



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การค้นหาและรูปแบบการแสดงออกของยีน Myo-inositol 1- Phosphate Synthase (MIPS) ในอ้อย (*Saccharum officinarum* L.) ที่ได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็ม
Gene discovery and expression pattern of Myo-Inositol 1-Phosphate Synthase (MIPS) gene in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) received mimic saline soil condition

นางสาวชนากานต์ ลักษณะ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณพ.ศ. ๒๕๖๐
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ ๕๔๕๑๗๔
สัญญาเลขที่ ๕/๒๕๖๐

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การค้นหาลักษณะรูปแบบการแสดงออกของยีน Myo-inositol 1- Phosphate Synthase (MIPS) ในอ้อย (*Saccharum officinarum* L.) ที่ได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็ม
Gene discovery and expression pattern of Myo-Inositol 1-Phosphate Synthase (MIPS) gene in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) received mimic saline soil condition

นางสาวชนากานต์ ลักษณะ
คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา
วิทยาเขตสระแก้ว

ได้รับงบประมาณ เดือนตุลาคม พ.ศ. ๒๕๕๙ – กันยายน พ.ศ. ๒๕๖๐

บทคัดย่อ

ยีน *MIPS* (*Myo-inositol 1-phosphate synthase*) เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะที่พืชใช้ตอบสนองต่อดินเค็ม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MIPS* ในอ้อย 3 พันธุ์ พบว่า มีขนาด 1533 นิวคลีโอไทด์ เมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 511 หน่วย เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามี 12 ตำแหน่งที่แตกต่างกัน แต่กรดอะมิโนจะมีเพียง 2 ตำแหน่งเท่านั้นที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนนี้ในอ้อย 3 พันธุ์ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 วัน พบว่า การแสดงออกของยีนที่รากจะมีมากกว่าที่ใบ และพบว่าที่โซเดียมคลอไรด์ 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ การแสดงออกของยีนดังกล่าวทั้งที่ใบและรากของพันธุ์ไบโอเทค 2 จะมีการแสดงออกสูงที่สุดเมื่อเทียบกับพันธุ์อื่นที่ 5 วัน และ 2 วันหลังได้รับโซเดียมคลอไรด์ ตามลำดับ ความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนรวมทั้งระดับการแสดงออกของยีนอาจมีความเกี่ยวข้องกัน และอาจจะสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด gene targeted marker เพื่อใช้ช่วยคัดเลือกอ้อยที่ทนทานต่อดินเค็มได้

Abstract

MIPS (*Myo-inositol 1-phosphate synthase*) gene is a gene that plants use for responding to saline soil. The objective of this study was to clone of *MIPS* from 3 sugarcane genotypes. It revealed that the full length of the gene contains 1533 nucleotides which encoded for 511 amino acid residues. There are 12 nucleotide positions and 2 amino acid residues different among 3 sugarcane genotypes. The expression levels of *MIPS* in the three sugarcane cultivars subjected to salt stress for 5 days were also compared. It was indicated that the expression levels of the gene in roots were higher than those in leaves. At 100 and 200 mM NaCl the expression levels of the gene in leaves and roots of Biotech 2 were highest at day 5 and day 2 of stress, respectively. 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.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล
(งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการ
วิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 5/2560

บทคัดย่อ

ยีน *MIPS* (*Myo-inositol 1-phosphate synthase*) เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะที่พืชใช้ตอบสนองต่อดินเค็ม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MIPS* ในอ้อย 3 พันธุ์ พบว่า มีขนาด 1533 นิวคลีโอไทด์ เมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 511 หน่วย เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามี 12 ตำแหน่งที่แตกต่างกัน แต่กรดอะมิโนจะมีเพียง 2 ตำแหน่งเท่านั้นที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนนี้ในอ้อย 3 พันธุ์ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 วัน พบว่า การแสดงออกของยีนที่รากจะมีมากกว่าที่ใบ และพบว่าที่โซเดียมคลอไรด์ 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ การแสดงออกของยีนดังกล่าวทั้งที่ใบและรากของพันธุ์ไบโอเทค 2 จะมีการแสดงออกสูงที่สุดเมื่อเทียบกับพันธุ์อื่นที่ 5 วัน และ 2 วันหลังได้รับโซเดียมคลอไรด์ ตามลำดับ ความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนรวมทั้งระดับการแสดงออกของยีนอาจมีความเกี่ยวข้องกัน และอาจจะสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด gene targeted marker เพื่อใช้ช่วยคัดเลือกอ้อยที่ทนทานต่อดินเค็มได้

Abstract

MIPS (*Myo-inositol 1-phosphate synthase*) gene is a gene that plants use for responding to saline soil. The objective of this study was to clone of *MIPS* from 3 sugarcane genotypes. It revealed that the full length of the gene contains 1533 nucleotides which encoded for 511 amino acid residues. There are 12 nucleotide positions and 2 amino acid residues different among 3 sugarcane genotypes. The expression levels of *MIPS* in the three sugarcane cultivars subjected to salt stress for 5 days were also compared. It was indicated that the expression levels of the gene in roots were higher than those in leaves. At 100 and 200 mM NaCl the expression levels of the gene in leaves and roots of Biotech 2 were highest at day 5 and day 2 of stress, respectively. 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.

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	9
ผลการวิจัย	13
วิจารณ์ผลการวิจัย	34
สรุปผลการวิจัย	35
ผลผลิต	36
รายงานการเงิน	37
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	41
ประวัตินักวิจัยและคณะ	42

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>MIPS</i> ที่สังเคราะห์ได้จากฐานข้อมูล GeneBank	22

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	แสดงการสังเคราะห์ inositol 6
2	total RNA ที่สกัดได้จากราก (R1-R4) และใบอ่อน (L1-L4) ของอ้อยพันธุ์การค้า (KPS 94-13) ที่ได้รับ NaCl นาน 0, 1, 2 และ 3 วัน 13
3	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ first strand cDNA ที่สังเคราะห์จาก total RNA จากอ้อยพันธุ์การค้า KPS 94-13 ที่ได้รับ NaCl 200 mM นาน 3 วัน เป็นแม่แบบและทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน <i>Actin</i> 14
4	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ first strand cDNA ที่สังเคราะห์จาก total RNA จากอ้อยพันธุ์การค้า (KPS 94-13) ที่ได้รับ NaCl 200 mM นาน 3 วัน เป็นแม่แบบและทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด degenerated primer บริเวณอนุรักษ์ของยีน <i>MIPS</i> 16
5	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ได้โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด degenerated primer จากบริเวณอนุรักษ์ของยีน <i>MIPS</i> ของพืชต่าง ๆ ในฐานข้อมูล Genbank 16
6	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ first strand cDNA ที่สังเคราะห์จาก total RNA จากอ้อยพันธุ์การค้า(KPS 94-13) ที่ได้รับ NaCl 200 mM นาน 3 วัน 17
7	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ได้โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด degenerated primer จากบริเวณ start codon ของยีน <i>MIPS</i> ของพืชต่าง ๆ ในฐานข้อมูล Genbank 18
8	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ specific primer ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น stop codon 19
9	พลาสมิด pGEM3 T easy เชื่อมต่อกับ full length ของยีน MIPS 19
10	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>MIPS</i> ของอ้อย 3 พันธุ์ 23
11	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>MIPS</i> ในอ้อย 3 พันธุ์ 26
12	แสดงส่วนของ exon และ intron ของยีน <i>MIPS</i> 27
13	แสดง Phylogenetic tree ของกรดอะมิโน <i>MIPS</i> ของอ้อยพันธุ์ปลูก KPS 94-13 (94-13) พันธุ์ป่า (wild) และลูกผสมระหว่างอ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก (biotech2) กับกรดอะมิโนของ <i>MIPS</i> ในพืชชนิดต่างๆด้วยโปรแกรม ClustalW2 28

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	วิเคราะห์ Transmembrane ของอ้อยทั้ง 3 สายพันธุ์ด้วยโปรแกรม SPLIT 4.0 SERVER	28
15	การแสดงออกของยีน <i>MIPS</i> ในใบ (ก) และราก (ข) ของพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน	29
16	การแสดงออกของยีน <i>MIPS</i> ในใบ (ก) และราก (ข) ของพันธุ์ป่า ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน	30
17	การแสดงออกของยีน <i>MIPS</i> ในใบ (ก) และราก (ข) ของพันธุ์ใบโอเทค 2 ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน	30
18	การแสดงออกของยีน <i>MIPS</i> ในใบ (ก) และราก (ข) ของพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน	31
19	การแสดงออกของยีน <i>MIPS</i> ในใบ (ก) และราก (ข) ของพันธุ์ป่า ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน	31
20	การแสดงออกของยีน <i>MIPS</i> ในใบและรากของพันธุ์ใบโอเทค 2 ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย	32
21	เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน <i>MIPS</i> ใบและรากของอ้อย 3 พันธุ์ ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน	32
22	เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน <i>MIPS</i> ใบและรากของอ้อย 3 พันธุ์ ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน	33

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

อ้อยเป็นพืชไร่เศรษฐกิจที่สำคัญของไทยชนิดหนึ่ง ในประเทศไทยมี 47 จังหวัดที่มีการปลูกอ้อย (Sriroth *et al.*, 2016) โดยพื้นที่ที่ปลูกอ้อยทั้งประเทศในปีการผลิต 2558/2559 มีประมาณ 11.01 ล้านไร่ ภาคตะวันออกก็เป็นอีกภาคที่มีการปลูกอ้อย โดยเฉพาะใน จ.สระแก้วมีพื้นที่ปลูกอ้อยถึง 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 ภาวะความเค็มและความแห้งแล้งจะทำให้มีความเข้มข้นของเกลือในระดับสูง จะทำให้สมดุลของไอออนต่าง ๆ เปลี่ยนแปลงไป เช่น สมดุลของ Na^+ , K^+ , Ca^{2+} และ Cl^- มีผลต่อแรงดันออสโมติกทำให้เกิดเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นพืชจึงต้องพยายามรักษาสมดุลไอออนและปรับแรงดันออสโมติก

การเพิ่มผลผลิตอ้อยที่ปลูกในพื้นที่ดินเค็มสามารถทำได้โดยการปรับปรุงสภาพดินเค็ม แต่การปรับปรุงดินดังกล่าวต้องใช้เวลานาน ค่าใช้จ่ายสูง และต้องใช้ความรู้ทางวิชาหลายแขนงเข้าร่วมอย่างมาก และอีกวิธีหนึ่งคือการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนทานต่อดินเค็มมากขึ้น อ้อยที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์นี้จะสามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้ในระดับที่น่าพอใจแม้จะปลูกในดินที่เป็นดินเค็มก็ตาม แต่การปรับปรุงพันธุ์อ้อยโดยวิธีการมาตรฐาน (conventional breeding) ใช้เวลานาน และค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งอาจประสบความสำเร็จได้ยากเนื่องจากต้องมีแหล่งพันธุกรรมของอ้อยที่ทนทานต่อดินเค็ม ดังนั้นจึงมีนาเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาค้นหาอ้อยใช้ตอบสนองต่อความเค็ม การแยกและการโคลนยีนบางยีนที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับกระบวนการการตอบสนองต่อความเค็ม จึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นแรกที่จะต้องทำ เมื่อทราบว่าอ้อยใช้ยีนชนิดใดตอบสนองต่อความเค็มแล้วจึงเป็นขั้นตอนที่จะใช้ประโยชน์จากยีนที่ค้นพบนั้น แนวทางหนึ่งที่จะใช้ประโยชน์จากยีนที่ค้นพบคือ การพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับลักษณะที่ยีนนั้นควบคุมอยู่ เพื่อใช้ในการคัดเลือกต้นหรือพันธุ์ที่มีความทนทานต่อดินเค็ม การใช้เทคนิคทางอณูวิทยาในการปรับปรุง

พันธุ์อ้อยให้ทนเค็มมากขึ้น จึงเป็นแนวทางปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนทานต่อสภาพดินเค็มได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นการเพิ่มผลผลิตอ้อยที่ง่ายและประหยัดที่สุด

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโนและโคลนยีน *MIPS* (Myo-inositol 1-Phosphate Synthase) ที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพดินเค็ม

2.2 ศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *MIPS* ที่โคลนได้ในอ้อย เพื่อเป็นแนวทางการใช้ประโยชน์จากยีนดังกล่าวในการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนดินเค็มในอนาคต

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้จะให้สภาพแวดล้อมที่เลียนแบบสภาพดินเค็มโดยการใช้สารละลายธาตุอาหารที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 และ 200 mM เพื่อให้อ้อยอยู่ในสภาพเครียดคล้ายที่เกิดจากดินเค็ม สภาพดังกล่าวจะกระตุ้นให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเค็มแสดงออกเพื่อความอยู่รอดของพืชเอง โดยอ้อยที่ใช้ในการทดลองนี้มี 3 สายพันธุ์ คือ อ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูกและลูกผสมระหว่างอ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก จากนั้นจึงสกัด total RNA ที่ประกอบไปด้วย mRNA ของยีนที่แสดงออกในสภาพดินเค็มปะปนอยู่ด้วย แล้วจึงเปลี่ยน mRNA ให้เป็น cDNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *MIPS* ในพืชหลายชนิด เพื่อให้จำเพาะกับยีน *MIPS* ในอ้อย ซึ่งยีน *MIPS* นี้จะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณการแลกเปลี่ยนและจัดเก็บออกซิน (auxin) การสังเคราะห์ phytic acid และการสร้างสารสำคัญในกลุ่มน้ำตาล inositol คือ myo-inositol ที่จะถูกสังเคราะห์เมื่อพืชได้รับสภาวะเครียดจากทั้งสภาวะความแล้ง และความเค็ม โดยจะปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์โดยการทำให้เกิดการสะสม myo-inositol ในสารละลายเพื่อช่วยในการควบคุมแรงดันออสโมติก หลังจากนั้นใช้ปฏิกิริยา RT-PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *MIPS* เมื่อได้ cDNA บางส่วนของยีน *MIPS* แล้วจึงนำมาศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหลือเพื่อให้ได้ครบทั้งยีน โดยเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับฐานข้อมูลสาธารณะเพื่อบ่งบอกชนิดและหน้าที่ของยีน และตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค real-time PCR เพื่อนำข้อมูลมาใช้ในการคัดเลือกต้นอ้อยที่ทนทานต่อดินเค็มต่อไป

4. ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สมมุติฐานของการวิจัยนี้คือ พืชสามารถปรับตัวให้ทนต่อสภาพเค็มหรือสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอื่นๆ ได้ นั่น จะขึ้นอยู่กับการแสดงออกของยีน ซึ่งการแสดงออกได้มากน้อยเร็วหรือช้า อาจขึ้นอยู่กับความแตกต่างขององค์ประกอบของยีนที่มีอยู่ในสายพันธุ์พืชที่ทนทานและอ่อนแอ เช่น ลำดับของนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนที่แตกต่างกัน ความแตกต่างกันของส่วนโปรโมเตอร์ ความแตกต่างกันของ transcription factor ยีนที่ควบคุมการลำเลียงโปรตรอนแลกกับโซเดียมและแคลเซียมไปสู่แวคิวโอล

(vacuole ATPase) หรือ ยีนควบคุมกลไกแรงดันออสโมซิสภายในเซลล์เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ โดยการที่พืชสังเคราะห์และสะสมสารพวก osmolytes การทราบชนิดของยีนและลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเค็ม จะทำให้เข้าใจถึงกระบวนการทำงานของพืชที่ทนทานหรืออ่อนแอต่อดินเค็มได้ ซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ได้ใช้เป็นแนวทางในการค้นหา ปรับปรุง และคัดเลือกพันธุ์หรือสายพันธุ์อ้อยที่มีความทนทานต่อดินเค็มได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีประสิทธิภาพมากขึ้น

5. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ความเค็ม (salinity) เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตของพืชลดลง เนื่องจากความเค็มจะไปยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆที่มีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าพืชบางชนิดสามารถปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดหรือเติบโตในสภาวะเค็มนี้ได้ 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 เกิดเนื่องจากความเป็นพิษของไอออนบางชนิดที่พืชดูดเข้าไปสะสมมากเกินไปจนความต้องการทำให้ไปยับยั้งการทำงานของธาตุอาหารอื่นๆได้ เช่น Na^+ และ Cl^- จะไปยับยั้งการดูดซึมธาตุอาหารที่จำเป็นต่อพืช เช่นโพแทสเซียม 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 (Cavalieri, 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 หรือการอบน้ำ (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.)

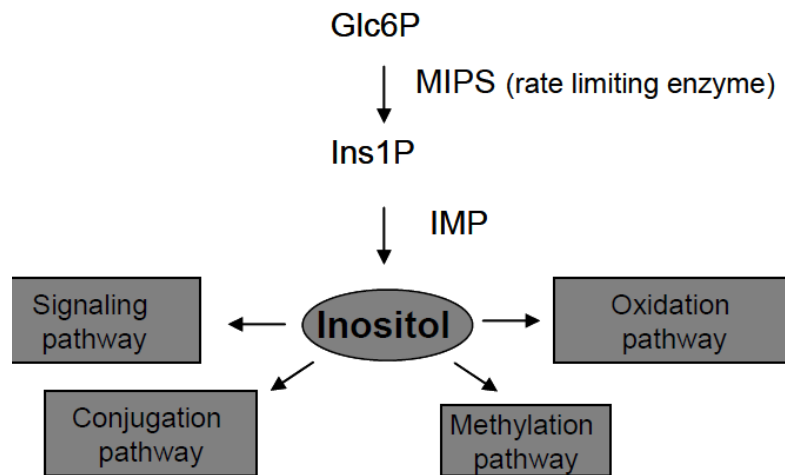
กลไกที่แตกต่างกันเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าพืชมีวิวัฒนาการหลากหลายรูปแบบเพื่อให้สามารถอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะที่มีเกลือสูง และสะท้อนให้เห็นว่ามียีนที่ควบคุมกลไกการทำงานเหล่านี้ด้วยเช่นกัน

ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลต่าง ๆ มาใช้ในการศึกษาและจำแนกยีนที่เกี่ยวข้อง หรือตอบสนองต่อสภาวะเค็ม เช่น การทดลองใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD หาตำแหน่งยีนทนเค็มในมะเขือเทศ และได้ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลต่อลักษณะทนเค็มในช่วงระยะการงอกของเมล็ด (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)

ความสามารถในการปรับตัวของเซลล์เพื่อให้สามารถปรับตัวอยู่ในสภาวะเค็มได้นั้นเกี่ยวข้องกับหลายกลไก การปรับลดค่าแรงดันออสโมติกก็เป็นอีกกลไกหนึ่งที่มีความสำคัญ โดยพืชจะทำการสร้างสาร osmolytes เมื่อเผชิญกับความเครียดจากสภาวะเค็ม (Cavalieri, 1983) การสะสมสารที่อยู่ในกลุ่มของ osmoprotective compounds ซึ่งเป็นที่รู้จักในชื่อ compatible solutes เป็นโมเลกุลของสารอินทรีย์ ขนาดเล็กที่ไม่มีพิษต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม ประกอบด้วยสารหลายชนิดเช่น proline, glycine betaine, polyols, sugar alcohols และ soluble sugars โดยสารเหล่านี้จะช่วยรักษาสภาพโปรตีนและโครงสร้างของเซลล์ และยังสามารถเพิ่มแรงดันออสโมติกในเซลล์ กลไกควบคุม osmotic pressure ของเซลล์ให้เหมาะสม

โดยการสะสมสารออสโมไลต์ เช่นเดียวกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส และฟรุกโตส สามารถปลดปล่อยจากแป้ง และฟรุกโตส เพื่อใช้ในการตอบสนองต่อความเครียด และเมื่อความเครียดหายไปน้ำตาลเหล่านี้ก็จะสามารถกลับคืนสู่รูปเดิมโดยกระบวนการรีโพลีเมอไรส์ (Chen and Norio, 2002) สารออสโมไลต์ ที่สำคัญ เช่น myo-inositol เป็นสารในกลุ่ม osmoprotectant คือ น้ำตาลโพลีออล เช่น กลีเซอริน แมนนิทอล ซอลบิทอล และซูโครส ซึ่งถูกสังเคราะห์มาจาก D-glucose-6-P ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในการสร้างเนื้อเยื่อเมมเบรนรวมทั้งการส่งสัญญาณในการป้องกันเซลล์พืชจากสภาวะเครียด เมตาบอลิซึมของพืชซึ่งเป็นปฏิกิริยาการย่อยกลูโคส และเป็นแหล่งของคาร์บอนในช่วงแรกของกระบวนการงอก (Rathinasabapathi, 2000; Karner *et al.*, 2004) ปฏิกิริยา isomerization และ methylation ของ myo - inositol ได้อนุพันธ์ต่างๆ เช่น O-methyl inositol, sequeoyitol, bornesitol, pinitol และ ononitol ใช้เป็น signal transduction ของเซลล์พืช (Gillaspy, 2011) และทำหน้าที่ส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับพืดเพตที่ทำหน้าที่ควบคุมยีนและเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเผาผลาญธาตุอาหาร ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องในการรักษาเสถียรภาพของเซลล์ในการป้องกันความเสียหายของเนื้อเยื่อและเอนไซม์ เพื่อเพิ่มความทนทานในพืชหลายชนิดที่ได้รับความเครียด

Myo-inositol 1-phosphate synthase (MIPS) เป็นเอนไซม์ ที่สามารถพบได้ทั้ง พืช สัตว์ และ เชื้อรา ส่วนใหญ่พบในพืชชั้นสูง เอนไซม์ MIPS เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน glucose 6-phosphate เป็น myo-inositol-1-phosphate หลังจากนั้น ถูกออกซิไดซ์ ด้วยเอนไซม์ชนิดที่สอง คือ myo-inositol - monophosphatase (MIP) ซึ่งเอนไซม์ MIP จะสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาดีฟอสโฟรีเลชัน (dephosphorylation) ทำให้หมู่ฟอสเฟตถูกปลดปล่อย ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนขนส่ง stress-related molecules มีบทบาท สำคัญในการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ (phospholipids) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวของกลีเซอรอล (glycerol) 1 โมเลกุล กรดไขมัน (fatty acid) 2 โมเลกุล และกรดฟอสฟอริก 1 โมเลกุล (phospholipids) นอกจากนั้นยังทำหน้าที่ส่งสัญญาณการแลกเปลี่ยนและจัดเก็บออกซิน (auxin) การสังเคราะห์ phytic acid และสารสำคัญในกลุ่มน้ำตาล inositol คือ myo-inositol จะถูกสังเคราะห์เมื่อพืชได้รับสภาวะเครียด Hegeman *et al.* (2001) รายงานว่า พบเอนไซม์ MIPS ในเมล็ดถั่วเหลืองในช่วงการพัฒนาของเมล็ด และระยะการสร้างใบเลี้ยง (cotyledonary) เพราะในระยะเวลาเจริญนี้เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาล glucose-6-phosphate เพื่อเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์ MIPS ตอบสนองต่อสภาวะความแล้ง และความเค็ม เพื่อปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์โดยการทำให้เกิดการสะสม myo-inositol ในสารละลายเพื่อช่วยในการควบคุมแรงดันออสโมติก



ภาพที่ 1 แสดงการสังเคราะห์ inositol

ที่มา: Majee *et al.* (2004)

Gajjeraman *et al.* (2011) ศึกษาอ้อยที่ปลูกในสภาพขาดน้ำแล้วทำการสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อทำ library พบว่ามียีนที่มีการแสดงออกในสภาวะแล้ง และพบว่ามี การแสดงออกของยีน myo-inositol 1-phosphate synthase ซึ่งสังเคราะห์ D-glucose-6-phosphate ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณในการสังเคราะห์กรดไขมัน เพื่อนำไป ใช้ในการเจริญเติบโต กระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ

Khurana *et al.* (2012) โคลนยีน *MIPS* ในข้าวสาลีด้วยเทคนิค RACE PCR ได้ยีนขนาด 1,530 คู่เบส จากการกระตุ้นด้วยอุณหภูมิสูง และตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า *MIPS1* จะแสดงออกตลอดเวลา ส่วน *MIPS2* จะแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้น นอกจากนั้นยังพบว่ามี การแสดงออกในใบมากกว่าราก

Chatterjee *et al.* (2006) ศึกษา ยีน *MIPS* ในหญ้า *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka ทดสอบความสามารถในการทนเค็มด้วยการถ่ายยีนนี้เข้าสู่ข้าวและยาสูบ จากผลการทดลองสามารถยืนยันได้ว่าพืชที่ได้รับยีน *MIPS* สามารถทนเค็มได้

ในอ้อยนั้นมียีนวิจัยหลายชิ้นที่พยายามโคลนบางส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองต่อความเค็ม ซึ่งจะสามารถนำมาศึกษาต่อยอดได้ทันที อันจะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์อ้อย และการพัฒนาเป็น specific marker สำหรับใช้ในการคัดเลือกอ้อยทนเค็มได้ในอนาคต เช่นยีนในกลุ่ม histidine containing phosphotransferase (*Hpt*) (ภัทราวดี, 2544) ยีน cysteine proteinase inhibitor (*cystatin*) (วรัญญา, 2546) และยีน vacuolar Na^+/H^+ antipoter (*SoNHX1*) (ภวินท์, 2554)

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

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

6.1 ประโยชน์ในแง่วิชาการได้แก่ นำเสนอผลงานในวารสารวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ อย่างน้อย 1 เรื่อง

6.2 ประโยชน์ในแง่การประยุกต์ การพัฒนาขึ้นเป็น specific marker หรือ gene targeted marker ที่ใช้ช่วยในการคัดเลือกอ้อยทนทานต่อดินเค็มได้ในอนาคต

6.3 หน่วยงานที่เกี่ยวข้องสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปใช้ได้ เช่น มหาวิทยาลัยและสถานการศึกษาที่มีการศึกษาทางด้านวิทยาศาสตร์ เกษตรศาสตร์ และหน่วยงานที่มีหน้าที่ในการปรับปรุงพันธุ์อ้อย เช่น กรมวิชาการเกษตร สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล และผู้สนใจทั่วไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. อ้อยที่ใช้ศึกษาประกอบด้วยอ้อย 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์การค้า KPS 94-13 อ้อยป่า (*Saccharum spontaneum*) และอ้อยลูกผสมระหว่างอ้อยปลูกและอ้อยป่า (พันธุ์ไบโอเทค 2)
2. อุปกรณ์สำหรับการค้นหา ยีน และการแสดงออกของยีน MIPS
 - 2.1 เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ ปีกเกอร์ กระบอกตวง
 - 2.2 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
 - 2.3 ตู้อบ (hot air oven)
 - 2.4 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH - meter)
 - 2.5 เครื่องชั่งสาร (balance)
 - 2.6 เตาไมโครเวฟ (microwave)
 - 2.7 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 MIPS
6. ไพรเมอร์สำหรับโคลนยีน และตรวจสอบการแสดงออกของยีน

ไพรเมอร์สำหรับโคลนยีน full length MIPS

MIPS F 5' ATGTTTCATCGAGAGCTTC

MIPS R 5' TCACTTGTA TCCAGGATCAT

ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน

Mip RT (inositol) F 5'CCCCAAGTCCGTCAAGTACA

Mip RT (inositol) R 5'CTTGGTCGCCCATGAGATCC

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 ที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นโดยการทำให้เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วย 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 เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ DNase I แล้วทำการตรวจสอบผลการกำจัดจีโนมดีเอ็นเอด้วยการทำให้เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ 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 MIPS ซึ่งเกี่ยวข้องในกระบวนการตอบสนองต่อสภาพดินเค็มโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลสาธารณะ เช่น Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) และโปรแกรมที่เกี่ยวข้องกับการออกแบบไพรเมอร์เช่น Primer3 จาก web site <http://simgene.com/Primer3> เพื่อใช้โคลนยีนดังกล่าวจากอ้อยที่ได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็ม จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนที่ออกแบบไว้เพื่อสร้าง cDNA บางส่วนของยีน เป้าหมาย MIPS-F1 และ MIPS-R1

2.4 clone cDNA บางส่วนของยีนเป้าหมายเข้าสู่ cloning vector pGem-T easy จากนั้น transform เข้าสู่ *E. coli* แล้วสุ่มเลือก colony เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลสาธารณะเพื่อบ่งชี้ยีนโดยใช้โปรแกรม BLAST จาก www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

2.5 หา full length ของยีน จากนั้นจึงตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และเทียบกับฐานข้อมูลอีกครั้ง เพื่อความถูกต้อง และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่ง DNA คู่สมผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1st BASE (First BASE Laboratories, Selangor DarulEhsan, Malaysia) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MIPS และ Actin ที่มีการ

รายงานในฐานข้อมูลสากล ด้วยโปรแกรม BLAST จากเว็บไซต์ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> และ ทำ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม clustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) และ PhyloDendron (<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html>) การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์และ bioinformatics นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ full-length ของยีน *MIPS* ที่ได้ เปลี่ยนเป็น ลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม MEGA6 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ multiple sequence alignment ด้วย โปรแกรม Protein BLAST ในฐานข้อมูล GenBank ([www.blast .ncbi.nlm.nih.gov](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)) และ ClustalW2 (www.ebi.ac.uk) สร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA6 (bootstrap value 1,000 replicate) และวิเคราะห์ hydrophobic plot ด้วยโปรแกรม TMPred (www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)

2.6 ส่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเก็บบนฐานข้อมูล GenBank (National Center for Biotechnology Information (NCBI), Madison, USA.)

3. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนโดยวิธี real-time PCR

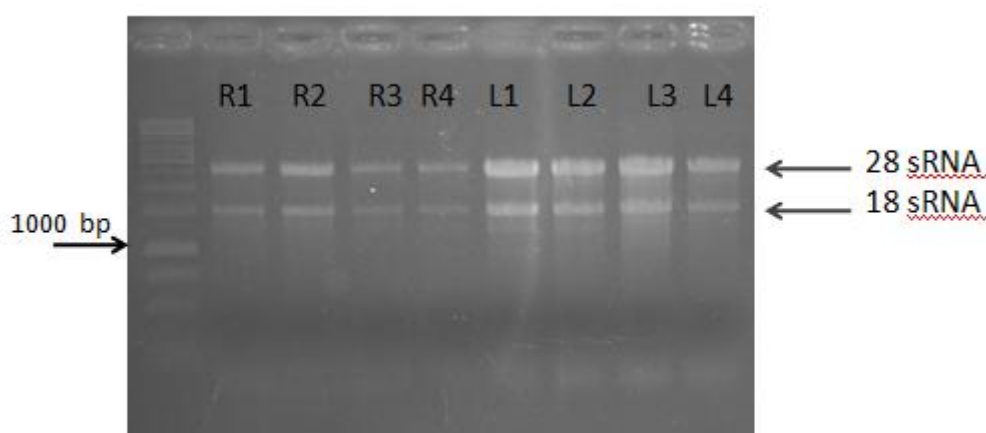
ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *MIPS* ด้วยโปรแกรม primer 3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีนที่เป็น full length ที่หาได้ โดยกำหนดให้ DNA ที่เป็นผลผลิตของปฏิกิริยามีขนาด 150-200 คู่เบส จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา real-time PCR กับ cDNA ของใบและรากที่สังเคราะห์จาก RNA ของอ้อยที่ได้รับ สภาพเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน โดยใช้ยีน *GADPH* (Accession number : CA254672) 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 ความเข้มข้นชนิดละ 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

การค้นหายีนที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อความเค็ม

การสกัด total RNA

นำรากและใบอ่อนของอ้อยพันธุ์การค้า (KPS 94-13) ทั้งที่ไม่ได้รับสภาพเปลี่ยนแปลงดินเค็มและที่ได้รับจากความเค็มจากโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ นาน 0, 1, 2 และ 3 วันมาสกัด total RNA พบว่าสามารถสกัด total RNA ที่มีคุณภาพดีได้เพียงพอต่อการนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 2 total RNA ที่สกัดได้จากราก (R1-R4) และใบอ่อน (L1-L4) ของอ้อยพันธุ์การค้า (KPS 94-13) ที่ได้รับ NaCl นาน 0, 1, 2 และ 3 วัน ตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis ใน 0.8% agarose ใช้ 0.5xTBE buffer ที่ 100 volt นาน 40 นาที)

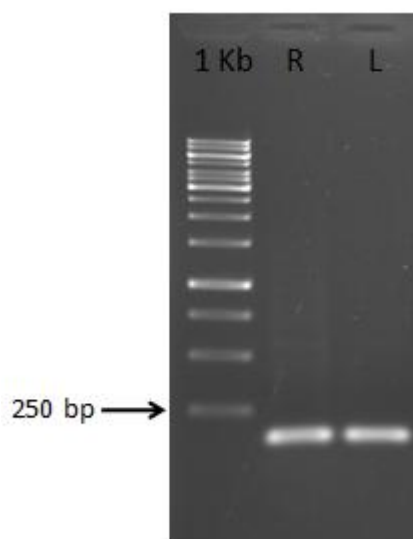
การสังเคราะห์ first strand cDNA

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 (*Actin*) ดังนี้

Actin-F: 5'-CGA AGG ATA TGC CCT TCC CC-3'

Actin-R: 5'-ATA CGA TCA GCG ATG CCT GG-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 *Actin* ให้ผลผลิตเป็น DNA ขนาด 200 bp จริง (ภาพที่ 3) แสดงว่า first strand cDNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมีคุณภาพดี สามารถนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไปได้



ภาพที่ 3 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ first strand cDNA ที่สังเคราะห์จาก total RNA จากอ้อยพันธุ์ KPS 94-13 ที่ได้รับ NaCl 200 mM นาน 3 วัน เป็นแม่แบบและทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *Actin* ตรวจสอบด้วยวิธี Electrophoresis (0.8% agarose ใน 0.5xTBE buffer ที่ 100 volt นาน 40 นาที)

การค้นหายีน *L-Myo-Inositol 1-Phosphate Synthase (MIPS)*

ออกแบบไพรเมอร์ชนิด degenerate ที่จำเพาะกับยีน *myo-inositol 1-phosphate synthase (MIPS)* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนอนุรักษ์ของยีน *MIPS* จากพืชชนิดต่าง ๆ เช่น ข้าวโพด (*Zea mays*) Accession number [EU961709.1](#), ข้าวญี่ปุ่น (*Oryza sativa Japonica*) [EU267961.1](#), *Brachypodium distachyon* ([XM_003558559.2](#)), ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) [JN609219.1](#), ข้าวบาเลย์ (*Hordeum vulgare*) [AF056325.1](#), *Porteresia coarctata* (AF412340), *Spartina alterniflora* (GU441843), ข้าวโอ๊ต (*Avena sativa*) AB059557 และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *Actin* Accession number NM001136991 (*Zea mays*), AY742219 (*Saccharum officinarum*), XM 003569070 (*Brachypodium*

distachyon), GU290546 (*Zoysia japonica*) ที่ปรากฏในฐานข้อมูล Genbank ออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม gentyx และ GeneDoc ดังนี้

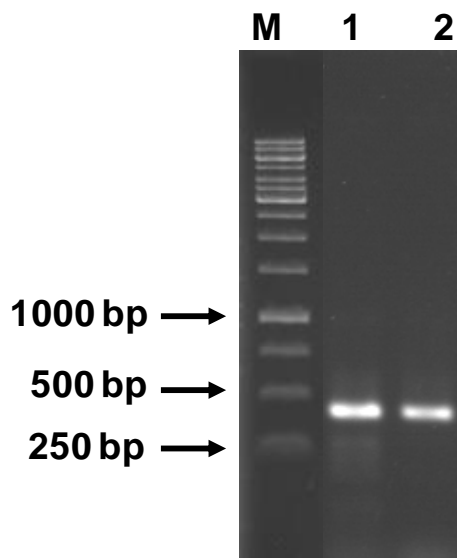
Partial *MIPS* Forward : 5' TGCTGGAATHAAGCCACCT 3'

Reverse : 5' TGAGGTAGCTCAGGATGGT 3'

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 490 bp (ภาพที่ 3)

เมื่อสกัด DNA จากเจลเพื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ผลดังนี้

GTGGACTAACCCCTTTGGGTAACAACGATGGCATGAACCTGTCTGCCCCTCAAACATTCAGGTCCAAGGA
GATCTCCAAGAGCAATGTGGTGGATGACATGGTCTCAAGCAATGCTATCCTCTATGAGCCCGGCGAGCAT
CCCGATCATGTTGTTGTCATCAAGTATGTGCCGTATGTGGGAGACAGTAAGAGGGCTATGGATGAGTACA
CCTCCGAGATCTTCATGGGCGGCAAGAACACCATCGTGCTGCACAACACCTGTGAGGACTCACTACTCGC
CGCACCTATCATCCTTGATCTGGTGCTCCTGGCTGAGCTCAGCACCAGGATCCAGCTAAAAGCTGAGGGA
GAGGACAAGTTCCACTCCTTCCACCCGGTGGCCACCATCCTGAGCTACCTCA



ภาพที่ 4 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ first strand cDNA ที่สังเคราะห์จาก total RNA จากอ้อยพันธุ์พันธุ์การค้า (KPS 94-13) ที่ได้รับ NaCl 200 mM นาน 3 วัน เป็นแม่แบบและทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด degenerated primer บริเวณอนุรักษ์ของยีน *MIPS*

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ในฐานข้อมูลสาธารณะโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BLASTN ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์นี้มีความเหมือนกับยีน *MIPS* ในพืชถึง 96% (ภาพที่ 5)

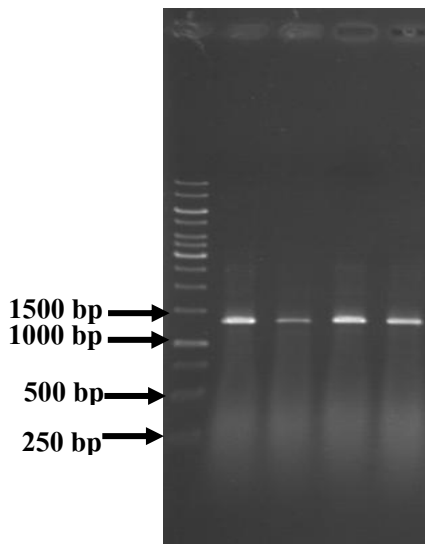
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Zea mays myo-inositol 1-phosphate synthase mRNA, complete cds	660	660	96%	0.0	96%	AFU56326.1
Zea mays inositol-3-phosphate synthase-like (mips2), mRNA	625	625	96%	2e-175	95%	NM_001112498.1
PREDICTED: Zea mays inositol-3-phosphate synthase-like (LOC103638125), transcript v1	590	590	96%	4e-165	93%	XM_008661111.1
Setaria italica inositol-3-phosphate synthase-like (LOC101773790), mRNA	585	585	96%	2e-163	93%	NM_001280847.1
PREDICTED: Zea mays inositol-3-phosphate synthase-like (LOC103638125), transcript v2	565	565	96%	1e-157	92%	XM_008661110.1
PREDICTED: Onza brachyantha inositol-3-phosphate synthase-like (LOC102712622), mF	533	533	96%	9e-148	90%	XM_006651061.1
Xerophyta viscosa myo-inositol-1-phosphate synthase INO1 mRNA, complete cds	527	527	96%	5e-146	90%	AY323824.1
Onza sativa Japonica Group clone KCS142A02 inositol-3-phosphate synthase mRNA, cor	521	521	96%	3e-144	90%	EU267961.1
Brassica juncea myo-iositol-1-phosphate synthase mRNA, partial cds	521	521	96%	3e-144	90%	EU371115.1

ภาพที่ 5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DNA ที่สังเคราะห์ได้โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด degenerated primer จากบริเวณอนุรักษ์ของยีน *MIPS* ของพืชต่าง ๆ ในฐานข้อมูล Genbank

จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ชนิด degenerate primer เพื่อค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5' ของสาย DNA ที่ได้จากการทำ PCR ครั้งแรก โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้เป็นดังนี้

MIPS3 F 5' ATGTTTCATCGARAGCTTY

MIPS R 5' GGRTGGAAGGARTGGAAGCTT



ภาพที่ 6 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ first strand cDNA ที่สังเคราะห์จาก total RNA จากอ้อยพันธุ์การคำ (KPS 94-13) ที่ได้รับ NaCl 200 mM นาน 3 วัน เป็นแม่แบบและทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด degenerated primer เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้าน 5'

เมื่อทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ first strand cDNA เป็นแม่แบบ ได้แถบ DNA ขนาดประมาณ 1,300 bp (ภาพที่ 6) และเมื่อนำ DNA ดังกล่าวไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วยส่วน start codon ด้วย ดังนี้

```

ATGTTTCATCGARAGCTTYCCGCGTGGAGAGCCCCACGTTTCGGTATGGCCCCGACGGAGATCGAGTCGGAG
TACCGGTACGACACGACGGAGCTGGTGCACGAGGGCAAGGACGGCGCCTCCCGCTGGGTCGTCGGCCCC
AAGTCCGTCAAGTACAACCTCCGGACCAGCACCGCCGTCGCCAACTCGGGGTGATGCTTGTGGGGTGGG
GAGGCAACAACGGGTCCACGCTGACGGCTGGGGTCATTGCCAACAGGGAGGGGATCTCATGGGCGACCA
AGGACAAGGTGCAGCAAGCAAACCTACTTCGGCTCCCTCACCCAGGCCTCCACCATCAGAGTCGGCAGCTA
CAACGGGGAGGAGATCTATGCGCCGTTCAAGAGCCTCCTTCCCATGGTGAACCCAGACGACCTTGTGTTC
GGAGGCTGGGACATCAGCAACATGAACCTGGCTGATTCCATGACCAGGGCCAAGGTGCTGGACATTGACC
TGCAGAAGCAGCTCAGGCCCTACATGGAGTCCATGGTACCACTTCCCTGGTATCTATGATCCGGACTTCAT
CGCTGCTAACCAAGGCTCTCGTGCCAACAATGTCATCAAGGGCACCAAGAAAGAACAGGTGGAGCAGATC
ATCAAGGATATCAGGGAGTTTAAGGAGAAGAACAAGTGGACAAGATAGTTGTGCTGTGGACTGCAAACA

```

CTGAAAGGTACAGCAATGTATGCACTGGTCTCAACGACACAATGGAGAATCTGCTGGCATCTGTGGACAG
AACGAGGCAGAGATCTCGCCATCAACACTATATGCCATTGCCTGTGTCATGGAGGGGGTGCCGTTCATT
ATGGGAGCCCCCAGAACACCTTTGTGCCTGGGCTGATCGATCTTGCTATTAAGAACCACTGCTTGATTGG
TGGTGACGACTTCAANAGTGGACAAACCANANGAAATCANNCTTGGTTGATTCCCTGTTGGTGCTGGAATA
AGCCCACCTCATTGTGANCNANCANCACTTGGANACANCNTGGTCTGAACTGCTGCCCTCAACNTTNGTC
CAGGAGATCTCNANAACATGTGGNGGATGACATGGTCTCAAGCAATGCTATCCTCTATGAGCCCCGGCGAG
CATCCTGATCATGTTGTTGTCATCAAGTATGTGCCGTATGTGGGAGACAGTAAGAGGGGCTATGGATGAGT
ACACCTCCGAGATCTTCATGGGCGGCAAGACACCATCGTGCTGCACAACACCTGTGAGGACTCACTACTC
GCCGCACCTATCATCCTTGATCTGGTGCTCCTGGCTGAGCTCAGCACCAGGATCCAGCTAAAAGCTGAGG
GAGAGGACAAGTTCCACTCCTTCCACCCGGTGGCCACCATCCTGAGCTACCTCA

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ในฐานข้อมูลสาธารณะโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BLASTN ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์นี้มีความเหมือนกับยีน *MIPS* ในพืชถึง 88-93% (ภาพที่ 7)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Zea mays clone 237754 inositol-3-phosphate synthase mRNA, complete cds	2035	2035	100%	0.0	93%	EU961709.1
<input type="checkbox"/>	Zea mays low phytic acid1 (lpa1), mRNA	2017	2017	100%	0.0	93%	NM_001112082.1
<input type="checkbox"/>	Zea mays myo-inositol 1-phosphate synthase mRNA, complete cds	2012	2012	100%	0.0	93%	AF056326.1
<input type="checkbox"/>	Zea mays inositol-3-phosphate synthase-like (mips2), mRNA	1988	1988	100%	0.0	93%	NM_001112498.1
<input type="checkbox"/>	Zea mays full-length cDNA clone ZM_BFc0016J05 mRNA, complete cds	1983	1983	100%	0.0	93%	BT064919.1
<input type="checkbox"/>	Setaria italica inositol-3-phosphate synthase-like (LOC101773790), mRNA	1804	1804	100%	0.0	91%	NM_001280847.1
<input type="checkbox"/>	Spartina alterniflora L-myo-inositol 1-phosphate synthase (INO1) mRNA, complete cds	1623	1623	100%	0.0	88%	GU441843.1

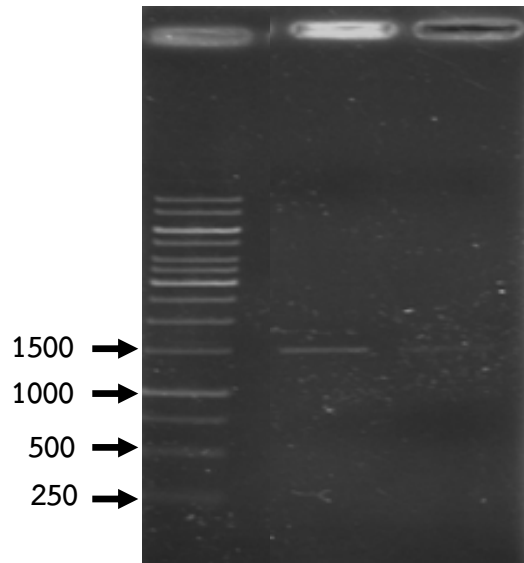
ภาพที่ 7 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ได้โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด degenerated primer จากบริเวณ start codon ของยีน *MIPS* ของพืชต่าง ๆ ในฐานข้อมูล Genbank

จากนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์ชนิด specific primer เพื่อค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 3' โดยให้ไพรเมอร์ที่เป็น reverse primer มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น stop codon อยู่ด้วย ดังนี้

MIPS3 F 5' GCACAACACCTGTGAGGACT

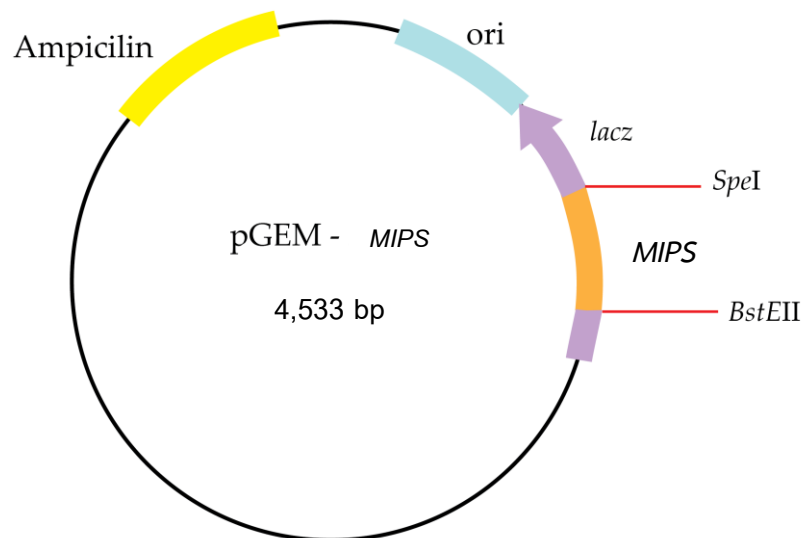
MIPS_stop R 5' TCACTTGTACTCCAGGATCAT

และเมื่อทำปฏิกิริยา PCR พบว่า เกิดแถบ DNA ขนาดประมาณ 1,500 bp (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ specific primer ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น stop codon อยู่ด้วย เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MIPS* พบว่ามีส่วนที่เป็น start และ stop codon อยู่ด้วย

หลังจากนั้นนำไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณยีน *MIPS* ให้ได้ตั้งแต่ส่วน start codon ถึง stop codon และนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM3 T easy เพื่อนำส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 9 พลาสมิด pGEM3 T easy เชื่อมต่อกับ full length ของยีน *MIPS*

ดังนั้น full length ของยีน *MIPS* จึงมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

ATGTTTCATCGAGAGCTTCCGCGTCGAGAGCCCCACGTTTCGGTATGGCCCGACGGAGATCGAGTCGGAGT
 ACCGGTACGACACGACGGAGCTGGTGCACGAGGGCAAGGACGGCGCCTCCCGCTGGGTCTCCGCCCA
 AGTCCGTCAAGTACAACCTCCGGACCAGCACCGCCGTCCCCAACTCGGGGTGATGCTTGTGGGGTGGGG
 AGGCAACAACGGGTCCACGCTGACGGCTGGGGTCATTGCCAACAGGGAGGGGATCTCATGGGCGACCAA
 GGACAAGGTGCAGCAAGCAAACCTACTTCGGCTCCCTCACCCAGGCCTCCACCATCAGAGTCGGCAGCTAC
 AACGGGGAGGAGATCTATGCGCCGTTCAAGAGCCTCCTTCCCATGGTGAACCCAGACGACCTTGTGTTCCG
 GAGGCTGGGACATCAGCAACATGAACCTGGCTGATTCCATGACCAGGGCTAAGGTGCTGGACATTGACCT
 GCAGAAGCAGCTCAGGCCCTACATGGAGTCCATGGTACCACTTCTGGTATCTATGATCCGGACTTCATC
 GCTGCTAACCAAGGCTCTCGTGCCAACAATGTCATCAAGGGCACCAAGAAAGAACAGGTGGAGCAGATCA
 TCAAGGATATCAGGGAGTTTAAGGAGAAGAACAAGTGGACAAGATAGTTGTGCTGTGGACTGCAAACAC
 TGAAAGGTACAGCAATGTATGCACTGGTCTcAAcGACACAATGGAGAATCTGCTGGCATCTGTGGACAAGA
 ACGAGGCAGAGATCTCGCCATCAACACTATATGCCATTGCCTGTGTCATGGAGGGGGTGCCGTTTATTAA
 TGGGAGCCCTCAGAACACCTTTGTGCCTGGGCTGATCGATCTTGCTATTAAGAACAACCTGCTTGATTGGT
 GGTGACGACTTCAAGAGTGGACAAACCAAGATGAAATCTGTCTTGGTTGATTTCTTGTGGTGGTGGAA
 TAAAGCCACCTCAATTGTGAGCTACAACCACTTGGGAAACAACGATGGCATGAACCTGTCTGCCCTCA
 AACATTCAGGTCCAAGGAGATCTCCAAGAGCAATGTGGTGGATGACATGGTCTCAAGCAATGCTATCCTC
 TATGAACCCGGCGAGCATCCTGATCATGTTGTTGTCATCAAGTATGTGCCGATGTGGGAGACAGTAAGA
 GGGCTATGGATGAGTACACCTCCGAGATCTTCATGGGCGCAAGAACCACCATCGTGCTGCACAACACCTG
 TGAGGACTCACTACTCGCCGCACCTATCATCCTTGATCTGGTGCTCCTGGCTGAGCTCAGCACCAGGATC
 CAGCTAAAAGCTGAGGGAGAGGACAAGTTCCACTCCTTCCACCCGGTGGCCACCATCCTGAGCTACCTCA
 CCAAGGCACCTCTGGTTCGCGCTGGCACACCGGTGGTGAACGCTCTGGCAAAGCAGAGGGCGATGCTGG
 AGAACATCATGAGGGCCTGCGTTGGCCTGGCCCCAGAGAACAACATGATCCTGGAGTACAAGTGA

หลังจากนั้นนำไพรเมอร์คู่ที่ได้ตั้งแต่ start codon ถึง stop codon ไปเพิ่มปริมาณยีน *MIPS* กับอ้อย
 พันธุ์อื่นๆ คือ พันธุ์ใบโอเทค 2 พันธุ์ป่า ได้ลำดับของนิวคลีโอไทด์ดังนี้

พันธุ์ใบโอเทค 2

ATGTTTCATCGAGAGCTTCCGCGTCGAGAGCCCCACGTTTCGGTATGGCCCGACGGAGATCGAGTCGGAGT
 ACCGGTACGACACGACGGAGCTGGTGCACGAGGGCAAGGACGGCGCCTCCCGCTGGGTCTCCGCCCA
 AGTCCGTCAAGTACAACCTCCGGACCAGCACCGCCGTCCCCAACTCGGGGTGATGCTTGTGGGGTGGGG
 AGGCAACAACGGGTCCACGCTGACGGCTGGGGTCATTGCCAACAGGGAGGGGATCTCATGGGCGACCAA
 GGACAAGGTGCAGCAAGCAAACCTACTTCGGCTCCCTCACCCAGGCCTCCACCATCAGAGTCGGCAGCTAC
 AACGGGGAGGAGATCTATGCGCCGTTCAAGAGCCTCCTTCCCATGGTGAACCCAGACGACCTTGTGTTCCG

GAGGCTGGGACATCAGCAACATGAACCTGGCTGATTCCATGACCAGGGCCAAGGTGCTGGACATTGACCT
GCAGAAGCAGCTCAGGCCCTACATGGAGTCCATGGTACCACTTCCTGGTATCTATGATCCGGACTTCATC
GCTGCTAACCAAGGCTCTCGTGCCAACAATGTCATCAAGGGCACCAAGAAAGAACAGGTGGAGCAGATCA
TCAAGGATATCAGGGAGTTTAAGGAGAAGAACAAGTGGACAAGATAGTTGTGCTGTGGACTGCAAACAC
CGAAAGGTACAGCAATGTATTCACTGGTCTCAACGACACAATGGAGAATCTGCTGGCATCTGTGGACAAG
AACGAGGCAGAGATCTCGCCATCAACACTATATGCCATTGCCTGTGTCATGGAGGGGGTGCCGTTCATT
ATGGGAGCCCCAGAACACCTTTGTGCCTGGGCTGATCGATCTTGCTATTAAGAACAACCTGCTTGATTGG
TGGTGACGGCTTCAAGAGTGGACAGACCAAGATGAAATCTGTCTTGGTTGATTTCCCTTGTGGTGCTGGA
ATAAAGCCCACCTCAATTGTGAGCTACAACCACTTGGGAAACAACGATGGCATGAACCTGTCTGCCCCTC
AAACATTCAGGTCCAAGGAGATCTCCAAGAGCAATGTGGTGGATGACATGGTCTCAAGCAATGCTATCCT
CTATGAGCCCCGGCAGCATCCCGATCATGTTGTTGTCATCAAGTATGTGCCGATGTGGGAGACAGTAAG
AGGGCTATGGATGAGTACACCTCCGAGATCTTCATGGGCGGCAAGAACACCATCGTCTGCACAACACCT
GTGAGGACTCACTACTCGCCGCACCTATCATCCTTGATCTGGTGCTCCTGGCTGAGCTCAGCACCAGGAT
CCAGCTAAAAGCTGAGGGAGAGGACAAGTTCCTCCTCCACCCGGTGGCCACCATCCTGAGCTACCTC
ACCAAGGCACCCCTGGTTCCGCCTGGCACACCGGTGGTGAACGCTCTGGCAAAGCAGAGGGCGATGCTG
GAGAACATCATGAGGGCCTGCGTTGGCCTGGCCCCAGAGAACAACATGATCCTGGAGTACAAGTGA

พันธุ์ป่า

ATGTTTCATCGAGAGCTTCCGCGTCGAGAGCCCCACGTTCCGGTATGGCCCGACGGAGATCGAGTCGGAGT
ACCGGTACGACACGACGGAGCTGGTGCACGAGGGCAAGGACGGCGCCTCCCGCTGGGTGCTCCGCCCA
AGTCCGTCAAGTACAACCTCCGGACCAGCACCGCCGTCCCCAACTCGGGGTGATGCTTGTGGGCTGGGG
AGGCAACAACGGGTCCACGCTGACGGCTGGGGTCATTGCCAACAGGGAGGGGATCTCATGGGCGACCAA
GGACAAGGTGCAGCAAGCAAACCTACTTCGGCTCCCTCACCCAGGCCTCCACCATCAGAGTCGGCAGCTAC
AACGGGGAGGAGATCTATGCGCCGTTCAAGAGCCTCCTTCCCATGGTGAACCCAGACGACCTTGTGTTCCG
GAGGCTGGGACATCAGCAACATGAACCTGGCTGATTCCATGACCAGGGCCAAGGTGCTGGACATTGACCT
GCAGAAGCAGCTCAGGCCCTACATGGAGTCCATGGTACCACTTCCTGGTATCTATGATCCGGACTTCATC
GCTGCTAACCAAGGCTCTCGTGCCAACAATGTCATCAAGGGCACCAAGAAAGAACAGGTGGAGCAGATCA
TCAAGGATATCAGGGAGTTTAAGGAGAAGAACAAGTGGACAAGATAGTTGTGCTGTGGACTGCAAACAC
TGAAAGGTACAGCAATGTATGCACTGGTCTCAACGACACAATGGAGAATCTGCTGGCATCTGTGGACAAG
AACGAGGCAGAGATCTCGCCATCAACACTATATGCCATTGCCTGTGTCATGGAGGGGGTGCCGTTCATT
ATGGGAGCCCTCAGAACACCTTTGTGCCTGGGCTGATCGATCTTGCTATTAAGAACAACCTGCTTGATTGG
TGGTGACGACTTCAAGAGTGGACAAACCAAGATGAAATCTGTCTTGGTTGATTTCCCTTGTGGTGCTGGA
ATAAAGCCCACCTCAATTGTGAGCTACAACCACTTGGGAAACAACGATGGCATGAACCTGTCTGCCCCTC

AAACATTCAGGTCCAAGGAGATCTCCAAGAGCAATGTGGTGGATGACATGGTCTCAAGCAATGCTATCCT
 CTATGAGCCCCGGCGAGCATCCTGATCATGTTATTGTCATCAAGTATGTGCCGTATGTGGGAGACAGTAAG
 AGGGCTATGGATGAGTACACCTCCGAGATCTTCATGGGCGGCAAGAACACCATCGTGCTTCACAACACCT
 GTGAGGACTCACTACTCGCCGCACCTATCATCCTTGATCTGGTGCTCCTGGCTGAGCTCAGCACCAGGAT
 CCAGCTAAAAGCTGAGGGAGAGGACAAGTTCCACTCCTTCCACCCGGTGGCCACCATCCTGAGCTACCTC
 ACCAAGGCACCTCTGGTTCCGCCTGGCACACCCGGTGGTGAACGCTCTGGCAAAGCAGAGGGCGATGCTG
 GAGAACATCATGAGGGCCTGCGTTGGCCTGGCCCCAGAGAACAACATGATCCTGGAGTACAAGTGA

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MIPS* ทั้ง 3 พันธุ์ไปเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับพืชหลายชนิดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MIPS* ที่สังเคราะห์ได้จากฐานข้อมูล GeneBank

Accession number	Description	ค่าความเหมือน Identities
<u>EU961709.1</u>	<i>Zea mays</i>	97%
NM_001280847.1	<i>Setaria italica</i>	93%
XM_006651061.1	<i>Oryza brachyantha</i>	90%
<u>AF542968.1</u>	<i>Triticum aestivum</i>	89%
<u>XM_010907606.1</u>	<i>Elaeis guineensis</i>	80%
<u>AF056325.1</u>	<i>Hordeum vulgare</i>	89%
<u>XM_010654521.1</u>	<i>Vitis vinifera</i>	85%
<u>KP053396.1</u>	<i>Camellia sinensis</i>	80%

และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับอะมิโน ของอ้อยแต่ละพันธุ์มาเปรียบเทียบกัน พบว่า มีบางตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน


```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100     *      120
ccm : ATGTTTCATCGAGAGCTTCCGCGTCGAGAGCCCCACGTTTCGGTATGGCCCGACGGAGATCGAGTCCGAGTACCGGTACGACACGACGGAGCTGGTGCACGAGGGCAAGGACGGCGCCTCC : 120
Wild : ATGTTTCATCGAGAGCTTCCGCGTCGAGAGCCCCACGTTTCGGTATGGCCCGACGGAGATCGAGTCCGAGTACCGGTACGACACGACGGAGCTGGTGCACGAGGGCAAGGACGGCGCCTCC : 120
bio : ATGTTTCATCGAGAGCTTCCGCGTCGAGAGCCCCACGTTTCGGTATGGCCCGACGGAGATCGAGTCCGAGTACCGGTACGACACGACGGAGCTGGTGCACGAGGGCAAGGACGGCGCCTCC : 120
      ATGTTTCATCGAGAGCTTCCGCGTCGAGAGCCCCACGTTTCGGTATGGCCCGACGGAGATCGAGTCCGAGTACCGGTACGACACGACGGAGCTGGTGCACGAGGGCAAGGACGGCGCCTCC

*      140     *      160     *      180     *      200     *      220     *      240
ccm : CGCTGGGTTCGTCGCGCCCCAAGTCCGTCGAGTACAACCTTCGGACCAGCACCGCCGTCGCCAAACTCGGGGTGATGCTTGTGGGCTGGGGAGGCAACAACGGGTCCACGCTGACGGCTGGG : 240
Wild : CGCTGGGTTCGTCGCGCCCCAAGTCCGTCGAGTACAACCTTCGGACCAGCACCGCCGTCGCCAAACTCGGGGTGATGCTTGTGGGCTGGGGAGGCAACAACGGGTCCACGCTGACGGCTGGG : 240
bio : CGCTGGGTTCGTCGCGCCCCAAGTCCGTCGAGTACAACCTTCGGACCAGCACCGCCGTCGCCAAACTCGGGGTGATGCTTGTGGGCTGGGGAGGCAACAACGGGTCCACGCTGACGGCTGGG : 240
      CGCTGGGTTCGTCGCGCCCCAAGTCCGTCGAGTACAACCTTCGGACCAGCACCGCCGTCGCCAAACTCGGGGTGATGCTTGTGGGCTGGGGAGGCAACAACGGGTCCACGCTGACGGCTGGG

*      260     *      280     *      300     *      320     *      340     *      360
ccm : GTCATTGCCAACAGGGAGGGGATCTCATGGGCGACCAAGGACAAGGTGCAGCAAGCAAACTACTTTCGGCTCCCTCACCAGGCCTCCACCATCAGAGTCGGCAGCTACAACGGGGAGGAG : 360
Wild : GTCATTGCCAACAGGGAGGGGATCTCATGGGCGACCAAGGACAAGGTGCAGCAAGCAAACTACTTTCGGCTCCCTCACCAGGCCTCCACCATCAGAGTCGGCAGCTACAACGGGGAGGAG : 360
bio : GTCATTGCCAACAGGGAGGGGATCTCATGGGCGACCAAGGACAAGGTGCAGCAAGCAAACTACTTTCGGCTCCCTCACCAGGCCTCCACCATCAGAGTCGGCAGCTACAACGGGGAGGAG : 360
      GTCATTGCCAACAGGGAGGGGATCTCATGGGCGACCAAGGACAAGGTGCAGCAAGCAAACTACTTTCGGCTCCCTCACCAGGCCTCCACCATCAGAGTCGGCAGCTACAACGGGGAGGAG

*      380     *      400     *      420     *      440     *      460     *      480
ccm : ATCTATGCGCCGTTCAAGAGCCTCCTTCCCATGGTGAACCCAGACGACCTTGTGTTTCGGAGGCTGGGACATCAGCAACATGAACCTGGCTGATTCCATGACCAGGGCCAAAGGTGCTGGAC : 480
Wild : ATCTATGCGCCGTTCAAGAGCCTCCTTCCCATGGTGAACCCAGACGACCTTGTGTTTCGGAGGCTGGGACATCAGCAACATGAACCTGGCTGATTCCATGACCAGGGCCAAAGGTGCTGGAC : 480
bio : ATCTATGCGCCGTTCAAGAGCCTCCTTCCCATGGTGAACCCAGACGACCTTGTGTTTCGGAGGCTGGGACATCAGCAACATGAACCTGGCTGATTCCATGACCAGGGCCAAAGGTGCTGGAC : 480
      ATCTATGCGCCGTTCAAGAGCCTCCTTCCCATGGTGAACCCAGACGACCTTGTGTTTCGGAGGCTGGGACATCAGCAACATGAACCTGGCTGATTCCATGACCAGGGCCAAAGGTGCTGGAC

*      500     *      520     *      540     *      560     *      580     *      600
ccm : ATTGACCTGCAGAAGCAGCTCAGGCCCTACATGGAGTCCATGGTACCCTTCCTGGTATCTATGATCCGGACTTCATCGCTGCTAACCAAGGCTCTCGTGCCAACAATGTATCAAGGGC : 600
Wild : ATTGACCTGCAGAAGCAGCTCAGGCCCTACATGGAGTCCATGGTACCCTTCCTGGTATCTATGATCCGGACTTCATCGCTGCTAACCAAGGCTCTCGTGCCAACAATGTATCAAGGGC : 600
bio : ATTGACCTGCAGAAGCAGCTCAGGCCCTACATGGAGTCCATGGTACCCTTCCTGGTATCTATGATCCGGACTTCATCGCTGCTAACCAAGGCTCTCGTGCCAACAATGTATCAAGGGC : 600
      ATTGACCTGCAGAAGCAGCTCAGGCCCTACATGGAGTCCATGGTACCCTTCCTGGTATCTATGATCCGGACTTCATCGCTGCTAACCAAGGCTCTCGTGCCAACAATGTATCAAGGGC

```

ภาพที่ 10 เปรียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MIPS* ของอ้อย 3 พันธุ์

```

*      620      *      640      *      660      *      680      *      700      *      720
ccm : ACCAAGAAAGAACAGGTGGAGCAGATCATCAAGGATATCAGGGAGTTTAAGGAGAAGAACAAGTGGACAAGATAGTTGTGCTGTGGACTGCAAACACTGAAAGGTACAGCAATGTATGC : 720
Wild : ACCAAGAAAGAACAGGTGGAGCAGATCATCAAGGATATCAGGGAGTTTAAGGAGAAGAACAAGTGGACAAGATAGTTGTGCTGTGGACTGCAAACACTGAAAGGTACAGCAATGTATGC : 720
bio : ACCAAGAAAGAACAGGTGGAGCAGATCATCAAGGATATCAGGGAGTTTAAGGAGAAGAACAAGTGGACAAGATAGTTGTGCTGTGGACTGCAAACACTGAAAGGTACAGCAATGTATGC : 720
      ACCAAGAAAGAACAGGTGGAGCAGATCATCAAGGATATCAGGGAGTTTAAGGAGAAGAACAAGTGGACAAGATAGTTGTGCTGTGGACTGCAAACACTGAAAGGTACAGCAATGTATGC

*      740      *      760      *      780      *      800      *      820      *      840
ccm : ACTGGTCTCAACGACACAATGGAGAATCTGCTGGCATCTGTGGACAAGAACGAGGCAGAGATCTCGCCATCAACACTATATGCCATTGCCTGTGTTCATGGAGGGGGTGCCGTTTCATTAAT : 840
Wild : ACTGGTCTCAACGACACAATGGAGAATCTGCTGGCATCTGTGGACAAGAACGAGGCAGAGATCTCGCCATCAACACTATATGCCATTGCCTGTGTTCATGGAGGGGGTGCCGTTTCATTAAT : 840
bio : ACTGGTCTCAACGACACAATGGAGAATCTGCTGGCATCTGTGGACAAGAACGAGGCAGAGATCTCGCCATCAACACTATATGCCATTGCCTGTGTTCATGGAGGGGGTGCCGTTTCATTAAT : 840
      ACTGGTCTCAACGACACAATGGAGAATCTGCTGGCATCTGTGGACAAGAACGAGGCAGAGATCTCGCCATCAACACTATATGCCATTGCCTGTGTTCATGGAGGGGGTGCCGTTTCATTAAT

*      860      *      880      *      900      *      920      *      940      *      960
ccm : GGGAGCCCTCAGAACACCTTTGTGCTGGGCTGATCGATCTTGCTATTAAGAACAACCTGCTTGATTGGTGGTGACGACTTCAAGAGTGGACAACCAAGATGAAATCTGTCTTGGTTGAT : 960
Wild : GGGAGCCCTCAGAACACCTTTGTGCTGGGCTGATCGATCTTGCTATTAAGAACAACCTGCTTGATTGGTGGTGACGACTTCAAGAGTGGACAACCAAGATGAAATCTGTCTTGGTTGAT : 960
bio : GGGAGCCCTCAGAACACCTTTGTGCTGGGCTGATCGATCTTGCTATTAAGAACAACCTGCTTGATTGGTGGTGACGACTTCAAGAGTGGACAACCAAGATGAAATCTGTCTTGGTTGAT : 960
      GGGAGCCCTCAGAACACCTTTGTGCTGGGCTGATCGATCTTGCTATTAAGAACAACCTGCTTGATTGGTGGTGACGACTTCAAGAGTGGACAACCAAGATGAAATCTGTCTTGGTTGAT

*      980      *      1000      *      1020      *      1040      *      1060      *      1080
ccm : TTCCTTGTGGTGCTGGAATAAAGCCACCTCAATTGTGAGCTACAACCCTTGGGAAACAACGATGGCATGAACCTGTCTGCCCTCAAACATTCAGGTCCAAGGAGATCTCCAAGAGC : 1080
Wild : TTCCTTGTGGTGCTGGAATAAAGCCACCTCAATTGTGAGCTACAACCCTTGGGAAACAACGATGGCATGAACCTGTCTGCCCTCAAACATTCAGGTCCAAGGAGATCTCCAAGAGC : 1080
bio : TTCCTTGTGGTGCTGGAATAAAGCCACCTCAATTGTGAGCTACAACCCTTGGGAAACAACGATGGCATGAACCTGTCTGCCCTCAAACATTCAGGTCCAAGGAGATCTCCAAGAGC : 1080
      TTCCTTGTGGTGCTGGAATAAAGCCACCTCAATTGTGAGCTACAACCCTTGGGAAACAACGATGGCATGAACCTGTCTGCCCTCAAACATTCAGGTCCAAGGAGATCTCCAAGAGC

*      1100      *      1120      *      1140      *      1160      *      1180      *      1200
ccm : AATGTGGTGGATGACATGGTCTCAAGCAATGCTATCCTCTATGAGCCCGGCGAGCATCCCGATCATGTTGTTGTCATCAAGTATGTGCCGTATGTGGGAGACAGTAAGAGGGCTATGGAT : 1200
Wild : AATGTGGTGGATGACATGGTCTCAAGCAATGCTATCCTCTATGAGCCCGGCGAGCATCCCGATCATGTTGTTGTCATCAAGTATGTGCCGTATGTGGGAGACAGTAAGAGGGCTATGGAT : 1200
bio : AATGTGGTGGATGACATGGTCTCAAGCAATGCTATCCTCTATGAGCCCGGCGAGCATCCCGATCATGTTGTTGTCATCAAGTATGTGCCGTATGTGGGAGACAGTAAGAGGGCTATGGAT : 1200
      AATGTGGTGGATGACATGGTCTCAAGCAATGCTATCCTCTATGAGCCCGGCGAGCATCCCGATCATGTTGTTGTCATCAAGTATGTGCCGTATGTGGGAGACAGTAAGAGGGCTATGGAT

```

ภาพที่ 10 เปรียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MIPS* ของอ้อย 3 พันธุ์ (ต่อ)

```

      *      1220      *      1240      *      1260      *      1280      *      1300      *      1320
ccm : GAGTACACCTCCGAGATCTTCATGGGCGGCAAGAACACCATCGTGCTGCACAACACCTGTGAGGACTCACTACTCGCCGCACCTATCATCCTTGATCTGGTGCTCCTGGCTGAGCTCAGC : 1320
Wild : GAGTACACCTCCGAGATCTTCATGGGCGGCAAGAACACCATCGTGCTGCACAACACCTGTGAGGACTCACTACTCGCCGCACCTATCATCCTTGATCTGGTGCTCCTGGCTGAGCTCAGC : 1320
bio : GAGTACACCTCCGAGATCTTCATGGGCGGCAAGAACACCATCGTGCTGCACAACACCTGTGAGGACTCACTACTCGCCGCACCTATCATCCTTGATCTGGTGCTCCTGGCTGAGCTCAGC : 1320
      GAGTACACCTCCGAGATCTTCATGGGCGGCAAGAACACCATCGTGCTGCACAACACCTGTGAGGACTCACTACTCGCCGCACCTATCATCCTTGATCTGGTGCTCCTGGCTGAGCTCAGC

      *      1340      *      1360      *      1380      *      1400      *      1420      *      1440
ccm : ACCAGGATCCAGCTAAAAGCTGAGGGAGAGGACAAGTCCACTCCTTCCACCCGGTGGCCACCATCCTGAGCTACCTACCAAGGCACCTCTGGTTCCGCCTGGCACACCCGGTGGTGAAC : 1440
Wild : ACCAGGATCCAGCTAAAAGCTGAGGGAGAGGACAAGTCCACTCCTTCCACCCGGTGGCCACCATCCTGAGCTACCTACCAAGGCACCTCTGGTTCCGCCTGGCACACCCGGTGGTGAAC : 1440
bio : ACCAGGATCCAGCTAAAAGCTGAGGGAGAGGACAAGTCCACTCCTTCCACCCGGTGGCCACCATCCTGAGCTACCTACCAAGGCACCTCTGGTTCCGCCTGGCACACCCGGTGGTGAAC : 1440
      ACCAGGATCCAGCTAAAAGCTGAGGGAGAGGACAAGTCCACTCCTTCCACCCGGTGGCCACCATCCTGAGCTACCTACCAAGGCACCTCTGGTTCCGCCTGGCACACCCGGTGGTGAAC

      *      1460      *      1480      *      1500      *      1520      *
ccm : GCTCTGGCAAAGCAGAGGGCGATGCTGGAGAACATCATGAGGGCCTGCGTTGGCCTGGCCCCAGAGAACAACATGATCCTGGAGTACAAGTGA : 1533
Wild : GCTCTGGCAAAGCAGAGGGCGATGCTGGAGAACATCATGAGGGCCTGCGTTGGCCTGGCCCCAGAGAACAACATGATCCTGGAGTACAAGTGA : 1533
bio : GCTCTGGCAAAGCAGAGGGCGATGCTGGAGAACATCATGAGGGCCTGCGTTGGCCTGGCCCCAGAGAACAACATGATCCTGGAGTACAAGTGA : 1533
      GCTCTGGCAAAGCAGAGGGCGATGCTGGAGAACATCATGAGGGCCTGCGTTGGCCTGGCCCCAGAGAACAACATGATCCTGGAGTACAAGTGA

```

ภาพที่ 10 เปรียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MIPS* ของอ้อย 3 พันธุ์ (ต่อ)

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100     *      120
ccm : MFIESFRVESPHVRYGPTEIESEYRYDTTELVEHEGKDGASRWVVRPKSVKYNFRTSTAVPKLGVMLVGVGGNNGSTLTAGVIANREGISWATKDKVQQANYFGSLTQASTIRVGSYNGEEIYA : 123
wild : MFIESFRVESPHVRYGPTEIESEYRYDTTELVEHEGKDGASRWVVRPKSVKYNFRTSTAVPKLGVMLVGVGGNNGSTLTAGVIANREGISWATKDKVQQANYFGSLTQASTIRVGSYNGEEIYA : 123
Bio : MFIESFRVESPHVRYGPTEIESEYRYDTTELVEHEGKDGASRWVVRPKSVKYNFRTSTAVPKLGVMLVGVGGNNGSTLTAGVIANREGISWATKDKVQQANYFGSLTQASTIRVGSYNGEEIYA : 123
MFIESFRVESPHVRYGPTEIESEYRYDTTELVEHEGKDGASRWVVRPKSVKYNFRTSTAVPKLGVMLVGVGGNNGSTLTAGVIANREGISWATKDKVQQANYFGSLTQASTIRVGSYNGEEIYA

*      140     *      160     *      180     *      200     *      220     *      240
ccm : PFKSLLPMVNPDDLVEFGWDISNMNLADSMTRAKVLDIDLQQLRPYMESMVPLPGIYDPDFIAANQGSRANNVIKGTKEQVEQIIKDIREFKEKNKVDKIVVLWTANTERYSNVCTGLNDT : 246
wild : PFKSLLPMVNPDDLVEFGWDISNMNLADSMTRAKVLDIDLQQLRPYMESMVPLPGIYDPDFIAANQGSRANNVIKGTKEQVEQIIKDIREFKEKNKVDKIVVLWTANTERYSNVCTGLNDT : 246
Bio : PFKSLLPMVNPDDLVEFGWDISNMNLADSMTRAKVLDIDLQQLRPYMESMVPLPGIYDPDFIAANQGSRANNVIKGTKEQVEQIIKDIREFKEKNKVDKIVVLWTANTERYSNVCTGLNDT : 246
PFKSLLPMVNPDDLVEFGWDISNMNLADSMTRAKVLDIDLQQLRPYMESMVPLPGIYDPDFIAANQGSRANNVIKGTKEQVEQIIKDIREFKEKNKVDKIVVLWTANTERYSNVCTGLNDT

*      260     *      280     *      300     *      320     *      340     *      360
ccm : MENLLASVDKNEAEISPSTLYAIACVMEGVPFINGSPQNTFVPLGLIDLAIKNNCLIGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIVSYNHLGNNDGMNLSAPQTFRSKEISKSNVDDMVSS : 369
wild : MENLLASVDKNEAEISPSTLYAIACVMEGVPFINGSPQNTFVPLGLIDLAIKNNCLIGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIVSYNHLGNNDGMNLSAPQTFRSKEISKSNVDDMVSS : 369
Bio : MENLLASVDKNEAEISPSTLYAIACVMEGVPFINGSPQNTFVPLGLIDLAIKNNCLIGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIVSYNHLGNNDGMNLSAPQTFRSKEISKSNVDDMVSS : 369
MENLLASVDKNEAEISPSTLYAIACVMEGVPFINGSPQNTFVPLGLIDLAIKNNCLIGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIVSYNHLGNNDGMNLSAPQTFRSKEISKSNVDDMVSS

*      380     *      400     *      420     *      440     *      460     *      480     *
ccm : NAILYEPGEHPDHVVVIKYPYVVGDSKRAMDEYTSIEIFMGGKNTIVLHNTCEDSLAAPIILDVLLAELSTRIQLKAEGEDKFHSFHPVATILSYLTKAPLVPPGTPVVNALAKQRAMLENI : 492
wild : NAILYEPGEHPDHVVVIKYPYVVGDSKRAMDEYTSIEIFMGGKNTIVLHNTCEDSLAAPIILDVLLAELSTRIQLKAEGEDKFHSFHPVATILSYLTKAPLVPPGTPVVNALAKQRAMLENI : 492
Bio : NAILYEPGEHPDHVVVIKYPYVVGDSKRAMDEYTSIEIFMGGKNTIVLHNTCEDSLAAPIILDVLLAELSTRIQLKAEGEDKFHSFHPVATILSYLTKAPLVPPGTPVVNALAKQRAMLENI : 492
NAILYEPGEHPDHV6VIKYPYVVGDSKRAMDEYTSIEIFMGGKNTIVLHNTCEDSLAAPIILDVLLAELSTRIQLKAEGEDKFHSFHPVATILSYLTKAPLVPPGTPVVNALAKQRAMLENI

500      *
ccm : MRACVGLAPENNMILEYK : 510
wild : MRACVGLAPENNMILEYK : 510
Bio : MRACVGLAPENNMILEYK : 510
MRACVGLAPENNMILEYK

```

ภาพที่ 11 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MIPS* ในอ้อย 3 พันธุ์

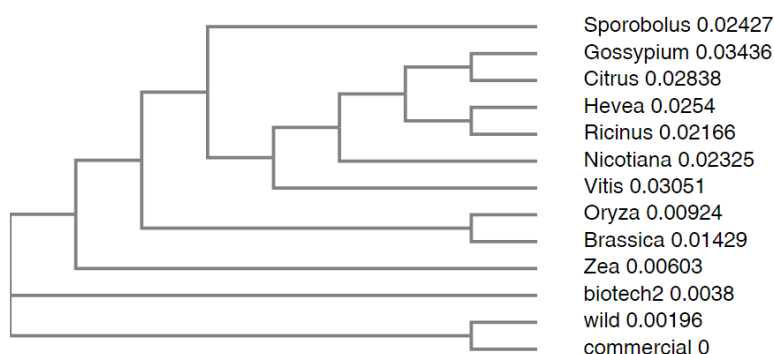
เมื่อแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MIPS* ของอ้อยทั้ง 3 พันธุ์ ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วนำมาเปรียบเทียบกันพบว่ามีความแตกต่างกัน 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 240 ในพันธุ์ไปโอเทค 2 เป็น และตำแหน่ง 306 พันธุ์ไปโอเทค 2 เช่นเดียวกันที่เป็น glycine (G) ในขณะที่อีก 2 พันธุ์ที่เหลือมีชนิดของกรดอะมิโนเหมือนกันคือ aspartic acid (D) (ภาพที่ 11) ความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนนี้อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับความสามารถในการแสดงออกของยีน *MIPS* และความสามารถในการทนต่อสภาพเครียดที่เกิดจากดินเค็มก็ได้ ซึ่งต้องมีการพิสูจน์ทราบต่อไป และถ้าในบริเวณดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องจริงก็จะสามารถออกแบบไปรเมอร์และพัฒนาขึ้นมาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด gene targeted marker เพื่อใช้คัดเลือกลักษณะทนทานดินเค็มในอ้อยได้



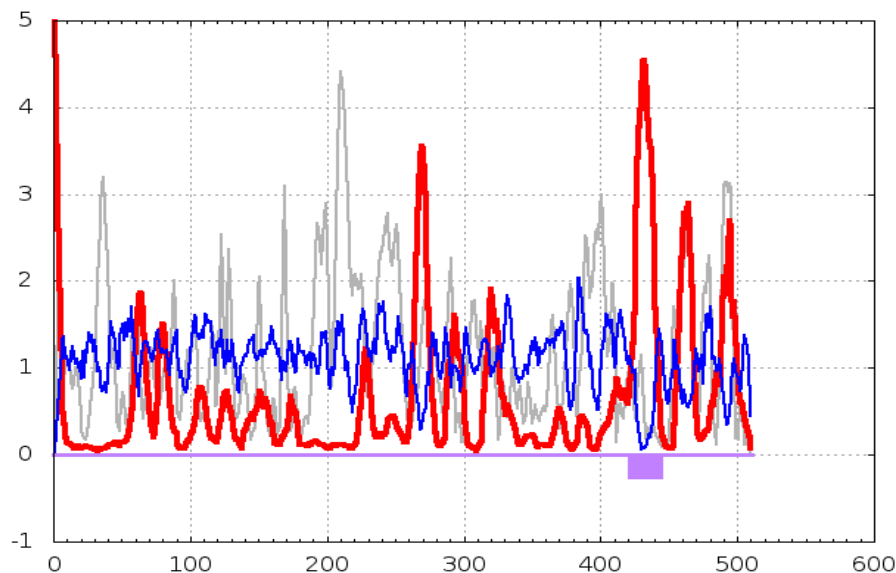
ภาพที่ 12 แสดงส่วนของ exon (■) และ intron (□) ของยีน *MIPS*

phylogenetic tree

นำลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากยีน *MIPS* ของอ้อยทั้ง 3 สายพันธุ์ มาวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับกรดอะมิโน *MIPS* ที่รายงานในพืชชนิดต่างๆ คือ *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) พบว่ากรดอะมิโนของทั้ง 3 สายพันธุ์นั้นมีความใกล้เคียงกับข้าวโพด (*Zea mays* (ACG33827.1)) มากที่สุด (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 แสดง Phylogenetic tree ของกรดอะมิโน MIPS ของอ้อยพันธุ์ปลูก KPS 94-13 (94-13) พันธุ์ป่า (wild) และลูกผสมระหว่างอ้อยพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก (biotech2) กับกรดอะมิโนของ MIPS 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)



ภาพที่ 14 วิเคราะห์ Transmembrane ของอ้อยทั้ง 3 สายพันธุ์ด้วยโปรแกรม SPLIT 4.0 SERVER
 เส้นสีแดง : Transmembrane helix preference. (THM index)
 เส้นสีน้ำเงิน: Beta preference. (BET index)
 เส้นสีเทา: Modified hydrophobic moment index. (INDA index)
 กล่องสีม่วง (below abscissa): เป็นตำแหน่งที่คาดว่าจะจะเป็น transmembrane helix position. (DIG index)

การตรวจสอบแสดงออกของยีน *MIPS* ในใบและรากของอ้อยด้วยเทคนิค real-time PCR

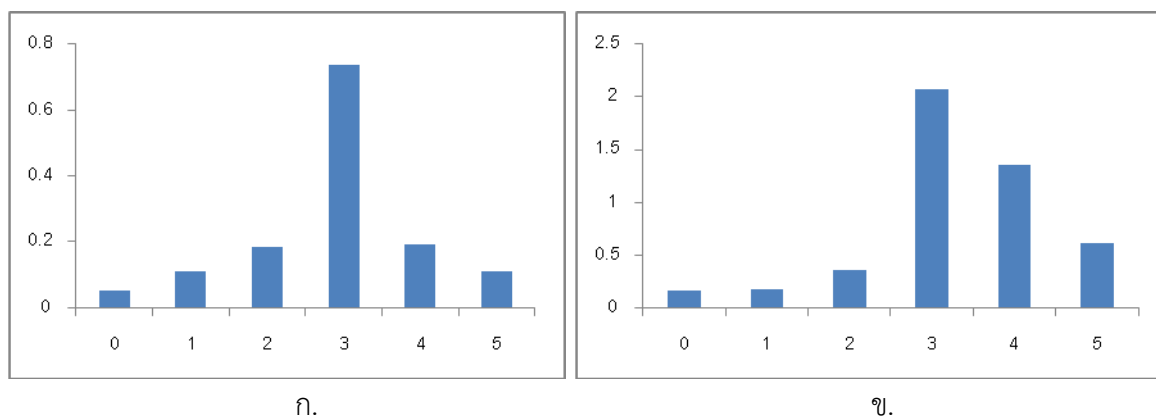
ได้ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *MIPS* ในอ้อย 3 พันธุ์ คือ พันธุ์กำแพงแสน 94-13 อ้อยพันธุ์ป่า และอ้อยลูกผสมไบโอเทค 2 ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างอ้อยพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่า โดยให้ต้นอ้อยที่ทดสอบได้รับสภาพเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน จากนั้น สกัด total RNA จากใบและราก แล้วเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA เพื่อนำมาใช้ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนโดยวิธี real-time PCR โพรเมอร์ที่ใช้จำเพาะกับยีน *MIPS* มีดังนี้

Forward : 5'- CCCCAAGTCCGTCAAGTACA -3'

Reverse : 5'- 5' CTTGGTCGCCCATGAGATCC -3'

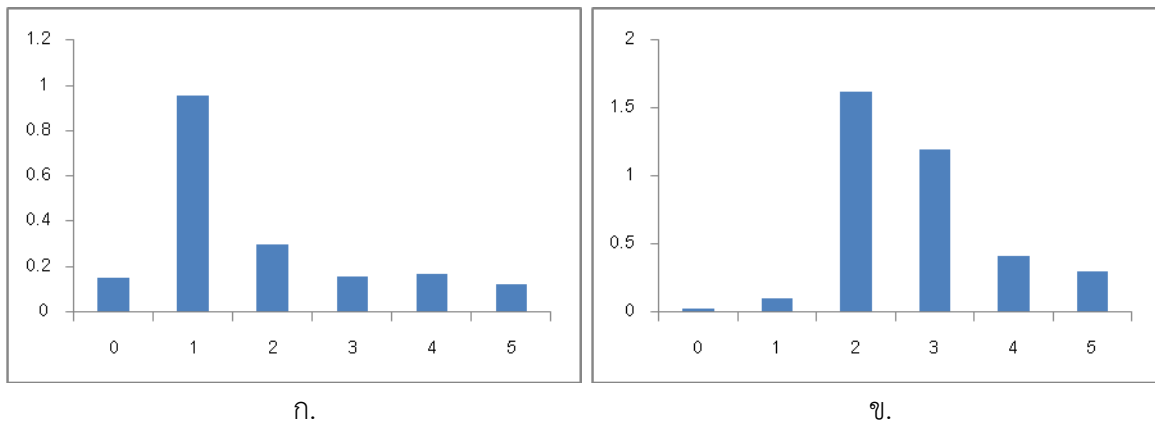
ตั้งโปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา PCR ดังนี้ denature อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที จำนวน 40 รอบ

ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 เมื่อได้รับสภาพเครียดที่เกิดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *MIPS* ทั้งในใบและราก พบว่า มีแนวโน้มการแสดงออกเหมือนกันคือมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับโซเดียมคลอไรด์นานขึ้น และแสดงออกสูงสุดในวันที่ 3 หลังได้รับสภาพเครียด จากนั้นจึงค่อย ๆ ลดลง แต่ระดับการแสดงออกที่รากจะสูงกว่าที่ใบ (ภาพที่ 15)



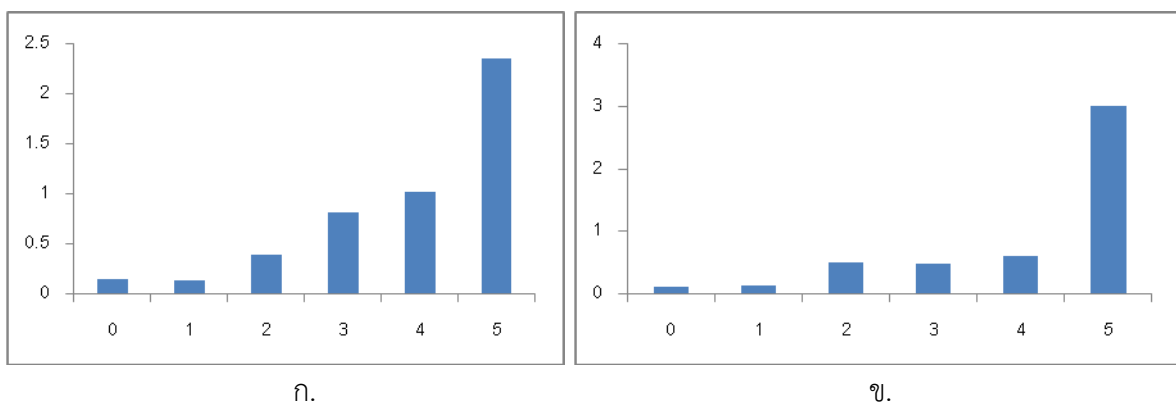
ภาพที่ 15 การแสดงออกของยีน *MIPS* ในใบ (ก) และราก (ข) ของพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน

ในอ้อยพันธุ์ป่า เมื่อได้รับสภาพเครียดที่เกิดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *MIPS* ทั้งในใบและราก พบว่า มีแนวโน้มการแสดงออกคล้ายกันคือ โดยที่ใบจะมีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับโซเดียมคลอไรด์ และการแสดงออกสูงสุดในวันที่ 1 หลังจากได้รับสภาพเครียด จากนั้นการแสดงออกของยีนจึงลดลง ส่วนที่รากมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับโซเดียมคลอไรด์และสูงสุดในวันที่ 2 หลังได้รับโซเดียมคลอไรด์ หลังจากนั้นการแสดงออกของยีนจึงค่อย ๆ ลดลง แต่ระดับการแสดงออกที่รากมีแนวโน้มสูงกว่าที่ใบ ณ ช่วงเวลาใดเวลาหนึ่ง (ภาพที่ 16)



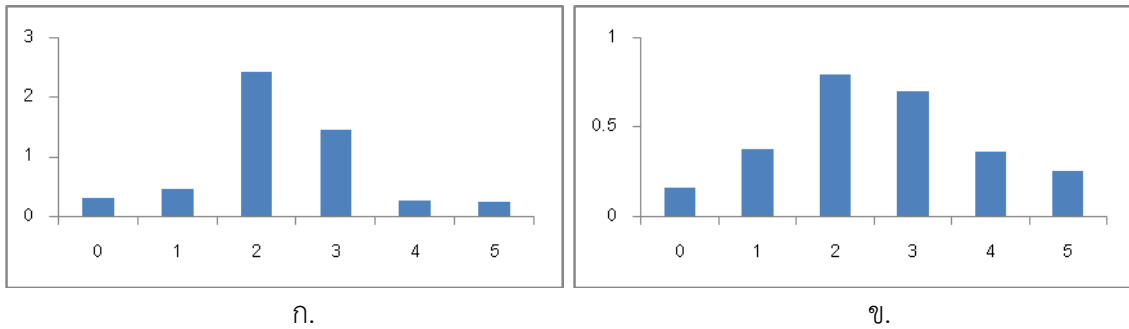
ภาพที่ 16 การแสดงออกของยีน *MIPS* ในใบ (ก) และราก (ข) ของพันธุ์ป่า ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน

ในอ้อยพันธุ์ใบโอเทค 2 เมื่อได้รับสภาพเครียดที่เกิดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *MIPS* ทั้งในใบและราก พบว่า มีแนวโน้มการแสดงออกเหมือนกันคือ การแสดงออกของยีนจะเพิ่มขึ้นที่ละน้อยเมื่อได้รับโซเดียมคลอไรด์ยาวนานขึ้น และการแสดงออกของยีนทั้งที่ใบและรากจะสูงสุดในวันที่ 5 หลังจากได้รับสภาพเครียด และเช่นเดียวกับการแสดงออกของยีน *MIPS* ในพันธุ์กำแพงแสนและพันธุ์ป่าที่ระดับการแสดงออกของยีนที่ที่รากจะมีสูงกว่าที่ใบ (ภาพที่ 17)



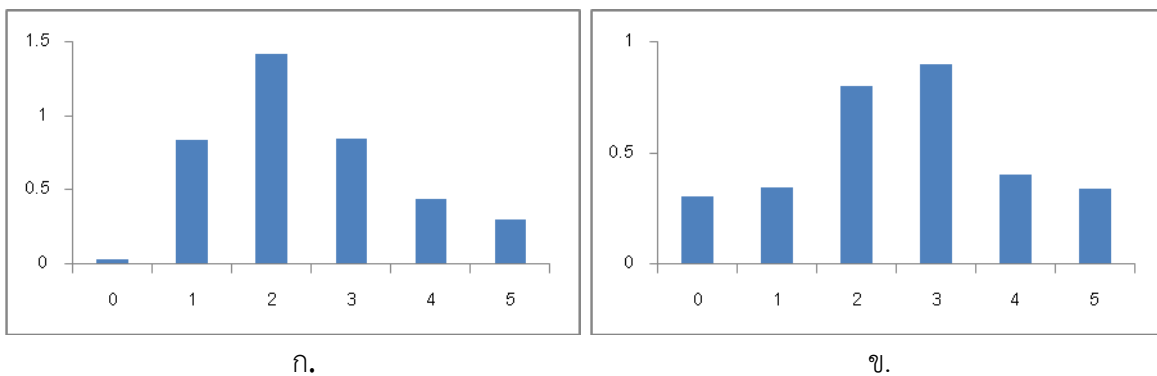
ภาพที่ 17 การแสดงออกของยีน *MIPS* ในใบ (ก) และราก (ข) ของพันธุ์ใบโอเทค 2 ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 200 มิลลิโมลาร์ และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *MIPS* ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 พบว่า การแสดงออกของยีนทั้งที่ใบและที่รากจะเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับความเครียดจากโซเดียมคลอไรด์ และสูงที่สุดในวันที่ 2 หลังจากนั้นการแสดงออกของยีนดังกล่าวจึงค่อย ๆ ลดลง โดยระดับการแสดงออกของยีนที่รากจะมีมากกว่าที่ใบ (ภาพที่ 18)



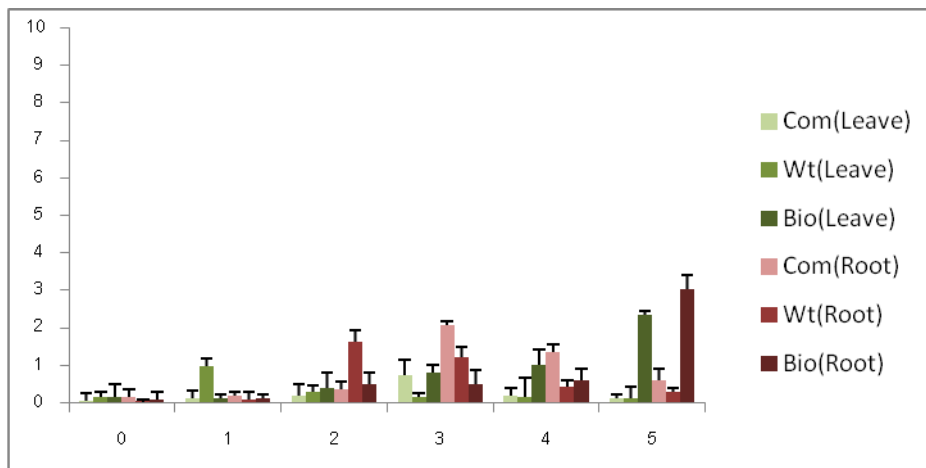
ภาพที่ 18 การแสดงออกของยีน *MIPS* ในใบ (ก) และราก (ข) ของพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน

ในพันธุ์ป่านั้นพบว่า การแสดงออกของยีนทั้งที่ใบและที่รากจะเพิ่มขึ้นเมื่อมือได้รับความเครียดจากโซเดียมคลอไรด์ โดยที่ใบการแสดงออกของยีนจะสูงที่สุดในวันที่ 2 หลังการได้รับโซเดียมคลอไรด์ ส่วนที่รากการแสดงออกจะสูงที่สุดในวันที่ 3 หลังจากนั้นการแสดงออกของยีนดังกล่าวจึง ่ลดลง โดยระดับการแสดงออกของยีนที่ใบจะมีมากกว่าที่ราก (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 19 การแสดงออกของยีน *MIPS* ในใบ (ก) และราก (ข) ของพันธุ์ป่า ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน

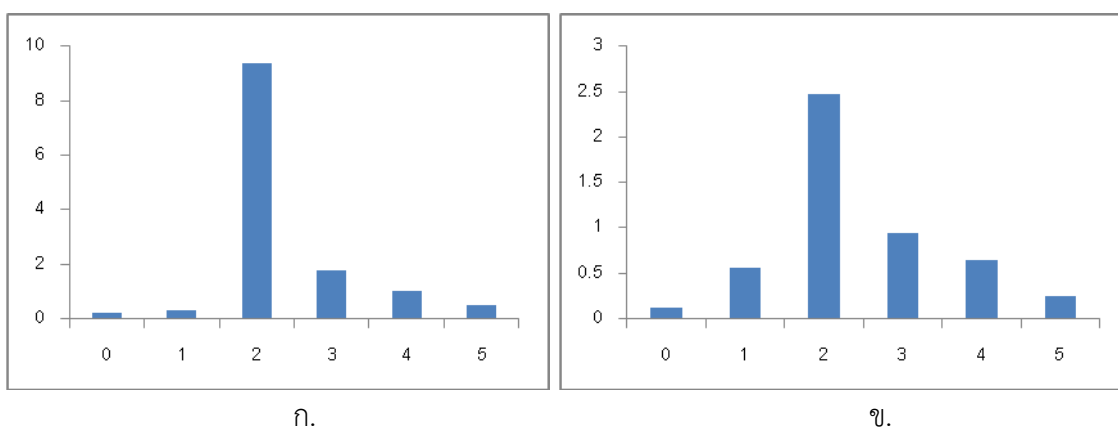
ในอ้อยลูกผสมระหว่างชนิดพันธุ์ใบโอเทค 2 นั้น การแสดงออกของยีนทั้งที่ใบและรากจะสูงที่สุดในวันที่ 2 หลังได้รับโซเดียมคลอไรด์ และการแสดงออกที่ใบสูงกว่าที่ราก (ภาพที่ 20)



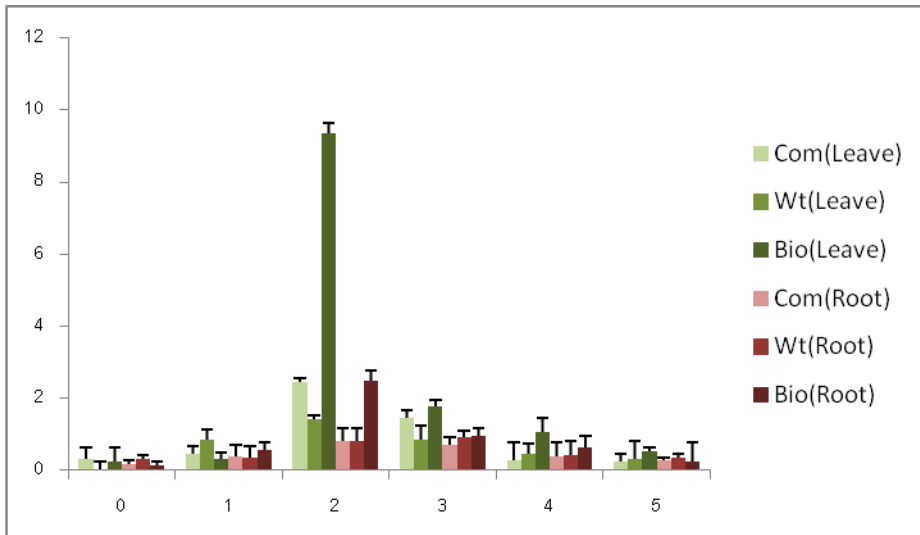
ภาพที่ 20 การแสดงออกของยีน *MIPS* ในใบและรากของพันธุ์ใบโอเทค 2 ที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย Hoagland ที่เติมไซโตลิมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน

เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *MIPS* ในอ้อยต่างพันธุ์ ที่ความเข้มข้นของไซโตลิมคลอไรด์ระดับหนึ่ง ๆ นั้น พบว่า ที่ไซโตลิมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ การแสดงออกของยีนดังกล่าวทั้งที่ใบและรากของพันธุ์ใบโอเทค 2 จะมีการแสดงออกสูงที่สุดเมื่อเทียบกับพันธุ์อื่น ๆ แต่กลับใช้เวลานานมากที่สุดที่ทำให้การแสดงออกดังกล่าวสูงที่สุดคือ 5 วันหลังได้รับไซโตลิมคลอไรด์ (ภาพที่ 20)

ที่ไซโตลิมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ การแสดงออกของยีน *MIPS* ทั้งที่ใบและรากของพันธุ์ใบโอเทค 2 ยังคงอยู่ในระดับที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับพันธุ์อื่น และมีการแสดงออกถึงระดับดังกล่าวเร็วที่สุดด้วย คือ 2 วัน หลังได้รับไซโตลิมคลอไรด์



ภาพที่ 21 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *MIPS* ใบและรากของอ้อย 3 พันธุ์ ที่ได้รับไซโตลิมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน



ภาพที่ 22 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *MIPS* ใบและรากของอ้อย 3 พันธุ์ ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ นาน 0-5 วัน

วิจารณ์ผลการวิจัย

กลไกของพืชที่เมื่อได้รับสภาพเครียดจากความเค็ม จะมีกระบวนการป้องกันตัวเองจากอันตรายที่จะเกิดจากความเค็มอย่างน้อย 2 กระบวนการคือ กลไกการขับเกลือส่วนเกินมาไว้ที่ผิวของใบโดยผ่านกระบวนการ ion exclusion หรือการกระจายเกลือไปเก็บไว้ตามส่วนต่าง ๆ ของพืช (Bradley and Morris, 1991) และ การปรับลดค่าแรงดันออสโมติก โดยการสร้างสาร osmolytes เพื่อลดการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ (Cavalieri, 1983) ยีน *Myo-inositol 1-phosphate synthase (MIPS)* ควบคุมการสังเคราะห์เอ็นไซม์ *Myo-inositol 1-phosphate synthase* เอ็นไซม์นี้เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน *glucose 6-phosphate* เป็น *myo-inositol-1-phosphate* หลังจากนั้น ถูกออกซิไดซ์ ด้วยเอ็นไซม์ชนิดที่สอง คือ *myo-inositol -monophosphatase (MIP)* ซึ่งเอ็นไซม์ MIP จะสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาดีฟอสโฟรีเลชัน (dephosphorylation) ทำให้หมู่ฟอสเฟตถูกปลดปล่อย ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนขนส่ง stress-related molecules มีบทบาทสำคัญในการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ (phospholipids) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวของกลีเซอรอล (glycerol) 1 โมเลกุล กรดไขมัน (fatty acid) 2 โมเลกุล และกรดฟอสฟอริก 1 โมเลกุล (phospholipids) นอกจากนั้นยังทำหน้าที่ส่งสัญญาณการแลกเปลี่ยนและจัดเก็บออกซิน (auxin) การสังเคราะห์ phytic acid และสารสำคัญในกลุ่มน้ำตาล inositol คือ *myo-inositol* จะถูกสังเคราะห์เมื่อพืชได้รับสภาวะเครียด (Majee *et al.*, 2004; Gajjeraman *et al.*, 2011) การศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ยีน *MIPS* มีขนาด 1533 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับยีน *MIPS* ในข้าวสาลีที่มีขนาด 1530 นิวคลีโอไทด์ (Khurana *et al.*, 2012) เมื่ออ้อยพันธุ์ต่างๆได้รับสภาพเครียดจากการขาดน้ำอันเนื่องมาจากความเค็มจะกระตุ้นให้ยีน *MIPS* มีการแสดงออกมากขึ้น โดยการแสดงออกที่ใบจะมีมากกว่าที่ราก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wang *et al.* (2011) ที่พบว่าการแสดงออกของยีน *MIPS* ในสับดูดำที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ 200 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าการแสดงออกของยีน *MIPS* ในใบมากกว่าราก และเมล็ด แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีน *MIPS* ในอ้อยทุกพันธุ์เมื่อแสดงออกถึงระดับสูงสุดก็จะเริ่มลดการแสดงออก ซึ่งในสภาวะปกติพืชจะมีการแสดงของยีน *MIPS* อยู่ก่อนแล้ว เมื่อได้รับความเครียดพืชจะสังเคราะห์เอ็นไซม์ MIPS มากขึ้น เพื่อใช้ในการสร้างสาร *myo-inositol* มากขึ้นภายในเซลล์ เพื่อรักษาแรงดันเต่งภายในเซลล์ได้ หลังจากนั้นการแสดงออกของยีนลดลงเพราะสารประกอบภายในเซลล์ที่สร้างขึ้น คือ *myo-inositol* มีเพียงพอที่จะช่วยปรับสมดุลน้ำภายในเซลล์ ทำให้พืชรักษาสภาพการเจริญได้ตามปกติ การแสดงออกของยีนจึงลดลง แต่การตอบสนองต่อความเค็มของอ้อยแต่ละพันธุ์ที่ศึกษาจะแตกต่างกันทั้งในแง่ของระดับการแสดงออกของยีน และระยะเวลาที่ตอบสนองที่เร็วหรือช้าต่างกัน ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ได้ชื่อว่าเป็นพันธุ์ทนแล้ง (บุศรินทร์, 2557) แต่มีแนวโน้มการแสดงออกของยีนที่ในระดับที่ต่ำกว่าพันธุ์ป่าหรือพันธุ์ลูกผสมระหว่างชนิด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในพันธุ์ป่าซึ่งปกติขึ้นอยู่ตามธรรมชาติในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันมาก มีความสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่า หรือในพันธุ์ลูกผสมระหว่างชนิดอาจได้รับยีนที่เกี่ยวข้องกับความทนทานมาจากพันธุ์ป่า

สรุปผลการทดลอง

1. ต้นอ้อยที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแบบ hydroponic ควรเป็นต้นอ้อยที่มีอายุไม่เกิน 1.5-2 เดือน โดยเพาะอ้อยแบบ 1 ท่อน 1 ตา ในวัสดุปลูกที่เป็นทราย:ซีเถ้าแกลบอัตรา 1:1
2. การตอบสนองต่อความเค็มที่เกิดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์นั้น อ้อยจะแสดงอาการเหี่ยวและใบแห้งในวันที่ 2-3 หลังได้รับเกลือ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุกรรม และความเข้มข้นของเกลือ โดยพันธุ์ป่าและพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่า (ไบโอเทค 2) มีแนวโน้มจะทนทานต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ดีกว่าพันธุ์ปลูกที่เป็นการค้า (กำแพงแสน 94-13)
3. ยีน *MIPS* ซึ่งเป็นยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและสะสมสาร osmolyte ของอ้อยทั้ง 5 พันธุ์มีขนาดเท่ากันคือ 1533 นิวคลีโอไทด์ เมื่อแปลรหัสพันธุกรรมเป็นโปรตีนจะได้โปรตีนที่มี 511 กรดอะมิโน และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้ในอ้อยทั้ง 5 พันธุ์จะพบว่าแปรปรวนทั้งสิ้น 14 ตำแหน่ง และ 3 ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความแตกต่างกัน
4. ระดับการแสดงออกของยีน *MIPS* เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนนี้ในอ้อยเมื่อได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ จะมีการแสดงออกของยีนที่รากจะมีมากกว่าที่ใบ และที่โซเดียมคลอไรด์ 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ การแสดงออกของยีนดังกล่าวทั้งที่ใบและรากของพันธุ์ไบโอเทค 2 จะมีการแสดงออกสูงที่สุดเมื่อเทียบกับพันธุ์อื่นที่ 5 วัน และ 2 วันหลังได้รับโซเดียมคลอไรด์ ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้ทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนที่แตกต่างกันไป รวมทั้งผลการแสดงออกของยีนในแต่ละสายพันธุ์ไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด gene targeted marker ที่ใช้ในการคัดเลือกอ้อยทนทานต่อดินเค็มระดับน้อยถึงปานกลางต่อไป

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติ และนานาชาติ อยู่ระหว่างการรอตีพิมพ์ เรื่อง Partial cloning and expression of *scbadh* and *scmips* gene in wild and cultivated sugarcane under mimic saline soil
2. การจดสิทธิบัตร -
3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ ขาย/ ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป -
4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)
ได้มีการนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนลงในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งเป็นฐานข้อมูลสาธารณะที่รวบรวมข้อมูลทางพันธุกรรม ทำให้นักวิจัยหรือผู้ที่สนใจนำข้อมูลของยีน *MIPS* ไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้

รายงานการเงิน

โครงการ สัญญาเลขที่ 5/2560 โครงการวิจัยประเภท งบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล

(งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การค้นหาและรูปแบบการแสดงออกของยีน Myo-inositol 1- Phosphate Synthase (MIPS)

ในอ้อย (*Saccharum officinarum* L.) ที่ได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็ม

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน อ.ชนากานต์ ลักษณะ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ต.ค. 59 ถึงวันที่ 30 ก.ย. 60

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ต.ค. 59 ถึงวันที่ 30 ก.ย. 60

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 120,600 บาท เมื่อ วันที่ 24 พ.ค. 2560

งวดที่ 2 (40%) 96,480 บาท เมื่อ วันที่ 17 ส.ค. 2560

งวดที่ 3 (10%) 24,120 บาท ยังไม่ได้รับ

รวม 241,200 บาท

รายจ่าย รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	26,800	26,800	-
2. ค่าจ้าง	-	-	-
3. ค่าวัสดุ	81,600	81,600	-
4. ค่าใช้สอย	132,800	132,800	-
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ ค่าธรรมเนียมมอดหนุน สถาบัน (10%)	26,800	26,800	-
รวม	268,000	268,000	-

๒๗ ๒๒

(นางสาวชนากานต์ ลักษณะ)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง

- กรมพัฒนาที่ดิน. ม.ป.ป.พืชทนเค็มและพืชชอบเกลือ. แหล่งที่มา
http://www.ddd.go.th/Lddwebsite/web_ord/Technical/pdf/P_Technical03001_3.pdf, 28มกราคม 2557.
- บุศรินทร์ อิ่มอินทร์. 2557. การโคลนบางส่วนของยีน BetaineAldehyde Dehydrogenase และ Myo - Inositol 1 - Phosphate Synthase ที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำ. ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาการปรับปรุงพันธุ์พืช คณะเกษตรกำแพงแสน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ภัทราวดี พิทักษ์พลรัตน์. 2544. การโคลนและวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนเอ็นเอที่จำเพาะในโคลนพันธุ์อ้อยทนเค็ม. วิทยานิพนธ์ ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 87 น.
- วรัญญา สีกัน. 2546. การโคลนและการหาลำดับเบสของยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดจากสภาวะความเครียดในอ้อย. วิทยานิพนธ์ ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 77 น.
- ภวินท์ พานิชพรพันธุ์. 2554. การโคลน การหาลำดับเบสและการแสดงออกของยีน *SoNHX1* ที่ตอบสนองต่อสภาพสภาวะทนเค็มจากอ้อย. วิทยานิพนธ์ ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 93 น.
- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2559. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อยปีการผลิต 2558/59. 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. and N.A. Akram. 2009. Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: An analytical comparison. *Biotech. Adv.* 27: 744-752.
- Bradley, P.M. and J.T. Morris. 1991. Relative importance of ion exclusion, secretion and accumulation in *Spartina alterniflora* Loisel. *J. Exp. Bot.* 42: 1525–1532.
- 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, T.H.H. and M. Norio. 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 250-257.
- 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+/N+ 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.
- 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.
- Gajjerman, P., P.G. Kwar., M.C. Pagariya and D.T. Prasad. 2011. Identification of water deficit stress upregulated genes in sugarcane. *Environ. Exp. Bot.* 36: 29-38.
- Gillaspy, G.E. 2011. The cellular language of myo-inositol signaling. *New Phytologist.* 192: 823-839.
- Hegeman, C.E., L.L. Good and E.A. Grabau. 2001. Expression of D-myo-inositol-3-phosphate synthase in soybean. Implications for phytic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* 125: 1941-1948.
- Karner, U., P. Thomas, R. Victor, A.J. David, L.H. Cliff and R. Andreas. 2004. Myo-Inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds. *J. Exp. Bot.* 55: 1981-1987.
- Khurana, N., C. Harsh and K. Paramjit. 2012. Expression analysis of a heat-inducible, myo-inositol-1-phosphate synthase (*MIPS*) gene from wheat and the alternatively spliced variants of rice and Arabidopsis. *Plant Cell Rep.* 31: 237-251.
- Kumar, S., K.M. Naidu and H.L. Sehita. 1994. Causes of growth reduction in elongation and expanding leaf tissue of sugarcane under saline condition. *Aust. J. Plant Physiol.* 21: 79-83.

- Laksana, C. and S. Chanprame. 2015. A simple and rapid method for RNA extraction from young and mature leaf of oil palm (*Elaeis guineensis jacq.*). ISSAAS J. 21(1): 96-106.
- Majee, M., S. Maitra, K.G. Dastidar, S. Pattnaik, A. Chatterjee and N.C. Hait. 2004. A novel salt-tolerant L-myo-inositol-1- phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a halophytic wild rice. J. Biol. Chem. 279: 28539-28552.
- Rahnama, A., K.Poustini, R. Tavakkol-Afshari, A. Ahmadiand H. Alizadeh. 2011. Growth properties and ion distribution in different tissues of bread wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.) differing in salt tolerance. J. Agron. Crop Sci. 197: 21-30.
- Rathinasabapathi, B. 2000. Metabolic engineering for stress tolerance: installing osmoprotectant synthesis. Ann. Bot. 86: 709-716.
- Sriroth, K., Vanichsriratana, W. and Sunthornvarabhas. 2016. The Current Status of Sugar Industry and By-products in Thailand. J. Sugar Tech. 18: 576-582
- Umeda, M., C. Hara, Y. Matsubayashi, H.H. Li, Q. Liu, F. Tadokoro, S. Aotsuka and H. Uchimiya. 1994. Expressed sequence tags from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) under stressed conditions: Analysis of transcripts of genes engaged in ATP-generating pathways. Plant Mol. Biol. 25: 469-478.
- USDA-ARS U.S. Salinity Laboratory. 2013. Halophyte database by Dr. Nicholas Yensen. Available at <http://www.ussl.ars.usda.gov/pls/caliche/halophyte.query?k=Genus&q= Saccharum>, January 28, 2014.
- Wang, Y., J. Huang, C. Bao Gou, X. Dai, F. Chen and W. Wei. 2011. Cloning and characterization of a differentially expressed cDNA encoding myo-inositol-1-phosphate synthase involved in response to abiotic stress in *Jatropha curcas*. Plant Cell Tiss Organ Cult. 106:269-277.
- Zhu, J.K. 2001. Plant salt tolerance. Trends Plant Sci. 6: 66-71.

ภาคผนวก

ประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติหัวหน้าวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล นางสาวชนากานต์ ลักษณะ
ชื่อ - นามสกุล Miss Chanakan Laksana
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3930100166063
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
คณะ เทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขต สระแก้ว จ.สระแก้ว 27160
โทรศัพท์ 089-4905-896
E-mail : chanakanl@buu.ac.th
5. ประวัติการศึกษาต้องระบุสถาบันการศึกษา สาขาวิชาและปีที่จบการศึกษา
 - 5.1 ปริญญาตรี สาขาทรัพยากรเกษตรชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีที่สำเร็จ 2544
 - 5.2 ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีที่สำเร็จ 2548
 - 5.3 ปริญญาเอก สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีที่สำเร็จ 2557
6. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ
เทคโนโลยีชีวภาพด้านพืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์พืช การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์
การสกัดสารทุติยภูมิจากพืชและการวิเคราะห์สารโดยใช้ HPLC และ ICP-MS
การถ่ายยีนในพืช โดยการใช้อโครแบคทีเรีย และการใช้เครื่องยิงอนุภาค
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
 - 7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -
 - 7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : -
 - 7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว
 1. Laksana, C., P. Chaochalad, N. Rassameejanphen and S. Chanprame. 2014. Cloning of *BOR1* (boron transporter) partial length cDNA from oil palm, sugarcane and physic nut. *ISSAAS Journal*. 21(2): 1-10.
 2. Laksana, C. and S. Chanprame. 2015. Simple and rapid RNA extraction from young and mature leave of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *ISSAAS Journal*. 22(1) 95-105.
 3. Priti. N.I., Laksana, C. and S. Chanprame. 2016. Transformation and expression of bt gene in sugarcane. *J. ISSAAS* 22: (1) 84-95.

4. **Laksana, C.,** T. Fujiwara and S. Chanprame. 2015. Cloning of boron transporter gene in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). (Manuscript preparation)
5. **Laksana, C.** and S. Chanprame. 2015. Expression of *BADH* and *MIPS* gene in 2 species of sugarcane under mimic sodic and soil saline soil. (Manuscript preparation)
6. **Laksana, C.** and S. Chanprame. 2015. Study of suitable concentration of agar for replacing agarose in electrophoresis. (Manuscript preparation)
7. **ชนากานต์ ลักษณะ และ สนธิชัย จันทร์เปรม.** 2557. การแสดงออกของยีน *BOR1* และการวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุโบรอนในปาล์มน้ำมันที่ได้รับโบรอนระดับต่างๆ. ว.วิทยาศาสตร์เกษตร. 45(2): 153-162.
8. **ชนากานต์ ลักษณะ, ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม, สนธิชัย จันทร์เปรม และ เสริมศิริ จันทร์เปรม.** ลักษณะทางสัณฐานและปริมาณสาร plumbagin ที่เปลี่ยนแปลงไปของต้นเจตมูลเพลิงแดงที่เกิดจาก hairy root. ว.วิทยาศาสตร์เกษตร. 40(1): 15-23.
9. **ชนากานต์ ลักษณะ และ สนธิชัย จันทร์เปรม.** 2560. การแสดงออกของยีน *BADH* ในอ้อยป่าและอ้อยการค้าภายใต้สภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิก, หน้า 133-140. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 55. สาขาพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
10. **อัญชนา รอดรังนก, ชนากานต์ ลักษณะ, และสนธิชัย จันทร์เปรม.** (2560). การโคลนและศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *NIP5;1* ในปาล์มน้ำมันชนิดเทอเนร่า. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 48(2) : 160-173.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ: -

ชื่อโครงการ	สถานภาพ	ปี
โครงการการพัฒนา gene targeted marker เพื่อใช้คัดเลือกอ้อยทนดินเค็ม	ผู้ร่วมโครงการ	2559
การสำรวจ การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษ เพื่อใช้คัดเลือกสายพันธุ์สลดที่มีสารพิษต่ำและการอนุรักษ์และขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ปีที่ 1)	หัวหน้าโครงการ	2561
การบ่งชี้และแยกยีน Ca^{2+}/H^{+} antiporter (CAX) ที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพดินเค็ม	หัวหน้าโครงการ	2561

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

- ชื่อ (ภาษาไทย) นายสนธิชัย จันทร์เปรม
(ภาษาอังกฤษ) MR. SONTICHAJ CHANPRAME
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3120300191344
- ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
- หน่วยงานที่สังกัด/ที่อยู่/โทรศัพท์
ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
โทรศัพท์ (034) 351-887 ต่อ 118 โทรศัพท์ (034) 352-812
e-mail : agrstc@ku.ac.th
- ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ปริญญา	วิชาเอก	สถาบัน	ประเทศ
2525	ว.ท.บ.(เกษตรศาสตร์)	พืชไร่	ม.เกษตรศาสตร์	ไทย
2528	ว.ท.ม.(เกษตรศาสตร์)	พืชไร่	ม.เกษตรศาสตร์	ไทย
2541	Ph.D. (Agronomy)	Plant Biotechnology	U. of Illinois	USA.

- สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ
 - การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
 - การถ่ายยีนในพืช
 - เทคนิคทางด้านชีววิทยาโมเลกุล

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอก

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ	สถานภาพ	ปี
การเพาะเลี้ยงและเก็บรักษาพืชวงศ์ขิงโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและใช้สภาวะเย็นยิ่งยวด	หัวหน้าโครงการ	2546
การพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายสำหรับลักษณะทนแล้งในอ้อย	หัวหน้าโครงการ	2546
การสร้างความปลอดภัยทางพันธุกรรมให้แก่เจตมูลเพลิงแดง	หัวหน้าโครงการ	2548
การปรับปรุงพันธุ์ว่านขมิ้นดอก (Curcuma xanthorrhiza Roxb.) เพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตสารทุติยภูมิสำหรับใช้ในทางการเกษตรโดยการเพิ่มชุดโครโมโซมและการก่อกลายพันธุ์	หัวหน้าโครงการ	2550
การปรับปรุงพันธุ์ว่านขมิ้นดอก (Curcuma xanthorrhiza Roxb.) เพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตสารทุติยภูมิสำหรับใช้ในทางการเกษตรโดย	หัวหน้าโครงการ	2550

การเพิ่มชุดโครโมโซมและการก่อกลายพันธุ์		
ศูนย์ความเป็นเลิศทางเทคโนโลยีชีวภาพของปาล์มน้ำมันเพื่อพลังงานทดแทน	ผู้ร่วมโครงการ	2550
การศึกษาารูปแบบของการแสดงออกของยีน invertase กับการสะสมน้ำตาลซูโครสในอ้อย	หัวหน้าโครงการ	2553

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : (ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุนย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)

1. ประกาย มานำ, ธรรมศักดิ์ ทองเกต, **สนธิชัย จันทร์เปรม** และเสริมศิริ จันทร์เปรม 2553. การสกัดโปรตีนที่สะสมในเมล็ดเพื่อนำมาใช้แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าวโพดหวานด้วยเทคนิค Ultrathin-layer Isoelectric Focusing. วิทยาศาสตร์เกษตร 41: 121-127.
2. ลลิตา อาจสูงเนิน, **สนธิชัย จันทร์เปรม** และ บุปผา คงสมัย. 2553. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) สายพันธุ์แท้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาาร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุล % AFLP . วิทยาศาสตร์เกษตร 41: 175-182.
3. Srinives, P., R. Kitsanachande, T. Chalee, W. Sommanas and **S. Chanprame**. 2010. Inheritance of resistance to iron deficiency and identification of AFLP markers associated with the resistance in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek. Plant Soil. 335: 423-437.
4. รุติพร สายมณี, เสริมศิริ จันทร์เปรม และ**สนธิชัย จันทร์เปรม**. 2553. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Eucalyptus camaldulensis* โดยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์. วิทยาศาสตร์เกษตร 41: 407-414.
5. ปิยนารถ ศรชัย, ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม, **สนธิชัย จันทร์เปรม** และเสริมศิริ จันทร์เปรม. 2553. การแยกเซลล์ไรฟ์นัง และการพัฒนาเป็นเซลล์ใหม่ของสาหร่ายเกลียวทอง. วิทยาศาสตร์เกษตร 41: 415-422.
6. Rungnoi, O., **S. Chanprame**, T. Toojinda, I. Godwin, C. Lambrides and P. Srinives. 2010. Characterization, inheritance, and molecular study of opaque leaf mutant in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). J. Crop Sci. Biotech. 13: 219-226.
7. ปิยนันท์ พวงจันทร์ บุปผา คงสมัย และ**สนธิชัย จันทร์เปรม**. 2553. การชักนำให้เกิดการกลายในทานตะวันลูกผสม (*Helianthus annuus*) โดยการฉายรังสีแกมมาาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, หน้า 191-198. ใน การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 7. 7-8 ธันวาคม 2553.
8. กุลชาติ นาคจันทิก บุปผา คงสมัย และ**สนธิชัย จันทร์เปรม**. 2553. การถ่ายยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืช ไกลโฟเสทเข้าสู่มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.) โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย, หน้า 199-206. ใน การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 7. 7-8 ธันวาคม 2553.

9. กุสุมา รอดแผ้วพาล นงลักษณ์ เทียนเสรี และ **สนธิชัย จันท์เปรม**. 2553. ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียของแคลลัสอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13, หน้า 207-215. ใน การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 7. 7-7-8 ธันวาคม 2553.
10. อัญชิสา ปานแก้ว, นงลักษณ์ เทียนเสรี และ **สนธิชัย จันท์เปรม**. 2555. การชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดจากก้านช่อดอกอ่อนและก้านใบอ่อนของสับดูดำพันธุ์โคราช, หน้า 2174-2181. ใน การประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9. 6-7 ธันวาคม 2555.
11. บุศริน อิมอินทร์, นงลักษณ์ เทียนเสรี และ **สนธิชัย จันท์เปรม**. 2555. การบ่งชี้ยีนที่ควบคุมการสร้าง betaine aldehyde dehydrogenase ที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำ, หน้า 2166-2173. ใน การประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9. 6-7 ธันวาคม 2555.
12. สุลักษณ์แจ่มจรัส, **สนธิชัย จันท์เปรม**, รงรองหอมหวล, มณฑาวงศ์มณีโรจน์ และ รัตนา เอการัมย์. 2555. การใช้สารโคโตซานร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวหอมมะลิ 105, หน้า 2189-2197. ใน การประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9. 6-7 ธันวาคม 2555.
13. Chaisan, T., P. Somta, P. Srinives, **S. Chanprame**, R. Kaveeta, and S. Dumrongkittikule. 2013. Development of tetraploid plants from and interspecific hybrid between mungbean (*Vigna radiata*) and rice bean (*Vigna umbellata*). J. Crop Sci. Biotech. 16(1): 45-51. DOI No. 10.1007/s12892-012-0078-y.
14. วิชา สิงห์ลอ, อัญชิสา ปานแก้ว, นงลักษณ์ เทียนเสรี, เสริมศิริ จันท์เปรม และ **สนธิชัย จันท์เปรม**. 2556. การชักนำให้เกิดยอดจากก้านช่อดอกอ่อนและก้านใบอ่อนของสับดูดำพันธุ์โคราชและปัจจัยที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนเข้าสู่สับดูดำโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ. วิทยาศาสตร์เกษตร 44 (1): 17-29.
15. กำไล เรียนหัตถกรรม, ปิยรัชฎ์ เจริญทรัพย์, ภาณี ทองพำนัก, ศิริกุล เกษา, พรชัย จุฑามาศ และ **สนธิชัย จันท์เปรม**. 2556. เทคนิคที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาคุณภาพของสับดูดำในสภาพเย็นยิ่งยวด. วิทยาศาสตร์เกษตร 44 (1): 53-62.
16. วณัญญา ฐิติผล, **สนธิชัย จันท์เปรม** และ นงลักษณ์ เทียนเสรี. 2556. การแสดงออกอย่างจำเพาะของยีน pyruvate decarboxylase (PDC) ในสับดูดำภายใต้สภาพน้ำท่วม, หน้า 2133-2141. ใน การประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 10 7-8 ธันวาคม 2556.
17. ชนาภานต์ ลักษณะ และ **สนธิชัย จันท์เปรม**. 2557. การแสดงออกของยีน *BOR1* และการวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุโบรอน ในปาล์มน้ำมันที่ได้รับโบรอนระดับต่างๆ. วิทยาศาสตร์เกษตร 45(2): 153-162.

18. Chanakan Laksana, Parisa chaochalad, Noppon Rassameejanphen, Duangkamon Sasiwattanapond and **Sontichai Chanprame**. 2014. Cloning of BOR1 (Boron transporter) partial length cDNA from oil palm, sugarcane and pyhsic nut. ISSAAS J. 20 (2): 1-10.
19. ปัทมา ศรีน้ำเงิน, นงลักษณ์ เทียนเสรี และ **สนธิชัย จันทน์เปรม**. 2557. การโคลนบางส่วนของยีน *APETALA1 (AP1)* ในอ้อยและการทำนายเชิงหน้าที่ของยีน โดยวิธี *in siligo*. วิทยาศาสตร์เกษตร 45 (3): 249-257.
20. ปัทมา ศรีน้ำเงิน และ **สนธิชัย จันทน์เปรม**. 2557. การศึกษาการเกิด DNA methylation ของอ้อยปลูก อ้อยป่า และลูกผสมอ้อยข้ามชนิดชั่วที่ 1. วิทยาศาสตร์เกษตร45 (3): 259-268.
21. รรรอง หอมหวล, สุกฤษณ์ แจ่มจำรัส, มณฑา วงศ์มณีโรจน์, รัตนา เอการัมย์, พีรพงษ์ แสงวงวงศ์กุล, ชูศักดิ์ คุณุไทย และ **สนธิชัย จันทน์เปรม**. 2558. ผลของโคโคซานและไรโดอะซูรอนในการเพาะเลี้ยง ข้าวขาวดอกมะละ 105 เพื่อสร้างสารสำคัญทางโภชนาการ. วิทยาศาสตร์เกษตร46 (1): 7-18.
22. Chanakan Laksana and Sontichai Chanprame. 2015. A simple and rapid method for RNA extraction from young and mature leaves of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. ISSAAS J. 21 (1): 96-106.
23. เยาวพรรณ สนธิกุล, **สนธิชัย จันทน์เปรม**, พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ และเสริมศิริ จันทน์เปรม. 2558. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสักและการทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของเนื้อเยื่อสักเพื่อการถ่ายยีน. วิทยาศาสตร์เกษตร46 (2): 101-113.
24. ชมภูษ ลีประสาท, **สนธิชัย จันทน์เปรม**, พรศิริ เลี้ยงสกุล และเสริมศิริ จันทน์เปรม. 2558. การประเมินอัลลีโลพาธีของกล้วยไม้สกุลหวายไซเนีย บอม 17 ดัดแปลงพันธุกรรม. วิทยาศาสตร์เกษตร 46 (2): 115-125.
25. ชนากานต์ ลักษณะ และ **สนธิชัย จันทน์เปรม**. 2560. การแสดงออกของยีน *BADH* ในอ้อยป่าและอ้อย การค้าภายใต้สภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิก, หน้า 133-140. ใน การประชุมวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 55. สาขาพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
26. อัญชนา รอดรังนก, **ชนากานต์ ลักษณะ**, และสนธิชัย จันทน์เปรม. (2560). การโคลนและศึกษารูปแบบ การแสดงออกของยีน *NIP5;1* ในปาล์มน้ำมันชนิดเทอเนร่า. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 48(2) : 160-173.

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่า ได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

-

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อโครงการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัย (ผู้บริหารโครงการ หัวหน้าโครงการ และ/หรือผู้ร่วมวิจัย) ระบุเดือน และปีที่เริ่มต้นและสิ้นสุด

ชื่อโครงการ	สถานภาพ	ปี
การบ่งชี้ยีนที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพแล้ง	ผู้ร่วมโครงการ	2556
การบ่งชี้ยีนที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพดินเค็มน้อยถึงปานกลาง	หัวหน้าโครงการ	2557
โครงการการพัฒนา gene targeted marker เพื่อใช้คัดเลือกอ้อยทนดินเค็ม	หัวหน้าโครงการ	2559

