

ยีน *NHX1* ในอ้อยพันธุ์ KPS94-13 และอ้อยป่า และรูปแบบการแสดงออก  
ในสภาวะเลียนแบบดินเค็ม  
*NHX1* Gene in Sugarcane cv. KPS94-13 and Wild Sugarcane and  
Gene Expression Pattern in Mimicking Saline Soil

ธนาวรรณ พรหมขลิบนิล<sup>1/</sup> ชนาکانต์ ลักษณะ<sup>2/</sup> สนิธิชัย จันทร์เปรม<sup>1/, 3/, 4/</sup>  
Tanawan Promkhlilnil<sup>1/</sup> Chanakan Laksana<sup>2/</sup> Sontichai Chanprame<sup>1/, 3/, 4</sup>

Received 22 Apr 2019/Revised 28 Jan 2019/Accepted 01 Jul 2019

### ABSTRACT

Saline soil affects both plant growth and productivity especially sugarcane which is an economic crop but sensitive to saline soil. One of sugarcane breeding program's goals is to improve salt tolerance in sugarcane cultivars. The objectives of this research were to clone and identify the *NHX1* gene from a commercial sugarcane cv. KPS94-13 and wild sugarcane, and to study the expression pattern of the genes in salt stress condition. It was found that the full length of the gene was 1,623 bp. The comparison of the sequence to nucleotide data base of GenBank found that the sequence was similar to that of *NHX1* gene of many monocotyledon plants. We named the sequence cloned from KPS 94-13 and wild sugarcane as SoNHX1KPS and SsNHX1WT, respectively. The sequence encoded a polypeptide of 540 amino acid residues. There were 5 amino acid residues difference between the amino acid sequences deduced from the genes of the two sugarcane species. The phylogenetic tree analysis indicated that the *SoNHX1KPS* and *SsNHX1WT* were closely related to *AtNHX1*. The analysis of hydrophobicity found 11 transmembrane domains in both polypeptide sequences. Gene expression study of *NHX1* in the two kinds of sugarcane used in this experiment revealed that when subjected to 100 mM and 200 mM of NaCl for 5 days the expression patterns of the *NHX1* gene depended on the concentrations of NaCl. The expression levels of the gene in roots and leaves of wild sugarcane were higher than those of KPS94-13 and the expression levels of the gene in leaves were higher than those in roots.

**Key words:** gene identification, gene expression, antiporter, sodium chloride, sugarcane

<sup>1/</sup> ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140 และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900  
Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand and Central for Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

<sup>2/</sup> คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว สระแก้ว 27160  
Faculty of Agricultural Technology, Burapha University Sa Kaeo Campus, Sa Kaeo 27160, Thailand

<sup>3/</sup> ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140  
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

<sup>4/</sup> ศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนา มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900  
Center for Advanced Studies for Agriculture and Food, Kasetsart University Institute for Advanced Studies, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand (CASAF, NRU-KU, Thailand)

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

## บทคัดย่อ

ดินเค็มเป็นสาเหตุที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช โดยเฉพาะในอ้อยซึ่งเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเป็นวัฏศูติบในการผลิตน้ำตาล แต่ไม่ทนดินเค็ม เป้าหมายหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์อ้อย คือ การปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนต่อดินเค็ม ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อโคลนและบ่งชี้ยีน *NHX1* จากอ้อยพันธุ์การค้าและอ้อยป่า และศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนนี้ในสภาวะที่อ้อยได้รับความเครียดจากความเค็ม พบว่า ยีน *NHX1* ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 1,623 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ไปเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความเหมือนกับยีน *NHX1* ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิด จึงให้ชื่อยีนที่โคลนได้จากอ้อยพันธุ์ KPS94-13 และอ้อยป่าว่า *SoNHX1KPS* และ *SsNHX1WT* ตามลำดับ เมื่อแปลรหัสพันธุกรรมจะได้ 540 กรดอะมิโน โดยลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสระหว่างอ้อยสองชนิดต่างกัน 5 ตำแหน่ง เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) พบว่า *SoNHX1KPS* และ *SsNHX1WT* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *AtNHX1* การวิเคราะห์ hydrophobicity ของสายโพลีเปปไทด์ทั้ง 2 สาย พบ 11 transmembrane domain การศึกษาแสดงออกของยีน *NHX1* กับอ้อยทั้ง 2 ชนิด ที่ได้รับเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 และ 200 mM เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่า รูปแบบการแสดงออกของยีน *NHX1* จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือ NaCl และระดับการแสดงออกของยีนที่รากและใบของอ้อยป่าสูงกว่าอ้อยพันธุ์ KPS94-13 โดยระดับการแสดงออกของยีนที่ใบจะสูงกว่าที่ราก

**คำสำคัญ:** การบ่งชี้ยีน การแสดงออกของยีน แอนติโพทเตอร์ โซเดียมคลอไรด์ อ้อย

## บทนำ

อ้อยเป็นพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มพืชพลังงานที่มีความสำคัญในการเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตน้ำตาล และสามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตสูงในสภาพดินที่เหมาะสม แต่อ้อยเป็นพืชที่อ่อนแอต่อดินเค็ม ซึ่งมีอยู่กระจุกกระจายในพื้นที่ปลูกอ้อยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อ้อยที่ปลูกในดินเค็มจะชะงักการเจริญเติบโต ใบเหี่ยวแห้งและม้วนในระยะเริ่มต้น และใบเหลืองจนกระทั่งหลุดร่วง ผลผลิตลดลง โดยทั่วไปพืชที่ได้รับความเครียดจากดินเค็มจะมีกลไกป้องกันการสะสมโซเดียมภายในเซลล์ได้แก่ กลไกการกักกันการเคลื่อนย้ายโซเดียมเข้าสู่เซลล์ที่บริเวณราก กลไกการกักเก็บโซเดียมไว้ในแวคิวโอ และกลไกการขับโซเดียมออกสู่ภายนอก (Chakraborty *et al.*, 2012) ซึ่งในแต่ละกลไกจะมีการทำงานในระดับยีน โดยมีกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกต่าง ๆ ได้แก่ *HKT1* จะเกี่ยวข้องกับการกักกันและขับโซเดียมไม่ให้มีการเคลื่อนย้ายเข้าสู่เซลล์ โดยจะควบคุมความสมดุลของโพแทสเซียมในสภาวะที่มีโซเดียม (Maathuis and Amtmann, 1999) *SOS1* จะเกี่ยวข้องกับการขับโซเดียมออกนอกไซโตพลาสซึมเพื่อลดระดับความเข้มข้นของโซเดียมให้น้อยลง ซึ่งจะถูกระตุ้นการทำงานด้วยแคลเซียม (Deinlein *et al.*, 2014) และ *NHX1* จะเกี่ยวข้องกับการจัดเก็บโซเดียมไว้ในแวคิวโอโดยอาศัยความแตกต่างของโปรตอน ( $H^+$ ) จากการทำงานของเอนไซม์  $H^+$ -ATPase ในการเคลื่อนย้ายเพื่อการปรับค่าออสโมติกสำหรับรักษาความสมดุลของโพแทสเซียมและโซเดียมภายในไซโตรซอล ซึ่งการเก็บโซเดียมไว้ในแวคิวโอเป็นกลไกการตอบสนองต่อดินเค็มที่มีประสิทธิภาพของพืช ในพืชที่ทนความเค็ม (halophytes) และไม่ทนความเค็ม (glycophytes) จะมีความสามารถในการจัดการรักษาระดับของโซเดียมให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นพิษ

แตกต่างกันมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับเอ็นไซม์ที่กระตุ้นการทำงานของยีน (Shabala and Munns, 2012) ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อแยกและบ่งชี้ยีน *NHX1* ในอ้อยพันธุ์การค้า KPS94-13 และอ้อยป่า รวมถึงศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *NHX1* ในสภาพเลียนแบบดินเค็ม การศึกษานี้จึงเป็นแนวทางการคัดแยกและบ่งชี้ระดับความทนทานของอ้อยต่อสภาวะดินเค็มในเบื้องต้น และเป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้คัดเลือกอ้อยทนเค็มได้

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

ตัดท่อนพันธุ์อ้อยพันธุ์การค้า KPS94-13 (*Saccharum officinarum*) และอ้อยป่า (*S. spontaneum*) เป็นท่อนยาวท่อนละประมาณ 3 ซม. แต่ละท่อนมี 1 ตา เพาะในกระบะทรายจนกระทั่งแตกยอด เมื่อต้นกล้าอ้อยอายุ 1.5 เดือน จึงย้ายปลูกแบบไฮโดรโปนิกส์ โดยใช้สารละลาย 1/10 Hoagland ในกระบะพลาสติกขนาด 60x120x30 ซม. จำนวน 3 กระบะ แต่ละกระบะมีอ้อยทั้ง 2 ชนิด ชนิดละ 18 ต้น (สำหรับ 6 ระยะเวลาที่ได้รับเกลือและจำนวน 3 ซ้ำ) เปลี่ยนสารละลายใหม่ทุก ๆ 5 วัน จากนั้น จำลองสภาวะเครียดจากความเค็ม โดยผสมเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 0 100 และ 200 mM และให้อ้อยได้รับสภาวะดังกล่าว เป็นระยะเวลา 5 วัน

### 2. การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA) และการสังเคราะห์ first strand cDNA

สกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบอ่อนและรากของอ้อยทั้งสองชนิดด้วยวิธี CTAB ตามวิธีการของ Laksana and Chanprame (2015) ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอ

ด้วยวิธีเจลอิลีคโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรส ความเข้มข้น 0.8% และความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 40 นาที และการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer 8000 (Eppendorf) ที่ช่วงความยาวคลื่น 280/260 nm จากนั้นสังเคราะห์ first strand cDNA จากอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดจากใบอ่อนและรากของอ้อยที่ได้รับ NaCl ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 5 ด้วยชุดสังเคราะห์ first strand cDNA และวิธีการของบริษัท Thermo Fisher Scientific (Thailand) เพื่อใช้เป็น cDNA แม่แบบสำหรับการโคลนยีน และใช้สำหรับสำหรับศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *NHX1*

### 3. การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *NHX1*

ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NHX1* ของพืชหลายชนิดที่มีความใกล้เคียงกับอ้อยจากฐานข้อมูล NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบเพื่อหาตำแหน่งนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์บริเวณด้านที่ติดกับ 5' UTR และ stop codon ด้าน 3' ด้วยโปรแกรม MEGA6 จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ชนิด degenerate primer ให้จำเพาะกับบริเวณดังกล่าว ด้วยโปรแกรมออนไลน์ Primer3 (<http://simgene.com/Primer3>) แล้วทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *NHX1* จากนั้นส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท 1<sup>st</sup> base Laboratory (Malaysia) ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้ BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry นำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *NHX1* แบบเต็มยีน (full length) ของอ้อยทั้งสองชนิดอีกครั้ง (Table 1) เพื่อใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนและนำไปวิเคราะห์ลักษณะอื่น ๆ ต่อไป

**Table 1** Primer sequences for amplifying partial and full length of *NHX1* gene and partial of the reference gene (*GADPH*)

Primer	Nucleotide sequence	Remark
<i>GADPH</i> (200 bp)	F: 5'-CAC GGC CAC TGG AAG CA-3' R: 5'-TCC TCA GGG TTC CTG ATG CC-3'	Reference gene
<i>NHX1</i> (150 bp)	F: 5'-TGC TCC ATT TCA GCG AGG AC-3' R: 5'-AGC GCC AAG GGA TAT CAC AG-3'	For real-time PCR
<i>NHX1</i> (1,632 bp)	F: 5'- GGA GAA CCA TGG ATG GGG CTG GCG CTG GGC GA-3' R: 5'- GGA GAA GGT GAC CTC AGT TCT CAT TGC CTG GAA-3'	For full length gene

#### 4. การโคลนยีน *NHX1* เติมนิยและและการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับการโคลนยีน *NHX1* เติมนิยประกอบด้วยสาร dNTP 0.05 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, โพรเมอร์ชนิด forward และ reverse (Table 1) ความเข้มข้นชนิดละ 0.5 μM, Taq DNA polymerase 0.5 U first strand cDNA ที่สังเคราะห์ไว้ 1 μg และปรับปริมาตรรวมด้วยน้ำที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อให้เป็น 10 μL ลำดับขั้นตอนของปฏิกิริยาเริ่มด้วย pre-denature ที่ 95°C. 2 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาเป็นรอบเริ่มจาก denature ที่ 95°C. 45 วินาที annealing ที่ 60°C. 30 วินาที extension ที่ 72°C. 45 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final-extension ที่ 72°C. 5 นาที นำผลผลิตที่เกิดจากปฏิกิริยาพีซีอาร์เข้าสู่เวกเตอร์ pGEM-T<sup>®</sup> easy vector (บริษัท Promega; USA) ตามวิธีการที่แนะนำในคู่มือของบริษัท และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยเทคนิค heat shock เพื่อเพิ่มจำนวนนิยแล้วส่งไปวิเคราะห์หาลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท 1<sup>st</sup> base Laboratory (Malaysia)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เติมนิยของยีน *NHX1* จากอ้อยทั้ง 2 ชนิด มาเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม GeneDoc แล้วนำไปเปรียบเทียบ

ความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blast จาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/> จากนั้นวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA6 เพื่อแปลรหัสพันธุกรรมเป็นลำดับกรดอะมิโน แล้วสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA6 โดยวิธี neighbor-joining (1,000 bootstrap replications) เพื่อหาความสัมพันธ์ของยีน *NHX1* ของอ้อยทั้ง 2 ชนิด กับนิยใน *Arabidopsis* ร่วมกับ alignment ลำดับอะมิโนโปรตีน เพื่อยืนยันความสัมพันธ์ จากนั้น วิเคราะห์ hydrophobic plot เพื่อค้นหา transmembrane domain ด้วยโปรแกรม TMpred ([www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED__form.html))

#### 5. การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *NHX1* ด้วยเทคนิค real-time PCR

ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *NHX1* ในใบอ่อนและรากของอ้อยทั้ง 2 ชนิด ที่ได้รับเกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 และ 200 mM ตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 5 ด้วยเทคนิค real-time PCR ใช้การแสดงออกของยีน *GADPH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) เป็นนิยอ้างอิง (reference gene) แต่ละปฏิกิริยา

ประกอบด้วย first strand cDNA 300 ng และสาร SensiFAST SYBR No-ROX mix buffer (บริษัท Bio line reagent) ความเข้มข้น 1X ไพรเมอร์ forward และ reverse (Table 1) ความเข้มข้นชนิดละ 0.4 M และปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อให้เป็น 10  $\mu$ l ขั้นตอนของปฏิกิริยาเริ่มด้วย pre-denature ที่ 95°C. 2 นาที จากนั้น ทำปฏิกิริยา 40 รอบ ที่ประกอบด้วย denature ที่ 95°C. 15 วินาที annealing ที่ 60°C. 15 วินาที และ extension ที่ 68°C. 20 วินาที ด้วยเครื่อง Mastercycler<sup>®</sup> ep realplex4 (บริษัท Eppendorf) ในแต่ละช่วงเวลาที่อ้อยได้รับความเค็มจากแต่ละความเข้มข้นของเกลือ NaCl ใช้ cDNA จากอ้อยแต่ละชนิด จำนวน 3 ต้น (biological replication) และแต่ละต้นจะทำปฏิกิริยา real-time PCR 3 ซ้ำ (technical replication)

## 6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD มีจำนวน 3 ซ้ำ โดยมีตัวแปรต้น คือ ระดับความเข้มข้น และตัวแปรตาม คือ การแสดงออกในแต่ละช่วงเวลา (วัน) และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม R (version 3.4.3) ร่วมกับวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT (Duncan's multiple range test)  $P \leq 0.05$

### ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 1. การโคลนยีน *NHX1* และการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

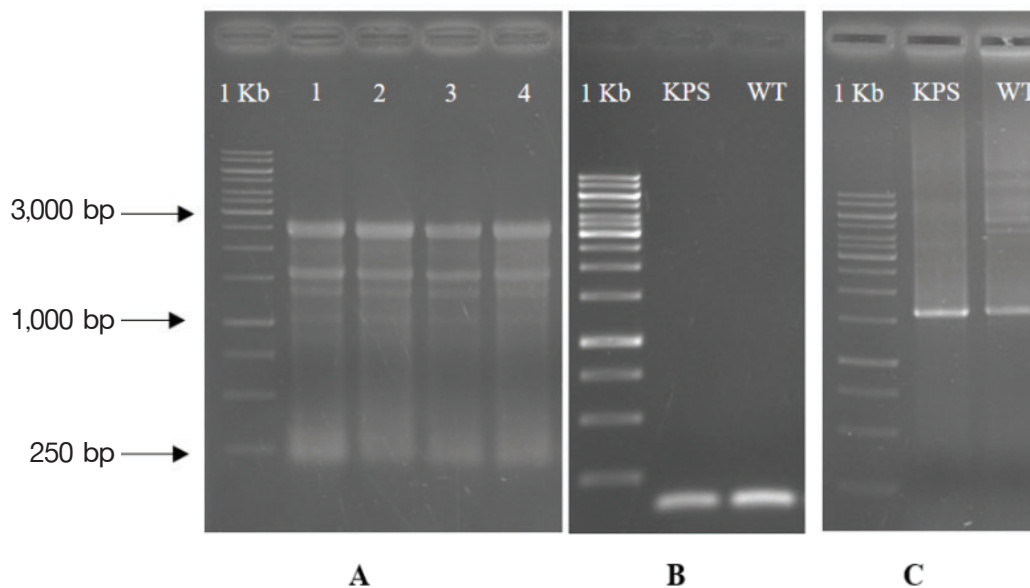
อาร์เอ็นเอรวมที่สกัดจากเนื้อเยื่อของใบและรากของอ้อยพันธุ์ KPS94-13 และอ้อยพันธุ์ป่า เมื่อนำไปตรวจสอบคุณภาพโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า อาร์เอ็นเอที่ได้มีปริมาณความเข้มข้นสูงและมีคุณภาพดี เนื่องจากได้แถบอาร์เอ็นเอ

ขนาด 28s และ 18s (Figure 1A) และเมื่อตรวจวัดคุณภาพอีกครั้งด้วยเครื่อง spectrophotometer ค่าอัตราส่วน 260/280 และ 230/280 อยู่ในช่วง 1.8-2.0 มีความบริสุทธิ์ที่ปราศจากการปนเปื้อนของโปรตีน และสารพวกฟีนอลิกต่าง ๆ ตามลำดับคุณสมบัติของอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมในการศึกษาการแสดงออกของยีนต้องใช้อาร์เอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ โดยค่า 260/280 จะอยู่ในช่วง 1.8-2.0 (Hillebrand and Bendzko, 2000; Laksana and Chanprame, 2015)

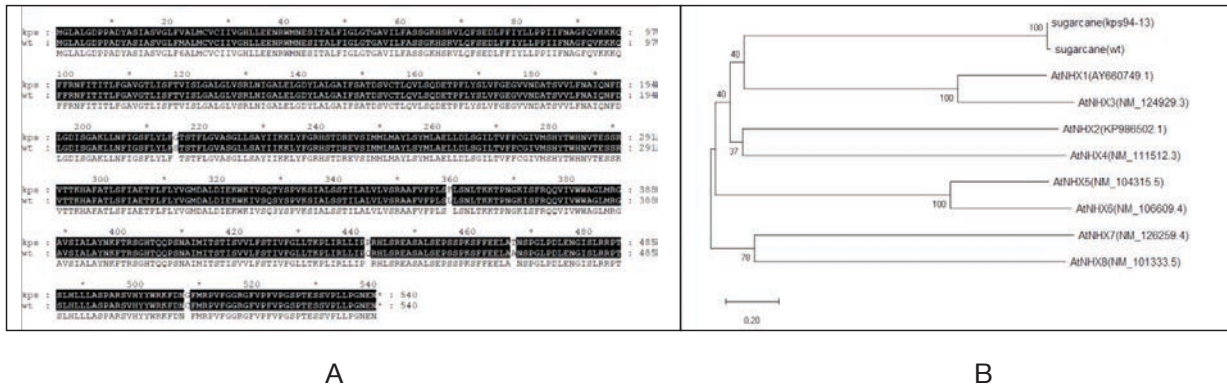
อาร์เอ็นเอรวมถูกเปลี่ยนเป็น first strand cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับไพรเมอร์จำเพาะกับยีน *NHX1* โดยเมื่อใช้ไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา real-time PCR จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 150 คู่เบส (Figure 1B) และเมื่อใช้ไพรเมอร์สำหรับการโคลนเต็มยีนจะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,632 คู่เบส (Figure 1C) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์เมื่อใช้ไพรเมอร์สำหรับการโคลนเต็มยีน พบว่า มีขนาด 1,632 คู่เบส ในอ้อยทั้งสองชนิด และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความเหมือนกับยีน *NHX 1* ของข้าวฟ่างไข่มุก 91.55% (*PgNHX1*; DQ367852.1) ข้าวสาลี 84.95% (*TaNHX1*; AY461512.1) ข้าวบาร์เลย์ 84.82% (*HbNHX1*; DQ285410.1) หญ้า Tall fescue 84.38% (*SaNHX1*; AY945806.1) และหญ้า Japanese lawn 75.78% (*ZjNHX1*; EU333827.2) จึงให้ชื่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากอ้อยพันธุ์ KPS94-13 ว่า *SoNHX1KPS* และที่ได้จากอ้อยป่าว่า *SsNHX1WT* และเมื่อแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนได้สาย polypeptide

ขนาด 540 กรดอะมิโน เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของสาย polypeptide ทั้งสองมาเปรียบเทียบกันพบว่า ชนิดของกรดอะมิโนมีความแตกต่างกัน 5 ตำแหน่ง (Figure 2A) และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโปรตีน SoNHX1KPS และ SsNHX1WT ร่วมกับกลุ่มโปรตีนจากยีน AtNHX1-8 ที่ได้จาก *Arabidopsis* 8 isoform แล้วสร้างเป็น phylogenetic tree ซึ่ง *Arabidopsis* จัดเป็นพืชโมเดลที่ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับ salt stress และมีการศึกษาและจำแนกยีน *NHX* ออกได้ 8 isoform ดังนั้น จึงได้เปรียบเทียบลำดับอะมิโนของโปรตีนที่สนใจว่าจะมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *NHX* ใน isoform ใดของ *Arabidopsis* มากที่สุด โดยพบว่าโปรตีน SoNHX1KPS

และ SsNHX1WT มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมาก และมีความใกล้เคียงกับโปรตีน AtNHX1 และ AtNHX3 มากกว่าโปรตีน isoform อื่น (Figure 2B) จึงมีความเป็นไปได้ว่ายีน SoNHX1KPS และ SsNHX1WT อาจจัดเป็นยีน *NHX1* เนื่องจากว่า เมื่อเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจากอ้อยทั้งสองชนิดมีความเหมือนกับยีน *NHX1* ในพืชหลายชนิดมากกว่า 80% และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน SoNHX1KPS, SsNHX1WT, AtNHX1 และ AtNHX3 มา alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่า SoNHX1KPS และ SsNHX1WT มีความเหมือนใกล้เคียงกับ AtNHX1 มากกว่า AtNHX3 ประมาณ 10%



**Figure 1** Total RNA extracted from leaves and roots of sugarcane (1-2, KPS94-13; 3-4 wild sugarcane) (A), PCR amplication product with primers specific to *NHX1* for real-time PCR (B), full length of *NHX1* (C)



**Figure 2** The deduced amino acid sequences and the alignment of *SoNHX1KPS* and *SsNHX1WT* by using MEGA6 and GeneDoc program, respectively (A) and the phylogenetic tree among the amino acid sequences of *NHX1* derived from sugarcane (KPS94-13 and wild sugarcane) and amino acid sequences of *NHX1-8* from *Arabidopsis thaliana* were analyzed by neighbor-joining with 1,000 bootstrap replication using MEGA6 program (B)

เมื่อนำลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีน NHX1 จากอ้อยทั้งสองชนิดมาวิเคราะห์เพื่อตรวจหาบริเวณที่เป็น membrane spanning region ด้วยโปรแกรม TMpred พบว่า โปรตีนจากยีน *SoNHX1KPS* และ *SsNHX1WT* มีบริเวณที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดมีขั้ว 11 บริเวณ ได้แก่ บริเวณที่แสดงด้วยอักษร A-K (Figure 3A) และแสดงตำแหน่งบนลำดับของกรดอะมิโนที่ขีดเส้นใต้ไว้ (Figure 3B) บริเวณที่เป็น transmembrane ทั้ง 11 domain เป็นจุดสำคัญในการพิจารณาประสิทธิภาพการเคลื่อนย้ายโซเดียมเข้าสู่ภายในแวคิโอลและเคลื่อนย้ายโซเดียมออกสู่ภายนอกเซลล์ และจัดเป็นคุณสมบัติของ Cation/Hydrogen antiporter (Apse *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2015) และมีรายงานว่ายีนในกลุ่ม *AtNHX* เป็นกลุ่มยีนที่ถูกกระตุ้นด้วยสภาวะเครียดจากความเค็ม (NaCl) (Rodrguez-Rosales *et al.*, 2009) และมีผลให้พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีนในกลุ่มนี้ทนทานต่อสภาวะเครียดจากความเค็มมาก

ยิ่งขึ้น (Jiang *et al.*, 2010; Leidi *et al.*, 2010) นอกจากนี้ ยังพบยีนในกลุ่มนี้ในพืชชนิดอื่น ๆ เช่น ถั่วเหลือง (*GmNHX1*) (Luo *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006) ข้าว (*OsNHX1*) (Zhang *et al.*, 2008) มัลเบอรี่ (*MaNHXs*) (Cao *et al.*, 2016) และ ต้นพอปปลา (*PpNHXs*) (Tian *et al.*, 2017) เป็นต้น โดยจะพบโปรตีนที่สังเคราะห์จากยีน *NHX1* ได้จากบริเวณโทโนพลาส (tonoplast) (Blumwald, 2000) โปรตีนนี้มีหน้าที่หลักในการจัดการโซเดียมภายในเซลล์ ซึ่งจะเป็นการแยกโซเดียมเข้าไปเก็บในแวคิโอลเมื่อเกิดจากสภาวะความเป็นพิษของโซเดียมไอออนภายในไซโทซอลภายใต้สภาวะเครียดจากความเค็ม (Jiang *et al.*, 2010) มักพบในพืชที่ทนเค็ม (halophytes) โดยแวคิโอลจะสามารถรองรับปริมาณโซเดียมได้สูง ในกลไกดังกล่าว จะมีการสังเคราะห์เอนไซม์  $H^+$ -ATPase และ  $H^+$ -PPiase สำหรับสร้างโปรตอน เพื่อปรับสภาวะภายในไซโทซอลให้สมดุล (Blumwald *et al.*, 2000) จากกลไกดังกล่าวประสิทธิภาพ

ในการเคลื่อนย้ายโซเดียมไอออนยอมขึ้นอยู่กับระดับการแสดงออกของยีน *NHX1* ที่ใบและรากที่จะตอบสนองต่อสภาวะเครียดจากเกลือ ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ (Venema *et al.*, 2002; Hernandez *et al.*, 2009)

## 2. การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *NHX1*

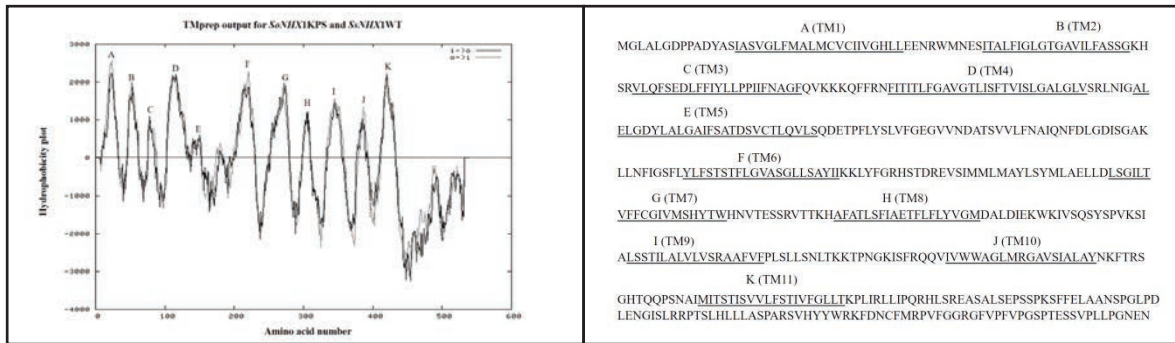
การศึกษาารูปแบบและระดับการแสดงออกของยีน *NHX1* ในใบและรากของอ้อยพันธุ์การค้า KPS94-13 และอ้อยป่าที่ได้รับความเข้มข้นของเกลือ NaCl 100 และ 200 mM เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่า การแสดงออกของยีน *SoNHX1KPS* ในใบและรากของอ้อยพันธุ์ KPS94-13 ที่ได้รับเกลือ NaCl 100 mM มีรูปแบบการแสดงออกที่คล้ายกัน คือ มีระดับการแสดงออกสูงที่สุดในวันที่ 1 หลังจากได้รับสภาพเครียดจากเกลือ และค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออกในวันที่ 1 มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออกของยีนในวันอื่น ๆ เมื่ออ้อยได้รับเกลือ NaCl 200 mM ระดับการแสดงออกของยีนที่ใบจะลดลงทันทีเมื่อเทียบกับวันที่ 0 (Control) และหลังจากนั้นระดับการแสดงออกจะค่อนข้างคงที่ (ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ) ส่วนการแสดงออกของยีนเดียวกันนี้ที่รากกลับมีรูปแบบการแสดงออกที่ไม่สม่ำเสมอ คือ มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ลดลง และเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับเกลือ NaCl ยาวนานขึ้น เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนที่ใบกับที่ราก พบว่า ที่ความเข้มข้นของเกลือเดียวกันยีนที่รากมีระดับการแสดงออกสูงกว่าที่ใบ และความเข้มข้นของเกลือที่ 100 mM กระตุ้นการแสดงออกของยีนได้สูงกว่าที่ 200 mM (Figure 4A)

การแสดงออกของยีน *SsNHX1WT* ทั้งในใบและรากของอ้อยป่าที่ได้รับเกลือ NaCl 100 mM

มีรูปแบบการแสดงออกที่คล้ายกัน คือ มีระดับการแสดงออกสูงที่สุดในวันที่ 1 และระดับการแสดงออกจะลดลงตามลำดับในวันที่ 2-5 โดยค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออกของยีนแต่ละวันที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนอ้อยป่าที่ได้รับ NaCl 200 mM พบว่า การแสดงออกของยีนดังกล่าวในใบและรากมีรูปแบบการแสดงออกที่คล้ายคลึงกัน แต่จะแตกต่างจากกรณีที่ได้รับเกลือ NaCl 100 mM โดยระดับการแสดงออกของยีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่ออ้อยได้รับสภาพเครียดจากความเค็มยาวนานขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างระดับการแสดงออกของยีนที่ 100 mM กับ 200 mM พบว่า ที่ 200 mM สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนได้มากกว่าที่ 100 mM และการแสดงออกของยีนที่ใบจะสูงกว่าที่ราก (Figure 4B) เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่างอ้อยปลูกและอ้อยป่าที่ได้รับความเค็มเดียวกัน พบว่า ที่ NaCl 100 mM การแสดงออกของยีนที่รากและใบของอ้อยพันธุ์ KPS94-13 จะสูงกว่าอ้อยป่าโดยเฉพาะในวันที่ 1 หลังได้รับสภาพเครียด แต่เมื่อเพิ่มระดับความเค็มเป็น 200 mM การแสดงออกของยีนทั้งที่รากและใบของอ้อยป่ามีแนวโน้มสูงกว่าอ้อยพันธุ์ KPS94-13

จากรูปแบบการแสดงออกสามารถอธิบายได้ว่า เมื่อพืชได้รับความเข้มข้นของเกลือสูงจะมีการเคลื่อนย้ายโซเดียมกระจายไปเก็บไว้ในแวคิลโอลตามส่วนต่าง ๆ ของพืช ทำให้ระดับการแสดงออกของยีนค่อย ๆ ลดลงในระยะต่อมา เนื่องจากมีการปรับสมดุลภายในไซโตซอลให้อยู่ในสภาวะปกติ ซึ่งมีรายงานว่าโซเดียมมีการเคลื่อนย้ายไปทุกส่วนของพืชโดยเฉพาะจากรากไปยังส่วนยอดด้วยการทำงานร่วมกันของยีน *SOS1* และ *HKT1* เป็นตัวควบคุมการเคลื่อนย้ายข้ามผ่าน plasma membrane

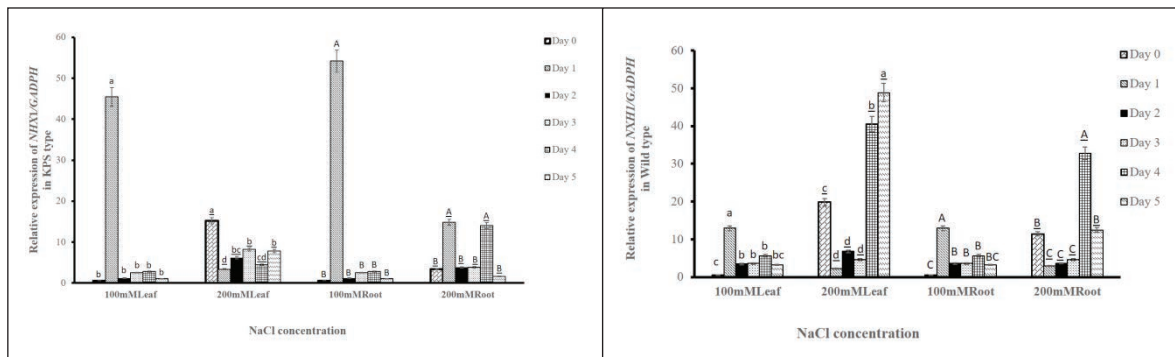




A

B

**Figure 3** The hydrophobicity plot of amino acid sequences of *NHX1* from 2 species of sugarcane, *SoNHX1KPS* and *SsNHX1WT* (A). The 11 putative transmembrane domains (TM) were underlined and were analyzed by TMpred program (B)



A

B

**Figure 4** Relative expression of *SoNHX1KPS* and *SsNHX1WT* gene in leaves and roots of sugarcane cv. KPS94-13 (A) and wild sugarcane (B) subjected to 100 and 200 mM NaCl for 5 days. Different letters and letters with underline on the boxes indicate significant differences among the number of the days receiving stress at the same NaCl concentration at  $P < 0.05$  according to DMRT

(Hauser and Horie, 2010; Guo *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2015) ที่ความเข้มข้นเกลือ 200 mM จัดว่าเป็นความเข้มข้นของโซเดียมที่สูงมาก และทำให้เกิดสภาวะความเป็นพิษต่อพืช หลังจากอ้อยอยู่ในสภาวะดังกล่าว ยีน *NHX1* ในอ้อยทั้งสองชนิดถูกกระตุ้นเช่นกัน แต่แสดงรูปแบบการแสดงออกต่างกันโดยในอ้อยพันธุ์ KPS94-13 มีระดับการแสดงออกในใบและรากน้อยกว่าอ้อยพันธุ์ป่าอย่าง

ชัดเจน เนื่องจากมีความเป็นไปได้ว่าลำดับอะมิโนโปรตีนที่ถูกถอดรหัสออกมาต่างกัน อาจจะมีผลให้รูปแบบการแสดงออกของอ้อยทั้งสองพันธุ์แตกต่างกัน แต่ในส่วนของ การแสดงออกของใบและรากแตกต่างกันเนื่องจากการเคลื่อนย้ายโซเดียมเพื่อปรับความสมดุลของเซลล์ และการแสดงออกของยีนในอ้อยป่าจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามวันที่เพิ่มขึ้น ระดับการแสดงออกสูงนั้นอาจมีความ

สัมพันธ์กับการสะสมโซเดียมปริมาณสูงในแวคิลโอ มีความเป็นไปได้ว่าจำนวน transmembrane domain อาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของกลไกการเคลื่อนย้ายโซเดียมเข้าไปเก็บไว้ในแวคิลโอ และโดยในพืชที่ทนทานต่อพิษของโซเดียม พืชจะใช้วิธีสะสมโซเดียมไว้ในเซลล์ แต่ในพืชที่ไม่ทนทานจะอาศัยกลไกการเคลื่อนย้ายขับโซเดียมออกนอกไซโตซอล (Blumwald *et al.*, 2000) เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนที่ใบกับที่ราก พบว่า การแสดงออกของยีนที่ใบจะสูงกว่าที่ราก ซึ่งสอดคล้องกับการพบการสะสมโซเดียมในใบข้าวสูงกว่าในราก ที่เป็นผลจากการแสดงออกของยีน *OsNHX1* ที่มีการแสดงออกมากในส่วนยอด แต่ขัดแย้งกับข้าวบาร์เลย์ (*HvNHX1*) ที่สะสมโซเดียมในรากสูงกว่าเพราะว่ามีการจำกัดการเคลื่อนย้ายโซเดียมไปสะสมในใบ (Fukuda *et al.*, 2004a, b) เมื่อพิจารณาจากข้อมูลดังกล่าวมาข้างต้น อาจกล่าวได้ว่าในสภาพดินเค็มจัดมาก (NaCl 200 mM) อ้อยป่าแนวโน้มที่จะมีความทนเค็มมากกว่าอ้อยพันธุ์ KPS93-14 เพราะยีนมีการแสดงออกสูงกว่าสะท้อนถึงความสามารถในการเคลื่อนย้าย  $\text{Na}^+$  ไปสะสมในแวคิลโอได้มากกว่า (Venema *et al.*, 2002; Hernandez *et al.*, 2009; Shabala and Munns, 2012)

### สรุปผลการทดลอง

การโคลนยีน *NHX1* จากอ้อยพันธุ์การค้า KPS94-13 และอ้อยป่า ได้ยีนที่มีนิวคลีโอไทด์ 1,632 คู่เบส โดยลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายกับยีน *NHX1* ของข้าวฟ่างไซมุก ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ เป็นต้น จึงให้ชื่อยีนนี้ว่า *SoNHX1KPS* และ *SsNHX1WT* ตามลำดับ เมื่อแปลรหัสพันธุกรรมเป็นลำดับกรดอะมิโน มีจำนวน 540

กรดอะมิโน โดยพบว่า มีกรดอะมิโนที่แปลรหัสพันธุกรรมจากยีนทั้งสองแตกต่างกัน 5 ตำแหน่ง แต่จากการศึกษา phylogenetic tree พบว่า ยีนทั้งสองมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด และมีความใกล้ชิดกับกลุ่มยีน *NHX1* ของ *Arabidopsis* มากที่สุด โปรตีนนี้จัดเป็น transmembrane protein ประกอบด้วย 11 transmembrane domains ซึ่งเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพในการเคลื่อนย้ายโซเดียมไอออนไปเก็บสะสมในแวคิลโอ รูปแบบการแสดงออกของยีน *NHX1* จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือ NaCl และระดับการแสดงออกของยีนที่รากและใบของอ้อยป่าสูงกว่าอ้อยพันธุ์ KPS94-13 และในภาพรวมระดับการแสดงออกของยีนที่ใบจะสูงกว่าที่ราก และสัมพันธ์กับความสามารถในการทนทานต่อความเค็มของพืชด้วย การศึกษาในระดับโมเลกุลและโปรตีนจะช่วยให้เข้าใจกลไกการทนทานต่อดินเค็มของพืชได้ดีขึ้น และช่วยให้สามารถออกแบบวิธีการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนเค็มได้อย่างถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

### คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์วิทยากรชั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษา และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่สนับสนุนทุนวิจัย และให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ และสถานที่ปฏิบัติงานวิจัย ขอขอบคุณ

ศูนย์วิจัยอ้อยและพัฒนาอ้อยและน้ำตาล  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน  
ที่ให้ความอนุเคราะห์ท่อนพันธุ์อ้อย สำหรับใช้เป็น  
พืชทดลอง

### เอกสารอ้างอิง

- Apse, P.M.; G.S. Aharon; W. A. Sendden and E. Blumwald. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258.
- Blumwald, E. 2000. Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 431-434.
- Blumwald, E.; G. S. Aharon and M. P. Apse. 2000. Sodium transport in plant cells. *Biochimica Biophysica Acta.* 146: 140-151.
- Chakraborty, K.; R.K. Sairam and R.C. Bhattacharya. 2012. Differential expression of salt overly sensitive pathway genes determine salinity stress tolerance in Brassica genotypes. *Plant Physiol. Biochem.* 51: 90-101.
- Chen, H.-T.; C. Xin; W. Bing-yue.; Y. Xing-xing; Z. Hong-mei; C. Xiao-yan and L. Xiao-qing. 2015. Whole- genome identification and expression analysis of  $\text{K}^+$  efflux antiporter (KEA) and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter (NHX) families under abiotic stress in soybean. *J. Integra. Agr.* 14(6): 1171-1183.
- Deinlein, U.; A.B. Stephan; T. Horie; W. Luo; G. Xu and J.I. Schroeder. 2014. Plant salt-tolerance mechanisim. *Trends Plant Sci.* 19: 371-379.
- Fukuda, A.; A. Nakamura; A. Tagiri; H. Tanaka; A. Miyao; H. Hirochika and Y. Tanaka. 2004a. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter from rice. *Plant Cell Physiol.* 45: 146-159.
- Fukuda, A.; K. Chiba; M. Maeda; A. Nakamura; M. Maeshima and Y. Tanaka. 2004b. Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar  $\text{H}^+$ -pyrophosphatase,  $\text{H}^+$ -ATPase subunit A, and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter from barley. *J. Exp. Bot.* 55: 585-594.
- Hernndez, A., X. Jiang, B. Cubero, P.M. Nieto, R.A. Bressan, P.M. Hasegawa and J.M. Pardo. 2009. Mutants of the *Arabidopsis thaliana* cation/ $\text{H}^+$  antiporter AtNHX1 conferring increased salt tolerance in yeast: The endosome/prevacuolar compartment is a target for salt toxicity. *J. Biol. Chem.* 284: 14276-14285.
- Hillebran, T. and P. Bendzko. 2000. Method for the simultaneous isolation of genomic DNA and high purity RNA. *United States Patent.* Number: 6,043,354 (Mar. 28, 2000).

- Jiang, X.; E.O. Leidi and J.M. Pardo. 2010. How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance? *Plant Signal. Behavior.* 5: 792-795.
- 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.*). *J. ISSAAS.* 21: 96-106.
- Maathuis, F.J.M. and A. Amtmann. 1999. K<sup>+</sup> nutrition and Na<sup>+</sup> toxicity: the basis of cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratios. *Ann. Bot.* 84: 123-133.
- Rodrguez-Rosales, P.M.; F.J. Glyez; R. Huertas; M.N. Aranda; M. Baghour; O. Cagnac and K. Venema. 2009. Plant NHX cation/proton antiporters (review). *Plant Signal. Behavior.* 4: 265-276.
- Shabala, S. and R. Munns. 2012. Salinity stress: Physiological constraints and adaptive mechanisms. pp 59-93. *In* Shabala, S. (ed.), *Plant Stress Physiology.* CAB International. Wallingford, UK.
- Yuan, H-J.; Q. Ma; G-Q. Wu; P. Wang; J. Hu and S-M. Wang. 2015. *ZxNHX* controls Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> homeostasis at the whole-plant level in *Zygophyllum xanthoxylum* through feedback regulation of the expression of genes involved in their transport. *Ann. Bot.* 115: 495-507.