รายงานเรื่องเต็ม ผลการทดลองสิ้นสุด ปีงบประมาณ 2560

1. **แผนงานวิจัย** : แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

2. **โครงการวิจัย** : โครงการการวิจัยการค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การถ่ายยีน ERD15 ที่อยู่ในรูป RNAi เข้าสู่พืชต้นแบบ (ยาสูบ) และศึกษาการแสดงออกของยีน

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : ERD15 gene transformation in the form of RNAi into the model plant (tobacco) and gene expression study.

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง นายพยุงศักดิ์ รวยอารี **สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน นางสาวอรุโณทัย ซาววา **สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

นางสาวภรณี สว่างศรี **สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ **สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. **บทคัดย่อ** :

บทคัดย่อ

ปัจจุบัน พืชประสบปัญหาสภาวะขาดน้ำจากสภาวแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เทคโนโลยี RNA interference (RNAi) ได้ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มคุณสมบัติของพืชให้มีลักษณะทนแล้งโดยใช้ยีนทนแล้งต่างๆ งานวิจัยนี้ได้ออกแบบเวคเตอร์ pRNAi-GG plant expression vector ที่ประกอบด้วยยีน ERD15 ในทิศทาง sense และ antisense ที่ประกอบด้วยยีนอินทรอน pdk คั่นกลาง และ ยีน ccdB (lethal gene) ถูกแทนที่ด้วย ERD15 โดยอาศัยวิธีการ One tube restriction-ligation method เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ BsaI และเชื่อมต่อด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase ตามวิธีการของ Pu Yan et al. 2012 ออกแบบและสังเคราะห์ยีน ERD15 ให้มีขนาดเท่ากับ 609 คู่เบส เติมจุดตัด BsaI ที่ด้านปลาย 5’ และ 3’ ของยีน บนพลาสมิดเวคเตอร์ pRNAi-GG (Golden gate vector) ที่ประกอบด้วยตำแหน่งไพรเมอร์จำเพาะเพื่อใช้ในการคัดเลือกทรานส์ฟอร์แมนส์และโครงสร้าง RNAi ที่

ได้ประกอบด้วยทั้ง CaMV35S promoter และ Nos terminator ศึกษาควบคุมการทำงานของยีนในลักษณะการยับยั้งการทำงานของยีน ERD15 (gene silencing) เมื่อ ccdB lethal gene ถูกแทนที่ด้วยยีน ERD15 ทั้งทิศทาง sense และ antisense ตรวจสอบผลการแทรกแซงของยีน ERD15 ในคอนส์ตรักส์ โดยการหาลำดับเบสและโดยการใช้ไพรเมอร์จำเพาะทิศทาง ผลการทดลองพบว่า ได้ยีน ERD15 ที่อยู่ใน pRNAiGG+ERD15 จำนวน 100% (12 โคโลนี จาก 12 โคโลนี) จากนั้นถ่ายฝากพลาสมิด pRNAi-GG ที่ประกอบด้วยยีน ERD15 (pRNAi+ERD15 construct) เข้าสู่คอมพิเทนต์เซลล์ *E. coli* เพื่อเพิ่มจำนวน โดยวิธี Electroporation ผลจากการตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนส์ พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของ ERD15 มีลำดับเบสคล้ายคลึงอย่างสูงกับ ERD15 ของ *Arabidopsis thaliana* และได้ ihpRNAi+GG คอนส์ตรักส์ที่ประกอบด้วยยีน ERD15 ทั้งทิศทาง sense และ antisense ที่ถูกต้อง ทำการทดลองระหว่างปี 2559 ถึง 2560 ณ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จากนั้น ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นยาสูบ เพื่อทำการถ่ายฝากยีน ERD15 โดยอาศัยวิธีการ Agrobacterium transformation เข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียม ElectroMAX LBA4404 และ A10460 ผลการทดลองในเบื้องต้น พบว่า ทรานส์ฟอร์แมนส์ที่ถ่ายฝากเข้าสู่เชื้อ Agrobacterium A10460 ได้ค่อนข้างสูง ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎี โดย A10460 มีคุณสมบัติต้านทานต่อยีน ccdB แต่ประสิทธิภาพการการถ่ายฝากยีน ERD15 เข้าสู่ต้นพืชยาสูบค่อนข้างต่ำเมื่อใช้ LBA4404 โดยทรานส์ฟอร์แมนส์ไม่สามารถเติบโตเป็นแคลลัสได้ จากการถ่ายฝากยีน แต่การทดลองควบคุม (control experiments) โดยอาศัยใบของต้นยาสูบ ประสบความสำเร็จ 100% สรุปได้ว่า ต้องศึกษาโดยใช้ Agrobacterium สายพันธุ์อื่นๆ พร้อมกับทำการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายฝากยีน ERD15 ในรูปพลาสมิด ihpRNAI+GG ด้วยวิธี ELECTRO agrobacterium transformation เพื่อให้ได้ต้นยาสูบที่ประกอบด้วยยีน ERD15 เพิ่มเติมต่อไป

Abstract

RNA interference (RNAi) of ERD15 gene has largely been used to study abiotic stress such as drought tolerance trait. Plasmid pRNA-GG plant expression vector comprising ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15) has been designed by GeneArtGene synthesis and RNAi silencing method according to Restriction-ligation method of Pu Yan et al., 2012. pRNAi-GG (Golden gate vector) contains both ccdB lethal genes and 5’ and 3’ end, pdk introns and primers-flanking sites for

transformant screening in its constructs. In this experiment, the full-length of synthesized ERD15 cDNA is 609 bp with BsaI restriction sites at 5' and 3' ends. The resulted ERD15 protein shares high protein amino acid similarity with ERD15 of *Arabidopsis thaliana* in the database. Then, the construct was transformed into *E. coli* electrocompetent cells for amplification. The results showed that a 100% of the transformants was shown. Furthermore, ERD15 gene was successfully transformed for analysis of the growth of transgenic plants into tobacco plants by agrobacterium-mediated transformation using both agrobacterium strains, LBA4404 and A10460. The results showed that the resulted transformants examined could not be grown onto the MS media+cefotaxim+kanamycin using agrobacterium LBA4404 strain comprising ccdB lethal gene and pdk intron in between. In constrast, the thransformants was able to grow on Agrobacterium A10460 lacking ccdB lethal gene. Our result indicated that the pRNAi-GG+ERD15 plasmid vector was successfully constructed for further analysis but further transformation using the different agrobacterium strains needed to be used for success plant transformation.

6. คำนำ :

ปัจจุบัน เป็นที่ทราบกันดีว่าอุณหภูมิของโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอันเนื่องมาจากกิจกรรมของมนุษย์ทั้งภาคเกษตรกรรมและภาคอุตสาหกรรม จำนวนประชากรมนุษย์ที่เพิ่มสูง จำนวนพื้นที่เพาะปลูกหรือภาคการเกษตรที่ลดลงเพื่อใช้ในกิจกรรมอย่างอื่นที่ไม่ใช่ภาคเกษตร บวกกับเทคโนโลยีใหม่ๆที่มนุษย์สร้างขึ้น ทำให้โลกต้องประสบกับปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นในชั้นบรรยากาศ (ชั้นบรรยากาศบางลง) บวกกับปัจจัยอื่นๆ เช่น รังสี ความเค็ม และความเครียดอื่นๆที่ส่งผลต่อพืช (Levitt, 1980) ทำให้เป็นที่คาดการณ์กันว่า มนุษย์ต้องเผชิญกับภาวะโลกร้อน ภาวะเรือนกระจกหรือสภาพการเปลี่ยนแปลงของภูมิอากาศ (climate change) อย่างมากในอนาคตอันใกล้และปัจจุบันได้เกิดขึ้นแล้ว (Sun *et al*., 2014) โดยจะส่งผลกระทบต่อทั้งธรรมชาติและมนุษย์ ปัจจุบันผลที่เกิดจากภาวะโลกร้อนได้ทำให้มนุษย์เห็นแล้วว่าส่งผลกระทบและมีความสำคัญอย่างแท้จริง เช่น ทำให้สภาพแวดล้อมของโลกเปลี่ยนแปลงไป เช่น ฝนตกไม่ถูกต้องตามฤดูกาล พืชเกิดสภาวะขาดน้ำจากภาวะโลกร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในภาคการเกษตร พืชต้องประสบกับปัญหาภัยแล้งในบางฤดูกาล เพราะฝนไม่ตกตามช่วงเวลาที่เหมาะสม ทำให้พืชประสบปัญหาภัยแล้ง และพืชบางพันธุ์อ่อนแอต่อสภาวะขาดน้ำ โดยสภาวะขาดน้ำนี้เป็นปัญหาที่พบได้ทั่วไป ทำให้พืชมีปริมาณน้ำในเซลล์ลดลง ความต่าง

ศักย์ของน้ำในเซลล์ลดลง สูญเสียความดันน้ำในเซลล์ ปากใบปิดน้อยลงทำให้เกิดการสูญเสียน้ำและท้ายสุดทำให้พืชมีการเจริญเติบโตลดลง และเกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านการแสดงออกของยีนและขบวนการเมตาบอลิซึม (Shinozaki *et al*., 2007) โดยทั่วไปแล้ว พืชจะมีการแสดงออกของยีนในสภาวะขาดน้ำเป็นสองช่วง คือ ในช่วงที่ขาดน้ำ (dehydration) และช่วงระยะเริ่มต้น (early responsive to dehydration) ทำให้เกษตรกรสูญเสียรายได้เพราะปริมาณพืชที่คาดหวังภายหลังการเพาะปลูกลดลง ทั้งมีสาเหตุมาจากไม่สามารถเพาะปลูกพืชได้ตามที่ต้องการหรือสูญเสียผลผลิตพืชที่ได้เพาะปลูกไป (yield loss) กล่าวโดยทั่วไปว่า ภัยแล้งจัดเป็นปัญหาทางกายภาพที่สำคัญที่สุดที่ทั่วโลกเผชิญ และทำให้การปรับปรุงพันธุ์ประสบความยากลำบากและท้าทาย (Cattivelli *et al*., 2008) เท่าที่ผ่านมา นอกเหนือจากวิธีการทางภาคเกษตรตามปกติแล้ว ได้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว โดยการพัฒนาพืชให้มีความทนทานแล้ง ทนต่อสภาวะขาดน้ำ หรือทนต่อสภาวะเครียดในช่วงการเพาะปลูกได้ (drought stress tolerance) โดยการศึกษาหายีนทนแล้งต่างๆ และนำยีนต่างๆ เหล่านั้นเข้าสู่จีโนมของพืชที่ต้องการให้มีสรีรวิทยาตามต้องการ อย่างไรก็ตาม การศึกษาตามวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพดังกล่าว ต่างให้ผลลัพธ์ที่แตกต่างกันออกไป เช่น ระดับการตอบสนองต่อการขาดน้ำหลังการได้รับยีนที่ผันแปรไปตามแต่ละชนิดยีนหรือชนิดพืช เป็นต้น อีกทั้งในด้านความซับซ้อนของการตอบสนองของสภาวะขาดน้ำ ทำให้การระบุหายีนที่มีผลต่อความทนทานต่อการขาดน้ำนั้นเป็นเรื่องยาก

ยีน ERD (Early Responsive to Dehydration) จัดอยู่ในประเภท gene family เป็นยีนที่ถูกกระตุ้นอย่างรวดเร็วในช่วงขาดน้ำ (Kiyosue *et al*., 1994) และพบมีความเป็นอนุรักษ์ในพืชทุกชนิด (conserved) จากการศึกษาโปรตีน ERD4 ในวัชพืชอะราบิดอบซิส *(Arabidopsis thaliana)* พบว่า ERD เป็นโปรตีนประเภท Integral membrane protein พบที่บริเวณเยื่อหุ้มคลอโรพลาสต์ (chloroplastic envelop membrane) เป็นโดเมนที่ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด (unknown function) (Froehlich *et al*., 2003)

ที่ผ่านมา การศึกษายีน ERD15 ใน Arabidopsis พบว่าการทำให้ยีนมีการแสดงออกที่สูงมากเกิน (overexpression) เป็นสาเหตุให้เกิดการตอบสนองของวิถีทนทานต่อสภาวะขาดน้ำที่วิถี (pathway) ที่ต้องอาศัย ABA และ SA (abscisic acid และ salicylic acid (SA)-dependent pathway) โดยทำให้การตอบสนองของ ABA ลดลง มีผลทำให้ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรม (transgenic plant) เกิดความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำลดลงและไม่สามารถที่จะเพิ่มความทนทานต่อสภาวะเย็นจัดเมื่อถูกให้ด้วยฮอร์โมนได้ ในทางตรงกันข้าม การสูญเสียการทำงานของ ERD15 อันเนื่องมาจากภาวะ gene silencing ทำให้เกิดภาวะ hypersensitivity ต่อ ABA และทำให้พืชที่ไม่มีการแสดงออกของยีน (silenced plants) ดังกล่าว แสดงความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำและสภาพเย็นจัดได้ (Kariola *et al*., 2006)

แม้ว่าการศึกษาเกี่ยวกับยีนทนแล้งจะมีอยู่ก็ตาม แต่ก็มีอยู่อย่างจำกัด ส่วนมากเป็นรายงานการศึกษาจากต่างประเทศ ด้วยเหตุนี้ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการหาหน้าที่ของยีน ERD15 ในสภาวะที่เกิด gene silencing ที่มีผลในเชิงสรีรวิทยาต่อการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำของพืชต้นแบบ (ยาสูบ) ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อการได้มาซึ่งข้อมูลในด้านความทนแล้งและกับการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในประเทศต่อไปในอนาคต

พืชมีการปรับตัวทางสรีระวิทยาให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เพื่อให้ตัวมันเองปรับตัวและมีความอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมนั้นๆได้ เช่น ขาดน้ำหรือแห้งแล้งเป็นต้น การปรับตัวของพืชให้มีการพัฒนาหรือให้เป็นไปตามปกติหรือคงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมดังกล่าวนั้น ต้องมีการแสดงออกของยีนบางชนิด ซึ่งอาจเป็นยีนเดียวหรือกลุ่มยีนส์ (ยีนหลายๆ ชนิดพร้อมกันในสภาวะเดียวกัน) จึงจะทำให้พืชมีการดำรงอยู่ในสภาวะนั้นๆ ได้หรือเกิดความเสียหายน้อยที่สุด ที่ผ่านมา นักวิจัยได้ศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในพืช เพื่อให้พืชเกิดการปรับตัวให้คงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี ในปัจจุบัน ข้อมูลยีนหรือกลุ่มยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในสภาวะขาดน้ำหรือแห้งแล้งที่ได้จากค้นคว้าวิจัยมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้การนำข้อมูลที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะทนแล้งโดยอาศัยวิธีการเทคโนโลยีชีวภาพนั้นมีความเป็นไปได้มากขึ้น อีกทั้ง จากการศึกษาที่ผ่านมา มีข้อมูลที่แสดงให้เห็นชัดแล้วว่า อุณหภูมิของโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกๆ ปี และพบว่าพืชมีการแสดงออกของยีนที่จำเพาะบางชนิด เพื่อที่จะตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเช่นขาดน้ำหรือแห้งแล้งได้

ในประเทศไทย พืชข้าวโพดนับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมากและพบข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งในประเทศอีกด้วย นับเป็นฐานพันธุกรรมในเชิงวิจัยได้เป็นอย่างดี รวมทั้งข้าวโพดเป็นพืชที่มีประโยชน์ทั้งด้านบริโภคและด้านงานวิจัย ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อถ่ายฝากยีน ERD15 ที่อยู่ในรูป RNAi เข้าสู่พืชต้นแบบ และเพื่อศึกษาระดับความทนแล้งของพืชต้นแบบ (ยาสูบ) ภายหลังการถ่ายฝากยีน ERD15 เพื่อนำข้อมูลที่ได้นั้นมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีคุณลักษณะทนแล้งได้ต่อไปในอนาคต ทำให้งานวิจัยนี้สามารถให้ข้อมูลในรูปยีนที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรของประเทศไทยได้

7. วิธีดำเนินการ :

อุปกรณ์

1.สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในงานโมเลกุลชีววิทยา

-TAE, TBE Buffers

- Molecular markers เช่น 1kb DNA ladders, 600 bp DNA laddersPlasmid DNA miniprep kit

-BsaI restriction enzyme, T4 DNA ligase

2. เมล็ดพันธุ์พืชที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เมล็ดยาสูบพันธุ์เวอร์จิเนีย

3. จุลินทรีย์ พลาสมิดและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- plasmid pRNAi-GG expression vector (golden gate vector) Genbank Accession Number : JQ085427 และมี pBI121 เป็นเวคเตอร์โครงสร้าง (skeletal vector structure)

- Stellar Electrocompetent cells (Invitrogen, USA)

- เชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ LBA4404 (Cat. No. A10460, Invitrogen)

- DH5alpha competent cells

- Plasmid DNA miniprep kit, Stellar Electrocompetent cells, Specific Gene Primers, PCR Kit, PCR purification kit,BsaI restriction enzyme (NEB) DNA extraction kit,

3. ไพรเมอร์

- M13 Forward and M13 Reverse เพื่อใช้สำหรับตรวจสอบทิศทางคอนส์ตรักส์

- Specific Gene Primers (P21, P22, P23, P24 และ P25) (Yan, Pu et al., 2015)

4. เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ

- ไมโครไปเปต ที่ใช้กับทิปขนาด 10 20 200 1000 ไมโครลิตร

- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystem)

- อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (Water bath)

- เครื่องรันเจลหรือแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าขนาดเล็ก (gel electrophoresis)

- เครื่องถ่ายภาพ (Gel documentation)

- กระดาษถ่ายภาพ (film)

- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Cold minicentrifugation)

- เครื่องอ่านลำดับเบสและโปรแกรมวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencers)

- ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- Electroporator

วิธีการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูลยีน ERD15 ของพืชชนิดต่างๆ ในฐานข้อมูลชีวภาพสากล

สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน ERD15 จากฐานข้อมูลชีวภาพสากล NCBI เพื่อใช้ในการออกแบบส่วนของยีน ERD15 ที่สามารถซับโคลนเข้าสู่พลาสมิดเวคเตอร์ pRNAi+GG (Expression Golden gate vector)

2. ออกแบบไพรเมอร์ 5'-accaggtctcaggag-gene ERD15 forward specific primers-3'

3. ออกแบบไพรเมอร์ 5'-acca ggtctc atcgt-gene ERD15 specific reverse primers-3'

4. ทำการสังเคราะห์ยีน ERD15 ที่มีปลาย 5' และ 3' เชื่อมต่อด้วยเอนไซม์ BsaI (GeneArt GeneSynthesis, Invrtrogen, USA) ขนาด 609 bp *Bsa*I restriction site (GGTCTC) เพราะฉะนั้น ปลาย 3' ไป 5' ของ BsaI คือ CCAGAG ตัด DNA ด้วยเอนไซม์ *Bsa*I และ พลาสมิดดีเอ็นเอ pRNAi+GG ด้วยเอนไซม์ *Bsa*I และเชื่อมต่อเข้ากันด้วย T4 DNA ligase ในหลอดเดียว (single tube reaction หรือ one tube reaction จากนั้น ทำการ transformation เข้าสู่ DH5 alpha หรือ Stellar Electrocompetent Cell เพื่อเพิ่มขยายจำนวน

One tube reaction

50 ng PCR product หรือ <u>ERD gene fragment synthesis</u> (Template DNA)

200 ng <u>Vector plastmid DNA (pRNAi-GG vecter)</u>

5 Units *Bsa*I Enzyme (NEB)

10 Units T4 DNA ligase (Promega, High concentration 20U/ul)

1x Ligation buffer

Total <u>10</u> ul

บ่มปฏิกิริยานาน 37 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง ต่อด้วย 5 นาทีที่ 50 องศาเซลเซียส 8 นาที ที่ 80 องศาเซลเซียส (Heat inactivation) ทรานส์ฟอร์มด้วย stellar electrocompetent cells, Invitrogen โดยการเพลทจานเพาะเชื้อ LB Medium + 25 mg/L คานามัยซิน และ 5ug/L คลอแรมเฟนิคอลเพื่อคัดเลือกรีคอมบิแนนต์ ตรวจสอบด้วย PCR และ DNA sequencing
ใช้ไพรเมอร์ P21 P22 P23 P24 และ P25 ตาม Pu Yan et al., 2012

5. ซับโคลนยีน (gene subcloning) ERD15 ขนาด 609 bp ที่สังเคราะห์ได้ เข้าสู่คอมพิเทนต์เซลล์ *E. coli* Stellar Electrocompetent cell หรือ DH5 alpha เพื่อเก็บไว้เป็นแบคทีเรียลสต๊อค ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ตามคู่มือผู้ผลิต

6. ตรวจสอบความถูกต้องของยีน ERD15 ตามตำแหน่งจุดตัดเอนไซม์ (restriction sites) เช่น ด้วยการใช้เอนไซม์ BsaI และด้วยการหาลำดับเบส (sequencing) เปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับ Similarity Blast search ก่อนทำการตัดต่อเข้าสู่พลาสมิด RNAi vector (pRNAi vector)

7. เตรียมยีนและพลาสมิดในรูป RNAi (pRNAiGG + ERD15) หรือที่เรียกว่า พลาสมิดคอนส์ตรักส์ pRNAiGG+ERD15 Constructs ทำการทรานส์ฟอร์ม พลาสมิดคอนส์ตรักส์เข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (Stellar Electrocompetent cells) ด้วยวิธีการยิงยีน ที่สภาวะ 2-2.5 K, 25 µF 200 โอห์ม บนอาหาร และ ตรวจสอบรีคอมบิแนนต์ (recombinants) ด้วยวิธีการหาลำดับเบส (5 คู่ไพรเมอร์) ตามขั้นตอนดังนี้

1. นำ competent cells ของเชื้อ *A. tumefaciens* จาก – 80 องศาเซลเซียส มาละลายในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที
2. นำพลาสมิด pRNAiGG + ERD15 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาใส่ลงในหลอด competent cells ผสมกันให้เข้ากัน เบาๆ
3. วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 15 - 30 นาที
4. ดูดส่วนผสมที่ได้จากข้อ 3 มาใส่ลงใน cuvette ขนาด 0.2 ซม. จากนั้น เคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยใช้สภาวะ (conditions) ตามคำแนะนำของบริษัท / คู่มือผู้ผลิต (Biorad- Gene Pulser) ดังนี้
    a. Cuvette 0.2 cm
    b. Voltage 2.5 kV
    c. Capacity 25 µF
    d. Resistance 360 – 480 โอห์ม
5. ก่อน pulse เช็ด cuvette ให้แห้ง อย่าให้มีฟองอากาศเด็ดขาด
6. หลัง pulse แล้ว เติมอาหาร YEP (ไม่เติมปฏิชีวนะ) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
7. แล้วย้ายส่วนผสมลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ
8. วางไว้บนน้ำแข็งนาน 30 นาที
9. แล้วไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

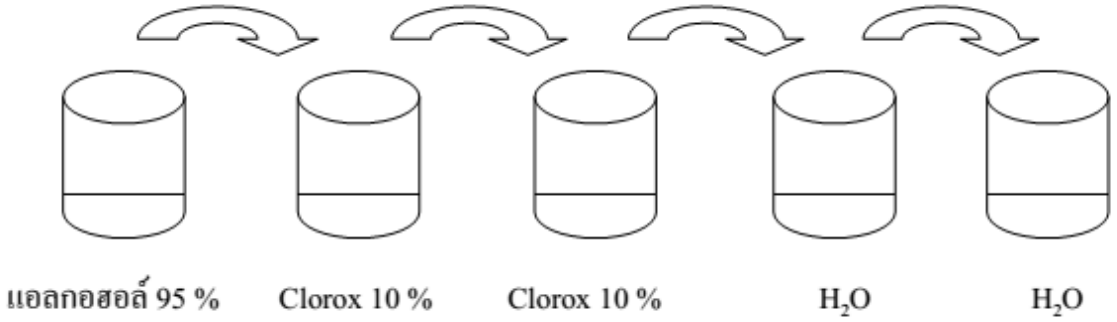
10. เขย่าที่ความเร็ว 220 rpm เป็นเวลา 2 ถึง 3 ชั่วโมง
11. ตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เทอาหารเหลวทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ YEP ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
12. Spread plate บนอาหารแข็ง + *rifam* YEP (control) + rifam และบนอาหารแข็ง YEP + *rifam* + kanamycin เพลทละ 80 ไมโครลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 2 -3 วัน
13. นำโคโลนีที่เจริญ เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มาตรวจสอบหายีนด้วย ไพรเมอร์ Forward และ Reverse primers (colony PCR)

8. เตรียมต้นยาสูบด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

8.1 การเพาะเมล็ดยาสูบ

<u>วัสดุอุปกรณ์</u>

1.ขวดพร้อมอาหาร MS Murashige and Skoog
2.ขวดอาหารเปล่า
3.Clorox 10 %
4.ปากคีบ
5.จานอาหาร (Plate) พร้อมกระดาษทิชชู่
6.ผ้าขาวบาง
7.แอลกอฮอล์ 95 %
8.น้ำ ที่ Autoclave แล้ว
9.ตะเกียงแอลกอฮอล์
10.เมล็ดยาสูบ



<u>ขั้นตอนการปฏิบัติ</u> (ทุกอย่างทำในตู้ปลอดเชื้อ)

1.ห่อเมล็ดยาสูบด้วยผ้าขาวบาง
2.เตรียมขวดตามลำดับ
3.นำปากคีบลนไฟที่ตะเกียงแอลกอฮอล์ ทิ้งไว้ให้เย็น
4.ใช้ปากคีบ คีบห่อเมล็ดยาสูบลงไปในขวดที่เตรียมไว้

5.ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95 % 5 นาที เขย่าขวดด้วยมือ
6.ล้างด้วย Clorox 10 % ครั้งละ 10 นาที 2 ครั้ง เขย่าขวดด้วยมือ
7.ล้างด้วย H_2O ครั้งละ 5 นาที 2 ครั้ง เขย่าขวดด้วยมือ
8.ใช้ปากคีบ คีบห่อเมล็ดยาสูบออกจากขวด วางลงในจานอาหาร (Plate) ที่มีกระดาษทิชชู่ เพื่อซับน้ำ
9.เปิดผ้าขาวบางออก ผึ่งเมล็ด
10.นำปากคีบ คีบเมล็ดวางบนขวดอาหาร MS
11.ปิดฝาขวดวางในที่ควบคุมแสงและอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
12.เมล็ดใช้เวลางอก 1 เดือน
13.ทำการย้ายใส่ขวดอาหารใหม่ เพื่อลดการปนเปื้อน จากขวดเพาะเมล็ดที่ไม่งอก
14.รอจนต้นยาสูบโต แล้วทำในขั้นตอนต่อไป
หมายเหตุ :1. ปากคีบต้องลนไฟและทิ้งไว้ให้เย็นทุกครั้ง
2. ก่อนเปิดและปิดฝาขวด ต้องลนไฟที่คอขวดทุกครั้ง

15. เตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ซึ่งมี origin of replication ต่ำกว่า E. coli เพื่อเตรียมไว้ใช้ในการถ่ายฝากยีนด้วยวิธีการ Electrotransformation

16. ถ่ายฝากยีนด้วยวิธีการ ยิงยีน (ELEXTROMAX LBA4404) และตรวจสอบการถ่ายฝากยีน เปรียบเทียบกับการทำเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ไม่ได้ทำการถ่ายฝากยีน (control)

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลาทำการทดลอง ตุลาคม 2559 – กันยายน 2560 (1 ปี)

สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 การโคลนชิ้นยีน ERD15 โดยการออกแบบและสังเคราะห์ยีนเข้าสู่เวคเตอร์ pUC19 โดยได้ชิ้นยีน ERD15 Fragment จากการออกแบบและสังเคราะห์ (ORF 609 คู่เบส) เพื่อโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pUC19 และถ่ายฝากเข้าสู่ Stellar Electrocompetent cells เพื่อเพิ่มขยายจำนวน โดยได้ออกแบบไพรเมอร์ที่ด้านปลาย 5’ (5’-end) ที่เติม protective bases-adapters สำหรับ pRNAi-GG (5’-protective abases adapters -BsaI- ORF (ERD open reading frame)–BsaI -Protective bases adapters - 3’) (ภาพที่ 1) ตามด้วย gene specific sequences-3’ ที่ปลาย 3’ (3’ -end) (ภาพที่ 2)

ได้ผลดังต่อไปนี้

5-BsaI-
ATGGCGTTAGTTTCAGGAGGAAGGTCGACACTGAATCCGAATGC
ACCTCTTTTCATCCCGTCTTATGTGCGTCAAGTGGAGGACTTTTCA
CCCGAATGGTGGAATTTGGTGACAACTTCGACATGGTTCCATGAT
TATTGGACGAGGCAGCATCAAGGAGAGGAATATGGCGATGATGC
TTTTGGTTTTACTGGGAATGATGTTGCTGACTTGCTTCCCGAAAAT
ATCGATCTTGATGTTGATGAAGATATTTTGAACATGGAAGCTCAGT
TTGAAGAATTCCTCCAATCATCTGAAAGTGAACAACAAGGAATCA
AGTCATCACCCTATGGTATCAGTGGTATGCTTCTATTTGGTATATAT
CTCCATTATCTTACAATTATAGTCATGATAGTGATAGAGCCACAAAT
TTATACTAGGGGATTCAAAAGTATACTGACCAAGGGTTCGGAGGC
ACTCGTAAGGACACTGAGCATATCAAAGGGGCCAAAATCTCCCAT
TGAGCCACCAAAGTACTATGAGAAACCAGCAAAGATTGTTAGCC
CAAAGAACAGCCTTCGCCGCATCCAGCAACCTCGCTAA-BsaI-3'

ภาพที่ 1 แสดงลำดับเบสของยีน ERD15 ที่เติมจุดตัดเอนไซม์ BsaI ที่ด้านปลาย 5' และ 3'

-IhpRNAiERD15 construct

5'-ACCA <u>GGT CTC</u> AGGAG

ATGGCGTTAGTTTCAGGAGGAAGGTCGACACTGAATCCGAATGCACCTCTTTTCATCCCGTCTTATGTGC

GTCAAGTGGAGGACTTTTCACCCGAATGGTGGAATTTGGTGACAACTTCGACATGGTTCCATGATTATTG

GACGAGGCAGCATCAAGGAGAGGAATATGGCGATGATGCTTTTGGTTTTACTGGGAATGATGTTGCTGA

CTTGCTTCCCGAAAATATCGATCTTGATGTTGATGAAGATATTTTGAACATGGAAGCTCAGTTTGAAGAA

TTCCTCCAATCATCTGAAAGTGAACAACAAGGAATCAAGTCATCACCCTATGGTATCAGTGGTATGCTTC

TATTTGGTATATATCTCCATTATCTTACAATTATAGTCATGATAGTGATAGAGCCACAAATTTATACTAGG

GGATTCAAAAGTATACTGACCAAGGGTTCGGAGGCACTCGTAAGGACACTGAGCATATCAAAGGGGCCA

AAATCTCCCATTGAGCCACCAAAGTACTATGAGAAACCAGCAAAGATTGTTAGCCCAAAGAACAGCCTTC

GCCGCATCCAGCAACCTCGCTAA ACGAT<u>GAGACC</u>TGGT-3'

ERD15 gene from *Nicotiana tabacum*

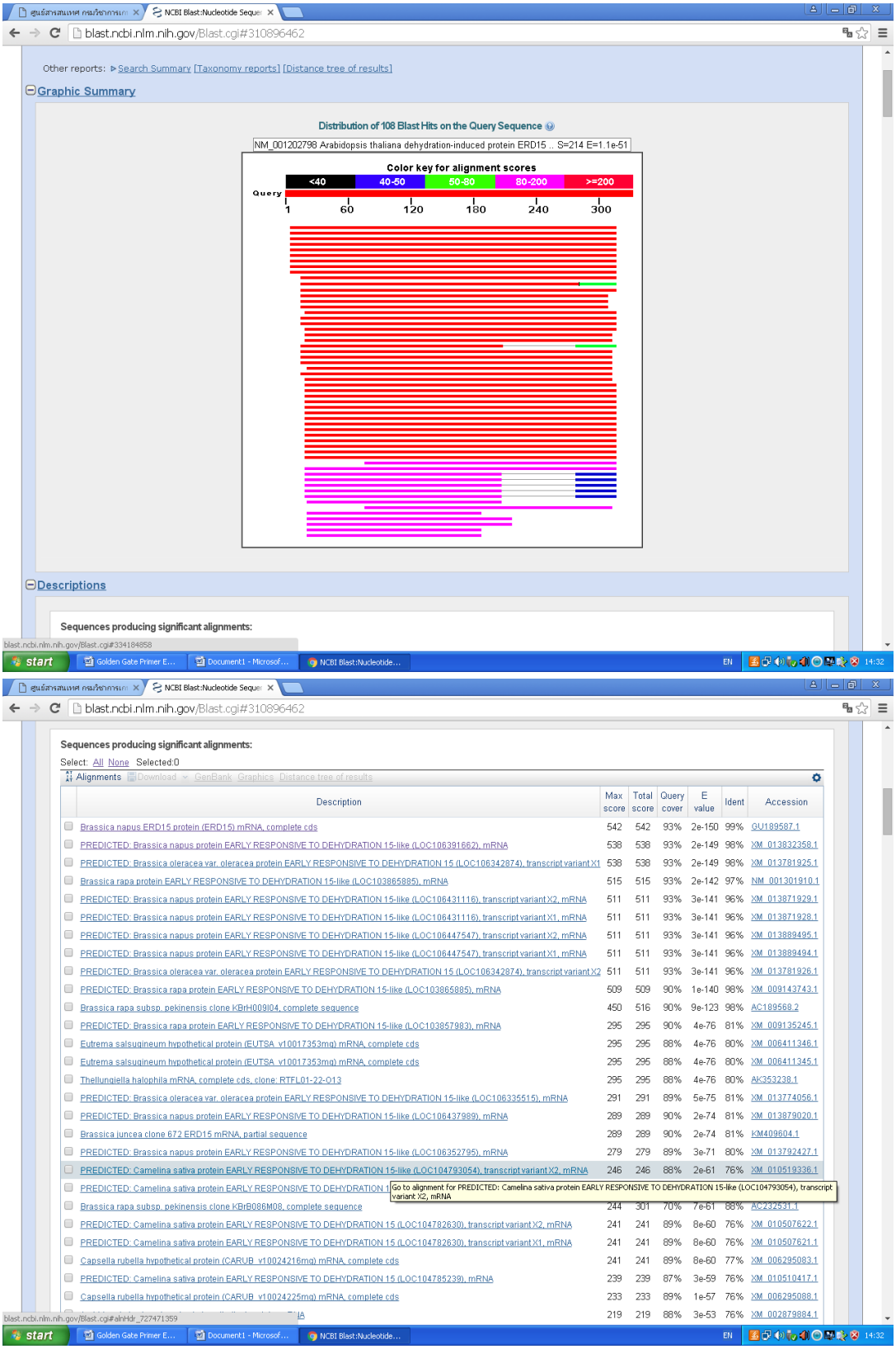
ERD15 gene from *Nicotiana tabacum* (GenBank Accession Number XM013594122 1.) Full-length ORF (587 bp)

5'ACCAGGTCTCAGGAG–
ATGGCGTTAGTTTCAGGAGGAAGGTCGACACTGAATCCGAATGCACCTCTTTTCATCCCGTC
TTATGTGCGTCAAGTGGAGGACTTTTCACCCGAATGGTGGAATTTGGTGACAACTTCGACAT
GGTTCCATGATTATTGGACGAGGCAGCATCAAGGAGAGGAATATGGCGATGATGCTTTTGGT
TTTACTGGGAATGATGTTGCTGACTTGCTTCCCGAAAATATCGATCTTGATGTTGATGAAGA
TATTTTGAACATGGAAGCTCAGTTTGAAGAATTCCTCCAATCATCTGAAAGTGAACAACAAG
GAATCAAGTCATCACCCTATGGTATCAGTGGTATGCTTCTATTTGGTATATATCTCCATTAT
CTTACAATTATAGTCATGATAGTGATAGAGCCACAAATTTATACTAGGGGATTCAAAAGTAT
ACTGACCAAGGGTTCGGAGGCACTCGTAAGGACACTGAGCATATCAAAGGGGCCAAAATCTC
CCATTGAGCCACCAAAGTACTATGAGAAACCAGCAAAGATTGTTAGCCCAAAGAACAGCCTT
CGCCGCATCCAGCAACCTCGCACGATGAGACCTGGT-3'

```
GGTCTC          5'-GGTCTC-3'
||||||            ||||||
CCAGAG          3'-CCAGAG-5'
```

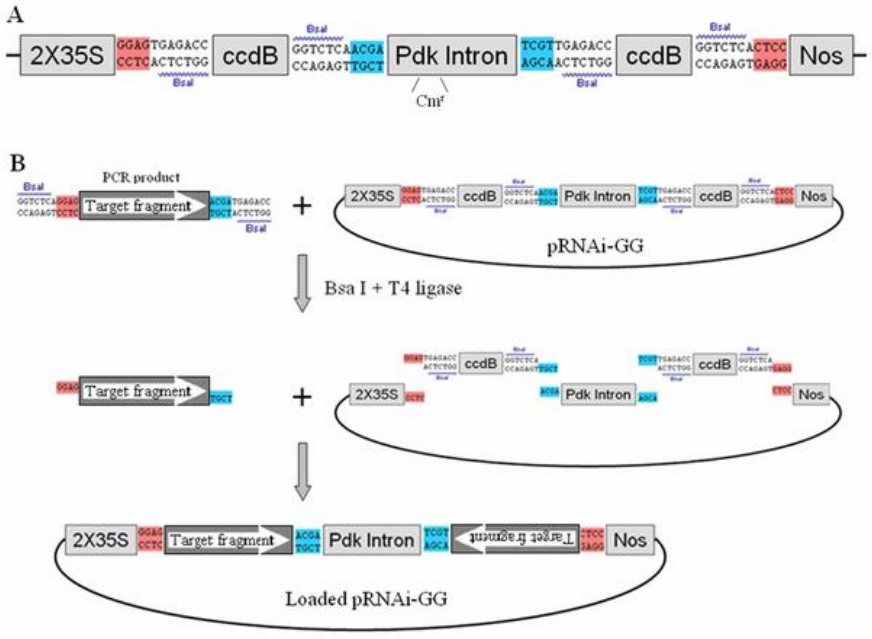
ภาพที่ 2 แสดง IhpRNAiERD15 construct ที่ประกอบด้วยลำดับไพรเมอร์ที่ด้านปลาย 5' (5'-end) และ 3' (3'end) ที่เติม protective bases-adapters สำหรับ pRNAi-GG (5'-protective abases adapters -BsaI- ORF (ERD open reading frame)–BsaI -Protective bases adapters - 3') ทั้งนี้ BsaI มีจุดตัด GGTCTC

เมื่อทำการหาลำดับเบสของ pRNAi คอนส์ตรักส์และเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล ได้ผลดังภาพที่ 3

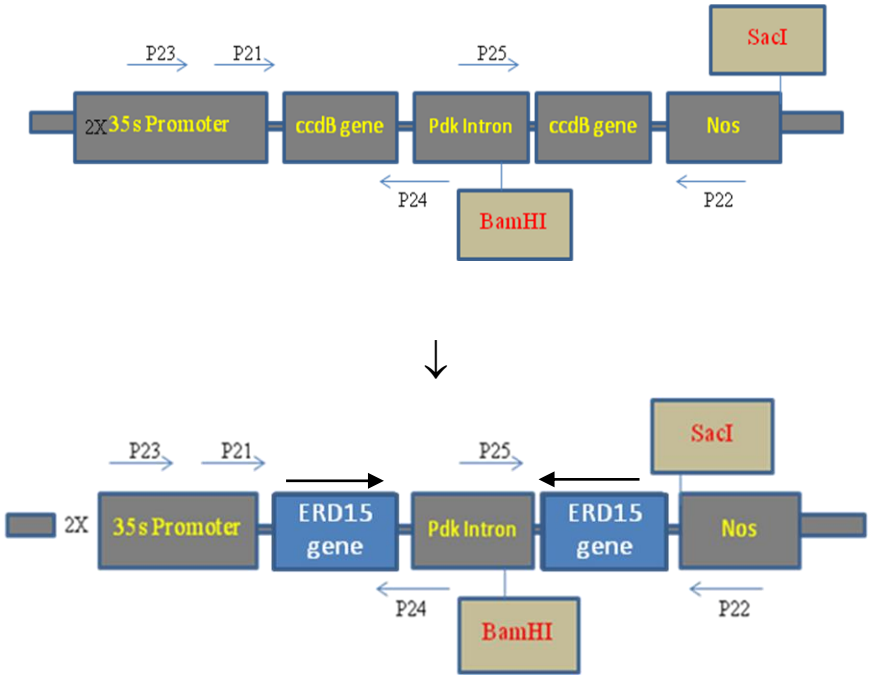


ภาพที่ 3 แสดงผลที่ได้จากการทำ blast search ระหว่าง ลำดับนิวคลิโอไทด์ของ IhpRNAiERD15 กับลำดับนิวคลิโอไทด์ของ ERD15 ในฐานข้อมูลชีวภาพสากล

8.2 การสร้างคาสเซตต์ของ pRNAiERD15 จากยีน ccdB คอนส์ตรักส์ โดย (ภาพที่ 4) แสดงคาสเซตต์หรือคอนส์ตรักส์ของ ERD15 ที่แทนที่ ccdB lethal gene ในทิศทาง sense และ antisense ที่ประกอบด้วย 35s Promoter; Pdk Intron และ Nos terminator และตรวจสอบทิศทางการโคลนคาสเซตต์ของ ERD15 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (BsaI) (ภาพที่ 5)

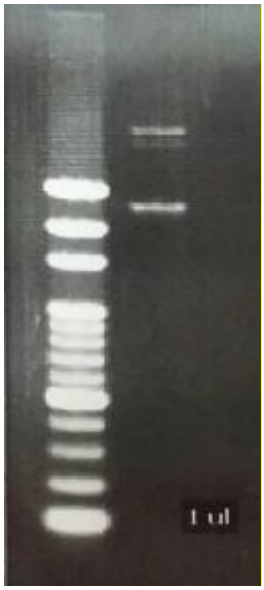


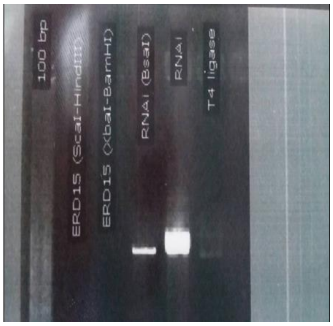
ที่มา : Yan, P. 2012.



ภาพที่ 4 แสดงแผนภาพคอนส์ตรักส์ของ ERD15 ที่แทนที่ ccdB lethal gene ในทิศทาง sense และ antisense ที่ประกอบด้วย 35s Promoter; Pdk Intron และ Nos terminator

100 bp ERD15





ภาพที่ 5 ภาพอะกาโลสเจลแสดงการเชื่อมต่อพลาสมิด pRNAi เข้ากับยีน ERD15 และการตัดพลาสมิด pRNAi+ERD15 คอนส์ตรักส์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆ

8.3 การหาลำดับเบสเพื่อยืนยันความถูกต้องของยีนและเทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล (NCBI)

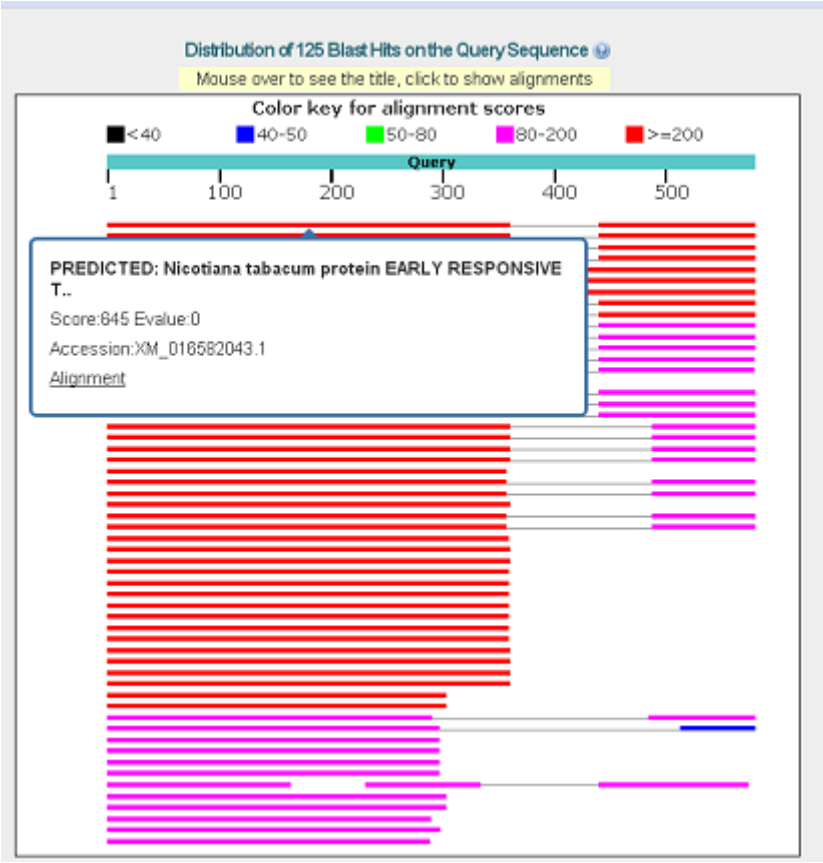
ผลการทำ blast search พบว่า match กับยีน Early responsive to dehydration ของพืช *Nicotiana tabacum* (100% identity), *Nicotiana sylvestris* (100% identity), *Nicotiana termentiformis* (95$ identity), *Capsicum annum* (90% identity), *Solanum pennelii* (83% identity) , *Solanum lycopersicum*, (83% identity), *Arabidopsis thaliana* (76% identity), *Glycine max* (70% identity) และ *Balsamifera populus* (70% identity) ตามลำดับ

ผลการหาลำดับเบสของพลาสมิด pRNAi-GG ด้วยไพรเมอร์ P22

(ก)

```
>141844_plasmid16_P22_D06
CTCTAGATCCATACCAGGTCTCAGGAGATGGCGTTAGTTTCAGGAGGAAGGTCGACACTGAATCCGAATGCACCTCTTTT
CATCCCGTCTTATGTGCGTCAAGTGGAGGACTTTTCACCCGAATGGTGGAATTTGGTGACAACTTCGACATGGTTCCATG
ATTATTGGACGAGGCAGCATCAAGGAGAGGAATATGGCGATGATGCTTTTGGTTTTACTGGGAATGATGTTGCTGACTTG
CTTCCCGAAAATATCGATCTTGATGTTGATGAAGATATTTTGAACATGGAAGCTCAGTTTGAAGAATTCCTCCAATCATC
TGAAAGTGAACAACAAGGAATCAAGTCATCACCCTATGGTATCAGTGGTATGCTTCTATTTGGTATATATCTCCATTATC
TTACAATTATAGTCATGATAGTGATAGAGCCACAAATTTATACTAGGGGATTCAAAAGTATACTGACCAAGGGTTCGGAG
GCACTCGTAAGGACACTGAGCATATCAAAGGGGCCAAAATCTCCCATTGAGCCACCAAAGTACTATGAGAAACCAGCAAA
GATTGTTAGCCCAAAGAACAGCCTTCGCCGCATCCAGCAACCTCGCACGATGAGACCTGGTATTGGATCGGATCCCGGGC
CCGTCGACTGCAGAGGCCTGCATGCAAGCTTGGTGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTC
ACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAAT
TGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGA
GAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCG
GTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGG
CCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACA
AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTC
GTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCA
TAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTCTCTAGATCATACCAGGTCTCAGG
AGATGGCGTTAGTTTCAGGAGGAAGGTCGACACTGAATCCGAATGCACCTCTTTTCATCCCGTCTTATGTGCGTCAAGTG
GAGGACTTTTCACCCGAATGGTGGAATTTGGTGACAACTTCGACATGGTTCCATGATTATTGGACGAGGCAGCATCAAGG
AGAGGAATATGGCGATGATGCTTTTGGTTTTACTGGGAATGATGTTGCTGACTTGCTTCCCGAAAATATCGATCTTGATG
TTGATGAAGATATTTTGAACATGGAAGCTCAGTTTGAAGAATTCCTCCAATCATCTGAAAGTGAACAACAAGGAATCAAG
TCATCACCCTATGGTATCAGTGGTATGCTTCTATTTGGTATATATCTCCATTATCTTACAATTATAGTCATGATAGTGAT
AGAGCCACAAATTTATACTAGGGGATTCAAAAGTATACTGACCAAGGGTTCGGAGGCACTCGTAAGGACACTGAGCATAT
CAAAGGGGCCAAAATCTCCCATTGAGCCACCAAAGTACTATGAGAAACCAGCAAAGATTGTTAGCCCAAAGAACAGCCTT
CGCCGCATCCAGCAACCTCGCACGATGAGACCTGGTATTGGATCGGATCCCGGGCCCGTCGACTGCAGAGGCCTGCATGC
AAGCTTGGTGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCG
GAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTC
CAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTC
TTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAA
TACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAA
AAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGC
CGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGT
TCGGGGGAAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGGTTGCACGAACCCCCCG
```

(ข)



ภาพที่ 6 แสดงผลการหาลำดับเบสของพลาสมิด pRNAi-GG ด้วยไพรเมอร์ P22 (ก) จากการ match จากการทำ blast search ของยีน ERD15 เทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล NCBI database ค่า alignment scores ของลำดับเบสยีน ERD15 เทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล (ข) และ ค่า sequences producing significant alignments ของ alignment scores (ค)

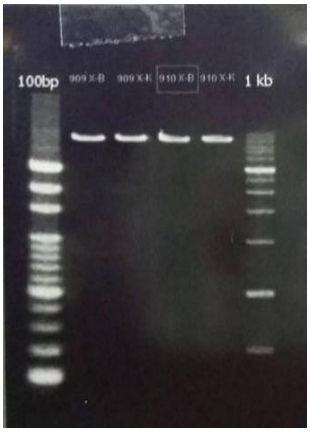
Description	score	score	cover	value	ident	Accession
PREDICTED: Nicotiana tabacum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107763558), transcript variant X1, mRNA	645	904	86%	0.0	99%	XM_016582043.1
PREDICTED: Nicotiana sylvestris protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 (LOC104249602), transcript variant X1, mRNA	645	904	86%	0.0	99%	XM_009806052.1
PREDICTED: Nicotiana tabacum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107763558), transcript variant X2, mRNA	618	877	83%	6e-173	100%	XM_016582044.1
PREDICTED: Nicotiana sylvestris protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 (LOC104249602), transcript variant X2, mRNA	618	877	83%	6e-173	100%	XM_009806053.1
Solanum pennellii chromosome ch04, complete genome	610	610	100%	9e-171	83%	HG975443.1
Solanum lycopersicum chromosome ch04, complete genome	605	605	100%	4e-169	83%	HG975516.1
Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL1080DF03, HTC in leaf	601	601	100%	5e-168	83%	AK247655.1
PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC104114318), mRNA	536	754	83%	2e-148	95%	XM_009624730.2
PREDICTED: Nicotiana tabacum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107831960), mRNA	531	749	83%	7e-147	94%	XM_016659754.1
PREDICTED: Solanum tuberosum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 (LOC102602203), mRNA	461	658	83%	1e-125	90%	XM_006357970.2
PREDICTED: Solanum pennellii protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 (LOC107018091), transcript variant X2, mRNA	459	648	83%	4e-125	90%	XM_015218464.1
PREDICTED: Solanum pennellii protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 (LOC107018091), transcript variant X1, mRNA	459	648	83%	4e-125	90%	XM_015218463.1
PREDICTED: Capsicum annuum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107869991), mRNA	457	635	82%	1e-124	90%	XM_016716361.1
Capsicum annuum ERD15 mRNA, complete cds	457	635	82%	1e-124	90%	DQ267932.1
PREDICTED: Capsicum annuum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107857836), mRNA	452	452	61%	6e-123	88%	XM_016702636.1
PREDICTED: Solanum lycopersicum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 (LOC101253770), transcript variant X2, mRNA	443	622	83%	3e-120	89%	XM_010320839.1
PREDICTED: Solanum lycopersicum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 (LOC101253770), transcript variant X1, mRNA	443	622	83%	3e-120	89%	XM_010320837.1
Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL1093CD01, HTC in leaf	443	622	83%	3e-120	89%	AK325230.1
PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC104091000), transcript variant X2, mRNA	342	444	78%	7e-90	81%	XM_009596242.2
PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC104091000), transcript variant X1, mRNA	342	444	78%	7e-90	81%	XM_009596241.2
PREDICTED: Nicotiana tabacum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107816008), mRNA	342	444	78%	7e-90	81%	XM_016641670.1
Nicotiana tabacum early responsive to dehydration 1 protein (ERD1) mRNA, complete cds	342	444	78%	7e-90	81%	GU144573.1
Solanum tuberosum clone SIDT31 dehydration-induced protein ERD15 mRNA, complete cds	331	331	61%	1e-86	80%	JX683413.1
PREDICTED: Nicotiana tabacum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107779052), transcript variant X2, mRNA	327	420	77%	2e-85	80%	XM_016599398.1
PREDICTED: Nicotiana tabacum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107779052), transcript variant X1, mRNA	327	420	77%	2e-85	80%	XM_016599397.1
PREDICTED: Solanum tuberosum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC102604076), mRNA	327	327	61%	2e-85	79%	XM_006351223.2
PREDICTED: Nicotiana sylvestris protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC104221563), transcript variant X2, mRNA	327	420	77%	2e-85	80%	XM_009772628.1
PREDICTED: Nicotiana sylvestris protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC104221563), transcript variant X1, mRNA	327	420	77%	2e-85	80%	XM_009772627.1
Solanum pennellii chromosome ch10, complete genome	325	325	61%	6e-85	79%	HG975449.1
PREDICTED: Solanum pennellii protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107002417), transcript variant X2, mRNA	324	324	61%	2e-84	79%	XM_015200440.1
PREDICTED: Solanum pennellii protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107002417), transcript variant X1, mRNA	324	324	61%	2e-84	79%	XM_015200439.1
Solanum lycopersicum chromosome ch10, complete genome	322	322	61%	7e-84	79%	HG975522.1

(ค) แสดง sequences producing significant alignments:

8.4 การทำทรานส์ฟอร์เมชั่นของแฟรกเมนต์ ERD15 เข้าสู่เชื้อ อีโคไล (E. coli) ชนิด Electrocompetent cells (ให้ผลตามข้อ 6)

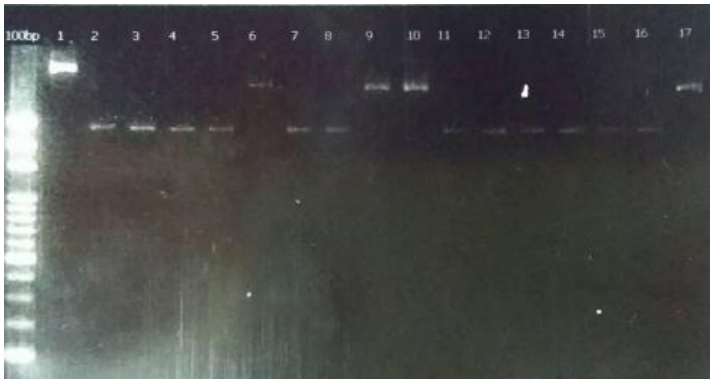
1. ทำกลีเซอรอลสต็อคเพื่อเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียสไว้ใช้ต่อไป

2.ทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการถ่ายฝากเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชต่อไป โดยการสกัดแยกไบนารี่เวคเตอร์ที่เตรียมไว้แล้ว ภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอของไบนารี่เวคเตอร์

3. เมื่อทำการหาลำดับเบสของยีน ERD15 จากจำนวน 17 โคโลนี พบว่ามี 4 โคโลนี ได้แก่ โคโลนี S1. S4, S10 และ S11 ที่ให้ผลเป็นยีน ERD15 (ภาพที่ 8) ลำดับนิวคลิโอไทด์ของโคโลนี S1 ,S4 ,S10 และ S11 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลิโอไทด์กับฐานข้อมูลชีวภาพสากล (blastx) ลำดับนิวคลิโอไทด์กับลำดับกรดอะมิโอ (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 8 แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก pRNAiGG+ERD15 ได้แก่ S1, S4, S10 และ S11

>S1

CGGGATCCGATCCAANTACCAGGTCTCATCGTGCGAGGTTGCNGGATGCGGCGAAGGCTGTTCTTTGGGCTAACAATCTT
TGCTGGTTTCTCATAGTACTTTGGTGGCTCAATGGGAGATTTTGGCCCCTTTGATATGCTCAGTGTCCTTACGAGTGCCT
CCGAACCCTTGGTCAGTATACTTTTGAATCCCCTAGTATAAATTTGTGGCTCTATCACTATCATGACTATAATTGTAAGA
TAATGGAGATATATACCAAATAGAAGCATACCACTGATACCATAGGGTGATGACTTGATTCCTTGTTGTTCACTTTCAGA
TGATTGGAGGAATTCTTCAAACTGAGCTTCCATGTTCAAAATATCTTCATCAACATCAAGATCGATATTTTCCGGAAGCA
AGTCAGCAAAATCATTCCCAGTAAAACCCA

>S4

C4_M13Reverse_H01 1002 bp
CTCTGCAGTCGACGGGCNGGGATCCGATCCAATACCAGGTCTCATCGTGCGAGGTTGCTGGATGCGGCGAAGGCTGTTCT
TTGGGCTAACAATCTTTGCTGGTTTCTCATAGTACTTTGGTGGCTCAATGGGAGATTTTGGCCCCTTTGATATGCTCAGT
GTCCTTACGAGTGCCTCCGAACCCTTGGTCAGTATACTTTTGAATCCCCTAGTATAAATTTGTGGCTCTATCACTATCAT
GACTATAATTGTAAGATAATGGAGATATATACCAAATAGAAGCATACCACTGATACCATAGGGTGATGACTTGATTCCTT
GTTGTTCACTTTCAGATGATTGGAGGAATTCTTCAAACTGAGCTTCCATGTTCAAAATATCTTCATCAACATCAAGATCG
ATATTTTCGGGAAGCAAGTCAGCAACATCATTCCCAGTAAAACCAAAAGCATCATCGCCATATTCCTCTCCTTGATGCTG
CCTCGTCCAATAATCATGGAACCATGTCGAAGTTGTCACCAAATTCCACCATTCGGGTGAAAAGTCCTCCACTTGACGCA
CATAAGACGGGATGAAAAGAGGTGCATTCGGATTCAGTGTCGACCTTCCTCCTGAAACTAACGCCATCTCCTGAGACCTG
GTATTGGATCTAGATGTATTCGCGAGGTACCGAGCTCGAATTCTCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAAC
CCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGA
TCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTA
TTTCACACCGCATATGGCGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAANCNAGCCACGACACCCGTCACNA
CCCGCTGACGCGCCCTGACGGGTTTGTCCGCTCCCGGCATCC

>S10

CGACGGGCCCGGGATCCGATCCAATACCAGGTCTCATCGTGCGAGGTTGCTGGATGCGGCGAAGGCTGTTCTTTGGGCTA
ACAATCTTTGCTGGTTTCTCATAGTACTTTGGTGGCTCAATGGGAGATTTTGGCCCCTTTGATATGCTCAGTGTCCTTAC
GAGTGCCTCCGAACCCTTGGTCAGTATACTTTTGAATCCCCTAGTATAAATTTGTGGCTCTATCACTATCATGACTATAA
TTGTAAGATAATGGAGATATATACCAAATAGAAGCATACCACTGATACCATAGGGTGATGACTTGATTCCTTGTTGTTCA
CTTTCAGATGATTGGAGGAATTCTTCAAACTGAGCTTCCATGTTCAAAATATCTTCATCAACATCAAGATCGATATTTTC
GGGAAGCAAGTCAGCAACATCATTCCCAGTAAAACCAAAAGCATCATCGCCATATTCCTCTCCTTGATGCTGCCTCGTCC
AATAATCATGGAACCATGTCGAAGTTGTCACCAAATTCCACCATTCGGGTGAAAAGTCCTCCACTTGACGCACATAAGAC
GGGATGAAAAGAGGTGCATTCGGATTCAGTGTCGACCTTCCTCCTGAAACTAACGCCATCTCCTGAGACCTGGTATTGGA
TCTAGATGTATTCGCGAGGTACCGAGCTCGAATTCTCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGT
TACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTT
CCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACAC
CGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGA
CGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGA
GGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGATGCAGCTCTGGCCCGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGAT
AAAAATATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACG
GGAAACGTCGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTAAATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGC
AATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGGATGGGAAGCCCGATGCCCCAAAATTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTANNGTT

>S11

AGTCGACGGGCCCGGGATCCGATCCAATACCAGGTCTCATCGTGCGAGGTTGCTGGATGCGGCGAAGGCTGTTCTTTGGG
CTAACAATCTTTGCTGGTTTCTCATAGTACTTTGGTGGCTCAATGGGAGATTTTGGCCCCTTTGATATGCTCAGTGTCCT
TACGAGTGCCTCCGAACCCTTGGTCAGTATACTTTTGAATCCCCTAGTATAAATTTGTGGCTCTATCACTATCATGACTA
TAATTGTAAGATAATGGAGATATATACCAAATAGAAGCATACCACTGATACCATAGGGTGATGACTTGATTCCTTGTTGT
TCACTTTCAGATGATTGGAGGAATTCTTCAAACTGAGCTTCCATGTTCAAAATATCTTCATCAACATCAAGATCGATATT
TTCGGGAAGCAAGTCAGCAACATCATTCCCAGTAAAACCAAAAGCATCATCGCCATATTCCTCTCCTTGATGCTGCCTCG
TCCAATAATCATGGAACCATGTCGAAGTTGTCACCAAATTCCACCATTCGGGTGAAAAGTCCTCCACTTGACGCACATAA
GACGGGATGAAAAGAGGTGCATTCGGATTCAGTGTCGACCTTCCTCCTGAAACTAACGCCATCTCCTGAGACCTGGTATT
GGATCTAGATGTATTCGCGAGGTACCGAGCTCGAATTCTCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGG
CGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCC
CTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCA
CACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGC
TGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTC
AAAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGATGCAGCTCTGGCCCGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAA
GATAAAAATATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCA
ACGGGAAACGTCGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTAATGGGGATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGG
GCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGGATGGGAAGCCCGATGCCCCCAAATTGTTTC

ภาพที่ 9 แสดงลำนิวคลิโอไทด์ของโคโลนี S1, S4, S10 และ S11

4. ภาพแสดงการทำ blast search ของยีน S1, S4, S10 และ S11 โดยใช้โปรแกรม blastx (non-redundant CDS translation) ได้ผลดังต่อไปนี้ (ภาพที่ 10)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
PREDICTED: protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 isoform X1 [Nicotiana sylvestris]	296	296	43%	1e-96	86%	XP_009804354.1
PREDICTED: protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 isoform X2 [Nicotiana sylvestris]	284	284	43%	5e-92	83%	XP_009804355.1
PREDICTED: protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like [Nicotiana tomentosiformis]	264	264	43%	3e-84	78%	XP_009623025.1
PREDICTED: protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like [Nicotiana tabacum]	260	260	43%	9e-83	77%	XP_016515240.1
PREDICTED: protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 [Solanum pennellii]	246	246	43%	3e-77	75%	XP_015073949.1
PREDICTED: protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 [Solanum tuberosum]	244	244	43%	1e-76	75%	XP_006358032.1
PREDICTED: protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like [Capsicum annuum]	243	243	43%	4e-76	74%	XP_016571847.1
PREDICTED: protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 [Solanum lycopersicum]	243	243	43%	6e-76	75%	XP_010319139.1
PREDICTED: protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like [Nicotiana tomentosiformis]	219	219	43%	1e-66	65%	XP_009594536.1
dehydration-induced protein ERD15 [Solanum lycopersicum]	218	218	43%	2e-66	67%	NP_001234461.1
PREDICTED: protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like [Solanum pennellii]	216	216	43%	1e-65	66%	XP_015056925.1
PREDICTED: protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like [Solanum tuberosum]	215	215	43%	3e-65	66%	XP_006351285.1
dehydration-induced protein ERD15 [Solanum tuberosum]	215	215	43%	3e-65	66%	AFX66978.1
PREDICTED: protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like [Capsicum annuum]	214	214	43%	9e-65	66%	XP_016543747.1
PREDICTED: protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like [Nicotiana sylvestris]	199	199	43%	1e-58	64%	XP_009770929.1

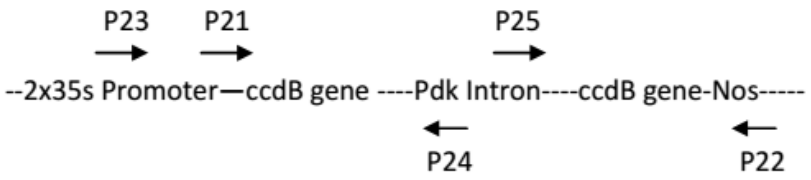
ภาพที่ 10 ภาพแสดง sequences producing significant alignments ของยีน ERD15 ที่โคลนได้

5. ออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการหา gene fragments ที่เชื่อมต่อเข้ากับไบนารี่เวคเตอร์ (one tube restriction-ligation reaction) เมื่อทำการทรานส์ฟอร์เมชั่นแล้ว (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับเบสรีคอมบิแนนต์ยีน ERD คอนสตรักส์

Primer Sequence (5’- 3’ description)		
P21	accatttacgaacgatagcc	For Recombinants identification
P22*	gtaaaacgacggccagtg	For Recombinants identification and sequencing
P23	cgaatctcaagcaatcaagc	For Recombinants sequencing
P24	cattttagcttccttagctcc	For Recombinants and intron orientation identification
P25	catttggattgattacagttgg	For Recombinants and intron orientation identification
หมายเหตุ		ทุกรีคอมบิแนนต์ ยืนยันผลการหาลำดับเบสและตรวจสอบทิศทาง และการทำ Blast searching

6. ตำแหน่งของไพรเมอร์ P21, P22, P23, P24 และ P25 ตำแหน่งยีนของคอนส์ตรักส์ที่ใช้ในการตรวจสอบทิศทางของคอนส์ตรักส์ (ภาพที่ 11)

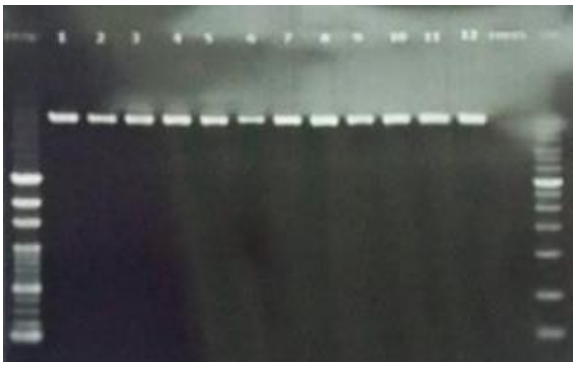


ภาพที่ 11 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับเบสที่ตำแหน่งของยีน ERD15 คอนสตรักส์

7.ทำการเลี้ยงเชื้อของเซลล์และสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอของเวคเตอร์ p-RNAi-GG (kanamycin resistant) ทำการหาลำดับเบสโดยใช้ไพรเมอร์ M13F และ M13R พบว่าเป็นเวคเตอร์ที่ถูกต้องจากจำนวน 12

โคโลนี (Forward และ Reverse) รวมเป็น 24 reactions (100% match) ยกตัวอย่าง 5 โคโลนีแรก มีลำดับเบสที่ match กับ pRNAi-GG (Gene Bank Accession no. JQ085427) ภาพที่ 12

1bp 1kb



M13 Primer

R1 F

CACTAGATGAACCGCGCGCGATAATTTATCCTAGTTTGCGCGCTATATTTTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGTATAATT

GCGGGACTCTAATCATAAAAACCCATCTCATAAATAACGTCATGCATTACATGTTAATTATTACATGCTTAACGTAATTC

AACAGAAATTATATGATAATCATCGCAAGACCGGCAACAGGATTCAATCTTAAGAAACTTTATTGCCAAATGTTTGAACG

ATCGGGGAAATTCGAGCTCGGAGTGAGACCCTGTGTATAAGGGAGCCTGACATTTATATTCCCCAGAACATCAGGTTAAT

GGCGTTTTTGATGTCATTTTCGCGGTGGCTGAGATCAGCCACTTCTTCCCCGATAACGGATACCGGCACACTGGCCATAT

CGGTGGTCATCATGCGCCAGCTTTCATCCCCGATATGCACCACCGGGTAAAGTTCACGGGAGACTTTATCTGACAGCAGA

CGTGCACTGGCCAGGGGGATCACCATCCGTCGCCCAGGCGTGTCAATAATATCACTCTGTACATCCACAAACAGACGATA

ACGGCTCTCTCTTTTATAGGTGTAAACCTTAAACTGCATTTCACCAGTCCCTGTTCTCGTCAGCAAAAGTTTAGCTTCCT

TAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTCATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTT

ACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTA

TTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCACAGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGCGTCGGGTGATGCTGCCAACTTAGTCGAGAATT

GGTCTCAACGATCTAGACGAAATCTCTAGACCAACTGTAATCAATCCAAATGTAAGATCAATGATAACACAATGACATGA

TCTATCATGTTACCTTGTTTATTCATGTTCGACTAATTCATTTAATTAATAGTCAATCCATTTAGAAGTTAATAAAACTA

CAAGTATTATTTAGAAATTAATGAGAATGTTGATTGAAAATAATACTATATAAAATTGATAGATCTTGCGCTTTGTTATA

TTAGCATTAGATTATGTTTTGTTACATTAGATTACTGGTTCCATTAATTTGAAATTATTTGTTACTTTAGCTTGGTATTT

AATATTTTGTTTATTGATAAATTACAAGCAAATTGGAATTTCTAACAAAATATTTATTAACTTTTAAACTAAAATATTTA

GTAATGGTATAGATATTTAATTATTTAATAAACTATTAATCCTAAAAAAATATTATTTTAATTTATTTATTCTTATTTTT

ACAAAAGAATTTTATCCTTGGAATTTTAATTCCTCAAACCGGCTAGAATTACATTTATGGGGCCGACATATCCAGTAATA

ATTTTT

R3 M13 F

CAAGTCAATGGACCCGCGCGCGATAATTTATCCTAGTTTGCGCGCTATATTTTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGTATAA
TTGCGGGACTCTAATCATAAAAACCCATCTCATAAATAACGTCATGCATTACATGTTAATTATTACATGCTTAACGTAAT
TCAACAGAAATTATATGATAATCATCGCAAGACCGGCAACAGGATTCAATCTTAAGAAACTTTATTGCCAAATGTTTGAA
CGATCGGGGAAATTCGAGCTCGGAGTGAGACCCTGTGTATAAGGGAGCCTGACATTTATATTCCCCAGAACATCAGGTTA
ATGGCGTTTTTGATGTCATTTTCGCGGTGGCTGAGATCAGCCACTTCTTCCCCGATAACGGATACCGGCACACTGGCCAT
ATCGGTGGTCATCATGCGCCAGCTTTCATCCCCGATATGCACCACCGGGTAAAGTTCACGGGAGACTTTATCTGACAGCA
GACGTGCACTGGCCAGGGGGATCACCATCCGTCGCCCAGGCGTGTCAATAATATCACTCTGTACATCCACAAACAGACGA
TAACGGCTCTCTCTTTTATAGGTGTAAACCTTAAACTGCATTTCACCAGTCCCTGTTCTCGTCAGCAAAAGTTTAGCTTC
CTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTCATTATGGTGAAAGTTGGAACCTC
TTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAGGATTTATT
TATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCACAGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGCGTCGGGTGATGCTGCCAACTTAGTCGAGAA
TTGGTCTCAACGATCTAGACGAAATCTCTAGACCAACTGTAATCAATCCAAATGTAAGATCAATGATAACACAATGACAT
GATCTATCATGTTACCTTGTTTATTCATGTTCGACTAATTCATTTAATTAATAGTCAATCCATTTAGAAGTTAATAAAAC
TACAAGTATTATTTAGAAATTTAATGAGAATGGTTGATTGGAAAATAATACTATTATAAAATTGAATAGATCTTGGCGCT
TTGGTAAAATTAGCATTAAAATAATGTCTTGGTTACATTAAGATTCCTGGTTACTAATAAGTTGGATATTATATTGATAC
CTTTAGCTAGGTAATTCAATATTATTGTTATATGGGTAAATATCACAAGTTAGAATTGGAATATTCAGAACAAATAATAT
TTATTTACTCTGTCATATCC

R4 M13 F

CATGCCATGACCCGCGCGCGATAATTTATCCTAGTTTGCGCGCTATATTTTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGTATAATT
GCGGGACTCTAATCATAAAAACCCATCTCATAAATAACGTCATGCATTACATGTTAATTATTACATGCTTAACGTAATTC
AACAGAAATTATATGATAATCATCGCAAGACCGGCAACAGGATTCAATCTTAAGAAACTTTATTGCCAAATGTTTGAACG
ATCGGGGAAATTCGAGCTCGGAGTGAGACCCTGTGTATAAGGGAGCCTGACATTTATATTCCCCAGAACATCAGGTTAAT
GGCGTTTTTGATGTCATTTTCGCGGTGGCTGAGATCAGCCACTTCTTCCCCGATAACGGATACCGGCACACTGGCCATAT
CGGTGGTCATCATGCGCCAGCTTTCATCCCCGATATGCACCACCGGGTAAAGTTCACGGGAGACTTTATCTGACAGCAGA
CGTGCACTGGCCAGGGGGATCACCATCCGTCGCCCAGGCGTGTCAATAATATCACTCTGTACATCCACAAACAGACGATA
ACGGCTCTCTCTTTTATAGGTGTAAACCTTAAACTGCATTTCACCAGTCCCTGTTCTCGTCAGCAAAAGTTTAGCTTCCT
TAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTCATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTT
ACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTA
TTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCACAGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGCGTCGGGTGATGCTGCCAACTTAGTCGAGAATT
GGTCTCAACGATCTAGACGAAATCTCTAGACCAACTGTAATCAATCCAAATGTAAGATCAATGATAACACAATGACATGA
TCTATCATGTTACCTTGTTTATTCATGTTCGACTAATTCATTTAATTAATAGTCAATCCATTTAGAAGTTAATAAAACTA
CAAGTATTATTTAGAAATTAATGAGAATGTTGATTGAAAATAATACTATATAAAATTGATAGATCTTGCGCTTTGTTATA
TTAGCATTAGATTATGTTTTGTTACATTAGATTACTGGTTCTATTAAGTTGAAAATTATTTGGTACTTTAGCTTGGTATT
TAAAATTTTGTTTATTGATAAATTACAAGCAGATTGGAATTTCTAACAAAATATTTATTAACTTTTTAAACTAAATATTT
AGTAATGGGTAAAGAAATTTAATTATATAATAAACTTTTTATTCATAAAAAAA

R5 M15 F

AAAAAGATGACCCGCGCGCGATAATTTATCCTAGTTTGCGCGCTATATTTTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGTATAATT

GCGGGACTCTAATCATAAAAACCCATCTCATAAATAACGTCATGCATTACATGTTAATTATTACATGCTTAACGTAATTC

AACAGAAATTATATGATAATCATCGCAAGACCGGCAACAGGATTCAATCTTAAGAAACTTTATTGCCAAATGTTTGAACG

ATCGGGGAAATTCGAGCTCGGAGTGAGACCCTGTGTATAAGGGAGCCTGACATTTATATTCCCCAGAACATCAGGTTAAT

GGCGTTTTTGATGTCATTTTCGCGGTGGCTGAGATCAGCCACTTCTTCCCCGATAACGGATACCGGCACACTGGCCATAT

CGGTGGTCATCATGCGCCAGCTTTCATCCCCGATATGCACCACCGGGTAAAGTTCACGGGAGACTTTATCTGACAGCAGA

CGTGCACTGGCCAGGGGGATCACCATCCGTCGCCCAGGCGTGTCAATAATATCACTCTGTACATCCACAAACAGACGATA

ACGGCTCTCTCTTTTATAGGTGTAAACCTTAAACTGCATTTCACCAGTCCCTGTTCTCGTCAGCAAAAGTTTAGCTTCCT

TAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTCATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTT

ACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTA

TTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCACAGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGCGTCGGGTGATGCTGCCAACTTAGTCGAGAATT

GGTCTCAACGATCTAGACGAAATCTCTAGACCAACTGTAATCAATCCAAATGTAAGATCAATGATAACACAATGACATGA

TCTATCATGTTACCTTGTTTATTCATGTTCGACTAATTCATTTAATTAATAGTCAATCCATTTAGAAGTTAATAAAACTA

CAAGTATTATTTAGAAATTAATGAGAATGTTGATTGAAAATAATACTATATAAAATTGATAGATCTTGCGCTTTGTTATA

TTAGCATTAGATTATGTTTTGTTACATTAGATTACTGGTTCTATTAGTTTGAAATTATTTGGTACTTTAGCTTGGTATTT

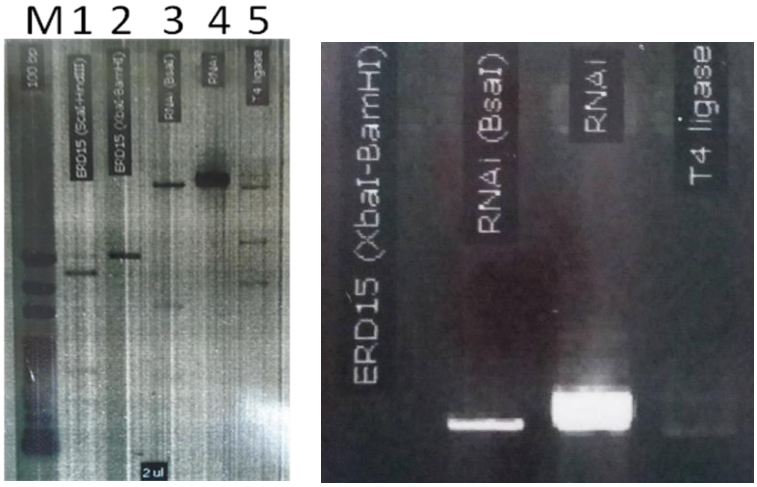
AATATTTTGGTTATTGATAAATTACAAGCAGATTGGAATTTCTAACAAAATATTTATTAACTTTTAAACTAAAATATTTA

GTAATGGGTTAAGAATTTTAATTTATTAATAAACTATTTATTCTTAAAAAAA

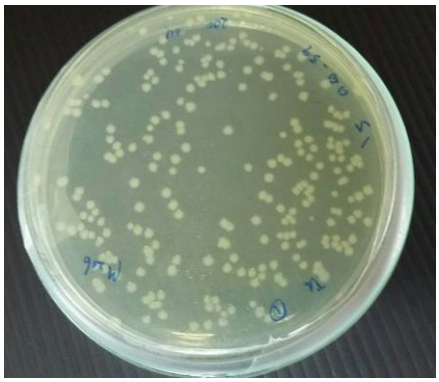
ภาพที่ 12 แสดง 5 โคโลนีแรก มีลำดับเบสที่ match กับ pRNAi-GG (Gene Bank Accession no. JQ085427)

10. ทำการตัดยีน ERD15 ที่ได้จากการทำทรานส์ฟอร์เมชั่น ตรวจสอบความถูกต้องของยีน จำนวน 8 โคโลนี ทั้งทิศทาง 5’ และ 3’ ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังต่อไปนี้ (เลนที่ 1 ; SacI-HindIII), (เลนที่ 2; XbaI-BamHI), RNAi (เลนที่ 3 ; ตัดด้วย BsaI), (เลนที่ 4; RNAi loading) และ (เลนที่ 5; RNAi+T4 DNA ligase) เพื่อทำการทรานส์ฟอร์เมชั่น ได้ผลดังต่อไปนี้ (M: DNA ladder 100 bp) (ภาพที่ 13ก)

(ก)



(ข)



ภาพที่ 13 (ก) แสดงการตัดยีน ERD15 ที่ได้จากการทำทรานส์ฟอร์เมชั่นด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆ การเชื่อมต่อกับ T4 DNA ligase และ pRNAi loading

(ข) แสดงโคโลนีที่ปรากฏภายหลังการทำทรานสฟอร์เมชั่นยีน ERD15 + T4 DNA ligase ด้วยปฏิกิริยา one-tube ligation reaction system

11. การทำทรานส์ฟอร์เมชั่น plasmid pRNAi+GG expression vector ซึ่งประกอบด้วยยีน ccdB ในคอนส์ตรักส์ (ทิศทาง sense และ anti-sense) เข้าสู่ อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์LBA4404 และถ่ายฝากเข้าสู่พืชยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) (ภาพที่ 14) ทำการทดลอง 2 ครั้ง ผลการทดลองให้ผลตามทฤษฎีคือ ต้นยาสูบไม่สามารถเติบโตได้ ดังนั้น จึงพิสูจน์ได้ว่า การไลเกต pRNAi+GG เข้าสู่เวคเตอร์ pRNAi+GG ซึ่งประกอบด้วยยีน ccdB ซึ่งเป็น lethal gene ต่ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ประสบความสำเร็จ

อย่างไรก็ตาม หากต้องการทดสอบการทรานส์ฟอร์มคอนส์ตรักส์ ยีน ERD15+plasmid RNAi+GG เข้าสู่ต้นยาสูบ อาจทดสอบด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์อื่นๆที่ไม่ประกอบด้วยยีน ccdB นอกเหนือจาก LBA4404 แล้วศึกษาการเติบโตของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายฝากยีนต่อไป ซึ่งเป็นคำแนะนำที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ จากการทดลองเบื้องต้น ได้สุ่มทดสอบนำคอนส์ครักส์ (ภาพที่ 15) pRNAiGG+ERD15 เข้าสู่ LBA4404 และทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นยาสูบ อยู่ระหว่างทำการสุ่มโคโลนี คอนส์ตรักส์เพื่อทรานส์ฟอร์มต่อได้ คำแนะนำคือ อาจเปลี่ยนไปใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์อื่น หรือ สุ่ม pRNAiGG+ERD15 เพิ่มเติมที่ได้จากการทำทรานส์ฟอร์เมชั่นก่อนหน้านี้

COLONY 1

CGGGATCCGATCCAANTACCAGGTCTCATCGTGCGAGGTTGCNGGATGCGGCGAAGGCTGTTCTTTGGGCTAACAATCTT
TGCTGGTTTCTCATAGTACTTTGGTGGCTCAATGGGAGATTTTGGCCCCTTTGATATGCTCAGTGTCCTTACGAGTGCCT
CCGAACCCTTGGTCAGTATACTTTTGAATCCCCTAGTATAAATTTGTGGCTCTATCACTATCATGACTATAATTGTAAGA
TAATGGAGATATATACCAAATAGAAGCATACCACTGATACCATAGGGTGATGACTTGATTCCTTGTTGTTCACTTTCAGA
TGATTGGAGGAATTCTTCAAACTGAGCTTCCATGTTCAAAATATCTTCATCAACATCAAGATCGATATTTTCCGGAAGCA
AGTCAGCAAAATCATTCCCAGTAAAACCCA

M13 REVERSE

COLONY 4

CTCTGCAGTCGACGGGCNGGGATCCGATCCAATACCAGGTCTCATCGTGCGAGGTTGCTGGATGCGGCGAAGGCTGTTCT
TTGGGCTAACAATCTTTGCTGGTTTCTCATAGTACTTTGGTGGCTCAATGGGAGATTTTGGCCCCTTTGATATGCTCAGT
GTCCTTACGAGTGCCTCCGAACCCTTGGTCAGTATACTTTTGAATCCCCTAGTATAAATTTGTGGCTCTATCACTATCAT
GACTATAATTGTAAGATAATGGAGATATATACCAAATAGAAGCATACCACTGATACCATAGGGTGATGACTTGATTCCTT
GTTGTTCACTTTCAGATGATTGGAGGAATTCTTCAAACTGAGCTTCCATGTTCAAAATATCTTCATCAACATCAAGATCG
ATATTTTCGGGAAGCAAGTCAGCAACATCATTCCCAGTAAAACCAAAAGCATCATCGCCATATTCCTCTCCTTGATGCTG
CCTCGTCCAATAATCATGGAACCATGTCGAAGTTGTCACCAAATTCCACCATTCGGGTGAAAAGTCCTCCACTTGACGCA
CATAAGACGGGATGAAAAGAGGTGCATTCGGATTCAGTGTCGACCTTCCTCCTGAAACTAACGCCATCTCCTGAGACCTG
GTATTGGATCTAGATGTATTCGCGAGGTACCGAGCTCGAATTCTCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAAC
CCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGA
TCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTA
TTTCACACCGCATATGGCGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAANCNAGCCACGACACCCGTCACNA
CCCGCTGACGCGCCCTGACGGGTTTGTCCGCTCCCGGCATCC

ภาพที่ 15 โคโลนี ERD15+plasmid RNAi+GG ที่สุ่มได้จากเพลทจานเพาะเลี้ยงภายหลังการทรานส์ฟอร์เมชั่น และ **ภาพที่ 16** ผลการ MATCH ของยีน ERD15 จาก pRNAi เวคเตอร์ เทียบกับยีน ERD15 ของต้นยาสูบที่ปรากฏในฐานข้อมูลชีวภาพ

PREDICTED: Nicotiana tabacum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107763558), transcript variant X1, mRNA

NCBI Reference Sequence: XM_016582043.1

GenBank Graphics

>gi|1025403043|ref|XM_016582043.1| PREDICTED: Nicotiana tabacum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107763558), transcript variant X1, mRNA

TAATAGAACCTTCTGTCATTGGGGATAAGACTTCATACGTGTACGAGTCGTTCCTGTAGTTGAAAGATAT
TTTCTCTCATTTCGAAGACATCTTGAGGTAACAATTTGGAGAAAGGAGAATGGCGTTAGTTTCAGGAGGA
AGGTCGACACTGAATCCGAATGCACCTCTTTTCATCCCGTCTTATGTGCGTCAAGTGGAGGACTTTTCAC
CCGAATGGTGGAATTTGGTGACAACTTCGACATGGTTCCATGATTATTGGACGAGGCAGCATCAAGGAGA
GGAATATGGCGATGATGCTTTTGGTTTTACTGGGAATGATGTTGCTGACTTGCTTCCCGAAAATATCGAT
CTTGATGTTGATGAAGATATTTTGAACATGGAAGCTCAGTTTGAAGAATTCCTCCAATCATCTGAAAGTG
AACAACAAGGAATCAAGTCATCACCCTATGGTATCAGTGGTATGCTTCTATTTGGTTTACCCAAGGGTTC
GGAGGCACTCGTAAGGACACTGAGCATATCAAAGGGGCCAAAATCTCCCATTGAGCCACCAAAGTACTAT
GAGAAACCAGCAAAGATTGTTAGCCCAAAGAACAGCCTTCGCCGCATCCAGCAACCTCGCTAAATGTAGT
TTAGCTTAAGCAAAAGCTCTTGGTTTGTAGTTTGGGCATGTCAGTTCTTAATTTGCAGCTTTGTCTTCTT
CACAAAGCAGCAGTTGAGAGTCTCTAAGAGTTTAGTTTCTGGTAACCTTTTGTATAGAGCAAGGTAGGTG
GCACCTTCTGTATCTAGCCTTGTTCATAGTTGTAGTATCCTTTGTTCAGTTTTTAACTTGTAAACAGCAA
AACTGTTAAAAGGGAAAAAATGTAAAAATCAGTTTACAAAATTGCAAAAAGAGCGTCTTTGAGTTTTATT
TCAGGTAA

ภาพที่ 16 ผลการ MATCH ของยีน ERD15 จาก pRNAi เวคเตอร์ เทียบกับยีน ERD15 ของต้นยาสูบที่ปรากฏในฐานข้อมูลชีวภาพ

12.ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นยาสูบ ดัดแปลงจาก Paul J. Bottino (2016)

ตามขั้นตอนในตู้ปลอดเชื้อดังต่อไปนี้

1. นำใบยาสูบมาทำให้ปลอดเชื้อตามลำดับดังนี้

   -95% เอทานอล นาน 15 วินาที
   -25% chlorox นาน 5 นาที
   -ล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อ

2. ซับด้วยกระดาษปลอดเชื้อ
3. เจาะยาสูบประมาณ 30-40 ชิ้นด้วย (hole punch) เก็บไว้ใน จานเพาะเชื้อปลอดเชื้อ
4. เทเชื้อ Agrobacterium ที่เพาะเลี้ยงไว้นานข้ามคืน และบ่มต่อด้วยการเขย่าเบาๆนาน 5-10 นาที

5. ขจัดแบคทีเรียส่วนเกินออกโดยการวางลงบนกระดาษซับและกระดาษปลอดเชื้อ และถ่ายไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อ MS cocultivation medium
6. Cocultivate ในสภาวะมืดนาน 48 ชั่วโมง
7. หลังจาก cocultivation ให้ถ่ายโอนไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อ MS selection medium โดยให้มีทิศทางด้านล่างของใบอยู่หงายขึ้น บ่มในสภาวะมืด และสังเกตการเกิดขึ้นของ transformed callus เป็นเวลาสองสัปดาห์
8. เมื่อปรากฏยอดใบแล้ว ให้ย้ายจานเพาะเชื้อไปที่มีแสงและที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อการเจริญเติบโตของพืช (ภาพที่ 17)

ภาพที่ 17 แสดงแสดงต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

9.สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

งานวิจัยนี้ เป็นการประยุกต์ใช้วิธีการของ Pu Yan et al., 2012 ในการสับโคลน (subcloning) ชิ้นส่วนยีน ERD15เข้าสู่ RNAi เวคเตอร์ ที่เรียกว่า Plasmid Golden Gate Expression Vector โดยวิธีนี้ มีข้อดีคือเป็นการซับโคลนที่ค่อนข้างง่าย อาศัยการตัดด้วยเอนไซม์ BsaI และการหาลำดับเบส ภายในคาสเซ็ตส์ (cassettes) ที่ประกอบด้วย ccdB lethal gene หากการสับโคลนประสบความสำเร็จจะเกิดโคโลนี แต่การถ่ายฝากเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียมจะไม่สามารถเติบโตได้ เพื่อเป็นการยืนยันการสร้างคอนส์ตรักส์ในเบื้องต้น การตรวจสอบทิศทางและรีคอมบิแนนต์ โดยวิธีการดังกล่าว ได้ประยุกต์ใช้การสังเคราะห์ยีนทดแทนการโคลนโดยวิธีเติมจุดตัดเอนไซม์ (restriction sites) แต่นำเอาจุดตัดเอนไซม์ (BsaI) ที่มีอยู่บน pRNAi มาใช้ เพื่อง่ายและสะดวกต่อการตรวจสอบรีคอมบิแนนต์ร่วมกับการหาลำดับเบส ดังกล่าว

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

10.1ผลงานวิจัยที่ได้ เป็นการสร้าง pRNA+ERD15 คอนส์ตรักส์ ซึ่งเป็นชนิด inphRNAi ที่สามารถนำไปใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะทนทานต่อสภาวะขาดน้ำหรือลักษณะ (traits) ที่สำคัญอื่นๆ ได้ ทั้งนี้ เพื่อเป็นการทดสอบการทำงานของยีน ERD15 เมื่ออยู่ในรูป pRNAi

10.2 สามารถถ่ายทอดองค์ความรู้หรือประยุกต์ใช้วิธีการที่ใช้ในงานวิจัย ไปใช้กับยีนที่สำคัญอื่นๆ ได้

10.3 สามารถเผยแพร่งานวิจัยหรือองค์ความรู้ ให้แก่นักวิจัยหรือนักปรับปรุงพืช ยกตัวอย่างเช่น นำวิธีการสร้างพลาสมิดคอนส์ตรักส์เพื่อยับยั้งการทำงานของยีนที่สำคัญทางการเกษตร โดยอาศัยวิธีการเดียวกันนี้ ต่อไปได้

10.4 นอกจากนี้ อาจทดสอบการทำงานของยีนใน transgenic yeast เพื่อเป็นการจำลองหน้าที่ของยีนใน pRNAi+ERD15 คอนส์ตรักส์ในเบื้องต้น

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

ขอขอบคุณคุณวิภาวรรณ วงศ์สุทธิ์ ที่ช่วยงานวิจัยการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

12. เอกสารอ้างอิง :

Cattvelli, L., Rizza, F., Badeck, F-W., Mazzucotelli, E., Mastrangelom A,N., Francia, E., Mare, C., Tondelli, A., Stanca, A.M. 2008. Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. Field Crops Research 105 (1), 1-14.

Cogoni, C., Irelan, J.T., Schumacher, M., Schmidhauser, T.J.,Selker, E.U., and Macino, G. 1996. Transgene silencing of the al-1 gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA–DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J.* 15: 3153–3163.

Cogoni C, Macino G. (1999). Gene silencing in *Neurospora crassa* requires protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. Nature 399: 166-169.

Froehlich, J.E., Wilkerson, c.g., Ray, W.K., Mc Andrew, R.S. Osteryoung, K.W., Gage, D.A., & Phinney, B.S. (2003). Proteomic study of the Arabidopsis thaliana chloroplast envelop membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *Journal of Proteome Research*, 2(4), 413-425.

Guimarães-Dias F[1], Neves-Borges AC, Viana AA, Mesquita RO, Romano E, de Fátima Grossi-de-Sá M, Nepomuceno AL, Loureiro ME, and Alves-Ferreira M. 2012. Expression analysis in response to drought stress in soybean: Shedding light on the regulation of metabolic pathway genes.Genet Mol Biol. Jun; 35(1 (suppl)):222-32.

Jorgensen, R.A. 2003. Sense cosuppression in plants: Past, present, and future. In *RNAi: A guide to gene silencing* (ed.G.J. Hannon). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp. 5–22.

Kariola, T., Brader, G., Helenius, E., Li, J., Heino, P., & Palva, E.T. (2006). EARLY RESPONSIVE to DEHYDRATION 15, a negative regulator of abscisic acid responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 142-1559.

Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1994). Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L.:identification of three ERDs as HSP cognate genes. Plant Molecular Biology, 25-791.

Kumar, R. 2014. Role of MicroRNAs in Biotic and Abiotic stress responses in crop plants. Appl. Biochem. Biotechnol. [Epub ahead of print].

Levitt, J., 1980. Responses of Plants to environmental stresses. Vol. 1, Acad. Press, 496 Pages.

Marouane Melloul, Driss Iraqi, Sripada M Udupa Gilles Erba, My Abdelaziz El Alaoui, Mohammed Ibriz & Elmostafa El Fahime. 2014. Analysis of mRNA Levels of Ten Genes Under Water Stress in *Triticum turgidum subsp. Durum*. Journal of Plant Studies; Vol. 3, No. 1. :65-79.

Napoli C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. Plant Cell. 2: 279-89.

Rai, A., Suprasanna, P., D'Souza, SF., and Kumar, V. 2012. Membrane Topology and Predicted RNA-Binding Function of the 'Early Responsive to Dehydration (ERD4). Plant Protein. 7(3). 1-11.

Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall,W.S., and Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference.*Nature Biotechnology* 22, 326–330.

Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 58-221.

Sun Q, Kong D, Miao C, Duan Q, Yang T, Ye A, Di Z, Gong W. 2014**.** Variations in global temperature and precipitation for the period of 1948 to 2010. Environ Monit Assess. May 16. [Epub ahead of print].

VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM (2008). "Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis". *Biotechniques* 44 (5): 619-626.

Wang, M.B., Wesley, S.V., Finnegan, E.J., Smith, N.A. and Waterhouse, P.M. 2001. Replicating satellite RNA induces sequence-specific DNA methylation and truncated transcripts in plants. RNA. 7: 16-28.