รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ระดับการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมในสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิก

Expression levels of *ScDREB2* gene in transgenic tobacco in mimic sodic saline soil

นางสาวชนากานต์ ลักษณะ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินรายได้ส่วนงาน

ประจำปีงบประมาณพ.ศ. ๒๕๖๓

มหาวิทยาลัยบูรพา

สัญญาเลขที่ ๑/๒๕๖๓

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ระดับการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม ในสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิก

Expression levels of *ScDREB2* gene in transgenic tobacco in mimic sodic saline soil

นางสาวชนากานต์ ลักษณะ
คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา
วิทยาเขตสระแก้ว

ได้รับงบประมาณ เดือนเมษายน พ.ศ. ๒๕๖๓ – มีนาคม พ.ศ. ๒๕๖๔

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้เงินรายได้ส่วนงาน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 มหาวิทยาลัยบูรพา เลขที่สัญญา 1/2563

บทคัดย่อ

ดินเค็มโซดิกเป็นดินที่มีปริมาณเกลือและ pH สูง พืชจึงเจริญเติบโตได้น้อยลง เมื่อพืชได้รับสภาพดินเค็มโซดิกยีนต่าง ๆ ทีเกี่ยวข้องจะมีการแสดงออกในรูปแบบและระดับที่แตกต่างกัน โดยระดับการแสดงออกของยีนจะถูกควบคุมด้วยกลุ่มของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ transcription factors อีกทีหนึ่ง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Dehydration responsive element binding protein* (*ScDREB2*) ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้าง transcription factor ที่แยกได้จากอ้อยป่าและอ้อยลูกผสมระหว่างอ้อยป่าและอ้อยพันธุ์ปลูก (Biotech 2) และถ่ายเข้าสู่ยาสูบ แล้วปลูกยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมดังกล่าวในสารละลายธาตุอาหาร 1/10 Hoagland ที่ปรับ pH ของสารละลายเป็น 8.5 และเติม NaCl ในความเข้มข้น 0 100 และ 200 mM พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มสูงขึ้นต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม และต้นที่ไม่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมจะแสดงอาการเหี่ยวและมีอาการใบเหลืองเพิ่มมากขึ้น เมื่อนำมาตรวจสอบลักษณะการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real-time PCR พบว่าการแสดงออกของยีนของต้นยาสูบที่ได้รับดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้จากอ้อยลูกผสมระหว่างชนิด (Biotech 2) มีการแสดงออกของยีนสูงกว่ายาสูบดัดแปลงพันธุกรรมจากยีน *ScDREB2* ของอ้อยป่า

Abstract

Saline sodic soil is a soil with high salt which easily dissolve water, high exchangeable sodium with high pH. It is harmful to the plants and results of less growth. In saline soils, only salt tolerant plants can grow normally. In saline sodic soil, beside the sodium toxicity, some nutrients and micronutrients are precipitated due to alkaline condition. Plants cannot absorb and show symptoms of nutrient deficiency. When the plants have been grown in saline soils, they have some mechanisms to respond survival. The objective of this study was to determine the expression of *DREB2* (*Dehydration responsive element binding proteins2*) isolated from wild sugarcane and interspecific sugarcane hybrid (Biotech 2) and transformed into tobacco which receiving mimic saline sodic soil. The transgenic tobacco plants were planted in 1/10 Hoagland solution at pH 8.5 together with NaCl at concentrations of 0, 100 and 200 mM. It was found that when the concentrations of NaCl were increased the plants wilted and leaves turned yellow. The determination of *DREB2* gene expression by using real-time PCR indicated that the expression of *DREB2* gene from interspecific sugarcane hybrid showed higher expression than that of wild cane.

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	6
ผลการวิจัย	8
วิจารณ์ผลการวิจัย	14
สรุปผลการวิจัย	16
ผลผลิต	16
รายงานการเงิน	17
เอกสารอ้างอิง	18
ประวัตินักวิจัยและคณะ	19

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน *ScDREB2* ของอ้อยที่ได้รับการถ่ายยีน *ScDREB2* จากอ้อยพันธุ์ป่า(WT8) และพันธุ์biotech2 (B2 and B3) และได้รับ NaCl 100 mM pH 8.5 นาน 1, 3, 5, 10, 15 และ 20 วัน	13
2	**2** ยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน *ScDREB2* ของอ้อยที่ได้รับการถ่ายยีน *ScDREB2* จากอ้อยพันธุ์ป่า(WT8) และพันธุ์biotech2 (B2 and B3) และได้รับ NaCl 200 mM pH 8.5 นาน 1, 3, 5, และ 10 วัน	14
3	การแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในใบที่ได้รับ NaCl ความเข้มข้น 100 mM and 200 mM NaCl pH 8.5 ในวันที่ 0 1 3 และ 5 วัน	15
4	การแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในรากที่ได้รับ NaCl ความเข้มข้น 100 mM and 200 mM NaCl pH 8.5 ในวันที่ 0 1 3 และ 5 วัน	20

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สระแก้วมีพื้นที่ปลูกอ้อยมากที่สุดในภาคตะวันออก โดยผลผลิตอ้อยเฉลี่ยของภาคตะวันออกอยู่ที่ 9.40 ตันต่อไร่ (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2558) ซึ่งถือว่าต่ำเพราะศักยภาพของพันธุ์อ้อยที่ปรับปรุงและส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก สาเหตุที่สำคัญสองประการที่ทำให้ผลผลิตอ้อยในภาคตะวันออกอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำ คือ การขาดแคลนน้ำชลประทานทำให้พื้นที่ปลูกมีความแห้งแล้ง และพื้นที่ปลูกบางส่วนเป็นดินเค็มหรือเค็มด่าง ในอดีตดินเค็มหรือเค็มด่างนั้นเกิดเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่ปัจจุบันปัญหาดินเค็มได้แพร่กระจายไปยังพื้นที่บางส่วนของภาคเหนือ ภาคกลาง รวมทั้งภาคตะวันออกด้วย ซึ่งดินเค็มหรือเค็มด่างนี้เป็นผลมาจากการใช้น้ำชลประทานที่ไม่ถูกต้อง รวมทั้งการขุดบ่อเก็บกักน้ำในแถบที่มีชั้นตะกอนเกลือสะสมอยู่ใต้ดิน ซึ่งจะทำให้เกิดการละลายเกลือออกมาอยู่ในน้ำใต้ดิน และเมื่อผิวดินแห้งน้ำที่มีเกลือละลายอยู่จะแทรกซึมขึ้นสู่ผิวดิน ทำให้มีการนำพาเกลือขึ้นมาสะสมในดินบนมากขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งพื้นที่ดินเค็มจะส่งผลกระทบต่อผลผลิตอ้อยเป็นอย่างมาก เมื่อพืชได้รับสภาวะที่ไม่เหมาะสมและทำให้เกิดความเครียด พืชจะมีการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดเหล่านั้น การตอบสนองต่อสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ จะถูกควบคุมด้วยยีนชนิดต่าง ๆ รวมทั้งยีน *DREB* (Dehydration responsive element binding) ซึ่งเป็น transcription factor ที่จะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเมื่อพืชได้รับสภาวะเครียดที่เกิดจากความความเค็มหรือเค็มด่าง (Wang *et al*., 2019) ซึ่งกลไกการทำงานที่สำคัญของ transcription factor คือจะเข้าจับเส้นดีเอ็นเอที่มีรหัสจำเพาะได้ ซึ่งทำให้สามารถควบคุมการทำงานของยีนอื่น Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki (2009) พบว่า ในพืชมียีน *DREB* 2 ชนิด คือ ยีน *DREB1* สำหรับควบคุมการแสดงออกของยีนที่ใช้ตอบสนองต่อความหนาวเย็น และยีน *DREB2* สำหรับควบคุมการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดออกโมติก (osmotic stress responsive gene) โดยโปรตีนที่ยีน *DREB* สังเคราะห์ขึ้นจะเข้าไปจับกับส่วนที่เรียกว่า *cis* element ที่เรียกว่า dehydration-responsive element/C-repeat (DRE/CRT) ที่อยู่ในส่วนของโปรโมเตอร์หลังจากนั้นจึงเริ่มการถอดรหัส (Lata and Prasad, 2011) ทำให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะเครียดแสดงออก และมีผลทำให้พืชทนทานต่อสภาวะเครียดดังกล่าวได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการตรวจสอบและเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ที่แยกได้จากอ้อยพันธุ์ป่า และอ้อยลูกผสมระหว่างชนิดที่ถ่ายเข้ายาสูบ เพื่อประเมินประสิทธิภาพของยีนดังกล่าวจากระดับการแสดงออกของยีน ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นแนวทางในการใช้เทคโนโลยีชีวภาพมาปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนทานต่อดินเค็มและดินเค็มโซดิกได้ดีขึ้นในอนาคต

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ทราบระดับการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมในสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิก เพื่อหาแนวทางการใช้ประโยชน์จากยีนดังกล่าวในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนดินเค็มในอนาคต

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้จะให้สภาพแวดล้อมที่เลียนแบบสภาพดินเค็มด่างโดยการใช้สารละลายธาตุอาหารที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 200 mM และ pH8 เพื่อให้ยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมอยู่ในสภาพเครียดคล้ายที่เกิดจากดินเค็มด่าง สภาพดังกล่าวจะกระตุ้นให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเค็มแสดงออกเพื่อความอยู่รอดของพืชเอง จากนั้นจึงสกัด total RNA ที่ประกอบไปด้วย mRNA ของยีนที่แสดงออกในสภาพดินเค็มด่างปะปนอยู่ด้วย แล้วจึงเปลี่ยน mRNA ให้เป็น cDNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาให้จำเพาะกับยีน *ScDREB* ซึ่งยีนนี้เป็น transcription factor โดย transcription factor จะเป็นโปรตีนที่สามารถเข้าจับอย่างจำเพาะกับ DNA เพื่อกระตุ้นให้เกิดการลอกรหัสพันธุกรรม (transcription) ได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น หลังจากนั้นใช้ปฏิกิริยา real time PCR เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนเมื่อยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมได้รับสภาพเครียดจากความเค็มด่างที่ระดับและระยะเวลาต่าง ๆ เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน และหาแนวทางใช้เป็นดัชนีคัดเลือกอ้อยทนค็มด่างในอนาคต

4. ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สมมุติฐานของการวิจัยนี้คือ พืชสามารถปรับตัวให้ทนต่อสภาพเค็มด่างหรือสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอื่นๆได้นั้นจะขึ้นอยู่กับการแสดงออกของยีน ซึ่งการแสดงออกได้มากน้อยเร็วหรือช้า อาจขึ้นอยู่กับความแตกต่างขององค์ประกอบของยีนที่มีอยู่ในสายพันธุ์พืชที่ทนทานและอ่อนแอเช่นลำดับของนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนที่แตกต่างกัน ความแตกต่างกันของส่วนโปรโมเตอร์ หรือความแตกต่างกันของ transcription factor ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนนั้นๆ ดังนั้น การทราบระดับการแสดงออกของยีนจะทำให้เข้าใจถึงกระบวนการทำงานของพืชที่ทนทานหรืออ่อนแอต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมชนิดนั้นๆ ได้ ซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ได้ใช้เป็นแนวทางในการค้นหา ปรับปรุง และคัดเลือกพันธุ์หรือสายพันธุ์อ้อยที่มีความทนทานต่อดินเค็มด่างได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีประสิทธิภาพมากขึ้น

5. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ความเค็ม หรือเค็มด่างเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตของพืชลดลง เนื่องจากความเค็มจะไปยับยั้งกระบวนการเมทาบอลิซึมต่างๆที่มีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าพืชบางชนิดสามารถปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดหรือเติบโตในสภาวะเค็มหรือเค็มด่างนี้ได้ การทนเค็มของพืชเป็นความสามารถที่พืชจะเจริญเติบโตและมีวงจรชีวิตสมบูรณ์ในสภาวะเค็มที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงในบริเวณราก พืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการทนเค็มต่างกัน โดยมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการทนเค็มของพืชเช่น พันธุกรรมของพืช ชนิดของเกลือ สภาพแวดล้อม สภาพของดิน และช่วงระยะการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช ผลกระทบจากความเค็มจะแสดงอาการคล้ายกับการที่พืชขาดน้ำ เช่น ชะงักการเจริญเติบโต ใบห่อลงเพื่อลดการคายน้ำทางปากใบ พืชบางชนิดอาจมีสีเขียวเข้มแกมน้ำเงิน (bluish green) มากกว่าพืชที่ขึ้นในดินปกติที่ปลูกในสภาพคล้ายคลึงกัน สีของใบพืชเปลี่ยนไปโดยจะเข้มกว่าปกติเนื่องจากใบมีคลอโรฟิลล์มาก และมีสารเคลือบใบ (cuticle) หนาเพื่อลดการสูญเสียน้ำ ขณะที่ในบางพืชอาจพบอาการปลายใบไหม้ (tip burn) เกิดจุดประ (mottles) บนใบ ใบม้วนและใบเหลืองเนื่องจากขาดคลอโรฟิลล์ ใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ปลายใบและขอบใบแห้งกรอบ (กรมพัฒนาที่ดิน, ม.ป.ป.)

เมื่อพืชได้รับสภาพเครียดจากความเค็ม พืชจะมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะเครียดดังกล่าว ซึ่งกลไกที่ทำให้พืชปรับตัวและอยู่รอดได้ในสภาพเค็มในพืชมีหลายรูปแบบ เช่น

1) ความสามารถในการปรับตัวของเซลล์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิด ion homeostasis และการปรับลดค่าแรงดันออสโมติก โดยการสร้างสาร osmolytes เมื่อเผชิญกับความเครียดจากสภาวะเค็ม (Cavalieri, 1983)

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

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

กลไกที่แตกต่างกันเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าพืชมีวิวัฒนาการหลากหลายรูปแบบเพื่อให้สามารถอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะที่มีเกลือสูง และสะท้อนให้เห็นว่ามียีนที่ควบคุมกลไกการทำงานเหล่านี้ด้วยเช่นกัน

DREB (Dehydration responsive element binding) เป็นtranscription factor ที่มีการทำงานเมื่อพืชอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีสภาวะเครียดทั้งหนาว แห้งแล้ง และเค็ม *DREB* เป็น transcription factor ซึ่งกลไกที่สำคัญของ transcription factor (TF) คือจะเข้าจับเส้นดีเอ็นเอ (DNA) ที่มีรหัสจำเพาะได้ ซึ่งทำให้สามารถควบคุมการทำงานของยีนอื่น ยีน *DREB* จะถูกนำไปใช้ใน osmotic-responsive pathway (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2009)โดย *DREB* จะเข้าไปจับกับส่วนที่เรียกว่า cis element (DRE/CRT) ที่อยู่ในส่วนของโปรโมเตอร์หลังจากนั้นจึงเริ่มการถอดรหัส (Lata and Prasad, 2011) ทำให้มีการแสดงออกของยีนและพืชก็สามารถทนอยู่ในสภาพดินเค็มได้

การปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ต้านทานต่อดินเค็มด่างจึงสามารถทำได้ทั้งโดยวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐาน (conventional breeding) หรือโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่จัดว่าเป็นเทคโนโลยีใหม่ แต่อย่างไรก็ตาม การปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจให้ทนทานต่อดินเค็มโดยใช้วิธีการมาตรฐานประสพความสำเร็จในวงจำกัด เนื่องจากความแปรปรวนทางพันธุกรรมมีจำกัด (Ashraf and Akram, 2009) ดังนั้นการใช้เทคโนโลยีชีวภาพเข้าช่วยปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนทานต่อดินเค็มจึงมีโอกาสประสพความสำเร็จสูง โดยงานวิจัยนี้จึงตรวจสอบและเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ที่แยกได้จากอ้อยพันธุ์ป่า และอ้อยลูกผสมระหว่างชนิดที่ถ่ายเข้ายาสูบ เพื่อประเมินประสิทธิภาพของยีนดังกล่าวจากระดับการแสดงออกของยีน ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นแนวทางในการใช้เทคโนโลยีชีวภาพมาปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนทานต่อดินเค็มและดินเค็มโซดิกได้ดีขึ้นในอนาคต และเพื่อให้สามารถใช้ประโยชน์จากองค์ความรู้นี้ไปประยุกต์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนทานดินเค็มในที่สุด

วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 (KK3)

2. อุปกรณ์สำหรับการทำเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
   - 2.1 เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ บีกเกอร์ กระบอกตวง
   - 2.2 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
   - 2.3 ตู้อบ (hot air oven)
   - 2.4 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH - meter)
   - 2.5 เครื่องชั่งสาร (balance)
   - 2.6 เตาไมโครเวฟ (microwave)
   - 2.7 ตู้ larminar flow
   - 2.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) และเครื่องกวนตะกอน (vortex®)
   - 2.9 ชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
   - 2.10 เครื่องปรับอากาศ (air conditioner)
   - 2.11 เครื่องเขย่า (shaker)
   - 2.12 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge)
   - 2.13 เครื่อง Thermal Cycler สำหรับทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)
   - 2.14 ชุดเครื่องมือ gel documentation system พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพเจล
   - 2.15 ชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส
   - 2.16 เครื่อง NanoDrop รุ่น 8000
3. สารเคมีสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ
4. สารเคมีสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
5. สารเคมีตามสูตร Hoagland สำหรับการปลูกอ้อยในสารละลายแบบ hydroponic
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
7. Polyethylene Glycon (PEG)

วิธีการ

การเตรียมต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม

นำต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *DREB2* จากอ้อยพันธุ์ป่า 1 สายต้น (ให้ชื่อรหัสเป็น WT8) และยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *DREB2* จากอ้อยลูกผสมระหว่างชนิดที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างอ้อยพันธุ์ปลูก (พันธุ์ชัยนาท 1) และอ้อยพันธุ์ป่า จำนวน 2 สายต้น (ให้ชื่อรหัสเป็น B2 และ B3) และต้นยาสูบที่ไม่ได้ดัดแปลงพันธุกรรม (ต้นควบคุม) อย่างละ 4 ต้น (ซ้ำ) นำออกปลูกแบบไฮโดรโพนิคในสารละลายธาตุอาหาร 1/10 Hoagland ปรับค่า pH เป็น 8.5 ด้วย NaOH และเติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 200 mM และเก็บตัวอย่างใบและรากในวันที่ 0, 1, 3 และ 5 หลังจากได้รับ NaCl และ ปรับค่า pH เป็น 8.5 เพื่อนำมาสกัด total RNA แล้วสังเคราะห์ RNA เป็น first strand cDNA สำหรับใช้ในการตรวจสอบผลการแสดงออกของยีน *DREB2* ด้วยเทคนิคการทำ real-time PCR และสังเกตและจดบันทึกลักษณะอาการต้นยาสูบหลังได้รับ NaCl ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในวันที่ 1, 3, 5, 10, 15 และ 20 วัน

การสกัด total RNA จากใบและรากของต้นยาสูบ

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

การสังเคราะห์ first-strand cDNA จาก total RNA

นำ total RNA ที่ได้จากการสกัดปริมาตร 5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) ผสมกับ 100 µM oligo $(dT)_{20}$ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10 mM dNTP mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย DEPC-dH_2O จนครบปริมาตร 12.5 ไมโครลิตรในหลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °ซ เป็นเวลา 5 นาที และบ่มต่อที่ 4 °ซ เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติม 5X reaction buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร RiboLock RNase inhibitor (Fermentas, Lithuania) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10 mM dNTP mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร Revert Aid M-MuLVRT (Fermentas, Lithuania) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 70 °ซ เป็นเวลา 10 นาที และนำไปแช่ในน้ำแข็ง นำ first strand cDNA ไปตรวจสอบคุณภาพโดยการทำ PCR กับยีน *NtEef-1a* (*Nicotiana tabacum* elongation factor-1 alpha)

การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิกด้วยเทคนิค real-time PCR

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิกที่ระดับและระยะเวลาต่าง ๆ โดยใช้ระดับการแสดงออกของยีน *NtEef-1a* (Accession number NM_001326165.1) เป็นยีนอ้างอิง (reference gene) ในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย first-strand cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (300 นาโนกรัม/

การวิเคราะห์ทางสถิติ

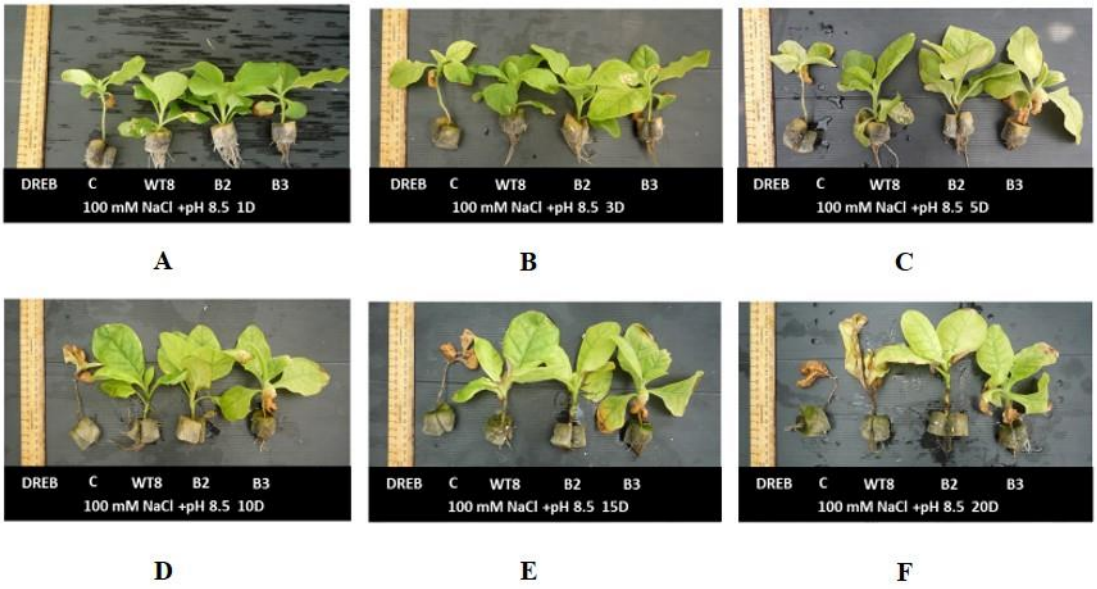
วางแผนการทดลองแบบ CRD มีจำนวน 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม R (version 3.4.3) ร่วมกับวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT (Duncan’s multiple range test) $P<0.05$

ผลการวิจัย

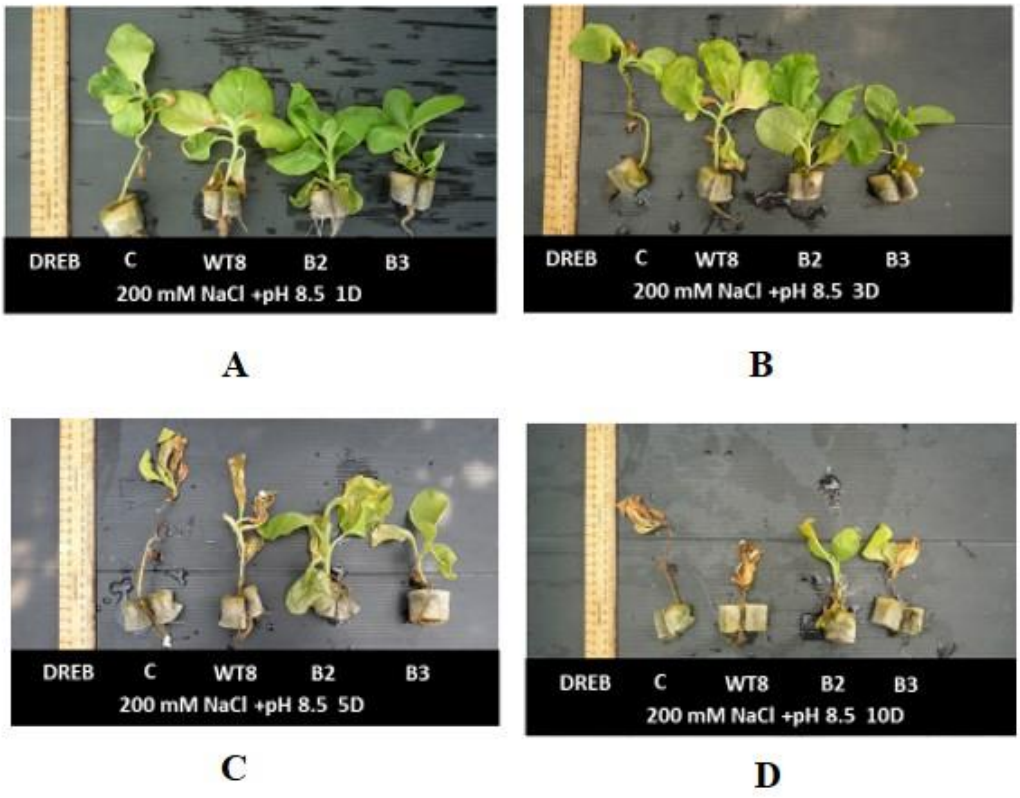
1. ลักษณะทางสัณฐานของต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *ScDREB2* เมื่อได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิก

ลักษณะสัณฐานของต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *ScDREB2* จากอ้อยพันธุ์ป่า (WT8) และอ้อยลูกผสมระหว่างชนิด (B2 และ B3) และยาสูบที่ไม่ได้ดัดแปลงพันธุกรรม (ต้นควบคุม) เมื่อปลูกแบบไฮโดรโพนิคในสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิกโดยปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 1/10 Hoagland ปรับค่า pH เป็น 8.5 และเติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0, 100 และ 200 mM เป็นเวลา 20 วัน พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl 100 mM ต้นยาสูบที่เป็นต้นควบคุมเริ่มแสดงอาการเหี่ยวในวันที่ 3 และใบอ่อนที่ยอดเริ่มเหลือง ส่วนยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม WT8 มีลักษณะปกติ ในขณะที่ยาสูบ B2 และ B3 มีอาการใบเหลืองเล็กน้อยเมื่อเทียบกับวันที่ 0 เมื่อยาสูบทุกต้นได้รับสภาวะเลียนแบบดินเค็มโซดิกยาวนานขึ้นก็แสดงอาการเหี่ยวมากขึ้น โดยยาสูบต้นควบคุมแห้งตายในวันที่ 10 หลังได้รับสภาวะเครียด ส่วนต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม WT8 ตายในวันที่ 20 ในขณะที่ยาสูบ B2 และ B3 ยังไม่ตายแต่มีอาการใบเหลืองและปลายใบไหม้ (รูปที่ 1) ส่วนต้นยาสูบที่ได้รับสารละลายธาตุอาหารที่เติม NaCl ความเข้มข้น 200 mM ยาสูบต้นควบคุมและ WT8 แสดงอาการเหี่ยวตั้งแต่วันที่ 1 หลังได้รับ NaCl และแสดงอาการเหี่ยวมากขึ้นเรื่อยๆ และยาสูบทั้ง 2 ต้นตายในวันที่ 5 ส่วนยาสูบ B2 และ B3 ยังคงมีชีวิตอยู่แต่ bio3 แสดงอาการเหี่ยวและใบไหม้อย่างรุนแรง แต่หลังจากวันที่ 10 เป็นต้นไปไม่มีต้นยาสูบที่รอดชีวิต (รูปที่ 2)

การที่ยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *ScDREB2* แสดงความทนทานต่อสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิกได้ดีกว่ายาสูบปกติแสดงว่ายีน *ScDREB2* มีบทบาทเพิ่มความสามารถในการทนทานต่อสภาพดังกล่าวของพืชได้ Shinozaki and Shinozaki (2009) พบว่า ยีน *DREB2* เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนที่พืชใช้ตอบสนองต่อความเครียดออสโมติกที่เกิดจากสภาวะการขาดน้ำและความเค็ม มีผลทำให้พืชทนทานต่อสภาวะดังกล่าวได้ดีขึ้น เช่นเดียวกับ Yao *et al*. (2016) ที่แยกยีน *DREB* จาก *Sophora moorcroftiana* ได้ 4 ยีน คือ *SmDREB1*, *SmDREB2*, *SmDREB3* และ *SmDREB4* โดยพบว่า สภาวะเครียดที่เกิดจากความเค็ม ความหนาวเย็น และความแห้งแล้งจะกระตุ้นให้ *SmDREB2* และ *SmDREB4* แสดงออก การศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับ Zhang *et al*. (2015) ที่ถ่ายยีน *SsDREB* จาก *Suaeda salsa* ซึ่งเป็นพืชตระกูลเดียวกับชะครามเข้าสู่ยาสูบ มีผลทำให้ยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมทนทานต่อความเค็มได้ดีขึ้น และยังทำให้การแสดงออกของยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมแสดงออกได้มากขึ้นด้วย Wang *et al*. (2017) ได้ถ่ายยีน *CsDREB* ที่แยกได้จาก *Camellia sinensis* เข้าสู่ *Arabidopsis thaliana* มีผลให้พืชทนทานต่อความเครียดที่เกิดจากความเค็มและความแห้งแล้ง เช่นเดียวกับ Nguyen *et al*. (2019) ที่ถ่ายยีน *GmDREB6* เข้าสู่ถั่วเหลืองแล้วมีผลทำให้ถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสามารถสร้างและสะสม proline ได้มากขึ้น และถั่วเหลืองดังกล่าวทนทานต่อทั้งความเค็มและความแห้งแล้งได้มากขึ้นด้วย



รูปที่ 1 ยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน *ScDREB2* ของอ้อยที่ได้รับการถ่ายยีน *ScDREB2* จากอ้อยพันธุ์ป่า(WT8) และพันธุ์biotech2 (B2 and B3) และได้รับ NaCl 100 mM pH 8.5 นาน 1 (A), 3 (B), 5 (C), 10 (D), 15 (E) และ 20 (F) วัน

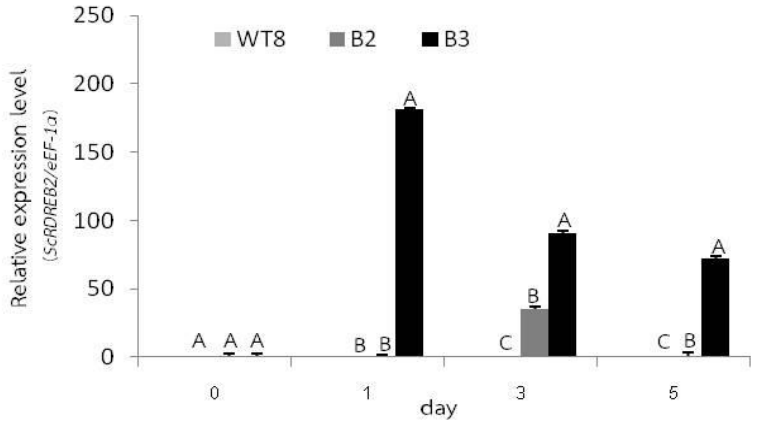


รูปที่ 2 ยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน *ScDREB2* ของอ้อยที่ได้รับการถ่ายยีน *ScDREB2* จากอ้อยพันธุ์ป่า(WT8) และพันธุ์biotech2 (B2 and B3) และได้รับ NaCl 200 mM pH 8.5 นาน 1 (A), 3 (B), 5 (C), และ 10 (D) วัน

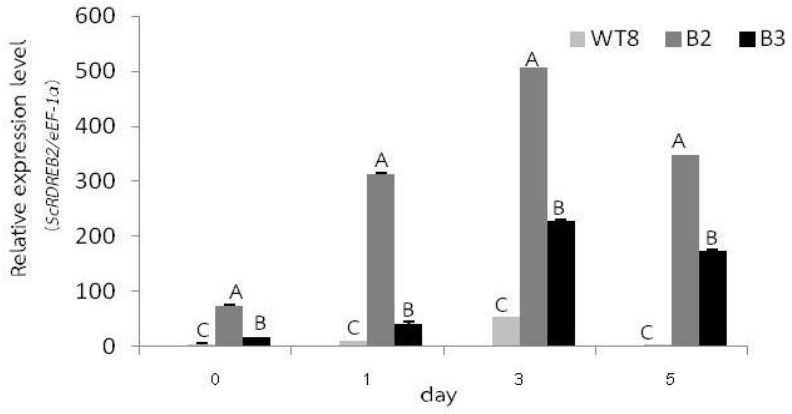
2. การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิกด้วยเทคนิค real-time PCR

การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในใบและรากของยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *ScDREB2* จากอ้อยพันธุ์ป่า อ้อยพันธุ์ลูกผสมระหว่างชนิดที่ได้รับสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิก โดยเทียบกับระดับการแสดงออกของยีน *NtEef-1a* พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในใบยาสูบที่ได้รับยีนดังกล่าวจากอ้อยลูกผสมระหว่างชนิด (B3) ที่เพาะเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่เติม NaCl 100 mM มีระดับการแสดงออกสูงสุดที่ 1 วัน ประมาณ 335 เท่าเมื่อเทียบกับการแสดงออกของยีนในสภาพปกติ (วันที่ 0) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการแสดงอออออกของยีน *ScDREB2* ในยาสูบ WT8 และ B3 การแสดงออกของยีนในต้น B3 ค่อยๆ ลดลงในวันที่ 3 และ 5 ในขณะที่ยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม B2 และ WT8 มีการแสดงออกยีน *DREB2* สูงสุดในวันที่ 3 และลดลงในวันที่ 5 และเมื่อเทียบการแสดออกของยีนในต้น B3 กับยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมต้นอื่นๆ ที่ได้รับสภาวะเครียดเป็นระยะเวลาเท่า ๆ กัน พบว่า การแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในต้น B3 สูงกว่าและแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 3A)

ที่ความเข้มข้นของ NaCl 200 mM พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในใบของต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 3 ต้น มีรูปแบบของการแสดงออกของยีนคล้ายกันคือ มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 และสูงสุดในวันที่ 3 แล้วลดลงในวันที่ 5 หลังจากได้รับสภาพเครียด แต่ระดับการแสดงออกของยีนในต้น B2 สูงกว่า WT8 และ B3 และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกวันที่มีการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ระดับการแสดงออกของยีนในต้น B2 ซึ่งสูงที่สุดในวันที่ 3 นั้นจะสูงกว่าการแสดงออกของยีนดังกล่าวในต้นเดียวกันในวันที่ 0 ประมาณ 7 เท่า (รูปที่ 3B)



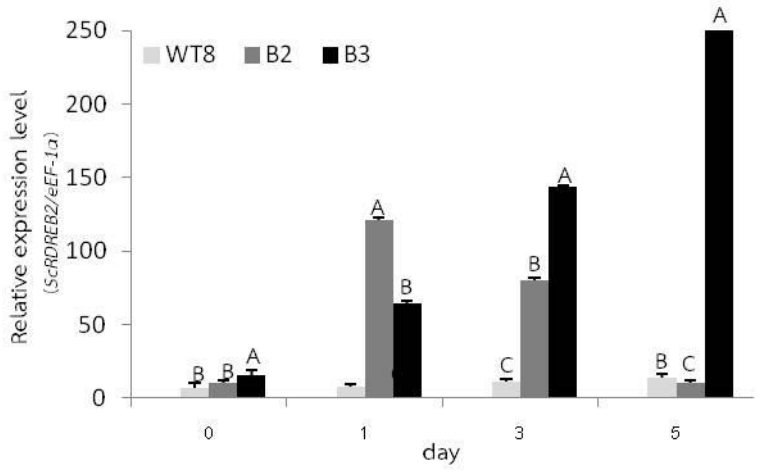
A



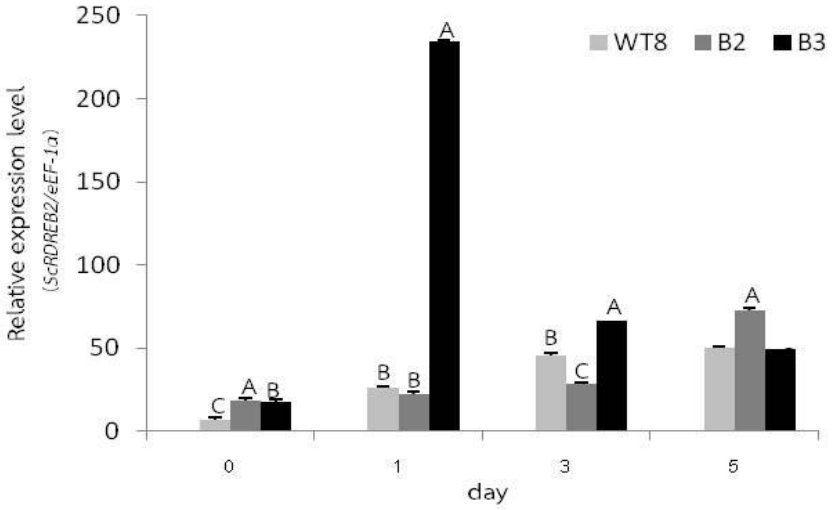
B

รูปที่ 3 การแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในใบที่ได้รับ NaCl ความเข้มข้น 100 mM (A) and 200 mM NaCl (B) pH 8.5 ในวันที่ 0 1 3 และ 5 วัน

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในรากของยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม พบว่ามีการแสดงออกเช่นกัน โดยที่ 100 mM NaCl พบว่า รูปแบบการแสดงออกของของยีนในต้น B2 และ B3 แตกต่างกัน คือ ต้น B2 มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 และสูงสุดในวันที่ 1 จากนั้นลดลงและต่ำสุดในวันที่ 5 หลังได้รับสภาวะเครียด ส่วน B3 นั้นระดับการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับ NaCl และสูงที่สุดในวันที่ 5 หลังได้รับสภาวะเครียด โดยสูงกว่าวันที่ 0 ประมาณ 10 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในรากของต้น B2 กับ B3 พบว่า เมื่อได้รับสภาวะเครียดจากสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิกระดับการแสดงออกของยีนในต้น B3 สูงกว่าต้น B2 และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ยกเว้นที่ 1 วันหลังได้รับสภาวะเครียด ที่รากของต้น B2 มีระดับการแสดงออกที่สูงกว่า B3 และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) ส่วนการแสดงออกของยีนในต้น WT8 พบว่ามีต่ำมากและค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาที่ทดลอง (รูปที่ 4A) ส่วนการแสดงออกของยีนในรากของต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับ NaCl 200 mM พบว่า การแสดงออกของยีนในรากของต้น B3 สูงสุดในวันที่ 1 หลังได้รับ NaCl โดยสูงกว่าวันที่ 0 ประมาณ 13 เท่า จากนั้นระดับการแสดงออกของยีนจึงลดลง ส่วนการแสดงออกของยีนในต้น B2 และ WT8 มีรูปแบบการแสดงออกที่คล้ายคลึงกัน คือ การแสดงออกจะเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับ NaCl ที่ยาวนานขึ้น แต่ระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นจะไม่มากนักและค่อนข้างคงที่ (รูปที่ 4B)



A



B

รูปที่ 4 การแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในรากที่ได้รับ NaCl ความเข้มข้น 100 mM (A) and 200 mM NaCl (B) pH 8.5 ในวันที่ 0 1 3 และ 5 วัน

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการทดลองจะเห็นว่าสภาวะเครียดที่เกิดจากสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิก สามารถกระตุ้นให้ยีน *ScDREB2* จากอ้อยลูกผสมระหว่างชนิดมีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นจากสภาพปกติ และมีการแสดงออกอยู่ในระดับสูง เช่นเดียวกับ Arenhart *et al.* (2013) ที่พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *ASR5* ซึ่งเป็น transcription factor ของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทนทานต่อพิษของ Al ในข้าวจะเพิ่มขึ้นในพันธุ์ที่ทนทานต่อ Al ในขณะที่พันธุ์ที่อ่อนแอระดับการแสดงออกจะไม่เปลี่ยนแปลง ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อพิจารณาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานของยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมดังกล่าวเมื่อได้รับสภาวะเครียดแล้วสามารถทนทานสภาวะดังกล่าวได้ดีกว่ากว่าต้นที่ไม่ได้ดัดแปลงพันธุกรรมและต้นที่ได้รับยีนนี้จากอ้อยพันธุ์ป่า เนื่องจากยีน *DREB2* เป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ transcription factor ที่มีผลต่อการกระตุ้นการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ที่พืชใช้ตอบสนองต่อสภาวะเครียดชนิดต่าง ๆ โดยการกระตุ้นในลักษณะนี้พบได้ในพืชเช่นต่าง ๆ เช่นกัน เช่น ในข้าว โดยในข้าวที่ได้รับสภาพเครียดจาก Al จะมีผลทำให้ยีน *ASR5* สังเคราะห์ transcription factor ชนิด ASR5 เข้าไปเกาะที่บริเวณโปรโมเตอร์และกระตุ้นการแสดงออกของยีนมากถึง 104 ยีน โดยเฉพาะยีน *STAR1* ซึ่งควบคุมการสร้างโปรตีน ABC transporter สำหรับลักษณะทนทานต่อพิษของ Al (Arenhart *et al.*, 2014) ในกรณีของอ้อยนั้นยีนที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อความเค็มมีหลายยีน เช่น salt overly sensitive 1 (*SOS1*) (Kaewjiw *et al*., 2018) ยีนสังเคราะห์ proline (pyrolline-5-carboxylate synthetase; *P5CS*), ion homeostasis หรือ Na^+/K^+ antiporter (*NHX1*) (ธนวรรณ และคณะ, 2562; Poonsawat *et al*., 2015) เป็นต้น จึงเป็นไปได้ว่ายีน *ScDREB2* จะควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในอ้อยเช่นกัน

อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ที่ได้จากอ้อยป่ามีการแสดงออกในระดับค่อนข้างต่ำ หรือแม้แต่ในยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม B2 และ B3 ที่มียีน *ScDREB2* ยีนเดียวกันจากอ้อยลูกผสมระหว่าง แต่มีระดับการแสดงออกของยีนต่างกัน ซึ่งอาจเกิดจากปรากฏการณ์ที่เรียกว่า position effects คือการที่ chromatin ของ host (ในที่นี้คือ genome ของยาสูบ) ที่อยู่ล้อมรอบยีนที่ถ่ายเข้าไป (ในที่นี้คือ *ScDREB2*) มีผลยับยั้งหรือส่งเสริมการแสดงออกของยีนที่ถ่ายเข้าไป (Markstein *et al*., 2008) เนื่องจากยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปจะไม่สามารถกำหนดตำแหน่งที่ยีนจะสอดแทรกเข้าสู่จีโนมของพืชในตำแหน่งที่แน่นอนได้ การแสดงออกของยีนเดียวกันในพืชดัดแปลงพันธุกรรมต่างต้นกันจึงอาจไม่เท่ากัน Raghavendrarao *et al*. (2017) พบว่ายีนที่ถ่ายเข้าไปในพืชจะแทรกในตำแหน่งต่างกันบนโครโมโซมเนื่องจากเป็นการแทรกแบบสุ่ม ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนได้ไม่เท่ากัน และ Abhyankar *et al*. (2005) รายงานว่าตำแหน่งของการแทรกตัวของยีนที่ถ่ายเข้าสู่พืชนั้นมีผลต่อลักษณะทางสัณฐานข และการแสดงออกของยีนเช่นกัน การศึกษาในครั้งนี้จึงยังไม่สามารถชี้ชัดลงไปได้ว่ายีน *ScDREB2* จากอ้อยป่าหรือจากอ้อยลูกผสมระหว่างชนิดมีประสิทธิภาพในการเพิ่มความทนทานต่อดินเค็ม

โซดิกได้มากกว่ากัน แม้ว่าจากข้อมูลลักษณะสัณฐานและระดับการแสดงออกของยีนจะชี้ไปในทางที่ยีนจากอ้อยลูกผสมระหว่างชนิดจะให้ผลดีกว่าก็ตาม

นอกจากนี้ยังพบว่ารูปแบบการแสดงออกของยีน *ScDREB2* มักจะเพิ่มขึ้นจนถึงระดับสูงสุดแล้วค่อย ๆ ลดลง ซึ่งสาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากว่ายีน *ScDREB2* สังเคราะห์โปรตีน DREB ที่มีผลกระตุ้นการทำงานของยีนต่าง ๆ ที่ยาสูบใช้ตอบสนองต่อความเค็ม และเมื่อยาสูบสามารถปรับสภาพตัวเองเพื่อต่อสู้กับสภาวะไม่เหมาะสมดังกล่าวได้ดีขึ้น ความต้องการโปรตีน DREB เพื่อใช้กระตุ้นการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องก็จะลดน้อยลง ทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ค่อย ๆ ลดลงในที่สุด เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนที่ใบกับที่รากที่ความเข้มข้นของ NaCl ระดับเดียวกัน พบว่า ที่ NaCl 100 mM ระดับการแสดงออกของยีนที่รากจะสูงกว่าที่ใบ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl เป็น 200 mM พบว่า ระดับการแสดงออกของยีนนี้ที่ใบกลับสูงกว่าที่ราก ซึ่งขัดแย้งกับ Ren *et al*. (2019) ที่พบว่าการแสดงออกของยีน *AmDREB* ในต้น *Ammopiptanthus mongolicus* ที่ขึ้นได้ในทะเลทรายมีระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวที่ใบสูงกว่าที่รากเมื่ออยู่ในสภาพธรรมชาติ (ระดับความเค็มต่ำ) แต่เมื่อเพิ่มระดับความเค็มให้สูงขึ้นการแสดงออกของยีนนี้ที่รากจะสูงกว่าที่ใบ การศึกษาในครั้งนี้ทำกับยีน *ScDREB2* จากอ้อยซึ่งเป็นพืชที่ไม่ทนเค็มจึงอาจมีรูปแบบการตอบสนองของยีนต่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมแตกต่างไปจากพืชทะเลทรายข้างต้น แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีน *DREB* มีผลต่อการแสดงออกของยีนอื่นที่เกี่ยวข้องอีกเป็นจำนวนมาก เมื่อยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมได้รับ NaCl เพิ่มขึ้นจาก 100 mM เป็น 200 mM พืชจำเป็นต้องมีกลไกที่ใช้เคลื่อนย้าย Na^+ ที่สะสมอยู่เป็นจำนวนมากที่รากไปสู่อวัยวะอื่นเช่นที่ใบ เพื่อลดความเป็นพิษของ Na^+ ในเซลล์ที่ราก ซึ่งการเคลื่อนย้าย Na^+ ต้องอาศัยการทำงานของยีนบางยีน เช่น *SOS1* (Yue *et al*.; 2012) ซึ่งการแสดงออกของยีนนี้ที่สูงขึ้นจะทำให้การเคลื่อนย้าย Na^+ มีประสิทธิภาพสูงขึ้นด้วย ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าต้องมีการกระตุ้นให้การแสดงออกของยีน *DREB* ที่ใบสูงขึ้นก่อน โปรตีน DREB จึงจะสามารถไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องให้สูงขึ้นได้

สรุปผลการทดลอง

สารละลายธาตุอาหาร 1/10 Hoagland ปรับค่า pH เป็น 8.5 และเติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 200 mM สามารถใช้แทนสภาพดินเค็มโซดิกได้ และในสภาพดังกล่าวสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมได้ รูปแบบการแสดงออกของยีนในยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับ NaCl 100 และ 200 mM จะคล้ายคลึงกัน คือมีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นในระยะแรก ๆ จากนั้นจึงค่อย ๆ ลดลง แต่ระดับการแสดงออกของยีนในยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมต่างสายต้นกันจะไม่เท่ากัน เนื่องจาก position effect จากผลการทดลองนี้ก็สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกสายพันธุ์อ้อยทนทานต่อดินเค็มโซดิกได้ โดยการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *ScDREB2* เมื่ออ้อยได้รับสภาวะไม่เหมาะสมดังกล่าว รวมทั้งนำไปใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจชนิดอื่นให้ทนต่อสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชชนิดต่างๆ ได้ แต่หากในอนาคตจะปรับปรุงพันธุ์อ้อยหรือพืชอื่น ๆ โดยวิธีการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม จำเป็นต้องมีการสร้างดัดแปลงพันธุกรรมให้ได้สายต้นจำนวนมาก จากนั้นจึงคัดเลือกเอาเฉพาะต้นที่มีระดับการแสดงออกของยีน และลักษณะสัณฐานตามที่ต้องการมากที่สุดอีกทีหนึ่ง

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป –

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติ
   อยู่ระหว่างการตีพิมพ์ เรื่อง ผลของระดับความเครียดในสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิกที่มีต่อรูปแบบและระดับการแสดงออกของยีน ScDREB2 ในยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม
2. การจดสิทธิบัตร -
3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนาเสนอไปผลิต/ ขาย/ ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนาไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป -
4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น) -

รายงานการเงิน

โครงการ สัญญาเลขที่ 1/2563 **โครงการวิจัยประเภท** งบประมาณเงินรายได้ จากเงินรายได้ส่วนงาน
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 มหาวิทยาลัยบูรพา
ชื่อโครงการ ระดับการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมในสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิก
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน อ.ชนากานต์ ลักษณะ
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 เมษายน 2563 **ถึงวันที่** 30 ก.ย. 2564
ระยะเวลาดำเนินการ 1 เมษายน 2563 **ถึงวันที่** 30 ก.ย. 63
รายรับ
จำนวนเงินที่ได้รับ
งวดที่ 1 (50%) 8,750 บาท **เมื่อ** วันที่ 17 มีนาคม 2563
งวดที่ 2 (40%) 7,000 บาท ยังไม่ได้รับ
งวดที่ 3 (10%) 1,750 บาท ยังไม่ได้รับ
รวม 17,500 บาท

รายจ่าย รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	-	-	-
2. ค่าจ้าง	-	-	-
3. ค่าวัสดุ	17500	17500	-
4. ค่าใช้สอย	-	-	-
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ ค่าธรรมเนียมอุดหนุนสถาบัน (10%)	-	-	-
รวม	17,500	17,500	-

(นางสาวชนากานต์ ลักษณะ)
ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. ม.ป.ป.พืชทนเค็มและพืชชอบเกลือ. แหล่งที่มา http://www.ldd.go.th/Lddwebsite/web_ord/Technical/pdf/P_Technical03001_3.pdf , 28มกราคม 2557.

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2558. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อยปีการผลิต 2557/58. แหล่งข้อมูล: http://www.ocsb.go.th/upload/journal/fileupload/923-9810.pdf

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 Morris J. T. 1991. Relative Importance of Ion Exclusion, Secretion and Accumulation in *Spartina alterniflora* Loisel. *Journal of Experimental Botany*, 42(12) : 1525–1532.

Cavalieri, 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.

FAO. n.d. Crop salt tolerance data. Available at http://www.fao.org/docrep/005/y4263e/y4263e0e.htm, January 28, 2014.

Laksana, C. and S. Chanprame. 2015. A simple and rapid method for RNA extraction from young and mature leaf of oil palm (*Elaeis guineensis* jacq.). *Journal of The International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*. 21(1): 96-106.

Lata, C and M. Prasad. 2011. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. J. Exp. Bot. 1-18.

Wang, G., X. Xua, H. Wanga, Q. Liua, X. Yanga, L. Liaoa, G. Caib. 2019. A tomato transcription factor, *SlDREB3* enhances the tolerance to chilling in transgenic tomato. Plant Physiol. Biochem. 142: 254–262.

Yamaguchi-Shinozaki, K and K. Shinozaki. 2009. DREB Regulons in Abiotic-Stress-Responsive Gene Expression in Plants. Molecular Breeding of Forage and Turf. 15-28.