



รายงานผลงานวิจัย

เรื่อง การศึกษาการทำงานของยีนทนร้อนเพื่อพัฒนาพันธุ์ข้าวไทยให้ทนทานอุณหภูมิสูง
Expression Study of Heat Shock Transcription Factor Genes for Development of
Thai Rice Varieties with Heat Tolerance

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2556

จำนวนเงิน 350,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางสาวแสงทอง พงษ์เจริญกิจ

ผู้ร่วมโครงการ นายอนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

นางสาววราภรณ์ แสงทอง

นางสาวช่อทิพา สกุดสิงหาโรจน์

นางวิศรา สุวรรณ

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

15 กรกฎาคม 2557

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาการทำงานของยีนทนร้อนเพื่อพัฒนาพันธุ์ข้าวไทยให้ทนทาน
อุณหภูมิสูง (Expression Study of Heat Shock Transcription Factor Genes for Development of
Thai Rice Varieties with Heat Tolerance) ได้สำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2556

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยข้าวสะเมิง สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ที่อนุเคราะห์ข้าว
พันธุ์น้ำริน

และขอขอบคุณนางสาวจันทร์เพ็ญ สระ และนางสาวกนกวรรณ จันทร์เพ็ญ ที่มีส่วนร่วม
ในการดำเนินการวิจัยของโครงการนี้

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
สารตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	8
ผลการวิจัย	16
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	31
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก	34
ภาคผนวก ก	35
ภาคผนวก ข	38

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>OsHsp17</i> จากข้าวไทย	18
ตารางที่ 2 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน OsHSP17 จากข้าวไทย	19
ตารางที่ 3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>OsHsfA4d</i> จากข้าวไทย	21
ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน OsHsfA4d จากข้าวไทย	22
ตารางที่ 5 ผลการโคลน การสร้างชุดของยีนและการถ่ายฝากยีนเข้าสู่ต้นข้าว	24
ตารางที่ 6 ผลการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวตรวจสอบ โดยวิธี GUS assay	28

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 กลไกการทนทานต่ออุณหภูมิสูงในพืช	7
ภาพที่ 2 แผนที่ของ pUC19-p2CA	8
ภาพที่ 3 ชุดของยีน	9
ภาพที่ 4 แผนที่ของพลาสมิด pGEM-T easy (Promega)	17
ภาพที่ 5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน OsHsp17 ที่แยกได้ จากข้าวไทย	18
ภาพที่ 6 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>OsHsfA4d</i> ที่แยกได้จากข้าว 4 สายพันธุ์	20
ภาพที่ 7 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ โปรตีน <i>OsHsfA4d</i> ที่แยกได้จากข้าว 4 สายพันธุ์	21
ภาพที่ 8 แผนที่ของชุดดีเอ็นเอใน pCAMBIA ที่ประกอบด้วยบริเวณรหัส (<i>OsHsp17</i>)	23
ภาพที่ 9 แผนที่ของชุดดีเอ็นเอใน pCAMBIA ที่ประกอบด้วยบริเวณรหัส (<i>OsHsfA4d</i>)	24
ภาพที่ 10 การตรวจสอบการถ่ายยีน <i>OsHsp17</i> โดยวิธี GUS assay	26
ภาพที่ 11 การตรวจสอบการถ่ายยีน <i>OsHsfA4d</i> โดยวิธี GUS assay	27
ภาพที่ 12 ผลการถ่ายยีน OsHsp17 -ปทุมธานี1 -sense เข้าข้าวสายพันธุ์นิปปอนบาเรย์ และไทซุง 65	29
ภาพที่ 13 ผลการถ่ายยีนยีน OsHsp17 -กุเมืองหลวง -sense เข้าข้าวสายพันธุ์นิปปอนบาเรย์ และไทซุง 65	30

การศึกษาการทำงานของยีนทนร้อนเพื่อพัฒนาพันธุ์ข้าวไทยให้ทนทานอุณหภูมิสูง
Expression Study of Heat Shock Transcription Factor Genes for Development of
Thai Rice Varieties with Heat Tolerance

แสงทอง พงษ์เจริญกิต¹ อนูรักษ์ โพธิ์เยี่ยม¹ วรภรณ์ แสงทอง¹ ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์¹
และวริศรา สุวรรณ¹

Saengtong Pongjaroenkit,¹ Anurug Poeaim,¹ Varaporn Sangtong,¹ Chotipa Sakulsingharoj,¹
and Warissara Suwan¹

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

ข้าวเป็นพืชอาหารที่สำคัญ โดยอุณหภูมิของโลกที่เพิ่มขึ้นเป็นปัญหาที่สำคัญของการเพาะปลูกข้าว เนื่องจากกระทบกับการเจริญเติบโตและนำไปสู่ผลผลิตที่ลดลง และจากการศึกษาวิจัยพบการแสดงออกของโปรตีนที่ช่วยให้ข้าวสามารถปรับตัวเข้ากับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นได้คือ โปรตีนตอบสนองต่ออุณหภูมิสูง (heat shock proteins/heat stress proteins; HSPs) หรือโปรตีนกลุ่มควบคุมการถอดรหัสของยีนที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิสูง ที่เรียกว่า heat shock/stress transcription factors (HSFs) ในงานวิจัยนี้จึงถ่ายฝากยีนของโปรตีนทนร้อนขนาดเล็ก (*OsHsp17*) ที่แยกได้จากข้าวไทยพันธุ์ปทุมธานี 1 และพันธุ์ภูเมืองหลวง และยีนของโปรตีนควบคุมการถอดรหัส (*OsHsfA4d*) ที่แยกได้จากข้าวไทยดอกมะลิ 105 ให้กับข้าวนิปปอนบาร์เลย์และไทซุง 65 โดยใช้อะโกรแบคทีเรีย จากการศึกษาประสิทธิภาพของการถ่ายยีน พบว่าชุดยีน *OsHsp17* มีประสิทธิภาพเฉลี่ย 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดยีน *OsHsfA4d* มีประสิทธิภาพเฉลี่ย 90 เปอร์เซ็นต์ และจากการคัดเลือกและชักนำให้เป็นต้น ได้ต้นข้าวที่มีชุดยีน *OsHsp17* จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี ในขณะที่ชุดยีนอื่นๆ ยังอยู่ระหว่างการคัดเลือกและชักนำให้เป็นต้น โดยต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจะนำไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนและความสามารถในการตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงต่อไป

คำสำคัญ: ข้าว ยีนโปรตีนทนร้อนขนาดเล็ก ยีนโปรตีนควบคุมการถอดรหัส การถ่ายฝากยีนอะโกรแบคทีเรีย

Abstract

Rice is an important food crop. The increasing temperature is one problem for rice because the rising temperature could effect growth and the production of rice. Several studies revealed that heat shock/stress proteins (HSPs) and heat shock/stress transcription factors (*Hsfs*) are important proteins involved in plant response to heat stress. In this study, small heat shock protein (*OsHsp17*) gene and heat shock transcription factor (*OsHsfA4d*) gene were transformed to Nipponbare and Taichung 65 by *Agrobacterium*. The *OsHsp17* genes were isolated from PathumThanil and GooMeuangLuang whereas *OsHsfA4d* gene was isolated from Khao Dawk Mali 105. *Agrobacterium* transformation efficiency study showed 70% and 90% transformation efficiency from *OsHsp17* gene cassette and *OsHsfA4d* gene cassette respectively. Recently, transgenic plants were obtained from *OsHsp17*- PathumThanil-sense gene cassette. While other gene cassettes still are in selection and regeneration process. Finally, transgenic plants will be further used in gene expression study and temperature response.

Key words: Rice, Small heat shock protein gene, Heat shock transcription factor gene,

Gene transformation, *Agrobacterium*

คำนำ

ภาวะโลกร้อนเป็นปัญหาที่สำคัญในการเพาะปลูกข้าว ซึ่งจากการติดตามผลกระทบจากอุณหภูมิที่มีต่อการเพาะปลูกข้าว ที่อาศัยระบบชลประทานในประเทศจีน อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไทย และเวียดนาม ระหว่าง พ.ศ. 2537-2542 ที่เป็นแหล่งผลิตข้าว 90% ของโลก พบว่าผลผลิตข้าวลดลงไปประมาณ 10-20% นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์ขององค์กรอูคูนิยมหาวิทยาลัยแห่งอังกฤษ ทำนายว่าโลกจะมีอุณหภูมิเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 4 องศาเซลเซียส ใน ค.ศ. 2100 จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิของโลกจะมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นต่อไป

ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันปัญหาการขาดแคลนอาหาร โดยข้าวเป็นพืชอาหารที่สำคัญของโลก จึงต้องมีการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวให้ทนต่ออุณหภูมิของโลกที่เพิ่มขึ้นได้ ซึ่งจากการศึกษาวิจัยในข้าว พบการแสดงออกของโปรตีนที่ทำให้ข้าวสามารถปรับตัวเข้ากับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นได้ คือ โปรตีนตอบสนองต่ออุณหภูมิสูง (heat shock proteins/heat stress proteins; HSPs) หรือโปรตีนกลุ่มควบคุมการถอดรหัสของยีนที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิสูง ที่เรียกว่า heat shock transcription factors (HSFs) ซึ่งกลไกในการทำให้ข้าวสามารถต้านทานต่ออุณหภูมินั้นยังไม่ทราบแน่ชัด ดังนั้นหากนำยีนทนร้อนเหล่านี้มาใช้ในการถ่ายฝากยีนให้กับข้าวไทยพันธุ์ดี ก็จะทำให้ข้าวไทยพันธุ์ดีทนต่ออุณหภูมิสูงได้ ซึ่งในเบื้องต้นการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมจะใช้เพื่อศึกษากลไกที่ยีนทนร้อนทำให้พืชทนทานต่ออุณหภูมิสูง ซึ่งผลการวิจัยที่ได้้นอกจากจะได้ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมแล้ว ยังได้ข้อมูลการทำงานของยีนทนร้อนที่สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวด้วยโมเลกุลเครื่องหมายต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสร้างข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่มียืนทนร้อนจากข้าวไทยพันธุ์ดี
2. เพื่อศึกษาความสามารถในการตอบสนองต่ออุณหภูมิของข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้
3. เพื่อศึกษาความสามารถในการทนแล้งของข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้
4. เพื่อศึกษากาลไกหรือความสัมพันธ์ของยืนทนร้อนกับยีนอื่นๆ ในข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. องค์ความรู้ที่ได้ นอกจากจะเป็นประโยชน์ต่อการทำงานวิจัยของคณะวิจัย ยังเป็นการเผยแพร่ ผลงานของไทยสู่นักวิจัยระดับสากล ผลงานที่คาดว่าจะตีพิมพ์ หัวเรื่อง “Enhanced heat tolerance in transgenic rice plants overexpressing a heat-shock protein”
2. นักวิจัยจากภาครัฐ เช่น จาก มหาวิทยาลัยต่างๆ และกรมวิชาการเกษตร หรือภาคเอกชน ที่สนใจกลไกการตอบสนองต่ออุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นหรือภาวะ โลกร้อนข้าวที่เป็นพืชอาหารและพืชพลังงานที่สำคัญ

การตรวจเอกสาร

อุณหภูมิของโลกที่เพิ่มขึ้นเป็นปัญหาทางเกษตรที่สำคัญ เนื่องจากกระทบกับการเจริญเติบโตและนำไปสู่ผลผลิตที่ลดลง ซึ่งจากการศึกษาพบว่าพืชมีกลไกที่จะปรับตัวกับอุณหภูมิที่สูงขึ้นในหลายรูปแบบ ดังภาพที่ 1 (A. Wahid *et al.*, 2007) เช่น หากความร้อนทำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งทำให้เซลล์ใช้กลไกการขจัดพิษ (detoxify) ที่มักเชื่อม ROS เข้ากับสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ต่าง ๆ ที่มีภายในเซลล์ ความร้อนอาจมีผลกระทบต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้โครงสร้างค้ำจุนเซลล์ (cytoskeleton) และการสื่อสารภายในเซลล์เปลี่ยนแปลง ซึ่งเซลล์จะชักนำให้เกิดการปรับแรงดันภายในเซลล์ (osmolytes adjustments) และการปรับตัวที่พบว่ามีบทบาทมากในการทำให้พืชทนทานต่ออุณหภูมิที่เพิ่ม คือ การป้องกันการเสียหายของโปรตีน (protein denaturation) ด้วยการทำงานของโปรตีนของโปรตีนทนร้อน ในการป้องกันการเสียหายของโปรตีนอื่น ที่จำเป็นต่อการเจริญ ซึ่งในโปรตีนกลุ่มทนร้อน อาจแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มโปรตีนตอบสนองต่ออุณหภูมิสูง (heat shock proteins; HSPs) และ กลุ่มโปรตีนกลุ่มควบคุมการถอดรหัสของยีนที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิสูง (heat shock transcription factors; HSFs) (S. Kotak *et al.*, 2007 ; A. Wahid *et al.*, 2007 ; E. Ruelland and A. Zachowski, 2010) จากการศึกษาการทำงานของโปรตีน HSFs พบว่าสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนอื่นด้วยการจับที่บริเวณโปรโมเตอร์ (promoter) ที่เรียกว่า heat shock elements (HSEs) ทำให้ยีนที่มีบริเวณ HSEs สามารถแสดงออกได้ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงขึ้น

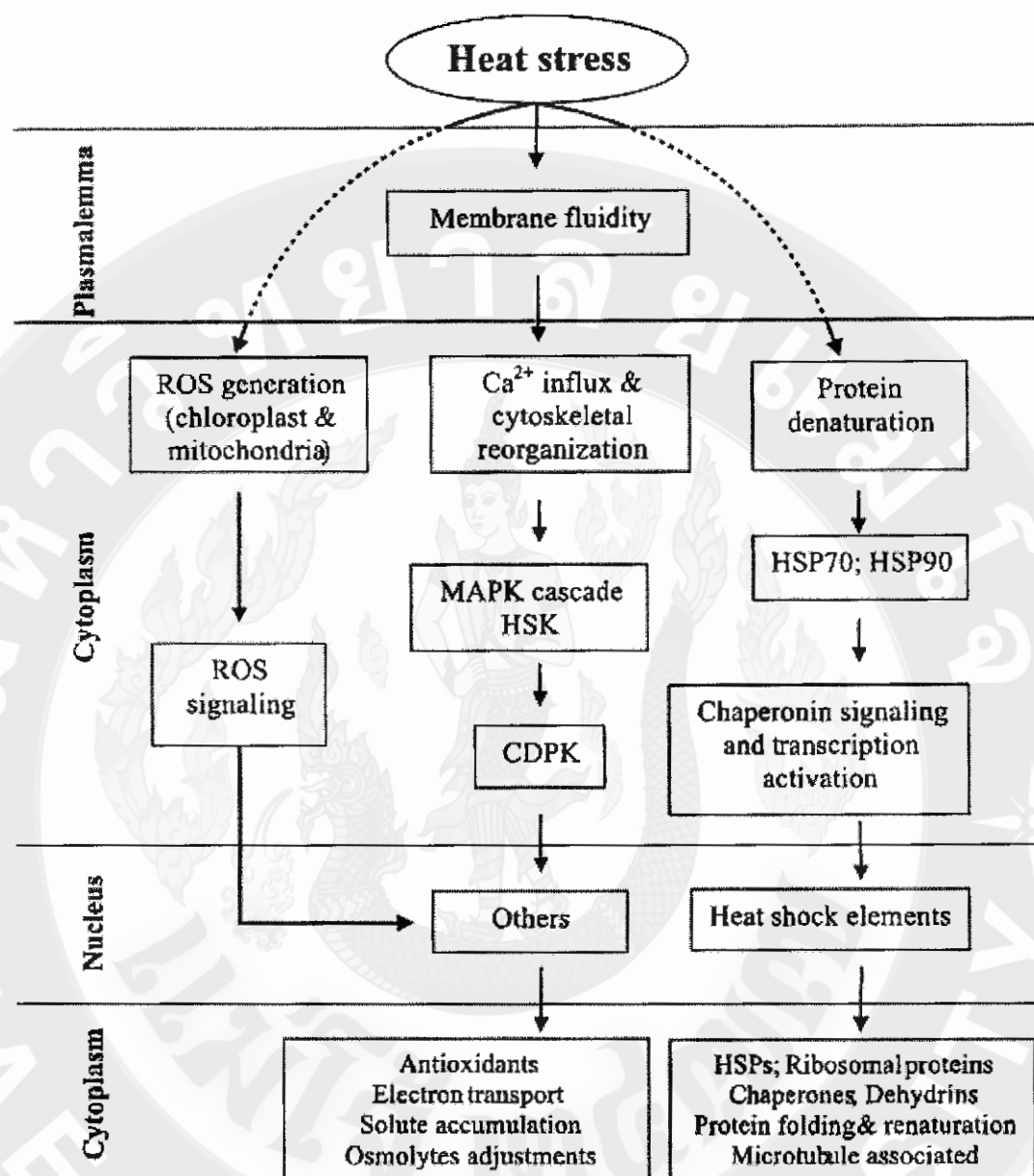
โปรตีนกลุ่ม HSPs สามารถจำแนกตามขนาดเป็น HSP90, HSP70 และ low molecular weight protein/ small HSPs ซึ่งพบว่ามีบทบาทสำคัญในการป้องกันเซลล์จากอุณหภูมิที่สูงขึ้น และมีรายงานในพืชหลายชนิด (A. Wahid *et al.*, 2007) รวมทั้งข้าว ได้แก่ OsHSP20 (Y. Ouyang *et al.*, 2009) Oshsp16.9-Oshsp18.0 (J. Guan *et al.* 2004) จากการศึกษาการแสดงออกของ small HSPs ในข้าวพบการแสดงออกของยีน small HSPs เพิ่มขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิเพิ่มขึ้น อุณหภูมิที่ลดลง การขาดน้ำ ความเค็ม (N. Sarkar *et al.*, 2009) และจากการศึกษาระยะการออกดอก (anthesis) ของข้าว 3 พันธุ์ พบว่าในข้าวพันธุ์ N22 การออกดอกสามารถทนทานต่ออุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส โดยที่เมื่อศึกษาโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ (proteomic analysis) ของข้าวทั้ง 3 พันธุ์ พบว่า HSPs มีปริมาณเพิ่มขึ้นในข้าวพันธุ์ N22 (S. V. K. Jagadish *et al.*, 2010) นอกจากนี้พบว่าการถ่ายฝากยีน *hsp101* ของ *Arabidopsis thaliana* (*Athsp101*) ให้กับข้าวบาสมาดิ พบว่าข้าวดัดแปลงพันธุกรรมสามารถทนทานต่ออุณหภูมิสูง

(S. Katiyar-Agarwal *et al.*, 2003) และการถ่ายฝากยีนของโปรตีน small HSP (sHSP17.7) ให้กับข้าวได้เป็นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม พบว่าทำให้ข้าวทนแล้งได้ (Y. Sato and S. Yokoya, 2008)

ส่วนโปรตีนกลุ่ม HSFs จากการศึกษาจีโนมของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์นิปปอนบาเรย์และข้าวอินดิกา พบการแสดงของยีน *Hsfs* โดยยีนที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิของข้าว (*OsHsf*) มีจำนวนมาก จากการศึกษาพบยีน *OsHsf* ที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิสูง เช่น ยีน *OsHsfA2a* *OsHsfA2c* *OsHsfA2d* *OsHsfA2f* *OsHsfB2a* *OsHsfB2e* *OsHsfA6b* และ *OsHsfC2a* (D. Mittal *et al.*, 2009 ; C. Wang *et al.*, 2009 ; W. Hu *et al.*, 2009) และเมื่อถ่ายฝากยีน *OsHsfA2e* ให้กับต้น *Arabidopsis* พบว่าพืชดัดแปลงพันธุกรรมสามารถทนทานต่ออุณหภูมิสูง (N Yokotani. *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังพบว่าการถ่ายยีนในกลุ่มของกลุ่มโปรตีนควบคุมการถอดรหัส (transcription factor) อื่น เช่น การศึกษาการถ่ายยีน *OsWRKY11* ของข้าว ที่มี WRKY domain โดยใช้โปรโมเตอร์ของยีน *HSP101* พบว่าทำให้ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมสามารถทนทานต่อความร้อนและความแล้ง (X. Wu *et al.*, 2009)

นอกจากยีนในกลุ่มยีนทนร้อนและยังพบว่าการสร้างข้าวดัดแปลงพันธุกรรมให้มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง คือ Calvin cycle enzyme sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase) ให้แสดงออกเพิ่มขึ้น (over-expression) เมื่อให้อุณหภูมิสูงขึ้น พบการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้น (L. Feng *et al.*, 2007)

เนื่องจากการศึกษากลไกการทำงานของยีนหรือโปรตีนต่างๆ ในข้าวในการตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงยังไม่ทราบแน่ชัด และจากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาของนักวิจัยทั่วโลก ซึ่งให้เห็นว่ายีนทนร้อนทั้งในกลุ่ม HSPs และกลุ่ม HSFs มีความสามารถทำให้ข้าวหรือพืชทนทานต่ออุณหภูมิสูงได้ (S. Katiyar-Agarwal *et al.*, 2003 ; Y. Sato and S. Yokoya, 2008 ; N Yokotani. *et al.*, 2008 ; N. Sarkar *et al.*, 2009) และจากการที่พบว่าโปรตีนทนร้อนนั้นมีความแตกต่างกันในข้าวแต่ละชนิด (S. V. K. Jagadish *et al.*, 2010) ซึ่งโปรตีนในกลุ่ม HSFs อาจจะสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง เช่น ยีน SBPase ดังนั้นการถ่ายฝากยีนของโปรตีนทนร้อนให้กับข้าวไทยพันธุ์ดี น่าจะเป็นทั้งการศึกษากลไกการทำงานของยีนทนร้อนและการพัฒนาพันธุ์ข้าวให้ทนทานต่ออุณหภูมิสูง

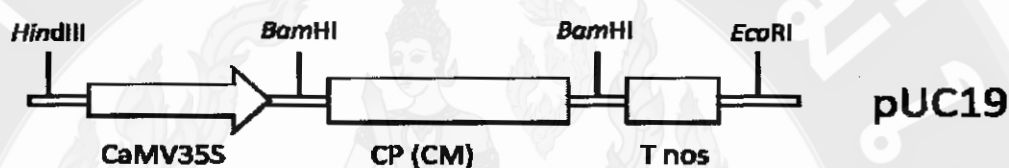


ภาพที่ 1 กลไกการทนทานต่ออุณหภูมิสูงในพืช (A. Wahid *et al.*, 2007)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสร้างชุดของยีนเพื่อการถ่ายฝากยีนทนร้อน

การสร้างชุดยีนแอสโดยย้ายบริเวณรหัสของยีนของโปรตีนทนร้อนขนาดเล็ก (*OsHsp17.0* kDa) และยีนของโปรตีนกลุ่มควบคุมการถอดรหัสของยีนที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิสูง (*OsHsfA4d*) ของโปรตีนเข้าแทนที่ขึ้น CM ที่พลาสมิด pUC19-p2CA ที่มีบริเวณโปรโมเตอร์ (CaMV35S) และบริเวณเทอร์มินเตอร์ (T nos) ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แผนที่ของ pUC19-p2CA ที่มีบริเวณโปรโมเตอร์ (CaMV35S) และบริเวณเทอร์มินเตอร์ (T nos)

โดยการเตรียมชิ้นยีน *OsHsp17* ด้วยเทคนิค PCR ของดีเอ็นเอในจีโนม (genomic DNA) และชิ้นยีน *OsHsfA4d* ด้วยเทคนิค RT-PCR จากนั้นโคลนเข้าดีเอ็นเอพาหะ pGEM-T easy (Promega) เมื่อตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้แล้ว สกัดดีเอ็นเอสายผสมแล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เพื่อให้ได้ชิ้นยีน แยกออกจาก pGEM-T easy แล้วทำการแยกบริสุทธิ์ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส และ 1,300 คู่เบส ตามลำดับ ด้วยชุดสำเร็จรูป PureLink Gel Extraction (Invitrogen) จากนั้นจะใช้ในการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pUC19-p2CA ที่ในเบื้องต้นพบว่า มีปัญหา คือ ไม่สามารถเชื่อมต่อแบบปลายเหนียวได้ (จากการทดลองเชื่อมและการทำ transformation จำนวน 5 รอบ) อาจจะเป็นเนื่องมาจากการขาดหายไปของปลายเหนียวบางส่วน จึงได้เปลี่ยนมาใช้หลักการเชื่อมแบบปลายทู่ โดยการการซ่อมให้ชิ้นดีเอ็นเอปลายเหนียวของพลาสมิด pUC19-p2CA จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เป็นดีเอ็นเอปลายทู่ โดยชุดสำเร็จรูป NEB Next End Repair Module (NEB BioLab) เพื่อเตรียมเป็นชิ้นบริเวณรหัส (coding region)

ส่วนพลาสมิด pUC19-p2CA ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* แล้ว แยกบริสุทธิ์เฉพาะชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4 กิโลเบส ทั้งชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 700 คู่เบสที่เป็นยีน CP ด้วยชุดสำเร็จรูป PureLink Gel Extraction (Invitrogen) จากนั้นซ่อมปลายด้วยชุด NEB Next End Repair Module (NEB BioLab) ได้เป็นชิ้นดีเอ็นเอปลายทู่ ทำการเชื่อมต่อกับ pUC19-p2CA – *BamHI*-blunt กับชิ้นยีน *OsHsp17*-*EcoRI*-blunt ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (NEB Biolab) ซึ่งจะได้ชุดของยีน

ดังภาพที่ 3 จากนั้นถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสม (transformation) เข้าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α แล้วคัดเลือกโคโลนีที่มีดีเอ็นเอสายผสมที่ต้องการ ด้วยการตรวจสอบขนาด (rapid size screening) เมื่อได้โคลนที่ต้องการจะได้นำไปหาลำดับดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของบริเวณโปรโมเตอร์ บริเวณรหัสของยีน และบริเวณเทอร์มินเตอร์ โดยส่งไปหาลำดับเบสที่บริษัท 1st base (Malasia)



ภาพที่ 3 ชุดของยีน

ซึ่งชุดยีนจะต้องมีบริเวณโปรโมเตอร์ บริเวณรหัส และบริเวณเทอร์มินเตอร์ที่ถูกต้อง เพื่อให้ยีนสามารถแสดงออกได้ ก่อนที่จะย้ายชุดของยีน และพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 ที่จะใช้ถ่ายฝากชุดของยีนเข้าต้นข้าว โดยที่จะตัดชุดของยีน และพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 ที่มีบริเวณตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* จากนั้นแยกบริสุทธิ์ชุดของยีน- *EcoRI*+*HindIII* และ pCAMBIA 1305.1- *EcoRI*+*HindIII* ชุดสำเร็จรูป PureLink Gel Extraction (Invitrogen) และทำการเชื่อมต่อชิ้นชุดของยีน- *EcoRI*+*HindIII* และ pCAMBIA 1305.1- *EcoRI*+*HindIII* ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (NEB Biolab) จากนั้นถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสม (transformation) เข้าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α แล้วคัดเลือกโคโลนีที่มีดีเอ็นเอสายผสมที่ต้องการ ด้วยการตรวจสอบขนาด (rapid size screening) เมื่อได้โคลนที่ต้องการ สกัดพลาสมิดสายผสมแล้วถ่ายฝากเข้าอะโกรแบคทีเรีย เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวต่อไป

2. การถ่ายฝากชุดของยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105

2.1 การเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ (competent cell) ของอะโกรแบคทีเรีย ที่มีวิธีการดังนี้

2.1.1 จัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 บนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะ ไรแฟมพิซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

2.1.2 เลือกโคโลนีเดี่ยว จำนวน 1 โคโลนี เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะ ไรแฟมพิซิน เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เช้าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ข้ามคืน

2.1.3 นำเชื้อจากข้อ 2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะ ไรแฟมพิซิน เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเช้าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 17 ชั่วโมง จนได้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.55

2.1.4 ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 6000 Xg นาน 10 นาที แล้วเทอาหารออกให้หมด

2.1.5 ละลายตะกอนเซลล์ด้วย สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (เย็น) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปตขึ้นลง จากนั้นเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (เย็น) อีก 16 มิลลิลิตร บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที

2.1.6 ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 6000Xg นาน 10 นาที แล้วเทสารละลายออกให้หมด

2.1.7 เติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (เย็น) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติมกลีเซอรอล ความเข้มข้น 80% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปต

2.1.8 แบ่ง competent cell เก็บใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 200 ไมโครลิตร โดยเมื่อทำการปิเปตเสร็จให้รีบแช่หลอดในไนโตรเจนเหลว จากนั้นจึงนำไปเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน

2.2 การถ่ายฝากชุดของยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย

2.2.1 นำชุดของยีนที่สร้างได้ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่มี competent cell ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มไว้บนน้ำแข็ง 30 นาที

2.2.2 เอาจานอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินและไรแฟมพิซิน มาวางรอไว้บนโต๊ะ รอให้แห้ง

2.2.3 นำหลอดจากข้อ 1 บ่มในไนโตรเจนเหลว นาน 90 วินาที

2.2.4 บ่มใน 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

2.2.5 เมื่อครบเวลาบ่มในน้ำแข็งทันที เติมหาอาหารเหลว LB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มและเช้าหลอดที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 120 นาที

2.2.6 นำหลอดไปปั่นเก็บเซลล์ ที่ 11,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ดูดส่วนใส ด้านบนทิ้ง ประมาณ 800 ไมโครลิตร เหลืออาหารประมาณ 200 ไมโครลิตร แล้วผสมตะกอนเซลล์ (resuspend) จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินและไรแฟมพิซิน

2.2.7 บ่มจานอาหารที่ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 3 วัน

2.3 การสกัดดีเอ็นเอสายผสมจากอะโครแบคทีเรียม ด้วยวิธีการ CTAB Mini Plasmid Preparation ซึ่งมีวิธีการดังนี้

2.3.1 นำโคโลนีที่ได้เลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินและไธมอฟิซิน ความเข้มข้นอย่างละ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

2.3.2 ตูดเชื้อที่เลี้ยงไว้ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทั้งส่วนใส ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง

2.3.3 เติม STET Buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วเติมเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสม (vortex) เพื่อให้ตะกอนเซลล์ผสมกับสาร

2.3.4 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ย้ายไปบ่มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

2.3.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย้ายส่วนใสไปไว้ในหลอดใหม่ (ทิ้งหลอดเก่า)

2.3.6 เติมสารละลาย 5% CTAB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร พลิกหลอดไปมาเพื่อผสม แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

2.3.7 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทั้งส่วนน้ำ เติม 1.2 M NaCl ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และเติม RNase (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.3.8 เติมโคโลฟอร์ม จำนวน 1 ปริมาตร (510 ไมโครลิตร) ผสม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ตูดส่วนบนไว้หลอดใหม่ (ประมาณ 400 ไมโครลิตร) ทิ้งหลอดเก่า

2.3.9 เติมสารละลาย 3 M โซเดียมอะซิเตด pH 5.6 จำนวน 0.1 ปริมาตร (ประมาณ 40 ไมโครลิตร) และเติม 95% เอทานอล จำนวน 2 ปริมาตร (ประมาณ 880 ไมโครลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ค้างคืน

2.3.10 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ทั้งส่วนน้ำ ระวังอย่าให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุด

2.3.11 เติม 70% เอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทั้งส่วนน้ำ ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ

2.3.12 ตั้งหลอดทิ้งไว้ให้แห้ง และละลายตะกอนดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย 10 mM Tris-HCl pH 8.5 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

3. การถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว

3.1 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดข้าว

ในการทดลองนี้จะเมล็ดแก่ของข้าวญี่ปุ่น (*Oryza sativa* L.) พันธุ์นิปปอนบารีย์ (nipponbare) และ พันธุ์ไทหุง 65 (taichung 65) ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้

- แกะเปลือกออกจากเมล็ดแก่ของข้าว
- นำเมล็ดที่แกะเปลือกแล้วใส่ในหลอดพลาสติก และเติม 70% ethanol ปริมาตร 25-30 มิลลิลิตร แช่ประมาณ 30 วินาที เท ethanol ทิ้ง และเติม 10 % sodium hypochlorite ปริมาตร 25-30 มิลลิลิตร
- ทำการฟอกฆ่าเชื้อโดยนำไปแช่บนเครื่องเขย่า ประมาณ 15 นาที หลังจากนั้นเทสารละลายทิ้ง
- ทำการฟอกฆ่าเชื้อซ้ำอีกครั้ง โดยเติม 10 % sodium hypochlorite ปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร แช่ประมาณ 15 นาที และเทสารละลายทิ้ง
- ล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ ปริมาตร 25-30 มิลลิลิตร จำนวน 4 ครั้ง
- วางเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วลงบนอาหารสูตร N6D โดยให้ส่วนของ embryo อยู่บนผิวของอาหาร ใช้เมล็ดประมาณ 8-10 เมล็ดต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง
- นำไปเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์

3.2 การปลูกเชื้อและการเพาะเลี้ยงร่วม ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้

3.2.1 Subculture of callus

- นำแคลลัสที่มีอายุประมาณ 3-4 สัปดาห์ มาทำการคัดเลือกแคลลัสชนิด embryogenic ที่มีเส้นผ่าน ศูนย์กลางประมาณ 2-4 มิลลิเมตร และมีลักษณะสีเหลืองอ่อน กลม แน่น
- ย้ายแคลลัสที่มีลักษณะดังกล่าวไปบนอาหารใหม่สูตร N6D
- ทำการเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.2.2 Infection และ coculture

- เชื้อเชื้อจาก glycerol stock ของ เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีชุดของยีน มาจีต (streak) ลงบนอาหารสูตร LB ทำการเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว

- นำโคโลนีเดี่ยว มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ acetosyringone ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืน (24 ชั่วโมง)

- นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้มาหาความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600})

- ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

- เทส่วนอาหารทิ้งแล้ว ละลายตะกอนด้วยอาหารเหลวสูตร 2N6 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

- เจือจางความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียให้ได้ค่า OD_{600} เป็น 0.15 ด้วย อาหารเหลวสูตร 2N6 ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 35 มิลลิลิตร

- เติม acetosyringone ลงในสารแขวนลอยเชื้อที่ได้ในข้อ 6 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

- ย้ายเซลล์ที่ได้จากการ subculture ไว้ลงบนตะแกรงที่ฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งวางบนจานเพาะเลี้ยงเปล่าที่ฆ่าเชื้อแล้ว

- เติมสารแขวนลอยอะโกรแบคทีเรีย จากข้อ 7 ลงบนเซลล์แล้วทำการปลูกเชื้อ (infection) เป็นเวลาประมาณ 90 วินาที

- วางตะแกรงลงชั้นบนกระดานที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อขับเชื้ออะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออกไป

- บนอาหารสูตร 2N6-AS แล้วทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันของเซลล์และ เชื้ออะโกรแบคทีเรียในที่มืด ที่อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.3 การล้างเซลล์และการตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีน ที่มีวิธีการดังต่อไปนี้

3.3.1 การล้างเซลล์

- หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับอะโกรแบคทีเรีย เป็นเวลา 3 วันแล้ว นำเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 35-40 มิลลิลิตร ในหลอดพลาสติก ค่อย ๆ กลับหลอดไปมาเป็นเวลาประมาณ 1-2 นาที

- เทน้ำทิ้งในบีกเกอร์ ตรวจสอบความขุ่นของน้ำ

- ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นทั้งหมด 3 ครั้ง หรือสังเกตจนน้ำในบีกเกอร์ไม่ขุ่น

- ทำการล้างแคลลัสครั้งสุดท้ายด้วยอาหารเหลวสูตร N6D ที่ฆ่าเชื้อแล้วที่มี 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ timentin (ในขั้นตอนการล้างทั้งหมดไม่ควรใช้เวลานาน 10 นาที)
- นำแคลลัสที่ล้างแล้วจับบนกระดาษทิชชูที่ฆ่าเชื้อแล้ว
- ย้ายแคลลัสที่ล้างแล้วลงบนอาหารคัดเลือก SM1 (อาหาร N6D ที่มี 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ hygromycin B และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ timentin) โดยวางแคลลัสประมาณ 20-30 แคลลัสต่อจานเพาะเลี้ยง (การคัดเลือกครั้งที่ 1)
- นำไปเลี้ยงแคลลัสในที่สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจาก 2 สัปดาห์ให้ย้ายแคลลัสที่รอดไปบนอาหารคัดเลือก SM2 (อาหาร N6D ที่มี 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ hygromycin B และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ timentin) ปิด plate ด้วย plastic wrap แล้วนำไปเลี้ยงในที่สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

3.3.2 การตรวจสอบโดยวิธี GUS assay

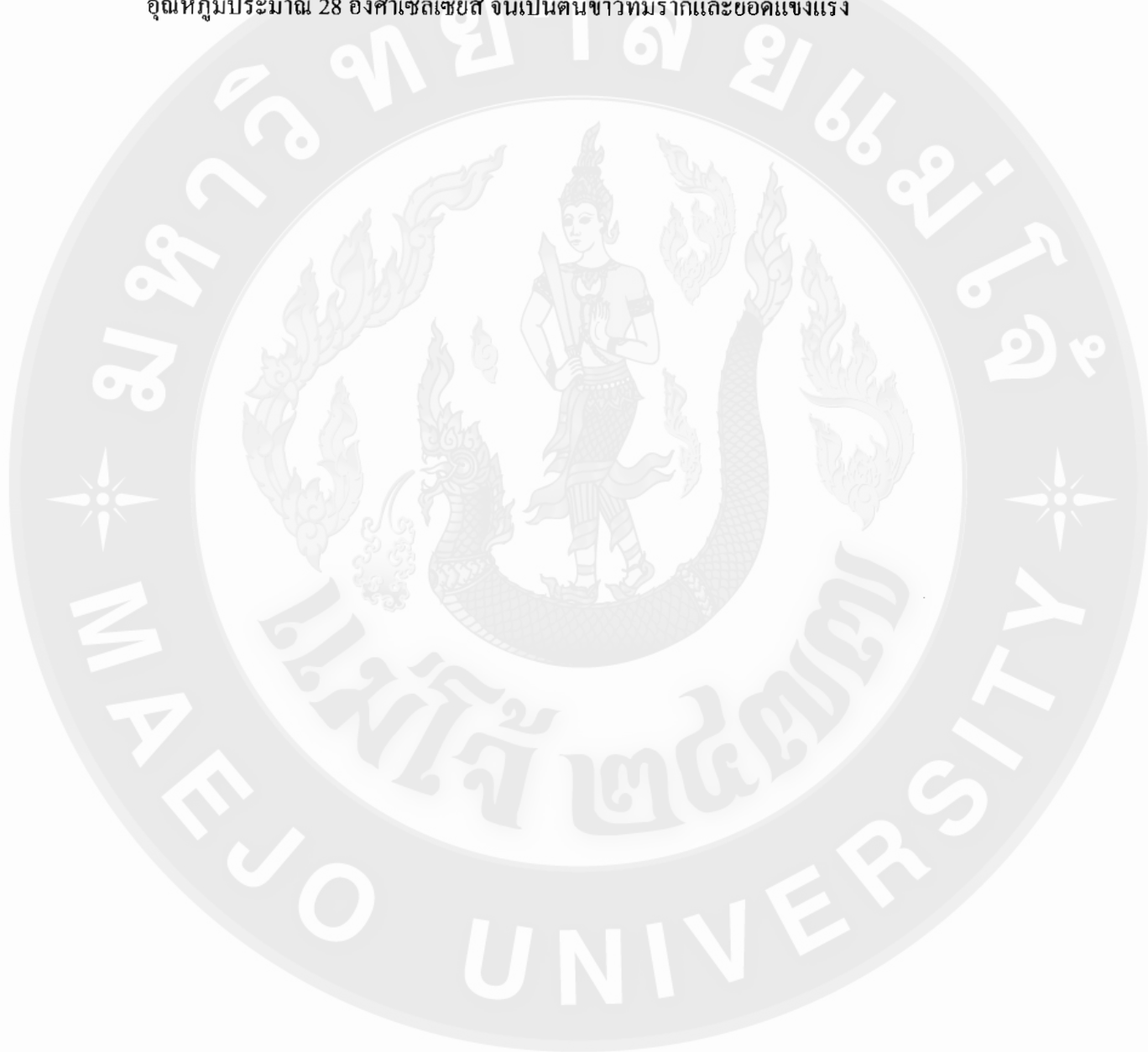
- เตรียมสารละลาย X-gluc ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 30-40 ไมโครลิตร
- นำชิ้นส่วนของแคลลัส หรือ ใบข้าวใส่ลงในหลอดที่มีสารละลาย X-gluc
- นำหลอดไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หรือ ข้ามคืน
- สังเกตการเกิดสีฟ้า เนื่องจากชิ้นส่วนพืชที่ได้รับยีนรายงานผล *gus* เมื่อมีการแสดงออกของยีนจะสร้าง เอนไซม์ β -glucuronidase ซึ่งจะเปลี่ยนสารตั้งต้น X-gluc ให้เป็นสารสีฟ้าทำให้ง่ายต่อการ ตรวจสอบและคัดเลือกพืชที่ได้รับยีน
- หากเป็นการตรวจสอบชิ้นส่วนใบหลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส แล้ว ให้เติม 95% ethanol แล้วแช่ไว้จนกว่าสีเขียวจะหายไป เพื่อกำจัดคลอโรฟิลล์

3.4 การชักนำให้แคลลัสที่ได้รับยีนเจริญเป็นต้น ซึ่งใช้วิธีการดังนี้

- ย้ายแคลลัสที่รอดตาย จากการเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร SM2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดขึ้น RM ครั้งที่ 1 (RM1: อาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, Kinetin 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, hygromycin B 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และ timentin 150 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพาะเลี้ยงในที่มืดแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา ประมาณ 2 สัปดาห์ บันทึกผล
- ย้ายแคลลัสที่รอดตาย ลงบนอาหารชักนำให้เกิดขึ้น RM ครั้งที่ 2 (RM2) แล้วเลี้ยงในที่มืดแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส ย้ายแคลลัสที่รอดตายและแคลลัสที่พัฒนาเกิดจุดเขียว ลงบนอาหารชักนำให้เกิดขึ้น RM3-5 แล้วเลี้ยงในที่มืดแสง 16 ชั่วโมงต่อ

วันที่อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส ต่อรอบการชักนำให้เกิดขึ้น จนเกิดเป็นยอดและราก
บันทึกผล

- ย้ายต้นอ่อนลงขวดที่มีอาหารสูตร MS (hormone-free medium) ที่มี 30 มิลลิกรัม
ต่อลิตร hygromycinB และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร timentin เลี้ยงในที่มืดแสง 16 ชั่วโมง ต่อวัน ที่
อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส จนเป็นต้นข้าวที่มีรากและยอดแข็งแรง



ผลการวิจัย

1. การสร้างชุดของยีน

1.1 การแยกยีนของโปรตีนทนร้อนขนาดเล็ก (*OsHsp17*)

การแยกยีนของโปรตีนทนร้อนขนาดเล็ก (*OsHsp17*) จากข้าวไทย ที่มีรายงานว่าสามารถทำให้พืชทนแล้งได้ (Yutaka Sato and Sakiko Yokoya, 2008) พบว่าสามารถแยกยีนได้จากข้าวจำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1, น้ำรุ, กุเมืองหลวง และพลาขามปราจีนบุรี ด้วยการเพิ่มจำนวนจากดีเอ็นเอในจีโนม (genomic DNA PCR) โดยที่ยีนเหล่านี้โคลนในดีเอ็นเอพาหะ pGEM-T easy แล้วหาลำดับดีเอ็นเอของยีนที่โคลนได้ จากนั้นเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของยีนและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ซึ่งผลการเปรียบเทียบพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OsHSP17* kDa มีความเหมือนกันมาก 93-100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4 และตารางที่ 1) ในขณะที่ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *OsHSP17* kDa พบว่าโปรตีนมีความเหมือนถึง 91-100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5 และตารางที่ 2)

```

OsHsp17-P1 : ATGTCGCTGATCCGCGCGCAGCAACGTGTTTCGACCCCTTCTCCCTCGACCTCTGGGACCCCTTCGACGGCTTCCCTTCGGC : 81
OsHsp17-Pa : ATGTCGCTGATCCGCGCGCAGCAACGTGTTTCGACCCCTTCTCCCTCGACCTCTGGGACCCCTTCGACGGCTTCCCTTCGGC : 81
OsHsp17-Na : ATGTCGCTGATCCGCGCGCAGCAACGTGTTTCGACCCCTTCTCCCTCGACCTCTGGGACCCCTTCGACGGCTTCCCTTCGGC : 81
OsHsp17-Go : ATGTCGCTGATCCGCGCGCAGCAACGTGTTTCGACCCCTTCTCCCTCGACCTCTGGGACCCCTTCGACGGCTTCCCTTCGGC : 81
gb|EU84699 : ATGTCGCTGATCCGCGCGCAGCAACGTGTTTCGACCCCTTCTCCCTCGACCTCTGGGACCCCTTCGACGGCTTCCCTTCGGC : 81
ATGTCGCTGATCCGCGCGCAGCAACGTGTTTCGACCCCTTCTCCCTCGACCTCTGGGACCCCTTCGACGGCTTCCCTTCGGC

OsHsp17-P1 : TCCGGCAG-----CGGCAGCTCTTCCCTC-----GCGCCAACTCCGAGCGCGCGGCTTCGCGCGCGCG : 141
OsHsp17-Pa : TCCGGCAG---AAGCAGCGGCAGCATCTTCCCTCCTTCCCGCGCGGACCTCTCCGAGACCGCGGCTTCGCGCGCGCG : 159
OsHsp17-Na : TCCGGCAGCAGAAGCAGCGGCAGCATCTTCCCTCCTTCCCGCGCGGACCTCTCCGAGACCGCGGCTTCGCGCGCGCG : 162
OsHsp17-Go : TCCGGCAG-----CGGCAGCTCTTCCCTC-----GCGCCAACTCCGAGCGCGCGGCTTCGCGCGCGCG : 141
gb|EU84699 : TCCGGCAG-----CGGCAGCTCTTCCCTC-----GCGCCAACTCCGAGCGCGCGGCTTCGCGCGCGCG : 141
TCCGGCAGCGGCAGCTCTTCCCTCGCCCTCCGACCGCGCGGCTTCGCGCGCGCG

OsHsp17-P1 : CCGATCGACTGGAAGGAGACGCCGAGGCGCACGTGTTCAAGGCGGACGTGCCGGGGCTGAAGAAGGAGGAGGTCAAGGTG : 222
OsHsp17-Pa : CCGATCGACTGGAAGGAGACGCCGAGGCGCACGTGTTCAAGGCGGACGTGCCGGGGCTGAAGAAGGAGGAGGTCAAGGTG : 240
OsHsp17-Na : CCGATCGACTGGAAGGAGACGCCGAGGCGCACGTGTTCAAGGCGGACGTGCCGGGGCTGAAGAAGGAGGAGGTCAAGGTG : 243
OsHsp17-Go : CCGATCGACTGGAAGGAGACGCCGAGGCGCACGTGTTCAAGGCGGACGTGCCGGGGCTGAAGAAGGAGGAGGTCAAGGTG : 222
gb|EU84699 : CCGATCGACTGGAAGGAGACGCCGAGGCGCACGTGTTCAAGGCGGACGTGCCGGGGCTGAAGAAGGAGGAGGTCAAGGTG : 222
CG ATCGACTGGAAGGAGACGCC GAGGCGCACGTGTTCAAGGCGGACGTGCCGGGGCTGAAGAAGGAGGAGGTCAAGGTG

OsHsp17-P1 : GAGGTGAGGACGGCAACGTCTCCAGATCAGCGGCGAGCGCATCAAGGAGCAGGAGGAGAAGACGGACAAGTGGCACCCGC : 303
OsHsp17-Pa : GAGGTGAGGACGGCAACGTCTCCAGATCAGCGGCGAGCGCATCAAGGAGCAGGAGGAGAAGACGGACAAGTGGCACCCGC : 321
OsHsp17-Na : GAGGTGAGGACGGCAACGTCTCCAGATCAGCGGCGAGCGCATCAAGGAGCAGGAGGAGAAGACGGACAAGTGGCACCCGC : 324
OsHsp17-Go : GAGGTGAGGACGGCAACGTCTCCAGATCAGCGGCGAGCGCATCAAGGAGCAGGAGGAGAAGACGGACAAGTGGCACCCGC : 303
gb|EU84699 : GAGGTGAGGACGGCAACGTCTCCAGATCAGCGGCGAGCGCATCAAGGAGCAGGAGGAGAAGACGGACAAGTGGCACCCGC : 303
GAGGTGAGGACGGCAACGTCTCCAGATCAGCGGCGAGCGCATCAAGGAGCAGGAGGAGAAGACGGACAAGTGGCACCCGC

OsHsp17-P1 : GTGGAGCGCAGCAGCGGCAAGTTCCTCCGAGGTTCCGGCTGCCGGAGAACACCAAGCCGAGCAGATCAAGGCGTCCATG : 384
OsHsp17-Pa : GTGGAGCGCAGCAGCGGCAAGTTCCTCCGAGGTTCCGGCTGCCGGAGAACACCAAGCCGAGCAGATCAAGGCGTCCATG : 402
OsHsp17-Na : GTGGAGCGCAGCAGCGGCAAGTTCCTCCGAGGTTCCGGCTGCCGGAGAACACCAAGCCGAGCAGATCAAGGCGTCCATG : 405
OsHsp17-Go : GTGGAGCGCAGCAGCGGCAAGTTCCTCCGAGGTTCCGGCTGCCGGAGAACACCAAGCCGAGCAGATCAAGGCGTCCATG : 384
gb|EU84699 : GTGGAGCGCAGCAGCGGCAAGTTCCTCCGAGGTTCCGGCTGCCGGAGAACACCAAGCCGAGCAGATCAAGGCGTCCATG : 384
GTGGAGCGCAGCAGCGGCAAGTTCCTCCGAGGTTCCGGCTGCCGGAGAACACCAAGCCGAGCAGATCAAGGCGTCCATG

OsHsp17-P1 : GAGAACCGGCTGCTCACCGTCACCGTGCCCAAGGAGGAGCCCAAGAAGCCCGACGTCAAGTCCATCCAGTTACCGGCTAG : 465
OsHsp17-Pa : GAGAACCGGCTGCTCACCGTCACCGTGCCCAAGGAGGAGCCCAAGAAGCCCGACGTCAAGTCCATCCAGTTACCGGCTAG : 483
OsHsp17-Na : GAGAACCGGCTGCTCACCGTCACCGTGCCCAAGGAGGAGCCCAAGAAGCCCGACGTCAAGTCCATCCAGTTACCGGCTAG : 486
OsHsp17-Go : GAGAACCGGCTGCTCACCGTCACCGTGCCCAAGGAGGAGCCCAAGAAGCCCGACGTCAAGTCCATCCAGTTACCGGCTAG : 465
gb|EU84699 : GAGAACCGGCTGCTCACCGTCACCGTGCCCAAGGAGGAGCCCAAGAAGCCCGACGTCAAGTCCATCCAGTTACCGGCTAG : 465
GAGAACCGGCTGCTCACCGTCACCGTGCCCAAGGAGGAGCCCAAGAAGCCCGACGTCAAGTCCATCCAGTTACCGGCTAG

```

ภาพที่ 4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OsHsp17* ที่แยกได้จากข้าวไทย 4 สายพันธุ์ กับยีนที่รายงานในฐานข้อมูล (EU846992) โดยที่ยีนจากข้าวไทย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (OsH17-Pa), น้ำรุ (OsH17-Na), ทุ่งเมืองหลวง (OsH17-Go) และพลาญงามปราจีนบุรี (OsH17-P1)

```

      *           20           *           40           *           60           *
OsHsp17-Pa : MSLIRRSNVDFPESLDLWDPPDGFPPFGSG-RSSGSIFPSFPRGTSSETAAAFAGARIDWKETPEAHVFKAD : 69
OsHsp17-Na : MSLIRRSNVDFPESLDLWDPPDGFPPFGSGRSSGSIFPSFPRGTSSETAAAFAGARIDWKETPEAHVFKAD : 70
gb|EU84699 : MSMIRRSNVDFPESLDLWDPPDGFPPFGSG---SGSLFP---R-ANSDAAAFAGARIDWKETPEAHVFKAD : 63
OsHsp17-Pl : MSLIRRSNVDFPESLDLWDPPDGFPPFGSG---SGSLFP---R-ANSDAAAFAGARIDWKETPEAHVFKAD : 63
OsHsp17-Go : MSLIRRSNVDFPESLDLWDPPDGFPPFGSG---SGSLFP---R-ANSDAAAFAGARIDWKETPEAHVFKAD : 63
      MS6IRRSNVDFPESLDLWDPPDGFPPFGSGSGS6FP R S AAFAGARIDWKETPEAHVFKAD

      80           *           100           *           120           *           140
OsHsp17-Pa : VPGLKKEEVKVEVEDGNVLQISGERSKEQEKTDKWHRVERSSGKFLRRRLPENTKPEQIKASMENGVL : 139
OsHsp17-Na : VPGLKKEEVKVEVEDGNVLQISGERSKEQEKTDKWHRVERSSGKFLRRRLPENTKPEQIKASMENGVL : 140
gb|EU84699 : VPGLKKEEVKVEVEDGNVLQISGERIKEQEKTDKWHRVERSSGKFLRRRLPENTKPEQIKASMENGVL : 133
OsHsp17-Pl : VPGLKKEEVKVEVEDGNVLQISGERIKEQEKTDKWHRVERSSGKFLRRRLPENTKPEQIKASMENGVL : 133
OsHsp17-Go : VPGLKKEEVKVEVEDGNVLQISGERIKEQEKTDKWHRVERSSGKFLRRRLPENTKPEQIKASMENGVL : 133
      VPGLKKEEVKVEVEDGNVLQISGERKEQEKTDKWHRVERSSGKFLRRRLPENTKPEQIKASMENGVL

      *           160
OsHsp17-Pa : TTVTPKEEPKKPDVKSIQVTG : 160
OsHsp17-Na : TTVTPKEEPKKPDVKSIQVTG : 161
gb|EU84699 : TTVTPKEEPKKPDVKSIQITG : 154
OsHsp17-Pl : TTVTPKEEPKKPDVKSIQVTG : 154
OsHsp17-Go : TTVTPKEEPKKPDVKSIQVTG : 154
      TTVTPKEEPKKPDVKSIQ6TG

```

ภาพที่ 5 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน OsHsp17 ที่แยกได้จากข้าวไทย 4 สายพันธุ์กับยีนที่รายงานในฐานข้อมูล (EU846992) โดยที่โปรตีนจากข้าวไทย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (OsH17-Pa), น้ำรัฐ (OsH17-Na), กุ้งเมืองหลวง (OsH17-Go) และพลายงามปราจีนบุรี (OsH17-Pl)

ตารางที่ 1 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน OsHsp17 จากข้าวไทย 4 สายพันธุ์กับยีนที่รายงานในฐานข้อมูล (EU846992)

ยีน	OsHsp17- พลายงาม ปราจีนบุรี	OsHsp17- ปทุมธานี1	OsHsp17 -น้ำรัฐ	OsHsp17-กุ้ง เมืองหลวง	OsHsp17- EU846992
OsHsp17- พลายงาม ปราจีนบุรี	-	93%	93%	100%	99%
OsHsp17- ปทุมธานี1	-	-	98%	93%	92%
OsHsp17- น้ำรัฐ	-	-	-	93%	92%
OsHsp17- กุ้ง เมืองหลวง	-	-	-	-	99%

ตารางที่ 2 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน OsHSP17 จากข้าวไทย 4 สายพันธุ์ กับยีนที่รายงานในฐานข้อมูล (EU846992)

โปรตีน	OsHsp17- พลาญงาม ปราจีนบุรี	OsHsp17- ปทุมธานี	OsHsp17- น้ำรู่	OsHsp17- ภูเมืองหลวง	OsHsp17- EU846992
OsHsp17- พลาญงาม ปราจีนบุรี	-	91% 93%	91% 93%	100% 100%	98% 100%
OsHsp17- ปทุมธานี	-	-	98% 98%	91% 93%	90% 93%
OsHsp17- น้ำรู่	-	-	-	91% 93%	90% 93%
OsHsp17- ภูเมืองหลวง	-	-	-	-	98% 100%

หมายเหตุ ตัวเลขบน เป็นความเหมือน ส่วนตัวเลขล่างเป็นความคล้าย

จากผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน จึงเลือกยีน *OsHsp17*-ภูเมืองหลวง เป็นตัวแทนของยีนจากข้าวพันธุ์พลาญงามปราจีนบุรี และยีนจากฐานข้อมูล เนื่องจากมีความคล้ายกันในระดับโปรตีน 100 เปอร์เซ็นต์ และเลือกยีน *OsHsp17*-ปทุมธานี1 เป็นตัวแทนของยีนข้าวพันธุ์น้ำรู่ มีความเหมือนกันในระดับโปรตีน 98 เปอร์เซ็นต์ โดยยีน *OsHsp17* จากข้าวทั้ง 2 พันธุ์จะนำไปสร้างชุดของยีนเพื่อการถ่ายยีนต่อไป

1.2 การแยกยีนของโปรตีนควบคุมการถอดรหัสของยีน (*OsHsfA4d*)

การแยกยีนของยีนของโปรตีนกลุ่มควบคุมการถอดรหัส *OsHsfA4* ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าสามารถแยกยีนได้จากข้าว จำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์ กข 6, ขาวดอกมะลิ 105, ไทหุง 65 และบาสมาดิ โดยที่ยีนเหล่านี้โคลนในดีเอ็นเอพาหะ pGEM-T easy แล้วหาลำดับดีเอ็นเอของยีนที่โคลนได้ ผลการเปรียบเทียบยีน *OsHsfA4d* จากข้าว 4 สายพันธุ์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OsHsfA4d* มีความเหมือนกันมาก 97-99 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 6 และตารางที่ 3) ในขณะที่ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน OsHsFA4d พบว่าโปรตีนมีความเหมือนถึง 91-99


```

pA4d_RD6 : MESSNLGGGGGGGGGPPPEFLIKTYEMVEDAATNHVSWGPGGASFFVWNPDPFSDLLPKYFKHNNFSSPIRQLNTYGERKIDPERWSEFANEDFIRGH : 98
pA4d_BT : MESSNLGGGGGGGGGPPPEFLIKTYEMVEDAATNHVSWGPGGASFFVWNPDPFSDLLPKYFKHNNFSSPIRQLNTYGERKIDPERWSEFANEDFIRGH : 98
pA4d_HD105 : MESSNLGGGGGGGGGPPPEFLIKTYEMVEDAATNHVSWGPGGASFFVWNPDPFSDLLPKYFKHNNFSSPIRQLNTYGERKIDPERWSEFANEDFIRGH : 98
pA4d_TU65 : MESSNLGGGGGGGGGPPPEFLIKTYEMVEDAATNHVSWGPGGASFFVWNPDPFSDLLPKYFKHNNFSSPIRQLNTYGERKIDPERWSEFANEDFIRGH : 100
MESSNLGGGGGGGGGPPPEFLIKTYEMVEDAATNHVSWGPGGASFFVWNPDPFSDLLPKYFKHNNFSSPIRQLNTYGERKIDPERWSEFANEDFIRGH

pA4d_RD6 : TLLLENIHRRKPVHSHSLQNGINGPLASSERRELEESINRLKYKESILVADLQRONQOQVYNWQMAEGRLVAMEBQROKNIVASLCENLORRGAVSS : 198
pA4d_BT : TLLLENIHRRKPVHSHSLQNGINGPLASSERRELEESINRLKYKESILVADLQRONQOQVYNWQMAEGRLVAMEBQROKNIVASLCENLORRGAVSS : 198
pA4d_HD105 : TLLLENIHRRKPVHSHSLQNGINGPLASSERRELEESINRLKYKESILVADLQRONQOQVYNWQMAEGRLVAMEBQROKNIVASLCENLORRGAVSS : 198
pA4d_TU65 : TLLLENIHRRKPVHSHSLQNGINGPLASSERRELEESINRLKYKESILVADLQRONQOQVYNWQMAEGRLVAMEBQROKNIVASLCENLORRGAVSS : 200
TLLLENIHRRKPVHSHSLQNGINGPLASSERRELEESINRLKYKESILVADLQRONQOQVYNWQMAEGRLVAMEBQROKNIVASLCENLORRGAVSS

pA4d_RD6 : SLLESDFEKKERPMHLVDDAA--GGGFFYFGGIGTMA--KMPVLVTNGEAFDRVELSLVLEKLFQRANDACTAAEEMYSHGCGTEPST : 294
pA4d_BT : SLLESDFEKKERPMHLVDDAA--GGGFFYFGGIGTMA--KMPVLVTNGEAFDRVELSLVLEKLFQRANDACTAAEEMYSHGCGTEPST : 294
pA4d_HD105 : SLLESDFEKKERPMHLVDDAA--GGGFFYFGGIGTMA--KMPVLVTNGEAFDRVELSLVLEKLFQRANDACTAAEEMYSHGCGTEPST : 294
pA4d_TU65 : SLLESDFEKKERPMHLVDDAA--GGGFFYFGGIGTMA--KMPVLVTNGEAFDRVELSLVLEKLFQRANDACTAAEEMYSHGCGTEPST : 300
SLLESDFEKKERPMHLVDDAA--GGGFFYFGGIGTMA--KMPVLVTNGEAFDRVELSLVLEKLFQRANDACTAAEEMYSHGCGTEPST

pA4d_RD6 : AICFEEENITAPMETGIDLQLPASLHPSSPNTGNAHLHLSTELTSSGFGVQSPFLPHASIREDIHVTRYPTQADVNSEASSTDTSDGDTSETASHGPTN : 394
pA4d_BT : AICFEEENITAPMETGIDLQLPASLHPSSPNTGNAHLHLSTELTSSGFGVQSPFLPHASIREDIHVTRYPTQADVNSEASSTDTSDGDTSETASHGPTN : 394
pA4d_HD105 : AICFEEENITAPMETGIDLQLPASLHPSSPNTGNAHLHLSTELTSSGFGVQSPFLPHASIREDIHVTRYPTQADVNSEASSTDTSDGDTSETASHGPTN : 394
pA4d_TU65 : AICFEEENITAPMETGIDLQLPASLHPSSPNTGNAHLHLSTELTSSGFGVQSPFLPHASIREDIHVTRYPTQADVNSEASSTDTSDGDTSETASHGPTN : 400
AICFEEENITAPMETGIDLQLPASLHPSSPNTGNAHLHLSTELTSSGFGVQSPFLPHASIREDIHVTRYPTQADVNSEASSTDTSDGDTSETASHGPTN

pA4d_RD6 : DVFWERELTETPRSCLDSEERQESPKDDVKAEGLGNGFHHREKVDQITSQMGHLASASQTLT : 457
pA4d_BT : DVFWERELTETPRSCLDSEERQESPKDDVKAEGLGNGFHHREKVDQITSQMGHLASASQTLT : 457
pA4d_HD105 : DVFWERELTETPRSCLDSEERQESPKDDVKAEGLGNGFHHREKVDQITSQMGHLASASQTLT : 457
pA4d_TU65 : DVFWERELTETPRSCLDSEERQESPKDDVKAEGLGNGFHHREKVDQITSQMGHLASASQTLT : 463
DVFWERELTETPRSCLDSEERQESPKDDVKAEGLGNGFHHREKVDQITSQMGHLASASQTLT

```

ภาพที่ 7 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *OsHsfA4d* ที่แยกได้จากข้าว 4 สายพันธุ์ โดยที่ยีนจากข้าว 4 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ กข 6 (pA4d_RD6), ข้าวดอกมะลิ 105 (pA4d_HD105), ไทซุง 65 (pA4d_TU65) และบาสมาติ (pA4d_BT)

ตารางที่ 3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OsHsfA4d* จากข้าวไทย 4 สายพันธุ์

ยีน	<i>OsHsfA4d</i> - กข 6	<i>OsHsfA4d</i> - บาสมาติ	<i>OsHsfA4d</i> -ข้าว ดอกมะลิ105	<i>OsHsfA4d</i> - ไทซุง 65
<i>OsHsfA4d</i> -กข 6	-	99%	99%	97%
<i>OsHsfA4d</i> -บาสมาติ	-	-	99%	97%
<i>OsHsfA4d</i> -ข้าวดอกมะลิ 105	-	-	-	97%

ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน OsHsfA4d จากข้าวไทย 4 สายพันธุ์

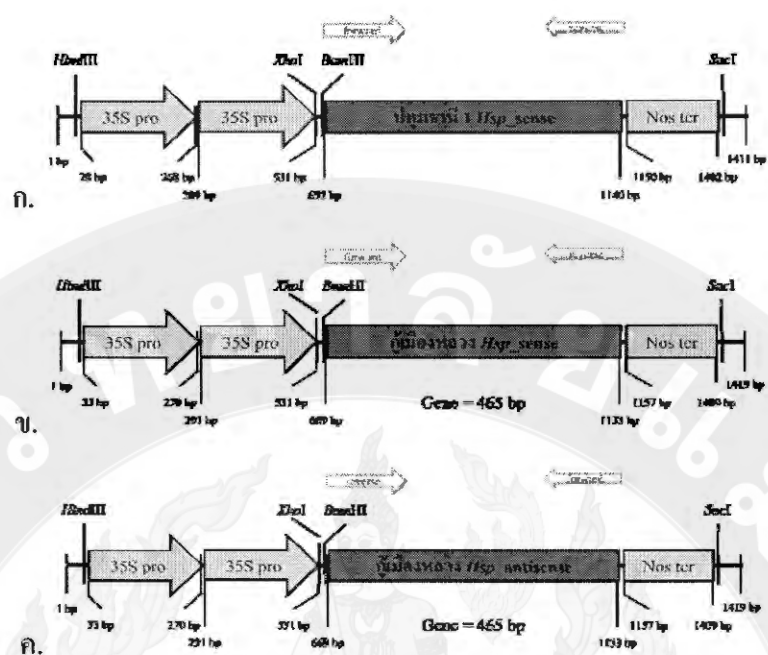
โปรตีน	OsHsfA4d- กข 6	OsHsfA4d - باسماتي	OsHsfA4d – ขาวดอกมะลิ 105	OsHsfA4d -ไทฮุง 65
OsHsfA4d-กข 6	-	99% 99%	99% 99%	92% 92%
OsHsfA4d -باسماتي	-	-	99% 99%	92% 92%
OsHsfA4d –ขาวดอกมะลิ 105	-	-	-	91% 92%

หมายเหตุ ตัวเลขบน เป็นความเหมือน ส่วนตัวเลขล่างเป็นความคล้าย

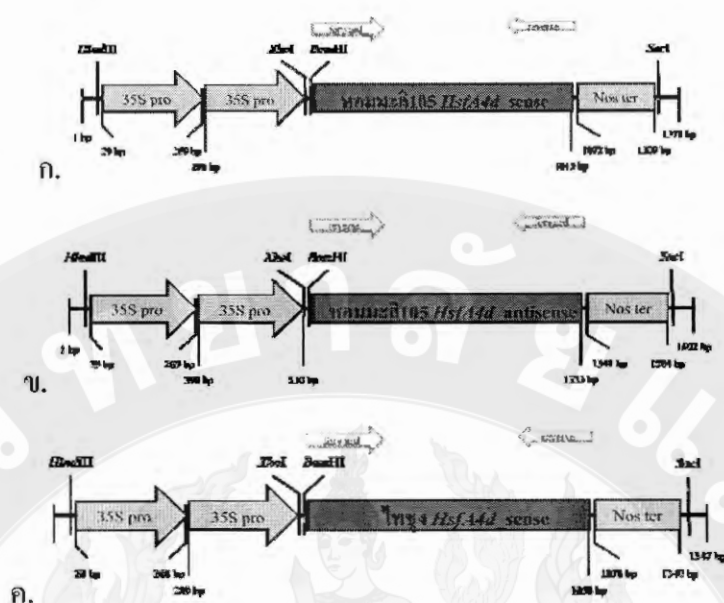
1.3 การสร้างชุดจีเอ็มเอใน pCAMBIA 1305.1

โดยการย้ายบริเวณรหัสของยีนของโปรตีนทนร้อนขนาดเล็ก (*OsHsp17*) และยีนโปรตีนควบคุมการถอดรหัส (*OsHsfA4d*) จากพลาสมิด pGEM-T easy เข้าพลาสมิด pUC19-p2CA ที่มีบริเวณโปรโมเตอร์ (CaMV35S) และบริเวณเทอร์มินเตอร์ (T nos) ซึ่งชุดยีนจะต้องมีบริเวณโปรโมเตอร์ และ บริเวณเทอร์มินเตอร์ เพื่อให้ยีนสามารถแสดงออกได้ ก่อนที่จะตัดย้ายเข้าเชื่อมต่อกับ pCAMBIA 1305.1 ที่บริเวณตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวต่อไป

โดยที่ชุดของยีนที่สร้างได้นั้นเมื่อนำเข้าสู่ pCAMBIA 1305.1 พบว่า สามารถสร้างเป็นชุดของยีนได้จาก ยีน *OsHsp17* จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และ พันธุ์กู่เมืองหลวง (ภาพที่ 8) และยีน *OsHsfA4d* จากข้าวพันธุ์ดอกมะลิ 105 และพันธุ์ไทฮุง 65 (ภาพที่ 9) โดยสามารถสร้างได้ใน 2 รูปแบบ คือ ทิศทางที่สามารถแสดงออกเป็นโปรตีนที่ต้องการ (sense) คาดว่าจะเพิ่มการแสดงออก และทิศทางสลับ (antisense) ที่คาดว่าจะสามารถยับยั้งการแสดงของยีน โดยผลการสร้างชุดของยีน และผลการถ่ายยีนของแต่ละชุดของยีนแสดงใน ตารางที่ 5



ภาพที่ 8 แผนที่ของชุดดีเอ็นเอใน pCAMBIA ที่ประกอบด้วยบริเวณรหัส (*OsHsp17*) บริเวณโปรโมเตอร์ (35S pro) และบริเวณเทอร์มินเตอร์ (Nos ter) โดยที่ ก. ยีนจากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1-sense ข. ยีนจากข้าวพันธุ์กู่เมืองหลวง-sense และ ค. ยีนจากข้าวพันธุ์กู่เมืองหลวง-antisense



ภาพที่ 9 แผนที่ของชุดดีเอ็นเอใน pCambia ที่ประกอบด้วยบริเวณรหัส (*OsHsfA4d*) บริเวณโปรโมเตอร์ (35S pro) และบริเวณเทอร์มิเนเตอร์ (Nos ter) โดยที่ ก. ยีนจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105-sense ข. ยีนจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105-antisense และ ค. ยีนจากข้าวพันธุ์ไทชุง 65-sense

ตารางที่ 5 ผลการโคลน การสร้างชุดของยีนและการถ่ายฝากยีนเข้าสู่ต้นข้าว

ชื่อยีนใน pGEM-T	พันธุ์ข้าว	ยีนที่มี 35S pro - Nos ter	ชุดยีนใน pCambia	การถ่ายยีนเข้าข้าว	พันธุ์ข้าวถ่ายยีน/จำนวนต้น
<i>OsHsp17</i>	ปทุมธานี 1	sense	sense	RM5 (ชักนำเป็นต้น)	- นิปอนบาเรย์ / 1 ต้น - ไทชุง 65 / 3 ต้น
	กุ่มเมืองหลวง	sense	sense	RM2 (ชักนำเป็นต้น)	-
		antisense	antisense	SM2 (คัดเลือก)	-
<i>OsHsfA4d</i>	ขาวดอกมะลิ 105	sense	sense	SM2 (คัดเลือก)	-
	มะลิ 105	antisense	antisense	SM2 (คัดเลือก)	-
	ไทชุง 65	sense	sense	-	-

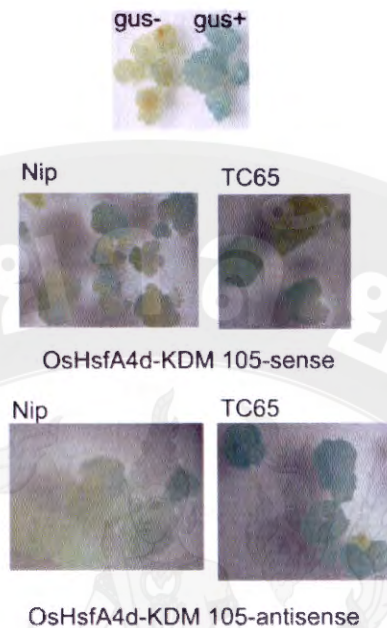
2. ผลของการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว

2.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีน โดยวิธี GUS assay

การตรวจสอบประสิทธิภาพที่การถ่ายยีน โดยการนับจำนวนแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน (ติคสีฟ้า) จากจำนวนแคลลัสที่ทำการถ่ายฝากยีนทั้งหมด (ภาพที่ 10) ชุดของยีน *OsHsp17* - ปทุมธานี 1-sense ที่ถ่ายฝากเข้าสู่ข้าว พบว่า ประสิทธิภาพที่การถ่ายยีนในข้าวพันธุ์นิปอนบาเรย์ และ ไทฮุง 65 ได้เท่ากับ 58.33 เปอร์เซ็นต์ และ 54.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนชุดของยีน *OsHsp17* - ภูเก็ตหลวง -sense ที่ถ่ายฝากเข้าสู่ข้าว พบว่า ประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์นิปอนบาเรย์ และ ไทฮุง 65 ได้เท่ากับ 73.68 เปอร์เซ็นต์ และ 76.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และชุดของยีน *OsHsp17* - ภูเก็ตหลวง -antisense ที่ถ่ายฝากเข้าสู่ข้าว พบว่า ประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์นิปอนบาเรย์ และ ไทฮุง 65 ได้เท่ากับ 94.12 เปอร์เซ็นต์ และ 71.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 10 การตรวจสอบการถ่ายยีน *OsHsp17* โดยวิธี GUS assay โดยที่แคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะมีสีขาว (gus-) ส่วนแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนจะมีสีฟ้า (gus+) ซึ่งชุดของยีน *OsHsp17* ทั้ง 3 ชุด สามารถถ่ายฝากเข้าสู่แคลลัสของข้าวพันธุ์นิปปอนบาเรย์ และไทซุง 65



ภาพที่ 11 การตรวจสอบการถ่ายยีน *OsHsfA4d* โดยวิธี GUS assay โดยที่เซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะมีสีขาว (gus-) ส่วนเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนจะมีสีฟ้า (gus+) ซึ่งชุดของยีน *OsHsfA4d* ทั้ง 2 ชุด สามารถถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ของข้าวพันธุ์นิปปอนบาเรย์และไทซุง 65

ชุดของยีน *OsHsfA4d* –ข้าวดอกมะลิ 105-sense ที่ถ่ายฝากเข้าข้าว พบว่าประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์นิปปอนบาเรย์ และ ไทซุง 65 ได้เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และ 78.95 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนชุดของยีน *OsHsfA4d* –ข้าวดอกมะลิ 105-antisense ที่ถ่ายฝากเข้าข้าว พบว่าประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์นิปปอนบาเรย์ และ ไทซุง 65 ได้เท่ากับ 82.76 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 11 และตารางที่ 6)

จากการทดลองจะเห็นพบว่าการถ่ายยีนเข้าข้าวพันธุ์นิปปอนบาเรย์และไทซุง 65 ค่อนข้างมีประสิทธิภาพสูง โดยประสิทธิภาพของการถ่ายยีน *OsHsp17* เฉลี่ยมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ประสิทธิภาพของการถ่ายยีน *OsHsfA4d* เฉลี่ยมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 6 ผลการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวตรวจสอบโดยวิธี GUS assay

ชุดของยีน	พันธุ์ข้าวที่ใช้ถ่ายยีน	จำนวนแคลลัสที่ใช้	จำนวนแคลลัสสีฟ้า	ประสิทธิภาพการถ่ายยีน (%)
OsHsp17 – ปทุมธานี1 -sense	นิปปอนบาเรย์	12	7	58.33
	ไทฮุง 65	22	12	54.54
OsHsp17- กู้เมืองหลวง-sense	นิปปอนบาเรย์	19	14	73.68
	ไทฮุง 65	17	13	76.47
OsHsp17- กู้เมืองหลวง-antisense	นิปปอนบาเรย์	17	16	94.12
	ไทฮุง 65	14	10	71.43
OsHsfA4d-ขาวดอกมะลิ105-sense	นิปปอนบาเรย์	24	24	100
	ไทฮุง 65	19	15	78.95
OsHsfA4d-ขาวดอกมะลิ105-antisense	นิปปอนบาเรย์	29	24	82.76
	ไทฮุง 65	12	12	100

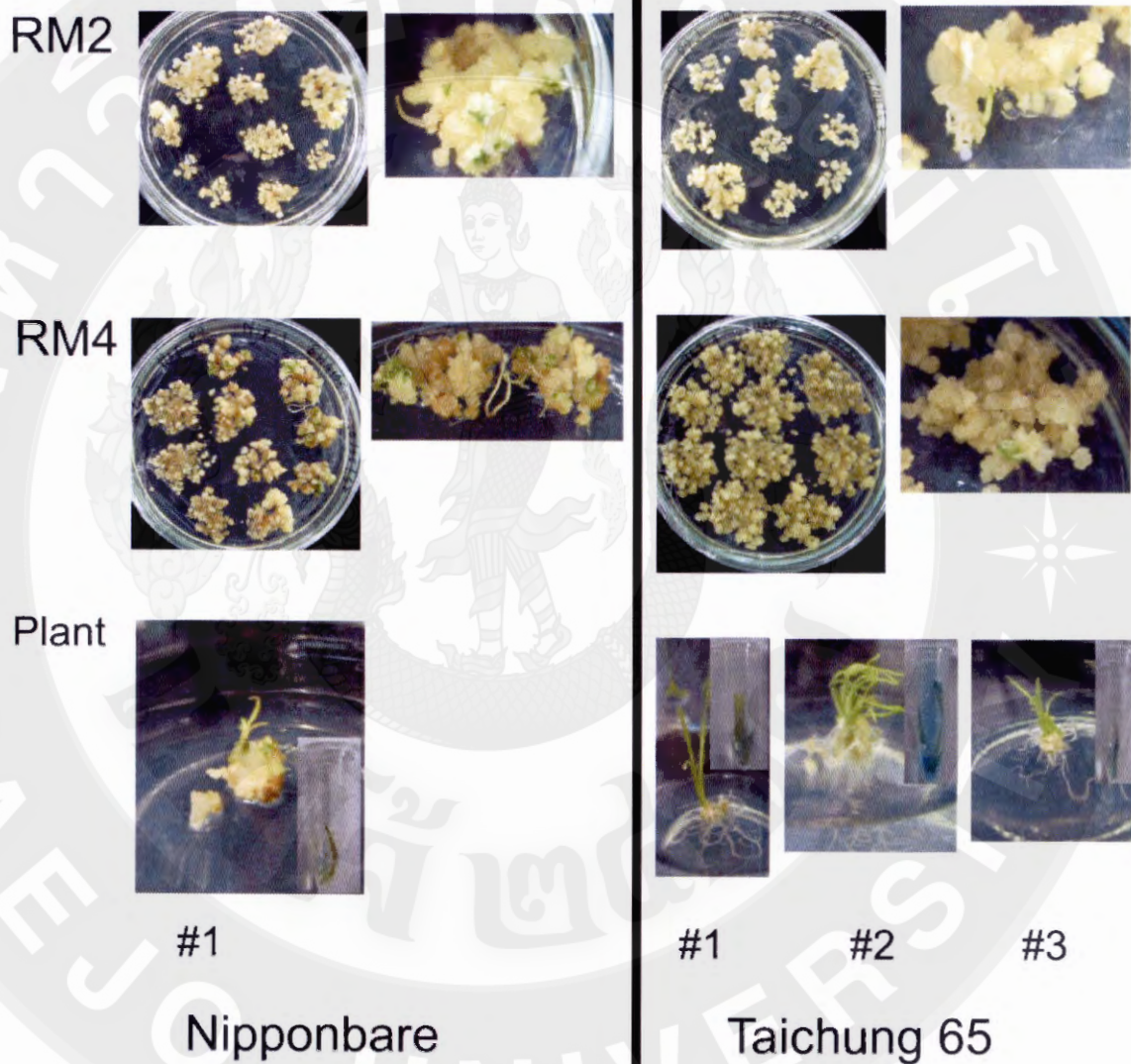
2.2 การคัดเลือกและชักนำให้เกิดต้นดัดแปลงพันธุกรรม

2.2.1 ชุดยีน *OsHsp17*-ปทุมธานี1-sense

ผลการถ่ายยีน *OsHsp17* –ปทุมธานี1-sense เข้าสู่แคลลัสข้าวสายพันธุ์นิปปอนบาเรย์ และไทฮุง 65 ซึ่งจากเลี้ยงในอาหารคัดเลือก (SM1 และ SM2) แล้วอย่างละ 2 สัปดาห์ และย้ายไปอาหารชักนำให้เกิดต้น (RM1) อีก 2 สัปดาห์ ได้เป็นแคลลัสหลังจากได้รับการถ่ายยีนประมาณ 6 สัปดาห์ ในอาหาร RM2 จะเริ่มเห็นจุดเขียว จากนั้นเพาะเลี้ยงในอาหารพร้อมทั้งย้ายอาหาร 2 ครั้ง อีกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (RM4) จะเริ่มเห็นต้น และเมื่อชักนำเป็นต้นสมบูรณ์ รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 11 สัปดาห์ โดยที่ได้เป็นต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมจากข้าวนิปปอนบาเรย์ จำนวน 1 ต้น และข้าวไทฮุง 65 จำนวน 3 ต้น ซึ่งเมื่อนำตัวอย่างใบของต้นที่ถ่ายยีนได้ไปทดสอบด้วย การทำ GUS assay พบว่า ใบของทั้ง 4 ต้นเป็นสีฟ้า ดังภาพที่ 12 แสดงให้เห็นว่าข้าวทั้ง 4 ต้นเป็นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม โดย

ที่ต้นข้าวเหล่านี้จะนำศึกษาการแสดงออกของยีนและความสามารถในการตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงต่อไป

OsHsp17-pathum thani 1-sense

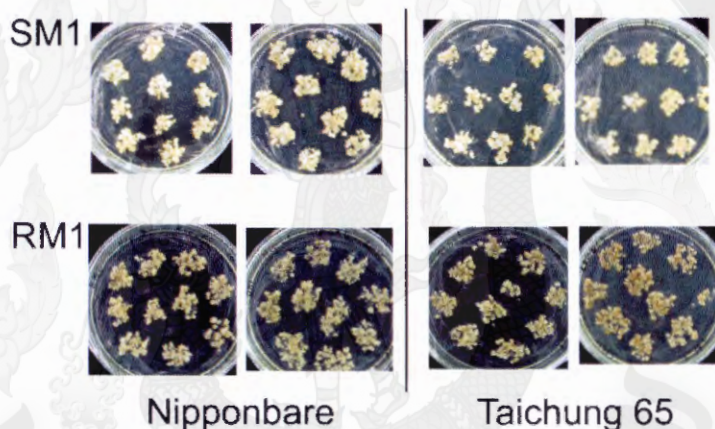


ภาพที่ 12 ผลการถ่ายยีน OsHsp17 -ปทุมธานี 1-sense เข้าข้าวสายพันธุ์นิปปอนbare และไทชุง 65 โดยแสดงการเกิดจุดเขียวในระยะชักนำให้เกิดต้น RM2 และการเกิดต้นในระยะชักนำให้เกิดต้น RM4 และต้น ที่ผลการทดสอบ GUS assay ให้ผลว่าเป็นต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม

2.2.2 ชุดยีน *OsHsp17*-กุ่มี้องหลวง-sense

ผลการถ่ายยีนยีน *OsHsp17* -กุ่มี้องหลวง-sense เข้าสู่เซลล์สข้าวสายพันธุ์นิปปอนบารีย์ และไทซุง 65 ซึ่งจากเลี้ยงในอาหารคัดเลือก (SM1 และ SM2) แล้วอย่างละ 2 สัปดาห์ และย้ายไปอาหารชักนำให้เกิดต้น (RM1) อีก 2 สัปดาห์ ดังภาพที่ 13 ขณะนี้กำลังอยู่ในขั้นตอนการชักนำให้เกิดต้น ซึ่งจะต้องใช้เวลาอีก 1 เดือนในการชักนำให้เป็นต้น และนำไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนและความสามารถในการตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงต่อไป

OsHsp17-goo meuang luang-sense



ภาพที่ 13 ผลการถ่ายยีนยีน *OsHsp17* -กุ่มี้องหลวง-sense เข้าข้าวสายพันธุ์นิปปอนบารีย์ และไทซุง 65 โดยแสดงผลการเลี้ยงในอาหารคัดเลือก SM1 และการเจริญในอาหารชักนำให้เกิดต้น RM1

ส่วนชุดของยีน *OsHsp17*- กุ่มี้องหลวง-antisense ชุด *OsHsfA4d*-ข้าวดอกมะลิ 105-sense และชุด *OsHsfA4d*-ข้าวดอกมะลิ105-antisense อยู่ในขั้นตอนการคัดเลือกบนอาหารคัดเลือก (SM2) ซึ่งจะต้องใช้เวลาอีก 1-2 เดือนในการชักนำให้เป็นต้น และนำไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนและความสามารถในการตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงต่อไป

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. การสร้างชุดของยีน พบว่าสามารถสร้างชุดของยีนได้จำนวน 6 ชุด ได้แก่ ชุดของยีน *OsHsp17* จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 แบบ sense และยีน *OsHsp17* จากข้าวพันธุ์ภูเมืองหลวง แบบ sense และ antisense และยีน *OsHsfA4d* จากข้าวพันธุ์ดอกมะลิ 105 แบบ sense และ antisense และพันธุ์ไทซุง 65 แบบ sense ซึ่งยีน *OsHsp17* และยีน *OsHsfA4d* ที่แยกได้จากข้าวไทยมีความเหมือนกันมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์
2. ยีน *OsHsp17* พบว่ามีการเพิ่มขึ้นมาของยีนที่แยกจากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และพันธุ์น้ำรุ ที่คาดว่าจะมีผลต่อการทำงานของโปรตีนที่จะแตกต่างไปจากยีนเดียวกันของข้าวพันธุ์พลาจามปราจินบุรี พันธุ์ภูเมืองหลวง ในงานวิจัยจึงเลือกสร้างข้าวตัดแปลงพันธุกรรมของยีน *OsHsp17* ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และพันธุ์ภูเมืองหลวง เพื่อศึกษาการทำงานของโปรตีนทนร้อนขนาดเล็ก
3. ยีน *OsHsfA4d* พบการขาดหายไปของยีนที่แยกได้จากข้าวอินดิกา (กข 6 ขาวดอกมะลิ 105 และ บาสมาทิ) เมื่อเปรียบเทียบกับยีนเดียวกันที่ได้จากข้าวจาโปนิกา (ไทซุง 65) ที่คาดว่าจะมีผลต่อการทำงานของโปรตีนควบคุมการถอดรหัส
4. การถ่ายยีน *OsHsp17* เข้าสู่ข้าวพันธุ์นิปอนบาเรย์และไทซุง 65 พบว่า ประสิทธิภาพการถ่ายยีนค่อนข้างสูง โดยเฉลี่ย 70 เปอร์เซ็นต์ ขณะนี้สามารถสร้างต้นที่มียีน *OsHsp17* ที่ได้จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ส่วนยีน *OsHsp17* ที่ได้จากข้าวพันธุ์ภูเมืองหลวง นั้นกำลังอยู่ในขั้นตอนการชักนำให้เป็นต้น โดยต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจะนำไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนและความสามารถในการตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงต่อไป
5. การถ่ายยีน *OsHsfA4d* เข้าสู่ข้าวพันธุ์นิปอนบาเรย์และไทซุง 65 พบว่า ประสิทธิภาพการถ่ายยีนค่อนข้างสูงมาก โดยเฉลี่ย 90 เปอร์เซ็นต์ ขณะนี้ขั้นตอนการชักนำข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *OsHsfA4d* ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้เป็นต้น โดยต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจะนำไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนและความสามารถในการตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- A. Wahid, S. Gelani, M. Ashraf and M.R. Foolad. 2007. Review article. Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany** 61(3): 199-223.
- C. Wang, Q. Zhang, and H. Shou. 2009. Identification and expression analysis of *OsHsfs* in rice. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B** 10(4): 291-300.
- D. Mittal, S. Chakrabarti, A. Sarkar, A. Singh and A. Grover. 2009. Heat shock factor gene family in rice: Genomic organization and transcript expression profiling in response to high temperature, low temperature and oxidative stresses. **Plant Physiology and Biochemistry** 47(9): 785-795.
- E. Ruelland and A. Zachowski. 2010. How plants sense temperature. **Environmental and Experimental Botany** 69(3): 225-232
- J. Guan, T. Jinn, C. Yeh, S. Feng, Y. Chen, and C. Lin. 2004. Characterization of the genomic structures and selective expression profiles of nine class I small heat shock protein genes clustered on two chromosomes in rice (*Oryza sativa* L.) **Plant Molecular Biology** 56: 795–809.
- L. Feng, K. Wang, Y. Li, Y. Tan, J. Kong, H. Li, Y. Li and Y. Zhu. 2007. Overexpression of SBPase enhances photosynthesis against high temperature stress in transgenic rice plant. **Plant Cell Rep** 26: 1635–1646.
- N. Sarkar, Y. Kim, and A. Grover. 2009. Rice sHsp genes: genomic organization and expression profiling under stress and development. **BMC Genomics** 10:393.
- N. Yokotani, T. Ichikawa, Y. Kondou, M. Matsui, H. Hirochika, M. Iwabuchi, and K. Oda. 2008. Expression of rice heat stress transcription factor OsHsfA2e enhances tolerance to environmental stresses in transgenic *Arabidopsis*. **Planta** 227: 957–967.
- Neelam K Sarkar, Yeon-Ki Kim, and Anil Grover. 2009. Rice sHsp genes: genomic organization and expression profiling under stress and development. **BMC Genomics**. 10: 393.
- S. V. K. Jagadish, R. Muthurajan, R. Oane, T. R. Wheeler, S. Heuer, J. Bennett and P. Q. Craufurd. 2010. Physiological and proteomic approaches to address heat tolerance during anthesis in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany** 61(1): 143–156.

- S. Katiyar-Agarwal, M. Agarwal and A. Grover. 2003. Heat-tolerant basmati rice engineered by over-expression of *hsp101*. **Plant Molecular Biology** 51: 677–686.
- W. Hu, G. Hu and B. Han. 2009. Genome-wide survey and expression profiling of heat shock proteins and heat shock factors revealed overlapped and stress specific response under abiotic stresses in rice. **Plant Science** 176(4): 583-590.
- X. Wu, Y. Shiroto, S. Kishitani, Y. Ito, and K. Toriyama. 2009. Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing *OsWRKY11* under the control of *HSP101* promoter. **Plant Cell Rep** 28: 21–30.
- Y. Ouyang, J. Chen, W. Xie, L. Wang, and Q. Zhang. 2009. Comprehensive sequence and expression profile analysis of Hsp20 gene family in rice. **Plant Mol Biol** 70(3): 341-57.
- Y. Sato and S. Yokoya. 2008. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. **Plant Cell Rep** 27: 329–334.



ภาคผนวก ก

ลำดับนิวคลีโอไทด์

ยีน OsHsp17-PathumThani1-2

ATGTCGCTGATCCGCCGAGCAACGTGTTGACCCCTTCTCCCTCGACCCCTGGGACCCCTTCGACGGC
 TTCCCTTCGGCTCCGGCAGAACGAGCGGCAGCATCTTCCCGTCCTTCCCCCGGGCACCTCCTCCGAG
 ACCGCGGCCTTCGCCGGCGCGGCATCGACTGGAAGGAGACGCCGGAGGCGCACGTGTTCAAGGCGGAC
 GTGCCGGGGCTGAAGAAGGAGGAGGTCAAGGTGGAGGTGGAGGACGGCAACGTCTCCAGATCAGCGGC
 GAGCGCAGCAAGGAGCAGGAGGAGAAGACGGACAAGTGGCACC CGTGGAGCGCAGCAGCGGCAAGTTC
 CTCCGCAGGTTCCGGCTGCCGGAGAACACCAAGCCGGAGCAGATCAAGGCGTCCATGGAGAACGGGGTG
 CTCACCGTCACCGTGCCCAAGGAGGAGCCCAAGAAGCCCGACGTCAAGTCCATCCAGGTTACCGGCTAG

ยีน OsHsp17-GooMeuangLuang-4

ATGTCGCTGATCCGCCGAGCAACGTGTTGACCCCTTCTCCCTCGACCTCTGGGACCCCTTCGACGGC
 TTCCCTTCGGCTCCGGCAGCGGCAGCCTCTTCCCTCGCGCCAACTCCGACGCGGCGGCCTTCGCCGGC
 GCGCGGATCGACTGGAAGGAGACGCCGAGGCGCACGTGTTCAAGGCGGACGTGCCGGGGCTGAAGAAG
 GAGGAGGTCAAGGTGGAGGTGAGGACGGCAACGTCTCCAGATCAGCGGCGAGCGCATCAAGGAGCAG
 GAGGAGAAGACGGACAAGTGGCACC CGTGGAGCGCAGCAGCGGCAAGTTCCTCCGCAGGTTCCGGCTG
 CCGGAGAACACCAAGCCGGAGCAGATCAAGGCGTCCATGGAGAACGGCGTGCTCACCGTCACCGTGCCC
 AAGGAGGAGCCCAAGAAGCCCGACGTCAAGTCCATCCAGGTTACCGGCTAG

ยีน OsHsp17-NamRoo-9

ATGTCGCTGATCCGCCGAGCAACGTGTTGACCCCTTCTCCCTCGACCTCTGGGACCCCTTCGACGGC
 TTCCCTTCGGCTCCGGCAGCAGAACGAGCGGCAGCATCTTCCCGTCCTTCCCCCGGGCACCTCCTCC
 GAGACCGCGGCCTTCGCCGGCGCGGCATCGACTGGAAGGAGACGCCGGAGGCGCACGTGTTCAAGGCG
 GACGTGCCGGGGCTGAAGAAGGAGGAGGTCAAGGTGGAGGTGGAGGACGGCAACGTCTCCAGATCAGC
 GCGAGCGCAGCAAGGAGCAGGAGGAGAAGACGGACAAGTGGCACC CGTGGAGCGCAGCAGCGGCAAG
 TTCTCCGCAGGTTCCGGCTGCCGGAGAACACCAAGCCGGAGCAGATCAAGGCGTCCATGGAGAACGGC
 GTGCTCACCGTCACCGTGCCCAAGGAGGAGCCCAAGAAGCCCGACGTCAAGTCCATCCAGGTTACCGGC
 TAG

ยีน OsHsp17-PlaiNgahmPrachinBuri-9

ATGTCGCTGATCCGCCGAGCAACGTGTTGACCCCTTCTCCCTCGACCTCTGGGACCCCTTCGACGGC
 TTCCCTTCGGCTCCGGCAGCGGCAGCCTCTTCCCTCGCGCCAACTCCGACGCGGCGGCCTTCGCCGGC
 GCGCGGATCGACTGGAAGGAGACGCCGAGGCGCACGTGTTCAAGGCGGACGTGCCGGGGCTGAAGAAG
 GAGGAGGTCAAGGTGGAGGTGAGGACGGCAACGTCTCCAGATCAGCGGCGAGCGCATCAAGGAGCAG
 GAGGAGAAGACGGACAAGTGGCACC CGTGGAGCGCAGCAGCGGCAAGTTCCTCCGCAGGTTCCGGCTG
 CCGGAGAACACCAAGCCGGAGCAGATCAAGGCGTCCATGGAGAACGGCGTGCTCACCGTCACCGTGCCC
 AAGGAGGAGCCCAAGAAGCCCGACGTCAAGTCCATCCAGGTTACCGGCTAG

ยีน Hsp จากฐานข้อมูล EU846992.1

ATGTCGATGATCCGCCGAGCAACGTGTTTCGACCCCTTCTCCCTCGACCTCTGGGACCCCTTCGACGGC
TTCCTTTCGGCTCCGGCAGCGGCAGCCTCTTCCCTCGCGCCAACTCCGACGCGGCGGCCTTCGCCGGC
GCGCGGATCGACTGGAAGGAGACGCCCCGAGGCGCACGTGTTCAAGGCGGACGTGCCGGGGCTGAAGAAG
GAGGAGGTCAAGGTGGAGGTTGAGGACGGCAACGTCTCCAGATCAGCGGCGAGCGCATCAAGGAGCAG
GAGGAGAAGACGGACAAGTGGCACCGCGTGGAGCGCAGCAGCGGCAAGTTCTCCGAGGTTCCGGCTG
CCGGAGAACACCAAGCCGGAGCAGATCAAGGCGTCCATGGAGAACGGCGTGCTACCGTCACCGTGCCC
AAGGAGGAGCCCAAGAAGCCCGACGTCAAGTCCATCCAGATCACCGGCTAG

ยีน HsfA4d_Basmati

ATGGAGAGTTCCAACCTGGGCGGCGGCGGAGGCGGCGGCGGTGGGCGCGCGCGTTCCTTGATCAAGACG
TACGAGATGGTGGAGGACGCGGCGACCAACCACGTGCTGTCGTGGGGCCCCGGCGGCGCCAGCTTCGTC
GTGTGGAACCCGCTCGACTTCTCCCGTGACCTGTTGCCAAGTACTTCAAGCACAACAACCTTCTCCAGC
TTCATCAGGCAGCTCAACACCTACGGTTTCCGAAAAATCGATCCTGAGAGATGGGAGTTTCGCAACGAG
GATTTTCATAAGAGGGCACACGCACCTTCTGAAGAACATCCATCGACGCAAGCCCGTGACAGCCACTCC
CTCCAGAACCAGATAAACGGACCACTCGCCGAATCGGAGAGGCGCGAGCTCGAAGAAGAGATCAACCGG
CTCAAGTACGAGAAGAGCATCCTCGTCGCGGACCTCCAGAGGCAGAACCAGCAGCAGTACGTGATCAAC
TGGCAGATGCAGGCGATGGAAGGCAGGCTAGTGGCGATGGAGCAACGGCAGAAGAACATCGTGGCCTCC
CTGTGCGAGATGCTGCAGAGACGCGGTGGCGCCGTGTCGAGCTCGCTGCTGGAGTCCGACCATTTTCAGC
AAGAAGAGGAGGGTCCCGAAGATGGATCTCTTCGTCGACGATTGCGCGGCGGGCGGAGAACAGAAGGTG
TTCCAGTTCCAGGGAATTGGGACGGATGCACCGGCCATGCCTCCCGTGCTTCTGTGACCAATGGTGAG
GCTTTTGACAGGGTTGAGCTGAGCCTGGTCTCCCTGGAGAACTCTTCCAGAGAGCAAATGATGCTTGC
ACAGCTGCTGAAGAAATGTACTCCCATGGTTCATGGTGGTACTGAACCCAGCACTGCTATATGTCCTGAA
GAGATGAACACTGCTCCAATGGAGACAGGCATCGATCTTCAGTTACCAGCTAGCCTCCATCCAGCTCA
CCCAACACAGGGAATGCCCATCTCCATTTATCCACTGAACTCACAGAGTCTCCAGGTTTTGTGCAGAGT
CCAGAGCTGCCAATGGCAGAGATTCTGTAAGATATCCATGTGACAAGATACCCAACACAAGCTGATGTA
AATTCTGAGATTGCCTCCTCCACTGATACTTCAAGATGGCACGTGAGAACTGAAGCTTCGCATGGA
CCGACCAACGATGTGTTTTGGGAGCGGTTCTTCACAGAGACTCCACGGTCATGTTTGGATGAGTCAGAA
AGACAAGAGTCTCCAAGGACGATGTAAAAGCAGAATTAGGCTGCAATGGCTTCCATCACCGGGAGAAG
GTTGATCAGATCACCGAGCAAATGGGGCACCTTGCTTCAGCCGAGCAGACTCTGCATACCTGA

ยีน HsfA4d Khao Dawk Mali 105

ATGGAGAGTTCCAACCTGGGCGGCGGCGGAGGCGGCGGCGGTGGGCGCGCGCGTTCCTTGATCAAGACG
TACGAGATGGTGGAGGACGCGGCGACCAACCACGTGCTGTCGTGGGGCCCCGGCGGCGCCAGCTTCGTC
GTGTGGAACCCGCTCGACTTCTCCCGTGACCTGTTGCCAAGTACTTCAAGCACAACAACCTTCTCCAGC
TTCATCAGGCAGCTCAACACCTACGGTTTCCGAAAAATCGATCCTGAGAGATGGGAGTTTCGCAACGAG
GATTTTCATAAGAGGGCACACGCACCTTCTGAAGAACATCCATCGACGCAAGCCCGTGACAGCCACTCC
CTCCAGAACCAGATAAACGGACCACTCGCCGAATCGGAGAGGCGCGAGCTCGAAGAAGAGATCAACCGG
CTCAAGTACGAGAAGAGCATCCTCGTCGCGGACCTCCAGAGGCAGAACCAGCAGCAGTACGTGATCAAC
TGGCAGATGCAGGCGATGGAAGGCAGGCTAGTGGCGATGGAGCAACGGCAGAAGAACATCGTGGCCTCC
CTGTGCGAGATGCTGCAGAGACGCGGTGGCGCCGTGTCGAGCTCGCTGCTGGAGTCCGACCATTTTCAGC
AAGAAGAGGAGGGTCCCGAAGATGGATCTCTTCGTCGACGATTGCGCGGCGGGCGAAGAACAGAAGGTG
TTCCAGTTCCAGGGAATTGGGACGGATGCACCGGCCATGCCTCCCGTGCTTCTGTGACCAATGGTGAG
GCTTTTGACAGGGTTGAGCTGAGCCTGGTCTCCCTGGAGAACTCTTCCAGAGAGCAAATGATGCTTGC
ACAGCTGCTGAAGAAATGTACTCCCATGGTTCATGGTGGTACTGAACCCAGCACTGCTATATGTCCTGAA
GAGATGAACACTGCTCCAATGGAGACAGGCATCGATCTTCAGTTACCAGCTAGCCTCCATCCAGCTCA
CCCAACACGGGGAATGCCCATCTCCATTTATCCACTGAACTCACAGAGTCTCCAGGTTTTGTGCAGAGT
CCAGAGCTGCCAATGGCAGAGATTCTGTAAGATATCCATGTGACAAGATACCCAACACAAGCTGATGTA
AATTCTGAGATTGCCTCCTCCACTGATACTTCAAGATGGCACGTGAGAACTGGAGCTTCGCATGGA
CCGACCAACGATGTGTTTTGGGAGCGGTTCTTCACAGAGACTCCACGGTCATGTTTGGATGAGTCAGAA
AGACGAGAGTCTCCAAGGACGATGTAAAAGCAGAATTAGGCTGCAATGGCTTCCATCACCGGGAGAAG
GTTGATCAGATCACCGAGCAAATGGGGCACCTTGCTTCAGCCGAGCAGACTCTGCATACCTGA

ຢູນ HsfA4d_RD6

ATGGAGAGTTCCAACCTGGGCGGCGGGCGGAGGCGGCGGCGGTGGGCGCGCGCGGTTCTTGATCAAGACG
TACGAGATGGTGGAGGACGCGGCGACCAACCACGTCTGTCTGTGGGGCCCCGGCGGGCGCCAGCTTCGTC
GTGTGGAACCCGCTCGACTTCTCCCGTGACCTGTTGCCCAAGTACTTCAAGCACAACTTCTCCAGC
TTCATCAGGCAGCTCAACACCTACGGTTTCCGAAAAATCGATCCTGAGAGATGGGAGTTTCGAAAACGAG
GATTTTCATAAGAGGGGCACACGCACCTTCTGAAGAACATCCATCGACGCAAGCCCGTGCACAGCCACTCC
CTCCAGAACCAGATAAACGGACCACTCGCCGAATCGGAGAGGCGCGAGCTCGAAGAAGAGATCAACCGG
CTCAAGTACGAGAAGAGCATCCTCGTCGCGGACCTCCAGAGGCAGAACCAGCAGCAGTACGTGATCAAC
TGGCAGATGCAGGCGATGGAAGGCAGGCTAGTGGCGATGGAGCAACGGCAGAAGAACATCGTGGCCTCC
CTGTGCGAGATGCTGCAGAGACGCGGTGGCGCCGTGTGAGCTCGCTGCTGGAGTCCGACCATTTTCAGC
AAGAAGAGGAGGGTCCCGAAGATGGATCTCTTCGTGACGATTGCGCGGCGGGCGAAGAACAGAAGGTG
TTCCAGTTCCAGGGAATTGGGACGGATGCACCGGCCATGCCTCCCGTGCTTCTGTGACCAATGGTGAG
GCTTTTGACAGGGTTGAGCTGAGCCTGGTCTCCCTGGAGAACTCTTCCAGAGAGCAAATGATGCTTGC
ACAGCTGCTGAAGAAATGTACTCCCATGGTCATGGTGGTACTGAACCCAGCACTGCTATATGTCCTGAA
GAGATGAACACTGCTCCAATGGAGACAGGCATCGATCTTCAGTTACCAGCTAGCCTCCATCCCAGCTCA
CCCAACACAGGGAATGCCCATCTCCATTTATCCACTGAACTCACAGAGTCTCCAGGTTTGTGTCAGAGT
CCAGAGCTGCCAATGGCAGAGATTCTGTGAAGATATCCATGTGACAAGATACCCAACACAAGCTGATGTA
AATTCCTGAGATTGCCTCCTCCACTGATACTTCACAAGATGGCACGTGAGAACTGAAGCTTCGCATGGA
CCGACCAACGATGTGTTTTGGGAGCGGTTCTCCTCACAGAGACTCCACGGTCATGTTTGGATGAGTCAGAA
AGACAAGAGTCTCCCAAGGACGATGTAAAAGCAGAATTAGGCTGCAATGGCTTCCATCACCAGGAGAAG
GTTGATCAGATCACCGAGCAAATGGGGCACCTTGCTTCAGCCGAGCAGACTCTGCATACCTGA

ຢູນ HsfA4d_Taichung 65

ATGGAGAGTTCCAACCTGGGCGGCGGGCGGCGGAGGCGGCGGCGGTGGGCGCGCGCGGTTCTTGATC
AAGACGTACGAGATGGTGGAGGACGCGGCGACCAACCACGTCTGTCTGTGGGGCCCCGGCGGGCGCCAGC
TTCGTCTGTGTGGAACCCGCTCGACTTCTCCCGTGACCTGTTGCCCAAGTACTTCAAGCACAACTTCT
TCCAGCTTCATCAGGCAGCTCAACACCTACGGTTTCCGAAAAATCGATCCTGAGAGATGGGAGTTTCGCA
AACGAGGATTTTCATAAGAGGGGCACACGCACCTTCTGAAGAACATCCATCGACGCAAGCCCGTGCACAGC
CACTCCCTCCAGAACCAGATAAACGGACCACTCGCCGAATCGGAGAGGCGCGAGCTCGAAGAAGAGATC
AACC GGCTCAAGTACGAGAAGAGCATCCTCGTCGCGGACCTCCAGAGGCAGAACCAGCAGCAGTACGTG
ATCAACTGGCAGATGCAGGCGATGGAAGGCAGGCTAGTGGCGATGGAGCAACGGCAGAAGAACATCGTG
GCCTCCCTGTGCGAGATGCTGCAGAGACGCGGTGGCGCCGTGTGAGCTCGCTGCTGGAGTCCGACTCA
TTTCTTAGCAAGAAGAGCGAGGGTCTCGAACAAAGATCTCTTCGTGACGATTGCGCGGCGGGGCGGA
AGAACCAGAAGGTGTTCCAGTTCCAGGGAATTGGGAACGGATGCACCCGGCCATGCCTCCCGTGCTT
CCTGTGACCAATGGTGAGGCTTTTGACAGGGTTGAGCTGAGCCTGGTCTCCCTGGAGAACTCTTCCAG
AGAGCAAATGATGCTTGACGGCTGCTGAAGAAATGTACTCCCATGGTCATGGTGGTACTGAACCCAGC
ACTGCTATATGTCCCGAAGAGATGAACACTGCTCCAATGGAGACAGGCATCGATCTTCAGTTACCAGCT
AGCCTCCATCCCAGCTCACCAACACAGGGAATGCCCATCTCCATTTATCCACTGAACTCACAGAGTCT
CCAGGTTTTGTGTCAGAGTCCAGAGCTGCCAATGGCAGAGATTCTGTGAAGATATCCATGTGACAAGATAC
CCAACACAAGCTGATGTAAATTCTGAGATTGCCTCCTCCACTGATACTTCACAAGATGGCACGTGAGAA
ACTGAAGCTTCGCATGGACCGACCAACGATGTGTTTTGGGAGCGGTTCTCCTCACAGAGACTCCACGGTCA
TGTTTGGATGGGTGAGAAAGACAAGAGTCTCCCAAGGACGATGTAAAAGCAGAATTAGGCTGCAATGGC
TTCCATCACCAGGAGAAGGTTGATCAGATCACCGAGCAAATGGGGCACCTTGCTTCAGCCGAGCAGACT
CTGCATACCTGA

ภาคผนวก ข

ลำดับกรดอะมิโน

โปรตีน OsHsp17-PathumThani1-2

MSLIRRSNVFDPFSLDPWDPFDGFPFGSGRSSGSIFPSFPRGTSSETAAAFAGARIDWKETPEAHVFKAD
VPGLKKEEVKVEVEDGNVLQISGERSKEQEEKTDKWHRVERSSGKFLRRFRLPENTKPEQIKASMENG
LTVTVPKKEEPKKPDVKSIQVTG*

โปรตีน OsHsp17-GooMeuangLuang-4

MSLIRRSNVFDPFSLDLWDPFDGFPFGSGSGSLFPRANSDAAAFAGARIDWKETPEAHVFKADVPLKK
EEVKVEVEDGNVLQISGERIKEQEEKTDKWHRVERSSGKFLRRFRLPENTKPEQIKASMENGVLTVTV
KEEPKKPDVKSIQVTG*

โปรตีน OsHsp17-NamRoo-9

MSLIRRSNVFDPFSLDLWDPFDGFPFGSGRSSGSIFPSFPRGTSSETAAAFAGARIDWKETPEAHVFKAD
DVPGLKKEEVKVEVEDGNVLQISGERSKEQEEKTDKWHRVERSSGKFLRRFRLPENTKPEQIKASME
NGVLTVTVPKKEEPKKPDVKSIQVTG*

โปรตีน OsHsp17-PlaiNgahmPrachinBuri-9

MSLIRRSNVFDPFSLDLWDPFDGFPFGSGSGSLFPRANSDAAAFAGARIDWKETPEAHVFKADVPLKK
EEVKVEVEDGNVLQISGERIKEQEEKTDKWHRVERSSGKFLRRFRLPENTKPEQIKASMENGVLTVTV
KEEPKKPDVKSIQVTG*

โปรตีน Hsp จากฐานข้อมูล EU846992.1

MSMIRRSNVFDPFSLDLWDPFDGFPFGSGSGSLFPRANSDAAAFAGARIDWKETPEAHVFKADVPLKK
EEVKVEVEDGNVLQISGERIKEQEEKTDKWHRVERSSGKFLRRFRLPENTKPEQIKASMENGVLTVTV
KEEPKKPDVKSIQVTG*

โปรตีน HsfA4d_Basmati

MESSNLGGGGGGGGPPFLIKTYEMVEDAATNHVVS_wGPGGASFVWVNPLDFSRDLLPKYFKHNNFSS
FIRQLNTYGFRKIDPERWEFANEDFIRGHTLLKNIHRRKPVHSHSLQNQINGPLAESERRELEEEINR
LKYEKSILVADLQRQNQQYVINWQMAMEGRVAMEQRQKNIVASLCEMLQRRGGAVSSSLESDFHS
KKRRVPKMDLFVDDCAAGGEQKVQFQIGIGTDAPAMPPVLPVTNGEAFDRVELSLVLEKLFQRANDAC
TAAEEMYSHGHTGTEPSTAICPEEMNTAPMETGIDLQPLASLHPSSPNTGNAHLHLSTELTESPGFVQS
PELPMAEIREDIHVTRYPTQADVNSEIASSTDTSQDGTSETEASHGPTNDVFWERFLTETPRSCLDSE
RQESPKDDVKAELGCNGFHHREKVDQITEQMGLASAEQTLHT*

โปรตีน HsfA4d Khao Dawk Mali 105

MESSNLGGGGGGGGGGPPFLIKTYEMVEDAATNHVVSWSGPGGASFVVWNPLDQSRDILLPKYFKHNNFSS
FIRQLNTYGFIRKIDPERWEFANEDFIRGHTLLKNIHRRKPVHSHSLQNQINGPLAESERRELEEEINR
LKYEKSILVADLQRQNQQQYVINWQMAMEGRLVAMEQRQKNIVASLCEMLQRRGGAVSSSLLESDFHS
KKRRVPKMDLFDVDDCAAGEEQKFQFQGGIGTDAPAMPPVLPVTNGEAFDRVELSLVSLEKLFQRANDAC
TAAEEMYSHGHHGGTEPSTAICPEEMNTAPMETGIDLQLPASLHPSSPNTGNAHLHLSTELTESPGFVQS
PELPM AEIREDIHVTRYPTQADVNSEIASSTDTSQDGTSETGASHGPTNDVFWERFLTETPRSCLEDESE
RRESPKDDVKAELGCNGFHHREKVDQITEQMGLASAEQTLHT*

โปรตีน HsfA4d_RD6

MESSNLGGGGGGGGGGPPFLIKTYEMVEDAATNHVVSWSGPGGASFVVWNPLDQSRDILLPKYFKHNNFSS
FIRQLNTYGFIRKIDPERWEFANEDFIRGHTLLKNIHRRKPVHSHSLQNQINGPLAESERRELEEEINR
LKYEKSILVADLQRQNQQQYVINWQMAMEGRLVAMEQRQKNIVASLCEMLQRRGGAVSSSLLESDFHS
KKRRVPKMDLFDVDDCAAGEEQKFQFQGGIGTDAPAMPPVLPVTNGEAFDRVELSLVSLEKLFQRANDAC
TAAEEMYSHGHHGGTEPSTAICPEEMNTAPMETGIDLQLPASLHPSSPNTGNAHLHLSTELTESPGFVQS
PELPM AEIREDIHVTRYPTQADVNSEIASSTDTSQDGTSETEASHGPTNDVFWERFLTETPRSCLEDESE
RQESPKDDVKAELGCNGFHHREKVDQITEQMGLASAEQTLHT*

โปรตีน HsfA4d_Taichung 65

MESSNLGGGGGGGGGGPPFLIKTYEMVEDAATNHVVSWSGPGGASFVVWNPLDQSRDILLPKYFKHNNF
SSFIRQLNTYGFIRKIDPERWEFANEDFIRGHTLLKNIHRRKPVHSHSLQNQINGPLAESERRELEEEI
NRLKYEKSILVADLQRQNQQQYVINWQMAMEGRLVAMEQRQKNIVASLCEMLQRRGGAVSSSLLES
FLSKKSEGPRTKISSSTIARRGGRTRRCSSSQGIGNGCTRPCLPVLPTNGEAFDRVELSLVSLEKLFQ
RANDACTAAEEMYSHGHHGGTEPSTAICPEEMNTAPMETGIDLQLPASLHPSSPNTGNAHLHLSTELTES
PGFVQSP ELPM AEIREDIHVTRYPTQADVNSEIASSTDTSQDGTSETEASHGPTNDVFWERFLTETPRS
CLDGSERQESPKDDVKAELGCNGFHHREKVDQITEQMGLASAEQTLHT*