บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ตรวจหาตำแหน่งในเซลล์ของโปรตีนเลกติน2 ซึ่งได้เคยรายงานไว้ก่อนหน้าแล้วว่าพบโปรตีนนี้เกี่ยวพันกับระยะพักตัวของตาข้างที่หัวแก่นตะวัน เพราะจากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE เมื่อตาข้างถูกกระตุ้นการงอกทำให้ความเข้มของแถบเลกติน2 ลดลง (พรพิมล เจียระนัยปรีเปรม และคณะ 2554) ผลการทดลองสกัดโปรตีนแยกส่วนจากเซลล์บ่งชี้ว่า เลกติน2 อยู่ที่ส่วนผนังเซลล์ ศึกษาการควบคุมการแสดงออกของโปรตีนเลกติน2 ที่ระดับยีนโดยวิธี RT-PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ F-R3 ซึ่งออกแบบใช้เองและกำหนดเงื่อนไขปฏิกิริยา PCR ให้จำเพาะขึ้นที่อุณหภูมิการ annealing ของไพรเมอร์สูงกว่าค่า Tm พบการลดลงของผลิตภัณฑ์ RT-PCR เป้าหมาย (412 bp) สรุปว่า ยีนของโปรตีนเลกติน2 เกิดการแสดงออกลดลงเมื่อตาข้างเกิดการกระตุ้นการงอก ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับข้อมูลในระดับโปรตีน ในขณะที่การแสดงออกของยีน *18S rRNA* เพิ่มขึ้นเมื่อตาข้างมีพัฒนาการของระยะการงอกซึ่งหมายถึงการสร้างโปรตีนรวมเพิ่มขึ้นพร้อมกับที่ตาข้างเจริญแบ่งเซลล์ อธิบายหน้าที่ของโปรตีนเลกติน2 ในเชิงสัมพันธ์กับสภาวะพักตัว การเบียดชิดกันของเซลล์ และอาจเกี่ยวข้องกับการควบคุมปริมาณฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนิน ไพรเมอร์คู่ใหม่อีก 1 คู่ คือ F-R2 ใช้ไม่ได้ผล ส่วนไพรเมอร์คู่ของ Nakagawa et al. (2003) ซึ่งใช้เป็นไพรเมอร์มาตรฐานคู่ควบคุมนั้นจากการทำ alignment ลำดับเบส น่าจะทำปฏิกิริยา PCR กับเลกตินทุกชนิดที่มีรายงานไว้ในหัวแก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus*) เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *CuZn-SOD* และ *APX* ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบใช้กับวิธี RT-PCR ผลการทดลองได้ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จำเพาะตามที่ต้องการ และแสดงว่าการแสดงออกของยีนทั้งสองสอดคล้องกัน ซึ่งบ่งชี้การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในการควบคุมปริมาณ ROS ในช่วงระยะการงอกของตาข้าง ทั้งนี้พบว่า การแสดงออกของ ยีน *CuZn-SOD* และ *APX* สูงในช่วงระยะพักตัวและช่วงเวลาใกล้เคียง (ระยะที่ 1 และ 2) ลดลงในระยะที่ตางอก และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในบางระยะ (ระยะที่ 5)

Abstract

In this work, fractionated extraction of the cellular proteins demonstrated its localization in the tuber bud cell wall. Transcriptional regulation of *lectin2* along the bud dormancy breakage was studied by RT-PCR using the *lectin2* forward primer (F) established elsewhere in combination with a newly designed reverse primer (R3). An amplified product of the predicted size (412 bp) was given once increasing the annealing temperature. With this primer pair (F-R3), the detection of the *lectin2* transcripts was found dynamically declined as a function of the tuber bud dormancy breakage and germination in corresponding to the evidence at the protein level. In this research work, cell fractionated protein extraction was conducted to indicate cellular localization of the lectin2 protein. This protein was previously described as a dormancy-associated protein of the Kaentawan lateral bud for its band intensity on SDS-PAGE continually declined during bud germination (พรพิมล เจียระนัยปรีเปรม และคณะ 2554). Transcriptional regulation of *lectin2* was studied by RT-PCR using the so-designed *lectin2* F-R3 primer pair. By this primer, the condition of the PCR reaction was stringently set up at an annealing temperature above the Tm. An amplified product of the predicted size (412 bp) was given. The detection of the *lectin2* transcripts was found dynamically declined as a function of the tuber bud dormancy breakage and germination in corresponding to the evidence at the protein level. Meanwhile, the expression of *18S rRNA* showed higher level along the higher bud developmental stage on bud germination. Higher *18S rRNA* expression reflected higher cellular protein synthesis. The explanation on the lectin2 function was made in correlation with the bud dormancy stage including tight cell adherence and a possible role in monitoring the level of auxin as well as cytokinin. Another newly proposed *lectin2* primer (F-R2) did not work well. The primer established by Nakagawa et al. (2003) was also introduced in the experiment as a reference. Alignment of base sequences remarkably notified its specificity to all accessed Kaentawan (*Helianthus tuberosus*) lectins. The study on gene expression of *CuZn-SOD* and *APX* was done using primer pairs designed here for RT-PCR. Single specific RT-PCR products were obtained for both cases demonstrating a concurrent pattern. Therefore, it revealed a cooperative function of CuZn-SOD and APX in controlling ROS occurrence during bud germination. Transcriptional expression of the two enzymes was high in the dormant bud and the immediate stage (stage 1 and 2). The expression turned low during bud germination with slightly raised up at a certain stage (stage 5).