

การระบุและวิเคราะห์การแสดงออกของยีน DREB1 ที่ตอบสนองในระยะเริ่มต้นต่อสภาวะ
ขาดน้ำของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมทนแล้งพันธุ์นครสวรรค์ 3

Identification and DREB1 Gene Expression Analysis in Response to Early
Water Deficits in a Drought Tolerance Hybrid Maize Nakhon Sawan 3

พยุงค์ศักดิ์ รวยอารี¹ สุริพัฒน์ ไทยเทศ²
Payungsak Rauyaree¹ Suriphat Thaitad²

ABSTRACT

DREB1 (Dehydration-responsive element binding protein 1) gene expression analysis of drought tolerance Hybrid Maize Nakhon Sawan 3 cultivar under water depletion had been identified and analyzed by Annealing Control Primers (ACP)-based polymerase chain reaction and by Quantitative Real-Time polymerase chain reaction methods. The experiments were conducted at the Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture during October 2011 to September 2014. To study the DREB1 gene expressed during drought stress, DREB1 gene sequence encoding 661 bp of transcription factor DREB1 and gene sequence encoding 519 bp of transcription factor AP2-EREBP DREB1 were isolated. Both sequences were deposited in the Genbank database with accession number KY678233 and KY678234, respectively. In addition, comparative gene expression analysis of DREB1 gene in comparison to ABRE (ABA-responsive element) binding protein and Elongation Factors were analyzed. Furthermore, DREB1 gene expression profile of drought tolerance Nakhon Sawan 3 cultivar and the control plant at 24, 48, 72 and 96 hr under water depletions from three weeks old of maize leaves following early water deficits were analyzed in this study. Considering the Quantitative Real-Time-PCR analysis of DREB1, ABRE and eEF (the housekeeping gene), the results showed that the gene expression level of DREB1 was higher than that of ABRE and eEF genes. This result suggested that transcription factors DREB1 genes were expressed during water depletions in drought tolerance hybrid Maize Nakhon Sawan 3. Based on these findings, this information may lead to the further study in molecular markers, and candidate genes for drought tolerance traits in plants in the future.

¹ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร โทร: 0 2904 6898

Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture Tel: 0 2904 6898

² ศูนย์วิจัยพืชไร่ นครสวรรค์ สถาบันวิจัยพืชไร่ และทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร โทร: 0 5624 1091

Nakhon Sawan Field Crops Research Centre, Field and renewable Energy Crops Research Institute, Department of Agriculture Tel: 0 5624 1091

Key words: Maize variety Hybrid Nakhon Sawan 3, DREB1, drought tolerant genes, Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction

บทคัดย่อ

ศึกษาการแสดงออกของยีน DREB1 (Dehydration-responsive element binding protein 1) ที่แสดงออกในสภาวะขาดน้ำ ในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมทนแล้งพันธุ์นครสวรรค์ 3 โดยวิธีการ Annealing Control Primers (ACP)-based polymerase chain reaction และการแสดงออกของยีน DREB1 ในเชิงปริมาณเปรียบเทียบกับยีน ABRE (ABA-responsive element (ABRE) binding protein) และ Elongation Factors (eEF) โดยวิธี Quantitative Real-Time RT-PCR ดำเนินการวิจัยที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ระหว่างเดือนตุลาคม ปี พ.ศ. 2554 – กันยายน 2557 ผลการวิเคราะห์ได้ยีน transcription factor DREB1 ขนาด 661 คู่เบส ขึ้นทะเบียนใน genbank มีรหัส KY678233 และ ยีน transcription factor AP2-EREBP ขนาด 519 คู่เบส มีรหัส KY678234 ตามลำดับ และผลการศึกษาการแสดงออกของยีน DREB1 ในเชิงปริมาณโดยวิธีการ Quantitative Real-time RT-PCR เทียบกับยีน ABRE และยีนเปรียบเทียบ eEF (Elongation Factors) พิจารณาจากค่า Cq (Quantification cycle) ของแต่ละยีนที่ปรากฏ ในระยะขาดน้ำที่ 24, 48, 72 และ 96 ชม. พบว่า ยีน DREB1 ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 มีการแสดงออกของยีนสูงกว่า ยีน ABRE และยีนอ้างอิงหรือยีนเปรียบเทียบ eEF ที่ระยะ 24 และ 96 ชม. ส่วนพืชที่มีการควบคุมให้น้ำปกติ การแสดงออกของยีน DREB1 ต่ำกว่า ยีน ABRE และ eEF จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า

ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 มีการแสดงออกของยีน DREB1 ในสภาวะขาดน้ำ และมีการแสดงออกในปริมาณที่สูงกว่ายีนทนแล้ง ABRE และ Elongation Factors ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางศึกษาโมเลกุลเครื่องหมาย (Molecular markers) การคัดเลือกยีนทนแล้ง (candidate genes) และหาคำแหน่งยีนทนแล้ง เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดให้มีลักษณะทนแล้งที่ดีขึ้นได้ต่อไป

คำสำคัญ : ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมพันธุ์นครสวรรค์ 3 ยีน DREB1 ยีนทนแล้ง Annealing Control Primers (ACP)-based PCR Quantitative Real-Time PCR

บทนำ

ข้าวโพด (*Zea mays* L.) เป็นธัญพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบหลักในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมเอทานอลและการผลิตเมล็ดพันธุ์ ซึ่งในประเทศไทยมีแนวโน้มความต้องการใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เพิ่มมากขึ้น ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550 เป็นต้นมา อย่างไรก็ตามการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์มักประสบกับสภาวะเครียดทางสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งสภาวะขาดน้ำอันเนื่องมาจากสภาวะโลกร้อนในปัจจุบัน ทำให้เกิดข้อจำกัดต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของข้าวโพด ทั้งทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีววิทยาระดับโมเลกุล ส่งผลให้การผลิตข้าวโพดมีปริมาณผลผลิตและคุณภาพลดลงอย่างต่อเนื่อง ผลผลิตที่ได้จะขึ้นอยู่กับระยะเวลาและความรุนแรงที่ประสบกับสภาวะขาดน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงสองสัปดาห์ก่อนหรือหลังออกไหม (silking) และในช่วงที่ข้าวโพดติดดอกออกฝัก ดังนั้นการทำความเข้าใจว่าพืชมีการตอบสนองต่อ

สภาวะเครียดอย่างไร และพืชใช้กลไกระดับโมเลกุลใดเพื่อเอาชนะสภาวะเครียดหรือปัจจัยทางกายภาพ (abiotic stress) จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง นอกจากนี้ ความรู้เกี่ยวกับพันธุกรรมและยีนต่าง ๆ ของพืชจะช่วยให้สามารถพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะพันธุ์ที่ทนทานแล้งได้ในระยะเวลายาวนานขึ้น ทำให้พืชมีคุณภาพดีและมีปริมาณผลผลิตที่สูงขึ้น

กรมวิชาการเกษตรได้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดพันธุ์ใหม่ ชื่อ “ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมเดี่ยวพันธุ์นครสวรรค์ 3” ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่มีลักษณะทนต่อความแล้ง (สภาวะขาดน้ำ) ในระยะออกดอก (พืชเจริญและคณะ 2552) และให้ปริมาณผลผลิตสูง แต่ความเข้าใจเกี่ยวกับหน้าที่หรือบทบาทของยีนต่อการต้านทานปัจจัยสิ่งแวดล้อมของข้าวโพดนี้ยังไม่ชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีนหรือโปรตีน DREB (Dehydration responsive element binding protein) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาของพืชและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสภาพความเครียดจากปัจจัยกายภาพ

ยีน DREB1 จัดเป็นหนึ่งใน APETALA2 (AP2/ERF) gene family โดยเป็น transcription factor family ที่เกี่ยวข้องกับ AP2-binding domain ที่เกิดการจับตัวกับ DRE/CRT cis-element และควบคุมการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสรีรวิทยา การเจริญเติบโต และสภาวะเครียด (stress response) ในพืช ยีน DREB1 เป็นตัวควบคุมหลักที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียด (Cao *et al.*, 2015) นอกจากนี้ ยังมียีน DREB2 ซึ่งเป็นยีน conserved domain จะเกี่ยวข้องกับสรีรวิทยาและการพัฒนาของพืชที่ตอบสนองและแสดงออกในช่วงเกิดสภาวะเครียด

อุณหภูมิสูง และความเครียดออกซิเดติกด้วย มีการศึกษาเกี่ยวกับยีน DREB1 ในพืชอื่น ๆ เช่น มีรายงานการพบยีน DREB1 ในพืชถั่วเหลือง (Kidokoro *et al.*, 2015) และ CBF (C-repeat/dehydration-responsive element binding transcription factors) /DREB ในพืช Brassica napa (Lee *et al.*, 2012, Akhtar, *et al.* 2012) เป็นต้น สำหรับข้าวโพด Liu, *et al.*, (2013) พบว่ามียีน DREB จำนวน 18 ยีน ปรากฏอยู่ในจีโนมข้าวโพด B73 ในการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำของข้าวโพด นอกจากนี้ มียีน ABRE (ABA responsive element) ซึ่งเป็นยีนโปรโมเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับ transcription factor ควบคุมการตอบสนองของยีนที่เกี่ยวข้องกับความดันออกซิเดติก และยีนที่แสดงออกในสภาวะขาดน้ำ (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2005, Chen *et al.*, 2013 Chen *et al.*, 2016) เช่น ในวัชพืชอะราบิโดพซิส (Kim *et al.*, 2011)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุยีน DREB1 ที่แสดงออกในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมพันธุ์นครสวรรค์ 3 ในระยะขาดน้ำโดยวิธี ACP-based PCR analysis ซึ่งเป็นวิธีการระบุยีนที่แสดงออกที่แตกต่างอย่างรวดเร็ว ขยายยีนง่าย และศึกษาการแสดงออกของยีน DREB1 ในเชิงปริมาณ เปรียบเทียบกับยีน ABRE และยีน Elongation Factor (EF) โดยวิธี Quantitative Real-Time PCR ทั้งนี้เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำ หรือนำยีนที่ศึกษาได้ไปประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular markers) หรือ ยีนคัดเลือก (candidate genes) ในการคัดเลือกหรือปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้งต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1 การเตรียมพืชและตัวอย่างทดลอง

พันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ พันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมทนแล้ง นครสวรรค์ 3 (NS3) มีคุณสมบัติทนทานแล้งในระยะออกดอก (พีเชษฐ์ และคณะ 2552)

1.1 ตัวอย่างทดลองสำหรับการระบุยีน ด้วยวิธี ACP-based PCR Method

ทำการเพาะเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 ในถุงพลาสติกดำขนาด 10 x 10 x 10 นิ้ว ในช่วงเดือนกันยายน ถึงตุลาคม ปี พ.ศ. 2556 ให้น้ำทุกวันเป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วหยุดให้น้ำเป็นเวลา 7 วัน (treated) สำหรับข้าวโพดที่ใช้เป็นตัวควบคุม (control plant) มีการให้น้ำปกติ (untreated) จากนั้นตัดส่วนของใบพืชทดสอบมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 °ซ เพื่อใช้สกัดสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอรวม

1.2 ตัวอย่างทดลองสำหรับวิเคราะห์ยีน ด้วยวิธี Quantitative Real -Time PCR

เพาะเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 ในถุงพลาสติกดำขนาด 10 x 10 x 10 นิ้ว ภายในโรงเรือนความชื้น 42% เมื่อเมล็ดงอกปล่อยให้ข้าวโพดเจริญเติบโตตามปกติ ให้น้ำทุกวัน เมื่อพืชเจริญอายุ 45 วัน และปล่อยให้ถึงระยะออกดอกประมาณ 10 วัน จึงหยุดให้น้ำ ส่วนพืชที่ใช้เป็นตัวควบคุม (control plant) ให้น้ำต่อไปปกติ เก็บใบตัวอย่างข้าวโพดในสภาวะขาดน้ำที่ระยะ 24, 48, 72 และ 96 ชม. ส่วนพืชควบคุมให้น้ำปกติ (Control) ตัดส่วนของใบพืชทดสอบเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°ซ เพื่อใช้สกัดสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอรวม (Total RNA) เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนเชิงปริมาณต่อไป

2 ศึกษาการระบุของยีนที่ตอบสนองในระยะเริ่มต้นต่อสภาวะขาดน้ำ โดยวิธี ACP-based PCR Method

2.1 การสกัดสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอรวม จากใบข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมพันธุ์นครสวรรค์ 3

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมพันธุ์นครสวรรค์ 3 ที่หยุดให้น้ำ และข้าวโพดที่ให้น้ำปกติ จากข้อ 1 โดยใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอ (Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit, BIORAD, USA; TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) และ/หรือด้วยการใช้ชุดสกัด Plant RNeasy mini kit (Qiagen, CA, USA) ตามคำแนะนำคู่มือผู้ผลิต จัดการปนเปื้อนตัวอย่างอาร์เอ็นเอรวมโดยใช้ DNaseI (BioLabs) เก็บรักษาตัวอย่างอาร์เอ็นเอรวม ทั้งในระยะสั้นที่อุณหภูมิ -20 °ซ และในระยะยาวที่ -80 °ซ

วิเคราะห์ความเข้มข้นและคุณภาพอาร์เอ็นเอรวม (1 ถึง 3 ไมโครกรัม) ที่สกัดได้โดยนำมาแยกผ่านสารละลาย 10x MOPS running buffer ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis) ขนาด 80 โวลต์ นาน 30 – 45 นาที โดยใช้ 1.0 % Denaturing Agarose Gel เป็นตัวกลาง และเติม 2x RNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher SCIENTIFIC, USA) ลงในตัวอย่างอาร์เอ็นเอรวม ล้างเจลด้วยเอทีเดียมโบรไมด์ นานประมาณ 1 นาที และบันทึกภาพด้วยเครื่องส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง Ultraviolet วัดปริมาณและคุณภาพของ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (BioDrop Resolution Life Science, UK) เก็บรักษา RNA ไว้ที่อุณหภูมิ -80°ซ

2.2 การสังเคราะห์ cDNA สายแรกและสายสอง (First-Stranded and Second-stranded cDNA Synthesis) โดยเอ็นไซม์ Reverse transcriptase

การทดลองการระบุการแสดงออกของยีน DREB1 โดยใช้ ACP-based Gene Fishing™ DEG PREMIX Kit (Kim, 2004; Catalog No. K1021-K1026) เริ่มต้นด้วยการสังเคราะห์ cDNA สายแรกจากตัวอย่างอาร์เอ็นเอรวมโดยใช้เอ็นไซม์ Moloney murine leukemia-virus reverse transcriptase (200u/ไมโครลิตร) ตามคำแนะนำคู่มือผู้ผลิต ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ใช้อาร์เอ็นเอรวมความเข้มข้น 3 ไมโครกรัม 5x reaction buffer dNTPs (2mM) dT-ACP1 (5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXXX (T)₁₈-3' (10 ไมโครโมลาร์) ; deoxyinosine (polydeoxyinosine) RNase inhibitor (40U/ไมโครลิตร) เมื่อปฏิกิริยาข้างต้นเสร็จสิ้นแล้ว ดำเนินปฏิกิริยาต่อไปอีกที่อุณหภูมิ 42 °ซ นาน 90 นาที บ่มปฏิกิริยา 2 นาที ปั่นเหวี่ยงหลอดเบาๆ แล้วเติมน้ำลงในปฏิกิริยาอีก 80 ไมโครลิตร (ปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร) เก็บตัวอย่าง cDNA ที่ -20 °ซ ก่อนนำไปใช้งาน

นำ cDNA สายแรก (50 นาโนกรัม) ที่ได้ ไปสังเคราะห์ cDNA สายสอง โดยใช้ ไพรมเมอร์ arbitrary ACP primers และไพรมเมอร์ dT-ACP2 (สำหรับปฏิกิริยา Gene Fishing™ PCR) 5 ไมโครโมลาร์ (5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXXX (T)₁₅-3') Arbitrary ACPs (1 ไมโครลิตร) ทำปฏิกิริยาแต่ละเส้นกับ 10 ไมโครโมลาร์ ACP (Annealing Control Primers) จำนวน 20 เส้น (2 ไมโครลิตร) เติมน้ำกลั่น และ 2X SeeAmp™ ACP™ Master Mix ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร ก่อนทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องเพิ่ม

ปริมาณ DNA Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystem®, USA) ตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ 94°ซ 5 นาที 50°ซ 3 นาที 71°ซ 1 นาที 94°ซ 40 วินาที 65°ซ 40 วินาที 72°ซ 40 วินาที 40 รอบ และ 72 °ซ 5 นาที 1 รอบ และจบปฏิกิริยาที่ 4 °ซ (Kim *et al.*, 2004)

2.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน DEGs (Differentially Expressed Genes)

นำผลผลิต PCR ที่ได้จากข้อ 2.2 ปริมาตร 2-3 ไมโครลิตร มาตรวจบน 2% อะกาโลสเจล สกัดแถบ PCR และเพิ่มจำนวนโดยโคลนแถบ PCR เข้า TOPO TA cloning vector (Invitrogen, Calsbad, CA, USA) ตามคำแนะนำคู่มือผู้ผลิต หากลำดับเบสจากพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหาลำดับเบส ABI PRISM® 377 DNA Sequencer ด้วยการใส่ M13 ไพรมเมอร์ (5'-CTG GCC GTC GTT TTA C-3') วิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม DNASTAR Lasergene software (Lasergene sequence analysis software) เปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูลชีวภาพสากล NCBI โดยใช้โปรแกรม BLASTN (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) และตรวจสอบแถบ PCR บน 1.5% อะกาโลสเจล (แถบยีน DREB1) ด้วย specific primers เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏด้วย 100 bp DNA ladder บันทึกลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีน DREB1 และ AP2 EREP2 transcription factors ของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3

3 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน DREB1 ในเชิงปริมาณ ด้วยวิธี Quantitative Real Time PCR

3.1 ออกแบบไพรมเมอร์

ในการศึกษานี้ ทำการออกแบบไพรมเมอร์ตามชนิดของยีน โดยนำ Full-length

cDNAs ของแต่ละชนิดยีนที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม SIGMA-ALDRICH OligoArchitech™ Primer and Probe Design Online, Beacon Designer™ Premier Biosoft 2013 (<http://www.oligoarchitech.com/SYBRGreenSearchServlet>, SIGMA-ALDRICH) นำข้อมูลลำดับเบสยีน DREB1(target genes) หมายเลขเข้าถึง GenBank Accession : AF448789.1, ยีน ABRE หมายเลขเข้าถึง GenBank Accession :NM_001197011.1 และ

ยีนเปรียบเทียบ Elongation Factor (Housekeeping gene) หมายเลขเข้าถึง GenBank Accession:NM_001156938.2 ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกคงที่เพื่อใช้ในการ Normalization ระดับการแสดงออกของยีน วิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสทุกยีนด้วย reverse and complement (transformation options; http://www.cellbiol.com/cgi-bin/complement/rev_comp.cgi) ขนาดและชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบแสดงใน Table 1

Table 1 Sizes, Nucleotide sequence and Length product (bp) of Primer names used in the PCR and Real-time PCR analysis. The sequences were accessed from deposited genbank accession numbers and primers designed by OligoArchitech™ Online (SIGMA-ALDRICH); SYBR® I)

| Primer name | Nucleotide Position | Nucleotide sequence (bp) | Length product (bp) | GenBank Accession number |
|--|---------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------------------|
| DREB1 (Sense Primer) | 945 | ACAATAGTAGCAGTGGTA (18) | 125 | NM_001111611.2 Zea mays |
| DREB1 (Anti-Sense Primer) | 1069 | AAGAAGAAGAAGAAGAA (20) | 125 | DREB-like protein (dreb1), mRNA. |
| ABRE binding protein (Sense Primer) | 1227 | TTCCAGTCCGCTTGCTTA (18) | 75 | NM_001197011.1 Zea mays ABRE |
| ABRE binding protein (Anti-Sense Primer) | 1301 | TGTTACTAACGGTGCTGCTA (20) | 75 | binding protein, mRNA |
| eEF (Sense Primer) | 661 | AGACCAAAGAGCACATTC (18) | 79 | NM_001156938.2 Zea mays elongation |
| eEF (Anti-Sense Primer) | 689 | ACCATGTCCTTCTTGTTG (18) | 79 | factor, mRNA |

3.2 สกัดอาร์เอ็นเอรวมตัวอย่างพืชทดลอง นำตัวอย่างใบพืชทดลองที่ให้น้ำปกติ และในระยะขาดน้ำที่ระยะเวลาต่าง ๆ จากข้อ 1.2 มาสกัดอาร์เอ็นเอรวมเช่นเดียวกับข้อ 2.1 จากนั้นนำอาร์เอ็นเอรวมตัวมาสังเคราะห์สายซีดีเอ็นเอ

สายแรกและสายสองโดยใช้เอ็นไซม์ iScript™ Reverse Transcriptase Supermix for RT-qPCR, BIO-RAD, USA) ตามคำแนะนำคู่มือผู้ผลิต โดยนำ cDNA สายสองที่เตรียมได้จากข้าวโพด มาเป็นแม่พิมพ์ในการวิเคราะห์ระดับการ

แสดงออกเชิงปริมาณในสภาพจริง ของยีนเป้าหมายเทียบกับยีนที่มีระดับของการแสดงออกคงที่ (housekeeping gene) ในวิธีการนี้ใช้สารเรืองสาร (Fluorescence dyes) ได้แก่ SYBR Green ในการจับกับโมเลกุลดีเอ็นเอสองสาย (double-stranded DNA) ของยีนที่สนใจศึกษา การเพิ่มจำนวนของผลผลิต PCR ในแต่ละรอบ ก่อให้เกิดความเข้มของสารเรืองแสงที่สามารถวัดและรายงานผลได้ในแต่ละรอบ PCR

3.3 การทำปฏิกิริยา Real-Time Polymerase Chain Reaction

ทำปฏิกิริยา Real-time PCRs ในหลอด 96 ช่องหลุม โดยการใช้ SsoAdvanced Universal SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ด้วยเครื่อง CFX96 TOUCH™ Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, USA) ประมวลผลโดย CFX Manager™ Software 3.1 และ Precision Melt Analysis Software ในการหาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการจับตัวระหว่างไพรเมอร์กับเทมเพลท (Gradient temperature หรือ Thermal gradient) ตามคำแนะนำคู่มือผู้ผลิต ในแต่ละตัวอย่างใช้ตัวอย่างอาร์เอ็นเอ 25 นาโนกรัม ในส่วนผสมปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ไพรเมอร์แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมล และเติมซีดีเอ็นเอที่แปลงได้จากตัวอย่าง อาร์เอ็นเอ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงใน PCR master mix ใน 96 ช่องหลุม PCR เพลท ทำการซีลเพลท ปั่นเหรียญ และนำเข้าเครื่อง PCR ตั้งค่า Thermal Cycling ตามคำแนะนำคู่มือผู้ผลิต (CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System) เตรียมเพลท negative controls (ไม่เติมเทมเพลท DNA, NTC หรือ Non Template Control) ด้วยวิธีการเดียวกัน

ทำการยืนยันผลบวกสองวิธี ได้แก่ 1) นำแอมพลิคอน PCR products มาผ่านเจลอิเล็กโตรโพอเรซิส และเทียบขนาดแอมพลิคอนกับยีนเครื่องหมาย 100 bp DNA ladder และ 2) ตรวจสอบปรากฏการณ์ Melting curve ตั้งแต่อุณหภูมิ 65°C ถึง 95°C โดยมีการวัดหาฟลูออเรสเซนซ์อย่างต่อเนื่องทุก ๆ 1 % เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น การวิเคราะห์ข้อมูล ด้วยซอฟต์แวร์ Bio-Rad CFX Manager 3.1 (BIO-RAD)

กำหนดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิแต่ละขั้นตอน ดังนี้ เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 98°C 3 นาที 98°C 15 วินาที 52°C 30 วินาที จากนั้นตามด้วยการทำซ้ำปฏิกิริยารอบสองเป็นจำนวน 39 รอบ ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลา คือ denaturation 98°C เป็นเวลา 30 วินาที annealing 56°C เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วย final extension 65°C เป็นเวลา 0.05 วินาที 50°C 30 วินาที 95°C แล้วจบปฏิกิริยาที่ 4°C ใช้ยีนเป้าหมาย DREB1, ABRE และ ยีนเปรียบเทียบ eEF (Elongation Factor) เป็น Housekeeping Gene จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาค่าการแสดงออกของยีนเชิงปริมาณ (normalized gene expression) ด้วยซอฟต์แวร์ Bio-Rad CFX Manager 3.1 (BIO-RAD) บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 98°C 30 วินาที 98°C 15 วินาที 60°C 30 วินาที และตามด้วยการทำซ้ำปฏิกิริยารอบสาม (เริ่มต้นที่ 98°C 15 วินาที 60°C 30 วินาที) เป็นจำนวน 39 รอบ ตามด้วย 65°C เป็นเวลา 30 วินาที 65°C เป็นเวลา 0.05 วินาที และ 95°C 5 วินาที และจบปฏิกิริยา ที่ 4°C ทำการทดลองสามซ้ำ ในแต่ละคู่ไพรเมอร์ แต่ละการทดลองอิสระต่อกัน เพื่อเป็นการทดสอบผลที่ได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับความแตกต่าง ตั้งแต่สองการทดลองขึ้นไป (reproducibility)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1 การระบุยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะเริ่มต้นของการขาดน้ำด้วยวิธี ACP-base PCR method

การระบุยีนที่แสดงออกจากใบข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 ที่ให้น้ำปกติและงดให้น้ำนาน 7 วัน พบว่า แอคติเอ็นเอที่มีการแสดงออกของยีนที่แตกต่าง ได้แก่ แอคติเอ็นเอ ACP2 กับ ACP12 (Figure 1a) และเมื่อตรวจสอบแถบ PCR บน 1.5% อะกาโรสเจล (แถบยีน DREB1) ด้วย specific primers เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่ปรากฏด้วย 100 bp DNA ladder ให้ผลที่ถูกต้องทุกตัวอย่าง (Figure 1b) เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า มีความเหมือนกับยีน DREB1 และ AP-2EREBP ในฐานข้อมูลชีวภาพสากล โดยมีขนาดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 661 (Figure 2a) และ 519 bp (Figure 2b) ที่ ค่า e-value 0.0 และ ค่าความเหมือน (Identity) 100% เก็บบันทึกไว้ในฐานข้อมูลของ

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ภายใต้อหมายเลข GenBank accession numbers KY678233 และ KY678234 ตามลำดับ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองมีความอนุรักษ์ (Conserved domain) กับยีน transcription factor ของยีน DREB1 ที่ได้บันทึกไว้ในฐานข้อมูลชีวภาพสากล NCBI จากการทดลองแสดงว่าวิธี ACP-base PCR method สามารถใช้ในการระบุยีน DREB1 ที่แสดงออกในระยะเริ่มแรกของการขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Qin *et al.* (2004), Owji *et al.* (2017) และ Li *et al.* (2017) ที่พบว่า มีปรากฏการแสดงออกของยีน AP2/ERF Transcription factors ในพืช *Brasica napus* และรายงานในข้าวโพด *Zea mays* (Liu *et al.* 2013) ในพืช *Eucalyptus grandis* (Cao, 2015) และในถั่วเหลือง (Kidosoro *et al.*, 2015) โดยการวิเคราะห์ในระดับจีโนม

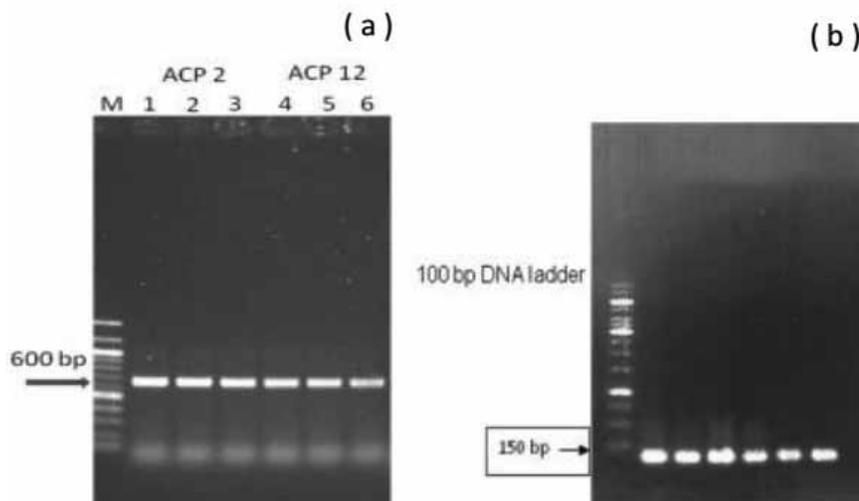


Figure 1 The result of DEGs (Differentially Expressed Genes) analyzed by ACP-based PCR in leaves. Total RNA was extracted from leaf samples and subjected to PCR with various ACP primers. (a) The DEGs (arrows 600 bp) were cloned, sequenced and for further analysis. (b) Showed agarose gel (1.5%) electrophoresis showing amplicon sizes for six PCR products of DREB1 using specific primers. M = 100 bp DNA ladder. Lane 1 – 6 ; DREB1 amplicons

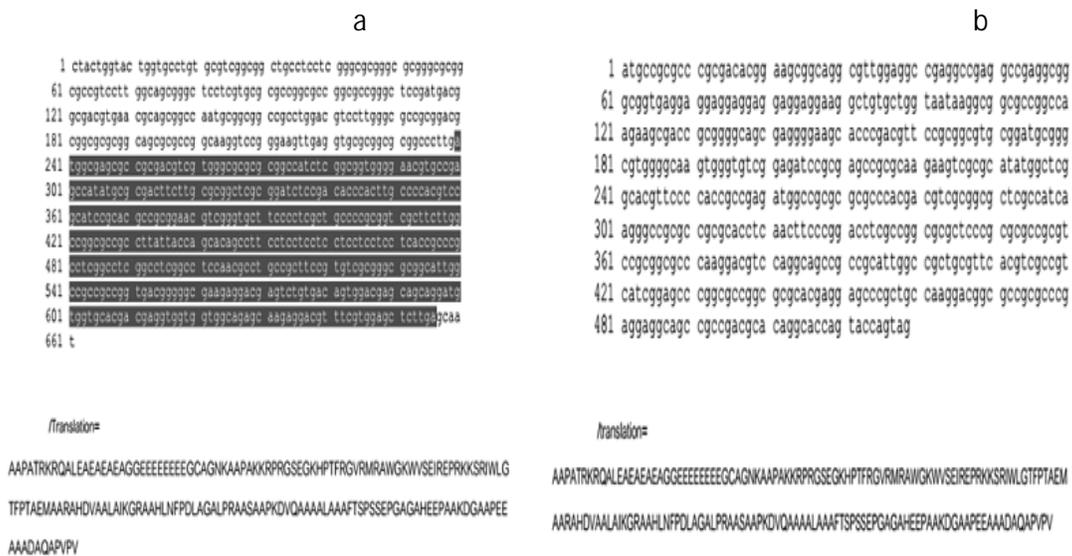


Figure 2 The result of two DREB1 Nakhon Sawan 3 genes isolated with its nucleotide sequences and deduced amino acids (a) Nucleotide and amino acid sequences of *Zea mays* cultivar Nakhon Sawan 3 transcription factor DREB1 mRNA, complete cds 661 bp with genbank accession number KY678233. Nucleotide spans at 240 to 656 positions. (b) Nucleotide and amino acid sequences of *Zea mays* cultivar Nakhon Sawan 3 transcription factor AP2-EREBP mRNA, partial cds 519 bp with genbank accession number KY678234. Nucleotide spans at 1 to 519

2 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน DREB1 ในเชิงปริมาณ ด้วยเครื่อง Real- Time PCR

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนทนแล้ง DREB1 ในเชิงปริมาณ (Quantitative Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Reaction) พบว่า คุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอรวม และซีดีเอ็นเอ มีค่าการดูดกลืนแสง (A260/280) มีค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ (RNA purity) เท่ากับ 2.0 ซึ่งมีคุณภาพและมากพอต่อการนำมาใช้ในขั้นตอนวิเคราะห์หากการแสดงออกของยีน DREB1 การตั้งค่า annealing temperature ปรากฏ Melting Curve (Figure 3a) Melting Peak (Figure 3b) จำนวนรอบที่เริ่มมีการเพิ่มจำนวนของยีนเท่ากับ 26 รอบ (amplification cycles) การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน DREB1 ตามการวิเคราะห์ค่า

Cq (quantification cycle value) ซึ่งเป็นบริเวณที่เครื่องสามารถตรวจจับสารเรืองแสง ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอสองสายตามรอบการทำปฏิกิริยา

Table 2 แสดงค่าเฉลี่ย Cq (Mean Cq) ซึ่งแสดงการแสดงออกของแต่ละยีน ได้แก่ DREB1, ABRE และ eEF ในเชิงปริมาณ ในระยะขาดน้ำที่ 24, 48, 72 และ 96 ชม. และในระยะให้น้ำปกติ ค่า Cq ของยีน DREB1 ในระยะงดให้น้ำ พบว่า มีค่าเฉลี่ย (Cq mean) เท่ากับ 33.87 ขณะที่ ค่า Cq ของยีน ABRE มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 28.10 และ ค่า Cq เฉลี่ยของยีนเปรียบเทียบกับ eEF เท่ากับ 25.30 ทุกโปรแกรมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาผ่านการทดสอบ Self-Dimer หรือ Cross Dimer (ΔG) มีค่าเท่ากับ 0.0 ซึ่งโปรแกรมจะประเมินเบื้องต้นตามลำดับเบสของโปรแกรม ว่ามีโอกาสที่

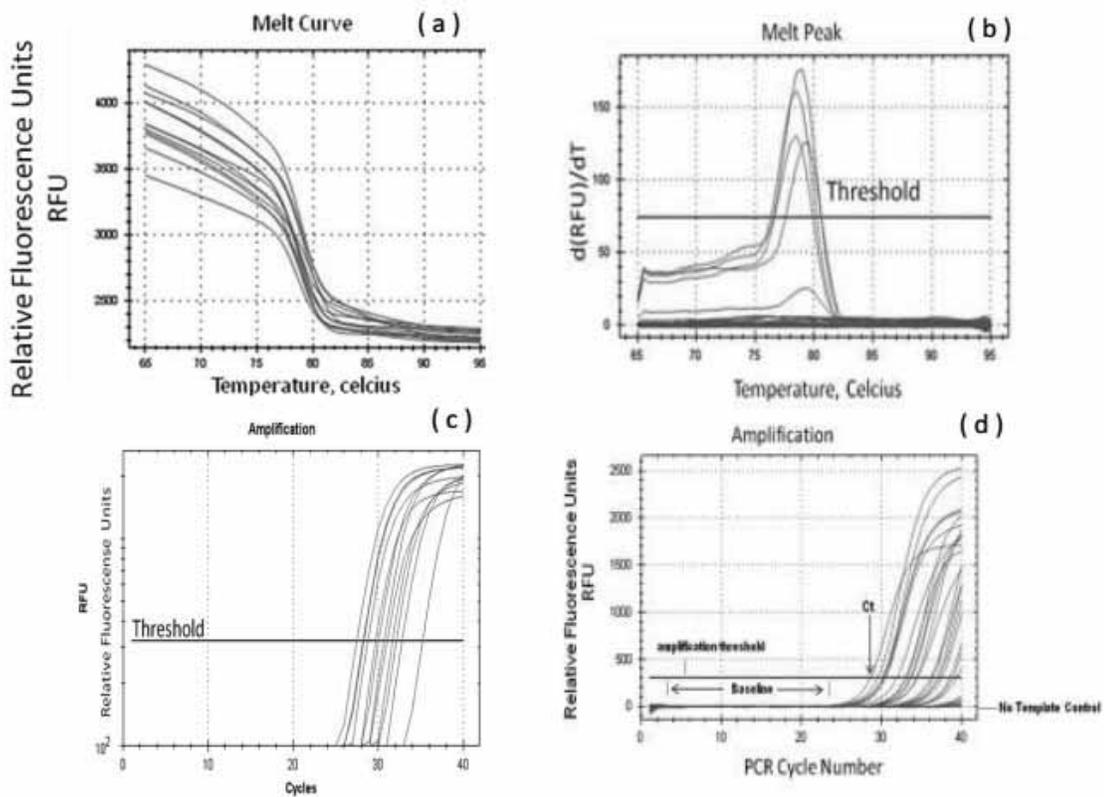


Figure 3 (a) Melting Curve with varied temperature ($^{\circ}\text{C}$) to identify gradient temperatures during efficient specific RT-PCR amplification (Melt Curve Chart). Curve represents fluorescents detected in each round of PCR amplification. Threshold line (green line) is an appropriate position following program determination for C_q identification. RFU represents Relative Fluorescence Units defined in the Log Scale Quantification Menu analyzed by the program. (b) Melt Peak Chart of RT-PCR gradient TM primers used in the reactions. Curve green line represents declined fluorescence detected during varied period of time in each PCR cycles against increasing temperatures. Green curved line shows fluorescence amounts declined at period of times against increased temperatures, and indicate the area for which the Melt peak is defined Melt peak values. Straight line represents threshold value during each PCR cycles. $d(\text{RFU})/dT$ means delta Rn (reaction) of the RT-PCR. (c) Real-Time PCR Cycles in Real-time PCR reaction and Amplification of DREB1 (Amplification Chart). Curve green line expresses the quantification of fluorescence detected in each round of PCR cycle amplified in each wells. Straight green line shows baseline threshold during each trace run cycle. (d) Amplification Curve and threshold level reported during each Real-Time PCR run of DREB1 gene. Straight green line shows baseline threshold during each trace run cycle. C_t (Threshold cycle) value is the spot where the reaction curve intersects threshold line. Baseline represents PCR cycles prior to C_t value of the reaction is reached. Straight line at the base line is no template control (NTC)

จะมาจับกันเองมาน้อยเพียงใด เมื่อพิจารณาจากค่า Cq ดังกล่าว ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน DREB1 พบว่า มีการแสดงออกของยีนเชิงปริมาณมากกว่ายีน ABRE และ ยีนเปรียบเทียบกับ eEF จากค่า Cq ของยีนที่แสดงออก ตามระยะเวลาการขาดน้ำ ซึ่งซอฟต์แวร์จะนำค่าเหล่านี้มาประมวลเป็นกราฟแท่งให้เห็นถึงความแตกต่างของปริมาณยีนที่แสดงออก ผลจากการประมวลค่า พบว่า วิธี Quantitative Real Time PCR สามารถวิเคราะห์การแสดงออกของยีน DREB1 ได้ หลังจากที่ถูกขาดน้ำ 24 ชม.(Figure 4b) และ 96 ชม. (Figure 4e)

ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์โดยวิธีนี้จะมีต้นทุนที่สูงกว่าวิธี ACP-based PCR แต่ก็ให้ผลที่แม่นยำและเป็นที่ยอมรับ ดังนั้น การนำเทคนิคทั้งสองมาใช้ในการศึกษายีนทนแล้งในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 ที่ตอบสนองในระยะเริ่มต้นในสภาวะขาดน้ำ จึงจำเป็นอย่างยิ่ง และงานวิจัยนี้เป็นรายงานการค้นพบยีนทนแล้ง DREB1 ในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมพันธุ์ทนแล้งครั้งแรกของประเทศไทยซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้งได้

Table 2 Analysis of DREB1, ABRE and EF expressions at various time points based on mean Cq data

| Target | Sample | Expression | ExpressionSEM | Corrected ExpressionSEM | Mean Cq |
|--------|-------------|------------|---------------|-------------------------|---------|
| ABRE | NS3 Str 24h | 0.96044 | 0.29024 | 0.29024 | 26.95 |
| ABRE | NS3 Str 48h | 1.07530 | 0.03275 | 0.03275 | 28.70 |
| ABRE | NS3 Str 72h | 0.98590 | 0.32951 | 0.32951 | 29.53 |
| ABRE | NS3 Str 96h | 0.83346 | 0.08984 | 0.08984 | 27.23 |
| ABRE | NS3 normal | 1.00000 | 0.08900 | 0.08900 | 25.33 |
| Dreb1 | NS3 Str 24h | 2.95763 | 1.96445 | 1.96445 | 30.72 |
| Dreb1 | NS3 Str 48h | 0.23406 | 0.27792 | 0.27792 | 36.28 |
| Dreb1 | NS3 Str 72h | 0.18544 | 0.11602 | 0.11602 | 37.32 |
| Dreb1 | NS3 Str 96h | 2.24950 | 2.32190 | 2.32190 | 31.19 |
| Dreb1 | NS3 normal | 0.07901 | 0.07583 | 0.07583 | 34.38 |
| eEF | NS3 Str 24h | 1.85099 | 0.39555 | 0.39555 | 24.97 |
| eEF | NS3 Str 48h | 3.14310 | 0.06778 | 0.06778 | 26.12 |
| eEF | NS3 Str 72h | 2.56676 | 0.60662 | 0.60662 | 27.11 |
| eEF | NS3 Str 96h | 1.90461 | 0.14534 | 0.14534 | 25.01 |
| eEF | NS3 normal | 1.00000 | 0.06294 | 0.06294 | 24.30 |

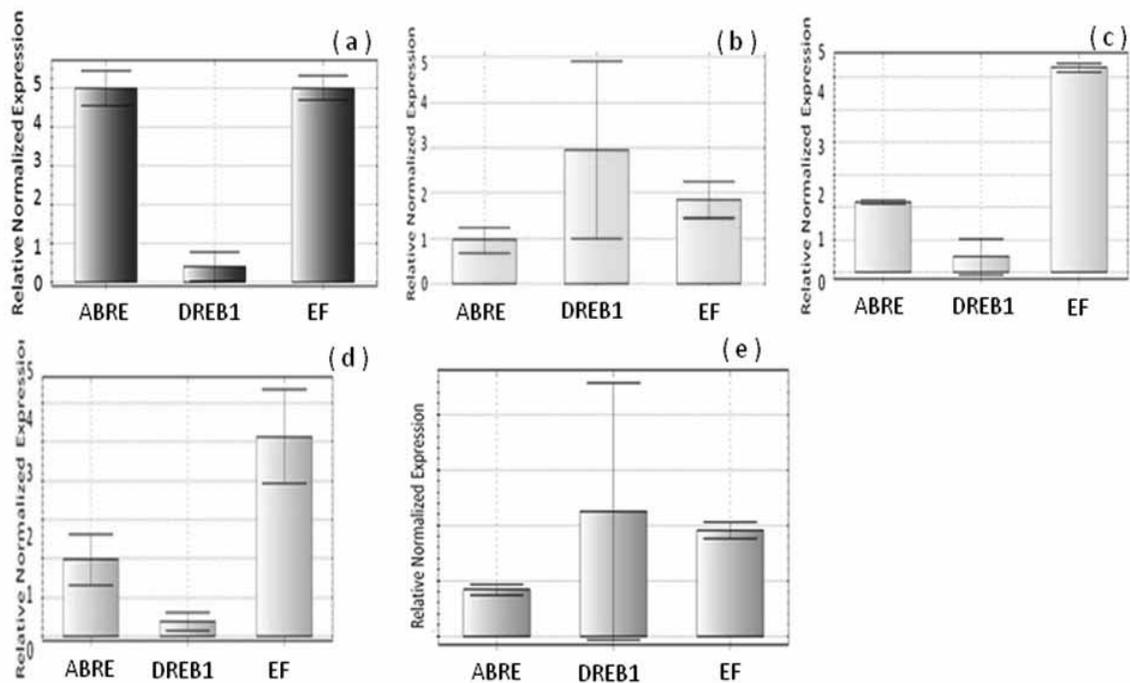


Figure 4 Quantitative expression analysis of DREB1 and ABRE genes in Nakhon Sawan 3 in comparison with the housekeeping gene eEF (Elongation Factor) under various water depletion periods. (a) Showed the expression analysis of control plant under normal water application (b) Showed the expression analysis at 24 hours under water depletion (c) Showed the expression analysis at 48 hours under water depletion (d) Showed the expression analysis at 72 hours under water depletion and (e) Showed the expression analysis at 96 hours under water depletion

สรุปผลการทดลอง

การวิจัยนี้ได้ยีนที่แสดงออกในสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดลูกผสมทนแล้งพันธุ์นครสวรรค์ 3 จากการใช้เทคนิค ACP-based Polymerase Chain Reaction ได้แก่ ยีน DREB1 จำนวน 2 ยีน ได้แก่ transcription factor DREB1 และ Transcription Factor AP2-EREBP ซึ่งจัดเป็น ยีนแฟมิลี (gene family) มีขนาดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 661 bp และ 519 bp ตามลำดับ และเก็บบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลชีวภาพสากล NCBI หรือ genbank หมายเลข KY678233 และ KY678234

นอกจากนี้ ยังประสบความสำเร็จในการใช้เทคนิคการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนเชิงปริมาณ (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction) ในการศึกษาการแสดงออกของยีน DREB1 เทียบกับยีน ABRE และยีนอ้างอิง eEF ในข้าวโพดลูกผสมพันธุ์นครสวรรค์ 3 อายุ 45 วัน และพบว่า ยีน DREB1 มีการแสดงออกอย่างสูงเมื่อเทียบกับยีน ABRE และยีนอ้างอิง eEF ทั้งนี้ที่พืชอยู่ในระยะขาดน้ำเริ่มต้นทันทีที่ 24 ชม. และเกิดการแสดงออกอย่างสูงในระยะขาดน้ำ ที่ 96 ชม. ข้อมูลที่ได้สามารถใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้งของไทยได้ โดยไม่ต้องกังวลเรื่องสิทธิบัตรยีน

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนางวิภาวรรณ สรวงเทพ นักวิชาการเกษตร กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร สำหรับให้ความช่วยเหลือการทดลองในห้องปฏิบัติการโมเลกุลชีววิทยา การเตรียมสารเคมี และบันทึกข้อมูล และขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตร ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- พิเชษฐ์ กุลุดลอยมา สุริพัฒน์ ไทยเทศ และ กัลยา ภาพิณธู. 2552. ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสม ทนแล้ง: พันธุ์ นครสวรรค์ 3. *แก่นเกษตร* 37 ฉบับพิเศษ : 43-48.
- Akhtar, M., A. Jaiswal, G. Taj, J.P. Jaiswal, M.I. Qureshi, and N.K. Singh. 2012. DREB1/CBF transcription factor: their structure function and role in abiotic stress tolerances in plants. *J. Genet.* 91(3) : 385-95.
- Cao, P.B., S. Azar, H. SanClemente, F. Mounet, C. Dunand, and G. Marque. 2015. Genome-Wide Analysis of the AP2/ERF Family Eucalyptus grandis: An Intriguing Over-Representation of Stress-Responsive DREB1/CBF Genes. *PLoS ONE* 10(4):e0121041. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4388522/>
- , Accessed: Dec. 2016.
- Chen, Y., J. Yang, Z. Wang, H. Zhang, X. Mao, and C. Li. 2013. Gene Structures, Classification and Expression Models of the DREB Transcription Factor Subfamily in *Populus trichocarpa*. *The Scientific World Journal*, 2013, 954640. Available at: <http://doi.org/10.1155/2013/954640>. Accessed: Nov. 2016.
- Chen, Y., L. Huang, H. Yan, X. Zhang, B. Xu, and X. Ma. 2016. Cloning and characterization of an ABA-independent DREB transcription factor gene, HcDREB2, in *Hemarthria compressa*. *Hereditas.*: 153:3. 1-7.
- Kidokoro, S., K. Watanabe, T. Ohori, T. Moriwaki, K. Maruyama, J. Mizoi, N. Myint Phyu Sin, Htwe, Y. Fujita, S. Sekita, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2015. Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression. *Plant J.* 81(3): 505-18.
- Kim, J.S., J. Mizoi, T. Yoshida, Y. Fujita, J. Nakajima, J. Ohori, D. Tokada, K. Nakashima, T. Hirayama, K. Shinosaki, and K. Yamaguchi-

- Shinozaki. 2011. An ABRE reporter sequence is involved in stress – responsive expression of the DREB2A gene , which encodes a transcription factor regulating drought inducible genes in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology*. 52(12): 2136-46.
- Kim, Y-L., K. Chae-II, G. Yang-yun. H. Intake, and C. Jong-yoon. 2004. Annealing Control Primer System for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *Bio techniques*. 36: 424-434.
- Lee, S-C., M-H. lim, J-G. yu, B-S. Park, and T-J Yang. 2012. Genome-wide characterization of the CBF/DREB1 gene family in *Brassica rapa*. *Plant Physio. Biochem*. 61:142-152.
- Liu, S., X. Wang, H. Wang, , H. Xin, X. Yang, J. Yan, J. Li, P. Jiansheng, L-S Phan Tran, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, and F. Qin. 2013. “Genome-Wide Analysis of ZmDREB Genes and Their Association with Natural Variation in Drought Tolerance at Seedling Stage of *Zea mays* L.” Ed. Nathan M. Springer. PLoS Genetics 9(9): e1003790.PMC. Web. 28 Dec. 2016.
- Li ,H., Y. Wang, M. Wu, L. Li, C. Li, Z. Han, J. Yuan, C. Chen, W. Song, , and C. Wang, 2017. Genome-Wide Identification of AP2/ERF Transcription Factors in Cauliflower and Expression Profiling of the ERF Family under Salt and Drought Stresses. *Front Plant Sci*. 8. Article 946: 1-13.
- Owji, H., A. Hajiebrahimi, H. Seradj, and S. Hemmati, 2017. Identification and functional prediction of stress responsive AP2/ERF transcription factors in Brassica napus by genome-wide analysis. *Comput Biol Chem*. 71: 32-56.
- Qin, F., Y. Sakuma, J. Li, Q. Liu, Y.Q. Li, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2004. Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold - responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol*. 45: 1042-1052.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and K. Shinozaki. 2005. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress –responsive promoters. *Trends Plant Sci*. 2005. Feb;10(2): 88-94.