การบ่งชี้ยีนที่ควบคุมการสร้าง betaine aldehyde dehydrogenase ที่อ้อยใช้ตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำ

Identification of Gene Controlling Betaine Aldehyde Dehydrogenase Synthesis for Water Deficit Response in Sugarcane

บุศริน อิ่มอินทร์[1] นงลักษณ์ เทียนเสรี[2] และ สนธิชัย จันทร์เปรม[2]

Budsarin Imin[1], Nongluk Teinseree[2] and Sontichai Chanprame[2]

บทคัดย่อ

สภาวะขาดน้ำในอ้อยเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้การเจริญเติบโตและผลผลิตลดลง งานวิจัยนี้มุ่งบ่งชี้และศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ betaine aldehyde dehydrogenase โดยชักนำให้อ้อยพันธุ์ Kps 94 -13 ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเกิดสภาวะขาดน้ำ โดยการเติม PEG เข้มข้น 2 ระดับ คือ 20 และ 30 % ลงในอาหารเพาะเลี้ยงต้นอ้อย ที่ระยะเวลาต่าง ๆ 7 ระดับ ได้แก่ 6 12 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง เมื่อทำปฏิกิริยา RT-PCR กับ total RNA ที่สกัดได้จากอ้อยที่ได้รับ PEG ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับยีนดังกล่าว เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 327 คู่เบส เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่คาดว่าจะเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ betaine aldehyde dehydrogenase โดยการเปรียบเทียบกับลำดับดีเอ็นเอในฐานข้อมูล พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนยีน *BADH* ในข้าวโพด 96 % ข้าวฟ่าง 93% หญ้า 90 % chinese leymus 86 % ข้าว 86 % ข้าวบาร์เลย์ 86 % และข้าวสาลี 85 % จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่คาดว่าจะเป็นยีน *BADH* โดยใช้เทคนิค real-time PCR นั้น พบว่า อ้อยที่ได้รับ PEG ที่ระดับความเข้มข้น 30 % ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีนมากที่สุด

ABSTRACT

Water deficit in sugarcane causes both growth and yield reduction. This research aims to identify and study the expression of gene controlling betaine aldehyde dehydrogenase biosynthesis. Sugarcane cultivar Kps 94-13 plantlets were cultivated under sterilized condition and subjected to water shortage by adding 20% or 30% PEG into culture medium for 6, 12, 24, 48, 72, 96 and 120 hr. It was found that DNA fragment of 327 bp was amplified from PEG treated sugarcane plantlets using RT-PCR with *BADH* specific primers. DNA sequence comparison indicated that high sequence similarity at 96, 93, 90, 86, 86, 86 and 85% to *BADH* gene from corn, sorghum, grass, chinese leymus, rice, barley and wheat, respectively. Real-time RT-PCR was performed and indicated that sugarcane treated with 30 % PEG for 12 hr showed the highest expression of *BADH* gene.

[1]สาขาการปรับปรุงพันธุ์พืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

[1]Program in Plant Breeding, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

[2]ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

[2]Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

Key Words: betaine aldehyde dehydrogenase, real time PCR, sugarcane

e-mail address: bpimin@hotmail.com

คำนำ

ปรากฏการณ์ทางธรรมชาติ และที่ชักนำโดยมนุษย์ อาทิ การเกิดน้ำท่วม และสภาวะแล้ง ทำให้พืชต้องใช้กลไกต่าง ๆ ในการปรับตัวเพื่อดำรงอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยที่ได้รับผลกระทบโดยตรง และก่อให้เกิดความเสียหายทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพของผลผลิต ซึ่งส่งผลต่อรายได้ของเกษตรกร และระบบเศรษฐกิจในภาพรวม ในทางสรีรวิทยาขณะที่เกิดสภาวะขาดน้ำพืชจะแสดงอาการเหี่ยว เมื่อแรงดันเต่งลดลงพืชจะพยายามหาทางรักษาสภาวะสมดุลเอาไว้ การทนแล้ง (drought tolerance) เป็นความสามารถของพืชที่จะมีชีวิตอยู่รอดได้เมื่อประสบกับสภาวะแล้ง กลไกอย่างหนึ่งที่เกิดขึ้นคือการสร้างสารประกอบไนโตรเจนและคาร์โบไฮเดรทที่ละลายน้ำได้เพิ่มมากขึ้น (Hanson and Hitz, 1982) ในเซลล์มีการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลเพื่อลดค่าความต่างศักย์ภายในเซลล์ ทำให้เกิดการออสโมซิสของน้ำกลับเข้ามาในเซลล์ เพื่อชะลอการลดลงของแรงดันเต่งทำให้เซลล์รักษาสภาพเอาไว้ได้ การตอบสนองความเครียดจากความแห้งแล้งนั้นพืชจะผลิตสารในกลุ่ม osmoprotectant เช่น glycine betaine ซึ่งเป็นสารประกอบแอมโมเนียม มีบทบาทในการปกป้องเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายเมื่อพืชได้รับความเครียด เช่น ความแล้ง ความเค็ม ความร้อน และความเย็น โดยในกระบวนการสังเคราะห์ glycine betaine มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือเอนไซม์ choline monooxygenase (*CMO*) และเอนไซม์ betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*) ในขั้นตอนสุดท้าย (Liu *et al*., 2010)

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อบ่งชี้และศึกษาการแสดงออกของยีน *BADH* ซึ่งอ้อยใช้สำหรับตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำ ข้อมูลที่ได้จะสามารถนำไปประยุกต์สำหรับคัดพันธุ์อ้อยทนแล้ง โดยจะเป็นการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลร่วมกับวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบมาตรฐาน เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการปรับปรุงพันธุ์ให้ดีขึ้น ทำให้สามารถคัดเลือกต้นที่ไม่มีลักษณะ (หรือไม่มียีน) ที่ต้องการออกไปได้ตั้งแต่ระยะที่เป็นต้นกล้าจึงเป็นการประหยัดแรงงาน เงินทุน และเวลาปฏิบัติงานลงอย่างมาก และยังสามารถลดความแปรปรวนของสภาพแวดล้อมที่อาจมีผลต่อลักษณะที่ต้องการคัดเลือกได้

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย

นำส่วนใบม้วนที่อยู่ด้านในสุดของอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำมะพร้าว 10 % เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส จากนั้นย้ายแคลลัสลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำต้นโดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 10 % เมื่อแคลลัสพัฒนาเป็นต้นแล้วจึงย้ายต้นอ้อยลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS เพื่อชักนำราก โดยเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์จนต้นอ้อยมีอายุ 2 เดือน

การให้สภาพขาดน้ำกับต้นอ้อยในสภาพปลอดเชื้อและการทำ first strand cDNA

ย้ายต้นอ้อยที่มีอายุ 2 เดือน เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เติม polyethylene glycol 6,000 (PEG) ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 20% และ 30 % เป็นเวลา 6 12 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง (Figure 1) เมื่อครบเวลาตามกำหนดจึงตัดใบและรากอ้อยมาสกัด total RNA แล้วนำมาสังเคราะห์เป็น frist strand cDNA โดยใช้ชุด First Strand cDNA Synthesis Kit ของบริษัท Fermentas โดยนำ total RNA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม ผสมกับ Oligo

$(dT)_{22}$ primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ DEPC-treated water ให้ได้ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วเติมสารละลายต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ 5 x reaction buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร RiboLock RNase Inhibitor ปริมาตร 1 ไมโครลิตร dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ Revert Aid M-MuLVRT ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่งโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปแช่ในน้ำแข็ง และเติม RNaseH ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร แล้ววัดความเข้มข้นของ first strand cDNA ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer

การออกแบบไพรเมอร์ และการทำ PCR จาก first strand cDNA

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับส่วนของยีน betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนอนุรักษ์ของยีน *BADH* จาก Accesssion number AB161705, AB183716, AY050316, EU770322, NM001112311, XM003574447 และ U12195 ที่ปรากฏในฐานข้อมูล Genbank ออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม OligoAnalyzer 3.1 (http://eu.idtdna.com) ไพรเมอร์ของยีน *BADH* ที่ออกแบบได้มีดังนี้ forward primer (5'-TTGAACTATCCTCTCYTGAT-3') และ reverse primer (5'- AGAGTCCATCACAGCTTT-3') ทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ frist strand cDNA เป็นแม่แบบและตั้งโปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา PCR ดังนี้ denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผล PCR โดยการทำ electrophoresis ใน agarose gel ความเข้มข้น 1.5 % จากนั้นส่ง PCR product ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีไทด์โดยบริษัท 1st BASE (ประเทศมาเลเซีย) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *BADH* โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BLASTN ในฐานข้อมูล NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)

ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR

ศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *BADH* ด้วย เทคนิค real-time PCR โดยออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้โดยใช้โปรแกรม GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design (http://www.genscript.com) ไพรเมอร์ของยีน *BADH* ที่ออกแบบได้มีดังนี้ forward primer (5'-TTGAACATTGTGACAGGATTAGG-3') และ reverse primer (5'-AGTTCCAGCGTAACAGGCTT-3') วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยเครื่อง Mastercycler® ep realplex บริษัท Eppendorf (Thailand) ชุด EXPRESS qPCR Supermix Universal kit บริษัท Invitrogen โดยการเติม Supermix Universal ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วเติม forward primer และ reverse primer ความเข้มข้นชนิดละ 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรชนิดละ 0.8 ไมโครลิตร เติม first strand cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเติม DEPC-treated water ปริมาตร 7.4 ไมโครลิตร 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 45 รอบ

ผลการทดลองและวิจารณ์

การออกแบบไพรเมอร์และการเพิ่มจำนวนยีน *BADH*

เพิ่มปริมาณของยีน BADH ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ของยีน *BADH* จากฐานข้อมูลของ NCBI จากนั้นตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1.5 % โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *Actin* ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลาเป็น internal control เพื่อดูการแสดงออกของยีน *BADH* ในอ้อย ในสภาพจำลองการขาดน้ำโดยการเติม PEG ที่ความเข้มข้น 20 % และ 30 % และระยะเวลาที่ได้รับสาร 6 12 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่า มีการแสดงออกของยีนที่คาดว่าจะเป็นยีน *BADH* ในใบอ้อยที่ไม่เติม PEG และที่เติม PEG ความเข้มข้น 20 % ที่ 6 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง และที่เติม PEG ความเข้มข้น 30 % ที่ 6 12 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง PEG ที่ระดับความเข้มข้น 20 % และ 30 % พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 30 % มีแนวโน้มกระตุ้นให้การแสดงออกของยีนสูงที่ 48 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบจากความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น นอกจากนี้พบว่ายีนนี้มีการแสดงออกในรากอ้อยที่ไม่เติม PEG และที่เติม PEG ความเข้มข้น 20 % ที่ 6 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง และที่เติม PEG ความเข้มข้น 30 % ที่ 6 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง (Figure 2) และเช่นเดียวกับการแสดงออกของยีนดังกล่าวในใบ PEG ที่ระดับความเข้มข้น 30 % สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนได้สูงกว่า PEG ที่ระดับ 20% ที่ 96 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบจากความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Ishitani *et al.* (1995) ที่รายงานว่าระดับการแสดงออกยีน *BADH* ในข้าวบาร์เลย์สูงขึ้นในสภาวะแล้งเช่นเดียวกับ Honson and Tully (1979) และ Wood *et al.* (1996) ที่ได้รายงานว่า ข้าวฟ่างในสภาวะขาดน้ำหรือได้รับสภาพเครียดส่งผลในการเพิ่มการแสดงออกของยีน *BADH*

Figure 1 Sugarcane plantlet cv. Kps 94-13 cultured in liquid medium control plantlet (A), plantlet in 20 %PEG (B), plantlet in 30 % PEG (C)

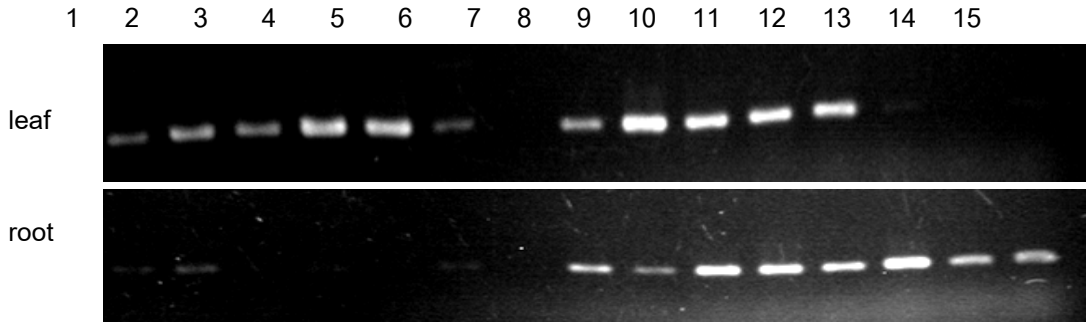

Figure 2 cDNA derived from total RNA of leaf and root of sugarcane cv. Kps 94-13 *via* RT-PCR reaction using specific primer of betaine aldehyde dehydrogenase gene (*BADH*)

1 = control

2, 3 = 6 hour PEG 20 % and PEG 30 %

4, 5 = 12 hour PEG 20 % and PEG 30 %

6, 7 = 24 hour PEG 20 % and PEG 30 %

8, 9 = 48 hour PEG 20 % and PEG 30 %

10, 11 = 72 hour PEG 20 % and PEG 30 %

12, 13 = 96 hour PEG 20 % and PEG 30 %

14, 15 = 120 hour PEG 20 % and PEG 30 %

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ พบว่า มีขนาด 327 คู่เบส และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับ ยีน *BADH* ในข้าวโพด 96% (Accession no. NM_001112311.1) ข้าวฟ่าง 93% (Accession no. U12195.1) หญ้า *Zoysia tenuifolia* 86% (Accession no. AB161709.1) Chinensis Leymus 86 % (*Leymus chinensis* Accession no. DQ497618.1) ข้าว 86% *(Oryza sativa japonica* Accession no. AB096083.1) ข้าวบาร์เลย์ 86 % (*Hordeum vulgare* subsp. Accession no. DQ288724.1) และข้าวสาลี 85 % (*Triticum aestivum* Accession no. AY050316.1) (Figure 3)

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
NM_001112311.1	Zea mays betaine aldehyde dehydrogenase (LOC606443),	513	513	98%	3e-142	96%	U G
U12195.1	Sorghum bicolor clone BADH1 betaine aldehyde dehydroge	461	461	98%	2e-126	93%	U M
AB161709.1	Zoysia tenuifolia mRNA for betaine aldehyde dehydrogena	435	435	98%	7e-119	90%	
DQ497618.1	Leymus chinensis betaine aldehyde dehydrogenase (BADH	374	374	98%	2e-100	86%	
AB096083.1	Oryza sativa Japonica Group BADH2 mRNA for betaine ald	372	372	98%	7e-100	86%	U G
DQ288724.1	Hordeum vulgare subsp. vulgare betaine aldehyde dehydro	370	370	98%	3e-99	86%	U
AY050316.1	Triticum aestivum betaine-aldehyde dehydrogenase (BADH	356	356	98%	6e-95	85%	U G

Figure 3 Sequences producing significant alignments of betaine aldehyde dehydrogenase of sugarcane cv. Kps 94-13

การวิเคราะห์ Real-time RT-PCR

ในการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้ real-time RT-PCR ได้ออกแบบไพรเมอร์ใหม่ ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน *BADH* ในอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 โดยใช้โปรแกรม GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design ก่อนการทำ real-time PCR ได้ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่นี้ด้วยปฏิกิริยา PCR พบว่าในใบอ้อยมีการแสดงออกยีน *BADH* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG ความเข้มข้น 20% และ 30 % ที่ 6 12 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง และต้นปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่ออ้อย

ได้รับสภาวะเครียด โดยเติม PEG จะเริ่มมีการแสดงออกของยีนที่ 6 ชั่วโมง ในขณะที่รากอ้อยมีการแสดงออกของยีน *BADH* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG ความเข้มข้น 20 และ 30 % ที่ 6 12 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง และต้นปกติ (Figure 4) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่ออ้อยได้รับสภาวะเครียด โดยเติม PEG เริ่มมีการแสดงออกของยีนที่ 6 ชั่วโมง ความแตกต่างของการแสดงออกของยีน *BADH* ในใบและรากขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่รับสารและระดับความเข้มข้นของ PEG เมื่อเพิ่มระยะเวลาการได้รับ PEG ซึ่งให้อ้อยขาดน้ำ และพืชจะตอบสนองต่อความเครียดนี้โดยการสังเคราะห์เอนไซม์ betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ glycine betaine ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม osmoprotectant เพื่อลดค่าความต่างศักย์ภายในเซลล์ปกป้องเซลล์ไม่ให้ถูกทำลาย (Fitzgerald *et al*., 2008; Liu *et al*., 2010)

เมื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *BADH* ด้วยวิธี real-time PCR โดยใช้ผลการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณของยีนที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (SYBR Green) พบว่ายีน *BADH* จากใบอ้อยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG ความเข้มข้น 20 % ที่ 6 ชั่วโมงมีการแสดงออกของยีนสูงที่สุด และลดลงที่ 12 24 ชั่วโมง จากนั้นมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอีกที่ 48 72 และ 96 ชั่วโมง และลดลงต่ำที่สุดที่ 120 ชั่วโมง ในขณะที่อ้อย ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 % ยีน *BADH* มีการแสดงออกมากที่ 6 ชั่วโมง และสูงที่สุดที่ 12 ชั่วโมง จากนั้นการแสดงออกของยีนค่อย ๆ ลดลงที่ระยะเวลาที่ 24 48 72 96 และต่ำที่สุดที่ 120 ชั่วโมง (Figure 5) Ishitani *et al*. (1995) พบการแสดงออกของยีน *BADH* ในข้าวบาร์เลย์ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 % นาน 48 ชั่วโมง ซึ่งการแสดงออกของยีน *BADH* ที่เพิ่มขึ้นอันเนื่องมาจากความเครียดจากการขาดน้ำ เป็นกลไกหนึ่งที่พืชใช้เพื่อรักษาสมดุลออสโมซิสอันเป็นการปรับตัวให้ทนต่อความเครียด (Oishi and Ebina, 2005) และมีรายงานการพบการแสดงออกของยีน *BADH* ที่เพิ่มขึ้นในผักโขม (Pan *et al.,* 1981) และยูคาลิปตัส (Sithtisarn *et al*.,2011) เมื่อได้รับสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์

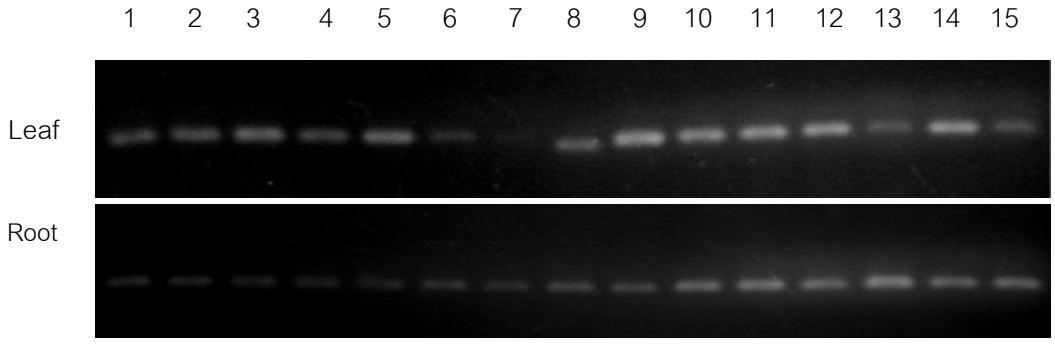

Figure 4 cDNA derived from total RNA of leaf and root of sugarcane cv. Kps 94-13 *via* RT-PCR reaction using specific primer for real-time PCR of betaine aldehyde dehydrogenase gene (*BADH*)

1	= control	8, 9	= 48 hour PEG 20 % and PEG 30 %
2, 3	= 6 hour PEG 20 % and PEG 30 %	10, 11	= 72 hour PEG 20 % and PEG 30 %
4, 5	= 12 hour PEG 20 % and PEG 30 %	12, 13	= 96 hour PEG 20 % and PEG 30 %
6, 7	= 24 hour PEG 20 % and PEG 30 %	14, 15	= 120 hour PEG 20 % and PEG 30 %

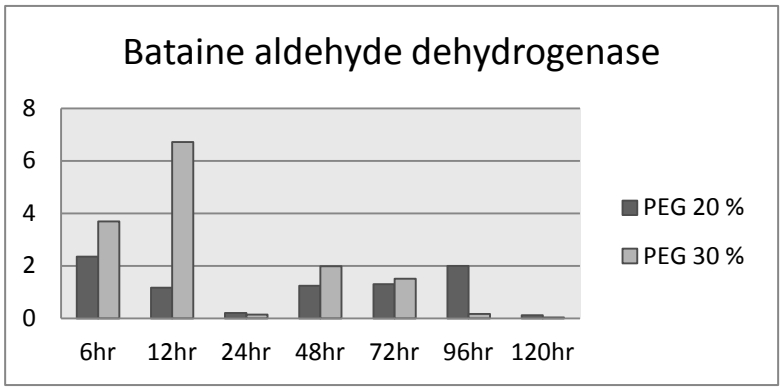

Figure 5 Relative gene expression level of betaine aldehyde dehydrogenase in leave tissue of sugarcane cv. Kps 94-13 treated with 20% and 30% PEG

สรุป

การศึกษาการแสดงออกของยีน *BADH* ในอ้อยพันธุ์ Kps 94-13 ภายใต้สภาวะขาดน้ำโดยการเติมสาร PEG 6,000 ลงในอาหารเพาะเลี้ยง พบว่าระดับการตอบสนองของอ้อยโดยการแสดงออกของยีน *BADH* ในใบและราก แตกต่างกันขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ได้รับและระดับความเข้มข้นของ PEG ผลการศึกษาด้วยวิธี real-time PCR ในใบอ้อย พบว่าการเติม PEG ความเข้มข้น 30 % ที่ 12 ชั่วโมง จะมีการแสดงออกสูงสุด ผลการทดลองนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน รวมทั้งกลไกความทนทานต่อสภาวะความเครียดจากการขาดน้ำโดยผ่านการแสดงออกของยีน betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH)* ในอ้อย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนด้านเครื่องมือวิจัยจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

เอกสารอ้างอิง

Fitzgerald, T. L., D. L. E. Waters and R. J. Henry. 2008. Betaine aldehyde dehydrogenase in plants. **Plant Biology** 11: 119-130.

Hanson, A. D and W. D. Hitz. 1982. Metabolic response of mesophytes to plant after deficits. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 33: 163 - 203.

Hanson, A. D. and R. E. Tully. 1979. Amino acids translocated from turgid and water-stressed barley leaves. **Plant Physiol.** 64: 467-471.

Ishitani, M, T. Nakamura, S. Y. Har and T. Takabe. 1995. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. **Plant Molec. Biol.** 27: 307-315.

Liu, J., H. Zenga, X. Li, L. Xu, Y. Wang. W. Tang and L. Han. 2010. Isolation and characterization of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in *Ophiopogon japonicas.* **Open Biotech J.** 4:18-25.

Oishi, H. and M. Ebina. 2005. Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia*. **Plant Physiol.** 162: 1077-1086

Pan, S. M., R. A. Moreau, C. Yu and A. H. C. Huang. 1981. Betaine accumulation and betaine aldehyde dehydrogenase in spinach leaves. **Plant Physiol.** 67: 1105-1108.

Sithtisarn, S., P. Harinasut, S. Pronbunlualap and S. Chaum. 2011. Accumulation of glycinebetaine and betaine aldehyde dehydroenase activity in *Eucalyptus camaldulensis* clone under *in vitro* salt stress. **Kasetsart J.** 43: 146 – 152.

Wood, A.J., H. Saneoka, D. Rhodes, R. J. Joly and P. B. Goldsbrough. 1996. Betaine aldehyde dehydrogenase in Sorghum. **Plant Physiol.** 110: 1301-1308.