รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. **โครงการวิจัย** : การค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตร

   กิจกรรม : -

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การศึกษาหายีนส์ทนแล้งเพื่อเตรียมไว้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้ง

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Discovery of drought tolerant genes in Maize for the drought tolerant genetic improvement

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : นายพยุงศักดิ์ รวยอารี

   ผู้ร่วมงาน : นางสุภาวดี ง้อเหรียญ

   : นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์

   หน่วยงานต้นสังกัด : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ : ในประเทศไทย ข้าวโพดนับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมากรวมทั้งข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ทนแล้งพันธุ์นครสวรรค์ 3 ที่พัฒนาโดยนักวิชาการกรมวิชาการเกษตร เมื่อพืชอยู่ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ขาดน้ำ พืชมีกลไกการปรับตัวให้สามารถคงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมนั้นได้ โดยให้มีการแสดงออกของยีนหรือกลุ่มยีนส์เพื่อตอบสนองต่อสภาวะดังกล่าว ซึ่งอาจเป็นยีนเดียวหรือหลายๆยีนพร้อมกันก็ได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกยีนทนแล้งจากพืชชนิดต่างๆ มาศึกษาในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 ว่ามีการปรากฏของยีนนั้นๆ หรือไม่โดยวิธีการ PCR และโดยวิธีการสร้าง cDNA Library จากใบข้าวโพดในสภาวะขาดน้ำที่ 24 ชั่วโมง โดยศึกษาในระหว่างเดือนตุลาคม 2554 – กันยายน 2556 ทำการออกแบบไพรเมอร์จากยีนทนแล้งจากฐานข้อมูลชีวภาพสากลและทำปฏิกิริยา PCR เพื่อให้ได้แอมพลิคอนยีนและสร้างซีดีเอ็นเอโคลนจากซีดีเอ็นเอไลบรารี่ (cDNA Library) หาลำดับเบสและนำลำดับ

เบสไปเทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล ผลการทดลองในเบื้องต้นพบยีนทนแล้งที่ได้มีการศึกษาจากพืชชนิดต่างๆปรากฏในจีโนมข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 จำนวน 5 ชนิดยีน ส่วนยีนที่ได้จากโคลน cDNA จะเป็นตัวบ่งบอกการแสดงออกของยีนในระยะขาดน้ำได้ การศึกษาหน้าที่ของยีนต่างๆในระดับอาร์เอ็นเอต่อไปจะเป็นประโยชน์อย่างดียิ่งในการนำมาใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีคุณลักษณะทนแล้งต่อไป

คำนำ : พืชมีการปรับตัวทางสรีระวิทยาให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เพื่อให้ตัวมันเองมีความอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมนั้นๆ เช่น ขาดน้ำหรือแห้งแล้ง เป็นต้น การปรับตัวของพืชให้มีการพัฒนาหรือให้เป็นไปตามปกติหรือคงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมดังกล่าวนั้น พืชต้องมีการแสดงออกของยีนบางชนิด ซึ่งอาจเป็นยีนเดียวหรือกลุ่มยีนส์ (ยีนหลายๆ ชนิดแสดงออกพร้อมกันในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน นอกเหนือจากยีนที่แสดงออกทั่วไปทุกสภาวะ) จึงจะทำให้พืชมีการดำรงอยู่ในสภาวะนั้นๆ ได้หรือเกิดความเสียหายน้อยที่สุด

ที่ผ่านมา นักวิจัยได้ศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในพืช เพื่อให้พืชเกิดการปรับตัวให้คงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี ในปัจจุบัน ข้อมูลยีนหรือกลุ่มยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในสภาวะขาดน้ำหรือแห้งแล้งที่ได้จากค้นคว้าวิจัยมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้การนำข้อมูลที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะทนแล้งโดยอาศัยวิธีการเทคโนโลยีชีวภาพนั้นมีความเป็นไปได้มากขึ้น อีกทั้ง จากการศึกษาที่ผ่านมา มีข้อมูลที่แสดงให้เห็นชัดแล้วว่า อุณหภูมิของโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกๆ ปี และพบว่าพืชมีการแสดงออกของยีนที่จำเพาะบางชนิด เพื่อที่จะตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเช่นขาดน้ำหรือแห้งแล้งได้

ข้าวโพด (*Zea mays* Linn.) เป็นธัญพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลกและของคนไทยที่นิยมรับประทานกันมาก นอกเหนือจากนำมาใช้เป็นอาหารที่รับประทานทั่วไปแล้ว พันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์หรือพันธุ์ข้าวโพดไร่ นั้น นับว่าเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เป็นอย่างดีที่สามารถนำมาใช้เป็นธัญพืชเลี้ยงสัตว์ให้เกิดการส่งออกในรูปเนื้อสัตว์ ส่งผลให้มีมูลค่าเพิ่มมากกว่าการส่งออกในรูปของเมล็ดข้าวโพดโดยตรง ทำให้ข้าวโพดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่ง ทว่า ความต้องการใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในประเทศมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นมากหลังจากมีการขยายอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2535 ส่งผลให้การส่งออกเนื้อสัตว์ลดลงตามลำดับ ปัจจุบันการผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์มีความต้องการเพิ่มขึ้นเทียบกับปริมาณความต้องการที่ต้องการใช้อยู่ภายในประเทศและมีปริมาณไม่แน่นอนเนื่องจากการผลิตขึ้นกับสภาพดินฟ้าอากาศ ทำให้มีความเสี่ยงต่อความเสียหายจากความแห้งแล้งมากและพื้นที่ปลูกต้องแข่งขันกับพืชเศรษฐกิจอื่นๆ ที่ให้ผลตอบแทนที่ดีกว่า โดยในระยะ 4-5 ปี ที่ผ่านมาประเทศไทยจำเป็นต้องนำเข้าเพื่อให้เพียงพอกับความต้องการใช้ภายใน ทั้ง ๆ ที่ในอดีต ประเทศไทยเคยเป็นประเทศผู้ส่งออกรายใหญ่รายหนึ่งของโลกและมีศักยภาพด้านการผลิตการตลาดที่สามารถแข่งขันกับต่างประเทศได้ ดังนั้น ประเทศไทยจึง

ควรเร่งรัดการผลิตข้าวโพดภายในประเทศให้เพิ่มขึ้นทันกับความต้องการใช้และมีเหลือส่งออก (เข้าถึงข้อมูลทางระบบอินเทอร์เนตเรื่อง "ข้าวโพด" http://www.doae.go.th/plant/corn.htm)

อย่างไรก็ตามเมื่อไม่นานนี้ พันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่มีลักษณะทนต่อความแล้ง (สภาวะขาดน้ำ) และให้ปริมาณผลผลิตสูงถึง 1,147 กิโลกรัมต่อไร่ (1,147 kg/rai) ได้รับการพัฒนาโดยนักวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืชจากกรมวิชาการเกษตรเป็นพันธุ์ใหม่ที่มีชื่อว่า "ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3" (เข้าถึงข้อมูลทางระบบอินเทอร์เนต http://www.food resources.org/news/view.php?id=2646) โดยกรมวิชาการเกษตรคาดว่าภายในปีพ.ศ. 2552 สามารถผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมพันธุ์นครสรรค์ 3 ได้ประมาณ 350 ตัน และนำไปส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกได้ประมาณ 10,000 ไร่ และสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรได้เป็นอย่างดี

ในปัจจุบัน ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับยีนส์ที่บ่งบอกถึงลักษณะหรือแสดงออกในสภาวะทนแล้งในพืชชนิดต่างๆ เช่น ยีนดีไฮดริน (dehydrins) (Labhilili et al., 1995; Cellier 1998; Giordani 1999), ไซโคลฟิลิน (cyclophilins) (Gasser et al., 1990), dehrydration responsive element binding (DREB) protein (Skinner et al., 2005; Latini, et al., 2007) , dehydration responsive factor 1 (DRF1) (Latini et al., 2013), เตรฮาโลส (trehalose) (Djilianov et al., 2005) และเบตาอีนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (betaine aldehyde dehydrogenase) (Iba, 2002; Djilianov et al., 2005) เป็นต้น รวมทั้ง ยีนโปรโมเตอร์ที่แสดงออกอย่างสูงในสภาวะขาดน้ำ (Yi et al., 2010) ทว่า ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทนแล้งหรือทนต่อสภาวะขาดน้ำดังกล่าวในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งนครสวรรค์ 3 ของไทย

ในประเทศไทย ข้าวโพดนับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมากและพบข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งในประเทศอีกด้วย นับเป็นฐานพันธุกรรมในเชิงวิจัยได้เป็นอย่างดีรวมทั้งข้าวโพด ซึ่งเป็นพืชที่มีประโยชน์ทั้งด้านบริโภคและด้านงานวิจัย อีกทั้งจีโนมของข้าวโพดก็ได้ผ่านการศึกษาโดยสมบูรณ์ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตยีนหรือกลุ่มยีนส์ที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำจากข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 โดยอาศัยวิธีการทางชีววิทยาโมเลกุลจากซีดีเอ็นเอโคลนของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์ทนแล้ง "นครสวรรค์ 3" เพื่อนำข้อมูลที่ได้นั้นมาต่อยอดหรือประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีคุณลักษณะทนแล้งได้ต่อไป

5. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

1. ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 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)
6. เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge; Labnet/Spectrafuge16M, National, USA)
7. เครื่องดูดสารปริมาณน้อย (ไมโครไปเปต) ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
8. อ่างน้ำปรับอุณหภูมิอัตโนมัติ 65°C
9. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4°C (LAWCHAIN LC203LD ยี่ห้อ CHILLED รุ่น PT-30 Series)
10. ตู้แช่แข็ง -20°C (Thermo Scientific Puffer Hubbard Refrigerator)
11. ตู้แช่แข็ง -80°C (SANYO ULTRA LOW FREEZER, SANY0, USA)
12. 10x TAE Buffer
13. GelStar Solution (Lonza, Rockland, ME, USA)
14. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)
15. สารละลาย GTE (4M Guanidine Isothiocyanate, 25 mM NaCitrate pH 7.0, 0.5% Lauryl Sarcosine และ 0.1 M Beta-Mercaptoethanol)
16. เครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าแนวนอนพร้อม Power supply
17. เครื่องส่องดูแถบสารพันธุกรรมภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (UV) GelDoc Transluminator (BIORAD, USA)
18. ชุดถ่ายภาพพร้อมเครื่องมือวิเคราะห์สารพันธุกรรม (GELDOC BIORAD, USA)
19. In-Fusion® SMARTer® Directional cDNA Library Construction Kit. (Clontech, USA/Canada, Cat No. 634933)
20. CloneMiner™ II cDNA Library Construction Kit. (Clonetech, USA, Cat No. A11180)
21. ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (Plasmid DNA) (QIAprep spin miniprep kit, Qiagen, Valencia, USA)
22. เครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ ABI PRISM® 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer, CA, USA)
23. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
24. ช้อนตักสาร กระดาษชั่งสาร และเครื่องชั่งสาร

- <u>วิธีการที่ 1</u> การสร้าง In-Fusion cDNA Library จากใบข้าวโพดด้วยวิธีการ In-Fusion (Clonetech, USA)

แบ่งขั้นตอนการศึกษาออกเป็น 7 ขั้นตอน ดังนี้

1. เตรียมพืชทดลอง โดยการปลูกข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 ในถุงพลาสติกสีดำขนาด 10 นิ้ว x 10 นิ้ว x 10 นิ้ว ที่ประกอบด้วยดินตราลำดวน ประมาณ 5 เมล็ดต่อถุง ในโรงเรือน ให้น้ำจนเมล็ดงอกมีอายุ 14 วัน จากนั้น งดให้น้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. สกัด RNA จากใบข้าวโพดและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ RNA ที่สกัดได้โดยวิธีเจลอิเลคโตรฟอเรซิส
3. สังเคราะห์ cDNA สายแรกโดย LD-PCR
4. สังเคราะห์ cDNA สายที่สองโดยใช้เอ็นไซม์ Advantage 2 Polymerase
5. การทำ cDNA ให้บริสุทธิ์และแยกขนาด cDNA ด้วยการใช้คอลัมน์
6. การโคลน cDNA เข้าสู่ pSMART2IFD Linearized Vector ด้วยวิธีการ In-Fusion
7. การทำการถ่ายฝาก cDNA เข้าสู่ *E. coli* competent cell, การประเมินและขยายปริมาณโคโลนีจาก cDNA ที่ได้ (Titration and Amplications) และการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (plasmid DNA isolation) จากโคโลนีแบคทีเรียโดยวิธี Alkaline lysis (Birnboim and Doly, 1979; Birnboim, 1983) ตามคำแนะนำจากบริษัทคู่มือผู้ผลิต

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> การเตรียมพืชทดลอง

ปลูกเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 ในถุงพลาสติกดำขนาด 10 นิ้ว x 10 นิ้ว 10 นิ้วที่ใส่ดินและปุ๋ยไว้เรียบร้อยแล้ว ให้น้ำทุกวันเป็นเวลา 14 วัน ก่อนงดให้น้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงเก็บใบเพื่อสกัดสารพันธุกรรม (Total RNA) ส่วน control plant ให้น้ำตามปกติ

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> การสกัดสารพันธุกรรม Total RNA จากใบข้าวโพดตัวอย่าง

2.1 ตัดใบข้าวโพดตัวอย่างมาเก็บไว้ที่ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -80 °C ก่อนสกัดด้วยสาร TRIzol® Reagent

2.2 ชั่งน้ำหนักใบพืชตัวอย่างละประมาณ 100 มิลลิกรัม และเติมสาร TRIzol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บดตัวอย่างใบให้ละเอียดโดยการใช้โกร่งและในสภาพไนโตรเจนเหลว ตักตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หรือในหลอดโพลิโพรพิลีนขนาด 15 มิลลิลิตร (Greiner Bio-one Inc, USA)

2.3 บ่มสารละลายที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

2.4 เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม 200 มิลลิลิตร เขย่าหลอดให้ทั่วนาน 15 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 – 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

2.4 ตกตะกอน RNA ด้วยการเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 100 ไมโครลิตร (สำหรับหลอดขนาดเล็ก) และ 1 มิลลิลิตร (สำหรับหลอดขนาดใหญ่) ผสมให้เข้ากัน เหวี่ยงหลอดด้วยความเร็วสูงนาน 15 นาที ที่ความเร็ว 5,000 g ใช้ไปเปตดูดสารละลายใสทิ้งไป ล้าง RNA ที่ได้ด้วย 70% เอทานอล จากนั้นดูดเอทานอลทิ้งไปปั่นเหวี่ยงหลอดซ้ำอีกครั้ง ดูดเอทานอลที่เหลือออกซ้ำอีกครั้งด้วยไปเปต

2.5 เติมบัฟเฟอร์ GTE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ละลาย RNA ให้เข้ากัน เก็บรักษา RNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C (ระยะสั้น และที่ -80°C ในระยะยาว)

2.6 วิเคราะห์ RNA ที่สกัดได้โดยนำมาแยกผ่านเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis) ขนาด 80 โวลต์ นาน 30 – 45 นาที โดยใช้ 1.2 เปอร์เซ็นต์ Agarose Gel เป็นตัวกลาง จากนั้นนำ Agarose Gel มาย้อมด้วยสาร Ethidium bromine นาน 1 ถึง 2 นาที ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นนานประมาณ 1 นาที และบันทึกภาพด้วยเครื่องส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง Ultraviolet (Geldoc transluminator) วัดปริมาณและคุณภาพของปริมาณ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) เก็บรักษา RNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80°C (ในระยะยาว)

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> วิธีการสังเคราะห์สาย cDNA (first-strand cDNA synthesis)

1. ในแต่ละตัวอย่างปฏิกิริยาในหนึ่งหลอด ประกอบด้วยองค์ประกอบดังต่อไปนี้

1. RNA ตัวอย่าง (50 ng – 1 µg)	1-3.5	ไมโครลิตร
2. CDS A (12 µM)	1	ไมโครลิตร
3. dH_2O	x	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	4.5	ไมโครลิตร

สำหรับปฏิกิริยาควบคุม (positive control) เติม 1 ไมโครลิตรของ Total RNA จากตับหนู

2. ผสมให้เข้ากันและปั่นหลอดเบาๆ ในเครื่องปั่นเหวี่ยง
   บ่มหลอดที่อุณหภูมิ 72°C ในเครื่อง Thermocycler นาน 3 นาที จากนั้นที่อุณหภูมิห้อง (ถึง 42 °C) นาน 2 นาที

3. เตรียม master mix ที่อุณหภูมิห้องด้วยการเติมสารละลายต่อไปนี้ ตามลำดับ

1.	5x First-strand buffer	2	ไมโครลิตร
2.	DTT (100 mM)	0.25	ไมโครลิตร
3.	dNTP Mix (10 mM)	1	ไมโครลิตร
4.	Oligonucleotide (12 μM)	1	ไมโครลิตร
5.	RNase Inhibitor	0.25	ไมโครลิตร
6.	Reverse Transcriptase (100U)	1	ไมโครลิตร
	รวมปริมาตร	5.5	ไมโครลิตร

4. เติม master mix (5.5 ไมโครลิตร) จากข้อ 4 ลงในแต่ละหลอดปฏิกิริยา ผสมให้เข้ากัน ปั่นเบาๆ
5. บ่มหลอดที่ 42°C นาน 90 นาที
6. บ่มหลอดให้ร้อนที่อุณหภูมิ 68 °C นาน 10 นาที เพื่อขจัด cDNA สายแรก
7. เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่ -20 °C

<u>ขั้นตอนที่ 4</u> การสังเคราะห์สาย cDNA สายสอง (Second-strand cDNA synthesis) โดย LD-PCR ด้วยการใช้เอ็นไซม์ Advantage 2 Polymerase

1. ทำเครื่อง Thermocycler ให้ร้อน ที่ 95 °C (preheated)
2. เตรียมปฏิกิริยา PCR สองหลอดปฏิกิริยา ด้วยการรวมสารละลายดังต่อไปนี้

cDNA สายแรก	2 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	80 ไมโครลิตร
10X Advantage 2 PCR buffer	10 ไมโครลิตร
50X dNTP Mix (10 mM)	2 ไมโครลิตร
5’ PCR primer (10 μM)	2 ไมโครลิตร
SMARTer PCR primer (12 μM)	2 ไมโครลิตร
50X Advantage 2 Polymerase Mix	2 ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	100 ไมโครลิตร

3. ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่า (vortexer) และปั่นหลอดเบาๆในเครื่องเหวี่ยงปั่น
4. นำหลอดมาใส่ในเครื่อง Thermocycler ที่ตั้งความร้อนที่ 95°C

5. ทำปฏิกิริยา PCR ดังต่อไปนี้

95 °C	1 นาที
จำนวนรอบ (ปรับตามผลที่ได้)	x
95 °C	15 วินาที
65 °C	30 วินาที
68 °C	6 นาที

จากนั้น ปรับตามสภาพปฏิกิริยา (PCR conditions) จนกระทั่งได้ PCR products

6. นำ 5 ไมโครลิตรที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาผ่านเครื่องแยกด้วยกระแสไฟฟ้า เทียบกับ 1kb DNA ladder บน 1.2% อะกาโลสเจล ใน TAE/TBE บัฟเฟอร์ ก่อนย้อมด้วย GelStar
7. แบ่งดีเอ็นเอหลอดละ 85 ไมโครลิตร เพื่อทำการแยกด้วยคอลัมน์และเก็บรักษาดีเอ็นเอที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

<u>ขั้นตอนที่ 5</u> การทำ cDNA ให้บริสุทธิ์ และ แยก cDNA ด้วยคอลัมน์

1. เตรียมคอลัมน์ (ดังอธิบายไว้ในคู่มือ) โดยการเขย่าคอลัมน์ไปมาเบาๆ เพื่อผสมเรซิน
2. ติดคอลัมน์เข้ากับขาตั้งที่ยึด (stand)
3. ดูดบัฟเฟอร์ลงบนคอลัมน์จนกระทั่งสังเกตเห็นเม็ดเจล (gel bed)
4. ปล่อยให้บัฟเฟอร์ไหลออกมา ค่อยเติมบัฟเฟอร์ไปให้ถึงส่วนบนสุดของคอลัมน์
5. หยด 85 ไมโครลิตร ของผลผลิต PCR (PCR products) ที่ได้ลงบนคอลัมน์
6. เก็บบัฟเฟอร์ที่ไหลออกมาทีละหยด (ประมาณ 16 หยด)
7. รวม cDNA ที่ได้ ประมาณ 4-5 หยด และตกตะกอนด้วยสารละลายต่อไปนี้

1/10 Sodium acetate	(3M; pH 4.8)
Glycogen	1.3 ไมโครลิตร
2.5 ปริมาตร 95% ethanol	(-20°C)

<u>ขั้นตอนที่ 6</u> การโคลน cDNA เข้าสู่แบคทีเรียเวคเตอร์ pSMART2IFD Linearized Vector

1. เตรียมปฏิกิริยาโคลนนิ่งตามคำแนะนำจากคู่มือบริษัทผู้ผลิต (Clontech Laboratories, Takara, Japan)
2. ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากันเบาๆ และเหวี่ยงหลอดโดยใช้เวลาเล็กน้อยในเครื่องเหวี่ยงปั่น
3. บ่มปฏิกิริยานาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 50°C

4. เติม TE และ QuickClean Resin ปริมาตร 90 ไมโครลิตรและ 10ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในแต่ละปฏิกิริยา เขย่าให้เข้ากันนาน 1 นาที จึงเหวี่ยงปั่นหลอดและดูดสารละลายใสลงในหลอดใหม่
5. เติมไกลโคลเจนปริมาตร 1.2 ไมโครลิตรในแต่ละปฏิกิริยา ผสมให้เข้ากัน ก่อนเติม 100% ปริมาตร 280 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบาๆ
6. วางหลอดลงในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70°C นานข้ามคืน
7. เหวี่ยงปั่นหลอดทดลองที่ความเร็ว 14,000 rpm นาน 20 นาที และดูดเอาเอทานอลออก
8. ตากเพลเลตให้แห้งในตู้บ่มเชื้อก่อนละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

<u>ขั้นตอนที่ 7</u> เตรียมปฏิกิริยาในขั้นตอนถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Recombinant plasmid transformation) ขั้นตอนการไตเตรต (Plasmid library titration) และขั้นตอนการเพิ่มจำนวนไลบรารี่ (Library amplification) ตามคำแนะนำจากคู่มือผู้ผลิต

- <u>วิธีการที่ 2</u> การสร้าง cDNA ไลบรารี่จากใบข้าวโพดโดยไม่ใช้เทคนิคการโคลนด้วย Restriction enzyme (CloneMinerII™ cDNA, Clonetech, USA)

<u>ขั้นตอนที่ 1</u>

1. เติมไพรเมอร์ Biotin-*att*B2(Oligo(dT) ความเข้มข้น 30 pmol/µl (priming reaction) ลงในตัวอย่าง RNA ที่ปรับความเข้มข้นไว้แล้ว
2. ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากันโดยการไปเปตและปั่นเหวี่ยงนาน 2 วินาที และวางบนน้ำแข็งก่อนการใช้ในขั้นตอนถัดไป
3. บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที ก่อนปล่อยตัวอย่างให้เย็นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 15-30 นาที
4. เติมสารต่างๆ ต่อไปนี้ลงในหลอดใหม่ ตามปริมาตรดังต่อไปนี้

สาร	นาโน	มาตรฐาน
5x First-strand buffer	2 µl	4 µl
0.1M DTT	1 µl	2 µl
10mM (dNTPs) แต่ละชนิด	0.5 µl	1 µl

5. ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากันโดยการไปเปตขึ้นลงเบาๆ 2 วินาที ก่อนวางลงบนน้ำแข็ง
6. เติมสารในขั้นตอนที่ 5 ลงในหลอดปฏิกิริยาที่เติมไพรเมอร์ที่อุณหภูมิลดลงที่ 45 องศาเซลเซียส (ขั้นตอนที่ 1) ตามปริมาตรที่ปรับให้เหมาะสม
7. บ่มหลอดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
8. บ่มหลอดในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมก่อนเติมเอ็นไซม์ SuperScriptIII® RT ตามคำแนะนำในคู่มือผู้ผลิต
9. ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากันเบาๆ อย่าให้เกิดฟอง
10. ตั้งปฏิกิริยา PCR ตามโปรแกรมดังต่อไปนี้

45°C	20 นาที
50°C	20 นาที
55°C	20 นาที

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> การสังเคราะห์ cDNA สายสอง

1. วาง cDNA สายแรกลงบนน้ำแข็ง และเติมสารต่างๆ ดังต่อไปนี้ลงในหลอด

สาร	นาโน	มาตรฐาน
DEPC-treated water	45.5 µl	90 µl
5x second strand buffer	15 µl	30 µl
10 mM dNTPs แต่ละชนิด	1.5 µl	3 µl
E. coli DNA ligase (10U/µl)	0.5 µl	1 µl
E. coli polymerase (10U/µl)	2 µl	4 µl

E. coli RNaseH (2U/µl)	0.5 µl	1 µl

2. ผสมปฏิกิริยาเบาๆ ให้เข้ากันและเหวี่ยงปั่นหลอดนาน 2 วินาที
3. บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง
4. เติมเอ็นไซม์ T4 DNA polymerase เพื่อสร้าง cDNA ปลายทู่ (blunt-ended)
5. บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16°C นาน 5 นาที
6. เติม 0.5M EDTA pH 8.0 เพื่อหยุดปฏิกิริยา

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> การสกัดด้วย phenol:chloroform:isoamylalcohol

1. เติม phenol:chloroform:isoamylalcohol และเขย่าด้วยมือให้ทั่วนาน 30 วินาทีโดยประมาณ
2. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm นาน 5 นาที และดูดสารละลายส่วนบนลงในหลอดใหม่ทันที
3. ตกตะกอนด้วยเอทานอลด้วยการเติมสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

สาร	นาโน	มาตรฐาน
ไกลโคเจน	80 µl	160 µl
7.5M แอมโมเนียมอะซิเตท	40 µl	80 µl
100% เอทานอล	300 µl	600 µl

4. วางหลอดในตู้ลบ 80 องศาเซลเซียส 10 นาที ก่อนปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) นาน 30 นาที
5. ทำหลอด cDNA ให้แห้งโดยการวางหลอดที่อุณหภูมิห้องนาน 2-3 นาที
6. ละลาย cDNA โดยการเติม DEPC-water 11-22 µl
7. ปั่นเหวี่ยงหลอดนาน 2 วินาที ก่อนวางลงบนน้ำแข็ง

<u>ขั้นตอนที่ 4</u> การเชื่อมต่อสาร cDNA กับ *att*B1 adapter (Ligation)

1. นำ cDNA สายคู่ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3 มาวางลงบนน้ำแข็ง ก่อนเติมด้วยสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

สาร	นาโน	มาตรฐาน
5x adapter buffer	5 µl	10 µl
AttB1 Adapter	2 µl	4 µl
0.1M DTT	4 µl	8 µl
T4 DNA ligase	3 µl	6 µl

2. ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากันเบาๆ โดยการไปเปต และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 16-24 ชั่วโมง

<u>ขั้นตอนที่ 5</u> การแยกขนาด cDNA ด้วยการใช้คอลัมน์ Size Fractionation Column

1. เตรียมคอลัมน์โดยการวางหรือเสียบคอลัมน์ที่ให้มาโดยบริษัทผู้ผลิตลงบนขาตั้ง (stand)
2. เปิดฝาด้านบน ตามด้วยฝาด้านล่าง และเติมสารละลาย TEN 0.8 มิลลิลิตรเพื่อชะคอลัมน์
3. ชะคอลัมน์ซ้ำอีก 3 ครั้ง โดยการเติม TEN ครั้งละ 0.8 มิลลิลิตร
4. เตรียมหลอดสะอาดจำนวน 3 หลอด ให้หมายเลขบนฝา 1, 2 และ 3 วางหลอดบนที่วางหลอด (rack)
5. เติม 100 µl สารละลาย TEN ลงใน cDNA ปริมาตร 50 µl ผสมให้เข้ากันเบาๆ และเหวี่ยงปั่นนาน 2 วินาที
6. หยอดสารละลายทั้งหมดลงในคอลัมน์ และปล่อยให้หยดลงมาลงในหลอดที่ 1
7. เติมสารละลาย TEN อีกครั้งที่ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บหลอดที่ 1 ไว้
8. เลื่อนหลอดที่ 2 มาไว้ที่ฐานที่ตั้งคอลัมน์ เติมสารละลาย TEN ปริมาตร 240 ไมโครลิตร ปล่อยให้สารละลายไหลและหยดลงในหลอดที่ 2 จนหมด
9. เลื่อนหลอดที่ 3 มาไว้ที่ฐานที่ตั้งคอลัมน์ เติมสารละลาย TEN ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ปล่อยให้สารละลายไหลและหยดลงในหลอดที่ 3 จนหมด
10. นำหลอดที่ 2 มาตกตะกอนด้วยเอทานอล

<u>ขั้นตอนที่ 6</u> การตกตะกอน cDNA ที่แยกได้จากคอลัมน์ด้วยเอทานอล

1. เติมสารละลายต่างๆ ต่อไปนี้ลงในตัวอย่าง cDNA

สาร	ปริมาณ
ไกลโคเจน 20µg/µl	1 µl
7.5M แอมโมเนียมอะซิเตท	ปริมาตร 0.5 เท่าของตัวอย่าง
100% เอทานอล	ปริมาตร 2.5 เท่าของตัวอย่าง

2. เก็บหลอดไว้ที่อุณหภูมิลบ 80 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที ก่อนปั่นเหวี่ยงหลอดที่ 14,000 rpm นาน 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. ดูดสารละลายใสออก ก่อนเติมด้วย 70% เอทานอล
4. ปั่นเหวี่ยงหลอดที่ 14,000 rpm นาน 2 นาที ดูดสารละลายส่วนบนออก และทำซ้ำอีกหนึ่งครั้ง
5. วางตัวอย่าง cDNA ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 5-10 นาที
6. ละลาย cDNA ด้วยสารละลาย TE โดยการดูดขึ้นลงเบาๆ 30-40 ครั้ง
7. ดูดตัวอย่างลงในหลอดใหม่

<u>ขั้นตอนที่ 7</u> การทำปฏิกิริยา BP recombination

1. เติมสารละลายต่างๆ ต่อไปนี้ลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร

สาร	นาโน	มาตรฐาน
ตัวอย่าง cDNA (*att*B-flanked)	X µl	X µl
pDON™ 222 (150ng/µl)	1 µl	2 µl
สารละลาย TE	7 µl	7 µl

2. เตรียมปฏิกิริยาควบคุม (control reaction) ดังที่ระบุไว้ในคู่มือผู้ผลิต
3. ละลายเอ็นไซม์ BP clonase™ II บนน้ำแข็ง
4. เหวี่ยงปั่นสองครั้งๆ 2 วินาที

5. เติมเอ็นไซม์ BP clonase™ II ลงในแต่ละตัวอย่าง ดูดตัวอย่างขึ้นลงเบาๆ และเหวี่ยงปั่นหลอด นาน 2 วินาที
6. บ่มปฏิกิริยาที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 16 – 20 ชั่วโมง

<u>ขั้นตอนที่ 8</u> การทำปฏิกิริยาการถ่ายฝากเข้าสู่ DH10B™ Phage resistant cell

1. ทำปฏิกิริยาการถ่ายฝากตามคำแนะนำในคู่มือผู้ผลิต ยกเว้นการเขย่าเชื้อจาก 1 ชั่วโมง (ตามคำแนะนำจากคู่มือผู้ผลิต) เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง (เพื่อให้เชื้อโตเพียงพอที่จะสร้างโคโลนี)
2. สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ตามคำแนะนำโดยคู่มือผู้ผลิต (NucleoSpinPlasmid® Macherey-Nagel, Germany)

<u>ขั้นตอนที่ 9</u> การตรวจสอบขนาดอินเสิร์ทของ cDNA สอดแทรก (inserted cDNA)

วิธีการที่ 1 ใช้ไพรเมอร์ M13 forward primer และ M13 reverse primer

วิธีการที่ 2 ตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ B*sr*GI

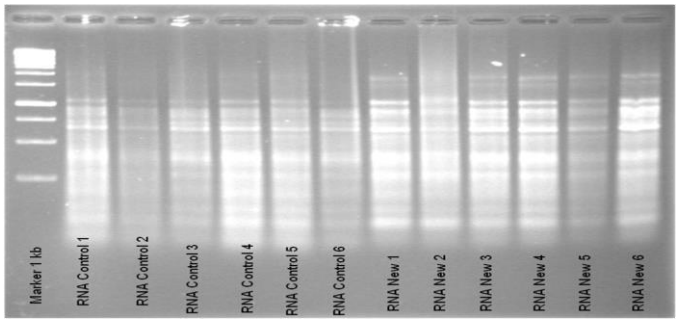
- เวลาและสถานที่
  - ระยะเวลา 3 ปี เริ่มต้น ต.ค. 2554 สิ้นสุด ก.ย. 2556
  - สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

6. ผลการทดลองและวิจารณ์ (เป็นส่วนสำคัญของการทำงานวิจัย)

- 1. ได้อาร์เอ็นเอบริสุทธิ์จากใบข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 ในสภาวะขาดน้ำที่กำหนด โดยสังเกตได้จากการนำอาร์เอ็นเอมาแยกผ่านกระแสไฟฟ้าภายใต้สภาวะที่กำหนดและใช้ Formaldehyde gel electrophoresis ในการแยก (รูปที่ 1) เพื่อป้องกันการ degrade ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้
- 2. ในแต่ละขั้นตอนย่อยในการสร้างซีดีเอ็นเอกระทั่งได้โคโลนีหรือซีดีเอ็นเอโคลน (cDNA clone) เมื่อเทียบกับชุดคิทได้ผลตามที่ได้ระบุไว้ในคู่มือผู้ผลิต เช่น ซีดีเอ็นเอสายสอง (รูปที่ 2)
- 3. รูปที่ 3 แสดงเวคเตอร์ pDONR™222 ที่ใช้ในการโคลนไลบรารี่
- 4. รูปที่ 4 แสดงตัวอย่างการตัดตัวอย่างซีดีเอ็นเอโคลนจากไลบรารี่ตามคำแนะนำจากบริษัทคู่มือผู้ผลิต

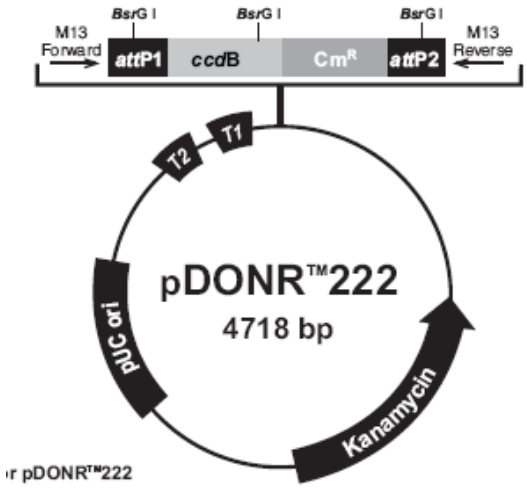
- 5. cDNA clone ที่สกัดได้หรือพลาสมิดดีเอ็นเอ (plasmid DNA) มีคุณภาพและความเข้มข้นดีและเพียงพอต่อการนำไปหาขนาดอินเสริ็ทและลำดับเบส หลังนำ cDNA clone มาผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (รูปที่ 5)
- 6. ยีนที่ได้จะได้นำไปเทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากลเพื่อหาความเป็นไปได้ของยีนที่แสดงออกต่อไป

รูปที่ 1 แสดง Total RNA ที่สกัดได้จากใบพืชข้าวโพดตัวอย่างที่สภาวะต่างๆ

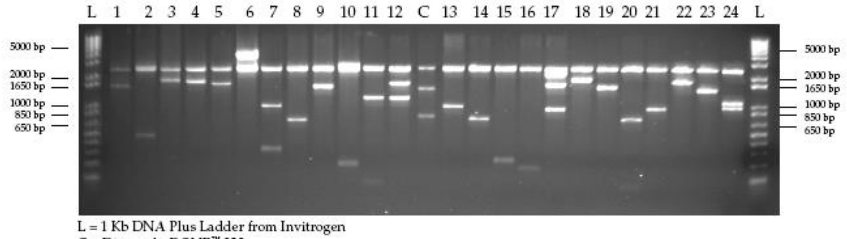


Control = ให้น้ำปกติ
New = ขาดน้ำ 24 ชั่วโมง

รูปที่ 2 แผนที่และลักษณะของเวคเตอร์ pDONR™222

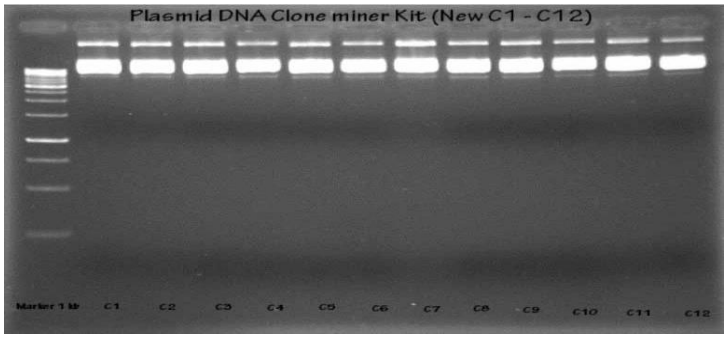


รูปที่ 3 แสดงตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอจำนวน 24 โคโลนีที่ความเข้มข้น 300-500 นาโนกรัมที่สกัดได้จากไลบรารี่ควบคุม (control) และเวคเตอร์ pDONR™ 222 (เลน C) ทีตัดด้วยเอ็นไซม์ B*sr*GI โดยตัวอย่างเวคเตอร์ (เลน C) สังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอ 3 แถบที่ขนาด 2.5kb, 1.4kb, และ 790 bp

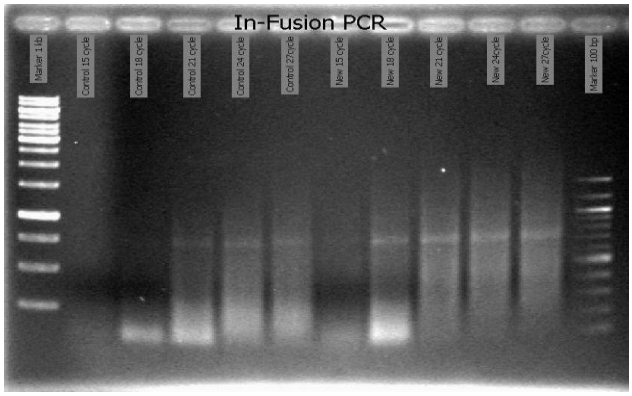


L = 1 Kb DNA Plus Ladder from Invitrogen
C = Digested pDONR™ 222

รูปที่ 4 แสดงตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอจำนวน 12 โคโลนีที่สกัดได้จากไลบรารี่ข้าวโพด และ 1kb DNA ladder ในเลนซ้ายมือสุด



รูปที่ 5 รูปแสดง PCR products ที่ได้จากการสังเคราะห์ SMARter cDNA โดยวิธีการ LD-PCR



7. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ : สร้าง cDNA ไลบรารี่จากส่วนใบข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 ที่เป็นข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งที่ปรับปรุงโดยนักวิชาการนักปรับปรุงพันธุ์กรมวิชาการเกษตร พลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากไลบรารี่จะถูกนำไปหาลำดับเบสในลำดับต่อไปและนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลชีวภาพสากล ข้อมูลยีนต่างๆ ที่ได้เป็นประโยชน์ด้านข้อมูลการแสดงออกของยีนทนแล้งที่ปรากฏในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 และอาจนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไปได้ในอนาคต อีกทั้ง อาจนำวิธีการ (approach) เดียวกันนี้ไปศึกษายีนที่แสดงออกในสภาวะขาดน้ำที่กำหนดในพืชสำคัญอื่นๆต่อไปได้

8. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ **:** ผลงานที่สิ้นสุดสามารถนำไปประโยชน์ ได้ดังต่อไปนี้

1. พัฒนาต่อในการปรับปรุงพันธุ์พืช
2. เป็นผลงานทางวิชาการ
3. ตีพิมพ์เผยแพร่ทางวิชาการได้

9. ขอบคุณ (ถ้ามี) : คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ กรมวิชาการเกษตร ที่อนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 เพื่อใช้ในการวิจัยในครั้งนี้

10. เอกสารอ้างอิง :

Altschul,S.F., T.L. Madden, A.A., Schäffer, J, Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.

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. http://www.food-resources.org/news/view.php?id=2646 (เข้าถึงข้อมูลทางระบบอินเทอร์เน็ต พ.ศ. 2552).

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.

Clonetech Laboratories, USA. In-Fusion® SMARTer® cDNA Library Construction Kit User Manual. Cat No. 634933. 40 p.

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.

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, and 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.

Labhilili, M., Joudrier, P. and 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, M., Dettori, M., Ammar, K., and Galeffi, P. 2007. Identification of DREB- related gene in *Triticum durum* and its expression under water stress conditions. *Annals of Applied Biology*. 150: 187-195.

Latini, A., Sperandei, M., Cantale, C., Arcangeli, C., Ammar, K., and Galeffi, P. 2013. Variability and expression profile of the DRF1 gene in four cultivars of durum wheat and one triticale under moderate water stress conditions. Planta. 237(4):967-78.

Plasmid isolation using Alkaline lysis. Plasmid Isolation Protocol. 2552. http://www.bio-protocol.org/wenzhang.aspx?id=30. (เข้าถึงข้อมูลทางระบบอินเทอร์เน็ต พ.ศ. 2552).

Sharma, A.D., and Kaur, P. 2009. Combinded 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.

Stress and disease tolerance. 2553. http://www.knowledgebank.irri.org/ricebreedingcourse/Breeding_for_drought_resistance.htm. (เข้าถึงข้อมูลทางระบบอินเทอร์เน็ต พ.ศ. 2553). International Rice Research Institute.

Zhu, W., Zhang, L., Lv, H., Zhang, H., Zhang, D., Wang, X., and 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.

11. 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