รายงานโครงการวิจัย

โครงการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อวิจัยพัฒนาพืชและจุลินทรีย์ในสภาวะโลกร้อน

Biotechnology Research and Development of Plants and Microbes under Global Warming Condition

หัวหน้าโครงการวิจัย

นางสุภาวดี ง้อเหรียญ

MRS. SUPHAWADEE NGORIAN

พ.ศ. 2559

รายงานโครงการวิจัย

โครงการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อวิจัยพัฒนาพืชและจุลินทรีย์ในสภาวะโลกร้อน

Biotechnology Research and Development of Plants and Microbes under Global Warming Condition

หัวหน้าโครงการวิจัย

นางสุภาวดี ง้อเหรียญ

MRS. SUPHAWADEE NGORIAN

พ.ศ. 2559

คำปรารภ

รายงานโครงการวิจัยเรื่อง การวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อวิจัยพัฒนาพืชและจุลินทรีย์ในสภาวะโลกร้อน เป็นรายงานผลงานวิจัย ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยตั้งแต่ ตุลาคม 2556 - กันยายน 2558 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1. ศึกษา ค้นหายีนและโคลนยีนที่เกี่ยวข้องความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมหรือสภาวะโลกร้อน และสร้างชุดยีน (plasmid construct) สำหรับนำไปถ่ายฝากเข้าสู่พืช เพื่อใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น การทนต่อสภาวะขาดน้ำของข้าวโพด และ 2. ปรับปรุงพันธุ์พืช และพัฒนาเทคนิคการถ่ายฝากยีนที่เกี่ยวข้องความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมหรือสภาวะโลกร้อน ได้แก่ การถ่ายฝากยีนของข้าวโพดที่ทนต่อการทนสภาวะเครียดหรือสภาวะขาดน้ำในพืชต้นแบบ และปรับปรุงถั่วเหลืองโปรตีนสูงให้ทนต่อความแห้งแล้งมากขึ้น โดยการดัดแปลงและถ่ายฝากยีน Multistress tolerance *OsSKIPa* ด้วยวิธี Ovary Drip ซึ่งผลลัพธ์จากการศึกษาวิจัยนี้ ได้แก่ ข้อมูลการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำ ในข้าวโพด ชุด cassette ยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทนทานต่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม และเทคนิคในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชด้วยวิธีอะโกรแบคทีเรียม และวิธี Ovary drip ซึ่งจะเป็นข้อมูลและเทคนิคที่สำคัญต่อการนำไปพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อเพิ่มศักยภาพในการทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมหรือสภาวะโลกร้อนต่อไปในอนาคต

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานเล่มนี้จะมีประโยชน์แก่นักวิจัย นักวิชาการเกษตร ตลอดจนเกษตรกร และผู้สนใจโดยทั่วไป ที่จะได้ศึกษาและนำเทคโนโลยีที่ได้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

(นางสุภาวดี ง้อเหรียญ)

หัวหน้าโครงการฯ

31 มีนาคม 2559

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
ผู้วิจัย	2
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	3
บทนำ	4
บทคัดย่อ	8
การทดลองที่ 1 การโคลนยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง	10
การทดลองที่ 2 การถ่ายยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนที่ทนต่อสภาวะเครียดในพืชต้นแบบ	30
การทดลองที่ 3 การศึกษาและค้นหายีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NSW3) โดยอาศัยเทคนิค PCR	45
การทดลองที่ 4 การปรับปรุงและถ่ายฝากยีนทนทานสภาพแวดล้อม *OsSKIPa* สู่ถั่วเหลืองโปรตีนสูง โดยเทคนิค Ovary drip	55
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	68
บรรณานุกรม	69

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อวิจัยพัฒนาพืชและจุลินทรีย์ในสภาวะโลกร้อนนี้เริ่มดำเนินการในปี 2557 – 2558 จนบรรลุวัตถุประสงค์ โดยได้รับการสนับสนุนจากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่ให้การสนับสนุนทุนในการศึกษาวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพที่ให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือในการทดลองและปฏิบัติงาน ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ที่อนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ นักวิจัยและผู้ช่วยวิจัยที่ช่วยเหลืองานวิจัยในด้านต่างๆ นอกจากนี้ยังมีผู้ที่ได้ให้การสนับสนุนงานในด้านอื่นๆ แต่มิได้เอ่ยนามไว้ ซึ่งล้วนมีส่วนช่วยส่งเสริมให้โครงการวิจัยนี้ดำเนินงานจนประสบผลสำเร็จ ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ผู้วิจัย

สุภาวดี ง้อเหรียญ — Suphawadee Ngorian

พยุงศักดิ์ รวยอารี — Payungsak Rauyaree

อัจฉราพรรณ ใจเจริญ — Adcharapun Chaicharoen

พงศกร สรรค์วิทยากุล — Pongsagorn Sunvittayagul

อรุโณทัย ซาววา — Aroonothai Sawwa

หทัยรัตน์ อุไรรงค์ — Hathairat Urairong

สุมนา ผ่องใส — Summana Ngampongsai

สุริพัฒน์ ไทยเทศ — Suriphat Thaitad

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ม.ล. = มิลลิลิตร	ก.ก. = กิโลกรัม	ซ.ม. = เซนติเมตร
ชม. = ชั่วโมง	% = เปอร์เซ็นต์	^{o}C = องศาเซลเซียส
µl = ไมโครลิตร	µM = ไมโครโมล	ml = มิลลิลิตร
ng = นาโนกรัม	mg = มิลลิกรัม	g = กรัม

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

ภาวะโลกร้อน (Global Warming) หรือ ภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง (Climate Change) คือ การที่อุณหภูมิเฉลี่ยของโลกเพิ่มขึ้นประมาณ 0.5-1 องศาเซลเซียสต่อปี จากผลของภาวะเรือนกระจก (Greenhouse Effect) ซึ่งมีต้นเหตุมาจากการที่มนุษย์ได้เพิ่มปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไนตรัสออกไซด์ และคลอโรฟลูโรคาร์บอน (CFC) จากการเผาไหม้เชื้อเพลิงต่างๆ การขนส่ง การผลิตในโรงงานอุตสาหกรรม และที่สำคัญจากการตัดไม้ทำลายป่าจำนวนมหาศาล ส่งผลกระทบต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช ซึ่งในปัจจุบันไม่สามารถคาดการณ์ปริมาณน้ำฝนที่ตกในแต่ละปีได้ อาจเกิดสภาวะน้ำท่วมฉับพลัน หรือแห้งแล้งอย่างรุนแรง ผลกระทบจากภาวะโลกร้อนที่เห็นได้ชัดเจนในระยะสั้นในประเทศไทยได้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก การปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ ที่ผ่านมาต้องอาศัยระยะเวลาและการปรับปรุงพันธุ์โดยอาศัยการปรับปรุงแบบปกติ ที่ผ่านมาไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร นักวิจัยจึงพยายามหาหนทางหรือแนวทางการปรับปรุงพันธุ์ โดยอาศัยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการพัฒนาสายพันธุ์พืชกันมากขึ้นทั้งในประเทศ และต่างประเทศ เพื่อช่วยเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำได้ ซึ่งกรมวิชาการเกษตร โดยสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการค้นหาและศึกษากลุ่มยีนการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เป็นการศึกษาหน้าที่ และการทำงานของยีน ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกทางสรีรวิทยาของพืชที่สามารถทนต่อสภาวะขาดน้ำ โดยนำยีนและข้อมูลยีนที่ได้มาใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์พืชให้มีความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำในพืชอื่นๆ ที่ต้องการ เพื่อให้สามารถนำมาใช้ในการลดปัญหาที่เกิดจากภาวะโลกร้อนได้ ซึ่งเป็นเรื่องที่นักวิจัยไทยต้องดำเนินการอย่างเร่งด่วน

พืชมีการปรับตัวทางสรีระวิทยาให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เพื่อให้ตัวมันเองมีความอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมนั้นๆ เช่น การขาดน้ำหรือแห้งแล้ง เป็นต้น การปรับตัวของพืชให้มีการพัฒนาหรือให้เป็นไปตามปกติหรือคงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมดังกล่าวนั้น ต้องมีการแสดงออกของยีนบางชนิด ซึ่งอาจเป็นยีนเดียวหรือกลุ่มยีน (ยีนหลายๆ ชนิดพร้อมกันในสภาวะเดียวกัน) จึงจะทำให้พืชมีการดำรงอยู่ในสภาวะนั้นๆ ได้หรือเกิดความเสียหายน้อยที่สุด ที่ผ่านมานักวิจัยได้ศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในพืช เพื่อให้พืชเกิดการปรับตัวให้คงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี ในปัจจุบัน ข้อมูลยีนหรือกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในสภาวะขาดน้ำหรือแห้งแล้ง ที่ได้จากค้นคว้าวิจัยมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้การนำข้อมูลที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะทนแล้งโดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพนั้นมีความเป็นไปได้มากขึ้น อีกทั้ง จากการศึกษาที่ผ่านมา มีข้อมูลที่แสดงให้เห็นชัดแล้วว่า อุณหภูมิของโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกๆ ปี และพบว่าพืชมีการแสดงออกของยีนที่จำเพาะบางชนิด เพื่อที่จะตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเช่น ขาดน้ำหรือแห้งแล้งได้

ความเสียหายในภาคการเกษตรที่เกิดจากอุณหภูมิผันผวนนั้น ไม่ได้เกิดจากสภาพอากาศที่ร้อนขึ้นเท่านั้น แต่อุณหภูมิกลางคืนที่เย็นมากขึ้นก็จะสร้างความเสียหายได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น ข้าวมีโอกาสเป็นหมันสูงถ้าอากาศหนาวเย็น งานวิจัยต่างประเทศพบว่าอุณหภูมิวิกฤติที่ทำให้เกิดการเป็นหมันจะต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์ อุณหภูมิวิกฤติของข้าวที่ทนหนาวอยู่ระหว่าง 15-17 องศาเซลเซียส ส่วนข้าวที่ไม่ทนหนาวอยู่ระหว่าง17-19 องศาเซลเซียส โดยความเป็นหมันจะรุนแรงขึ้นเมื่อ อุณหภูมิลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่จะไม่แสดงอาการเมื่ออุณหภูมิกลางวันค่อนข้างอุ่นแต่กลางคืนเย็นจัด ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลกระทบดังกล่าวส่งผลให้พืชเกิดสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่เราเรียกว่าสภาวะแวดล้อมอชีวนะ (abiotic stress) ยกตัวอย่างเช่นการ ขาดน้ำของพืช ดินเค็ม เป็นต้น

จากปัญหาการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภูมิอากาศต่างๆ ที่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช ทำให้นักวิจัยเริ่มตระหนักถึงปัญหาดังกล่าว จึงเริ่มศึกษาค้นหาลักษณะทางพันธุกรรมของพืช ที่สามารถทนต่อสภาวะการเปลี่ยนแปลงทางด้านปัจจัยสภาวะแวดล้อมอชีวนะซึ่งข่าววงการวิจัยพืช ได้รายงานในวารสารวิชาการ Science ว่าค้นพบยีนที่ช่วยให้พืชทนต่อสภาพแวดล้อมที่เลวร้าย รวมทั้งความแห้งแล้งและความร้อน Peter McCourt หนึ่งในคณะวิจัยซึ่งเป็นศาสตราจารย์ทางด้านเซลล์และชีววิทยาเชิงระบบ กล่าวว่า "พืชมีระบบฮอร์โมนที่ช่วยให้มันปรับตัวกับความเครียดต่างๆ ได้ หากเราสามารถควบคุมฮอร์โมนเหล่านี้ ก็จะทำให้เราสามารถปกป้องพืชผลทางการเกษตรต่างๆ จากภาวะโลกร้อนได้" การค้นพบครั้งนี้จึงมีความสำคัญต่ออนาคตในการพัฒนาพืชที่มีความทนทานต่อภาวะ โลกร้อนได้ อันที่จริง สิ่งที่นักวิจัยค้นพบในรายงานนี้ ก็เป็นเพียงกุญแจดอกหนึ่งในการไขปริศนาว่าพืชปรับตัวอย่างไรต่อสภาพแวดล้อม ที่รุนแรง กลไกในการปรับตัวของพืชนั้นมีความซับซ้อนมากและยังต้องการการวิจัยขั้นพื้นฐาน (Basic Research) อีกสักระยะเวลาหนึ่ง จนกว่าเราจะสามารถพัฒนาพืชเกษตรทนร้อนได้ (Park *et. Al.,* 2009) จะเห็นได้ว่าฮอร์โมนที่สร้างจากพืชนั้นเป็นสิ่งหนึ่งที่พืชสร้างขึ้นมาจากรหัสพันธุกรรมที่อยู่บนโครโมโซมของมันอยู่แล้ว จึงเป็นแรงกระตุ้นให้นักวิทยาศาสตร์พยายามค้นหายีนที่จะช่วยให้พืชทนต่อภาวะเครียดต่างๆ ที่เกิดขึ้นในปัจจุบัน เพื่อให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ดีในสภาพอากาศเปลี่ยนแปลงในปัจจุบันได้ ดังนั้น การทดลองนี้ได้นำเอายีนที่ค้นหามาจากการทดลอง การโคลนยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง ซึ่งสภาวะการขาดน้ำในพืชส่งผลให้เกิดสภาวะเครียดต่อพืชได้ จึงนำยีนดังกล่าวมาศึกษาการแสดงออกของยีนโดยการถ่ายยีนเข้าพืชต้นแบบยาสูบ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน

ข้าวโพด (*Zea mays* Linn.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย ทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมากและพบข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งในประเทศอีกด้วย ถือได้ว่าเป็นฐานพันธุกรรมในเชิงวิจัยได้เป็นอย่างดี รวมทั้งข้าวโพดเป็นพืชที่มีประโยชน์ทั้งด้านบริโภคและด้านงานวิจัย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นนำเสนอการค้นหายีนหรือกลุ่มยีนที่ได้มีการศึกษาค้นคว้ามาแล้วในพืชชนิดต่างๆ แล้วนำยีนนั้นๆ มาศึกษากับข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งในประเทศไทยว่าข้อมูลที่ได้มีความสอดคล้องหรือแตกต่างกันหรือไม่ เพื่อนำข้อมูลที่ได้นั้นมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีคุณลักษณะทนแล้วได้ต่อไปในอนาคต ทำให้งานวิจัยนี้สามารถให้ข้อมูลในรูปของยีนที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรของประเทศไทยได้ ข้าวโพดเป็นธัญพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลกและของคนไทยที่นิยมรับประทานกันมาก นอกเหนือจากนำมาใช้เป็นอาหารที่รับประทานทั่วไปแล้ว ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์หรือพันธุ์ข้าวโพดไร่ (Field corn) ยังเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เป็นอย่างดี ที่สามารถนำมาใช้เป็นธัญพืชเลี้ยงสัตว์ก่อให้เกิดการส่งออกในรูปเนื้อสัตว์ ส่งผลให้มีมูลค่าเพิ่มมากกว่าการส่งออกในรูปของข้าวโพดเมล็ดโดยตรง ทำให้ข้าวโพดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง ทว่าความต้องการใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ใน

ประเทศมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นมากหลังจากที่มีการขยายอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535 เป็นผลให้การส่งออกเนื้อสัตว์ลดลงตามลำดับ ปัจจุบันการผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์มีความต้องการเพิ่มขึ้นต่อปริมาณความต้องการใช้ภายในประเทศและมีปริมาณไม่แน่นอนเนื่องจากการผลิตขึ้นกับสภาพดินฟ้าอากาศ ทำให้มีความเสี่ยงต่อความเสียหายจากภาวะโลกร้อน ความแห้งแล้งและปริมาณพื้นที่เพาะปลูกที่ต้องแข่งขันกับพืชเศรษฐกิจอื่นๆ ที่ให้ผลตอบแทนที่ดีกว่า ในระยะเวลา 4-5 ปี ที่ผ่านมา ประเทศไทยจำเป็นต้องนำเข้าข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เพื่อให้เพียงพอกับความต้องการใช้ภายในทั้ง ๆ ที่ในอดีต ประเทศไทยเคยเป็นผู้ส่งออกรายใหญ่รายหนึ่งของโลกและมีศักยภาพด้านการผลิตทางการตลาดที่สามารถแข่งขันกับต่างประเทศได้ ดังนั้นจึงควรเร่งรัดการผลิตข้าวโพดภายในประเทศให้เพิ่มมากขึ้นเพียงพอกับความต้องการใช้และมีเหลือส่งออก (เข้าถึงข้อมูลทางระบบอินเทอร์เน็ต บทความเรื่อง “ข้าวโพด” กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (http://www.doae.go.th/plant/corn.htm)

ในปี พ.ศ. 2552 นักวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืช ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ กรมวิชาการเกษตร ได้พัฒนาปรับปรุงข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมพันธุ์ใหม่ชื่อว่า “พันธุ์นครสวรรค์ 3 (NSW3)” ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมที่มีลักษณะทนทานแล้ง (สภาวะขาดน้ำ) ได้ดีเมื่อประสบภาวะแล้งในช่วงออกดอก ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง และโรคราสนิม เก็บเกี่ยวด้วยมือง่าย และให้ปริมาณผลผลิตสูงถึง 1,106 กิโลกรัมต่อไร่ โดยข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์ลูกผสมนี้ ได้มาจากข้าวโพดเลี้ยงสัตว์สายพันธุ์แท้ตากฟ้า 1 (สายพันธุ์แม่) และสายพันธุ์แท้ตากฟ้า 3 (สายพันธุ์พ่อ) ต่อมาศูนย์ฯ ได้จัดทำโครงการนำร่อง เพื่อความร่วมมือในการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมทนทานแล้งนครสวรรค์ 3 ในเชิงพาณิชย์ โดยในปี 2551-2552 ที่ผ่านมา สามารถผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมพันธุ์นครสรรค์ 3 ได้ประมาณ 190 ตัน นำไปส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกได้ประมาณ 63,634 ไร่ (เข้าถึงข้อมูลทางระบบอินเทอร์เน็ต เรื่อง “ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์นครสวรรค์ 3 ผลงานวิจัยดีเด่นกรมวิชาการเกษตร จดหมายข่าว ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ ฉบับเดือนมิถุนายน 2553) (http://nsfcrc-news.blogspot.com/2010/06/hk.html) สร้างรายได้ให้แก่เกษตรกร กลุ่มเกษตรกร สหกรณ์การเกษตร และบริษัทผลิตภัณฑ์รายย่อยได้เป็นอย่างดี โดยสามารถนำไปผลิตเป็นเมล็ดพันธุ์จำหน่าย ช่วยลดต้นทุนการผลิตได้ อย่างไรก็ตาม แม้ว่าข้อมูลทางสรีระวิทยาของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมพันธุ์นครสวรรค์ 3 ในด้านทนแล้งหรือสภาวะขาดน้ำนั้น ได้ผ่านการศึกษามาเป็นอย่างดี แต่ข้อมูลเกี่ยวกับแบบแผนการแสดงของยีนหรือกลุ่มยีน (Gene expression profiling) ที่ควบคุมการแสดงออกทางสรีระวิทยาดังกล่าวยังมีอยู่น้อยมาก ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษายีนหรือกลุ่มยีนที่แสดงออกหรือควบคุมลักษณะทนแล้งของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 โดยอาศัยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล ในงานวิจัยปี พ.ศ. 2554 ถึง 2556 ที่ผ่านมาได้ทำการศึกษาการค้นหายีนหรือกลุ่มยีนที่แสดงออกในสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 โดยอาศัยวิธีการผลิตซีดีเอ็นเอไลบรารี่ การออกแบบไพรเมอร์ยีนทนแล้งเพื่อทำการโคลนยีน การหาลำดับเบสและนำข้อมูลยีนที่ปรากฏไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากลในภายหลัง ซึ่งนับได้ว่าเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ โดยสามารถเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับยีนที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูลชีวภาพสากล ทว่าวิธีการดังกล่าวอาศัยขั้นตอนและวิธีการที่ซับซ้อน อาศัยผลการวิเคราะห์เชิงสถิติกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล และมีข้อจำกัดอยู่ที่ผลที่ได้นั้น จำกัดหรือเน้นยีนที่แสดงออกในจำนวนชุดของยีนที่ซ้ำๆกัน (high copy number) เท่านั้น ส่วนยีนที่แสดงออกแบบ low copy number (ซึ่งอาจมีความเกี่ยวข้องกับลักษณะทนแล้งหรือยีนที่มีความสำคัญ) อาจปรากฏออกมาได้น้อยโดยวิธีการดังกล่าว ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงได้นำเทคโนโลยีด้านการโคลนยีนมาประยุกต์ใช้ในการ

ค้นหาและศึกษาคุณสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพด และสามารถนำยีนที่ได้ไปถ่ายฝากลงในพืชเศรษฐกิจอื่นๆ เพื่อให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำต่อไป

ถั่วเหลือง (*Glycine max (L.) Merrill*) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย มีคุณค่าทางอาหารสูงและเป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมการผลิต โดยมีผลิตภัณฑ์ต่างๆ มากมาย เช่น น้ำมัน ถั่วเหลือง นมถั่วเหลือง เต้าหู้ และสารชูรส เป็นต้น ลักษณะทางการเกษตรของเมล็ดถัวเหลือง เช่น ปริมาณโปรตีน ในเมล็ดและขนาดเมล็ด เป็นส่วนสำคัญหรือมีบทบาทในการเป็นสิ่งบ่งชี้คุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารจากถั่วเหลือง (Clake and Wiseman, 2000; Friedman and Brandon, 2001) การนำถั่วเหลืองไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร ถั่วเหลืองที่ใช้เป็นวัตถุดิบจะต้องมีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่า 36% อนึ่งปัญหาการลดลงของพื้นที่ปลูกถั่วเหลืองในประเทศไทย เนื่องจากผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดถั่วเหลืองไม่แน่นอน และสภาพอากาศที่ไม่เอื้ออำนวย อุณหภูมิโลกที่สูงขึ้น ความแห้งแล้ง และฝนที่ไม่ตกตามฤดู ส่งผลกระทบต่อปริมาณการผลิตและคุณภาพของถั่วเหลือง ในขณะที่ความต้องการถั่วเหลืองสำหรับแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพิ่มขึ้น

การถ่ายฝากหรือการปรับปรุงยีนทนแล้ง หรือยีนซึ่งช่วยในการปรับตัวต่อสภาพอากาศที่ไม่เอื้ออำนวย เป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวได้ โดยช่วยเพิ่มผลผลิตทำให้ผลผลิตถั่วเหลืองมีปริมาณคงที่ ไม่จำเป็นต้องใช้ปุ๋ยเคมี รวมถึงยาฆ่าแมลงเกินความจำเป็นซึ่งอาจก่อให้เกิดสารตกค้างเป็นอันตรายต่อสุขภาพได้ และแม้ในสภาพอากาศที่แห้งแล้ง ปริมาณน้ำไม่เพียงพอ ถั่วเหลืองก็ยังเจริญเติบโตได้ ยีน *OsSKIPa* เป็นยีนที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง โดยพบ Homologue ของยีนชนิดนี้อยู่ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด จนถึงพืชบางชนิด เช่น ข้าว สิ่งนี้แสดงให้เห็นว่า gene ชนิดนี้มีความสำคัญและถูก reserve ไว้ระหว่างวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ยีนชนิดนี้ช่วยในการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการดำรงชีวิต ความทนแล้ง และยีนตัวนี้อาจเป็นยีนที่ช่วยเพิ่ม “ความสามารถในการมีชีวิตอยู่และเจริญเติบโตได้ของเซลล์” หรือ Cell viability อีกด้วย ทั้งนี้นอกจากจะทำการถ่ายฝากยีน Stress tolerance เพื่อปรับปรุงความทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การเพิ่มผลผลิตและปริมาณโปรตีนของถั่วเหลืองแล้ว จะมีการนำเทคนิค Ovary drip มาใช้กับ Linear gene cassette ซึ่งจะช่วยลดขั้นตอนความยุ่งยากต่างๆ ในการทำ Tissue cell culture, plant regeneration ของถั่วเหลืองซึ่งทำได้ยาก ซับซ้อน และต้องใช้ผู้ที่ได้รับการฝึกฝนมาเฉพาะด้านในการดำเนินการ นอกจากนี้การใช้ Linear gene cassette แทนการสร้างเวคเตอร์ จะช่วยลด DNA ปนเปื้อนที่จะทำการถ่ายฝากเข้าสู่พืชด้วย เช่น ลดการใช้ยีนคัดเลือกต่างๆ อาทิยีนซึ่งช่วยให้พืชทนทานต่อ Antibiotic เป็นต้น

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้ นอกจากจะช่วยตอบโจทย์ในการศึกษาวิจัยแล้ว ยังสามารถนำเทคนิคสมัยใหม่ที่มีประสิทธิภาพและเทคนิคที่มีความปลอดภัยทางชีวภาพ (Biosafety) มาใช้ในการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจต่างๆ ให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมหรือสภาวะโลกร้อน อีกทั้งยังสามารถนำไปเป็นต้นแบบสู่การวิจัยต่อไปในอนาคตอีกด้วย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษา ค้นหายีน และโคลนยีนที่เกี่ยวข้องความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมหรือสภาวะโลกร้อน และสร้างชุดยีน (plasmid construct) สำหรับนำไปถ่ายฝากเข้าสู่พืช เพื่อใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น การทนต่อสภาวะขาดน้ำของข้าวโพด

2. เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืช และพัฒนาเทคนิคการถ่ายฝากยีนที่เกี่ยวข้องความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมหรือสภาวะโลกร้อน ได้แก่ การถ่ายฝากยีนของข้าวโพดที่ทนต่อการทนสภาวะเครียดหรือสภาวะขาดน้ำในพืชต้นแบบ และปรับปรุงถั่วเหลืองโปรตีนสูงให้ทนต่อความแห้งแล้งมากขึ้น โดยการดัดแปลงและถ่ายฝากยีน Multistress tolerance *OsSKIPa* ด้วยวิธี Ovary Drip

วิธีการวิจัย

1. การศึกษาหายีนทนแล้งเพื่อเตรียมไว้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้ง โดยการศึกษาหน้าที่ของยีน กลไกลการทำงานของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำ ทำการโคลนยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง และสร้างชุด cassette ของยีนที่โคลนได้ จากนั้นถ่ายฝากชุดยีนดังกล่าวเข้าสู่พืชต้นแบบ (ยาสูบ) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทนต่อสภาวะเครียดในพืชต้นแบบ (ยาสูบ) ในสภาพห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การทนต่อสภาวะเค็ม โดยใช้เกลือ (NaCl) และการทนต่อสภาวะขาดน้ำ โดยใช้ PEG6000 เปรียบเทียบระหว่างต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนกับต้นยาสูบปกติ

2. การศึกษาและค้นหายีน/กลุ่มยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NSW3) โดยอาศัยเทคนิค PCR จากนั้นศึกษาการแสดงออกของยีน/กลุ่มยีนดังกล่าว โดยการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ปรากฏระหว่างข้าวโพดที่ควบคุมการให้น้ำ (treatment) และข้าวโพดที่ให้น้ำปกติ (control) เพื่อหาความแตกต่างของการแสดงออกของยีน (up-regulated, down-regulated genes) ระหว่างสองกลุ่มตัวอย่าง

3. การปรับปรุงและถ่ายฝากยีนทนทานสภาพแวดล้อม *OsSKIPa* สู่ถั่วเหลืองโปรตีนสูง โดยเทคนิค Ovary drip และการตรวจสอบความสามารถในการทนแล้งของถั่วเหลืองที่ได้รับการถ่ายฝากยีนในสภาพห้องปฏิบัติการ นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองพันธุ์ปกติ

บทคัดย่อ

สภาวะโลกร้อน (Global Warming) หรือ สภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง (Climate Change) ส่งผลกระทบต่อพื้นที่เกษตรกรรมโดยตรงทั้งปัญหาโรคพืช แมลงศัตรูพืช และสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น สภาวะขาดน้ำ ดินเค็ม และน้ำท่วมฉับพลัน เป็นต้น โครงการวิจัยนี้วัตถุประสงค์เพื่อ 1. ค้นหายีนและโคลนยีนที่เกี่ยวข้องความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และสร้างชุด cassette ยีน สำหรับนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม และ 2. เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชและพัฒนาเทคนิคการถ่ายฝากยีนที่เกี่ยวข้องความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยใช้เทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่พืชและเทคนิค Ovary Drip งานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง ได้แก่ ยีน *SINA3* และ *SINAT3* จากข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง 4 พันธุ์ ได้แก่ ตากฟ้า 1 (TF1), ตากฟ้า 3 (TF3), นครสวรรค์ 3 (NS3) และ นครสวรรค์ 1 (NS1) โดยใช้เทคนิค RT–PCR พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณยีน *SINA3* และ *SINAT3* มีขนาดเท่ากับ 1,026 คู่เบส และ 1,050 คู่เบส ตามลำดับ สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีนได้เท่ากับ 341 และ 349 amino acids จากนั้นทำการสร้างชุด cassette ยีน โดยการเชื่อมต่อชิ้นยีน *ZmSINA3* และ *ZmSINAT3* เข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) ที่ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ได้พลาสมิดสายผสม pCAMBIA2300 – *ZmSINA3* และ pCAMBIA2300 – *ZmSINAT3* มีขนาด 10.6 และ 10.7 กิโลเบส ตามลำดับ และได้มีการนำชุด cassette ยีน pCAMBIA2300 – *ZmSINA3* ไปถ่ายฝากยีนเข้าสู่พืชต้นแบบ (ยาสูบ) เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่ทนต่อสภาวะเครียดในยาสูบ โดยการเพาะเลี้ยงยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *SINA3* บนอาหารสูตร MS ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ สภาวะขาดน้ำ เติม PEG 6000 ความเข้มข้น 0, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และสภาวะเครียดเกลือ เติม NaCl ความเข้มข้น 0, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เปรียบเทียบกับยาสูบปกติที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 และ NaCl ระดับความเข้มข้นเดียวกันเป็นชุดควบคุม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน พบว่า ต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับต้นยาสูบชุดควบคุม ทั้งน้ำหนักสด ความสูงของต้น และจำนวนใบ แสดงว่ายีน *SINA3* ที่ถ่ายฝากเข้าสู่ยาสูบ แบบ over expression นั้น ไม่สามารถทนทานต่อสภาวะเครียดเกลือและสภาวะขาดน้ำได้ งานวิจัยการศึกษาและค้นหายีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NSW3) โดยอาศัยเทคนิค PCR พบว่า เมื่อนำ cDNA ของใบข้าวโพดขาดน้ำนาน 7 วัน และ cDNA จากใบข้าวโพดให้น้ำปกติ (control) มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ arbitrary ACP primers จำนวน 12 ไพรเมอร์ สามารถตรวจหาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันได้ (differentially expressed genes) และพบ ACP primers จำนวน 2 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเอของยีนที่แตกต่างกันชัดเจนที่สุด (up-regulated) ได้แก่ ACP2 และ ACP12 ซึ่งข้อมูลที่ได้อาจนำไปสู่การศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในพืชและพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้งต่อไป สำหรับงานวิจัยการปรับปรุงและถ่ายฝากยีนทนทานสภาพแวดล้อม *OsSKIPa* สู่ถั่วเหลืองโปรตีนสูงโดยเทคนิค Ovary drip นั้นเป็นการพัฒนาเทคนิคในการถ่ายยีน ซึ่งเป็นเทคนิคใหม่ที่มีประโยชน์อย่างมากเพราะสามารถลดข้อกังวลที่เกิดจากการใช้เวคเตอร์ เช่น ยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะและยีนที่ไม่พึงประสงค์อื่นๆ ซึ่งจะติดมากับเวคเตอร์ ในขณะที่

linear gene cassette ที่ออกแบบไว้จะมีเพียงยีนที่เราต้องการเท่านั้น งานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบ linear gene cassette ของยีน *OsSKIPa* สำหรับใช้ในการถ่ายฝากยีนเข้าสู่ถั่วเหลืองโดยวิธีการ Ovary drip ผลจากการถ่ายยีน *OsSKIPa* เข้าสู่ถั่วเหลืองพันธุ์ไทยนี้ยังไม่พบ Insert จาก linear gene cassette ในถั่วเหลืองรุ่นลูกที่ได้รับการถ่ายยีนโดยวิธีดังกล่าวซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากสภาวะแวดล้อมและอุณหภูมิของประเทศไทยที่ไม่เหมาะสมต่อวิธีการดังกล่าวและทำให้ไม่เกิดการถ่ายยีน

Abstract

Global warming or climate change is a directly affect to agricultural crops, diseases, insect pests and abiotic stress such as drought salinity and flooding, etc. This research study aimed to (1.) gene discovery and clone to abiotic stress and invent expression cassette for applying to plant variety improvement particularly against abiotic stress; and (2.) plant variety improvement and gene transfer technique improvement to abiotic stress by plant gene transfer and ovary drip techniques. In this study, two full-length cDNA sequences of corn (*Zea mays* L.) encoded to *Zm*SINA3 and *Zm*SINAT3 were isolated from four corn variety names TAKFA 1, TAKFA 3, NAKORNSAWAN 3 and NAKORNSAWAN 1 via RT – PCR based method. The SINA3 and SINAT3 gene sequence contains a fragment of 1,026 and 1,050 bp complete ORF, encoded to 341 and 349 amino acids polypeptide. A 1,026 bp and 1,050 bp fragment of *Zm*SINA3 and *Zm*SINAT3 gene were inserted into plant expression vector pCAMBIA2300 containing 35SCaMV promoter and NOS terminator. *NPT*II was used as a selectable marker in this selection. It were found that the total size of derived over – expression cassette (pCAMBIA2300 – *Zm*SINA3 and pCAMBIA2300 – *Zm*SINAT3) were 10.6 and 10.7 kb. The SINA3 gene was constructed into a plant expression vector and transformed into *Nicotiana tabacum*. Transgenic tobaccos were grown in MS medium. Drought was induced by adding Polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) to the culture medium at concentrations of 0, 10, 15, 20 and 25 % (w/v), while salinity was induced by adding sodium chloride (NaCl) to the medium at concentrations of 0, 1, 1.5, 2, 2.5 and 3 % (w/v). The plant growth parameters were analyzed after 30 days in culture. Differentiation fresh weight, number of leaves and shoot length of the transgenic plants were similar to those of wild-type plants. The result showed that overexpression of *SINA3* gene do not tolerant to salt and drought stresses in transgenic tobacco. The research project of genes discovery expressed in response to drought stress in the drought tolerant Maize (NSW3 variety) by PCR technique, we have used an annealing control primer (ACP) based reverse transcription polymerase chain reaction to identify drought-stress-induced differentially expressed genes in cDNA of maize leaves at 7 days after water depletion and cDNA from maize leaves to usually water (control) using 12 ACP-based RT-PCR screening method, two up-regulated ACPs were identified which were ACP2 and ACP12. The information might be helpful for better understanding of drought stress mechanism in maize to further gaining information about the plant genetic improvement for drought tolerance in plant. The research project of genetic manipulation and gene insertion of *OsSKIPa*, a multistress tolerance gene to high protein soybean using ovary drip transformation, we have the development of direct transformation become very useful and more attractive to researcher because of the concerning on using genetic maker in the vector such as antibiotic gene or other illegal inserts. With directed transformation method, linear gene cassette will be

the only insert to plant genome. This study is intended to transform drought resistance gene *OsSKIPa* to soybean via Ovary drip. The experiment was done successfully with the synthesis of linear gene cassette and development of the protocol via remove mostly styles and direct DNA drip to the soybean flower. Despite all efforts and many tries, the transformation frequencies come out o% and no Insert found in F1 Thai soybean cultivar which may cause from high temperature and inappropriate environment & condition.

การทดลองที่ 1

การโคลนยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง

Cloning of Drought Stress Gene in *Zea mays* (L.)

สุภาวดี ง้อเหรียญ พยุงศักดิ์ รวยอารี อรุโณทัย ซาววา หทัยรัตน์ อุไรรงค์

Suphawadee Ngorian Payungsak Rauyaree Aroonothai Sawwa Hathairat Urairong

คำสำคัญ (Key words)

การโคลนยีน (cloning) สภาวะขาดน้ำ (drought stress) ข้าวโพด (*Zea mays* L.), เวคเตอร์ (plant expression vector), ชุด cassette ยีน (gene cassette)

บทคัดย่อ

การโคลนยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีนและศึกษาคุณสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำในพืช สำหรับนำไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์พืชให้มีศักยภาพในการให้ผลผลิตและสามารถทนต่อสภาวะเครียดอันเกิดจากภาวะขาดน้ำในพืชได้ ซึ่งยีนที่ทำการโคลนในครั้งนี้ได้แก่ ยีน *SINA3* และ *SINAT3* เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม E3 ubiquitin ligase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดของพืช โดยการควบคุมการเปลี่ยนแปลงกระบวนการถอดรหัส (responsive transcription factors) ที่จำเป็นสำหรับการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะเครียดและการควบคุมกิจกรรมของโปรตีนต่างๆ สำหรับนำไปใช้ภายในเซลล์พืช งานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีน *SINA3* และ *SINAT3* จากข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *SINA3* และ *SINAT3* นำมาทำปฏิกิริยา RT–PCR กับอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพด 4 พันธุ์ ได้แก่ ตากฟ้า 1 (TF1), ตากฟ้า 3 (TF3), นครสวรรค์ 3 (NS3) และ นครสวรรค์ 1 (NS1) ได้ยีน *SINA3* และ *SINAT3* มีขนาดเท่ากับ 1,026 คู่เบส และ 1,050 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีนโดยใช้โปรแกรม EMBL-EBI database พบว่า ยีน *SINA3* และ *SINAT3* ที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Open Reading Frame (ORF) จำนวน 1 exon สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน *SINA3* และ *SINAT3* เท่ากับ 341 และ 349 amino acids เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีน *SINA3* ที่โคลนได้จากข้าวโพดมีความเหมือนอย่างสูงกับยีนในกลุ่ม E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays* L.) (EF434383.1) และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic*a (L.) Beauv.) (XM003572636.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SINAT3* ที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays* L.) (EU966994.1) และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic*a (L.) Beauv.) (XM004960614.1) โดยมีค่าความเหมือน (% Max Identities) เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ จากนั้นทำการสร้างชุด cassette ยีน โดยการเชื่อมต่อชิ้น

ยีน *ZmSINA3* และ *ZmSINAT3* เข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) ที่ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ได้พลาสมิดสายผสม pCAMBIA2300 – *ZmSINA3* และ pCAMBIA2300 – *ZmSINAT3* มีขนาด 10.6 และ 10.7 กิโลเบส ตามลำดับ สามารถนำชุดยีนดังกล่าวไปศึกษาการแสดงออกของยีนโดยการถ่ายฝากยีนเข้าสู่พืชต้นแบบ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับนำไปพัฒนาพันธุ์พืชเศรษฐกิจที่สนใจ เช่น ถั่วเหลือง ข้าวโพด อ้อย ฯลฯ เพื่อเพิ่มศักยภาพการทนต่อสภาวะขาดน้ำต่อไปในอนาคต

Abstract

SINA3 and *SINAT3* genes is an E3 ubiquitin ligase enzyme that plays a critical role in regulating plant responses to abiotic stresses such as drought, temperature fluctuations, high salinity, radiation and nutrient deprivation adversely affect growth, development and productivity. In this study, two full-length cDNA sequences of corn (*Zea mays* L.) encoding *ZmSINA3* and *ZmSINAT3* have been isolated from four corn variety names TAKFA 1, TAKFA 3, NAKORNSAWAN 3 and NAKORNSAWAN 1 via RT – PCR based method with SINA3 (forward) + SINA3 (reverse) and SINAT3 (forward) + SINAT3 (reverse). The *SINA3* and *SINAT3* gene sequence contains a fragment of 1026 and 1050 bp complete ORF, encoded for 341 and 349 amino acids polypeptide. The highly conserved region of the gene is E3 ubiquitin protein ligase which are also found in monocots *Zea mays* L. (EF434383.1, EU966994.1) and *Setaria italic*a (L.) Beauv. (XM003572636.1, XM004960614.1) with 99% and 90% of homology respectively. A 1,026 bp and 1,050 bp fragment of the *ZmSINA3* and *ZmSINAT3* gene was inserted into plant expression vector pCAMBIA2300 containing 35SCaMV promoter and NOS terminator, nptII as selectable marker with total size of 10.6 and 10.7 kb for pCAMBIA2300 – *ZmSINA3* and pCAMBIA2300 – *ZmSINAT3* over – expression cassette.

บทนำ

สภาวะโลกร้อน (Global Warming) หรือ สภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง (Climate Change) คือ การที่อุณหภูมิเฉลี่ยของโลกเพิ่มขึ้นประมาณ 0.5-1 องศาเซลเซียสต่อปี จากผลของภาวะเรือนกระจก (Greenhouse Effect) และปรากฏการณ์เอลนิโน (ELNINO) ซึ่งเป็นหนึ่งในวิกฤติการณ์ที่ส่งให้อากาศในโลกร้อนขึ้นเรื่อยๆ สภาวะอากาศเปลี่ยนแปลงไปอย่างไม่เคยพบมาก่อน เช่น ฤดูหนาวที่สั้นลง ฤดูร้อนที่ยาวนานขึ้น ภาวะภัยแล้ง และอุทกภัยที่เกิดบ่อยครั้งและรุนแรงขึ้นส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต ตลอดจนพืชผลทางการเกษตร ความรุนแรงของภัยแล้งขึ้นกับความชื้นในอากาศ ความชื้นในดินและระยะเวลาที่เกิดความแห้งแล้ง ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา นอกจากประเทศไทยจะประสบกับปัญหาอุทกภัยที่รุนแรงแล้ว ปัญหาการขาดน้ำทั้งด้านอุปโภคบริโภค และการเกษตร ซึ่งอาจทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโต และพื้นที่การเกษตรเสียหาย ซึ่งมีต้นเหตุมาจากการที่มนุษย์ได้เพิ่มปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไนตรัสออกไซด์ และคลอโรฟลูโรคาร์บอน (CFC) จากการเผาไหม้เชื้อเพลิงต่างๆ การขนส่ง การผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมและที่สำคัญจากการตัดไม้ทำลายป่าจำนวนมหาศาล ส่งผลกระทบต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช (http://www.baanjomyut.com/library/global_warming) ซึ่งในปัจจุบันไม่สามารถคาดการณ์ปริมาณน้ำฝนที่ตกในแต่ละปีได้ อาจเกิดสภาวะน้ำท่วมฉับพลัน หรือแห้งแล้งอย่างรุนแรง ผลกระทบจากภาวะโลกร้อนที่เห็นได้ชัดเจนในระยะสั้นในประเทศไทยได้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก

การตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำของพืชในระดับยีน จากการศึกษาในพืชชนิดต่างๆ พบว่า มียีนจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนแล้งและการตอบสนองต่อสภาวะแล้งของพืชจะชักนำให้มีการแสดงออกของยีนต่างๆ การศึกษาการแสดงออกของยีนต่อสภาวะขาดน้ำ สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มสำคัญ คือ (1) กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับ signal transduction pathways (STPs) และการควบคุมการถอดรหัส (2) กลุ่มยีนที่ป้องกันเมมเบรนและฟังก์ชันของโปรตีน และ (3) กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมน้ำ ไอออน และการขนส่ง (Vierling, 1991; Ingram and Bartels, 1996; Smirnoff, 1998; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000) และพบว่ายีนที่ถูกชักนำให้แสดงออกในช่วงที่พืชเผชิญสภาวะขาดน้ำ มีหน้าที่หลัก 2 ด้านคือ ช่วยป้องกันเซลล์จากการขาดน้ำ และช่วยควบคุมการแสดงออกของยีนระหว่างที่พืชอยู่ภายใต้ภาวะเครียดจากการขาดน้ำ

การปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ ที่ผ่านมาต้องอาศัยระยะเวลา และการปรับปรุงพันธุ์โดยอาศัยการปรับปรุงแบบปกติ ที่ผ่านมาไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร นักวิจัยจึงพยายามหาหนทางหรือแนวทางการปรับปรุงพันธุ์ โดยอาศัยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการพัฒนาสายพันธุ์พืชกันมากขึ้นทั้งในประเทศ และต่างประเทศ เพื่อช่วยเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำได้ ซึ่งกรมวิชาการเกษตร โดยสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการค้นหาและศึกษากลุ่มยีน การแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เป็นการศึกษาหน้าที่การทำงานของยีน และค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกทางสรีรวิทยาของพืชที่สามารถทนต่อสภาวะขาดน้ำ โดยนำยีนและข้อมูลยีนที่ได้มาใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์พืชให้มีความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำในพืชเศรษฐกิจอื่นๆ ที่ต้องการ

เพื่อให้สามารถนำมาใช้เป็นพืชทางเลือกในการลดปัญหาที่เกิดจากภาวะโลกร้อนได้ ซึ่งเป็นเรื่องที่นักวิจัยไทยต้องดำเนินการอย่างเร่งด่วน

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงได้นำเทคโนโลยีด้านการโคลนยีนมาประยุกต์ใช้ในการค้นหาและศึกษาคุณสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพด และสามารถนำยีนที่ได้ไปถ่ายฝากลงในพืชเศรษฐกิจอื่นๆ เพื่อให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย

ประเด็นวิจัย : เป็นการศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลยีน/กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำในพืช โดยทำการโคลนยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำจากข้าวโพด และสร้างชุด cassette ยีน สำหรับนำไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชที่สนใจ เพื่อเพิ่มศักยภาพในการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้

สถานที่ทดลอง : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ระยะเวลาทำการวิจัย : ตุลาคม 2556 - กันยายน 2557

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

ได้คัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดที่มีลักษณะทนแล้ง ได้แก่ พันธุ์ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และนครสวรรค์ 1 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ โดยนำเมล็ดพันธุ์มาปลูกในกระถางที่เตรียมไว้ รดน้ำ 2 – 3 วัน/ครั้ง เมื่ออายุประมาณ 45 วัน งดให้น้ำ นำใบอ่อนมาสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อหาส่วนของยีนที่มีการแสดงออก

2. ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *SINA3* และ *SINAT3*

ทำการศึกษา และค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพด ได้แก่ ยีน SINA3 และ SINAT3 ที่มีรายงานในพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต (www.ncbi.nim.nih.gov/) นำมาวิเคราะห์ลำดับเบสที่มีความเหมือนกันอย่างสูง (conserve region) โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 Multiple Alignment (European Bioinformatics Institute, UK) ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *SINA3* และ *SINAT3* คือ SINA3 (forward) SINA3 (reverse) SINAT3 (forward) และ SINAT3 (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน *SINA3* และ *SINAT3* คือ SINAXbaI (forward) SINAKpnI (reverse) SINATXbaI (forward) และ SINATKpnI (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการเชื่อมต่อของชิ้นยีน *SINA3* และ *SINAT3* เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) คือ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) **(ตารางที่ 1)**

3. การโคลนยีน *SINA3* และ *SINAT3* ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน

3.1 การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

ตัวอย่างข้าวโพดที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และ นครสวรรค์ 1 เมื่ออายุได้ 45 วัน งดให้น้ำ นำมาสกัดอาร์เอ็นเอรวม โดยใช้ MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (BIONEER Corporation) ตัดใบอ่อนของข้าวโพดประมาณ 5 มิลลิกรัม บดในโกร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง ย้ายตัวอย่างลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Tissue and Cell Lysis Solution 300 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 65°C นาน 15 นาที เขย่าทุกๆ 5 นาที วางตัวอย่างบนน้ำแข็งนาน 3 – 5 นาที เติม MPC Protein Precipitation Reagent 150 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 10 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ย้ายส่วนใสใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 30 – 40 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสออกให้หมด ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย DNaseI Solution 200 ไมโครลิตร บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 – 30 นาที เติม MPC Protein Precipitation Reagent 200 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 10 วินาที วางตัวอย่างบนน้ำแข็ง นาน 3 – 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ย้ายสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 30 – 40 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% Ethanol 300 ไมโครลิตร (ทำ 2 ครั้ง) เอา Ethanol ออกให้หมดโดยใช้ไปเปตละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย TE buffer 35 ไมโครลิตร แล้วเติม Script Guard RNase Inhibitor 1 ไมโครลิตร เพื่อยับยั้งไม่ให้อาร์เอ็นเอถูกย่อย วัดค่าความเข้มข้น (O.D.) ของสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่ -80°C จนกว่าจะใช้งาน

3.2 การสังเคราะห์ cDNA จาก total RNA โดยวิธี RT–PCR

ทำการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ โดยใช้ SuperScrip™ III One–Step RT–PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) ด้วยวิธี One–Step RT–PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน SINA3 คือ SINA3 (forward) และ SINA3 (reverse) และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน SINAT3 คือ SINAT3 (forward) และ SINAT3 (reverse) ในปริมาตรของปฏิกิริยาพอลิเมเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลาย total RNA 10 นาโนกรัม – 1 ไมโครกรัม, 10 μM Gene Specific Primer (forward), 10 μM Gene Specific Primer (reverse), 2X Reaction Mix, 2U SuperScript™III RT/Platinum Taq Mix นำปฏิกิริยาเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR (Thermal Cycle 9700) โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre–Denature 55°C 30 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94°C 2 นาที จำนวน 1 รอบ และ

ตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 15 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 68°C 3 นาที จำนวน 40 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 68°C 5 นาที อีก 1 รอบ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4°C และนำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.3 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *SINA3* และ *SINAT3* เข้ากับเวกเตอร์ และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

3.3.1 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *SINA3* และ *SINAT3* เข้ากับเวกเตอร์ และการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

นำผลผลิต PCR มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) นำมาแยกด้วย 0.8% low melting gel แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex Bio Science Rockland, Inc) จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอบนเครื่อง Dark Reader Transilluminators ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจลที่ได้เติม QG Buffer 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C นาน 1 ชั่วโมง เขย่าแรงๆ ทุก 2 นาที จนเจลละลายหมด เติม Isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน ย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ใน Binding Column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม EB Buffer (อุ่นที่อุณหภูมิ 50 – 60°C) 30 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ T&A Cloning Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ในปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Gel-purified PCR product 4 ไมโครลิตร, T&A Cloning vector 2 ไมโครลิตร, Ligation Buffer A 1 ไมโครลิตร, Ligation Buffer B 1 ไมโครลิตร, T4 DNA Ligase 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 22°C เป็นเวลา 15 – 30 นาที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นานข้ามคืน จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยนำปฏิกิริยา ligation จำนวน 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป heat – shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที (ไม่ต้องเขย่า) นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไป spread บนอาหารแข็ง LB (เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15 กรัม Bacto-Agar, ddH_2O) เติมสารปฏิชีวนะ amplicillin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

3.3.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน *SINA3* และ *SINAT3* ในเวกเตอร์

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้นส่วนของยีนสอดแทรกอยู่ นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ amplicillin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที นาน 12 – 16 ชั่วโมง นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์ละลาย เติม Lysis Solution 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง เติม Neutralization Solution 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นย้ายสารละลายเซลล์ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร เพื่อล้าง column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้นาน 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การตรวจสอบการปรากฏของยีน SINA3 และ SINAT3 โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 – 200 นาโนกรัม, 1X FastDigest Buffer, 0.5U FastDigest Enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที นำมาตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis

3.5 การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA Sequencing)

นำตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน SINA3 และ SINAT3 มาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้สารเคมี ABI PRISM® BigDye® Terminator Cycle Sequencing V3.1 Kit (Perkin-Elmer) ร่วมกับไพรเมอร์ M13 (forward) 5′ – GTA AAA CGA CGG CCA GT – 3′ และ M13 (reverse) 5′ –GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G – 3′ ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, BigDye™ 2 ไมโครลิตร, Ready Reaction buffer 1 ไมโครลิตร, 5 ไมโครโมล ไพรเมอร์ Forward / Reverse และ ddH_2O 3.4 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยา cycle sequencing ที่ได้ เข้าเครื่อง Thermal Cycler 9700 โดยตั้งรอบปฏิกิริยาดังนี้ Denaturation 96°C 10 วินาที, Annealing 50°C 5 วินาที, Extention 60°C 4 นาที จำนวน 25 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) หลังจากนั้นทำการล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำผลผลิตที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Solution A (ddH_2O 16 ไมโครลิตร: 95% ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย

70% Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งในที่มืด จากนั้นละลายตะกอนด้วย Hidi-formamide 10 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากันในหลอด นำไปปั่นให้ดีเอ็นเอตกที่ก้นหลอด นำตัวอย่างใส่หลอด Septa บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 2 นาที และแช่ไว้บนน้ำแข็งทันที นำตัวอย่าง load เข้าเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

4. การสร้างชุด cassette ยีน และการตรวจสอบการปรากฏของยีน *SINA3* และ *SINAT3*

4.1 การสร้างชุด cassette ยีน

4.1.1 การเพิ่มปริมาณยีน *SINA3* และ *SINAT3* จากพลาสมิดดีเอ็นเอของข้าวโพด โดยวิธี PCR

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *SINA3* และ *SINAT3* ไปเพิ่มปริมาณส่วนที่ต้องการในหลอดทดลองกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *SINA3* คือ SINAXbaI (forward) และ SINAKpnI (reverse) และยีน *SINAT3* คือ SINATXbaI (forward) และ SINATKpnI (reverse) ซึ่งได้เติมลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I เพื่อบังคับทิศทางของการเชื่อมต่อชิ้นยีน โดยใช้ Hot Start Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) ในปริมาตรของปฏิกิริยาพอลิเมเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, 0.5U HotStart Taq Master Mix, 0.4 µM Gene Specific Primer (forward), 0.4 µM Gene Specific Primer (reverse) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre–Denature 93°C 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 30 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 68°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4°C และตรวจวิเคราะห์ผล โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transiluminators พร้อมบันทึกภาพ

4.1.2 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *SINA3* และ *SINAT3* เข้ากับ Plant Expression Vector

นำพลาสมิด pCAMBIA2300 ที่มีส่วนประกอบของโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ซึ่งมีขนาด 9,648 คู่เบส มาใช้เป็น Plant Expression Vector มียีน nptII (kanamycin) เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก และชิ้นดีเอ็นเอของยีน *SINA3* และ *SINAT3* ขนาด 1,026 คู่เบส และ 1,050 คู่เบส นำแต่ละตัวอย่างมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *KpnI* โดยในปฏิกิริยาทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอของยีน SINA3 และ SINAT3/พลาสมิดดีเอ็นเอของ pCAMBIA2300 ที่ความเข้มข้นตัวอย่างละ 1 ไมโครกรัม, 1X FastDigest Buffer, 1U FastDigest enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำมาแยกด้วย 0.8% low melting gel แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex Bio Science Rockland, Inc)

ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการบนเครื่อง Dark Reader Transilluminators และแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) (ข้อ 3.3.1) จะได้ชิ้นพลาสมิด pCAMBIA2300 และชิ้นยีน *SINA3/SINAT3* โดยที่ปลายข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งจำจดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และอีกข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งของเอนไซม์ *Kpn*I นำชิ้นยีน SINA3 และ SINAT3 เชื่อมต่อเข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) เพื่อสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่สมบูรณ์ ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอของยีน *SINA3/SINAT3* 200 นาโนกรัม, pCAMBIA2300 400 นาโนกรัม, 1X Ligation Buffer, T4 DNA ligase, ปรับปริมาตรด้วยน้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 22°C นาน 1 ชั่วโมง และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยนำปฏิกิริยา ligation จำนวน 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป heat – shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 45 วินาที นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 30 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไป spread บนอาหารแข็ง LB (เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15 กรัม Bacto-Agar, ddH_2O) เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

4.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน ใน Plant Expression Vector

4.2.1 การตรวจสอบการปรากฏของยีน *SINA3* และ *SINAT3* ด้วยเทคนิค PCR

คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสม นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) (ข้อ 3.3.2) นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาทำปฏิกิริยา PCR ร่วมกับไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) **(ตารางที่ 1)** ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม, 2U HotStart Taq Master Mix, 0.5 µM Primer (forward), 0.5 µM Primer (reverse) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre–Denature 95°C 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 30 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 72°C 3 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) ตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker พร้อมบันทึกภาพ

4.2.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน *SINA3* และ *SINAT3* ด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตรวจสอบการปรากฏของยีน *SINA3* และ *SINAT3* ด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I ในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร, 1X FastDigest buffer, 0.5U FastDigest enzyme, ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่

80°C นาน 5 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, USA)

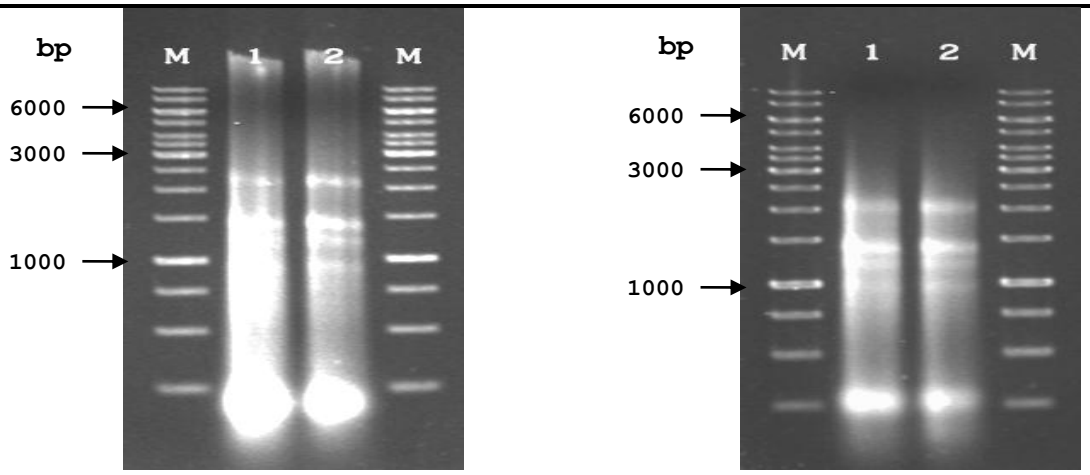
ผลการทดลองและอภิปราย

1. การโคลนยีน *SINA3* และ *SINAT3* จากข้าวโพดในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก

จากการโคลนยีน *SINA3* และ *SINAT3* ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *SINA3* คือ SINA3 (forward) และ SINA3 (reverse) และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *SINAT3* คือ SINAT3 (forward) และ SINAT3 (reverse) **(ตารางที่ 1)** โดยนำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มาทำปฏิกิริยา RT – PCR กับอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), ตากฟ้า 3 (TF3) **(ภาพที่ 1ก)**, นครสวรรค์ 3 (NS3) และ นครสวรรค์ 1 (NS1) **(ภาพที่ 1ข)** พบว่า สามารถสังเคราะห์ยีน *SINA3* และ *SINAT3* จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.0 กิโลเบส **(ภาพที่ 2ก และ 2ข)** นำดีเอ็นเอของยีน *SINA3* และ *SINAT3* ที่ได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ T&A Cloning Vector Kit และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย DH5α คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่ามียีน *SINA3* และ *SINAT3* นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ **(ภาพที่ 3ก และ 3ข)** และตรวจสอบโคโลนีที่ได้รับการถ่ายยีนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I พบว่า รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน *SINA3* และ *SINAT3* ที่มีความถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาดประมาณ 2.7 กิโลเบส เป็นขนาดของเวกเตอร์ (Vector) และ 1.0 กิโลเบส เป็นขนาดของยีน *SINA3* ตามลำดับ **(ภาพที่ 4ก และ 4ข)** นำพลาสมิดดีเอ็นเอโคลนที่มียีน *SINA3* และ *SINAT3* จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer พบว่า ยีน *SINA3* จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 1,026 คู่เบส และสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนในส่วนที่มีการแสดงออก (ORF) ของยีน *SINA3* จำนวน 341 amino acid **(ภาพที่ 5)** และ ยีน *SINAT3* จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 1,050 คู่เบส และสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนในส่วนที่มีการแสดงออก (ORF) ของยีน *SINAT3* จำนวน 349 amino acid **(ภาพที่ 6)**

ตารางที่ 1 แสดงคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT – PCR ของยีน *SINA3* และ *SINAT3*

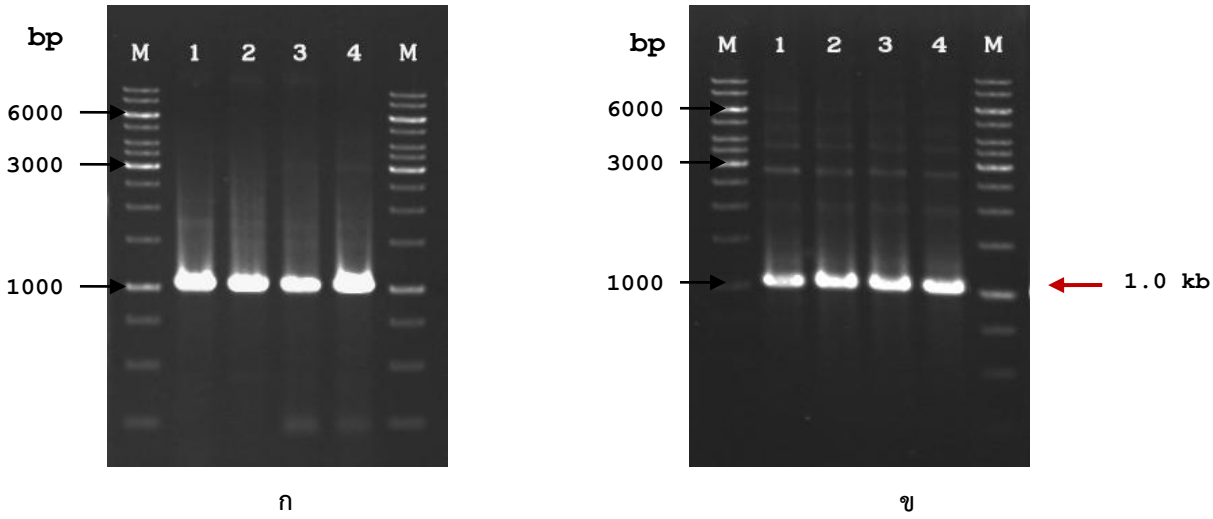
ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ขนาด (bp.)	อุณหภูมิ Tm (^{o}C)	GC content (%)
SINA3(forward)	ATG GAG CTG GAC AGC ATC GAG TGC ATG TCC TAC	33	71.6(55)	54.5
SINA3(reverse)	TCA GCT GAA CAA ATT GGG AAT GCA GGC TCC TG	32	69.4(55)	50.0
SINAT3(forward)	ATG GAC ATG GAC AGG GAC AGC GTG GAG TGC CTC	33	73.2(55)	60.6
SINAT3(reverse)	TCA GCT GCA AAG GTT AGG AAT GCA GGC TCC	30	70.4(55)	53.3
SINAXbaI(forward)	CAC TCT AGA ATG GAG CTG GAC AGC ATC GAG TGC ATG	36	68.0(55)	52.8
SINAKpnI(reverse)	CAC GGT ACC TCA GCT GAA CAA ATT GGG AAT GCA GGC	36	68.0(55)	52.8
SINATXbaI(forward)	CAC TCT AGA ATG GAC ATG GAC AGG GAC AGC GTG GAG	36	69.0(55)	55.6
SINATKpnI(reverse)	CAC GGT ACC TCA GCT GCA AAG GTT AGG AAT GCA GGC	36	69.0(55)	55.6
NOS(forward)	GTT TGA ACG ATC GGG GAA ATT CGA GCT C	28	67.5(60)	50.0
35SCaMV(reverse)	CAT TTG GAG AGG ACA CGC TGA CAA GCT GAC	30	70.1(60)	53.3



ก ข

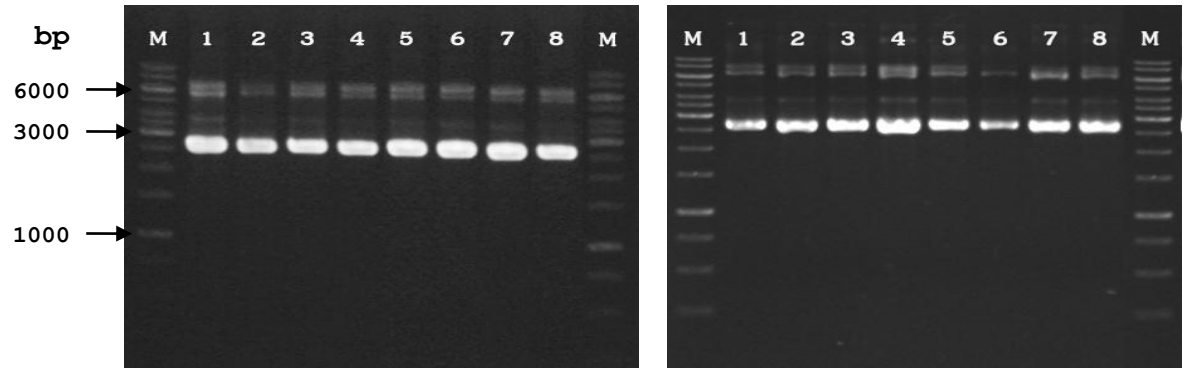
ภาพที่ 1 **ก.** แสดงอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้จากข้าวโพด 2 พันธุ์, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1) และ Lane 2 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3)

ข. แสดงอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้จากข้าวโพด 2 พันธุ์, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 2 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)



ภาพที่ 2 **ก.** แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *SINA3* ที่เพิ่มปริมาณได้จากข้าวโพด 4 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ SINA3 (forward) และ SINA3 (reverse) ด้วยเทคนิค RT-PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = แถบดีเอ็นเอของยีน *SINA3* ในข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1(TF1), Lane 2 = แถบดีเอ็นเอของยีน *SINA3* ในข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 3 = แถบดีเอ็นเอของยีน *SINA3* ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 4 = แถบดีเอ็นเอของยีน *SINA3* ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

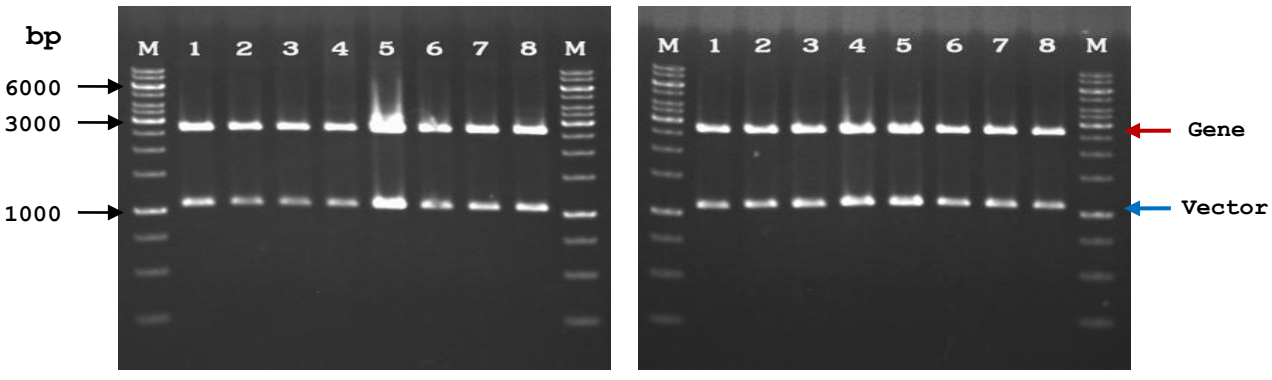
ข. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *SINAT3* ที่เพิ่มปริมาณได้จากข้าวโพด 4 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ SINAT3 (forward) และ SINAT3 (reverse) ด้วยเทคนิค RT-PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = แถบดีเอ็นเอของยีน *SINAT3* ในข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1(TF1), Lane 2 = แถบดีเอ็นเอของยีน *SINAT3* ในข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 3 = แถบดีเอ็นเอของยีน *SINAT3* ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 4 = แถบดีเอ็นเอของยีน *SINAT3* ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)



ก ข

ภาพที่ 3 **ก.** แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโคโลนีที่คาดว่ามียีน *SINA3*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

ข. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโคโลนีที่คาดว่ามียีน *SINAT3*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

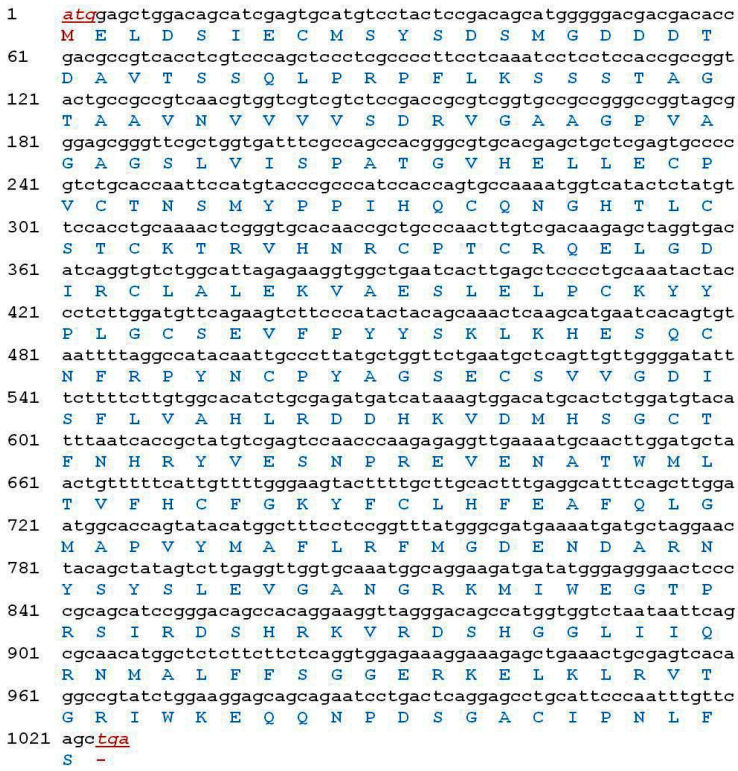


ก ข

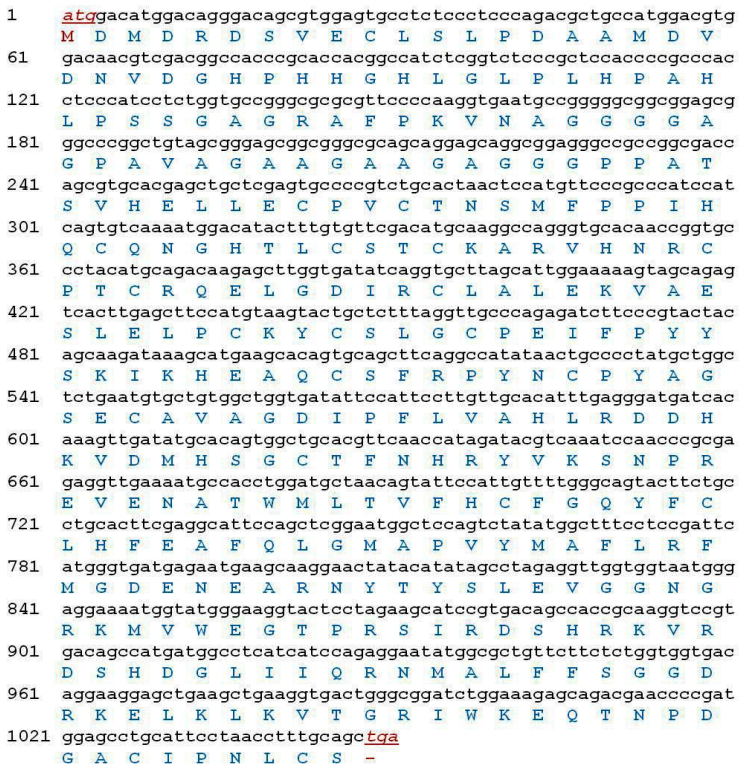
ภาพที่ 4 **ก.** แสดงรูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน *SINA 3* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = รูปแบบของแถบ ดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

ข. แสดงรูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน *SINAT 3* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพด

พันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)



ภาพที่ 5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *SINA3* ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) ในส่วนที่มีการแสดงออก



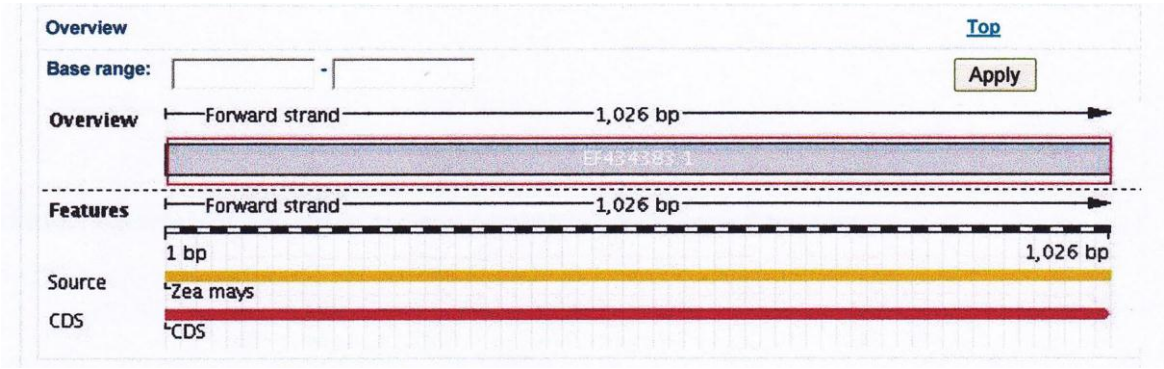
ภาพที่ 6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *SINAT3* ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) ในส่วนที่มีการแสดงออก

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน *SINA3* และ *SINAT3* มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีน โดยใช้โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของยีน *SINA3* และ *SINAT3* มีค่าความเหมือนกัน (% Identities) เท่ากับ 78 % **(ภาพที่ 7)** และพบว่ายีน *SINA3* และ *SINAT3* เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม E3 ubiquitin ligase ซึ่งอยู่ในกระบวนการ ubiquitination คือ เป็นหนึ่งในกระบวนการ post-translational modification (กระบวนการดัดแปลงโปรตีนภายหลังการแปลรหัส เช่น การเติมหมู่ฟอสเฟต, การเติมหมู่น้ำตาล หรือโมเลกุลอื่นๆ ให้กับโปรตีน) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการพัฒนาทั้งหมดในเซลล์ eukaryotic เกิดการสร้างพันธะ covalent โดยอาศัยการเติม ubiquitin เข้าไปยังหมู่กรดอะมิโนไลซีน (lysine residue) ของโปรตีนเป้าหมาย เพื่อควบคุมความกระบวนการต่างๆ ในเซลล์พืช เช่น ความคงตัว, การเกิดกิจกรรม และการขนส่ง เป็นต้น โดยโปรตีน E3 ubiquitin ligase เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทนต่อสภาวะเครียด ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงระหว่างกระบวนการ ubiquitin proteosome system (UPS) กับกลไกการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดต่างๆ โดย UPS อาจทำหน้าที่ในการรับรู้ต่อการกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอกอย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพ ซึ่งจะช่วยให้เซลล์ของพืชมีการปรับตัวเพื่อสามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตรอดได้เมื่ออยู่ในสภาวะไม่เหมาะสม (Thomann *et al.,* 2005; Sonoda *et al*., 2009; Pokhilko *et al*., 2011.)

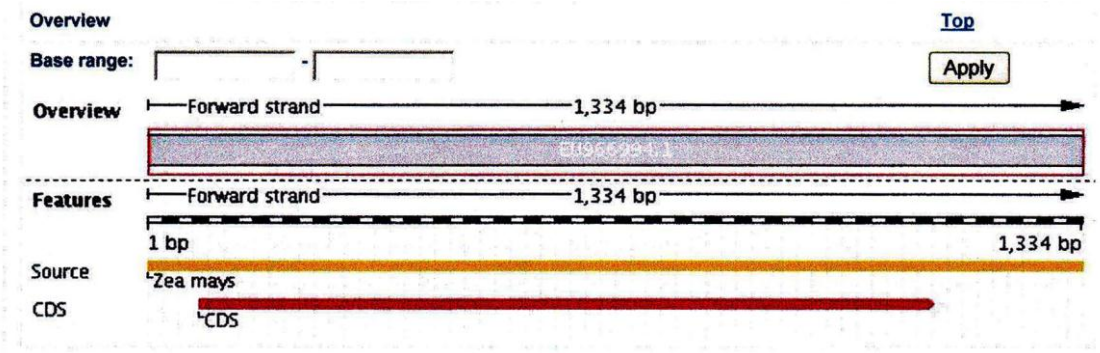
```
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

SINA3_NS3     --MELDSIECMSYSDS-MGDDDTDAVTSS---QLP-RPFLKSSSTAGTAAVNVVVVSDRV 53
SINAT3_NS3    MDMDRDSVECLSLPDAAMDVDNVDGHPHHGHLGLPLHPAHLPSSGAGRAFPKVNAGGGGA 60
                *: **:**:* .*: *. *:.*. .       ** :*    .** ** *  :* . .. .

SINA3_NS3     G--AAGPVAGAGSLVISPATGVHELLECPVCTNSMYPPIHQCQNGHTLCSTCKTRVHNRC 111
SINAT3_NS3    GPAVAGAAGAAGAGGGPPATSVHELLECPVCTNSMFPPIHQCQNGHTLCSTCKARVHNRC 120
              *  .**....**:    .***.**************:*****************:******

SINA3_NS3     PTCRQELGDIRCLALEKVAESLELPCKYYPLGCSEVFPYYSKLKHESQCNFRPYNCPYAG 171
SINAT3_NS3    PTCRQELGDIRCLALEKVAESLELPCKYCSLGCPEIFPYYSKIKHEAQCSFRPYNCPYAG 180
              **************************** .***.*:******:***:**.**********

SINA3_NS3     SECSVVGDISFLVAHLRDDHKVDMHSGCTFNHRYVESNPREVENATWMLTVFHCFGKYFC 231
SINAT3_NS3    SECAVAGDIPFLVAHLRDDHKVDMHSGCTFNHRYVKSNPREVENATWMLTVFHCFGQYFC 240
              ***:*.***.************************:********************:***

SINA3_NS3     LHFEAFQLGMAPVYMAFLRFMGDENDARNYSYSLEVGANGRKMIWEGTPRSIRDSHRKVR 291
SINAT3_NS3    LHFEAFQLGMAPVYMAFLRFMGDENEARNYTYSLEVGGNGRKMVWEGTPRSIRDSHRKVR 300
              *************************:****:******.*****:****************

SINA3_NS3     DSHGGLIIQRNMALFFSGGERKELKLRVTGRIWKEQQNPDSGACIPNLFS 341
SINAT3_NS3    DSHDGLIIQRNMALFFSGGDRKELKLKVTGRIWKEQTNPD-GACIPNLCS 349
              ***.***************:******:********* *** ******* *
```

ภาพที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนระหว่างยีน *SINA3* และ *SINAT3* ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) วิเคราะห์โดยโปรแกรม ClustalW Multiple Alignment http://www.ebi.ac.uk/clustalw/

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์โครงสร้างของยีน โดยใช้โปรแกรม EMBL – EBI database บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ยีน *SINA3* และ *SINAT3* มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสส่วนที่มีการแสดงออกของยีน open reading frame (ORF) หรือ coding sequence (CDS) ของยีน *SINA3* ขนาด 1,026 คู่เบส มีจำนวน 1 exon (ภาพที่ 8) และของยีน *SINAT3* ขนาด 1,050 คู่เบส มีจำนวน 1 exon (ภาพที่ 9) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SINA3* ที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีนในกลุ่ม E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays* L.) (EF434383.1) และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic* (L.) Baeuv.) (XM004952220.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ **(ตารางที่ 2)** และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SINAT3* ที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays* L.) (EU966994.1) และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic* (L.) Baeuv.) (XM004960614.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ **(ตารางที่ 3)**



ภาพที่ 8 โครงสร้างของยีน *SINA3* ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน coding sequence (CDS) มีขนาด 1,026 คู่เบส (แถบลูกศรสีแดง) วิเคราะห์โดยโปรแกรม EMBL-EBI database.



ภาพที่ 9 โครงสร้างของยีน *SINAT3* ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน coding sequence (CDS) มีขนาด 1,050 คู่เบส (แถบลูกศรสีแดง) วิเคราะห์โดยโปรแกรม EMBL-EBI database.

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SINA3* ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) กับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

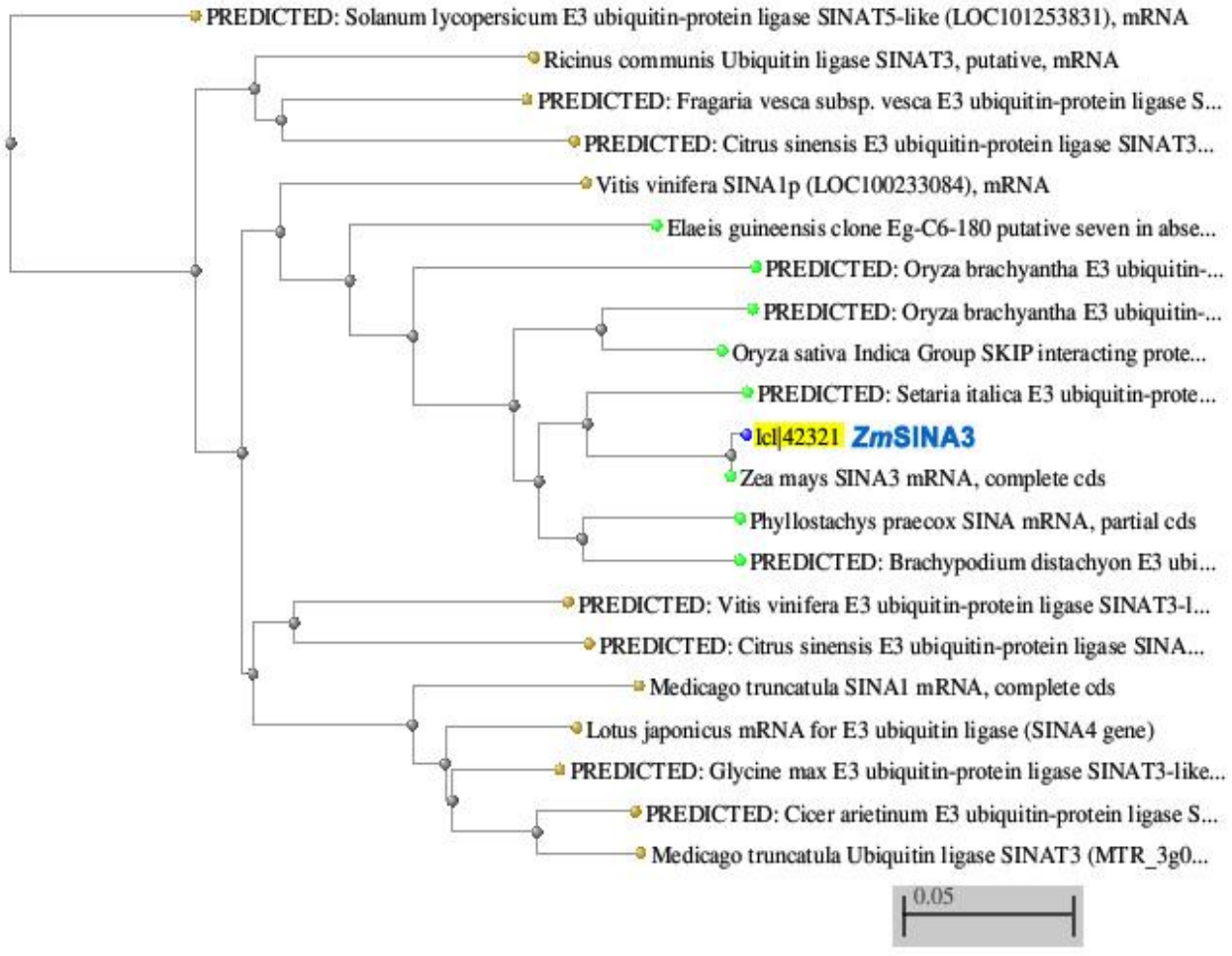
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identities	Accession
Zea mays SINA3 mRNA, complete cds	1950	1950	100%	0.0	99%	EF434383.1
Setaria italica E3 ubiquitin-protein ligase SINAT4-like (LOC101753703), mRNA	1367	1367	100%	0.0	90%	XM004952220.1
Brachypodium distachyon E3 ubiquitin-protein ligase SINAT5-like (LOC100826252), mRNA	1029	1106	90%	0.0	89%	XM003572636.1
Phyllostachys praecox SINA mRNA, partial cds	1038	1038	79%	0.0	89%	DQ013805.1
Oryza brachyantha E3 ubiquitin-protein ligase SINAT3-like (LOC102707930), mRNA	952	1030	94%	0.0	87%	XM006647122.1

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SINAT3* ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) กับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

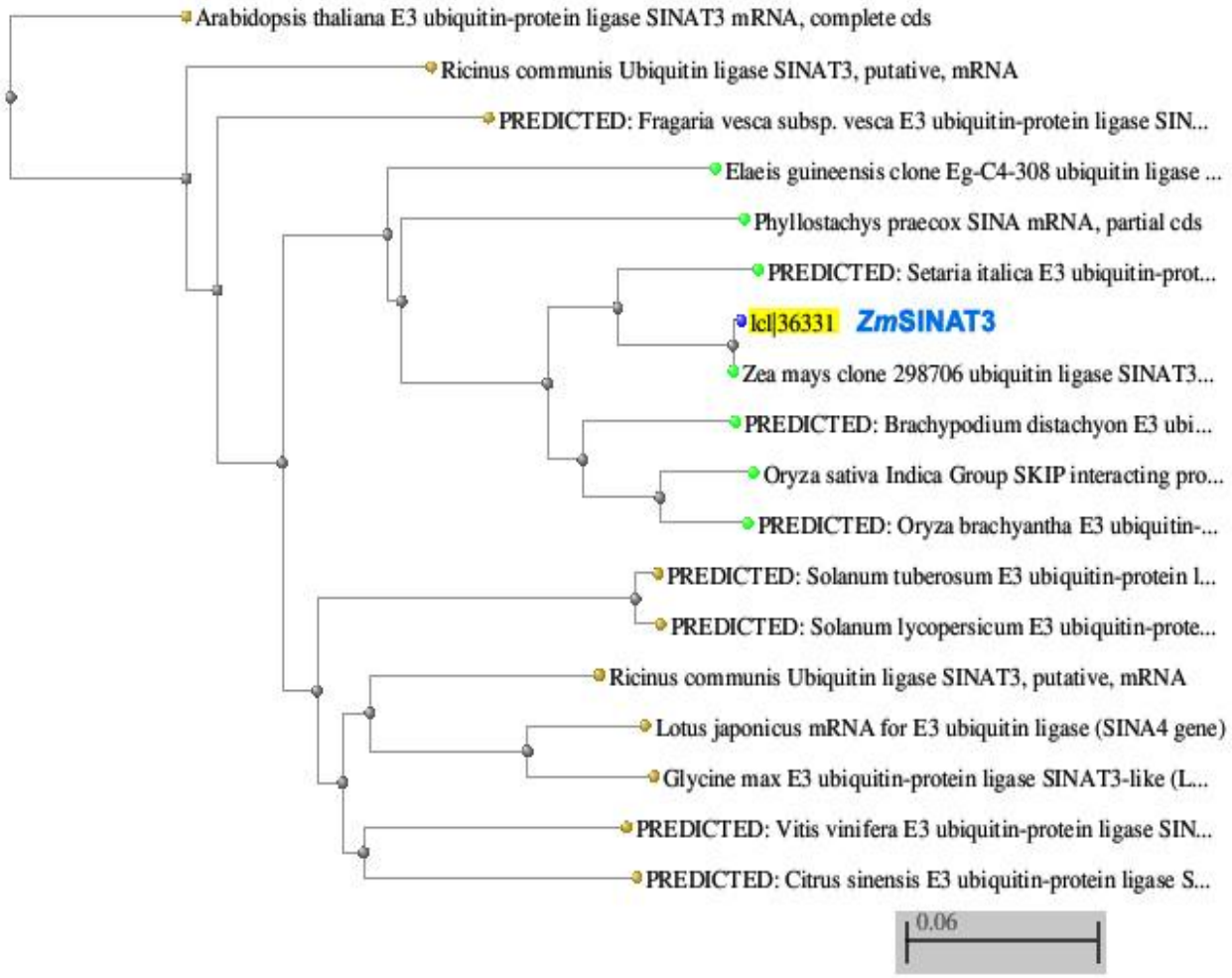
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identities	Accession
Zea mays clone 298706 ubiquitin ligase SINAT3 mRNA, complete cds	1880	1880	100%	0.0	99%	EU966994.1
Setaria italica E3 ubiquitin-protein ligase SINAT3-like (LOC101763752), mRNA	1385	1385	99%	0.0	90%	XM004960614.1
Brachypodium distachyon E3 ubiquitin-protein ligase SINAT3-like (LOC100822426), mRNA	1148	1148	99%	0.0	86%	XM003566357.1

Oryza brachyantha E3 ubiquitin-protein ligase SINAT3-like (LOC102711436), partial	1079	1079	79%	0.0	89%	XM006655063.1
Phyllostachys praecox SINA mRNA, partial cds	687	687	77%	0.0	81%	DQ013805.1

เมื่อนำข้อมูลยีน *SINA3* และ *SINAT3* จากข้าวโพดมาศึกษาความสัมพันธ์กับยีนชนิดเดียวกันในพืชชนิดต่างๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/ treeView.cgi) พบว่ายีน *SINA3* และ *SINAT3* ที่สังเคราะห์ได้จากข้าวโพด (*Zea mays* L.) มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชในกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยว คือ ข้าวโพด (*Zea may* L.) ข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italica* (L.) Beauv.) และพืชตระกูลหญ้า (*Brachypodium distachyon*) มากกว่าพืชในกลุ่มใบเลี้ยงคู่ **(ภาพที่ 10 และ ภาพที่ 11)**



ภาพที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน *SINA3* ที่โคลนได้จากข้าวโพด เปรียบเทียบกับพืชชนิดต่างๆ โดยใช้โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi

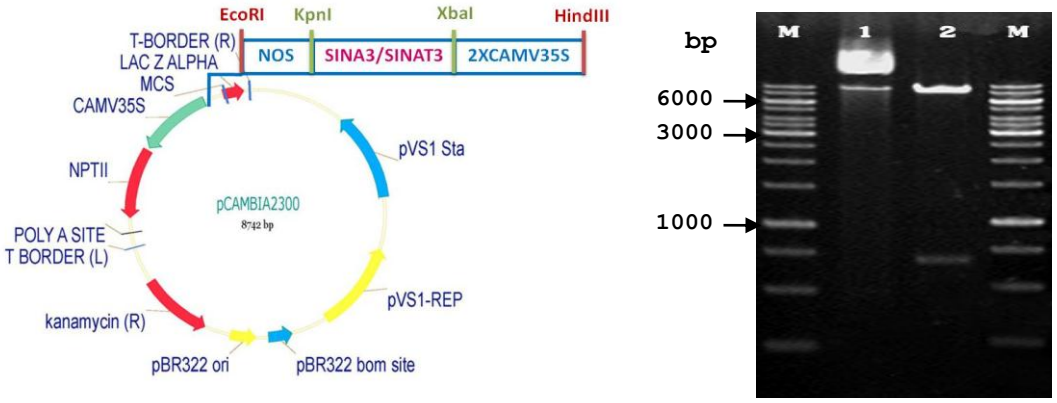


ภาพที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน *SINAT3* ที่โคลนได้จากข้าวโพด เปรียบเทียบกับพืชชนิดต่างๆ โดยใช้โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi

3. การสร้างชุด cassette ยีน และการตรวจสอบการปรากฏของยีน *SINA3* และ *SINAT3* ใน Plant Expression Vector

การเพิ่มปริมาณยีน *SINA3* และ *SINAT3* ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน โดยการทำปฏิกิริยา PCR กับพลาสมิดดีเอ็นเอของข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *SINA3* คือ SINAXbaI (forward) และ SINAKpnI (reverse) และยีน *SINAT3* คือ SINATXbaI (forward) และ SINATKpnI (reverse) ซึ่งได้เติมตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I ได้ชิ้นยีนขนาด 1,026 คู่เบส และ 1,050 คู่เบส ตามลำดับ นำมาเชื่อมต่อเข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) ที่มีขนาด 9,640 คู่เบส โดยที่ pCAMBIA2300 ประกอบด้วย โปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน มียีน neomycin phosphortransferase (nptII) ควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก **(ภาพที่ 12ก)** ซึ่งผ่านการทำ double digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ

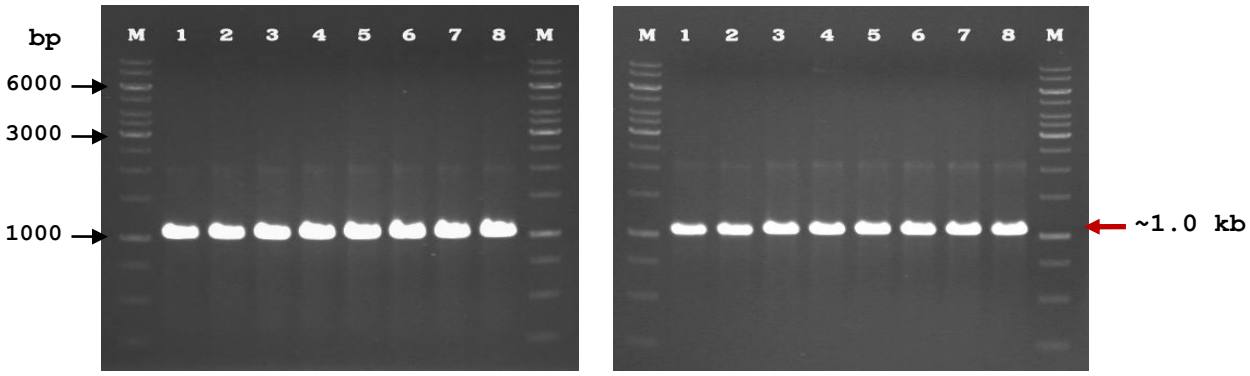
*Kpn*I **(ภาพที่ 12ข)** จากนั้นทำการเชื่อมต่อชิ้นยีน *SINA3* และ *SINAT3* เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ในตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I ทำการถ่ายฝากชุด cassette ยีนทั้ง 2 ชุด เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ DH5α โดยวิธี heat – shock และตรวจสอบการปรากฏของยีน *SINA3* และ *SINAT3* ที่อยู่ใน pCAMBIA2300 ซึ่งมี 2 วิธีด้วยกัน วิธีแรกคือ การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอของยีน SINA3 และ SINAT3 ขนาดประมาณ 1.0 กิโลเบส **(ภาพที่ 13ก และ 13ข)** และวิธีที่สองคือ การตรวจสอบด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาดประมาณ 1.1 กิโลเบส (ยีน SINA3 และยีน SINAT3) และขนาดประมาณ 9 กิโลเบส (pCAMBIA2300) ตามลำดับ **(ภาพที่ 14ก และ 14ข)** เมื่อนำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มีชิ้นส่วนของยีน *SINA3* และ *SINAT3* สอดแทรกอยู่ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด พบว่า ตำแหน่งในการเชื่อมต่อของยีน *SINA3* และ *SINAT3* ที่อยู่ภายในเวกเตอร์ pCAMBIA2300 มีความถูกต้อง โดยโครงสร้างของพลาสมิดสายผสมที่มีความสมบูรณ์สามารถเชื่อมต่อชิ้นยีน *SINA3* และ *SINAT3* เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300 – *ZmSINA3* และ pCAMBIA2300 – *ZmSINAT3*) จะมีขนาดประมาณ 10.6 กิโลเบส และ 10.7 กิโลเบส ตามลำดับ **(ภาพที่ 15)**



ก ข

ภาพที่ 12 ก. แผนที่ของ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) และตำแหน่งในการเชื่อมต่อชิ้นยีน *SINA3* และ *SINAT3*

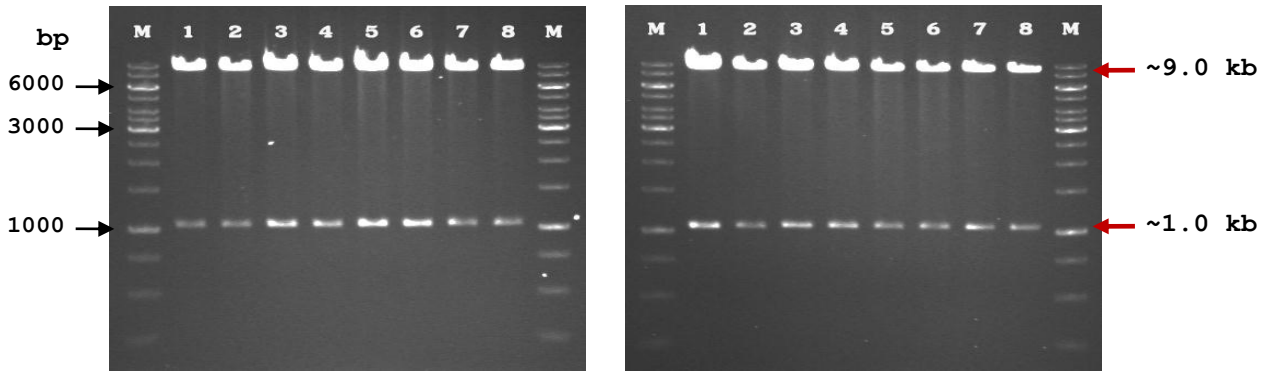
ข. แสดงแถบดีเอ็นเอของ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = แถบดีเอ็นเอของ pCAMBIA2300, Lane 2 = แถบดีเอ็นเอของ pCAMBIA2300 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I



ก ข

ภาพที่ 13 **ก.** แสดงแถบดีเอนเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR กับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300 – *ZmSINA3* โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse), Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1–2 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3–4 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5–6 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7–8 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

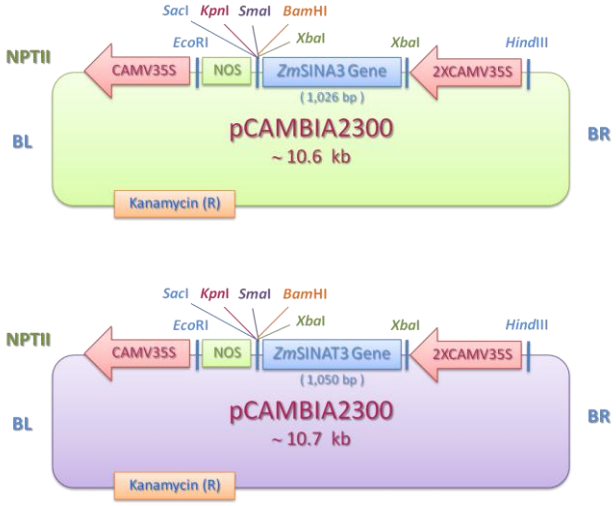
ข. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR กับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300 – *ZmSINAT3* โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse), Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1–2 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3–4 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5–6 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7–8 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)



ก ข

ภาพที่ 14 **ก.** แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอส เยผสม pCAMBIA2300 – *ZmSINA3* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1–2 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3–4 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5–6 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7–8 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

ข. แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300 – *ZmSINAT3* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1–2 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3–4 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5–6 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7–8 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)



ภาพที่ 15 แสดงโครงสร้างพลาสมิดสายผสม pCAMBIA2300 – *ZmSINA3* และ pCAMBIA2300 – *ZmSINAT3* ที่มีความสมบูรณ์

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การโคลนยีน *SINA3* และ *SINAT3* ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออกจากอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ด้วยเทคนิค RT – PCR พบว่า ยีน *SINA3* ที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 1,026 คู่เบส และยีน *SINAT3* ที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 1,050 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างของยีนด้วยโปรแกรม EMBL-EBI database บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ยีนที่โคลนได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปแปลรหัสเป็นโปรตีน พบว่า ยีน *SINA3* สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้จำนวน 341 amino acid และ ยีน *SINAT3* สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้จำนวน 349 amino acid

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SINA3* และ *SINAT3* ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีน *SINA3* มีความเหมือนอย่างสูงกับยีนในกลุ่ม E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic* (L.) Baeuv.) (XM004952220.1) โดยมีค่าความเหมือน (% Max Identities) เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SINAT3* ที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic* (L.) Baeuv.) (XM004960614.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ

การสร้างชุด cassette ยีน โดยการเชื่อมต่อชิ้นยีน *SINA3* และ *SINAT3* เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35SCaMV และเทอร์มิเนเตอร์ NOS ได้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300 – *ZmSINA3* และ pCAMBIA2300 – *ZmSINAT3* มีขนาดประมาณ 10.6 และ 10.7 กิโลเบส ตามลำดับ

การโคลนยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง ได้แก่ ยีน *SINA3* และ *SINAT3* และการสร้างชุด cassette ยีน ที่อยู่ในรูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มีความสมบูรณ์ (pCAMBIA2300 – *ZmSINA3* และ pCAMBIA2300 – *ZmSINAT3*) ซึ่งขณะนี้ได้มีการนำชุดยีนดังกล่าวไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชต้นแบบเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน และศึกษาข้อมูลของยีนในด้านต่างๆ ก่อนที่จะนำไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชเศรษฐกิจ เช่น ถั่วเหลือง ข้าวโพด อ้อย และมันสำปะหลัง เป็นต้น เพื่อเพิ่มศักยภาพในการให้ผลผลิตและสามารถทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้ อีกทั้งยังเป็นพืชทางเลือกในการเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไปในอนาคต

การทดลองที่ 2

การถ่ายยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนที่ทนต่อสภาวะเครียดในพืชต้นแบบ

Transformation and Expression of Gene for Abiotic Stress Tolerances in Model Plants

อัจฉราพรรณ ใจเจริญ อรุโณทัย ซาววา สุภาวดี ง้อเหรียญ
พยุงศักดิ์ รวยอารี หทัยรัตน์ อุไรรงค์
Adcharapun Chaicharoen Aroonothai Sawwa Suphawadee Ngorian
Payungsak Rauyaree Hathairat Urairong

คำสำคัญ

ยีน *SINA3* (*SINA3* gene), สภาวะเครียดเกลือ (Salt stress), สภาวะขาดน้ำ (Drought stress), การแสดงออกของยีน (Genes expression), การถ่ายยีน (Transformation)

บทคัดย่อ

ยีน *SINA3* เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม E3 ubiquitin ligase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดของพืช โดยการควบคุมการเปลี่ยนแปลงกระบวนการถอดรหัส (responsive transcription factors) ที่จำเป็นสำหรับการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะเครียดและการควบคุมกิจกรรมของโปรตีนต่างๆ สำหรับนำไปใช้ภายในเซลล์พืช งานวิจัยนี้ได้ได้นำเอายีน *SINA3* มาศึกษาการแสดงออกของยีนโดยการถ่ายยีนเข้าพืชต้นแบบยาสูบ เพื่อศึกษาผลของการถ่ายยีนและตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทนต่อสภาวะเครียดในยาสูบ โดยนำยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *SINA3* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ สภาวะขาดน้ำโดยเติม Polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) ลงในอาหารที่ความเข้มข้น 0, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ สภาวะเครียดเกลือเกิดจากการเติม sodium chloride (NaCl) ลงในอาหารความเข้มข้น 0, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยเพาะเลี้ยงยาสูบปกติบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 และ NaCl ระดับความเข้มข้นเดียวกันเป็นชุดควบคุม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน พบว่าต้นยาสูบที่มียีน SINA3 ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับต้นยาสูบชุดควบคุม ทั้งน้ำหนักสด ความสูงของต้น และจำนวนใบ แสดงว่ายีน SINA3 ที่ถ่ายฝากเข้าสู่ยาสูบ แบบ over expression นั้น ไม่สามารถทนทานต่อสภาวะเครียดเกลือและสภาวะขาดน้ำได้

Abstract

SINA3 genes is an E3 ubiquitin ligase enzyme that plays a critical role in regulating plant responses to abiotic stresses such as drought, temperature fluctuations, high salinity, radiation and nutrient deprivation adversely affect growth, development and productivity. In this study, the SINA3 gene was constructed into a plant expression vector and transformed into *Nicotiana tabacum*. Transgenic tobaccos were grown in MS medium. Drought was induced by adding

Polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) to the culture medium at concentrations of 0, 10, 15, 20 and 25 % (w/v), while salinity was induced by adding sodium chloride (NaCl) to the medium at concentrations of 0, 1, 1.5, 2, 2.5 and 3 % (w/v). The plant growth parameters were analyzed after 30 days in culture. Differentiation fresh weight, number of leaves and shoot length of the transgenic plants were similar to those of wild-type plants. The result showed that overexpression of *SINA3* gene do not tolerant to salt and drought stresses in transgenic tobacco.

บทนำ

สภาวะโลกร้อนหรือโกลบบอลวอร์มมิ่ง (Global warming) ได้ทำให้เกิดความผกผันของอากาศทั่วโลก ส่งผลกระทบต่างๆ นานา ด้านผลกระทบที่มีต่อการเจริญเติบโตของพืชมีสองส่วนหลัก คือผลกระทบโดยตรงจากการที่อุณหภูมิมีแนวโน้มสูงขึ้น ซึ่งสามารถวัดผลกระทบในเชิงวิทยาศาสตร์ได้ค่อนข้างชัดเจน นักวิชาการด้านพืชได้ให้ความเห็นว่าแม้ว่าอุณหภูมิเฉลี่ยทั้งปีจะไม่ได้สูงขึ้นมาก แต่สำหรับพืชนั้นความผันผวนของอุณหภูมิเพียงไม่กี่นาทีที่เกิดขึ้นในช่วงใดช่วงหนึ่งของการเจริญเติบโตจะทำให้ผลผลิตลดลงได้ ความเสียหายในภาคการเกษตรที่เกิดจากอุณหภูมิผันผวนนั้น ไม่ได้เกิดจากสภาพอากาศที่ร้อนขึ้นเท่านั้น แต่อุณหภูมิกลางคืนที่เย็นมากขึ้นก็จะสร้างความเสียหายได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น ข้าวมีโอกาสเป็นหมันสูงถ้าอากาศหนาวเย็น ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลกระทบดังกล่าวส่งผลให้พืชเกิดสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่เราเรียกว่าสภาวะแวดล้อมอชีวนะ (abiotic stress) ยกตัวอย่างเช่น การขาดน้ำของพืช ดินเค็ม เป็นต้น

ปัจจัยสภาวะแวดล้อมอชีวนะ (abiotic stress) เป็นปัจจัยที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชและผลผลิตของพืชอย่างมาก เพื่อความอยู่รอดของพืชเองหรือเพื่อตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมนี้ พืชต้องอาศัยกลไกและกลยุทธ์การปรับตัวที่ซับซ้อน เช่น การเจริญเติบโตหรือพัฒนาการของเซลล์ สัณฐานวิทยา สรีรวิทยา หรือชีวเคมี ลักษณะความทนทานดังกล่าว เกี่ยวข้องกับกลไกการปรับตัวที่หลากหลาย เช่น การปรับสภาพแรงดันออสโมติกหรือวิถีการสังเคราะห์หรือสลายแรงดันออสโมติก วิถีเอสโอเอส (SOS) หรือวิถีโปรตีนไคเนสที่พึ่งพาแคลเซียมหรือซีดีพีเค (CDPK) เป็นต้น (Tarczynsk *et al*., 1993; Sanchez-Barrena *et al*., 2005) อีกทั้งการศึกษาพบการทำงานของยีนเพื่อตอบสนองหรือถูกควบคุมขณะเติบโตในสภาพแวดล้อมอชีวนะและชีวนะ (biotic stress) มีความเชื่อมโยงที่สัมพันธ์หรือเกี่ยวข้องกัน (Kunkel et al., 2002) เช่น กลุ่มยีนประเภททรานส์คริปชันนัล แฟกเตอร์ พลาสมาเมมเบรนโปรตีน และกลุ่มยีนอื่นๆ เป็นต้น

SINA และ *SINAT* เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม E3 ubiquitin ligases เป็นโปรตีน Ubiquitination ที่มีกลไกสำคัญในการควบคุมหน้าที่ของเซลล์ เช่น การเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ วัฏจักรเซลล์ การตอบสนองต่อความเครียด และการตายของเซลล์ โปรตีน SINA จะมีส่วนด้าน N-terminal RING (Really Interesting New Gene) ที่สามารถไปจับกับส่วน C-terminal ของโปรตีนเป้าหมาย โดยส่วน RING ของ E3 จะทำปฏิสัมพันธ์กันกับโปรตีน E2 ubiquitin-conjugation เพื่อส่งถ่าย ubiquitin ไปยังโปรตีนที่ต้องการ โดย E3 จะจดจำและเชื่อมต่อเข้าหาโปรตีนเป้าหมายที่ทำหน้าที่เฉพาะอย่างแม่นยำ เป็นการควบคุมการแสดงออกของโปรตีนภายหลังการแปลรหัส (Post-translational protein regulation)(Peralta et al., 2013) โปรตีน SINA หรือ E3 ubiquitin ligases มีการศึกษาในสัตว์และมนุษย์มาก่อน แล้วค่อยศึกษาในพืชโดยเริ่มต้นเปรียบเทียบโปรตีนดังกล่าวกับพืช พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมาก เมื่อศึกษายีนดังกล่าวในต้นอะราบิดอบซิส พบว่า ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนแบบยับยั้ง

การสร้างโปรตีน SINA หรือ E3 ubiquitin ligases โดยวิธีการกลายพันธุ์ มีความต้านทานต่อเชื้อ *Pseudomonas syringae* ลดลง แต่ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนแบบ over expression จะมีความต้านทานต่อเชื้อ *Pseudomonas syringae* เพิ่มขึ้น (Kim *et al.* ,2006) นอกจากนี้มีการทดลองเกี่ยวกับการสร้างปมของต้นอะราบิดอบซิสภายหลังจากการฝากถ่ายเชื้อไรโซเบียม โดยเปรียบเทียบต้นปกติ กับต้นที่ได้รับการถ่ายฝากยีน 35s: SINAT5DN พบว่า ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีการสร้างปมมากกว่า ลำต้นยาวกว่า ขนาดใบใหญ่กว่า และมีจำนวนรากที่มากกว่าต้นปกติ (Den Herder *et al.,* 2008)

จากปัญหาการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภูมิอากาศต่างๆ ที่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช ทำให้นักวิจัยเริ่มตระหนักถึงปัญหาดังกล่าว จึงเริ่มศึกษาค้นหาลักษณะทางพันธุกรรมของพืช ที่สามารถทนต่อสภาวะการเปลี่ยนแปลงทางด้านปัจจัยสภาวะแวดล้อมอชีวนะ ซึ่งข่าววงการวิจัยพืช ได้รายงานในวารสารวิชาการ Science ว่าค้นพบยีนที่ช่วยให้พืชทนต่อสภาพแวดล้อมที่เลวร้าย รวมทั้งความแห้งแล้งและความร้อน Peter McCourt หนึ่งในคณะวิจัยซึ่งเป็นศาสตราจารย์ทางด้านเซลล์และชีววิทยาเชิงระบบ กล่าวว่า "พืชมีระบบฮอร์โมนที่ช่วยให้มันปรับตัวกับความเครียดต่างๆ ได้ หากเราสามารถควบคุมฮอร์โมนเหล่านี้ ก็จะทำให้เราสามารถปกป้องพืชผลทางการเกษตรต่างๆ จากภาวะโลกร้อนได้" การค้นพบครั้งนี้จึงมีความสำคัญต่ออนาคตในการพัฒนาพืชที่มีความทนทานต่อภาวะ โลกร้อนได้ อันที่จริง สิ่งที่นักวิจัยค้นพบในรายงานนี้ ก็เป็นเพียงกุญแจดอกหนึ่งในการไขปริศนาว่าพืชปรับตัวอย่างไรต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรง กลไกในการปรับตัวของพืชนั้นมีความซับซ้อนมากและยังต้องการการวิจัยขั้นพื้นฐาน (Basic Research) อีกสักระยะเวลาหนึ่ง จนกว่าเราจะสามารถพัฒนาพืชเกษตรทนร้อนได้ (Park *et. Al.,* 2009) จะเห็นได้ว่าฮอร์โมนที่สร้างจากพืชนั้นเป็นสิ่งหนึ่งที่พืชสร้างขึ้นมาจากรหัสพันธุกรรมที่อยู่บนโครโมโซมของมันอยู่แล้ว จึงเป็นแรงกระตุ้นให้นักวิทยาศาสตร์พยายามค้นหายีนที่จะช่วยให้พืชทนต่อภาวะเครียดต่างๆ ที่เกิดขึ้นในปัจจุบัน เพื่อให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ดีในสภาพอากาศเปลี่ยนแปลงในปัจจุบันได้ ดังนั้น การทดลองนี้ได้นำเอายีน *SINA3* ที่ค้นหามาจากการทดลอง การโคลนยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง มาศึกษาการแสดงออกของยีน โดยการถ่ายยีนเข้าพืชต้นแบบยาสูบ เพื่อศึกษาผลของการถ่ายยีนและตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทนต่อสภาวะเครียดในพืชต้นแบบ

ระเบียบวิธีการวิจัย

ประเด็นวิจัย : เป็นงานศึกษาวิจัยต่อเนื่องจากการทดลอง การโคลนยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง ซึ่งสภาวะขาดน้ำในพืชส่งผลให้เกิดสภาวะเครียดต่อพืช จึงได้นำยีนที่โคลนได้จากการทดลองดังกล่าวมาทำการศึกษาผลของการถ่ายยีนและตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทนต่อสภาวะเครียด โดยทำการถ่ายเข้าสู่พืชต้นแบบ (ยาสูบ) เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเครียดต่างๆ เช่น สภาวะเค็ม และสภาวะขาดน้ำในสภาพห้องปฏิบัติการ

สถานที่ทดลอง : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ระยะเวลาทำการวิจัย : ตุลาคม 2557 - กันยายน 2558

วิธีการทดลอง

1. การเคลื่อนย้ายชุดยีน *SINA3* เข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ด้วยวิธี electroporation

1.1 การเตรียม competent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens*

เลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ในอาหารเหลว 2YT ที่ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว 2YT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่านาน 2-3 ชั่วโมง จนได้ค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.2-0.3 แช่เชื้อไว้บนน้ำแข็งนาน 15-30 นาที จากนั้นตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 3500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% glycerol ทีแช่เย็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็งต่อเป็นเวลา 10 นาที นำไปตกตะกอนและละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% glycerol ทีแช่เย็นปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปตกตะกอนและละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% glycerol ทีแช่เย็นปริมาตร 2 มิลลิลิตร แบ่ง competent cell ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บเซลล์ที่ได้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

1.2 การเคลื่อนย้ายชุดยีน *SINA3* เข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens*

นำ competent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens* จาก -80 องศาเซลเซียส มาละลายในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำพลาสมิดทีมียีน *SINA3* ปริมาตร 2 ไมโครลิตร มาใส่ลงในหลอด competent cell ผสมให้เข้ากันเบาๆ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนผสมมาใส่ลงใน cuvette แช่เย็นในน้ำแข็ง นาน 30 นาที เคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี electroporation (BTX ECM600) ตามสภาวะดังนี้

Cuvette Gap	0.2	cm
Voltage	1.4	kV
Capacitor	25.0	μF
Resistor	360.0	Ω
Time Constant	8-9	msec

หลังจาก pulse แล้ว เติมอาหารเหลว 2YT ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทันที แล้วย้ายส่วนผสมลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ เลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่า นาน 1 ชั่วโมง ตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เทอาหารเหลวทิ้ง แล้วเติมอาหารเหลวใหม่ลงไป 100 ไมโครลิตร แบ่งมา 50 ไมโครลิตร เพื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง 2YT ที่เติมกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน นำโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรวจสอบยีน *SINA3* ด้วยเทคนิค PCR

1.3 การตรวจสอบโคลนที่มี ยีน *SINA3* จากเซลล์ *A. tumefaciens* ด้วยเทคนิค PCR

ตรวจสอบโคโลนีของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก โดยใช้ไพรเมอร์ SINA3 (forward) **5'-**ATGGAGCTGGACAGCATCGAGTGCATGTCCTAC-**3'** และ SINA3 (reverse) **5'-** TCAGCTGAA CAAATTGGGAATGCAGGCTCCTG-**3'** โดยเตรียมปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ดังต่อไปนี้

dH2O	32.1	ไมโครลิตร
5X buffer	10.0	ไมโครลิตร
1 mM dNTPs	4.0	ไมโครลิตร
10 μM forward primer	1.0	ไมโครลิตร
10 μM reward primer	1.0	ไมโครลิตร
DMSO	1.5	ไมโครลิตร
Phusion DNA Polymerase	0.4	ไมโครลิตร

ใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ มาจุ่มลงในปฏิกิริยา PCR โดยใช้เครื่อง GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยกำหนดรอบการทำปฏิกิริยาดังนี้

เริ่มต้นปฏิกิริยาที่ :

98 °C	30	วินาที

ตามด้วยโปรแกรมดังต่อไปนี้ จำนวน 35 รอบ

98 °C	30	วินาที
55 °C	30	วินาที
72 °C	60	วินาที

ปิดท้ายปฏิกิริยาที่ :

72 °C	7	นาที
4 °C	α	

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้ว นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาตรวจวิเคราะห์ด้วย 0.8 % agarose gel

2. การถ่ายยีนในยาสูบ

2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อยาสูบสำหรับการถ่ายยีน

ฟอกเมล็ดยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) โดยใช้คลอร็อกซ์ความเข้มข้น 10% ผสม 0.5% Tween-20 2-3 หยด นำไปเขย่าเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ใน คลอร็อกซ์ 5% ผสม 0.5% Tween-20 ประมาณ 2-3 หยด เขย่าเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาแล้วล้างคลอร็อกซ์ออก ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดยาสูบไปเพาะในอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ขวดละ 15-20 เมล็ด เมื่อเมล็ดเริ่มงอกจนมีใบชนกัน จะทำการย้ายขวดโดยเลี้ยงเป็นต้นเดี่ยวๆ ในอาหารสูตรเดิม หลังจากเพาะเลี้ยงอยู่นานประมาณ 3-4 สัปดาห์ ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส จะได้ต้นยาสูบที่สมบูรณ์ มีความสูงประมาณ 2-3 เซนติเมตร พร้อมที่จะนำใบมาใช้สำหรับการถ่ายยีน

2.2 การเตรียมเชื้อ A. tumefaciens

เลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* ที่มียีนเป้าหมายบนอาหารแข็ง 2YT ที่เติมกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน ย้ายโคโลยีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2YT ที่

เติมกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง นำมาวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 1.6-2.0 จากนั้นนำเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารเหลวทิ้ง เติมอาหารเหลว MS ลงไปปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าจนเซลล์ทั้งหมดแขวนลอยอยู่ในอาหารเจือจางเซลล์แบคทีเรียในอัตรา 1 ต่อ 1 ด้วยอาหารเหลว MS 5 มิลลิลิตร ที่มีสาร acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์

2.3 การถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อยาสูบด้วยวิธี Leaf disc

ตัดชิ้นส่วนของใบให้ติดเส้นกลางใบขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร นำมาผสมกับสารแขวนลอยเชื้อจากข้อ 2.2 นาน 10 นาที ซับเนื้อเยื่อบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ แล้วย้ายเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง บนอาหารสูตร MS ที่เติมกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 1 เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์ ย้ายเนื้อเยื่อที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะคัดเลือก มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารสูตรเดิมที่ไม่มีสารปฏิชีวนะคัดเลือก เพาะเลี้ยงให้พัฒนาเป็นต้นโดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ นำต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมาตรวจสอบยีนด้วยวิธี PCR

2.4 การคัดเลือกและการตรวจสอบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน

ใช้ไพรเมอร์ SINA3 (forward) และ SINA3 (reverse) ในการตรวจสอบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน โดยบดใบยาสูบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มิลลิเมตร ในปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ดังต่อไปนี้

dH2O	7.0	ไมโครลิตร
2x PCR master mix	10.0	ไมโครลิตร
10 μM forward primer	1.0	ไมโครลิตร
10 μM reward primer	1.0	ไมโครลิตร

ใช้เครื่อง GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยกำหนดรอบการทำปฏิกิริยาดังนี้

เริ่มต้นปฏิกิริยาที่ :

98 °C	5	นาที

ตามด้วยโปรแกรมดังต่อไปนี้ จำนวน 35 รอบ

98 °C	5	วินาที
55 °C	5	วินาที
72 °C	20	วินาที

ปิดท้ายปฏิกิริยาที่ :

72 °C 7 นาที

4 °C α

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้ว นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาตรวจวิเคราะห์ด้วย 0.8 % agarose gel

2.5 การเพิ่มปริมาณต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน

ตัดลำต้นของยาสูบให้มีส่วนตาข้าง ขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร ย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS หลังจากนั้นนำขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อวางบนชั้นในห้องเพาะเลี้ยง ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

3. ทดสอบระดับการทนสภาวะเครียดของต้นยาสูบบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl และ Polyethylene glycol (PEG) 6000

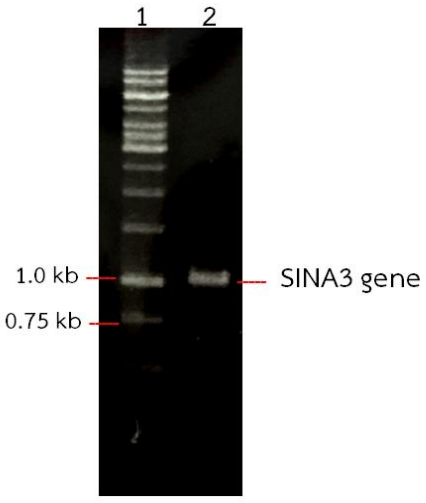
ทดสอบระดับการทนสภาวะเครียดของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *SINA3* วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Random Design; CRD) โดยนำต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *SINA3* อายุประมาณ 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ความเข้มข้น 0, 1.0, 1.5, 2.0 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG 6000 ที่ความเข้มข้น 0, 10.0, 15.0, 20.0 และ 25.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ระดับความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ โดยเพาะเลี้ยงยาสูบปกติบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl และ PEG6000 ระดับความเข้มข้นเดียวกัน เป็นชุดควบคุม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน บันทึกผลการทดลอง

ผลการทดลองและอภิปราย

1. การเคลื่อนย้ายชุดยีน *SINA3* เข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ด้วยวิธี electroporation

นำพลาสมิดสายผสมที่มียีน *SINA3* (ภาพที่ 1) ถ่ายเข้าสู่ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ด้วยวิธี electroporation คัดเลือกเซลล์ *A. tumefaciens* ที่ได้รับพลาสมิดสายผสมที่มียีน *SINA3* บนอาหารสูตร 2YT ที่ผสมกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สุ่มโคลนมาตรวจสอบยีนด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SINAT3 (forward) และ SINAT3 (reverse) ได้ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *SINA3* ขนาด 1.0 กิโลเบส (ภาพที่ 2) ซึ่งมีขนาดของยีนถูกต้องตรงตามที่รายงานไว้คือ ยีน *SINA3* มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ 1.026 กิโลเบส

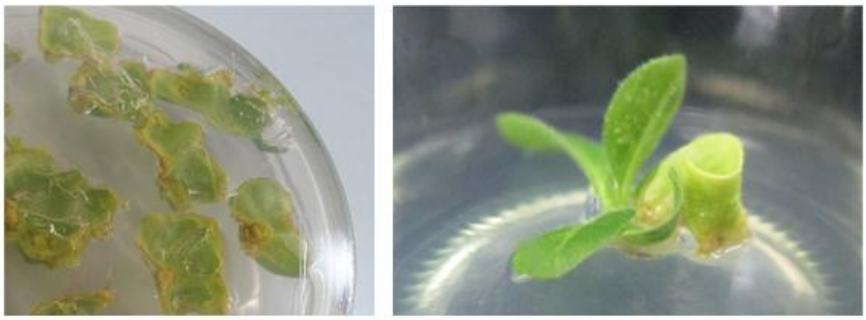
ภาพที่ 1 เจลอิเล็คโตรโฟริซิสแสดงแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดสายผสมที่มียีน *SINA3* (lane 2) เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder; Fermentas (lane 1)



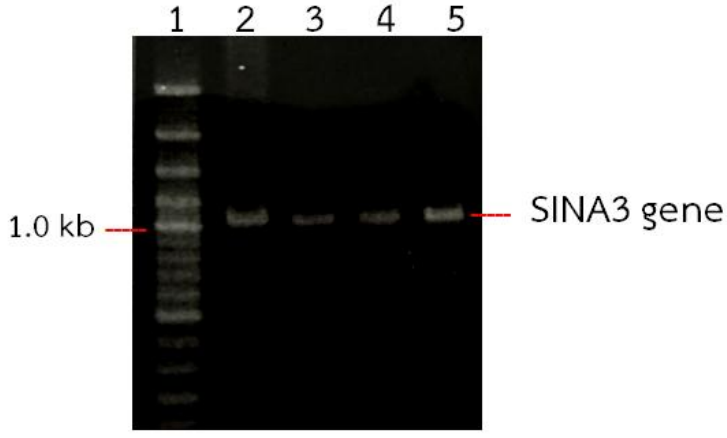
ภาพที่ 2 เจลอิเล็คโตรโฟริซิสแสดงแถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ของยีน *SINA3* จากเซลล์ *A. tumefaciens* ที่ได้รับพลาสมิดสายผสม (lane 2) เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder; Fermentas (lane 1)

2. การถ่ายยีน *SINA3* เข้าสู่เนื้อเยื่อยาสูบด้วยวิธี Leaf disc

หลังจากเลี้ยง *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิดสายผสม จนมีค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 2 นำไปถ่ายเข้าสู่ยาสูบใบกลางและคัดเลือกเนื้อเยื่อยาสูบบนอาหารสูตร MS ที่เติมกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เวลาคัดเลือกนาน 15 วัน เนื้อเยื่อยาสูบเริ่มพัฒนาเป็นแคลลัส เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกต่ออีกเป็นเวลา 45 วัน เนื้อเยื่อยาสูบจึงพัฒนาเป็นต้น (ภาพที่ 3) จึงนำมาตรวจสอบยีน *SINA3* ด้วยเทคนิค PCR พบว่า มีต้นยาสูบจำนวน 4 ต้น ที่ตรวจพบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส (ภาพที่ 4) ซึ่งตรงกับขนาดของยีน *SINA3* จึงนำยาสูบทั้ง 4 ต้น เพิ่มปริมาณเพื่อทดสอบการทนเค็มและทนแล้งต่อไป



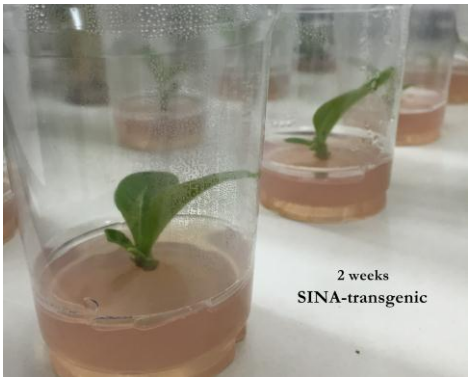
ภาพที่ 3 การเกิดแคลลัสและต้นของใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *SINA3* หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 60 วัน



ภาพที่ 4 เจลอิเล็คโตรโฟริซิสแสดงแถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ของยีน *SINA3* จากต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 1 2 3 และ 4 (lane 2 3 4 และ 5 ตามลำดับ) เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA Ladder; Fermentas (lane 1)

3. ทดสอบระดับการทนสภาวะเครียดของต้นยาสูบบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl และ PEG 6000

นำต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* อายุประมาณ 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 5) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ทดสอบสภาวะเครียดเกลือของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* โดยอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการนำไฟฟ้า เท่ากับ 6.2, 22, 29, 36.3, 44.6 และ 50.3 มิลลิเดซิซิเมนต่อเซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป จัดเป็นอาหารที่ให้ความเค็มจัด เนื่องจากมีการการนำไฟฟ้ามากกว่า 15 มิลลิเดซิซิเมนต่อเซนติเมตร ตามการจำแนกความเค็มที่มีผลกระทบต่อพืชของ **FAO (**1976**)** (ตารางที่ 2) หลังจากเพาะเลี้ยงยาสูบเป็นเวลา 7 วัน พบว่า ต้นยาสูบชุดควบคุมและยาสูบที่มียีน *SINA3* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NaCl ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป ใบยาสูบมีสีเหลืองซีด และต้นยาสูบหยุดการเจริญเติบโตหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NaCl นาน 14 วัน เมื่อเทียบกับต้นยาสูบชุดควบคุมและยาสูบที่มียีน *SINA3* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม NaCl ยังคงมีการเจริญเติบโต โดยมีความสูงและจำนวนใบสีเขียวที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shi *et.al.* (2015) ทดสอบสภาวะเครียดเกลือในต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ที่ได้รับการถ่ายยีน *Lycopene β-cyclase* เพื่อให้มีการเจริญเติบโตและต้านทานต่อสภาวะเครียด พบว่า ต้นยาสูบปกติเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดเกลือจะแสดงอาการใบเหลืองซีดและชะงักการเจริญเติบโตเช่นเดียวกัน



ภาพที่ 5 ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *SINA3* อายุ 2 สัปดาห์ ที่ทำการขยายชิ้นส่วนเพื่อทดสอบการทนสภาวะเครียด

ตารางที่ 1 ค่าการนำไฟฟ้าของอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ความเข้มข้นระดับต่างๆ

ปริมาณ NaCl (% w/v)	ค่าการนำไฟฟ้า (mS/cm)
0	6.2
1.0	22.0
1.5	29.0
2.0	36.3
2.5	44.6
3.0	50.3

ตารางที่ 2 การจำแนกระดับความเค็มที่มีผลกระทบต่อพืช (FAO, 1976)

ค่าการนำไฟฟ้า (mS/cm)	ระดับความเค็ม	การตอบสนองของพืช
น้อยกว่า 2	ไม่เค็ม	ไม่มีผลกระทบต่อพืช
2-4	เค็มน้อย	มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชไม่ทนเค็ม
4-8	เค็มปานกลาง	มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด
8-15	เค็มมาก	พืชทนเค็มสามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้
มากกว่า 15	เค็มจัด	พืชทนเค็มสูงสามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้

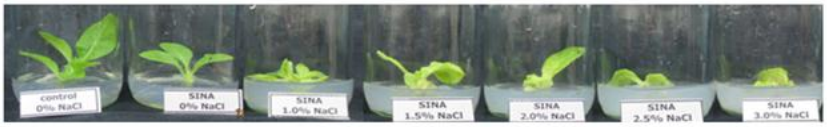
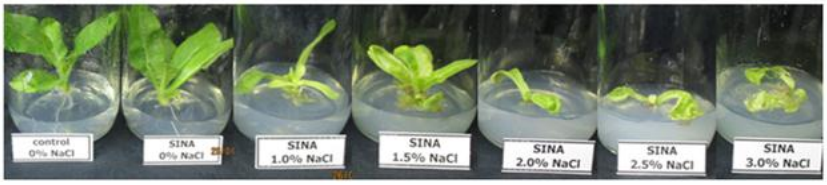
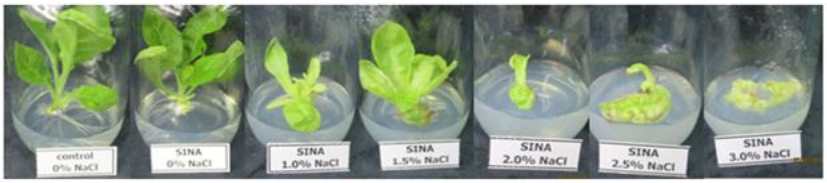
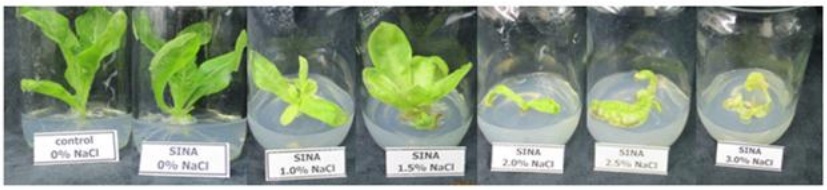
จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ 4) พบว่า ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จะพบว่าน้ำหนักสดของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักสดเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน โดยมีน้ำหนักสดอยู่ในช่วง 1.22-1.94 กรัม ซึ่งแตกต่างจากต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ จะมีน้ำหนักสดเฉลี่ยน้อยกว่าอยู่ในช่วง 0.84 – 1.06 กรัม เมื่อวิเคราะห์ความสูงของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีความสูงเฉลี่ยอยู่ในช่วง 3.5 – 5.30 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม NaCl โดยมีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 8.50 และ 5.90 เซนติเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ เมื่อวิเคราะห์จำนวนใบของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 1.5, 2,

2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีลักษณะเช่นเดียวกับความสูงของต้นยาสูบคือ ต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม NaCl มีจำนวนใบเฉลี่ย เท่ากับ 6.80 และ 5.80 ใบ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนใบเฉลี่ยอยู่ในช่วง 2 – 9.20 ใบ

หลังจากเพาะเลี้ยงต้นยาสูบบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 ความเข้มข้นระดับ 0, 10, 15, 20 และ 25 % (w/v) เป็นเวลา 7 วัน พบว่าต้นยาสูบชุดควบคุมและยาสูบที่มียีน *SINA3* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG6000 ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป ต้นยาสูบมีลักษณะแคระแกร็นและเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม สูตรเดิม นาน 14 วัน ต้นยาสูบชุดควบคุมและยาสูบที่มียีน *SINA3* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG6000 ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป หยุดการเจริญเติบโต แต่ยังคงมีใบสีเขียว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Almansouri *et.al* (2001). พบว่าเมื่อข้าวสาลีอยู่ในสภาวะขาดน้ำ จะมีความยาวของลำต้นน้อยลง เช่นเดียวกับรายงานของ OKÇU et al. (2005) พบว่า PEG6000 มีผลต่องอกและการยืดของยอดถั่วลันเตา

เมื่อวิเคราะห์ผลจากข้อมูลทางสถิติ (ตารางที่ 6) พบว่า ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสด ความสูงของต้น และจำนวนใบของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป มีความแตกต่างจากต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม PEG6000 โดยน้ำหนักสดเฉลี่ยของต้นยาสูบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 อยู่ในช่วง 0.37–0.74 กรัม เมื่อเทียบกับต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม PEG6000 มีน้ำหนักสดเฉลี่ย เท่ากับ 1.94 และ 1.22 กรัม ตามลำดับ ส่วนความสูงเฉลี่ยของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม PEG6000 มีความสูงเฉลี่ย เท่ากับ 8.50 และ 5.90 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ความสูงเฉลี่ยของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 อยู่ในช่วง 2.38–4.24 เซนติเมตร เช่นเดียวกับจำนวนใบเฉลี่ยของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม PEG6000 มีจำนวนใบเท่ากับ 6.80 และ 5.80 ใบ ตามลำดับ โดยที่จำนวนใบเฉลี่ยของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* และต้นยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 อยู่ในช่วง 2.40–5.00 ใบ

ตารางที่ 3 ลักษณะของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ความเข้มข้นระดับ 0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (w/v) เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 30 วัน เทียบกับต้นยาสูบปกติที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม NaCl

จำนวนวันหลังเติม NaCl	ยาสูบชุดควบคุม	ยาสูบที่มียีน SINA3 บนอาหาร MS ที่เติม NaCl (% w/v)					
		0	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
7							
14							
21							
30							

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสด ความสูงของต้น และจำนวนใบของยาสูบที่มียีน *SlNA3* และยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วัน

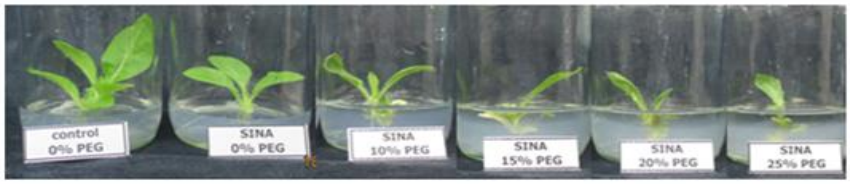
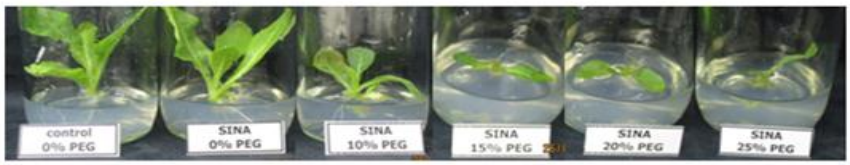
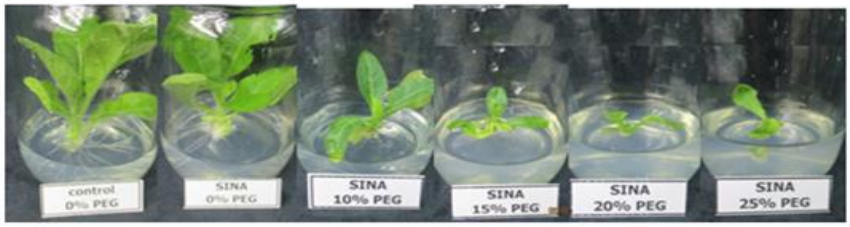
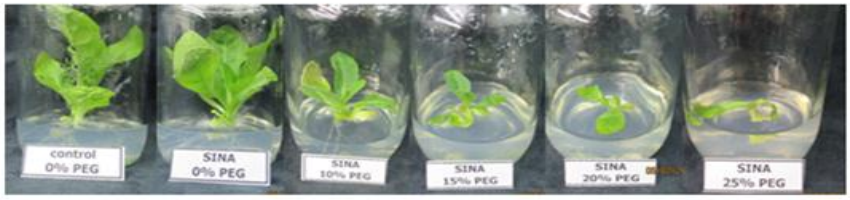
ความเข้มข้นของ NaCl (%)		ค่าเฉลี่ย		
		น้ำหนักสด (g)	ความสูง (cm)	จำนวนใบ (ใบ)
ยาสูบชุดควบคุม				
MS+NaCl	0	1.22 abc[1/]	5.90 b[1/]	5.80 bc[1/]
MS+NaCl	1	0.91 c	4.70 bcd	4.20 cd
MS+NaCl	1.5	1.33 abc	5.04 bcd	4.00 cde
MS+NaCl	2	0.98 bc	4.78 bcd	3.00 de
MS+NaCl	2.5	0.92 c	3.50 d	2.00 de
MS+NaCl	3	0.84 c	3.80 cd	2.20 de
ยาสูบที่มียีน *SlNA3*				
MS+NaCl	0	1.94 a	8.50 a	6.80 b
MS+NaCl	1	1.81 ab	5.28 bc	9.20 a
MS+NaCl	1.5	1.80 ab	5.30 bc	4.00 cde
MS+NaCl	2	0.93 c	3.94 cd	3.00 de
MS+NaCl	2.5	0.99 bc	3.96 cd	2.60 de
MS+NaCl	3	1.06 bc	3.90 cd	2.40 de
F test		*	**	**
C.V. (%)		46.79	23.26	34.20

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 5 ลักษณะของต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 ความเข้มข้นระดับ 0, 10, 15, 20 และ 25 % (w/v) เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 30 วัน เทียบกับต้นยาสูบปกติที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม PEG6000

จำนวนวันหลังเติม PEG6000	ยาสูบชุดควบคุม	ยาสูบที่มียีน SINA3 บนอาหาร MS ที่เติม PEG6000 (% w/v)				
		0	10	15	20	25
7						
14						
21						
30						

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสด ความสูงของต้น และ จำนวนใบของยาสูบที่มียีน *SINA3* และยาสูบชุดควบคุม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วัน

ความเข้มข้นของ PEG (%)		**ค่าเฉลี่ย**		
		น้ำหนักสด (g)	**ความสูง (cm)**	**จำนวนใบ (ใบ)**
ยาสูบชุดควบคุม				
MS+PEG	0 %	1.22 b[1/]	5.90 b[1/]	5.80 ab[1/]
MS+PEG	10 %	0.68 c	3.96 cd	5.00 abc
MS+PEG	15 %	0.37 c	3.20 cde	4.60 bcd
MS+PEG	20 %	0.52 c	2.38 e	4.00 bcde
MS+PEG	25 %	0.51 c	3.30 cde	2.40 e
ยาสูบที่มียีน *SINA3*				
MS+PEG	0 %	1.94 a	8.50 a	6.80 a
MS+PEG	10 %	0.74 c	4.24 c	4.20 bcde
MS+PEG	15 %	0.58 c	2.60 de	3.60 cde
MS+PEG	20 %	0.55 c	3.60 cde	3.60 cde
MS+PEG	25 %	0.51 c	3.18 cde	2.80 de
F test		**	**	**
C.V. (%)		46.05	24.06	32.20

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan’s Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองนี้ได้นำเอายีน *SINA3* ถ่ายฝากยีนเข้าพืชต้นแบบยาสูบ เพื่อศึกษาผลของการแสดงออกของยีนที่ทนต่อสภาวะเครียดเกลือและสภาวะขาดน้ำ โดยนำชุดยีนที่มียีน *SINA3* เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ได้ และถ่ายฝากยีน *SINA3* เข้าสู่เนื้อเยื่อยาสูบ ด้วยวิธี Leaf disc คัดเลือกต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* ได้ จำนวน 4 ต้น เพิ่มปริมาณและนำมาทดสอบสภาวะเครียดเกลือและสภาวะขาดน้ำ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl และ PEG6000 นั้น พบว่าต้นยาสูบที่มียีน *SINA3* ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับต้นยาสูบชุดควบคุม ทั้งน้ำหนักสด ความสูงของต้น และจำนวนใบ แสดงว่าต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *SINA3* ไม่สามารถทนทานต่อสภาวะเครียดเกลือและสภาวะขาดน้ำได้ ซึ่งอาจเกิดจากการทำงานของโปรตีน SINA มีทั้งส่งเสริมและยับยั้งหน้าที่ของโปรตีนชนิดอื่นภายในเซลล์ จากการศึกษาการควบคุมการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในข้าว โดยตั้งชื่อโปรตีนในกลุ่ม E3 ubiquitin ligases ว่า OsDIS1 (for *Oryza sitiva* Drought-induced SINA protein 1) พบว่า ข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *OsDIS1* แบบ over expression จะทำให้ความทนแล้งของข้าวลดลง แต่เมื่อยับยั้งการทำงานของยีน *OsDIS1* ด้วยเทคนิค RNAi ทำให้ข้าวมีความทนแล้งเพิ่มขึ้น (Ning (1) et al., 2011) ต่อมาพบว่า การ over expression ยีน *OsDIS1* ในข้าวแล้วส่งเสริมให้ทนแล้งลดลงนั้น เกิดจากโปรตีน OsDIS1 ทำปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน OsNek6 ซึ่งยีน *Nek6* เป็นยีนที่ตอบสนองต่อความเค็มและสภาวะ osmotic stress โปรตีน OsNek6 จะขัดขวางไม่ให้ OsDIS1 ทำงานกับ ubiquitinates จึงทำให้ข้าวไม่ทนต่อสภาวะขาดน้ำ แต่เมื่อ OsDIS1 ทำปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน OsSKIPa ซึ่งจะขัดขวางการทำงานของ 26s proteasome ทำให้โปรตีน OsDIS1 ทำงานร่วมกับ ubiquitinates โดยตรง จึงทำให้ข้าวเกิดการทนแล้งขึ้นมาได้ (Ning (2) et al., 2011)

จากงานวิจัยครั้งนี้ จะพบว่ายีน *SINA3* ที่ถ่ายฝากเข้าสู่ยาสูบ แบบ over expression นั้น ยังไม่สามารถทำให้ยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนมีความต้านทานต่อสภาวะเครียดได้ ดังนั้น ในการศึกษายีน *SINA3* ต่อไป อาจต้องใช้เทคนิค RNAi ร่วมกับการการถ่ายยีนแบบ over expression เพื่อศึกษาความทนทานต่อสภาวะเครียดของพืชนั้นๆ ต่อไป นอกจากนี้ยังมีข้อมูลพื้นฐานสำหรับความทนทานต่อสภาวะเครียดเกลือและสภาวะขาดน้ำของต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) โดยเมื่อเพาะเลี้ยงยาสูบใบกลางบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl 1 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป เป็นเวลา 7 วัน ต้นยาสูบจะเริ่มมีใบสีเหลืองซีด และหยุดการเจริญเติบโต ภายในเวลา 14 วัน ส่วนต้นยาสูบใบกลางที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม PEG6000 ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป มีผลต่อการเจริญเติบโตและการยืดยาวของลำต้น ภายใน 7 วัน

การทดลองที่ 3

การศึกษาและค้นหายีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NSW3) โดยอาศัยเทคนิค PCR

Genes Discovery expressed in response to drought stress in the drought tolerant Maize (NSW3 variety) by PCR technique.

พยุงศักดิ์ รวยอารี สุริพัฒน์ ไทยเทศ
Payungsak Rauyaree Suriphat Thaitad

คำสำคัญ

การค้นหายีน (genes discovery), สภาวะขาดน้ำ (drought stress), ข้าวโพด (*Zea mays* L.), การแสดงออกของยีน (Gene Expression)

บทคัดย่อ

นำวิธีการ PCR ที่อิงไพรเมอร์ควบคุมการเชื่อมต่อสาย (Annealing Control-Primers-based Gene Fishing Technique) มาใช้ในการระบุยีนที่แสดงออกจากใบข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 ในสภาวะขาดน้ำนาน 7 วัน (treated) จากการใช้ 20 ไพรเมอร์ควบคุมกับ cDNA ใบข้าวโพดขาดน้ำเป็นเทมเพลทในปฏิกิริยา PCR เทียบกับ cDNA จากใบข้าวโพดให้น้ำปกติ (untreated) แอมพลิคอนยีนที่ปรากฏจะถูกนำมาสกัดแยกดีเอ็นเอ โคลนนิ่ง หาลำดับเบสเปรียบเทียบลำดับเบสและหาหน้าที่ของยีน (putative gene functions) เทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล ข้อมูลเบื้องต้นโดยใช้ cDNA ควบคุม (control cDNA) ในการทำปฏิกิริยา PCR ผลการทดลองให้ผลบวกส่วนปฏิกิริยา PCR ที่ใช้อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 ในสภาวะขาดน้ำนาน 7 วัน เป็นเทมเพลท โดยใช้ไพรเมอร์ควบคุม พบการเชื่อมต่อสายกับไพรเมอร์สองเส้นที่แสดงออก (up-regulated) ได้แก่ ACP2 และ ACP12 ข้อมูลที่ได้ในเบื้องต้นอาจนำมาสู่การศึกษาหน้าที่ของยีน หรือความเข้าใจมากขึ้นเกี่ยวกับการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในพืช และนำไปสู่การพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้งต่อไป

Abstract

In the present study, we have used an annealing control primer (ACP) based reverse transcription polymerase chain reaction (Annealing Control-Primers-based Gene Fishing Technique) to identify drought-stress-induced differentially expressed genes in 19 days maize leaves after seedling. The total RNA was extracted from maize leaves at 7 days after water depletion. Using 12 ACP-based RT PCR screening method, two up-regulated ACPs were identified

which were ACP2 and ACP12. DEG screening was performed by GeneFishing method. The identified up-regulated ACPs were then isolated, cloned and sequenced for their putative gene functions. The results of these two ACPs, ACP2 and ACP12 are hypothethical proteins. The information might be helpful for better understanding of drought stress mechanism in maize to further gaining information about the plant genetic improvement for drought tolerance in plant.

บทนำ

PCR (Polymerase Chain Reaction) เป็นปฏิกิริยาเอนไซม์ที่อาศัยหลักการที่ง่าย ทำนายผลง่ายและรวดเร็ว ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย การศึกษาที่ผ่านมา สามารถนำวิธีการนี้มาใช้ในการค้นหาที่เกี่ยวข้องกับสภาวะทนแล้งที่ส่งผลต่อผลผลิตได้ เช่น ยีน DREB (Garg, et al., 2008) พืชมีการปรับตัวทางสรีระวิทยาให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมต่างๆที่ไม่เหมาะสม เพื่อให้ตัวมันเองมีความอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมนั้นๆ เช่น ในสภาพเซลล์ขาดน้ำหรือแห้งแล้ง เป็นต้น การปรับตัวของพืชให้มีการพัฒนาหรือให้เป็นไปตามปกติหรือคงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมดังกล่าวนั้น ต้องมีการแสดงออกของยีนบางชนิด ซึ่งอาจเป็นยีนเดียวหรือกลุ่มยีน (ยีนหลายๆ ชนิดแสดงออกเพื่อตอบสนองพร้อมกันในสภาวะเดียวกัน) ยีนที่ตอบสนอง เช่น ดีไฮดรินส์, LEA (late embryogeneis abundant protein group II) (Ingram and Bartels, 1996), ไซโคลฟิลิต (Gasser *et al*., 1990) Dedydration responsive element binding (DREB) (Skinner *et al*., 2005; Latini *et al*., 2007) เป็นต้น จึงจะทำให้พืชมีการดำรงอยู่ในสภาวะนั้นๆ ได้หรือเกิดความเสียหายน้อยที่สุด ที่ผ่านมานักวิจัยได้ศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในพืช เพื่อให้พืชเกิดการปรับตัวให้คงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี

ในปัจจุบัน ข้อมูลยีนหรือกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในสภาวะขาดน้ำหรือแห้งแล้งที่ได้จากค้นคว้าวิจัยมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้การนำข้อมูลที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะทนแล้งโดยอาศัยวิธีการเทคโนโลยีชีวภาพนั้นมีความเป็นไปได้มากขึ้น อีกทั้ง จากการศึกษาที่ผ่านมา มีข้อมูลที่แสดงให้เห็นชัดแล้วว่า อุณหภูมิของโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกๆ ปี และพบว่าพืชมีการแสดงออกของยีนที่จำเพาะบางชนิด เพื่อที่จะตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเช่นขาดน้ำหรือแห้งแล้งได้ งานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์นำเทคนิค PCR มาใช้ในการค้นหาการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์ลูกผสมนครสวรรค์ 3 (ชื่อเดิมว่า NSX 042029) เป็นพันธุ์ลูกผสมเดี่ยว เกิดจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์แท้ตากฟ้า 1 (พันธุ์แม่) และพันธุ์แท้ตากฟ้า 3 (พันธุ์พ่อ) ซึ่งศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ ได้ทำการศึกษาระหว่างปี 2547-2551 มีลักษณะทนต่อความแล้งและให้ปริมาณสูงถึง 1,147 กิโลกรัมต่อไร่ (http://www.food-resources.org/news/view.php?id=2646) โดยกรมวิชาการได้คาดการณ์ไว้ว่า จะสามารถผลิตเมล็ดข้าวโพดได้ 350 ตัน นำไปส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกได้ 10,000 ไร่

ในประเทศไทย ข้าวโพดนับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมากและพบข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งในประเทศอีกด้วย นับเป็นฐานพันธุกรรมในเชิงวิจัยได้เป็นอย่างดี รวมทั้งข้าวโพดเป็นพืชที่มีประโยชน์ทั้งด้านบริโภคและด้านงานวิจัย ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการค้นหายีนหรือกลุ่มยีนที่ได้มีการศึกษา

ค้นคว้ามาแล้วในพืชชนิดต่างๆ แล้วนำยีนนั้นๆ มาศึกษากับข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งในประเทศไทยว่าข้อมูลที่ได้มีความสอดคล้องหรือแตกต่างกันหรือไม่ เพื่อนำข้อมูลที่ได้นั้นมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีคุณลักษณะทนแล้งได้ต่อไปในอนาคต ทำให้งานวิจัยนี้สามารถให้ข้อมูลในรูปยีนที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรของประเทศไทยได้

ระเบียบวิธีการวิจัย

ประเด็นวิจัย : เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 โดยใช้เทคนิค PCR ที่อิงไพรเมอร์ควบคุมการเชื่อมต่อสาย (Annealing Control-Primers-based Gene Fishing Technique) ในการระบุยีนที่แสดงออกจาก cDNA ใบข้าวโพดที่งดให้น้ำนาน 7 วัน (treated) เทียบกับ cDNA จากใบข้าวโพดให้น้ำปกติ (untreated) ข้อมูลที่ได้นำมาสู่การศึกษาหน้าที่ของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดและนำไปสู่การพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้งต่อไป

สถานที่ทดลอง : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ระยะเวลาทำการวิจัย : ตุลาคม 2556 - กันยายน 2557

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมพืชทดลอง การงดให้น้ำ และการเก็บพืชตัวอย่าง

เพาะเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 ในถุงพลาสติกดำขนาด 10x10x10 นิ้ว ที่ใส่ดินและปุ๋ยในช่วงเดือนกันยายนถึงตุลาคม พ.ศ. 2556 ให้น้ำทุกวันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนงดให้น้ำเป็นเวลา 7 วัน (treated) จึงตัดใบ ส่วน control plant ให้น้ำต่อไปปกติ (untreated) เก็บใบพืชที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาใช้สกัดสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอรวม (Total RNA)

ขั้นตอนที่ 2 การสกัดสารพันธุกรรม Total RNA จากใบข้าวโพดตัวอย่าง

2.1 ตัดใบข้าวโพดตัวอย่างจากตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -80°C สกัดอาร์เอ็นเอด้วยสาร TRIzol® Reagent และ/หรือด้วยการใช้ชุดสกัด Plant RNeasy mini kit (Qiagen, CA, USA)

2.2 สำหรับการสกัดด้วยการใช้ TRIzol® Reagent ชั่งน้ำหนักใบพืชตัวอย่างละประมาณ 100 มิลลิกรัม และเติมสาร TRIzol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บดตัวอย่างใบให้ละเอียดโดยการใช้โกร่งและในสภาพไนโตรเจนเหลว ตักตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หรือในหลอดโพลิโพรพิลีนขนาด 15 มิลลิลิตร (Greiner Bio-one Inc, USA) ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนปริมาตรการสกัด ส่วนการสกัดด้วยวิธีการใช้ชุดสกัด ทำตามคำแนะนำที่ระบุไว้ในคู่มือผู้ผลิต

2.3 บ่มสารละลายที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

2.4 เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม 200 มิลลิลิตร (สำหรับหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร) เขย่าหลอดให้ทั่วนาน 15 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ถึง 3 นาที

2.5 ปั่นหลอดที่อุณหภูมิ 4°C ที่ความเร็ว 12,000 g นาน 15 นาที ดูดสารละลายใส (supernatant) ลงในหลอดใหม่ และเหวี่ยงหลอดด้วยความเร็วสูงซ้ำอีกครั้งนาน 5 นาที ที่ 10,000 rpm ดูดสารละลายใสลงในหลอดใหม่

2.6 ตกตะกอน RNA ด้วยการเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 100 ไมโครลิตร (สำหรับหลอดขนาดเล็ก) และ 1 มิลลิลิตร (สำหรับหลอดขนาดใหญ่) ผสมให้เข้ากัน เหวี่ยงหลอดด้วยความเร็วสูงนาน 15 นาที ที่ความเร็ว 5,000 g ใช้ไปเปตดูดสารละลายใสทิ้งไป ล้าง RNA ที่ได้ด้วยเอทานอล 70% จากนั้นดูดเอทานอลทิ้งปั่นเหวี่ยงหลอดซ้ำอีกครั้ง ดูดเอทานอลที่เหลือออกซ้ำอีกครั้งด้วยไปเปต

2.7 เติมบัฟเฟอร์ GTE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ละลาย RNA ให้เข้ากัน เก็บรักษาในระยะสั้น RNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C (และเก็บที่ -80°C ในระยะยาว)

2.8 วิเคราะห์ RNA ที่สกัดได้โดยนำมาแยกผ่านเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis) ขนาด 80 โวลต์ นาน 30 – 45 นาที โดยใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ Agarose Gel เป็นตัวกลาง จากนั้นนำ Agarose Gel มาย้อมด้วยสาร GelStar นาน 10 ถึง 15 นาที ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นนานประมาณ 5 นาที และบันทึกภาพด้วยเครื่องส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง Ultraviolet (GelDoc transluminator) วัดปริมาณและคุณภาพของปริมาณ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) เก็บรักษา RNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80°C

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> การสังเคราะห์ cDNA สายแรก (First-Strand cDNA synthesis) โดยเอ็นไซม์ Reverse transcriptase (Promega, Madison, USA) ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

3.1 อาร์เอ็นเอที่สกัดไว้ความเข้มข้นประมาณ 3 ไมโครกรัม	x	ไมโครลิตร
3.2 5x reaction buffer	4	ไมโครลิตร
3.3 dNTPs (2Mm แต่ละชนิด)	5	ไมโครลิตร
3.4 dT-ACP1 (10μM)	2	ไมโครลิตร
3.5 Rnase inhibitor (40U/μl)	0.5	ไมโครลิตร
3.6 Moloney murine leukemia - virus reverse transtriptase (200U/ μl)	1	ไมโครลิตร
3.7 เติมน้ำ (dH_20) ลงในปฏิกิริยาข้างต้น	x - 8	ไมโครลิตร
3.8 ปริมาตร	20	ไมโครลิตร

3.9 ดำเนินปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1.5 ชั่วโมง

3.10 เติมน้ำ (dH_20) ลงในปฏิกิริยาข้างต้นอีก	80	ไมโครลิตร

<u>ขั้นตอนที่ 4</u> การเตรียมปฏิกิริยา PCR สำหรับ ACP-based Gene Fishing PCR (Second-Strand cDNA Synthesis and Cloning), การโคลนแอมพลิคอนยีนที่ปรากฏเข้าสู่เวคเตอร์ TOPO cloning vector, และการหาลำดับเบส

1. เตรียมปฏิกิริยา PCR สำหรับ ACP-based PCR ตามที่ได้อธิบายไว้ใน Kim และคณะ (2004)
2. 2x seeAmp ACP™ mastermix
3. Reverse transcriptase
4. 2 mM dNTP RNase inhibitor
5. RNase-free water
6. PCR Thermocyclers
7. สังเคราะห์ cDNA สายสอง สำหรับใช้ในปฏิกิริยาในปฏิกิริยา PCR ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม โดยนำcDNA สายแรกในขั้นตอนที่ 3 มาใช้ (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม โดยประมาณ) ปริมาตร 3-5 ไมโครลิตร และปรับสภาวะ PCR ให้เหมาะสม ตามที่ได้อธิบายไว้ใน Kim และคณะ (2004)
8. แยกแถบที่ปรากฏบน 2% อะกาโลสเจล
9. ย้อมด้วย GelStar และตัดแถบ PCR -DEG ที่ปรากฏ
10. แถบดีเอ็นเอจากอะกาโลสเจล (Gel / PCR DNA Fragments Extraction Kit, Geneaid, Taiwan)
11. นำแถบดีเอ็นเอโคลนเข้าสู่ TOPO TA cloning vector (Invitrogen, Calsbad, CA, USA) ตามคำแนะนำจากคู่มือผู้ผลิต
12. หาลำดับเบสจากพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยการใช้ M13 ไพรเมอร์ โดยใช้เครื่องหาลำดับเบส (ABI PRISM® 377 DNA Sequencer) เปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูลชีวภาพสากล

ผลการทดลองและอภิปราย

รูปที่ 1 แสดงภาพโดยสรุป (overview) ของเทคนิค PCR-DEG เพื่อที่จะระบุยีนที่แสดงออกหรือตอบสนองในสภาวะขาดน้ำ ในการทดลองนี้ได้นำวิธีการ ACP-based Gene Fishing Technique มาใช้ร่วมกับไพรเมอร์ ACP จำนวน 12 คู่ (Seegene, South Korea) ที่อยู่ในชุดคิท (รูปที่ 2) โดยเทคนิคนี้ ได้ประยุกต์เทคนิคระบบ Annealing control primer system มาใช้ในการค้นหาการแสดงแสดงของยีนที่แตกต่าง (Kim et al., 2004) รูปที่ 3 แสดงอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) ที่นำมาใช้ในปฏิกิริยาควบคุม และใช้อาร์เอ็นเอจากตับหนูและไตหนูเป็นตัวอย่างควบคุม

ภายหลังทดสอบปฏิกิริยาควบคุมแล้ว จากการสังเคราะห์ cDNA สายแรก โดยใช้ oligo$(dT)_{15}$ ACP เป็นไพรเมอร์ และใช้ RNA ตัวอย่างจริงเป็นเทมเพลท ทำให้แต่ละตัวอย่าง RNA สังเคราะห์เป็น cDNA สายแรกได้ และนำ cDNA สายแรกที่ได้ มาใช้เป็นเทมเพลทในการสังเคราะห์ cDNA สายสอง จากการใช้ arbitrary ACP primers และสามารถตรวจหา (detect) การแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันได้ (differentially expressed genes) พบว่า ACP จำนวน 2 คู่ ให้ผลแถบดีเอ็นเอที่แสดงของยีนที่แตกต่างกันชัดเจนที่สุด (up-regulated) ได้แก่ ACP2 และ ACP12 โดยในตัวอย่าง RNA จากใบข้าวโพดที่อยู่ในสภาวะขาดน้ำแสดงแถบพีซีอาร์เข้ม (รูปที่ 3) เมื่อเทียบกับตัวอย่าง RNA จากข้าวโพดที่ให้น้ำปกติ

เพื่อทดสอบการแสดงออกของยีนว่ามีการ up-regulated หรือ down-regulated การทดลองเกี่ยวกับการวิเคราะห์ northern blot และ/หรือ real time PCR สามารถนำมาใช้ต่อยอดในการยืนยันการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะขาดน้ำต่อไปได้ ส่วนการทดลองแบบ large scale หรือการค้นหายีนจำนวนมากในสภาวะที่กำหนด สามารถนำเทคนิคดีเอ็นเอไมโครแอเรย์ หรือดีเอ็นเอชิพ (Shalon, 2008) มาใช้ทดสอบการทดสอบการแสดงออกของยีนในสองสภาวะ เพื่อหาการปรากฏของยีนได้พร้อมกันในเวลาเดียวกัน

เพื่อที่จะทำการศึกษาในเบื้องต้นต่อการปรากฏของยีนที่ตอบสนองในสภาวะขาดน้ำกับข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์ลูกผสมนครสวรรค์ 3 การทดลองนี้ได้ทำการเลือกยีนที่ได้แสดงออกในสภาวะขาดน้ำในพืชชนิดต่างๆ ที่ได้เคยมีการศึกษามาแล้ว โดยนำวิธีการพีซีอาร์มาใช้ ได้แก่ ยีน Extensin, Dehydrin, Dreb1, Dr4, Dhn1, SAD2, ARBE และ lea2 ผลการทดลองสังเกตพบแอมพลิคอนยีนปรากฏจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ยกเว้นยีน ARBE, lea2 และ sad2 ดังรูปที่ 4 ทำการยืนยันยีนที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยวิธีการหาลำดับเบส พบมีความเหมือนกับชนิดยีนที่ต้องการ

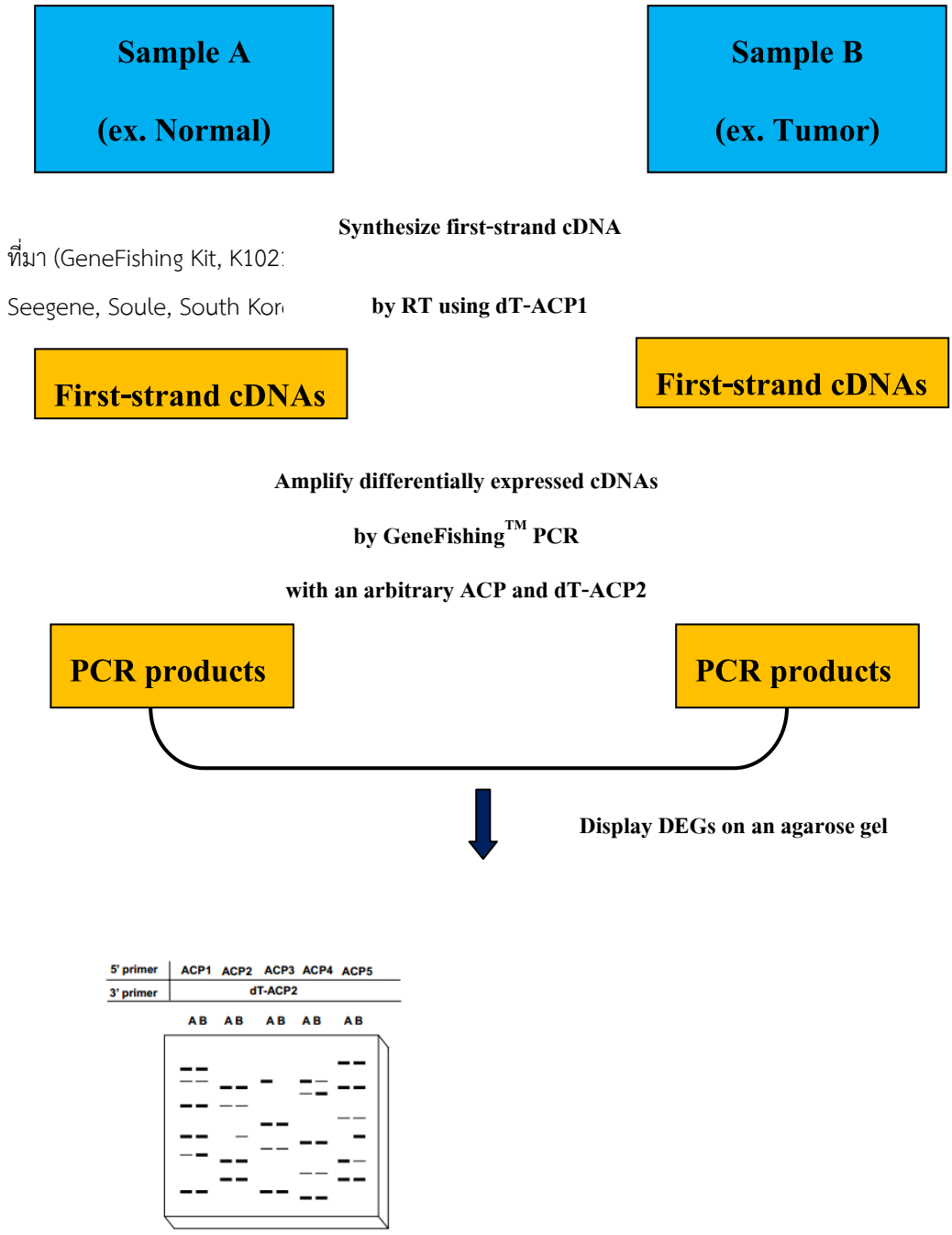
ยีน *Dreb* ประกอบด้วย 2 subfamilies ได้แก่ Dreb1 และ Dreb2 และจัดเป็น homologous ยีน และเกิดการการแสดงอย่างสูง (induction) ในสภาวะเค็มจัด, เย็นจัด และขาดน้ำ

อย่างไรก็ตาม ผลที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากความซับซ้อนของยีนแฟมิลี่ (gene family) หรือเนื่องมาจากความไม่ชัดเจนจากปฏิกิริยาพีซีอาร์

มากไปกว่านั้น ผลที่ได้จากการทดลองนี้จะได้นำไปใช้ต่อยอดในการศึกษาการแสดงออกที่แตกต่างของยีนในสภาวะขาดน้ำเชิงปริมาณหรือที่เรียกว่าวิธี “quantitative RT-PCR” เพื่อนำพัฒนาเป็นโมเลกุลเครื่องหมาย (molecular markers) หรือเป็นเครื่องมือ (tools) ในการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้งต่อไป

ในการทดลองใช้เทคนิคนี้ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนต่อสภาวะแล้งในพืชอื่นๆ เช่น บาร์เลย์ พบว่า ภายใน 6 ชั่วโมง หลังงดให้น้ำ มีการแสดงออกของระดับ mRNA เพิ่มมากขึ้นของยีนดีไฮดริน รีเซบเตอร์ ไคเนส (receptor kinase) และกรดแจสโมนิค (Jasmonic acid) (Lee, *et al*., 2011)

ในปัจจุบัน เป็นที่ทราบกันดีว่า การเปลี่ยนแปลงสภาวะภูมิอากาศของโลก เป็นสิ่งสำคัญยิ่งที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณผลผลิตพืช ดังนั้น เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องค้นหายีนใหม่ๆ เพื่อใช้พัฒนาปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะทนแล้ง



รูปที่ 1 ภาพโดยสรุปของเทคนิค PCR-DEG

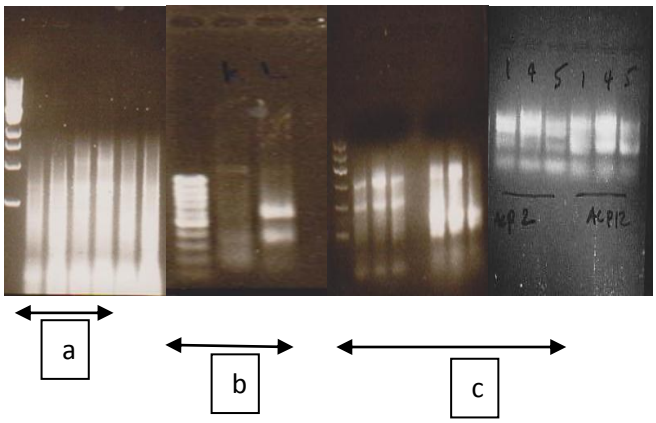
• dT- ACP1 (10 μM): For Reverse Transcription, ใช้เปลี่ยนเป็น first stranded cDNA
dT-ACP1: 5′-CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXXX(T)18 -3′

• dT- ACP2 (10 μM):, ใช้สำหรับ GeneFishing™ PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์เส้นใดเส้นหนึ่งต่อไปนี้ในชุดคิท กับ dT-ACP2: 5′-CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXXX(T)15 -3′

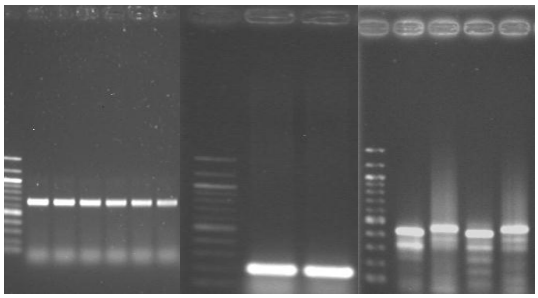
Arbitrary ACPs (5 μM):

ACP1 : 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCCATCGACC-3′
ACP2 : 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXAGGCGATGCC-3′
ACP3 : 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCCGGAGGATG-3′
ACP4 : 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCTGCTCGCG-3′
ACP5 : 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXAGTGCGCTCG-3′
ACP6 : 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGGCCACATCG-3′
ACP7 : 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCTGCGGATCG-3′
ACP8 : 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGGTCACGGAG-3′
ACP9 : 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGATGCCGCTG-3′
ACP10: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXTGGTCGTGCC-3′
ACP11: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCTGCAGGACC-3′
ACP12: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXACCGTGGACG-3′
ACP13: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCTTCACCGC-3′
ACP14: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCAAGTCGGC-3′
ACP15: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCCACCGTGTG-3′
ACP16: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGTCGACGGTG-3′
ACP17: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCAAGCCCACG-3′
ACP18: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCGGAGCATCC-3′
ACP19: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCTCTGCGAGC-3′
ACP20: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGACGTTGGCG-3′

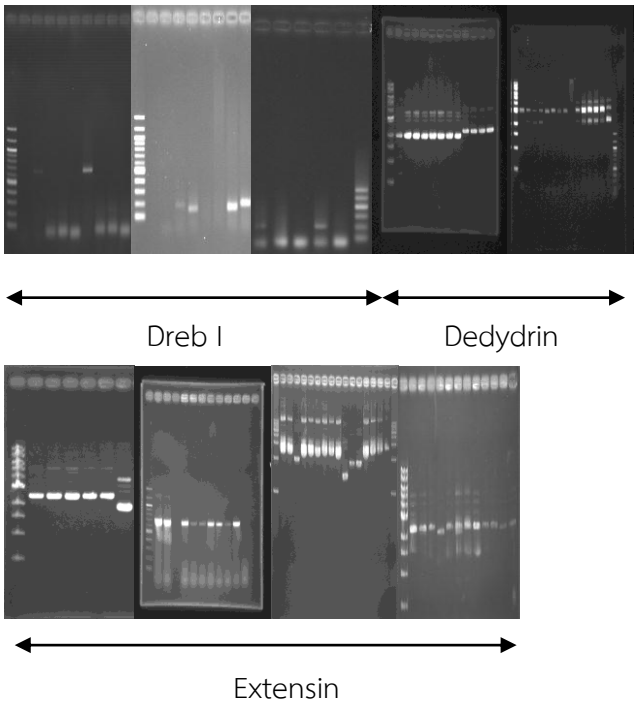
รูปที่ 2 ไพรเมอร์ (arbitrary primers) ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR-DEG (GeneFishing™ Kit, Cat. No. K1021-k1026, Seegene, Soul, Korea)



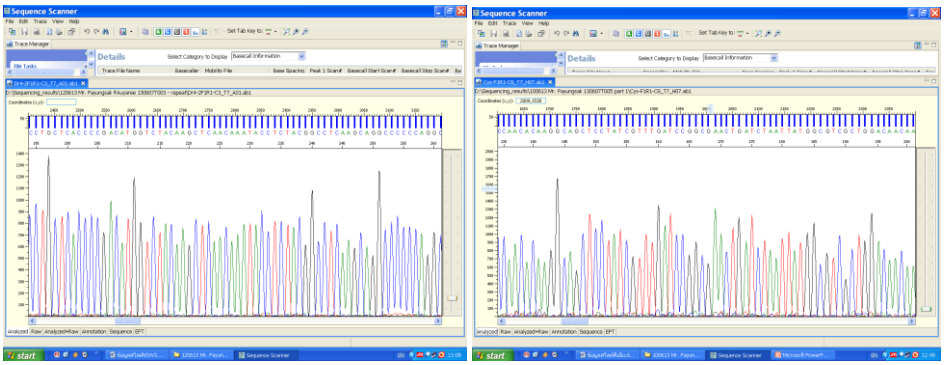
รูปที่ 3 (a) แสดงภาพแยกชิ้นส่วนสารพันธุกรรมผ่านกระแสไฟฟ้า (อะกาโลสเจลอิเลกโตรฟอเรซิส) ของ Total RNA ที่สกัดได้จากใบข้าวโพดตัวอย่างก่อนนำมาผ่านเอ็นไซม์ DNaseI (b) ปฏิกิริยาควบคุม ACP-based Gene Fishing โดยใช้ liver mouse RNA และ kidney mouse RNA (control experiment) (c) การทำปฏิกิริยา ACP-based PCR โดยใช้ RNA จากใบข้าวโพดตัวอย่างให้น้ำปกติ (ควบคุม) และใบข้าวโพดตัวอย่างขาดน้ำ (3 เลนขวามือ) และนำแถบดีเอ็นเอที่แยกได้มาแอมพลิไฟล์ด้วยการใช้ ACP primers (5μM) ในชุดคิทจำนวน 2 คู่ (ACP2 และ ACP 12) จากจำนวน 12 คู่



รูปที่ 4 แสดงพีซีอาร์แอมพลิคอนที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน DrebI, Cystatin และ Dr4 โดยใช้ Gene Specific primers



รูปที่ 5 แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอและแอมพลิคอนยีนชนิดต่างๆ ที่โคลนและแยกได้โดยวิธี colony PCR รูปที่ (1) แสดง Dreb I แอมพลิคอน, Dedydrin แอมพลิคอน และ Extensin แอมพลิคอน



รูปที่ 6 ตัวอย่างลำดับดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหาลำดับเบส

ยีน *DREB* (มีความเหมือนกับ NCBI Reference Sequence : NM_001111611.1) nucleotide (57-902)

TTTTGGCCAACGTCGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGCTCAAGAGCTCCACGAAACGTCCTCTT
GCTCTGCCACCACCACCTCGTCGTGCACCACATCCTGCTGCTCGTCCACTGTCACAGACTCGTCCTCTTCGCCCCCGTCAC
CGGCGGCGGCCAATGCCGCGCCCGCGACACGGAAGCGGCAGGCGTTGGAGGCCGAGGCCGAGGCCGAGGCGGGCGGTGAGG
AGGAGGAGGAGGAGGAAGGCTGTGCTGGTAATAAGGCGGCGCCGGCCAAGAAGCGACCGCGGGGCAGCGAGGGGAAGC
ACCCGACGTTCCGCGGCGTGCGGATGCGGACGTGGGGCAAGTGGGTGTCGGAGATCCGCGAGCCGCGCAAGAAGTCGCGCA
TATGGCTCGGCACGTTCCCCACCGCCGAGATGGCCGCGCGCGCCCACGACGTCGCGGCGCTCGCCATCAAGGGCCGCGCCG
CGCACCTCAACTTCCCGGACCTTGCCGGCGCGCTGCCGCGCGCCGCGTCCGCGGCGCCCAAGGACGTCCAGGCGGCCGCCG
CATTGGCCGCTGCGTTCACGTCGCCGTCATCGGAGCCCGGCGCCGGCGCCGGCGCGCACGAGGAGCCCGCTGCCAAGGACG
GCGCCGCGCCCGCGCCCGCGCCCGAGGAGGCAGCCGCCGACGCACAGGCACCAGTACCAGTAGCACTACCACCGCAATCAC
TAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAG
TGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAAA
CATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCAACATTAAATTGCGTGGCGCTC
ACCTGCCCGCCTTT

ยีน *DREB* (มีความเหมือนกับ NCBI Reference Sequence : NM_001111611.1) nucleotide (51-723)

TGGGGCCCGAGTTCCATGCTCCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGCTCAAGAGCTCCACGAAACGTCCTCT
TGCTCTGCCACCACCACCTCGTCGTGCACCACATCCTGCTGCTCGTCCACTGTCACAGACTCGTCCTCTTCGCCCCCGTCA
CCGGCGGCGGCCAATGCCGCGCCCGCGACACGGAAGCGGCAGGCGTTGGAGGCCGAGGCCGAGGCCGAGGCGGGCGGTGAG
GAGGAGGAGGAGGAGGAAGGCTGTGCTGGTAATAAGGCGGCGCCGGCCAAGAAGCGACCGCGGGGCAGCGAGGGGAAG
CACCCGACGTTCCGCGGCGTGCGGATGCGGACGTGGGGCAAGTGGGTGTCGGAGATCCGCGAGCCGCGCAAGAAGTCGCGC
ATATGGCTCGGCACGTTCCCCACCGCCGAGATGGCCGCGCGCGCCCACGACGTCGCGGCGCTCGCCATCAAGGGCCGCGCC
GCGCACCTCAACTTCCCGGACCTTGCCGGCGCGCTGCCGCGCGCCGCGTCCGCGGCGCCCAAGGACGTCCAGGCGGCCGCC
GCATTGGCCGCTGCGTTCACGTCGCCGTCATCGGAGCCCGGCGCCGGCGCCGGCGCGCACGAGGAGCCCGCTGCCAAGGAC
GGCGCCGCGCCCGCGCCCGCGCCCGAGGAGGCAGCCGCCGACGCACAGGCACCAGTACCAGTAGCACTACCACCGCAATCA
CTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATA
GTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTTCCTGTGTGAAATGTTATCCGCTCACATCTCCACACAA
CATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGGTGCCTAAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGGTTGGCG

รูปที่ 7 ลำดับเบสของยีนทนแล้งที่ได้จากซีดีเอ็นเอใบข้าวโพดลูกผสมพันธุ์นครสวรรค์ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ยีนชนิดต่างๆที่ใช้ในการปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR)

Gene Names ™(˚C)	Primers	PCR Sizes
Dreb (60°C)	drebF1 (5'-gctcaagagctccacgaaac-3')	700 bp
	drebR1 (5'-gcggtggtagtgctactggt-3'	
Dehydrin (39°C)	dehyF (5'-GAYGARTAYGGIAAYCC-3')	300 bp
	dehyR (5'-GGIARYTTYTCYTTIATYTT-3)'	
Cystatin (55°C)	cysF1(5'-aaaactacaggctgcgcatt-3')	200 bp
	cysR1(5'-acgcggtacttgcagaattt-3')	
	cysF1(5'-aaaactacaggctgcgcatt-3')	200 bp
	cysR2(5'-tcctagaaggcgactcgaac-3')	
RiP5 (extensin) (60°C)	extF2(5'-cgcattgtctgaaggactga-3')	200 bp
	extR2(5'-gtcttgggcttaggccttttt-3')	

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ได้สารพันธุกรรม (Total RNA - อาร์เอ็นเอรวม) จากใบข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 อายุสองสัปดาห์ที่ให้น้ำปกติ (untreated) และ งดให้น้ำ (treated) ที่สภาวะกำหนดขาดน้ำ 7 วัน โดยใช้วิธีการพีซีอาร์อิงไพรเมอร์ควบคุมเอซีพีด้วยการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอกับไพรเมอร์จำนวน 20 ไพรเมอร์ (ACP-based primers Gene Fishing reverse transcription PCR) มาใช้ในการหาการแสดงออกของแถบซีดีเอ็นเอที่ปรากฏ เพื่อทำการโคลนนิ่ง และหาลำดับเบส และเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูลชีวภาพสากล ผลการทดลองให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างใบข้าวโพดภายใต้สองสภาวะได้แก่ ให้น้ำปกติ (control) และสภาวะขาดน้ำ (treated) และพบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏได้แก่ ACP2 กับ ACP12 และลำดับเบสพบมีความเหมือนกับ hypothethical proteins ผลจากการศึกษานี้ พบว่า ระดับการแสดงออกของยีนระหว่างสองสภาวะมีความแตกต่างกัน จึงได้ออกแบบไพรเมอร์ยีนทนแล้งจำนวน 5 ยีน ที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ (ในการทดลองการศึกษาการแสดงออกของกลุ่มยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในระดับอาร์เอ็นเอในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ) เพื่อนำมาใช้ศึกษากับยีนทนแล้งในข้าวโพดพันธุ์ลูกผสมนครสวรรค์ 3 อาจอาศัยเทคนิค RT-PCR เพื่อเปรียบเทียบแบบแผนการแสดงออกของยีนทนแล้งเพิ่มเติมที่ปรากฏกับพืชที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ และเพื่อเป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดต่อไป

การตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น ขาดน้ำ เย็นจัด หรือ เค็ม หรือสภาวะเครียดอื่นๆในพืช เป็นสิ่งที่พืชในแต่ละสปีชีส์แตกต่างกันในแง่ของการตอบสนอง เพื่อให้อยู่รอดภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆเหล่านั้น ทั้งทางด้านสรีระวิทยา โครงสร้างของเซลล์ และชีวโมเลกุล แม้ว่าที่ผ่านมาได้มีการศึกษาถึงปัจจัยที่

ควบคุมการตอบสนองต่อการแสดงออกของยีนที่เหนี่ยวนำในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในพืชหลายๆ ชนิด เช่น อะราบิดอปซิส ข้าว บาร์เลย์และพืชอื่นๆ เป็นต้น แต่ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 ที่พัฒนาโดยนักวิชาการศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ 3 กรมวิชาการเกษตร ยังไม่มีการศึกษาในแง่ของการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองในสภาวะขาดน้ำ (stress inducible gene expression) จึงได้มีการนำ ACP-based Gene Fishing Techniques มาใช้ในการหายีนที่แสดงออกของยีนในสภาวะขาดน้ำ 7 วัน ในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมพันธุ์นครสวรรค์ 3 จากการนำ arbitrary primers มาใช้จำนวน 20 เส้น ร่วมกับ ACP ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์เส้นที่ ACP2 และ ACP12 มีการปรากฏ (up-regulated) จากการปฏิกิริยา PCR การตรวจสอบต่อไปโดยใช้วิธีการ northern blot analysis หรือการวิเคราะห์หาการแสดงออกของยีนเชิงปริมาณ (quantitative real time PCR) จะเป็นประโยชน์ต่อไป

อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองพบว่า ยีนบางชนิดมีการแสดงออกของแบบ up-regulated ได้แก่ ยีน *Extensin*, *Dehydrin*, *Dreb1*, *Dr4*, *Dhn1*, *SAD2*, *ARBE* และ *lea2* ผลการทดลองสังเกตพบแอมพลิคอนทุกชนิดยีนปรากฏจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ยกเว้นยีน *ARBE*, *lea2* และ *sad2* ทำการยืนยันยีนที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยวิธีการหาลำดับเบส พบมีความเหมือนกับชนิดยีนที่ต้องการ จากนั้น จึงนำยีนที่สนใจมาหาการแสดงออกของยีนด้วยวิธีการ quantitative realtime PCR ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่ามีการแสดงออกของยีนบางชนิดในเชิงปริมาณของพืชในสภาวะขาดน้ำนาน 7 วัน ในงานวิจัยต่อเนื่อง จะได้นำวิธีการ quantitative real time PCR มาใช้ในการหาแสดงออกของยีนเชิงปริมาณที่ได้คัดเลือกได้จำนวน 5 ชนิดยีน และ อีก 3 ชนิดยีนที่แสดงในทุกสภาวะ (housekeeping genes) มาทดสอบซ้ำต่อไป

การทดลองที่ 4

การปรับปรุงและถ่ายฝากยีนทนทานสภาพแวดล้อม OsSKIPa สู่ถั่วเหลืองโปรตีนสูง โดยเทคนิค Ovary-drip

Genetic Manipulation and Gene Insertion of OsSKIPa, a Multistress Tolerance Gene, to High Protein Soybean Using Ovary Drip Transformation.

พงศกร สรรค์วิทยากุล สุภาวดี ง้อเหรียญ สุมนา งามผ่องใส

Pongsagorn Sunvittayagul Suphawadee Ngorian Summana Ngampongsai

คำสำคัญ

การถ่ายยีน (Transformation), ถั่วเหลือง (*Glycine max* L. Merrill), ยีนทนทานสภาพแวดล้อม (multistress tolerance), เทคนิค Ovary drip (Ovary drip technique)

บทคัดย่อ

การพัฒนาเทคนิคในการถ่ายยีนโดยตรงซึ่งเป็นเทคนิคใหม่จะมีประโยชน์อย่างมาก และที่นิยมมากขึ้นเรื่อยๆ เพราะความกังวลที่เกิดจากการใช้เวคเตอร์ ยีนต่อต้านสารปฏิชีวนะต่างๆและยีนที่ไม่พึงประสงค์อื่นๆ ซึ่งจะติดมากับเวคเตอร์ แต่ linear gene cassette จะมีเพียงยีนที่เราต้องการเท่านั้นที่จะทำการถ่ายเข้าสู่พืช ในงานทดลองนี้ได้ดำเนินการศึกษาเพื่อจะทำการถ่ายยีนทนแล้ง *OsSKIPa* เข้าสู่ถั่วเหลืองโดยวิธี Ovary drip และประสบความสำเร็จในการออกแบบและสังเคราะห์ linear gene cassette เพื่อใช้ในการดำเนินการทดลอง รวมถึงพัฒนาวิธีการ Ovary drip ในถั่วเหลืองพันธุ์ไทย แต่อย่างไรก็ดียังไม่พบ Insert จาก linear gene cassette ในถั่วเหลืองรุ่นลูกที่ได้รับการถ่ายยีนโดยวิธีดังกล่าวซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากสภาวะแวดล้อมและอุณหภูมิของประเทศไทยที่ไม่เหมาะสมต่อวิธีการดังกล่าวและทำให้ไม่เกิดการถ่ายยีนขึ้น

Abstract

Development of direct transformation become very useful and more attractive to researcher because of the concerning on using genetic maker in the vector such as antibiotic gene or other illegal inserts. With directed transformation method, linear gene cassette will be the only insert to plant genome. This study is intended to transform drought resistance gene *OsSKIPa* to soybean via Ovary drip. The experiment was done successfully with the synthesis of

linear gene cassette and development of the protocol via remove mostly styles and direct DNA drip to the soybean flower. Despite all efforts and many tries, the transformation frequencies come out o% and no Insert found in F1 Thai soybean cultivar which may cause from high temperature and inappropriate environment & condition.

บทนำ

สิ่งที่แตกต่างระหว่างพืชกับสัตว์นั้นคือ พืชจำเป็นที่จะต้องปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงตลอดเวลาโดยการปรับตัวระดับโมเลกุลและทางสรีรวิทยา ปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในกระบวนการปรับตัวนี้คือ ยีนซึ่งอยู่กลุ่ม Transcription factor ในพืช (S. Yamaguchi *et al*., 2006, JK. Zhu 2002) จากหลักฐานที่ผ่านมามีข้อบ่งบอกว่า กระบวนการสังเคราะห์ RNA มีส่วนเกี่ยวข้องกับ การปรับตัวของพืชต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวย นอกจากนี้มีการค้นพบว่ามียีน 8 ยีน ที่อยู่ในกระบวนการสังเคราะห์ RNA มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวย หรือ phytohormone abcisic acid เช่น โปรตีน STABILIZED 1 เป็น Ortholog ของ PRP46 ใน Arabidopsis โปรตีนชนิดนี้ เป็น Splicing factor ของ Pre-mRNA ทำหน้าที่ตัด หรือเปลี่ยนสภาพ pre-mRNA ที่ไม่เสถียร (แต่ Pre-mRNA ตัวนี้สำคัญต่อการปรับตัวของพืชต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวย (GH. Lee *et al*., 2006)

อย่างไรก็ตาม หน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราห์ RNA เหล่านี้ ยังไม่เป็นที่เปิดเผยแน่ชัดว่าเกี่ยวข้องอย่างไรกับกระบวนการปรับตัวของพืช แต่หลักฐานเหล่านี้เป็นหลักฐานสำคัญที่สนับสนุนว่า RNA metabolism มีส่วนสำคัญต่อการปรับตัว และการตอบสนองของพืชต่อปัจจัยที่ไม่เอื้ออำนวยต่างๆ หนึ่งในนั้นก็คือ ยีน OsSKIPa, ยีน OsSKIPa สังเคราะห์โปรตีนที่ชื่อว่า SKIP หรือ SKI interating protein มีรายงานว่า โปรตีน SKIP มีความสำคัญต่อ Cell viability ในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด โปรตีน SKIP และ โฮโมลอกส์ Bx42 ได้ถูกค้นพบใน *Drosophila (*H. Saumweber et al., 1990*)* และ ระบุเอกลักษณ์โดยใช้เทคนิค two-hybrid screening (*R. Dahl et al. 1998*) โปรตีน SKIP ได้รับการระบุว่าเป็น transcriptional coregulator และ spliceosome component ในมนุษย์ *(JD. Figueroa et al. 2004, GM. Leong et al. 2004)*

โฮโมลอกส์ทั้งหมดของ SKIP ที่ได้รับการวิจัยประกอบด้วยโดเมน SNW/SKIP มี Signature เป็นรหัสเปปไทน์ S-N-W-K-N ซึ่งอาจจะมีความสำคัญต่อหน้าที่พื้นฐานของโปรตีน ตัวอย่างเช่น เป็น Cofactor ใน Transcription และ Splicing (*Folk P. et al. 2004*) อย่างไรก็ตาม หน้าที่อื่นๆ ของ โฮโมลอกส์ SKIP แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต เช่น โฮโมลอกส์ Bx42 ใน *Drosophila melanogaster* มีหน้าที่ร่วมในส่วนของ ecdysone-stimulated transcription *(C. Wieland et al.1994)* และ การถ่ายทอด Notch signal *(D. Negeri et al. 2002)* นอกจากนี้ โปรตีน SKIP ยังจำเป็นต่อการพัฒนาระบบประสาท *(Al. Ivanov et al. 2004)* และเนื่อเยื่ออื่นๆอีกด้วย *(D. Negeri et al. 2002)* ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โปรตีน PRP45 เป็นโปรตีนซึ่งประกอบด้วยโดเมน SNW/SKIP มีความจำเป็นต่อ cell viability *(M. Albers et al. 2003)* โฮโมลอกส์ ของ SKIP CeSKIP (Skp-1) ใน *Caenorhabditis elegans* (หนอนจำพวกหนึ่ง) ได้ถูกระบุว่าเป็นส่วนประกอบสำคัญใน transcription complexe ของ RNA Polymerase II และ *C. elegans* ไม่สามารถขาดโปรตีนตัวนี้ได้ในการดำรงชีวิตอยู่ *(M. Kostrouchova et al. 2002)* สำหรับในพืชนั้น โฮโมลอกส์ ของ Ski-interacting protein (SKIP) ในข้าว (*Oryza sativa L.*) มีความเกี่ยวข้องโดยจำเป็นกับ cell viability และการปรับตัวต่อสภาวะความเครียดในข้าว *(Xin Hou. et al. 2009)*

สำหรับการถ่ายยีนในถั่วเหลืองนั้น วิธีที่นิยมใช้กันในปัจจุบันคือ การเหนี่ยวนำการถ่ายยีนโดย Agrobacterium ใน cotyledonary nodes และ การใช้ gene gun particle bombardment ใน embryogenic cultures (Sato et al. 1993, Droste et al. 2002, Paz et al. 2004; 2006, Xue et al. 2006) อย่างไรก็ตาม เทคนิคที่กล่าวมานั้นมีวิธีการที่ซับซ้อนและต้องการความเชี่ยวชาญ โดยเฉพาะในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองซึ่งทำได้ยาก (Bent 2000, Mello-Farias and Chaves 2008). การพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนสู่พืชโดยตรงด้วยประอัตราความสำเร็จสูงและไม่ต้องผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะเป็นประโยชน์อย่างมาก เทคนิคดังกล่าวอาจช่วยแก้ปัญหาด้านข้อจำกัดของ Genotype specificity ปัญหาจากการแปรผันทางพันธุกรรมซึ่งเป็นผลมาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการลดลงของภาวะเจริญพันธุ์ (Hu and Wang, 1999)

เทคนิคการถ่ายยีน โดยใช้ Agrobacterium เป็นตัวเหนี่ยวนำในเซลล์สืบพันธุ์ของพืช (ดอก) หรือการถ่ายยีนแบบ in planta floral-dip เป็นที่นิยมใช้และประสบความสำเร็จในการใช้ในพืชต้นแบบ Arabidopsis thaliana และพืชตระกูลถั่ว Medicago truncatula (Clough and Bent. 1998, Trieu et al. 2000, Bent 2006, Zhang et al. 2006) โดยเทคนิคการใช้ Agrobacterium เพื่อการถ่ายยีนแบบ in planta floral-dip นั้นกระทำโดยการแช่ เซลล์สืบพันธุ์ซึ่งพัฒนาเต็มที่แล้วลงในสารละลาย Agrobacterium ซึ่งมี Plasmid DNA อยู่ภายใน โดยมีเป้าหมายที่เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียรวมถึง Ovary (Ye et al. 1999, Bechtold et al. 2000, Bent 2000, Desfeux et al. 2000) อัตราความสำเร็จในการถ่ายยีนใน Arabidopsis thaliana มีค่าอย่างน้อย 1% และในถั่ว Medicago มีค่าอยู่ระหว่าง 4.7% - 76% (Trieu et al. 2000)

ดังนั้นหากสามารถพัฒนาเทคนิคในการถ่ายยีนโดยตรง จะมีประโยชน์อย่างมาก ซึ่งมีรายงานการใช้เทคนิคการถ่ายยีนซึ่งเป็นสายรหัสพันธุกรรมอย่างเดียวโดยตรงผ่าน Stigma เพื่อให้รหัสพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์ไข่หรือเรียกว่า Ovary-drip ทั้งแบบใช้ Agrobacterium เป็นสื่อนำ ในฝ้าย (Chen et al. 2010) ข้าวสาลี (Zale et al., 2009) และใช้ linear gene cassette อย่างเดียวในข้าว (Luo and Wu, 1988) ข้าวโพด (Yang et al., 2009; Wu et al. 2008) ถั่วเหลือง (Gao *et al*. 2007; Liu et al. 2009a; Liu et al. 2009b) หัวหอม (Cheng et al. 2009) มะเขือเทศ (Chen et al. 2010) ถั่วเขียว (ศิริวรรณ อินทร์พรหม 2548)โดยมีอัตราความสำเร็จในการถ่ายยีนอยู่ระหว่าง 3% - 11% ทั้งนี้การใช้ linear gene cassette เป็นที่นิยมมากขึ้นเรื่อยๆเพราะความกังวลที่เกิดจากการใช้เวคเตอร์ ยีนต่อต้านสารปฏิชีวนะต่างๆและยีนที่ไม่พึงประสงค์อื่นๆ ซึ่งจะติดมากับเวคเตอร์ แต่ linear gene cassette จากมีเพียงยีนที่เราต้องการเท่านั้นที่จะทำการถ่ายเข้าสู่พืช

ในงานทดลองนี้จะทำการถ่ายยีนทนแล้ง OsSKIPa เข้าสู่ถั่วเหลืองโดยวิธี Ovary-drip และใช้ linear gene cassette เป็นหลักเพื่อพัฒนาเทคนิคดังกล่าวมาใช้กับถั่วเหลืองพันธุ์ไทย

ระเบียบวิธีการวิจัย

<u>ประเด็นวิจัย :</u> งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธีการถ่ายฝากยีน Stress tolerance (*OsSKIPa*) เพื่อปรับปรุงความทนทานต่อสภาพอากาศ การเพิ่มผลผลิตและปริมาณโปรตีนของถั่วเหลือง โดยการนำเทคนิค Ovary drip มาใช้กับ Linear gene cassette ในถั่วเหลืองพันธุ์ไทยซึ่งจะช่วยลดขั้นตอนความยุ่งยากต่างๆ ในการทำ Tissue cell

culture, plant regeneration ของถั่วเหลืองซึ่งทำได้ยาก ซับซ้อน และต้องใช้ผู้ที่ได้รับการฝึกฝนมาเฉพาะด้านในการดำเนินการ นอกจากนี้การใช้ Linear gene cassette แทนการสร้างเวคเตอร์จะช่วยลด DNA ปนเปื้อนที่จะทำการถ่ายฝากเข้าสู่พืชด้วย เช่น ลดการใช้ยีนคัดเลือกต่างๆ อาทิ ยีนที่ช่วยให้พืชทนทานต่อ Antibiotic เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้นอกจากจะช่วยปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลือง เพื่อให้ทนต่อสภาวะโลกร้อนมากขึ้นแล้ว ยังมีการนำเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยทางชีวภาพ (Biosafety) มาใช้เพื่อเป็นต้นแบบสู่การวิจัยต่อไปในอนาคตอีกด้วย

สถานที่ทดลอง : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ระยะเวลาทำการวิจัย : ตุลาคม 2557 - กันยายน 2558

วิธีการทดลอง

การโคลน Cassette และการตรวจสอบความถูกต้องของ Vector และ Cassette

นำเวคเตอร์ pCAMBIA2300 ซึ่งมี Cassette OsSKIPa ที่อยู่ภายใน Transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α (ดูวิธีการทดลอง, ดัดแปลงจาก Chung, C. T. *et al.* 1989)

การตรวจสอบ Transformants

Spread เชื้อที่ได้รับการถ่าย Vector ลงบน Plate อาหาร LB Agar ผสม Kanamycin ความเข้มข้น 50 µg/ml และ Spread เชื้อที่ไม่ได้รับการถ่าย Vector (negative control) ลงบน Plate อาหาร LB Agar ผสม Kanamycin ความเข้มข้นเดียวกัน ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อบน Plate

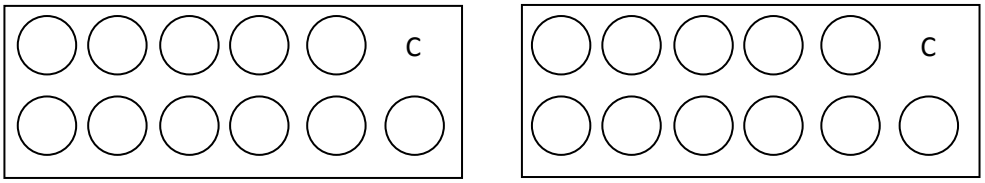
ดำเนินการตรวจสอบ Transformant โดยตรวจสอบ Vector ที่ได้รับการถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียโดยเทคนิค Colony PCR โดยใช้ Primer Os1_F และ Os1_R (Ta = 53°C) โดยมี PCR product มีขนาด 1,007 bp และ 746 bp เพื่อใช้ตรวจสอบทิศของโพรโมเตอร์และยีน

การเพิ่มปริมาณ Transform cassette

นำเวคเตอร์จาก Clone ที่ 5 มาใช้ในการเพิ่มปริมาณ **Transform cassette** โดย Conventional PCR ด้วย primer LB_Os และ RB_Os ที่ Ta=47°C Volume total 50 µl เพื่อให้ได้ Transform cassette ที่ขนาด 2,810 bp และทำให้บริสุทธิ์ (QIAquick PCR purification Kit) และวัดความเข้มข้น โดยจะได้ความเข้มข้นของ Transform cassette ระหว่าง 100 – 200 ng/µl

การทดสอบ Artificial pollination และการทำ Ovary drip

ดำเนินการปลูกถั่วเหลืองพันธุ์ S17-3 ในกระถาง จำนวน 22 กระถาง และ เชียงใหม่ 60 (Control) จำนวน 2 กระถาง เมื่อถั่วเหลืองโตถึงระดับ node ที่ 6 จึงเริ่มเตรียม Transform cassette เพื่อใช้ทดสอบ Ovary drip ตาม Protocol ดัดแปลงจาก Ellen B. et al. 2003 ในการทดลองนี้ได้เตรียม Transform cassette ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 100 ng/µl กับ DMSO 0.25%, NAA 4mg/l และ GA 4 mg/l



ภาพที่ 1 แสดงแผนผังการปลูกถั่วเหลืองในกรงกันหนู/แมลง

เมื่อถั่วเหลืองออกดอก เลือกดอกถั่วเหลืองที่บานแล้วมีอายุ 1 วัน ใช้ Forcep ขนาดหัว 0.15 mm ค่อยๆ ฉีกกลีบดอกชั้นนอกและกลีบดอกชั้นในออก จากนั้นตัดเกสรตัวผู้ใส่แผ่นฟลอยด์เก็บใส่ sterile petri-dish ที่ 4°C จากนั้นเลือกตัวแทนดอกถั่วเหลืองที่จะทำการทดสอบมา 50 ดอกที่ยังไม่บาน ใช้ Forcep ขนาดหัว 0.15 mm ค่อยๆ ฉีกกลีบดอกชั้นนอกและกลีบดอกชั้นในออก โดยไม่ได้ฉีกฐานรองดอกออกตัดเกสรตัวผู้ออกทั้งหมดจากนั้นป้ายเกสรตัวผู้ด้วยพู่กันที่เกสรตัวเมีย และทำสัญลักษณ์ไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 20 ชั่วโมง เพื่อให้เกสรตัวผู้ต่อท่อเกสรถึงเกสรตัวเมีย จากนั้นจึงดำเนินการทำ Ovary drip โดยการเฉือนที่โคนของ Style เกสรตัวเมีย จึงหยอดสารละลาย Transform cassette ที่ความเข้มข้นประมาณ 100 ng/µl, DMSO 0.25%, NAA 4mg/l และ GA 4 mg/l ปริมาตร 7 µl ทั้ง 50 ดอก และทำสัญลักษณ์ไว้

การทำ Ovary drip ในดอกที่ผ่านการผสมตัวเองแล้ว

เมื่อถั่วเหลืองออกดอกแล้ว เลือกดอกถั่วเหลืองที่บานแล้วมีอายุประมาณ 1 วัน (ประมาณ 20 ชั่วโมง) และยังบานไม่เต็มที่ใช้ Forcep ขนาดหัว 0.15 mm ค่อยๆฉีกกลีบดอกชั้นนอกและกลีบดอกชั้นในออกเพื่อให้เกสรตัวผู้ต่อท่อเกสรถึงเกสรตัวเมีย เด็ดเกสรตัวผู้ทิ้งและจึงดำเนินการทำ Ovary drip โดยการเฉือนที่โคนของ Style เกสรตัวเมีย แล้วหยอดสารละลาย Transform cassette ที่ความเข้มข้น DNA ประมาณ 100 ng/µl, DMSO 0.25%, NAA 4mg/l และ GA 4 mg/l ปริมาตร 7 µl จำนวน 50 ดอก และทำสัญลักษณ์ไว้

การสกัดดีเอ็นเอการตรวจสอบ Transformant

นำใบมาต้นละ 4 ใบ เพื่อให้ได้ปริมาณ 200 – 300 mg จากนั้นจึงบดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลว และสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี 2% CTAB และดำเนินการทำ DNA ให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Resin และตรวจสอบ Transformant โดยใช้ Primer Os1_F และ Os1_R (Ta = 53°C)

ผลการทดลองและอภิปราย

การศึกษาข้อมูลยีน *OsSKIPa* โดยวิธี Bioinformatic เพื่อสังเคราะห์ Transformation cassette

สืบค้นข้อมูลความเหมือนของลำดับเบสของ SKIP จาก ฐานข้อมูล NCBI (gene bank) พบ SKIP/SNW Domain อยู่บนจีโนมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เลือกสายรหัส ยีน *snw1* บนจีโนมมนุษย์ บน Chromosome คู่ที่ 14; NC_000014.9 (77717599..77761201, complement) โดยนำ CDS ของยีน *snw1* SNW domain-

containing protein 1 [Homo sapiens] Accession No. NP_036377 ไป Blast กับฐานข้อมูลจีโนมของข้าว The Institute for Genomic Research (http://rice.plantbiology.msu.edu/) Rice Genome Annotation Project พบ putative SKIP homologs ในข้าวชื่อว่า LOC_Os02g52250 หรือ OsSKIPa บนโครโมโซมคู่ที่ 2 ตำแหน่ง 31,997,697–31,995,218 ยีนมีขนาด 1,824 bp สายรหัสยีน putative SKIP ที่พบในข้าวมีความเหมือนกับ SKIP ของ มนุษย์ 61% โดย ORF สามารถสังเคราะห์โปรตีนความยาว 608 aa เมื่อนำสายรหัสเปปไทด์ไป Blast กับฐานข้อมูลโปรตีน Pfam database พบว่า SKIP/SNW Domain อยู่ระหว่างอะมิโนแอซิดที่ 190 และ 350 (ภาพที่ 2) โดยมีสายรหัสเปปไทด์ดังนี้

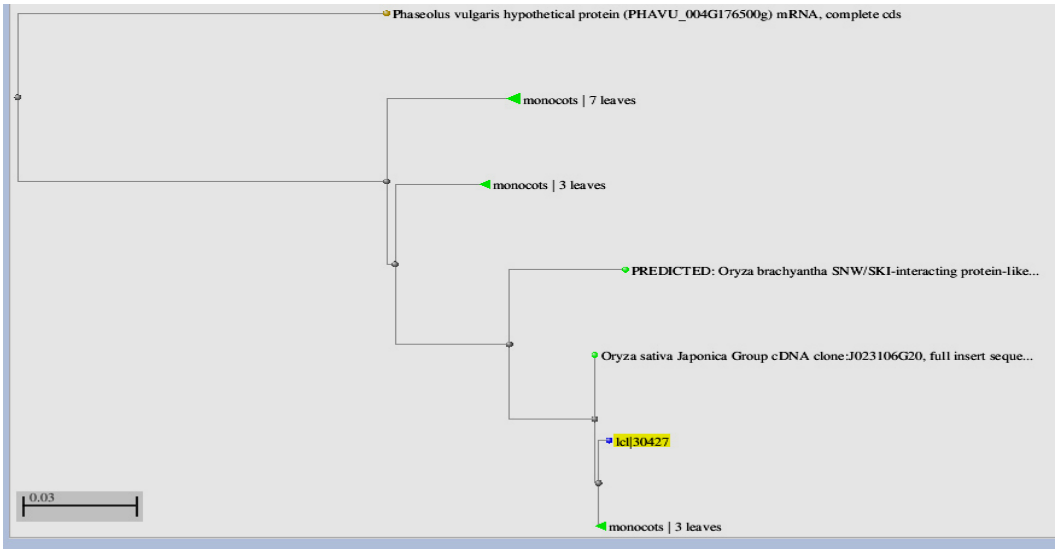
"SKFIKYKPSQQSAAFNSGAKERIIRMSEMAQDPLEPPKFKHKRVPRASGSPPVPVMHSPPRPVTVKDQQDwKIPPC
ISNWRNPKGYTIPLDKRLAADGRGLQEVQINDNFAKLSEALYVAEQKAREAVQMRSKVQRELQLKEKERKEQELRAL
AQKARMERTGAPPAPTGVPAGGGRGAVDDREEDMDLEQPREQRRESREEREARIERDRIREERRRERERERRLEARD
AAMGKKSKLTRDRDRDVSEKIALGMASTGGAKGGEVMYDQRLFNQDKGMDSGFATDDQYNIYSKGLFTAQPTLSTLY
RPKKDGDSDVYGDADEQLEKVMKTDRFKPDKGFSGASERSGKR"

นำข้อมูลสายรหัสพันธุกรรมจาก สุภาวดี และ คณะ 2555 (เรื่องเต็ม) ซึ่งโคลนได้จากยีนข้าวสายพันธุ์ไทย KDML 105 มา Blast กับฐานข้อมูลจีโนมของข้าว The Institute for Genomic Research (http://rice.plantbiology.msu.edu/) Rice Genome Annotation Project พบ putative SKIP homologs ในข้าวชื่อว่า LOC_Os02g52250 เช่นเดียวกับการ Blast ยีน *snw1* ของมนุษย์ โดยสายรหัสยีน putative SKIP ที่พบในข้าวมีความเหมือนกับ SKIP LOC_Os02g52250 ของ Database 99.67% โดยพบว่ามีรหัสเบสเปลี่ยนแปลงไป 6 เบส เมื่อนำมาจำลองการ Translation พบว่า มีอะมิโนแอซิดเปลี่ยนไป 3 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งที่ 23, 120 และ 564 โดยเปลี่ยนจาก Serine (S) เป็น Glycine (G), Glycine (G) เป็น Serine (S) และ Lysine (K) เป็น Glutamic acid (E) อย่างไรก็ตาม ตำแหน่งที่กรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลงไม่ใช่ส่วนที่เป็น SKIP/SNW Domain จึงไม่น่ามีผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีน

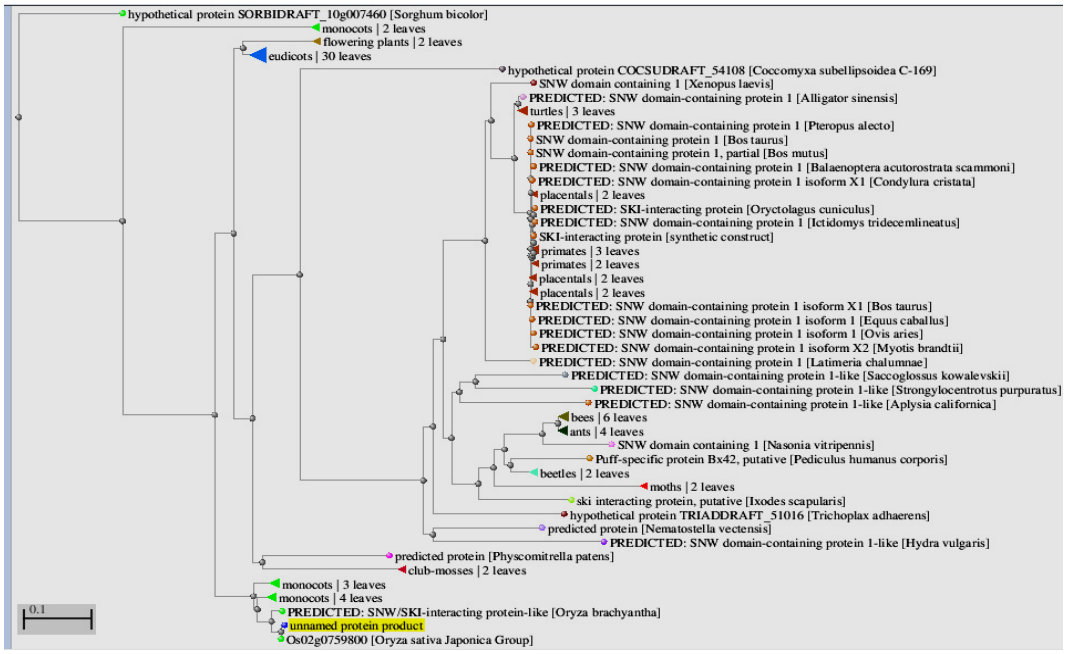
ภาพที่ 2 แสดงตำแหน่ง SKIP/SNW Domain

เพื่อวิเคราะห์การวิวัฒนาการระดับ Genome และ Proteome นำข้อมูลสายรหัสพันธุกรรมจาก สุภาวดี และ คณะ 2555 (เรื่องเต็ม) ไป Blast กับ NCBI Database Nucleotide จำลองการ Translation และนำสายรหัสกรดอะมิโนไป Blast อีกครั้งกับ BlastP พบว่า ในระดับจีโนมหรือยีนมีการกระจายตัวของรหัสพันธุกรรมค่อนข้างน้อยและจำเพาะเจาะจงอยู่เฉพาะในพืชจำพวกข้าวและ ข้าวโพด เท่านั้น (ภาพที่ 3) ในขณะที่การกระจายตัวในระดับ Proteome พบการกระจายตัวในสิ่งมีชีวิตหลากหลายกว่าและมีการใช้ SKIP/SNW Domain ร่วมกันมากว่า (ภาพที่ 3) จึงสรุปได้ว่า SKIP/SNW Domain มีการวิวัฒนาการร่วมกันในระดับโปรตีโอมิคมากกว่าจีโนมิค

จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโปรตีน SKIP มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตชั้นสูง (Eukaryote) หลายชนิดและ SKIP/SNW protein Domain ได้รับการอนุรักษ์ไว้ในวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง (Eukaryote) ด้วยเช่นกัน



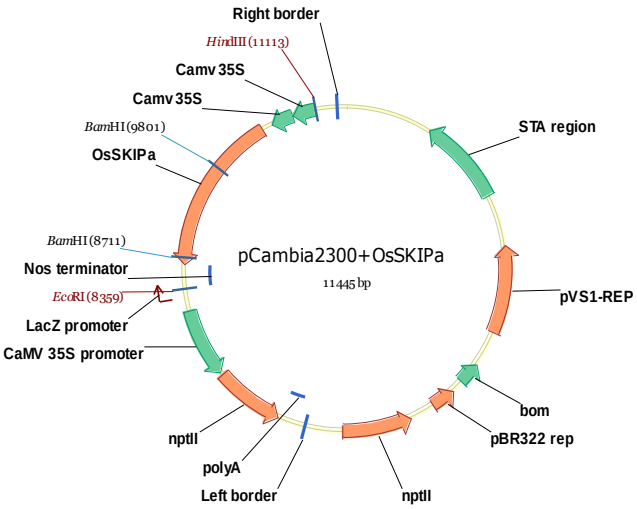
ภาพที่ 3 แสดงการนำข้อมูลรหัสพันธุกรรมมา Blast Nucleotide database



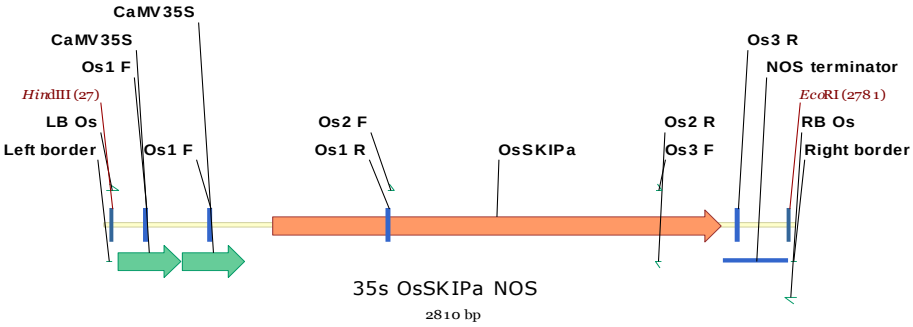
ภาพที่ 4 แสดงการนำข้อมูลรหัสเปปไทด์มา Blast protein database

การออกแบบ Transformation cassette

ดำเนินการออกแบบ Transformation cassette โดยออกแบบจากข้อมูล ยีน Insert ภายใน vector pCAMBIA2300 – *OsSKIPa* (สุภาวดี และ คณะ, 2555) (ภาพที่ 5) โดยเติม Left border ที่ 5’UTR Camv35S และ Right order ที่ 3’UTR Nos terminator (ภาพที่ 5) เพื่อให้สาย Transform cassette มีความเสถียร



ภาพที่ 5 แสดง pCambia2300+*OsSKIPa*



ภาพที่ 6 แสดงแผนภาพ Transform cassette และตำแหน่ง primer ที่ออกแบบบน Transform cassette

ดำเนินการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้โคลน Transform cassette และใช้ตรวจสอบ Transformation cassette โดย Forward ไพรเมอร์ LB_Os และ RB_Os ออกแบบให้มี Left border และ Right border โดยมี Binding site อยู่ในบริเวณ 5’UTR Camv35S ใช้โคลนและตรวจสอบตำแหน่งของ Transform cassette บนจีโนมของถั่วเหลืองในกรณีที่มีการ transform cassette เข้าสู่ถั่วเหลือง ในส่วนของ Os(1-3)_F และ Os(1-3)_R มี Binding site อยู่ในบริเวณ โปรโมเตอร์ Camv35S ยีน *OsSKIPa* และ Nos terminator ใช้ตรวจสอบตำแหน่งของโปรโมเตอร์ Camv35S ยีน *OsSKIPa* และ Nos terminator (ตารางที่ 1, ภาพที่ 6)

ตารางที่ 1 ตารางแสดงไพรเมอร์ใช้ในการโคลนและตรวจสอบ Transformation cassette และยีน *OsSKIPa*

หมายเหตุ	Name	Sequence(5'-3')	Tm (°C)	Size (bp)
ใช้โคลนตั้งแต่ส่วนหัวของ Transform cassette ของ *OsSKIPa*	LB_Os	TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCCGAT Binding site: AAGCTTGCATGCCTGCAGGTCCGA	67.2	50
ใช้โคลนตั้งแต่ส่วนปลายของ Transform cassette ของ *OsSKIPa*	RB_Os	GTTTACCCGCCAATATATCCTGTCAGAATTCCCGATCTAGTAACATAGAT Binding site: GAATTCCCGATCTAGTAACATAGAT	49.3	50
ใช้แอมส่วนต้นของ Transform cassette ของ *OsSKIPa*	Os1_F	CATTGCGATAAAGGAAAGGC	51.8	20
ใช้แอมส่วนต้นของ Transform cassette ของ *OsSKIPa*	Os1_R	GCTTTAGTTCGTTCAGTGGT	46.2	20
ใช้แอมส่วนกลางของ Transform cassette ของ *OsSKIPa*	Os2_F	GAAGAAACCACTGAACGAACTAAAG	52.7	25
ใช้แอมส่วนกลางของ Transform cassette ของ *OsSKIPa*	Os2_R	TTTGTCTGGTTTGAACCTATCTGTC	53.4	25
ใช้แอมส่วนปลายของ Transform cassette ของ *OsSKIPa*	Os3_F	CAGATAGGTTCAAACCAGACAAAGG	55.2	25
ใช้แอมส่วนปลายของ Transform cassette ของ *OsSKIPa*	Os3_R	GATAATCATCGCAAGACCGG	52.1	20

การโคลน Cassette และการตรวจสอบความถูกต้องของ Vector และ Cassette

นำเวคเตอร์ pCAMBIA2300 ซึ่งมี Cassette *OsSKIPa* ที่อยู่ภายใน Transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5**α** (ดูวิธีการทดลอง, ดัดแปลงจาก Chung, C. T. *et al.* 1989)

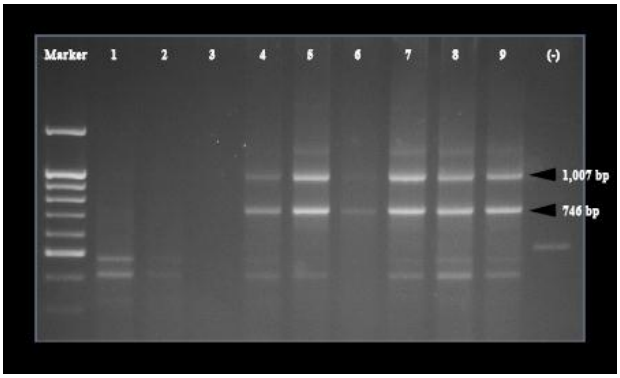
การตรวจสอบ Transformants

Spread เชื้อที่ได้รับการถ่าย Vector ลงบน Plate อาหาร LB Agar ผสม Kanamycin ความเข้มข้น 50 µg/ml และ Spread เชื้อที่ไม่ได้รับการถ่าย Vector (negative control) ลงบน Plate อาหาร LB Agar ผสม Kanamycin ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าไม่มีเชื้อที่ไม่ได้รับการถ่าย Vector (negative control) โตบน Plate เลย และมี Colony ของเชื้อโตบน Plate อาหาร LB Agar ผสม Kanamycin ประมาณ 2,140 colonies สามารถคำนวน Transformant efficiency ได้ตามสูตร colonies on plate/ng of DNA plated X 1000

ng/µg โดยใช้จำนวน colony บน Plate ที่ Spread เชื้อปริมาตร 200 µl คำนวนพบ Transformant efficiency มีค่าเท่ากับ 8.56 x 10^3 Transformants/µg DNA

ดำเนินการตรวจสอบ Transformant โดย Duplicate single colony จำนวน 9 colonies ลง Plate อาหาร LB Agar ผสม Kanamycin และ ตรวจสอบ Vector ที่ได้รับการถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียโดยเทคนิค Colony PCR โดยใช้ Primer Os1_F และ Os1_R (Ta = 53°C, ดูวิธีการ, ภาพที่ 6) โดยได้ PCR product มีขนาด 1007 bp และ 746 bp เพื่อใช้ตรวจสอบทิศของโพรโมเตอร์และยีน

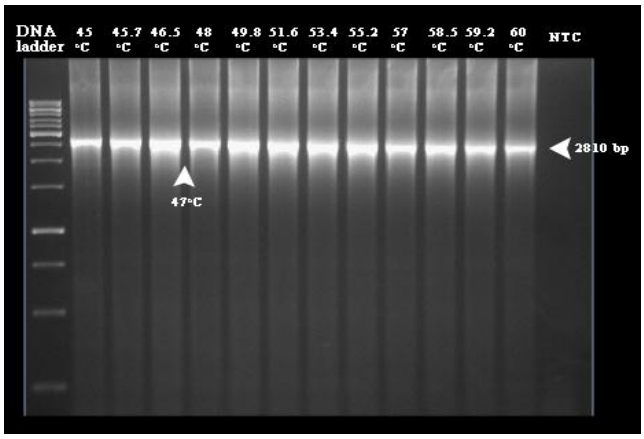
เมื่อดำเนินการตรวจ Colony ทั้ง 9 colonies พบว่า ปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นได้ดีใน Colony ที่ 4, 5, 7, 8 และ 9 และได้ PCR Product ที่ 1,007 bp และ 746 bp ตามที่คาดการ (ภาพที่ 7) ทั้งนี้ได้เลือก E-coli clone ที่ 5,7,8 และ 9 ไปทำ Stock และเก็บไว้ที่ -80°C และนำ Clone ที่ 5 มาใช้เพื่อ Clone Vector และสกัด Plasmid ต่อไป



ภาพที่ 7 แสดงผลการทำ Colony PCR ใน Transformant 1 – 9

การเพิ่มปริมาณ Transform cassette

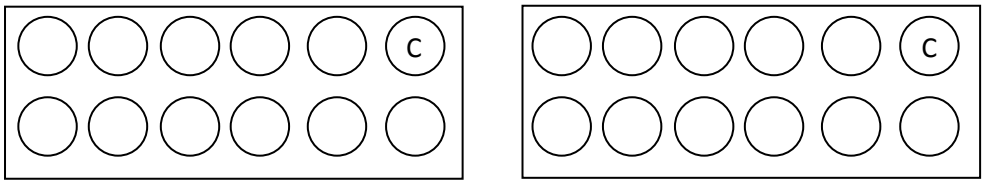
นำเวคเตอร์จาก Clone ที่ 5 มาใช้ในการเพิ่มปริมาณ **Transform cassette** ทดสอบ Gradient PCR เพื่อหา Optimal temperature ที่จะใช้เพื่อให้ได้ปริมาณ DNA และความบริสุทธิ์ที่ดีที่สุด พบว่าอุณหภูมิ 47°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่เป็นอุณหภูมิที่ไม่สูงเกินไปและให้ลักษณะของ DNA band ที่เป็น band เดี่ยว และมีสเมียร์ต่ำ (ภาพที่ 8) จากนั้นดำเนินการทำ Conventional PCR ด้วย primer LB_Os และ RB_Os ที่ Ta=47°C Volume total 50 µl ได้ Transform cassette ที่ขนาด 2,810 bp และทำให้บริสุทธิ์ (QIAquick PCR purification Kit) และวัดความเข้มข้น ได้ความเข้มข้นของ Transform cassette ระหว่าง 100 – 200 ng/µl



ภาพที่ 8 แสดงการทดสอบ Gradient PCR เพื่อหา Optimal temperature ของ primer LB_Os และ RB_Os ในการเพิ่มปริมาณ Transform cassette

การทดสอบ Artificial pollination และการทำ Ovary drip

ดำเนินการปลูกถั่วเหลืองพันธุ์ S17-3 ในกระถาง จำนวน 22 กระถาง และ เชียงใหม่ 60 (Control) จำนวน 2 กระถาง (ภาพที่ 9) เมื่อถั่วเหลืองโตถึงระดับ node ที่ 6 จึงเริ่มเตรียม Transform cassette เพื่อใช้ทดสอบ Ovary drip ตาม Protocol ดัดแปลงจาก Ellen B. *et al*. 2003 ในการทดลองนี้ได้เตรียม Transform cassette ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 100 ng/µl กับ DMSO 0.25%, NAA 4mg/l และ GA 4 mg/l



ภาพที่ 9 แสดงแผนผังการปลูกถั่วเหลืองในกรงกันหนู/แมลง

เมื่อถั่วเหลืองออกดอกแล้ว เลือกดอกถั่วเหลืองที่บานแล้วมีอายุ 1 วัน ใช้ Forcep ขนาดหัว 0.15 mm ค่อยๆ ฉีกกลีบดอกชั้นนอกและกลีบดอกชั้นในออก จากนั้นตัดเกสรตัวผู้ใส่แผ่นฟลอยด์เก็บใส่ sterile petri-dish ที่ 4°C จากนั้นเลือกตัวแทนดอกถั่วเหลืองที่จะทำการทดสอบมา 50 ดอกที่ยังไม่บาน ใช้ Forcep ขนาดหัว 0.15 mm ค่อยๆฉีกกลีบดอกชั้นนอกและกลีบดอกชั้นในออก โดยไม่ได้ฉีกฐานรองดอกออกตัดเกสรตัวผู้ออกทั้งหมด (ภาพที่ 10) จากนั้นป้ายเกสรตัวผู้ด้วยพู่กันที่เกสรตัวเมียและทำสัญลักษณ์ไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 20 ชั่วโมง เพื่อให้เกสรตัวผู้ต่อท่อเกสรถึงเกสรตัวเมีย จากนั้นจึงดำเนินการทำ Ovary drip โดยการเฉือนที่โคนของ Style เกสรตัวเมีย จึงหยอดสารละลาย Transform cassette ที่ความเข้มข้นประมาณ 100 ng/µl, DMSO 0.25%, NAA

4mg/l และ GA 4 mg/l ปริมาตร 7 µl ทั้ง 50 ดอก และทำสัญลักษณ์ไว้ พบว่าหลังจาก 4 วัน ดอกที่ดำเนินการทำ Ovary drip จากการทำ Artificial pollination ไม่ติดและร่วงทั้งหมด

ภาพที่ 10 แสดงภาพของดอกถั่วเหลืองที่ได้รับการดึงกลีบดอกออกทั้งหมดเหลือแต่เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย

การทำ Ovary drip ในดอกที่ผ่านการผสมตัวเองแล้ว

เมื่อถั่วเหลืองออกดอกแล้วเลือกดอกถั่วเหลืองที่บานแล้วมีอายุประมาณ 1 วัน (ประมาณ 20 ชั่วโมง) และยังบานไม่เต็มที่ใช้ Forcep ขนาดหัว 0.15 mm ค่อยๆฉีกกลีบดอกชั้นนอกและกลีบดอกชั้นในออกเพื่อให้เกสรตัวผู้ต่อท่อเกสรถึงเกสรตัวเมีย เด็ดเกสรตัวผู้ทิ้งและจึงดำเนินการทำ Ovary drip โดยการเฉือนที่โคนของ Style เกสรตัวเมีย แล้วหยอดสารละลาย Transform cassette ที่ความเข้มข้น DNA ประมาณ 100 ng/µl, DMSO 0.25%, NAA 4mg/l และ GA 4 mg/l ปริมาตร 7 µl ทั้ง 50 ดอก และทำสัญลักษณ์ไว้ พบว่ามีดอกติดและไม่ร่วงทั้งสิ้น 33 ดอก และสามารถพัฒนาไปเป็นฝัก ได้ 17 ฝัก (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตาม ด้วยสภาพการปลูกในกระถางอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ฝักพัฒนาได้ไม่เต็มที่และต้นแห้งตาย เมล็ดที่ได้มีลักษณะแคระแกรนไม่สามารถปลูกขึ้นเพื่อใช้เป็นรุ่น F1 ได้และมีเมล็ดเพียง 34 ที่น่าจะสามารถนำไปปลูกต่อเพื่อทดสอบในขั้นต่อไปได้ จึงต้องดำเนินการปลูกใหม่และทำซ้ำ

ตารางที่ 2 แสดงผลการทำ Ovary drip เปรียบวิธีการ 2 วิธี Ovary drip with Artificial pollination และ Ovary drip with self-pollinated

Transformation method	Number of flower with successful drip	Number of pod	Number of Maturing seed
Ovary drip with Artificial pollination	0	0	Not available
Ovary drip with self-pollinated	33	17	34

การสกัดดีเอ็นเอ

ดำเนินการปลูกเมล็ดถั่วเหลืองทั้ง 34 เมล็ดเพื่อตรวจสอบ Transformant ในบ่อซีเมนต์ใหญ่ที่ได้จากการทำ Ovary drip (ภาพที่ 11) เมื่อต้นกล้าถั่วเหลืองโตได้ที่จึงเด็ดใบมาต้นละ 4 ใบ เพื่อให้ได้ปริมาณ 200 – 300 mg จากนั้นจึงบดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลว และสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี 2% CTAB และดำเนินการทำ DNA ให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Resin พบว่า ได้ปริมาณ Genomic DNA 200 – 1,000 ng/ul (ภาพที่12)

ภาพที่ 11 การปลูกถั่วเหลืองในบ่อซีเมนต์แทนการปลูกในกระถางช่วยให้ถั่วเหลือง เจริญเติบโตได้ดีและต้นไม่แคระแกรน

ภาพที่ 12 แสดงผลการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอของถั่วเหลือง

การตรวจสอบ Insert Cassette

ดำเนินการตรวจสอบ Transformant โดยใช้ Primer Os1_F และ Os1_R (Ta = 53°C, ดูวิธีการ, ภาพที่ 5) อย่างไรก็ตามปรากฏว่าผล PCR เป็น Negative ทั้งหมด คือไม่มี Insert อยู่ภายในจึงต้องดำเนินการปลูกต้นถั่วเหลืองเพิ่มและดำเนินการทดลองซ้ำโดยหยอด DNA ลงในดอกทั้งสิ้น 60 ดอก และเว้นช่วงเวลาที่คาดว่าท่อเกสรตัวผู้สามารถต่อลงถึงรังไข่โดยกะระยะเวลาให้ได้ใกล้เคียงมากที่สุด เป็น 20 ชั่วโมง 25 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง แบ่งเป็นชุดชุดละ 20 ดอก หลังจากหยอดดีเอ็นเอแล้วพบว่ามีดอกประมาณ 90% อนึ่งหลังจากดอกติดเมล็ดพบว่า สามารถเจริญไปเป็นฝักได้ทั้งหมด ประมาณ 51% และได้เมล็ดทั้งหมด 78 เมล็ด (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงผลการทำ Ovary drip จาก self-pollinated

Transformation method	Number of flower with successful drip	Number of pod	Number of Maturing seed
Ovary drip with self-pollinated at 20 h after pollination	14	8	23
Ovary drip with self-pollinated at 25 h after pollination	20	11	30
Ovary drip with self-pollinated at 30 h after pollination	20	10	25

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

นำเมล็ดถั่วเหลืองที่ได้ไปปลูกและเก็บใบอ่อนไปสกัดดีเอ็นเมื่อนำไปตรวจด้วยวิธีการ PCR พบว่าไม่พบ Insert gene อยู่ภายในถั่วเหลืองรุ่นลูกที่ได้ และจากการทดลองดำเนินการเช่นเดิม ยังคงตรวจไม่พบ Insert ในรุ่นลูกถั่วเหลือง

สาเหตุความเป็นไปได้จากผลการทดลองอาจเกิดจากหลายประการคือ สภาพแวดล้อมในการปลูกภายในโรงเรือนมีอากาศร้อน อบ และแสงไม่เพียงพอ ซึ่งอาจทำให้สภาพของต้นถั่วไม่สมบูรณ์แข็งแรงและดอกถั่วเหลืองมีลักษณะผิดปกติ ทำให้ DNA ที่ drip ไม่สามารถ Insert เข้าไปในจีโนมได้ หากสามารถปลูกถั่วเหลืองได้ในปริมาณมากในสภาวะอากาศที่อุณหภูมิที่เหมาะสมอาจทำให้การ Ovary drip ประสบผลสำเร็จมากกว่านี้

นอกจากนี้ นักวิชาการ/นักวิชาการเกษตรที่สนใจยังสามารถนำข้อมูลยีน *OsSKIPa* และชุด Transform cassette ที่ออกแบบไว้รวมถึงข้อมูลวิธีการดำเนินการ Ovary drip ไปใช้ในงานวิจัยต่อไปได้

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ผลการวิจัยของโครงการ (output) ประกอบด้วย

1. ยีนและข้อมูลยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำจากข้าวโพดในส่วนที่มีการแสดงออกของยีนและชุด cassette ยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำ จำนวน 2 ชุด ได้แก่ pCAMBIA2300 – *ZmSINA3* และ pCAMBIA2300 – *ZmSINAT3* สำหรับนำไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชต้นแบบ

2. ทราบหน้าที่และการแสดงออกของยีนที่ทนต่อสภาวะเครียดในพืชต้นแบบ (ยาสูบ)

3. ข้อมูลไพรเมอร์ยีนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะขาดน้ำของพืชและชุดไพรเมอร์สำหรับจำแนกชนิดของยีน

4. กลุ่มยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับความทนแล้งของข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งนครสวรรค์ 3 (DREB-like protein (Dreb1) และ ARBE binding protein (AP2)) จากการการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์และจากการใช้ชุดไพรเมอร์จำแนก

5. เทคนิค Ovary drip ในการถ่ายฝากยีน *OsSKIPa* สู่ถั่วเหลือง

ข้อเสนอแนะ (outcome) ประกอบด้วย

1. สามารถนำยีน *Zm*SINA3 และ *Zm*SINAT3 และชุด cassette ยีน (pCAMBIA2300 – *Zm*SINA3 และ pCAMBIA2300 – *Zm*SINAT3) ไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชเศรษฐกิจ เช่น ถั่วเหลือง ข้าวโพด อ้อย และมันสำปะหลัง เป็นต้น เพื่อเพิ่มศักยภาพในการให้ผลผลิตและสามารถทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้ อีกทั้งยังเป็นพืชทางเลือกในการเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไปในอนาคต

2. ได้องค์ความรู้หน้าที่และการแสดงออกของยีน *Zm*SINA3 ที่ทนต่อสภาวะเครียดในพืชต้นแบบ (ยาสูบ) และสามารถนำไปต่อยอดโดยการถ่ายฝากเข้าสู่พืชเศรษฐกิจเพื่อให้ทนต่อสภาวะเครียดต่อไป

3. ได้ชุดไพรเมอร์สำหรับใช้จำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทนแล้งของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 และสามารถนำไปใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดได้

4. ได้กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำจากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 คือ DREB-like protein (Dreb1) และ ARBE binding protein (AP2) สำหรับนำไปพัฒนาปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำต่อไป

5. ได้เทคนิคการถ่ายฝากยีน *OsSKIPa* แบบ Ovary drip ในถั่วเหลืองโปรตีนสูง เพื่อให้ทนต่อสภาวะแล้ง และสามารถนำองค์ความรู้ไปพัฒนาวิธีการถ่ายฝากยีนกับพืชมีดอกชั้นสูงอื่นๆ ต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

การทดลองที่ 1

ภาวะโลกร้อน. 2555. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://www.baanjomyut.com/library/global_warming. 9 มีนาคม 2555.

Ingram, J. and D. Bartels. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 47: 377 – 403.

Pokhilko, A., J.A. Ramos, H. Holtan, D.R. Maszle, R. Khanna and A.J. Millar. 2011. Ubiquitin ligase switch in plant photomorphogenesis: a hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*. 270: 31 – 41.

Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*. 3: 217 – 223.

Smirnoff, N. 1998. Plant resistance to environmental stress. *Curr Opin Biotech.* 9: 214 – 219.

Sonoda, Y., K. Sako, Y. Maki, N. Yamazaki, H. Yamamoto, A. Ikeda and J. Yamaguchi. 2009. Regulation of leaf organ size by the Arabidopsis RPT2a 19S proteasome subunit. *The Plant Journal*. 60: 68 – 78.

Thomann, A., V. Brukhin, M. Dieterle, J. Gheyeselinck, M. Vantard, U. Grossniklaus and P. Genschik. 2005. Arabidopsis CUL3A and CUL3B genes are essential for normal embryogenesis. *The Plant Journal.* 43: 437 – 448.

Vierling, E. 1991. The roles of heat – shock proteins in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 42: 579 – 620

การทดลองที่ 2

Almansouri , M., J.-M. Kinet and S. Lutts. .2001. Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (Triticum durum Desf.). Plant and Soil, 231:243-254

Den Herder G., A. D. Keyser, R. D. Rycke, S. Rombauts, W. V. d. Velde, M R. Clemente, C Verplancke, P Mergaert, E Kondorosi, M Holsters, and S. Goormachtig. 2008. Seven in Absentia Proteins Affect Plant Growth and Nodulation in *Medicago truncatula*. Plant Physiology. pp. 369-382.

FAO. 1976. Prognosis of salinity and alkalinity. FAO Soil Bulletin 31. FAO, Rome.

Kim Y., B. Ham, K. Paek, C. Park and N. Chua. 2006. An Arabidopsis homologue of human seven-in-absentia-interacting protein is involved in pathogen resistance. Mol. Cells, Vol. 21, No. 3, pp. 389-394.

Kunkel, B.N. and Brooks, D.M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. Curr Opin Plant Biol 5: 325-331

Ning Y.(1), C. Jantasuriyarat, Q. Zhao, H. Zhang, S. Chen, J. Liu, L. Liu, S. Tang, C. H. Park, X. Wang, X. Liu, L. Dai, Q. Xie, and G. Wang. 2011. The SINA E3 Ligase OsDIS1 Negatively Regulates Drought Response in Rice. Plant Physiology. pp. 242–255.

Ning Y.(2), Q. Xie and G.Wang. 2011. OsDIS1-mediated stress response pathway in rice. Plant Signaling & Behavior 6:11. pp. 1684-1686.

OKÇU, G., M. D. Kaya and M. Atak. 2005. Effects of Salt and Drought Stresses on Germination and Seedling Growth of Pea (Pisum sativum L.). Turkish journal of agriculture and forestry, 29: 237-242.

Park .S.Y, P. Fung, N. Nishimura, D.R. Jensen, Hi. Fujii, Y. Zhao, S. Lumba, J. Santiago, A. Rodrigues, T.F. Chow, S. E. Alfred, D. Bonetta, R. Finkelstein, N. J. Provart, D. Desveaux, P.L. Rodriguez, P. McCourt, J.Zhu, J.I. Schroeder, B.F. Volkman, and S.R. Cutler. 2009. Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. Science; (DOI: 10.1126/science.1173041)

Peralta D. A., A. Araya., C. F. Nardi, M. V. Busi and D. F. Gomez-Casati. 2013. Characterization of the Arabidopsis thaliana E3 Ubiquitin-Ligase AtSINAL7 and Identification of the Ubiquitination Sites. PLOS ONE www.plosone.org. Volume 8, Issue 8, e73104.

Sanchez-Barrena, M.J. Martinez-Ripoll, M., Zhu, J.K. Albert, A. (2005). The structure of the *Arabidopsis thaliana* SOS3: molecular mechanism of sensing calcium for salt stress response. Journal of Molecular Biology 345, 1253-1264.

Shi, Y., J. Guo, W. Zhang, L. Jin, P. Liu, X. Chen, F. Li, P. Wei, Z. Li, W. Li, C. Wei, Q. Zheng, Q. Chen, J. Zhang, F. Lin, L. Qu, J. H. Snyder and R. Wang 2015. Cloning of the *Lycopene β-cyclase* Gene in *Nicotiana tabacum*and Its Overexpression Confers Salt and Drought Tolerance. *International journal of molecular sciences 16:* 30438-30457.

Tarczynsk, M.C. Jensen, R.G., and Bohhert, H.J. (1993). Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. Science 259: 508-510.

การทดลองที่ 3

Birnboim, H.C. and J. Doly. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-23.

Birnboim H.C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in Enzymology*. 100: 243-55.

ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3. 2552. สืบค้นจาก: http://www.food-resources.org/news/view.php?id=2646.

Cellier, F., G., Conejero, J-C. Brietler and F. Casse. 1998. Molecular and physiological responses to water deficit in drough-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower. Plant Physiology. 116. 319-328.

Djilianov, D., Georgieva, T., Moyankova, D., Atanassov, A., Shinozaki, K., Smeeken, S.C.M., Verma, D.P.S., and Murata, N. 2005. Improved abiotic stress tolerance in plants by accumulation of osmoprotectants – Gene transfer approach. Biotechnol. Biotechnol. Equip. 19. (Special issue): 63-71.

Garg, N, Pundher, S, Prakash, A and Kumar, A. 2008. PCR Primer Design:DREB Genes. Journal of Computer Science and Systems Biology. 1.021-040.

Gasser, C.S., Gunning, D.A., Budeller, K.A., and Brown, S.M. 1990. Structure and expression of cytosolic/cyclophilin peptidyl- prolyl *cis-trans* isomerase of higher plants and and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87. 9519-9523.

Giodani, Natali L, D'Ercole A, Pugliesi C, Fambrini M, Vernieri P, Vitagliano C, Cavallini A. 1999. Expression of a dehydrin gene during embryo development and drought stress in ABA-deficient mutants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). 39(4):739-48.

Iba, K. 2002. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. Annu. Rev. Plant. Biol. 53: 225-245.

Ingram, J and Bartel, D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biolo*gy,47,377-403.

Labhilili, M., Joudrier, P. & Gautier, M.F. 1995. Characterization of cDNA encoding Triticum durum dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. Plant Science. 112. 219-30.

Latini, A., Raci,C., Sperandei, M, Cantale, C, Iannetta,C., et al. 2007. Identification of *DREB1A* related genes in *Triticum durum* and its expression under water stress conditions. Annals of Applied Biology. 150(2). 187-195.

Lee S-H, Lee K-W, Kim K-Y, Choi GJ, Yoon SH, Ji, HC, Seo H, Lim YC, and Ahsan N (2009). Identification of salt stress induced differentially expressed in barleys leaves using the annealing control-primer-based Gene Fishing technique. Afr. J. Biotechnol. 8:1326-1331.

Shalon, D. Gene expression microarrays: 1998. A new tool for genomic research. Pathol Biol. 46:107-9.

Sharma, A.D., and Kaur, P. 2009. Combined effect of drought stress and heat shock on cyclophilin protein expression in *Triticum aestivum*. General and Applied Plant Physiology. 35 (1-2). 88-92.

Skinner, J.S., von Zitszewitz, J., Szucs, P., Marquez-Cedillo, L., Filichkin, T., Amundsen, K., Stockinger, E.J., Thomasow, M.F., Chen, T.N.N., & Hayes, P.M. 2005. Structure, functional and phylogenetic characterization of a large CBF gene family in Barley. Plant Molecular Biology. 59, 533-551.

International Rice Research Institute. 2006. Stress and disease tolerance. สืบค้นจาก: http://www.knowledgebank.irri.org/ricebreedingcourse/Breeding_for_drought_resistance.htm [2553].

Zhu W, Zhang L, Lv H, Zhang H, Zhang D, Wang X, Chen J. 2013. The dehydrin wzy2 promoter from wheat defines its contribution to stress tolerance. Funct Integr Genomics. 2013. [Epub ahead of print].

Yi, L., Shenjiao, Y., Shiqing, L., Xinping,C., and Fang, C. 2010. Growth and development of maize (*Zea mays* L.) in response to different field water management practices: Resource capture and use efficiency. Agriculture and Forest Meteorology. 150. 606-613.

Yun-Jee Kim, Chae-Il Kwak, Young-yun Gu, In-Taek Hwang, and Jong-Yoon Chun. 2004. Annealing Control Primer System for Identification of Differentially Expressed Genes on Agarose gels. Biotechniques. 36(3).1-5.

การทดลองที่ 4

Albers M., Diment A., Muraru M, Russell C.S., Beggs J.D. 2003. Identification and characterization of Prp45p and Prp46p, essential pre-mRNA splicing factors. *RNA*. 9:138–150.

E. J. Clake and J. Wiseman, 2000. Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soya beans I. Protein and amino acid content.

M. Friedman and D.L. Brandon, 2001. Nutritional and health benefits of soy proteins. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49(3):1069-1086.

Dahl R., Wani B., Hayman M. J. 1998. The Ski oncoprotein interacts with Skip, the human homolog of Drosophila Bx42. *Oncogene*. 16:1579–1586.

Figueroa J.D., Hayman M.J. 2004. Differential effects of the Ski-interacting protein (SKIP) on differentiation induced by transforming growth factor-beta1 and bone morphogenetic protein-2 in C2C12 cells. *Exp Cell Res*. 296:163–172.

Folk P., Puta F., Skruzny M. 2004. Transcriptional coregulator SNW/SKIP: The concealed tie of dissimilar pathways. *Cell Mol Life Sci*. 61:629–640.

Ivanov A.I., Rovescalli A.C., Pozzi P., Siuk Y. , Mozer B., Li H.P. , Yu S.H. ,Higashida H., Guo V., Spencer M., and Nirenberg M. 2004. Genes required for Drosophila nervous system development identified by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:16216–16221.

Kostrouchova M., Housa D., Kostrouch Z., Saudek V., Rall J.E. 2002. SKIP is an indispensable factor for Caenorhabditis elegans development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:9254–9259.

Lee B.H., Kapoor A., Zhu J., Zhu J.K. 2006. STABILIZED1, a stress-upregulated nuclear protein, is required for pre-mRNA splicing, mRNA turnover, and stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*. 18:1736–1749.

Leong G.M., Subramaniam N., Issa L.L., Barry J.B., Kino T., Driggers P.H., Hayman M.J., Eisman J.A., Gardiner E.M. 2004. Ski-interacting protein, a bifunctional nuclear receptor coregulator that interacts with N-CoR/SMRT and p300. *Biochem Biophys Res Commun*. 315:1070–1076.

Negeri D., Eggert H., Gienapp R., SaumweberH. 2002. Inducible RNA interference uncovers the Drosophila protein Bx42 as an essential nuclear cofactor involved in Notch signal transduction. *Mech Dev*. 117:151–162.

Saumweber H., Frasch M., Korge G. 1990. Two puff-specific proteins bind within the 2.5 kb upstream region of the Drosophila melanogaster Sgs-4 gene. *Chromosoma*. 99:52–60.

Wieland C., Mann S., V. Besser H., Saumweber H. 1992. The Drosophila nuclear protein Bx42, which is found in many puffs on polytene chromosomes, is highly charged. *Chromosoma*. 101:517–525.

Xin H., Kabin X., Jialing Y., Zhuyun Q., and Lizhong X. 2009. A homolog of human ski-interacting protein in rice positively regulates cell viability and stress tolerance. *PNAS*. 6410–6415.

Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 2006. Transcriptional regulatory networksin cellular responses and tolerance to dehydrationandcold stresses. *Annu Rev Plant Biol.* 57:781–803.

Zhu J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 53:247–273.