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 : ในการศึกษานี้ได้นำวิธีการ PCR ที่อิงไพรเมอร์ควบคุมการเชื่อมต่อสาย (Annealing Control Primers-based PCR) มาใช้ในการระบุยีนที่แสดงออกจากใบข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 ในสภาวะขาดน้ำที่ 24 ชั่วโมง (treated) จากการใช้ 20 ไพรเมอร์ควบคุมกับ cDNA ใบข้าวโพดขาดน้ำเป็นเทมเพลทในปฏิกิริยา PCR เทียบกับ cDNA จากใบข้าวโพดให้น้ำปกติ (untreated) แอมพลิคอนยีนที่ปรากฏจะถูกนำมาเปรียบเทียบ สกัดแยก โคลน หาลำดับเบสและหาหน้าที่ของยีน (putative gene functions) เทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล ข้อมูลเบื้องต้นโดยใช้ cDNA ควบคุม (control cDNA) ในการทำปฏิกิริยา PCR ผลการทดลองให้ผลบวก ส่วน

ปฏิกิริยา PCR ที่ใช้อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 ในสภาวะขาดน้ำที่ 24 ชั่วโมง เป็นเทมเพลท โดยใช้ไพรเมอร์ควบคุม พบการเชื่อมต่อสายกับไพรเมอร์บางเส้นในการทำปฏิกิริยา PCR ข้อมูลที่ได้ในเบื้องต้นอาจนำมาสู่ความเข้าใจมากขึ้นเกี่ยวกับการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในพืช และนำไปสู่การพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป

คำนำ : พืชมีการปรับตัวทางสรีระวิทยาให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เพื่อให้ตัวมันเองมีความอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมนั้นๆ เช่น ขาดน้ำหรือแห้งแล้งเป็นต้น การปรับตัวของพืชให้มีการพัฒนาหรือให้เป็นไปตามปกติหรือคงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมดังกล่าวนั้นต้องมีการแสดงออกของยีนบางชนิด ซึ่งอาจเป็นยีนเดียวหรือกลุ่มยีนส์ (ยีนหลายๆ ชนิดแสดงออกพร้อมกันในสภาวะเดียวกัน) จึงจะทำให้พืชมีการดำรงอยู่ในสภาวะนั้นๆ ได้หรือเกิดความเสียหายน้อยที่สุด ที่ผ่านมานักวิจัยได้ศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในพืช เพื่อให้พืชเกิดการปรับตัวให้คงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี ในปัจจุบัน ข้อมูลยีนหรือกลุ่มยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในสภาวะขาดน้ำหรือแห้งแล้งที่ได้จากค้นคว้าวิจัยมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้การนำข้อมูลที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะทนแล้งโดยอาศัยวิธีการเทคโนโลยีชีวภาพนั้นมีความเป็นไปได้มากขึ้น อีกทั้ง จากการศึกษาที่ผ่านมา มีข้อมูลที่แสดงให้เห็นชัดแล้วว่า อุณหภูมิของโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกๆ ปี และพบว่าพืชมีการแสดงออกของยีนที่จำเพาะบางชนิด เพื่อที่จะตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเช่นขาดน้ำหรือแห้งแล้งได้

ในประเทศไทย ข้าวโพดนับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมากและพบข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งในประเทศอีกด้วย นับเป็นฐานพันธุกรรมในเชิงวิจัยได้เป็นอย่างดี รวมทั้งข้าวโพดเป็นพืชที่มีประโยชน์ทั้งด้านบริโภคและด้านงานวิจัย ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นนำเสนอการค้นหายีนหรือกลุ่มยีนส์ที่ได้มีการศึกษาค้นคว้ามาแล้วในพืชชนิดต่างๆ แล้วนำยีนนั้นๆ มาศึกษากับข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งในประเทศไทยว่าข้อมูลที่ได้มีความสอดคล้องหรือแตกต่างกันหรือไม่ เพื่อนำข้อมูลที่ได้นั้นมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีคุณลักษณะทนแล้งได้ต่อไปในอนาคต ทำให้งานวิจัยนี้สามารถให้ข้อมูลในรูปยีนที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรของประเทศไทยได้

5. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์ - ระบุอุปกรณ์ที่สำคัญ เช่น เครื่องมือ พันธุ์ สารเคมี ปุ๋ย ฯลฯ

-

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) และ ชุดคิทสกัดอาร์เอ็นเอรวม 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. ชุดสกัดสารพันธุกรรมจากอะกาโลสเจล (GeneJet Gel Extraction Kit. Thermoscientific)
9. เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (Labnet/Spectrafuge16M, National, USA)
10. เครื่องดูดสารปริมาณน้อย (ไมโครไปเปต) ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
11. อ่างน้ำปรับอุณหภูมิอัตโนมัติ 65°C
12. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4°C (LAWCHAIN LC203LD ยี่ห้อ CHILLED รุ่น PT-30 Series)
13. ตู้แช่แข็ง -20°C (Thermo Scientific Puffer Hubbard)
14. ตู้แช่แข็ง -80°C (SANYO ULTRA LOW FREEZER, SANY0, USA)
15. 10x TAE Buffer
16. GelStar Solution (Lonza, Rockland, ME, USA)
17. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (Gene Amp PCR system 9700, Applied Biosystems, Foster, CA, USA)
18. สารละลาย GTE (4M Guanidine Isothiocyanate, 25 mM NaCitrate pH 7.0, 0.5% Lauryl Sarcosine และ 0.1 M Beta-Mercaptoethanol)
19. เครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าแนวนอนพร้อม Power supply
20. เครื่องส่องดูแถบสารพันธุกรรมภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (UV) GelDoc Transluminator (BIORAD, USA)
21. ชุดถ่ายภาพพร้อมเครื่องมือวิเคราะห์สารพันธุกรรม (GELDOC BIORAD, USA)
22. PCR DEG Kit (Soul, South Korea)
23. ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (Plasmid DNA) (QIAprep spin miniprep kit, Qiagen,

Valencia, USA)

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

- วิธีการ

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

เพาะเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 ในถุงพลาสติกดำขนาด 10x10x10 นิ้ว ที่ใส่ดินและปุ๋ย ในช่วงเดือนกันยายนถึงตุลาคม พ.ศ. 2556 ให้น้ำทุกวันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนงดให้น้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (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 (และที่ -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 (ในระยะยาว)

<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	8	ไมโครลิตร

<u>ขั้นตอนที่ 4</u> การเตรียมปฏิกิริยา PCR สำหรับ ACP-based PCR, การโคลนแอมพลิคอนยีนที่ปรากฏเข้าสู่เวคเตอร์ TOPO cloning vector, การโคลนนิ่งและการหาลำดับเบส

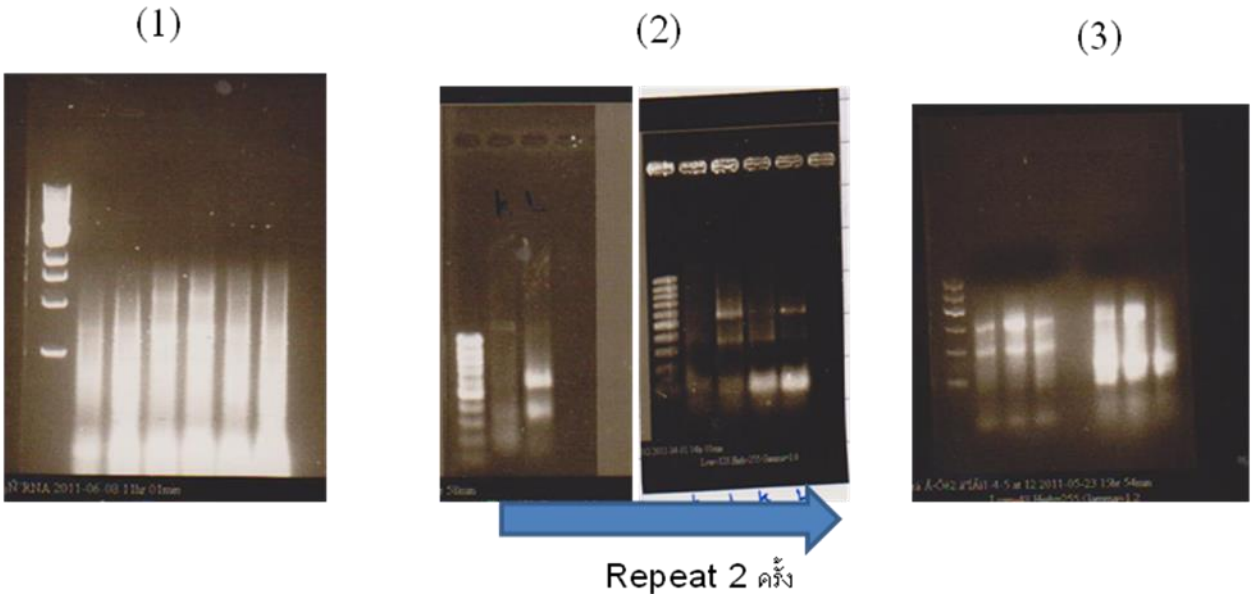
1. เตรียมปฏิกิริยา PCR สำหรับ ACP-based PCR ตามที่ได้อธิบายไว้ใน Kim และคณะ (2004)
2. แยกแถบที่ปรากฏบน 2% อะกาโลสเจล
3. ย้อมด้วย GelStar และแยกแถบ PCR (DEG) ที่ปรากฏด้วยตา
4. ชุดสกัดแถบดีเอ็นเอจากอะกาโลสเจล (Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit, Geneaid, Taiwan)
5. นำแถบดีเอ็นเอโคลนเข้าสู่ TOPO TA cloning vector (Invitrogen, Calsbad, CA, USA) ตามคำแนะนำจากคู่มือผู้ผลิต
6. หาลำดับเบสจากพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยการใช้ M13 ไพรเมอร์ โดยใช้เครื่องหาลำดับเบส
7. เปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูลชีวภาพสากล

- เวลาและสถานที่
  - ระยะเวลา 1 ปี เริ่มต้น ต.ค. 2556 สิ้นสุด ก.ย. 2556
  - สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

6. ผลการทดลองและวิจารณ์ (เป็นส่วนสำคัญของการทำงานวิจัย)

- อธิบายผลการทดลองที่สำคัญ อ้างอิงถึงตาราง กราฟ หรือรูปประกอบพร้อมเหตุผลสนับสนุนการทดลอง และวิจารณ์เหตุผลที่ทำให้ผลการทดลองเป็นเช่นนั้น รวมทั้งอ้างถึงผลการทดลองของผู้อื่น (จากเอกสารอ้างอิงในคำนำ หรืออุปกรณ์และวิธีการ) เพื่อสนับสนุนหรือคัดค้านผลการทดลองนั้นๆ

รูปที่ 1 แสดง Total RNA ที่สกัดได้จากใบข้าวโพดตัวอย่างก่อนนำมาผ่านเอ็นไซม์ DnaseI (1) ปฏิกิริยาควบคุม (control experiment) โดยใช้ RNA จากชุดคิท (2) และ การทำปฏิกิริยา ACP-based PCR โดยใช้ RNA จากใบข้าวโพดตัวอย่างให้น้ำปกติ (ควบคุม) ((3 เลนซ้ายมือ) และ ใบข้าวโพดตัวอย่างขาดน้ำ (3 เลนขวามือ)



7. **สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ** : ได้สารพันธุกรรม (Total RNA - อาร์เอ็นเอรวม) จากใบพืชทดลองควบคุมอายุสองสัปดาห์ที่ให้น้ำปกติ (untreated) และ งดให้น้ำ (treated) ที่สภาวะกำหนด (ขาดน้ำ 24 ชั่วโมง) โดยใช้วิธีการ PCR อิงไพรเมอร์ควบคุมเอซีพีด้วยการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอกับไพรเมอร์จำนวน 20 ไพรเมอร์ (ACP-based primers) มาใช้ในการหาการแสดงออกของแถบซีดีเอ็นเอที่ปรากฏ เพื่อทำการโคลนนิ่ง และหาลำดับเบส และเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูลชีวภาพสากล ผลการทดลองให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง ระหว่างใบข้าวโพดภายใต้สองสภาวะได้แก่ ให้น้ำปกติ (control) และสภาวะขาดน้ำ (treated) ผลจากการศึกษานี้ อาจนำมาใช้ในการเปรียบเทียบกับยีนที่ปรากฏที่ได้จากการออกแบบไพรเมอร์ยีนจำนวน 6 ยีน ที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ (ในการ

ทดลองการศึกษาการแสดงออกของกลุ่มยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในระดับอาร์เอ็นเอในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ) เพื่อนำมาใช้ในการเปรียบเทียบยีนทนแล้งที่ปรากฏกับพืชที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ และเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดต่อไป

8. สรุปเนื้อหา สาระสำคัญของผลงาน และข้อเสนอแนะใน งานวิจัยเรื่องนั้นๆ ในอนาคต

9. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : ผลงานที่สิ้นสุดสามารถนำไปประโยชน์ ได้ดังต่อไปนี้

1. พัฒนาต่อในการปรับปรุงพันธุ์พืช
2. เป็นผลงานทางวิชาการ
3. ตีพิมพ์เผยแพร่ทางวิชาการได้

10. ขอบคุณ (ถ้ามี) : คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ กรมวิชาการเกษตร ที่อนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 สำหรับนำมาใช้ในการวิจัยในครั้งนี้

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. 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.

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, 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. & 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.

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.

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, 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.

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