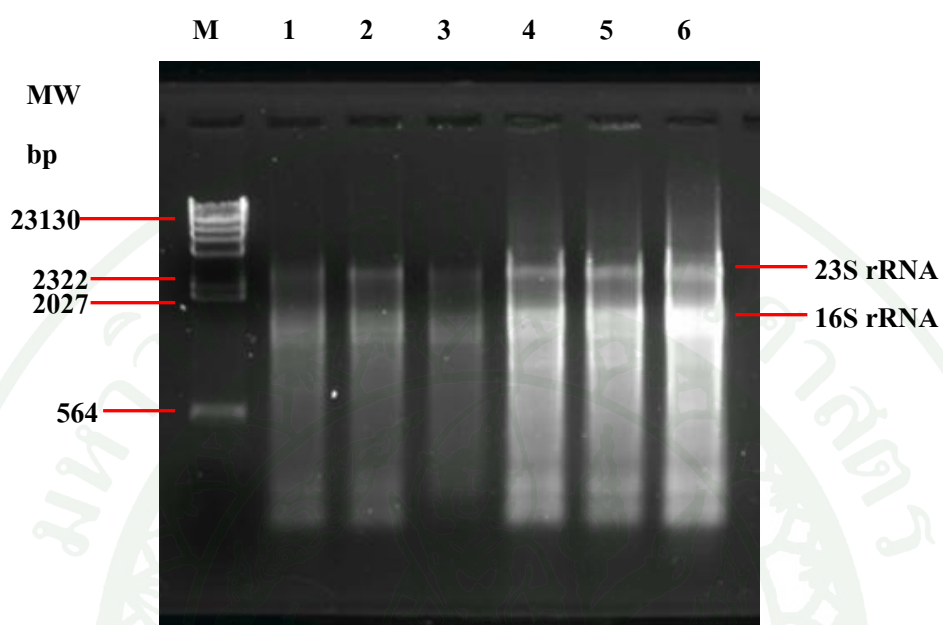
นำ total RNA ที่สกัดได้จากการทดลองข้อ 3.2.1.1 มาทำ RT-PCR ด้วย SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (invitrogen) โดยใช้ไพรเมอร์ NHXF1 และ NHXR1 และใช้ total RNA ความเข้มข้น 400 ng เท่ากันทุกตัวอย่างในการทำปฏิกิริยา ได้ RT-PCR Product ขนาดประมาณ 590 เบส ดังผลจาก ภาพที่ 14 โดยพบว่า ยีน NHX1 จากอ้อย มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อของใบอ้อยแต่ไม่พบในราก สอดคล้องกับการทดลองของ Bao-Yan *et al.*, (2008) ที่พบว่าการแสดงออกของยีน *MsMHX1* ในต้น Alfalfa มีการแสดงออกในใบเพิ่มขึ้นมากกว่าการแสดงออกในรากอย่างมีนัยสำคัญซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน *MsNHX1* มีบทบาทสำคัญในใบมากกว่ารากเมื่ออยู่ในสภาวะทนเค็ม นอกจากนี้ในการทดลองของ Fukuda *et al.*, (1999) พบว่า การแสดงออกของยีน *OsNHX1* ในข้าวเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ภายใต้ความเครียดจากสภาวะทนเค็ม โดยระดับการแสดงออกของยีนจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมากในยอดมากกว่าในราก จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ตำแหน่งการแสดงออกของยีน NHX1 ใน

เนื้อเยื่ออ้อยมีความสอดคล้องกับการแสดงออกในข้าว และ Alfalfa คือมีการแสดงออกในส่วน
ของเนื้อเยื่อใบ

ค. การโคลนดีเอ็นเอจาก RT-PCR product ของยีน NHX1 และการคัดเลือกลูก
positive clone ที่มี RT-PCR product โดยการตัดด้วย restriction enzyme

นำ RT-PCR Product ขนาดประมาณ 590 bp ที่ได้จากตัวอย่างใบอ้อยที่
ความเข้มข้นสารละลายเกลือ 1.0% (w/v) (ภาพที่ 14) มาแยกออกจากเจลให้บริสุทธิ์ด้วยชุดด้วย
PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) และทำการวิเคราะห์ผล RT-PCR Product ที่ทำ
Gene clean แล้ว บน 1.0 % (w/v) agarose gel (ภาพที่ 15)

นำชิ้น DNA ที่ผ่านการทำ Gene clean มาเชื่อมต่อกับ pGEM-Teasy Easy
vector (Promega) แล้วนำไปฝากถ่ายยีนเข้าสู่ competent cell *E. coli* JM109 (Promega) โดยใช้
เทคนิค heat shock transformation (Sambrook *et al.*, 1989) เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นนำมา spread
plate ที่มี X-GAL, IPTG และ Ampicilin บน plate ที่ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง ทำการเลือก
โคโลนีสีขาว และนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (LB) ที่มี ampicilin 0.2 mg./ml. แล้วเขย่าด้วย
incubator shaker ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เก็บเซลล์ที่เลี้ยงได้ มาแยก
recombinant plasmid ด้วยวิธี miniprep (Alkaline lysis) โดยใช้ lysozyme solution วิเคราะห์
ผลบน 1 % (w/v) agarose gel



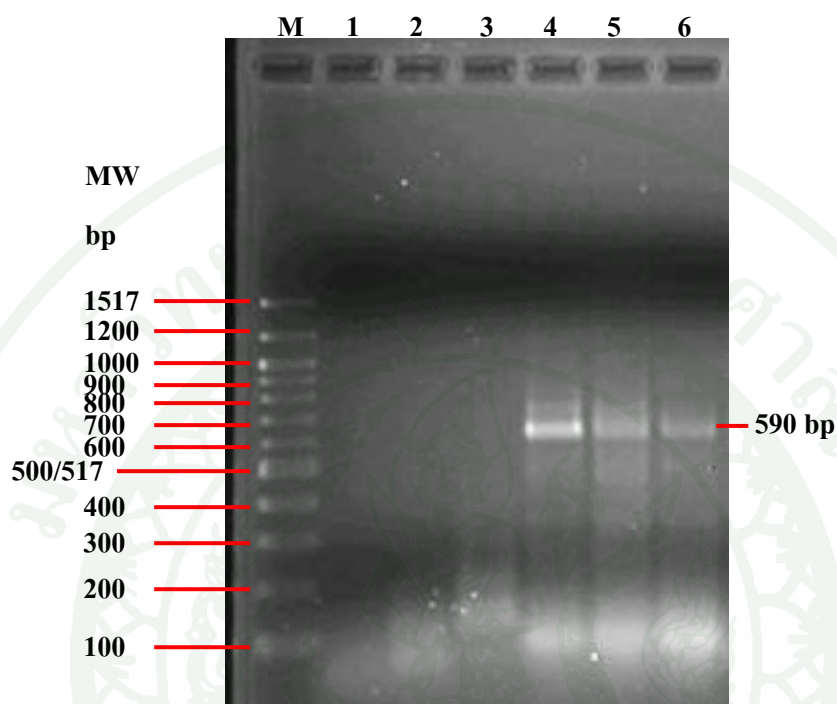
ภาพที่ 13 วิเคราะห์ผลการสกัด total RNA จากอ้อยพันธุ์ K 84-200 ที่ทดสอบด้วยระดับความเข้มข้นของเกลือต่างๆ บน 1% (w/v) Agarose gel

Lambda DNA – *Hind*III digest Marker (M)

total RNA ที่สกัดจากรากอ้อย ที่ความเข้มข้นของสารละลายเกลือ 0, 1.0, 2.0 % (w/v) (1-3)

total RNA ที่สกัดจากใบอ้อย ที่ความเข้มข้นของสารละลายเกลือ 0, 1.0, 2.0 % (w/v) (4-6)

ใช้กระแสไฟฟ้า 100 Voltage นาน 30 นาที ด้วยเครื่อง Electrophoresis



ภาพที่ 14 วิเคราะห์ผล RT-PCR Product ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือต่างๆบน 1.5% (w/v)

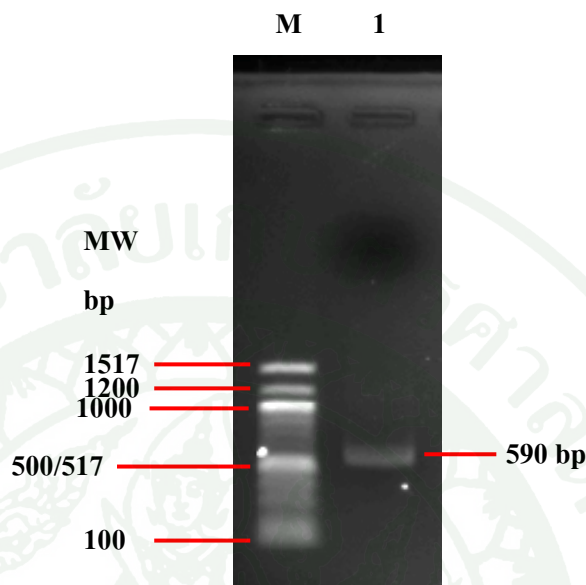
Agarose gel

100 bp DNA Ladder Marker (M)

RT-PCR Product จากตัวอย่าง total RNA รากอ้อย ที่ความเข้มข้นของสารละลายเกลือ
0, 1.0, 2.0 % (w/v) (1-3)

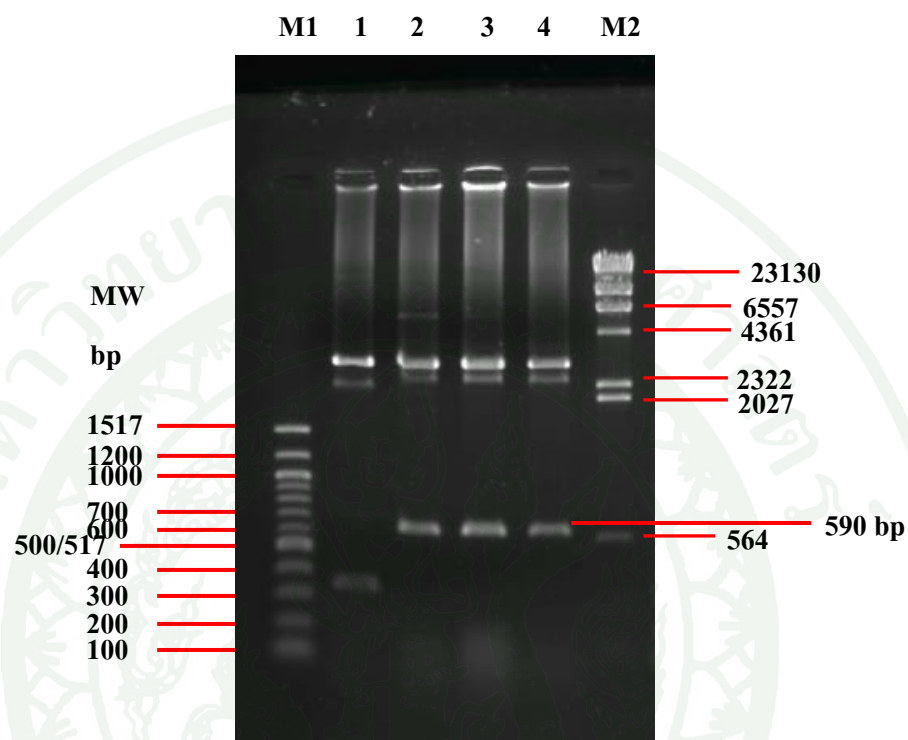
RT-PCR Product จากตัวอย่าง total RNA ใบอ้อย ที่ความเข้มข้นของสารละลายเกลือ
0, 1.0, 2.0 % (w/v) (4-6)

ใช้กระแสไฟฟ้า 100 Voltage นาน 50 นาที ด้วยเครื่อง Electrophoresis



ภาพที่ 15 RT-PCR Product ที่ทำ Gene Clean บน 1% (w/v) Agarose gel
 100 bp DNA Ladder Marker (M)
 RT-PCR Product ขนาดประมาณ 590 bp จากตัวอย่างใบอ้อยที่ความเข้มข้น
 สารละลายเกลือ 1.0% (w/v) (1)
 ใช้กระแสไฟฟ้า 100 Voltage นาน 50 นาที ด้วยเครื่อง Electrophoresis

พลาสมิดที่สกัดได้จะต้องนำมากำจัด RNA ออกก่อนด้วยเอนไซม์ RNaseA จากนั้นทำการ
 เลือกมาบางตัวอย่างมาตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* เพื่อวิเคราะห์ชิ้น DNA insert โดยวิเคราะห์ผลบน
 1 % (w/v) agarose gel (ภาพที่ 18) การตัดพลาสมิดเพื่อวิเคราะห์ชิ้น DNA insert ด้วยเอนไซม์
EcoRI เพื่อเลือก clone ที่มี insert ขนาดที่ถูกต้องคือ ประมาณ 590 เบส ก่อนจะนำ clone ที่เลือกไป
 ทำการหาลำดับเบส DNA ต่อไป



ภาพที่ 16 วิเคราะห์ชิ้น DNA จาก recombinant plasmid ที่ตัดด้วยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI
 Lambda DNA *Hind*III digest Marker (M1), 100 bp DNA Ladder Marker (M2)
 clone 4 ได้ชิ้น DNA ขนาด 350 bp (1)
 clone 5 ได้ชิ้น DNA ขนาด 590 bp (2)
 clone 8 ได้ชิ้น DNA ขนาด 590 bp (3)
 clone 10 ได้ชิ้น DNA ขนาด 590 bp (4)
 ใช้กระแสไฟฟ้า 100 Voltage นาน 50 นาที ด้วยเครื่อง Electrophoresis

ง. การหาลำดับเบสของ insert DNA ที่โคลนด้วย pGEM-Teasy vector ของ
ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่จำเพาะต่อยีน NHX1 ในอ้อย

นำ plasmid ที่สกัดได้จาก clone 10 ส่งไปหาลำดับเบสที่ห้องปฏิบัติการ First
Base Laboratories ประเทศมาเลเซีย ซึ่งทำการหาลำดับเบส ด้วยวิธี dye terminator ที่ติดฉลาก
nucleotide โดยลำดับเบสของ insert DNA ที่ได้จากการโคลน RT-PCR Product ที่จำเพาะต่อยีน
NHX1 จากตัวอย่าง clone 10 มีความยาว 591 เบส ดังภาพที่ 19

Locus 591 bp. DNA

A 131 bp. C 132 bp. G 127 bp. T 201 bp.

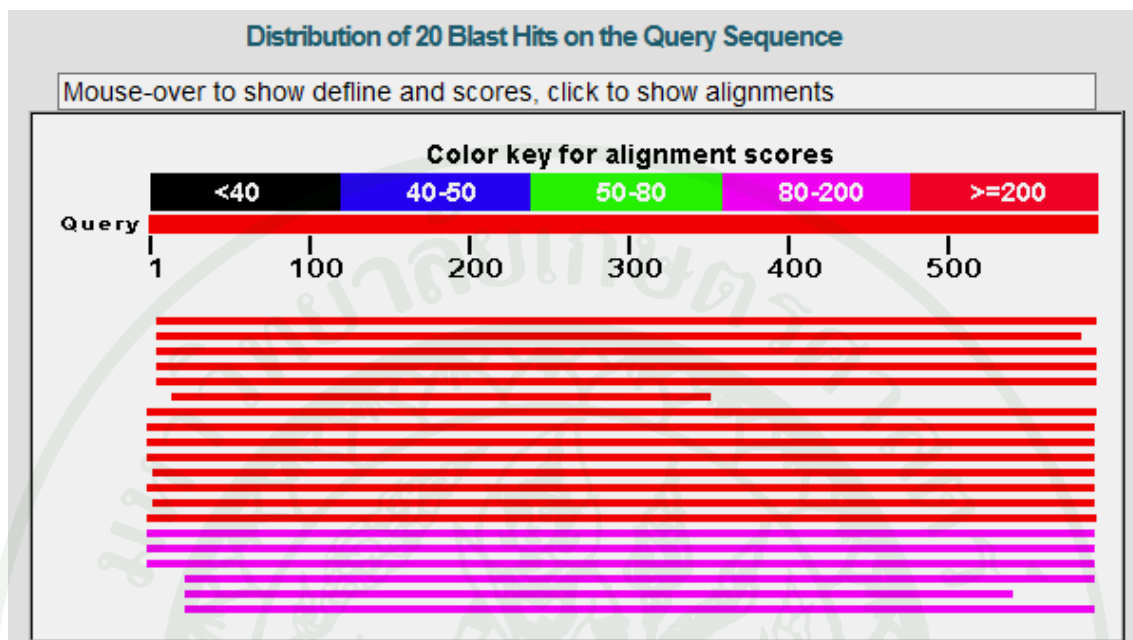
Base count

10	20	30	40	50	60
TTCATCTACC	TGCTCCCGCC	GATCATATTT	AATGCAGGCT	TCCAAGTGAA	GAAGAAACAG
70	80	90	100	110	120
TTCTTTTCGAA	ACTTCATTAC	TATTACACTG	TTTGGTGCAG	TTGGCACCTT	GATCTCTTTT
130	140	150	160	170	180
ACTGTGATAT	CCCTTGCGCG	TCTAGGACTA	GTATCAAGGC	TTAATATTGG	TGCACTTGAG
190	200	210	220	230	240
CTTGGAGACT	ATCTCGCACT	TGGGGCAATA	TTCTCGGCCA	CAGACTCGGT	TTGCACCTTG
250	260	270	280	290	300
CAGGTGTTAA	GCCAAGATGA	GACACCCTTC	TTGTACAGTC	TCGTGTTTGG	TGAAGGTGTT
310	320	330	340	350	360
GTCAATGACG	CAACTTCTGT	TGTGTTGTTC	AATGCAATCC	AGAACTTTGA	TCTTGGAGAT
370	380	390	400	410	420
ATCAGTGGTG	CCAAATTACT	GAACTTTATT	GGCAGTTTCC	TTTATCTGTT	CGGCACCAGC
430	440	450	460	470	480
ACCTTTCTTG	GAGTAGCTTC	TGGACTTCTT	AGTGCTTATA	TCATTAAGAA	GTTGTACTTT
490	500	510	520	530	540
GGCAGGCACT	CAACCGATCG	TGAAGTCTCC	ATCATGATGC	TAATGGCTTA	TTTATCTTAC
550	560	570	580	590	600
ATGCTAGCCG	AATTGCTTGA	TTTGAGTGGC	ATCCTCACCG	TGTTCTTCTG	C.....

ภาพที่ 17 ลำดับเบสของ *Sacharum officinarum* NHX1 (SoNHX1) ที่ได้จากการโคลน และ
จัดเรียงลำดับเบสดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม DNAsis version 2.1 ที่มีขนาดความยาว 591bp

จ. การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับเบสกับฐานข้อมูล GenBank

วิเคราะห์ลำดับเบสของ clone 10 ด้วยโปรแกรม BLASTN version 2.2.25 ผ่านระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ต โดยเลือกค้นหาความเหมือนกับฐานข้อมูลจีเอ็นเอ non-redundant ซึ่งผลวิเคราะห์ความเหมือน (Identity) จากลำดับเบสของ clone 10 ที่มีขนาด 591 เบส กับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTN version 2.2.25 พบว่าบางส่วนของ clone มีลำดับเบสเหมือน accession number ใน GenBank จากทั้งสองทิศทางทั้งหมด 20 หมายเลข ได้แก่ XM002451153.1, AY109416.1, BT084759.1, EU971537.1, NM001148643.1, NM001111751.1, DQ367852.1, AY184476.1, AY461512.1, DQ285410.1, AK359097.1, AY945806.1, DQ372061.1, AB531436.1, AK371136.1, AB089197.1, AY461511.1, AB033989.1, AB292774.1 และ AB054979.1 ตามลำดับ โดยจะแสดง alignment score เป็นจำนวนคะแนนสีต่างๆ (ภาพที่ 20) และแสดงรายละเอียดของ accession number ชื่อของสิ่งมีชีวิต จำนวนเบสทั้งหมด ทิศทางการเปรียบเทียบ เปอร์เซ็นต์ความเหมือน score bit และ E value (ตารางที่ 3) โดยจากข้อมูลในตารางที่ 3 พบว่า มีลำดับเบสจีเอ็นเอ 6 ตัวที่เป็นยีน NHX1 ได้แก่ NM001111751.1 (AY270036.1), AY184476.1, AY945806.1, AB531436.1, AB089197.1 และ AB292774.1 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (Identity) เท่ากับ 93, 87, 85, 75, 73 และ 72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยลำดับเบสของยีน NHX1 ที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของ clone 10 มากที่สุดคือ ยีน *Zea mays* Na⁺/H⁺ antiporter NHX1 (AY270036.1) มีผลคะแนนสีแดงและมีความเหมือน 93 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 18 การวิเคราะห์ความเหมือนโดยเปรียบเทียบลำดับเบสของ clone 10 กับ ฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTN 2.2.25

ตารางที่ 5 รายละเอียดฐานข้อมูล GeneBank ที่เหมือนกับลำดับเบสของ clone 10 จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTN version 2.2.25

Accession Number	Description	Lenth	Strand	Identity	Score (bits)	E value
XM002451153.1	<i>Sorghum bicolor</i> hypothetical protein, mRNA	2405	Plus / Plus	566/585 (97%)	976(528)	0.0
AY109416.1	<i>Zea mays</i> CL694_1 mRNA sequence	3272	Plus / Plus	548/576 (95%)	909(492)	0.0
BT084759.1	<i>Zea mays</i> full-length cDNA clone ZM_BFb0175J21 mRNA, complete cds	2667	Plus / Plus	556/585 (95%)	920(498)	0.0
EU971537.1	<i>Zea mays</i> clone 366774 sodium/hydrogen exchanger 2 mRNA, complete cds	1809	Plus / Plus	556/585 (95%)	920(498)	0.0
NM001148643.1	<i>Zea mays</i> hypothetical protein LOC100274279 (LOC100274279), mRNA >gb BT042669.1 <i>Zea mays</i> full-length cDNA clone ZM_BFc0006A02 mRNA, complete cds	1858	Plus / Plus	555/585 (95%)	915(495)	0.0
NM001111751.1	<i>Zea mays</i> Na ⁺ /H ⁺ antiporter NHX1 (NHX1), mRNA >gb AY270036.1 <i>Zea mays</i> Na ⁺ /H ⁺ antiporter NHX1 mRNA, complete cds	1623	Plus / Plus	313/337 (93%)	488(264)	2e-134
DQ367852.1	<i>Pennisetum glaucum</i> Na ⁺ /H ⁺ antiporter-like mRNA, complete sequence	1664	Plus / Plus	533/594 (90%)	754(408)	0.0
AY184476.1	<i>Hordeum brevisubulatum</i> Na ⁺ /H ⁺ antiporter (NHX1) mRNA, complete cds	1916	Plus / Plus	516/594 (87%)	658(356)	0.0

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Accession Number	Description	Lenth	Strand	Identity	Score (bits)	E value
AY461512.1	<i>Triticum aestivum</i> Na ⁺ /H ⁺ antiporter precursor mRNA, complete cds	1966	Plus / Plus	516/595 (87%)	652(353)	0.0
DQ285410.1	<i>Hordeum brevisubulatum</i> vacuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter mRNA, complete cds	1632	Plus / Plus	514/594 (86%)	647(350)	0.0
AK359097.1	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complete cds, clone: NIASHv1089F23	2206	Plus / Plus	510/592 (86%)	630(341)	3e-177
AY945806.1	<i>Schedonorus arundinaceus</i> Na ⁺ /H ⁺ antiporter (NHX1) mRNA, complete cds	1623	Plus / Plus	511/596 (85%)	619(335)	5e-174
DQ372061.1	<i>Hordeum vulgare</i> Na ⁺ /H ⁺ antiporter (NHX3) mRNA, complete cds	1794	Plus / Plus	507/598 (84%)	582(315)	7e-163
AB531436.1	<i>Salsola komarovii</i> SkNHX1 mRNA for sodium/proton antiporter, complete cds	2535	Plus / Plus	462/612 (75%)	261(141)	4e-66
AK371136.1	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complete cds, clone: NIASHv2126B22	2565	Plus / Plus	450/616 (73%)	171(92)	7e-39
AB089197.1	<i>Hordeum vulgare</i> HvNHX1 mRNA for sodium/proton antiporter, complete cds	2564	Plus / Plus	450/616 (73%)	171(92)	7e-39

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Accession Number	Description	Lenth	Strand	Identity	Score (bits)	E value
AY461511.1	<i>Hordeum vulgare</i> Na ⁺ /H ⁺ antiporter precursor mRNA, complete cds	2559	Plus / Plus	450/617(72%)	165(89)	3e-37
AB033989.1	<i>Ipomoea nil Purple</i> mRNA for Na ⁺ /H ⁺ exchanger, complete cds	2218	Plus / Plus	431/591 (72%)	159(86)	1e-35
AB292774.1	<i>Ipomoea tricolor nhx1</i> mRNA for Na ⁺ /H ⁺ antioprtter, complete cds	1674	Plus / Plus	392/538 (72%)	143(77)	1e-30
AB054979.1	<i>Ipomoea tricolor</i> ItNHX1 mRNA for Na ⁺ /H ⁺ exchanger, complete cds	2173	Plus / Plus	427/590 (72%)	143(77)	1e-30

เปรียบเทียบความเหมือนลำดับเบสดีเอ็นเอของ clone 10 กับลำดับเบสดีเอ็นเอของยีน NHX1 ในพืชชนิดอื่นจากฐานข้อมูลพันธุกรรมใน GenBank ได้แก่ *Arabidopsis thaliana* (AtNHX1, AF106324), *Zea mays* (ZmNHX1 AY270036.1), *Triticum aestivum* (TaNHX1, AY040246), *Oryza sativa* (OsNHX1, AB021878.1), *Hordeum vulgare* (HvNHX1, AB089197.1) และ *Atriplex gmelini* (AgNHX1, AB039492.1) วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม DNASIS version 2.1 (ภาพที่ 21) และทำการสร้างแผนภาพ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม ClustalW multiple sequence alignment version 2.1 (ภาพที่ 22) ซึ่งจากผลการเปรียบเทียบ พบว่า ลำดับเบสดีเอ็นเอของ clone 10 กับลำดับเบสดีเอ็นเอของยีน NHX1 ที่พบในพืชอื่นมีลำดับเบสที่ค่อนข้างเหมือนกัน ทำให้ทราบว่า RT-PCR Product จากอ้อยที่นำเอามาโคลนนั้นมีความจำเพาะต่อยีน NHX1

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอของ clone 10 ด้วยโปรแกรม BLASTN version 2.2.25 ผ่านระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ต พบว่า ยีน *Zea mays* Na⁺/H⁺ antiporter NHX1 (AY270036.1) มีความเหมือนกับลำดับเบสของ clone 10 มากที่สุด 93 เปอร์เซ็นต์ จึงนำมาทำการเปรียบเทียบลำดับเบสดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม DNASIS version 2.1 (ภาพที่ 23)

Clone10	-----TTCATCTACCT	11
ZmNHX1	TAGCCGGGGGGTGGTTATTACAGTCCTAGTCTTCTCCGAGGACCTCTTCTTCTCTATCT	266
AtNHX1	TAGTAAAGGAAAAAGCTCGCATCTTCTCGTCTTTAGTGAAGATCTTTTCTTCATATATCT	727
AgNHX1	TAGTGGAGGAAAAAGTTCACATCTTTTGGTCTTCAGTGAAGATCTTTTCTTCATATACCT	950
OsNHX1	GACCAAAGGGGAGAGCTCGCACTTATTCTGCTTTCAGTGAGGATCTTCTTCATCTACCT	559
HvNHX1	CACCAAAGGGGAGAGCTCGCACGTGCTCGTCTTCAGCGAGGACCTCTTCTTCATATACCT	664
TaNHX1	CACCAAAGGGGTGAACCTCGCGCATCCTTATCTTCAGCGAGGATATTTTCTTCATCTACTT	423
	*** ** *	
Clone10	GCTCCCGCCGATCATATTTAATGCAGGCTTCCAAGTGAAGAAGAAACAGTTCTTTTCGAAA	71
ZmNHX1	TTTGCCGCCGATCATTTTCAATGCAGGGTTCCAAGTGAAGAAGAAACAGTTCTTTTCGAAA	326
AtNHX1	TTTGCCACCCATTATATTCAATGCAGGGTTTCAAGTAAAAAGAAAGCAGTTTTCGCGAA	787
AgNHX1	TCTTCCACCGATTATATTCAATGCAGGCTTTCAGGTGAAGAAGAAAGCAGTTCTTCGCGAA	1010
OsNHX1	CCTCCCTCCGATCATCTTCAATGCAGGTTTTCAGGTAAAGAAAAAGCAATTCTTCGCGAA	619
HvNHX1	CCTCCCTCCCATCATCTTCAACGCCGGTTTCCAGGTGAGGAAGAAAGCAGTTCTTCGCGAA	724
TaNHX1	GCTCCCGCCCATCATTTTAAACGCCGGTTTCAAGTAAAGAAAAAGCAATTCTTCGCGAA	483
	* * * * *	
Clone10	CTTCATTACTATTACACTGTTTGGTGCAGTTGGCACCTTGATCTCTTTTACTGTGATATC	131
ZmNHX1	CTTCATTACTATTACACTGTTTGGTGCAGTTGGCACCTTGATCTCTTTTACTGTAATATC	386
AtNHX1	TTTCGTGACTATTATGCTTTTGGTGTCTTGGGACTATTATTTCTTGACAAATCATATC	847
AgNHX1	CTTCATTACTATTGTATTGTTGGAGCTGTGGTACATTGGTATCATTACCATCATATC	1070
OsNHX1	TTTCATGACGATCACATTATTGGAGCCGTGCGGACAATGATATCTTTTTCACAATATC	679
HvNHX1	TTTCATGACAATCACATCATTCGCGCTGTGCGGACGATGATTTTCATTCTTCACAATCTC	784
TaNHX1	CTTTGCGACAATTATTTTATTTGGTGTCTGGAACACTGATATCTTTGTAATAATCAC	543
	* * * * *	
Clone10	CCTTGGCGCTCTAGGACTAGTATCAAG--GCTTAATATTGGTGCCTTGAGCTTGGAGAC	189
ZmNHX1	CCTTGGCGCTCTAGGACTAATATCAAG--GCTTAATATCGGCGCACTTGAACCTGGGAGAC	444
AtNHX1	TCTAGGTGTAACACAGTT--CTTTAAGAAGTTGGACATTGGAACCTTTGACTTGGGTGAT	905
AgNHX1	TCTGGGAGCGTTGTCAAT--TTTAAAGAAATTGGATATTGGTACTCTGGAGTTGGCAGAC	1128
OsNHX1	TATTGCTGCCATTGCAATA--TTCAGCAGAATGAACATTGGAACGCTGGATGTAGGAGAT	737
HvNHX1	TCTTGTGCTGCCATTGCGATA--TTCAGCAAGATGAACATTGGGACACTGGATGTATCAGAT	842
TaNHX1	GTTGCGTGCTATGGGATTG--TTCAGCAAACTTGATGTTGGTCCACTCGAGCTTGGGGAC	601
	* * * * *	
Clone10	TATCTCGCACTTGGGGCAATATTCTCGGCCACAGACTCGGTTTGCACCTTGAGGTGTTA	249
ZmNHX1	TATCTTGCACCTTGGGGCAATATTCTCGGCCACAGACTCGGTTTGCACCTTGAGGTGTTA	504
AtNHX1	TATCTTGTCTATTGGTGCCATATTGCTGCAACAGATTAGTATGTACACTGCAGGTCTCTG	965
AgNHX1	TATCTTGCAAATTGGTGCAATATTCTGCTGCCACAGATTCTGTTTGCACACTGCAGGTCTCT	1188
OsNHX1	TTTCTTGCAAATTGGAGCCATCTTTCTGCGACAGATTCTGTCTGCACATTGCAGGTCTCTC	797
HvNHX1	TTTCTGCAATTGGAGCCATCTTTCCGCGACAGATTCTGCTGCACTTTACAGGTCTCTC	902
TaNHX1	TATCTTGCAAATTGGGGCTATCTTCTCAGCAACAGATTCTGTTTGCACCTTACAGGTGCTT	661
	* * * * *	
Clone10	AGCCAAGATGAGACACCTTCTTGTACAGTCTCGTGTGGTGAAGGTGTTGTCAATGAC	309
ZmNHX1	AGCCAAGATGAGACACCTTCTTGTACAGTCTTGTATTCTGGTGAAGGCGTGTCAACGAT	564
AtNHX1	AATCAAGACGAGACACCTTTGCTTTACAGTCTTGTATTCTGGAGAGGGTGTGTGAATGAT	1025
AgNHX1	AATCAGGATGAGACCCCTCTGCTCTACAGTCTGGTCTTTGGCGAGGGTGTGTGAATGAT	1248
OsNHX1	AATCAGGATGAGACACCTTTTTGTACAGTCTGGTATTCTGGTGAAGGTGTTGTGAACGAT	857
HvNHX1	AATCAGGACGAGACGCCCTTTCTGTACAGTCTAGTTTTCTGGGGAAGGTGTTGTGAACGAT	962
TaNHX1	AACCAGGATGAAGCACCCCTACTGTATAGTCTAGTTTTTGGTGAAGGTGTTGTGAATGAT	721
	* * * * *	

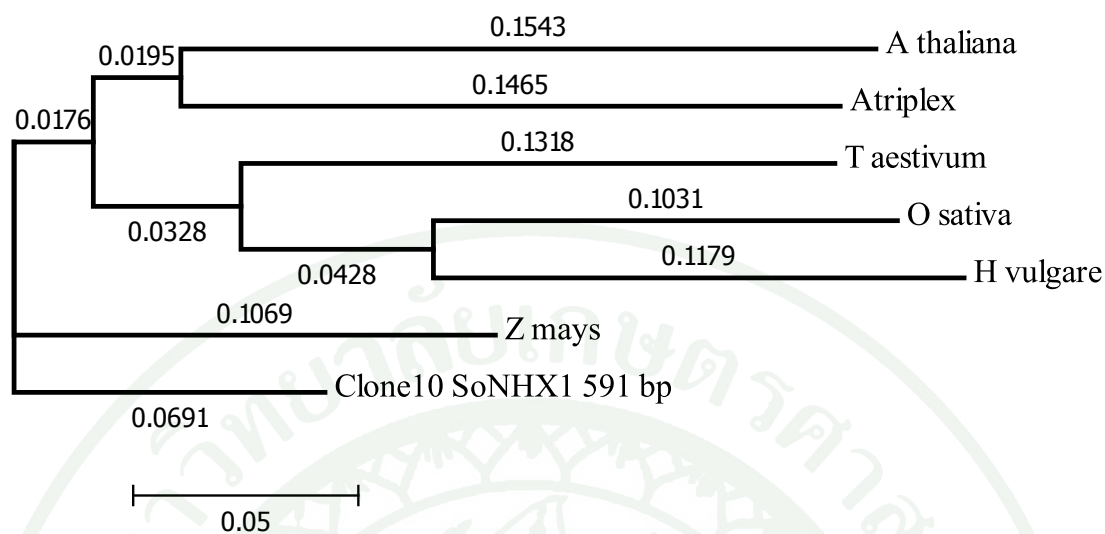
ภาพที่ 19 เปรียบเทียบลำดับเบสดีเอ็นเอของ clone 10 กับ ยีน NHX1 ใน *Arabidopsis thaliana* (*AtNHX1*, AF106324), *Zea mays* (*ZmNHX1* AY270036.1), *Triticum aestivum* (*TaNHX1*, AY040246), *Oryza sativa* (*OsNHX1*, AB021878.1), *Hordeum vulgare* (*HvNHX1*, AB089197.1) และ *Atriplex gmelini* (*AgNHX1*, AB039492.1)

```

Clone10      GCAACTTCTGTTGTGTTGTTCAATGCAATCCAGAACTTTGATCTTGGAGATATCAGTGGT 369
ZmNHX1       GCCACTTCCGTAGTGGTGTTCATGCACTCCAAAACCTTTGATATAACTCACATCGATGCG 624
AtNHX1       GCAACGTCAGTTGTGGTCTTCAACGCGATTGAGAGCTTTGATCTCACTCACCTAAACCAC 1085
AgNHX1       GCCACATCAGTGGTTCTTTTCAATGCAATTCAGAGCTTTGACCTCACAAGAATTGATCAC 1308
OsNHX1       GCTACATCAATTGTGCTTTTCAACGCACTACAGAACTTTGATCTTGTCCACATAGATGCG 917
HvNHX1       GCCACATCAGTCTGCTTTTCAACGCGCTCCAGAACTTCGATCCTAACCAAAATCGATGCA 1022
TaNHX1       GCTACATCAGTTGTGCTCTTCAATGCAATTCAAAACATTGATATTAATCATTTTGTATGTC 781
              ** ** ** * ** * ** ** ** * ** ** ** **
Clone10      GCCAAATTACTGAAC-TTtATT-GGCAGTTTCCTTTATCTGTTGCGGCACCAGCACCTTTC 427
ZmNHX1       G--AGGTTGTCTTCCATCTATTAGGAAACTTCTTCTACCTCTTCC-TTCTATCAACTGTG 681
AtNHX1       G--AAGCTGCTTTTCATCTTCTTGGAAACTTCTTGTATTTGTTTCTCCTAAGTACCTTGC 1143
AgNHX1       A--GAATAGCTTTACAATTTATGGGCAACTTCTTATATTTATTTATCGCAAGCAGGATA 1366
OsNHX1       GC--TGTCGTTCTGAAATTTCTTGGGAACTTCTTTTATTTATTTTGTGAGCACCTTCC 975
HvNHX1       AT--CGTCATTCTGAAGTTCTTGGGAAACTTCTGCTACTTATCCGTGTCAAGCACCTTCC 1080
TaNHX1       TT--CGTTCCTACTACAATTCATCGGAAATTCCTCTACCTATTCTTACCAGCACCGTTC 839
              * * * * * ** * * * * *
Clone10      TTGG-AGTAGCTTCTGGACTT--CTTAGTGCTTATATCATTAAAGAGTTGTACTTTGGCA 484
ZmNHX1       TTGGGAGTGGCCACAGGACTTATCTCAGCGTTAGTG--ATTAAAAAGCTATACTTTGGAC 739
AtNHX1       TTGG-TGCTGCAACCGGCTG--ATAAGTGCCTATGTTATCAAGAAGCTATACTTTGGAA 1200
AgNHX1       TTGG-AGCATTTACTGGCTTG--CTCAGTGCTTACATTATCAAAAAGCTGTACTTTGGAA 1423
OsNHX1       TTGG-AGTATTTGCTGGATTG--CTCAGTGCTATACATAATCAAGAAGCTATACATTGGAA 1032
HvNHX1       TTGG-AGTATTTTCTGGATTG--CTCAGTGCTATACATAATCAAGAAGTTATACATAGGAA 1137
TaNHX1       TTGG-AGTAGCTGCTGGGTTG--CTTAGTGCTATACATTATTAAGAACTTTGTTTGGCA 896
              *****
Clone10      GGCACCTCAACCGATCGTGAAGTCTCCATCATGATGCTAATGGCTTATTTATCTTACATGC 544
ZmNHX1       GGCACCTCTACTGACAGGGAGGTGGCTCTTATGATGCTTATGGCGTATCTCTCCTACATGT 799
AtNHX1       GGCACCTCAACTGACCGAGAGGTTGCCCTTATGATGCTTATGGCGTATCTTTCTTATATGC 1260
AgNHX1       GGCATTCCACTGATCGTGAGGTTGCTTTAATGATGCTTATGGCTTATCTATCTTACATGC 1483
OsNHX1       GGCATTCTACTGACCGTGAGGTTGCCCTTATGATGCTCATGGCTTACCTTTTCATATATGC 1092
HvNHX1       GGCATTCTACTGACCGTGAGGTTGTGCTTATGATGCTCATGGCTTACCTCTCATATATGC 1197
TaNHX1       GACACTCAACTGACAGAGAAGTTGCTATCATGATACTCATGGCATACCTTTCGTATATGC 956
              * * * * * ** * * * * *
Clone10      TAGCCGAATTGCTTGATTGAGTGGCATCCTCACC GTGTTCTTC---TGC----- 591
ZmNHX1       TGGCGGAACCTCTTCGCGCTGAGCGGGATCTTGACGGTATTCTTTGGGTGCATTGTTATGA 859
AtNHX1       TTGCTGAGCTTTTTCGACTTGAGCGGTATCCTCACTGTGTTTTCTGTGGTATTGTGATGT 1320
AgNHX1       TTGCTGAACCTTTTCTATTTGAGTGAATTCCTTACTGTATTCTTCTGTGGGATTGTCATGT 1543
OsNHX1       TGGCTGAGTTGCTAGATTGAGCGGCATTCTCACC GTATTCTTCTGTGGTATTGTAATGT 1152
HvNHX1       TAGCTGAGCTGCTTGATTGAGTGGCATCCTCACC GTTCTTCTGTGGTATTGTGATGT 1257
TaNHX1       TGTCAATGCTGCTGGATCTGAGTGGCATTCTAACC GTTCTTCTGTGGAATAGTAATGT 1016
              * * * * * *****

```

ภาพที่ 19 (ต่อ)



ภาพที่ 20 การวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของ clone 10 (SoNHX1) กับ ยีน NHX1 ใน *Arabidopsis thaliana* (AtNHX1, AF106324), *Zea mays* (ZmNHX1 AY270036.1), *Triticum aestivum* (TaNHX1, AY040246), *Oryza sativa* (OsNHX1, AB021878.1), *Hordeum vulgare* (HvNHX1, AB089197.1) และ *Atriplex gmelini* (AgNHX1, AB039492.1)

```

Clone10      -----+TTCATCTACCTGCTCCCGCCGATCATATTTAATGCAGGCTTCCAA 45
ZmNHX1      TCCGAGGACCTCTTCTTCTTCTATCTTTTGCCGCGATCATTTTCAATGCAGGGTTCCAA 300
              *** **
Clone10      GTGAAGAAGAAACAGTTCTTTTGAAACTTCATTACTATTACACTGTTTGGTGCACTTGGC 105
ZmNHX1      GTGAAGAAGAAACAGTTCTTTTGAAACTTCATTACTATTACACTGTTTGGTGCACTTGGC 360
              *****
Clone10      ACCTTGATCTCTTTTACTGTGATATCCCTTGGCGCTCTAGGACTAGTATCAAGGCTTAAT 165
ZmNHX1      ACCTTGATCTCTTTTACTGTAAATATCCCTTGGCGCTCTAGGACTAAATCAAGGCTTAAT 420
              *****
Clone10      ATTGGTGCACTTGAGCTTGGAGACTATCTCGCACTTGGGGCAATATTCTCGGCCACAGAC 225
ZmNHX1      ATCGGCGCACTTGAAGTGGGAGACTATCTTGCACTTGGGGCAATATTCTCGGCCACAGAC 480
              ** *
Clone10      TCGGTTTGCACTTGCAGGTGTTAAGCCAAGATGAGACACCCTTCTGTACAGTCTCGTG 285
ZmNHX1      TCGGTTTGCACTTGCAGGTGTTAAGCCAAGATGAGACACCATTCTGTACAGTCTTGTA 540
              *****
Clone10      TTTGGTGAAGGTGTTGTCAATGACGCAACTTCTGTTGTGTTGTTCAATGCAATCCAGAAC 345
ZmNHX1      TTCGGTGAAGGCGTGGTCAACGATGCCACTTCCGTAGTGGTGTTCATGCACTCCAAAC 600
              ** *
Clone10      TTTGATCTTGAGATATCAGTGGTGCCAAATTACTGAAC-TTTATT-GGCAGTTTCTTT 403
ZmNHX1      TTTGATATAACTCACATCGATGCGG--AGGTTGTCTTCCATCTATTAGGAACTTCTTCT 658
              *****
Clone10      ATCTGTTTCGGCACCAGCACCTTTCTTGG-AGTAGCTTCTGGACTT--CTTAGTGCTTATA 460
ZmNHX1      ACCTCTTCC-TTCTATCAACTGTGTTGGGAGTGGCCACAGGACTTATCTCAGCGTTAGTG 717
              * *
Clone10      TCATTAAGAAGTTGTACTTTGGCAGGCACTCAACCGATCGTGAAGTCTCCATCATGATGC 520
ZmNHX1      --ATTAAAAAGCTATACTTTGGACGGCACTCTACTGACAGGGAGGTGGCTCTTATGATGC 775
              *****
Clone10      TAATGGCTTATTTATCTTACATGCTAGCCGAATTGCTTGATTGAGTGGCATCCTCACCG 580
ZmNHX1      TTATGGCGTATCTCTCTACATGTTGGCGGAACCTTTCGCGCTGAGCGGGATCTTGACGG 835
              * *
Clone10      TGTTCCTC---TGC----- 591
ZmNHX1      TATTCTTTGGGTGCATTGTTATGAGCCACTATACATGGCACAACGTGACAGAGTCCAGCA 895
              * *

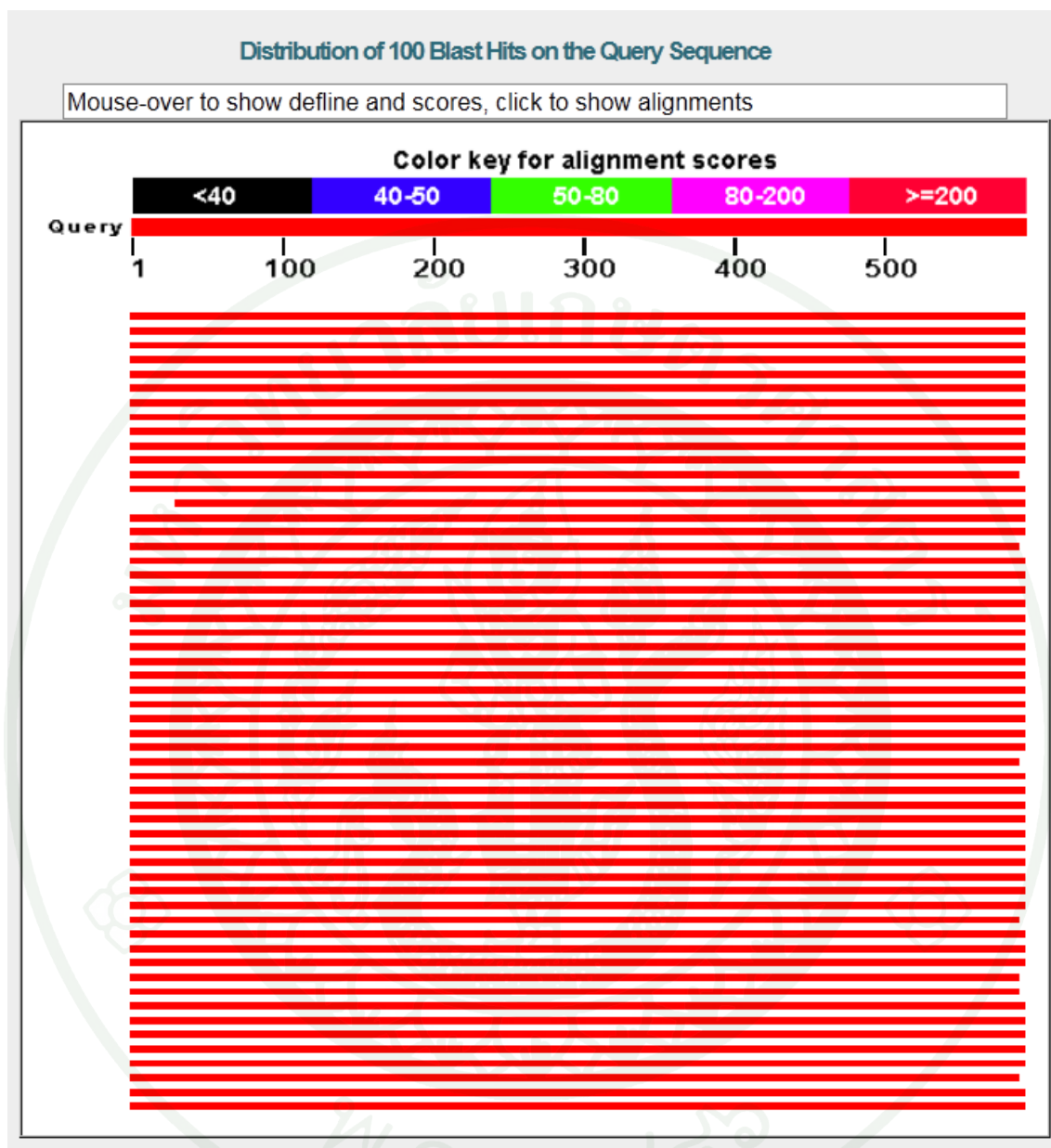
```

ภาพที่ 21 เปรียบเทียบลำดับเบสดีเอ็นเอของ clone 10 กับ ยีน NHX1 ใน *Zea mays* (ZmNHX1 AY270036.1),

จ. การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล GenBank

นำลำดับเบสดีเอ็นเอของ clone 10 มาวิเคราะห์ ด้วยโปรแกรม BLASTX version 2.2.25 ผ่านระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ต โดยโปรแกรมทำการแปรรหัสลำดับเบสดีเอ็นเอของ clone 10 ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน และวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ clone 10 โดยเลือกค้นหาคความเหมือนกับฐานข้อมูลโปรตีน non-redundant ซึ่งผลวิเคราะห์ความเหมือน (Identity) จากลำดับเบสของ clone 10 ที่มีขนาด 591 เบส กับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTX version 2.2.25 พบว่าบางส่วนของ clone มีลำดับเบสเหมือน accession number ใน GenBank ทั้งหมด 100 หมายเลข ได้แก่ XP_002451198.1, ACR35112.1, ACG43655.1, NP_001142115.1, AAO25547.1, BAJ90308.1, AAS17949.1, AAX45242.1, EEC83172.1, NP_001068371.1, ABB86294.1, NP_001105221.1, NP_001169551.1, EEE69477.1, ABY19311.2, ACZ97405.1, NP_001105224.1, NP_001060571.2, ABD62853.1, BAA83337.1, BAK23261.1, XP_002461168.1, AAU81619.1, AAV80466.1, ADB54780.1, BAB56106.1, AAQ08988.1, BAC56698.1, AAW31851.1, ABN54446.1, AAQ74383.1, BAB56105.1, AAP55209.1, AAK76737.1, XP_002277061.1, AAR17789.2, AAO91943.2, AAK76738.2, BAB11940.1, CAN99589.1, ABM17091.1, AAN08157.1, BAD91200.1, ABN71591.2, BAJ06110.1, AAV73803.1, CAK12754.1, NP_001054650.1, ADK62565.1, BAD95562.1, AAQ07963.1, AAT36679.1, AAK27314.2, NP_001105531.1, AAZ82019.1, ACG58413.1, ACA33931.1, AAS17948.1, AAO48271.1, ACO90356.1, ABU49649.1, AAQ72785.1, NP_001105222.1, ACY03397.1, XP_002269477.1, ACT53748.1, BAJ34595.1, BAE95195.1, ABF68604.1, AAR19752.1, AAK53432.1, AAM54141.2, ACN40903.1, ABU92562.1, ABC18331.1, ADL28385.1, AAT36678.1, AEA07714.1, BAB56107.1, ADK74832.1, ACU01852.1, XP_002874403.1, ACF05807.1, ABJ97691.1, ABF48496.1, AAT95387.1, NP_198067.1, AAM34759.1, XP_002516862.1, ABW93557.1, ACU01854.1, XP_002320366.1, BAG48260.1, AAF08577.1, AAO33456.1, NP_187288.2, CAC84522.1, XP_002884487.1, NP_001105943.1 และ AAO41905.1 ตามลำดับ โดยจะแสดง alignment score เป็นจำนวนคะแนนสี่ตัว (ภาพที่ 24) และ แสดงรายละเอียดของ accession number ชื่อของสิ่งมีชีวิต จำนวนเบสทั้งหมด เปอร์เซ็นต์ความเหมือน score bit ทิศทางการเปรียบเทียบและ E value (ตารางที่ 4) โดยจากข้อมูลในตารางที่ 4 พบว่า มีลำดับลำดับกรดอะมิโน 52 ตัวที่เป็นยีน NHX1 ได้แก่ AAO25547.1, AAS17949.1, AAX45242.1, ABB86294.1, NP_001105221.1, ABY19311.2, ABD62853.1, BAA83337.1,

BAK23261.1, AAU81619.1, AAV80466.1, BAB56106.1, AAQ08988.1, AAW31851.1, ABN54446.1, BAB56105.1, AAP55209.1, AAK76737.1, AAR17789.2, AAO91943.2, AAK76738.2, BAB11940.1, CAN99589.1, AAN08157.1, ABN71591.2, BAJ06110.1, AAV73803.1, ADK62565.1, AAQ07963.1, AAT36679.1, AAZ82019.1, ACG58413.1, ACA33931.1, AAO48271.1, ACO90356.1, ABU49649.1, AAQ72785.1, ACT53748.1, AAR19752.1, AAK53432.1, AAM54141.2, ABU92562.1, ADL28385.1, AAT36678.1, AEA07714.1, BAB56107.1, ADK74832.1, ACF05807.1, NP_198067.1, BAG48260.1, AAO33456.1 และ CAC84522.1 โดยลำดับลำดับกรดอะมิโนของยีน NHX1 ที่มีความเหมือนกับ ลำดับลำดับกรดอะมิโนที่แปรรหัสมาจาก clone 10 มากที่สุดคือ *Hordeum brevisubulatum* Na⁺/H⁺ antiporter (AAO25547.1) มีผลคะแนนสีแดงและมีความเหมือน 91 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 22 การวิเคราะห์ความเหมือนโดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ clone 10 กับ ฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLASTX 2.2.25

ตารางที่ 6 รายละเอียดฐานข้อมูล GeneBank ที่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ clone 10 จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTX version 2.2.25

Accession Number	Description	Lenth	Identity	Score (bits)	Frame	E value
XP_002451198.1	hypothetical protein SORBIDRAFT_05g025700 [Sorghum bicolor] >gb EES10186.1 hypothetical protein SORBIDRAFT_05g025700 [Sorghum bicolor]	541	195/197 (99%)	343	+1	8e-93
ACR35112.1	unknown [Zea mays]	546	190/197 (96%)	334	+1	4e-90
ACG43655.1	sodium/hydrogen exchanger 2 [Zea mays]	546	190/197 (96%)	334	+1	4e-90
NP_001142115.1	hypothetical protein LOC100274279 [Zea mays] >gb ACF87674.1 unknown [Zea mays]	546	189/197 (96%)	333	+1	8e-90
AAO25547.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Hordeum brevisubulatum]	540	180/197 (91%)	323	+1	9e-87
BAJ90308.1	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	541	180/197 (91%)	322	+1	1e-86
AAS17949.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter precursor [Triticum aestivum]	541	178/197 (90%),	321	+1	4e-86
AAX45242.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Festuca arundinacea]	540	179/197 (91%)	321	+1	4e-86
EEC83172.1	hypothetical protein OsI_28401 [Oryza sativa Indica Group]	545	178/197 (90%)	320	+1	7e-86

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Accession Number	Description	Lenth	Identity	Score (bits)	Frame	E value
	Os11g0648000 [Oryza sativa Japonica Group] >gb ABA95118.1 sodium/hydrogen exchanger 3 family protein, expressed [Oryza sativa Japonica Group] >dbj BAJ06109.1 sodium/proton antiporter [Oryza sativa Japonica Group]	545	178/197 (90%)	320	+1	7e-86
NP_001068371.1						
ABB86294.1	vacuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Hordeum brevisubulatum] Na ⁺ /H ⁺ antiporter NHX1 [Zea mays] >gb AAP20428.1	543	178/197 (90%)	320	+1	1e-85
NP_001105221.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter NHX1 [Zea mays]	540	167/196 (85%)	295	+1	2e-78
NP_001169551.1	hypothetical protein LOC100383429 [Zea mays] >gb ACN34108.1 unknown [Zea mays]	546	162/197 (82%)	295	+1	3e-78
EEE69477.1	hypothetical protein OsJ_28900 [Oryza sativa Japonica Group]	500	166/187 (89%)	294	+1	4e-78
ABY19311.2	Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Zoysia japonica]	540	163/197 (83%)	292	+1	2e-77
ACZ97405.1	putative vacuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Aeluropus lagopoides]	540	162/197 (82%)	291	+1	3e-77

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Accession Number	Description	Lenth	Identity	Score (bits)	Frame	E value
NP_001105224.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter NHX6 [Zea mays] >gb AAP20433.1					
	Na ⁺ /H ⁺ antiporter NHX6 [Zea mays]	541	164/196 (84%)	291	+1	5e-77
NP_001060571.2	Os07g0666900 [Oryza sativa Japonica Group]					
	>dbj BAF22485.2 Os07g0666900 [Oryza sativa Japonica Group]	536	161/197 (82%)	290	+1	6e-77
ABD62853.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Hordeum vulgare]	541	167/198 (84%)	290	+1	6e-77
	OsNHX1 [Oryza sativa Japonica Group] >dbj BAC20076.1					
BAA83337.1	putative sodium/proton antiporter [Oryza sativa Japonica Group] >dbj BAG88958.1 unnamed protein product [Oryza sativa Japonica Group]	535	161/197 (82%)	290	+1	6e-77
BAK23261.1	Na ⁺ /H ⁺ exchanger [Puccinellia tenuiflora]	538	162/197 (82%)	290	+1	8e-77
	hypothetical protein SORBIDRAFT_02g042190 [Sorghum					
XP_002461168.1	bicolor] >gb EER97689.1 hypothetical protein SORBIDRAFT_02g042190 [Sorghum bicolor]	442	163/197 (83%)	290	+1	8e-77

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Accession Number	Description	Lenth	Identity	Score (bits)	Frame	E value
AAU81619.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Iris lactea]	546	162/197 (82%)	290	+1	8e-77
AAV80466.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Aeluropus littoralis]	540	160/197 (81%)	288	+1	3e-76
ADB54780.1	Na ⁺ /H ⁺ exchanger [Phyllostachys edulis]	545	161/197 (82%)	287	+1	5e-76
BAB56106.1	Na H-antiportor [Nierembergia caerulea]	553	160/197 (81%),	287	+1	5e-76
AAQ08988.1	Na/H antiporter Nhxl [Tetragonia tetragonioides]	554	163/197 (83%)	286	+1	9e-76
BAC56698.1	sodium/proton antiporter [Hordeum vulgare] >dbj BAK02334.1 predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	538	160/197 (81%)	286	+1	9e-76
AAW31851.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Lophopyrum elongatum]	546	161/197 (82%)	286	+1	1e-75
ABN54446.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Thinopyrum intermedium]	546	161/197 (82%)	286	+1	2e-75
AAQ74383.1	putative Na/H antiporter [Oryza sativa Japonica Group]	535	159/197 (81%)	285	+1	2e-75
BAB56105.1	Na H-antiportor [Petunia x hybrida]	540	159/196 (81%)	285	+1	2e-75
AAP55209.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Triticum aestivum]	546	159/197 (81%)	285	+1	3e-75
AAK76737.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Triticum aestivum]	546	160/197 (81%)	285	+1	3e-75

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Accession Number	Description	Lenth	Identity	Score (bits)	Frame	E value
XP_002277061.1	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera] >emb CAN61480.1 hypothetical protein VITISV_010931 [Vitis vinifera] >emb CBI26120.3 unnamed protein product [Vitis vinifera]	541	160/197 (81%)	284	+1	6e-75
AAR17789.2	Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Lophopyrum elongatum]	538	156/197 (79%)	284	+1	6e-75
AAO91943.2	vacuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Hordeum vulgare]	546	160/197 (81%)	283	+1	1e-74
AAK76738.2	Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Triticum aestivum]	538	156/197 (79%)	283	+1	1e-74
BAB11940.1	Na/H antiporter Nhx1 [Atriplex gmelini]	555	161/197 (82%)	283	+1	1e-74
CAN99589.1	vacuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Mesembryanthemum crystallinum]	556	160/197 (81%)	283	+1	1e-74
ABM17091.1	antiporter protein [Helianthus tuberosus]	549	156/197 (79%)	283	+1	1e-74
AAN08157.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter Nhx1 [Salicornia europaea]	560	157/197 (80%)	282	+1	2e-74
BAD91200.1	sodium proton antiporter [Ipomoea nil] >dbj BAD91201.1 sodium proton antiporter [Ipomoea nil]	536	154/196 (79%)	282	+1	2e-74
ABN71591.2	Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Chrysanthemum x morifolium]	550	155/197 (79%)	281	+1	3e-74

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Accession Number	Description	Lenth	Identity	Score (bits)	Frame	E value
BAJ06110.1	sodium/proton antiporter [Salsola komarovii]	559	157/197 (80%)	281	+1	4e-74
AAV73803.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter NHX [Kalidium foliatum]	560	158/197 (80%)	281	+1	4e-74
CAK12754.1	(Sodium/potassium)/proton exchanger 3 [Solanum lycopersicum]	537	157/196 (80%)	280	+1	6e-74
NP_001054650.1	Os05g0148600 [Oryza sativa Japonica Group] >gb AAQ63678.1 Na ⁺ /H ⁺ exchanger [Oryza sativa Japonica Group] >gb AAT93981.1 putative Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Oryza sativa Japonica Group] >dbj BAF16564.1 Os05g0148600 [Oryza sativa Japonica Group] >gb EEE62333.1 hypothetical protein OsJ_17122 [Oryza sativa Japonica Group] >dbj BAJ06107.1 sodium/proton antiporter [Oryza sativa Japonica Group]	544	157/196 (80%)	280	+1	8e-74
	ADK62565.1 Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Halostachys caspica]	551	157/197 (80%)	280	+1	1e-73
	BAD95562.1 putative Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Phragmites australis]	538	157/197 (80%)	280	+1	1e-73
AAQ07963.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter NHX1 [Lophopyrum elongatum]	546	158/197 (80%),	280	+1	1e-73

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Accession Number	Description	Lenth	Identity	Score (bits)	Frame	E value
AAT36679.1	NHX1 [Citrus reticulata]	542	155/197 (79%)	279	+1	1e-73
AAK27314.2	sodium/proton exchanger [Citrus x paradisi]	542	155/197 (79%)	279	+1	1e-73
NP_001105531.1	Na+/H+ antiporter NHX2 [Zea mays] >gb AAP20429.1					
	Na+/H+ antiporter NHX2 [Zea mays]	540	154/196 (79%),	279	+1	1e-73
AAZ82019.1	Na+/H+ antiporter [Salicornia bigelovii]	560	156/197 (79%)	279	+1	1e-73
ACG58413.1	Na+/H+ antiporter [Thinopyrum intermedium subsp. barbulatum]	546	158/197 (80%)	279	+1	2e-73
ACA33931.1	Na+/H+ antiporter [Salicornia brachiata]	560	156/197 (79%)	279	+1	2e-73
AAS17948.1	Na+/H+ antiporter precursor [Hordeum vulgare]	538	157/197 (80%)	279	+1	2e-73
AAO48271.1	Na/H antiporter Nhxl [Atriplex dimorphostegia]	555	158/197 (80%)	279	+1	2e-73
ACO90356.1	Na+/H+ antiporter [Cucumis melo]	553	154/197 (78%)	278	+1	2e-73
ABU49649.1	Na+/H+ antiporter [Salsola soda]	559	156/197 (79%)	278	+1	2e-73
AAQ72785.1	Na+/H+ antiporter [Chenopodium glaucum]	551	158/197 (80%),	278	+1	2e-73
NP_001105222.1	Na+/H+ antiporter NHX3 [Zea mays] >gb AAP20430.1					
	Na+/H+ antiporter NHX3 [Zea mays]	539	150/197 (76%)	278	+1	2e-73

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Accession Number	Description	Lenth	Identity	Score (bits)	Frame	E value
ACY03397.1	putative NHX2 antiporter isoform 1 [Vitis vinifera] >gb ACY03398.1 putative NHX2 antiporter isoform 2 [Vitis vinifera] >gb ACY03399.1 putative NHX2 antiporter isoform 3 [Vitis vinifera]	538	154/197 (78%)	278	+1	4e-73
XP_002269477.1	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera] >emb CBI32267.3 unnamed protein product [Vitis vinifera]	538	154/197 (78%)	278	+1	4e-73
ACT53748.1	vacuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Rhizophora stylosa]	537	153/197 (78%)	277	+1	5e-73
BAJ34595.1	unnamed protein product [Thellungiella halophila]	554	154/197 (78%)	277	+1	7e-73
BAE95195.1	putative Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Suaeda japonica]	554	156/197 (79%)	277	+1	7e-73
ABF68604.1	putative vacuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Suaeda corniculata]	554	156/197 (79%)	277	+1	7e-73
AAR19752.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Lophopyrum elongatum]	539	154/198 (78%)	277	+1	7e-73
AAK53432.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Suaeda salsa]	556	156/197 (79%),	277	+1	7e-73
AAM54141.2	Na/H antiporter [Gossypium hirsutum]	543	156/197 (79%),	277	+1	7e-73
ACN40903.1	unknown [Picea sitchensis]	552	152/197 (77%)	276	+1	9e-73
ABU92562.1	vacuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Zygophyllum xanthoxylum]	532	155/197 (79%)	276	+1	9e-73

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Accession Number	Description	Lenth	Identity	Score (bits)	Frame	E value
ABC18331.1	vacuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter Nhx2 [Karelinia caspia]	550	153/197 (78%)	276	+1	9e-73
ADL28385.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Cicer arietinum]	542	156/197 (79%),	275	+1	2e-72
AAT36678.1	NHX1 [Citrus trifoliata]	541	155/197 (79%)	275	+1	2e-72
AEA07714.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Glycine max]	546	155/197 (79%),	275	+1	3e-72
BAB56107.1	Na H-antiportor [Torenia hybrida]	555	155/197 (79%)	275	+1	3e-72
ADK74832.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Arachis hypogaea]	539	155/197 (79%)	275	+1	4e-72
ACU01852.1	Na ⁺ /H ⁺ exchanger 1 [Populus euphratica]	528	151/197 (77%),	275	+1	4e-72
XP_002874403.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_910883 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata] >gb EFH50662.1 hypothetical protein ARALYDRAFT_910883 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	542	152/197 (77%),	274	+1	5e-72
ACF05807.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter protein [Limonium gmelinii]	551	153/197 (78%),	274	+1	5e-72
ABJ97691.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Eutrema halophilum] >gb ACN76859.1 sodium/hydrogen antiporter [Eutrema halophilum] >dbj BAJ33874.1 unnamed protein product [Thellungiella halophila]	545	152/197 (77%)	274	+1	5e-72

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Accession Number	Description	Lenth	Identity	Score (bits)	Frame	E value
ABF48496.1	sodium proton exchanger [Eutrema halophilum]	545	152/197 (77%),	274	+1	5e-72
AAT95387.1	sodium proton exchanger [Arabidopsis thaliana]	538	152/197 (77%),	274	+1	5e-72
	sodium/hydrogen exchanger 1 [Arabidopsis thaliana] >sp Q68KI4.2 NHX1_ARATH RecName: Full=Sodium/hydrogen exchanger 1; AltName: Full=Na(+)/H(+) exchanger 1; Short=NHE-1					
NP_198067.1	>gb AAF21755.1 AF056190_1 Na+/H+ exchanger [Arabidopsis thaliana] >gb AAD16946.1 sodium proton exchanger Nhx1 [Arabidopsis thaliana] >dbj BAE98703.1 Na+/H+ exchanger [Arabidopsis thaliana] >gb AED93655.1 sodium/hydrogen exchanger 1 [Arabidopsis thaliana]	538	152/197 (77%)	274	+1	5e-72
AAM34759.1	Na+/H+ antiporter [Arabidopsis thaliana] sodium/hydrogen exchanger, putative [Ricinus communis]	538	151/197 (77%)	273	+1	8e-72
XP_002516862.1	>gb EEF45476.1 sodium/hydrogen exchanger, putative [Ricinus communis]	541	154/197 (78%),	273	+1	1e-71

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Accession Number	Description	Lenth	Identity	Score (bits)	Frame	E value
ABW93557.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter protein [Plantago maritima]	553	153/197 (78%)	273	+1	1e-71
ACU01854.1	Na ⁺ /H ⁺ exchanger 3 [Populus euphratica]	545	152/197 (77%)	273	+1	1e-71
	sodium proton exchanger [Populus trichocarpa]					
XP_002320366.1	>gb EEE98681.1 sodium proton exchanger [Populus trichocarpa]	528	150/197 (76%)	273	+1	1e-71
BAG48260.1	vacuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter [Zostera marina]	540	157/197 (80%)	273	+1	1e-71
AAF08577.1	putative sodium proton exchanger [Arabidopsis thaliana]	552	154/197 (78%),	273	+1	1e-71
AAO33456.1	NHX1 [Triticum aestivum]	204	154/192 (80%),	273	+1	1e-71
	sodium/hydrogen exchanger 3 [Arabidopsis thaliana]					
NP_187288.2	>gb AEE74383.1 sodium/hydrogen exchanger 3 [Arabidopsis thaliana]	503	154/197 (78%)	273	+1	1e-71
CAC84522.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter, isoform 1 [Solanum lycopersicum]	534	153/197 (78%)	273	+1	1e-71
	hypothetical protein ARALYDRAFT_477785 [Arabidopsis					
XP_002884487.1	lyrata subsp. lyrata] >gb EFH60746.1 hypothetical protein ARALYDRAFT_477785 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	543	150/197 (76%)	272	+1	2e-71

ตารางที่ 6 (ต่อ)

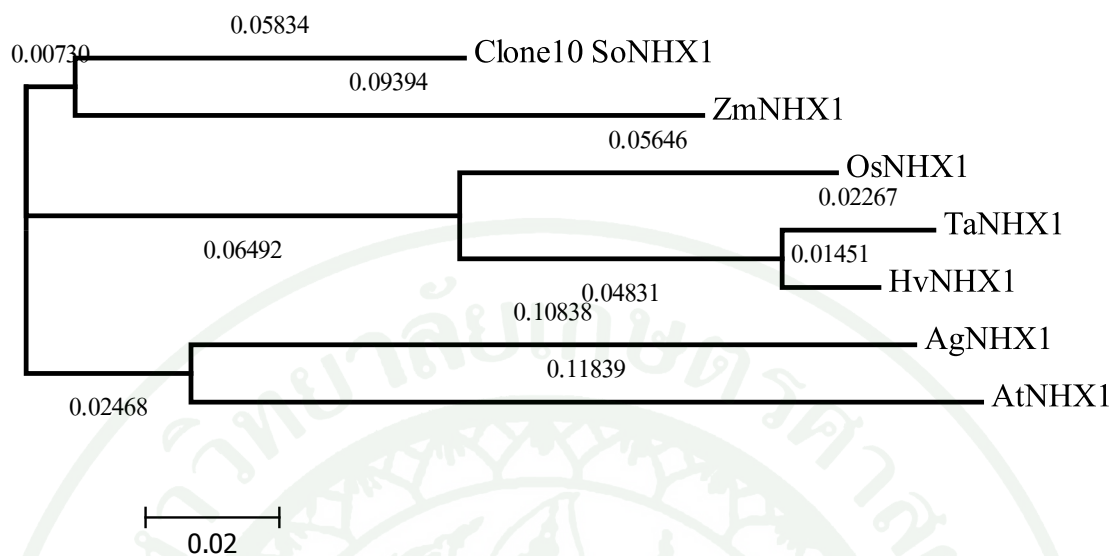
Accession Number	Description	Lenth	Identity	Score (bits)	Frame	E value
NP_001105943.1	Na ⁺ /H ⁺ antiporter NHX4 [Zea mays] >gb AAP20431.1					
	Na ⁺ /H ⁺ antiporter NHX4 [Zea mays]	538	149/197 (76%)	272	+1	2e-71
AAO41905.1	putative sodium proton exchanger [Arabidopsis thaliana]	503	153/197 (78%)	271	+1	4e-71

เปรียบเทียบความเหมือนลำดับกรดอะมิโนของ clone 10 กับลำดับลำดับกรดอะมิโนของยีน NHX1 ในพืชชนิดอื่นจากฐานข้อมูลพันธุกรรมใน GenBank ได้แก่ *Arabidopsis thaliana* (AtNHX1, AAD16946), *Zea mays* (ZmNHX1 AY270036.1), *Triticum aestivum* (TaNHX1, AAK76738), *Oryza sativa* (OsNHX1, BAA83337), *Hordeum vulgare* (HvNHX1, BAC56698) และ *Atriplex gmelini* (AgNHX1, BAB11940) วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม DNASIS version 2.1 (ภาพที่ 25) และทำการสร้างแผนภาพ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม ClustalW multiple sequence alignment version 2.1 (ภาพที่ 26) ซึ่งจากผลการเปรียบเทียบ พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสลำดับเบสดีเอ็นเอของ clone 10 กับ ลำดับกรดอะมิโนของยีน NHX1 ที่พบในพืชอื่นมีลำดับกรดอะมิโนที่ค่อนข้างเหมือนกันมากโดยเฉพาะพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ทำให้ทราบว่า RT-PCR Product จากอ้อยที่นำเอามาโคลนนั้นมีความจำเพาะต่อยีน NHX1

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอของ clone 10 ด้วยโปรแกรม BLASTX version 2.2.25 ผ่านระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ต พบว่า ยีน *Hordeum brevisubulatum* Na⁺/H⁺ antiporter (AAO25547.1) มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสลำดับเบสของ clone 10 มากที่สุด 91 เปอร์เซ็นต์ จึงนำมาทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม DNASIS version 2.1 (ภาพที่ 27)

Clone10 (SoNHX1)	-----	
ZmNHX1	MGLGVVAE-LVRLGVLSSTSDHASVVSINLFVALLCACIVLGHLLLEENRWVNEST-ALIV	58
TaNHX1	MGYQVVAQLARLSGALGTSDHASVVSITLFVALLCACIVLGHLLLEENRWLNESITALII	60
HvNHX1	MAFEVVAQLARLSDALATSDHASVVSINLFVALLCACIVLGHLLLEENRWLNESITALII	60
OsNHX1	MGMEVAAAARLGALY---TTSDYASVVSINLFVALLCACIVLGHLLLEENRWVNESTITALII	57
AgNHX1	-MWSQLSSLLSGKMDALTTSDHASVVSINLFVALLCGCIVIGHLLLEENRWVNESTITALII	59
AtNHX1	---MLDSLVS-KLPSLSTSDHASVVALNLFVALLCACIVLGHLLLEENRWVNESTITALII	55
Clone10 (SoNHX1)	-----FIYLLPPIIFNAGFQVKKKQFFRNFITITLFGA	33
ZmNHX1	GLGTGTVILMISRGVVIHVLVFESEDLFFIYLLPPIIFNAGFQVKKKQFFRNFITITLFGA	118
TaNHX1	GLCTGVVILMTTKGKSSHVLVFESEDLFFIYLLPPIIFNAGFQVKKKQFFRNFMATITLFGA	120
HvNHX1	GLCTGVVILMTTKGKSSHVLVFESEDLFFIYLLPPIIFNAGFQVKKKQFFRNFMATITLFGA	120
OsNHX1	GLCTGVVILMTTKGKSHLVFESEDLFFIYLLPPIIFNAGFQVKKKQFFRNFMATITLFGA	117
AgNHX1	GLATGVVILLISGGKSHLLVFESEDLFFIYLLPPIIFNAGFQVKKKQFFRNFMATITLFGA	119
AtNHX1	GLGTGVTILLISKGKSHLLVFESEDLFFIYLLPPIIFNAGFQVKKKQFFRNFMATITLFGA	115
	*:*****:*	
Clone10 (SoNHX1)	VGTLISFTVISLGLGLVSRNLNIGALELGDYLAIGAIFSATDSVCTLOVLSQDETPFLYS	93
ZmNHX1	VGTLISFTVISLGLGLISRLNIGALELGDYLAIGAIFSATDSVCTLOVLSQDETPFLYS	178
TaNHX1	VGTMMSFTIISLAAIAIFSRMNIGTLDVSDFLAIGAIFSATDSVCTLOVLNQDETPFLYS	180
HvNHX1	VGTMISFTIISLAAIAIFSKMNIGTLDVSDFLAIGAIFSATDSVCTLOVLNQDETPFLYS	180
OsNHX1	VGTMISFTIISIAAIAIFSRMNIGTLDVSDFLAIGAIFSATDSVCTLOVLNQDETPFLYS	177
AgNHX1	VGTLVSFTIISLGLSIFKKLDIGTLEADYLAIGAIFAATDSVCTLOVLNQDETPFLYS	179
AtNHX1	VGTIISCTIISLGVTOFFKKLDIGTDFLDYLAIGAIFAATDSVCTLOVLNQDETPFLYS	175
	***:* **.. :.:*	
Clone10 (SoNHX1)	LVFGEGVVDATSVVLFNAIQNFDLGDISGAKLLNFIGSFLYLFGTSTFLGVASGLLSAY	153
ZmNHX1	LVFGEGVVDATSVVVFNALQNFIDITHIDAEVVFHLLGNFFYLFLSTVLGVATGLISAL	238
TaNHX1	LVFGEGVVDATSVVLFNALQNFDPNQIDAIVILKFLGNFCYLFVSSTFLGVFTGLLSAY	240
HvNHX1	LVFGEGVVDATSVVLFNALQNFDPNQIDAIVILKFLGNFCYLFVSSTFLGVFSGLLSAY	240
OsNHX1	LVFGEGVVDATSVVLFNALQNFDLVHIDAADVFLKFLGNFFYLFLSSTFLGVFAGLLSAY	237
AgNHX1	LVFGEGVVDATSVVLFNAIQSFDLTRIDHRIALQFMGNFLYLFIASTILGAFTGLLSAY	239
AtNHX1	LVFGEGVVDATSVVVFNAIQSFDLTHLNHEAFAHLLGNFLYLFLLSTLLGAATGLISAY	235
	*****:*:*:*:*:* .. :.:*.* ** **.. :*:**	
Clone10 (SoNHX1)	IIKKLYFGRHSTDREVSIMMLMAYLSYMLAELLDLSGILTFFFC-----	197
ZmNHX1	VIKKLYFGRHSTDREVALMMLMAYLSYMLAELFALSGILTFFFCIVMSHYTWHNVTESS	298
TaNHX1	VIKKLYFGRHSTDREVALMMLMAYLSYMLAELLDLSGILTFFFCIVMSHYTWHNVTESS	300
HvNHX1	IIKKLYFGRHSTDREVALMMLMAYLSYMLAELLDLSGILTFFFCIVMSHYTWHNVTESS	300
OsNHX1	IIKKLYFGRHSTDREVALMMLMAYLSYMLAELLDLSGILTFFFCIVMSHYTWHNVTESS	297
AgNHX1	IIKKLYFGRHSTDREVALMMLMAYLSYMLAELFYLSGILTFFFCIVMSHYTWHNVTESS	299
AtNHX1	VIKKLYFGRHSTDREVALMMLMAYLSYMLAELFDLSGILTFFFCIVMSHYTWHNVTESS	295
	:*****:*****:*****:*****	
Clone10 (SoNHX1)	-----	
ZmNHX1	RITTKHAFATLSFLAETFLFLYVGMDALDIDKWRVSVDTPGKSLAISSILMGLVMVGRAA	358
TaNHX1	RVTTKHAFATLSFIAETFLFLYVGMDALDIEKWKFASDSPGKSIGISSILLGLVLVGRAA	360
HvNHX1	RVTTKHAFATLSFIAETFLFLYVGMDALDIEKWKFASDSPGKSIGISSILLGLVLVGRAA	360
OsNHX1	RVTTKHAFATLSFIAETFLFLYVGMDALDIEKWEFASDRPGKSIGISSILLGLVLIGRAA	357
AgNHX1	RVTTKHAFATLSFVAEVFLFLYVGMDALDIEKWRVSDSPGKSIVAVSSILLGLVMVGRAA	359
AtNHX1	RITTKHTFATLSFLAETFIFLYVGMDALDIDKWRVSVDTPGTSIAVSSILMGLVMVGRAA	355

ภาพที่ 23 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ clone 10 กับ ยีนNHX1 ใน *Arabidopsis thaliana* (*AtNHX1*, AAD16946), *Zea mays* (*ZmNHX1* AY270036.1), *Triticum aestivum* (*TaNHX1*, AAK76738), *Oryza sativa* (*OsNHX1*, BAA83337), *Hordeum vulgare* (*HvNHX1*, BAC56698) และ *Atriplex gmelini* (*AgNHX1*, BAB11940)



ภาพที่ 24 การวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของ clone 10 (SoNHX1) กับ ยีน NHX1 ใน *Arabidopsis thaliana* (AtNHX1, AAD16946), *Zea mays* (ZmNHX1 AY270036.1), *Triticum aestivum* (TaNHX1, AAK76738), *Oryza sativa* (OsNHX1, BAA83337), *Hordeum vulgare* (HvNHX1, BAC56698) และ *Atriplex gmelini* (AgNHX1, BAB11940)

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Clone10 (SoNHX1) -----
HbNHX1      MGWGLGDPPADYGSIMAVGLFVALMCICIIIVGHLLEENRWMNESTTALLLGLGAGTVILF 60

Clone10 (SoNHX1) -----FIYLLPPIIFNAGFQVKKKQFFRNFITITLFGAVGTLISFTVI 43
HbNHX1      ASSGKNSRLMVSEDLFFIYLLPPIIFNAGFQVKKKQFFRNFMITLFAVVGTLISFSII 120
              *****:*****.*****:*

Clone10 (SoNHX1)  SLGALGLVSRNLNIGALELGDYLALGAIFSATDSVCTLQVLSQDETPFLYSLVFGEGVVND 103
HbNHX1      SLGAMGLISRLNIGALELGDYLALGAIFSATDSVCTLQVLSQDETPFLYSLVFGEGVVND 180
              ****.*:*****

Clone10 (SoNHX1)  ATSVVLFNAIQNFDLGDISGAKLLNFIGSFLYLFGTSTFLGVASGLLSAYIIKKLYFGRH 163
HbNHX1      ATSVVLFNAIQNFDLGNFSSLKFLQFIGNFLYLFGASTFLGVASGLLSAYVIKKLYFGRH 240
              *****:*. *:.*:***.*****:*****:*****

Clone10 (SoNHX1)  STDREVSIMMLMAYLSYMLAELLDLSGILTFFFC----- 197
HbNHX1      STDREVAIMMLMAYLSYMLAELLDLSGILTFFFCGIVMSHYTWHNVTESSRVTTKHAFAT 300
              *****:*****

Clone10 (SoNHX1) -----
HbNHX1      LSFISETFLLFLYVGMDALDIEKWKIVSETYSPMKSITLSSIIILALVLVARAAAFVPLSYL 360

Clone10 (SoNHX1) -----
HbNHX1      SNLTKKKTAGEKISIRQQVIIWWAGLMRGAVSIALAYNKFAKSIGHTQLPSNAIMITSTIII 420

Clone10 (SoNHX1) -----
HbNHX1      VLFSTIVFGLLTKPLIRLLIPARHLTREVSALSEPSSPKSFLEQLTVNGPETDVENGVSII 480

Clone10 (SoNHX1) -----
HbNHX1      RRPTSLRMLLASPTRSVHHYWRKFDNAFMRPVFGGRGFVPFVPGSPTESSVPLLHAGSEN 540

```

ภาพที่ 25 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ clone 10 กับ ยีนNHX1 ใน *Hordeum brevisubulatum*
 Na^+/H^+ antiporter (AAO25547.1)

ได้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *SoNHX1* ในอ้อย ซึ่งมีขนาดของ PCR Product 580 เบส

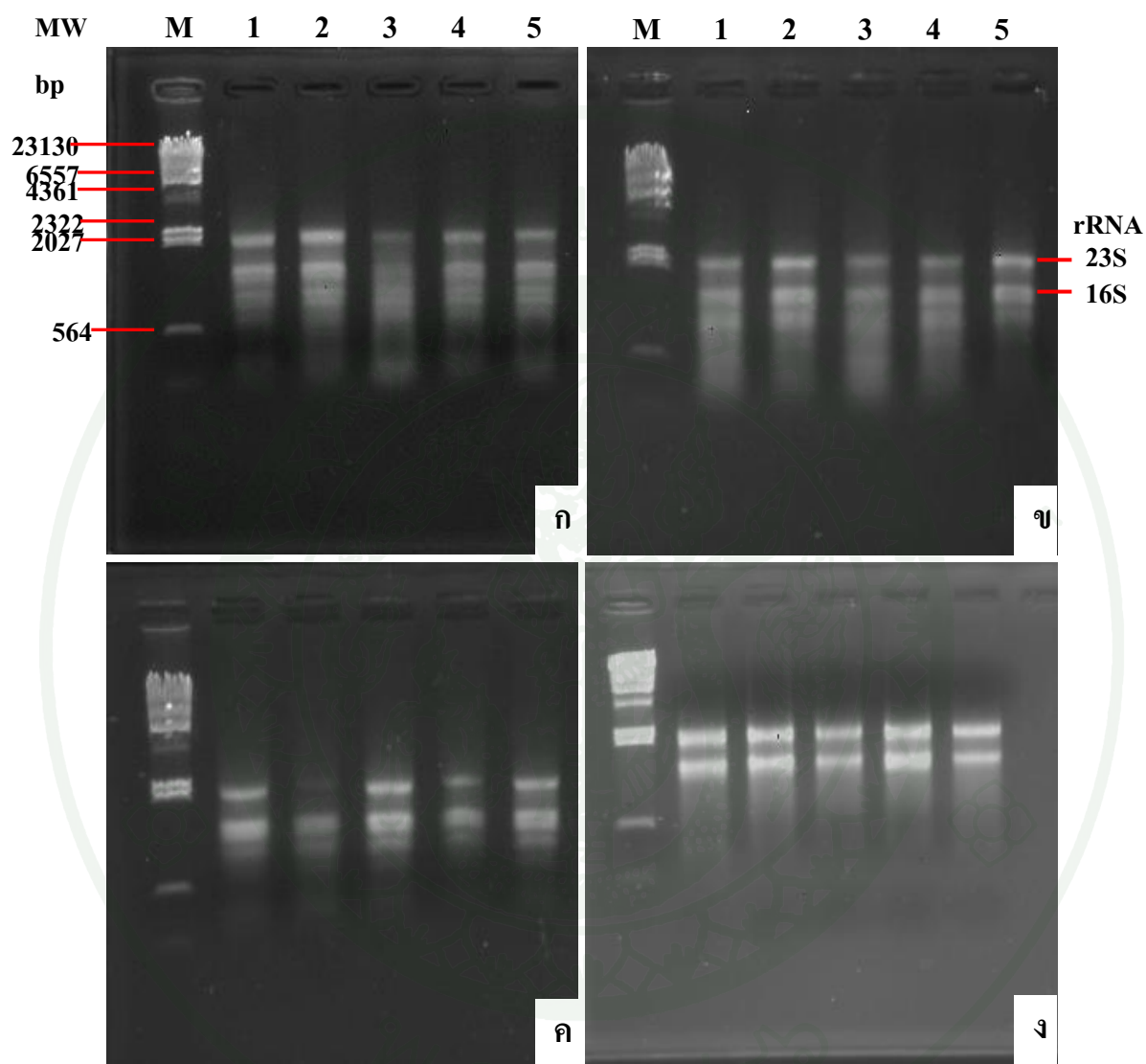
- ไพรเมอร์ *SoNHXF1* 5' GCTCCCGCCGATCATATTTA 3' และ

- ไพรเมอร์ *SoNHXR1* 5' GCAGAAGAACACGGTGAGGA 3'

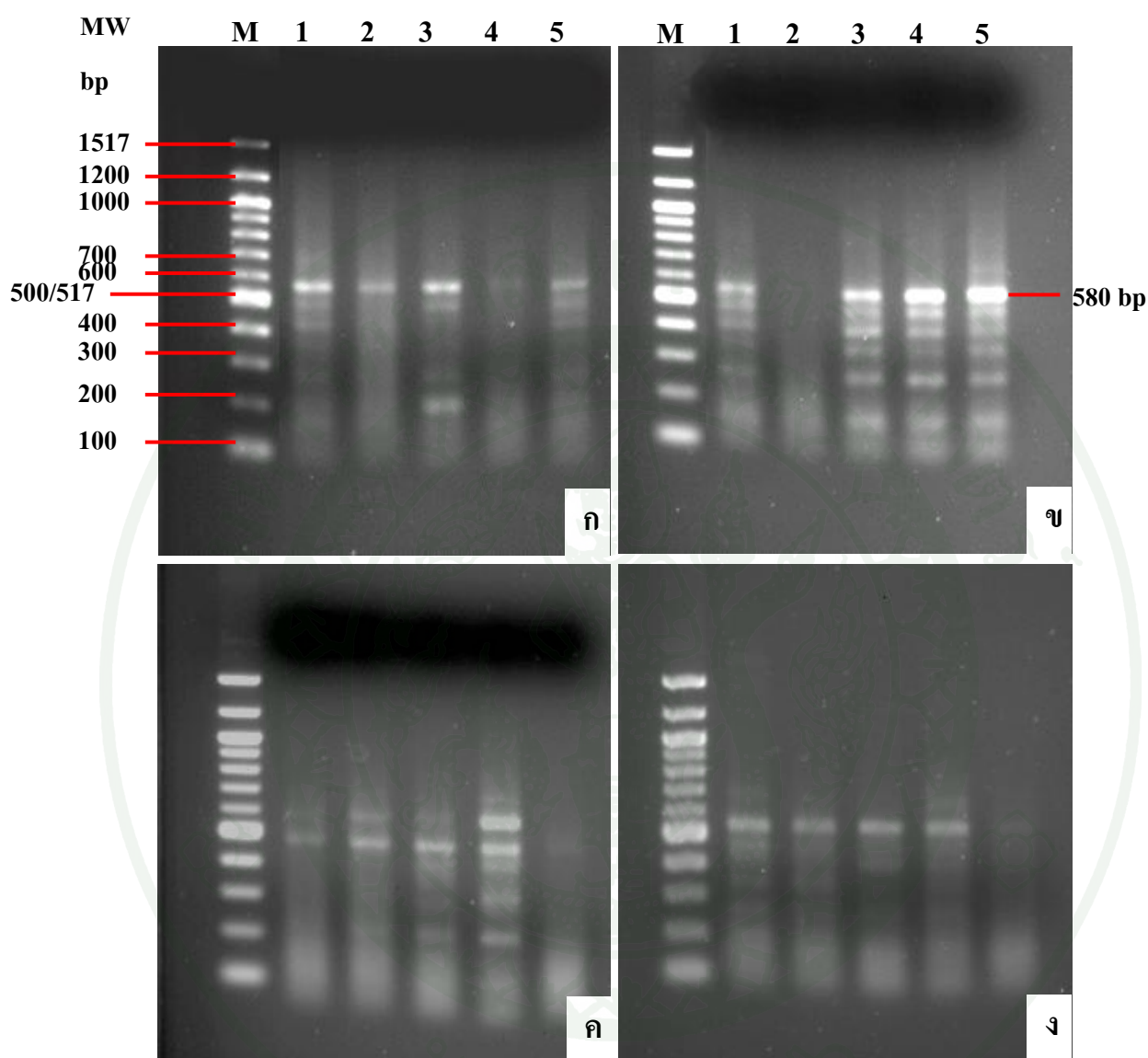
3.2.2 ศึกษาการแสดงผลการแสดงออกของยีน *SoNHX1* ในอ้อยโดยวิธี RT-PCR

สกัด total RNA ด้วยวิธี Aurum™ Total RNA Mini Kit (วิธีการทดลองข้อ 3.2.2.2) ของ อ้อยพันธุ์ K 84-200, พันธุ์ KPS 94-13, พันธุ์ สุพรรณบุรี 80 และ พันธุ์ LK 92-11 (ภาพที่ 27) ที่ระดับเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% (w/v) ตามลำดับ ศึกษาการแสดงผลการแสดงออกของยีน *SoNHX1* โดยวิธี RT-PCR (ภาพที่ 28) ตามข้อ 3.2.2ค ในวิธีการทดลอง แล้ววิเคราะห์ผลบน 1 % (w/v) agarose gel

การแสดงผลการแสดงออกของยีน *SoNHX1* ในอ้อยพันธุ์ K84-200 และ พันธุ์ KPS 94-13 พบการตอบสนองในความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงคือที่ 2.0 % (w/v) แต่ในการแสดงผลการแสดงออกของยีน *SoNHX1* ในอ้อยพันธุ์ LK92-11 และ สุพรรณบุรี 80 นั้นลดลงเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้น และไม่มีการแสดงออกที่ระดับโซเดียมคลอไรด์ 2.0 % (w/v) สอดคล้องกับผลการที่แสดงออก และปริมาณการสะสมโซเดียมคลอไรด์ที่มากกว่าพันธุ์ K84-200 และ พันธุ์ KPS 94-13 แสดงให้เห็นว่าพันธุ์ K 84-200 พันธุ์ และ พันธุ์ KPS 94-13 ที่มีการแสดงผลการแสดงออกของยีน *SoNHX1* ได้ในความเข้มข้นของเกลือที่สูงเป็นกลไกหนึ่งในการป้องกันตัวเองจากสภาวะความเค็มที่ไม่เหมาะสม ทำให้สามารถเจริญเติบโต และมีชีวิตรอดได้นานกว่าพันธุ์ LK 92-11 และ สุพรรณบุรี 80 ที่มีการแสดงผลการแสดงออกของยีน *SoNHX1* ลดลงเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์สูง



ภาพที่ 27 วิเคราะห์ผลการสกัด total RNA จากใบอ้อยพันธุ์ K 84-200 พันธุ์ KPS 94-13
พันธุ์ สุพรรณบุรี 80 และ พันธุ์ LK 92-11 (ก-ง) ตามลำดับ ที่ทดสอบด้วยสารละลายเกลือ
ระดับความเข้มข้นเข้มข้น 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 % (w/v) (1-5) ตามลำดับ
Lambda DNA – *Hind*III digest Marker (M)
ใช้กระแสไฟฟ้า 100 Voltage นาน 30 นาที ด้วยเครื่อง Electrophoresis



ภาพที่ 28 วิเคราะห์ผล RT-PCR product ที่จำเพาะต่อยีน *SoNHX1* จากใบอ้อยพันธุ์ K 84-200 พันธุ์ KPS 94-13 พันธุ์ สุพรรณบุรี 80 และ พันธุ์ LK 92-11 (ก-ง) ตามลำดับ ที่ทดสอบด้วยสารละลายเกลือ ระดับความเข้มข้นเข้มข้น 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 % (w/v) (1-5) ตามลำดับ

100 bp DNA Ladder Marker (M)

ใช้กระแสไฟฟ้า 100 Voltage นาน 50 นาที ด้วยเครื่อง Electrophoresis

จากการศึกษาแสดงออกของยีน *SoNHX1* ในอ้อยพบว่ามีความสอดคล้องกับ การแสดงออกของยีน *OsNHX1* ในข้าวโดยการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ภายใต้ความเครียดจากสภาวะทนเค็ม และยังมีหน้าที่สำคัญในการทำให้ข้าวทนเค็ม (Fukuda *et al.*, 1999) และ ยีน *RhNHX1* ในกุหลาบมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ (Kagami and Suzuki, 2005) ซึ่งภายใต้ความเข้มข้นของเกลือที่สูงเกินในใบพืชจะไปรบกวนเมตาบอลิซึมภายในเซลล์เป็นสาเหตุให้เกิดการเป็นพิษในเซลล์จนส่งผลต่อการเจริญเติบโตที่ลดลง และอาการผิดปกติได้ ซึ่งจากการทดลองในอ้อยพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้นจนถึง 2.0 % (w/v) ใบอ้อยจะแสดงอาการผิดปกติ คือ อาการใบเหลืองและอาการใบไหม้ออกมา โดยอาการจะเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นเกลือที่เพิ่มขึ้น ในอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่แสดงอาการผิดปกติมากที่สุดนั้น พบว่า ไม่มีการแสดงออกของยีน *SoNHX1* ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ระดับ 2.0 % (w/v) แสดงให้เห็นว่าอ้อยพันธุ์ที่ไม่ทนเค็มจะมีการสะสมโซเดียมคลอไรด์ในเนื้อเยื่อสูงกว่าพันธุ์ที่ทนเค็มและ มีการแสดงออกของยีน *SoNHX1* ที่ระดับต่ำกว่า

Popova and Gollack (2007) ได้ทำการทดลอง In situ PCR เพื่อหาการแสดงออกของยีน *LmNHX1* ในใบต้น *Lobularia maritima* ที่ทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 500mM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า มีการชักนำให้แสดงออกของยีน *LmNHX1* ที่เซลล์ชนิด mesophyll ขณะที่เซลล์ epidermal ไม่พบการแสดงออก แสดงให้เห็นว่า ยีน *LmNHX1* มีการแสดงออกเพื่อลดความเป็นพิษในเซลล์ mesophyll ใน *Lobularia maritima*. โดยเนื่องจากพืชไม่สามารถทนเกลือปริมาณมากๆ ภายใน cytoplasm ได้ พืชจึงต้องมีการขับเกลือเข้าไปเก็บใน vacuole หรือแบ่งกระจายไอออนไปตามเนื้อเยื่อต่างๆ เพื่อให้พืชมี metabolic เป็นปกติ (Readdy *et al.*, 1992) ดังนั้นการแสดงออกของยีน *NHX1* ในพืชหลายชนิดเป็นการปรับตัวของพืชให้ทนต่อสภาวะความเค็มได้

สรุปผลการทดลอง

1. การทดลองศึกษาการตอบสนองของอ้อยทั้ง 4 พันธุ์ ต่อระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์พบว่า ทุกพันธุ์มีการตอบสนองในระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.5 และ 2 % (w/v) โดยแสดงอาการใบเหลืองและมีอาการใบไหม้อย่างชัดเจน พันธุ์อ้อยที่ทนต่อสภาวะทนเค็มได้ดีคือพันธุ์ K 84-200 และ KPS 94-13 พันธุ์อ้อยที่ไวต่อสภาวะความเค็มที่สุดคือพันธุ์

LK 92-11

2. ปริมาณการสะสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในเนื้อเยื่อ พบว่า อ้อยทั้ง 4 พันธุ์ มีการสะสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในเนื้อเยื่อรากมากกว่าเนื้อเยื่อใบ โดยพันธุ์ LK 92-11 มีการสะสมเกลือโซเดียมคลอไรด์มากที่สุด และพันธุ์ที่สะสมเกลือโซเดียมคลอไรด์น้อยที่สุดคือพันธุ์ K 84-200 ซึ่งการสะสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในเนื้อเยื่อมีผลต่อความสามารถในการทนเค็ม

3. การแสดงออกของยีน *SoNHX1* พบว่า พันธุ์อ้อยที่ทนต่อสภาวะทนเค็มได้ดีคือพันธุ์ K 84-200 และ KPS 94-13 มีการแสดงออกของยีน *SoNHX1* เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูง คือ 2.0 % (w/v) สอดคล้องกับอาการที่แสดงออก ขณะที่พันธุ์ LK 92-11 ไม่มีการแสดงออกของยีน *SoNHX1* ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.0 % (w/v) สอดคล้องกับการแสดงอาการผิดปกติทางใบ ดังนั้นการแสดงออกของยีน *SoNHX1* จึงมีความเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองของอ้อย โดยการขับเกลือเข้าไปเก็บใน vacuole ตามเนื้อเยื่อต่างๆ เพื่อให้พืชมี metabolic เป็นปกติ เป็นการปรับตัว เนื่องมาจากสภาวะเครียดจากความเค็ม

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เฉลิมพล ไหลรุ่งเรือง. 2547. เอกสารวิชาการอ้อย. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 2548. ความก้าวหน้าการดำเนินการวิจัยและพัฒนาทางด้านอ้อย. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

สมศรี อรุณินท์. 2539. ดินเค็มในประเทศไทย. กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2551. ผลการสำรวจพื้นที่ปลูกอ้อยประจำปีการผลิต 2550 - 2551. กระทรวงอุตสาหกรรม. สืบค้นจาก <http://www.ocsb.go.th> เมื่อวันที่ 2 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553

ปรีชา สุริยพันธุ์. 2523. พฤกษศาสตร์ของอ้อย เอกสารวิชาการ เล่มที่ 1. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

อรุณี ยูวะนิคม. 2546. การจัดการแก้ไขปัญหาดินเค็ม. เอกสารวิชาการกลุ่มวิจัยและพัฒนาการจัดการดินเค็ม สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน, กรุงเทพฯ.

Apse, M.P., G.S. Aharon, W.A. Snedden and E. Blumwald. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in Arabidopsis. **Science**. 285: 1256–1258.

Bao-Yan, A., L. Yan, L. Jia-Rui, Q. Wei-Hua, Z. Xian-Sheng and G. Xin-Qi. 2008. Expression of a Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiporter Gene of Alfalfa Enhances Salinity Tolerance in Transgenic Arabidopsis. **Acta Agron. Sin.** 34: 557-564.

- Brini, F., R.A. Gaxiola, G.A. Berkowitz and K. Masmoudi. 2005. Cloning and Characterization of wheat vacuolar cation/proton antiporter and pyrophosphate proton pump. **Plant Physiol. Bioch.** 43 :347-54.
- Chinnusamy, V., A. Jagendorf and J.K. Zhu. 2005. Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants. **Crop Sci.** 45: 437–448.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant miniprep: version II. **Plant Mol. Biol. Rep.** 1: 19-21.
- Dietz, K.J., N. Tavakoli, C. Kluge, T. Mimura, S.S. Sharma, G.C. Harris, A.N. Chardonnens and D. Golldack. 2001. Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. **J. Exp.Bot.** 52: 1969–1980.
- Frederick, Z.P., C. Meinzer and E. Federman. 2000. Leaf development, transpiration and ion uptake and distribution in sugarcane cultivars grown under salinity. **Plant Soil.** 218: 59-69.
- Fukuda, A., A. Nagamura and Y. Tanaka. 1999. Molecular Cloning and expression of the Na^+/H^+ exchange gene in *Oryza sativa*. **Biochim. Biophys. Acta.** 1446: 149-155.
- Joshi, G. V. and G. R. Naik. 1980. Response of sugarcane to different type of salt stress. **Plant Soil.** 56: 255-263.
- Kagami, T. and M. Suzuki. 2005. Molecular and functional analysis of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene of *Rosa hybrida*. **Genes Genet. Syst.** 80: 122-128.

- Li, J., G. Jiang, P. Huang, J. Ma and F. Zhang. 2007. Overexpression of the Na^+/H^+ antiporter gene from *Suaeda salsa* confers cold and salt tolerance to transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Tiss. Org.** 90: 41-48.
- Lingle, S.E. and C.L. Wiegand. 1997. Soil salinity and sugarcane juice quality. **Field Crop. Res.** 54: 259-268.
- Liu, P., G.D. Yang, H. Li, C.C. Zheng and C.A. Wu. 2010. Overexpression of NHX1s in transgenic *Arabidopsis* enhances photoprotection capacity in high salinity and drought conditions. **Acta Physiol. Plant.** 32: 81-90.
- Parida, A.K. and A.B. Das. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotox. Environ. Safe.** 60: 324-349.
- Popova, O.V. and D. Gollack. 2007. In the halotolerant *Lobularia maritima* (Brassicaceae) salt adaptation correlates with activation of the vacuolar H^+ -ATPase and the vacuolar Na^+/H^+ antiporter. **J. Plant Physiol.** 164: 1278-1288.
- Ohta, M., Y. Hayashi, A. Nakashima, A. Hamada, A. Tanaka, T. Nakamura and T. Hayakawa. 2002. Introduction of a Na^+/H^+ antiporter gene form *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice. **FEBS Lett.** 532: 279-282.
- Reddy, M.P., Sanish, S., Iyengar, E.R.R. 1992. Photosynthetic studies and compartmentation of ions in different tissues of *Salicornia brachiata* Roxb. under saline conditions. **Photosynthetica.** 26: 173-179.
- Shi, H.Z. and J.K. Zhu. 2002. Regulation of expression of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *AtNHX1* by salt stress and abscisic acid. **Plant Mol. Biol.** 50: 543-550.

- Tian, L., C. Huang, R. Yu, R. Liang, Z. Li, L. Zhang, Y. Wang, X. Zhang and Z. Wu. 2006. Overexpression $^{At}NHX1$ confers salt-tolerance of transgenic tall fescue. **Afr. J. Biot.** 5: 1041-1044.
- Verma, D., S.L. Singla-Pareek, D. Rajagopal, M.K. Reddy and S.K. Sopory. 2007. Functional validation of a novel isoform of Na^+/H^+ antiporter from *Pennisetum glaucum* for enhancing salinity tolerance in rice. **J. Biosciences.** 32: 621-628.
- Wu, Y.Y., Q.J. Chen, M. Chen, J. Chen and X.C. Wang. 2005. Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene. **Plant Sci.** 169: 65-73.
- Xia, G., J. Zhao, D. Zhi, Z. Xue and H. Liu. 2007. Enhanced salt tolerance of transgenic progeny of tall fescue (*Festuca arundinacea*) expressing a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene from *Arabidopsis*. **J. Plant Physiol.** 164: 1377-1383.
- Xue, Z.Y., D.Y. Zhi, G.P. Xue, H. Zhang, Y.X. Zhao and G.M. Xia. 2004. Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene with improved grain yield in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na^+ . **Plant Sci.** 167: 849-859.
- Zhou, S., X. Chen, X. Zhang and Y. Li. 2008. Improved salt tolerance in tobacco plants by co-transformation of a betaine synthesis gene *BADH* and a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *SeNHX1*. **Biotechnol. Lett.** 30: 369-376.

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ -นามสกุล	นายภวินท์ พานิชพรพันธุ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	31 มกราคม พ.ศ. 2527
สถานที่เกิด	ตำบลในเวียง อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) สาขาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ระดับปริญญาตรี - โครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดี วิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ระดับปริญญาโท - โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.-สถาบันการศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานกองทุน สนับสนุนการวิจัย (สกว.)