

การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในอ้อยภายใต้สภาพขาดน้ำ DNA Methylation in Sugarcane Genotypes under Water Deficit Stress

จิรรัตน์ คูวิจิตรจารุ¹ ศรุตะ มานิตกุล¹ และ นงลักษณ์ เทียนเสรี²
Tisirat Kuvijitjaru¹, Saruta Manitkul¹ and Nongluk Teinseree²

บทคัดย่อ

ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นกลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนที่พืชใช้ตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงได้มีการใช้เทคนิค MSAP เพื่อตรวจสอบผลของการขาดน้ำต่อระดับและรูปแบบของการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในอ้อย โดยการชักนำให้อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 และโคลนกำแพงแสน 01-11-6 ได้รับสภาพขาดน้ำเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง 1 3 และ 5 วัน โดยการเติมสารละลาย PEG 6000 ที่ระดับความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารเพาะเลี้ยง ตรวจสอบความผันแปรของการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอและจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ถูกเติมหมู่เมทิล โดยใช้ MSAP ไพรมเมอร์ พบว่าการขาดน้ำกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับและรูปแบบของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในอ้อยได้ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ถูกเติมหมู่เมทิลทั้งหมดจากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดคิดเป็น 64.2 และ 65.1 เปอร์เซ็นต์ในโคลนกำแพงแสน 01-11-6 และพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ตามลำดับ และมีจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ถูกเติมหมู่เมทิล รูปแบบที่ 4 ในโคลนกำแพงแสน 01-11-6 คงที่ แต่ในพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสภาพควบคุม เปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของแถบดีเอ็นเอที่ถูกเติมหมู่เมทิล พบการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันในอ้อยทั้งสองสายพันธุ์ โดยโคลนกำแพงแสน 01-11-6 มีระดับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันเพิ่มขึ้นขณะที่พันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีระดับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันเพิ่มขึ้น เมื่อได้รับสภาพขาดน้ำ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างของรูปแบบเมทิลเลชัน พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit K (*ndhK*), ยีน hexokinase-1 และ ยีน ribosomal RNA

คำสำคัญ : ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน อ้อย สภาพขาดน้ำ MSAP

Abstract

DNA methylation is one of the process involved in the regulation of gene expression in plant's response to environmental stresses. Hence, methylation-sensitive amplified polymorphisms (MSAP) were used to evaluate the effect of water deficit stress on the extent and patterns of DNA methylation in sugarcane leaves. Sugarcane cultivar KPS 94-13 and KPS 01-11-6 plantlets were subjected to water deficit stress for 12 h, 1, 3 and 5 days by adding 16% PEG 6000 into culture medium. Changes in DNA methylation and polymorphism in methylated DNA were assessed by using selective MSAP primer combinations. Water deficit induced genome-wide DNA methylation polymorphisms accounted for 64.2 % and 65.1% of the total bands at all time-points in KPS 01-11-6 and KPS 94-13, respectively. The number of hyper-methylated band (type IV) was stable in KPS 01-11-6 but increased considerably in KPS 94-13 in comparison with the control. The changes in cytosine methylation banding patterns between control and water deficit stress were compared. These finding indicated that alteration in DNA methylation under

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

² ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

water deficit stress occurred in two sugarcane genotypes. The water deficit stress induced more DNA demethylation than DNA methylation in KPS 01-11-6 whereas the level of DNA methylation was increased in KPS 94-13. Based on the BLAST results of polymorphic methylated fragments, the cloned fragments showed significant homology to known sequences of NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit K (*ndhK*) gene, hexokinase-1 gene and ribosomal RNA gene.

Keywords: DNA methylation, sugarcane, water deficit, MSAP

คำนำ

อ้อย (*Saccharum* spp.) เป็นพืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในแถบอากาศร้อนและชุ่มชื้น ประเทศไทยจึงเป็นประเทศหนึ่งที่มีพื้นที่และสภาพอากาศที่เหมาะสมในการเพาะปลูกอ้อย ยกเว้นภาคใต้ที่มีฝนตกชุกและอากาศร้อนตลอดปี (ประเสริฐ, 2551) จากการศึกษาความต้องการใช้น้ำของอ้อย พบว่าอ้อยมีความต้องการใช้น้ำประมาณ 120 ลูกบาศก์เมตรต่อตัน คิดเป็น 8,400 ลูกบาศก์เมตรต่อฤดูปลูก ซึ่งถือว่าใช้น้ำในการผลิตมากเป็นอันดับ 2 รองจากข้าว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสรีรวิทยาและพันธุกรรมของอ้อยแต่ละสายพันธุ์ รวมถึงปัจจัยจากสภาพแวดล้อม (เจษฎา, 2553) การขาดน้ำจึงเป็นปัญหาสำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของอ้อยตั้งแต่การงอกของเมล็ดจนถึงการให้ผลผลิต ในสภาวะที่อ้อยต้องประสบกับสภาวะเครียดจากการขาดน้ำจะเกิดการตอบสนองในหลายระดับ เริ่มตั้งแต่การตอบสนองในระดับโมเลกุลต่อเนื่องไปถึงการเปลี่ยนแปลงในระดับสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา ตามลำดับ ดังเช่นในรายงานวิจัยที่พบว่าการเปลี่ยนแปลงของอ้อยในระดับสัณฐานวิทยา (Silva *et al.*, 2008) ระดับสรีรวิทยา (Cha-um and Kirdmanee, 2009) และระดับโมเลกุลตามลำดับ (Rodrigues *et al.*, 2009)

กระบวนการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอ (ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน) เป็นการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต เกิดจากการย้ายหมู่เมทิล ($-CH_3$) จาก S-adenosyl-2-methionine (SAM) ไปยังไนโตรจีนัสเบสของ นิวคลีโอไทด์ที่พบมากในจีโนมของพืชชั้นสูงมักจะมีเกิดไซโตซีนเมทิลเลชันในตำแหน่งที่มีการเรียงตัวของเบสแบบ 5'-CG-3' 5'-CNG-3' และ 5'-CNN-3' โดยที่ N อาจเป็นเบสอะดีนีน (A) หรือเบสไซโตซีน (C) หรือเบสไทมีน (T) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA methyltransferase 1; Dnmt 1) ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่บริเวณ CG และเอนไซม์โครโมเมทิลเลส (chromomethylase 3; CMT 3) ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่บริเวณ CNG นอกจากนี้ยังมีกระบวนการนำหมู่เมทิลออกจากตำแหน่งที่เกิดเมทิลเลชัน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไกลโคซิลเลส (glycosylase) ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่าดีเอ็นเอดีเมทิลเลชัน (DNA demethylation) (Valledor *et al.*, 2007; Sahu *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2015) ดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่เกิดขึ้นในจีโนมของพืชและสัตว์มีบทบาทสำคัญต่อเสถียรภาพของจีโนม (genome stability) และการควบคุมการแสดงออกของยีนซึ่งจะส่งผลต่อการเจริญและการพัฒนาของทั้งพืชและสัตว์ โดยพบว่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันยับยั้งหรือลดการจับกันของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (transcription factor) ที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนและเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครมาตินเพื่อควบคุมการแสดงออกของยีน (Diéguez *et al.*, 1997; Cao and Jacobsen, 2002; Calladine *et al.*, 2004) กระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันยังมีผลต่อการปรับตัวและตอบสนองของพืชต่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น สภาพขาดน้ำกระตุ้นให้ระดับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันเพิ่มขึ้นในรากของ ถั่วลิสง (Labra *et al.*, 2002) หรือถั่วลูกไก่ (chickpea) สายพันธุ์ทนหนาวที่ได้รับอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 6 วัน พบว่ารูปแบบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันเปลี่ยนแปลงไป คือเกิดแบบดีเมทิลเลชันเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ไม่ทนหนาว (Rakei *et al.*, 2016) และในงานวิจัยที่ศึกษาเรื่องการเติมหมู่เมทิลในส่วนของอินทรธอนของยีน *ZmGS7* ในใบข้าวโพดนั้น เมื่อปลูกเลี้ยงต้นข้าวโพดในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland ที่เติม PEG (Polyethylene Glycol) และเกลือ

โซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเกิดกระบวนการดีเมทิลเลชันเพิ่มขึ้น และมีผลให้ยีน *ZmGST* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (Tan, 2010)

เทคนิคหนึ่งที่ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในการศึกษารูปแบบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่เบสไซโตซีนของสิ่งมีชีวิต คือเทคนิค Methylation-sensitive amplification polymorphism หรือ MSAP เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันได้ทั่วทั้งจีโนม โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นมาก่อน (Xu *et al.*, 2000) ซึ่งเทคนิคนี้อาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความสามารถในการตัดสายดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งจดจำได้ต่างกัน ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน เมื่อมีรูปแบบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่แตกต่างกัน (Xiong *et al.*, 1999) การศึกษาว่าการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอมีระดับและรูปแบบที่มีความแตกต่างกันหรือไม่ในอวัยวะที่ทนแล้งได้ต่างกัน จะเป็นหนึ่งในข้อมูลประกอบการศึกษากลไกระดับเหนือพันธุกรรมและพันธุกรรมในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้งในอ้อยต่อไป ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบระดับและรูปแบบการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอภายหลังได้รับสภาวะขาดน้ำในอ้อย 2 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค MSAP และทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันหรือดีเมทิลเลชันอันเป็นผลเนื่องมาจากสภาพขาดน้ำ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การสร้างสภาวะขาดน้ำแก่อ้อยและการสกัดแยกดีเอ็นเอ

นำส่วนใบม้วนจากส่วนยอดของอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ที่อายุ 6 เดือน ซึ่งเป็นพันธุ์ทนแล้ง มาชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog's, 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พีเอช 5.7 เพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส จากนั้นชักนำให้เกิดยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ส่วนอ้อยโคลนกำแพงแสน 01-11-6 ซึ่งมีลักษณะไม่ทนแล้ง (ได้รับความอนุเคราะห์ต้นอ้อยในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง คณะเกษตร กำแพงแสน) นำอ้อยทั้งสองพันธุ์มาเพิ่มปริมาณต้นและรากในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA (Naphthaleneacetic acid) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมนูโครส 20 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.7 จนได้ต้นอ้อยที่มียอดและรากสมบูรณ์ใช้เวลาประมาณ 6 เดือน สร้างสภาพขาดน้ำให้กับต้นอ้อย โดยย้ายต้นอ้อยที่สมบูรณ์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว สูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมสารละลาย PEG 6000 ความเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ ทำให้มีค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในอาหารเหลวสูตร MS มีค่าประมาณ -1,000 กิโลพาสคาล เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง 1 3 และ 5 วัน เก็บตัวอย่างใบอ้อยทั้งสองพันธุ์ที่อยู่ในสภาพควบคุมและสภาพขาดน้ำมาสกัดแยก ดีเอ็นเอ โดยประยุกต์จากวิธีการของ Aljanabi *et al.* (1999)

2. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค MSAP

วิธีการ MSAP ประยุกต์จาก Xu *et al.* (2000) โดยปรับความเข้มข้นดีเอ็นเออ้อยแต่ละตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 200 นาโนกรัม แล้วจึงนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชุดคือ *EcoRI* กับ *HpaII* และ *EcoRI* กับ *MspI* (Promega, USA) ร่วมกับ 1X SuRE/Cut Buffer A (Roche Life Science, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง เชื่อมต่อ ดีเอ็นเอกับ adapter จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ใน 2 ขั้นตอน คือ ปฏิกริยา pre-selective amplification ด้วยไพรเมอร์ ER (5'- GACTGCGTACCAATTC + A -3') และไพรเมอร์ HM (5'- ATCATGAGTCCTGCTCGG -3') เจือจางผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ 20 เท่าด้วยน้ำกลั่น เพื่อเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอน selective amplification โดยใช้ไพรเมอร์ ER+3 ได้แก่ ACT AAC ACC AAG และ AGG

ไพรเมอร์ HM+3 ได้แก่ GAC GGC GAC และ TAA และ HM+4 ได้แก่ TCCA TTTC และ TCAC รวมคู่ไพรเมอร์ที่เป็น ER จับคู่กับ HM ทั้งสิ้น 35 คู่ ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ในโพสิทีฟคอนโทรล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยการย้อมเจลด้วยวิธี silver staining (Sanguinefti *et al.*, 1994) จากนั้นคัดเลือกเฉพาะคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างที่ชัดเจนระหว่างสภาพควบคุมและสภาพขาดน้ำในแต่ละสายพันธุ์ รวมถึงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์

3. การบันทึกผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

บันทึกข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากตัวอย่างย่อยทั้งสองพันธุ์ โดยบันทึกเป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และเป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ โดยบันทึกแยกกันตามชุดของการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI-HpaII* (H) และ *EcoRI-MspI* (M) จากนั้นแปลงผลข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่บันทึกได้ตามรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง โดยบันทึกเป็นรูปแบบ 1 เมื่อพบแถบดีเอ็นเอปรากฏในช่อง H และ M กล่าวคือ ไม่มีการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโตซีนของตำแหน่งจดจำ 5'-CCGG-3'/5'-GGCC-3' (non-methylated state) บันทึกเป็นรูปแบบ 2 เมื่อพบแถบดีเอ็นเอปรากฏเฉพาะในช่อง H เนื่องจากเกิดการเติมหมู่เมทิลที่ external cytosine ในสายดีเอ็นเอสายใดสายหนึ่ง คือ 5'-^mCCGG-3'/3'-GGCC-5' หรือ 5'-^mC^mCGG-3'/5'-GGCC-3' (hemi-methylated state) บันทึกเป็นรูปแบบ 3 เมื่อพบแถบดีเอ็นเอปรากฏเฉพาะในช่อง M ซึ่งเกิดจากการเติมหมู่เมทิลที่ external cytosine ทั้งสองสายของดีเอ็นเอ คือ 5'-C^mCGG -3'/3'-GGC^mC-5' (fully methylated state) และรูปแบบ 4 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในช่อง H และ M คือเกิดการเติมหมู่เมทิลที่ external และ internal cytosine ทั้งสองสายของดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 5'-^mC^mCGG-3'/3'-GGC^mC^m-5' (hyper methylated state)

4 การโคลนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ตัดแถบดีเอ็นเอที่มีรูปแบบของการเกิดเมทิลเลชันที่แตกต่างกันระหว่างสภาพควบคุมกับสภาพขาดน้ำหรือระหว่างสายพันธุ์ ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจ (บริษัท SolGent, Korea) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่โคลนได้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การวิเคราะห์รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและปริมาณการเติมหมู่เมทิล

ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของย่อยโคลนกำแพงแสน 01-11-6 และพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ที่ได้รับสภาพขาดน้ำเป็นเวลา 12 ชั่วโมง 1 3 และ 5 วัน ด้วยเทคนิค MSAP โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 35 คู่ จากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างสภาพควบคุมเทียบกับสภาพขาดน้ำในแต่ละสายพันธุ์ที่ให้ผลชัดเจนได้จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ นำข้อมูลแถบดีเอ็นเอในแต่ละรูปแบบมาวิเคราะห์หาความผันแปรของการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอ (methylation polymorphism) พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอในรูปแบบที่ 1 ถึง 4 ทั้งหมด 1,130 และ 1,395 แถบ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ถูกเติมหมู่เมทิลทั้งหมด 725 และ 908 แถบ คิดเป็น 64.2 และ 65.1 เปอร์เซ็นต์จากจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด (% MSAP) ในย่อยโคลนกำแพงแสน 01-11-6 และพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ตามลำดับ โดยเกิดได้ทั้งในสภาพควบคุมและสภาพขาดน้ำ (ตารางที่ 1) การเกิดเมทิลเลชันในย่อยโคลนกำแพงแสน 01-11-6 ในสภาพควบคุมมี % MSAP เท่ากับ 66.4 เปอร์เซ็นต์ใกล้เคียงกับในสภาพขาดน้ำ ซึ่งมี % MSAP เฉลี่ยจากทุกระยะการขาดน้ำ 63.6 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ย่อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มี % MSAP 58.8 เปอร์เซ็นต์ในสภาพควบคุมและมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำยาวนานขึ้น คือเฉลี่ยจากทุกระยะการขาดน้ำเท่ากับ 66.7 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอในพืชอื่น พบว่ามีความแตกต่างกันไปตามชนิดและสภาพเครียดที่พืชได้รับ เช่น ในข้าวโพดพันธุ์ w9816 ซึ่งเป็นพันธุ์ทนหนาว มี % MSAP อยู่ในช่วง 32 ถึง 35 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกันระหว่างสภาพควบคุมและเมื่อได้รับ

อุณหภูมิต่ำ (Shan *et al.*, 2013) ในข้าวที่เผชิญกับสภาพเครียดจากความเค็ม พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ โดยพันธุ์ pokkali ซึ่งทนเค็ม มี % MSAP 57.6 เปอร์เซ็นต์ในสภาพควบคุม และสูงขึ้นเป็น 65.3 เปอร์เซ็นต์เมื่อปลูกเลี้ยงในสารละลายที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 15 วัน ต่างกับรูปแบบการตอบสนองของพันธุ์ข้าว IR29 ซึ่งเป็นพันธุ์ไม่ทนเค็มที่มี % MSAP 51.7 เปอร์เซ็นต์ ลดลงจากสภาพควบคุม (59.3 เปอร์เซ็นต์) (Karan *et al.*, 2012) หรือในฝ้ายสายพันธุ์ YZ1 ซึ่งมี % MSAP ในสภาพควบคุม 41.2 เปอร์เซ็นต์ และลดลงเป็น 34.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับสภาพเค็ม (Xue-Lin *et al.*, 2009) ซึ่งการที่อ้อยมีปริมาณการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงกว่าพืชอื่น อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของชนิดพืช สายพันธุ์ ชนิดของเนื้อเยื่อ รวมถึงปัจจัยจากสภาพแวดล้อมที่พืชได้รับที่แตกต่างกัน (Pan *et al.*, 2011)

นำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่บันทึกได้มาวิเคราะห์รูปแบบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน พบว่าอ้อยทั้งสองสายพันธุ์มีการเกิด ดีเอ็นเอเมทิลเลชันในรูปแบบที่ 1 มากที่สุด ทั้งในสภาพควบคุมและสภาพขาดน้ำ รองลงมาได้แก่การเกิดแถบดีเอ็นเอของรูปแบบที่ 4 และรูปแบบที่ 2 พบได้น้อยที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในหลายพืช เช่น ข้าว (Wang *et al.*, 2015b) สบู่ดำ (Mastan *et al.*, 2012) หรือผักกาดก้านขาว (rapeseed) (Gao *et al.*, 2014) ที่พบว่า แถบดีเอ็นเอของรูปแบบที่ 1 เป็นแบบที่พบมากที่สุด แสดงให้เห็นว่าบริเวณ CCGG ซึ่งเป็นตำแหน่งตัดของเอนไซม์ส่วนใหญ่ไม่มีการเติม หมู่เมทิล นอกจากนี้ยังพบว่าสภาพขาดน้ำกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในทิศทางเดียวกันในอ้อยทั้งสองสายพันธุ์ กล่าวคือแถบดีเอ็นเอในรูปแบบที่ 2 มีจำนวนไม่แตกต่างกัน และแถบดีเอ็นเอในรูปแบบที่ 3 มีจำนวนลดลง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสภาพควบคุมและเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำยาวนานขึ้น ขณะที่อ้อยทั้งสองพันธุ์มีการเกิด เมทิลเลชัน รูปแบบที่ 4 แตกต่างกัน โดยในอ้อยโคลนกำแพงแสน 01-11-6 แถบดีเอ็นเอในรูปแบบที่ 4 มีจำนวนค่อนข้างคงที่ แต่ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ซึ่งเป็นพันธุ์ทนแล้งมีการเกิดแถบดีเอ็นเอในรูปแบบที่ 4 เพิ่มขึ้นเมื่อขาดน้ำมากขึ้น (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่าสภาพขาดน้ำกระตุ้นให้เกิดทั้งกระบวนการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอ และนำหมู่เมทิลออกจากตำแหน่งที่เกิดเมทิลเลชัน ซึ่งแตกต่างกันในอ้อยต่างสายพันธุ์ สอดคล้องกับผลการศึกษารูปแบบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในพืชภายใต้สภาพเครียดแบบต่าง ๆ ซึ่งมีความแตกต่างกันไปตามชนิดและพันธุ์พืช ดังเช่นในงานวิจัยของ Shan *et al.* (2013) ที่พบว่า การเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเมทิลเลชันในรูปแบบที่ 4 เป็นรูปแบบหลักที่มีผลให้จำนวนแถบดีเอ็นเอลดลง ทำให้เกิดสภาพ ดีเมทิลเลชัน ภายใต้สภาพเครียดจากความหนวดยืนในข้าวโพด หรือในการศึกษาพันธุ์ข้าวภายใต้สภาพเครียดจากความเค็ม ข้าวพันธุ์ทนเค็ม พบการเกิดแถบดีเอ็นเอในรูปแบบที่ 3 ลดลงและแบบที่ 4 เพิ่มขึ้น ขณะที่พันธุ์ไม่ทนเค็ม มีจำนวนแถบดีเอ็นเอในรูปแบบที่ 3 เพิ่มขึ้น และรูปแบบที่ 4 ลดลง (Karan *et al.*, 2012)

Table 1 DNA methylation changes in leaves under control and different levels of water deficit stress conditions.

Pattern	KPS 01-11-6					KPS 94-13				
	0 hour	12 hours	1 day	3 days	5 days	0 hour	12 hours	1 day	3 days	5 days
1	76	79	87	82	81	115	93	92	110	77
2	35	32	24	44	42	44	39	42	38	56
3	44	43	41	38	32	49	37	48	55	41
4	71	72	74	62	71	71	110	97	76	105
Total site ^{1/}	226	226	226	226	226	279	279	279	279	279
MSAP (%) ^{2/}	66.4	65.0	61.5	63.7	64.2	58.8	66.7	67.0	60.6	72.4
Non methylated band (%) ^{3/}	33.6	35.0	38.5	36.3	35.8	41.2	33.3	33.0	39.4	27.6
Hemi methylated band (%) ^{4/}	15.5	14.2	10.6	19.5	18.6	15.8	14.0	15.1	13.6	20.1
Fully methylated band (%) ^{5/}	50.9	50.9	50.9	44.2	45.6	43.0	52.7	52.0	47.0	52.3

^{1/} Total site = 1+2+3+4^{2/} MSAP (%) = [(2+3+4)/(1+2+3+4)] x 100^{3/} Non-methylated ratio (%) = [(1)/(1+2+3+4)] x 100^{4/} Hemi methylated ratio (%) = [(2)/(1+2+3+4)] x 100^{5/} Fully methylated ratio (%) = [(3+4)/(1+2+3+4)] x 100

2. การเปลี่ยนแปลงรูปแบบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันภายใต้สภาพขาดน้ำ

นำข้อมูลแถบดีเอ็นเอจากทั้ง 10 คู่ไพรเมอร์ ที่บันทึกได้มาเปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นระหว่างสภาพควบคุมและสภาพขาดน้ำ พบการเปลี่ยนแปลง 15 รูปแบบ ซึ่งสามารถแบ่งรูปแบบการเปลี่ยนแปลงออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือนกันทั้งในสภาพควบคุมและสภาพขาดน้ำ (no change) แทนด้วยสัญลักษณ์ A ถึง D กลุ่มที่ 2 มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของแถบดีเอ็นเอเป็นแบบดีเมทิลเลชัน (demethylation) แทนด้วยสัญลักษณ์ E ถึง J และกลุ่มที่ 3 มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงแถบดีเอ็นเอเป็นแบบเมทิลเลชัน (methylation) แทนด้วยสัญลักษณ์ K ถึง P (ตารางที่ 2) ผลการเปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลงการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในสภาพขาดน้ำเทียบกับสภาพควบคุมจากทั้ง 10 คู่ไพรเมอร์ พบว่าในอ้อยโคลนกำแพงแสน 01-11-6 ภายใต้สภาพขาดน้ำ มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงแบบ no change อยู่ในช่วง 39.8 ถึง 48.2 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่พันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 38.0 ถึง 50.9 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับสภาพขาดน้ำยาวนานขึ้นอ้อยทั้งสองพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงแบบ no change ลดลง

ในส่วนของรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของแถบดีเอ็นเอแบบเมทิลเลชันหรือดีเมทิลเลชัน เมื่อได้รับสภาพขาดน้ำกระตุ้นให้อ้อยโคลนกำแพงแสน 01-11-6 มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงแบบดีเมทิลเลชัน เท่ากับ 24.3 29.2 34.1 และ 31.9 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงแบบเมทิลเลชัน เท่ากับ 27.4 29.2 25.7 และ 28.3 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่

ที่อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงแบบดีเมทิลเลชั่น เท่ากับ 16.5 19.7 25.8 และ 22.6 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง แบบเมทิลเลชั่น เท่ากับ 34.1 29.4 29.4 และ 39.4 เปอร์เซ็นต์ภายใต้สภาพ ฆาดน้ำที่ 12 ชั่วโมง 1 3 และ 5 วัน ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงแบบดีเมทิลเลชั่น แบบ H เป็นแบบที่มีการเปลี่ยนแปลง มากที่สุดในอ้อยทั้งสองพันธุ์ คือในสภาพควบคุมเกิดแถบดีเอ็นเอในรูปแบบที่ 3 (fully methylated state) เมื่อได้รับ สภาพฆาดน้ำมีผลให้ระดับเมทิลเลชั่นลดลงเป็นแบบที่ 2 (hemi-methylated state) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง จากจำนวนตำแหน่งที่พบที่ 12 ชั่วโมงถึง 5 วัน เท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ ในอ้อยโคลนกำแพงแสน 01-11-6 และ 66.7 เปอร์เซ็นต์ ในพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ขณะที่การเปลี่ยนแปลงแบบเมทิลเลชั่นแบบ O เป็นแบบที่มีการเปลี่ยนแปลง มากที่สุดในพันธุ์กำแพงแสน 01-11-6 ซึ่งในสภาพควบคุมเกิดแถบดีเอ็นเอในรูปแบบที่ 2 เมื่อได้รับสภาพฆาดน้ำมีผล ให้ระดับเมทิลเลชั่นเพิ่มขึ้นเป็นแบบไฮเปอร์เมทิลเลชั่น (hyper methylation) คือเกิดแถบดีเอ็นเอในรูปแบบที่ 4 คิด เป็นเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเท่ากับ 64.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนพันธุ์กำแพงแสน 94-13 การเกิดเมทิลเลชั่นแบบ M เป็น แบบ ที่มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด ซึ่งในสภาพควบคุมไม่พบการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโตซีนของตำแหน่งจดจำของ เอนไซม์ตัดจำเพาะ คือเกิดแถบดีเอ็นเอในรูปแบบที่ 1 เมื่อได้รับสภาพฆาดน้ำมีผลให้ระดับเมทิลเลชั่นเพิ่มขึ้นเป็นแบบ ไฮเปอร์เมทิลเลชั่น คือเกิดแถบดีเอ็นเอในรูปแบบที่ 4 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเท่ากับ 37.9 เปอร์เซ็นต์

จากการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นหรือดีเมทิลเลชั่นที่เกิดขึ้น พบว่าในอ้อยโคลน กำแพงแสน 01-11-6 สภาพฆาดน้ำทำให้ระดับของการเกิดเมทิลเลชั่นลดลง คือมีการเปลี่ยนแปลงแบบดีเมทิลเลชั่นมา กกว่าแบบเมทิลเลชั่น ขณะที่อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 สภาพฆาดน้ำชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแบบเมทิลเลชั่น สูงกว่าแบบดีเมทิลเลชั่น รูปแบบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยในฝ่ายภายใต้สภาพเครียดจากความ เเค็ม โดยฝ่ายสายพันธุ์ YZ1 มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงแบบเมทิลเลชั่นสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น (Xue-Lin *et al.*, 2009) และในฝ่ายสายพันธุ์ทนเค็ม (CCRI35 และ Zhong07) มีระดับของการเกิดเมทิลเลชั่นเพิ่มขึ้น ขณะที่พันธุ์ไม่ทนเค็ม (CCRI12) เกิดการเปลี่ยนแปลงแบบดีเมทิลเลชั่น คือมีระดับของการเกิดเมทิลเลชั่น ลดลง เมื่อระดับความเค็มเพิ่มขึ้น (Wang *et al.*, 2015a)

Table 2 Analysis of DNA methylation patterns under water deficit stress conditions.

Pattern	Class	C ^{1/}		S ^{1/}		KPS 01-11-6				KPS 94-13			
		H	M	H	M	12	1	3	5	12	1	3	5
						hours	day	days	days	hours	day	days	days
No change	A	1	1	1	1	49	49	46	47	75	72	77	53
	B	1	0	1	0	6	3	7	7	10	11	8	15
	C	0	1	0	1	16	10	13	9	10	17	8	5
	D	0	0	0	0	38	32	25	27	43	42	32	33
					%	48.2	41.6	40.3	39.8	49.5	50.9	44.8	38.0
Demethylation	E	1	0	1	1	12	11	12	6	4	8	8	3
	F	0	1	1	1	7	8	13	10	10	10	15	10
	G	0	0	1	1	11	19	11	18	4	6	10	11
	H	0	1	1	0	3	8	6	12	4	8	10	12
	I	0	0	1	0	12	5	23	18	13	11	10	10
	J	0	0	0	1	10	15	12	8	11	12	19	17
					%	24.3	29.2	34.1	31.9	16.5	19.7	25.8	22.6
Methylation	K	1	1	1	0	11	8	8	5	12	12	10	19
	L	1	1	0	1	6	8	10	10	10	10	17	14
	M	1	1	0	0	10	11	12	14	18	17	11	29
	N	1	0	0	1	11	8	3	5	6	5	11	5
	O	1	0	0	0	6	13	13	17	24	20	17	21
	P	0	1	0	0	18	18	12	13	25	18	16	22
					%	27.4	29.2	25.7	28.3	34.1	29.4	29.4	39.4

^{1/} C: control, S: water deficit stress, H and M represents digestion with *EcoRI/HpaII*, and *EcoRI/MspI*, respectively.,

Ascore of 1 and 0 represents the presence and absence of bands, respectively.

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่ถูกเติมหมู่เมทิล

โคลนแถบดีเอ็นเอที่มีรูปแบบของการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่แตกต่างกันระหว่างสภาพควบคุมกับสภาพขาดน้ำหรือระหว่างสายพันธุ์ย่อย จากการใช้คูไพรเมอร์ 10 คู่ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้นั้น 34 เปอร์เซ็นต์ ไม่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล และในส่วนลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล แต่ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นส่วนของยีนหรือไม่ หรือยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน คิดเป็น 49 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่พบทั้งหมด อาจเนื่องมาจากจีโนมของอ้อยมีขนาดใหญ่ และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของอ้อยยังไม่สมบูรณ์เมื่อเทียบกับพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น ประกอบกับชนิดดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค MSAP มีขนาดค่อนข้างสั้น ประมาณ 180 ถึง 400 คู่เบส จึงทำให้ยากต่อการระบุความ

เหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ อย่างไรก็ตาม 17 เปอร์เซ็นต์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้พบว่ามี ความเหมือนกับยีนต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิตอื่นในฐานข้อมูล (ตารางที่ 3) เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่ 3 และ 4 ซึ่งได้ จากคู่ไพรเมอร์ ER+ACT/HM+GGC มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันแบบ G จากอ้อยโคลน กำแพงแสน 01-11-6 และแบบ M ในพันธุ์กำแพงแสน 94-13 และมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน hexokinase1 (*HXK1*) ซึ่งยีน *HXK1* เกี่ยวข้องกับสังเคราะห์เอนไซม์ HXK1 ที่ทำหน้าที่ในปฏิกิริยาฟอสโฟไรเลชัน (phosphorylation) ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็น glucose 6-phosphate ในขั้นตอนแรกของกระบวนการไกล โคไลซิส (glycolysis) ทำหน้าที่เป็นตัวกลางรับ-ส่งสัญญาณในกระบวนการ sugar sensing and signal transduction pathways เพื่อสร้างสมดุลในการสร้างน้ำตาล การใช้น้ำตาล และรักษาระดับน้ำตาลในพืช (Gupta and Kaur, 2005) และมีบทบาทในการควบคุมการเปิด-ปิดของปากใบ (Granot *et al.*, 2014) นอกจากนี้ยังพบตัวอย่างแถบดีเอ็นเอที่ 6 ซึ่งมีขนาด 183 คู่เบส ได้จากคู่ไพรเมอร์ ER+ACT/HM+GAC มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน แบบ F จากอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit K (*ndhK*) ซึ่งเป็นยีนที่สังเคราะห์ subunit k ใน NDH complex ที่พบในคลอโรพลาสต์ ทำ หน้าที่เป็นตัวกลางในการขนถ่ายอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งมีผลให้เกิดการสังเคราะห์ ATP เพิ่ม ขึ้น (Darie *et al.*, 2006; Rumeau *et al.*, 2007)

การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันหรือดีเมทิลเลชัน เป็นกระบวนการหนึ่งที่มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออก ของยีนและการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันนี้ สามารถถูกกระตุ้นได้จากภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม (Chinnusamy and Zhu, 2009) ดังเช่นในงานวิจัยของ Dyachenko *et al.* (2006) พบว่าภายใต้สภาพเครียดจาก ความเค็ม *Mesembryanthemum crystallinum* เกิดเมทิลเลชันในบริเวณที่เป็นดีเอ็นเอชุดซ้ำมากขึ้นเป็น 2 เท่า สันนิษฐานว่าเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโครมาติน ซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของยีนจำนวนมาก (Santos *et al.*, 2011) มีรายงานเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนเมทิลเลชันขึ้น เช่น ใน *Arabidopsis* จากยีน จำนวน 25,423 ยีน 61.5 เปอร์เซ็นต์ของยีนเหล่านี้ไม่พบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน 5.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเกิดเมทิล เลชันขึ้นในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน (promoter-methylated genes) และอีก 33.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นยีนที่เกิดเมทิลเลชัน ขึ้นในบริเวณที่ใช้ในการถอดรหัสของยีน (body-methylated genes) ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดดีเอ็น เอเมทิลเลชันและรูปแบบการแสดงออกของยีน พบว่าระดับการแสดงออกของยีนที่เกิด เมทิลเลชันในบริเวณที่ใช้ใน การถอดรหัสของยีนสูงกว่ายีนที่ไม่เกิดเมทิลเลชัน ขณะที่ยีนที่เกิดเมทิลเลชันในบริเวณที่เป็น โปรโมเตอร์มีการแสดงออก ในระดับต่ำเป็นไปได้อย่างมากการเกิดเมทิลเลชันขึ้นในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนมีผลต่อการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อที่ เฉพาะเจาะจง และเมื่อเปรียบเทียบตำแหน่งการเกิดเมทิลเลชันในยีนกับหน้าที่ยีน พบว่า กลุ่มยีนที่เกิด เมทิลเลชันใน บริเวณที่เป็นโปรโมเตอร์ มักประกอบด้วยยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ในกระบวนการโปรทีโอไลซิส (Proteolysis) ขณะที่กลุ่มยีนที่เกิดเมทิลเลชันขึ้นในบริเวณที่ใช้ในการถอดรหัสของยีน ประกอบด้วยยีนที่เกี่ยวข้องกับ การสร้างเอนไซม์ในกลุ่มคะตะไลติก (catalytic enzymes) สำหรับกลุ่มยีนที่ไม่เกิดเมทิลเลชันเป็นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้อง กับการสร้าง ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ต่าง ๆ (Zhang *et al.*, 2006) ดังนั้นการเกิดกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันหรือ ดีเมทิลเลชันจึงอาจยังไม่ใช่วิธีกำหนดการแสดงออกของยีนภายใต้สภาพเครียดแต่เพียงอย่างเดียว จึงควรต้องม ีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่อง การแสดงออกของยีนเหล่านี้ เพื่อให้เข้าใจถึงผลของการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันหรือดีเมทิล เลชันทั้งรูปแบบและตำแหน่งที่ก่อต่อการแสดงออกของยีน และบทบาทของยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทน ต่อสภาพขาดน้ำของอ้อยต่อไป

Table 3 BLAST results of polymorphic MSAP fragments.

MSAP fragment	Genotype	Methylation status	Size (bp)	Homologous sequence in NCBI	Accession	Identity	E-value
1	94-13	demethylation	266	Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 260G18 sequence, complete sequence	KF184924.1	95%	1E-67
2	94-13	methylation	323	<i>Oryza brachyantha</i> chromosome 11	FQ378032.1	100%	1E-03
3	01-11-6	demethylation	188	<i>Zea mays</i> hexokinase-1 (LOC100283735), mRNA	NM_001156634.1	87%	1E-20
4	94-13	methylation	188	<i>Zea mays</i> hexokinase-1 (LOC100283735), mRNA	NM_001156634.1	87%	1E-20
5	01-11-6	demethylation	304	<i>Sorghum bicolor</i> 22 kDa kafirin cluster	AF061282.1	93%	9E-14
6	94-13	demethylation	183	<i>Joinvillea ascendens</i> NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit K (ndhK) gene, complete cds; plastid	HQ181329.1	98%	4E-70
7	01-11-6	methylation	225	Rice 25S ribosomal RNA gene	M11585.1	98%	1E-91
				<i>Zea mays</i> 26S ribosomal RNA gene	NR_028022.2	97%	5E-90
				<i>Zea mays</i> 25S rRNA gene and transposon-like sequence	AJ309824.2	97%	5E-90
8	94-13	demethylation	225	Rice 25S ribosomal RNA gene	M11585.1	98%	1E-91
9	01-11-6	methylation	186	<i>Zea mays</i> subsp. Mays genotype CMS-S mitochondrion, complete genome	DQ490951.2	98%	8E-72
10	94-13	methylation	372	<i>Oryza rufipogon</i> 18S ribosomal RNA gene	KM117266.1	99%	1E-172

สรุปผลการทดลอง

สภาพขาดน้ำสามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับและรูปแบบของการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอในจีโนม้อยได้แตกต่างกันระหว่างอ้อยพันธุ์ทนแล้งและไม่ทนแล้ง จากการใช้เทคนิค MSAP ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีการเกิดแถบ ดีเอ็นเอในรูปแบบที่ 4 เพิ่มขึ้น และมีระดับของการเกิดเมทิลเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสภาพขาดน้ำ ขณะที่ในอ้อยโคลนกำแพงแสน 01-11-6 มีรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอค่อนข้างคงที่ระหว่างสภาพควบคุมและสภาพขาดน้ำ และมีระดับของการเกิดเมทิลเพิ่มขึ้นลดลง

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่ถูกเติมหมู่เมทิลที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบเมทิลเลชันหรือดีเมทิลเลชันภายใต้สภาพขาดน้ำจากอ้อยทั้งสองสายพันธุ์ พบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในพืชอื่นๆ เช่น ยีน NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit K (*ndhK*) ยีน hexokinase-1 และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง ribosomal RNA

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานักพัฒนานักนิเทศศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

- เจษฎา ภักธเลพงศ์. 2553. การศึกษาความต้องการใช้น้ำของอ้อย, น.1-57. ใน รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการสร้างองค์ความรู้และพัฒนาอ้อยภายใต้แผนแม่บทโครงการสร้างพื้นฐานทางปัญญา โครงการระยะยาว ปี 2552: เล่ม 2 ด้านดิน น้ำ และปุ๋ย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ประเสริฐ สุดใหม่. 2551. อ้อย: พืชเศรษฐกิจที่มีอนาคต. เคนการเกษตร. 32(1): 216-220.
- Aljanabi, S.M., L. Forget and A. Dookun. 1999. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol-free sugarcane DNA. *Plant Mol Biol Report*. 17: 1-8.
- Calladine, C.R., H.R. Drew, B.F. Luisi and A.A. Travers. 2004. *Understanding DNA*. Academic press, United States. 334.
- Cao, X. and S. Jacobsen. 2002. Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 16491-16498.
- Cha-um, S. and C. Kirdmanee. 2009. Proline accumulation, photosynthesis abilities and growth characters of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plantlets in response to iso-osmotic salt and water-deficit stress. *Agric Sci Chin*. 8: 51-58.
- Chinnusamy V. and J.K. Zhu. 2009. Epigenetic regulation of stress responses in plant. *Curr Opin Plant Biol*. 12: 133-139.
- Darie, C.C., L.D. Pascalis, B. Mutschler and W. Haehnel. 2006. Studies of the Ndh complex and photosystem II from mesophyll and bundle sheath chloroplasts of the C4-type plant *Zea mays*. *J Plant Physiol*. 163: 800-808.
- Diéguez, M.J., M. Bellotto, K. Afsar, O.M. Scheid and J. Paszkowski. 1997. Methylation of cytosines in nonconventional methylation acceptor sites can contribute to reduced gene expression. *Mol Gen Genet*. 253: 581-588.
- Dyachenko, O.V., N.S. Zakharchenko, T.V. Shevchuk, H.J. Bohnert, J.C. Cushman and Y.I. Buryanov. 2006. Effect of hypermethylation of CCWGG sequences in DNA of *Mesembryanthemum crystallinum* plants on their adaptation to salt stress. *Biochemistry*. 71: 461-465.
- Gao, G., J. Li, H. Li, F. Li, K. Xu, G. Yan, B. Chen, J. Qiao and X. Wu. 2014. Comparison of the heat stress induced variations in DNA methylation between heat-tolerant and heat-sensitive rapeseed seedlings. *Breed Sci*. 64: 125-133.
- Granot, D., G. Kelly, O. Stein and R. David-Schwartz. 2014. Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development. *J Exp Bot*. 65(3): 809-819.
- Gupta, A.K. and N. Kaur. 2005. Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plant. *J Biosci*. 30(5): 761-775.
- Karan, R., T. DeLeon, H. Biradar and P.K. Subudhi. 2012. Salt stress induced variation in DNA methylation pattern and influence on gene expression in contrasting rice genotypes. *PLoS One*. 7(6): e40203.
- Khan, A.R., S.M. Shah and N. Irshad. 2015. Immediate and transgenerational regulation of plant stress response through DNA methylation. *J Agric Sci*. 7(4): 144-151.
- Labra, M., A. Ghiani, S. Citterio, S. Sgorbati, F. Sala, C. Vannini, M. Ruffini-Castiglione and M. Bracale. 2002. Analysis of cytosine methylation pattern in response to water deficit in pea root tips. *Plant Biol*. 4: 694-699.
- Mastan, S.G., M.S. Rathore, V.D. Bhatt, P. Yadav and J. Chikara. 2012. Assessment of changes in DNA methylation by methylation-sensitive amplification polymorphism in *Jatropha curcas* L. subjected to salinity stress. *Gene*. 508: 125-129.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*. 15: 473-479.

- Pan, Y., W. Wang, X. Zhao, L. Zhu, B. Fu and Z. Li. 2011. DNA methylation alterations of rice in response to cold stress. *POJ*. 4(7): 364-369.
- Rakei, A., R. Maali-Amiri, H. Zeinali and M. Ranjbar. 2016. DNA methylation and physio-biochemical analysis of chickpea in response to cold stress. *Protoplasma*. 253(1): 61-76.
- Rodrigues, F.A., M.L. Laia and S.M. Zingaretti. 2009. Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. *Plant Sci*. 176: 286-302.
- Rumeau, D., G. Peltier and L. Cournac. Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant Cell Environ*. 30: 1041-1051.
- Sahu, P.P., G. Pandey, N. Sharma, S. Puranik, M. Muthamilarasan and M. Prasad. 2013. Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. *Plant Cell Rep*. 32: 1151-1159.
- Sanguinetti, C.J., N.E. Dias and A.J. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 17: 915-919.
- Santos, A.P., L. Ferreira, J. Maroco and M.M. Oliveira. 2011. Abiotic stress and induced DNA hypomethylation cause interphase chromatin structural changes in rice rDNA loci. *Cytogenet Genome Res*. 132: 297-303.
- Shan, X., X. Wang, G. Yang, Y. Wu, S. Su, S. Li, H. Liu and Y. Yuan. 2013. Analysis of the DNA methylation of maize (*Zea mays* L.) in response to cold stress based on methylation-sensitive amplified polymorphisms. *J Plant Biol*. 56(1): 32-38.
- Silva, M.A., J.A.G. Silva, J. Enciso, V. Sharma and J. Jifon. 2008. Yield components as indicators of drought tolerance of sugarcane. *Sci Agric*. 65(6): 620-627.
- Tan, M.P. 2010. Analysis of DNA methylation of maize in response to osmotic and salt stress based on methylation-sensitive amplified polymorphism. *Plant Physiol Biochem*. 48: 21-26.
- Valledor, L., R. Hasbún, M. Meijón, J.L. Rodríguez, E. Santamaría, M. Viejo, M. Berdasco, I. Feito, M.F. Fraga, M.J. Cañal and R. Rodríguez. 2007. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 91: 75-86.
- Wang, B., R. Fu, M. Zhang, Z. Ding, L. Chang, X. Zhu, Y. Wang, B. Fan, W. Ye and Y. Yuan. 2015a. Analysis of methylation-sensitive amplified polymorphism in different cotton accessions under salt stress based on capillary electrophoresis. *Genes Genom*. 37: 713-724.
- Wang, W., F. Huang, Q. Qin, X. Zhao, Z. Li and B. Fu. 2015b. Comparative analysis of DNA methylation changes in two rice genotypes under salt stress and subsequent recovery. *Biochem Biophys Res Commun*. 465: 790-796.
- Xiong, L.Z., C.G. Xu, M.A. Saghai Maroof and Q. Zhang. 1999. Pattern of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its potential lines, detected by methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol Gen Genet*. 261:439-446.
- Xu, M., X. Li and S.S. Korban. 2000. AFLP-based detection of DNA methylation. *Plant Mol Biol Report*. 18: 361-368.
- Xue-Lin, L. Zhong-Xu, N. Yi-Chun, G. Xiao-Ping and Z. Xian-Long. 2009. Methylation-sensitive amplification polymorphism of epigenetic changes in cotton under salt stress. *Acta Agron Sin*. 35(4): 588-596.
- Zhang, X., J. Yazaki, A. Sundaresan, S. Cokus, S.W.L. Chan, H. Chen, L.R. Henderson, P. Shinn, M. Pellegrini, S.E. Jacobsen and J.R. Ecker. 2006. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell*. 126(6): 1189-1201.