

# การแสดงออกของยีน *TPS1* และ *TPS2* และค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบในอ้อยสองพันธุ์ภายใต้สภาพขาดน้ำ

## *TPS1* and *TPS2* gene expression and leaf water potential in two sugarcane varieties under water stress

ศรุตะ มานิต<sup>1,2</sup> และ นงลักษณ์ เทียนเสรี<sup>3\*</sup>

Saruta Manitkul<sup>1,2</sup> and Nongluk Teinseree<sup>3\*</sup>

**บทคัดย่อ:** สภาพขาดน้ำจัดเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลผลิตในพืชลดลง กลไกหนึ่งที่พืชใช้เพื่อปรับตัวต่อสภาพขาดน้ำคือการสะสมสาร osmoprotectant เพื่อรักษาสมดุลของน้ำภายในเซลล์ ยีน trehalose-6-phosphate synthase (*TPS*) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลส ซึ่งเป็นหนึ่งในสารที่ช่วยให้พืชทนต่อสภาพเครียดจากสิ่งแวดล้อมได้ เพื่อศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาและการแสดงออกของยีน *TPS1* และ *TPS2* ในอ้อยภายใต้สภาพขาดน้ำ ได้จำลองสภาพเครียดจากการขาดน้ำให้กับอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 และพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 16% polyethylene glycol (PEG) 6000 เป็นระยะเวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่าอ้อยทั้งสองพันธุ์มีค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบและค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำลดต่ำลง โดยในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 สามารถรักษาค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบได้ดีกว่าพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 เมื่อได้รับสภาพขาดน้ำยาวนานขึ้น ศึกษาการแสดงออกของยีน *TPS1* และ *TPS2* ในใบอ้อยโดยใช้เทคนิค qRT-PCR หลังได้รับสภาพขาดน้ำเป็นเวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่ายีนทั้งสองนี้มีการแสดงออกในใบอ้อยทั้งในสภาพควบคุมและสภาพขาดน้ำ รูปแบบการแสดงออกของยีนในอ้อยทั้ง 2 พันธุ์แตกต่างกัน ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ยีน *TPS1* และ *TPS2* มีระดับการแสดงออกสูงขึ้นเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำยาวนานขึ้น โดยมีการแสดงออกสูงกว่าในสภาพควบคุม และสูงกว่าในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6

**คำสำคัญ:** อ้อย, น้ำตาลทรีฮาโลส, กลุ่มยีน *TPS*, แล้ง

Received December 12, 2018

Accepted June 12, 2019

<sup>1</sup> ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University Kamphaeng Saen C campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

<sup>2</sup> ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

<sup>3</sup> ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

\* Corresponding author: agrnlt@ku.ac.th

**ABSTRACT:** Water deficit is considered one of the most important limiting factor for growth rates and crop productivity. The accumulation of osmoprotectants enables the plants to grow under water stress conditions by maintaining cell water balance. Trehalose-6-phosphate synthase (*TPS*) genes play crucial roles in trehalose metabolism and involved in abiotic stress tolerance mechanism in plants. To study the physiological response and expression of *TPS1* and *TPS2* in two sugarcane varieties, the experiments were conducted with KPS 94-13 and KPS 01-11-6 which cultured in vitro and subjected to water deficit stress by addition of 16 % polyethylene glycol (PEG) 6000 in the MS medium for 24, 48, 72, 96 and 120 hrs. Water stress caused the reduction in the total leaf water potential and osmotic potential in both sugarcane varieties. The KPS 94-13 showed significantly less declines in the total leaf water potential than KPS 01-11-6 correlated with the increase in the duration of stress. Expression of *TPS1* and *TPS2* genes were compared in two sugarcane varieties after treated with 16 % PEG 6000 for 24, 48, 72, 96 and 120 hr., using qRT-PCR. The result showed that *TPS1* and *TPS2* genes expressed in both stress and non-stress conditions. The variability in gene expression profiles in different varieties of sugarcane were detected. The extent of expression of *TPS1* and *TPS2* genes in KPS 94-13 were observed initially and gradually increased under long-term exposure to stress. In KPS 94-13, the *TPS1* and *TPS2* expression were up-regulated and showed higher levels than control and KPS 01-11-6.

**Keywords:** *Saccharum* spp., trehalose, trehalose-6-phosphate synthase, drought

## บทนำ

ข้าว (Saccharum spp.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทยและของโลก เนื่องจากเป็นวัตถุดิบสำคัญในอุตสาหกรรมน้ำตาล พื้นที่เพาะปลูกข้าวในประเทศไทยกระจายอยู่ในภาคต่างๆ และมากกว่า 80% อยู่นอกเขตพื้นที่ชลประทาน การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ และความแปรปรวนของปริมาณฝนก่อให้เกิดสภาวะฝนทิ้งช่วงและปัญหาภัยแล้งรุนแรงและยาวนานมากขึ้นทุกปี (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและน้ำตาดทราย, 2560) การขาดน้ำส่งผลกระทบต่อข้าวตั้งแต่การออกจนถึงการให้ผลผลิต และส่งผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้การเจริญเติบโต การสร้างและสะสมน้ำตาลลดลงส่งผลให้ผลผลิตต่อไร่ลดลงด้วย โดยเฉพาะในระยะแตกกอและระยะย่างปล้องซึ่งเป็นระยะที่ไวต่อการขาดน้ำมากที่สุด (Ramesh, 2000; Endres et al, 2010) หนึ่งในกลไกสำคัญที่มันงานวิจัยรองรับ คือการสร้างและสะสมสาร osmoprotectant ภายในเซลล์พืช เพื่อใช้ในการควบคุมแรงดันออสโมติกของน้ำภายในเซลล์และป้องกันไม่ให้เซลล์สูญเสียน้ำมากเกินไปจนส่งผลกระทบต่อกระบวนการ metabolism ต่างๆของเซลล์ ซึ่งจะถูกรักษาด้วยกลูโคสในกระบวนการสร้างสาร

osmoprotectant แต่ละชนิด กลุ่มยีน trehalose-6-phosphate synthase (*TPS*) เป็นกลุ่มยีนที่ทำงานในกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสในพืช โดยเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ trehalose-6-phosphate synthase (*TPS*) โดยเอนไซม์ *TPS* จะทำการสลายน้ำตาลตั้งต้นคือ UDP-glucose และ glucose-6-phosphate ให้กลายเป็น trehalose-6-phosphate (*T6P*) จากนั้นเอนไซม์ trehalose-6-phosphate phosphatase (*TPP*) จะเปลี่ยน *T6P* ไปเป็นน้ำตาลทรีฮาโลส (Godijn and Dun, 1999) ในแบคทีเรียและยีสต์ พบว่าน้ำตาลทรีฮาโลสทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและถูกสังเคราะห์ออกมาเมื่อได้รับสภาพเครียดต่างๆ เช่น เค็ม หรือ อุณหภูมิสูง แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลชนิดนี้ทำหน้าที่เป็น osmoprotectant ขณะที่ในพืชพบว่าในสภาพปกติจะมีน้ำตาลทรีฮาโลสสะสมอยู่น้อยและจะมีการสะสมเพิ่มมากขึ้นเมื่อพืชได้รับสภาพเครียด และยังพบว่าในพืชที่มีการสะสมน้ำตาลทรีฮาโลสเพิ่มมากขึ้นสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ได้ เช่น สภาพขาดน้ำ เค็ม อุณหภูมิสูงหรือต่ำ ซึ่งเห็นว่าน้ำตาลทรีฮาโลสทำหน้าที่เป็นสาร osmoprotectant ในพืชได้เช่นกัน (Hounsa et al, 1998; Godijn and Dun, 1999; Garg et al, 2002)

จากการวิเคราะห์จีโนมของพืชหลายชนิด

พบว่ายีน *TPS* ในพืชแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ class I *TPS* และ class II *TPS* จำนวนของยีนในแต่ละกลุ่มแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด เช่น class I *TPS* ใน *Arabidopsis* พบ 4 ยีน ในข้าวพบ 1 ยีน และในข้าวสาลีพบ 3 ยีน ขณะที่ใน class II *TPS* ใน *Arabidopsis* พบ 7 ยีน พบในข้าว 10 ยีน และพบในข้าวสาลี 9 ยีน (Leyman et al., 2001; Lunn, 2007; Zang et al, 2010; Yang et al. 2012; Xie et al, 2015) การแสดงออกของกลุ่มยีน *TPS* ในรากของข้าวสาลีพันธุ์พื้นหนาว พบยีน *TaTPS1*, *TaTPS2*, *TaTPS3*, *TaTPS4*, *TaTPS10*, *TaTPS11* และ *TaTPS12* มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น เมื่อได้รับสภาพเย็นจัด 24 ชั่วโมง แต่กลับมีระดับการแสดงออกลดลงในพันธุ์ไม่ทน (Xie et al., 2015) ขณะที่ในอ้อยมีรายงานเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *TPS* แล้ว 2 ยีนคือ *TPS1* และ *TPS2* โดยยีน *TPS1* จัดอยู่ใน class I *TPS* และยีน *TPS2* จัดอยู่ในกลุ่ม class II *TPS* (Junior et al., 2013) และในการศึกษาการตอบสนองในอ้อยหกพันธุ์ที่ทนแล้งได้ต่างกัน เมื่อได้รับสภาพขาดน้ำ พบว่าอ้อยพันธุ์ทนแล้งสามารถรักษาปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (RWC) ในเซลล์ ประสิทธิภาพของการใช้แสง (Fv/Fm) และค่าความเขียวใบไว้ได้สูงกว่า ขณะที่ในอ้อยพันธุ์อ่อนแอเกิดลักษณะใบเหี่ยว ใบม้วน และแห้งเป็นสีน้ำตาลเร็วกว่า และพบการรวบไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ มากกว่าอ้อยพันธุ์ทนแล้ง และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนจากชิ้นส่วนใบ พบว่าอ้อยพันธุ์ทนแล้งมีระดับการแสดงออกของยีน *TPS*, *LEA*, *DREB*, *SNAC*, *dehydrin* และ *SPS* สูงกว่าในอ้อยพันธุ์ไม่ทนแล้ง (Devi et al., 2019) จะเห็นว่าพืชต่างพันธุ์กันมีรูปแบบและระดับการแสดงออกของยีนลักษณะพื้นฐานและการตอบสนองทางสรีรวิทยาแตกต่างกันตามระดับและรูปแบบของสภาพเครียดที่ได้รับการศึกษาการตอบสนองในระดับโมเลกุลและการเปลี่ยนแปลงในระดับสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา จะช่วยให้เข้าใจกลไกการปรับตัวและตอบสนองของอ้อยต่อสภาพขาดน้ำได้ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *TPS1* และ *TPS2* และการตอบสนองทางสรีรวิทยาในอ้อยสองพันธุ์ที่ทนแล้งได้ต่างกันภายใต้สภาพขาดน้ำ ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาเครื่องมือช่วยในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนต่อสภาพแล้งต่อไป

## วิธีการศึกษา

### การสร้างสภาพขาดน้ำแก้อ้อย

นำต้นอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ซึ่งมีลักษณะทนแล้ง และพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 ซึ่งเป็นพันธุ์ไม่ทนแล้ง (ศูนย์วิจัยและพัฒนาอ้อยและน้ำตาล ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน) ที่มีใบและรากสมบูรณ์ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และจำลองสภาวะขาดน้ำโดยการเติม Polyethylene Glycol (PEG) 6000 ที่ระดับความเข้มข้นความเข้มข้น 16% (W/V) ทำให้ค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในอาหารเหลวสูตร MS ( $\Psi_{\pi, \text{solution}}$ ) มีค่าประมาณ -1000 kPa โดยให้ต้นอ้อยอยู่ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG 6000 16% เป็นระยะเวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD จำนวน 4 ซ้ำ ทรีทเมนต์ประกอบด้วยการรวมกันของ 2 ปัจจัยคือ สภาพการขาดน้ำ 2 สภาวะ และพันธุ์อ้อย 2 พันธุ์ บันทึกลักษณะทางสรีรวิทยา ได้แก่ ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ (total leaf water potential;  $\Psi_l$ ) ด้วยเครื่องวัดความดัน (pressure chamber) โดยวัดผลจากใบตัดแห้งที่ 3 นาทีจากยอดในแต่ละช่วงเวลาที่ได้รับสภาพขาดน้ำ จากนั้นนำใบที่ใช้วัดค่า  $\Psi_l$  ไปวัดค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบ (osmotic potential;  $\Psi_{\pi}$ ) โดยใช้เครื่องออสโมมิเตอร์ (osmometer รุ่น Vapro 5520) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่บันทึกได้ตามแผนการทดลองแบบ factorial in CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p \leq 0.05$ )

### การสกัดอาร์เอ็นเอรวม และการสังเคราะห์ first strand cDNA

สกัดตัวอย่างอาร์เอ็นเอรวมจากใบอ่อนของอ้อยที่ได้รับสภาพขาดน้ำในแต่ละระยะเวลา และใบอ้อยที่อยู่ในสภาพควบคุม โดยใช้ชุดสำเร็จรูป GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, US) นำอาร์เอ็นเอรวมที่ได้มาสังเคราะห์ first strand cDNA ด้วยเทคนิค reverse transcription-PCR ด้วยชุด Revert Aid First

Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, US) โดยกำหนดรอบในการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

### การแสดงออกของยีน *TPS1* และ *TPS2* ในอ้อยภายใต้สภาวะขาดน้ำ

ออกแบบคู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ

ยีน *TPS* ในอ้อย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล NCBI ในการออกแบบคู่ไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) ได้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *TPS1* และยีน *TPS2* (Table 1) นำ first strand cDNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวนเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *TPS1* และ *TPS2* ในอ้อยทั้งสองสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบกับยีนอ้างอิง Actin ด้วยเทคนิค quantitative real-time polymerase

Table 1 Primers sequences used for Real-time PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer	Note
<i>TPS1</i>	AGGTCACCATCGAATGGCAG	CCGACGAACTCAGCAGGTAA	For real-time PCR
<i>TPS2</i>	AGCAGCTGAGGCATGGAAAA	CGCCACCACCCCTAAATCCAA	For real-time PCR
<i>Actin</i>	CGTTGTCCGAATGGCCAGACC	CGTAGGTCTGAATATTCCGGTCC	Reference gene

chain reaction (qRT-PCR) ใช้ตัวอย่างจากอ้อยแต่ละพันธุ์ที่ได้รับสภาพขาดน้ำ ระยะเวลาละ 3 ต้น (3 biological replicates) โดยให้ชุด SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (BIOLINE, Canada) และคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน ด้วยเครื่อง Mastercycler® ep realplex (Eppendorf, Thailand) ทำซ้ำ 3 รอบ (3 technical replicates) กำหนดรอบสำหรับปฏิกิริยา 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 วิเคราะห์ระดับการแสดงออกจากค่า relative expression โดยใช้สูตรการคำนวณแบบ  $2^{-\Delta\Delta CT}$  โดย  $\Delta\Delta CT = (C_T \text{ target gene} - C_T \text{ reference gene})^{\text{treatment}} - (C_T \text{ target gene} - C_T \text{ reference gene})^{\text{control}}$  ตามวิธีการของ Livak and Schmittgen (2001)

### ผลการศึกษาและวิจารณ์

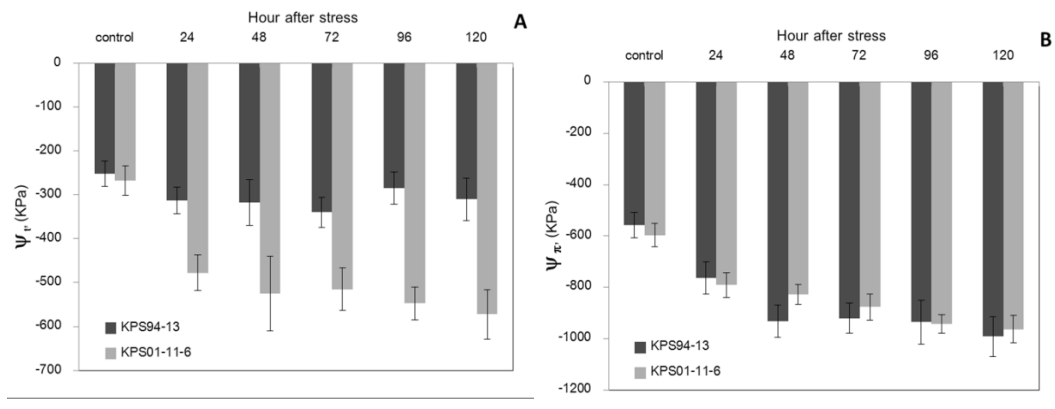
#### การเปลี่ยนแปลงค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบอ้อยภายใต้สภาวะขาดน้ำ

สภาพเครียดจากการขาดน้ำมีผลให้ค่า  $\Psi_t$  และค่า  $\Psi_\pi$  ในใบอ้อยทั้งสองพันธุ์เปลี่ยนแปลง โดยทั้งค่า  $\Psi_t$  และค่า  $\Psi_\pi$  มีค่าต่ำกว่าในสภาพควบคุม และมีค่าต่ำลงอย่างต่อเนื่องเมื่อได้รับสภาพขาด

น้ำยาวนานขึ้น โดยอ้อยอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 มีค่า  $\Psi_t$  ลดลงเร็วกว่าและต่ำกว่าพันธุ์กำแพงแสน 94-13 อย่างชัดเจนในทุกระยะเวลาที่ขาดน้ำ ขณะที่ไม่พบความแตกต่างของค่า  $\Psi_\pi$  ในระหว่างอ้อยทั้งสองพันธุ์ (Table 2) ความแตกต่างของค่า  $\Psi_t$  ลดลงแตกต่างกันอย่างมากระหว่างพันธุ์อ้อย โดยในสภาพที่ไม่ขาดน้ำ (0 ชั่วโมง) ค่า  $\Psi_t$  ในใบอ้อยทั้งสองพันธุ์ไม่แตกต่างกัน เมื่อได้รับสภาพขาดน้ำยาวนานขึ้น อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีค่า  $\Psi_t$  เฉลี่ยลดลงต่ำสุดที่ -340 kPa ขณะที่อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 มีค่า  $\Psi_t$  ลดลงต่ำกว่าพันธุ์กำแพงแสน 94-13 อย่างต่อเนื่อง และตรวจวัดได้ค่าต่ำสุดที่ประมาณ -570 kPa เมื่อได้รับสภาพขาดน้ำเป็นเวลา 120 ชั่วโมง (Figure 1A) การเปลี่ยนแปลงค่า  $\Psi_\pi$  ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีการปรับลดค่า  $\Psi_\pi$  ลงเร็วกว่าพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 โดยอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีค่า  $\Psi_\pi$  เฉลี่ยอยู่ที่ -558 kPa ในสภาพควบคุม ลดลงเป็น -932 kPa ภายใน 48 ชั่วโมงหลังได้รับสภาพขาดน้ำ จากนั้นค่า  $\Psi_\pi$  ค่อนข้างคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 120 มีค่า  $\Psi_\pi$  เฉลี่ยอยู่ที่ -992 kPa ขณะที่ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 ค่า  $\Psi_\pi$  มีการลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดช่วงเวลาขาดน้ำ จากค่า  $\Psi_\pi$  เฉลี่ย -590 kPa ในสภาพควบคุม ลดลงเป็น -943 kPa ภายใน 96 ชั่วโมงหลังได้รับสภาพขาดน้ำ จากนั้นชั่วโมงที่ 120 มีค่า  $\Psi_\pi$

เฉลี่ยอยู่ที่ -963 kPa (Figure 1B) ผลที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Meideiros et al., (2013) ซึ่งเปรียบเทียบการตอบสนองของอ้อยสองสายพันธุ์ที่ได้รับสภาพขาดน้ำ และได้สรุปว่าอ้อยพันธุ์ RB962962 ทนแล้งได้ดีกว่าอ้อยพันธุ์ RB867515 เนื่องจากพันธุ์ RB962962 สามารถรักษาค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบ ค่าน้ำไหลปากใบ และอัตราสังเคราะห์แสงสุทธิไว้ได้สูงกว่า และมีผลให้สามารถฟื้นตัวได้เร็วกว่าพันธุ์ RB867515 เมื่อได้รับน้ำอีกครั้ง โดยทั่วไปการปรับตัวของพืชต่อสภาพเครียดจากการขาดน้ำเกิดได้จากหลายกลไก เช่น การเปิดปิดปากใบ เพื่อลดการสูญเสียน้ำในช่วงแรก และการสร้างและสะสมสาร osmoprotectant เพื่อปรับแรงดันออสโมติก (osmotic adjustment) ช่วยรักษาแรงเต่งของเซลล์ (นวรรัตน์, 2558) ค่า  $\Psi_t$  ที่

ติดลบมากขึ้นในอ้อยทั้งสองพันธุ์นี้แสดงให้เห็นว่าอ้อยมีการจัดการการสูญเสียน้ำมากขึ้นเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำยาวนานขึ้น ขณะที่ค่า  $\Psi_{\pi}$  ในใบอ้อยทั้งสองพันธุ์ติดลบมากขึ้นเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำยาวนานขึ้นเช่นกัน สะท้อนถึงความเข้มข้นของตัวถูกละลายในสารละลายในเซลล์ที่สูงขึ้น เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงพลังงานศักย์ของน้ำในใบอ้อยเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำ พบว่าในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ซึ่งเป็นพันธุ์ทนแล้งมีค่า  $\Psi_t$  ที่สูงกว่าและค่า  $\Psi_{\pi}$  ปรับค่าลดลงเร็วกว่าอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 ซึ่งไม่ทนแล้ง กล่าวได้ว่าสภาวะขาดน้ำมีผลกระทบทำให้เกิดกลไกการปรับแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ ส่งผลให้อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีแรงดันเต่งในเซลล์สูงกว่าพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการรักษาน้ำในเซลล์



**Figure 1** Change in total leaf water potential (A) and osmotic potential (B) in 2 sugarcane varieties (KPS 94-13 and KPS 01-11-6) under water deficit stress subjected to 16% PEG 6000 for 24, 48, 72, 96 and 120 hours. Error bars represent of standard error of the mean.

ซึ่งอาจเกิดจากกลไกการสร้างและสะสมสารในกลุ่ม osmoprotectant เช่น โปรตีน โกลบินเบตาอิน และ ทรีฮาโลส เพื่อการรักษาน้ำในเซลล์และช่วยรักษาโครงสร้างเซลล์เมื่อได้รับสภาพขาดน้ำ (Bielsa et al., 2018)

#### การแสดงออกของยีน *TPS1* และยีน *TPS2* ในอ้อยภายใต้สภาพขาดน้ำ

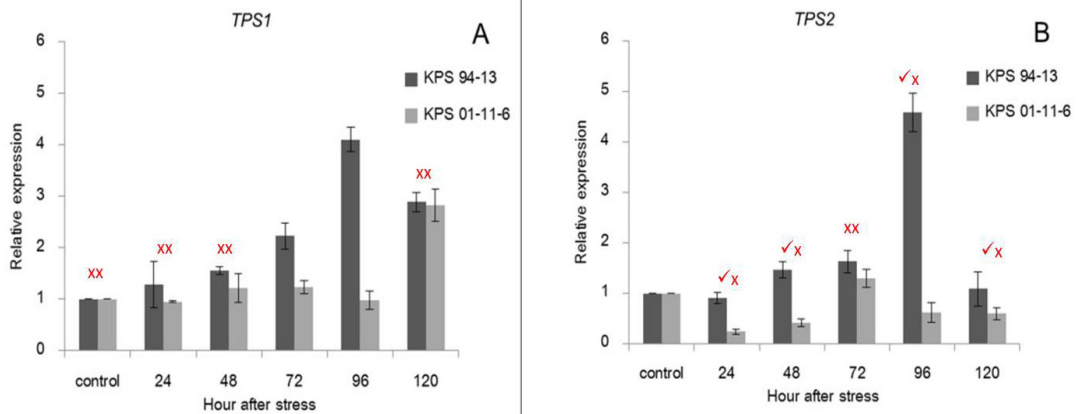
จากการออกแบบคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *TPS1* และ *TPS2* ในอ้อย และตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ดังกล่าว พบว่าได้ยีนดีเอ็นเอของยีน

*TPS1* ขนาด 226 คู่เบส และยีนดีเอ็นเอของยีน *TPS2* ขนาด 158 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BlastN พบว่า ยีนยีน *TPS1* ในอ้อยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน *OsTPS1* ในข้าว (HM050424) และยีน *TPS1* (predicted) ในข้าวฟ่าง (XM\_021447682.1) ที่ 82.73% และ 98.48 % ตามลำดับ ขณะที่ยีน *TPS2* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน *OsTPS6* ในข้าว (HM050434) และ *TPS7* (predicted) ในข้าวฟ่าง (XM\_0024440036.2) ที่ 90.26% และ 98.10%

ตามลำดับ เมื่อนำคูโพรเมอริ์ดังกล่าวมาใช้ศึกษาการแสดงออกของยีน *TPS1* และ *TPS2* ในอ้อยภายใต้สภาพขาดน้ำพบว่า ยีน *TPS1* มีการแสดงออกในใบอ้อยทั้งสองพันธุ์ แต่มีรูปแบบและระดับการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างพันธุ์ โดยในพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีระดับการแสดงออกของยีน *TPS1* สูงกว่าในสภาพควบคุมในทุกระยะเวลาที่ได้รับสภาพขาดน้ำ และเพิ่มสูงขึ้นอย่างมากในช่วง 48-120 ชั่วโมงหลังจากได้รับสภาพขาดน้ำ ระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำยาวนานขึ้น โดยมีระดับการแสดงออกสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 หลังจากได้รับสภาพขาดน้ำ คิดเป็น 4.09 เท่าของสภาพควบคุม ขณะที่ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 มีระดับการแสดงออกของยีน *TPS1* ไม่แตกต่างจากในสภาพควบคุม แต่เมื่อได้รับ

สภาพขาดน้ำยาวนานขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 120 ตรวจพบระดับการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น คิดเป็น 2.82 เท่าของสภาพควบคุม และระดับการแสดงออกของยีน *TPS1* ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 ต่ำกว่าในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 โดยตรวจพบอย่างชัดเจนในช่วง 72-96 ชั่วโมงหลังได้รับสภาพขาดน้ำ (Figure 2 A)

ในส่วนของการแสดงออกของยีน *TPS2* ในใบอ้อย พันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสภาพขาดน้ำที่รุนแรงขึ้น โดยมีระดับการแสดงออกของยีนสูงกว่าในสภาพควบคุมอย่างชัดเจนในช่วง 48-96 ชั่วโมงหลังได้รับสภาพขาดน้ำ ระดับการแสดงออกสูงสุดพบในชั่วโมงที่ 96 คิดเป็น 4.58 เท่า



**Figure 2** The relative expression level of *TPS1* (A) and *TPS2* gene (B) in leaves of 2 sugarcane varieties (KPS 94-13 and KPS 01-11-6) under water deficit stress subjected to 16% PEG 6000 for 24, 48, 72, 96 and 120 hours.. Error bars represent of standard error of the mean.

ของสภาพควบคุม ขณะที่ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 กลับพบว่าสภาพขาดน้ำในช่วง 48 ชั่วโมงแรกกระตุ้นให้การแสดงออกของยีน *TPS2* ต่ำกว่าในสภาพควบคุม อย่างไรก็ตามเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำยาวนานขึ้นเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้น คิดเป็น 1.3 เท่าเมื่อเทียบกับสภาพควบคุม จากนั้นระดับการแสดงออกของยีน *TPS2* กลับลดลงต่ำกว่าสภาพควบคุมอีกครั้ง เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนในระหว่างพันธุ์อ้อยพบว่าอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีระดับการแสดงออกของยีน *TPS2* สูงกว่าในอ้อย

พันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 ในทุกระยะเวลาที่ได้รับสภาพขาดน้ำ

ในการศึกษาคั้งนี้พบว่ายีน *TPS1* และยีน *TPS2* ในอ้อยทั้งสองสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำ โดยอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีระดับการแสดงออกของทั้งสองยีนเพิ่มสูงกว่าในสภาพควบคุม ขณะที่อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 มีการแสดงออกของยีนต่ำกว่าสภาพควบคุม และต่ำกว่าในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 รูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกันของยีนในกลุ่ม *TPS* ระหว่าง

อ้อยสองสายพันธุ์ที่ทนแล้งได้ต่างกันสอดคล้องกับการศึกษาของ Junior et al. (2013) พบว่ายีน *TPS1* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในอ้อยสายพันธุ์ SP90-1638 ซึ่งเป็นพันธุ์ทนแล้ง และมีระดับการแสดงออกลดลงต่ำกว่าในสภาพควบคุมในอ้อยพันธุ์ SP83-2847 ซึ่งไม่ทนแล้ง ขณะที่ยีน *TPS2* มีการแสดงออกต่ำกว่าสภาพควบคุมในอ้อยทั้งสองพันธุ์ ในการศึกษาของ Vantini et al. (2015) พบว่าในอ้อยพันธุ์ RB867515 ซึ่งเป็นพันธุ์ทนแล้ง มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างน้ำตาลทรีฮาโลสสูงกว่าในอ้อยพันธุ์ SP8655 ซึ่งไม่ทนแล้ง และงานวิจัยของ Devi et al., 2019 ที่ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *TPS* ในใบอ้อยหกลสายพันธุ์ พบว่าการแสดงออกของยีน *TPS* ในอ้อยพันธุ์ Co 8021 และ Co 7336 ซึ่งเป็นพันธุ์ไม่ทนแล้ง มีระดับต่ำกว่าในพันธุ์ Co 06022 ซึ่งทนแล้ง โดยพันธุ์ Co 06022 มีระดับการแสดงออกของยีน *TPS* สูงสุดทั้งเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำ และเมื่ออยู่ในระยะฟื้นตัว เมื่อพืชได้รับสภาพขาดน้ำ พืชจะมีกลไกในการป้องกันตัวโดยการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะเครียด 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ ยีนที่ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณกระตุ้นการทำงานของยีนอื่น และยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันเซลล์จากการขาดน้ำ ยีนในกลุ่ม *TPS* เป็นยีนกลุ่มหนึ่งที่มีรายงานว่ามีการตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำในพืช และเกี่ยวข้องกับการป้องกันเซลล์จากการขาดน้ำ (Ciarmiello et al., 2011) จากการศึกษาของ Zhang et al. (2006) ในอ้อยที่ได้รับการถ่ายยีน trehalose synthase (*TSase*) จาก *Grifola frondosa* พบว่าเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำเป็นเวลา 15 วัน ต้นอ้อยที่ได้รับการถ่ายยีนมีการแสดงออกของยีน *TSase* เพิ่มมากขึ้น มีการสะสมทรีฮาโลสเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 8.805 – 12.863 mg/g ต่อน้ำหนักสด และมีความสามารถในการทนทานต่อการขาดน้ำและฟื้นตัวหลังจากได้รับน้ำเร็วกว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีน *TSase* ส่งผลให้มีการสร้างและสะสมน้ำตาลทรีฮาโลสเพิ่มขึ้น และช่วยให้อ้อยทนแล้งได้มากขึ้น ซึ่งการแสดงออกของยีนที่ทำงานในกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลส และปริมาณทรีฮาโลสที่มีการสะสมเพิ่มขึ้นในอ้อยและพืชตระกูลหญ้าเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำ

พบว่ามีผลต่อการปรับค่าแรงดันออสโมติกและเพิ่มความสามารถในการทนแล้ง (Almeida et al., 2013; Hongbo et al., 2006)

ถึงแม้ในปัจจุบันกลไกการทำงานของยีนในกลุ่ม *TPS* ในกระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับ การทนต่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมยังอยู่ระหว่างการศึกษาค้นคว้า แต่ผลจากการวิจัยในหลากหลายพืชภายใต้สภาพเครียดแบบต่างๆ ยืนยันได้ชัดเจนถึงบทบาทของยีนนี้ในการช่วยให้พืชสามารถทนต่อสภาพเครียดได้ โดยอาจทำงานผ่านหลายกระบวนการ เช่น การทำหน้าที่เป็นสาร osmoprotectant ของน้ำตาลทรีฮาโลส ซึ่งช่วยการปรับค่าแรงดันออสโมติกภายในเซลล์เมื่อได้รับสภาพขาดน้ำ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ซึ่งเป็นพันธุ์ทนแล้งแสดงความสามารถในการรักษาค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบอ้อยเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำสอดคล้องกับการระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีน *TPS1* และยีน *TPS2* นับเป็นอีกหนึ่งผลงานที่ยืนยันถึงบทบาทของยีน *TPS* ในการช่วยให้อ้อยทนต่อสภาพขาดน้ำได้

## สรุป

ภายใต้สภาพเครียดจากการขาดน้ำ อ้อยทั้งสองพันธุ์มีค่า  $\Psi_t$  และ  $\Psi_\pi$  ลดลงต่ำกว่าในสภาพควบคุม และอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ซึ่งเป็นพันธุ์ทนแล้งมีค่า  $\Psi_t$  สูงกว่า และมีการปรับลดค่า  $\Psi_\pi$  เร็วกว่าอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 ซึ่งไม่ทนแล้ง การแสดงออกของยีนในกลุ่ม *TPS* มีระดับและรูปแบบการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างพันธุ์อ้อย โดยในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีการแสดงออกของยีน *TPS1* และ *TPS2* สูงกว่าในสภาพควบคุม และสูงกว่าในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6

## เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร  
กองยุทธศาสตร์และแผนงาน สำนักงาน  
คณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย  
กระทรวงอุตสาหกรรม. 2560. รายงานการ  
ผลิตอ้อยของประเทศไทยประจำปีการผลิต  
2560/61. แหล่งข้อมูล: [http://www.ocsb.  
go.th/upload/journal/  
fileupload/923-3254.pdf](http://www.ocsb.go.th/upload/journal/fileupload/923-3254.pdf). ค้นเมื่อ 1  
กุมภาพันธ์ 2562.
- นวัฒน์ อุดมประเสริฐ. 2558. สรีรวิทยาของพืช  
ภายใต้สภาวะเครียด. สำนักพิมพ์แห่ง  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- Bielsal B., Hewitt S., Reyes-Chin-Wo S.,  
Dhingra A. and Rubio-Cabetas M. J.  
2018. Identification of water use  
efficiency related genes in 'Garnem'  
almond-peach rootstock using time-  
course transcriptome analysis. Plos  
one. 13: 1-24.
- Chary S.N., Hicks G.R., Choi Y.G., Carter D.  
and Raikhel N.V. 2008. Trehalose-6-  
phosphate synthase/phosphatase  
regulates cell shape and plant  
architecture in Arabidopsis. Plant  
Physiol. 146: 97 – 107.
- Ciarmiello L., Woodrow P., Fuggi A., Pontecorvo  
G. and Carillo P. 2011. Plant genes for  
abiotic stress. P. 283 - 308. In: A.  
Shanker. Abiotic Stress in Plants –  
Mechanisms and Adaptations. InTech.
- Endres L., Silva J. V., Ferreira V. M. and  
Barbosa G. V. S. 2010. Photosynthesis  
and water relations in Brazilian  
sugarcane. The Open Agriculture  
Journal. 4: 31 – 37.
- Figuroa C. M. and Lunn J. E. 2016. A tale of  
two sugars: trehalose-6-phosphate and  
sucrose. Plant Physiol. 172: 7 – 27.
- Garg A.H., Kim J., Owens T.G., Ranwala A.P.,  
Chol Y. D., Kochlan and Wu R.J., 2002.  
Trehalose accumulation in rice plants  
confers high tolerance levels to different  
abiotic stresses. PNAS. 99(25): 15898  
– 15903.
- Goddijn O.J.M. and Dun K.V. 1999. Trehalose  
metabolism in plants. Trends Plant Sci.  
4: 315 – 319.
- Hounsa C. G., Brandt E. V., Thevelein J.,  
Hohman S. and Prior B. A. 1998. Role of  
trehalose in survival of *Saccharomyces  
cerevisiae* under osmotic stress.  
Microbiology. 144: 671 – 680.
- Junior N.N., Nicolau M.S.A.P., Mantovanini  
L.J. and Zingaretti S.M. 2013.  
Expression analysis of two genes  
coding for trehalose-6-phosphate  
synthase (TPS), in sugarcane  
(*Saccharum* spp.) under water stress.



- AJPS. 4: 91 – 99.
- Leyman, B., P. van Dijck and J.M. Thevelein. 2001. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trend Plant Sci.* 6: 510 – 513.
- Lunn, J.E. 2007. Gene families and evolution of trehalose metabolism in plants. *Funct Plant Biol.* 34: 550 – 563.
- Li H. W., Zang B. S., Dwng X. W. and Wang X. P. 2011. Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene *OsTPS1* enhances abiotic stress tolerance in rice. *Planta* 234: 1007 – 1018.
- Livak. K.J. and Schmittgen. T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25: 402 – 408.
- Miranda J.A., Avonce N., Suarez R., Thevelein J.M., Dijck P.V. and Iturriaga G. 2007. A bifunctional *TPS-TPP* enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 226: 1411 – 1421.
- Pramanik M. H. R. and Imai R. 2005. Functional identification of a trehalose-6-phosphate phosphatase gene that is involved in transient induction of trehalose biosynthesis during chilling stress in rice. *Plant Mol Bio.* 58: 751 – 762.
- Ponnu J., Wahl V. and Markus Schmid. 2011. Trehalose-6-phosphate: connecting plant metabolism and development. *Front. Plant Sci.* 4(2): 70.
- Ramesh P. 2000. Effect of different levels of drought during the formative phase on growth parameters and its relationship with dry matter accumulation in sugarcane. *J Agron Crop Sci.* 185(2): 83 – 89.
- Suzuki N., Bajad S., Shuman J. Shulaev V. and Mittler R. 2008. The transcriptional co-activator MBF1c is a key regulator of thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Biol Chem* 283: 9269 – 9275.
- Vantini J. S., Dedemo G. C., Jovino D. F., Fonseca L. F. S., Tezza R. I. D., Mutton M. A., Ferro J. A. and Ferro M. I. T, 2015. Differential gene expression in drought-tolerant sugarcane roots. *Genet Mol Res.* 14(2): 196 – 207.
- Xie D. W., Wang X. N., Fu L. S., Sun J., Zheng W. and Li Z. F. 2015. Identification of the trehalose-6-phosphate synthase gene family in winter wheat and expression analysis under conditions of freezing stress. *J Genet.* 94(1): 55 – 65.

- Yang H. L., Liu Y. J., Wang C. L. and Zeng Q. Y. 2012. Molecular evolution of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family in *Populus*, *Arabidopsis* and rice. *PLOS ONE*. 7. 8: e42438.
- Zang B., Li H., Li W., Deng X. W. and Wang X., 2010. Analysis of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family suggests the formation of TPS complexes in rice. *Plant Mol Bio*. 76: 507 – 522.