



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์

พันธุศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การบ่งชี้และวิเคราะห์หน้าที่ของยีนควบคุมระบบที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรากสะสมอาหาร
ของมันสำปะหลัง

Identification and Functional Analysis of Genes Involving in Storage Root Formation
in Cassava

นามผู้วิจัย นางสาววรรษมน อิ่มประสิทธิ์ชัย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช, D.Agr.Sci.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ศุภชัย วุฒิพงษ์ชัยกิจ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ยีนดี ชาญวิวัฒนา, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ธราธร ทิรมลิตติ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การบ่งชี้และวิเคราะห์หน้าที่ของยีนควบคุมระบบที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรากสะสมอาหาร
ของมันสำปะหลัง

Identification and Functional Analysis of Genes Involving in Storage Root Formation in Cassava

โดย

นางสาววรรณ อิ่มประสิทธิ์ชัย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วรรณมณ อิมประสิทธิ์ชัย 2557: การบ่งชี้และวิเคราะห์หน้าที่ของยีนควบคุมระบบที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช, Dr.Agr.Sci. 92 หน้า

การศึกษานี้เทคนิค differential display reverse transcription-PCR (DDRT-PCR) ได้นำมาใช้เพื่อค้นหา ยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของรากสะสมอาหาร จากเทคนิคดังกล่าวได้คัดเลือกยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนในกลุ่ม homeodomain-leucine zipper (*HD-Zip*) และ integral membrane protein ได้แก่ *MeHD-ZipIII* และ *MeTM* ผลของการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนโดย reverse transcription-PCR (RT-PCR) พบว่ายีนทั้งสองมีการแสดงออกสูงในช่วงที่รากสะสมอาหารมีการเจริญขยายขนาดทางด้านข้างเพื่อการสะสมแป้ง ดังนั้นยีนดังกล่าวจึงน่าจะเกี่ยวข้องกับการสะสมแป้งหรือการสร้างรากสะสมอาหาร ดังนั้นจึงได้สร้างพาหะที่ชักนำให้มีการแสดงออกสูงของทั้งสองยีนภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35SCaMV และ patatin ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่ชักนำให้ยีนมีการแสดงออกจำเพาะที่อวัยวะสะสมอาหาร ทำการถ่ายโอนโครงสร้างของยีนที่จะส่งผลชักนำให้มีการแสดงออกสูงดังกล่าวเข้าสู่ต้นมันฝรั่ง จากผลการทดลองสามารถสร้างต้นมันฝรั่งตัดแปรพันธุกรรมที่ชักนำให้มีการแสดงออกสูงด้วยยีน *MeTM* ภายใต้โปรโมเตอร์ 35SCaMV ได้ 2 ต้น โดยทำการยืนยันแล้วว่าในต้นดังกล่าวมีการแทรกตัวของยีน *MeTM* ในจีโนมของมันฝรั่ง 1 และ 2 ชุด และสามารถชักนำให้ต้นฝรั่งตัดแปรพันธุกรรมมีการสร้างหัวสะสมอาหารภายในขวดทดลอง

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Watsamon Imprasittichai 2014: Identification and Functional Analysis of Genes Involving in Storage Root Formation in Cassava. Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Associate Professor Somsak Apisitwanich, Dr. Agr. Sci. 92 Pages.

This study, the differential display reverse transcription-PCR (DDRT-PCR) technique was employed to investigate cassava genes involving in storage root development. Genes encoding a homeodomain-leucine zipper (*HD-Zip*) protein; *MeHD-ZipIII*, and an integral membrane protein; *MeTM*, were selected as being up-regulated during the storage root induction stage. Reverse transcription-PCR (RT-PCR) results confirmed that both genes are highly expressed in the swelling fibrous root by radial growing for starch granule storage. These two identified genes showed participation in increasing of starch accumulation on storage root formation. Consequently, overexpression cassettes of both genes under the control of 35S CaMV promoter and storage organ-specific, papatin promoter, were constructed and introduced into potato, a model organism. Two independent transgenic lines of 35S:*MeTM* were found with a single and double copies of the transgene. This *MeTM* gene could induced *in vitro* tuberization of the transgenic potatoes.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.ดร.สมศักดิ์ อภิสถิวัฒนิช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ดร.ศุภชัย วุฒิพงษ์ชัยกิจ ดร.ยินดี ชาญวิวัฒนา ดร.ธราธร ทิรมลจิตติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สำหรับคำปรึกษาและคำแนะนำในระหว่างการเรียนรู้ การศึกษาวิจัยและตลอดจนการตรวจแก้ไข รูปเล่มวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ ประธานกรรมการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.นฤมล ชนานันต์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย สำหรับคำแนะนำต่างๆ ที่มีคุณค่าอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณ ดร. โอภาส บุญเส็งและเจ้าหน้าที่ภายในศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองสำหรับตัวอย่างที่ใช้ในการทำการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณ รุ่งโรจน์ รักมิตร ผู้ช่วยนักวิจัย ที่ให้คำแนะนำต่างๆ และวัตถุดิบที่สำคัญในการทำการวิจัย ขอขอบคุณสมาชิกในห้องปฏิบัติการทุกท่าน สำหรับคำแนะนำในการทำการวิจัย

ขอขอบคุณบิดา-มารดา และครอบครัว สำหรับการช่วยเหลือในทุกด้าน

ขอขอบคุณเงินทุนสนับสนุนจาก โครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ภายใต้สัญญาทุนเลขที่

TG-22-11-52-027M

วรรษมน อิ่มประสิทธิ์ชัย

กันยายน 2557

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	19
อุปกรณ์	19
วิธีการ	20
ผลและวิจารณ์	43
สรุปและข้อเสนอแนะ	82
สรุป	82
ข้อเสนอแนะ	84
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	85
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	92

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงไพรเมอร์ของยีน <i>MeHD-ZipIII</i> และ <i>MeTM</i> ที่ได้รับการออกแบบ โดยเพิ่มตำแหน่งของเอนไซม์ <i>BamHI</i> และ <i>SacI</i> เพื่อใช้ในการสร้าง โครงสร้างเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน	30
2	แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบหาต้นมันฝรั่งทรานส์เจนิค	35
3	แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ Semi-quantitative nested RT-PCR	38
4	แสดงผลการทำ differential display RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ A21 ถึง A40 รูปเจลเรียงตามระยะพัฒนาการของมันสำปะหลัง Fi TR และ SR ตามลำดับ	44
5	แสดงหน้าที่ของยีน <i>HD-ZIP</i> ทั้ง 4 กลุ่ม	48
6	แสดงลำดับกรดอะมิโนของ transmembrane protein ทั้ง 4 ตำแหน่ง	52

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของมันสำปะหลัง	7
2	แสดงระบบรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง	8
3	ลักษณะทางกายภาพของรากฝอยและรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง	10
4	แสดงขั้นตอนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างแป้งและการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลซูโครสที่เกิดขึ้นที่บริเวณคลอโรพลาสต์และไซโตซอล	12
5	แสดงกลไกการสร้างแป้งจากซูโครส	13
6	แสดงตำแหน่งของยีนต่างๆบน Ti plasmid	16
7	แสดงกระบวนการการส่งถ่ายยีนจาก <i>Agrobacterium tumefaciens</i> เข้าสู่เซลล์พืช	18
8	แสดงการแทรกเข้าจีโนมพืชของ T-DNA	18
9	แสดงการจัดวางอุปกรณ์สำหรับการเคลื่อนย้ายแถบดีเอ็นเอจากเจลลงสู่เมมเบรน	41
10	แสดงคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดจากรากระยะต่างๆ ของมันสำปะหลัง	43
11	ต้นไม้วิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของยีนกลุ่ม HD-ZIP ในพืช	47
12	แสดงการจำแนกกลุ่มของยีน HD-ZIP	48
13	ผลการเทียบเคียงลำดับกรดอะมิโนและการหา domain ของโปรตีนสมาชิกกลุ่ม MeHD-ZIPIII	49
14	แสดงผลการวิเคราะห์ transmembrane ในโครงสร้างโปรตีนของยีน integral membrane protein	51
15	แสดงผลการวิเคราะห์บริเวณและโครงสร้างของ transmembrane region ของยีน integral membrane protein ในมันสำปะหลัง	51
16	ตัวอย่างเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของกระบวนการพัฒนารากสะสมอาหารและเนื้อเยื่อส่วนเหนือพื้นดิน	53
17	ระดับการแสดงออกของยีน MeHD-ZIPIII ในเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของกระบวนการพัฒนารากสะสมอาหารและเนื้อเยื่อส่วนเหนือพื้นดิน	54
18	ระดับการแสดงออกของยีน MeTM ในเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของกระบวนการพัฒนารากสะสมอาหารและเนื้อเยื่อส่วนเหนือพื้นดิน	54
19	แสดงลักษณะโครงสร้างพลาสมิดสายผสมเพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีน MeHD-ZIPIII	55

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	แสดงลักษณะโครงสร้างพลาสมิดสายผสมเพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีน <i>MeTM</i>	56
21	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกลุ่ม <i>MeHD-ZIPIII</i>	57
22	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกลุ่ม <i>MeTM</i>	58
23	แสดงตำแหน่งที่ออกแบบฟอร์เวดและรีเวิร์สไพร์เมอร์ของยีน <i>MeHD-ZIPIII</i>	59
24	แสดงตำแหน่งที่ออกแบบฟอร์เวดและรีเวิร์สไพร์เมอร์ของยีน <i>MeTM</i>	60
25	แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน <i>MeHD-ZIPIII</i>	61
26	แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน <i>MeTM</i>	61
27	แสดงผลการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดสายผสมของยีน <i>MeHD-ZIPIII</i>	63
28	แสดงผลการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดสายผสมยีน <i>MeTM</i>	64
29	แสดงพลาสมิด pBI121:35S:: <i>MeHD-ZIPIII</i> และ pBI121:B33:: <i>MeHD-ZIPIII</i> ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>SacI</i> และ <i>BamHI</i>	65
30	แสดงพลาสมิด pBI121:35S:: <i>MeTM</i> #1,2 และ pBI121:B33:: <i>MeTM</i> #1,2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>SacI</i> และ <i>BamHI</i>	66
31	แสดงผลการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ของ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105	67
32	แสดงผลการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ของ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105	68
33	แสดงส่วนของ T-DNA ของพลาสมิดสายผสม	69
34	แสดงตำแหน่งของไพร์เมอร์บน T-DNA ที่ใช้ในการตรวจสอบหาต้นทรานส์เจนิคของยีน <i>MeHD-ZIPIII</i>	70
35	แสดงการตรวจหาต้นทรานส์เจนิคมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:35S:: <i>MeHD-ZIPIII</i>	71
36	แสดงการตรวจหาต้นทรานส์เจนิคมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:B33:: <i>MeHD-ZIPIII</i>	71
37	แสดงตำแหน่งของไพร์เมอร์บน T-DNA ที่ใช้ในการตรวจสอบหาต้นทรานส์เจนิคของยีน <i>MeTM</i>	73
38	แสดงการตรวจหาต้นทรานส์เจนิคมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:35S:: <i>MeTM</i>	73

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
39	แสดงการตรวจหาต้นทรานส์เจนิคมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:B33::MeTM	74
40	แสดงผลการแสดงออกของต้นทรานส์เจนิคที่ได้รับการถ่ายโอนยีน MeHD-ZIPIII	75
41	แสดงผลการแสดงออกของต้นทรานส์เจนิคที่ได้รับการถ่ายโอนยีน MeTM	76
42	แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ 2 คู่ที่ใช้ในการทำ Semi-quantitative Nested RT-PCR	78
43	แสดงผลการทำ Semi-quantitative Nested RT-PCR ของต้นทรานส์เจนิค ของยีน pBI:35S::MeHDZIPIII	78
44	แสดงผลการทำ Semi-quantitative Nested RT-PCR ของต้นทรานส์เจนิคของยีน pBI:35S::MeTM	79
45	แสดงตำแหน่งและขนาดของโพรบ NptII บน T-DNA	80
46	แสดงผลการสังเคราะห์ NptII โพรบ	80
47	แสดงผลการทำ Southern blot ของต้นทรานส์เจนิค	81

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

18S rRNA	=	18S ribosomal Ribonucleic Acid
Aux	=	Auxin
BLAST	=	Basic Local Alignment Search Tool
DNA	=	deoxyribonucleic acid
CaMV	=	Cauliflower mosaic virus
cDNA	=	complementary DNA
cm	=	centimeter
bp	=	DNA base pair
°C	=	degree Celsius
DDRT-PCR	=	Differential display Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction
DEGs	=	Differentially expressed genes
EST	=	expressed sequence tag
<i>et al.</i> ,	=	et alli/alia
FAO	=	Food and Agriculture Organization
Fi	=	Fibrous
GSP	=	gene specific primer
HD-Zip	=	Homeodomain-leucine zipper
IAA	=	Indole-3-acetic acid
l	=	liter
M	=	molar
MEGA	=	Molecular evolutionary genetics analysis program
mg	=	milligram
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
OAE	=	Office of Agricultural Economics
O.D.	=	optical density
μM	=	micromolar
NCBI	=	National Center for Biotechnology Information
nm	=	nanometer
<i>nptII</i>	=	ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ kanamycin

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

PCR	=	polymerase chain reaction
RT-PCR	=	reverse transcription PCR
RNA	=	ribonucleic acid
RNAi	=	RNA interference
®	=	registered
rRNA	=	ribosomal RNA
SR	=	Storage root
T-DNA	=	Transfer DNA
TM	=	Integral membrane protein
T _m	=	melting temperature
™	=	Trademark
<i>Taq</i>	=	<i>Thermus aquaticus</i>
TR	=	Transition root
UTR	=	untranslated region
v/v	=	volume by volume
w/v	=	weight by volume

การบ่งชี้และวิเคราะห์หน้าที่ของยีนควบคุมระบบที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรากสะสม อาหารของมันสำปะหลัง

Identification and Functional Analysis of Genes Involving in Storage Root Formation in Cassava

คำนำ

ปัจจุบันสถานการณ์ทางด้านอาหารและพลังงานฟอสซิลเข้าสู่ภาวะวิกฤตและคาดว่าจะทวีความรุนแรงขึ้นในอนาคตอันใกล้ โดยเฉพาะพลังงานเชื้อเพลิงที่มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วอันเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของประชากรอย่างต่อเนื่องและความเจริญก้าวหน้าของเทคโนโลยีที่ใช้พลังงานเชื้อเพลิงเป็นแหล่งกำเนิดพลังงานอย่างไม่หยุดยั้งทำให้ต้องมีมาตรการในการรองรับการขาดแคลนของพลังงานเชื้อเพลิงที่จะเกิดขึ้นในอนาคตอันใกล้และหนึ่งในกระบวนการที่จะนำมาใช้ในการทดแทนการสูญเสียของพลังงานเชื้อเพลิงนั้นคือ การผลิตเอทานอลเพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนพลังงานเชื้อเพลิง ขณะนี้ได้มีการนำเอทานอลซึ่งได้จากการแปรรูปวัสดุทางการเกษตร เช่น อ้อย กากน้ำตาลและมันสำปะหลัง มาใช้เป็นส่วนผสมกับน้ำมันเชื้อเพลิงเพื่อลดปริมาณการใช้พลังงานเชื้อเพลิง โดยในปัจจุบันแก๊สโซฮอล์ซึ่งมีส่วนผสมของเอทานอล 10% 20% และ 80% เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากมีราคาต่ำกว่าน้ำมันเบนซินและยังมีการเผาไหม้ที่สมบูรณ์ขึ้นเนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของแอลกอฮอล์ทำให้ลดมลพิษในอากาศได้อีกด้วย ซึ่งในขณะเดียวกันได้มีการพัฒนาการผลิตเครื่องยนต์ที่สามารถรองรับการใช้เอทานอล 100% เพื่อเป็นแหล่งพลังงานในการขับเคลื่อน รวมถึงแนวโน้มของความต้องการใช้ปริมาณเอทานอลที่สูงขึ้นในอนาคตอีกด้วย ดังนั้นผลผลิตทางการเกษตรที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลจึงจำเป็นต้องมีปริมาณที่สูงขึ้นตามไปด้วย การวิจัยและพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีผลผลิตที่สูงขึ้นจึงเป็นหนึ่งในยุทธศาสตร์ที่ถูกนำมาใช้เพื่อพัฒนาสายพันธุ์พืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

มันสำปะหลังมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกาใต้บริเวณลุ่มแม่น้ำอะเมซอนในประเทศบราซิลโดยมันสำปะหลังจัดเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของโลกเขตร้อนรวมทั้งประเทศไทยมีการเพาะปลูกเป็นบริเวณกว้างเพื่อนำรากสะสมอาหารซึ่งอุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรตมาใช้ในการบริโภคและตัดแปรเป็นวัตถุดิบในวงการอุตสาหกรรมหลากหลายชนิด รวมถึงอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานทางเลือกแทนที่พลังงานเชื้อเพลิงที่กำลังจะหมดไป จึงถือได้

ว่ามันสำปะหลังนั้นเป็นพืชที่มีศักยภาพที่จะสามารถตอบโจทย์ของวิกฤตการณ์ทั้งในด้านอาหารและพลังงานได้ ซึ่งเป้าหมายหลักของการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาสายพันธุ์มันสำปะหลังคือการเพิ่มผลผลิตของรากสะสมอาหารให้เพียงพอเพื่อตอบสนองความต้องการในการนำไปใช้ในการบริโภคและการผลิตเอทานอลซึ่งนับแต่จะมีสูงขึ้นอยู่ตลอดเวลา ทั้งนี้ที่ผ่านมาได้มีความพยายามในการปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์มันสำปะหลังที่ให้ผลผลิตรากสะสมอาหารสูง และประสบความสำเร็จในการนำสายพันธุ์ใหม่ที่ได้พัฒนาขึ้นมาอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังนั้นทำได้ยากและใช้เวลานาน โดยสาเหตุหลักนั้นเนื่องมาจากฐานข้อมูลพันธุกรรมของมันสำปะหลังที่มีอยู่น้อยมากทำให้ประสิทธิภาพและความแม่นยำในการคัดเลือกสายพันธุ์นั้นต่ำ จึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนในการศึกษาเพื่อให้ทราบถึงกลไกพันธุกรรมควบคุมการชักนำและพัฒนาของรากสะสมอาหารในมันสำปะหลังอย่างถ่องแท้และนำองค์ความรู้ที่ได้ไปช่วยเสริมให้การปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีความเป็นเลิศในการสร้างรากสะสมอาหารตามที่ต้องการให้มีความถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วยิ่งขึ้น

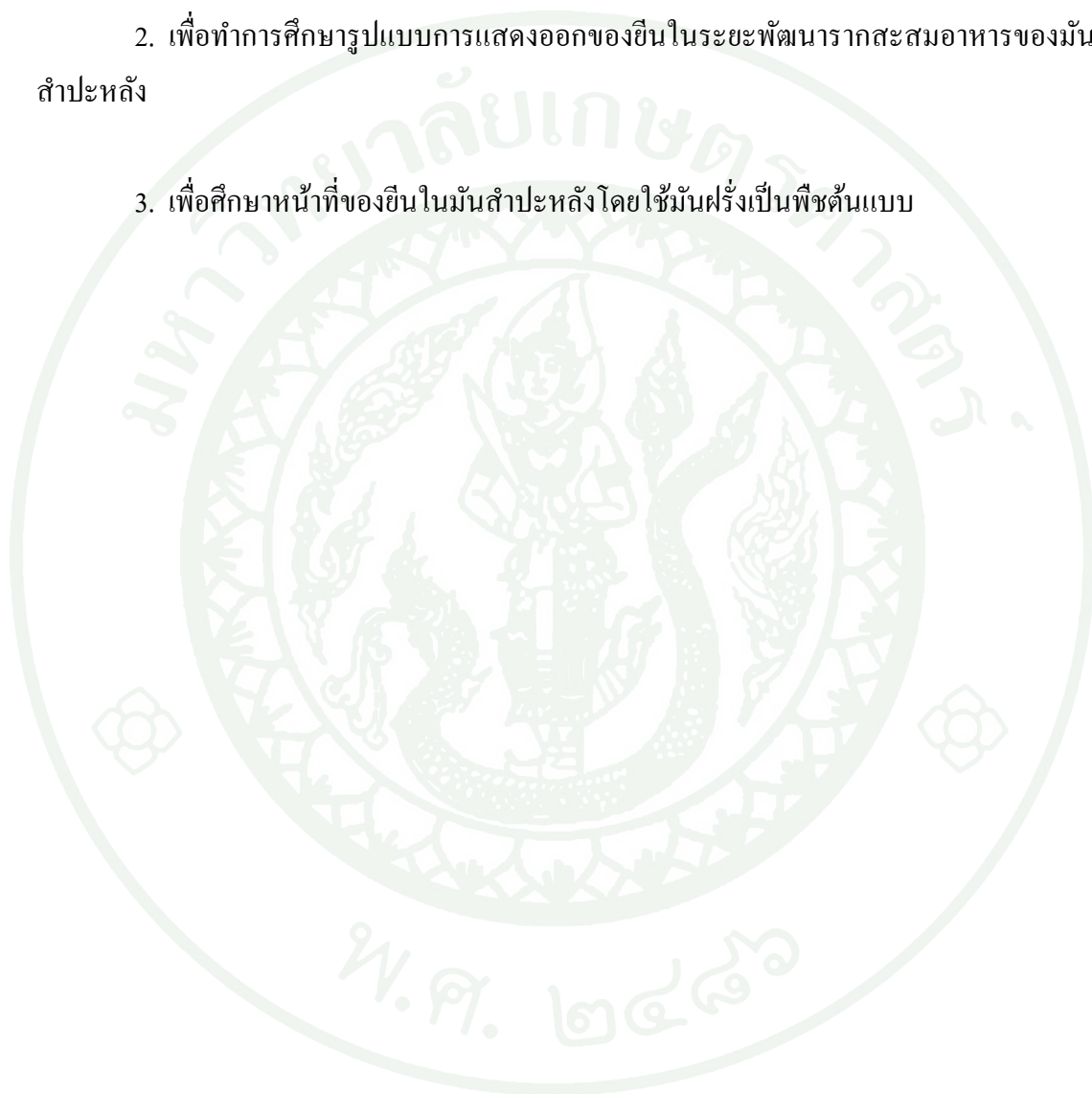
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความพยายามในการสร้างฐานองค์ความรู้ของทางพันธุกรรมที่ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการพัฒนาและเจริญเติบโตของรากสะสมอาหารมันสำปะหลัง เพื่อเสริมสร้างศักยภาพของการนำความก้าวหน้าของเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์ของมันสำปะหลัง เพื่อเป้าหมายของผลผลิตรากมันสำปะหลังที่สูงขึ้นสำหรับรองรับกับความต้องการในการนำไปใช้ประโยชน์ในหลากหลายอุตสาหกรรม รวมถึงกระบวนการผลิตเอทานอล ซึ่งมันสำปะหลังเป็นพืชที่ทนต่อสภาพที่แห้งแล้งและสามารถเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ นอกจากนี้มันสำปะหลังยังเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญของมนุษย์และสัตว์ เนื่องด้วยส่วนหัวของมันสำปะหลังสามารถสร้างและสะสมแป้งซึ่งเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญรองมาจากอ้อย ส่งผลให้มันสำปะหลังเป็นแหล่งพลังงานที่ถูกที่สุดเพื่อเป็นแหล่งอาหารของทั้งคนและสัตว์ วิทยานิพนธ์นี้เลือกนำวิธีที่จะใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาระบบรากสะสมอาหารของมันสำปะหลังคือ การสืบค้นยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในช่วงระยะต่างๆ ของการพัฒนารากสะสมอาหารด้วยกรรมวิธี differential display โดยเทคนิคนี้จะสามารถแยกการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในระยะต่างๆ ระหว่างการพัฒนาไปเป็นรากสะสมอาหารได้โดยใช้ cDNA ที่ได้จาก mRNA เป็นแม่แบบในการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์แบบสุ่ม ซึ่งผลที่ได้จากการทำ differential display สามารถทำให้แยกได้ว่าที่ระยะการเจริญต่าง ๆ ของมันสำปะหลังมีแถบดีเอ็นเอใดบ้างที่แตกต่างกันจึงทำการเลือกแถบดีเอ็นเอที่สนใจไปทำการศึกษาต่อเพื่อค้นหายีนที่มีบทบาทในกระบวนการกระตุ้นให้เกิดรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง และนำไปสู่การพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีศักยภาพสูงใน

การสร้างรากสะสมอาหารต่อไปซึ่งผลงานที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นส่วนหนึ่งของคลังความรู้พื้นฐานของเครือข่ายพันธมิตรที่ควบคุมการสร้างและพัฒนาของรากสะสมอาหารมันสำปะหลังที่นับว่ายังมีความขาดแคลนอยู่ และจะเป็นรากฐานสำคัญที่จะสามารถนำไปสู่การพัฒนาสายพันธุ์มันสำปะหลังที่มีความเป็นเลิศของผลผลิตรากสะสมอาหารเพื่อตอบสนองต่อความต้องการใช้ประโยชน์จากแป้งมันสำปะหลังได้อย่างเป็นรูปธรรม ทั้งนี้เพื่อเป็นการส่งเสริมให้ประเทศไทยมีความมั่นคงทางอาหารและพลังงานในอนาคต ทำให้สามารถแก้ไขปัญหาเรื่องการขาดแคลนคาร์โบไฮเดรตในพื้นที่ห่างไกลที่มีปัจจัยจากเรื่องปริมาณอาหารไม่เพียงพอต่อการบริโภคในบางพื้นที่นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มปริมาณการส่งออกผลิตภัณฑ์จากมันสำปะหลังได้อีกด้วย



วัตถุประสงค์

1. เพื่อสืบค้นยีนที่มีการแสดงออกสูงในช่วงการพัฒนารากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง
2. เพื่อทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนในระยะพัฒนารากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง
3. เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนในมันสำปะหลังโดยใช้มันฝรั่งเป็นพืชต้นแบบ



การตรวจเอกสาร

1. มันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง มีชื่อเรียกสามัญว่า Cassava หรือ Manioc หรือ Tapioca มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Manihot esculenta* Crantz. เป็นพืชอยู่ในจิ้นัส *Manihot* ภายใต้แฟมิลี่ Euphorbiaceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในที่ลุ่มเขตร้อนแถบทวีปอเมริกาใต้บริเวณลุ่มแม่น้ำอะเมซอนในฝั่งตะวันตกของประเทศบราซิล (Olsen *et al.*, 1999) ตั้งแต่ประมาณ 10,000 ปีก่อนคริสต์ศักราช จากนั้นมีหลักฐานการพบมันสำปะหลังที่ประเทศเม็กซิโกและประเทศเอลซัลวาดอร์และทวีปยุโรป ส่วนในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้นั้นมันสำปะหลังได้ถูกนำเข้ามาปลูกโดยชาวยุโรปในยุคสมัยการล่าอาณานิคม ในปัจจุบันการปลูกมันสำปะหลังมีการนิยมนปลูกกันอย่างแพร่หลายในทุกทวีปทั่วโลกและมันสำปะหลังกลายเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย และอินโดนีเซีย เนื่องจากมันสำปะหลังเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ในพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินต่ำ และพื้นที่ที่มีความแห้งแล้งรวมถึงพื้นที่ที่มีสภาวะเป็นกรดได้ (Mussio *et al.*, 2006) และผลผลิตมันสำปะหลังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายทั้งทางตรงและทางอ้อม ไม่ว่าจะเป็นการใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมและการนำมาใช้เป็นอาหารของทั้งมนุษย์และสัตว์ เนื่องจากมันสำปะหลังสามารถสร้างและสะสมคาร์โบไฮเดรตได้ในปริมาณที่สูง โดยมันสำปะหลังสามารถสร้างคาร์โบไฮเดรตได้มากกว่าข้าวถึง 40% และมากกว่าข้าวโพด 25% ส่งผลให้มันสำปะหลังเป็นแหล่งพลังงานที่ถูกที่สุด มันสำปะหลังเป็นพืชอาหารที่สำคัญเป็นอันดับที่ 5 ของโลก รองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว และมันฝรั่ง ทั้งยังเป็นแหล่งพลังงานของคนอีกมากกว่า 750 ล้านคนทั่วโลก (Cock, 1982; Nassar and Ortiz, 2010; Yang *et al.*, 2011) โดยประมาณ 70% ของผลผลิตของมันสำปะหลังใช้เพื่อเป็นอาหารของมนุษย์และอีก 30% ใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบของการผลิตอาหารสัตว์และในงานอุตสาหกรรม เช่น การผลิตแป้งมันสำปะหลัง การแปรรูปมันสำปะหลังอัดเม็ด การผลิตมันสำปะหลังแบบเส้น รวมไปถึงการผลิตแอลกอฮอล์ซึ่งมีสถานะของความจำเป็นอย่างมากในการนำมาใช้ที่เป็นพลังงานทดแทนพลังงานเชื้อเพลิงในสภาวะที่พลังงานเชื้อเพลิงมีน้อยหรือลดลงอย่างรวดเร็วในปัจจุบันนี้

2. มันสำปะหลังในประเทศไทย

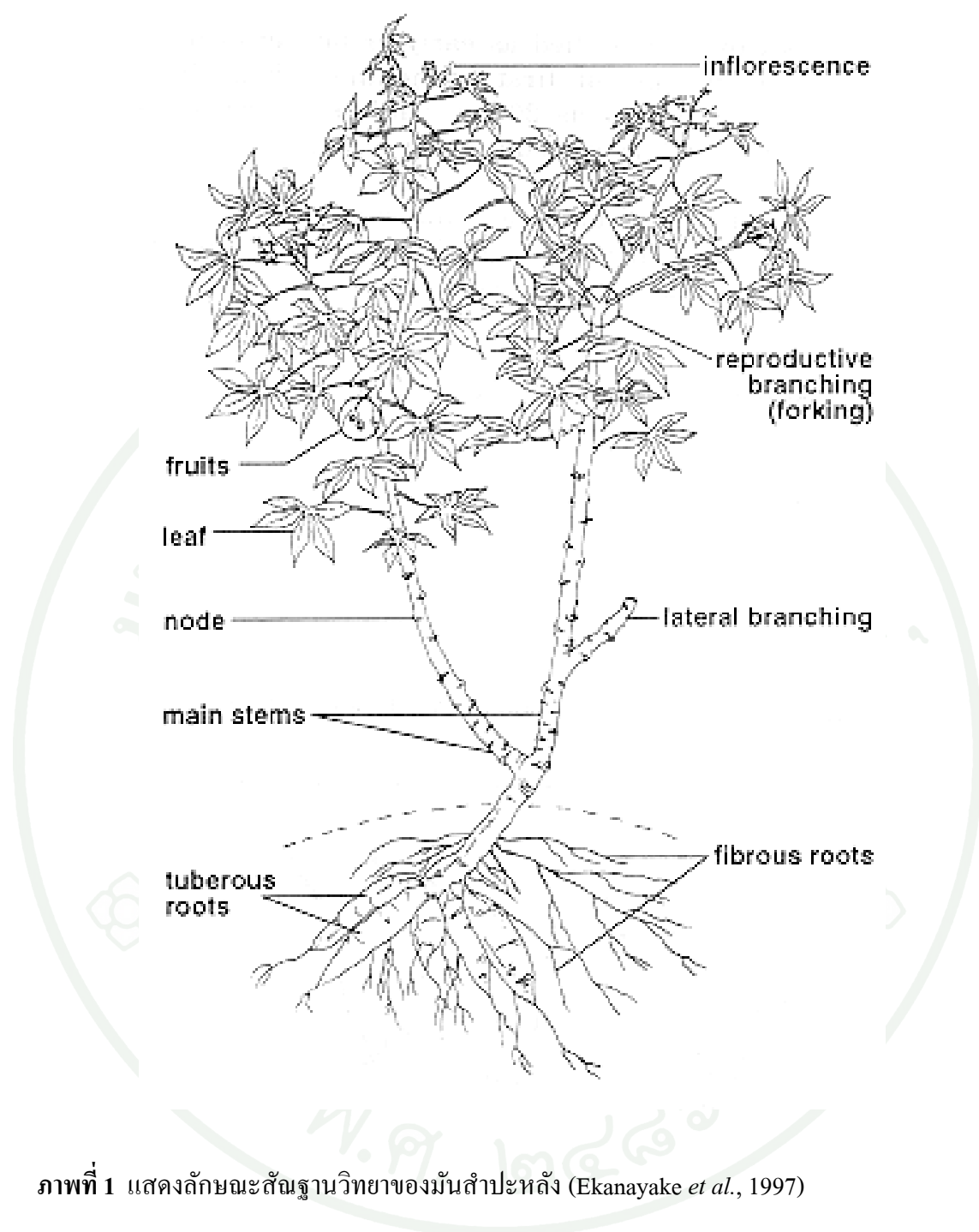
เนื่องจากมันสำปะหลังเป็นพืชที่สามารถเพาะปลูกได้ในพื้นที่ที่มีความสมบูรณ์ของแร่ธาตุอาหารในดินต่ำ ทนต่อสภาวะแห้งแล้งจึงทำให้เป็นที่นิยมปลูกกันอย่างแพร่หลาย ดังนั้นประเทศไทยจึงเป็นประเทศที่มีการส่งออกมันสำปะหลังมากที่สุดในโลก ประเทศที่ไทยส่งผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังในรูปของมันอัดเม็ดไปขายมากที่สุดคือ ประเทศในกลุ่มประชาคมยุโรป (เนเธอร์แลนด์ สเปน เยอรมัน โปรตุเกส) เกาหลีใต้และญี่ปุ่น ส่วนในรูปของแป้งมันสำปะหลัง ประเทศญี่ปุ่นสั่งซื้อ มากที่สุด รองลงมาคือ ฮองกง สหรัฐอเมริกา มาเลเซีย สิงคโปร์ และไต้หวัน (กรมวิชาการเกษตร., 2009) ประเทศไทยมีการส่งออกมันสำปะหลังมานานกว่า 50 ปี และมันสำปะหลังถือเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเป็นอันดับ 3 ของประเทศไทยรองจากข้าว และอ้อย (Sriroth *et al.*, 2007)

3. การใช้ประโยชน์จากมันสำปะหลัง

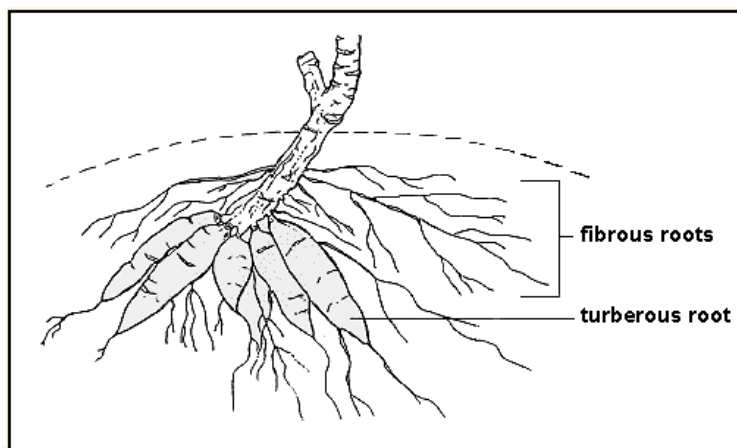
การใช้ประโยชน์จากมันสำปะหลังในการนำมาบริโภคเนื่องจากในประเทศไทยมีการบริโภคข้าวเป็นหลักคาร์โบไฮเดรตหลักดังนั้นมันสำปะหลังจึงไม่นิยมนำมาบริโภคแต่มันสำปะหลังถูกนำไปแปรรูปเป็นอาหารหวาน ถูกนำมาดัดแปรเป็นผลิตภัณฑ์แป้งเพื่อใช้ในการประกอบในอาหาร การใช้ประโยชน์จากมันสำปะหลังในงานอุตสาหกรรมมีการนำมันสำปะหลังมาใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ การผลิตยา ไปจนถึงการใช้มันสำปะหลังในการผลิตพลังงานทดแทน เอทานอลเพื่อใช้ในการทดแทนพลังงานเชื้อเพลิง

4. ลักษณะวิทยาของมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมีลักษณะเป็นไม้พุ่ม ลำต้นตั้งตรงเป็นไม้เนื้อแข็ง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-6 เซนติเมตร มีความสูง 1-5 เมตร ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ลักษณะของใบเป็นแบบใบเดี่ยวเกิดหมุนเวียนรอบลำต้น ที่แผ่นใบมีลักษณะเป็นแฉก 3-9 แฉก มีช่อดอกเป็นแบบ panical คือมีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกันแต่แยกกันอยู่คนละดอก ช่อดอกมักเกิดที่บริเวณปลายยอดของลำต้นหรือกิ่ง ดอกตัวผู้มีขนาดเล็กกว่าดอกตัวเมีย ดอกตัวผู้มักอยู่บริเวณส่วนปลายหรือยอดของช่อดอก ส่วนดอกตัวเมียมักอยู่บริเวณส่วนโคนของช่อดอก ทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียไม่มีกลีบดอก มีกลีบรองดอก 5 กลีบ ภายในดอกตัวผู้มีเกสรตัวผู้ 10 อันแบ่งเป็น 2 วง วงละ 5 อัน ส่วนภายในดอกเกสรตัวเมียตรงกลางเป็นเกสรตัวเมียและรังไข่มี 3 carpel แต่ละ carpel มี 1 ovule



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของมันสำปะหลัง (Ekanayake *et al.*, 1997)



ภาพที่ 2 แสดงระบบรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง

5. การพัฒนารากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง

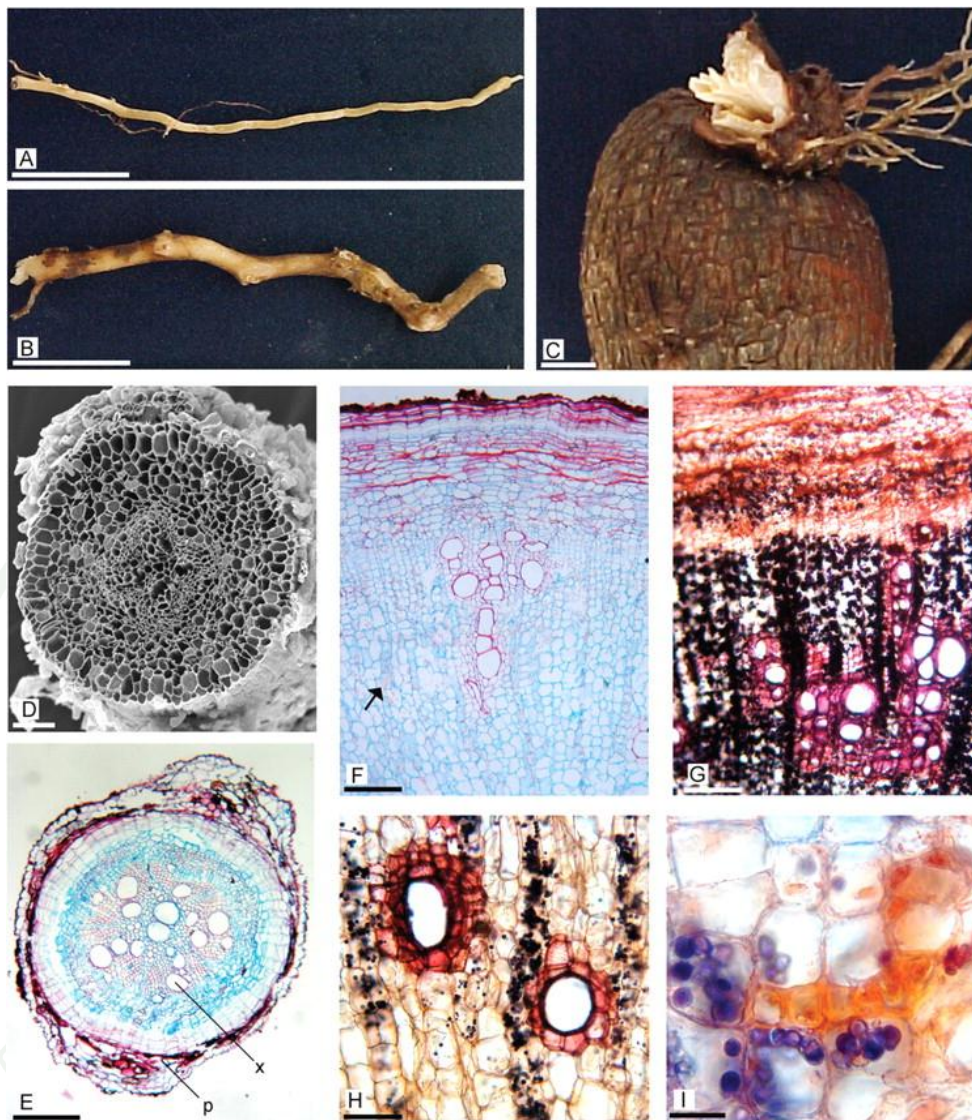
มันสำปะหลังมีการขยายพันธุ์โดยการปักท่อนพันธุ์ยาวประมาณ 15-20 เซนติเมตร ปักลงในดิน โดยท่อนพันธุ์ที่ใช้มีอายุ 8-12 เดือน จากนั้นประมาณ 5-15 วันจะมีการสร้างรากออกมาจากผิวของท่อนพันธุ์โดยที่รากที่สร้างนี้จะเป็นฝอยโดยจะเริ่มงอกออกจากท่อนพันธุ์ เรียกรากชนิดนี้ว่า adventitious roots มีหน้าที่ในการดูดน้ำและแร่ธาตุในช่วงแรก จากนั้นรากฝอยจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นรากสะสมอาหาร โดยมีการพัฒนาของของเซลล์บริเวณ vascular cambium แต่ไม่ใช่ทุกรากที่จะสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นรากสะสมอาหาร รากที่ไม่ได้เปลี่ยนแปลงไปเป็นรากสะสมอาหารจะมีหน้าที่ในการลำเลียงน้ำและแร่ธาตุเพื่อเป็นอาหารให้ต้นมันสำปะหลัง ในการเปลี่ยนแปลงของรากฝอยไปเป็นรากสะสมอาหารนั้นจะเกิดขึ้นตั้งแต่ช่วงเวลากลางวันจะเกิดการสังเคราะห์แสงขึ้นที่บริเวณใบของมันสำปะหลังแป้งที่เกิดจากการสังเคราะห์แสงในช่วงกลางวันนี้เรียกว่า transitory starch จะถูกเก็บสะสมไว้ในเม็ดคอลลอโรพลาสที่บริเวณใบมันสำปะหลังแล้วในช่วงกลางคืนจะเกิดการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลซูโครสแล้วถูกลำเลียงผ่านท่อลำเลียงอาหาร เพื่อนำไปเก็บสะสมไว้ที่บริเวณเนื้อเยื่อพาราเนโครมาของราก ทำให้บริเวณเนื้อเยื่อพาราเนโครมาเกิดการขยายตัวในแนวขวางเพื่อเพิ่มพื้นที่ในการเก็บสะสมแป้งดังนั้นรากที่มีการสะสมอาหารจึงมีลักษณะโป่งพอง

ระบบรากสะสมอาหารของมันสำปะหลังมีลักษณะแตกต่างจากรากชนิดอื่นคือ รากสะสมอาหารของมันสำปะหลังมีหน้าที่ในการเก็บสะสมอาหารที่มีสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรตไขมันและโปรตีน รากสะสมอาหารของมันสำปะหลังเป็นผลมาจากการงอกออกของรากผ่านการเติบโตในระดับทุติยภูมิ (secondary growth) รากสะสมอาหารของมันสำปะหลังประกอบด้วย

เนื้อเยื่อ 5 ชั้น โดยชั้นนอกสุดประกอบด้วย phellogen และ phelloderm ชั้นที่สองประกอบด้วย ท่อลำเลียงอาหารและเนื้อเยื่อลำเลียง ชั้นที่สามประกอบด้วย เซลล์พารენไคมาในระยะเริ่มมีการพัฒนา ชั้นที่สี่ประกอบด้วยท่อลำเลียงน้ำทุดิยภูมิและเซลล์พารენไคมาที่พัฒนาแล้ว ชั้นที่ห้าประกอบด้วยท่อลำเลียงน้ำปฐมภูมิและเซลล์พารენไคมาที่พัฒนาสมบูรณ์ (Souza., 2003)

6. ยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาอวัยวะสะสมอาหาร

กลไกการพัฒนาอวัยวะสะสมอาหารและกระบวนการเก็บสะสมแป้งนั้นเกิดจากการเจริญเติบโตแบบทุดิยภูมิของเนื้อเยื่อหลายชนิด (Pardales and Yamauchi., 2003) ปัจจัยทางสภาพแวดล้อมก็มีผลต่อกระบวนการสะสมอาหารของรากโดยเฉพาะช่วงความยาวของแสง (Ewing and Struik., 1992) ช่วงวันที่สั้นและอุณหภูมิที่ต่ำชักนำให้เกิดการสะสมอาหาร และปฏิกิริยาของฮอร์โมนต่างๆ เช่น ออกซิน ไซโตโคนิน กรดจัสโมนิก และกรดแอบไซคอปิกรวมไปจนถึงการแสดงออกของยีน (Ravi *et al.*, 2009) ล้วนมีผลต่อการพัฒนาของอวัยวะสะสมอาหาร ในการสร้างอวัยวะสะสมอาหารของมันสำปะหลังมี 25 วิธีที่สำคัญโดยเฉพาะวิถีไกลโคไรซิสและกลูโคโนโอจีนีซิส (Jun *et al.*, 2011) จากงานวิจัยของ Tanaka และคณะ ในปี 2005 ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสะสมอาหารในมันเทศจำนวน 10 ยีน คือ SRF 1-10 พบว่า ยีน SRF1 SRF2 SRF3 SRF5 SRF6 SRF7 และ SRF9 มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในช่วงของการพัฒนารากสะสมอาหารและเมื่อทำการถอดรหัสยีน SRF6 พบว่ามีส่วนเป็น receptor-like kinase (RLK) ซึ่งมีส่วนประกอบของ Leucine rich repeat (LRRs) และพบการแสดงออกของยีนสูงในบริเวณ primary cambium และเนื้อเยื่อเจริญบริเวณที่ลำเลียงซึ่งเนื้อเยื่อเหล่านี้จะถูกพัฒนาไปเป็นส่วนสะสมอาหาร

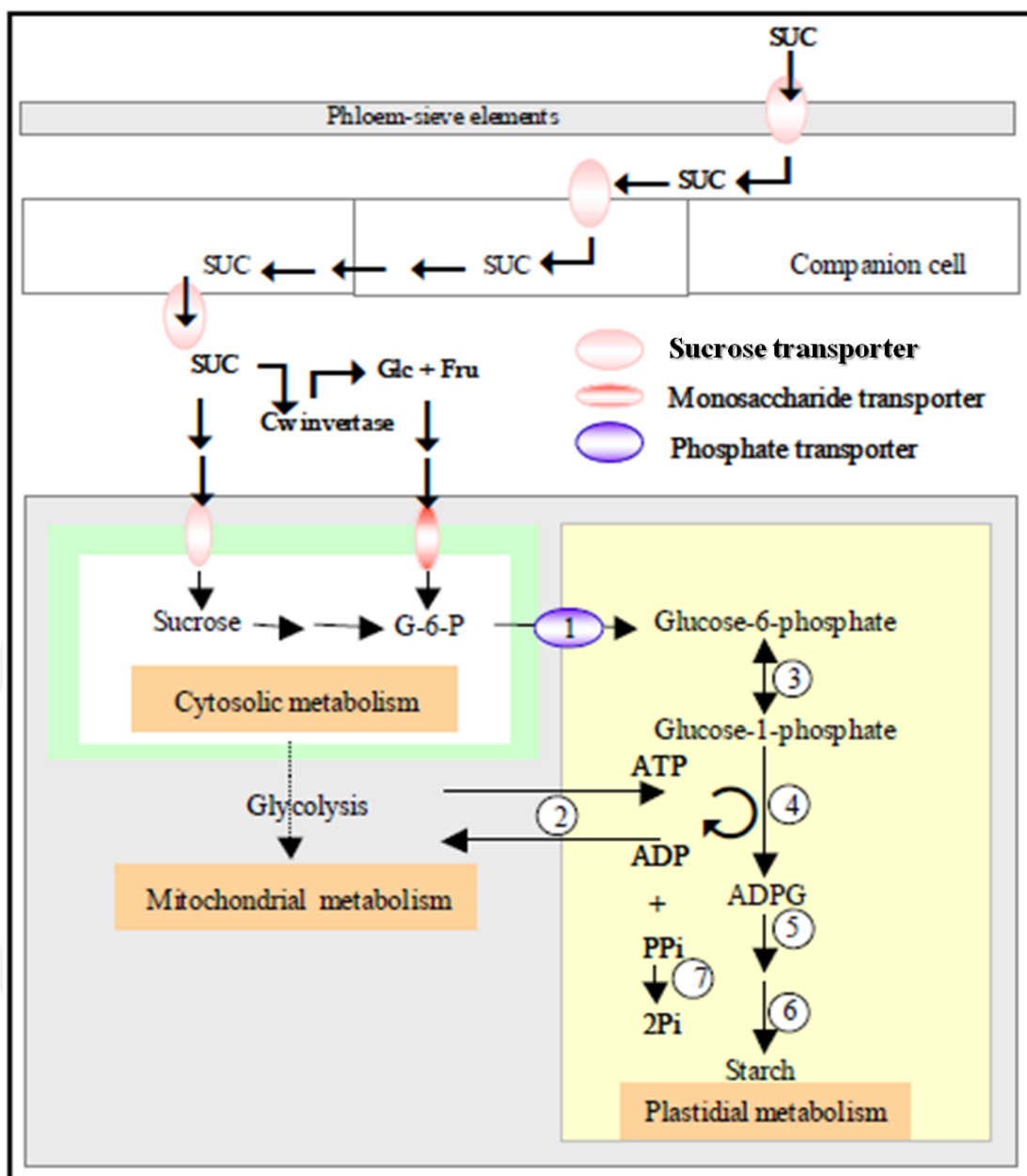


ภาพที่ 3 ลักษณะทางกายภาพของรากฝอยและรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง A. รากฝอยปฐมภูมิ B. รากฝอยทุติยภูมิ C. รากสะสมอาหารที่ยึดติดกับลำต้น D. ภาพตัดขวางของรากฝอยปฐมภูมิ E. ภาพตัดขวางของรากฝอยทุติยภูมิ X คือ ท่อลำเลียงน้ำทุติยภูมิ P คือ periderm F. ภาพตัดขวางของรากสะสมอาหาร ที่ถูกย้อมด้วย safranin G-I คือ ภาพตัดขวางของรากสะสมอาหารที่ย้อมด้วยซาฟรานิน ugol's reagent. H. secondary xylem. I. secondary phloem. (Medina *et al.*, 2007)

7. กลไกการสร้างแป้ง

กลไกการสร้างแป้งและสะสมอาหารในอวัยวะสะสมอาหารนั้นเริ่มต้นที่คลอโรพลาสต์ใน ส่วนของใบในเวลากลางวันประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน คือ 1. การสร้าง glucose-6-phosphate 2. ขั้นตอนการสังเคราะห์ ADP-glucose (ADPG) จาก Glc-1-P และขั้นตอนสุดท้ายคือ การสังเคราะห์แป้งจาก ADPG ในขั้นตอนแรกของการสร้างแป้งเริ่มจากการสังเคราะห์ glucose-6-phosphate ผ่าน Calvin-Benson cycle ได้ fructose-6-phosphate จากนั้นเอนไซม์ phosphoglucosyltransferase (PGT) จะทำการเปลี่ยน fructose-6-phosphate ได้เป็น glucose-6-phosphate ขั้นตอนถัดมาเอนไซม์ phosphoglucomutase (PGM) จะทำการเปลี่ยน glucose-6-phosphate ได้เป็น glucose-1-phosphate และ glucose-1-phosphate จะถูกเปลี่ยนเป็น ADP-glucose โดยเอนไซม์ ADPGlc pyrophosphorylase (AGPase) จากนั้นขั้นตอนสุดท้ายคือขั้นตอนการสังเคราะห์แป้งจาก ADPG โดยเอนไซม์ Starch synthases branching enzymes และ debranching enzymes (SSBE, DBE) ได้เป็นแป้งเก็บไว้ในคลอโรพลาสต์ชั่วคราวเรียกว่า transitory starch

ในเวลากลางคืนแป้งที่ถูกเก็บสะสมไว้ชั่วคราวในคลอโรพลาสต์จะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลซูโครสแล้วผ่านกระบวนการลำเลียงทางท่อลำเลียงอาหาร (Phloem) จากใบไปที่ราก โดยการเปลี่ยน transitory starch เป็นน้ำตาลซูโครสเริ่มจากมีการเติมหมู่ฟอสเฟตที่โมเลกุลของแป้งจากนั้น จะเกิดปฏิกิริยา dephosphorylation และ glucan hydrolysis เปลี่ยนโมเลกุลของแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคสและมอลโทสโดย debranching enzyme และ α -amylase เพื่อลำเลียงสู่ไซโทซอลในไซโทซอลมอลโทสจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสโดย disproportionating enzyme จากนั้นน้ำตาลกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็น glucose-6-phosphate โดย hexokinase และเปลี่ยนเป็น glucose-1-phosphate โดย phosphoglucomutase ขั้นตอนต่อไป glucose-1-phosphate ถูกเปลี่ยนเป็น UDPGlc โดย UDPglucose pyrophosphorylase และขั้นตอนสุดท้ายคือการเปลี่ยน UDPGlc เป็นซูโครสโดยเอนไซม์ sucrose-phosphate synthase และ sucrose phosphate phosphatase เมื่อได้ซูโครสแล้ว จากนั้นซูโครสจะถูกลำเลียงผ่านท่อลำเลียงจากใบลงไปสู่ราก ขั้นตอนดังที่ได้กล่าวมาแสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 5 แสดงกลไกการสร้างแป้งจากซูโครส (Yuna., 2004)

น้ำตาลซูโครสจะถูกลำเลียงจากใบมายังอวัยวะเก็บสะสมอาหารทางท่อโฟลเอ็ม (Phloem) และถูกลำเลียงออกจากท่อลำเลียงทาง sucrose transporter ผ่านเข้าและออกจาก companion cell เพื่อเข้าสู่เซลล์พารานไคมาจากนั้นน้ำตาลซูโครสจะเปลี่ยนเป็น glucose-6-phosphate และ glucose-6-phosphate จะถูกลำเลียงผ่านทาง glucose-6-phosphate transporter ออกจากเซลล์พารานไคมาเพื่อเข้าสู่อะไมโลพลาสต์ซึ่งเป็นเม็คสิสำหรับเก็บสะสมแป้ง ซึ่งในอะไมโลพลาสต์จะเกิดกระบวนการเปลี่ยน glucose-6-phosphate เป็น glucose-1-phosphate โดยเอนไซม์ phosphoglucomutase จากนั้น

glucose-1-phosphate จะถูกเปลี่ยนเป็น ADPglucose โดยเอนไซม์ ADP-glucose pyrophosphorylase ซึ่ง ADPglucose จะถูกสร้างเป็นแป้งโดยเอนไซม์ starch synthases และ starch branching enzymes และถูกเก็บสะสมไว้ใน อะไมโลพลาสของอวัยวะสะสมอาหาร ขึ้นตอนดังที่กล่าวมาแสดงดังภาพที่ 5

8. Differential Display reverse transcription PCR (DDRT-PCR)

เทคนิค differential display reverse transcription PCR (DDRT-PCR) นั้นได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในแต่ละเนื้อเยื่อของเซลล์ยูคาริโอต โดยเทคนิคนี้ใช้ในการเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีนระหว่างตัวอย่าง 2 ตัวอย่างขึ้นไป โดยใช้ cDNA ที่ได้จากการถอดรหัสของ mRNA เป็นต้นแบบในการทำ PCR และใช้ไพรมเมอร์แบบสุ่ม จากนั้นใช้ gel electrophoresis ในการแยกขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้และทำการเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอระหว่างตัวอย่างที่เป็นเป้าหมายในการศึกษาการแสดงออก ซึ่งวิธีนี้เป็นแนวทางเลือกใหม่ที่จะสามารถค้นหา functional candidate gene ใหม่ ๆ จึงเป็นกุญแจที่สำคัญที่นำไปสู่การค้นพบองค์ความรู้ใหม่ในระดับโมเลกุล ที่จะช่วยให้เข้าใจถึงกลไกที่สำคัญซึ่งควบคุมลักษณะการให้ผลผลิตต่างๆ ทำให้สามารถเสริมช่วยพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ในขั้นตอนการทำการทดลอง ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ 1 ขั้นตอนของการทำ reverse transcription โคนใช้ไพรมเมอร์ที่จำเพาะในการสร้างสาย cDNA ขั้นตอนที่ 2 คือ ขั้นตอนของการทำ PCR ข้อดีของ DDRT-PCR คือ สามารถใช้ในการจำลองการทำงานของยีนว่ามีมากหรือน้อยโดยมีข้อได้เปรียบที่สามารถทำการเปรียบเทียบกันที่หลายตัวอย่างและยังสามารถแสดงรูปแบบของการแสดงออกของยีนให้เห็นในยีนที่มีการแสดงออกปานกลาง ไปจนถึงยีนที่มีการแสดงออกต่ำและยังมีขั้นตอนการทดลองที่ง่ายเนื่องจาก differential display มีขั้นตอนการทำการทดลองเหมือนการทำ PCR และ DNA sequencing gel electrophoresis นอกจากนี้ differential display ยังใช้ระยะเวลาที่สั้นในการทำการทดลอง

9. การศึกษาหน้าที่ของยีน

การศึกษาหน้าที่การทำงานของยีนเป้าหมายมีวิธีที่นิยมใช้ 2 วิธีคือ การเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนและการลดระดับการแสดงออกของยีน 1) ในการศึกษาหน้าที่การทำงานของยีนโดยการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนและทำการติดตามการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นถูกนำมาใช้ภายใต้โปรโมเตอร์ที่แตกต่างกัน 2 ประเภท คือ โปรโมเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออก

ทุกส่วนของพืช เช่น *CaMV35S* โปรโมเตอร์จาก cauliflower mosaic virus เป็นโปรโมเตอร์ที่นิยมใช้ทั่วไปในการทำพันธุวิศวกรรมพืชเนื่องจากเป็นโปรโมเตอร์ที่ชักนำให้ยีนมีการแสดงออกในระดับสูงในทุกเนื้อเยื่อ ในงานวิจัยของ Anjan และคณะในปี 2006 ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *SIBEL5* ในต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมันฝรั่งภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ *CaMV35S* โปรโมเตอร์พบว่าต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมันฝรั่งมีการแสดงออกของยีนในทุกส่วนของพืช และเมื่อศึกษาการลักษณะการแสดงออกของยีนที่อวัยวะสะสมอาหารของต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมันฝรั่งพบว่าการสร้างส่วนสะสมอาหารมากกว่ามันฝรั่งที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน และโปรโมเตอร์ที่จำเพาะกับเนื้อเยื่อ เช่น *papatin* โปรโมเตอร์ เป็นโปรโมเตอร์ที่จำเพาะกับอวัยวะสะสมอาหารถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีนที่จำเพาะกับอวัยวะสะสมอาหาร ในงานวิจัยของ Uzoma และคณะในปี 2006 ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *glgC* ในมันสำปะหลังภายใต้การควบคุมของ *papatin* โปรโมเตอร์ พบว่าในต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมีการแสดงออกของยีนเฉพาะในรากสะสมอาหารไม่มีการแสดงออกของยีนในใบและลำต้น 2) การลดระดับการแสดงออกของยีนคือการทำให้หน้าที่ของยีนที่ต้องการศึกษามีการเปลี่ยนแปลงไปโดยการลดระดับการแสดงออกของยีน Gene knock-down หรือการทำให้ยีนสูญเสียหน้าที่ในการแสดงออก gene knock-out วิธีที่นิยมนำมาใช้เพื่อลดการแสดงออกของยีนคือการทำ RNA interference (RNAi) เป็นกลไกที่สิ่งมีชีวิตตอบสนองเพื่อต่อต้านไม่ให้มีการแสดงออกของยีนผู้บุกรุก มีการนำหลักการดังกล่าวไปใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนในพืช

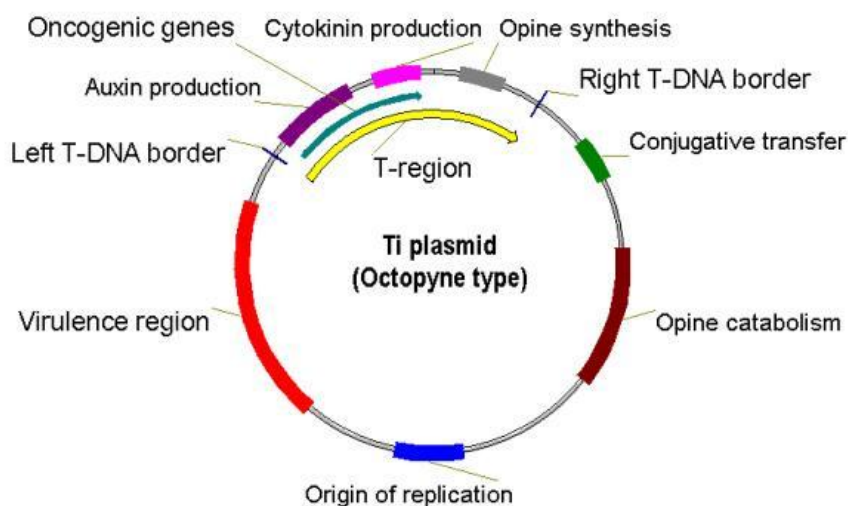
10. การถ่ายยีนเข้าสู่พืช

ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชเพื่อศึกษาหน้าที่การทำงานของการทำงานของยีนเข้าสู่พืชเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงในการศึกษาหน้าที่การทำงานของพืชในการทำงานวิจัยทางด้านพืช วิธีที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชที่มีประสิทธิภาพสูงที่นิยมใช้คือ การใช้ *Agrobacterium* เป็นตัวกลางในการถ่ายยีน

การถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นตัวกลาง

Agrobacterium tumefaciens แบคทีเรียแกรมลบอาศัยอยู่ในดิน สามารถก่อให้เกิดโรค crown gall disease ในพืชจากการที่ *Agrobacterium tumefaciens* จะเข้าสู่พืชในบริเวณที่มีบาดแผลของพืชเนื่องจากบริเวณบาดแผลของพืชมีสารประกอบประเภทฟีนอลิกเป็นตัวกระตุ้นให้ *Agrobacterium tumefaciens* เกิดการส่งถ่ายยีนจาก *Agrobacterium tumefaciens* เข้าสู่ในจีโนมของพืชทำให้พืชเกิดการแบ่งเซลล์อย่างไม่หยุดยั้งเป็นผลมาจากการทำงานของยีนบน Tumor inducing

plasmid จาก *Agrobacterium tumefaciens* ดังแสดงในภาพที่ 6 ทำให้พืชเกิดลักษณะเป็นปุ่มปม โดย *Agrobacterium tumefaciens* สามารถก่อให้เกิดโรคได้เฉพาะพืชใบเลี้ยงคู่เท่านั้น



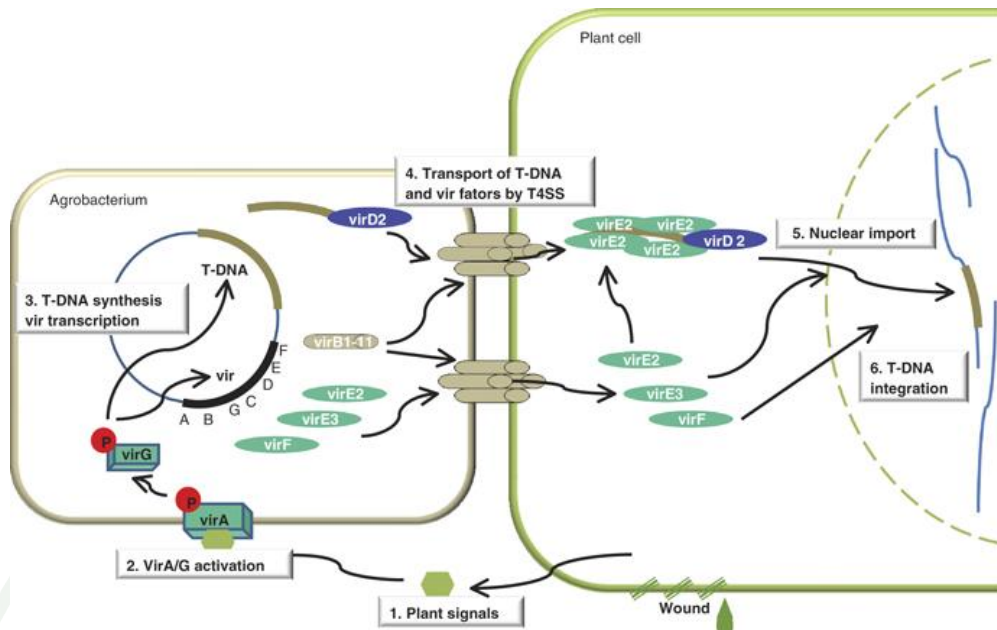
ภาพที่ 6 แสดงตำแหน่งของยีนต่างๆบน Ti plasmid

(http://arabidopsis.info/students/paaras/t_dna.htm)

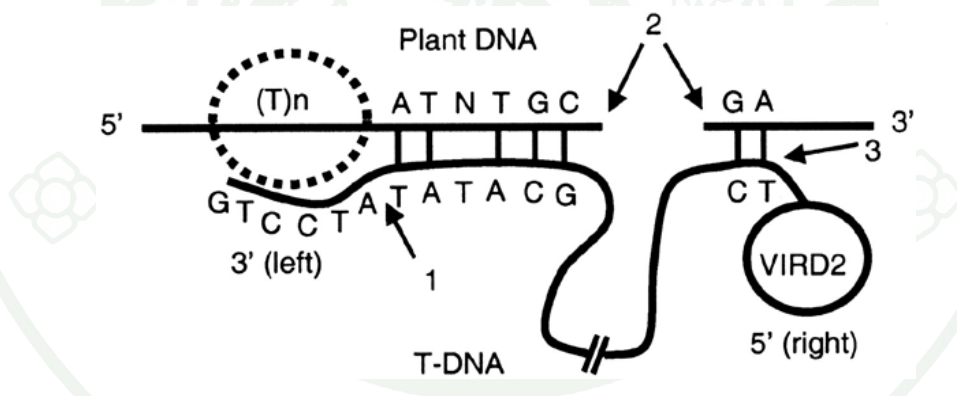
เมื่อ *Agrobacterium tumefaciens* เข้าสู่เซลล์พืชแล้วจะทำการถ่ายส่วนของ T-region (บริเวณลูกศรสีเหลือง) เข้าไปแทรกในจีโนมของพืชโดยการทำงานของยีนกลุ่ม *Virulence gene* (บริเวณสีแดง) ซึ่งบริเวณ T-region ที่แทรกเข้าสู่จีโนมพืชนั้นจะประกอบด้วยยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการผลิตฮอร์โมนออกซิน (บริเวณสีม่วง) และยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการผลิตฮอร์โมนไซโตไคนิน (บริเวณสีแสด) ยีนหรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า oncogenic gene ทำให้พืชเกิดการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วและไม่หยุดยั้ง ทำให้เกิดลักษณะเป็นปุ่มปมงอกออกมา โดยยีน Opine synthesis (บริเวณสีเทา) ทำหน้าที่สร้างสารประเภท opine (octopine หรือ nopaline แล้วแต่ประเภทของ Ti plasmid) ซึ่ง *Agrobacterium tumefaciens* จะผลิตสาร opine เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต กระบวนการส่งถ่ายยีนจาก *Agrobacterium tumefaciens* เข้าสู่พืชนั้นเริ่มจากยีน *virA* จะจดจำสารประกอบประเภท phenolic compound ที่ผลิตจากพืชขณะมีบาดแผล และไปกระตุ้นยีน *virG* จากนั้น *virG* ไปกระตุ้นให้มีการลอกหรัสของยีนอื่นๆ ในกลุ่ม *vir* genes เริ่มจาก *virD1* ทำงานร่วมกับ *virD2* ในการตัด phosphodiester bond สายเดี่ยวที่ Right-hand T-DNA border และ Left-hand T-DNA border ยีน *virC* จะเข้าจับที่บริเวณ overdrive sequence ที่ T-DNA border ทำให้เกิดการส่งถ่าย T-DNA ได้ดีขึ้น *virE* ทำหน้าที่เป็น single strand binding protein จับกับ T-DNA สายเดี่ยวเพื่อป้องกันไม่ให้โดนทำลายเป็นโครงสร้าง T-complex ทั้ง *virD2* และ *virE2* จะทำงานร่วมกันในการนำส่วนของ T-

DNA เข้าสู่นิวเคลียสของพืช และ *virB* สร้าง membrane protein ให้ T-complex เคลื่อนออกจากเซลล์ *Agrobacterium tumefaciens* เข้าสู่เซลล์พืชที่บริเวณ VirB channel จากนั้นจะเกิดการการแทรกส่วนของ T-DNA เข้าสู่ในจีโนมของพืช กระบวนการดังกล่าวแสดงดังภาพที่ 7 ในการถ่ายโอนส่วนของ T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชนั้นเป็นแบบ Illegitimate recombination เริ่มจากการเกิดรอยฉีกขาดบริเวณจีโนมของพืชเพียงแค่สายเดียว จากนั้นช่วงของลำดับเบสคู่สมบนส่วนของ T-DNA เข้าจับกับลำดับเบสคู่สมบนจีโนมพืช แล้วเกิดการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ที่บริเวณสาย T-DNA เกิดการคลายออกของสาย T-DNA แล้วใช้สาย T-DNA เป็นต้นแบบในการซ่อมแซมรอยฉีกขาดที่บนจีโนมของพืช ดังนั้นส่วนของ T-DNA จึงแทรกเข้าไปในจีโนมของพืช ดังแสดงในภาพที่ 8 ในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นตัวกลางในการถ่ายโอนจะใช้ยีนคัดเลือกเพื่อติดตามหาต้นพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนเข้าไปซึ่งยีนดังกล่าวจะต้องไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นพืช ยีนคัดเลือกที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะซึ่งจะใส่ยาปฏิชีวนะดังกล่าวลงในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงต้นพืช เช่น ยีน *nptII* (Nigel *et al.*, 2004) ต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและชนิดของเนื้อเยื่อพืชที่ใช้ในการถ่ายโอนยีน (Lorence and Verpoort., 2005)

ในปัจจุบันการถ่ายโอนยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นตัวกลางในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิดไม่ว่าจะเป็นการถ่ายโอนยีนในกล้วย (Yonghong *et al.*, 2001) ข้าวสาลี (Bhalla., 2006) ในมันฝรั่งมีการถ่ายโอนยีนเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *SrBEL5* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างส่วนสะสมอาหารพบว่าต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมีปริมาณส่วนสะสมอาหารมากกว่าต้นมันฝรั่งที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน (Anjan *et al.*, 2006)



ภาพที่ 7 แสดงกระบวนการการส่งถ่ายยีนจาก *Agrobacterium tumefaciens* เข้าสู่เซลล์พืช (Andrea and Heribert., 2010)



ภาพที่ 8 แสดงการแทรกเข้าจีโนมพืชของ T-DNA, (Andrea and Heribert., 2010)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลอง

1.1 ตัวอย่างมันสำปะหลัง

ตัวอย่างมันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลองคือสายพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (KU50) และสายพันธุ์ระยอง 9 ได้รับการอนุเคราะห์จาก ดร. โอภาส บุญเส็งจากศูนย์วิจัยพืชไร่กรมวิชาการเกษตร จังหวัดระยอง

1.2 ตัวอย่างมันฝรั่ง

ตัวอย่างต้นมันฝรั่งที่ใช้ในการถ่ายยีนสายพันธุ์สปุนตาร์ ได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ประสาทพร สมิตะมาน

2. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

2.1 *Escherichia coli* DH5 α

2.2 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105

3. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

5. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน โดยวิธี differential display reverse transcription PCR

6. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย

7. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้สำหรับถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืช
8. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้สำหรับงานพันธุวิศวกรรม
9. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้สำหรับการทำ southern blot

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างรากมันสำปะหลังที่อายุการเจริญเติบโตต่าง ๆ

ทำการเก็บตัวอย่างรากมันสำปะหลังสายพันธุ์ เกษตรศาสตร์ 50 และ ระยะเวลา 9 จากศูนย์วิจัยพืชไร่จังหวัดระยอง ที่อายุพัฒนาการต่างๆ ตั้งแต่รากฝอย (fibrous roots, Fi) รากที่เริ่มมีการโป่งพอง (transition roots, TR) รากสะสมอาหาร (storage roots, SR) ใบอ่อน (young leave, YL) ใบแก่ (mature leave, ML) และส่วนปลายยอดของลำต้น (top part of stem, TS) ของต้นมันสำปะหลังที่มีอายุตั้งแต่ 5 6 และ 7 สัปดาห์และ 2 3 และ 6 เดือน แล้วทำการล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ และเก็บรักษาที่ -80°C เพื่อใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ

1.1 การสกัดแยก total RNA คุณภาพสูงจากมันสำปะหลังที่ระยะพัฒนาการต่างๆ

อาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเนื้อเยื่อมันสำปะหลังถูกแยกออกมาโดยใช้ Concerted™ Plant RNA Reagent (Invitrogen) โดยทำการบดเนื้อเยื่อให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวจนมีลักษณะเป็นผงแป้ง จากนั้นเทใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นใส่บัฟเฟอร์สำหรับสกัดอาร์เอ็นเอที่เย็นลงไป ผสมให้เข้ากัน เมื่อผสมเข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที โดยวางหลอดทดลองในแนวนอน เมื่อครบ 5 นาทีทำการปั่นเหวี่ยงที่ $2,600 \times g$ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนที่เป็นสารละลายใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติม 5M NaCl ปริมาณ 0.2 เท่าของปริมาตรของสารละลายที่ดูดได้ แล้วเติม chloroform ปริมาณ 0.6 เท่าของปริมาตรของสารละลายที่ดูดได้ ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการเขย่าอย่างแรง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $2,600 \times g$ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำสารละลายใสที่ได้ใส่ในหลอดใหม่ จากนั้นทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 0.9 เท่าของสารละลายใสที่ดูดได้ ผสมสารละลายโดยการพลิกหลอดไปมาแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนอาร์เอ็นเอที่ได้โดยการปั่นเหวี่ยงที่ $2,600 \times g$ อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอโดยใช้ DEPC-treated water ปริมาตร 900 ไมโครลิตร และทำการดูดสารละลายใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 10M LiCl ปริมาตร 0.3 เท่าของสารละลาย ผสมสารละลายให้เข้ากันทำการบ่มสารละลายที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้อาร์เอ็นเอตกตะกอนมากขึ้นจากนั้นเก็บตะกอนอาร์เอ็นเอ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 x g เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำการล้างตะกอนด้วย 2.5 M LiCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 x g เป็นเวลา 5 นาที และทำการล้างตะกอนอาร์เอ็นเออีกครั้งด้วย absolute ethanol ที่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตากตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้ง จากนั้นทำการละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย DEPC-treated water เก็บอาร์เอ็นเอไว้ที่ -80 °C

1.2 การกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนในสารละลายอาร์เอ็นเอ

นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ได้ทั้งหมดมาทำการบ่มกับเอนไซม์ *DNaseI* เพื่อกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ ปฏิบัติดังกล่าวดังประกอบด้วยอาร์เอ็นเอปริมาณ 20 ไมโครกรัม 10X reaction buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร RQ1 RNase Free-DNase (Promega) ความเข้มข้น 1 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติม deionized water จนกระทั่ง ปริมาตรสุทธิรวม 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำ DEPC ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายผสม acid phenol และ chloroform (1:1) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่าสารละลาย เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดสารละลาย ส่วนใสขึ้นบนใส่หลอดทดลองใหม่ จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าสารละลาย เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดสารละลายส่วนใสขึ้นบนใส่หลอดใหม่ เติมเอทานอลเข้มข้นและ โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate) ความเข้มข้น 3M pH 5.2 ปริมาตร 2.5 เท่า และ 0.1 เท่าของ สารละลายส่วนใส ตามลำดับ กลับหลอดทดลองไปมา 10 ครั้ง และบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการดูดสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอน ด้วยเอทานอลในน้ำ DEPC ความเข้มข้น 75% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งเปิดฝาทิ้งไว้ให้ ตะกอนแห้ง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำ DEPC ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

1.3 การตรวจสอบหาปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอ

ทำการวัดปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้โดยนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ทั้งหมดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (NANODROP model) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 260 และ 280 นาโนเมตร จากนั้นวิเคราะห์อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร (OD_{260}/OD_{280}) ควรอยู่ในช่วงระหว่าง 1.8-2.0 และอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 230 นาโนเมตร (OD_{260}/OD_{230}) ควรมากกว่าหรือเท่ากับ 2.0 แสดงว่าตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไม่มีการปนเปื้อนโปรตีนและสารประกอบโพลีฟีนอลิก

1.4 การตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอและการปรับความเข้มข้นอาร์เอ็นเอโดยใช้ denaturing agarose gel electrophoresis

การตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอและการปรับความเข้มข้นอาร์เอ็นเอให้เท่ากันโดยวิธี denaturing agarose gel electrophoresis โดยการเตรียม agarose gel ความเข้มข้นของ agarose 1.2% w/v มีส่วนประกอบดังนี้ agarose 1.08 กรัม 10X MOPS 9 มิลลิลิตร (200 mM MOPS 80 mM sodium acetate 10 mM EDTA pH8.0) และ DEPC-treated water 78.3 มิลลิลิตร นำส่วนประกอบทุกอย่างมาผสมให้เข้ากันในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นทำการหลอม agarose ด้วยเตา microwave จนกระทั่ง agarose หลอมหมดรวมเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้อุณหภูมิของสารละลาย agarose ลดลงเล็กน้อย จากนั้นเติม 37% formaldehyde 2.7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงในถาดสำหรับเตรียม electrophoresis gel ที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หรือสังเกตดูจนกระทั่งเจลแข็ง แล้วทำการเตรียมอาร์เอ็นเอปริมาณ 1 ไมโครกรัม ละลายใน DEPC-treated water ให้ได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ RNA loading dye 5 ไมโครลิตร (100% deionized formamide 250 ไมโครลิตร 37% formaldehyde 83 ไมโครลิตร 10X MOPS buffer 50 ไมโครลิตร 2.5% bromophenol blue 10 ไมโครลิตร DEPC-treated water 57 ไมโครลิตร กลีเซอรอล 50 ไมโครลิตร และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ethidium bromide 10 ไมโครลิตร) แล้วให้ความร้อนที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่อาร์เอ็นเอในน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว จากนั้นนำไปแยกด้วย denaturing gel ที่เตรียมไว้ ซึ่งแผ่นเจลจะอยู่ในสารละลาย 1X MOPS buffer ใช้กระแสไฟ 50 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจสอบและถ่ายภาพด้วยเครื่อง UV transilluminator โดยดูจากขนาดของแถบอาร์เอ็นเอที่ปรากฏ ประกอบด้วย 28S และ 18S ของ ribosomal RNA (rRNA) ทำการวัดความเข้มของแถบอาร์เอ็นเอด้วย densitometer และคำนวณปริมาณอาร์เอ็นเอของทุกตัวอย่างให้เท่ากันโดยใช้ผลจากการวัดด้วย densitometer เพื่อปรับความเข้มข้นอาร์เอ็นเอใหม่ให้เท่ากันทุก

ตัวอย่าง และนำมาตรวจสอบความเข้มข้นอีกครั้งหนึ่งด้วย RNA denaturing agarose gel electrophoresis จนกระทั่งแถบของอาร์เอ็นเอเท่ากันในทุกตัวอย่าง แล้วจึงนำมาทำการสังเคราะห์ เป็น cDNA

2. การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Differential display RT-PCR

ทำการวิเคราะห์เพื่อค้นหายีนที่แสดงออกแตกต่างกันในระยะเวลาพัฒนาการของรากสะสมอาหารตั้งแต่ระยะรากฝอย fibrous root (Fi) ระยะที่รากเริ่มมีการโป่งพอง transition root (TR) และระยะที่รากมีการสะสมอาหาร storage root (SR) โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป มีวิธีการดังนี้

2.1 การทำ Reverse transcription เพื่อสร้าง cDNA สำหรับทำ DDRT-PCR

เมื่อได้อาร์เอ็นเอที่มีปริมาณเท่ากันทุกตัวอย่างและมีคุณภาพตามที่ต้องการแล้วขั้นตอนต่อมาคือการสร้างสาย cDNA จาก mRNA ของรากมันสำปะหลังที่ระยะพัฒนาการต่าง ๆ ตั้งแต่ รากฝอย (Fi) รากที่เริ่มมีการสะสมอาหาร (TR) และรากสะสมอาหาร (SR) เริ่มต้นจากนำ อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จำนวน 3 ไมโครกรัม 10 μ M dT-ACPI 2 ไมโครลิตร และ DEPC-treated water 4.5 ไมโครลิตร มาผสมให้เข้ากันจากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงนำไปปั่นในระยะเวลาสั้นๆ ในขั้นตอนนี้ primer dT-ACPI จะเข้าจับกับ poly A ของอาร์เอ็นเอแล้วต่อมาจะทำการสร้างเส้น cDNA โดยทำการเติม 5X RT buffer 4 ไมโครลิตร 2mM dNTP 1 ไมโครลิตร RNase inhibitor (40 ยูนิต/ไมโครลิตร) 0.5 ไมโครลิตร และ Reverse transcriptase (200 ยูนิต/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร ลงในส่วนผสมในขั้นแรกแล้วนำส่วนผสมดังกล่าวไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที ในขั้นตอนนี้จะได้เป็นเส้น cDNA ที่สมบูรณ์เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

2.2 การเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำ cDNA จากตัวอย่างจากรากมันสำปะหลังที่ระยะพัฒนาการต่าง ๆ ตั้งแต่ รากฝอย (Fi) รากที่เริ่มมีการสะสมอาหาร (TR) และรากสะสมอาหาร (SR) ที่ได้ในขั้นตอนก่อนหน้ามาเปรียบเทียบการแสดงออกโดยใช้ชุดไพรเมอร์ (Arbitrary ACP) โดยการศึกษาครั้งนี้จะใช้ไพรเมอร์

จากชุดน้ำยาสำเร็จรูป 20 ไพรเมอร์ ซึ่งปฏิกิริยา PCR ทั้งหมด 20 ไมโครลิตรจะประกอบไปด้วย cDNA 50 ไมโครกรัม 5 μ M Arbitrary ACP 2 ไมโครลิตร 10 μ M dT-ACP2 1 ไมโครลิตร distilled water 2x SeeAmp™ ACP™ MasterMix (Seegene)

กระบวนการที่เกิดขึ้นในเครื่อง PCR

ขั้นตอนที่	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ	ระยะเวลา
1	1	94°C	5 นาที
2	1	50°C	3 นาที
3	1	72°C	1 นาที
4	40	94°C	40 วินาที
		65°C	40 วินาที
		72°C	40 วินาที
5	1	72°C	5 นาที

จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.8% ในการวิเคราะห์ จากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator (BIO-RAD) เลือกแถบดีเอ็นเอที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในระยะต่างๆ

2.3 ขั้นตอนการเชื่อมดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับดีเอ็นเอพาหะและการถ่ายโอนยีนเข้าในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α

โดยทำการเชื่อมต่อแถบดีเอ็นเอที่สนใจเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pGEM-T[®] Easy vector (Promega) จากนั้นทำการถ่ายโอนพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสายผสมเพื่อนำไปใช้ในการตรวจหาลำดับเบสต่อไป

2.3.1 การเชื่อมแถบดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้าสู่เวกเตอร์จะใช้ชุดสำเร็จรูป pGEM[®]-T Easy (Promega) ในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้าสู่เวกเตอร์ทั้งหมด 10 ไมโครลิตรจะประกอบไปด้วย 1x ligation buffer T4 DNA ligase 3 ยูนิต pGEM[®]-T Easy vector 50 นาโนกรัม และแถบดีเอ็นเอที่สนใจ

ปริมาณ 3 ไมโครลิตร ปฏิกริยาจะบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นจะทำการถ่ายไอออนเวกเตอร์เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียต่อไป

2.3.2 การถ่ายไอออนดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

2.3.2.1 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียให้พร้อมสำหรับการรับการถ่ายยีน

Competent cell ถูกเตรียมตามวิธีของ Inoue *et al.*, 1990 โดยเริ่มจากการเตรียมเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ในอาหารเหลว LB ที่เติม 20 mM MgSO₄ ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงได้จำนวน 3 มิลลิตร ถ่ายลงในอาหาร LB ซึ่งเติม 20 mM MgSO₄ ปริมาตร 100 มิลลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน นำเชื้อที่เลี้ยงได้มาบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ที่ส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำเซลล์ที่ได้มาละลายใน transformation buffer (10 mM Pipes-NaOH pH 6.7 15 mM CaCl₂ 0.25 mM KCl และ 55mM MnCl₂) ที่เย็น จากนั้นแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วย TB buffer ที่เย็น 20 มิลลิตร และ DMSO 1.5 มิลลิตร นำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ก่อนที่จะแบ่งใส่หลอด microcentrifuge ที่เย็น ทำให้เย็นในไนโตรเจนเหลวและเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ในการถ่ายไอออนเวกเตอร์

2.3.2.2 Heat-shock transformation

เพื่อถ่ายไอออน recombinant plasmid เข้าสู่เซลล์ *E. coli* โดยดูดสารละลายจากปฏิกริยา ligation 5 ไมโครลิตร ใสลงใน competent cell 50 ไมโครลิตร และบ่มไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นทำการ heat-shock เซลล์ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นแช่น้ำแข็ง 3 นาที แล้วเติมอาหาร LB ลงไป 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ประมาณ 100-150 ไมโครลิตร มาเลี้ยงบนอาหาร LB solid medium ที่ประกอบไปด้วย 100 ไมโครลิตร/มิลลิตร ampicillin 1.6 มิลลิกรัม X-Gal และ 2.5 mM IPTG บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเห็นเป็น colony และสามารถเลือกโคลนได้โดยใช้หลักการ blue-white screen แล้วจึงนำโคลนนี้สีขาวที่ได้มาตรวจสอบโดยการทำ colony PCR ต่อไป

2.3.2.3 การเลือกโคลนที่ต้องการด้วยเทคนิค Colony polymerase chain reaction (colony PCR)

ในการทำ Colony PCR จะเลือกโคโลนีที่มีสีขาวมาทำโดยในปฏิกิริยาประกอบด้วยไพรเมอร์ M13-F และ M13-R ความเข้มข้น 10 μ M ปริมาตรอย่างละ 0.3 ไมโครลิตร 10 mM dNTPs 0.2 ไมโครลิตร 10X reaction buffer water 8.15 ไมโครลิตร และ *Taq* DNA polymerase (fermentas) 0.05 ไมโครลิตร และใช้ไม้จิ้มฟันจิ้มโคโลนีที่ต้องการใส่ลงไปในปฏิกิริยาแล้วทำการตั้งค่าเครื่อง PCR โดยตั้งค่าโปรแกรมดังนี้

ขั้นตอนที่	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ	ระยะเวลา
1	1	94 °ซ	3 นาที
2	35	94 °ซ	30 วินาที
		55 °ซ	30 วินาที
		72 °ซ	30 วินาที
3	1	72 °ซ	5 นาที

จากนั้นนำผลที่ได้จากการทำ colony PCR มาตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.0% ในการวิเคราะห์ จากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator แล้วทำการเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการขึ้นเพื่อนำไปตรวจสอบอีกครั้งหนึ่ง โดยการสกัดพลาสมิดและทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

2.3.2.4 การตรวจสอบพลาสมิดหลังจากที่ถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสมเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เพื่อตรวจสอบหายีนที่แทรกเข้าไปในเวกเตอร์หลังจากที่ถ่ายโอน เข้าไปในแบคทีเรียแล้ว และเพื่อดูว่าพลาสมิดนี้มียื่นเชื่อมต่อยุ่จริงและเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียได้จริงหรือไม่

2.3.2.4.1 การสกัดพลาสมิดสายผสมจากโคลนแบคทีเรีย *E. coli*

การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจะใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปของ QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN) โดยจะต้องทำการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ทำการเติม ampicillin ความ

เข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นทำการปั่นเพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ นำส่วนของเซลล์ละลายด้วย buffer A1 ปริมาณ 250 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ buffer A2 ปริมาณ 250 ไมโครลิตร ทำการผสมสารละลายนี้โดยพลิกหลอดไปมา จากนั้น ใส่ buffer A3 ปริมาณ 350 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันดี จากนั้นทำการปั่นตกตะกอน 13,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนสารละลายใส่ใน QIAprep spin column ล้างด้วย PE buffer ก่อนชะ DNA ด้วย EB buffer จากนั้นตรวจสอบความเข้มข้นของพลาสมิดโดยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer model NANODROP)

2.3.2.4.2 การตรวจสอบพลาสมิดสายผสมโดยการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

เพื่อตรวจสอบอีกครั้งว่าเป็นพลาสมิดสายผสมที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการปฏิบัติการประกอบด้วยพลาสมิดที่สกัดได้ 1 ไมโครลิตร 10X *EcoRI* buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ *EcoRI* (Fermentas) ความเข้มข้น 10 หน่วย/ไมโครลิตร ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร และ deionized water ปริมาตร 7.7 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมงแล้วหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C ระยะเวลา 15 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator จากนั้นทำการเลือกโคลนที่มีแถบของยีนที่ต้องการทำการหาลำดับเบสเพื่อนำมาวิเคราะห์หายีนที่ต้องการ

2.4 การสืบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดีเอ็นเอ

โดยการนำพลาสมิดที่ผ่านการตรวจสอบแล้วว่า มีชิ้นของยีนที่ต้องการแทรกอยู่จริงเพื่อส่งไปทำการหาลำดับเบสที่ 1st base INC นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้เทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนใน NCBI ด้วยโปรแกรม BlastX และเทียบกับฐานข้อมูลจีโนมมันสำปะหลังเพื่อคาดคะเนถึงหน้าที่ของยีน (<http://www.phytozome.net/cassava>)

3. การศึกษารูปแบบการแสดงออกของกลุ่มยีนที่คัดเลือกได้โดยใช้เทคนิค semi-quantitative

RT-PCR

เพื่อติดตามรูปแบบการแสดงออกและอวัยวะที่มีการแสดงออกของยีนที่น่าสนใจที่คัดเลือกได้จากเทคนิค differential display RT-PCR โดยระบบ semi-quantitative RT-PCR จะได้นำมาใช้ในงานวิจัยนี้โดยทำการออกแบบคู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนที่น่าสนใจ จากลำดับเบสของยีน และนำไพรเมอร์เข้าสู่ปฏิกิริยา RT-PCR กับอาร์เอ็นเอที่สกัดจากรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง ที่ระยะการเจริญต่างๆ ตั้งแต่รากฝอย เข้าสู่รากที่เริ่มมีการโป่งพอง และรากสะสมอาหาร เปรียบเทียบกับส่วนของใบอ่อน ใบที่เจริญเต็มวัยและส่วนยอดของลำต้นของมันสำปะหลัง ที่ระยะการเจริญเติบโต 2 3 และ 6 เดือน ซึ่งในการทดลองจะใช้วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ การกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนในอาร์เอ็นเอและการปรับอาร์เอ็นเอให้เท่ากันในทุกตัวอย่างเหมือนขั้นตอนการเตรียมอาร์เอ็นเอสำหรับทำ differential display แต่จะแตกต่างกันในขั้นตอนต่อไป

3.1 การสร้างสาย cDNA

ในการสังเคราะห์สาย cDNA สำหรับใช้ในการศึกษารูปแบบแสดงออกของยีนนั้นเริ่มจากการผสม อาร์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัม random hexamer 1 ไมโครลิตร 10mM dNTPs mix 1 ไมโครลิตร เติมน้ำ DEPC จนได้ปริมาตร 13 ไมโครลิตรจากนั้นนำไปทำการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการแช่ลงในน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว จากนั้นทำการเติม 5x reverse transcription buffer 4 ไมโครลิตร 10mM dNTPs mixed 1 ไมโครลิตร 0.1M DTT 2 ไมโครลิตร 100 μ M Q_T primer 0.5 ไมโครลิตร RiboLock™10 ยูนิต และ reverse transcriptase (Invitrogen) 200 ยูนิต จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการเก็บรักษา cDNA ที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 ปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส

เพื่อวิเคราะห์หารูปแบบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในอวัยวะต่างๆ ของมันสำปะหลังโดยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย first strand cDNA ที่เจือจาง 20 เท่า จำนวน 2 ไมโครลิตร 10 μ M forward primer และ reverse primer อย่างละ 0.2

ไมโครลิตร DreamTaq™ PCR master mix (Fermentas) 5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2.6 ไมโครลิตร ทำการตั้งค่าการทำงานของเครื่องพีซีอาร์ดังต่อไปนี้

ขั้นตอนของปฏิกิริยาถูกลูกโซ่	<i>MeHD-ZIPIII</i>	<i>MeTM</i>
Denaturation	94°C, 1 นาที	94°C, 1 นาที
	31 รอบ	30 รอบ
Denaturation	94°C, 30 วินาที	94°C, 30 วินาที
Annealing	60°C, 30 วินาที	60°C, 30 วินาที
Extension	72°C, 1 นาที	72°C, 1 นาที
Final extension	72°C, 5 นาที	72°C, 5 นาที

จากนั้นนำผลที่ได้จากการทำ semi-quantitative RT-PCR มาตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 2.0% ในการวิเคราะห์ จากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator

4. การสร้างโครงสร้างสำหรับเพิ่มการแสดงออกของยีนเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการถ่ายโอนยีนเพื่อตรวจสอบหน้าที่ของยีน

เป้าหมายการเพื่อตรวจสอบหน้าที่ของยีน *MeHD-ZIPIII* และ integral membrane protein (*MeTM*) ที่แยกได้จากรากที่เริ่มโป่งพองของมันสำปะหลัง

4.1 การโคลน full-length cDNA

ทำการโคลน full-length cDNA เพื่อสร้างโครงสร้างสำหรับเพิ่มการแสดงออกของยีนเพื่อใช้ในการตรวจสอบหน้าที่ของยีน *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM* โดยทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM* ที่บริเวณ 5' และ 3' UTR ของลำดับดีเอ็นเอของยีนซึ่งไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จะมีการเติมตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I เข้าไปด้วยเพื่อใช้ในการตัดต่อยีนเข้ากับเวกเตอร์ pBI121 ดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นทำการสังเคราะห์ยีนโดยใช้พีซีอาร์ใช้ cDNA ของรากสะสมอาหารของมันสำปะหลังเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน เมื่อได้ยีนที่ต้องการแล้วทำการเชื่อมต่อยีนเข้ากับเวกเตอร์ pGEM®-T Easy vector แล้วทำการถ่ายเวกเตอร์

ดังกล่าวเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มียีนที่ต้องการนำไปตรวจสอบลำดับเบสแล้วทำการเก็บรักษาสายพันธุ์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 แสดงไพรเมอร์ของยีน *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM* ที่ได้รับการออกแบบโดยเพิ่มตำแหน่งของเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I (บริเวณที่ขีดเส้นใต้) เพื่อใช้ในการสร้างโครงสร้างเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน

primer name	Sequence
<i>MeTM</i> F	5'- CA ACC <u>GGA TCC</u> TTT TCT TCA GGC CAA A -3'
<i>MeTM</i> R	5'- TGA TTA CAA ATA CAT GAC AGT <u>GAG AGC</u> TC -3'
<i>MeHD-ZIPIII</i> F	5'- GCC GCC AAC TTG <u>GAT CCG</u> TTT CTC TTC-3'
<i>MeHD-ZIPIII</i> R	5'- GTG ATG TTA CTG <u>GAG CTC</u> GCT CGT AAC-3'

4.2 การตัดส่วนที่เป็น GUS gene ออกจากเวกเตอร์ pBI121

เพื่อทำการสร้างส่วนของ backbone เวกเตอร์สำหรับเชื่อมต่อกับยีน *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM* โดยการนำเวกเตอร์ pBI121 มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI (NEB) และ *Sac*I (NEB) โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย pBI121 30 ไมโครกรัม, 10x NEB buffer3 3 ไมโครลิตร, 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร BSA 3 ไมโครลิตรและ *Bam*HI (NEB) 20 ยูนิต ในปริมาตร 30 ไมโครลิตรจากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการนำไปให้ความร้อนที่ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการตัดอีกครั้งหนึ่งด้วยเอนไซม์ *Sac*I โดยทำการเติม 10x NEB buffer3 3 ไมโครลิตร, 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร BSA 3 ไมโครลิตรและ *Sac*I 20 ยูนิต ลงในปฏิกิริยา *Bam*HI ในปริมาตร 60 ไมโครลิตรแล้วนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา alkaline phosphatase เพื่อทำการเคลื่อนย้ายหมู่ฟอสเฟตออกจาก backbone vector โดยในการทำปฏิกิริยา alkaline phosphatase ประกอบด้วย ปฏิกิริยา double digestion 60 ไมโครลิตร 10x NEB buffer3 6 ไมโครลิตรและ CIP (NEB) 10 ยูนิต ในปริมาตร 120 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยาไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการสกัดด้วย ฟีนอล/คลอโรฟอร์ม แล้วตกตะกอนด้วย 3M sodium acetate pH5.2 ในปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตรทั้งหมด และ เอทานอลเข้มข้น ปริมาณ 2.5 เท่าของปริมาตรทั้งหมด แล้วทำการบ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นทำการเก็บตะกอนดีเอ็นเอโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ

ต่อมาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% v/v นำตะกอนที่แห้งแล้วละลายตะกอนในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

4.3 การตัดชิ้นส่วนของยีน *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM* ออกจากพลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector

นำพลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector (Promega) ที่มียีน *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM* มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I เพื่อให้ได้เฉพาะชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการนำไปเชื่อมต่อกับ pBI121 backbone vector โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย พลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector ที่มียีน *MeHD-ZIPIII* หรือ integral membrane protein 30 ไมโครกรัม, 10x NEB buffer3 3 ไมโครลิตร 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร BSA 3 ไมโครลิตร และ *Bam*HI (NEB) 20 ยูนิต ในปริมาตร 30 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการนำไปให้ความร้อนที่ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการตัดอีกครั้งหนึ่งด้วยเอนไซม์ *Sac*I โดยทำการเติม 10x NEB buffer3 3 ไมโครลิตร 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร BSA 3 ไมโครลิตร และ *Sac*I (NEB) 20 ยูนิต ลงในปฏิกิริยา *Bam*HI ในปริมาตร 60 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำปฏิกิริยาที่ได้มาทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอของยีนออกจากพลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector โดยทำการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 1% agarose gel จากนั้นทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการออกจากเจลและสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัด QIAquick[®] Gel extraction kit (QIAGEN) และทำการเก็บชิ้นส่วนของยีน *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM* ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดลองต่อไป

4.4 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนของยีน *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM*

ทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนของยีน *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM* เข้ากับส่วนของ backbone พลาสมิด pBI121:35S และ pBI121:B33 ที่ผ่านการตัดส่วนของ GUS gene ออกไปโดยในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อประกอบด้วย pBI121 backbone พลาสมิดจำนวน 5 ไมโครลิตร ชิ้นส่วนของยีน *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM* ปฏิกิริยาละ 10 ไมโครลิตร 5x T4 DNA ligase buffer 4 ไมโครลิตร T4 DNA ligase (Invitrogen) 5 ยูนิต นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำการถ่ายเข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5 α ทำการคัดเลือกในอาหารแข็ง LB ที่ผสม ampicillin 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และทำการตรวจสอบยีนที่ถ่ายเข้าไปโดยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ เมื่อได้เซลล์ที่ที่ได้รับยีนเข้าไป

แล้วทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว LB ที่ผสม ampicillin 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำการสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์และทำการตัดพลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของขนาดของชิ้นยีนที่ทำการเชื่อมต่อเข้าไป เมื่อได้พลาสมิดสายผสมที่มีขนาดที่ถูกต้องแล้วนำพลาสมิดดังกล่าวไปทำการถ่ายเข้าสู่เซลล์ *Agrobacterium* เพื่อใช้ถ่ายเข้าสู่ต้นมันฝรั่งต่อไป

4.5 การถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์ *Agrobacterium*

4.5.1 การเตรียม *Agrobacterium* competent cell

ทำการเพาะเลี้ยงโคโลนีเดี่ยวของ *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA105 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YEP ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงได้มาทำการเลี้ยงในปริมาตร 45 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง หรือจนกว่าค่า OD₆₀₀ ได้ 0.5 จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 × g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างตะกอนของเซลล์ที่ได้ด้วย 0.15 M NaCl 15 มิลลิลิตร จากนั้นละลายตะกอนที่ได้ในสารละลาย 20 mM CaCl₂ ที่เย็นจัด

4.5.2 การถ่ายโอนพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ *Agrobacterium* โดยใช้วิธี freeze-thaw method

เพื่อทำการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *Agrobacterium* ใช้พลาสมิดดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม ใส่ลงไปใน *Agrobacterium* competent cell 200 ไมโครลิตร แล้วนำปฏิกิริยาดังกล่าวไปทำการบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำปฏิกิริยาไปทำให้แข็งแบบทันทีทันใดในไนโตรเจนเหลว แล้วนำไปทำให้ละลายโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ YEP เข้าไป 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงให้ *Agrobacterium* ขึ้นตัวที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ *Agrobacterium* ที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิดดีเอ็นเอมาทำการเลี้ยงบนอาหารแข็ง YEP ที่เติม kanamycin เข้าไปความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน ทำการตรวจสอบโคโลนี *Agrobacterium* ว่าได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอหรือไม่โดยการทำโคโลนีพีซีอาร์ จากนั้นทำการเก็บรักษาสายพันธุ์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

5 การถ่ายยีนเข้าสู่พืช

ในงานวิจัยนี้ทำการถ่ายยีนที่ต้องการศึกษาหน้าที่การแสดงออกของยีนที่สนใจเข้าสู่มันฝรั่งเพื่อใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาหน้าที่และการแสดงออกของยีนจากมันสำปะหลังเนื่องด้วยในมันฝรั่งและมันสำปะหลังมีกระบวนการในการพัฒนาการสะสมอาหารและการสะสมแป้งที่คล้ายคลึงกันแต่การถ่ายยีนในมันสำปะหลังยังทำได้ยากและใช้เวลานาน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกทำการถ่ายยีนในมันฝรั่ง

5.1 การเตรียมเซลล์ *Agrobacterium* สำหรับถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืช

สำหรับยีนที่จะทำการถ่ายโอนเข้าสู่พืชคือ ยีน *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM* ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นและทำการโคลนเข้าใน pBI121:35S และ pBI:B33 โดยมี cauliflower mosaic virus 35S (P35S) และ storage organ specific papatin promoter (B33) เป็นโปรโมเตอร์สำหรับควบคุมการแสดงออกของ recombination vector ได้ถูกทำการถ่ายลงใน *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชนั้นเริ่มจากการเตรียมเซลล์ *Agrobacterium* โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ได้ทำการเก็บรักษาไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส บนอาหารแข็ง YEP ที่มีส่วนผสมของ kanamycin 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นเลือกเอาโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหาร YEP แบบเหลวที่เติม kanamycin 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลาหนึ่งคืน จากนั้นนำไปวัด OD₆₀₀ ให้ได้ 0.6 ทำการเก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 7000 x g 5 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย infection media; IM จากนั้นละลายเซลล์ใน IM ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เติม 200 mM acetosyringone แล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งเพื่อรอทำการ co-cultivation ต่อไป

5.2 การถ่ายยีนเข้าสู่พืชและการชักนำให้พืชเจริญเป็นต้น

สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่พืชนั้นได้ทำตามวิธีของ Benerjee *et al.*, 2006b. โดยใช้ส่วนที่เป็นตาและลำต้นของมันฝรั่งอายุ 4 สัปดาห์ที่เพาะเลี้ยงในห้องทดลอง เริ่มจากตัดส่วนของลำต้นของมันฝรั่งระหว่างตา แล้วทำการสร้างบาดแผลให้มันฝรั่งแล้วแช่ใน IM เมื่อได้ปริมาณของชิ้นส่วนพืชที่จะทำการถ่ายยีนครบแล้ว นำชิ้นส่วนพืชที่ตัดไว้เหล่านั้นไปแช่ใน *Agrobacterium* ที่ได้เตรียมไว้ในขั้นต้น นำไปแช่ที่ความเร็วรอบ 40 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 45 นาที ในที่มืด จากนั้นนำชิ้นส่วนพืช

มาจับส่วนที่เป็นเซลล์ *Agrobacterium* ออกด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วนำชิ้นส่วนพืชมาวางลงบนอาหาร MGC ที่มีส่วนผสมของ 200 mM acetosyringone แล้วทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีด เมื่อครบ 48 ชั่วโมง ทำการย้ายชิ้นส่วนพืชมาเลี้ยงในอาหาร MGS แล้วทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นใช้เวลาประมาณ 14-17 วันจะเห็นส่วนยอดเริ่มงอกออกมาจากลำต้นของมันฝรั่ง

5.3 การตรวจสอบหาต้นมันฝรั่งที่ได้รับยีนเข้าไป

5.3.1 การคัดเลือกต้นมันฝรั่งที่ผ่านการถ่ายยีนเข้าไป และการชักนำให้เจริญเป็นต้นมันฝรั่ง

หลังจากผ่านกระบวนการถ่ายยีนเข้าสู่มันฝรั่งทำการคัดเลือกต้นมันฝรั่งที่ได้รับยีนเข้าไปบนอาหารเพาะเลี้ยง MGS ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ cefotaxim ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการคัดเลือกต้นมันฝรั่งที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเพาะเลี้ยงที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ ตัดเอาส่วนใบมาใช้ในการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอเพื่อทำการตรวจสอบว่ามียีนที่ต้องการแทรกเข้าไปในจีโนมพืชหรือไม่

5.3.2 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของใบมันฝรั่งนั้นจะนำส่วนใบ 0.5-1 กรัม ทำการบดให้ละเอียดจนกลายเป็นผงแป้งในไนโตรเจนเหลวจากนั้นเติม CTAB isolation buffer (2% 2-hexadecyltrimethyl-ammoniumbromide; CTAB 0.2 % 2-mercaptoethanol 20 mM EDTA 100 mM Tris-HCL pH 8.0) ที่ผ่านการให้ความร้อนที่ 65 องศาเซลเซียส จำนวน 600 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการเติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) จำนวน 600 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดเอาแต่ส่วนใสชั้นบนสุดใส่ในหลอดทดลองใหม่ แล้วทำการเติมไอโซโพรพานอลในปริมาตร 0.7 เท่าของปริมาตรทั้งหมด ในขั้นตอนนี้จะเห็นจีโนมิกดีเอ็นเอเป็นเส้นสีขาวขุ่นใช้ตะขอก็กวาดดีเอ็นเอขึ้นมาใส่ในหลอดทดลองใหม่แล้วทำการล้างดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 % v/v ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนที่เป็นเอทานอล 70 % v/v ออกให้หมด ทำการฝั่งตะกอนจีโนมิกดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายดีเอ็นเอที่ได้ใน TE buffer ที่มีส่วนผสมของ RNase เพื่อ

กำจัดอาร์เอ็นเอที่ปนเปื้อนออกไป จากนั้นทำการเก็บรักษาจีโนมิกดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้งานต่อไป

5.3.3 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบหาต้นมันฝรั่งที่ได้รับยีนเข้าไป

ทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบหาต้นมันฝรั่งที่ได้รับยีนเข้าไป โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบนั้นได้ถูกออกแบบจากบริเวณ NOS promoter, *NptII*, NOS terminator และภายในบริเวณของยีนโดยไพรเมอร์ที่ใช้แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบหาต้นมันฝรั่งมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

primer name	Sequence
NOS-promoterF1	5'-GTCGCCTAAGGTCACTATCAGCTAGCA-3'
nptIIIR	5'-TGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGT-3'
HD-ZIPIII RT-F	5'- CCT GGA AAG TGT TGA ACG AAG AGG -3'
A22 RT-F	5'- CTC GTA AAG AAG TTG AAG GAG ATG C -3'
pBITnos-R	5'-AGTAACATAGATGACACCGCGC-3'

5.3.4 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เพื่อตรวจสอบหาชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกถ่ายโอนเข้าไปในต้นมันฝรั่ง ด้วยปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซึ่งประกอบด้วย 1/20 diluted genomic DNA 5 ไมโครลิตร 10x ExTaq buffer 1.2 ไมโครลิตร 2.5 mM dNTP mix 2 ไมโครลิตร 25 mM MgCl₂ 0.4 ไมโครลิตร forward primer 0.2 ไมโครลิตร reverse primer 0.2 ไมโครลิตร ExTaq (TAKARA) 0.12 ไมโครลิตรในปริมาตรทั้งหมด 10 ไมโครลิตร โดยมีขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

PCR Step	<i>MeHD-ZIPIII</i>	<i>MeTM</i>	NOS-F NptII-R
Denaturation	94°C, 4 นาที	94°C, 4 นาที	94°C, 4 นาที
	37 รอบ	37 รอบ	37 รอบ
Denaturation	94°C, 30 วินาที	94°C, 30 วินาที	94°C, 30 วินาที
Annealing	55°C, 30 วินาที	57°C, 30 วินาที	64°C, 30 วินาที
Extension	72°C, 1 นาที	72°C, 1 นาที	72°C, 1 นาที
Final extension	72°C, 10 นาที	72°C, 10 นาที	72°C, 10 นาที

5.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

5.4.1 การทดสอบหาลักษณะที่แสดงออกของต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

ทำการทดสอบหาฟีโนไทป์ของต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนโดยวิธี *in vitro* tuberization โดยการ sub-culture ต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนแล้วนำไปปลูกในขวดทดลองที่ใส่อาหารสำหรับชักนำให้เกิดหัวแล้วนำไปเลี้ยงใน growth chamber ภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70% ช่วงแสง 8 ชั่วโมง และช่วงมืด 16 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 สัปดาห์

5.4.2 การสกัดอาร์เอ็นเอจากต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมันฝรั่งและต้นมันฝรั่งที่ไม่มียีนเป้าหมาย

ทำการตัดใบจากต้นมันฝรั่งและต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมันฝรั่งจำนวน 1 กรัม จากนั้นทำการบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว แล้วทำการสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) โดยทำตามวิธีการของผู้ผลิต จะได้ total RNA จากนั้นทำการสร้าง cDNA เพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่อไป

5.4.3 การสร้าง cDNA จาก total RNA

ในการสังเคราะห์สาย cDNA สำหรับใช้ในการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนนั้นเริ่มจาก อาร์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัม random hexamer 1 ไมโครลิตร 10mM dNTPS mix 1 ไมโครลิตรเติมน้ำ DEPC จนได้ปริมาตร 13 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 5 นาที แล้วทำการแช่ลงในน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว จากนั้นทำการเติม 5x reverse transcription buffer 4 ไมโครลิตร 10mM dNTPs mixed 1 ไมโครลิตร 0.1M DTT 2 ไมโครลิตร 100 μ M Random hexamer 0.5 ไมโครลิตร RiboLock™ 10 ยูนิท และ reverse transcriptase (Invitrogen) 200 ยูนิท จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการเก็บรักษา cDNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการทดลองต่อไป

5.4.4 การทำ Nested semi-quantitative RT-PCR เพื่อตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีนที่ถ่ายโอนเข้าสู่มนัฟรัง

เพื่อวิเคราะห์หารูปแบบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในอวัยวะต่าง ๆ ของมนัฟรัง โดยใช้วิธี nested semi-quantitative RT-PCR ใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ในการทำพีซีอาร์ 2 ครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 3 ในการทำพีซีอาร์รอบแรกใช้ cDNA เป็นต้นแบบในการทำพีซีอาร์ ในการทำพีซีอาร์รอบที่ 2 ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ในรอบแรกเป็นต้นแบบในการทำพีซีอาร์ โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์รอบแรกประกอบด้วย first strand cDNA ที่เจือจาง 20 เท่า จำนวน 2 ไมโครลิตร 10 μ M forward primer และ reverse primer อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร Extaq™ buffer 2.5 ไมโครลิตร Extaq 0.15 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 17.35 ไมโครลิตร ทำการตั้งค่าการทำงานของเครื่องพีซีอาร์ดังต่อไปนี้

1 st PCR Step	MeHD-ZIPIII	MeTM
Denaturation	94°C, 1 นาที	94°C, 1 นาที
	35 รอบ	35 รอบ
Denaturation	94°C, 30 วินาที	94°C, 30 วินาที
Annealing	57°C, 30 วินาที	60°C, 30 วินาที
Extension	72°C, 30 วินาที	72°C, 30 วินาที
Final extension	72°C, 5 นาที	72°C, 5 นาที

จากนั้นนำผลที่ได้จากการทำ 1st PCR มาตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 2.0% ในการวิเคราะห์ จากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV Transilluminator

นำผลผลิตจาก 1st PCR มาใช้เป็นต้นแบบในการทำ 2nd PCR โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย 1st PCR จำนวน 2 ไมโครลิตร 10 μ M forward primer และ reverse primer อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร ExtaqTM buffer 2.5 ไมโครลิตร Extaq 0.15 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 17.35 ไมโครลิตร ทำการตั้งค่าการทำงานของเครื่องพีซีอาร์ดังต่อไปนี้

1 st PCR Step	MeHD-ZIPIII	MeTM
Denaturation	94°C, 1 นาที	94°C, 1 นาที
	40 รอบ	40 รอบ
Denaturation	94°C, 30 วินาที	94°C, 30 วินาที
Annealing	55°C, 30 วินาที	55°C, 30 วินาที
Extension	72°C, 30 วินาที	72°C, 30 วินาที
Final extension	72°C, 5 นาที	72°C, 5 นาที

ตารางที่ 3 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ Semi-quantitative nested RT-PCR

Primer name	Sequence
HDOuter-F	5'-AAGTATCTGCCTGTCAAGTTGGAC-3'
HDRT-F	5'-CCTGCAAAGTGTTGAACGAAGAGG-3'
A22Outer-F	5'-GAAGTTCTGCAGAAGAATGGCAGC-3'
A22RT-F	5'-CTCGTAAAGAAGTTGAAGGAGATGC-3'
pBITnosR	5'-AGTAACATAGATGACACCGCGC-3'
pBITnosinR	5'-ATCGCAAGACCGGCAACAGGATTC-3'

จากนั้นนำผลที่ได้จากการทำ 2nd PCR มาตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 2.0% ในการวิเคราะห์ จากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminaton

5.5 การตรวจสอบจำนวนชุดของยีนในต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนโดยวิธี southern blot hybridization

5.5.1 การเตรียมดีเอ็นเอ

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของใบมันฝรั่งนั้นจะนำส่วนใบ 5 กรัม ทำการบดให้ละเอียดจนกลายเป็นผงแป้งในไนโตรเจนเหลวจากนั้นเติม CTAB isolation buffer (2% 2-hexadecyltrimethylammoniumbromide; CTAB 0.2% 2-mercaptoethanol 20 mM EDTA 100 mM Tris-HCl pH 8.0) ที่ผ่านการให้ความร้อนที่ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปทำการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการเติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ในปริมาณเท่ากับ 2% CTAB เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดเอาแต่ส่วนใสชั้นบนสุดใส่ในหลอดทดลองใหม่ แล้วทำการเติมไอโซโพรพานอลในปริมาตร 0.7 เท่าของปริมาตรทั้งหมด ในขั้นตอนนี้จะเห็นจีโนมิกดีเอ็นเอเป็นเส้นสีขาวขุ่นใช้ตะขอก็กีวีดีเอ็นเอขึ้นมาใส่ในหลอดทดลองใหม่แล้วทำการล้างดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 %v/v ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนที่เป็นเอทานอล 70 %v/v ออกให้หมด ทำการตากตะกอนจีโนมิกดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลาย ดีเอ็นเอที่ได้ใน TE buffer ที่มีส่วนผสมของ RNase เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอที่ปนเปื้อนออกไป จากนั้นทำการเก็บรักษาจีโนมิกดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้งานต่อไป

5.5.2 การตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำจีโนมิกดีเอ็นเอจำนวน 45 ไมโครกรัม ทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งตัด 1 ตำแหน่งบนบริเวณ T-DNA โดยเลือกใช้เอนไซม์ *HindIII* และ *EcoRI* ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ต่อความเข้มข้นเอนไซม์ 10 ยูนิต ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วทำการหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยการสกัดด้วย phenol:chloroform:IAA (25:24:1) แล้วทำการตกตะกอนดีเอ็นเอโดยใช้โซเดียมอะซิเตตในปริมาตร 0.1 เท่า ของสารละลาย และเอทานอล 2.5 เท่าของสารละลาย จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดเอทานอลทิ้งให้หมดแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ดีเอ็นเอละลายที่ 4 องศาเซลเซียส

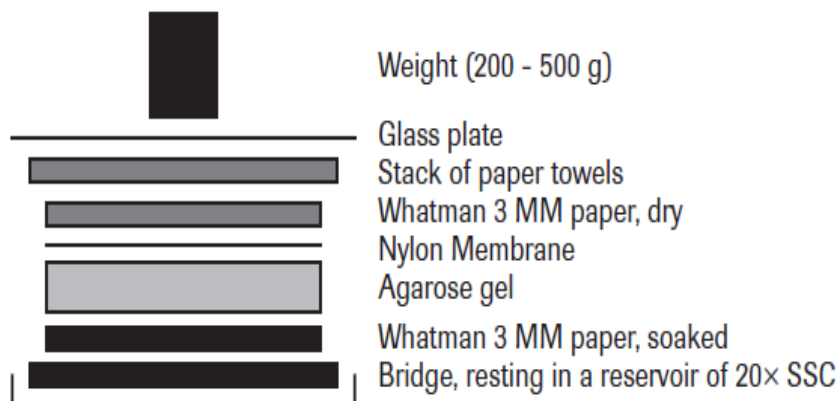
5.5.3 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส

ทำการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 %w/v โดยผสมสีย้อมดีเอ็นเอในสารละลายดีเอ็นเอ แล้วทำการแยกแถบดีเอ็นเอที่กระแสไฟ 60 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือ จนกว่าจะสังเกตเห็นสีน้ำเงินของสีย้อมดีเอ็นเอเคลื่อนที่จนสุดขอบล่างของเจล

5.5.4 การเคลื่อนย้ายแถบดีเอ็นเอจากเจลลงสู่เมมเบรน

นำเจลที่ผ่านการแยกขนาดดีเอ็นเอทำการตัดส่วนของ DNA ladder ออก เพื่อนำไปย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์แล้วทำการบันทึกภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตเพื่อเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอต่อไป ส่วนของเจลที่เหลือนำไปแช่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 250 mM เป็นเวลา 20 นาที พร้อมเขย่า ล้างเจลด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำเจลไปแช่ต่อใน denaturation solution (0.5 M NaOH 1.5 M NaCl) เป็นเวลา 15 นาทีพร้อมเขย่า ในขั้นตอนนี้ทำซ้ำ 2 ครั้ง ล้างเจลด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำเจลไปแช่ใน neutralization solution (0.5M Tris-HCl pH 7.5 1.5M NaCl) เป็นเวลา 15 นาทีพร้อมเขย่า ในขั้นตอนนี้ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำเจลไปแช่ใน 20X SSC เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที

ทำการเคลื่อนย้ายแถบดีเอ็นเอจากเจลสู่ positive charge nylon membrane ตามภาพที่ 9 โดยในการเคลื่อนย้ายแถบดีเอ็นเอใช้เวลา 16 ชั่วโมงจากนั้นนำแผ่น positive charge nylon membrane ที่ถูกย้ายดีเอ็นเอมาแล้วทำการตรึงดีเอ็นเอให้อยู่บนเมมเบรนโดย UV crosslinking ที่ 120 mJ ล้างเมมเบรนโดยใช้น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วทำการฝั่งเมมเบรนให้แห้งเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการ hybridization ต่อไป



ภาพที่ 9 แสดงการจัดวางอุปกรณ์สำหรับการเคลื่อนย้ายแถบดีเอ็นเอจากเจลลงสู่เมมเบรน

5.5.5 การสังเคราะห์โพรบ

ทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อสังเคราะห์โพรบในบริเวณ *NptII* gene เมื่อได้ไพรเมอร์แล้วทำการติดฉลากโพรบโดยใช้ PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย pBI:35S:A22 จำนวน 0.5 ไมโครลิตร 10 μ M forward primer และ reverse primer อย่างละ 2.5 ไมโครลิตร PCR buffer with MgCl₂ 5 ไมโครลิตร PCR DIG mix 5 ไมโครลิตร enzyme mix 0.75 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อ 33.75 ไมโครลิตร ทำการตั้งค่าการทำงานของเครื่องพีซีอาร์ดังต่อไปนี้

ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

Denaturation	95°ซ, 1 นาที
	30 รอบ
Denaturation	95°ซ, 30 วินาที
Annealing	57°ซ, 30 วินาที
Extension	72°ซ, 40 วินาที
Final extension	72°ซ, 7 นาที

จากนั้นนำผลที่ได้จากการสังเคราะห์โพรบมาตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.0% ในการวิเคราะห์ จากนั้นย้อมด้วยเอซีเดียมโบรไมด์และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV Transilluminator

5.5.6 การทำ Hybridization

นำเมมเบรนใส่ในหลอด hybridization ใส่ DIG hybridization granule 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส หมุนด้วยความเร็วระดับ 2 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเท DIG hybridization granule ที่แล้วเติม DIG hybridization buffer 15 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 49 องศาเซลเซียส หมุนด้วยความเร็วระดับ 2 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเมมเบรนออกจากหลอด hybridization ใต้งในถาดพลาสติกที่มี low stringency buffer (2x SSC 0.1% SDS) จำนวน 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที พร้อมเขย่า ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นเท low Stringency buffer ที่แล้วเติม high stringency buffer (0.5x SSC 0.1% SDS) ที่ถูกทำให้อุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่า เป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง

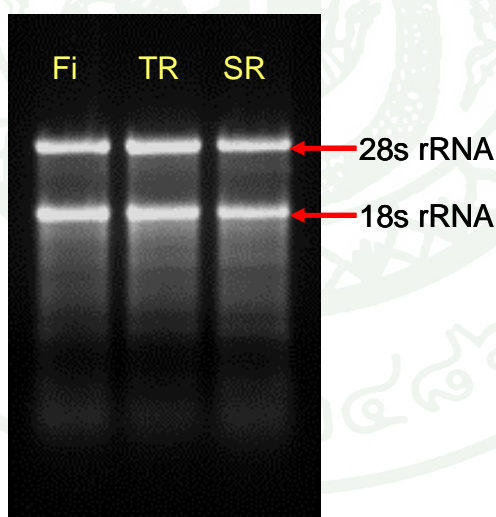
5.5.7 ขั้นตอนการตรวจสอบผล

ย้ายเมมเบรนมาใส่ในถาดพลาสติกใส่ washing buffer (0.1 M Maleic acid 0.15 M NaCl; pH 7.5 0.3% v/v Tween 20) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที พร้อมเขย่า เท washing buffer ที่เติม blocking Solution 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที พร้อมเขย่า เท blocking solution ที่ย้ายเมมเบรนใส่ในหลอด hybridization ใส่ antibody solution 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที พร้อมเขย่า เท antibody solution ที่ จากนั้นล้างเมมเบรนใน washing buffer บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที พร้อมเขย่า ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำเมมเบรนแช่ใน detection buffer (0.1 M Tris-HCl 0.1 M NaCl; pH 9.5) เป็นเวลา 3 นาที นำเมมเบรนวางบนถาดพลาสติก หยด CSPD (ROCHE) ให้ทั่วเมมเบรน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการซีลปิดถาด นำเมมเบรนไปวางใน cassette แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการประกบฟิล์มเอ็กซ์เรย์เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างฟิล์มเพื่อตรวจสอบผล

ผลและวิจารณ์


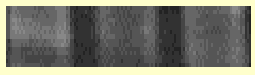


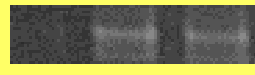
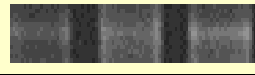

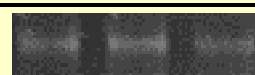
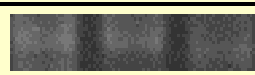

1. การค้นหาลำดับที่เกี่ยวของกับกลไกการควบคุมและพัฒนาของรากสะสมอาหารมันสำปะหลัง

การค้นหาลำดับที่คาดว่ามีส่วนเกี่ยวของกับกลไกการควบคุมและพัฒนาการของรากสะสมอาหารมันสำปะหลังในงานวิจัยได้ใช้เทคนิค differential display RT-PCR เริ่มจากทำการสกัดแยกอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างรากสะสมอาหารมันสำปะหลังระยะ fibrous root (Fi) transition root (TR) และ storage root (SR) ที่อายุ 2 เดือน เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการทดลอง จากนั้นทำการวัดปริมาณอาร์เอ็นเอและคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดแยกได้โดยการวัดด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer ร่วมกับวิธีการทำ denaturing gel electrophoresis ซึ่งอาร์เอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดี โดยจะสังเกตเห็นหน่วยย่อยขนาด 18S และ 28S ได้ชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 10 จากนั้นทำการปรับปริมาณอาร์เอ็นเอให้เท่ากันทุกตัวอย่าง เพื่อนำไปใช้เป็นแม่แบบในการการสังเคราะห์ cDNA ที่มี dT-ACP1 เป็นไพรเมอร์นำ cDNA ที่ได้มาใช้เป็นต้นแบบในการค้นหาลำดับและพบว่ามีการแสดงออกของยีนที่ระดับต่างกันของรากมันสำปะหลังที่ระยะต่างๆ โดยใช้ชุดไพรเมอร์แบบสุ่ม arbitrary ACP จำนวน 20 คู่



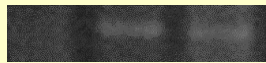





ภาพที่ 10 แสดงคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดจากรากที่ระยะพัฒนาการต่างๆ ของมันสำปะหลัง Fi คือ ระยะรากฝอย TR คือ ระยะรากเริ่มโป่งพอง SR คือ ระยะรากสะสมอาหาร จากภาพแสดงอาร์เอ็นเอปริมาณ 1 ไมโครกรัม

ตารางที่ 4 แสดงผลการทำ differential display RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ A21 ถึง A40 รูปเจลเรียงตามระยะพัฒนาการของมันสำปะหลัง Fi คือ ระยะรากฝอย TR คือ ระยะรากเริ่มโป่งพอง SR คือ ระยะรากสะสมอาหาร

Primer	Picture	Band Size (bp)	Identified gene	Identities (%)
A21	No Bands	NIL	NIL	NIL
A22		200	Integral membrane protein	97
A23		300	nuclear movement protein	87
A24	No Bands	NIL	NIL	NIL
A25	No Bands	NIL	NIL	NIL
A26		NIL	NIL	NIL
A27		NIL	NIL	NIL
A28		600	AGC protein kinases	100
A29		NIL	NIL	NIL
A30		NIL	NIL	NIL
A31	No Bands	NIL	NIL	NIL
A32		NIL	NIL	NIL
A33		NIL	NIL	NIL
A34		400	auxin responsive protein	97
A35	No Bands	NIL	NIL	NIL

*All gel picture is in the sequence of fibrous root (Fi), transition root (TR) and storage root (SR)

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Primer	Picture	Band Size (bp)	Identified gene	Identities (%)
A36		200	Photosystem protein	100
A36		1000	homeodomain-leucine zipper (HD-Zip)	98
A37		NIL	NIL	NIL
A38		200	phosphatidic acid phosphatase related protein	98
A39		NIL	NIL	NIL
A40		NIL	NIL	NIL

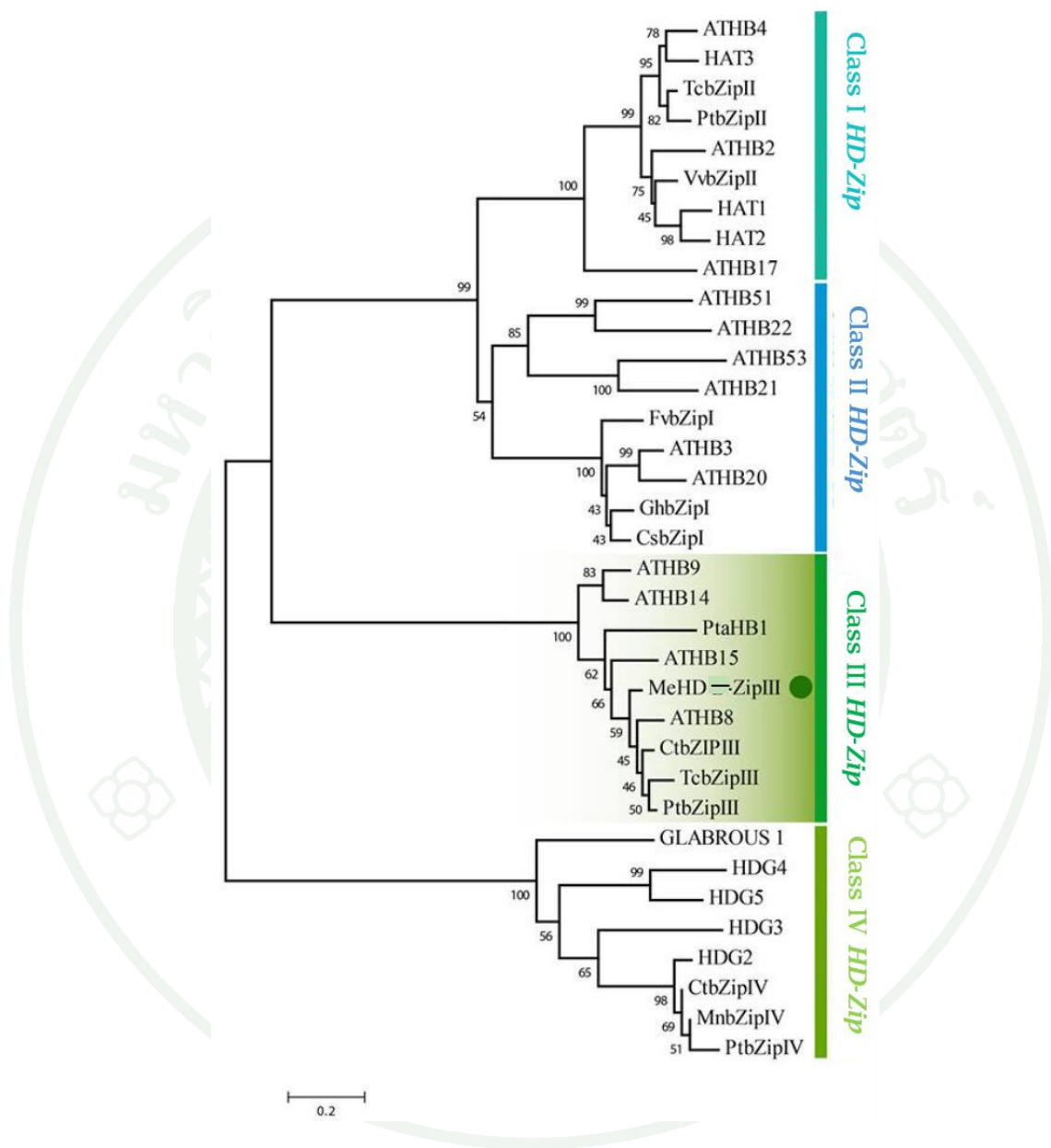
*All gel picture is in the sequence of fibrous root (Fi), transition root (TR) and storage root (SR)

รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการดำเนินการของ differential display RT-PCR จากไพรเมอร์ 20 คู่ พบว่ามีคู่ไพรเมอร์จำนวน 7 คู่ ที่แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในระยะการพัฒนารากมันสำปะหลัง (Masaru *et al.*, 2005) จึงได้ทำการเชื่อมต่อแถบดีเอ็นเอดังกล่าวเข้าสู่ pGEM[®] T easy vector เพื่อตรวจหาลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่สนใจทั้ง 7 แถบ จากนั้นนำผลการตรวจหาลำดับเบสที่ได้ไปทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI (Aron *et al.*, 2008) และกลุ่มยีนที่ได้ เมื่อนำไปตรวจสอบและวิเคราะห์หน้าที่ของยีนเบื้องต้นพบว่า มี 4 กลุ่มยีนที่ได้จาก 4 คู่ไพรเมอร์ คือ A22 A28 A34 และ A36 ที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับกลไกการพัฒนารากสะสมอาหาร ซึ่งในการทดลองนี้ได้คัดเลือก 2 ยีน คือ Integral membrane protein และ homeodomain-leucine zipper (HD-ZIP) ที่คาดว่าจะมีความสัมพันธ์มากที่สุดคือ A22 และ A36 มาศึกษาและวิจัยต่อไป

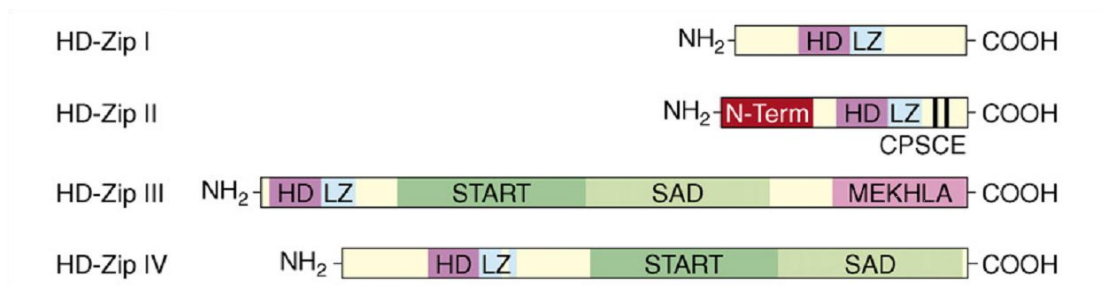
1.1 Homeodomain-leucine zipper (*HD-ZIP*) ในมันสำปะหลัง

จากข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากการทำ DDRT-PCR นำไปสู่การหาข้อมูล full length ของยีน *HD-ZIP* จากฐานข้อมูลจีโนมมันสำปะหลังทั้งนี้เพื่อศึกษาถึงหน้าที่ของยีนจึงนำ full length ของยีน ทำการถอดรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนเพื่อหาความสัมพันธ์ของยีนที่ได้กับยีนกลุ่ม *HD-ZIP* ใช้ แผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (MEGA4) ในการวิเคราะห์โดยนำลำดับกรดอะมิโนของยีน ตัวแทนในกลุ่ม *HD-ZIP* จากพืชต่างๆ ที่ได้ถูกจำแนกอยู่ในกลุ่ม *HD-ZIP* ที่ 1 ถึง กลุ่มที่ 4 (Mohamed and Claudio, 2009) กลุ่มละ 4 ชนิดเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบจัดหมวดหมู่ลำดับ วิวัฒนาการ ซึ่งพบว่ายีน *HD-ZIP* ที่ได้จากมันสำปะหลังมีความสัมพันธ์กับยีน *HD-ZIP* กลุ่มที่ 3 ดัง แสดงในภาพที่ 11 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับยีน *ATHB15* และยีน *ATHB8* ซึ่งเป็นกลุ่ม *HD-ZIP*III ที่แยกได้จาก *Arabidopsis thaliana* โดยยีนกลุ่ม *HD-ZIP* แบ่งออกได้ 4 กลุ่ม (Federico *et al.*, 2007) ตามองค์ประกอบของ domain ที่พบในโปรตีนโดยทุกกลุ่มจะต้องมีส่วนของ homeodomain-leucine zipper domain และมี domain กลุ่มอื่นที่แตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 12 และเมื่อนำลำดับ กรดอะมิโนของยีน *MeHD-ZIP*III มาเทียบเคียงกับโปรตีนกลุ่ม *HD-ZIP*III ใน *Populus trichocarpa* (*PtbZIP*III) และ *Arabidopsis thaliana* (*ATHB14*) เพื่อวิเคราะห์หา domain พบว่า *MeHD-ZIP*III *PtbZIP*III และ *ATHB14* มีองค์ประกอบของโดเมนที่ 1 และ 2 คือ homeodomain-leucine zipper domain (บริเวณแถบสีเขียว เหลือง และส้ม) โดเมนที่ 3 คือ START domain (บริเวณแถบสีฟ้า) และ โดเมนที่ 4 MEKHLA domain (บริเวณแถบสีชมพู) ซึ่ง MAKHLA domain เป็น domain ที่พบเฉพาะ ยีนในกลุ่ม *HD-ZIP*III เท่านั้น (Krishanu and Burglin, 2006) ดังแสดงในภาพที่ 13 ดังนั้นจึงสรุปได้ ว่ายีน *MeHD-ZIP* จัดอยู่ในกลุ่ม *HD-ZIP*III ซึ่งยีนในกลุ่ม *HD-ZIP*III นี้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการ พัฒนาเอมบริโอ การพัฒนาของยอด การเกิดตาข้าง กระบวนการพัฒนาใบ กระบวนการพัฒนา ระบบท่อลำเลียงน้ำและอาหาร และการขนส่งฮอร์โมนออกซิน หน้าที่ของยีน *HD-ZIP* ทั้ง 4 กลุ่มมี ดังที่แสดงดังตารางที่ 5 ซึ่งจากงานวิจัยมีผู้ศึกษาหน้าที่ของยีนกลุ่ม *HD-ZIP*III ใน *Populus trichocarpa* พบว่ายีน *PtbZIP*III มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญในแนวขวางของการสร้างเซลล์และ เพิ่มปริมาณเนื้อไม้ของลำต้น (Marcel *et al.*, 2011) ดังนั้นยีน *MeHD-ZIP*III อาจมีส่วนใน กระบวนการพัฒนาของเซลล์พาราเรโนไมมา (Kyoko *et al.*, 2005) เพื่อสะสมอาหารในบริเวณราก สะสมอาหารของมันสำปะหลังน่าจะมีผลจากยีน *MeHD-ZIP*III ซึ่งหน้าที่ของยีนในรากสะสม

อาหารมันสำปะหลังนี้จะถูกนำมาศึกษา โดยการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนและใช้มันฝรั่งเป็นต้นแบบในการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 11 แผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ของยีนกลุ่ม HD-ZIP ในพืช โดยยีน HD-ZIP ของมันสำปะหลังที่ถูกค้นพบในการศึกษานี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม HD-ZIP Class III ถูกบ่งชี้ด้วยวงกลมสีแดง



ภาพที่ 12 แสดงการจำแนกกลุ่มของยีน *HD-ZIP* และ โดเมนที่พบในยีน *HD-ZIP* แต่ละกลุ่ม (Federico *et al.*, 2007)

ตารางที่ 5 แสดงหน้าที่ของยีน *HD-ZIP* ทั้ง 4 กลุ่ม (Federico *et al.*, 2007)

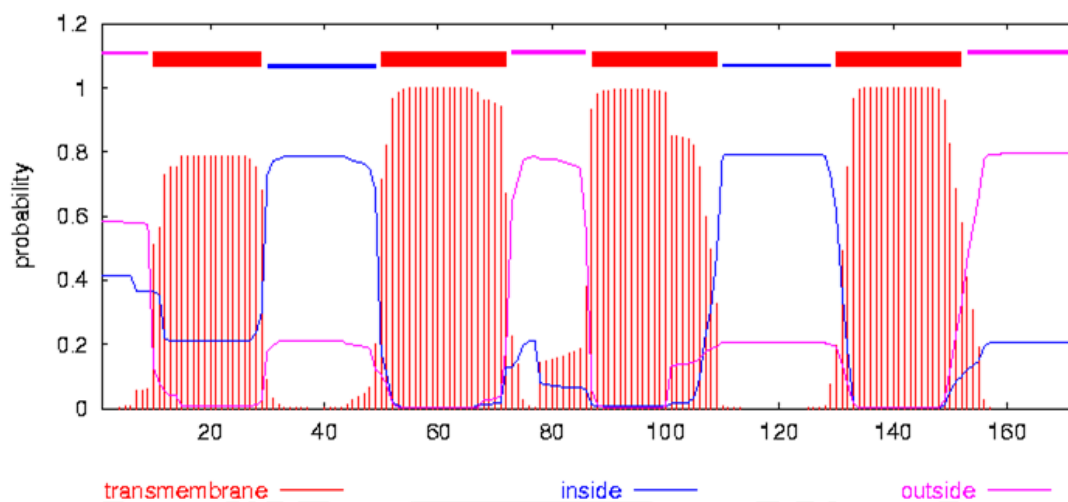
Subfamily	functions
<i>HD-ZIPI</i>	Response to abiotic stress, Response to ABA, De-etiolation, Blue-light signaling
<i>HD-ZIPII</i>	Response to illumination conditions Shade avoidance, Response to auxin
<i>HD-ZIPIII</i>	Embryogenesis, Meristem regulation, lateral organ initiation Leaf polarity, Vascular system development Auxin transport
<i>HD-ZIPIV</i>	Epidermal cell differentiation, Anthocyanin accumulation Root development, Trichomes formation



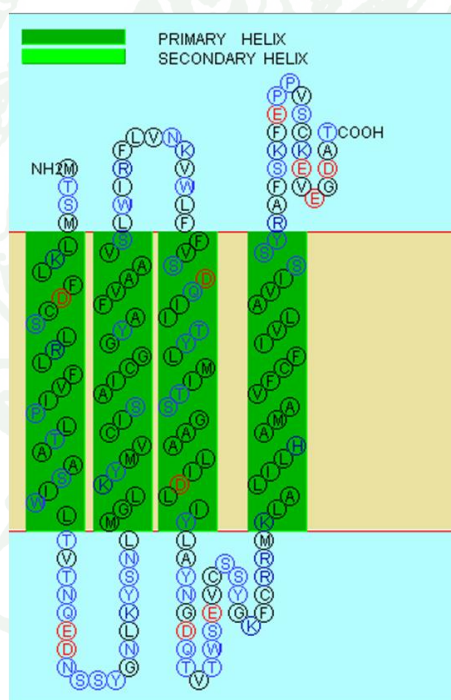
ภาพที่ 13 ผลการเทียบเคียงลำดับกรดอะมิโนและการหา domain ของโปรตีนสมาชิกกลุ่ม HD-ZIPIII ของมันสำปะหลังคือ MeHD-ZIPIII กับโปรตีน HD-ZIPIII ที่พบในพืชอื่น (Pt = *Populus trichocarpa*, At = *Arabidopsis thalina*)

1.2 Integral membrane protein ในมันสำปะหลัง

ผลที่ได้จากการทำ DDRT-PCR พบว่าแถบดีเอ็นเอของยีนรหัสของ integral membrane protein ให้ชื่อว่า *MeTM* มีการแสดงออกสูงในช่วงรากฝอยและรากที่เริ่มโป่งพอง จึงคาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมและพัฒนาการของรากสะสมอาหารมันสำปะหลังอันนำไปสู่การสืบหาข้อมูล Full length ของยีนรหัสของ *MeTM* จากฐานข้อมูลจีโนมมันสำปะหลัง เนื่องจาก integral membrane protein บางยีนมีลักษณะเป็น transmembrane protein เนื่องจากมีส่วนของ membrane spanning region ฝังอยู่ใน membrane มากกว่า 2 ตำแหน่ง (Johm, 2000) ดังนั้นจึงทำการถอดรหัสยีนรหัสของ *MeTM* เป็นลำดับกรดอะมิโนเพื่อวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน โดยใช้โปรแกรม TMHMM พบว่ายีนรหัสของ integral membrane protein ในมันสำปะหลังที่ได้จากการศึกษามีลักษณะเป็น transmembrane protein เนื่องจากมีโครงสร้างของ transmembrane spanning region 4 ตำแหน่ง ดังแสดงในภาพที่ 14 และเมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างและตำแหน่งของ transmembrane region พบว่าโครงสร้างของ transmembrane spanning region 4 ตำแหน่ง มีลักษณะการเรียงตัวเป็นแบบ primary helix ดังแสดงในภาพที่ 15 โดยมีลำดับกรดอะมิโนและความยาวของแต่ละ transmembrane region ดังแสดงในตารางที่ 6



ภาพที่ 14 แสดงผลการวิเคราะห์ transmembrane ในโครงสร้างโปรตีนของยีนรหัสของ *MeTM* บริเวณที่คาดว่าจะเป็ transmembrane spanning region ถูกแทนด้วยบริเวณสีแดง



ภาพที่ 15 แสดงผลการวิเคราะห์บริเวณและโครงสร้างของ transmembrane region ของยีนรหัสของ *MeTM* ในมันสำปะหลัง

ตารางที่ 6 แสดงลำดับกรดอะมิโนของ transmembrane protein ทั้ง 4 ตำแหน่งที่พบในโปรตีน

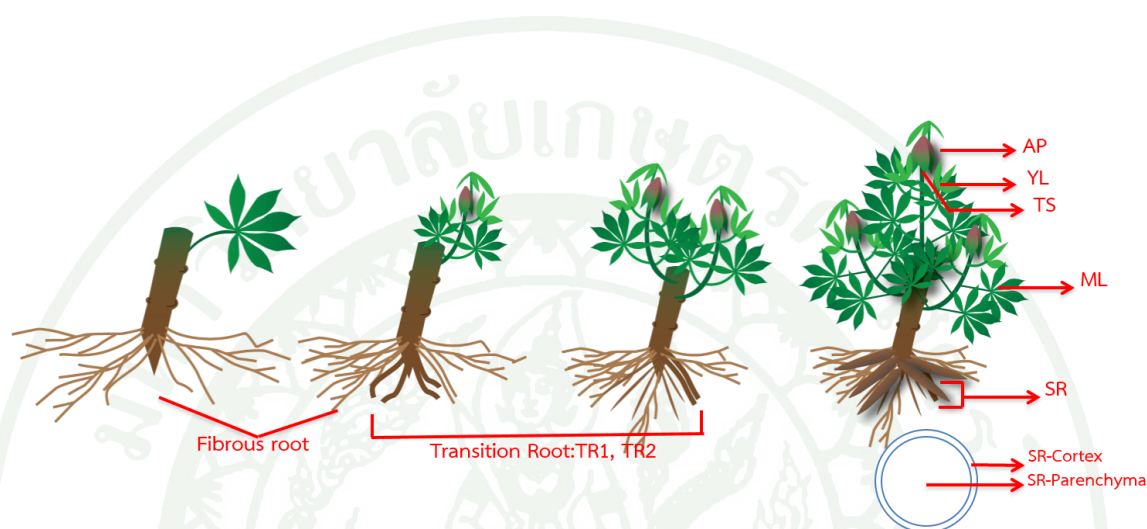
MeTM

ลำดับ ที่	ตำแหน่ง ของกรดอะ มิโนที่ C- terminal	Transmembrane region	ตำแหน่งของ กรดอะมิโน ที่ C- terminal	ประเภท	ความ ยาว
1	5	LKLFDCSLRFLVPLTAASIWL	26	PRIMARY	23
2	46	MGLKYMVCISAICGGYAFVAAVS	68	PRIMARY	23
3	82	FVSDQIITYLMITSGAALIDLIY	104	PRIMARY	23
4	130	KLALILHAMAVFCFIVLAVISSY	152	PRIMARY	23

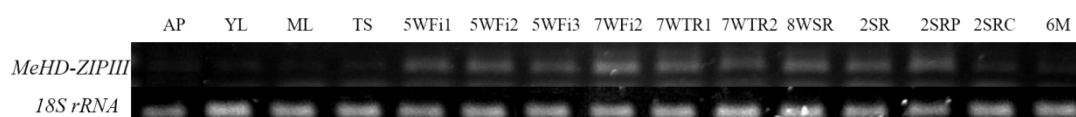
2. การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *MeHD-ZIPIII* และ *integral membrane protein (MeTM)* จากรากสะสมอาหารมันสำปะหลัง

ทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *HD-ZIPIII* และ *MeTM* โดยใช้เทคนิค semi-quantitative RT-PCR เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนที่สนใจในระยะพัฒนาการต่างๆ ของการสะสมอาหารในรากสะสมอาหารมันสำปะหลัง เริ่มตั้งแต่ระยะรากฝอย รากที่เริ่มมีการพัฒนาเป็นรากสะสมอาหาร ไปจนถึงรากสะสมอาหาร และในส่วนใบอ่อน ใบแก่และส่วนยอดตัวอย่างที่ถูกนำมาใช้ในการทดลองดังแสดงในภาพที่ 16 โดยใช้ยีน 18S *rRNA* เป็นยีนควบคุมภายใน จากการศึกษาแบบการแสดงออกของยีนพบว่าทั้งยีน *HD-ZIPIII* และยีน *MeTM* มีรูปแบบการแสดงออกที่เหมือนกันคือ มีการแสดงออกของยีนในระดับต่ำมากในเนื้อเยื่อส่วนที่อยู่เหนือพื้นดินคือ ส่วนปลายยอด ใบอ่อน ใบแก่ แต่ในเนื้อเยื่อส่วนที่อยู่ใต้พื้นดินพบระดับการแสดงออกของยีนในระดับสูงในเนื้อเยื่อส่วนรากตั้งแต่ส่วนรากฝอยอายุ 5 สัปดาห์จนถึงในระยะรากสะสมอาหารอายุ 2 เดือน ในส่วนของรากฝอยอายุ 7 สัปดาห์การแสดงออกของยีนสูงที่สุด และยีนทั้งสองมีการแสดงออกลดลงในรากสะสมอาหารอายุ 6 เดือน (Masaru *et al.*, 2005) โดยการแสดงออกของยีน *HD-ZIPIII* แสดงในภาพที่ 17 และยีน *MeTM* แสดงในภาพที่ 18 ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการค้นหาด้วยวิธี differential display RT-PCR ที่พบว่ายีนทั้งสองมีการแสดงออกสูงในช่วงของการพัฒนาจากรากฝอยไปเป็นรากที่เริ่มมีการสะสมอาหาร และมีการแสดงที่ลดลงในรากสะสมอาหารซึ่งสอดคล้องกับหน้าที่ของยีนกลุ่ม *HD-ZIP class III* ที่เกี่ยวข้องกับ

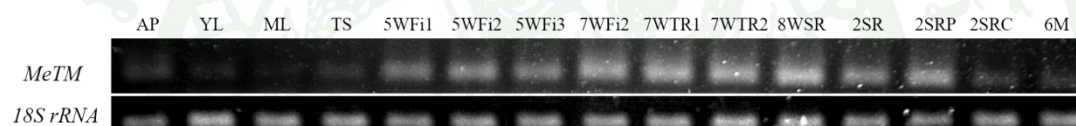
กระบวนการพัฒนาระบบลำเลียงอาหาร (Mohamed and Claudio, 2009) และลักษณะของ transmembrane protein ที่เกี่ยวกับกระบวนการขนถ่ายระหว่างเซลล์ (Liwen and Rogers, 1998) โดย จะทำการศึกษาหน้าที่ของยีน *HD-ZIPIII* และ *MeTM* ให้ชัดเจนด้วยการทำ overexpression เพื่อ ศึกษาหน้าที่ของยีนดังกล่าว โดยใช้มันฝรั่งเป็นตัวแทนในการศึกษาหน้าที่ของยีนดังกล่าวจากมัน ลำปะหลัง



ภาพที่ 16 ตัวอย่างเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของกระบวนการพัฒนารากสะสมอาหารและเนื้อเยื่อส่วนเหนือพื้นดิน AP, apex; YL, young leaf; ML, mature leaf; TS, top of stem; Fi, fibrous root; TR1, thickening root stage1; TR2, thickening root stage2; SR, storage root; SRP, storage root parenchyma; SRC, storage root cortex



ภาพที่ 17 ระดับการแสดงออกของยีน *HD-ZIPIII* ในเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของกระบวนการพัฒนารากสะสมอาหารและเนื้อเยื่อส่วนเหนือพื้นดิน AP, apex; YL, young leaf; ML, mature leaf; TS, top of stem; 5WFi1, 5 weeks fibrous root stage 1; 5WFi2, 5 weeks fibrous root stage 2; 5WFi3, 5 weeks fibrous root stage 3; 7WFi2, 7 weeks fibrous root stage 2; 7WTR1, 7 weeks thickening root stage 1; 7WTR2, 7 weeks thickening root stage 2; 8WSR, 8 weeks storage root; 2SR, 2 months storage root; 2SRP, 2 months storage root parenchyma; 2SRC, 2 months storage root cortex; 6M, 6 months storage root. ยีนที่ใช้ควบคุมคือยีน *18S rRNA*

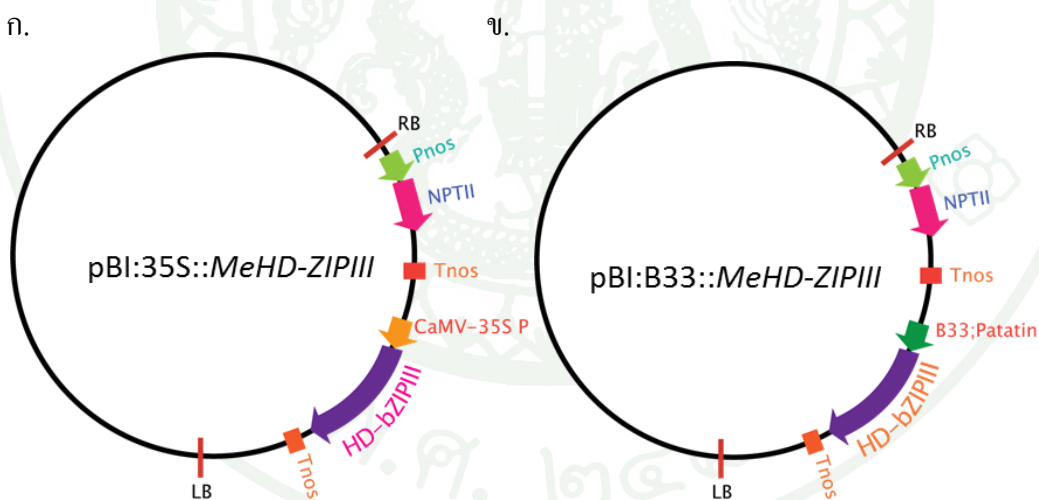


ภาพที่ 18 ระดับการแสดงออกของยีน *MeTM* ในเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของกระบวนการพัฒนารากสะสมอาหารและเนื้อเยื่อส่วนเหนือพื้นดิน AP, apex; YL, young leaf; ML, mature leaf; TS, top of stem; 5WFi1, 5 weeks fibrous root stage 1; 5WFi2, 5 weeks fibrous root stage 2; 5WFi3, 5 weeks fibrous root stage 3; 7WFi2, 7 weeks fibrous root stage 2; 7WTR1, 7 weeks thickening root stage 1; 7WTR2, 7 weeks thickening root stage 2; 8WSR, 8 weeks storage root; 2SR, 2 months storage root; 2SRP, 2 months storage root parenchyma; 2SRC, 2 months storage root cortex; 6M, 6 months storage root. ยีนที่ใช้ควบคุมคือยีน *18S rRNA*

3. การเพิ่มระดับการแสดงออกและการตรวจสอบพืชที่ได้รับยีนเป้าหมาย

3.1 การสร้างโครงสร้างที่เพิ่มระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม *MeHD-ZIPIII* และยีนกลุ่ม integral membrane protein (*MeTM*)

ทำการสร้างโครงสร้างที่เพิ่มระดับการแสดงออกของยีนเพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนสมาชิกในกลุ่ม *MeHD-ZIPIII* และยีนกลุ่ม *MeTM* ที่ได้จากระบวนการชักนำให้เกิดการสร้างรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง (Uzoma *et al.*, 2006) ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ที่มีการแสดงออกสูง 2 ชนิดคือ 35S CaMV ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่มีการส่งผลให้ยีนแสดงออกสูงในทุกส่วนของต้นพืช (Jacobo *et al.*, 2010) และ papatin (B33) ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่ส่งผลให้ยีนแสดงออกสูงที่มีความจำเพาะกับส่วนอวัยวะสะสมอาหาร โดยลักษณะโครงสร้างดังกล่าวแสดงดังภาพที่ 19 ก. และ ข. คือโครงสร้างของพลาสมิดสายผสม pBI121:35S::*MeHD-ZIPIII* และ pBI121:B33::*MeHD-ZIPIII* ตามลำดับ ส่วนภาพที่ 20 ก. และ ข. คือโครงสร้างของพลาสมิดสายผสม pBI121:35S::*MeTM* และ pBI121:B33::*MeTM* ตามลำดับ

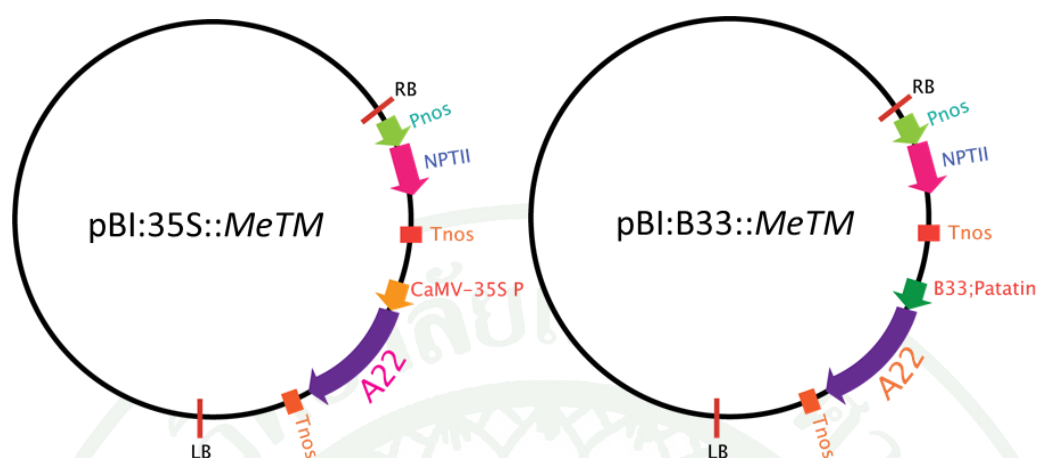


ภาพที่ 19 แสดงลักษณะโครงสร้างพลาสมิดสายผสมเพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีน *MeHD-ZIPIII*

ก. โครงสร้างของพลาสมิดสายผสม pBI121:35S::*MeHD-ZIPIII* ข. โครงสร้างของพลาสมิดสายผสม pBI121:B33::*MeHD-ZIPIII* ตั้งแต่ส่วนของ RB คือ Right border; Pnos คือ Nos promoter; NptII คือ ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน; Tnos คือ Nos terminator; 35S CaMV หรือ B33 คือ 35S Cauliflower mosaic virus promoter หรือ Patatin promoter; Tnos คือ Nos terminator; LB คือ left border

ก.

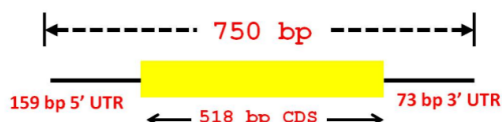
ข.



ภาพที่ 20 แสดงลักษณะ โครงสร้างพลาสมิดสายผสมเพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีน *MeTM* ก. โครงสร้างของพลาสมิดสายผสม pBI121:35S::*MeTM* ข. โครงสร้างของพลาสมิดสายผสม pBI121:B33::*MeTM* ตั้งแต่ส่วนของ RB คือ Right border; Pnos คือ Nos promoter; NptII คือ ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน; Tnos คือ Nos terminator; 35S CaMV หรือ B33 คือ 35S Cauliflower mosaic virus promoter หรือ Papatin promoter; Tnos คือ Nos terminator; LB คือ left border

3.2 การหาข้อมูลลำดับเบสของยีนกลุ่ม *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM*

จากข้อมูลลำดับเบสบางส่วนของยีนกลุ่ม *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM* ที่ได้จากการทำ Differential display RT-PCR นำมาทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับเบสของมันสำปะหลัง (www.phytozome.com) เพื่อหาข้อมูลลำดับเบสแบบเต็มยีนของยีนกลุ่ม *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM* ซึ่งจากฐานข้อมูลได้ค้นพบลำดับเบสของยีนกลุ่ม *MeHD-ZIPIII* ในมันสำปะหลัง ดังแสดงในภาพที่ 21 ซึ่ง full length mRNA ของยีน *MeHD-ZIPIII* ประกอบด้วย 5'UTR 305 คู่เบส 3'UTR 113 คู่เบส และ CDS 2559 คู่เบส แปลรหัสได้โปรตีน 852 กรดอะมิโน และข้อมูลลำดับเบสของยีนกลุ่ม Integral membrane protein ในมันสำปะหลัง ดังแสดงในภาพที่ 22 ในขณะที่ full length mRNA ของยีนกลุ่ม *MeTM* ประกอบด้วย 5'UTR 159 คู่เบส 3'UTR 73 คู่เบส และ CDS 519 คู่เบส แปลรหัสได้โปรตีน 172 กรดอะมิโน



```

CCAACCGCACCCCTTTCTTCAGGCCAAAAGAAGAGTATATATTGTGATCTATCCCCAGTTTCCAATTTCAATCCAACAGAATTTCTTCTCTTTCTCCTT 100
CAACTCTGGTTCTTTTATTACCTTCACCTTCAGTGGGCTTTGCTTTTATTTGCAGAGCTTCACTCAATGCTTAAGCTCTTTGATTGCTCTCTCAGGCT 200
      M T S M L K L F D C S L R L
CTTTGTGATTCCTCTCACTGCTGCAACCATCTGGTTAACTGTAACCAACCAGGAAGATAACAGCAGCTATGGGAATTTGAAGTACAGCAATCTCATGGGC 300
F V I P L T A A T I W L T V T N Q E D N S S Y G N L K Y S N L M G
CTCAAGTACATGGTTGTATCAGTGCCATTTGGTGGTTATGCTTTTGTGCTGCTGTCTCTTTGGATCAGATTCTTAGTTAATAAAGTTTGGCTGT 400
L K Y M V C I S A I C G G Y A F V A A V S L W I R F L V N K V W L
TCTTTGTTCTGACCAGATTACTTACTTATGATGATCACATCTGGGGCTGCACATCAGCTGATAGACCTGATATACTTAGCTTATAATGGAGATCAACAGTGAC 500
F F V S D Q I I T Y L M I T S G A A L I D L I Y L A Y N G D Q T V T
ATGGAGTGAAGTCTGCAGTTCTTATGGGAAGTTCTGCAGAAGAATGAAGCTAGCTTTGATTCTCCATGCCATGGCTGTTTCTGCTTCATTGTTTGTAGCT 600
W S E V C S S Y G K F C R R M K L A L I L H A M A V F C F I V L A
GTAATATCTTATAGAGCTTTAGCAAATTTGAACCTCCTGTTTCTCGTAAAGAAGTTGACGGAGATGCAACTTACATCTGATCCTTCACCTGTCATG 700
V I S S Y R A F S K F E P V S R K E V D G D A T Z
TATTTGTAATCACAGCATATTGAAATATGATTGATCACTTGATGTTTTTA 750

```

ภาพที่ 22 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ full length mRNA ของยีนกลุ่ม *MeTM* ซึ่งประกอบด้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5'UTR 159 คู่เบส บริเวณ CDS 519 คู่เบส และบริเวณ 3'UTR 73 คู่เบส

3.3 การโคลนยีนกลุ่ม *MeHD-ZIPIII* และยีนกลุ่ม *MeTM* จากรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง

3.3.1 การออกแบบไพรเมอร์

ในการศึกษาหน้าที่การทำงานของยีนกลุ่ม *MeHD-ZIPIII* และ ยีนกลุ่ม *MeTM* โดยการใช้มันฝรั่งเป็นต้นแบบในการศึกษาจึงต้องมีการสร้างโครงสร้างที่เพิ่มการแสดงออกของยีนดังกล่าว โดยในขั้นตอนแรกนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกลุ่ม *MeHD-ZIPIII* และ ยีนกลุ่ม *MeTM* มาทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการทำพีซีอาร์เพื่อสร้างยีนกลุ่มดังกล่าวและนำไปใช้ในการโคลนยีนเข้าสู่เวกเตอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *MeHD-ZIPIII* และยีนกลุ่ม *MeTM* ในมันฝรั่งต่อไป โดยทำการออกแบบฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ที่ตำแหน่งที่ลำดับเบสก่อนถึง start codon และรีเวิร์สไพรเมอร์ที่ตำแหน่งถัดจาก stop codon ดังภาพที่ 23 และภาพที่ 24 และในบริเวณของฟอร์เวิร์ดและรีเวิร์สไพรเมอร์จะทำการเติมตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *BamHI* (5' GGA TCC 3') และ *SacI* (5' GAG CTC 3') ตามลำดับเพื่อใช้เป็นตำแหน่งตัดต่อในการโคลนยีนดังกล่าวเข้าสู่ pBI121:35S และ pBI121::B33 เวกเตอร์ (Chen *et al.*, 2003) เพื่อใช้ในการตรวจสอบหน้าที่ของยีน *MeHD-ZIPIII* และ ยีนกลุ่ม *MeTM* ต่อไป

```

GCCGCCAACTTTTTTTTGGTTCTCTCCTCTTCGAAATATCTGTATGATTTTTGGCTTCTCTGTGTTGAGCTGAAGGGTTTACAGAATCTGCTTCCA 100
AAACTTCATGTTACTGATTTGAGGCAGAAAGGGCGGCGCCTGATCTGCGCCGTTTTTTTGAACGGTAAATTAGCTTACTTGTGCTGGAAGAGTTTGT 200
TTGTTGATGATACTGAGTTAGGAAGTTTCGTTTTTCTACTGTAAGCTTTCTGTGTGCTGGTCTGTGTGAGGAGAAGTGACGTTTGTAGGAGAATCT 300
TTTTGATGATGATGAGGAAAATGTTATGATGCAGAAGTGTATGGCGGTAACCTCGACCTGCAAGGATGGCGGAAGCAAGATTGCAATGGACAACGG 400
M M M M E K C Y D A E V M M A V T S T C K D G G S K I A M D N G
CAAGTACGTCAGATACACGCCGGAGCAGGTGGAAGCGTTGGAGAGACTCTACTATGAATGTCTTAAACCAAGTCTATGCGCCGGCAACAGTTGATTAGG 500
K Y V R Y T P E Q V E A L E R L Y E C P K P S S M R R Q Q L I R
GAGTGCCTTATCTCTTAACATAGAGCCTAAGCAGATCAAAGTTTGGTTTCAAGATTCGACGTTGTAGAGAGAAAAGAGGATCTCGGCTTC 600
E C P I L S N I E P K Q I K V W F Q N R R C R E K Q R K E A S R L
AAGCTGTGAATAGGAAGTTGACGGCGATGAATAAGTTTATGATGGAGGAGAATGATAGATTGCAAAAGCAAGTGTCTCAGCTGTTTTATGAGAATAGCTA 700
Q A V N R K L T A M N K L L M E E N D R L Q K Q V S Q L V Y E N S Y
TTTCGCCAACAGACTCAAAATGCGACCGACCTCGCCACCACAGACACAAAGTTGTGAATCGGTGATCAGTGGACAGCTCCATTTGACTCCTCAGAAT 800
F R Q Q T Q N A T D L A T T D T S C E S V V I S G Q L H L T P Q N
CAACCAAGGGATGCTAGTCTG CAGGACTTTTGCATTGCAGAGGAGACTTTAGCAGAGTTTCTTTCAAGGCCACAGGAACTGCTGTAGAGTGGTCC 900
Q P R D A S P A G L L S I A E E T L A E F L S K A T G T A V E W V
AAATGCC TGGGATGAAGCCTGGTCCGGATTCCCTTTGGAATCGTGTGCTATTTCATGTTGCCCTGGTGTGGCAGCAGTGCATGCGCCCTTGTGGTCT 1000
G M P G M K P G P D S F G I V A I S H G C P G V A A R A C G L V G L
AGAACCCTACCAGAGTTG CAGAAATCTTAAAGATCGGCCATCATGGTTTCGTGATTGCCGAGCTGTGGATGTTTTGAATGCATGTCACCTGGAAATGG 1100
E P T R V A E I L K D R P S W F R D C R A V D V L N A L S T G N G
GGAACAATTGAACTGCTTTACATGCAGCTTTATGCACCGACAACCTTTGGCACCAGCCCTGACTTCTGTTACTGCGCTACACTTCTGTTTTGGAGGATG 1200
G T I E L L Y M Q L Y A P T T L A P A R D F W L L R Y T T G D W S M L
GCAGTCTTGTGGTTTGTGAGAGTCACTTAGTAACACTCAGAATGTCCTCAAGTGTGCCACCTACACAGAAATTTGTGAGAGCAGAAATGCTACCTAGTGG 1300
G S L V V C E R S L S N T Q N G P S V P P T Q N F V R A E M L P S G
GTATCTGATTAGACCTTGTGAAGGAGTGGATCAATTATTATATAGTTGACCATATGGACTTAGAGCCTTGGAGTGTGCCGAAGTGTGGCCCACTT 1400
Y L I R P C E G G G S I I H I V D H M D L E P W S V P E V L R P L
TATGAGTCATCAACATTGCTAGCTCAGAAAACAACAATGGCGCTTTACGACATTTGAGGCAAAATTTCTCAAGAAGTTTCTCAGCCAAATGCTCTGGTT 1500
Y E S S T L L A Q K T T M A A L R H L R Q I S Q E V S Q P N V S G
GGGTTAGAACCTGCTGCTTTACGTGCACTTAGTCAGAGACTGAGCAAGGGCTTTAATGAAGCTGTTAATGGGTTCACTGATGAGGGGTGCTCTATGCT 1600
W G R R P A A L R A L S Q R L S K G F N E A V N G F T D E G W S M L
GGAAAGTATGAGCATTGATGTTACAGTTCCTGTGAAATTCATCTCCGCAAAATATGGGCTCAAATATTCTTATGCCAGTGGATTTCCATCTATG 1700
E S D G I D D V T V L V N S S P G K I L G L N I S Y A S G F P S M
AGCAATGGGGTCTTTGTGCAAAAGCGTCCATGTTGTACAGAATGTGCTCCAGCAACTTCTTAGGTTCCGCTGAGCATCGGTGAGAATGGGCAG 1800
S N G V L C A K A S M L L Q N V P P A I L L R F L R E H R S E W A
ACAGTGGTATGATGCTTATGCAGCTGCTGCTGTTAAAGCTGGTCCCTGTACCTTGCCAGTTCCCTCGAGTTGGAATTTTGGTGGTCAAGTATTCTTCC 1900
D S G I D A Y A A A A V K A G P C T L P V P R V G N F G G Q V I L P
CTTGGCTCACACCATTGAGCAGCAAGAGTTTATGAGGTAATTAACCTGAAATATGGGATACCGGGAGGACATGATATGCTCGGTGACATCTTCTCT 2000
L A H T I E H E E F M E V I K L E N M G Y R E D M I M P G D I F L
TTGCAATTTGTACTGGAGTAGACGAGAATGCTGTTGCACCTGCGCTGAACTTATCTTGTGCTCCCATGATGCCCTTTTTCTGATGATGACACCTATTA 2100
L Q F C T G V D E N A V G T C A E L I F A P I D A S F S D D A P I
TTCCTTCCAGGTTCCGCATCATCTCTTGGACTCCCGAATGGATGCTAGTAGTCCAAACCGGACACTTGACCTTGCCTCTGCTCTTGTGTTGGACCAAC 2200
I P S G F R I I P L D S R M D A S S P N R T L D L A S A L D V G P T
NVASMARQYVRSVVASVQRVALALS SPSRFGPQA 2300
GTTTCCGTCACCACCTGGTACTCCCGAAGCGCTTACACTTGACCTTGGATATGTCAAAGTATAGGTGCTATCTAGGTATGGAGCTTCTCAAAGTGA
GFRPPPGTPEALTLARWICQSYRRCYLGMELELSE 2400
AGGAAGTGAATCCATTCTGAAATCGCTTTGGCATCACTGATGCAATATGTGCTGCTCTTTGAAGGCTGCTCCAGTTTTTACCTTTGCAAAATCAGGGA
GSESLKSLWHHSDAIMCCSLKALPVFTFANQG 2500
GGACTAGATATGCTTGAGACAACCTTTGGTTGCTCTCAAGACATCACTTTGGAAAAGATATTTGATGACAACGGACGCAAGACTTTGTGTTGATGATTTG 2600
GLDMLETTLLVALQDITLEKIFDDNNGRKTLCSEF
CTCAAATAATGCAACAGGCTTTATGTCCTCCAGGGTGGTATCTGCTGTCAGATGGAAGGCCAGTATCTATGAAAGAGCAGTAGCCTGGAAAGT 2700
P Q I M Q Q G F M C L Q G G I C L S S M G R P V S Y E R A V A W K V
GTTGAACGAAGAGGAACTGCTCACTGCTTTCATGTTTCACTTGAAGTGTGCTGTAAGTGTGAAGTGTGAAGTGTGAAGTGTGAAGTGTGAAGTGTGAAG 2800
LNEEETAHCICFMFINWTFVZ
ATTATAAACTTTCTTTTTTTTCTCTGSGTGAAGCTTTGATCCTGTACGAGCATCTCCGACAGTAACATCA 2977

```

ภาพที่ 23 แสดงตำแหน่งที่ออกเบบฟอร์มิคและรีเวิร์สไพรมอร์ (บริเวณที่ขีดเส้นใต้) ของยีน

MeHD-ZIPIII

```

CCAACCGCACCTTTTCTTCAGGCCAAAAGAAGGTATATATTGTGATCTATCCCCAGTTFCCAATTTCAATCCAACAGAAATCTTCCTTTCTCAGGCT 100
CAACTCTGGTCTTTTATTCACCTTCACCTTCAGTGGGCTTTCGCTTTTATTTGCAGAGATGACTTCAATGCTTAAGCTCTTTGATTGCTCTCTCAGGCT 200
M T S M L K L F D C S L R L
CTTTGTGATTCCTCTCAGCTGCAACCATCTGGTTAACTGTAACCAACCAGGAAGATAACAGCAGCTATGGGAATTTGAAGTACAGCAATCTCATGGGC 300
F V I P L T A A T I W L T V T N Q E D N S S Y G N L K Y S N L M G
CTCAAGTACATGGTTTGTATCAGTGCATTTGTGGTGGTTATGCTTTTGTGCTGCTGTGTCTCTTTGGATCAGATCTTAGTAAATAAAGTTTGGCTGT 400
L K Y M V C I S A I C G G Y A F V A A V S L W I R F L V N K V W L
TCTTTGTTCTGACCAGATTACTTACTTGATGATCAGATCTGGGCTGCACTCATAGACCTGATATACTTAGCTTATAATGGAGATCAACAGTGAC 500
E F V S D Q I I T Y L M I T S G A A L I D L I Y L A Y N G D Q T V T
ATGGAGTGAAGTCTGCAGTCTTATGGGAAGTTCTGCAGAAGAATGAAGCTAGCTTTGATTCTCCATGCCATGGCTGTTTTCTGCTTCATGTTTGTAGCT 600
W S E V C S S Y G K F C R R M K L A L I L H A M A V F C F I V L A
GTAATATCTTCTATAGAGCTTTAGCAAATTTGAACCTCCTGTTTCTCGTAAAGAAGTTGACGGAGATGCAACTTAGATACTGATCCTTCACTGTCATG 700
V I S S Y R A F S K F E P P V S R K E V D G D A T Z
TATTTGTAATCACGCATATTGAAATATGATTGATCACTTGATGTTTTA 750

```

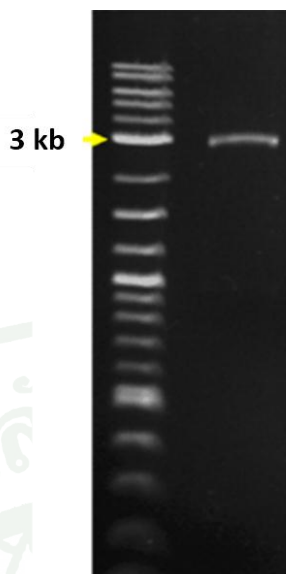
ภาพที่ 24 แสดงตำแหน่งที่ออกแบบฟอร์วิดและรีเวิร์สไพรเมอร์ (บริเวณที่ขีดเส้นใต้) ของยีน

MeTM

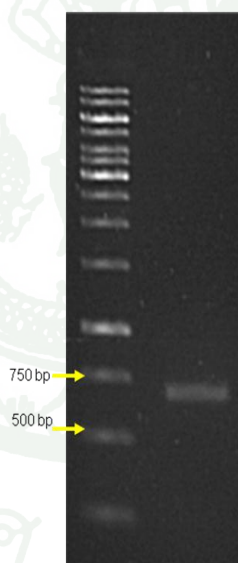
3.3.2 การสร้างโอนยีนสำหรับยีน *MeHD-ZIPIII* และ ยีน *MeTM*

การทำ PCR โดยใช้ cDNA จากรากสะสมอาหารของมันสำปะหลังอายุ 6 เดือน เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน *MeHD-ZIPIII* และ Integral membrane protein โดยการทำให้ซีอาร์ ได้ขนาดแถบดีเอ็นเอของยีน *MeHD-ZIPIII* มีขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส และยีน *MeTM* มีขนาดประมาณ 750 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 25 และภาพที่ 26 ตามลำดับ

หลังจากที่ได้แถบดีเอ็นเอของทั้งยีน *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM* มาแล้ว นำแถบดีเอ็นเอดังกล่าวมาทำการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM[®] T easy vector จากนั้นทำการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสของยีนทั้งสองโดยการ sequencing แล้วนำลำดับเบสที่ได้จากการหาลำดับเบสมาเปรียบเทียบความถูกต้องกับข้อมูลลำดับเบสของยีน *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM*



ภาพที่ 25 แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *MeHD-ZIPIII* ขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส ที่ได้จากปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

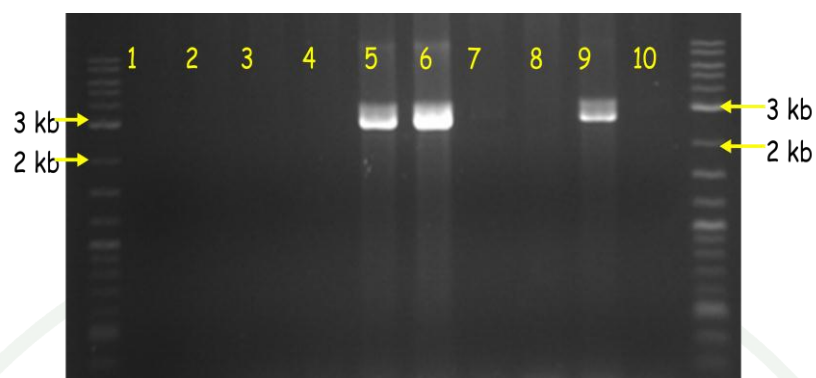


ภาพที่ 26 แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *MeTM* ขนาดประมาณ 750 คู่เบส ที่ได้จากปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

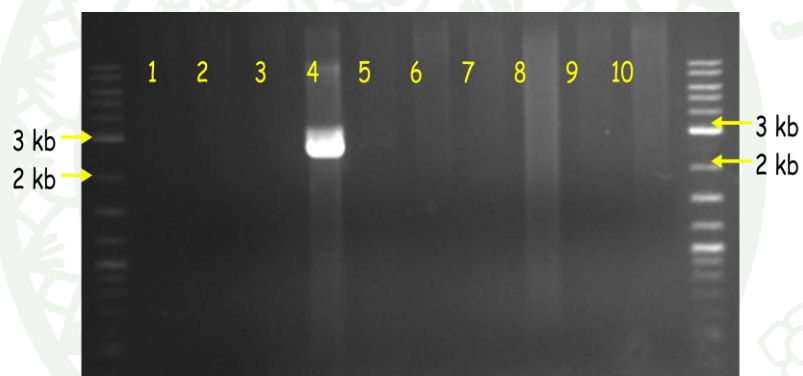
3.3.3 การสร้างพลาสมิดสายผสม pBI:35S::MeHD-ZIPIII pBI:B33::MeHD-ZIPIII pBI:35S::MeTM และ pBI:B33::MeTM

เมื่อได้พลาสมิดสายผสม pGEM[®] T easy vector ที่มีชิ้นส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการของยีน *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM* ที่โคลนได้จากรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง นำพลาสมิดดังกล่าวมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI* แล้วทำการแยกชิ้นส่วนของยีน *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM* ออกจากพลาสมิด pGEM[®] T easy vector จากนั้นนำชิ้นยีนไปทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pBI121 เพื่อใช้ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืช (Chen *et al.*, 2003) โดยใช้พลาสมิด pBI121 ที่ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ 2 ชนิดคือ pBI121:35S และ pBI121:B33 ที่ตัดเอาชิ้นส่วนของยีน *GUS* ออกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI* เมื่อเชื่อมต่อกันจะได้พลาสมิดสายผสม pBI:35S::MeHD-ZIPIII pBI:B33::MeHD-ZIPIII pBI:35S::MeTM และ pBI:B33::MeTM ถ่ายโอนพลาสมิดสายผสมดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5 α เลี้ยงเซลล์บนอาหารคัดเลือก จากนั้นนำโคโลนีที่ขึ้นมาทำโคโลนีพีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบหาชิ้นที่ทำการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ทั้งสองโดยผลการทำพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบพลาสมิดสายผสม pBI:35S::MeHD-ZIPIII และ pBI:B33::MeHD-ZIPIII ได้ผลดังที่แสดงในภาพที่ 27 ก. ซึ่งผลการทดลองบ่งชี้โคโลนีหมายเลข 5, 6 และ 9 มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,000 คู่เบสของยีน *MeHD-ZIPIII* เกิดขึ้นแสดงว่าโคโลนีหมายเลข 5, 6 และ 9 มีพลาสมิดสายผสม pBI:35S::MeHD-ZIPIII อยู่จริง และภาพที่ 28 ข. จากผลการทดลองบ่งชี้โคโลนีหมายเลข 4 มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส ของยีน *MeHD-ZIPIII* เกิดขึ้นแสดงว่าโคโลนีหมายเลข 4 มีพลาสมิดสายผสม pBI:35S::MeHD-ZIPIII อยู่จริง และจากผลการทำโคโลนีพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบพลาสมิดสายผสม pBI:35S::MeTM และ pBI:B33::MeTM ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 28 ก. ซึ่งจากผลการทดลองบ่งชี้ว่าโคโลนีหมายเลข 1 ถึงหมายเลข 10 มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 คู่เบส ของยีน *MeTM* เกิดขึ้นแสดงว่าโคโลนีหมายเลข 1 ถึงหมายเลข 10 มี พลาสมิดสายผสม pBI:35S::MeTM อยู่จริง และภาพที่ 28 ข. ซึ่งจากผลการทดลองบ่งชี้ว่าโคโลนีหมายเลข 1 ถึงหมายเลข 10 ทุกโคโลนียกเว้นโคโลนีหมายเลข 3 มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 คู่เบส ของยีน *MeTM* เกิดขึ้นแสดงว่าโคโลนีทุกโคโลนียกเว้นโคโลนีหมายเลข 3 มีพลาสมิดสายผสม pBI:B33::MeTM อยู่จริง

ก.

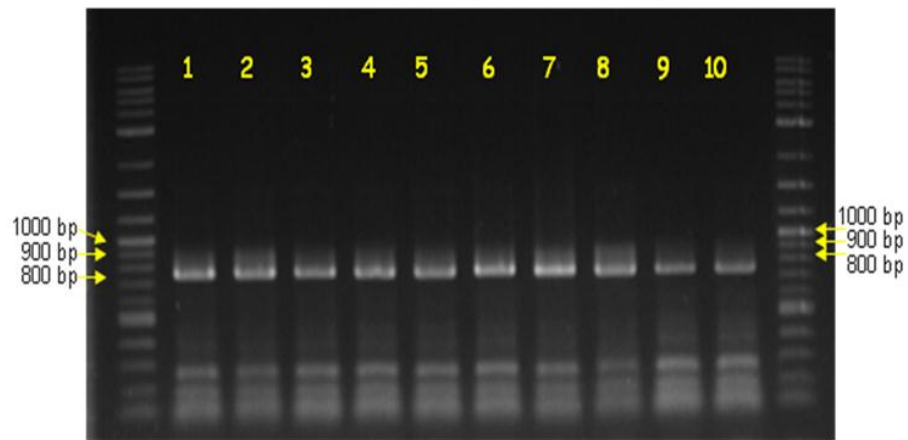


ข.

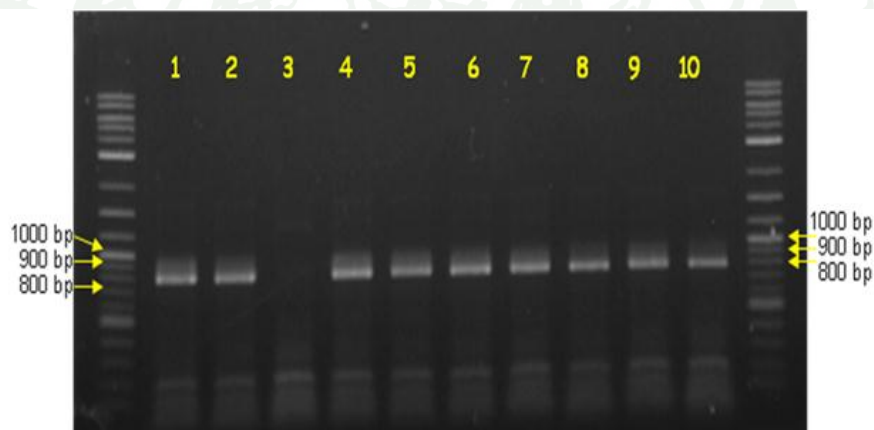


ภาพที่ 27 แสดงผลการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ตรวจสอบการมีขึ้นอยู่ของพลาสมิดสายผสมของยีน *MeHD-ZIPIII* โดยในภาพ ก. แสดงผลการตรวจสอบการมีขึ้นอยู่ของพลาสมิดสายผสม pBI121:35S::*MeHD-ZIPIII* และในภาพ ข. แสดงผลการตรวจสอบการมีขึ้นอยู่ของพลาสมิดสายผสม pBI121:B33::*MeHD-ZIPIII*

ก.



ข.

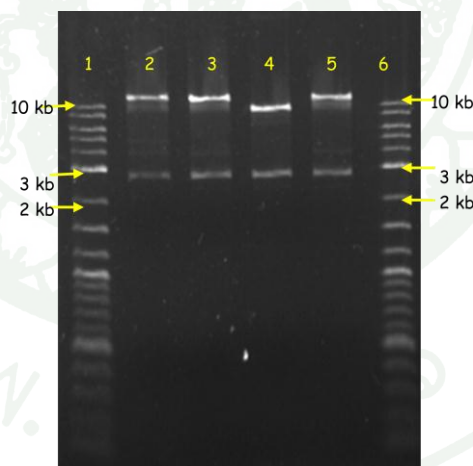


ภาพที่ 28 แสดงผลการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ตรวจสอบการมีขึ้นอยู่กับของพลาสมิดสายผสมของยีน *MeTM* โดยในภาพ ก. แสดงผลการตรวจสอบการมีขึ้นอยู่กับของพลาสมิดสายผสม pBI121:35S:: *MeTM* และในภาพ ข. แสดงผลการตรวจสอบการมีขึ้นอยู่กับของพลาสมิดสายผสม pBI121:B33:: *MeTM*

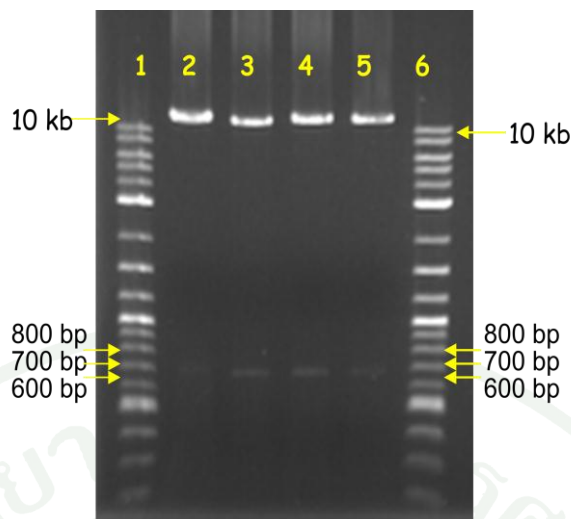
จากผลการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์เพื่อสืบหาพลาสมิดสายผสมจึงเลือกนำโคลนนิ่งหมายเลข 5, 6 และ 9 ของพลาสมิดสายผสม pBI121:35S::*MeHD-ZIPIII* และโคลนนิ่งหมายเลข 4 ของพลาสมิดสายผสม pBI121:B33::*MeHD-ZIPIII* มาทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวนแล้วทำการสกัดพลาสมิดและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI* เพื่อยืนยันผลความถูกต้องของการสร้างพลาสมิดสายผสมอีกครั้งหนึ่งได้ผลดังภาพที่ 29 โดยเมื่อตัดพลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พลาสมิดสาย

ผสมที่ถูกต้องจะได้ชิ้นส่วนของพลาสมิด pBI:35S ขนาดประมาณ 12,000 คู่เบส หรือ พลาสมิด pBI:B33 ขนาด 14 kbp และชิ้น *MeHD-ZIPIII* ขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส จากผลการทดลองพบว่า โคลิโคนี้หมายเลข 5, 6 ของพลาสมิดสายผสม pBI121:35S::*MeHD-ZIPIII* และ โคลิโคนี้หมายเลข 4 ของพลาสมิดสายผสม pBI121:B33::*MeHD-ZIPIII* เป็นพลาสมิดสายผสมที่มีชิ้น *MeHD-ZIPIII* เชื่อมต่ออยู่จริง

จากการทำโคลิโคนี้ที่ซีอาร์หาพลาสมิดสายผสมจึงเลือกนำโคลิโคนี้หมายเลข 1 และ 2 ของพลาสมิดสายผสม pBI:35S::*MeTM* และ โคลิโคนี้หมายเลข 1 และ 2 ของพลาสมิดสายผสม pBI121:B33::*MeTM* มาทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวนแล้วทำการสกัดพลาสมิดและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI* เพื่อยืนยันผลความถูกต้องของการสร้างพลาสมิดสายผสมอีกครั้งหนึ่ง ได้ผลดังภาพที่ 30 โดยเมื่อตัดพลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พลาสมิดสายผสมที่ถูกต้องจะได้ชิ้นส่วนของพลาสมิด pBI:35S ขนาดประมาณ 14 kbp หรือ พลาสมิด pBI:B33 ขนาดประมาณ 14 kbp และชิ้น *MeHD-ZIPIII* ขนาดประมาณ 750 คู่เบส จากผลการทดลองพบว่า โคลิโคนี้หมายเลข 1 และ 2 ของพลาสมิดสายผสม pBI:35S::*MeTM* และ โคลิโคนี้หมายเลข 1 และ 2 ของพลาสมิดสายผสม pBI121:B33::*MeTM* เป็นพลาสมิดสายผสมที่มีชิ้น *MeTM* เชื่อมต่ออยู่จริง



ภาพที่ 29 แสดงพลาสมิด pBI121:35S::*MeHD-ZIPIII* และ pBI121:B33::*HD-ZIPIII* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* และ *BamHI* โดยช่องที่ 1 และช่องที่ 6 คือ 2 log DNA marker ช่องที่ 2, 3 และช่องที่ 4 คือ pBI121:35S::*MeHD-ZIPIII* หมายเลขที่ 5, 6 และ 9 ตามลำดับ ช่องที่ 5 คือ pBI121:B33::*HD-ZIPIII* pBI:B33::*MeHD-ZIPIII* หมายเลข 4



ภาพที่ 30 แสดงพลาสมิด pBI121:35S::MeTM#1,2 และ pBI121:B33::MeTM#1,2 ที่ตัดด้วย เอนไซม์ *SacI* และ *BamHI* โดยช่องที่ 1 และช่องที่ 6 คือ 2 log DNA marker ช่องที่ 2 และช่องที่ 3 คือ pBI:121:35S::MeTM หมายเลขที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ช่องที่ 4 และ 5 คือ pBI121:B33::MeTM หมายเลข 1 และ 2 ตามลำดับ

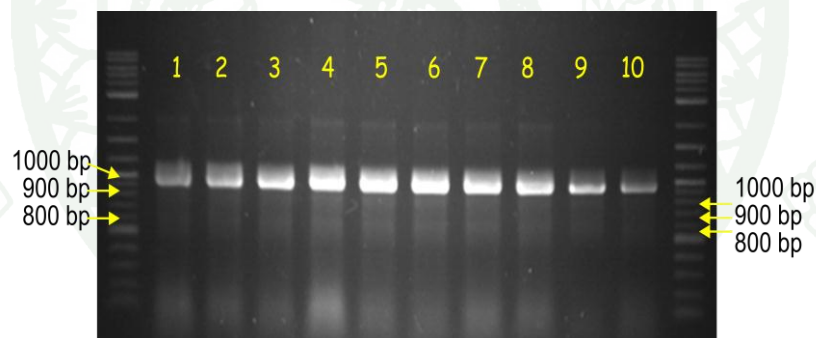
4 การสร้างระบบการถ่ายโอนยีนในมันฝรั่งเพื่อวิเคราะห์หน้าที่ของยีนเป้าหมาย

ผลจากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM* แสดงให้เห็นว่ายีนมีการแสดงออกที่สอดคล้องไปกับการพัฒนารากช่วงแรกซึ่งเริ่มสร้างเป็นรากสะสมอาหารอย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้ว่ายีนดังกล่าวเกี่ยวข้องหรือส่งผลต่อการพัฒนารากสะสมอาหารของมันฝรั่งโดยตรง การวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่เกิดจากการชักนำของยีนเป้าหมายจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการศึกษาหน้าที่ของยีนซึ่งจากการถ่ายโอนยีนเป้าหมายเข้าสู่มันฝรั่งพบว่าการแสดงออกสูงในพืชต้นแบบเนื่องจากมันฝรั่งมีกรรมวิธีถ่ายยีนและระบบการชักนำให้เกิดเป็นต้นจนกระทั่งเจริญเติบโตนั้นมีระยะเวลาของการเจริญที่สั้นกว่าจึงเลือกพืชชนิดนี้มาใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนเป้าหมายจากมันสำปะหลัง อีกทั้งมีความเหมือนของกระบวนการสร้างส่วนที่สะสมอาหารของทั้งมันสำปะหลังและมันฝรั่งซึ่งคาดว่าจะเกิดจากปัจจัยควบคุมภายในที่เหมือนกันหรือใกล้เคียงกัน (Ku *et al.*, 2008) ดังนั้นในงานวิจัยจึงเลือกใช้มันฝรั่งเป็นต้นแบบในการศึกษา

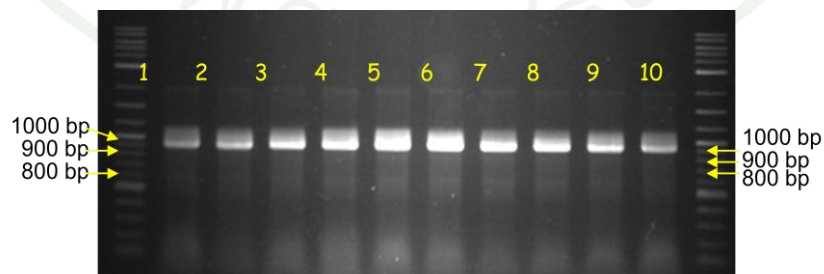
4.1 การถ่ายยีนเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens*

นำพลาสมิดสายผสม pBI:35S::MeHD-ZIPIII , pBI:B33::MeHD-ZIPIII , pBI:35S::MeTM และ pBI:B33::MeTM มาทำการถ่ายโอนเข้าไปใน *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 เพื่อใช้เป็นพาหะในการถ่ายยีนเข้าสู่ต้นมันฝรั่งต่อไป (Sarría *et al.*, 2000) หลังจากทำการถ่ายยีนเข้าสู่ *Agrobacterium* แล้วทำการตรวจสอบหาพลาสมิดสายผสมที่ถ่ายเข้าสู่ *Agrobacterium* ด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์ โดยเลือกโคลนนิ่งที่ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดสายผสมที่ขึ้นในอาหารคัดเลือกพลาสมิดละ 10 โคลนนิ่ง แล้วทำการตรวจสอบหาพลาสมิดสายผสมพบว่าทั้ง pBI:35S::MeHD-ZIPIII , pBI:B33::MeHD-ZIPIII ทุกโคลนนิ่งมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 คู่เบส ของพลาสมิดสายผสมอยู่จริง ดังแสดงในภาพที่ 31ก และข และพลาสมิดสายผสม pBI:35S::MeTM และ pBI:B33::MeTM ทุกโคลนนิ่งมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 คู่เบส ของพลาสมิดสายผสมอยู่จริง ดังแสดงในภาพที่ 32 ก และ ข

ก.

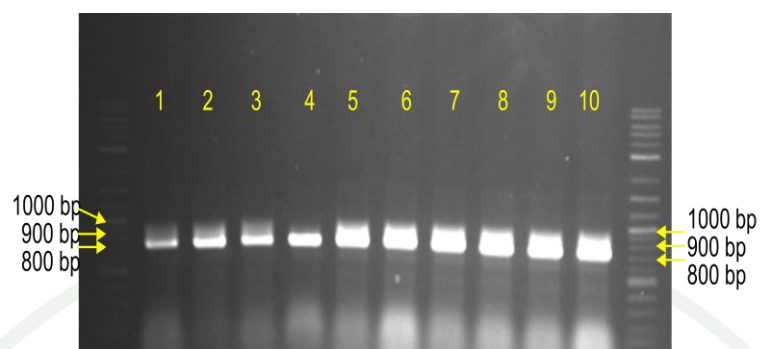


ข.

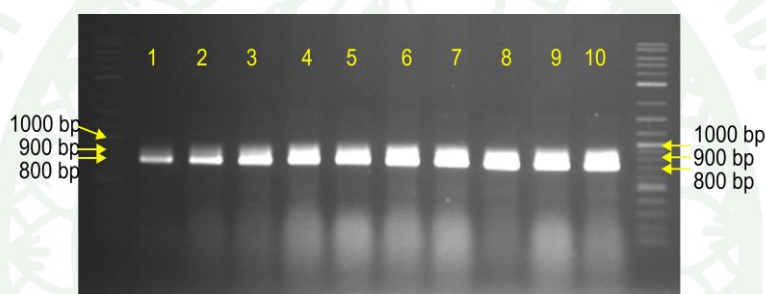


ภาพที่ 31 แสดงผลการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ของ *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 โดยภาพ ก. แสดงผลการถ่ายเวกเตอร์ pBI121:35S::MeHD-ZIPIII ภาพ ข. แสดงผลการถ่ายเวกเตอร์ pBI121:B33::MeHD-ZIPIII

ก.



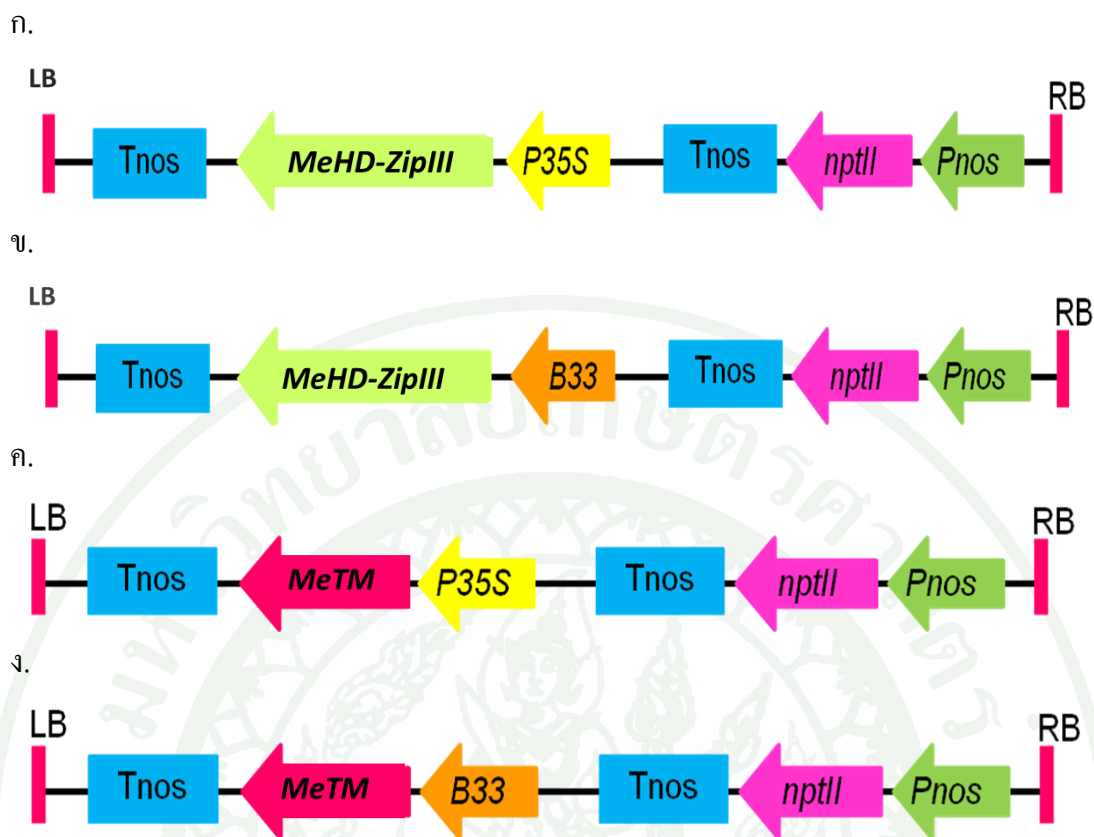
ข.



ภาพที่ 32 แสดงผลการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ของ *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 โดยภาพ ก. แสดงผลการถ่ายเวกเตอร์ pBI121:35S::MeTM ภาพ ข. แสดงผลการถ่ายเวกเตอร์ pBI121:B33::MeTM

4.2 การถ่ายยีนจากเซลล์ *Agrobacterium tumefaciens* เข้าสู่มันฝรั่ง

สร้างต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมันฝรั่งเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *MeHD-ZIPIII* และยีน *MeTM* โดยทำการถ่ายยีนจาก *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 เข้าสู่ส่วนข้อของมันฝรั่งตามวิธีการของ (Benerjee *et al.*, 2006) ส่วนข้อที่ผ่านการถ่ายโอนยีนจะถูกชักนำให้เกิดเป็นต้น และถูกนำไปชักนำให้เจริญเติบโตต่อไปในอาหาร MS ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะกานามัยซินเพื่อคัดเลือกให้มีการเจริญเฉพาะต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีนเข้าไป โดยเฉพาะส่วนของ T-DNA เท่านั้นที่ถูกถ่ายโอนเข้าพืช ดังแสดงในภาพที่ 33

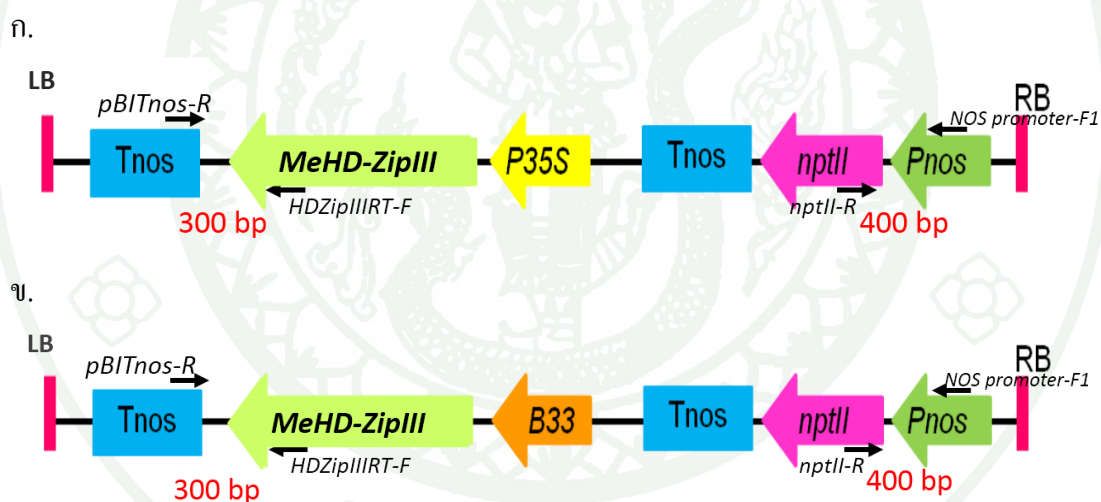


ภาพที่ 33 แสดงส่วนของ T-DNA ของพลาสมิดสายผสม ก. pBI:35S::MeHD-ZIPIII ข. pBI:B33::MeHD-ZIPIII ค. pBI:35S::MeTM และ ง. pBI:B33::MeTM ที่ถูกถ่ายโอนจาก *Agrobacterium tumefaciens* เข้าสู่ต้นฝรั่ง ตั้งแต่ส่วนของ RB คือ Right border; Pnos คือ Nos promoter; NptII คือ ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน; Tnos คือ Nos terminator; CaMV35S หรือ B33 คือ Cauliflower mosaic virus 35S promoter หรือ Papatin promoter; Tnos คือ Nos terminator; LB คือ left border

4.3 การตรวจหาต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

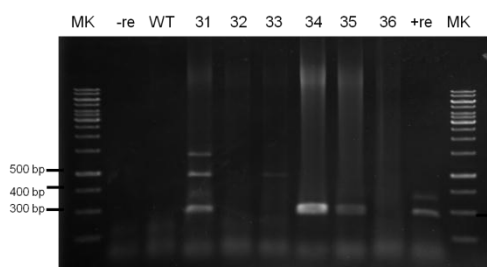
เมื่อได้ต้นมันฝรั่งที่เจริญเติบโตสมบูรณ์ในขวดจากนั้นทำการตัดใบของต้นมันฝรั่งแล้วทำการสกัดจีโนมิก ดีเอ็นเอ เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการตรวจสอบหาชิ้นส่วนของยีนที่ได้ทำการถ่ายโอนเข้าสู่ต้นมันฝรั่งโดยการทำพีซีอาร์ (Chen *et al.*, 2003) โดยมีต้นมันฝรั่งที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน และพลาสมิดสายผสมที่ใช้ในการถ่ายโอนยีนเป็นตัวควบคุม และใช้ไพรเมอร์ในการตรวจสอบทั้งหมด 2 คู่ คือไพรเมอร์ที่จับกับส่วนของยีนที่ต้องการตรวจสอบการแสดงออก (*HD-ZIPIII* RT-F) และ *NOS* terminator (pBITnos-R) จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 คู่เบส และไพรเมอร์ที่จับ

กับส่วนของ Nopaline Synthase promoter (*NOS* promoter-F1) กับส่วนของ kanamycin resistance gene (*nptII*-R) ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส ดังภาพที่ 34 ก และ ข แสดงตำแหน่งไพรเมอร์บน T-DNA ของ pBI:35S::MeHD-ZIPIII และ pBI:B33::MeHD-ZIPIII ตามลำดับ ผลการทำพีซีอาร์เพื่อตรวจหาต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับยีนและ Nopaline Synthase terminator (Pierre *et al.*, 1991) แสดงในภาพที่ 35 ก. และ ข. พบว่าต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนหมายเลข 31, 34 และ 35 มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 คู่เบส และ 400 คู่เบส จึงสรุปได้ว่าต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนหมายเลข 31, 34 และ 35 เป็นต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:35S::MeHD-ZIPIII และจากผลการทดลองหาต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:B33::MeHD-ZIPIII พบว่าต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนหมายเลข 31, 33, 34, 35, 38 และ 39 มีแถบดีเอ็นเอประมาณ 300 คู่เบส และ 400 คู่เบส ของทั้งสองคู่ไพรเมอร์เกิดขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 36 ก. และ ข สรุปได้ว่าต้นมันฝรั่งหมายเลขดังกล่าวเป็นต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:B33::MeHD-ZIPIII เข้าไปอยู่จริง

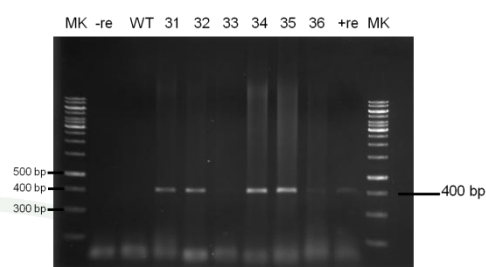


ภาพที่ 34 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์บน T-DNA ที่ใช้ในการตรวจสอบหาต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนของยีน ก. T-DNA ของยีน pBI:35S::MeHD-ZIPIII ข. T-DNA ของยีน pBI:B33::MeHD-ZIPIII ตั้งแต่ส่วนของ RB คือ Right border; Pnos คือ Nos promoter; NptII คือ ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน; Tnos คือ Nos terminator; 35SCaMV หรือ B33 คือ 35S Cauliflower mosaic virus promoter หรือ Papatin promoter; Tnos คือ Nos terminator; LB คือ left border

ก.

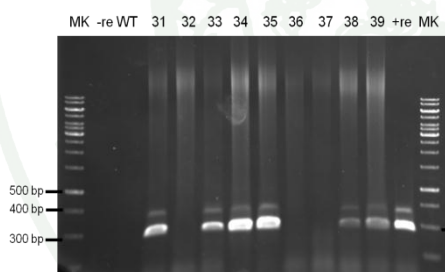


ข.

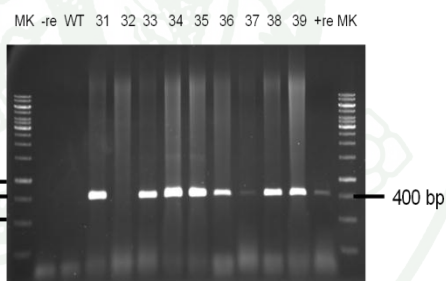


ภาพที่ 35 แสดงการตรวจหาต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:35S::MeHD-ZIPIII ด้วยวิธีพีซีอาร์ ก. โพรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับยีน *MeHD-ZIPIII* และ *NOS* terminator ข. โพรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับ *NOS* promoter และ kanamycin resistance gene โดย WT คือ ต้นมันฝรั่งที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน; -re คือ negative control; +re คือ positive control และ MK คือ 100 bp DNA ladder

ก.



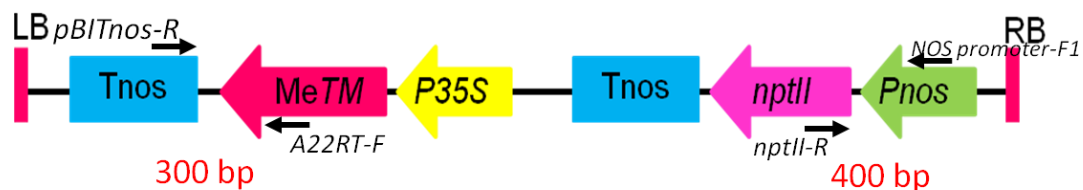
ข.



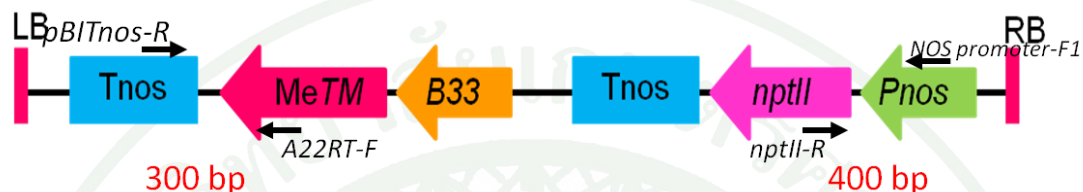
ภาพที่ 36 แสดงการตรวจหาต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:B33::MeHD-ZIPIII ก. โพรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับยีน *MeHD-ZIPIII* และ *NOS* terminator ข. โพรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับ *NOS* promoter และ kanamycin resistance gene โดย WT คือ ต้นมันฝรั่งที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน; -re คือ negative control; +re คือ positive control และ MK คือ 100 bp DNA ladder

การตรวจสอบหาต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:35S:MeTM ด้วยไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ คือไพรเมอร์ที่จับกับส่วนของยีนที่ต้องการตรวจสอบการแสดงออก (A22RT-F) และ NOS terminator (pBITnos-R) จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 คู่เบส และไพรเมอร์ที่จับกับส่วนของ NOS promoter (NOS promoter-F1) (Chen *et al.*, 2003) กับส่วนของ kanamycin resistance gene (*nptII-R*) ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส โดยแต่ละคู่ไพรเมอร์มีตำแหน่งบนส่วนของ T-DNA ดังภาพที่ 37 ก. และ ข. ตามลำดับ ผลการทำพีซีอาร์เพื่อตรวจหาต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับยีนและ NOS terminator (Pierre *et al.*, 1991) แสดงในภาพที่ 38 ก. พบว่าต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนระบบยีนหมายเลข 31, 32 และ 34 มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 คู่เบส เกิดขึ้นและเมื่อทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับ NOS promoter และ kanamycin resistance gene ดังแสดงในภาพที่ 38 ข. พบว่าต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน หมายเลข 31, 32, 33 และ 34 มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส เกิดขึ้น สรุปได้ว่าต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนหมายเลข 31, 32 และ 34 เป็นต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:35S:MeTM จากการทดสอบหาต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:B33:MeTM พบว่าหมายเลข 31, 33 และ 34 มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 คู่เบส และ 400 คู่เบส จากไพรเมอร์ทั้งสองคู่เกิดขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 39 ก และ ข สรุปได้ว่าต้นมันฝรั่งหมายเลข 31, 33 และ 34 เป็นต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:B33:MeTM

ก.

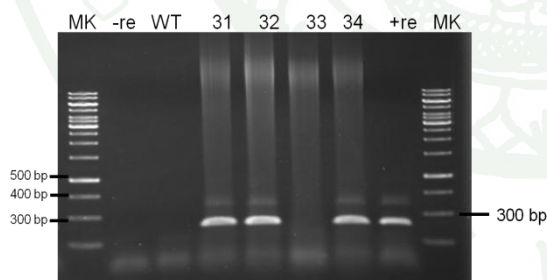


ข.

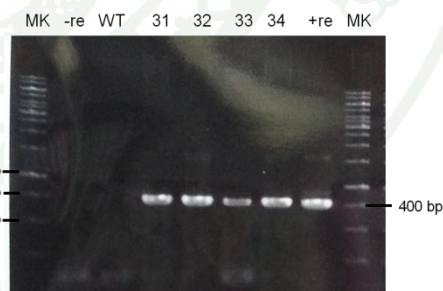


ภาพที่ 37 แสดงตำแหน่งของโปรเมอร์บน T-DNA ที่ใช้ในการตรวจสอบหาต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน ก. T-DNA ของ pBI:35S::MeTM ข. T-DNA ของ pBI:B33::MeTM ตั้งแต่ส่วนของ RB คือ Right border; Pnos คือ Nos promoter; NptII คือ ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ กานามัยซิน; Tnos คือ Nos terminator; 35S CaMV หรือ B33 คือ 35S Cauliflower mosaic virus 35S promoter หรือ Papatin promoter; Tnos คือ Nos terminator; LB คือ left border

ก.

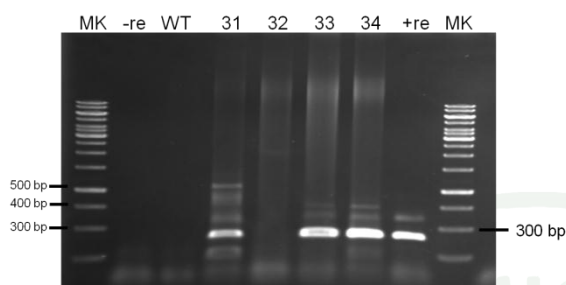


ข.

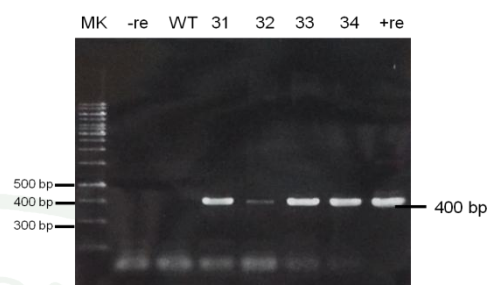


ภาพที่ 38 แสดงการตรวจหาต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:35S::MeTM ด้วยวิธีลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ก. โปรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับยีน MeTM และ NOS terminator ข. โปรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับ NOS promoter และ kanamycin resistance gene โดย WT คือ ต้นมันฝรั่งที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน; -re คือ negative control; +re คือ positive control และ MK คือ 100 bp DNA ladder

ก.



ข.



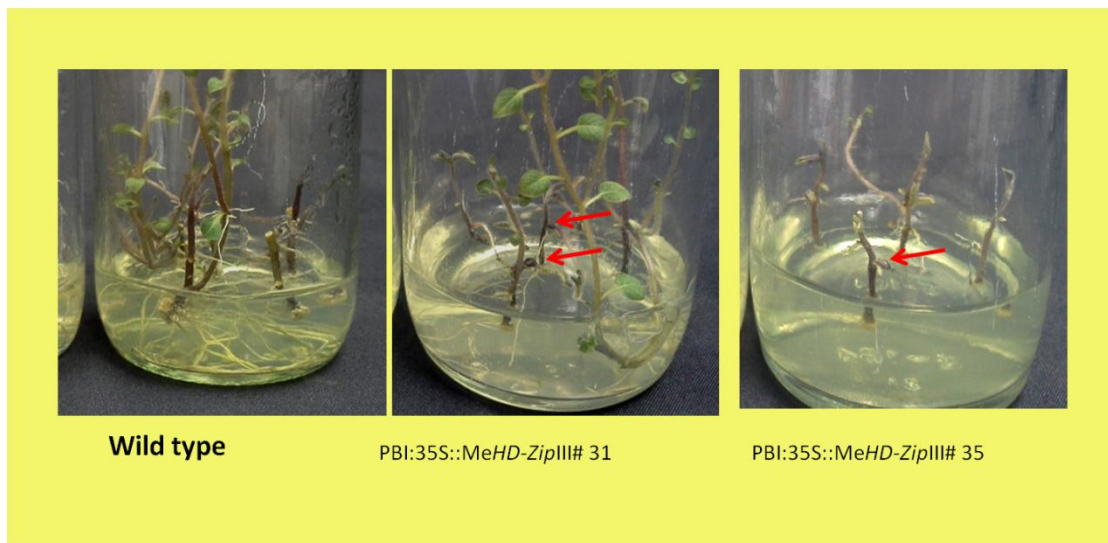
ภาพที่ 39 แสดงการตรวจหาต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:B33::MeTM ด้วยวิธีพีซีอาร์ ก. ไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับยีน *MeTM* และ *NOS* terminator ข. ไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับ *NOS* promoter และ kanamycin resistance gene

5. การตรวจสอบลักษณะที่แสดงออกของต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมันฝรั่ง

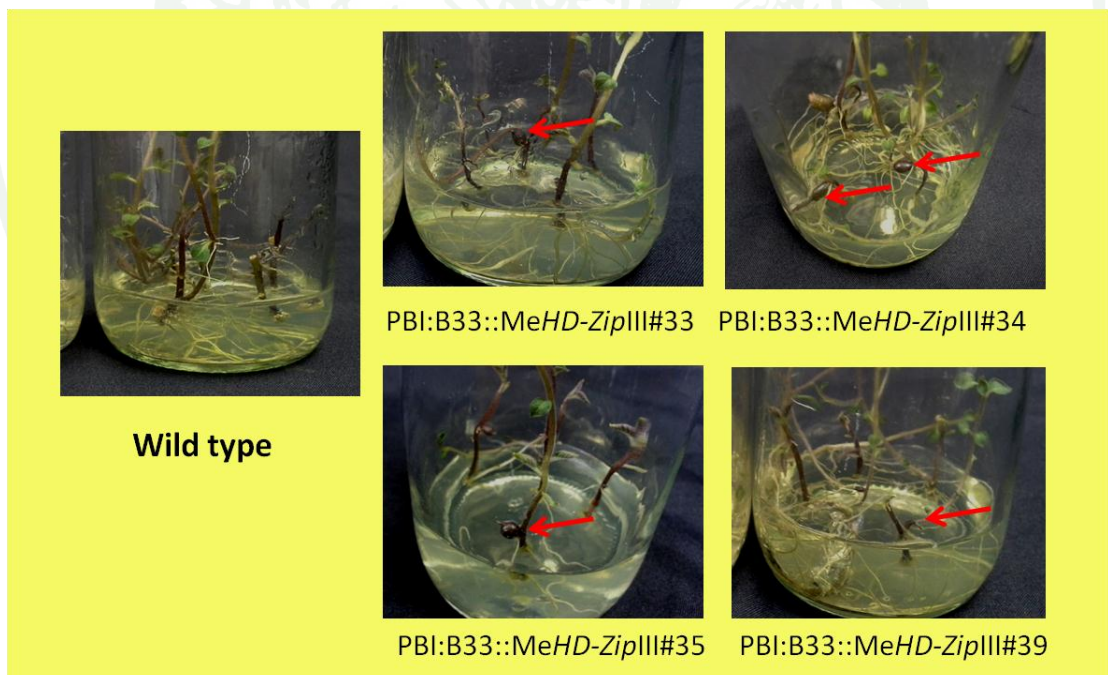
5.1 การตรวจดูฟีโนไทป์ของมันฝรั่ง

ทำการตรวจดูเปรียบเทียบลักษณะที่แสดงออกของต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมันฝรั่งผ่านการถ่ายโอนยีนเพื่อศึกษาหน้าที่โดยการเพิ่มการแสดงออกของยีน *MeHD-ZIPIII* ภายใต้การควบคุมของ 35S CaMV promoter และ Papatin promoter เปรียบเทียบกับต้นมันฝรั่งที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีนในขวดทดลองโดยเทคนิค *in vitro* tuberlization (Hoque, 2010) ทำการเพาะเลี้ยงในขวดทดลองเป็นเวลา 7 สัปดาห์ พบว่าต้นมันฝรั่งที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีนไม่มีส่วนที่สะสมอาหารเกิดขึ้นขณะที่ต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *MeHD-ZIPIII* ภายใต้การควบคุมของ 35S CaMV และ papatin promoter (Anjan *et al.*, 2006) มีหัวมันฝรั่งเกิดขึ้นซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการแสดงออกของยีน *HD-ZIP* class III ซึ่งยีนดังกล่าวทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแบ่งเซลล์ของระบบท่อลำเลียงอาหาร (Kyoko *et al.*, 2005) ดังแสดงในภาพที่ 40 ก. และ ข. ตามลำดับ

ก.



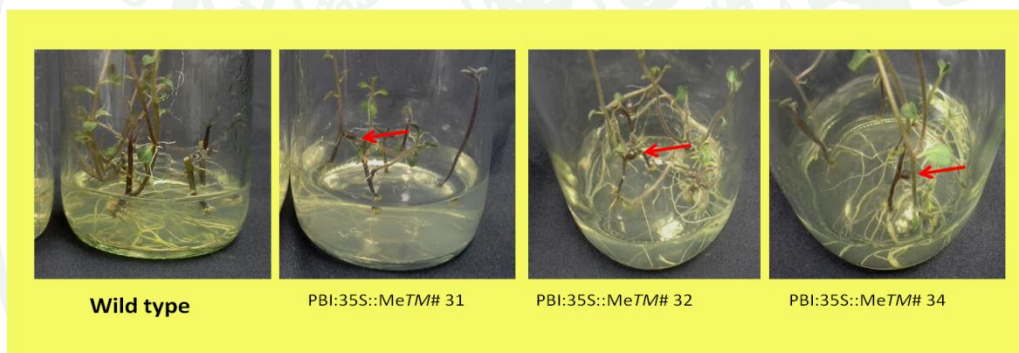
ข.



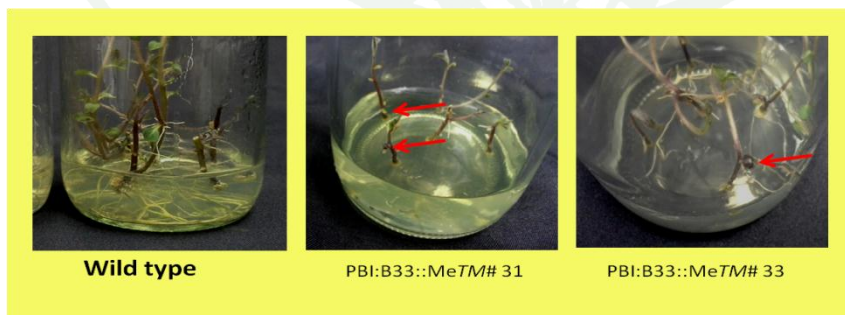
ภาพที่ 40 แสดงผลการแสดงออกของต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *MeHD-ZIPIII* ก. ต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *HD-ZIPIII* ภายใต้ 35S CaMV promoter ข. ต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *HD-ZIPIII* ภายใต้ papatin promoter

การเปรียบเทียบลักษณะที่แสดงออกของต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมันฝรั่งผ่านการถ่ายโอนยีนเพื่อศึกษาหน้าที่โดยการเพิ่มการแสดงออกของยีน *MeTM* ภายใต้การควบคุมของ 35S CaMV promoter และ Papatin promoter เปรียบเทียบกับต้นมันฝรั่งที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีนในหลอดทดลองโดยเทคนิค *in vitro* tuberization (Hoque, 2010) ทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 7 สัปดาห์ พบว่าต้นมันฝรั่งที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีนไม่มีอวัยวะสะสมอาหารเกิดขึ้นส่วนต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *MeTM* ภายใต้การควบคุมของ 35S CaMV และ papatin promoter (Anjan *et al.*, 2006) มีหัวมันฝรั่งเกิดขึ้นซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *MeTM* ที่มีการแสดงออกสูงในระยะเวลาที่เริ่มมีการสะสมอาหารของรากสะสมอาหารมันสำปะหลัง ดังนั้นยีนดังกล่าวอาจจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสะสมอาหาร (Lusching *et al.*, 2013) ดังแสดงในภาพที่ 41 ก. และ ข. ตามลำดับ

ก.



ข.



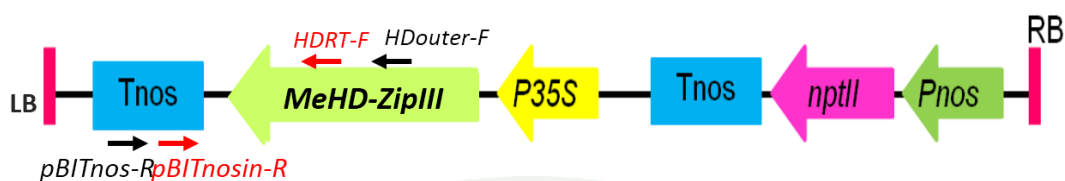
ภาพที่ 41 แสดงผลการแสดงออกของต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *MeTM* ก. ต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *MeTM* ภายใต้ 35S CaMV promoter ข. ต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *MeTM* ภายใต้ papatin promoter

5.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนในต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมันฝรั่ง

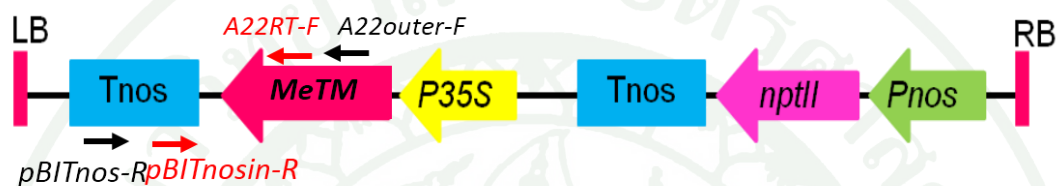
ทำการหาระดับการแสดงออกของยีน *MeHDZIII* และ *MeTM* ในต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนเปรียบเทียบกับต้นมันฝรั่งที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีนด้วยวิธี semi-quantitative nested RT-PCR โดยทำการอาร์เอ็นเอจากต้นมันฝรั่งที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน และต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:35S::*MeHDZIII* หมายเลข 31 และ 35 และต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:35S::*MeTM* หมายเลข 31 32 และ 34 จากนั้นทำการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ random hexamer เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ cDNA จากนั้นทำ nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่

จากการทำ semi-quantitative nested RT-PCR ในต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:35S::*MeHDZIII* โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ ดังภาพที่ 43 ก แสดงการทำ nested PCR ครั้งที่ 1 และ ภาพที่ 43 ข แสดงการทำ nested PCR ครั้งที่ 2 โดยใช้ผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในครั้งแรกเป็นต้นแบบ (Anjan *et al.*, 2006) พบว่าไม่มีการแสดงออกของยีนเกิดขึ้นทั้งในต้นมันฝรั่งที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีนและต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมันฝรั่งซึ่งเหตุการณ์ดังกล่าวอาจเกิดจากกระบวนการถ่ายโอนยีนจาก *Agrobacterium* เข้าสู่พืชที่ใช้ส่วนของข้อเป็นอวัยวะที่รับการถ่ายโอนยีนและชักนำให้เกิดเป็นต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนโดยไม่ผ่านกระบวนการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส (Beaujean *et al.*, 1998) ดังนั้น สูญหายของยีนในระหว่างกระบวนการ sub-culture เพื่อเพิ่มปริมาณต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในการนำมาใช้ในการทดลอง (Trujillo *et al.*, 2001) ในส่วนของยีน pBI:35S::*MeTM* ผลการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ แสดงดังภาพที่ 44 ก และ ข พบว่าต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:35S::*MeTM* หมายเลข 31 และหมายเลข 34 มีแถบดีเอ็นเอที่บ่งชี้ถึงการแสดงออกของยีนเกิดขึ้นโดยต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนหมายเลข 31 มีการแสดงออกสูงกว่าต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนหมายเลข 34 ในขณะที่ต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนหมายเลข 32 ไม่มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นซึ่งต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนดังกล่าวอาจเกิดการสูญหายของยีนเกิดขึ้นเช่นเดียวกับต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:35S::*MeHDZIII* (Trujillo *et al.*, 2001)

ก.



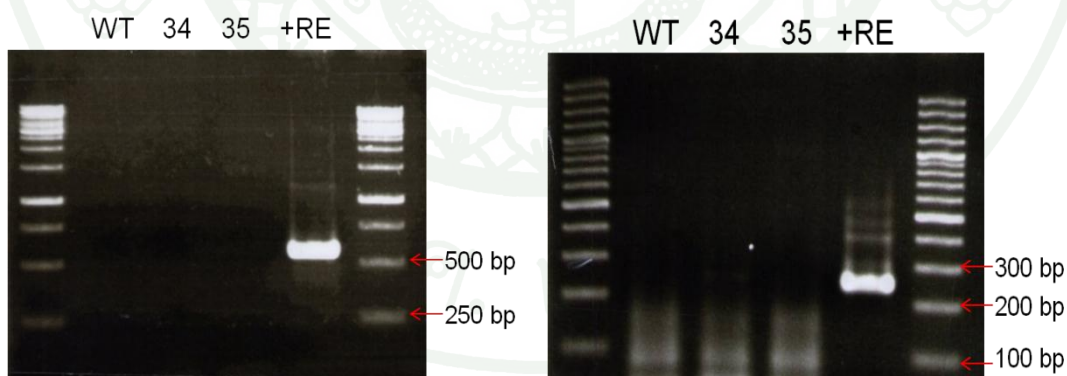
ข.



ภาพที่ 42 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ 2 คู่ที่ใช้ในการทำ Nested PCR ก.แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ บน T-DNA ของ pBI:35S::MeHDZIPIII ข.แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ บน T-DNA ของ pBI:35S::MeTM

ก.

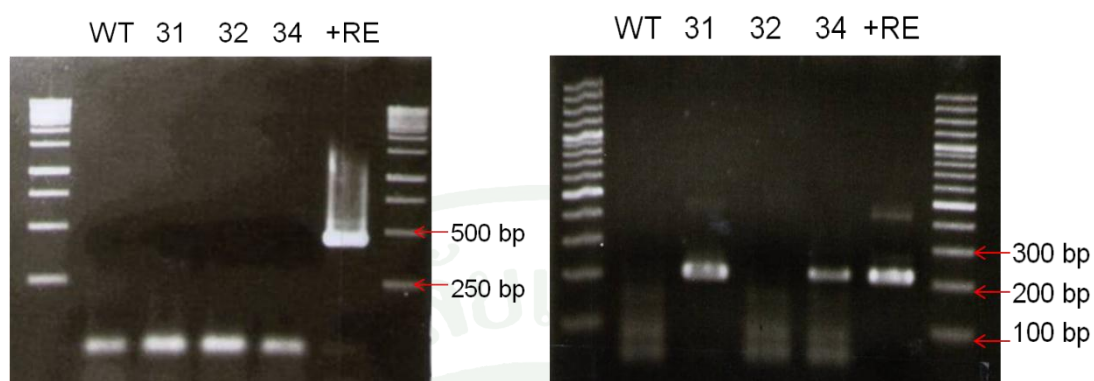
ข.



ภาพที่ 43 แสดงผลการทำ Semi-quantitative Nested RT-PCR ของต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:35S::MeHDZIPIII ก. ผลการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่อยู่ด้านนอก (pBITnosR, HDOuter-F) ข. ผลการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่อยู่ด้านใน (pBITnosinR, HDRT-F) โดย WT คือ ต้นมันฝรั่งที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน; +re คือ positive control และ MK คือ 100 bp DNA ladder และ 1kb DNA ladder

ก.

ข.

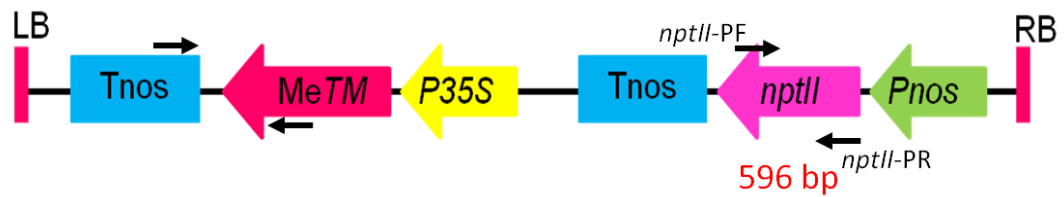


ภาพที่ 44 แสดงผลการทำ Semi-quantitative Nested RT-PCR ของต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *pBI:35S::MeTM* ก. ผลการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่อยู่ด้านนอก (*pBITnosR A22Outer-F*) ข. ผลการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่อยู่ด้านใน (*pBITnosinR A22RT-F*) โดย WT คือ ต้นมันฝรั่งที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน; +re คือ positive control และ MK คือ 100 bp DNA ladder และ 1kb DNA ladder

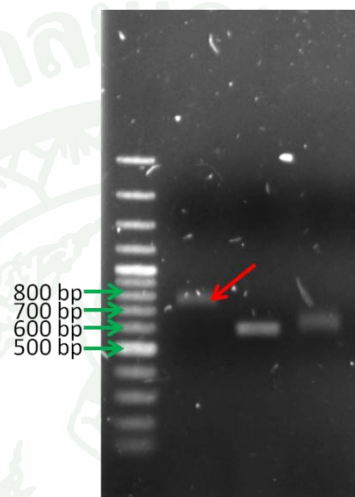
6. การหาจำนวนชุดของยีนในต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมันฝรั่ง

6.1 การสังเคราะห์โพรบ

ในการทำ Southern blot hybridization เพื่อหาจำนวนชุดของยีนที่แทรกเข้าไปในจีโนมของต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมันฝรั่ง โดยใช้โพรบที่จำเพาะกับยีน *NptII* ซึ่งอยู่บนบริเวณ T-DNA (Pierre *et al.*, 1991) ของพลาสมิดสายผสมที่ถูกถ่ายโอนเข้าสู่จีโนมมันฝรั่งตำแหน่งของโพรบแสดงในภาพที่ 45 โพรบมีขนาด 596 คู่เบส จากนั้นทำการสังเคราะห์โพรบโดยวิธีพีซีอาร์ติดฉลากโพรบด้วย DIG แสดงในภาพที่ 46



ภาพที่ 45 แสดงตำแหน่งและขนาดของโพรบ *NptII* บน T-DNA ของยีน pBI:35S::*MeTM*



ภาพที่ 46 แสดงผลการสังเคราะห์ *NptII* โพรบลูกศรสีแดงชี้คือแถบดีเอ็นเอของ *NptII* probe ที่ถูกติดฉลากด้วย DIG แถบดีเอ็นเอในช่องที่ 3 คือ *nptII* PCR control ที่ไม่ได้ติดฉลาก และ แถบดีเอ็นเอในช่องสุดท้าย คือ tPA control

6.2 การทำ Southern blot hybridization

ทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลัง จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จำนวน 45 ไมโครกรัม ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *HindIII* จากนั้นทำการแยกแถบดีเอ็นเอที่ถูกตัดบน 0.8% agarose gel แล้วทำการถ่ายแถบดีเอ็นเอที่ผ่านการแยกขนาดลงบน H^+ bond nitrocellulose membrane นำเมมเบรนทำการ hybridization กับ *NptII* probe ทำการตรวจผลบนฟิล์มเอกซเรย์ ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 47 จากผลการทดลองพบว่าต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:35S::*MeTM* หมายเลข 31 ได้รับการถ่ายโอนยีนเข้าไป 2 ตำแหน่ง และต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:35S::*MeTM* หมายเลข 34 ได้รับการถ่ายโอนยีนเข้าไป 1 ตำแหน่ง ซึ่งจำนวนชุดของยีนที่แทรกเข้าไปในต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษการแสดงผลออกของยีน *MeTM* โดยใช้วิธี Semi-quantitative nested RT-PCR ที่พบว่าต้นมันฝรั่งที่ได้รับ

การถ่ายโอนยีน pBI:35S::MeTM หมายเลข 31 มีการแสดงออกที่สูงกว่ามันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:35S::MeTM หมายเลข 34



ภาพที่ 47 แสดงผลการทำ Southern blot hybridization ของต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pBI:35S::MeTM

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การสืบหายีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนารากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง

จากการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนารากสะสมอาหารของมันสำปะหลังโดยวิธี differential display RT-PCR พบว่ามียีนที่อาจทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนารากสะสมอาหารมันสำปะหลังจำนวน 4 ยีน คือ AGC protein kinases, auxin responsive protein, homeodomain-leucine zipper (*HD-ZIP*) และยีน integral membrane protein ที่มีการแสดงออกสูงในช่วงรากฝอยและรากที่เริ่มมีการ โป่งพอง จึงคาดว่ายีนดังกล่าวน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนารากสะสมอาหาร และจากฐานข้อมูลพบว่ายีน homeodomain-leucine zipper (*HD-ZIP*) ในมันสำปะหลังที่ถูกจัดอยู่ใน class III มีรายงานถึงบทบาทในการทำหน้าที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการเจริญเติบโตแนวขวางและการพัฒนาของระบบท่อลำเลียง ส่วนยีน Integral membrane protein อาจมีส่วนในกระบวนการลำเลียงสารอาหารต่างๆ เข้าสู่เซลล์ของรากสะสมอาหาร ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกศึกษาหน้าที่ของยีน integral membrane protein และ homeodomain-leucine zipper (*HD-ZIP*) ในมันสำปะหลัง โดยใช้มันฝรั่งเป็นพืชต้นแบบในการศึกษา

2. การศึกษาลักษณะการแสดงออกของยีน homeodomain-leucine zipper (*HD-ZIP*) และ integral membrane protein ของมันสำปะหลัง

จากการศึกษาลักษณะการแสดงออกของยีน homeodomain-leucine zipper (*MeHD-ZIPIII*) และ integral membrane protein (*MeTM*) ในมันสำปะหลังพบว่ายีนทั้ง 2 มีการแสดงออกที่น้อยมากในส่วนของพืชที่อยู่เหนือพื้นดินได้แก่ ปลายยอด ใบอ่อน ใบแก่ และลำต้น แต่มีการแสดงออกที่สูงในช่วงระยะการเจริญของรากโดยเฉพาะ รากที่เริ่มโป่งพองและรากสะสมอาหารในระยะแรกของการพัฒนาการ และการแสดงออกจะลดลงในระยะที่รากสะสมอาหารมีอายุ 6 เดือน ดังนั้นจึงคาดว่ายีนทั้งสองมีความเกี่ยวข้องับกระบวนการพัฒนารากสะสมอาหารในมันสำปะหลัง

3. การศึกษาการแสดงออกของยีน *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM* ในมันฝรั่ง

ทำการสร้างโครงสร้างเพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีน *MeHD-ZIPIII* และ *MeTM* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ *CaMV 35S* และ *Papatin* โปรโมเตอร์ และศึกษาการแสดงออกของยีนในมันฝรั่ง เมื่อทำการศึกษาการเจริญของส่วนของพืชที่สะสมอาหารในเขตทดลองพบว่าต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *pBI:35S::MeHDZIPIII* *pBI:B33::MeHDZIPIII* *pBI:35S::MeTM* และ *pBI:B33::MeTM* มีการสร้างส่วนของพืชที่สะสมอาหารเกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นมันฝรั่งสายพันธุ์ที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่สภาวะเพาะเลี้ยงเดียวกัน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ยีนทั้งสองมีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับกลไกการพัฒนารของอวัยวะสะสมอาหาร

4. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *pBI:35S::MeHD-ZIPIII* และ *pBI:35S::MeTM* ในต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *pBI:35S::MeHD-ZIPIII* และ *pBI:35S::MeTM* ที่ถูกถ่ายโอนเข้าไปในต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนด้วยวิธี Semi-quantitative nested RT-PCR พบว่าไม่พบการแสดงออกของยีน *pBI:35S::MeHD-ZIPIII* อาจเนื่องมาจากการเกิดการสูญหายของยีนในขั้นตอนการ sub-culture เพื่อเพิ่มปริมาณต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน ส่วนต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *pBI:35S::MeTM* พบว่าต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน หมายเลข 31 มีระดับการแสดงออกของยีนสูงกว่าต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนหมายเลข 34 ส่วนหมายเลข 32 นั้นคาดว่าการสูญหายของยีนเช่นเดียวกับต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *pBI:35S::MeHDZIPIII*

5. การหาจำนวนชุดของยีนในต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

ทำการหาจำนวนชุดของยีน *pBI:35S::MeTM* ในต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน หมายเลข 31 และ 34 ด้วยวิธี southern blot hybridization พบว่าต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน หมายเลข 31 มีจำนวนชุดของยีน 2 ชุด และต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนหมายเลข 34 มีจำนวนชุดของยีน 1 ชุด จึงพบระดับการแสดงออกของยีนในต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนหมายเลข 31 สูงกว่าต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนหมายเลข 34

ข้อเสนอแนะ

Integral membrane protein ในมันสำปะหลัง

เนื่องจากการแสดงออกที่โดดเด่นของยีน integral membrane protein ในต้นมันสำปะหลัง และยังมีข้อมูลการศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบการพัฒนาส่วนที่สะสมอาหารของพืชอยู่น้อยมากดังนั้นยีน integral membrane protein จึงมีความน่าสนใจในการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของยีนที่มีต่อกระบวนการสะสมอาหาร รวมถึงหน้าที่ของยีนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชอื่นๆ

การถ่ายยีนเข้าสู่มันฝรั่ง

ในกระบวนการถ่ายยีนเข้าสู่มันฝรั่ง ได้ใช้ส่วนของข้อมันฝรั่งและชักนำให้เกิดเป็นต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน กระบวนการที่ส่วนของ T-DNA แทรกเข้าไปในจีโนมมันฝรั่งนั้นเกิดการแทรกเข้าไปใน 1 เซลล์จากเซลล์เป็นล้านเซลล์ ดังนั้นจึงมีโอกาสเกิดการสูญหายของยีนได้ อันเนื่องมาจากกระบวนการ sub-culture เพื่อเพิ่มจำนวนต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีนเพื่อใช้ในกระบวนการตรวจสอบต่างๆ เนื่องจากแต่ละกระบวนการมีความต้องการใช้ตัวอย่างในปริมาณมาก เพื่อให้ได้มาซึ่งจีโนมิกดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ในปริมาณสูง ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนากระบวนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่มันฝรั่งเพื่อให้ได้มาซึ่งความเสถียรของต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2009. **มันสำปะหลัง.**

แหล่งที่มา:<http://it.doa.go.th/vichakan/news.php?newsid=14>, 3 มกราคม 2555.

กล้าณรงค์ ศรีรอด. 2542. **การแปรรูปและการใช้ประโยชน์มันสำปะหลัง** เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ
ภาควิชาพืชไร่ ภาควิชาเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

ฝ่ายพัฒนาธุรกิจ แก๊สโซฮอลล์ ปตท. 2551. **ข้อมูลแก๊สโซฮอลล์.** แหล่งที่มา:

<http://www.pttplc.com/Files/Document/Pdf/energy/%E0%B8%82%E0%B9%89%E0%B8%AD%E0%B8%A1%E0%B8%B9%E0%B8%A5%E0%B8%99%E0%B9%89%E0%B8%B3%E0%B8%A1%E0%B8%B1%E0%B8%99%E0%B9%81%E0%B8%81%E0%B9%8A%E0%B8%AA%E0%B9%82%E0%B8%8B%E0%B8%AE%E0%B8%AD%E0%B8%A5%E0%B9%8C.pdf>, 1 กุมภาพันธ์ 2555.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กรมการต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์. 2553. **รายงานปริมาณและข้อมูลสินค้ามาตรฐานที่ส่งออกนอกราชอาณาจักร ประจำเดือนมกราคม 2553.** ม.ป.ท.

อุทัยวรรณ กุณวงศ์ และคณะ การศึกษาขึ้นที่ที่มีการแสดงออกสูงในระยะแรกของการพัฒนาเป็นรากสะสมอาหารของมันสำปะหลัง, **Congress on science and technology of thailand.** ครั้งที่ 34. มหาวิทยาลัยมหิดล, ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์

Abd, El-Baki, S.M., M.S. Nowar, S.M. Bassuny, E. Hassona, and E.S. Soliman. 1993. Cassava as new animal feed in Egypt. 3. Pelleted complete cassava feed for growing rabbits. **World Rabbit Science** 1(4):139-145.

Andrea, P. and H. Heribert. 2010. New insights into an old story: *Agrobacterium* induced tumour formation in plants by plant transformation. **The EMBO Journal** 29:1021-1032.

- Anjan, K.B., P. Salome' and J.H. David. 2006. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. *Andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Plant Science** 170:732-738.
- Aron, M.B., J.B. Anderson, C. Ferideh, M.K. Derbyshire, C.D. Scott, J.H. Fong, L.Y. Geer, R.C. Geer, N.R. Gonzales, M. Gwadz, S. He, D.I. Hurwitz, J.D. Jackson, Z. Ke, C.L. Lanczycki, C.A. Liebert, C. Liu, F. Lu, S. Lu, G.H. Marchler, M. Mullokandov, J.S. Song, A. Tasneem, N. Thanki, R.A. Yamashita, D. Zhang, N. Zhang and S.H. Bryant. 2008. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. **Nucleic Acids Res** 37:205-210.
- Beaujean, A., R.S. Sangwan, A. Lecardonnel and B.S. Sangwan-Norreel. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced intermodal explants: an efficient protocol of transformation. **J. Exp. Bot** 49:1589-1595.
- Chen, P.Y., C.K. Wang, S.C. Soong and K.Y. To. 2003. Cloning sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. **Mol. Breeding** 11:287-293.
- Ekanayake, I.J., D.S.O. Osiru and M.C.M. Porto. 1997. Morphology of cassava. IITA Research Guide 61. **Training Program, IITA**, First edition. Ibadan, Nigeria.
- EL-sharkawy, M.A. 2004. Cassava biology and physiology. **Plant mol. Biol.** 56:481-501.
- Ewing, E.E. and P.C. Struik. 1992. Tuber formation in potato: Induction, initiation and growth. **Hort. Rev.** 14:89-198.
- Ferico, D.A., A.M. Pablo, A.D. Carlos and L.C. Raquel. 2007. The true story of the HD-Zip family. **TRENDS in Plant Sci.** 419-426.

Food and Agriculture Organizations. 2002. **Partnership formed to improve cassava, staple food of 600 million people.**

Hannapel, D.J., H. Chen, F.M. Rosin, A.K. Banerjee and P.J. Davies. 2004. Molecular controls of tuberization. **Amer. J. of Potato Res.** 81:5-16.

Hoque, M.E. 2010. In vitro tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Omics J.** 3(1):7-11.

Ihemere, U., D.A. Garzon, S. Lawrence and R. Sayre. 2006. Genetic modification of cassava for enhanced starch production. **Plant Biot. J.** 4:453-465.

Indira, J. E., S. David, O. Osiru and C.M. Marcio. Morphology of cassava. **IITA research guide 61 training program.** First edition: Ibaden, Nigeria.

Jacobo, A., B. Salazar, R. Welsch, F. Sarmiento, P. Beyer and S. Al-Babili. 2010. Putative storage root specific promoters from cassava and yam: cloning and evaluation in transgenic carrots as a model system. **Plant Cell Rep.** 29:651-659.

John, M.W. 2001. Identification of novel families of membrane proteins from the model plant *Arabidopsis thaliana*. **Bioinform. Disc. Note** 17:560-563.

Kenneth, M.O. and A.S. Barbara. 1999. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. **PNAS.** 96:5586-5591.

Kizito, E.B. 2006. **Genetic and root growth studies in cassava (*Manihot esculenta*. Crantz). implications for breeding.** Ph.D Thesis, Swedish university of Agricultural Sciences.

Krishanu, M. and T.R. Burglin. 2006. MEKHALA, a Novel domain with similarity to PAS domains, is fused to plant homeodomain-leucine zipper III proteins. **Plant Physiol.** 140:1142-1150.

- Kyoko, O., M. Kubo, T. Demura and H. Fukuda. 2005. ClassIII homeodomain leucine-zipper proteins regulate xylem cell differentiation. **Plant Cell Physiol.** 46(10):1646-1656.
- Lian, P. and A.B. Pardee. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science** 257: 967-71.
- Liwen, J. and J.C. Rogers. 1998. Integral membrane protein Sorting to Vacuoles in Plant Cells: Evidence for Two Pathways. **The J. cell Biol.** 143:1183-1199.
- Lopez, C., J. Veronique, B. Piegue, M. Chickelu, D. Cortes, S. Restrepo, M. Soto, M. Laudie, C. Berger, R. Cooke, M. Delseny, J. Tohme and V. Verdier. 2004. A unique catalogue of 5700 expressed genes in cassava. **Plant Mol. Biol.** 56:541-554.
- Lorence, S.B. and R. Verpoorte. 2005. Gene transfer and expression in plant. **Recombinant gene expression: review and protocols.** Totowa: Humana Press Inc, New York.
- Lusching, C., R.A. Gaxiola, P. Grisafi and R.F. Gerald. 1998. EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. **Genes & Devel.** 12:2175-2187.
- Marcel, R., J. Du, E. Miura and A. Groover. 2010. The *Populus* classIII HD ZIP, *popREVOLUTA*, Influences Cambium Initiation and Patterning of Woody Stems. **Plant Physiol.** 155:1214-1225.
- Masaru, T., Y. Takahata and M. Nakatani. 2005. Analysis of genes developmentally regulated during storage root formation of sweet potato. **J. plant physiol.** 162: 91-102.
- Masona, M.V., J.T. Nigel, A. I. Robertson and C.M. Fauquet. 2001. Transferring a cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genetic engineering capability to the African environment: Progress and prospects. **Euphytica** 120:43-48.

- Medina, R.D., M.M. Faloci, A.M. Gonzalez and L.A. Mroginski. 2007. In vitro cultured primary roots derived from stem segments of cassava (*Manihot esculenta*) can behave like storage organs. **Ann. bot.** 99(3):409-423.
- Mohamed, E. and S. Claudio. 2009. Structure and function of homodomain-leucine zipper (HD-Zip) proteins. **Plant Signaling & Behavior.** 4:2, 86-88.
- Mussio, I., M.H. Chaput, I. Serraf, G. Ducreux and D. Sihachakr. 2006. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of an African clone of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and analysis of the conformity of regenerated plants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 53:205-211.
- Nigel, T., C. Paul, R. Krit, S. Dimuth and Z. Peng. 2004. Development and application of transgenic technologies in cassava. **Plant mol. Boil.** 56:671-688.
- Olsan, K.M. and B.A. Schaal. 1999. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. **PNAS.** 96:5568-5591.
- Pardales, J.R. and A. Yamauchi. 2003. Regulation of root development in sweetpotato and cassava by soil moisture during their establishment period. **Plant and Soil** 225:201-208.
- Ravi, V., S.K. Naskar, T. Makesh Kumar, B. Babu and B.S. Prakash Krishnan. 2009. Molecular physiology of storage root formation and development in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **J. Root Crops.** 35:1-27.
- Pierre, R.F., B.L. Miki and V.N. Iyer. 1991. Detection of gene regulatory signals in plants revealed revealed by T-DNA-mediated fusions. **Plant Mol. Boil.** 17:837-851.

- Sakurai, T., G. Plata, F.R. Zapata, M. Seki, A. Salcedo, A. Toyoda, A. Ishiwata, J. Tohme, Y. Sakaki, K. Shinozaki and M. Ishitani. 2007. Sequencing analysis of 20,000 full-length cDNA clones from cassava reveals lineage specific expansions in gene families related to stress response. **BMC Plant Biol.** 7:66, 17 Pages.
- Sarria, R., E. Torres, F. Angel, P. Chavarriague and W.M. Roca. 2000. Transgenic plants of cassava (*Manihot esculenta*) with resistance to Basta Obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell Rep.** 19:339-344.
- Sojikul, P., P. Kongsawadworakul, U. Viboonjun, J. Thaiprasit, B. Intawong, J. Narangajavana, and M.R. Svasti. 2010. AFLP-based transcript profiling for cassava genome-wild expression analysis in the onset of storage formation. **Physiol. Plant** 140(2):189-98.
- Souza, C.R., E.R. Almeida, L.J. Carvalho and E.S. Gande. 2003. Studies toward the identification of transcription factors in cassava storage root. **Brazilian J. plant physiol.** 15(3): 167-170.
- Stein, J. and P. Liang. 2002. Differential display technology: a general guide. **Cell Mol. Life Sci.** 59(8):1235-40.
- Tanaka, M., Y. Takahata and M. Nakatani. 2005. Analysis of genes developmentally regulated during storage root formation of sweet potato. **J. Plant Physiol.** 162:91-102.
- Trujillo, E., E. Rodriguze-Arango, S. Jaramillo, R. Hoyos, S. Orduz and R. Arango. 2001. Onestep transformation of two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. subsp. Andigena), **Plant cell Rep.** 20:637-641.
- Yang, J., D. An and P. Zhang. 2011. Expression profiling of cassava storage roots reveals an active process of glycolysis/gluconeogenesis. **J. Integrative Plant Biol.** 53(3):193-211.

Uzoma, I., A.G. Diana, L. Susan and S. Richard. 2006. Genetic modification of cassava for enhanced starch production. **Plant biot. J.** 4:453-465



ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาววรรษมน อิ่มประสิทธิ์ชัย
เกิดวันที่	26 พฤศจิกายน 2527
สถานที่เกิด	อ.เมือง จ.นครปฐม
ประวัติการทำงาน	2549-2550 สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) 2550-2552 ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม) เกียรตินิยมอันดับ 2 คณะเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยรังสิต (2548)
วิทยานิพนธ์	การประดิษฐ์สายพันธุ์ยีสต์ดัดแปลงเพื่อย่อยแป้งเป็นเอทานอล
ผลงานวิจัยตีพิมพ์	Strain Improvement of Ethanol Fermentation Yeast Using Random Mutagenesis Technique Identification and Functional Analysis of Genes Involving in Storage Root Formation and Development in Cassava
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ประจำปี 2552