



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การบ่งชี้และแยกยีน Ca^{2+}/H^+ antiporter (CAX) ที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพดินเค็ม
Identification and Isolation of Ca^{2+}/H^+ antiporter (CAX) Gene, the Saline Responsive
Gene in Sugarcane

นางสาวชนากานต์ ลักษณะ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณพ.ศ. ๒๕๖๒
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ ๕๗๘๓๑
สัญญาเลขที่ ๔.๑/๒๕๖๒

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การบ่งชี้และแยกยีน Ca^{2+}/H^+ antiporter (CAX) ที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพดินเค็ม
Identification and Isolation of Ca^{2+}/H^+ antiporter (CAX) Gene, the Saline Responsive
Gene in Sugarcane

นางสาวชนากานต์ ลักษณะ
คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา
วิทยาเขตสระแก้ว

ได้รับงบประมาณ เดือนตุลาคม พ.ศ. ๒๕๖๑ – กันยายน พ.ศ. ๒๕๖๒

บทคัดย่อ

CAX (Vacuoles Ca^{2+}/H^{+} antiporter) เป็นยีนที่ควบคุมให้เกิดการสมดุลของ Ca^{2+} เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเค็มหรือความแห้งแล้ง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CAX ในอ้อย 3 พันธุ์ พันธุ์การค้า KPS 94-13 อ้อยป่า (*Saccharum spontaneum*) และอ้อยลูกผสมระหว่างอ้อยปลูกและอ้อยป่า (พันธุ์ไบโอเทค 2) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า มี 12 ตำแหน่งที่แตกต่างกัน แต่กรดอะมิโนจะมีเพียง 4 ตำแหน่งเท่านั้นที่แตกต่างกัน ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนรวมทั้งระดับการแสดงออกของยีนอาจมีความเกี่ยวข้องกัน และอาจจะสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด gene targeted marker เพื่อใช้ช่วยคัดเลือกอ้อยที่ทนทานต่อดินเค็มได้ ดังนั้นจึงทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยการถ่ายยีนนี้เข้าสู่ต้นยาสูบแล้วตรวจสอบการแสดงออกของยีน เมื่อมีการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในใบของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน ScCAX จากอ้อยทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าพันธุ์ป่ามีการแสดงออกของยีนสูงกว่ายาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และต้นที่ได้รับการถ่ายยีน ScCAX จากอ้อยป่า มีการแสดงออกของยีนสูงที่สุด

Abstract

CAX (Vacuoles Ca^{2+}/H^{+} antiporter gene is a gene that modulate specific Ca^{2+} signatures and Ca^{2+} homeostasis in plants under saline soil. The objective of this study was to clone of CAX from 3 sugarcane genotypes. It revealed that the full length of the gene contains 1254 nucleotides which encoded for 417 amino acid residues. There are 14 nucleotide positions and 3 amino acid residues different among 3 sugarcane genotypes. The variation in nucleotide and amino acid sequences and the expression levels of the gene may be related. This will be a promising for gene targeted marker development for selection of salt tolerance sugarcane. ScCAX from KPS 94-13, wild sugarcane and Biotech 2 were introduced to tobacco and found that transgenic tobacco introduced with ScCAX from wild sugarcane possessed the highest expression level.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล
(งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการ
วิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 4.1/2562

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	7
ผลการวิจัย	14
วิจารณ์ผลการวิจัย	36
สรุปผลการวิจัย	37
ผลผลิต	38
รายงานการเงิน	39
เอกสารอ้างอิง	40
ประวัตินักวิจัยและคณะ	43

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ส่วนประกอบพลาสมิด pGEM-ScCAX	10
2	ส่วนประกอบพลาสมิด Pcambia1304-ScCAX ที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน	10
3	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CAX ของพืชต่าง ๆ ในฐานข้อมูล Genbank	16
4	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ first strand cDNA ที่สังเคราะห์จาก total RNA จากอ้อย	17
5	พลาสมิด pGEM3 T easy เชื่อมต่อกับ full length ของยีน CAX	18
6	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ได้โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดที่ออกแบบเพื่อให้ได้ full length ของยีน CAX ของพืชต่าง ๆ ในฐานข้อมูล Genbank	21
7	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CAX ของอ้อย 3 พันธุ์	22
8	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CAX ในอ้อย 3 พันธุ์	25
9	Phylogenetic tree ของกรดอะมิโน CAX ของอ้อยทั้ง 3 สายพันธุ์ กับกรดอะมิโนของ CAX ในพืชชนิดต่างๆ	27
10	การแสดงออกของยีน CAX ในใบของอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 พันธุ์ biotech2 และ พันธุ์ป่า ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์	29
11	การแสดงออกของยีน CAX ในรากของอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 พันธุ์ biotech2 และ พันธุ์ป่า ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์	30
12	การแสดงออกของยีน CAX ในใบของอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 พันธุ์ biotech2 และพันธุ์ป่า ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์	31
13	การแสดงออกของยีน CAX ในรากของอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 พันธุ์ biotech2 และพันธุ์ป่า ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์	32
14	ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน ScCAX จากใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 เป็นพาหะด้วยเทคนิคพีซีอาร์	34
15	เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน ScCAX ในใบของอ้อย 3 พันธุ์ ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ นาน 3 วัน	35

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

อ้อยเป็นพืชไร่เศรษฐกิจที่สำคัญของไทยชนิดหนึ่ง พื้นที่ปลูกอ้อยทั้งประเทศในปีการผลิต 2558/2559 มีประมาณ 11.01 ล้านไร่ ในภาคตะวันออกก็เป็นอีกพื้นที่ที่มีการปลูกอ้อย ซึ่ง จ.สระแก้วมีพื้นที่ปลูกอ้อย 419,283 ไร่ หรือคิดเป็น 66% ของพื้นที่ปลูกในภาคตะวันออก สระแก้วจึงนับเป็นจังหวัดที่มีพื้นที่ปลูกอ้อยมากที่สุดในภาคตะวันออก โดยผลผลิตอ้อยเฉลี่ยของจังหวัดสระแก้วและภาคตะวันออกอยู่ที่ 9.39 และ 9.12 ตันต่อไร่ ตามลำดับ (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2559) ซึ่งถือว่าต่ำเพราะศักยภาพของพันธุ์อ้อยที่ปรับปรุงและส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกสามารถให้ผลผลิตได้มากกว่า 15 ตันต่อไร่ สาเหตุที่สำคัญสองประการที่ทำให้ผลผลิตอ้อยในภาคตะวันออกอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำ คือ การขาดแคลนน้ำชลประทานทำให้พื้นที่ปลูกมีความแห้งแล้ง และพื้นที่ปลูกบางส่วนเป็นดินเค็ม ในอดีตดินเค็มนั้นเกิดเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่ปัจจุบันปัญหาดินเค็มได้แพร่กระจายไปยังพื้นที่บางส่วนของภาคเหนือ ภาคกลาง รวมทั้งภาคตะวันออกด้วย ซึ่งดินเค็มนี้เป็นผลมาจากการใช้น้ำชลประทานที่ไม่ถูกต้อง รวมทั้งการขุดบ่อเก็บกักน้ำในแถบที่มีชั้นตะกอนเกลือสะสมอยู่ใต้ดิน ซึ่งจะทำให้เกิดการละลายเกลือออกมาอยู่ในน้ำใต้ดิน และเมื่อผิวดินแห้งน้ำที่มีเกลือละลายอยู่จะแทรกซึมขึ้นสู่ผิวดิน ทำให้มีการนำพาเกลือขึ้นมาสะสมในดินบนมากขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งพื้นที่ดินเค็มจะส่งผลกระทบต่อผลผลิตอ้อยเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเกิดภาวะแห้งแล้งจะยิ่งทำให้ผลกระทบจากดินเค็มเพิ่มมากขึ้นด้วย ภาวะความเค็ม ความแห้งแล้งจะทำให้มีความเข้มข้นของเกลือในระดับสูง จะทำให้สมดุลของไอออนต่างๆ เปลี่ยนแปลงไป เช่น สมดุลของ Na^+ , K^+ , Ca^{2+} และ Cl^- มีผลต่อแรงดันออสโมติกทำให้เกิดเป็นพืชต่อเซลล์

การเพิ่มผลผลิตอ้อยที่ปลูกในพื้นที่ดินเค็มสามารถทำได้โดยการปรับปรุงสภาพดินเค็ม แต่การปรับปรุงดินดังกล่าวต้องใช้เวลาาน ค่าใช้จ่ายสูง และต้องใช้ความรู้ทางวิชาหลายแขนงเข้าร่วมอย่างมาก และอีกวิธีหนึ่งคือการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนทานต่อดินเค็มมากขึ้น อ้อยพันธุ์ใหม่นี้จะสามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้ในระดับที่น่าพอใจแม้จะปลูกในดินที่เป็นดินเค็มก็ตาม แต่การปรับปรุงพันธุ์อ้อยโดยวิธีการมาตรฐาน (conventional breeding) ใช้เวลานาน และค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งอาจประสบความสำเร็จได้ยากเนื่องจากต้องมีแหล่งพันธุกรรมของอ้อยที่ทนทานต่อดินเค็ม ดังนั้นจึงมีนาเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาค้นหายีนที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อความเค็ม การบ่งชี้และการโคลนยีนบางยีนที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับกระบวนการการตอบสนองต่อความเค็ม จึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นแรกที่จะต้องทำ เมื่อทราบว่าอ้อยใช้ยีนชนิดใดตอบสนองต่อความเค็มแล้วจึงเป็นขั้นตอนที่จะใช้ประโยชน์จากยีนที่ค้นพบนั้น แนวทางหนึ่งที่จะใช้ประโยชน์จากยีนที่ค้นพบคือ การพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับลักษณะที่ยีนนั้นควบคุมอยู่ เพื่อใช้ในการคัดเลือกต้นหรือพันธุ์ที่มีความทนทานต่อดินเค็ม การใช้เทคนิคทางอณูวิทยาในการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนเค็มมากขึ้น จึงเป็นแนวทางปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนทานต่อสภาพดินเค็มได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นการเพิ่มผลผลิตอ้อยที่ง่ายที่สุดและประหยัดที่สุดสำหรับเกษตรกร

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์และโคลนยีน CAX ที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพดินเค็ม
2. ทราบรูปแบบการแสดงออกของยีนที่โคลนได้ เพื่อประโยชน์ในการหาแนวทางการใช้ประโยชน์จากยีนดังกล่าวในการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนดินเค็มในอนาคต

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้จะให้สภาพแวดล้อมที่เลียนแบบสภาพดินเค็มโดยการใช้สารละลายธาตุอาหารที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 และ 200 mM เพื่อให้อ้อยอยู่ในสภาพเครียดคล้ายที่เกิดจากดินเค็ม สภาพดังกล่าวจะกระตุ้นให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเค็มแสดงออกเพื่อความอยู่รอดของพืชเอง จากนั้นจึงสกัด total RNA ที่ประกอบไปด้วย mRNA ของยีนที่แสดงออกในสภาพดินเค็มปะปนอยู่ด้วย แล้วจึงเปลี่ยน mRNA ให้เป็น cDNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน CAX ในพืชหลายชนิด เพื่อให้จำเพาะกับยีน CAX ในอ้อย ซึ่งยีนนี้ทำหน้าที่เป็น Ca^{2+}/H^{+} antiporter โดย antiporter ชนิดนี้ขับ Ca^{2+} จากไซโทพลาสซึมเข้าสู่แวคิวโอล หลังจากนั้นใช้ปฏิกิริยา RT-PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน CAX เมื่อได้ cDNA บางส่วนของยีน CAX แล้วจึงนำมาศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหลือเพื่อให้ได้ครบทั้งยีน โดยเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลสาธารณะเพื่อบ่งบอกชนิดและหน้าที่ของยีน และตรวจสอบการแสดงออกของยีน

4. ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สมมุติฐานของการวิจัยนี้คือ พืชสามารถปรับตัวให้ทนต่อสภาพเค็มหรือสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอื่นๆ ได้นั้น จะขึ้นอยู่กับการแสดงออกของยีน ซึ่งการแสดงออกได้มากน้อยเร็วหรือช้า อาจขึ้นอยู่กับความแตกต่างขององค์ประกอบของยีนที่มีอยู่ในสายพันธุ์พืชที่ทนทานและอ่อนแอ เช่น ลำดับของนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่ยีนที่แตกต่าง ความแตกต่างของส่วนโปรโมเตอร์ ความแตกต่างของ transcription factor หรือ ยีนที่ควบคุมการลำเลียงโปรตรอนแลกกับโซเดียมและแคลเซียมไปสู่แวคิวโอล (vacuole ATPase) การทราบชนิดของยีน และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเค็ม จะทำให้เข้าใจถึงกระบวนการทำงานของพืชที่ทนทานหรืออ่อนแอต่อดินเค็มได้ ซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ได้ใช้เป็นแนวทางในการค้นหา ปรับปรุง และคัดเลือกพันธุ์หรือสายพันธุ์อ้อยที่มีความทนทานต่อดินเค็มได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีประสิทธิภาพมากขึ้น

5. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ความเค็ม (salinity) เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตของพืชลดลง เนื่องจากความเค็มจะไปยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆที่มีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าพืชบางชนิดสามารถปรับตัวเพื่อให้

อยู่รอดหรือเติบโตในสภาวะเค็มนี้ได้ การทนเค็มของพืชเป็นความสามารถที่พืชจะเจริญเติบโตและมีวงจรชีวิตสมบูรณ์ในสภาวะเค็มที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงในบริเวณราก พืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการทนเค็มต่างกัน โดยมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการทนเค็มของพืชเช่น พันธุกรรมของพืช ชนิดของเกลือ สภาพแวดล้อม สภาพของดิน และช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช พืชส่วนใหญ่มีผลผลิตลดลงเมื่อสารละลายดินมีค่าการนำไฟฟ้า (ECe) มากกว่า 2 dS/m พืชบางชนิดทนเค็มได้ถึง 4-8 dS/m แต่เมื่อระดับความเค็มสูงถึง 16 dS/m พืชเกือบทุกชนิดแสดงอาการที่ได้รับผลกระทบอย่างรุนแรง เมื่อพืชไม่ทนเค็มหรือทนเค็มน้อยได้รับผลกระทบจากความเค็มจะแสดงอาการคล้ายกับการที่พืชขาดน้ำ เช่น ชะงักการเจริญเติบโต ใบห่อลงเพื่อลดการคายน้ำทางปากใบ พืชบางชนิดอาจมีสีเขียวเข้มแกมน้ำเงิน (bluish green) มากกว่าพืชที่ขึ้นในดินปกติที่ปลูกในสภาพคล้ายคลึงกัน สีของใบพืชเปลี่ยนไปโดยจะเข้มกว่าปกติเนื่องจากใบมีคลอโรฟิลล์มาก และมีสารเคลือบใบ (cuticle) หนาเพื่อลดการสูญเสียน้ำ ขณะที่ในบางพืชอาจพบอาการปลายใบไหม้ (tip burn) เกิดจุดประ (mottles) บนใบ ใบม้วนและใบเหลืองเนื่องจากขาดคลอโรฟิลล์ ใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ปลายใบและขอบใบแห้งกรอบ (กรมพัฒนาที่ดิน, ม.ป.ป.)

ภายใต้สภาวะเค็ม พืชจะเกิดความเครียดในรูปแบบต่าง ๆ มีผลทำให้การเจริญเติบโต ผลผลิต และคุณภาพของพืชลดลง (Zhu, 2001) ได้แก่

1) ionic stress เกิดเนื่องจากความเป็นพิษของไอออนบางชนิดที่พืชดูดเข้าไปสะสมมากเกินไปจนเกินความต้องการทำให้ไปยับยั้งการทำงานของธาตุอาหารอื่น ๆ ได้ เช่น Na^+ และ Cl^- จะไปยับยั้งการดูดซึมธาตุอาหารที่จำเป็นต่อพืช เช่น โพแทสเซียม แคลเซียม ทำให้เกิดความเครียดเนื่องจากการขาดธาตุอาหารพืชร่วมด้วย เมื่อสมดุลของน้ำและไอออนทั้งในระดับเซลล์และต้นพืชถูกรบกวนทำให้แสดงลักษณะอาการขอบใบไหม้ และลูกกลมเข้าเส้นกลางใบ และการเปลี่ยนแปลงสมดุลของน้ำและไอออนจะนำไปสู่การทำลายเซลล์

2) osmotic stress เกิดจากการลดลงของค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในดิน (osmotic potential) เนื่องจากการที่มีเกลือละลายอยู่ ส่งผลให้เซลล์พืชมีอาการขาดน้ำและอาจถึงตายได้ เพราะน้ำจะไหลจากบริเวณที่มีความต่างศักย์สูง (เกลือเจือจาง) ไปสู่บริเวณที่มีความต่างศักย์ที่ต่ำกว่า (เกลือเข้มข้น) และหากสารละลายในดินเข้มข้นกว่าในพืช ความเป็นประโยชน์ของน้ำในดินจะลดลง ทำให้พืชไม่สามารถดูดน้ำจากดินได้ ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจากการขาดน้ำ

3) oxidative stress ซึ่งมีผลให้เมมเบรนเสียหาย เกิด metabolic toxicity และยับยั้งการสังเคราะห์แสง ทำให้การเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืชลดลงและอาจทำให้พืชตายในที่สุด

เมื่อพืชเจริญอยู่ภายใต้ภาวะที่มีความเค็มมักแสดงอาการหรือมีการตอบสนองได้หลายรูปแบบทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืช ระดับความเป็นพิษของไอออนและสภาพแวดล้อมที่พืชขึ้นอยู่ งานวิจัยส่วนใหญ่ประเมินความสามารถในการทนเค็มของพืชโดยใช้อัตราการอยู่รอดของพืชหรือใช้น้ำหนักแห้งของพืชเป็นเกณฑ์ (Munns, 2002) เช่นการศึกษาใน bread wheat (*Triticum aestivum* L.) พบว่าพันธุ์ที่ไม่ทนต่อความเค็ม

(เกลือ NaCl) อัตราการเจริญเติบโตจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการได้รับเกลือผลกระทบเกิดขึ้นโดยตรงต่อการสะสมน้ำหนักรากและผลผลิตของเมล็ดซึ่งเกิดจากความเครียดออสโมติกโดยพันธุ์ที่ทนเค็มผลผลิตเมล็ดลดลงเนื่องจากขนาดเมล็ดลดลงในขณะที่พันธุ์ไม่ทนเค็มเกิดจากจำนวนเมล็ดลดลง (Rahnama *et al.*, 2011) นอกจากนี้ในพืชสกุลข้าวฟ่าง (Sorghum) มีการศึกษาภายใต้ระบบ hydroponic พบว่าเมื่อพืชอยู่ในสภาพเค็ม (เกลือ NaCl) การเจริญเติบโตของพืชลดลงโดยน้ำหนักแห้งของพืชลดลงอย่างมากโดยเฉพาะน้ำหนักใบและในพันธุ์ที่ทนเค็มพบว่าน้ำหนักแห้งของรากเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับพันธุ์ไม่ทนเค็ม (Chaugool *et al.*, 2013)

โดยทั่วไปอ้อยปลูกสามารถทนเกลือได้เพียงประมาณ 1.7 ds/m หรือน้อยกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์ของเกลือในดิน ซึ่งจัดว่าเป็นพืชที่ไม่ทนเค็ม (moderately sensitive) (FAO, n.d.) ดังนั้นเมื่อปลูกอ้อยในสภาพดินเค็ม จะมีอาการไหม้ที่ปลายยอด ใบด่างเหลือง ผลผลิต จำนวนใบ การขยายตัวของใบและขนาดของใบลดลง จำนวนลำต่อกอมีข้อถี่และปล้องสั้นกว่าอ้อยที่ปลูกในสภาพปกติ (Abdul *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 1994) แต่ในอ้อยชนิดอื่น ได้แก่ *Saccharum arundinaceum*, *S. robustum* และ *S. spontaneum* มีข้อมูลว่าสามารถทนเค็มได้ (USDA-ARS U.S. Salinity Laboratory, 2013)

เมื่อพืชได้รับสภาพเครียดจากความเค็ม พืชจะมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะเครียดดังกล่าว ซึ่งกลไกที่ทำให้พืชปรับตัวและอยู่รอดได้ในสภาพเค็มในพืชมีหลายรูปแบบ เช่น

1) ความสามารถในการปรับตัวของเซลล์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิด ion homeostasis และ การปรับลดค่าแรงดันออสโมติก โดยการสร้างสาร osmolytes เมื่อเผชิญกับความเครียดจากสภาวะเค็ม (Cavaliere, 1983) นอกจากนี้พืชยังมีกลไกการจับเก็บโซเดียมเข้าสู่แวคคิวโอล ต้องอาศัยการทำงานของตัวสูบโปรตรอน ได้แก่ vacuole (V-ATPase), plasma membrane (P-ATPase), vacuolar pyrophosphatase membrane (V-PPase) และ ขบวนการ secondary transport ได้แก่ Na^+/K^+ antiporter และ $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter (CAX)

2) ความสามารถในการควบคุม ช่อมแซม หรือบรรเทาความเสียหายที่เกิดจากความเครียดจากสภาวะเค็ม ซึ่งมักพบในพืชที่มีถิ่นกำเนิดในสภาพที่เป็นดินเค็มหรือบึงน้ำเค็ม เช่น กลไกการขับเกลือส่วนเกินมาไว้ที่ผิวของใบโดยผ่านกระบวนการ ion exclusion หรือการกระจายเกลือไปเก็บไว้ตามส่วนต่าง ๆ ของพืช หรือการอวบน้ำ (succulent) พืชบางชนิดมี salt regulator ทำให้พืชดูดน้ำพองออก (swell) เมื่อเกลือเข้าไปในพืช ทำให้ความเข้มข้นของเกลือในเซลล์ไม่เพิ่มขึ้น หรือใบพืชมีสารเคลือบผิว (wax) เพื่อลดการสูญเสียน้ำ (Bradley and Morris, 1991)

3) กลไกการหลีกเลี่ยงเกลือ เพื่อให้เกลือเข้าไปในต้นได้น้อยที่สุด เพื่อให้พืชสามารถเจริญเติบโตในพื้นที่ดินเค็มได้ เช่น การยืดเวลาออกหรือเวลาแก่ หยุดกิจกรรมเพื่อการเจริญเติบโตจนกว่าสภาพแวดล้อมจะเหมาะสม (กรมพัฒนาที่ดิน, ม.ป.ป.)

กลไกที่แตกต่างกันเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าพืชมีวิวัฒนาการหลากหลายรูปแบบเพื่อให้สามารถอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะที่มีเกลือสูง และสะท้อนให้เห็นว่ามียีนที่ควบคุมกลไกการทำงานเหล่านี้ด้วยเช่นกัน

ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลต่าง ๆ มาใช้ในการศึกษาและจำแนกยีนที่เกี่ยวข้อง หรือตอบสนองต่อสภาวะเค็ม เช่น การทดลองใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD หาคำแหน่งยีนทนเค็มในมะเขือเทศ และความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลต่อลักษณะทนเค็มในช่วงระยะการงอกของเมล็ด (Fooland and Chen, 1998) หรือหาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุล RFLP กับลักษณะทนเค็มในข้าวสาลี (Dubcovsky *et al.*, 1996) ข้าว (Flowers *et al.*, 2000) การจำแนก stress-specific transcripts ในสภาวะเค็มโดยการหา expressed sequence tag (EST) เช่น การหาลำดับเบสของ 780 EST ของเซลล์แขวนลอยในข้าวที่ได้รับภาวะเค็ม พบว่ามีการแสดงออกของเอ็นไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับ glycolysis, tricarboxylic acid cycle และ ATP product (Umeda *et al.*, 1994) หรือ EST จากพืชทนเค็ม *M. crystallinum* พบว่าต้นที่ได้รับสภาพเครียดมีการแสดงออกของยีนมากกว่าต้นที่ไม่ได้รับสภาพเครียดประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ (Cushman *et al.*, 1999)

จากการศึกษาพบว่า เมื่อพืชได้รับสภาพเครียดจาก NaCl จะมีผลทำให้ความเข้มข้นของ Ca^{2+} ในไซโตพลาสซึมเพิ่มขึ้นอันเนื่องมาจากการเคลื่อนย้าย Ca^{2+} จากช่องว่างระหว่างเซลล์เข้าภายในเซลล์ (Knight *et al.*, 1997) ซึ่งจะนำไปมีผลกระตุ้นกระบวนการ signal transduction และทำให้พืชมีการปรับตัวสู้กับสภาพเค็มดังกล่าวได้ (Mendoza *et al.*, 1994; Knight *et al.*, 1997)

CAX (Vacuoles Ca^{2+}/H^+ antiporter) เป็นยีนที่ควบคุมให้เกิดการสมดุลของ Ca^{2+} เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเค็มหรือความแห้งแล้ง ยีน CAX จะรักษาระดับ Ca^{2+} ในไซโตพลาสซึมให้มีความเข้มข้นต่ำ โดยยีน CAX จะทำหน้าที่เป็น antiporter จะขับ Ca^{2+} จากไซโตพลาสซึมเข้าสู่แวคคิวโอล (Rasi-Caldogno *et al.*, 1995) ได้มีการโคลนและศึกษา ยีน CAX ในพืชหลายชนิด โปรตีน CAX1 จะทำงานร่วมกับโปรตีน SOS2 ที่อยู่ใน pathway SOS ที่พืชใช้ตอบสนองต่อความเค็ม โดยจะมีผลทำให้เซลล์สามารถรักษา Ca^{2+} ไว้ได้เมื่อมีปริมาณ Na^+ ในเซลล์มากเกินไป (Cheng *et al.*, 2004) ยีน CAX2 ในยาสูบ ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้าย Ca^{2+} , Mn^{2+} , and Cd^{2+} การกระตุ้นให้ยีน CAX2 ในยาสูบแสดงออกมากขึ้นจะมีผลให้ Ca^{2+} ถูกนำไปเก็บไว้ใน vacuole มากขึ้น (Cheng *et al.*, 2003) ในปี 2014 Kamiya *et al.* ได้แยกยีน CAX (*OsCAX1a*, *OsCAX1b*, *OsCAX2* และ *OsCAX3*) จากข้าว และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในยีสต์ พบว่า ทนทานต่อ Ca^{2+} ยกเว้น *OsCAX2* และ Senadheera *et al.* (2009) ได้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน CAX ในข้าวที่ทนเค็มและไม่ทนเค็ม พบว่าต้นที่ทนเค็มมีการแสดงออกของยีน CAX ต่ำกว่าต้นที่ไม่ทนเค็ม

ในอ้อยนั้นมิงงานวิจัยหลายชิ้นที่พยายามโคลนบางส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองต่อความเค็ม ซึ่งจะสามารถนำมาศึกษาต่อยอดได้ทันที อันจะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์อ้อย และการพัฒนาเป็น specific marker สำหรับใช้ในการคัดเลือกอ้อยทนเค็มได้ในอนาคต เช่นยีนในกลุ่ม *histidine*

containing phosphotransferase (HPT) (ภัทรราวี, 2544) ยีน *cysteine proteinase inhibitor (cystatin)* (วรัญญา, 2546) และยีน *vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter (SoNHX1)* (ภวินท์, 2554)

การปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ต้านทานต่อดินเค็มสามารถทำได้ทั้งโดยวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐาน (conventional breeding) หรือโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่จัดว่าเป็นเทคโนโลยีใหม่ แต่อย่างไรก็ตาม การปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจให้ทนทานต่อดินเค็มโดยใช้วิธีการมาตรฐานประสบความสำเร็จในวงจำกัด เนื่องจากความแปรปรวนทางพันธุกรรมมีจำกัด (Ashraf and Akram, 2009) ดังนั้นการใช้เทคโนโลยีชีวภาพเข้าช่วยปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนทานต่อดินเค็มจึงมีโอกาประสพความสำเร็จสูง โดยต้องเริ่มจากการค้นหาและศึกษาถึงยีนที่อ้อยใช้ตอบสนองเพื่อการปรับตัวให้อยู่รอดในสภาพดินเค็มให้ได้ จะทำให้ทราบว่าอ้อยใช้กลไกชนิดใดเป็นกลไกหลักในการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในสภาวะดังกล่าว และเพื่อให้สามารถใช้ประโยชน์จากองค์ความรู้นี้ไปประยุกต์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนทานดินเค็มในที่สุด

วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. อ้อยที่ใช้ศึกษาประกอบด้วยอ้อย 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์การค้า KPS 94-13 อ้อยป่า (*Saccharum spontaneum*) และอ้อยลูกผสมระหว่างอ้อยปลูกและอ้อยป่า (พันธุ์ไบโอเทค 2)
2. อุปกรณ์สำหรับการค้นหา ยีน และการแสดงออกของยีน CAX
 - 2.1 เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ ปีกเกอร์ กระจกบอทวง
 - 2.2 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
 - 2.3 ตู้อบ (hot air oven)
 - 2.4 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH - meter)
 - 2.5 เครื่องชั่งสาร (balance)
 - 2.6 เตาไมโครเวฟ (microwave)
 - 2.7 โกร่งบดตัวอย่าง
 - 2.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) และเครื่องกวนตะกอน (vortex[®])
 - 2.9 เครื่อง Thermal Cycler สำหรับทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)
 - 2.10 ชุดเครื่องมือ gel documentation system พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพเจล
 - 2.11 ชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส
 - 2.12 เครื่อง real time Biorad CFX96[®].
 - 2.13 เครื่อง NanoDrop รุ่น 8000
 - 2.14 เครื่องเขย่า (shaker)
 - 2.15 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge)
3. สารเคมีสารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอและ สังเคราะห์ first stranded cDNA จากพืช
4. สารเคมีตามสูตร Hoagland สำหรับการปลูกอ้อยในสารละลายแบบ hydroponic
5. สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารสูตร LB สำหรับโคลนยีน CAX
6. ไพรเมอร์สำหรับโคลนยีน และตรวจสอบการแสดงออกของยีน
 - ไพรเมอร์สำหรับโคลนยีน full length CAX
CAX F 5' ATGGAGACTCCTCAAATC
CAX R 5' TCAGCCATCACTTGATTG
 - ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน
SoCAX RT-F TGGACGGAGCAACATTTACA
SoCAX RT-R ATCAGATGCTCCCTCAATGG

วิธีการ

1. การเตรียมต้นอ้อย

1.1 การเตรียมต้นอ้อย ตัดต้นอ้อยทั้ง 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์การค้า KPS 94-13 พันธุ์ป่าและลูกผสมระหว่างอ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก ที่มีอายุประมาณ 8 เดือน โดยตัดเป็นท่อน แต่ละท่อนมีตาเพียงหนึ่งตา เพาะท่อนพันธุ์อ้อยในกระบะที่ผสมทราย:ขี้เถ้าแกลบ ในสัดส่วน 1:1 โดยวางให้ส่วนตาอยู่ด้านบน รดน้ำให้ชุ่มทุกวัน จนกว่าตาจะงอกเป็นต้นที่มีอายุประมาณ 1.5-2 เดือน จึงนำมาล้างเอาวัสดุปลูกออกแล้วย้ายไปเลี้ยงในสภาพ hydroponic ในสารละลาย 1/10 Hoagland ปรับ pH เป็น 5.6 ในกระบะมั่ง โดยตั้งต้นอ้อยบนแผ่นโฟมหนา 2 นิ้ว แต่ละกระบะมั่งมีอ้อยทั้ง 3 พันธุ์ๆ ละ 3 ต้น บี้มอากาศลงสู่สารละลายตลอดเวลา เพาะเลี้ยงอ้อยในสภาพดังกล่าวเพื่อให้อ้อยปรับตัวได้อย่างน้อย 2 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนถ่ายสารละลายใหม่อย่างน้อยทุกๆ 5 วัน หลังจากนั้นนำต้นอ้อยทั้ง 3 พันธุ์ มาปลูกในสภาพเค็ม โดยเติมเกลือ NaCl ลงในสารละลายธาตุอาหารในความเข้มข้น 200 mM เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปสกัด total RNA เพื่อใช้ในการค้นหายีนต่อไป

2. การค้นหายีนที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อความเค็ม

2.1 การสกัด total RNA โดยสกัด total RNA จากส่วนราก และใบอ่อนของอ้อยที่ได้รับความเค็มที่ 200 mM เป็นเวลา 3 วัน ตามวิธีการของ Laksana and Sontichai (2015) ดังนี้ นำใบอ่อนและรากของอ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูกและลูกผสมระหว่างอ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูกมาบดในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด ย้ายตัวอย่างที่บดแล้วลงหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม extraction buffer ที่ประกอบด้วย 2% CTAB, 2% PVP, 2M NaCl, 25mM EDTA และ 100 mM Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วเติม β -mercaptonethanol ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย Vortex และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าแรงๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใสหลอดใหม่ แล้วเติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตรหนึ่งเท่าของปริมาตรส่วนใสผสมให้เข้ากัน โดยเขย่าแรงๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใสหลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ 5M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาทีแล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ที่เย็น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วตากตะกอนประมาณ 10 นาที และละลายตะกอนด้วยการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการทำลายเอนไซม์ RNase (DEPC-dH₂O) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

นำ total RNA ที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นโดยการทำให้เจลอีเล็กโทรโฟรีซิสด้วย 1.5% อะกาโรสใน 0.5X TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

การกำจัดจีโนมดีเอ็นเอออกจากตัวอย่าง total RNA ทำโดยนำ total RNA ที่สกัดได้ 1 ไมโครกรัม เติม 10X DNase I reaction buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร DNaseI ปริมาตร 1 ไมโครลิตร DEPC-dH₂O ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม 0.5 M EDTA 1 ไมโครลิตร แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็ง 1 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNase I แล้วทำการตรวจสอบผลการกำจัดจีโนมดีเอ็นเอด้วยการทำให้เจลอีเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ 0.8% อะกาโรสใน 0.5X TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 40 นาที

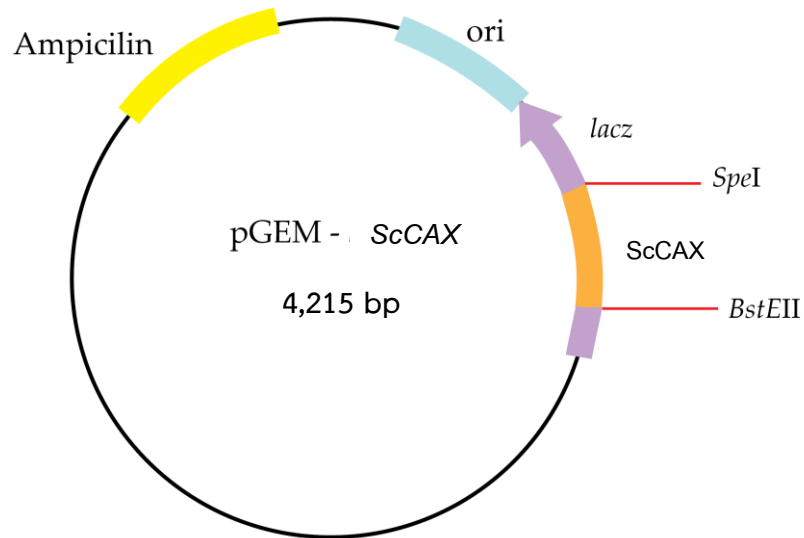
2.2 การสังเคราะห์ first strand cDNA จาก total RNA นำ total RNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) ผสมกับ 100 μ M oligo (dT)₂₀ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10 mM dNTP ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย DEPC-dH₂O จนครบปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และบ่มต่อที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติม 5x reaction buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร RiboLock RNase inhibitor ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 10 mM dNTP ปริมาตร 2 ไมโครลิตร Revert Aid M-MuL VRT ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและบ่มต่อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปแช่ในน้ำแข็ง

2.3 การออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน CAX ซึ่งเกี่ยวข้องในกระบวนการตอบสนองต่อสภาพดินเค็มโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลสาธารณะ เช่น Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) และโปรแกรมที่เกี่ยวข้องกับการออกแบบไพรเมอร์เช่น Primer3 จาก web site <http://simgene.com/Primer3> เพื่อใช้โคลนยีนดังกล่าวจากอ้อยที่ได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็ม จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนที่ออกแบบไว้เพื่อสร้าง cDNA บางส่วนของยีน เป้าหมาย CAX-F1 และ CAX-R1

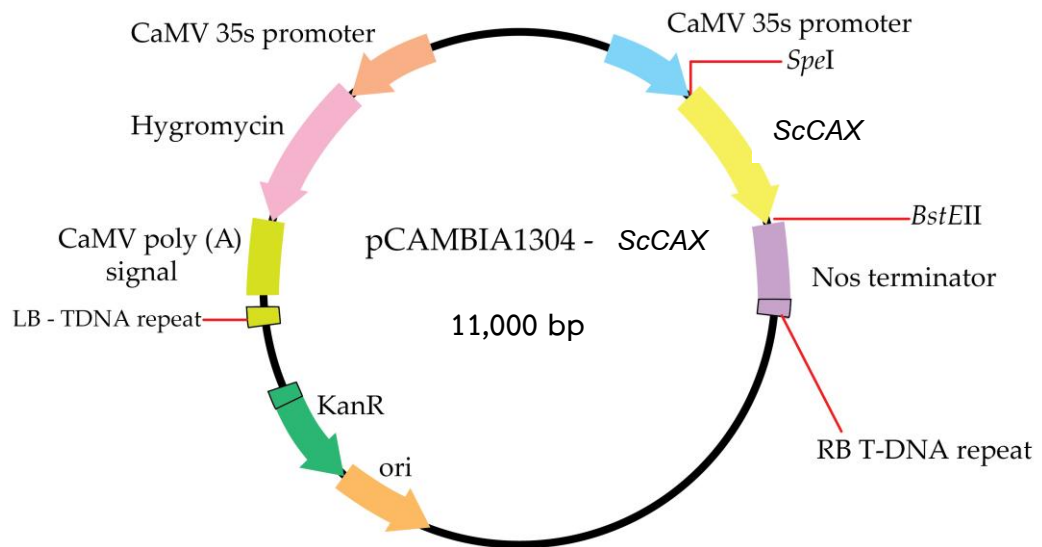
5. ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยการทำให้ gene transformation เข้าสู่ยาสูบ

5.1 การเตรียม plasmid สำหรับการถ่ายยีน

เตรียมชิ้นส่วนของยีน ScCAX โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *SpeI* ทางด้าน Forward และ ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *BstEII* ทางด้าน Reverse แล้วนำไปเชื่อมต่อกับ pGEM T- easy plasmid (ภาพที่ 1) นำ pGEM T easy-CAX มาตัดด้วยเอนไซม์ *SpeI* และ *BstEII* นำชิ้นส่วนที่ตัดได้มาเชื่อมเข้ากับพลาสมิด pCAMBIA-1304 (ภาพที่ 2) ที่ตัดด้วย เอนไซม์ *SpeI* และ *BstEII* เช่นเดียวกัน แล้วนำพลาสมิด pCAMBIA-CAX 1304 เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* เพื่อเพิ่มปริมาณ



ภาพที่ 1 ส่วนประกอบพลาสมิด pGEM - ScCAX



ภาพที่ 2 ส่วนประกอบของพลาสมิด pCAMBIA1304 - ScCAX ที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน

5.2 การนำพลาสมิด pCAMBIA-CAX 1304 เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 โดยวิธี heat shock

นำพลาสมิด pCAMBIA-CAX 1304 ซึ่งมีขนาดประมาณ 11,000 คู่เบส เข้าสู่ competent cell ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดนี้ โดยเติมพลาสมิดสายผสม ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มี competent cell 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ บ่มบนน้ำแข็งนาน 30 นาที แล้วจุ่มในน้ำที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที รีบ

นำกลับมาบ่มในน้ำแข็งอีก 5 นาที จากนั้นเติมอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารเก่าทิ้ง ดูอาหารเหลวสูตร LB ออกปริมาตร 1,500 ไมโครลิตร แล้วผสมเซลล์ที่ตกตะกอนกับอาหาร LB นำเซลล์แขวนลอยเชื้อที่ได้มาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารสูตร LB ที่เติม สารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

5.3 การตรวจสอบโคลนที่คาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสม

สุ่มโคลนที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากแบคทีเรียด้วยชุดสกัดพลาสมิด NucleoSpin (บริษัท Macherey Nagel)

ตรวจสอบพลาสมิดสายผสมด้วยการย่อยดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเอนไซม์ *SpeI* และ *BstEII* ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 40 นาที โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

5.4 การนำพลาสมิด pCAM-ScCAX 1304 เข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

นำพลาสมิดที่ได้รับการตรวจสอบว่ามียีน CAX แล้วเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เตรียมโดยเติมพลาสมิดสายผสม ปริมาตร 1 ไมโครกรัม ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ที่มี competent cell ของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วบ่มในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วย้ายมาแช่ในไนโตรเจนเหลว นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำมาบ่มในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วย้ายมาแช่ในไนโตรเจนเหลว นาน 5 นาที อีก 2 รอบ แล้วเติมอาหารสูตร LB ปริมาตร 1 มิลลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง แล้วจึงปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารเก่าทิ้ง 800 ไมโครลิตร แล้วผสมเซลล์ที่ตกตะกอนกับอาหาร LB นำเซลล์แขวนลอยเชื้อที่ได้มาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารสูตร LB ที่เติม สารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน ตรวจสอบชุดยีน CAX จากโคลนที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับตรวจหายีน CAX ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis ก่อนจะนำเซลล์เลี้ยงเพิ่มปริมาณเพื่อใช้ในการถ่ายยีนต่อไป

6. การถ่ายยีน CAX เข้าสู่ต้นยาสูบ

6.1 การเตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิดสายผสม

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของอะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pCAMBIA1304 – ScCAX ซึ่งมียีน *hygromycin* เป็นยีนคัดเลือก เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยเชื้อ 0.2 มิลลิลิตร (OD₆₀₀ ~ 0.8-1) เติมนลงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสาร acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 16 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เทอาหารเลี้ยงเชื้อออก เติมหาอาหารเหลวสูตรชักนำแคลลัส 20 มิลลิลิตร (ไม่เจือจางเชื้อ) กวนตะกอนเซลล์ให้แขวนลอย แล้วเติมสาร acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์

6.2 การถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

เตรียมเนื้อเยื่อใบยาสูบ โดยทำให้ใบยาสูบเกิดบาดแผลด้วยการตัดใบยาสูบให้ได้ขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร จำนวน 100 ชิ้น ใส่ในอาหารสูตร MS แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อทำให้เกิดบาดแผล หลังจากนั้นย้ายเนื้อเยื่อมาใส่ลงในภาชนะที่มีเซลล์แขวนลอยเชื้อในอัตราส่วน 1:0 ร่วมกับสาร acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ ปิดฝาเขย่า ให้ชิ้นส่วนใบสัมผัสกับเชื้ออย่างทั่วถึง นาน 20 นาที แล้วซบแบคทีเรียส่วนเกินออกจากชิ้นใบด้วยกระดาษซับที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำแคลลัส โดยใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสาร acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ และฮอร์โมน NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในที่มีดินาน 2 วัน ล้างเนื้อเยื่อด้วยอาหารเหลวสูตรชักนำแคลลัสที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่านาน 30 นาที จากนั้นย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 7 วัน จากนั้นย้ายมาเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำต้นที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ hygromycin ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ จนแคลลัสพัฒนาเป็นต้น นำต้นที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เพื่อเพาะเลี้ยงให้เป็นต้นเดี่ยวที่สมบูรณ์ต่อไป

7. การตรวจสอบต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน

ตัดปลายใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนและมีชีวิตรอด มาตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ชุด kit Phire Plant Direct PCR Master Mix (Thermo Scientific™) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการใช้ชุด kit มาตรวจสอบยีน ScCAX ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน ScCAX

เริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิสำหรับ denaturation รอบแรกที่ 98 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้น ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จำนวน 35 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ สำหรับ denaturation, annealing และ extension เป็น 98, 56 และ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที, 5 วินาที และ 20 วินาที ตามลำดับ และใช้อุณหภูมิสำหรับ extension รอบสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง อัลตราไวโอเล็ต

8. ตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ถ่ายเข้ายาสูบด้วยวิธี real time PCR

การเตรียมต้นยาสูบที่ได้ได้รับการถ่ายยีน ScCAX จากอ้อยพันธุ์ปลูก KPS 94-13 พันธุ์ป่า และลูกผสม ระหว่างอ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก ที่มีอายุประมาณ 1 เดือน เลี้ยงในสภาพ hydroponic ในสารละลาย 1/10 Hoagland ปรับ pH เป็น 5.6 ในกระละมั่ง โดยตรึงต้นยาสูบบนแผ่นโฟมหนา 2 นิ้ว แต่ละกระละมั่งมีต้นยาสูบ ที่ได้รับการถ่ายยีน ScCAX จากอ้อยทั้ง 3 พันธุ์ ละ 3 ต้น ป้อนอากาศลงสู่สารละลายตลอดเวลา เพาะเลี้ยง ยาสูบในสภาพดังกล่าวเพื่อให้ยาสูบปรับตัวได้อย่างน้อย 2 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนถ่ายสารละลายใหม่อย่างน้อย ทุกๆ 5 วัน หลังจากนั้นนำต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน ScCAX จากอ้อยทั้ง 3 พันธุ์ มาปลูกในสภาพเค็ม โดยเติมเกลือ NaCl ลงในสารละลายธาตุอาหารในความเข้มข้น 100 200 และ 300 mM เป็นเวลา 1 3 และ 5 วัน แล้วนำไปสกัด total RNA เพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real time PCR

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน CAX ด้วยโปรแกรม primer 3

(<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีนที่เป็น full length ที่หาได้ โดยกำหนดให้ DNA ที่เป็นผลผลิตของปฏิกิริยามีขนาด 150-200 คู่เบส จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา real-time PCR กับ cDNA ของใบและรากที่สังเคราะห์จาก RNA ของอ้อยที่ได้รับ สภาพเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน โดยใช้ยีน *GADPH* และ *EF1 α* เป็นยีนอ้างอิง ทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยเครื่อง Mastercycler® ep realplex บริษัท Eppendorf (Thailand) ใช้น้ำยาชุด SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit บริษัท BIOLIN โดยการเติม 2X SensiFAST SYBR No-ROX Mix ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วเติม forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น ชนิดละ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรชนิดละ 0.4 ไมโครลิตร เติม first stranded cDNA ความเข้มข้น 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และเติม DEPC - treated water ปริมาตร 3.2 ไมโครลิตร

ผลการวิจัย

การค้นหายีน CAX ที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อความเค็ม

การสกัด total RNA

นำรากและใบอ่อนของอ้อยพันธุ์การค้า KPS 94-13 อ้อยป่า (*Saccharum spontaneum*) และอ้อยลูกผสมระหว่างอ้อยปลูกและอ้อยป่า (พันธุ์ไปโอเทค 2) ทั้งที่ไม่ได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็มและที่ได้รับความเค็มจากโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ นาน 0, 1, 2 และ 3 วันมาสกัด total RNA พบว่า สามารถสกัด total RNA ที่มีคุณภาพดี โดยค่า A280/A260 จะอยู่ในช่วง 1.8-2.0 จึงนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

การสังเคราะห์ first strand cDNA

ใช้ first strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific) มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ส่วนประกอบ Total RNA (1 ไมโครกรัม), 100 mM Oligo dT primer, 10 mM dNTP, dH₂O, 5x Reaction buffer, RiboLockRNase Inhibitor, RevertAid M-MuLVRT บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเติม RNase H ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นตรวจสอบประสิทธิภาพของ first strand cDNA โดยใช้เทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ housekeeping gene (*GADPH*) ดังนี้

Sc-GADPH -F: 5'- CACGGCCACTGGAAGCA -3'

Sc-GADPH -R: 5'- TCCTCAGGGTTCCTGATGCC -3'

ใช้โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาดังนี้ pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จากนั้นทำ 30 รอบตั้งแต่ denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที annealing ที่ 58 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และ รอบสุดท้ายเป็น final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ผลผลิตของปฏิกิริยาเป็น DNA ขนาด 200 bp การการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *GADPH* ให้ผลผลิตเป็น DNA ขนาด 200 bp จริง แสดงว่า first strand cDNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมีคุณภาพดี สามารถนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไปได้

การค้นหายีน Ca²⁺/H+antipoter (CAX)

ออกแบบไพรเมอร์ชนิด degenerate ที่จำเพาะกับยีน CAX โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนอนุรักษ์ของยีน CAX จากพืชชนิดต่าง ๆ เช่น ข้าวโพด (*Zea mays*) Accession number NM_001348553.1 Accession number ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) Accession number XM_002447192.2, ข้าวญี่ปุ่น (*Oryza sativa*)

Japonica) Accession number XM_015780202.2, *Brachypodium distachyon* (XM_014896183.2), ข้าวบาเลย์ (*Hordeum vulgare*) AB218888.1, และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *GADPH* Accession number NM_001136991 (*Zea mays*), AY742219 (*Saccharum officinarum*), XM_003569070 (*Brachypodium distachyon*), GU290546 (*Zoysia japonica*) ที่ปรากฏในฐานข้อมูล Genbank ออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม gentyx และ GeneDoc ดังนี้ XM_002447192.2 (*Sorghum bicolor*) NM_001348553.1 (*Zea mays*) AB218888.1 (*Hordeum vulgare*) XM_015780202.2 (*Oryza sativa Japonica*)

Partial CAX Forward : 5' CTTTTCAGCATGCTAGGM 3'

Reverse : 5' CTCCTCAATGGCGTTAA3'

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย first-strand cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10mM dNTP ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร 50mM MgCl₂ ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร *Taq* polymerase (invitrogen) 0.5 ไมโครลิตร 10xreaction buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10μM forward และ reverse ของไพรเมอร์สำหรับยีน *MIPS* ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยใช้โปรแกรมในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ preliminary denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำโปรแกรม denaturing ถึง extension จำนวน 30 รอบ แล้วตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตรวจสอบการเพิ่มปริมาณด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน 0.7% อะกาโรส ใน 0.5X TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 35 นาที พบว่า เกิดแถบ DNA ขนาดประมาณ 636 bp (ภาพที่ 3)

เมื่อสกัด DNA จากเจลเพื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ผลดังนี้

CTTTTCAGCATGCTAGGAATAACACCTTTAGCAGAGCGATTGGGATATGCGACTGAGCAGCTTGCAATAT
 ACACTGGTCCAACAGTTGGTGGCCTTCTGAATGCTACATTTGGAAATGCAACTGAAATGATCATTGCAATA
 TATGCTTTGAAAAATGGAATGATCCGAGTAGTGCAGCAGTCACTATTGGGTTCCATTTTGTCAAATATGCT
 GTTGGTTATGGGCTGTGCTTTCTTTGCTGGTGGTATTGTTTCATCGCAACAAAGACCAAGTCTTCAGTAAGG
 CAACTGCAGTTGTCAACTCAGTTTTACTGTTGATGGCTGTCATGGGATTGATGTTTCCTGCCGTTCTTCAT
 TTCACTCATTGAGAAGTGCAGGCAAGGAGCATCAGAAGTTGCTCTTTCAAGGTTTCAGTAGTTGTATTATGCT
 TGTGGCGTACGCAAGCTATCTCTATTTCCAATTAAGTGGACGGAGCAACATTTACAGTCCAATAGGCAGT
 GAAGAGGCGCCTAATGAGGATACAGTGAAGAAGATGAAGAAGCTGAGATTGGCATGTGGGAGGCAGTAA
 CATGGCTTGCGGTGTTAACTCTGGGTGTCTTTCTTTCTGAGTACCTAGTTAACGCCATTGAGGGAGCA

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Sorghum bicolor vacuolar cation/proton exchanger 3 (LOC8079604), transcript variant X2, mRNA	1112	1112	100%	0.0	99%	XM_002447192.2
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Sorghum bicolor vacuolar cation/proton exchanger 3 (LOC8079604), transcript variant X1, mRNA	1112	1112	100%	0.0	99%	XM_021463428.1
<input type="checkbox"/>	Zea mays Vacuolar cation/proton exchanger 2 (LOC100384161), mRNA	1058	1058	100%	0.0	97%	NM_001176739.2
<input type="checkbox"/>	Zea mays full-length cDNA clone ZM_BFc0145J04 mRNA, complete cds	1058	1058	100%	0.0	97%	BT069344.1
<input type="checkbox"/>	Zea mays uncharacterized LOC541635 (pco139871a), transcript variant 2, mRNA	1040	1040	100%	0.0	96%	NM_001348553.1
<input type="checkbox"/>	Zea mays uncharacterized LOC541635 (pco139871a), transcript variant 1, mRNA	1040	1040	100%	0.0	96%	NM_001111390.2
<input type="checkbox"/>	Zea mays full-length cDNA clone ZM_BFc0079C07 mRNA, complete cds	1040	1040	100%	0.0	96%	BT055624.1
<input type="checkbox"/>	Zea mays clone 425413 vacuolar cation/proton exchanger 3 mRNA, complete cds	1040	1040	100%	0.0	96%	EU973976.1
<input type="checkbox"/>	Zea mays full-length cDNA clone ZM_BFb0088J10 mRNA, complete cds	1040	1040	100%	0.0	96%	BT035931.1
<input type="checkbox"/>	Zea mays ZCAX2 mRNA for Ca²⁺/H⁺ antiporter, complete cds	1034	1034	100%	0.0	96%	AB044567.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Setaria italica vacuolar cation/proton exchanger 3 (LOC101768889), transcript variant X3, mRNA	917	917	100%	0.0	92%	XM_012844773.2
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Setaria italica vacuolar cation/proton exchanger 3 (LOC101768889), transcript variant X2, mRNA	917	917	100%	0.0	92%	XM_012844772.2
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Setaria italica vacuolar cation/proton exchanger 3 (LOC101768889), transcript variant X1, mRNA	917	917	100%	0.0	92%	XM_004960193.3

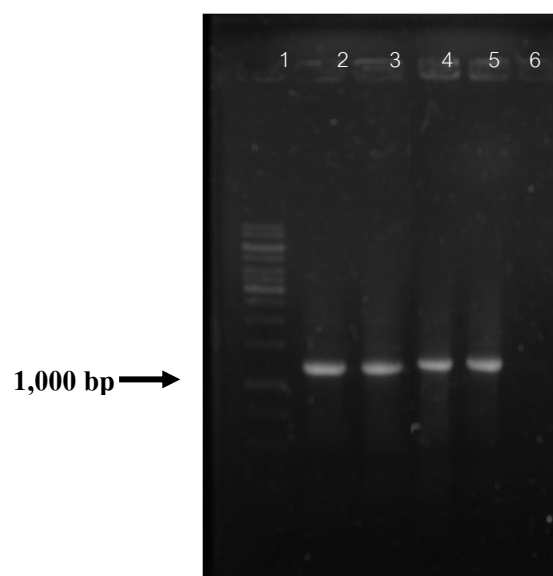
ภาพที่ 3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีน DNA ที่สังเคราะห์ได้โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด degenerated primer จากบริเวณอนุรักษ์ของยีน CAX ของพืชต่าง ๆ ในฐานข้อมูล Genbank

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ในฐานข้อมูลสาธารณะโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BLASTN ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์นี้มีความเหมือนกับยีน CAX ในพืชถึง 99% (ภาพที่ 1)

จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ เพื่อค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งทางด้าน 5' และ 3' เพื่อให้ได้ full length ของสาย DNA ที่ได้จากการทำ PCR ครั้งแรก โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้เป็นดังนี้

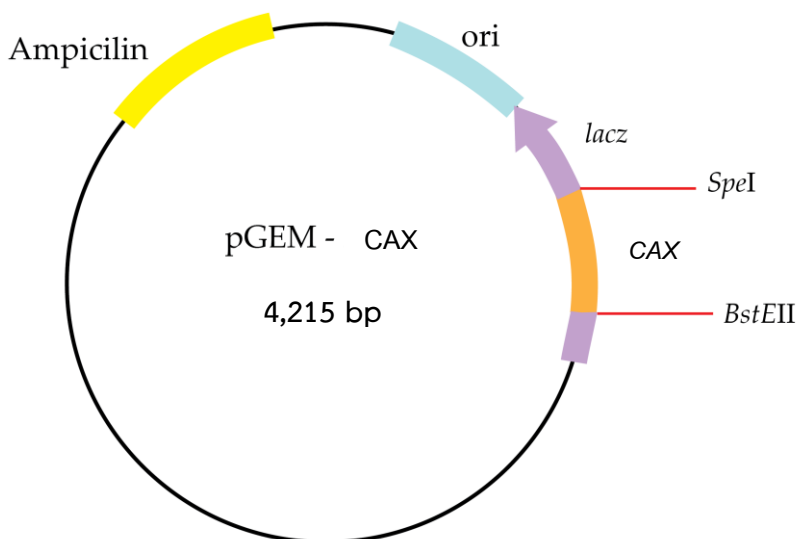
Full lengthCAX F 5' ATGGAGACTCCTCAAATC

Full lengthCAX R 5' TCAGCCATCACTTGATTG



ภาพที่ 4 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ first strand cDNA ที่สังเคราะห์จาก total RNA จากอ้อยพันธุ์การค้า (KPS 94-13) (lane2) อ้อยพันธุ์ป่า(lane3) และอ้อยพันธุ์ลูกผสม (lane 4,5) ที่ได้รับ NaCl 200 mM นาน 3 วัน เป็นแม่แบบและทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อให้ได้ full length lane 1= 1 kb marker lane 6= negative (dH₂O)

สกัดแยกแถบดีเอ็นเอออกจากเจลของยีน CAX จากอ้อยทั้ง 3 สายพันธุ์ แล้วนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM3 T easy เพื่อนำส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 5 พลาสมิด pGEM3 T easy เชื่อมต่อกับ full length ของยีน CAX

เมื่อทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ first strand cDNA เป็นแม่แบบ ได้แถบ DNA ขนาดประมาณ 1,254 bp (ภาพที่ 2) และเมื่อนำ DNA ดังกล่าวไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่วิเคราะห์ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วยส่วน start และ stop codon ด้วย ดังนี้

อ้อยลูกผสมระหว่างอ้อยปลูกและอ้อยป่า (พันธุ์โบโฮเทค 2)

```

ATGGAGACTCCTCAAATCGAGATGGGCGTTTTCAAGGTCAACAGCCCCGCAAGTGCCCAACGGTGGGTTGC
AGCCCACCGTGGCCTCCTCCTGGAAGTCGCGAGGGACGGTCGAGAGGGCGCTCAAGAGCATCAGGATCG
TCGTTTTCACTTCCAAGCTCAACTTGCTCATGCCGTTCCGGCCTGCGTCCATCATTCTCCACTTCACGACT
AGGAGGCATGGATTGTTTTCTTTTCAGCATGCTAGGAATAACACCTTTAGCAGAGCGATTGGGATATG
CGACTGAGCAGCTTGCAATATACACTGGTCCAACAGTTGGTGGCCTTCTGAATGCTACATTTGGAAATGCA
ACTGAAATGATCATTGCAATATATGCTTTGAAAAATGGAATGATCCGAGTAGTGCAGCAGTCACTATTGGG
TTCCATTTTATCAAATATGCTGTTGGTTATGGGCTGTGCTTTCTTTGCTGGTGGTATTGTTTCATCGCAACA
AAGACCAAGTCTTCAGTAAGGCAACTGCAGTTGTCAACTCAGGTTTACTGTTGATGGCTGTCATGGGATTG
ATGTTTCCTGCTGTTCTTCATTTCACTCATTGCAAGTGCAGGCAAGGAGCATCAGAGGTTGCTCTTTCAAG
GTTTCAGTAGTTGTATTATGCTTGTGGCATAACGCAAGCTATCTCTATTTCCAATTAAGTGGACAGAGCAACA
TTTACAGTCCAATAGGAAGTGAAGAGGGCGCCTAATGAGGATACCGTGGGAAGAAGATGAAGAAGCTGAGAT
TGGCATGTGGGAGGCAGTAACATGGCTTGCAGTGTAACTCTGGGTGCTTTTTCTTTCTGAGTACCTAG
TTAACGCCATTGAGGGAGCATCTGATTCATTGAACCTTCCGGTGGCTTTTATCAGTGTTATTTTGCTTCTCT
ATTGTGGGTAATGCAGCTGAACATGCAAGCGCAATAATGTTTGCCATGAAAGATAAACTTGACATAACACT

```


CGGTGTTGCAATTGGTTCATCAACACAGATATCAATGTTTGTGATTCCATTTTGTGTTGTTATTGGTTGGG
 TGATGGGACAAAAGATGGACTTGAATTTTCAGCTATTTGAGACAGCAACTCTCTTCATAACAGTATTCTGTG
 GTGGCATTATGCTACAGGATGGCACCGCGAACTACTTGAAAGGACTTATGCTGATCCTATGTTATCTAAT
 AGTTGCTGCCAGTTTCTTTGTTTCATGTTGATCCACAATCAAGTGATGGCTGA

อ้อยป่า (*Saccharum spontaneum*)

ATGGAGACTCCTCAAATCGAGATGGGCGTTTTCAAGGTCAACAGCCCCGCAAGTGCCCAACGGTGGGTTGC
 AGCCACCGTGGCCTCCTCCTGGAAGTCGCGAGGGACGGTCGAGAGGGCGCTCAAGAGCATCAGGATCG
 TCGTTTTCACTTCCAAGCTCAACTTGCTCATGCCGTTCCGGCCTGCGTCCATCATTCTCCACTTCACGACC
 AGGAGGCATGGATTGGTTTTCTTTTCAGCATGCTAGGAATAACACCTTTAGCAGAGCGATTGGGATATG
 CGACTGAGCAGCTTGCAATATACTGGTCCAACAGTTGGTGGCCTTCTGAATGCTACATTTGGAAATGCA
 ACTGAAATGATCATTGCAATATATGCTTTGAAAAATGGAATGATCCGAGTAGTGCAGCAGTCACTATTGGG
 TTCCATTTTGTCAAATATGCTGTTGGTTATGGGCTGTGCTTTCTTTGCTGGTGGTATTGTTTCATCGCAACA
 AAGACCAAGTCTTCAGTAAGGCAACTGCAGTTGTCAACTCAGGTTTACTGTTGATGGCTGTCATGGGATTG
 ATGTTTCCTGCTGTTCTTCATTTCACTCATTGCAAGTGCGGCAAGGAGCATCAGAGGTTGCTCTTTCAAG
 GTTCAGTAGTTGTATTATGCTTGTGGCATAACGCAAGCTATCTCTATTTCCAATTAAGTGGACGGAGCAACA
 TTTACAGTCCAATAGGCAGTGAAGAGGCGCCTAATGAGGATACCGTGAAAGAAGATGAAGAAGCGGAGAT
 TGGCATGTGGGAGGCAGTAACATGGCTTGCGGTGTTAACTCTGGGTGCTTTTTCTTTCTGAGTACCTAG
 TTAACGCCATTGAGGGAGCATCTGATTCATTGAACCTTCCGGTGGCTTTTATCAGTGTTATTTTGTCTCCT
 ATTGTGGGTAATGCAGCTGAACATGCAAGCGCAATAATGTTTGCATGAAAGATAAACTTGACATAAACT
 CGGTGTTGCAATTGGTTCATCAACACAGATATCAATGTTTGTGATTCCATTTTGTGTTGTTATTGGTTGGG
 TGATGGGACAAAAGATGGACTTGAATTTTCAGCTATTTGAGACAGCAACTCTCTTCATAACAGTACTCGTG
 GTGGCATTATGCTACAGGATGGCACCGCGAACTACTTGAAAGGACTTATGCTGATCCTATGTTATCTAAT
 AGTTGCTGCCAGTTTCTTTGTTTCATGTTGATCCACAATCAAGTGATGGCTGA

พันธุ์การค้า KPS 94-13

ATGGAGACTCCTCAAATCGAGATGGGCGTTTTCAAGGTCAACAGCCCCGCAAGTGCCCAACGGTGGGTTGC
 AGCCACCGTGGCCTCCTCCTGGAAGTCGCGAGGGACGGTCGAGAGGGCGCTCAAGAGCATCAGGATCG
 TCGTTTTCACTTCCAAGCTCAACTTGCTCATGCCGTTCCGGCCTGCGTCCATCATTCTCCACTTCACGACT
 AGGAGGCATGGATTGGTTTTCTTTTCAGCATGCTAGGAATAACACCTTTAGCAGAGCGATTGGGATATG
 CGACTGAGCAGCTTGCAATATACTGGTCCAACAGTTGGTGGCCTTCTGAATGCTACATTTGGAAATGCA
 ACTGAAATGATCATTGCAATATATGCTTTGAAAAATGGAATGATCCGAGTAGTGCAGCAGTCACTATTGGG
 TTCCATTTTGTCAAATATGCTGTTGGTTATGGGCTGTGCTTTCTTTGCTGGTGGTATTGTTTCATCGCAACA

AAGACCAAGTCTTCAGTAAGGCAACTGCAGTTGTCAACTCAGGTTTACTGTTGATGGCTGTCATGGGATTG
ATGTTTCCTGCCGTTCTTCATTTCACTCATTTCAGAAAGTGCGGCAAGGAGCATCAGAAGTTGCTCTTTCAAG
GTTTCAGTAGTTGTATTATGCTTGTGGCGTACGCAAGCTATCTCTATTTCCAATTAAGTGGACGGAGCAACA
TTTACAGTCCAATAGGCAGTGAAGAGGCGCCTAATGAGGATACAGTGGAAAGAAGATGAAGAAGCTGAGAT
TGCCATGTGGGAGGCAGTAACATGGCTTGCAGGTGTTAACTCTGGGTGCTTTTTCTTTCTGAGTACCTAG
TTAACGCCATTGAGGGAGCATCTGATTCATTGAACCTTCCGGTGGCTTTTATCAGTGTTATTTTGCTTCCT
ATTGTGGTAATGCAGCTGAACATGCAAGCGCAATAATGTTTGCCATGAAAGATAAACTTGACATAGCACT
CGGTGTTGCAATTGGTTCATCAACACAGATATCAATGTTTGTGATTCCATTTTGTGTTGTTATTGGTTGGG
TGATGGGACAAAAGATGGACTTGAATTTTCAGCTATTTGAGACAGCAACTCTCTTCATAACAGTACTCGTG
GTGGCATTATGCTACAGGATGGCACCGGCAACTACTTGAAAGGACTTATGCTGATCCTATGTTATCTAAT
AGTTGCTGCCAGTTTCTTTGTTTCATGTTGATCCACAATCAAGTGATGGCTGA

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ในฐานข้อมูลสาธารณะโดยใช้
โปรแกรมสำเร็จรูป BLASTN ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์นี้มีความเหมือนกับยีน *CAX* ในพืชถึง
87-98% (ภาพที่ 4)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Sorghum bicolor vacuolar cation/proton exchanger 3 (LOC8079604), transcript variant X2, mRNA	2140	2140	100%	0.0	98%	XM_002447192.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Sorghum bicolor vacuolar cation/proton exchanger 3 (LOC8079604), transcript variant X1, mRNA	2140	2140	100%	0.0	98%	XM_021463428.1
<input type="checkbox"/> Zea mays uncharacterized LOC541635 (pco139871a), transcript variant 2, mRNA	2049	2049	100%	0.0	96%	NM_001348553.1
<input type="checkbox"/> Zea mays uncharacterized LOC541635 (pco139871a), transcript variant 1, mRNA	2049	2049	100%	0.0	96%	NM_001111390.2
<input type="checkbox"/> Zea mays full-length cDNA clone ZM_BFc0079C07 mRNA, complete cds	2049	2049	100%	0.0	96%	BT055624.1
<input type="checkbox"/> Zea mays full-length cDNA clone ZM_BFb0088J10 mRNA, complete cds	2049	2049	100%	0.0	96%	BT035931.1
<input type="checkbox"/> Zea mays Vacuolar cation/proton exchanger 2 (LOC100384161), mRNA	2046	2046	100%	0.0	96%	NM_001176739.2
<input type="checkbox"/> Zea mays full-length cDNA clone ZM_BFc0145J04 mRNA, complete cds	2046	2046	100%	0.0	96%	BT069344.1
<input type="checkbox"/> Zea mays clone 425413 vacuolar cation/proton exchanger 3 mRNA, complete cds	2040	2040	100%	0.0	96%	EU973976.1
<input type="checkbox"/> Zea mays ZCAX2 mRNA for Ca2+/H+ antiporter, complete cds	2040	2040	100%	0.0	96%	AB044567.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Panicum hallii vacuolar cation/proton exchanger 3 (LOC112901070), transcript variant X2, mRNA	1811	1811	100%	0.0	92%	XM_025969900.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Panicum hallii vacuolar cation/proton exchanger 3 (LOC112901070), transcript variant X1, mRNA	1811	1811	100%	0.0	92%	XM_025969899.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Setaria italica vacuolar cation/proton exchanger 3 (LOC101768889), transcript variant X2, mRNA	1811	1811	100%	0.0	92%	XM_012844772.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Setaria italica vacuolar cation/proton exchanger 3 (LOC101768889), transcript variant X1, mRNA	1811	1811	100%	0.0	92%	XM_004960193.3
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Setaria italica vacuolar cation/proton exchanger 3 (LOC101768889), transcript variant X3, mRNA	1799	1799	99%	0.0	92%	XM_012844773.2
<input type="checkbox"/> Zea mays clone 1559617 mRNA sequence	1553	1553	74%	0.0	97%	EU956249.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Oryza sativa Japonica Group vacuolar cation/proton exchanger 3-like (LOC4337242), mRNA	1526	1526	99%	0.0	87%	XM_015780202.2
<input type="checkbox"/> Oryza sativa Japonica Group OsCAX3 mRNA for cation/proton exchanger 3, complet cds	1526	1526	99%	0.0	87%	AB112773.1
<input type="checkbox"/> Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:J033068D06, full insert sequence	1526	1526	99%	0.0	87%	AK073795.1

ภาพที่ 6 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีน DNA ที่สังเคราะห์ได้โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด ที่ออกแบบเพื่อให้ได้ full length ของยีน CAX ของพืชต่าง ๆ ในฐานข้อมูล Genbank

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับอะมิโน ของอ้อยแต่ละพันธุ์มาเปรียบเทียบกัน พบว่า มีบางตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
Biotech-CA : ATGGAGACTCCTCAAATCGAGATGGGCGGTTTTCAAGGTCAACAGCCCGCAAGTGCCCAACGGTGGGTTCAGCCCCACCGTGGCCTCCTCCTGGAAGTCGCGAGGGACGGTTCGAG : 114
Wild-CAX   : ATGGAGACTCCTCAAATCGAGATGGGCGGTTTTCAAGGTCAACAGCCCGCAAGTGCCCAACGGTGGGTTCAGCCCCACCGTGGCCTCCTCCTGGAAGTCGCGAGGGACGGTTCGAG : 114
KPS94-13-C : ATGGAGACTCCTCAAATCGAGATGGGCGGTTTTCAAGGTCAACAGCCCGCAAGTGCCCAACGGTGGGTTCAGCCCCACCGTGGCCTCCTCCTGGAAGTCGCGAGGGACGGTTCGAG : 114
            ATGGAGACTCCTCAAATCGAGATGGGCGGTTTTCAAGGTCAACAGCCCGCAAGTGCCCAACGGTGGGTTCAGCCCCACCGTGGCCTCCTCCTGGAAGTCGCGAGGGACGGTTCGAG

      120      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220
Biotech-CA : AGGGCGCTCAAGAGCATCAGGATCGTCGTTTTCACTTCCAAGCTCAACTTGCTCATGCCGTTTCGGGCCTGCGTCCATCATTTCTCCACTTCACGACTAGGAGGCATGGATTGGTT : 228
Wild-CAX   : AGGGCGCTCAAGAGCATCAGGATCGTCGTTTTCACTTCCAAGCTCAACTTGCTCATGCCGTTTCGGGCCTGCGTCCATCATTTCTCCACTTCACGACTAGGAGGCATGGATTGGTT : 228
KPS94-13-C : AGGGCGCTCAAGAGCATCAGGATCGTCGTTTTCACTTCCAAGCTCAACTTGCTCATGCCGTTTCGGGCCTGCGTCCATCATTTCTCCACTTCACGACTAGGAGGCATGGATTGGTT : 228
            AGGGCGCTCAAGAGCATCAGGATCGTCGTTTTCACTTCCAAGCTCAACTTGCTCATGCCGTTTCGGGCCTGCGTCCATCATTTCTCCACTTCACGACTAGGAGGCATGGATTGGTT

      *      240      *      260      *      280      *      300      *      320      *      340
Biotech-CA : TTCCTTTTCAGCATGCTAGGAATAACACCTTTAGCAGAGCGATTGGGATATGCGACTGAGCAGCTTGCAATATACACTGGTCCAACAGTTGGTGGCCTTCTGAATGCTACATTT : 342
Wild-CAX   : TTCCTTTTCAGCATGCTAGGAATAACACCTTTAGCAGAGCGATTGGGATATGCGACTGAGCAGCTTGCAATATACACTGGTCCAACAGTTGGTGGCCTTCTGAATGCTACATTT : 342
KPS94-13-C : TTCCTTTTCAGCATGCTAGGAATAACACCTTTAGCAGAGCGATTGGGATATGCGACTGAGCAGCTTGCAATATACACTGGTCCAACAGTTGGTGGCCTTCTGAATGCTACATTT : 342
            TTCCTTTTCAGCATGCTAGGAATAACACCTTTAGCAGAGCGATTGGGATATGCGACTGAGCAGCTTGCAATATACACTGGTCCAACAGTTGGTGGCCTTCTGAATGCTACATTT

      *      360      *      380      *      400      *      420      *      440      *
Biotech-CA : GGAAATGCAACTGAAATGATCATTGCAATATATGCTTTGAAAAATGGAATGATCCGAGTAGTGCAGCAGTCACTATTGGGTTCATTTTGTCAAATATGCTGTTGGTTATGGGC : 456
Wild-CAX   : GGAAATGCAACTGAAATGATCATTGCAATATATGCTTTGAAAAATGGAATGATCCGAGTAGTGCAGCAGTCACTATTGGGTTCATTTTGTCAAATATGCTGTTGGTTATGGGC : 456
KPS94-13-C : GGAAATGCAACTGAAATGATCATTGCAATATATGCTTTGAAAAATGGAATGATCCGAGTAGTGCAGCAGTCACTATTGGGTTCATTTTGTCAAATATGCTGTTGGTTATGGGC : 456
            GGAAATGCAACTGAAATGATCATTGCAATATATGCTTTGAAAAATGGAATGATCCGAGTAGTGCAGCAGTCACTATTGGGTTCATTTTGTCAAATATGCTGTTGGTTATGGGC

```

ภาพที่ 7 เปรียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CAX ของอ้อย 3 พันธุ์

```

      460      *      480      *      500      *      520      *      540      *      560      *
Biotech-CA : TGTGCTTTCTTTGCTGGTGGTATTGTTTCATCGCAACAAAGACCAAGTCTTCAGTAAGGCAACTGCAGTTGTCAACTCAGGTTTACTGTTGATGGCTGTCATGGGATTGATGTTT : 570
Wild-CAX   : TGTGCTTTCTTTGCTGGTGGTATTGTTTCATCGCAACAAAGACCAAGTCTTCAGTAAGGCAACTGCAGTTGTCAACTCAGGTTTACTGTTGATGGCTGTCATGGGATTGATGTTT : 570
KPS94-13-C : TGTGCTTTCTTTGCTGGTGGTATTGTTTCATCGCAACAAAGACCAAGTCTTCAGTAAGGCAACTGCAGTTGTCAACTCAGGTTTACTGTTGATGGCTGTCATGGGATTGATGTTT : 570
            TGTGCTTTCTTTGCTGGTGGTATTGTTTCATCGCAACAAAGACCAAGTCTTCAGTAAGGCAACTGCAGTTGTCAACTCAGGTTTACTGTTGATGGCTGTCATGGGATTGATGTTT

      580      *      600      *      620      *      640      *      660      *      680
Biotech-CA : CCTGCTGTTCTTCATTTCACTCATTTCAGAAGTGCGGCAAGGAGCATCAGAGGTTGCTCTTTCAAGGTTTCAGTAGTTGTATTATGCTTGTGGCATACGCAAGCTATCTCTATTTTC : 684
Wild-CAX   : CCTGCTGTTCTTCATTTCACTCATTTCAGAAGTGCGGCAAGGAGCATCAGAGGTTGCTCTTTCAAGGTTTCAGTAGTTGTATTATGCTTGTGGCATACGCAAGCTATCTCTATTTTC : 684
KPS94-13-C : CCTGCTGTTCTTCATTTCACTCATTTCAGAAGTGCGGCAAGGAGCATCAGAGGTTGCTCTTTCAAGGTTTCAGTAGTTGTATTATGCTTGTGGCATACGCAAGCTATCTCTATTTTC : 684
            CCTGCTGTTCTTCATTTCACTCATTTCAGAAGTGCGGCAAGGAGCATCAGAGGTTGCTCTTTCAAGGTTTCAGTAGTTGTATTATGCTTGTGGCaTACGCAAGCTATCTCTATTTTC

      *      700      *      720      *      740      *      760      *      780      *      8
Biotech-CA : CAATTAAGTGGACgGAGCAACATTTACAGTCCAATAGGcAGTGAAGAGGGCGCCTAATGAGGATACcGTGgAAGAAGATGAAGAAGCTgGAGATTGGCATGTGGGAGGCAGTAACA : 798
Wild-CAX   : CAATTAAGTGGACgGAGCAACATTTACAGTCCAATAGGcAGTGAAGAGGGCGCCTAATGAGGATACcGTGgAAGAAGATGAAGAAGCGGAGATTGGCATGTGGGAGGCAGTAACA : 798
KPS94-13-C : CAATTAAGTGGACgGAGCAACATTTACAGTCCAATAGGcAGTGAAGAGGGCGCCTAATGAGGATACcGTGgAAGAAGATGAAGAAGCTgGAGATTGGCATGTGGGAGGCAGTAACA : 798
            CAATTAAGTGGACgGAGCAACATTTACAGTCCAATAGGcAGTGAAGAGGGCGCCTAATGAGGATACcGTGgAAGAAGATGAAGAAGCTgGAGATTGGCATGTGGGAGGCAGTAACA

      00      *      820      *      840      *      860      *      880      *      900      *
Biotech-CA : TGGCTTGCGGTGTTAACTACTCTGGGTGTCTTTTCTTTCTGAGTACCTAGTTAACGCCATTGAGGGAGCATCTGATTCATTGAACCTTCCGGTGGCTTTTATCAGTGTATTTTGG : 912
Wild-CAX   : TGGCTTGCGGTGTTAACTACTCTGGGTGTCTTTTCTTTCTGAGTACCTAGTTAACGCCATTGAGGGAGCATCTGATTCATTGAACCTTCCGGTGGCTTTTATCAGTGTATTTTGG : 912
KPS94-13-C : TGGCTTGCGGTGTTAACTACTCTGGGTGTCTTTTCTTTCTGAGTACCTAGTTAACGCCATTGAGGGAGCATCTGATTCATTGAACCTTCCGGTGGCTTTTATCAGTGTATTTTGG : 912
            TGGCTTGCGGTGTTAACTACTCTGGGTGTCTTTTCTTTCTGAGTACCTAGTTAACGCCATTGAGGGAGCATCTGATTCATTGAACCTTCCGGTGGCTTTTATCAGTGTATTTTGG

```

ภาพที่ 7 เปรียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CAX ของอ้อย 3 พันธุ์ (ต่อ)

```

          920      *      940      *      960      *      980      *      1000      *      1020
Biotech-CA : CTTCCCTATTGTGGGTAATGCAGCTGAACATGCAAGCGCAATAATGTTTGCCATGAAAGATAAACTTGACATAACACTCGGTGTTGCAATTGGTTCATCAACACAGATATCAATG : 1026
Wild-CAX   : CTTCCCTATTGTGGGTAATGCAGCTGAACATGCAAGCGCAATAATGTTTGCCATGAAAGATAAACTTGACATAACACTCGGTGTTGCAATTGGTTCATCAACACAGATATCAATG : 1026
KPS94-13-C : CTTCCCTATTGTGGGTAATGCAGCTGAACATGCAAGCGCAATAATGTTTGCCATGAAAGATAAACTTGACATAACACTCGGTGTTGCAATTGGTTCATCAACACAGATATCAATG : 1026
          CTTCCCTATTGTGGGTAATGCAGCTGAACATGCAAGCGCAATAATGTTTGCCATGAAAGATAAACTTGACATAaCACTCGGTGTTGCAATTGGTTCATCAACACAGATATCAATG

          *      1040      *      1060      *      1080      *      1100      *      1120      *      1140
Biotech-CA : TTTGTGATTCCATTTTGTGTTGTTATTGGTTGGGTGATGGGACAAAAGATGGACTTGAATTTTCAGCTATTTGAGACAGCAACTCTCTTCATAACAGTACTCGTGGTGGCATTI : 1140
Wild-CAX   : TTTGTGATTCCATTTTGTGTTGTTATTGGTTGGGTGATGGGACAAAAGATGGACTTGAATTTTCAGCTATTTGAGACAGCAACTCTCTTCATAACAGTACTCGTGGTGGCATTI : 1140
KPS94-13-C : TTTGTGATTCCATTTTGTGTTGTTATTGGTTGGGTGATGGGACAAAAGATGGACTTGAATTTTCAGCTATTTGAGACAGCAACTCTCTTCATAACAGTACTCGTGGTGGCATTI : 1140
          TTTGTGATTCCATTTTGTGTTGTTATTGGTTGGGTGATGGGACAAAAGATGGACTTGAATTTTCAGCTATTTGAGACAGCAACTCTCTTCATAACAGTACTCGTGGTGGCATTI

          *      1160      *      1180      *      1200      *      1220      *      1240      *
Biotech-CA : ATGCTACAGGATGGCACCGCGAACTACTTCAAAGGACTTATGCTGATCCTATGTTATCTAATAGTTGCTGCCAGTTTCTTTGTTTCATGTTGATCCACAATCAAGTGATGGCTGA : 1254
Wild-CAX   : ATGCTACAGGATGGCACCGCGAACTACTTCAAAGGACTTATGCTGATCCTATGTTATCTAATAGTTGCTGCCAGTTTCTTTGTTTCATGTTGATCCACAATCAAGTGATGGCTGA : 1254
KPS94-13-C : ATGCTACAGGATGGCACCGCGAACTACTTCAAAGGACTTATGCTGATCCTATGTTATCTAATAGTTGCTGCCAGTTTCTTTGTTTCATGTTGATCCACAATCAAGTGATGGCTGA : 1254
          ATGCTACAGGATGGCACCGCGAACTACTTCAAAGGACTTATGCTGATCCTATGTTATCTAATAGTTGCTGCCAGTTTCTTTGTTTCATGTTGATCCACAATCAAGTGATGGCTGA

```

ภาพที่ 7 เปรียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CAX ของอ้อย 3 พันธุ์ (ต่อ)

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *      12
wt      : METPQIEMGGFKVNSPQVPNGGLQPTVASSWKS RGTVERALKSIRIVVFTSKLNLMPFGPASII LHFTTRRHGLVFLFSMLGITPLAERLGYATEQLAIYTGPTVGGLLNATFGNATE : 119
kps94-13 : METPQIEMGGFKVNSPQVPNGGLQPTVASSWKS RGTVERALKSIRIVVFTSKLNLMPFGPASII LHFTTRRHGLVFLFSMLGITPLAERLGYATEQLAIYTGPTVGGLLNATFGNATE : 119
Biotech : METPQIEMGGFKVNSPQVPNGGLQPTVASSWKS RGTVERALKSIRIVVFTSKLNLMPFGPASII LHFTTRRHGLVFLFSMLGITPLAERLGYATEQLAIYTGPTVGGLLNATFGNATE : 119
METPQIEMGGFKVNSPQVPNGGLQPTVASSWKS RGTVERALKSIRIVVFTSKLNLMPFGPASII LHFTTRRHGLVFLFSMLGITPLAERLGYATEQLAIYTGPTVGGLLNATFGNATE

0      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220      *      2
wt      : MIIAIYALKNGMIRVVQQSLLGSILSNMLLVMGCAFFAGGIVHRNKDQVFSKATAVVNSGLLMAMVGLMFPVAVLHFTTHSEVRQGASEVALSRFSSCIMLVAYASYLYFQLSGRSNIYS : 238
kps94-13 : MIIAIYALKNGMIRVVQQSLLGSILSNMLLVMGCAFFAGGIVHRNKDQVFSKATAVVNSGLLMAMVGLMFPVAVLHFTTHSEVRQGASEVALSRFSSCIMLVAYASYLYFQLSGRSNIYS : 238
Biotech : MIIAIYALKNGMIRVVQQSLLGSILSNMLLVMGCAFFAGGIVHRNKDQVFSKATAVVNSGLLMAMVGLMFPVAVLHFTTHSEVRQGASEVALSRFSSCIMLVAYASYLYFQLSGRSNIYS : 238
MIIAIYALKNGMIRVVQQSLLGSILSNMLLVMGCAFFAGGIVHRNKDQVFSKATAVVNSGLLMAMVGLMFPVAVLHFTTHSEVRQGASEVALSRFSSCIMLVAYASYLYFQLSGRSNIYS

40      *      260      *      280      *      300      *      320      *      340      *
wt      : PIGSEEAPNEDTV EDEEEA EIGMWEAVTWLAVLTLWVSFLSEYLVNAIEGASDSLNLPVAFISVILLPIVGNAAEHASAIMFAMKDKLDITLGVAIGSSTQISMFVIPFCVVI GWVMGQ : 357
kps94-13 : PIGSEEAPNEDTV EDEEEA EIGMWEAVTWLAVLTLWVSFLSEYLVNAIEGASDSLNLPVAFISVILLPIVGNAAEHASAIMFAMKDKLDITLGVAIGSSTQISMFVIPFCVVI GWVMGQ : 357
Biotech : PIGSEEAPNEDTV EDEEEA EIGMWEAVTWLAVLTLWVSFLSEYLVNAIEGASDSLNLPVAFISVILLPIVGNAAEHASAIMFAMKDKLDITLGVAIGSSTQISMFVIPFCVVI GWVMGQ : 357
PIGSEEAPNEDTV EDEEEA EIGMWEAVTWLAVLTLWVSFLSEYLVNAIEGASDSLNLPVAFISVILLPIVGNAAEHASAIMFAMKDKLDITLGVAIGSSTQISMFVIPFCVVI GWVMGQ

360      *      380      *      400      *
wt      : KMDLNFQLFETATLFI TVLVVAFMLQDGTANYLKGLMLILCYLIVAASFFVHVDPQSSDG : 417
kps94-13 : KMDLNFQLFETATLFI TVLVVAFMLQDGTANYLKGLMLILCYLIVAASFFVHVDPQSSDG : 417
Biotech : KMDLNFQLFETATLFI TVLVVAFMLQDGTANYLKGLMLILCYLIVAASFFVHVDPQSSDG : 417
KMDLNFQLFETATLFI TVLVVAFMLQDGTANYLKGLMLILCYLIVAASFFVHVDPQSSDG

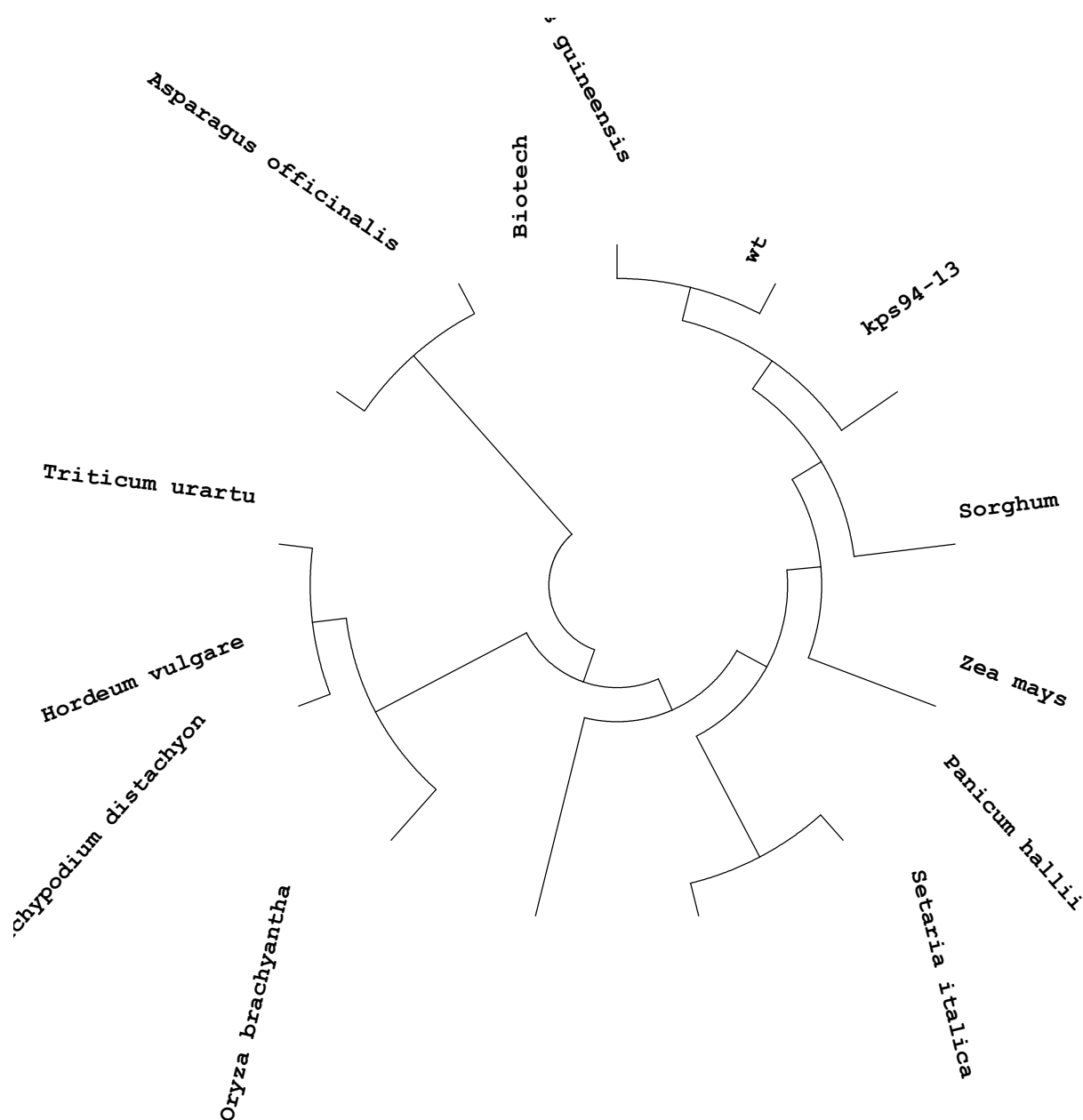
```

ภาพที่ 8 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CAX ในอ้อย 3 พันธุ์

เมื่อแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CAX ของอ้อยทั้ง 3 พันธุ์ ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วนำมาเปรียบเทียบกันพบว่ามีความแตกต่างกัน 4 ตำแหน่ง (ภาพที่ 6) ความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนนี้อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับความสามารถในการแสดงออกของยีน CAX และความสามารถในการทนต่อสภาพเครียดที่เกิดจากดินเค็มก็ได้ ซึ่งต้องมีการพิสูจน์ทราบต่อไป และถ้าในบริเวณดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องจริงก็จะสามารถออกแบบไพรเมอร์ และพัฒนาขึ้นมาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด gene targeted marker เพื่อใช้คัดเลือกลักษณะทนทานดินเค็มในอ้อยได้

phylogenetic tree

นำลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากยีน CAX ของอ้อยทั้ง 3 สายพันธุ์ มาวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับกรดอะมิโน MIPS ที่รายงานในพืชชนิดต่างๆ คือ XP_002447237.1 [*Sorghum bicolor*], AOK46723.1 [*Zea mays*], XP_025825684.1 [*Panicum hallii*], XP_004960250.1 [*Setaria italica*], XP_006652933.1 [*Oryza brachyantha*], XP_003580710.1 [*Brachypodium distachyon*], BAK04366.1 [*Hordeum vulgare*], EMS64730.1 [*Triticum urartu*] XP_020241059.1 [*Asparagus officinalis*] และ XP_010917335.1 [*Elaeis guineensis*] พบว่ากรดอะมิโนของทั้ง 3 สายพันธุ์นั้นมีความใกล้เคียงกับข้าวฟ่างและข้าวโพด มากที่สุด (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 9 แสดง Phylogenetic tree ของกรดอะมิโน CAX ของอ้อยพันธุ์ปลูก KPS 94-13 (94-13) พันธุ์ป่า (wild) และลูกผสมระหว่างอ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก (biotech2) กับกรดอะมิโนของ CAX ในพืชชนิดต่างๆด้วยโปรแกรม ClustalW2 Neighbour-joining method with 1,000 bootstrap replication .GenBank accession numbers ของกรดอะมิโนที่ใช้ในการจัดกลุ่ม : *Sporobolus alterniflorus* (ADC33414.1), *Gossypium hirsutum* (ACJ11714.1), *Citrus sinensis* (XP_006464258.1), *Hevea brasiliensis* (AFD61599.1), *Ricinus communis* (NP_001310667.1), *Nicotiana tabacum* (NP_001311846.1), *Vitis vinifera* (XP_010652823.1), *Oryza brachyantha* (XP_006651124), *Brassica juncea* (ABY74556.1), *Zea mays* (ACG33827.1) and *Sorghum bicolor* (KXG39974.1)

การตรวจสอบแสดงออกของยีน CAX ในใบและรากของอ้อยด้วยเทคนิค real-time PCR

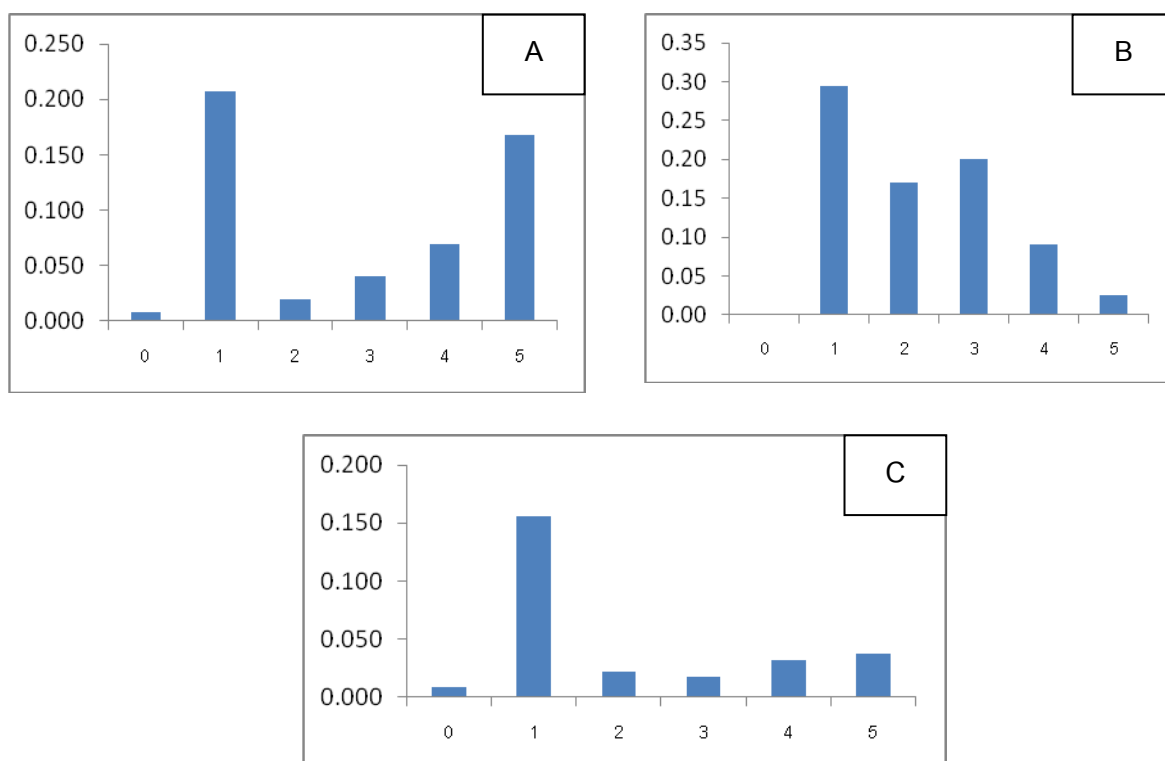
ได้ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน CAX ในอ้อย 3 พันธุ์ คือ พันธุ์กำแพงแสน 94-13 อ้อยพันธุ์ป่า และอ้อยลูกผสมไบโอเทค 2 ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างอ้อยพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่า โดยให้ต้นอ้อยในอ้อย 3 พันธุ์ ที่ทดสอบได้รับสภาพเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน จากนั้น สกัด total RNA จากใบและราก แล้วเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA เพื่อนำมาใช้ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน โดยวิธี real-time PCR โพรเมอร์ที่ใช้จำเพาะกับยีน CAX มีดังนี้

SoCAX RT-F TGGACGGAGCAACATTTACA

SoCAX RT-R ATCAGATGCTCCCTCAATGG

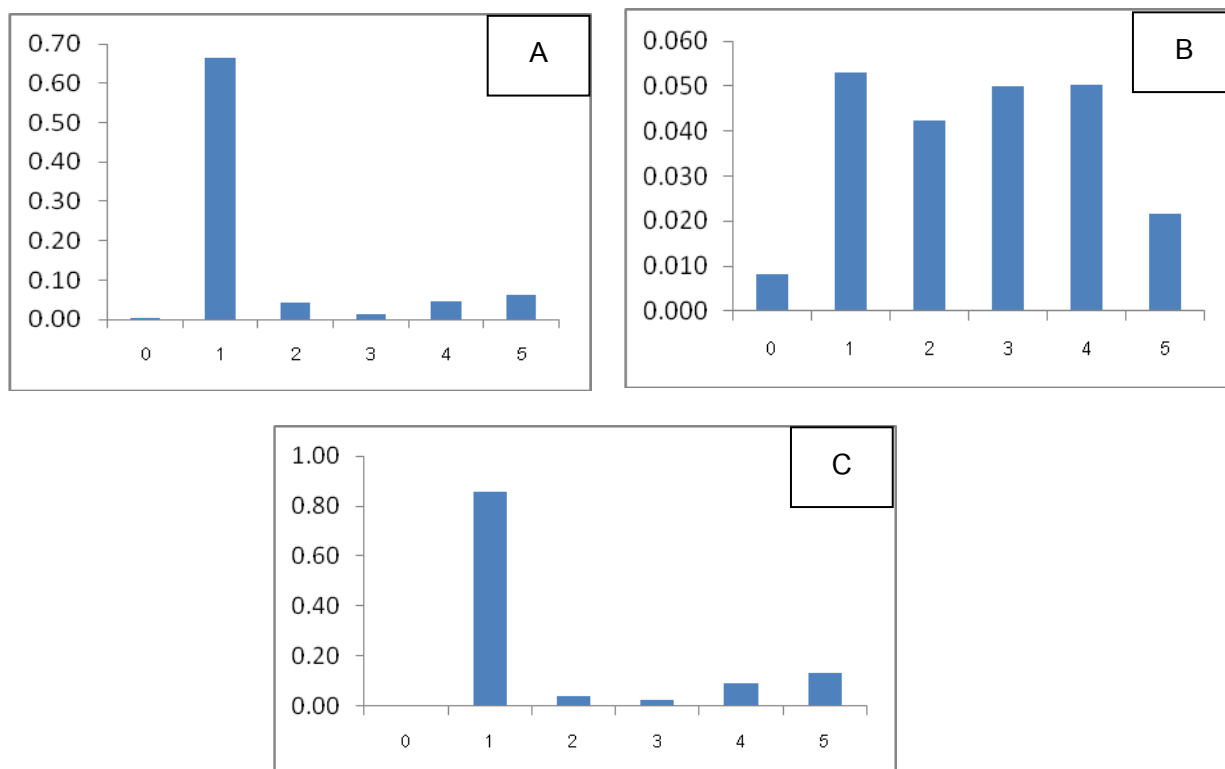
ตั้งโปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา PCR ดังนี้ denature อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที จำนวน 40 รอบ

ในอ้อยทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อได้รับสภาพเครียดที่เกิดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน CAX ทั้งในใบและราก พบว่า มีการแสดงออกของยีนสูงขึ้นกว่าต้นที่ไม่ได้รับกรถ่ายยีนนี้ (ภาพที่ 8-11)



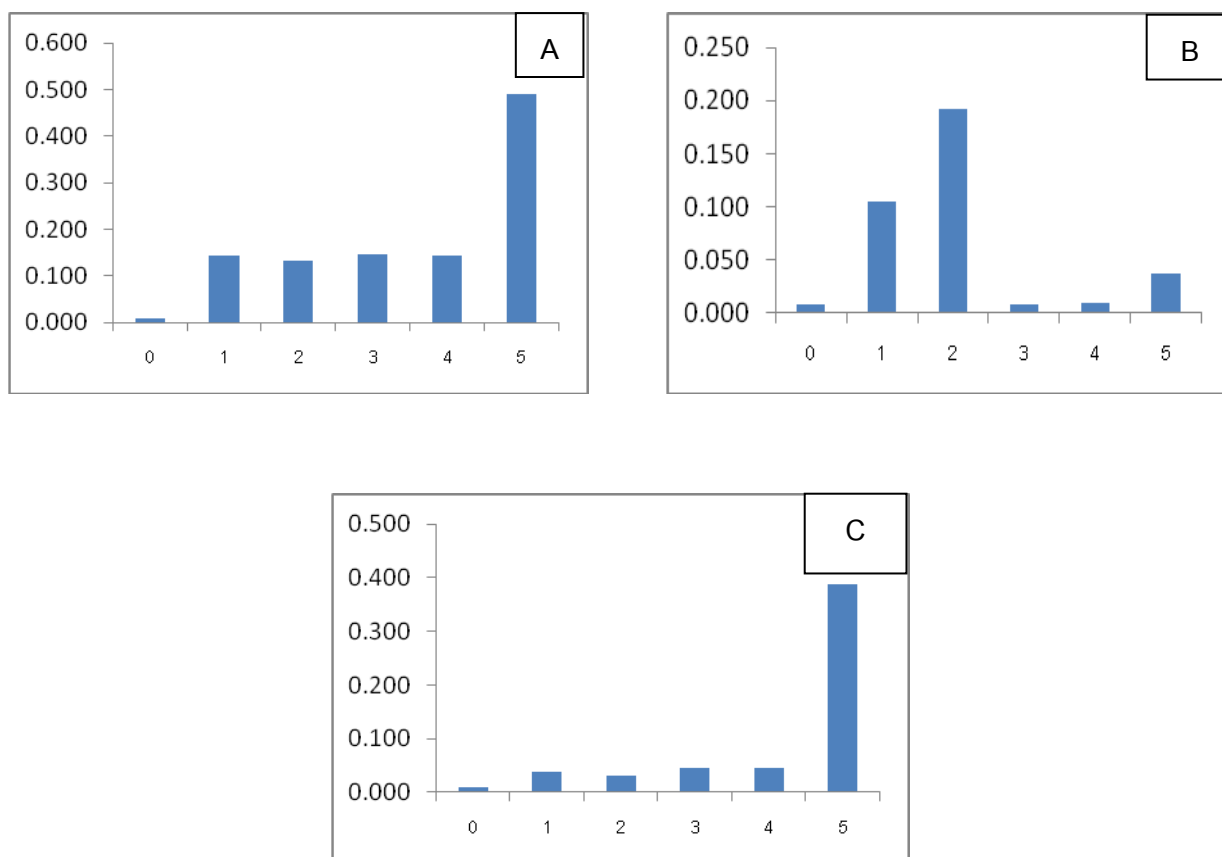
ภาพที่ 10 การแสดงออกของยีน CAX ในใบของอ้อยพันธุ์ก้าแพงแสน 94-13 (A) พันธุ์ biotech2 (B) และพันธุ์ป่า (C) ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน

ในอ้อยพันธุ์ก้าแพงแสน 94-13 พันธุ์ biotech2 และพันธุ์ป่า เมื่อได้รับสภาพเครียดที่เกิดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และตรวจสอบการแสดงออกของยีน CAX ในใบ พบว่ามีแนวโน้มการแสดงออกคล้ายกันคือมีการแสดงออกสูงสุดตั้งแต่วันแรกในอ้อยทั้ง 3 สายพันธุ์ได้รับโซเดียมคลอไรด์และหลังจากนั้นจะมีการแสดงออกของยีนลดลงยกเว้นในอ้อยพันธุ์ก้าแพงแสน 94-13 ที่มีการแสดงออกของยีนสูงสุดในวันแรกแล้วลดลงในวันที่ 2 แต่หลังจากนั้นก็มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นอีกอาจเป็นเพราะในช่วงแรกอ้อยได้รับโซเดียมส่งผลให้แคลเซียมสูงขึ้นด้วยสูงจึงมีการแสดงออกของยีน CAX เพื่อกำจัดแคลเซียม หลังจากนั้นอ้อยก็สามารถมีชีวิตอยู่ได้แต่หลังจากนั้นอ้อยยังได้รับโซเดียมอยู่การแสดงออกของยีน CAX จึงเพิ่มขึ้นอีกรอบ



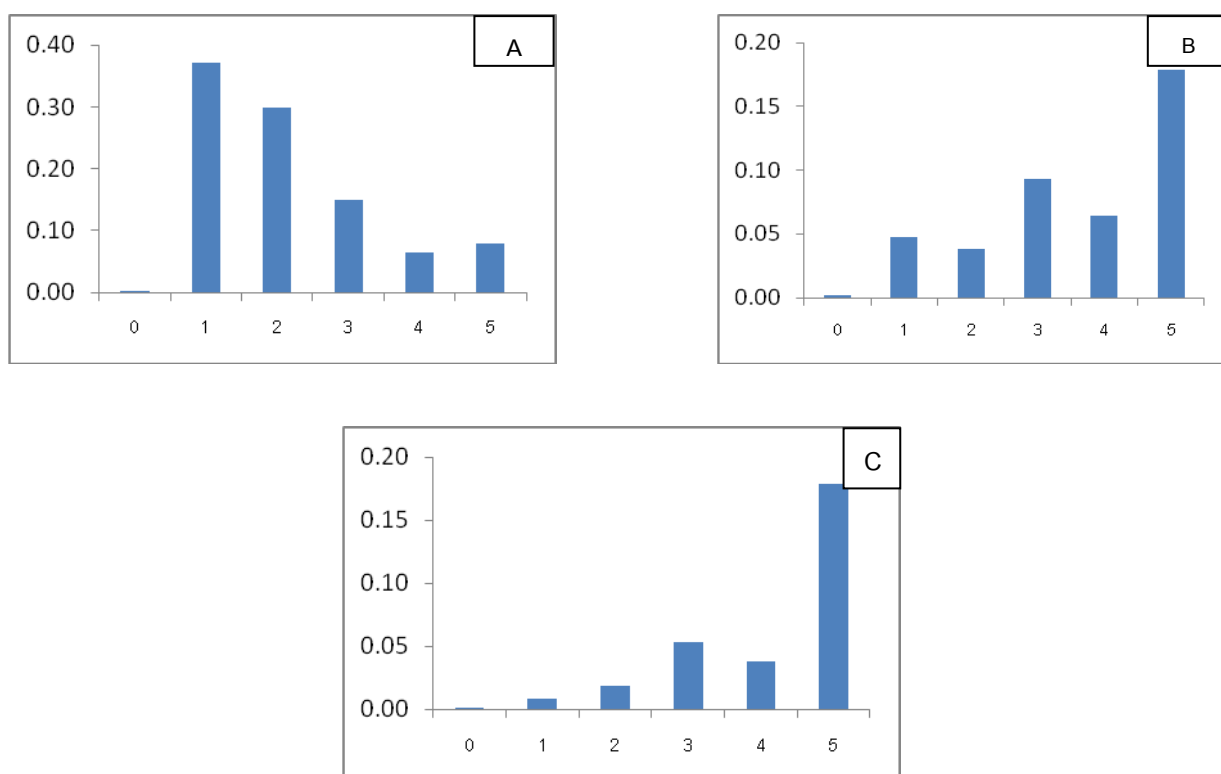
ภาพที่ 11 การแสดงออกของยีน CAX ในรากของอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 (A) พันธุ์ biotech2 (B) และ พันธุ์ป่า (C) ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน

ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 พันธุ์ biotech2 และพันธุ์ป่า เมื่อได้รับสภาพเครียดที่เกิดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และตรวจสอบการแสดงออกของยีน CAX ในราก พบว่ามีแนวโน้มการแสดงออกคล้ายกันในทุก 3 สายพันธุ์แล้วคล้ายกับการแสดงออกของใบที่ คือมีการแสดงออกสูงสุดตั้งแต่วันแรกในอ้อยทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์และหลังจากนั้นจะมีการแสดงออกของยีนลดลงยกเว้นในอ้อยพันธุ์ biotech2 ที่มีการแสดงออกของยีนสูงสุดในวันแรกแต่หลังจากนั้นการแสดงออกของยีนก็ใกล้เคียงกับวันแรก



ภาพที่ 12 การแสดงออกของยีน CAX ในใบของอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 (A) พันธุ์ biotech2 (B) และพันธุ์ป่า (C) ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน

ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 พันธุ์ biotech2 และพันธุ์ป่า เมื่อได้รับสภาพเครียดที่เกิดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ และตรวจสอบการแสดงออกของยีน CAX ในใบ พบว่าในทั้ง 3 สายพันธุ์ที่มีการเพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์มีการแสดงออกของยีนสูงกว่าต้นที่ไม่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ และ อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 และพันธุ์ป่ามีการแสดงออกของยีนใน 4 วันแรกต่ำและมีการแสดงออกสูงสุดในวันที่ 5 แต่ในขณะที่อ้อยพันธุ์ biotech2 มีการแสดงออกของยีนสูงตั้งแต่วันแรกและแสดงออกสูงสุดในวันที่ 2 ของการได้รับโซเดียมคลอไรด์



ภาพที่ 13 การแสดงออกของยีน CAX ในรากของอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 (A) พันธุ์ biotech2 (B) และ พันธุ์ป่า (C) ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน

ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 พันธุ์ biotech2 และพันธุ์ป่า เมื่อได้รับสภาพเครียดที่เกิดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ และตรวจสอบการแสดงออกของยีน CAX ในราก พบว่าในทั้ง 3 สายพันธุ์ที่มีการที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์มีการแสดงออกของยีนสูงกว่าต้นที่ไม่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ และ อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13มีการแสดงออกสูงสุดตั้งแต่วันแรกที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์และหลังจากนั้นก็มีการแสดงออกของยีนที่ลดลง ในขณะที่พันธุ์ Biotech2 และ พันธุ์ป่ามีการแสดงออกของยีนใน 4 วันแรกต่ำและมีการแสดงออกสูงสุดในวันที่ 5 ของการได้รับโซเดียมคลอไรด์

การถ่ายยีน ScCAX เข้าสู่ต้นยาสูบ

1. การนำพลาสมิด pCAM-ScCAX 1304 เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *A. tumefaciens*

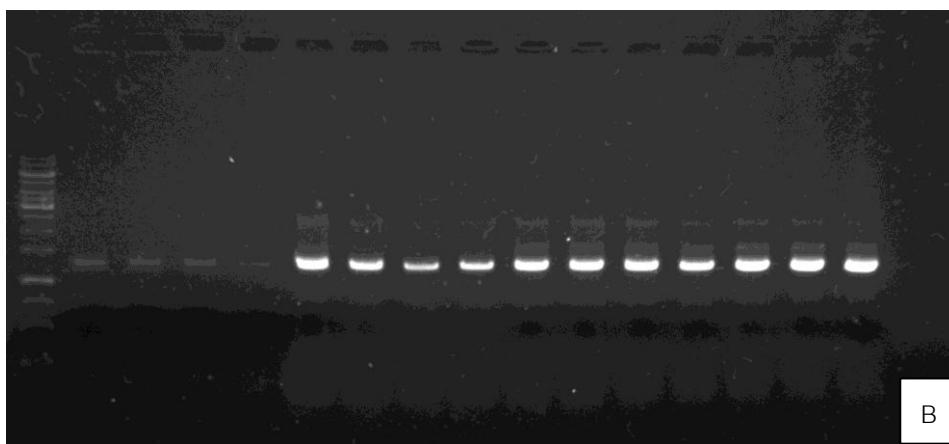
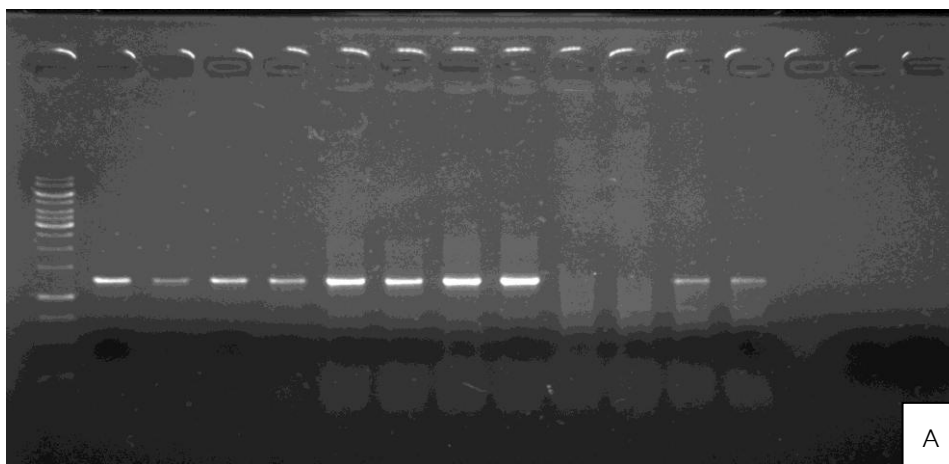
การบรรจุพลาสมิด pCAMBIA1304 – ScCAX เข้าสู่ competent cell ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยใช้วิธี heat shock เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* บนอาหารสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร คัดเลือกโคโลนีเดียวที่สามารถโตได้บนอาหารคัดเลือกมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นสกัดพลาสมิดออกจาก

เซลล์ของ *E. coli* ด้วยชุดสกัดพลาสมิด Nucleospin (บริษัท Macherey Nagel) ตรวจสอบพลาสมิดที่ได้ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI* และ *BstEII* แล้วแยกแถบดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel พบว่า หลังจากการตัดพลาสมิด pCAMBIA1304 – ScCAX ที่สกัดได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองชนิด พบว่าได้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบคือ 9700 และอีกแถบคือ 790 คู่เบส โดยแถบดีเอ็นเอขนาด 790 คู่เบส เป็นแถบดีเอ็นเอของยีน ScCAX จึงสามารถยืนยันได้ว่าพลาสมิด pCAM-EPSPs 1304 ได้ถูกถ่ายเข้าไปใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α จริง หลังจากนั้นก็นำพลาสมิดเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียและถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบต่อไป

เมื่อทำการถ่ายยีน ScCAX เข้าสู่ใบยาสูบขนาด 1x1 เซนติเมตร หลังจากเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 2 วัน นำเนื้อเยื่อมาเลี้ยงและฆ่าเชื้อด้วย cefotaxime เพื่อฆ่าเชื้อแล้วนำเนื้อเยื่อไปเลี้ยงในอาหารที่ชักนำให้เกิดยอดคือสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA 0.1 mg/l และ BA 1 mg/l รวมทั้งเติม hygromycin เนื่องจากพลาสมิด pCAMBIA1304 – ScCAX มียีน *hygromycin* เป็นยีนคัดเลือก หลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรนี้เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จะมียอดเล็กๆของต้นยาสูบแตกออกมาจากของใบ (ภาพที่ 21) ก็จะนำต้นที่ได้นี้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติ เพื่อนำไปตรวจสอบการมีอยู่ของยีน ScCAX ต่อไป

ตรวจสอบต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *ScCAX* ด้วยเทคนิค PCR

สกัดดีเอ็นเอจากใบของยาสูบที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่เติม hygromycin และใบของยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบผลการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *ScCAX* จากนั้นนำผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ จากผลการตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอของยีน *ScCAX* ขนาด ประมาณ 1,250 คู่เบส ซึ่งจากการตรวจสอบต้นยาสูบที่ได้รับยีนจากอ้อยทั้ง 3 พันธุ์ จำนวนพันธุ์ละ 10 โคลน พบว่าทุกโคลนที่มียีน *ScCAX* จำนวน 26 โคลน (ภาพที่ 22)



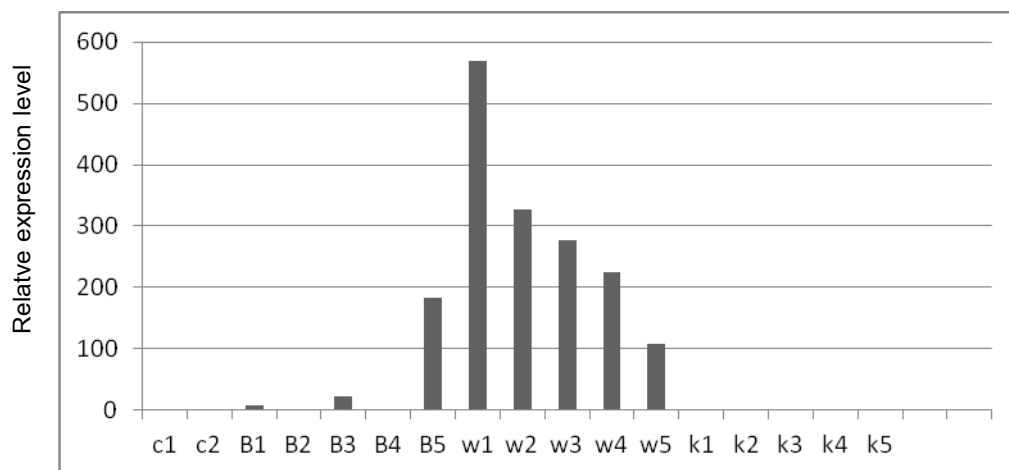
ภาพที่ 14 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *ScCAX* จากใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 เป็นพาหะด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ภาพ A Lane 1 : 1 kb marker Lane 2-11 : ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *ScCAX* ของอ้อยพันธุ์ป่า Lane 12-16 : ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *ScCAX* ของอ้อยพันธุ์ KPS94-13

ภาพ B Lane 1 : 1 kb marker Lane 2-6 : ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *Sc CAX* ของอ้อยพันธุ์ KPS94-13 และ Lane 7-16 : ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *ScCAX* ของอ้อยพันธุ์ biotech และ Lane 18: Negative control (dH₂O)

ตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ถ่ายเข้ายาสูบ

การเตรียมต้นยาสูบที่ได้ได้รับการถ่ายยีน *ScCAX* จากอ้อยพันธุ์ปลูก KPS 94-13 พันธุ์ป่า และลูกผสมระหว่างอ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก ที่มีอายุประมาณ 1 เดือน เลี้ยงในสภาพ hydroponic ในสารละลาย 1/10 Hoagland ปรับ pH เป็น 5.6 ในกระละมั่ง โดยตรึงต้นยาสูบบนแผ่นโฟมหนา 2 นิ้ว แต่ละกระละมั่งมีต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *ScCAX* จากอ้อยทั้ง 3 พันธุ์ๆ ละ 3 ต้น ป้อนอากาศลงสู่สารละลายตลอดเวลา เพาะเลี้ยงยาสูบในสภาพดังกล่าวเพื่อให้ยาสูบปรับตัวได้อย่างน้อย 2 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนถ่ายสารละลายใหม่อย่างน้อยทุกๆ 5 วัน หลังจากนั้นนำต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *ScCAX* จากอ้อยทั้ง 3 พันธุ์ มาปลูกในสภาพเค็ม โดยเติมเกลือ NaCl ลงในสารละลายธาตุอาหารในความเข้มข้น 200 เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปสกัด total RNA เพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่อไป



ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน

ภาพที่ 15 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *ScCAX* ในใบของอ้อย 3 พันธุ์ ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ นาน 3 วัน
 c1 และ c2 ต้นปกติ
 w1-5 ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *ScCAX* จากอ้อยพันธุ์ป่า
 b1-b5 ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *ScCAX* จากอ้อยพันธุ์ biotech 2
 k1- k5 ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *ScCAX* จากอ้อยพันธุ์ KPS 94-13

วิจารณ์ผลการวิจัย

กลไกของพืชที่เมื่อได้รับสภาพเครียดจากความเค็ม จะมีกระบวนการป้องกันตัวเองจากอันตรายที่จะเกิดจากความเค็มอย่างน้อย 2 กระบวนการคือ กลไกการขับเกลือส่วนเกินมาไว้ที่ผิวของใบโดยผ่านกระบวนการ ion exclusion หรือการกระจายเกลือไปเก็บไว้ตามส่วนต่าง ๆ ของพืช (Bradley and Morris, 1991) และการปรับลดค่าแรงดันออสโมติก โดยการสร้างสาร osmolytes เพื่อลดการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ (Cavalieri, 1983) ยีน *Myo-inositol 1-phosphate synthase (MIPS)* ความสามารถในการปรับตัวของเซลล์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิด ion homeostasis และการปรับลดค่าแรงดันออสโมติก โดยการสร้างสาร osmolytes เมื่อเผชิญกับความเครียดจากสภาวะเค็ม (Cavalieri, 1983) นอกจากนี้พืชยังมีกลไกการจัดเก็บโซเดียมเข้าสู่แวคคิวโอล ต้องอาศัยการทำงานของตัวสูบลำโปรตรอน ได้แก่ vacuole (V-ATPase), plasma membrane (P-ATPase), vacuolar pyrophosphatase membrane (V-PPase) และ ขบวนการ secondary transport ได้แก่ Na^+/K^+ antiporter และ $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter (CAX) ในงานวิจัยนี้จึงศึกษา ยีน CAX ยีน CAX หรือ Vacuoles $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter เป็นยีนที่ควบคุมให้เกิดการสมดุลของ Ca^{2+} เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเค็มหรือความแห้งแล้ง ยีน CAX จะรักษาระดับ Ca^{2+} ในไซโตพลาสซึมให้มีความเข้มข้นต่ำ โดยยีน CAX จะทำหน้าที่เป็น antiporter จะขับ Ca^{2+} จากไซโตพลาสซึมเข้าสู่แวคคิวโอล พบว่า ยีน CAX มีขนาด 1,254 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นขนาดเท่ากับ ยีน CAX ในข้าวฟ่างที่มีขนาด 1254 นิวคลีโอไทด์ เมื่ออ้อยพันธุ์ต่างๆได้รับสภาพเครียดจากการขาดน้ำอันเนื่องมาจากความเค็มจะกระตุ้นให้ยีน CAX มีการแสดงออกมากขึ้น โดยการแสดงออกที่ NaCl ความเข้มข้น 100 mM ในรากจะมีมากกว่าที่ใบ และที่ความเข้มข้น 200 mM การแสดงออกของยีนในใบสูงกว่าในราก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Martins et al. (2017) ที่พบว่า การแสดงออกของยีน CAX ในอ้อย พบว่าการแสดงออกของยีน CAX ในใบมากกว่าราก แต่ในลำต้นมีการแสดงออกของยีนนี้สูงสุด แต่อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของยีน CAX ในอ้อยทุกพันธุ์เมื่อแสดงออกในระดับสูงสุดในวันแรกก็จะเริ่มลดการแสดงออก ซึ่งในสภาวะปกติพืชจะมีการแสดงของยีน CAX อยู่ก่อนแล้ว เมื่อได้รับความเครียดพืชจะสังเคราะห์เอนไซม์ CAX มากขึ้น เพื่อใช้ในการลำเลียง Ca มากขึ้นภายในเซลล์ เพื่อรักษาสภาพเซลล์ หลังจากนั้นการแสดงออกของยีนลดลงเพราะสารประกอบภายในเซลล์ที่สร้างขึ้น คือ โดยจะมีผลทำให้เซลล์สามารถรักษา Ca^{2+} ไว้ได้เมื่อมีปริมาณ Na^+ ในเซลล์มากเกินไป (Cheng et al., 2004) ทำให้พืชรักษาสภาพการเจริญได้ตามปกติ การแสดงออกของยีนจึงลดลง แต่การตอบสนองต่อความเค็มของอ้อยแต่ละพันธุ์ที่ศึกษาจะแตกต่างกันทั้งในแง่ของระดับการแสดงออกของยีน และระยะเวลาที่ตอบสนองที่เร็วหรือช้าต่างกัน ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ได้ชื่อว่าเป็นพันธุ์ทนแล้ง (บุศรินทร์, 2557) แต่มีแนวโน้มการแสดงออกของยีนในระดับที่ต่ำกว่าพันธุ์ป่าหรือพันธุ์ลูกผสมระหว่างชนิด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในพันธุ์ป่าซึ่งปกติขึ้นอยู่ตามธรรมชาติในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันมาก มีความสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่า หรือในพันธุ์ลูกผสมระหว่างชนิดอาจได้รับยีนที่เกี่ยวข้องกับความทนทานมาจากพันธุ์ป่า

สรุปผลการทดลอง

1. ยีน *CAX* เป็นยีนที่ควบคุมให้เกิดการสมดุลของ Ca^{2+} เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเค็มหรือความแห้งแล้งของอ้อยทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่ามีความยาวของยีน 1,254 นิวคลีโอไทด์ เมื่อแปลรหัสพันธุกรรมเป็นโปรตีนจะได้โปรตีนที่มี 417 กรดอะมิโน และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้ในอ้อยทั้ง 3 พันธุ์จะพบว่าแปรปรวนทั้งสิ้น 12 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความแตกต่างกัน

2. ระดับการแสดงออกของยีน *CAX* เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนนี้ในอ้อยเมื่อได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ จะมีการแสดงออกของยีนที่รากจะมีมากกว่าที่ใบที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์และที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ การแสดงออกของยีนดังกล่าวจะแสดงออกในใบสูงกว่าราก

3. ระดับการแสดงออกของยีน *CAX* ในต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนจากอ้อยพันธุ์ป่า พันธุ์ใบโอเทค 2 และพันธุ์ KPS 94-13 พบว่าใบของต้นยาสูบที่ได้รับยีน *CAX* จากอ้อยพันธุ์ป่ามีการแสดงออกของยีนสูงที่สุด

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้ทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนที่แตกต่างกันไป รวมทั้งผลการแสดงออกของยีนในแต่ละสายพันธุ์ไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด gene targeted marker ที่ใช้ในการคัดเลือกอ้อยทนทานต่อดินเค็มระดับน้อยถึงปานกลางต่อไป

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติ และนานาชาติ อยู่ระหว่างการรอตีพิมพ์ เรื่อง Identification and expression of ScCAX gene in sugarcane under mimic saline soil
2. การจดสิทธิบัตร -
3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ ขาย/ ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป -
4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)
ได้มีการนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนลงในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งเป็นฐานข้อมูลสาธารณะที่รวบรวมข้อมูลทางพันธุกรรม ทำให้นักวิจัยหรือผู้ที่สนใจนำข้อมูลของยีน CAX ไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้

รายงานการเงิน

โครงการสัญญาเลขที่ ๔.๑/๒๕๖๒ โครงการวิจัยประเภท งบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล

(งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การบ่งชี้และแยกยีน Ca²⁺/H+antipoter (CAX) ที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพดินเค็ม

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน อ.ชนากานต์ ลักษณะ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ต.ค. 61 ถึงวันที่ 30 ก.ย. 62

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ต.ค. 61 ถึงวันที่ 30 ก.ย. 62

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 151,700 บาท เมื่อ วันที่ 11 ธันวาคม 2561

งวดที่ 2 (40%) 121,360 บาท เมื่อ วันที่ 4 มีนาคม 2562

งวดที่ 3 (10%) 30,340 บาท ยังไม่ได้รับ

รวม 303,400 บาท

รายจ่าย รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	30,340	30,340	-
2. ค่าจ้าง	-	-	-
3. ค่าวัสดุ	134,340	134,340	-
4. ค่าใช้สอย	108,380	108,380	-
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ ค่าธรรมเนียมยอดหนุน สถาบัน (10%)	30,340	30,340	-
รวม	303,400	303,400	-

(นางสาวชนากานต์ ลักษณะ)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง

- กรมพัฒนาที่ดิน. ม.ป.ป.พืชทนเค็มและพืชชอบเกลือ. แหล่งที่มา
http://www.ldd.go.th/Lddwebsite/web_ord/Technical/pdf/P_Technical03001_3.pdf, 28มกราคม 2557.
- ภัทราวดี พิทักษ์พลรัตน์. 2544. การโคลนและวิเคราะห์ลำดับเบสของจีนติเอ็นเอที่จำเพาะในโคลนพันธุ์อ้อยทนเค็ม. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 87 น.
- วรัญญา สীগัน. 2546. การโคลนและการหาลำดับเบสของยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดจากสภาวะความเครียดในอ้อย. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์ธุรกิจ), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 77 น.
- ภวิวิท พานิชพรพันธุ์. 2554. การโคลน การหาลำดับเบสและการแสดงออกของยีน *SoNHX1* ที่ตอบสนองต่อสภาพสภาวะทนเค็มจากอ้อย. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 93 น.
- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2560. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อยปีการผลิต 2559/60. แหล่งข้อมูล: <http://www.ocsb.go.th/upload/OCSBActivity/fileupload/8071-2689.pdf>
- Abdul, W.L., A. Rao and E. Rasul. 1997. Identification of salt tolerance traits in sugarcane lines. Field Crops Res. 54: 9-17.
- Ashraf, M., H.R. Athar, P.J.C. Harris and T.R. Kwon. 2008. Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. Adv. Agron. 97:45-110.
- Ashraf, M. and N.A. Akram. 2009. Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: An analytical comparison. Biotech. Adv. 27: 744-752.
- Cavaliere, A.J. 1983. Proline and glycine betaine accumulation by *Spartina alterniflora* Loisel in response to NaCl and nitrogen in a control environment. Oecologia 57: 20-24.
- Chaugool, J., H. Naito, S. Kasuga and H. Ehara. 2013. Comparison of young seedling growth and sodium distribution among *Sorghum* plants under salt stress. Plant Prod. Sci. 16: 261-270.
- Chen, M., Q.Y. Wang, X.G. Cheng, Z.S. Xu, L.C. Li, X. G. Ye, L.Q. Xia and Y.Z. Ma. 2007. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. Biochem. and Biophysic. Res. Com. 353 : 299-305.

- Cheng, N.H., J.K. Pittman, B.J. Barkla, T. Shigaki and K.D. Hirschi. 2003. The *Arabidopsis* *cax1* mutant exhibits impaired ion homeostasis, development, and hormonal responses and reveals interplay among vacuolar transporters. *The Plant Cell* 15:347–364.
- Cheng, N.H., J.K. Pittman, J.K. Zhu and K.D. Hirschi. 2004. The protein kinase SOS2 activates the *Arabidopsis* H^+/Ca^{2+} antiporter CAX1 to integrate Ca transport and salt tolerance. *J. Biol. Chem.* 279: 2922–2926.
- Cong, L., T.Y. Chai and Y.X. Zhang. 2008. Characterization of the novel gene *BjDREB1B* encoding a DRE-binding transcription factor from *Brassica juncea* L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371:702–706.
- Cushman, M.A., D.D. Bufford, M. Fredrickson, A. Ray, I. Akselrod, D. Landrith, L. Stout, J. Macroco and J. Cushman. 1999. An expressed sequence tag (EST) database for the common ice plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* 120: 145-150.
- Dubcovsky, J., G.S. Maria, E. Epstein, M.C. Luo and J. Dvorak. 1996. Mapping of the K^+/Na^+ discrimination locus *Kna1* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 92: 448-454.
- FAO. n.d. Crop salt tolerance data. Available at <http://www.fao.org/docrep/005/y4263e/y4263e0e.htm>, January 28, 2014.
- Fayez, K.A. and S.A. Bazaid. 2014. Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate. *J. Saudi Soc. Agri. Sci.*, 13:45–55.
- Flowers, T.J., M.L. Koyama, S.A. Flowers, C. Suchakar, K.P. Singh and A.R. Yeo. 2000. QTL: Their place in engineering tolerance of rice to salinity. *J. Exp. Bot.* 51: 99-106.
- Fooland, M.R. and F.Q. Chen. 1998. RAPD markers associated with salt tolerance in an inter specific cross of tomato. *Plant Cell Rep.* 17: 306-312.
- Kamiya, T. and M. Maeshima. 2004. Residues in Internal Repeats of the Rice Cation/ H^+ Exchanger Are Involved in the Transport and Selection of Cations. *The Journal of Biological Chemistry.* 279: 812–819.
- Kamiya, T., T. Akahori, M. Ashikari and M. Maeshima. 2005. Expression of the vacuolar Ca^{2+}/H^+ exchanger, *OsCAX1a*, in rice: cell and age specificity of expression and enhancement by Ca^{2+} . *Plant Cell Physiol.* 47:96–106.
- Knight, H., A.J. Trewavas and M.R. Knight. 1997. Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.* 12: 1067–1078.

- Lata, C and M. Prasad. 2011. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *J. Exp. Bot.* 1-18.
- Mendoza, I., F. Rubio, A. Rodriguez-Navarro, and, J.M. Prado. 1994. The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269: 8792–8796.
- Rasi-Caldogno, F., A. Carnelli and M.I. De Michelis. 1995. Identification of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase and of its autoinhibitory domain. *Plant Physiol.* 108: 105-113.
- Senadheera, P., R. K. Singh and F. J. M. Maathuis. 2009. Differentially expressed membrane transporters in rice roots may contribute to cultivar dependent salt tolerance. *J. of Experimental Botany.* 60: 2553–2563.
- Xianjun, P., M. Xingyong , F. Weihong , S. Man , C. Liqin , I. Alam , B.H. Lee , Q. Dongmei , S. Shihua and L. Gongshe. 2011. Improved drought and salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* by transgenic expression of a novel DREB gene from *Leymus chinensis*. *Plant Cell Rep.* 30(8):1493-502.
- Yamaguchi-Shinozaki, K and K. Shinozaki. 2009. DREB Regulons in Abiotic-Stress-Responsive Gene Expression in Plants. *Molecular Breeding of Forage and Turf.* 15-28.
- Zhu, J.K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6: 66–71.