รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. **โครงการวิจัย** : การค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตร

   กิจกรรม : -

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การศึกษาและค้นหายีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NSW3) โดยอาศัยเทคนิค PCR

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

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : นายพยุงศักดิ์ รวยอารี

   หน่วยงานต้นสังกัด : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

   ผู้ร่วมงาน : นายสุริพัฒน์ ไทยเทศ

   หน่วยงานต้นสังกัด : ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ กรมวิชาการเกษตร

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 หาลำดับเบส เปรียบเทียบลำดับเบสและหาหน้าที่ของยีน (putative gene functions) เทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล ข้อมูลเบื้องต้นโดยใช้ cDNA ควบคุม (control cDNA) ในการทำปฏิกิริยา PCR ผลการทดลอง

ให้ผลบวก ส่วนปฏิกิริยา 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.

คำนำ : PCR (Polymerase Chain Reaction) เป็นปฏิกิริยาเอนไซม์ที่อาศัยหลักการที่ง่าย ทำนายผลง่ายและรวดเร็ว ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย การศึกษาที่ผ่านมา สามารถนำวิธีการนี้มาใช้ในการค้นหาที่เกี่ยวข้องกับสภาวะทนแล้งที่ส่งผลต่อผลผลิตได้ เช่น ยีน DREB (Garg, et al., 2008) พืชมีการปรับตัวทางสรีระวิทยาให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมต่างๆที่ไม่เหมาะสม เพื่อให้ตัวมันเองมีความอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมนั้นๆ เช่น ในสภาพเซลล์ขาดน้ำหรือแห้งแล้ง เป็นต้น การปรับตัวของพืชให้มีการพัฒนาหรือให้เป็นไปตามปกติหรือคงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมดังกล่าวนั้น ต้องมีการแสดงออกของยีนบางชนิด ซึ่งอาจเป็นยีนเดียวหรือกลุ่มยีนส์ (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 ที่ผ่าน

มานักวิจัยได้ศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในพืช เพื่อให้พืชเกิดการปรับตัวให้คงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี

ในปัจจุบัน ข้อมูลยีนหรือกลุ่มยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในสภาวะขาดน้ำหรือแห้งแล้งที่ได้จากค้นคว้าวิจัยมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง 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 งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการค้นหายีนหรือกลุ่มยีนส์ที่ได้มีการศึกษาค้นคว้ามาแล้วในพืชชนิดต่างๆ แล้วนำยีนนั้นๆ มาศึกษากับข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งในประเทศไทยว่าข้อมูลที่ได้มีความสอดคล้องหรือแตกต่างกันหรือไม่ เพื่อนำข้อมูลที่ได้นั้นมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีคุณลักษณะทนแล้งได้ต่อไปในอนาคต ทำให้งานวิจัยนี้สามารถให้ข้อมูลในรูปยีนที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรของประเทศไทยได้

5. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

1. ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์ลูกผสมนครสวรรค์ 3 (ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์, กรมวิชาการเกษตร)
2. ถุงพลาสติกสีดำขนาด 10" x 10" x 10" (กว้าง x ยาว x ลึก)
3. ดินและปุ๋ยตราลำดวน
4. ไนโตรเจนเหลวและโกร่งสำหรับใช้บดใบข้าวโพดตัวอย่าง

5. ชุดสกัด RNA (Trizol® Reagent, Invitrogen, USA) และ ชุดสกัดอาร์เอ็นเอรวม Plant RNeasy mini kit (Qiagen, CA, USA)
6. เอ็นไซม์ Reverse transcriptase (Promega, Madison, USA)
7. TOPO TA cloning kit (Life Technology, Calsbad, CA, USA)
8. GENECLENEII kit (Q. BIOgene, USA)
9. 100bp DNA ladder (ThermoFisher SCIENTIFIC, USA)
10. ชุดสกัดสารพันธุกรรมจากอะกาโลสเจล (GeneJet Gel Extraction Kit, ThermoFisher SCIENTIFIC, USA)
11. เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (Labnet/Spectrafuge16M, National, USA)
12. เครื่องดูดสารปริมาณน้อย (ไมโครไปเปต) ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
13. อ่างน้ำปรับอุณหภูมิอัตโนมัติ 65°C
14. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4°C (LAWCHAIN LC203LD ยี่ห้อ CHILLED รุ่น PT-30 Series)
15. ตู้แช่แข็ง -20°C (Thermo Scientific Puffer Hubbard, Austria)
16. ตู้แช่แข็ง -80°C (SANYO ULTRA LOW FREEZER, SANY0, USA)
17. 10x TAE Buffer (Promega, USA)
18. GelStar Solution (Lonza, Rockland, ME, USA)
19. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (Gene Amp PCR system 9700, Applied Biosystems, Foster, CA, USA)
20. สารละลาย GTE (4M Guanidine Isothiocyanate, 25 mM NaCitrate pH 7.0, 0.5% Lauryl Sarcosine และ 0.1 M Beta-Mercaptoethanol)
21. เครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าแนวนอนพร้อมเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าในตัว (Toyobo, GelMate 2000, Japan)
22. เครื่องส่องดูแถบสารพันธุกรรมภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (UV) GelDoc Transluminator (BIORAD, USA)
23. ชุดถ่ายภาพพร้อมเครื่องมือวิเคราะห์สารพันธุกรรม (GELDOC BIORAD, USA)
24. PCR GeneFishing DEG Kit (Soul, South Korea) cat. No. K1021 (GeneFishing™ DEG Kit, Seegene, Soul, South Korea)
25. ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (Plasmid DNA) (QIAprep spin miniprep kit, Qiagen, Valencia, USA)

26. เครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ ABI PRISM® 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer, CA, USA)
27. DNAStar Software Analysis (DNASTAR, Inc, USA)
28. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
29. ช้อนตักสาร กระดาษชั่งสาร และเครื่องชั่งสาร

- วิธีการ

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> การเตรียมพืชทดลอง การงดให้น้ำ และการเก็บพืชตัวอย่าง

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

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> 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 มิลลิกรัมและเติมสาร 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 ที่ได้ด้วย 70% เอทานอล 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 โดยนำ cDNA 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)
13. เปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูลชีวภาพสากล

- เวลาและสถานที่
  - ระยะเวลา 1 ปี เริ่มต้น ต.ค. 2557 สิ้นสุด ก.ย. 2558
  - สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

6. ผลการทดลองและวิจารณ์

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 1) 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

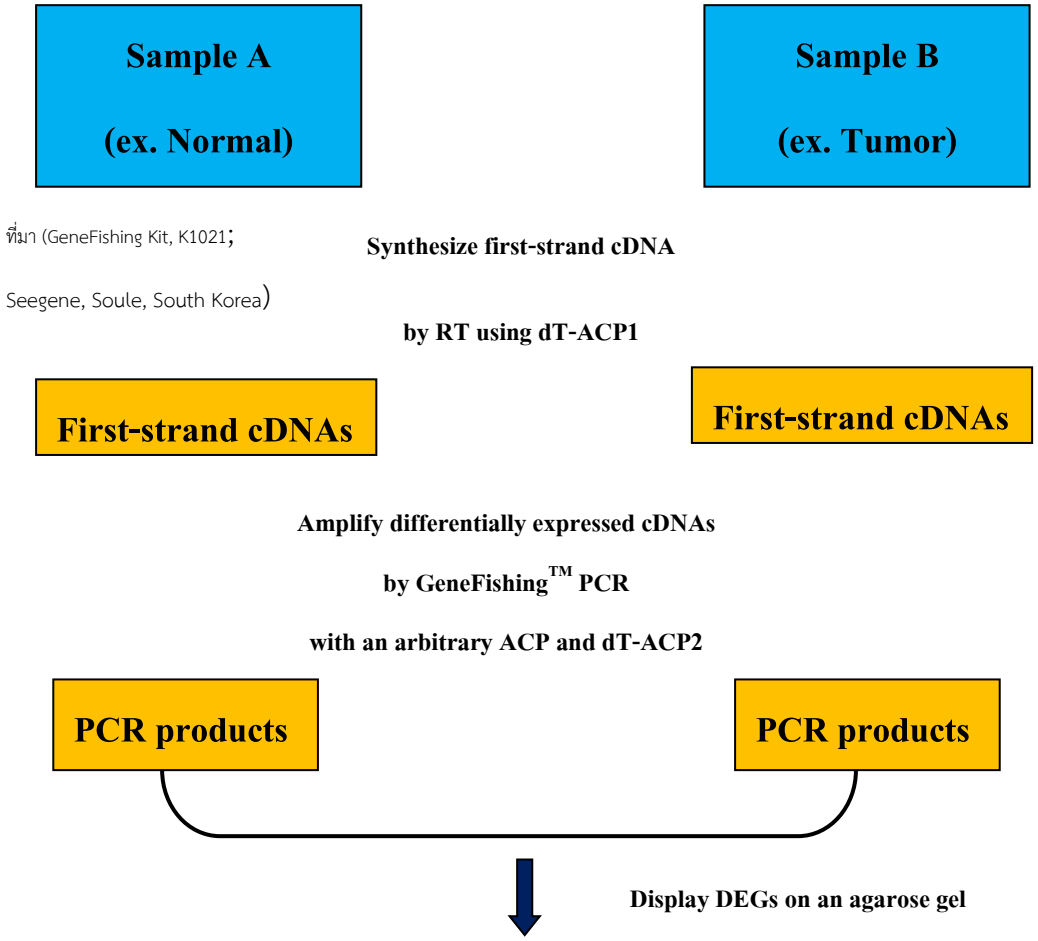
มากไปกว่านั้น ผลที่ได้จากการทดลองนี้จะได้นำไปใช้ต่อยอดในการศึกษาการแสดงออกที่แตกต่างของยีนในสภาวะขาดน้ำเชิงปริมาณหรือที่เรียกว่าวิธี “quantitative RT-PCR” เพื่อนำ

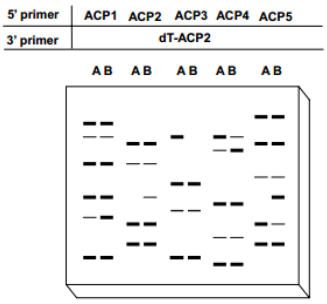
พัฒนาเป็นโมเลกุลเครื่องหมาย (molecular markers) หรือเป็นเครื่องมือ (tools) ในการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้งต่อไป

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





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

• 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′

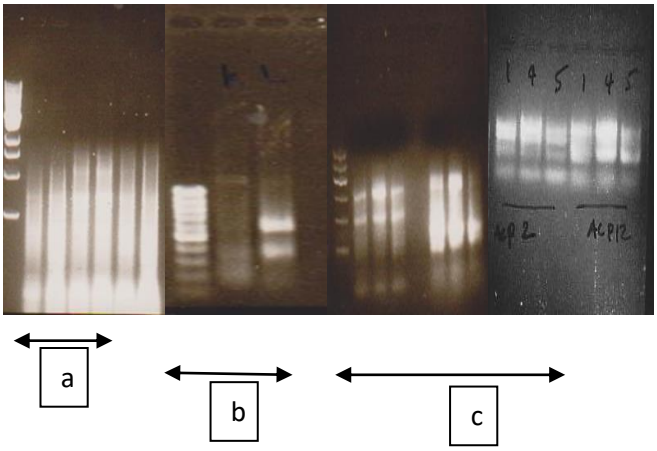
ACP17: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCAAGCCCACG-3′

ACP18: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCGGAGCATCC-3′

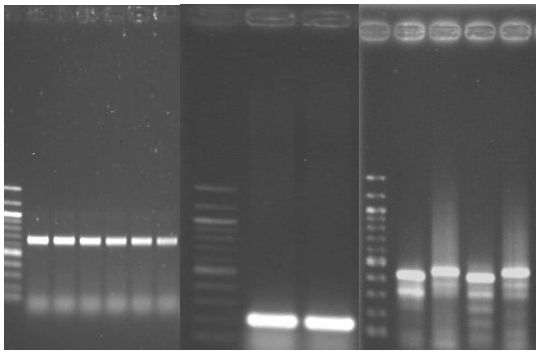
ACP19: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCTCTGCGAGC-3′

ACP20: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGACGTTGGCG-3′

รูปที่ 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) และ ใบข้าวโพดตัวอย่างขาดน้ำ (3 เลนขวามือ) และนำแถบดีเอ็นเอที่แยกได้มาแอมพลิไฟล์ด้วยการใช้ ACP primers (5μM) ในชุดคิทจำนวน 2 คู่ (ACP2 และ ACP 12) จากจำนวน 12 คู่

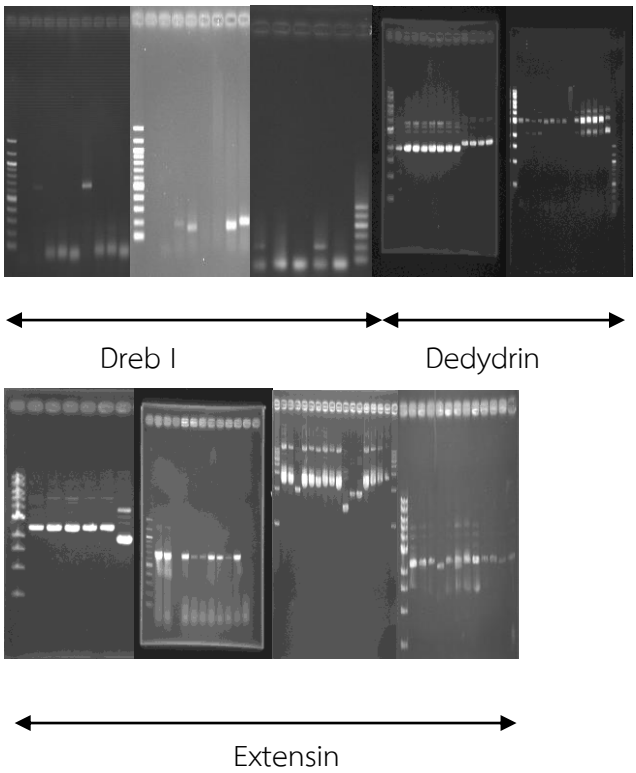


รูปที่ 3 แสดงพีซีอาร์แอมพลิคอนที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน DrebI, Cystatin และ Dr4 โดยใช้ Gene Specific primers

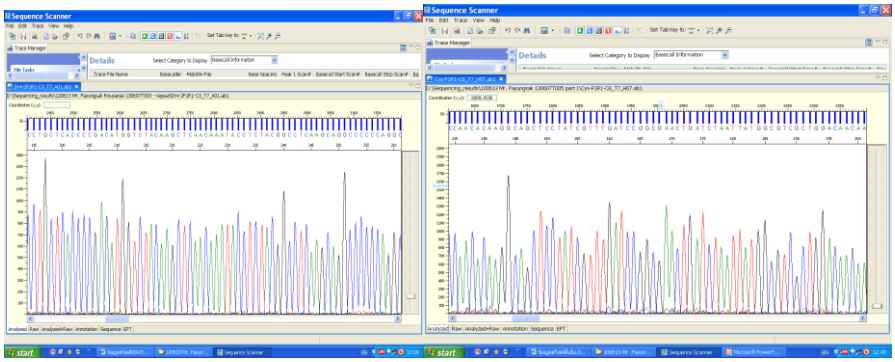


Dreb I Cystatin Dr4

รูปที่ 4 แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอและแอมพลิคอนยีนชนิดต่างๆ ที่โคลนและแยกได้โดยวิธี colony PCR รูปที่ (1) แสดง Dreb I แอมพลิคอน, Dedydrin แอมพลิคอน และ Extensin แอมพลิคอน



รูปที่ 5 ตัวอย่างลำดับดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหาลำดับเบส



รูปที่ 6 ลำดับเบสของยีนทนแล้งที่ได้จากซีดีเอ็นเอใบข้าวโพดลูกผสมพันธุ์นครสวรรค์ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล

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

TTTTGGCCAACGTCGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGCTCAAGAGCTCCACGAAACGTCCTCT
TGCTCTGCCACCACCACCTCGTCGTGCACCACATCCTGCTGCTCGTCCACTGTCACAGACTCGTCCTCTTCGCCCCCGTC
ACCGGCGGCGGCCAATGCCGCGCCCGCGACACGGAAGCGGCAGGCGTTGGAGGCCGAGGCCGAGGCCGAGGCGGGCGGTG
AGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAGGCTGTGCTGGTAATAAGGCGGCGCCGGCCAAGAAGCGACCGCGGGGCAGCGAGGGG
AAGCACCCGACGTTCCGCGGCGTGCGGATGCGGACGTGGGGCAAGTGGGTGTCGGAGATCCGCGAGCCGCGCAAGAAGTC
GCGCATATGGCTCGGCACGTTCCCCACCGCCGAGATGGCCGCGCGCGCCCACGACGTCGCGGCGCTCGCCATCAAGGGCC
GCGCCGCGCACCTCAACTTCCCGGACCTTGCCGGCGCGCTGCCGCGCGCCGCGTCCGCGGCGCCCAAGGACGTCCAGGCG
GCCGCCGCATTGGCCGCTGCGTTCACGTCGCCGTCATCGGAGCCCGGCGCCGGCGCCGGCGCGCACGAGGAGCCCGCTGC
CAAGGACGGCGCCGCGCCCGCGCCCGCGCCCGAGGAGGCAGCCGCCGACGCACAGGCACCAGTACCAGTAGCACTACCAC
CGCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAG
TATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAA
TTCCACACAAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCAACATTAAAT
TGCGTGGCGCTCACCTGCCCGCCTTT

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

TGGGGCCCGAGTTCCATGCTCCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGCTCAAGAGCTCCACGAAACGTCCTC
TTGCTCTGCCACCACCACCTCGTCGTGCACCACATCCTGCTGCTCGTCCACTGTCACAGACTCGTCCTCTTCGCCCCCGT
CACCGGCGGCGGCCAATGCCGCGCCCGCGACACGGAAGCGGCAGGCGTTGGAGGCCGAGGCCGAGGCCGAGGCGGGCGGT
GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAGGCTGTGCTGGTAATAAGGCGGCGCCGGCCAAGAAGCGACCGCGGGGCAGCGAGGG
GAAGCACCCGACGTTCCGCGGCGTGCGGATGCGGACGTGGGGCAAGTGGGTGTCGGAGATCCGCGAGCCGCGCAAGAAGT
CGCGCATATGGCTCGGCACGTTCCCCACCGCCGAGATGGCCGCGCGCGCCCACGACGTCGCGGCGCTCGCCATCAAGGGC
CGCGCCGCGCACCTCAACTTCCCGGACCTTGCCGGCGCGCTGCCGCGCGCCGCGTCCGCGGCGCCCAAGGACGTCCAGGC
GGCCGCCGCATTGGCCGCTGCGTTCACGTCGCCGTCATCGGAGCCCGGCGCCGGCGCCGGCGCGCACGAGGAGCCCGCTG
CCAAGGACGGCGCCGCGCCCGCGCCCGCGCCCGAGGAGGCAGCCGCCGACGCACAGGCACCAGTACCAGTAGCACTACCA
CCGCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGA
GTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTTCCTGTGTGAAATGTTATCCGCTCACA
TCTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGGTGCCTAAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATT
GCGGTTGGCG

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'-gtcttgggcttaggcctttt-3')	

7. 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 ผลการทดลองให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง ระหว่างใบข้าวโพดภายใต้สองสภาวะได้แก่ 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

8. สรุปเนื้อหา สาระสำคัญของผลงาน และข้อเสนอแนะในงานวิจัยเรื่องนั้นๆ ในอนาคต

การตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น ขาดน้ำ เย็นจัด หรือ เค็ม หรือสภาวะเครียดอื่นๆในพืชเป็นสิ่งที่พืชในแต่ละสปีชีส์แตกต่างกันในแง่ของการตอบสนอง เพื่อให้อยู่รอดภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆ เหล่านั้น ทั้งทางด้านสรีระวิทยา โครงสร้างของเซลล์ และชีวโมเลกุล แม้ว่าที่ผ่านมา ได้มีการศึกษา

ถึงปัจจัยที่ควบคุมการตอบสนองต่อการแสดงออกของยีนที่เหนี่ยวนำในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในพืชหลายๆ 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 ได้แก่ยีน 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

9. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : ผลงานที่สิ้นสุดสามารถนำไปประโยชน์ ได้ดังต่อไปนี้

1. พัฒนาต่อในการปรับปรุงพันธุ์พืช
2. เป็นผลงานทางวิชาการ
3. ตีพิมพ์เผยแพร่ทางวิชาการได้

10. ขอบคุณ (ถ้ามี) : คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ กรมวิชาการเกษตร ที่อนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมพันธุ์นครสวรรค์ 3 สำหรับนำมาใช้ในการวิจัย

11. เอกสารอ้างอิง :

Birnboim H.C., Doly J. (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.; Conejero, G.; Brietler,; J-C,Casse, F. 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.

12. ภาคผนวก : -

หมายเหตุ : **-**

รูปแบบ :

- หัวเรื่องข้อ 1-13 : ตัวอักษร TH SarabunPSK ขนาด 16 Point ตัวหนา
- เนื้อหา : ตัวอักษร TH SarabunPSK ขนาด 16 Point ตัวธรรมดา
- Page Setup : ด้านบน 2.5 ซม. ด้านซ้าย 2.5 ซม. ด้านขวา 2 ซม. ด้านล่าง 2.5 ซม.
- ขนาด A4 โดยใช้ Program Microsoft Word

* ให้แนบไฟล์รูปภาพประกอบด้วย เพื่อนำไปจัดทำรูปเล่มต่อไป

* จัดส่งข้อมูลไปยังกลุ่มติดตามและประเมินผล กองแผนงานและวิชาการในรูปเอกสารหรือส่งข้อมูลทาง Email Address : nonglux.k@doa.in.th