

ผลจากโมทิฟของ *OsNUC1* ต่อการเติบโตของ *Arabidopsis thaliana* L.  
ที่ตัดแปรพันธุกรรมภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็ม

นางสาวรัฐธิภา ธนารักษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

EFFECTS OF *OsNUC1* MOTIF ON TRANSGENIC *Arabidopsis thaliana* L. GROWTH  
UNDER SALT STRESS CONDITION

Miss Ratthipha Thanaruksa

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลจากโมทิฟของ *OsNUC1* ต่อการเติบโตของ *Arabidopsis thaliana* L. ที่ตัดแปรพันธุกรรมภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็ม

โดย

นางสาวรัฐธิภา ธนารักษ์

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุมพล คุณวาสี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ยุพิน จินตภากร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร.รักษนก โคโต)

รัฐจิภา ธนารักษ์ : ผลจากโมทิฟของ *OsNUC1* ต่อการเติบโตของ *Arabidopsis thaliana* L. ที่ตัดแปรพันธุกรรมภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็ม. (EFFECTS OF *OsNUC1* MOTIF ON TRANSGENIC *Arabidopsis thaliana* L. GROWTH UNDER SALT STRESS CONDITION) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
 หลัก: รศ.ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์, 143 หน้า.

ยีนนิวคลีโอลินในข้าว (*OsNUC1*) เป็นยีนที่ตอบสนองต่อภาวะเครียดจากความเค็มซึ่งถอดรหัส/แปลรหัสให้โปรตีน *OsNUC1* ประกอบไปด้วยโดเมนบริเวณปลาย N (*N'\_OsNUC1*) ซึ่งมีโดเมน acidic-serine-rich และ bipartite nuclear localize signal (NLS) และโดเมนบริเวณปลาย C (*C'\_OsNUC1*) ประกอบด้วย RNA recognition motifs (RRMs) 2 โมทิฟ และโดเมน Glycine-Arginine-rich (GAR) งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อเปรียบเทียบบทบาทของโดเมนบริเวณปลาย N และ C ของ *OsNUC1* เมื่อถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ชนิดแสดงออกตลอดเวลา (โปรโมเตอร์ *35SCaMV*) หรือโปรโมเตอร์ชนิดที่แสดงออกเฉพาะเมื่อได้รับภาวะแล้ง (โปรโมเตอร์ *rd29A*) ที่มีต่อการเติบโตของพืชในภาวะปกติและภาวะเครียดจากความเค็ม งานวิจัยนี้เลือก *Arabidopsis thaliana* เป็นต้นแบบในการศึกษา หลังจากถ่ายยีนชุดโครงสร้างยีนเข้าสู่ต้น *Arabidopsis* คัดเลือกต้นตัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ที่ตรวจสอบแล้วว่าเป็น homozygous และมีระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ที่ต่างกันมาศึกษาเกี่ยวกับการเติบโตพบว่า ไม่ว่าจะ เป็น *full-length* cDNA หรือส่วน cDNA ที่ถอดรหัสให้ *N'\_OsNUC1* หรือส่วน cDNA ที่ถอดรหัสให้ *C'\_OsNUC1* ที่ถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ชนิดแสดงออกตลอดเวลาหรือชนิดที่แสดงออกเฉพาะเมื่อได้รับภาวะแล้งอย่างใดอย่างหนึ่งสามารถเพิ่มความยาวรากแก้วในภาวะปกติได้ มีข้อน่าสังเกตว่าไม่สามารถคัดเลือกเมล็ด  $T_1$  ของต้นตัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน *N'\_OsNUC1* แบบมีการแสดงออกของยีนตลอดเวลาบนอาหารที่เติมยาปฏิชีวนะ 4 วันหลังจากย้ายปลูกบนอาหารเพาะเลี้ยง (ภาวะปกติ) พบว่าทุกสายพันธุ์ของต้นกล้าตัดแปรพันธุกรรมอายุ 10 วันที่มียีน *N'\_OsNUC1* ถูกควบคุมโปรโมเตอร์แบบแสดงออกเฉพาะเมื่อได้รับภาวะแล้งมีน้ำหนักสดสูงกว่าต้น WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับภาวะเค็มในวันที่ 4 หลังทำการทดลองต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *N'\_OsNUC1* และโปรโมเตอร์ *rd29A* มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงกว่า wild type ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ในขณะเดียวกันไม่พบว่าการเพิ่มขึ้นของการเติบโตในต้นตัดแปรพันธุกรรมอื่นยกเว้นต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *full-length OsNUC1* แบบแสดงออกตลอดเวลาที่มีแนวโน้มให้รากแก้วที่มีความยาวเพิ่มมากขึ้นในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า *OsNUC1* มีส่วนเกี่ยวข้องในการเจริญเติบโตของพืชโดยเฉพาะกระบวนการพัฒนาของราก ทั้งนี้บริเวณปลาย N และ C ของโปรตีนต่างมีบทบาทในกระบวนการพัฒนาเช่นเดียวกัน บทบาทของโปรโมเตอร์ชนิดแสดงออกตลอดเวลาและแบบแสดงออกเฉพาะเมื่อได้รับภาวะแล้งอาจยังไม่ชัดเจนนักเมื่อพิจารณาจากการแสดงออกของยีน *full-length* และ *N'\_OsNUC1* อย่างไรก็ตามเนื่องจากไม่สามารถคัดต้นตัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน *N'\_OsNUC1* แบบแสดงออกตลอดเวลาได้ ดังนั้นโปรโมเตอร์แบบแสดงออกเฉพาะเมื่อได้รับการกระตุ้นก็น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้ศึกษาหน้าที่ของบริเวณดังกล่าว ซึ่งเป็นบริเวณที่ให้ผลการทดลองช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของพืชในภาวะเค็มได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากไม่มีหลักฐานที่ยืนยันถึงการมีอยู่ของ *N'\_OsNUC1* ในข้าว จึงเป็นไปได้ว่าความสามารถในการทนเค็มซึ่งเป็นผลของ *N'\_OsNUC1* ก็อาจไม่มีอยู่จริงในธรรมชาติ การเจริญเติบโตของพืชที่เพิ่มขึ้นระหว่างได้รับภาวะเค็มในต้นตัดแปรพันธุกรรมที่มียีน *N'\_OsNUC1* จึงอาจเป็นผลจากโดเมนอื่นที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับโครงสร้างของ *N'\_OsNUC1*

สาขาวิชา...เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อ.....  
 ปีการศึกษา...2554.....ลายมือชื่อ อ. ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

# # 5172418023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : NUCLEOLIN/ ARABIDOPSIS/ RD29A PROMOTER/ SALT STRESS

RATTHIPHA THANARUKSA : EFFECTS OF *OsNUC1* MOTIF ON TRANSGENIC *Arabidopsis thaliana* L. GROWTH UNDER SALT STRESS CONDITION. ADVISOR : ASSOC. PROF. SUPACHITRA CHADCHAWAN, Ph.D., 143 pp.

*OsNUC1* is a salt responsive gene in rice, encoding the Nucleolin1 (*OsNUC1*) protein which consists of N-terminal acidic-serine-rich domain (*N'\_OsNUC1*) with bipartite nuclear localization signal (NLS) and C-terminal domain (*C'\_OsNUC1*) with two RNA recognition motifs (RRMs) and glycine-arginine rich (GAR) region. The objective of this research is to compare the effects of N-terminal and C-terminal domains of *OsNUC1* under the constitutive (*35SCaMV* promoter) and drought inducible (*rd29A*) promoter regulation on plant growth in normal and salt stress conditions. *Arabidopsis thaliana* L. was used as a model for the investigation. The expression constructs were transferred to *Arabidopsis* and the homozygous transgenic lines with different *OsNUC1* gene expression level were selected for growth analysis. It was found that the full-length cDNA or the cDNA fragment, encoding *N'\_OsNUC1* (*N'\_OsNUC1*) or the cDNA fragment, encoding *C'\_OsNUC1* (*C'\_OsNUC1*) regulated by either constitutive or drought inducible promoter could enhance primary root elongation in normal condition. It should be noticed that the  $T_1$  seeds from transgenic lines with the constitutive expression of *N'\_OsNUC1* could not be selected on antibiotic containing medium. After normal medium refreshing for 4 days, all 10 day-old transgenic lines with drought inducible promoter regulated *N'\_OsNUC1* expression showed the significant higher level of fresh weight, when compared to the wild type, while only some transgenic lines with other constructs performed the higher fresh weight in normal condition than wild type. In salt stress condition, the transgenic lines with *N'\_OsNUC1* expression regulated with *rd29A* promoter had a higher fresh weight and dry weight after 4 days of treatment, when compared to non-transformed wild type, while the transgenic lines with other construct did not clearly show growth enhancement under salt stress condition, except that the transgenic lines with the constitutive expression of full-length *OsNUC1* tended to have the long primary root after 6 days of salt stress. These data suggested that *OsNUC1* protein functioned in both normal and salt stress condition in plant growth and development, especially in root developmental process, and both N- and C- termini of this protein play roles in the plant development. The effects of constitutive and drought inducible promoters may not be clearly seen in the regulation of full-length *OsNUC1* and *C'\_OsNUC1* gene expression. However, as the transgenic plants with the constitutive expression of *N'\_OsNUC1* could not be selected, the inducible promoter was an alternative promoter to study the function study of the particular region of the gene, which resulted in the enhancement of plant growth in salt-stress condition. Because there is no evidence of the *N'\_OsNUC1* existence in rice, the salt tolerant function of *N'\_OsNUC1* might not exist in nature. Growth enhancement during salt stress in the transgenic lines with *N'\_OsNUC1* might result from the similarity of that region of *OsNUC1* to other salt resistant genes in *Arabidopsis*.

Field of Study : ..... Biotechnology ..... Student's Signature .....

Academic Year : ..... 2011 ..... Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำสั่งสอน ข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์ในทุกด้าน ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุมพล คุณวาสี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ยุพิน จินตภากร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.รักษนก โคอโต กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ภายนอกที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ “ทุนไทยพัฒนา” โดยการสนับสนุนของรัฐบาลไทยผ่านทางสำนักงานคณะกรรมการข้าราชการพลเรือน (ก.พ.) สำหรับทุนการศึกษาต่อเพื่อทำวิจัยนี้

ขอขอบคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเพื่อสถานที่ในการทำวิจัย และขอขอบคุณ คุณศิริพร ศรีภิญโญวณิชย์ คุณธนิกานต์ อุดมชโลทร คุณธานินทร์ จันทโรชิตี คุณณัฐวดี จินตโกวิท คุณภูมิพงษ์ ชูช่วยสุวรรณ คุณหนึ่งฤทัย คณานนท์ คุณศรียรัตน์ รอดตมรงค์ คุณจักรี เหล็กกล้า คุณธนศ จิระพรประเสริฐ และสมาชิกทุกท่านในหน่วยปฏิบัติการวิจัยสิ่งแวดล้อมและสรีรวิทยาของพืช รวมถึงคณาจารย์ในภาคพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือด้านต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาเรียนและการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ วิทยานิพนธ์เล่มนี้คงจะไม่สามารถสำเร็จลงได้ ถ้าไม่ได้รับความรัก กำลังใจ การสนับสนุนและความช่วยเหลือในทุกด้านจากคุณพ่อ คุณแม่ น้องสาวและสมาชิกในครอบครัว

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร.....	5
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	16
อุปกรณ์การศึกษา.....	16
วิธีการทดลอง.....	21
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	34
4.1 สร้าง Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่มีโมทิฟของ <i>OsNUC1</i> รูปแบบต่างกัน...	34
4.2 ตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนยีนใน Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่สร้างขึ้น.....	44
4.3 ตรวจสอบการแสดงออกของชุดโครงสร้างยีนของ <i>OsNUC1</i> ในต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็ม ด้วย quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR).....	51
4.4 ผลการเติบโตของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ <i>OsNUC1</i> ที่ต่างกัน.....	54
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง.....	68
5.1 สร้าง Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่มีโมทิฟของ <i>OsNUC1</i> รูปแบบต่างกัน...	68
5.2 ตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนยีนใน Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่สร้างขึ้น.....	70
5.3 ตรวจสอบการแสดงออกของชุดโครงสร้างยีนของ <i>OsNUC1</i> ในต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็มด้วย quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR).....	72

5.4 ผลการเติบโตของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ ถอดรหัสให้โมทิฟของ <i>OsNUC1</i> ที่ต่างกัน.....	74
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	86
6.1 สร้าง Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่มีโมทิฟของ <i>OsNUC1</i> รูปแบบต่างกัน...	86
6.2 ตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนยีนใน Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่ สร้างขึ้น.....	86
6.3 ตรวจสอบการแสดงออกของชุดโครงสร้างยีนของ <i>OsNUC1</i> ในต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็มด้วย quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR).....	87
6.4 ผลการเติบโตของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ ถอดรหัสให้โมทิฟของ <i>OsNUC1</i> ที่ต่างกัน.....	87
รายการอ้างอิง.....	88
ภาคผนวก.....	98
ภาคผนวก ก.....	99
ภาคผนวก ข.....	114
ภาคผนวก ค.....	137
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	143



## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบชุดโครงสร้างยีน.....	22
4.1	จำนวนต้นกล้า Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีนในแต่ละชุดโครงสร้างยีน.....	43
4.2	จำนวนต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมรูปแบบ (I): <i>pJim19::rd29A::full-length_OsNUC1</i> ในรุ่น T <sub>1</sub> ของสายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อทดสอบด้วย $\chi^2$ .....	48
4.3	จำนวนต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมรูปแบบ (II): <i>pJim19::rd29A::N'_OsNUC1</i> ในรุ่น T <sub>1</sub> ของสายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อทดสอบด้วย $\chi^2$ .....	49
4.4	จำนวนต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมในแต่ละรุ่นที่สามารถยืนยันการถ่ายชุดโครงสร้างยีน .....	50
ข-1	ระดับการแสดงออกของยีน <i>full-length_OsNUC1</i> ใน Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (I): <i>pJim19::rd29A::full-length_OsNUC1</i> หลังจากได้รับภาวะเค็มที่เวลาต่าง ๆ (mean $\pm$ SE).....	115
ข-2	ระดับการแสดงออกของยีน <i>N'_OsNUC1</i> ใน Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (II): <i>pJim19::rd29A::N'_OsNUC1</i> หลังจากได้รับภาวะเค็มที่เวลาต่าง ๆ (mean $\pm$ SE).....	116
ข-3	น้ำหนักสดของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ OsNUC1 รูปแบบ (A) <i>rd29A::full-length_OsNUC1</i> เมื่อย้ายปลูกในภาวะปกติ (MS) และภาวะเค็ม (NaCl) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean $\pm$ SE).....	117
ข-4	น้ำหนักสดของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ OsNUC1 รูปแบบ (B) <i>rd29A::N'_OsNUC1</i> เมื่อย้ายปลูกในภาวะปกติ (MS) และภาวะเค็ม (NaCl) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean $\pm$ SE).....	121
ข-5	น้ำหนักสดของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ OsNUC1 รูปแบบ (C) <i>rd29A::C'_OsNUC1</i> เมื่อย้ายปลูกในภาวะปกติ (MS) และภาวะเค็ม (NaCl) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean $\pm$ SE).....	125
ข-6	น้ำหนักสดของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ OsNUC1 รูปแบบ (D) <i>35SCaMV::full-length_OsNUC1</i> เมื่อย้ายปลูกในภาวะปกติ (MS) และภาวะเค็ม (NaCl) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean $\pm$ SE).....	129

ตารางที่	หน้า
ข-7	น้ำหนักรากของ <i>Arabidopsis</i> ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้ โมทีฟของ <i>OsNUC1</i> รูปแบบ (E) 35SCaMV::C' <sub>OsNUC1</sub> เมื่อย้ายปลูกในภาวะ ปกติ (MS) และภาวะเค็ม (NaCl) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean ± SE) .....

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างทั่วไปของ Nucleolin หรือ Nucleolin-like protein ที่พบในสัตว์ พืช และยีสต์.....	8
3.1 ภาพจำลองแสดงการสร้างชุดโครงสร้างยีน (I): <i>pJim19::rd29A::full-length_OsNUC1</i> .....	24
3.2 ภาพจำลองแสดงการสร้างชุดโครงสร้างยีน (II): <i>pJim19::rd29A::N'_OsNUC1</i> .....	24
4.1 ชุดโครงสร้างยีน (I): <i>pJim19::full-length_OsNUC1</i> (a) และชุดโครงสร้างยีน (II): <i>pJim19::N'_OsNUC1</i> (b).....	35
4.2 ขนาดของแถบ DNA ก่อนนำมาเชื่อมต่อกันเพื่อสร้างชุดโครงสร้างยีน (I): <i>pJim19::rd29A::full-length_OsNUC1</i> บน 0.8% (w/v) agarose gel.....	37
4.3 แถบ DNA ยืนยันชิ้นส่วนโปรโมเตอร์ <i>rd29A</i> ที่ได้จาก colony ต่าง ๆ ของ <i>E. coli</i> ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (I) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR.....	38
4.4 แถบ DNA ยืนยันชิ้นส่วนยีน <i>full-length_OsNUC1</i> ที่ได้จาก colony ต่าง ๆ ของ <i>E. coli</i> ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (A) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR.....	38
4.5 ขนาดของแถบ DNA หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อยืนยันชิ้นส่วนยีน (I): <i>full-length_OsNUC1</i> และ (II): <i>N'_OsNUC1</i> .....	39
4.6 ขนาดของแถบ DNA ก่อนนำมาเชื่อมต่อกันเพื่อสร้างชุดโครงสร้างยีน (B): <i>pJim19::rd29A::N'_OsNUC1</i> บน 0.8% (w/v) agarose gel.....	39
4.7 แถบ DNA ยืนยันชิ้นส่วนยีน <i>N'_OsNUC1</i> ที่ได้จาก colony ต่าง ๆ ของ <i>E. coli</i> ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (II) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR.....	40
4.8 แถบ DNA ยืนยันชิ้นส่วนโปรโมเตอร์ <i>rd29A</i> ที่ได้จาก colony ต่าง ๆ ของ <i>E. coli</i> ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (II) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR.....	40
4.9 แถบ DNA ยืนยันชิ้นส่วนยีน <i>full-length_OsNUC1</i> จาก colony ต่าง ๆ ของ <i>A. tumefaciens</i> ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (I) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR.....	42
4.10 แถบ DNA ยืนยันชิ้นส่วนยีน <i>N'_OsNUC1</i> จาก colony ต่าง ๆ ของ <i>A. tumefaciens</i> ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (II) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR.....	42
4.11 แถบ DNA ยืนยันชิ้นส่วนยีน <i>N'_OsNUC1</i> จาก colony ต่าง ๆ ของ <i>A. tumefaciens</i> ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (III) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR.....	43

ภาพที่	หน้า	
4.12	แถบ DNA ยีนยืนขึ้นยืนในต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมรุ่น T <sub>0</sub> a) ขึ้นยืน <i>full-length_OsNUC1</i> ในต้นที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (I) b) ขึ้นยืน <i>N'_OsNUC1</i> ในต้นที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (II) c) ขึ้นยืน <i>N'_OsNUC1</i> ในต้นที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (III) .....	46
4.13	ภาพแสดงจำนวนต้น T <sub>1</sub> ของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่ต้านทานสาร ปฏิชีวนะต่อจำนวนต้นไม่ต้านทานที่มีอัตราส่วนเป็น 3:1 ตามกฎของ Mendel's...	46
4.14	ภาพแสดงต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมรูปแบบ (III): <i>pJim19::35SCaMV::</i> <i>N'_OsNUC1</i> รุ่น T <sub>1</sub> เมื่อคัดเลือกบนอาหารกึ่งแข็ง ½MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ กานามัยซิน และมีอัตราต้านทานสารปฏิชีวนะเป็นศูนย์.....	47
4.15	แถบ DNA ยีนยืนขึ้นยืนในต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมรุ่น T <sub>2</sub> a) ขึ้นยืน <i>full-length_OsNUC1</i> ในต้นที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (I) b) ขึ้นยืน <i>N'_OsNUC1</i> ในต้นที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (II) .....	47
4.16	ระดับการแสดงออกของยีน <i>full-length_OsNUC1</i> ใน Arabidopsis ดัดแปร พันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (I): <i>pJim19::rd29A::</i> <i>full-length_OsNUC1</i> หลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (bar = SE)....	53
4.17	ระดับการแสดงออกของยีน <i>N'_OsNUC1</i> ใน Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมสาย พันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (II): <i>pJim19::rd29A::N'_OsNUC1</i> หลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (bar = SE) .....	53
4.18	น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) และความยาว รากแก้ว (d) ของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรม (A): <i>rd29A::full-length_</i> <i>OsNUC1</i> เมื่อย้ายปลูกบนอาหาร MS เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE).....	58
4.19	น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) และความยาว รากแก้ว (d) ของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรม (B): <i>rd29A::N'_OsNUC1</i> เมื่อ ย้ายปลูกบนอาหาร MS เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE) .....	59
4.20	น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) และความยาว รากแก้ว (d) ของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรม (C): <i>rd29A::C'_OsNUC1</i> เมื่อ ย้ายปลูกบนอาหาร MS เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE) .....	60
4.21	น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) และความยาว รากแก้ว (d) ของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรม (D): <i>35SCaMV::full-length_</i> <i>OsNUC1</i> เมื่อย้ายปลูกบนอาหาร MS เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE) .....	61

ภาพที่	หน้า
4.22 น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) และความยาวรากแก้ว (d) ของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรม (E): <i>35SCaMV::C'_OsNUC1</i> เมื่อย้ายปลูกบนอาหาร MS เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE) .....	62
4.23 น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) ความยาวรากแก้ว (d) ของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรม (A): <i>rd29A::full-length_OsNUC1</i> เมื่อย้ายปลูกบนอาหาร MS ที่เติม NaCl 100 mM เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE) .....	63
4.24 น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) ความยาวรากแก้ว (d) ของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรม (B): <i>rd29A::N'_OsNUC1</i> เมื่อย้ายปลูกบนอาหาร MS ที่เติม NaCl 100 mM เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE) .....	64
4.25 น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) ความยาวรากแก้ว (d) ของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรม (C): <i>rd29A::C'_OsNUC1</i> เมื่อย้ายปลูกบนอาหาร MS ที่เติม NaCl 100 mM เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE) .....	65
4.26 น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) ความยาวรากแก้ว (d) ของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรม (D): <i>35SCaMV::full-length_OsNUC1</i> เมื่อย้ายปลูกบนอาหาร MS ที่เติม NaCl 100 mM เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE) .....	66
4.27 น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) ความยาวรากแก้ว (d) ของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรม (E): <i>35SCaMV::C'_OsNUC1</i> เมื่อย้ายปลูกบนอาหาร MS ที่เติม NaCl 100 mM เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE) .....	67
5.1 น้ำหนักสดของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรม (A): <i>rd29A::full-length_OsNUC1</i> (B): <i>rd29A::N'_OsNUC1</i> (C): <i>rd29A::C'_OsNUC1</i> (D): <i>35SCaMV::full-length_OsNUC1</i> และ (E): <i>35SCaMV::C'_OsNUC1</i> เมื่อย้ายปลูกบนอาหาร MS เป็นเวลา 4 วัน (bar = SE) .....	76
5.2 ความยาวรากแก้วของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรม (A): <i>rd29A::full-length_OsNUC1</i> (B): <i>rd29A::N'_OsNUC1</i> (C): <i>rd29A::C'_OsNUC1</i> (D): <i>35SCaMV::full-length_OsNUC1</i> และ (E): <i>35SCaMV::C'_OsNUC1</i> เมื่อย้ายปลูกบนอาหาร MS เป็นเวลา 6 วัน (bar = SE) .....	77

ภาพที่	หน้า	
5.3	<p>น้ำหนักสดของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรม (A): <i>rd29A::full-length_OsNUC1</i> (B): <i>rd29A::N'_OsNUC1</i> (C): <i>rd29A::C'_OsNUC1</i> (D): <i>35SCaMV::full-length_OsNUC1</i> และ (E): <i>35SCaMV::C'_OsNUC1</i> เมื่อย้ายปลูกบนอาหาร MS ที่เติม NaCl 100 mM เป็นเวลา 4 วัน (bar = SE).....</p>	84
5.4	<p>ความยาวรากแก้วของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรม (A): <i>rd29A::full-length_OsNUC1</i> (B): <i>rd29A::N'_OsNUC1</i> (C): <i>rd29A::C'_OsNUC1</i> (D): <i>35SCaMV::full-length_OsNUC1</i> และ (E): <i>35SCaMV::C'_OsNUC1</i> เมื่อย้ายปลูกบนอาหาร MS ที่เติม NaCl 100 mM เป็นเวลา 6 วัน (bar = SE) .....</p>	85
ค-1	<p>ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>full-length_OsNUC1</i> cDNA (AK103446) และ <i>C'_OsNUC1</i> cDNA (AK063918, ตัวหนา) ที่แสดงถึงตำแหน่งและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ FL_<i>OsNUC</i> และ N_<i>OsNUC</i> (ขีดเส้นใต้) ที่ใช้ในตรวจสอบชุดโครงสร้างยีน (A) และ (B) ตามลำดับ.....</p>	138
ค-2	<p>การเทียบเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (Pairwise sequence alignment) ของ colony E และ B ที่ใช้สำหรับถ่ายชุดโครงสร้างยีน (A): <i>pJim19::rd29A::full-length_OsNUC1</i> และ (B): <i>pJim19::rd29A::N'_OsNUC1</i> ตามลำดับ เข้าสู่ WT <i>Arabidopsis thaliana</i> L. ....</p>	139
ค-3	<p>ตำแหน่ง <i>cis</i>-elements ของ <i>rd29A</i> promoter ได้แก่ DRE/CRT (dehydration-reponsive/C-repeat elements) และ ABRE (ABA-responsive element) .....</p>	140
ค-4	<p>ความยาวรากแก้วของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ หลังย้ายปลูกบนอาหารกึ่งแข็ง MS (ภาวะปกติ) เป็นระยะเวลา 6 วัน.....</p>	141
ค-5	<p>ความยาวรากแก้วของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ หลังย้ายปลูกบนอาหารกึ่งแข็ง MS ที่เติม NaCl 100 mM (ภาวะเค็ม) เป็นระยะเวลา 6 วัน</p>	142

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ภาวะเค็มเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม ที่มีผลยับยั้งการเติบโตของพืช โดยส่งผลกระทบต่อลักษณะทางกายภาพต่อเนื่องไปถึงด้านชีวเคมีรวมถึงเมแทบอลิซึมของพืช พืชจึงจำเป็นต้องมีกลไกเพื่อป้องกันและปรับตัวให้สามารถดำรงชีวิตรวมทั้งช่วยลดความเสียหายเมื่อเผชิญกับภาวะเครียดจากความเค็ม ซึ่งกลไกดังกล่าวนั้นถูกควบคุมด้วยยีน

โปรตีนที่พืชสร้างขึ้นในภาวะเครียดสามารถแบ่งตามลักษณะการทำหน้าที่ได้เป็นสองกลุ่ม คือกลุ่มแรกเป็นโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อปกป้องเซลล์จากภาวะเครียดโดยตรง (functional proteins) เช่น เอนไซม์ในกระบวนการสร้างสาร osmolyte โปรตีนกลุ่ม LEA (late embryogenesis abundant) และกลุ่มที่สองเป็นโปรตีนควบคุม (regulatory proteins) ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่นซึ่งเกี่ยวข้องกับการส่งต่อสัญญาณตอบสนองต่อภาวะเครียด เช่น transcription factor และโปรตีนไคเนส (kinases) (Shinozaki *et al.*, 1998) ซึ่งผลจากการทำงานของโปรตีนเหล่านี้ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านชีวเคมี สรีรวิทยา และด้านการพัฒนาของพืช ซึ่งจะช่วยลดความเสียหายที่พืชได้รับจากภาวะเครียด รวมทั้งช่วยให้พืชทนทานต่อภาวะเครียด (stress tolerance) และให้ผลผลิตต่อไร่ได้มากขึ้น

สมพร มณีประสพสุข (2547) ศึกษาการแสดงออกของยีนในข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) ซึ่งเป็นพันธุ์ไม่ทนเค็มเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ LPT123-TC171 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ทนเค็มที่ได้จากการกลาย (mutation) ในหลอดทดลองของเนื้อเยื่อข้าวพันธุ์ LPT123 (Thikart *et al.*, 2005; Udomchalothorn *et al.*, 2009) ด้วยเทคนิค differential display พบชิ้นส่วนของยีนใหม่ *OsD1B18-18* ซึ่งมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นหลังจากได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของยีน *OsD1B18-18* กับฐานข้อมูลใน GenBank (GenBank, 1982) พบว่ายีนดังกล่าวมีความคล้ายคลึง 100% กับยีนนิวคลีโอลิน (*Nucleolin1*) หรือชื่อย่อ *OsNUC1* ในข้าว tribe japonica

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ full-length cDNA ของ *OsNUC1* ในฐานข้อมูล GenBank (GenBank, 1982) มีความยาวสองขนาดคือ ความยาว 1943 bp (accession number AK063918) และความยาว 2447 bp (accession number AK103446) เมื่อแปลรหัสจาก open reading frame ของ AK103446 จะได้โปรตีนที่ประกอบด้วย 3 โดเมน คือ

1) ส่วนปลายอะมิโน (amino-terminal domain) เป็น acidic-serine-rich region ซึ่งมี bipartite nuclear localization signal (NLS) ทำหน้าที่เป็นสัญญาณที่กำหนดให้โปรตีนเคลื่อนที่ไปยังนิวเคลียส โดยมีลักษณะการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนพื้นฐานที่แสดงความเป็น NLS จำนวนสองชุด (cluster)

2) ส่วนกลาง (central domain) ซึ่งมี RNA recognition motifs (RRMs) หรืออีกชื่อคือ RNA-binding domains (RBD) อยู่สองบริเวณ และ

3) ส่วนปลายคาร์บอกซิล (carboxyl-terminal domain) เป็นบริเวณที่มีกรดอะมิโน glycine และ arginine กระจายตัวอยู่จำนวนมาก เรียกบริเวณดังกล่าวว่า glycine-arginine-rich (GAR) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ไปยังนิวเคลียสของไรโบโซมอลโปรตีน (Ginisty *et al.*, 1999; Lischwe *et al.*, 1982)

เมื่อแปลรหัสจาก full-length cDNA ของ *OsNUC1* ที่มี accession number AK063918 พบว่าจะได้โปรตีนที่ประกอบด้วยส่วนกลางและส่วนปลายคาร์บอกซิลที่พบในการแปลรหัสของ full-length cDNA AK103446 เท่านั้น

นิวคลีโอลินเป็นโปรตีนสำคัญในยูคาริโอตที่มีหน้าที่หลากหลาย (multifunctional protein) พบมากในนิวเคลียส ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการบวกรวมแทบอไลซิมในเซลล์ โดยเฉพาะการสร้างไรโบโซมและการเคลื่อนย้ายไรโบโซมอลโปรตีน และซับยูนิตของไรโบโซมระหว่างนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม (Ginisty *et al.*, 1999; Tuteja and Tuteja, 1998) นิวคลีโอลินพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด มีรายงานว่าโปรตีน *OsNUC1* ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีขนาดแตกต่างกันเนื่องมาจากส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่ต่างชนิดกันในบริเวณปลายอะมิโน โดยเฉพาะในบริเวณ NLS ยกตัวอย่างเช่น KKGKRQAEIEIKKVSARKKQK ในถั่วลิสง KKRKSEDAEEIEDEESSNKKQK ในยีสต์ และ KRKKEMAKQAAPEAKKQK ในคน (González-Camacho and Medina, 2004; Schmidt-Zachmann and Nigg, 1993)

ดังที่กล่าวข้างต้นว่า การแสดงออกของยีนเป็นส่วนสำคัญที่นำไปสู่การสร้างโปรตีนที่จะช่วยปกป้องเซลล์จากภาวะเครียด จึงมีความพยายามที่จะศึกษาบริเวณส่วนควบคุมการแสดงออกของยีนที่เรียกว่าโปรโมเตอร์ ที่ผ่านมาการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการถ่ายยีนนิยมใช้โปรโมเตอร์ชนิดควบคุมการ



แสดงออกของยีนให้มีการแสดงออกตลอดเวลา (constitutive promoter) มาควบคุมการทำงานของยีนที่ต้องการเพิ่มประสิทธิภาพ ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่ต้องการตลอดเวลา (constitutive expression) ส่งผลช่วยเพิ่มความสามารถของพืชให้ทนต่อภาวะเครียดและให้ผลผลิตต่อไร่ได้มากขึ้น ตัวอย่างของโปรโมเตอร์ ชนิดแสดงออกตลอดเวลาที่นิยมนำมาใช้ ได้แก่ *35S cauliflower mosaic virus (35SCaMV)* promoter อย่างไรก็ตาม การแสดงออกตลอดเวลาของยีนบางยีนก็ส่งผลด้านลบต่อการเจริญเติบโตของพืชได้เช่นกัน มีงานวิจัยที่ทำการแทนที่โปรโมเตอร์ *35SCaMV* ด้วยโปรโมเตอร์แบบที่ทำงานเฉพาะเมื่อได้รับการกระตุ้นจากภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม (inducible promoter) คือ *rd29A promoter (responsive to dehydration29A)* ของ *Arabidopsis thaliana* ในการถ่ายยีน *DREB1 (dehydration-responsive element binding1)* ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม transcription factor เข้าสู่ต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) พบว่าโปรโมเตอร์ *rd29A* สามารถลดลักษณะแคระแกร็นของต้นยาสูบตัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ใช้โปรโมเตอร์ *35SCaMV* ควบคุม ส่งผลให้ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนแบบใช้โปรโมเตอร์ *rd29A* ควบคุม มีลักษณะและขนาดของต้นใกล้เคียงกับต้นสายพันธุ์ปกติ และมีความทนทานต่อภาวะเครียดจากความเค็มและแล้งได้ดีมากขึ้นเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีนแบบใช้โปรโมเตอร์ *35SCaMV* ควบคุมการแสดงออกของยีน (Kasuga *et al.*, 1999; Kasuga *et al.*, 2004)

งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจศึกษาผลการทำงานของโปรโมเตอร์ทั้งสองชนิด คือ โปรโมเตอร์ *35SCaMV* และโปรโมเตอร์ *rd29A* เมื่อนำไปควบคุมการทำงานของโมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบต่าง ๆ ภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็ม เพื่อให้ทราบว่าโมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบใดและภายใต้การทำงานของโปรโมเตอร์แบบใดทำให้พืชมีความสามารถในการทนทานต่อภาวะเครียดจากความเค็มได้ดี โดยทำการเปรียบเทียบ 3 โมทิฟของ *OsNUC1* ได้แก่ 1) บริเวณปลายอะมิโนที่มีเฉพาะ bipartite NLS (เรียกโดยย่อว่า ปลาย N หรือ N'\_OsNUC1) 2) บริเวณกลางและบริเวณปลายคาร์บอกซิล ซึ่งเป็นบริเวณเดียวกันกับที่ได้จากการถอดรหัสจาก cDNA ของ *OsNUC1* accession no. AK063918 ซึ่งมีบริเวณ RRM's และ GAR กระจายอยู่ เรียกรวมบริเวณกลางและปลายคาร์บอกซิลรวมกันว่า ปลาย C หรือ C'\_OsNUC1 และ 3) โมทิฟ ของ *OsNUC1* ที่ได้จาก cDNA ของ *OsNUC1* accession no. AK103446 ซึ่งจะถอดรหัสให้ทั้งบริเวณปลายอะมิโน บริเวณกลาง และปลายคาร์บอกซิลของ *OsNUC1* (เรียก full-length\_OsNUC1)

## บทที่ 2

### การตรวจเอกสาร

#### 1. การตอบสนองของพืชเมื่อได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม

ภาวะเค็ม (salinity) เป็นภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่มีผลกระทบโดยตรงต่อการเจริญเติบโต ทำให้ผลผลิตของพืชต่อไร่ลดลง เนื่องจากภาวะเค็มมีผลทำให้ทั้งลักษณะทางกายภาพ และกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืชเสียสมดุล ซึ่งมีสาเหตุหลัก ๆ มาจากการเกิดความเครียดออสโมติก (osmotic stress) และความเป็นพิษจากไอออน (ion toxicity) โดยที่ความเครียดออสโมติกจะทำให้รากพืชดูดน้ำได้น้อยลง เนื่องจากการสะสมของไอออนเกลือในดินทำให้ค่า water potential ของน้ำในดินลดลง พืชต้องใช้แรงดันออสโมติก (osmotic pressure) มากขึ้นในการนำน้ำมาใช้ ซึ่งส่งผลให้เซลล์พืชเกิดภาวะขาดน้ำในที่สุด นอกจากนี้การสะสมของไอออนเกลือที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อพืชได้รับภาวะเค็มเป็นเวลานาน ยังจะก่อให้เกิดความเป็นพิษจากไอออน (ion toxicity) ส่งผลกระทบต่อสมดุลไอออนภายในเซลล์พืช รวมไปถึงการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ในกระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งส่งผลกระทบต่อเป็นลูกโซ่ไปยังกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชให้ลดลง (Greenway and Munns, 1980; Zhu, 2001) ทั้งนี้ช่วงแรกที่พืชได้รับภาวะเค็มจะมีอาการและการตอบสนอง เช่นเดียวกับการได้รับภาวะแล้ง (drought stress)

เนื่องจากพืชไม่สามารถเคลื่อนที่หนีจากพื้นที่เพาะปลูกที่มีการสะสมของไอออนเกลือได้ พืชแต่ละชนิดจึงต้องมีกลไกการตอบสนองและปรับตัวต่อภาวะเค็มมาแก้ปัญหา ซึ่งกลไกที่นำมาใช้ก็จะแตกต่างกันไปตามชนิด ช่วงอายุ ระยะการเจริญเติบโตของพืช รวมไปถึงความรุนแรงของภาวะเค็มที่พืชได้รับ (Hasegawa *et al.*, 2000) ตัวอย่างการปรับตัวของพืชเมื่อได้รับภาวะเค็มจนเกิด osmotic stress เช่น การลดพื้นที่ใบ ปิดปากใบ การม้วนใบ รวมไปถึงเปลี่ยนแปลงลักษณะของใบให้มีขนที่ผิวใบหรือมีสารเคลือบผิวใบเพื่อลดการสูญเสียน้ำ (Taiz and Zeiger, 1998; Zhu, 2002)

สำหรับไอออนที่เป็นพิษซึ่งโดยมากเป็นการสะสมของโซเดียมไอออน ( $\text{Na}^+$ ) และคลอไรด์ไอออน ( $\text{Cl}^-$ ) พืชมีวิธีการปรับตัวด้วยการลดเกลือที่จะถูกนำเข้าสู่ต้นพืช โดยใช้วิธีเช่น การขจัดเกลือ (salt secretion) ผ่านทางต่อม salt glands (Flowers *et al.*, 1977) พืชบางชนิดนำเกลือออกทางใบ หรือปรับตัวให้มีลักษณะที่เรียกว่าพืชอวบน้ำ (succulence) ซึ่งเป็นการนำน้ำเข้าสู่เซลล์ส่งผลให้ความเข้มข้นของเกลือลดลง (Sobrado, 2004) หรือบางชนิดปรับตัวโดยใช้การลำเลียงไอออนที่เป็นพิษไปเก็บในแวคคูลโอล (Flowers *et al.*, 1977) ซึ่งถือเป็นการลดความเข้มข้นของไอออนเกลือในไซโทพลาซึมอีกหนึ่งวิธีเช่นกัน ทั้งนี้การสะสมไอออน  $\text{Na}^+$  ไว้ในแวคคูลโอลยังเป็นการช่วยลด osmotic potential ของเซลล์ได้อีกด้วย (Dajic, 2006) นอกจากนี้พืชยังมีกระบวนการที่เรียกว่า osmotic

adjustment มาช่วยแก้ปัญหา โดยเป็นการสะสมสาร compatible osmolyte (Hare *et al.*, 1998) ซึ่งโดยมากมักเป็นสารอินทรีย์ อย่างเช่น น้ำตาลฟรุคโตส กลูโคส หรือ กลีเซอรอล รวมไปถึงอนุพันธ์ของกรดอะมิโนอย่าง โพลีน glycine betaine ซึ่งการสะสมสารเหล่านี้จะช่วยลด water potential ในเซลล์ของพืชทำให้รากสามารถดูดน้ำได้มากขึ้นเมื่อเผชิญกับภาวะเค็ม ทั้งนี้พืชสามารถสะสม osmolyte ไว้ได้ในระดับสูงมากโดยไม่รบกวนกระบวนการชีวเคมีในเซลล์ (Nuccio *et al.*, 1999; Yokoi *et al.*, 2002)

การปรับตัวของพืชที่กล่าวมาข้างต้น เป็นผลจากการควบคุมการแสดงออกของยีนในพืชซึ่งนำไปสู่การสร้างโปรตีนที่ช่วยบรรเทาความเสียหายจากภาวะเค็ม อย่างไรก็ตามการตอบสนองและปรับตัวของพืชเกิดจากการทำงานของกระบวนการที่ซับซ้อนระหว่างยีนหลายยีน โดยเริ่มจากเมื่อพืชได้รับภาวะเค็ม จะมี receptor ตรึงบริเวณ cell membrane รับสัญญาณ (signal reception) จากนั้นจะมีการส่งต่อสัญญาณความเครียดเป็นลำดับชั้นของเครือข่ายโมเลกุลต่าง ๆ (cascades of molecular network) เรียกกระบวนการนี้ว่า signal transduction โดยมี secondary messenger เช่น  $Ca^{2+}$  หรือ reactive oxygen species (ROS) ร่วมรับส่งสัญญาณต่อไปยังนิวเคลียส และไปกระตุ้นให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะเค็มเกิดการแสดงออก (gene expression) ได้เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ช่วยให้พืชมีการปรับตัวและอยู่รอดได้ในภาวะเครียด (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997)

โปรตีนที่พืชสร้างขึ้นแบ่งตามลักษณะการทำหน้าที่ได้เป็น โปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อปกป้องเซลล์จากภาวะเครียดโดยตรง (functional protein) เช่น เอนไซม์ในกระบวนการสร้างสาร osmolyte โปรตีนกลุ่ม LEA (late embryogenesis abundant) และกลุ่มโปรตีนควบคุม (regulatory protein) ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่นซึ่งเกี่ยวข้องกับการส่งต่อสัญญาณตอบสนองต่อภาวะเครียด (signal transduction pathways) เช่น transcription factor โปรตีน kinases รวมถึงเอนไซม์เกี่ยวกับการสร้างฮอร์โมน abscisic acid (ABA) หรือ phosphoinositide (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Xiong *et al.*, 2002) ผลจากการทำงานของโปรตีนทั้ง 2 กลุ่มนี้ก่อให้เกิดความเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านชีวเคมี กายภาพ สรีรวิทยาและด้านการพัฒนา (development) ซึ่งจะช่วยให้พืชทนทานต่อความเครียด (stress tolerance) ได้มากขึ้น

งานวิจัยจำนวนมากนิยมนำยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้โปรตีนที่ทำหน้าที่อย่างใดอย่างหนึ่ง ใน 2 กลุ่มข้างต้นมาทำการ overexpression เพื่อหวังปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรม ให้ได้พืชที่สามารถทนทานต่อความเครียด สามารถให้ผลผลิตได้สูงใกล้เคียงกับพืชในภาวะปกติ

## 2. นิวคลีโอลิน

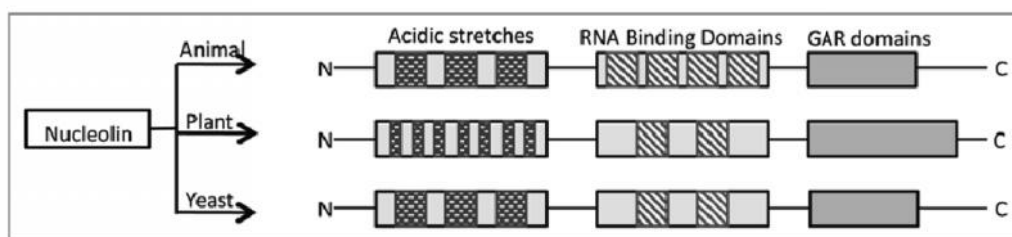
นิวคลีโอลิน (Nucleolin) เป็นฟอสโฟโปรตีน (phosphoprotein) ที่กระจายตัวอยู่ในนิวคลีโอลัส (nucleolus) นิวเคลียสรวมถึงในนิวคลีโอพลาสซึม (nucleoplasm) เป็นจำนวนมาก ในไซโตพลาสซึมพบเพียงส่วนน้อยเท่านั้น (Medina *et al.*, 2010; Srivastava and Pollard, 1999) บทบาทที่สำคัญของ Nucleolin คือ การสร้างไรโบโซมและ rRNA โดยเฉพาะกระบวนการ pre-rRNA ซึ่ง Nucleolin จะเข้าไปมีส่วนร่วมตั้งแต่ขั้นตอนการตัดบริเวณ 5' ETS (external transcribed spacer) ของ rRNA นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของไรโบโซมอลีน อย่าง RNA polymerase (Pol) I และ rDNA repeat รวมถึงช่วยในกระบวนการ splicing ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนรูป (formation) ของ mRNA รวมถึงเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายไรโบโซมอลโปรตีนและซับยูนิตระหว่างนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม (Borer *et al.*, 1989; Ginisty *et al.*, 1998; Tuteja and Tuteja, 1998)

Nucleolin เป็นนิวคลีโอลาร์โปรตีนที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลากหลายกลุ่ม ตั้งแต่ในยีสต์จนถึงสัตว์มีกระดูกสันหลัง จากการวิเคราะห์ phylogeny tree ทำให้ทราบว่ายีนที่แปรรหัสให้โปรตีน Nucleolin ถูกพบตั้งแต่ในบรรพบุรุษของยูคาริโอต (ancestor eukaryotic) Nucleolin จึงถือเป็นโปรตีนที่ถูกอนุรักษ์ไว้ตั้งแต่ในช่วงแรกของวิวัฒนาการหรืออีกนัยหนึ่งคือ มีการเปลี่ยนแปลงตลอดวิวัฒนาการที่น้อยมาก (González-Camacho and Medina, 2004) Nucleolin ถูกกล่าวถึงครั้งแรกในช่วงปี 1970 โดยเป็นการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน C23 ในเซลล์มะเร็งตับ (Novikoff hepatoma cells) และในรังไข่ของจีนีสแฮมสเตอร์ (Chinese hamster ovary; CHO) ชื่อ C23 ได้มาจากตำแหน่งบน Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (Orrick *et al.*, 1973) ในช่วงปลายของทศวรรษที่ 80 เริ่มมีรายงานถึง Nucleolin รวมถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Nucleolin ในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพิ่มมากขึ้น เช่น หนู (*Mus musculus*) ไก่ (*Gallus gallus*) และคน (*Homo sapiens*) หลังจากนั้นจึงเริ่มมีรายงานวิจัยถึง Nucleolin ในพืช เช่น alfalfa (*Medicago sativa*) pea (*Pisum sativum*) Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) และยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) (González-Camacho and Medina, 2004) โดยโปรตีนที่พบในพืชบางชนิด ที่มีเพียงลักษณะโครงสร้างและหน้าที่ในกระบวนการสร้างไรโบโซมใกล้เคียงกับ Nucleolin แต่มีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างจาก Nucleolin ที่พบในสัตว์ จะถูกเรียกว่า “Nucleolin-like protein”

เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของทั้ง Nucleolin และ Nucleolin-like protein พบว่าโครงสร้างโดยทั่วไปของโปรตีนจะมีลักษณะจำเพาะร่วมกัน โดยเป็นการเรียงต่อกันด้วยลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันของโดเมน (domain) จำนวน 3 โดเมน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มสิ่งมีชีวิต

สัตว์ พืช และยีสต์พบว่า โครงสร้างของ Nucleolin ในแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันที่จำนวนของ โหมดิฟในแต่ละโดเมน (ภาพที่ 2.1) โดยทั่วไปโดเมนทั้งสามประกอบด้วย

- 1) โดเมนส่วนปลายอะมิโน: มีกรดอะมิโน serine ในลักษณะ acidic stretches กระจายตัวอยู่
- 2) โดเมนส่วนกลาง: มี RNA-binding domains (RBD) หรืออีกชื่อคือ RNA recognition motifs (RRMs) โดยมีจำนวนโหมดิฟอยู่ระหว่าง 2-4 โหมดิฟแตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด
- 3) โดเมนส่วนปลายคาร์บอกซิล: มีกรดอะมิโน glycine และ arginine จำนวนมาก เรียกบริเวณดังกล่าวว่า glycine-arginine-rich หรือ GAR domain (Ginisty *et al.*, 1999; Lischwe *et al.*, 1982) ซึ่งจากลักษณะที่แตกต่างกันอย่างมาของทั้ง 3 โดเมนนี้เองที่ส่งผลถึงหน้าที่ที่หลากหลายและทำให้ Nucleolin มีบทบาทสำคัญในหลายกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ จนกลายเป็น multifunctional protein ที่สำคัญของยูคาริโอต



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทั่วไปของ Nucleolin หรือ Nucleolin-like protein ที่พบในสัตว์ พืช และยีสต์ (Tajrishi *et al.*, 2011)

### โดเมนส่วนปลายอะมิโน (N-terminal หรือ amino-terminal domain)

ส่วนปลายอะมิโนประกอบไปด้วย acidic stretches หรือ acidic/serine ซึ่งจะเรียงตัวเป็น ลักษณะซ้ำ (repeat) กระจายอยู่ทั่วบริเวณ โดยที่จำนวนซ้ำของ acidic/serine จะแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ Nucleolin ในสัตว์ เช่น หนู ไก่ หรือคนพบว่ามีจำนวนซ้ำ 4 ซ้ำ ในขณะที่ Nucleolin-like protein ในพืชจะมีจำนวนซ้ำมากกว่าแต่มีความยาวของลำดับกรดอะมิโนที่สั้นกว่า เช่น pea และ Arabidopsis มี 7 ซ้ำ ส่วน alfalfa มีถึง 9 ซ้ำ (González-Camacho and Medina, 2004; Srivastava and Pollard, 1999) นอกเหนือจากที่พบการกระจายตัวของ acidic/serine แล้ว ในบริเวณนี้ยังมีตำแหน่งที่สามารถเกิดปฏิกิริยา phosphorylation โดยการทำงานของโปรตีน casein kinase 2 (CK2) และโปรตีน cyclin dependent kinase 1 (CDK1) แทรกอยู่ด้วยเป็นจำนวนมาก (Mongelard and Bouvet, 2007) ส่งผลให้ Nucleolin เป็นโปรตีนที่มีอัตราการถูกฟอสโฟริเลตสูง รวมถึงการทำงานของ CK2 มักเกิดขึ้นในระยะ interphase ส่งผลให้ปฏิกิริยา phosphorylation ที่เกิดขึ้นนั้นเป็นตัวกำหนดและควบคุมการทำงานของ Nucleolin ที่เกิดขึ้นในช่วง cell cycle ไปโดย

ปริยาย (Ginisty *et al.*, 1999; Peter *et al.*, 1990) นอกจากนี้ ในบริเวณฝั่ง downstream ของ ส่วนปลายอะมิโนยังพบลำดับกรดอะมิโนที่มีลักษณะจำเพาะซึ่งเรียกว่า bipartite nuclear localization signal (NLS) ทำหน้าที่เป็นสัญญาณกำหนดให้โปรตีนเคลื่อนที่ไปยังนิวเคลียส อย่างไรก็ตามงานวิจัยของ Schmidt-Zachmann และ Nigg (1993) ที่ทำการทดลองให้บริเวณ NLS ของ Nucleolin ในไก่ (chicken nucleolin) กลายพันธุ์และถ่ายยีนเข้าสู่ HeLa cell หลังจากใช้ indirect immunofluorescence microscopy ตรวจสอบกลับไม่พบ consensus signal sequence สำหรับนำ Nucleolin ไปยังนิวเคลียส อย่างไรก็ตามงานวิจัยจึงสรุปว่าการสะสมของ Nucleolin ในบริเวณนิวเคลียสน่าจะเป็นผลมาจากการจับอย่างจำเพาะของ Nucleolin กับส่วนประกอบอื่น ๆ ของนิวเคลียสอย่างเช่น rDNA rRNA และโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ nucleolar matrix

NLS ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนสายสั้นเพียง 4 ตำแหน่ง เรียงตัวเป็น 2 ชุด โดยมีลำดับกรดอะมิโนอื่นคั่นกลาง ระยะห่างระหว่าง 2 ชุดของลำดับกรดอะมิโนสายสั้นนี้จะแตกต่างกันสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด สำหรับในพืชอย่าง alfalfa *Arabidopsis* ถั่วลิสงเตาและยาสูบจะมี NLS ที่คล้ายคลึงกัน และค่อนข้างอนุรักษ์ (conserved) คือ มีลำดับกรดอะมิโนชุดแรกเป็น KK GK และถัดไปอีก 12 - 13 ตำแหน่งเป็นกรดอะมิโนชุดที่สองที่เรียงตัวกันเป็น KK QK ในขณะที่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อย่างหนูแฮมสเตอร์และคนจะมีลำดับกรดอะมิโนเป็น KR KK และ KK QK นอกจากนี้ตำแหน่งของ NLS ในพืชและสัตว์ยังมีความแตกต่างกันอีกด้วย โดยในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม NLS จะเชื่อมอยู่ตรงกลางระหว่างโดเมนส่วนปลายอะมิโนและโดเมนส่วนกลาง ในขณะที่ NLS ในพืชจะอยู่ส่วน downstream หรือตรงตำแหน่งเริ่มต้นของโดเมนส่วนปลายอะมิโน (González-Camacho and Medina, 2004) ความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนในบริเวณนี้ ส่งผลให้มวลโมเลกุลของ Nucleolin แตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ ส่วนมาก Nucleolin จะมีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 100 – 110 kDa มีเพียงในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเท่านั้นที่คาดว่าจะมีน้ำหนักประมาณ 77 kDa (Lapeyre *et al.*, 1987) โดเมนส่วนปลายอะมิโนเกี่ยวข้องกับกระบวนการถอดรหัสของ rDNA (transcription) โดยจะทำหน้าที่เข้าจับกับ histone H1 และ rDNA repeat ตรงบริเวณที่ไม่ถูกถอดรหัส (Tajrishi *et al.*, 2011)

### โดเมนส่วนกลาง (central domain)

โดเมนส่วนกลางประกอบด้วย consensus RNA-binding domains (CS-RBD) หรืออีกชื่อคือ RNA recognition motifs (RRMs) ถูกอนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด Nucleolin ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมี RRM 4 โมทิฟ ในขณะที่ในพืชและยีสต์ซึ่งเป็น Nucleolin-like protein มีเพียง 2 โมทิฟ Nucleolin มีส่วนร่วมในกระบวนการ pre-rRNA โดยการเข้าจับกับโครงสร้าง stem-loop ของ RNA ผ่านทาง RRM (Ginisty *et al.*, 1998) Allain และคณะ (2000) ได้อธิบายเพิ่มเติมถึงการทำงานดังกล่าว โดยใช้ NMR spectroscopy ศึกษาโครงสร้างของ RRM ทั้งสองโมทิฟที่พบในพืช (RRM1

และ RRM2) พบว่า RRM2 จะเข้าจับกับ RNA ในลักษณะหนีบให้ RNA อยู่ตรงกลางซึ่งจะทำให้บริเวณปลาย 5' และ 3' ของลำดับ UCCCCG ซึ่งเป็นบริเวณจำเพาะของ RNA สามารถฟอร์มรูปร่างเป็น stem-loop ได้ ซึ่งทางผู้วิจัยได้เสนอแนะว่าหน้าที่ดังกล่าวของ Nucleolin ถือเป็นความช่วยเหลือป้องกันการเปลี่ยนรูปที่ไม่เหมาะสมของ pre-rRNA

### โดเมนส่วนปลายคาร์บอกซิล (C-terminal หรือ carboxyl-terminal domain)

เป็นบริเวณที่มีกรดอะมิโน glycine และ arginine กระจายตัวอยู่จำนวนมาก เรียกบริเวณดังกล่าวว่า glycine-arginine-rich (GAR) หรือ RGG ซึ่งย่อมาจาก Arg-Gly-Gly กรดอะมิโนในบริเวณนี้มีโครงสร้างที่เป็นลักษณะจำเพาะคือโมเลกุลรูปวงแหวน (aromatic ring) ความยาวและลำดับกรดอะมิโนของโดเมนส่วนปลายคาร์บอกซิล มีความแตกต่างจากโดเมนส่วนกลางและส่วนปลายอะมิโนเนื่องจากไม่ถูกอนุรักษ์ในระหว่างชนิด โดยในพืชจะมีความยาวมากกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Bögge *et al.*, 1996) GAR เกี่ยวข้องกับกระบวนการ heterogeneous RNA packaging และมีบทบาทอย่างมากในกระบวนการ interaction ระหว่างโปรตีน โดยเข้าจับกับ histone H1 U3 snoRNP (small nucleolar ribonucleoprotein) และไรโบโซมอลโปรตีน (Ginisty *et al.*, 1998) ในโปรตีนที่มีโดเมนส่วนปลายคาร์บอกซิลเป็นส่วนประกอบ มักจะมีโดเมนที่มี RBD ร่วมอยู่ด้วย โดย RBD จะจับกับ telomerase ซึ่งแสดงผลถึง subcellular localization (Khurts *et al.*, 2004) นอกจากนี้มีรายงานเพิ่มเติมว่า GAR ช่วยเพิ่มความสามารถในการเข้าจับระหว่าง RBD ใน Nucleolin กับเป้าหมายที่อยู่ใน complex RNA ทั้งยังมีส่วนช่วย destabilize บริเวณ rRNA/rRNA helical ใน rRNA ทำให้บริเวณนี้สามารถถูกจดจำจากโดเมนส่วนกลาง (RRMs) ของ Nucleolin ได้ (Ghisolfi *et al.*, 1992)

### 3. โปรโมเตอร์เป็นกุญแจสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีน

การแสดงออกของยีน เป็นส่วนที่สำคัญที่สุดที่ทำให้เกิดความหลากหลายทางฟีโนไทป์ของสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ ทั้งที่เซลล์ทุกเซลล์ของสิ่งมีชีวิตก็มีข้อมูลทางพันธุกรรม (genetic information) ที่เหมือนกัน แต่การแสดงออกของยีนต่าง ๆ ในแต่ละเซลล์อาจแตกต่างกัน ในเซลล์หนึ่ง ๆ บางยีนมีการแสดงออก ในขณะที่บางยีนไม่มีการแสดงออก ซึ่งแตกต่างกันไปตามแต่ว่าอยู่ในอวัยวะใดหรือช่วงเวลาใดในวัฏจักรชีวิตของสิ่งมีชีวิต รูปแบบของการแสดงออกของยีนที่ต่างกันนำไปสู่การสร้างโปรตีนที่ต่างกัน ส่งผลถึงลักษณะภายนอกของสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน โปรโมเตอร์จึงเป็นเหมือน switch ปิด-เปิดระดับโมเลกุลสำหรับควบคุมการแสดงออกของยีนที่ต้องการ ให้มีหรือไม่มีการแสดงออกของยีนได้ตามต้องการ การศึกษาถึงองค์ประกอบต่าง ๆ ของโปรโมเตอร์จะเป็นตัวช่วยเพิ่มโอกาสในการ

ควบคุมการทำงานของยีนให้มากขึ้นรวมถึงเพิ่มความเป็นไปได้ในการปรับแต่งการแสดงออกของยีนในงานพันธุวิศวกรรม (Barcelo *et al.*, 2001; Yoshida, 2000)

ในระดับ DNA แบ่งยีนของพืชได้เป็นสามบริเวณ คือ บริเวณส่วนควบคุม (regulatory region) บริเวณที่มีการแสดงออกของยีน (structural region) และบริเวณที่เป็นส่วน terminator ซึ่งมี poly-A signal อยู่ในบริเวณปลายสุดของยีน โดยบริเวณแรกที่เป็นส่วนควบคุมจะเป็นที่อยู่ของโปรโมเตอร์อยู่บริเวณฝั่ง 5' end ของยีน โดยจะมีบริเวณที่เรียกว่า CAAT และ TATA-box (core promoter) ซึ่งเป็นบริเวณที่เอนไซม์ RNA polymerase II รวมถึงโปรตีน TATA binding protein (TBP) เข้าจับ ทำให้เกิดการ transcription ของยีน (Smale and Kadonaga, 2003) ห่างจาก TATA-box ขึ้นไปทางบริเวณเหนือ (upstream) มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะสายสั้นที่เรียก cis-element ซึ่งจะมีส่วน binding sites สำหรับจับจำเพาะกับโมเลกุลอื่นที่อาจจะเป็นโปรตีนหรือลำดับ DNA ก็ได้เรียกโมเลกุลเหล่านั้นว่า *trans-acting factors* ส่วนใหญ่มักเป็นพวก transcription factors โดยที่ transcription factors เองมีบริเวณของ DNA-binding domains (DBDs) อย่างน้อย 1-2 บริเวณ เพื่อใช้จับกับสาย DNA ของ cis-element การจับกันของ transcription factors กับ cis-element นี้ก็จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของ RNA polymerase อาจจะนำไปสู่การลดการแสดงออกของยีน (repression of transcription) หรือเพิ่มความสามารถในการแสดงออกของยีน (activation of transcription) ก็ได้ ซึ่งจะนำไปสู่การสังเคราะห์โปรตีนต่อไป (White, 2007)

โปรโมเตอร์พืชที่นิยมนำมาใช้ในงานด้านพันธุวิศวกรรม แบ่งได้เป็นสี่กลุ่ม (Yoshida, 2000) คือ

1.) Constitutive promoter (high-level expression systems) เป็นโปรโมเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อ ทุกการพัฒนา มีการแสดงออกตลอดเวลาและเป็นอิสระไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อมหรือแม้แต่ช่วงการพัฒนาของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนข้ามชนิดรวมถึงข้ามอาณาจักรได้อีกด้วย ที่นิยมนำมาใช้กันก็เช่น โปรโมเตอร์ 35S ของ *Cauliflower Mosaic Virus (35SCaMV)* โปรโมเตอร์ *actin 1* จากข้าว (*Oryza sativa*) หรือ *ubiquitin* จากข้าวโพด (*Zea mays*) โดยมากมักนำมาใช้เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนที่ควบคุมลักษณะบางอย่างที่เป็นประโยชน์เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนให้มีลักษณะดีตามต้องการ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากต้องใช้พลังงานมากเป็นพิเศษในการควบคุมการแสดงออกของยีนให้สูงอยู่ตลอดเวลา constitutive promoter จึงอาจก่อให้เกิดผลเสียต่อพืชได้เช่นกัน ไม่ว่าจะเป็นชะลอการเจริญเติบโต ให้ต้นลักษณะแคระแกร็น รวมทั้งทำให้ผลผลิตน้อยกว่าปกติ

2.) Tissue-specific หรือ development-stage-specific promoter เป็นโปรโมเตอร์ซึ่งควบคุมการทำงานของยีนในเนื้อเยื่อที่จำเพาะหรือในช่วงการพัฒนาที่จำเพาะ เช่น ทำงานเฉพาะ



บริเวณเนื้อเยื่อที่มีการสังเคราะห์แสงหรือเฉพาะในเมล็ดเท่านั้น โพรโมเตอร์ในกลุ่มนี้จะควบคุมการทำงานของยีนในสิ่งมีชีวิตกลุ่มใกล้เคียงกันได้ดีมาก โดยเฉพาะถ้าเป็นกลุ่มที่มี homologous promoter เหมือนกันซึ่งก็ได้แก่ โพรโมเตอร์ของยีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน จากกลุ่มยีน (gene family) เดียวกัน

3.) Inducible promoter เป็นโพรโมเตอร์ที่ไม่ได้ถูกควบคุมจากกระบวนการภายใน แต่จะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมรวมถึงการถูกกระตุ้นจาก stimuli ที่มาจากภายนอก โดยมาก stimuli ที่จะได้แก่พวกภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสง อุณหภูมิ การเกิดแผลจากแมลง รวมไปถึงสารประกอบทางเคมีบางตัวหรือโลหะหนัก โพรโมเตอร์ในกลุ่มนี้มักมีลักษณะเด่น 2 ประการคือ มีระดับการแสดงออกก่อนได้รับการกระตุ้นที่ค่อนข้างต่ำ และจะมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นที่จำเพาะ ที่นิยมใช้กันก็เช่น โพรโมเตอร์ *PR-1a* (pathogenesis-related protein) ที่ได้จากยาสูบ โพรโมเตอร์ *rd29A* (responsive to desiccation 29A) ซึ่งได้มาจาก *Arabidopsis* โพรโมเตอร์กลุ่มนี้มักนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนต่อภาวะเครียด พืชตัดแปรพันธุกรรมจำพวก super drought-tolerant หรือ super salt-tolerant มักได้มาจากโพรโมเตอร์ประเภทนี้เช่นเดียวกัน

4.) Synthetic promoter เป็นโพรโมเตอร์ที่ถูกสร้างขึ้นจากส่วนประกอบเบื้องต้นของโพรโมเตอร์หลาย ๆ ตัวแล้วแต่ว่าต้องการจะนำไปใช้ควบคุมการทำงานของยีนใด เช่น TATA box transcription start site และ CCAAT consensus sequence โดยออกแบบเชื่อมกับบริเวณซ้ำ (multiple repeats) หรือส่วนควบคุม เช่น *cis*-motifs Transcription factor-binding sites ของยีนที่ต้องการศึกษา (Roa-Rodríguez, 2007: online) นิยมนำมาใช้เพื่อควบคุมการถอดรหัสของยีนในสถานะที่จำเพาะ เช่น Pathogen-inducible promoter อย่าง GCC-like elements (Ohme-Takagi *et al.*, 2000)

#### 4. โพรโมเตอร์ *rd29A* ในการควบคุมการแสดงออกของยีน

โพรโมเตอร์ *rd29A* มีที่มาจากงานวิจัยของ Yamaguchi-shinozaki และคณะ (1992) ซึ่งเป็นงานวิจัยแรกที่โคลนและศึกษาการแสดงออกของยีน *RD29* (Responsive to Desiccation 29 หรือ *rd29*) ใน *Arabidopsis* ด้วยวิธี Northern blot และพบว่ายีน *rd29* มีการแสดงออกเมื่อได้รับภาวะเครียดจากภาวะขาดน้ำ (desiccation) โดยจะแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดที่ 2 ระยะเวลา ได้แก่ ที่เวลา 20 นาทีแรกเมื่อได้รับภาวะขาดน้ำซึ่งผู้วิจัยเรียกช่วงนี้ว่าเป็น early induction และที่เวลา 3 ชั่วโมงหลังจากขาดน้ำซึ่งเรียกว่า secondary induction นอกเหนือจากภาวะเครียดจากการขาดน้ำแล้ว Yamaguchi-Shinozaki และ Shinozaki (1993) ได้รายงานว่ภาวะ

เครียดทางกายภาพอื่น ๆ เช่น ภาวะเครียดจากความเย็นที่ 4 องศาเซลเซียส หรือจากความเค็มสูง (high-salt condition) เมื่อได้รับ NaCl 250 mM และการได้รับ ABA 100  $\mu$ M จากภายนอกก็ทำให้ *rd29* มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน ในงานวิจัยดังกล่าวยังพบว่า *rd29* แบ่งได้เป็น *rd29A* และ *rd29B* ซึ่งจะมีการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับภาวะเครียดทางกายภาพที่แตกต่างกัน อย่างที่กล่าวในข้างต้นว่า ในภาวะขาดน้ำ *rd29A* จะมีการแสดงออกของยีนแบ่งเป็น 2 ระยะที่ 20 นาทีและที่เวลา 3 ชั่วโมง *rd29B* มีลักษณะต่างออกไปเนื่องจากจะเริ่มมีการแสดงออกของยีนก็ต่อเมื่ออยู่ในภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 5 ชั่วโมง สำหรับภาวะเครียดจากการได้รับ ABA จากภายนอกทั้ง *rd29A* และ *rd29B* เริ่มมีการแสดงออกของยีนในระหว่างชั่วโมงที่ 2-5 โดย *rd29A* จะมีระดับการแสดงออกของยีนมากกว่า *rd29B* ถึง 10 เท่าในชั่วโมงที่ 10 หลังจากได้รับ ABA

จากผลการทดลอง northern blot ผู้วิจัยได้สรุปว่า *rd29A* มี cis-acting element อย่างน้อย 2 รูปแบบที่ต่างกันอย่างสิ้นเชิง รูปแบบแรกมีการแสดงออกอย่างรวดเร็ว เกิดขึ้นได้ทันทีหลังจากได้รับภาวะเครียดที่เป็นภาวะขาดน้ำและไม่ตอบสนองต่อ ABA (ABA-independent induction by water deficiency) รูปแบบที่สองเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อ ABA (ABA-responsive induction) ซึ่งแตกต่างจากรูปแบบแรกตรงที่ต้องใช้ระยะเวลาอันนานจึงจะเริ่มทำงาน สำหรับ *rd29B* ที่มีการแสดงออกของยีนช้า (ที่ 3 ชั่วโมง) ถือว่ามี cis-acting element รูปแบบที่สองเท่านั้น ซึ่งในภายหลังกลุ่มผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์โปรโมเตอร์ของยีนทั้งสอง ด้วยการลบบางบริเวณของโปรโมเตอร์ (deletion analysis of promoter) และค้นพบว่า cis-acting element รูปแบบแรกคือ DRE (dehydration-responsive elements) โดยมี core sequence เป็น A/GCCGAC ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการตอบสนองอย่างรวดเร็วของยีน (early induction) และรูปแบบที่สอง คือ ABRE (ABA-responsive element) ซึ่งรับผิดชอบกับตอบสนองแบบช้าของยีน (slow/ secondary induction) โดยในโปรโมเตอร์ *rd29B* จะมีเพียงบริเวณที่ลำดับเบสคล้ายคลึงกับ ABRE (ABRE-like sequence) จำนวน 2 บริเวณ ABRE มีลำดับเบสที่จำเพาะเป็น PyACGTGGC (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994) ซึ่งในภายหลังค้นพบว่า โปรโมเตอร์ *rd29B* ทำงานตอบสนองต่อ ABA เท่านั้น เนื่องจากมี ABRE ถึง 3 บริเวณและมี DRE เพียง 1 บริเวณ (Nakashima *et al.*, 2006)

ชนิดของ cis-element ที่คล้ายคลึงกัน ทำให้โปรโมเตอร์ของทั้งยีน *rd29A* และ *rd29B* มีความเหมือนกัน (identical) สูงถึง 60.93% (Jia *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตาม โปรโมเตอร์ทั้งสองมักถูกเลือกไปใช้ในงาน osmotic stress ที่แตกต่างกัน โดยโปรโมเตอร์ *rd29A* มักถูกเลือกไปใช้ในงานที่เกี่ยวข้องกับภาวะแล้งและอุณหภูมิต่ำ ในขณะที่โปรโมเตอร์ *rd29B* จะถูกนำไปใช้กับภาวะเครียดที่ทำงานผ่าน ABA และภาวะเค็ม (Msanne *et al.*, 2011) ทั้งนี้โปรโมเตอร์ *rd29A* ทำงานได้ดีทั้งใน ABA-dependent และ ABA-independent pathway ช่วงสิบกว่าปีที่ผ่านมางานวิจัยส่วนมากนิยมใช้ inducible promoter อย่างโปรโมเตอร์ *rd29A* มาทำหน้าที่ในการควบคุมให้มีการแสดงออกของยีน

ที่ต้องการปรับปรุง (เพื่อให้ทนต่อภาวะเครียด) แทนการใช้โปรโมเตอร์ 35SCaMV เพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบด้านลบของ constitutive promoter ที่ถึงแม้จะทำให้ได้พืชที่ทนต่อภาวะเครียดแต่ก็จะมีลักษณะ (phenotype) ที่ไม่พึงปรารถนาบางประการเพิ่มมาด้วย (Hong *et al.*, 2006; Kasuga *et al.*, 1999; Kasuga *et al.*, 2004; Pellegrineschi *et al.*, 2004)

## 5. การสร้างพืชตัดแปรพันธุกรรม

การถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรียแกรมลบ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นหนึ่งในวิธีที่นิยมใช้กันมากในการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยใช้หลักการทางธรรมชาติที่ *A. tumefaciens* ก่อให้เกิดโรคปุ่มปม (crown gall tumor) มาช่วยในการถ่ายยีนที่สามารถแทรกยีนเป้าหมายเข้าไปในจีโนมของพืชที่ใช้เป็น เซลล์เจ้าบ้าน ทั้งนี้เนื่องจาก *A. tumefaciens* สามารถส่ง DNA บางส่วนที่เรียกว่า transferred DNA (T-DNA) ขนาดประมาณ 10-20 kb ซึ่งถอดรหัสให้ยีนกลุ่ม oncogenes เข้าสู่จีโนมของพืชได้ ทำให้เซลล์พืชเกิดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ไม่จำกัด ให้ลักษณะปุ่มปมที่ไม่สามารถพัฒนาต่อเป็นยอดหรือรากได้ ขึ้น T-DNA ดังกล่าวแทรกอยู่ในพลาสมิด Ti (tumor-inducing) โดยมียีนจำพวก *vir* (*virulence*) และยีนที่สร้าง opine catabolism ซึ่งเป็นแหล่งอาหารรวมอยู่ในพลาสมิด Ti ด้วย โดยเรียงตัวในลักษณะ *cis* กับ T-DNA นอกจากนี้บริเวณด้านซ้ายและขวาของ T-DNA ยังขนานข้างด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ๆ ข้างละประมาณ 25 bp เรียก left (LB) และ right border (RB) ทั้งสองบริเวณดังกล่าวจะถูกส่งเข้าสู่จีโนมของเซลล์เจ้าบ้านพร้อมกับ T-DNA (Komori *et al.*, 2007; Tzfira and Citovsky, 2006)

หลักการถ่ายยีนทำได้โดยการแทนที่ตำแหน่งของ T-DNA ด้วยยีนที่ต้องการศึกษา โดยการเปลี่ยนแปลงพลาสมิด Ti ให้ยังคงความสามารถในการส่ง T-DNA เข้าสู่เซลล์ของพืชได้เช่นเดิม (ยีนที่ต้องการศึกษาก็จะถูกส่งเข้าไปพร้อมกัน) แต่ไม่ก่อโรค ที่ผ่านมามีการพัฒนาาระบบที่เรียกว่า binary vector system ขึ้นมาช่วยให้การถ่ายยีนด้วย *A. tumefaciens* สะดวกมากขึ้น ทำงานได้ทั้งใน *E. coli* และ *A. tumefaciens* โดยใช้หลักการแบ่งพลาสมิด Ti ให้เป็นพลาสมิด 2 วง ที่มีลักษณะเป็น autonomously-replicating โดยที่พลาสมิดทั้ง 2 วงยังคงอยู่ในเซลล์ของ *Agrobacterium* เซลล์เดียวกัน พลาสมิดวงแรกเรียก autonomous vector หรือ backbone sequences เป็นพลาสมิดที่ทำกรแทนที่ T-DNA ตามธรรมชาติของ *A. tumefaciens* ด้วยยีนที่ต้องการศึกษาพร้อมด้วย promoter และ terminator ทั้งนี้ยังมีการเพิ่มยีนที่ใช้เป็น selectable marker เข้าไปด้วยเพื่อใช้ในการคัดเลือก พลาสมิดวงที่สอง (helper plasmid หรือ disarmed Ti plasmid) เป็นพลาสมิดที่มี *vir* gene ซึ่งจำเป็นต่อการส่ง T-DNA เข้าสู่เซลล์พืช (Lee and Gelvin, 2008)

สายพันธุ์ของ *A. tumefaciens* ที่เป็นระบบ binary vector ที่นิยมใช้มีหลายสายพันธุ์ ยกตัวอย่างเช่น GV3101 [pPM6000; pTd33] ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ตัดแปรพันธุกรรมมาจากสายพันธุ์

## บทที่ 3

### วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### พืชทดลอง

1. เมล็ด *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* L.) ecotype Columbia ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ให้ชื่อย่อ wild-type หรือ WT)
2. เมล็ด *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* L.) ecotype Columbia สายพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน *Central and C-terminal OsNUC1* (*C'\_OsNUC1*) ที่ถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์แบบแสดงออกตลอดเวลา *35SCaMV* (*35SCaMV::C'\_OsNUC1*) 2 สายพันธุ์ คือ ox\_3.2 และ ox\_3.7 และแบบที่ถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์แบบแสดงออกเมื่อได้รับสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม (*rd29A::C'\_OsNUC1*) 3 สายพันธุ์ คือ rd\_3.9 rd\_3.10 และ rd\_3.13 (Siriporn Sripinyowanich, 2010)

#### สถานที่ปลูกพืชทดลอง

ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 22 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ความเข้มแสง  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  โดยมีความยาวช่วงแสง 16 ชั่วโมง/วัน (16/8 L/D cycle)

ห้องปลูกพืชควบคุมอุณหภูมิ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 22 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ความเข้มแสง  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  โดยมีความยาวช่วงแสง 16 ชั่วโมง/วัน (16/8 L/D cycle) เปิดไฟระดับสูง (100%)

#### อุปกรณ์การศึกษา

##### 1. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดพลาสมิด DNA

- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง -20 และ -80 องศาเซลเซียส
- หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (LabTech, USA)
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (Mettler, Germany)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) (Universal 32R Hettich, Germany)

- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (microcentrifuge) (Sorvall Biofuge Pico, Germany)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Agilent Technology, USA) และ cuvette
- ขวดรูปชมพู่ 25 มิลลิลิตร
- เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) (Labnet, USA)

## 2. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด genomic DNA และ RNA

- อะลูมิเนียมฟอยล์
- ตู้แช่สำหรับเก็บตัวอย่าง -20 และ -80 องศาเซลเซียส
- หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- แท่งบด (grinder)
- โกร่งบดพร้อมที่บด
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (LabTech, USA)
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (Mettler, Germany)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (microcentrifuge) (Sorvall Biofuge Pico, Germany)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) (Universal 32R Hettich, Germany)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) และ cuvette
- เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) (Labnet, USA)

## 3. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการ cloning

- หลอด PCR microcentrifuge ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (Axygen Scientific, Inc., USA)
- หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- PTC-100 TM programmable thermal controller (MJ research, USA)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Agilent Technology, USA) และ cuvette
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (LabTech, USA)
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (Mettler, Germany)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (microcentrifuge) (Sorvall Biofuge Pico, Germany)

#### 4. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

- iCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง (dry bath incubator) (MD-01N-220, Taiwan)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (microcentrifuge) (Sorvall Biofuge Pico, Germany)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) (Universal 32R Hettich, Germany)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Agilent Technology, USA) และ cuvette
- เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) (Labnet, USA)
- 96-well plate (Bio-Rad, USA)
- ตู้แช่สำหรับเก็บตัวอย่าง -20 และ -80 องศาเซลเซียส

#### 5. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ใน electrophoresis

- ชุดแยกกรดนิวคลีอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ (MiniRun GE-100, Hangzhou BIOER Technology Co., Ltd., China)
- เครื่องกำเนิดแสง UV และบันทึกภาพเจล (Gel Doc™ 2000, Bio-Rad, USA)
- เต้าไมโครเวฟ

#### 6. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูก Arabidopsis

- กระบะพลาสติก 50 x 100 ตารางเซนติเมตร
- กระถางกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร
- Petri dish เส้นผ่านศูนย์กลาง 88 มิลลิเมตร
- หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- วัสดุปลูก perlite vermiculite และ peatmoss

#### 7. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในศึกษาผลของภาวะเครียดจากความเค็มที่มีต่อการเติบโตของ Arabidopsis

- Petri dish เส้นผ่านศูนย์กลาง 88 มิลลิเมตร
- กล้องถ่ายรูป
- อะลูมิเนียมฟอยล์
- เครื่องชั่งอย่างละเอียดทศนิยม 3 และ 4 ตำแหน่ง
- ตู้อบตัวอย่างพืช (hot air oven) (Binder, Germany)

## สารเคมี

### 1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิด DNA

- 3M sodium acetate (Sigma-Aldrich Co., USA)
- Absolute ethanol (Merck, Germany)
- Phenol:Chloroform (1:1) (v/v)
- RNase A (Sigma-Aldrich Co., USA)
- Solution I (ภาคผนวก ก)
- Solution II (ภาคผนวก ก)
- Solution III (ภาคผนวก ก)
- Sodium acetate ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) (Sigma-Aldrich Co., USA)

### 2. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด genomic DNA และ RNA ของ Arabidopsis

- CTAB buffer (ภาคผนวก ก)
- RNA extraction buffer (ภาคผนวก ก)
- Absolute ethanol (Roche, Switzerland)
- Sodium acetate ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) (Sigma-Aldrich Co., USA)
- Chloroform (Merck, Germany)
- 2- mercaptoethanol (Merck, Germany)
- Liquid nitrogen
- Phenol:Chloroform (1:1) (v/v)
- Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (25:24:1) (v/v)
- Ethyl alcohol
- Lithium chloride (Sigma-Aldrich Co., USA)
- Diethyl pyrocarbonate (DEPC) (Sigma-Aldrich Co., USA)
- TE buffer (ภาคผนวก ก)

### 3. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

- 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Roche, Switzerland)
- Oligo(dT)15 (Promega, USA)
- Sodium acetate (Sigma-Aldrich Co., USA)
- Absolute ethanol (Merck, Germany)

- RQ1 RNase-free *DNase*I (Takara Bio Inc., Japan)
- MMLV reverse Transcriptase (Promega, USA)
- iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Super Mix (Bio-Rad, USA)

#### 4. สารเคมีที่ใช้ใน cloning และ bacterial transformation

- LB medium (ภาคผนวก ก)
- Antibiotic: Ampicillin (Meiji, Thailand), Kanamycin (Meiji, Thailand), Rifampicin (Siam Bheasach, Thailand), Gentamycin (Meiji, Thailand)
- Calcium chloride (Merck, Germany)
- Restriction enzyme (*Hind*III, *Xba*I และ *Sac*I, New England Biolabs, USA)
- T4 DNA *ligase* (Takara Bio Inc., Japan)
- Ultra Clean<sup>TM</sup> 15 DNA purification Kit (MO BIO Laboratories, Inc., USA)
- Absolute ethanol (Merck, Germany)
- Sodium acetate (CH<sub>3</sub>COONa) (Sigma-Aldrich Co., USA)
- Glycerol (Ajax Finechem Pty Ltd., Australia)

#### 5. สารเคมีที่ใช้ใน electrophoresis

- TBE buffer (ภาคผนวก ก)
- DNA loading dye (ภาคผนวก ก)
- RNA loading dye (ภาคผนวก ก)
- Agarose (Research Organics, USA)
- DNA marker (GeneRuler<sup>TM</sup> 1 kB DNA ladder, Fermentas, USA)
- Ethidium bromide (Gibco BRL, USA)

#### 6. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาผลของภาวะเครียดจากความเค็มที่มีต่อการเติบโตของ *Arabidopsis*

- Clorox<sup>®</sup> (Clorox company, Spain)
- Murashige and Skoog (MS) (ภาคผนวก ก)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co., USA)
- Sucrose (Sigma-Aldrich Co., USA)
- 1.5% agar
- Sodium chloride (Merck, Germany)



## วิธีการทดลอง

### 1. สร้าง Arabidopsis ตัดแปรพันธุกรรมที่มีโมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบต่างกัน

สร้าง Arabidopsis ตัดแปรพันธุกรรมที่มีโมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบต่างกันจำนวน 3 รูปแบบ ได้แก่ (I): ชุดโครงสร้างยีนที่ถอดรหัสให้ full-length ของ *OsNUC1* ที่ควบคุมด้วยโปรโมเตอร์

*rd29A* (*pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1*)

(II): ชุดโครงสร้างยีนที่ถอดรหัสให้ปลาย N ของ *OsNUC1* ที่ควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *rd29A*

(*pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1*)

(III): ชุดโครงสร้างยีนที่ถอดรหัสให้ปลาย N ของ *OsNUC1* ที่ควบคุมด้วยโปรโมเตอร์

*35SCaMV* (*pJim19::35SCaMV::N'\_OsNUC1*)

1.1 สร้างชุดโครงสร้างยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* และ (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1*

การสร้างชุดโครงสร้างยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1*

1.1.1 นำโคลน (1) *full-length\_OsNUC1* (accession no. AK103446) ที่ถูกสร้างโดย ธนิกานต์ อุดมชโลทร (unpublished data) ซึ่งอยู่ใน TOPO®vector (Invitrogen) โคลน (2) *pJim19::35SCaMV::C'\_OsNUC1* ในเวกเตอร์ *pJim19* และโคลน (3) โปรโมเตอร์ *rd29A* (ภาคผนวก ค) ที่อยู่ใน pGEM®-T easy vector (Siriporn Sripinyowanich, 2010) มาสกัดแยกพลาสมิด DNA ด้วยวิธี small-scale preparation of plasmid DNA lysis by alkali (Sambrook *et al.*, 1989) หลังจากนั้นทำการตัดพลาสมิด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) *HindIII* *SaCI* และ *XbaI* (ภาคผนวก ก และภาพที่ 3.1)

1.1.2 แยกแถบ DNA ตามขนาดด้วย electrophoresis ในแนวระนาบ โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 0.8% (w/v) ในสารละลาย 0.5X TBE และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร จากนั้นย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 5-10 µg/ml เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที แล้วนำไปตรวจสอบด้วยแสง UV และบันทึกภาพ

1.1.3 สกัด DNA fragments ทั้งสามชิ้น คือ ชิ้นส่วน *full-length\_OsNUC1* (ได้จากโคลน (1)) ชิ้นส่วนเวกเตอร์ *pJim19* (ได้จากโคลน (2)) และชิ้นส่วนโปรโมเตอร์ *rd29A* (ได้จากโคลน (3)) ออกจาก agarose gel โดยใช้ Ultra Clean™ 15 DNA purification Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ ตรวจสอบ

ปริมาณและความถูกต้องของขนาดของแถบ DNA ด้วย electrophoresis เช่นเดียว กับวิธีการในข้อ 1.1.2

- 1.1.4 นำชิ้นส่วน DNA ทั้งสามชิ้นส่วนมาเชื่อมต่อเข้าด้วยกัน โดยใช้ T4 DNA ligase (Takara) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ ได้เป็นชุดโครงสร้างยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* (ภาพที่ 3.1) โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้น DNA ของเวกเตอร์ต่อ DNA ของชิ้นส่วนยีนต่อ DNA ของโปรโมเตอร์ (vector:promoter:insert molar ratio) เป็น 1:8:8 โดยมีปริมาณ DNA ของเวกเตอร์เท่ากับ 50 µg/µl
- 1.1.5 โคลนชุดโครงสร้างยีน (I) จากข้อ 1.1.4 เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี heat shock (ภาคผนวก ก) คัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนซึ่งเป็น single colony บนอาหารกึ่งแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 mg/L (เพื่อคัดเลือกเวกเตอร์ *pJim19* ซึ่งมี kanamycin resistance marker) มาตรวจสอบชิ้นส่วน DNA ของ *full-length\_OsNUC1* ด้วยวิธี colony PCR (ภาคผนวก ก) โดยใช้ไพรเมอร์ FL\_OsNUC (F) และ FL\_OsNUC (R) และใช้ไพรเมอร์ rd29A (F) และ rd29A (R) สำหรับตรวจสอบชิ้นส่วนโปรโมเตอร์ *rd29A* จากนั้นนำ colony ที่ให้ผลของ colony PCR เป็นบวกซึ่งแสดงถึงการแทรกตัวของชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการในเซลล์ของ *E. coli* ไปทดลองตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อยืนยันชิ้นส่วน DNA อีกครั้ง ก่อนจะนำ colony ดังกล่าว ไปบ่มเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ทำการสกัดแยกพลาสมิด DNA ตามวิธีข้อ 1.1.1 ก่อนส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ รายละเอียดของไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 3.1

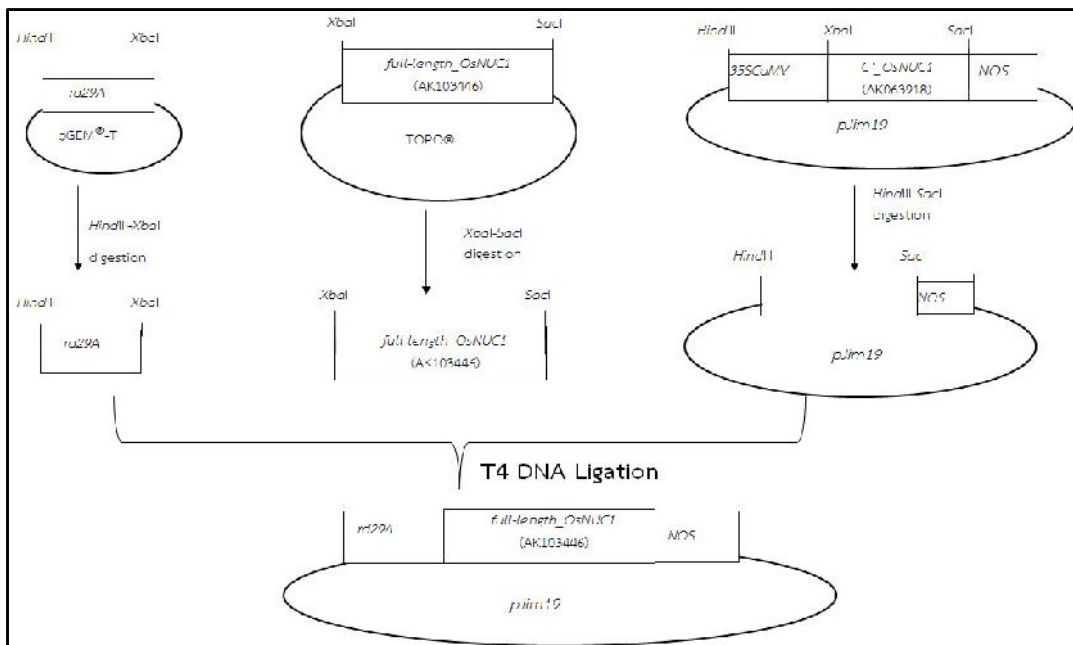
ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบชุดโครงสร้างยีน

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	อุณหภูมิ annealing (°C)	ขนาดของ DNA ที่ได้ (bp)
FL_OsNUC (F)	5'-GGCTCTAGACGCTTCCTCGTTTGGAAATTA-3'	56	2324
FL_OsNUC (R)	5'-CCTGAGCTCTCGGGCAAATTTACCAACAC-3'		(≈2400)
rd29A (F)	5'-AAGCTTCCCGACCGACTACTAA-3'	53	357
rd29A (R)	5'-TCTAGAGGCGTCTTCCATG-3'		(≈400)
N_OsNUC (F)	5'-GGCTCTAGACGCTTCCTCGTTTGGAAATTA-3'	55	1360
N_OsNUC (R)	5'-AATGAGCTCCGAACCAACTCACACAGCAG-3'		(≈1400)

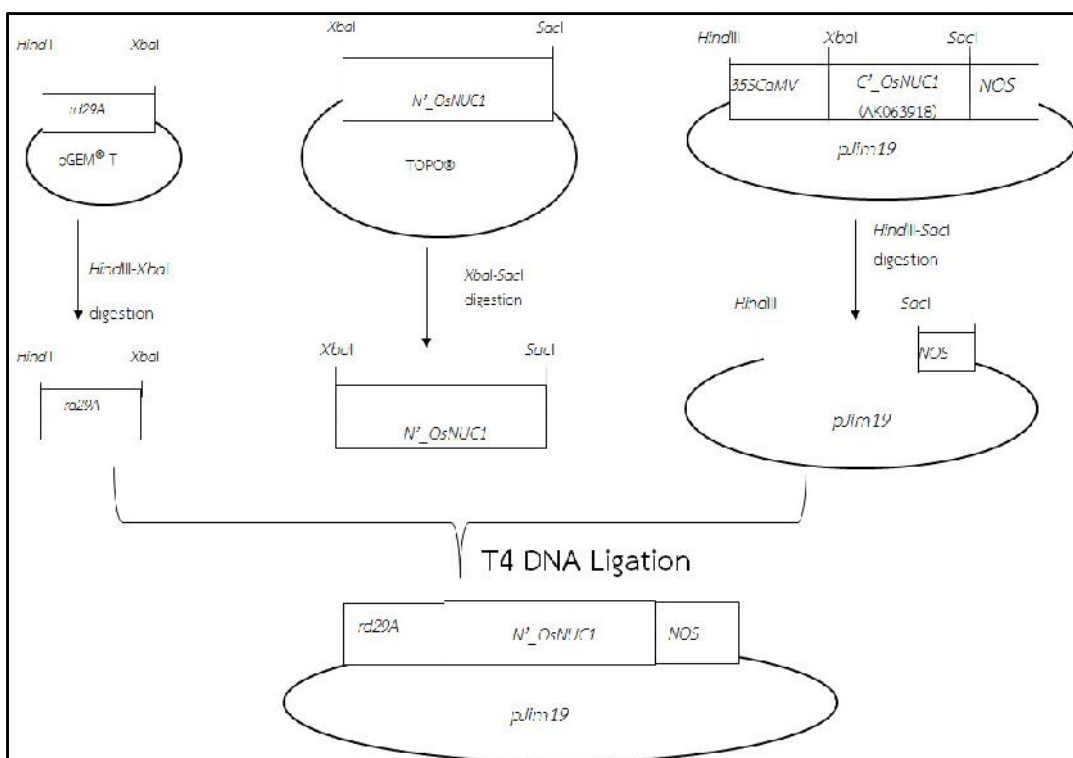
- 1.1.6 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน DNA ที่ได้จากข้อ 1.1.5 ด้วย ABI Sequencing 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystem) โดยใช้บริการของ AIT biotech (Singapore) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลใน GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) คัดเลือกโคลนที่ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรโมเตอร์ *rd29A* (accession no. EF090409) และของ full-length cDNA ของ *OsNUC1* ในข้าวสายพันธุ์ *japonica* (accession no. AK103446) มาทำการทดลองต่อ
- 1.1.7 นำพลาสมิด DNA จากข้อ 1.1.6 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้อง เข้าสู่แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* L. สายพันธุ์ GV3101 ด้วยวิธี freeze/thaw method (ภาคผนวก ก) คัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารกึ่งแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 mg/L ไโรฟมพิซิน 20 mg/L และเจนตามัยซิน 50 mg/L (คัดเลือก *A. tumefaciens* สายพันธุ์ GV3101) จากนั้นทำการตรวจสอบชิ้นส่วน DNA ของยีน *full-length\_OsNUC1* และชิ้นส่วนโปรโมเตอร์ *rd29A* โดยใช้วิธีการเดียวกับในข้อ 1.1.5 คัดเลือก colony ที่ให้ผลของ colony PCR เป็นบวก มาสกัดแยกพลาสมิด DNA ตามวิธีข้อ 1.1.1

การสร้างชุดโครงสร้างยีน (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1*

ชุดโครงสร้างยีน (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* ใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.1 เพียงแต่ใช้โคลน *N'\_OsNUC1* ที่ถูกสร้างและถ่ายยีนเข้าสู่ TOPO@vector โดยธนิกันต์ อุดมชโลทร (unpublished data) มาทำการทดลองแทน (ภาพที่ 3.2) โดยใช้ไพรเมอร์ *N'\_OsNUC (F)* และ *N'\_OsNUC (R)* (ตารางที่ 3.1) ในการตรวจสอบชิ้นส่วนชุดโครงสร้างยีน (II) ด้วย colony PCR (ภาคผนวก ก) เมื่อได้ชุดโครงสร้างยีนที่ต้องการ ทำการถ่ายยีนเข้าสู่ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ GV3101 และคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนตามที่ระบุไว้ในข้อ 1.1.7 มาสกัดแยกพลาสมิด DNA



ภาพที่ 3.1 ภาพจำลองแสดงการสร้างชุดโครงสร้างยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1*



ภาพที่ 3.2 ภาพจำลองแสดงการสร้างชุดโครงสร้างยีน (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1*

## 1.2 สร้าง Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่มีชุดโครงสร้างยีนของโมทิฟของ *OsNUC1*

การสร้าง Arabidopsis ที่มีชุดโครงสร้างยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1*

- 1.2.1 ถ่ายชิ้นส่วน DNA ของชุดโครงสร้างยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* ที่ได้จากข้อ 1.1 เข้าสู่ WT *Arabidopsis thaliana* L. ecotype Columbia (Col-0) ซึ่งเป็นพันธุ์ดั้งเดิม ด้วยวิธี *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation (Clough and Bent, 1998) (ภาคผนวก ก)
- 1.2.2 คัดเลือกเมล็ด Arabidopsis ที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีนจากข้อ 1.2.1 บนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่มีการเติม 1% (w/v) sucrose และสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 mg/L นำเมล็ดที่ต้านทานสารปฏิชีวนะย้ายปลูกลงดินเพื่อเก็บเมล็ดรุ่นถัดไป โดยปลูกในห้องปลูกพืชควบคุมอุณหภูมิประมาณ 22 องศาเซลเซียสและมีระยะเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

การสร้าง Arabidopsis ที่มีชุดโครงสร้างยีน (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* หรือชุด

โครงสร้างยีน (III): *pJim19::35SCaMV::N'\_OsNUC1*

ถ่ายชิ้นส่วน DNA ของชุดโครงสร้างยีน (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* ที่ได้จากข้อ 1.1 หรือชุดโครงสร้างยีน (III): *pJim19::35SCaMV::N'\_OsNUC1* ที่สร้างโดย ธนิกานต์ อุดมชโลทร (unpublished data) เข้าสู่ WT *Arabidopsis thaliana* L. ecotype Columbia (Col-0) ด้วยวิธีตามข้อ 1.2.1 แล้วคัดเลือกเมล็ดที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธีตามข้อ 1.2.2 มาทำการทดลองในขั้นต่อไป

## 2. ตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนยีนใน Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่สร้างขึ้น

2.1 Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่มีชุดโครงสร้างยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1*

2.1.1 นำเมล็ด Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีน (I) รุ่น T<sub>0</sub> มาฟอกฆ่าเชื้อด้วย washing solution (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 5-6 ครั้ง นำไปวางบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½MS ที่เติม 1% (w/v) sucrose และสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 mg/L ทำ stratification ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายไปเลี้ยงต่อที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 22 องศาเซลเซียสและให้ความเข้มแสง 35  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  เป็นเวลา 7 วัน คัดเลือกต้นที่สามารถต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซินไปปลูกลงดินเพื่อเก็บเมล็ด โดยปลูกในห้องปลูกพืชควบคุมอุณหภูมิที่ควบคุมให้มีอุณหภูมิประมาณ 22 องศาเซลเซียสและให้ความเข้มแสง 180  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

2.1.2 นำใบของต้น Arabidopsis จากข้อ 2.1.1 (ต้น T<sub>0</sub>) อายุประมาณ 5-6 สัปดาห์มาสกัด genomic DNA โดยใช้วิธีการ CTAB (ภาคผนวก ก) และนำไปตรวจสอบการแทรกตัวของชุดโครงสร้างยีน (I) และโปรโมเตอร์ *rd29A* ด้วย PCR (ภาคผนวก ก) เก็บเมล็ด T<sub>1</sub> ของต้น Arabidopsis T<sub>0</sub> ที่ให้ผล PCR เป็นบวกมาทำการทดลองในข้อถัดไป

2.1.3 ทำการคัดเลือกเมล็ด T<sub>1</sub> ของต้นจากข้อ 2.1.2 โดยพิจารณาจากอัตราการต้านทานสารปฏิชีวนะของเมล็ดบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½MS ที่เติม 1% (w/v) sucrose และสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 mg/L ให้จำนวนของต้นที่ต้านทานต่อต้นไม่ต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซินเป็นอัตราส่วน 3:1 ตามกฎของเมนเดล (Mendel's laws of segregation) โดยใช้การทดสอบทางสถิติแบบ Chi-square test ( $\chi^2$ ) ทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าสังเกต (observed data) ของจำนวนต้น T<sub>1</sub> ที่ต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซินกับค่าที่คาดหวัง (expected data) ของจำนวนต้น T<sub>1</sub> ที่ต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซิน คัดเลือกต้น/สายพันธุ์ (line) ที่มีอัตราความต้านทานสารปฏิชีวนะของต้น T<sub>1</sub> เป็นอัตราส่วน 3:1 และมีค่า  $\chi^2$  ที่ยอมรับได้ ซึ่งแสดงถึงจำนวนชิ้นส่วนของยีนที่ถ่ายเข้าไปว่ามีเพียงหนึ่งชุด (single insertion) ตามกฎของเมนเดลไปทดลองต่อไป

สมการของค่าสถิติของการทดสอบ Chi-square test ( $\chi^2$ ) คือ

$$\chi^2 = \frac{(O-E)^2}{E}$$

โดยที่ O คือ ค่าสังเกตของจำนวนต้น  $T_1$  ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ (observed data)

E คือ ค่าคาดหวังของจำนวนต้น  $T_1$  ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ (expected data)

- 2.1.4 นำต้น  $T_1$  ที่งอกได้บนอาหารกึ่งแข็งจากข้อ 2.1.3 ไปปลูกลงดิน สกัด genomic DNA จากใบ และตรวจสอบการแทรกตัวของชุดโครงสร้างยีนด้วยวิธี PCR เช่นเดียวกับในข้อ 2.1.2 เก็บเมล็ด  $T_2$  ของต้นที่ให้ผล PCR เป็นบวกมาทำการทดลองต่อไป
- 2.1.5 นำเมล็ด  $T_2$  มาคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่มีอัตราต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 100% เมื่อคัดเลือกด้วยอาหารกึ่งแข็งสูตร  $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม 1% (w/v) sucrose และสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ซึ่งถือเป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีนแบบ homozygous single insertion นำไปตรวจสอบการแทรกตัวของชุดโครงสร้างยีนด้วย PCR และนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

- 2.2 Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่มีชุดโครงสร้างยีน (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* และ (III): *pJim19::35SCaMV::N'\_OsNUC1*

ตรวจสอบการแทรกตัวของชุดโครงสร้างยีน (II) และ (III) ในต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรม ด้วยวิธี PCR โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับชุดโครงสร้างยีน (ตาราง 3.1) และคัดเลือกด้วยวิธีเช่นเดียวกับในข้อ 2.1 จนได้สายพันธุ์  $T_1$  และ  $T_2$  ตามลำดับ หลังจากนั้นนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

### 3. ตรวจสอบการแสดงออกของชุดโครงสร้างยีนของ *OsNUC1* ในต้น *Arabidopsis* ตัดแปร พันธุ์กรรมภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็ม ด้วย quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

- 3.1 คัดเลือกสายพันธุ์ในรุ่น T<sub>2</sub> ของ *Arabidopsis* ตัดแปรพันธุ์กรรมที่ได้รับการถ่ายยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* จำนวน 3 สายพันธุ์ที่เป็นอิสระต่อกันและยีน (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* จำนวน 3 สายพันธุ์ โดยมี WT *Arabidopsis* ecotype Columbia เป็นชุดควบคุม รวมเป็น 7 ชุดการทดลองมาทำการทดลอง
- 3.2 นำเมล็ดจำนวน 150-200 เมล็ดของแต่ละชุดการทดลอง มาทำการฆ่าเชื้อด้วย washing solution (ภาคผนวก ก) แล้วเพาะลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½MS ที่เติม 1% (w/v) sucrose นำเมล็ดของทั้ง 7 ชุดการทดลอง ไป stratification และเพาะตามวิธีในข้อ 2.1.1
- 3.3 เมื่อต้นกล้าอายุได้ 16 วันนับจากวันเพาะ นำต้นกล้าทั้ง 7 ชุดการทดลอง ที่มีขนาดและความสมบูรณ์ใกล้เคียงกัน ย้ายบนกระดาดชกรองที่ชุ่มด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 1% (w/v) sucrose และ NaCl 100 mM ซึ่งถือเป็นภาวะเครียดจากความเค็ม
- 3.4 เก็บตัวอย่างต้นกล้า *Arabidopsis* จากข้อ 3.3 เพื่อนำไปสกัด total RNA โดยแต่ละชุดการทดลองจะเก็บตัวอย่างต้นกล้า *Arabidopsis* เป็นจำนวน 20 ต้น ที่ระยะเวลา 0 3 6 และ 12 ชั่วโมงหลังจากได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม
- 3.5 สกัด total RNA จากตัวอย่างต้นกล้า *Arabidopsis* จากข้อ 3.4 ด้วยวิธีซึ่งปรับปรุงจากวิธี Hot Phenol ของปาร์วี ธิกาศ (2546) หลังจากนั้นตรวจสอบคุณภาพของ RNA โดยใช้ gel electrophoresis system และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย RNA ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่คลื่นความยาว 260 นาโนเมตร เพื่อคำนวณปริมาณ total RNA โดยคำนวณจากสมการ

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times \text{dilution factor} \times 40$$

โดย ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm ( $A_{260}$ ) จะเท่ากับ 1.0 เมื่อ RNA มีความเข้มข้นประมาณ 40 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989)

- 3.6 นำ total RNA ปริมาณ 10 ไมโครกรัม (µg) มากำจัด DNA ด้วยเอนไซม์ *DNAse I* (Takara, Japan) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ (ภาคผนวก ก) ตรวจสอบคุณภาพและคำนวณปริมาณ total RNA ตามวิธีในข้อ 3.5



3.7 นำ RNA ปริมาณ 3 µg มาสร้าง cDNA สายแรก ด้วยการทำให้ reverse transcription โดยใช้เอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase (Promega) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ (ภาคผนวก ก) หลังจากนั้นนำ cDNA ที่ได้ มาใช้เป็นแม่แบบในการทำ qRT-PCR ด้วยเครื่อง iCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad) โดยใช้เอนไซม์ iQ™ SYBR® Green Super Mix (Bio-Rad) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ (ภาคผนวก ก)

3.8 เปรียบเทียบการแสดงออกของโมทิฟของยีน *OsNUC1* ทั้งสองกลุ่ม

3.8.1 เปรียบเทียบการแสดงออกของ *rd29A::full-length\_OsNUC1* ในต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน (I) (*rd29A::full-length\_OsNUC1*) ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยวัดระดับของการแสดงออกของยีน *full-length\_OsNUC1* ในแต่ละสายพันธุ์ ในแต่ละช่วงเวลา จากการเปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกที่ชั่วโมงที่ 0 ของ Arabidopsis สายพันธุ์ rd\_fl10 (control) โดยมียีน Arabidopsis *EF-1α* (*Elongation factor-1α*) เป็นยีนอ้างอิง (reference gene) และมี WT Arabidopsis เป็นชุดควบคุม ออกแบบไพรเมอร์จาก *OsNUC1* cDNA (accession no. AK063918) เพื่อใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *full-length\_OsNUC1* และจาก *AtEF-1α* cDNA (At5g60390) สำหรับตรวจสอบยีนอ้างอิง โดยมีลำดับเบสดังนี้ (Siriporn Sripinyowanich, 2010)

qRT-fl\_*OsNUC1* (F)                    5'-ATGGATCTGACCTCGGTGGA-3'

qRT-fl\_*OsNUC1* (R)                    5'-GTCTTCCTCCTCTCTCAGTG-3'

(อนุภูมิภาคที่ไพรเมอร์เข้าจับกับ cDNA 48.2 องศาเซลเซียส)

*AtEF-1α* (F)                                5'-TTCTCCGAGTACCCACCTT-3'

*AtEF-1α* (R)                                5'-ATTTGGCACCTTTCTTCACT-3'

(อนุภูมิภาคที่ไพรเมอร์เข้าจับกับ cDNA 58.2 องศาเซลเซียส)

3.8.2 สำหรับการแสดงออกของ *N'\_OsNUC1* ในต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน (II) (*rd29A::N'\_OsNUC1*) ทำการศึกษาด้วยวิธีตามที่ระบุในข้อ 3.8.1 โดยวัดระดับของการแสดงออกของยีน *N'\_OsNUC1* ในแต่ละตัวอย่างได้จากการเปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกที่ชั่วโมงที่ 0 ของ Arabidopsis สายพันธุ์ rd\_5i (control) และมี Arabidopsis *EF-1α* เป็นยีนอ้างอิง (reference gene) โดยมี WT Arabidopsis เป็นชุดควบคุมและเพื่อให้สามารถตรวจสอบการแสดงออกของโมทิฟบริเวณปลาย N ของยีน *OsNUC1* ทำการออกแบบไพรเมอร์จาก

*OsNUC1* cDNA (accession no. AK103446) และใช้ *AtEF-1 $\alpha$*  เป็นยีนอ้างอิง เช่นเดียวกัน โพรเมอร์สำหรับ *N'\_OsNUC1* มีลำดับเบสดังนี้

qRT-*N'\_OsNUC1* (F)            5'-CGCTTCCTCGTTTGGGAATTA-3'

qRT-*N'\_OsNUC1* (R)            5'-CTCTGAGACTGAGACAGAGG-3'

(อุณหภูมิที่โพรเมอร์เข้าจับกับ cDNA 48.2 องศาเซลเซียส)

3.9 นำผลจากข้อ 3.8 มาคำนวณหาค่าการแสดงออกของยีน *full-length\_OsNUC1* หรือ *N'\_OsNUC1* ด้วยวิธีเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนที่ต้องการศึกษากับการแสดงออกของยีนในตัวอย่างที่ใช้เป็น control (relative quantification) โดยมี *AtEF-1 $\alpha$*  เป็นยีนอ้างอิง ตามวิธีของ Pfaffl (2001) ดังสมการ

$$R = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-sample)}}$$

โดยที่	R	คือ	relative expression ratio
	$E_{target}$	คือ	$10^{-1/slope}$ ของยีน <i>full-length_OsNUC1</i> หรือ <i>N'_OsNUC1</i>
	$E_{ref}$	คือ	$10^{-1/slope}$ ของยีน <i>AtEF-1<math>\alpha</math></i>
	$\Delta CP_{target}(control-sample)$	คือ	ผลต่างของค่า CP (cross-over point) (หรืออีกชื่อคือ ค่า Ct; threshold cycle) ของยีน <i>full-length_OsNUC1</i> หรือ <i>N'_OsNUC1</i> เมื่อเปรียบเทียบกับค่า CP ของตัวอย่าง control
	$\Delta CP_{ref}(control-sample)$	คือ	ผลต่างของค่า CP ของยีน <i>AtEF-1<math>\alpha</math></i> เมื่อเปรียบเทียบกับค่า CP ของตัวอย่าง control

#### 4. ศึกษาการเติบโตของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* ที่ต่างกัน

##### 4.1 การเติบโตในภาวะปกติ

###### 4.1.1 วางแผนการทดลอง

ออกแบบการทดลองให้เป็นแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีจำนวนซ้ำ 6 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยต้น *Arabidopsis* อย่างน้อย 6 ต้น

###### 4.1.2 การศึกษาการเติบโตของต้น *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* ที่ต่างกัน ภายใต้การควบคุมการทำงานของโปรโมเตอร์ 2 รูปแบบ (ภาพที่ 3.3) มีพืชทดลอง คือ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนทั้งสิ้น 5 กลุ่ม (รวม 13 สายพันธุ์) ดังนี้

(A): ชุดโครงสร้างยีน *rd29A::full-length\_OsNUC1*

จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ rd\_fl10 rd\_fl16 และ rd\_fl22

(B): ชุดโครงสร้างยีน *rd29A::N'\_OsNUC1*

จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ rd\_5i rd\_5.14 และ rd\_5.114

(C): ชุดโครงสร้างยีน *rd29A::C'\_OsNUC1* (Siriporn Sripinyowanich, 2010)

จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ rd\_3.9 rd\_3.10 และ rd\_3.13

(D): ชุดโครงสร้างยีน *35SCaMV::full-length\_OsNUC1* ของธนิกานต์ อุดมชโลธร (unpublished data) จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ox\_fl31 และ ox\_fl23

(E): ชุดโครงสร้างยีน *35SCaMV::C'\_OsNUC1* (Siriporn Sripinyowanich, 2010)

จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ox\_3.7 และ ox\_3.5

และมี WT *Arabidopsis* ecotype Columbia เป็นชุดควบคุม

โดยที่กลุ่ม (A) ถึง (C) เป็นกลุ่มที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* ที่ถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์แบบแสดงออกเมื่อได้รับสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม (inducible promoter) คือ โปรโมเตอร์ *rd29A* ในขณะที่กลุ่ม (D) และ (E) เป็นกลุ่มที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* ที่ควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *35SCaMV* ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์แบบแสดงออกตลอดเวลา (constitutive promoter)

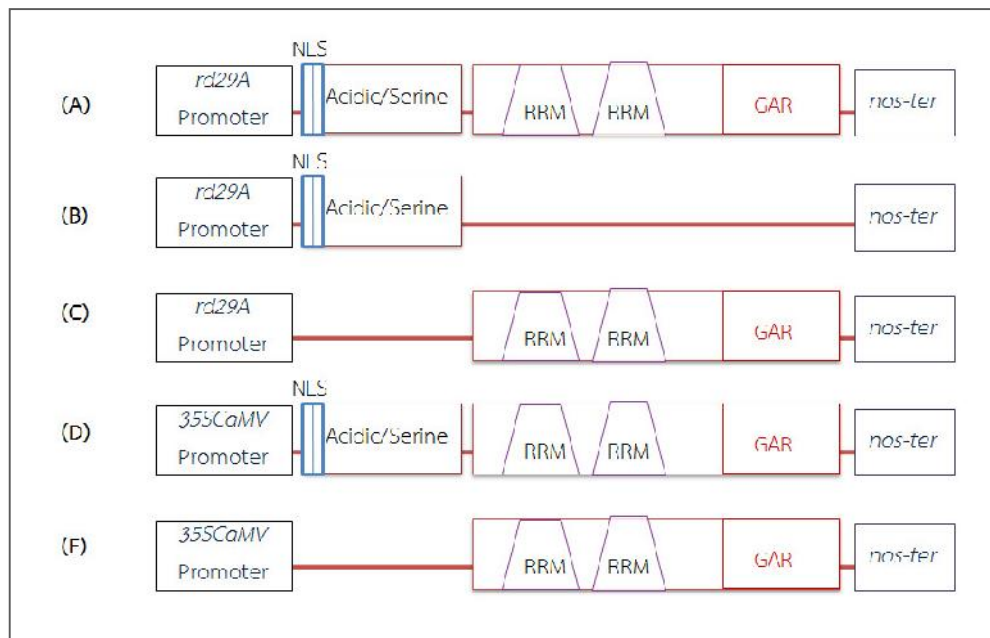
- 4.1.3 นำเมล็ด Arabidopsis ของทุกสายพันธุ์ในข้อ 4.1.2 จำนวน 800 – 900 เมล็ดต่อสายพันธุ์มาฆ่าเชื้อและเพาะตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 2.1.1 โดยนำเมล็ดไปวางบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½MS ที่เติม 1% (w/v) sucrose และ stratification ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายไปเลี้ยงต่อที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- 4.1.4 นำต้นกล้า Arabidopsis อายุ 7 วันนับจากวันเพาะของทุกสายพันธุ์ในข้อ 4.1.3 ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ย้ายไปปลูกบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 1% (w/v) sucrose (ภาวะปกติ) เปรียบเทียบการเติบโตของต้นกล้า Arabidopsis โดยวัดค่าน้ำหนักสดทั้งต้น น้ำหนักแห้งทั้งต้นและความยาวรากแก้ว (primary root) ที่ระยะเวลา 0 2 4 และ 6 วัน
- 4.1.5 สำหรับค่าน้ำหนักสดทั้งต้นและน้ำหนักแห้งทั้งต้นได้จากการเก็บตัวอย่างพืช ทั้งส่วนยอดและส่วนรากที่ระยะเวลา 0 2 4 และ 6 วัน นำไปบันทึกน้ำหนักสดและอบในตู้อบ 60°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาชั่งเพื่อบันทึกน้ำหนักแห้ง โดยชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งครั้งละ 10 ต้นต่อซ้ำ (ต้น/ซ้ำ) แสดงค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งต่อต้น นำค่าที่ได้มาทดสอบทางสถิติ โดยทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของทุกสายพันธุ์เปรียบเทียบกับของต้น WT โดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)
- 4.1.6 สำหรับการวัดจากความยาวรากแก้วของต้น Arabidopsis ได้จากการย้ายต้น Arabidopsis อายุ 7 วันนับจากวันเพาะไปทำการปลูกในแนวตั้ง (vertical) เก็บข้อมูลด้วยการถ่ายรูปที่ระยะเวลา 0 2 4 และ 6 วันหลังย้ายปลูก จากนั้นใช้โปรแกรม Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) วัดความยาวรากแก้วจำนวน 6 ต้น/ซ้ำ ทำการทดสอบทางสถิติโดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความยาวรากแก้ว โดยใช้ Duncan's Multiple Range Test
- 4.1.7 นำน้ำหนักแห้งมาคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (Relative Growth Rate, RGR) โดยคำนวณจากสมการ

$$\frac{(\ln W_2 - \ln W_1)}{(t_2 - t_1)}$$

โดยที่  $W_2$  และ  $W_1$  คือ น้ำหนักแห้งของพืชที่เวลา  $t_2$  และ  $t_1$  ตามลำดับ

#### 4.2 การเติบโตในภาวะเค็ม

วางแผนและทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1 แต่ต่างเพียงอาหารที่ใช้ เมื่อย้ายปลูกต้นกล้า Arabidopsis อายุ 7 วัน โดยย้ายปลูก Arabidopsis ทุกสายพันธุ์ที่ทำการศึกษาลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 1% (w/v) sucrose และ NaCl 100 mM ซึ่งถือเป็นภาวะเครียดจากความเค็มแล้วเปรียบเทียบการเติบโตของต้นกล้า โดยวัดจากค่าน้ำหนักสดทั้งต้น น้ำหนักแห้งทั้งต้นและความยาวรากแก้วด้วยวิธีเดียวกัน



ภาพที่ 3.3 ภาพจำลองแสดงชุดโครงสร้างยีนที่ใช้ในการทดลอง

(A): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1*

(B): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1*

(C): *pJim19::rd29A::C'\_OsNUC1*

(D): *pJim19::35SCaMV::full-length\_OsNUC1*

(E): *pJim19::35SCaMV::C'\_OsNUC1*

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

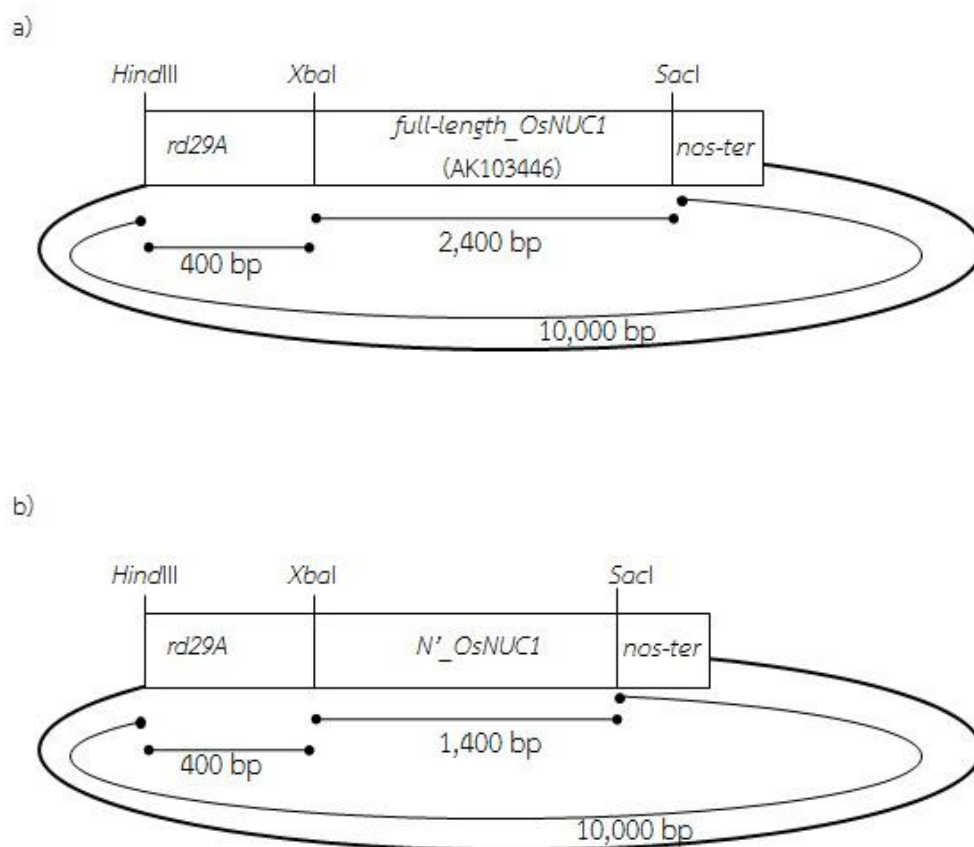
#### 1. สร้าง Arabidopsis คัดแปรพันธุกรรมที่มีโมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบต่างกัน

ขั้นตอนแรกในการสร้างต้น Arabidopsis คัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* หรือ (III): *pJim19::35SCaMV::N'\_OsNUC1* เริ่มจากการสร้างชุดโครงสร้างยีน โดยนำชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการมาต่อเชื่อมต่อด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase โดยใช้ความจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เนื่องจากชุดโครงสร้างยีน (III): *pJim19::35SCaMV::N'\_OsNUC1* ได้ถูกสร้างและถ่ายยีนเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  โดยธนิกันต์ อุดมชโลทรแล้ว (unpublished data) จึงทำการสร้างเฉพาะชุดโครงสร้างยีน (I) และ (II)

##### 1.1 สร้างชุดโครงสร้างยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* (ภาพที่ 4.1a) และ (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* (ภาพที่ 4.1b)

ชุดโครงสร้างยีน (I) สร้างจากการนำชิ้นส่วน DNA สามชิ้นซึ่งประกอบด้วย 1) ชิ้นส่วน DNA ของเวกเตอร์ *pJim19* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* และ *SacI* ให้เหลือเฉพาะส่วนเวกเตอร์เปล่าที่มีขนาดประมาณ 10,000 bp (ภาพที่ 4.1a) 2) ชิ้นส่วน DNA ของโปรโมเตอร์ *rd29A* ซึ่งอยู่ในเวกเตอร์ pGEM®-T Easy vector ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* และ *XbaI* และเหลือเฉพาะส่วนโปรโมเตอร์ *rd29A* ขนาดประมาณ 400 bp (ภาพที่ 4.1a) และ 3) ชิ้นส่วน DNA ของ *full-length\_OsNUC1* ที่อยู่ในเวกเตอร์ TOPO® ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *XbaI* และ *SacI* เหลือเฉพาะชิ้นส่วน *full-length\_OsNUC1* ขนาดประมาณ 2,400 bp (ภาพที่ 4.1a) มาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase ได้เป็นชุดโครงสร้างยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้น DNA ของเวกเตอร์ต่อ DNA ของโปรโมเตอร์และต่อ DNA ของชิ้นส่วนยีน *full-length\_OsNUC1* (vector:promoter:insert molar ratio) เป็น 1:8:8 ในการทำปฏิกิริยา ligation ชิ้นส่วน DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก่อนนำไปทำปฏิกิริยา ligation แสดงในภาพที่ 4.2

เมื่อทำการสร้างชุดโครงสร้างยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* และถ่ายยีนเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ด้วยวิธี heat shock แล้วคัดเลือก colony จำนวน 14 colony ที่ได้รับการถ่ายยีนซึ่งสามารถโตได้บนอาหารกึ่งแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 mg/L ไปยืนยันการแทรกตัวของชิ้นส่วนยีนในเซลล์ของ *E. coli* ด้วยวิธี colony PCR โดยตรวจสอบชิ้นส่วนโปรโมเตอร์ *rd29A* และชิ้นส่วนยีน *full-length\_OsNUC1* ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบมาอย่างจำเพาะต่อชิ้นส่วน DNA นั้น (ตารางที่ 3.1)



ภาพที่ 4.1 ชุดโครงสร้างยีน (I): *pJim19::full-length\_OsNUC1* (a) และชุดโครงสร้างยีน (II): *pJim19::N'\_OsNUC1* (b)

จากการทดลองพบว่า จาก colony ทั้งหมดที่นำมาใช้เป็นแม่แบบ (template) ทำ colony PCR มีเพียง colony E ที่ให้แถบ DNA ที่แสดงถึงทั้งชิ้นส่วนโปรโมเตอร์ *rd29A* ขนาดประมาณ 400 bp (ภาพที่ 4.3) และชิ้นส่วนยีน *full-length\_OsNUC1* ขนาดประมาณ 2,400 bp (ภาพที่ 4.4) จึงคัดเลือก colony E มาสกัดพลาสมิด DNA และนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองคู่เพื่อยืนยันชิ้นส่วนยีนที่ถ่ายเข้าไปอีกครั้ง โดยตรวจสอบขนาดของแถบ DNA ด้วย electrophoresis

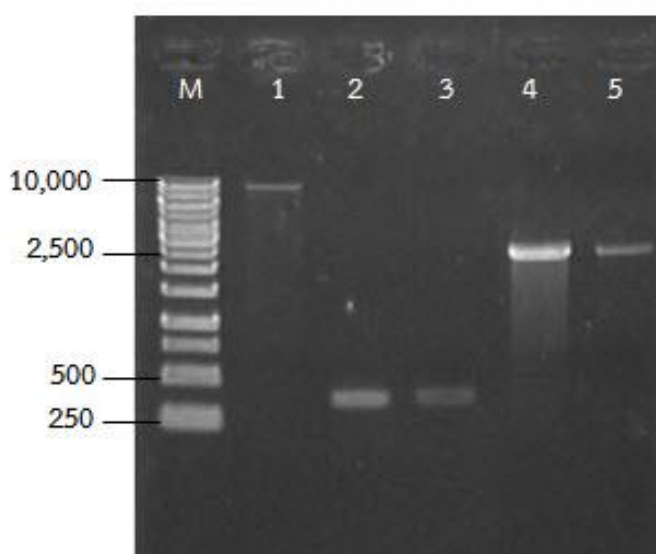
ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์คู่แรกที่นำมาใช้คือ *XbaI* และ *SacI* ที่มีตำแหน่งตัดแบบจำเพาะแสดงดังภาพที่ 4.1a สามารถตัดพลาสมิด *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* ออกเป็น 2 ชิ้นส่วนได้แก่ ชิ้นส่วนขนาดใหญ่ของเวกเตอร์ *pJim19* ประมาณ 10,400 bp และชิ้นส่วนขนาดเล็กซึ่งเป็นชิ้นยีน *full-length\_OsNUC1* ขนาด 2,400 bp และการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์คู่ที่สองคือ *HindIII* และ *SacI* ก็ให้แถบ DNA ของบริเวณโปรโมเตอร์ *rd29A* ที่เชื่อมกับบริเวณชิ้นยีน *full-length\_OsNUC1* รวมเป็นแถบ DNA ขนาดประมาณ 2,900 bp (ภาพที่ 4.5; lane 1- 3) แสดงให้เห็นว่า colony E ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1*

สำหรับชุดโครงสร้างยีน (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* (ภาพที่ 4.1b) ใช้วิธีการสร้างเช่นเดียวกับชุดโครงสร้างยีน (I) ภาพที่ 4.6 แสดงถึงชิ้นส่วน DNA ก่อนนำไปทำการเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase โดยมีขนาดของเวกเตอร์ *pJim19* ของโปรโมเตอร์ *rd29A* และ *N'\_OsNUC1* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเท่ากับ 10,000 400 และ 1,400 bp ตามลำดับ โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของ DNA (vector:promoter:insert molar ratio) ในการทำปฏิกิริยา ligation เป็น 1:8:8 และถ่ายยีนเข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ด้วยวิธี heat shock แล้วทำการคัดเลือก colony ของ *E. coli* จำนวน 12 colony ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วย colony PCR เช่นเดียวกัน

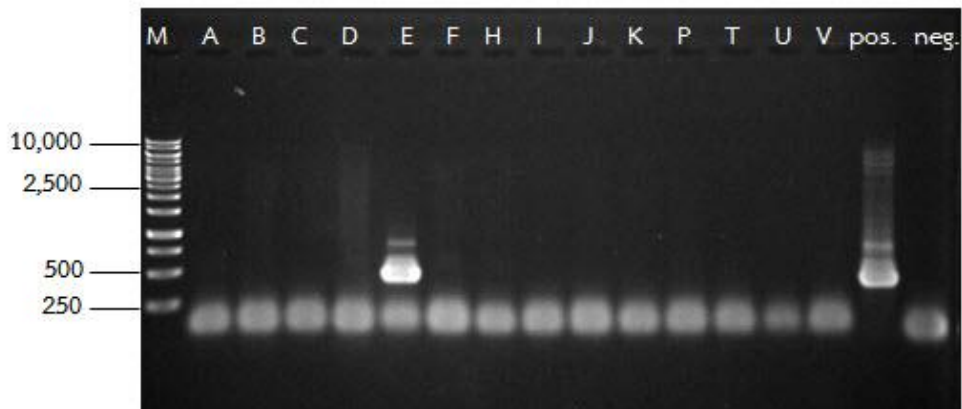
เมื่อทำ colony PCR ด้วยไพรเมอร์ *N'\_OsNUC1* (F) และ *N'\_OsNUC1* (R) ซึ่งหากมี insertion ของ *N'\_OsNUC1* จะได้ชิ้น DNA ขนาดประมาณ 1,400 bp จากภาพที่ 4.7 จะเห็นว่า มี colony ที่เมื่อ amplify แล้วได้ชิ้น DNA ตามขนาดที่คาดหวังคือ colony A B D F และ J จึงนำไปตรวจสอบการมีโปรโมเตอร์ *rd29A* โดยการ amplify ด้วยไพรเมอร์ *rd29A* (F) และ *rd29A* (R) ซึ่งหากมีโปรโมเตอร์ *rd29A* ควรจะได้ชิ้น DNA ขนาดประมาณ 400 bp จากผลการทดลองในภาพที่ 4.8 จะพบว่า colony B D และ J มีชิ้นยีนของโปรโมเตอร์ *rd29A* ดังนั้นคัดเลือก colony B ไปทดลองตัดด้วยเอนไซม์สองชนิด คือ เอนไซม์ *XbaI* และ *SacI* แล้วนำไปตรวจสอบด้วย electrophoresis ผลการทดลองพบว่าแถบ DNA ที่ได้จากการสกัดพลาสมิดของ colony B เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ทั้งสองจะมีขนาด 1,400 bp ซึ่งเป็นขนาดของชิ้นส่วนยีน *N'\_OsNUC1* ที่ถูกตัดออกจากเวกเตอร์ *pJim19* และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์คู่ที่สองคือ *HindIII* และ *SacI* ซึ่งมีตำแหน่งตัดจำเพาะ



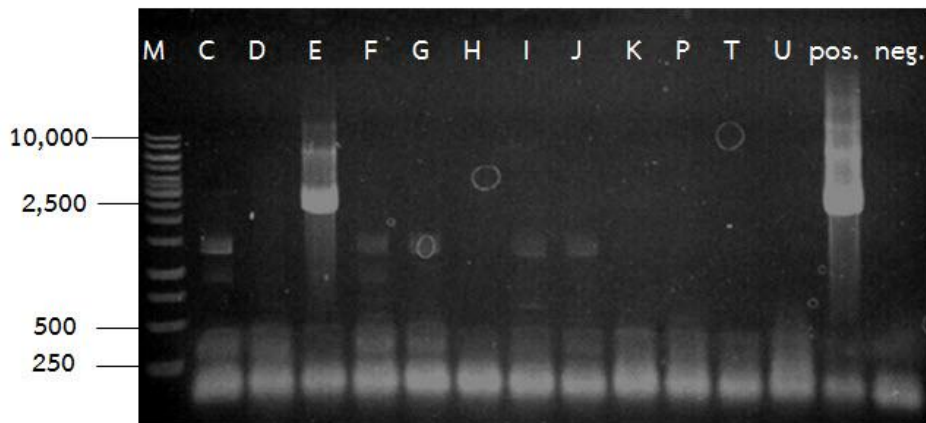
ตรงตำแหน่งแรกของลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรโมเตอร์ *rd29A* และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์สุดท้ายของชิ้นส่วนยีน *N'\_OsNUC1* ก็ให้ผลการทดลองเป็นชิ้นส่วน DNA ขนาดประมาณ 1,900 bp ตรงตามขนาดของชิ้น DNA ที่คาดไว้ (ภาพที่ 4.5; lane 4-6) จากผลการทดลองสรุปได้ว่า colony B ได้รับความถ่ายชุดโครสร้างยีน *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1*



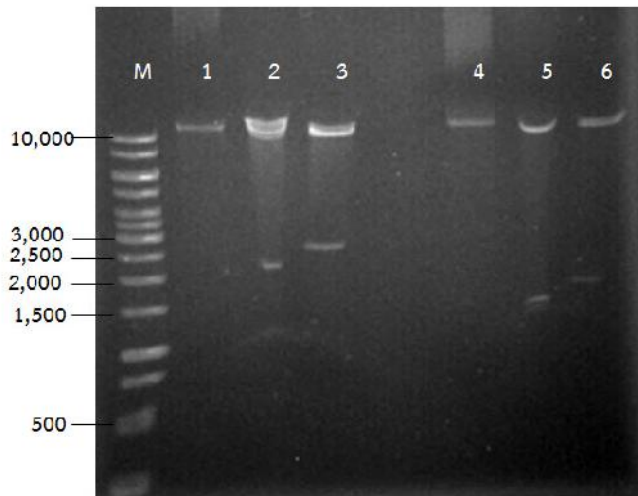
ภาพที่ 4.2 ขนาดของแถบ DNA ก่อนนำมาเชื่อมต่อกันเพื่อสร้างชุดโครสร้างยีน  
 (l): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* บน agarose gel ความเข้มข้น 0.8% (w/v)  
 (M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, lane 1: *pJim19* vector, lane 2-3: *rd29A* promoter และ lane 4-5: ชิ้นยีน *full-length\_OsNUC1*)



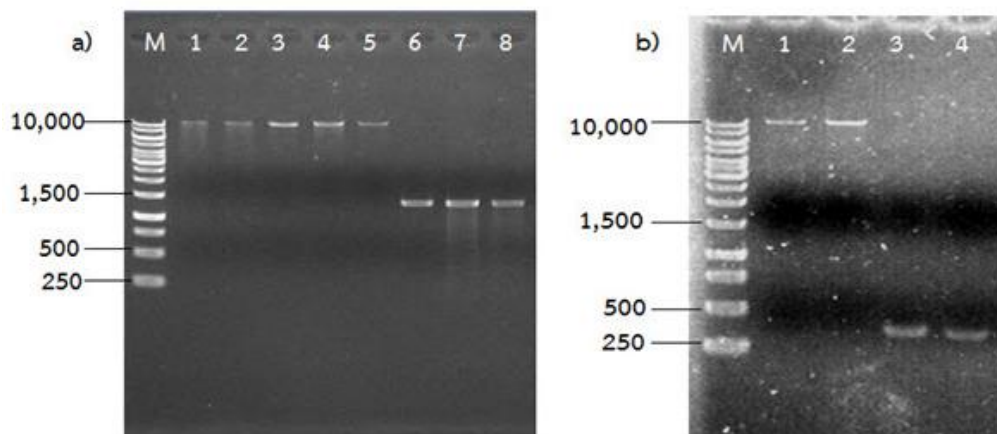
ภาพที่ 4.3 แถบ DNA ยืนยันชิ้นส่วนโปรโมเตอร์ *rd29A* ที่ได้จาก colony ต่าง ๆ ของ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (I) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR (M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, A – V: ชื่อของ colony ที่นำมาใช้เป็น template ในการทำ colony PCR, pos.: พลาสมิด *rd29A* ใน pGEM-T vector, neg.: น้ำกลั่น)



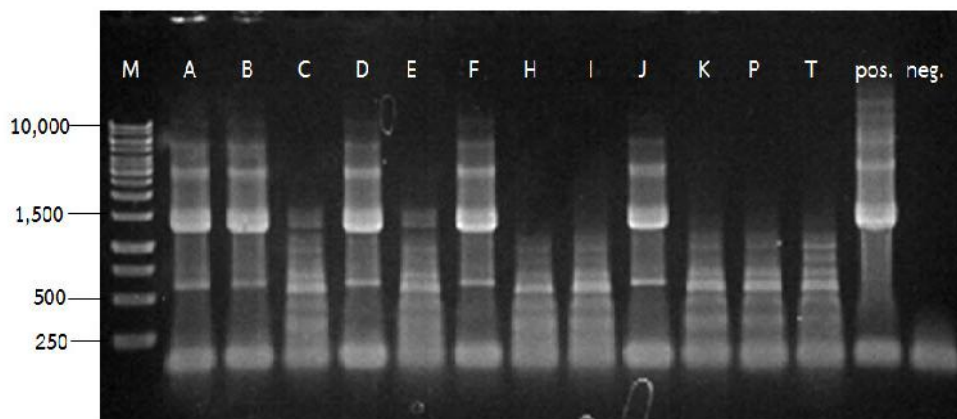
ภาพที่ 4.4 แถบ DNA ยืนยันชิ้นส่วนยีน *full-length\_OsNUC1* ที่ได้จาก colony ต่าง ๆ ของ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (I) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR (M: GeneRuler™ 1 kb DNA, C – U: ชื่อของ colony ที่นำมาใช้เป็น template, pos.: พลาสมิด *full-length\_OsNUC1* ใน TOPO®vector, neg.: น้ำกลั่น)



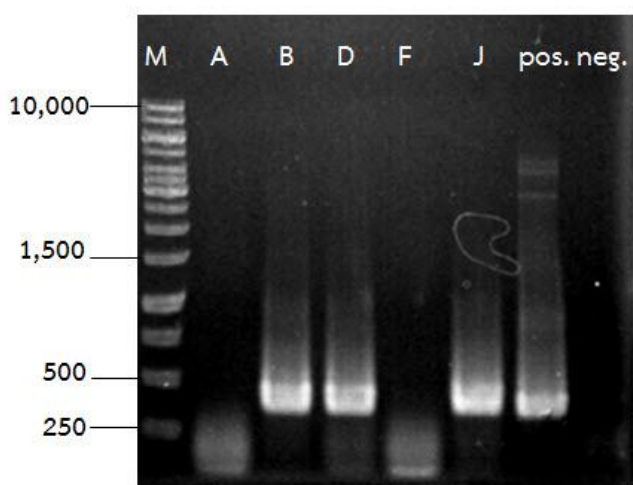
ภาพที่ 4.5 ขนาดของแถบ DNA หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อยืนยันชิ้นส่วนยีน (I): *full-length\_OsNUC1* และ (II): *N'\_OsNUC1* (M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, lane 1-3: plasmid DNA *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* ใน colony E, lane 4-6: plasmid DNA *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* ใน colony B โดยที่ lane 1 & 4: uncut plasmid DNA, lane 2 & 5: cut with *XbaI* & *SacI*, lane 3 & 6: cut with *HindIII* & *SacI*)



ภาพที่ 4.6 ขนาดของแถบ DNA ก่อนนำมาเชื่อมต่อกันเพื่อสร้างชุดโครงสร้างยีน (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* บน agarose gel ความเข้มข้น 0.8% (w/v) a) M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, lane 1-5: *pJim19* vector, lane 6-8: ชิ้นยีน *N'\_OsNUC1* b) M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, lane 1-2: *pJim19* vector, lane 3-4: *rd29A* promoter



ภาพที่ 4.7 แถบ DNA ยืนยันชิ้นส่วนยีน *N'\_OsNUC1* ที่ได้จาก colony ต่าง ๆ ของ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (II) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR (M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, A – T: ชื่อของ colony ที่นำมาใช้เป็น template, pos.: พลาสมิด *N'\_OsNUC1* ใน TOPO® vector, neg.: น้ำกลั่น)



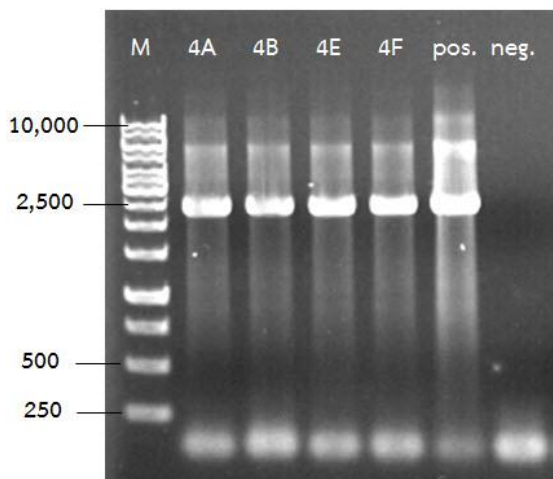
ภาพที่ 4.8 แถบ DNA ยืนยันชิ้นส่วนโปรโมเตอร์ *rd29A* ที่ได้จาก colony ต่าง ๆ ของ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (II) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR (M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, A - J: ชื่อของ colony ที่นำมาใช้เป็น template, pos.: พลาสมิด *rd29A* ใน pGEM-T vector, neg.: น้ำกลั่น)

## 1.2 สร้าง Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่มีชุดโครงสร้างยีนของโมทิฟของ *OsNUC1*

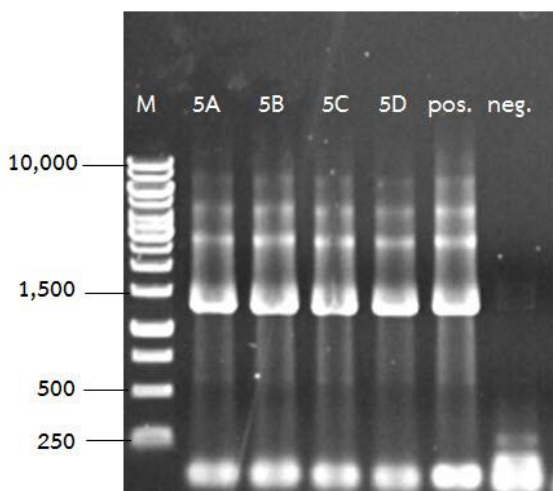
เมื่อนำชุดโครงสร้างยีนทั้งสาม ได้แก่ (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* และ (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* ซึ่งอยู่ใน *E. coli* และผ่านการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ว่าถูกต้อง (ภาคผนวก ค ภาพที่ ค-2) รวมทั้งชุดโครงสร้างยีน (III): *pJim19::35SCaMV::N'\_OsNUC1* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ธนิชานต์ อุดมชลโทร มาถ่ายยีนเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ GV3101 ด้วยวิธี freeze/thaw method และคัดเลือก colony ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีนโดยใช้อาหารกึ่งแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 mg/L ไรแฟมพิซิน 20 mg/L และเจนตามัยซิน 50 mg/L รวมถึงใช้วิธี colony PCR ประกอบการคัดเลือก โดยตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนยีน *full-length\_OsNUC1* หรือ *N'\_OsNUC1* พบว่าทุก colony ของ *A. tumefaciens* ในแต่ละชุดการทดลองที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (I) (II) และ (III) เมื่อนำไปเป็น template ในการทำ colony PCR ให้ผลแสดงถึงขนาดแถบ DNA ที่ถูกต้องตรงกับชิ้นส่วนยีนที่ทำการถ่ายยีนเข้าไป (ภาพที่ 4.9-โครงสร้างยีน (I) ภาพที่ 4.10-โครงสร้างยีน (II) และ ภาพที่ 4.11-โครงสร้างยีน (III)) ทำการคัดเลือก 1 colony สำหรับแต่ละชุดโครงสร้างยีน ได้แก่ colony 4A colony 5A และ colony 35.5A สำหรับชุดโครงสร้างยีน (I) (II) และ (III) ตามลำดับ ไปถ่ายยีนเข้าสู่ *Arabidopsis thaliana* L. ด้วยวิธี *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation (Clough and Bent, 1998)

เมื่อเก็บเมล็ดของต้น *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีน ( $T_0$ ) มาทำการคัดเลือกบนอาหารกึ่งแข็ง ½MS ที่เติม 1% (w/v) sucrose และสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 mg/L พบว่า จำนวนต้น *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (I) มีจำนวน 21 ต้น ชุดโครงสร้าง (II) 27 ต้นและชุดโครงสร้าง (III) 17 ต้น (ตารางที่ 4.1) โดยที่ประสิทธิภาพในการถ่ายยีน (transformation efficiency) ด้วยวิธี *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation (Clough & Bent, 1998) เมื่อคิดจากจำนวนต้น *Arabidopsis*  $T_0$  ที่ได้รับการถ่ายยีนและสามารถต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซินเมื่อทำการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะกานามัยซินจากจำนวนเมล็ดทั้งหมดที่นำไปเพาะอยู่ระหว่าง 1.7 ถึง 2.7 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนเมล็ดทั้งหมดที่นำไปเพาะมีจำนวนมากกว่า 1,000 เมล็ดต่อหนึ่งชุดโครงสร้าง ซึ่งคำนวณได้จากน้ำหนักรวมของเมล็ดจำนวน 250 เมล็ดที่มีน้ำหนักประมาณ 4.0 mg อย่างไรก็ตาม เมื่อต้น  $T_0$  ของแต่ละชุดโครงสร้างยีนที่ถูกย้ายปลูกลงดินมีอายุประมาณ 3-4 สัปดาห์หลังการย้ายปลูก เก็บตัวอย่างใบนำมาสกัด genomic DNA เพื่อทำ PCR ยืนยันการแทรกตัวของชุดโครงสร้างยีนในต้น  $T_0$  ของต้น *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมรูปแบบ (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* รูปแบบ (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* และรูปแบบ (III): *pJim19::35SCaMV::N'\_OsNUC1* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับชิ้นส่วนยีนนั้น ๆ จากการทดลองพบว่าสามารถยืนยันชิ้นส่วนยีนในต้น  $T_0$  ของต้น *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมรูปแบบ

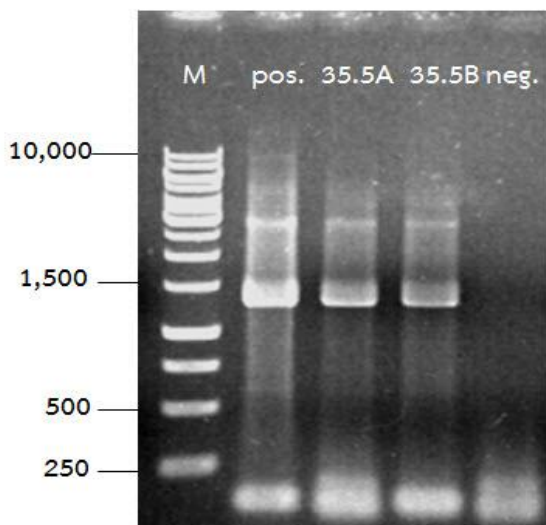
(I) ได้ 16 ต้น รูปแบบ (II) และ (III) ยืนยันได้ 19 และ 10 ต้นตามลำดับ (ภาพที่ 4.12) สรุปประสิทธิภาพของการถ่ายยีนคิดเป็น 1.0-1.9 เปอร์เซ็นต์ ต้น *Arabidopsis* T<sub>0</sub> ที่สามารถยืนยันการแทรกตัวของชิ้นยีนด้วย PCR จะถูกปลูกต่อไปจนถึงระยะเก็บเมล็ด (เมล็ด T<sub>1</sub>)



ภาพที่ 4.9 แถบ DNA ยืนยันชิ้นยีน *full-length\_OsNUC1* จาก colony ต่าง ๆ ของ *A. tumefaciens* ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (I) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR (M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, 4A-4F: ชื่อ colony ที่ใช้เป็น template, pos.: พลาสมิด *full-length\_OsNUC1*, neg.: น้ำกลั่น)



ภาพที่ 4.10 แถบ DNA ยืนยันชิ้นยีน *N'\_OsNUC1* จาก colony ต่าง ๆ ของ *A. tumefaciens* ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (II) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR (M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, 5A-5D: ชื่อ colony ที่นำมาใช้เป็น template, pos.: พลาสมิด *N'\_OsNUC1* ใน TOPO® vector, neg.: น้ำกลั่น)



ภาพที่ 4.11 แถบ DNA ยืนยันชิ้นยีน *N'\_OsNUC1* จาก colony ต่าง ๆ ของ *A. tumefaciens* ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (C) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR (M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, 5A-5D: ชื่อ colony ที่นำมาใช้เป็น template, pos.: พลาสมิด *N'\_OsNUC1* ใน TOPO® vector, neg.: น้ำกลั่น)

ตารางที่ 4.1 จำนวนต้นกล้า Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีนในแต่ละชุดโครงสร้างยีน

ชุดโครงสร้างยีน	Arabidopsis (Col-0) ที่นำมาถ่ายยีน (ต้น)	ต้น T <sub>0</sub> ที่ได้รับการถ่ายยีน (ต้น)	ประสิทธิภาพในการถ่ายยีน (เปอร์เซ็นต์)
(I): <i>pJim19::rd29A::full-length_OsNUC1</i>	10	16	< 1.6
(II): <i>pJim19::rd29A::N'_OsNUC1</i>	12	19	< 1.9
(III): <i>pJim19::35SCaMV::N'_OsNUC1</i>	6	10	< 1.0

## 2. ตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนยีนใน Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่สร้างขึ้น

นำเมล็ด  $T_1$  ของแต่ละต้น  $T_0$  ในชุดโครงสร้างยีน (I) (II) และ (III) ที่ยืนยันการแทรกตัวของชิ้นยีนด้วย PCR แล้ว โดยคัดเลือกเฉพาะต้นที่ให้แถบ DNA ที่มีความเข้มชัดเจน (ภาพที่ 4.12) จำนวน 16 19 และ 4 สายพันธุ์ ตามลำดับ ไปเพาะบนอาหารกึ่งแข็ง  $\frac{1}{2}MS$  ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน นับจำนวนต้น  $T_1$  ที่ต้านทานต่อจำนวนต้นไม่ต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซินให้มีอัตราส่วนเป็น 3:1 ตามกฎของ Mendel (Mendel's laws of segregation) (ภาพที่ 4.13) โดยใช้การทดสอบแบบ Chi-square test ( $\chi^2$ ) มาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าที่สังเกตได้ (observed data) กับค่าที่ควรจะเป็น (expected data) โดยค่า  $\chi^2$  ที่ความน่าจะเป็นเท่ากับ 0.05 และ  $df = 1$  ที่ยอมรับได้ต้องอยู่ในช่วง 0 - 3.841 หลังจากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ค่า  $\chi^2$  ของต้น  $T_1$  ที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ย้ายปลูกลงดินเพื่อเก็บเมล็ดรุ่น  $T_2$

ผลการทดลองพบว่า จำนวนสายพันธุ์ของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมรูปแบบ (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* ที่ให้อัตราส่วนต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซินของเมล็ดเป็น 3:1 และมีค่า  $\chi^2$  อยู่ในช่วง 0-3.841 ที่สามารถยอมรับได้มีจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ rd\_fl10 rd\_fl16 rd\_fl17 และ rd\_fl22 (ตารางที่ 4.3) ในขณะที่ต้นดัดแปรพันธุกรรมรูปแบบ (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* มี 8 สายพันธุ์ ได้แก่ rd\_5.1 rd\_5.3 rd\_5.5 rd\_5.14 rd\_5.18 rd\_5.113 rd\_5.114 และ rd\_5i (ตารางที่ 4.4)

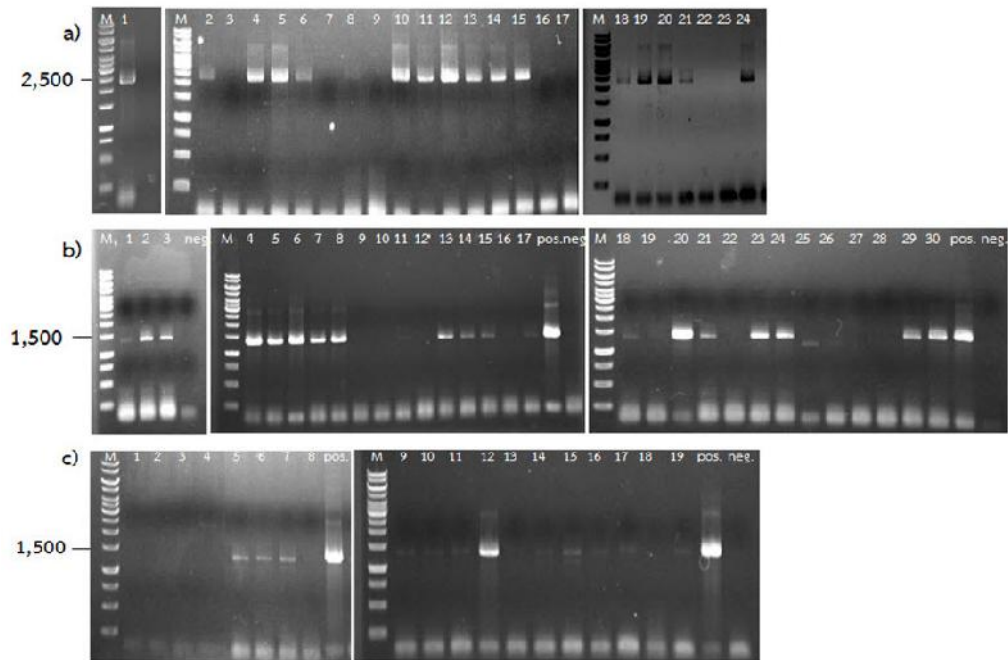
สำหรับ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมรูปแบบ (III): *pJim19::35SCaMV::N'\_OsNUC1* พบว่าจำนวนต้น  $T_1$  ที่สามารถต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซินมีค่าเท่ากับศูนย์ ทดลองทำการทดลองเพาะเมล็ด  $T_1$  ซ้ำอีกครั้ง ก็ยังไม่พบต้น  $T_1$  ที่สามารถต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซินบนอาหารกึ่งแข็ง  $\frac{1}{2}MS$  ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินได้ (ภาพที่ 4.14) จึงจำเป็นต้องหยุดการทดลอง

ต้นกล้า  $T_1$  ของ Arabidopsis ทั้ง 12 สายพันธุ์ที่มีค่า  $\chi^2$  เป็นไปตามกฎของ Mendel (ตารางที่ 4.2 และ 4.3) สายพันธุ์ละ 6-8 ต้น ถูกย้ายปลูกลงดินเพื่อเก็บเมล็ด  $T_2$  หลังจากนั้นคัดเลือกเฉพาะต้นที่ให้เมล็ด  $T_2$  ที่สามารถต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซินคิดเป็นอัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารกึ่งแข็ง  $\frac{1}{2}MS$  ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินซึ่งแสดงถึง single insert homozygous ไปทำการทดลองต่อไป ผลการคัดเลือกพบว่า Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรม (I) ทุกสายพันธุ์ที่นำไปคัดเลือกให้เมล็ด  $T_2$  ที่ต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรม (II) มี 6 สายพันธุ์ที่ให้อัตราการต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซินของเมล็ด  $T_2$  เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ rd\_5i rd\_5.3 rd\_5.5 rd\_5.14 rd\_5.113 และ rd\_5.114 ซึ่งทั้ง 10 สายพันธุ์นี้คาดว่า เป็น homozygous transgenic lines

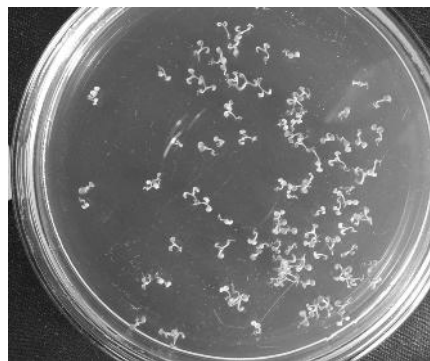


จาก T<sub>2</sub> จำนวน 10 สายพันธุ์ที่คาดว่าเป็น homozygous transgenic lines ทำการคัดเลือกเพียง 6 สายพันธุ์ แบ่งเป็น 3 สายพันธุ์สำหรับ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* ได้แก่ rd\_fl10 rd\_fl16 และ rd\_fl22 และอีก 3 สายพันธุ์ สำหรับที่ได้รับการถ่ายยีน (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* ได้แก่ rd\_5i rd\_5.14 และ rd\_5.114 มาตรวจสอบโดยวิธี PCR เพื่อยืนยันการแทรกตัวของชิ้นส่วนยีนดังกล่าว และนำไปศึกษาการแสดงออกของยีน *OsNUC1* เมื่อถอดรหัสให้โมทิฟรูปแบบต่าง ๆ ภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็ม

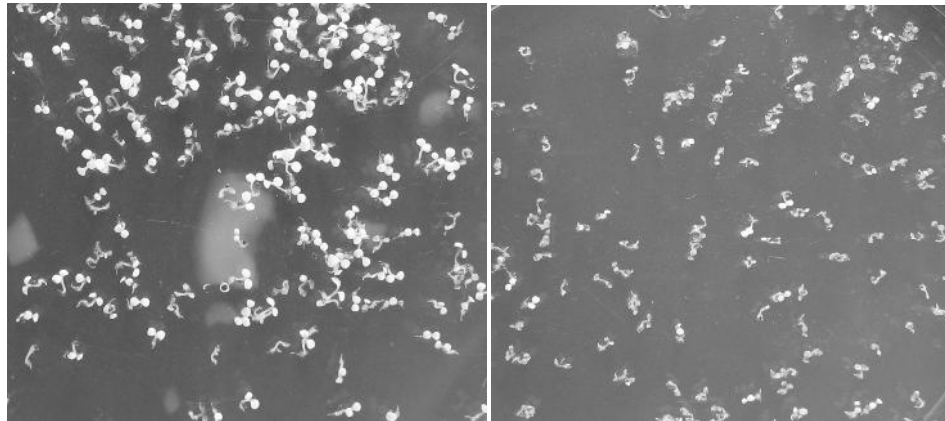
ผลการตรวจสอบต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธี PCR สามารถยืนยันชิ้นส่วนยีนที่ทำการถ่ายยีนเข้าไปในทั้ง 6 สายพันธุ์ที่คัดเลือก เปรียบเทียบกับต้น WT Arabidopsis พบชิ้นส่วนของยีน *full-length\_OsNUC1* ในกลุ่มที่ได้รับการถ่ายยีน (I) โดยมีขนาดของชิ้นส่วนของ DNA ที่เพิ่มจำนวนได้ ขนาด 2,400 bp และชิ้นส่วนของ *N'\_OsNUC1* ขนาด 1,400 bp ในกลุ่มที่ได้รับการถ่ายยีน (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* โดยที่เมื่อใช้ DNA จากต้น WT Arabidopsis ไม่มีชิ้นส่วน DNA เกิดขึ้น (ภาพที่ 4.15)



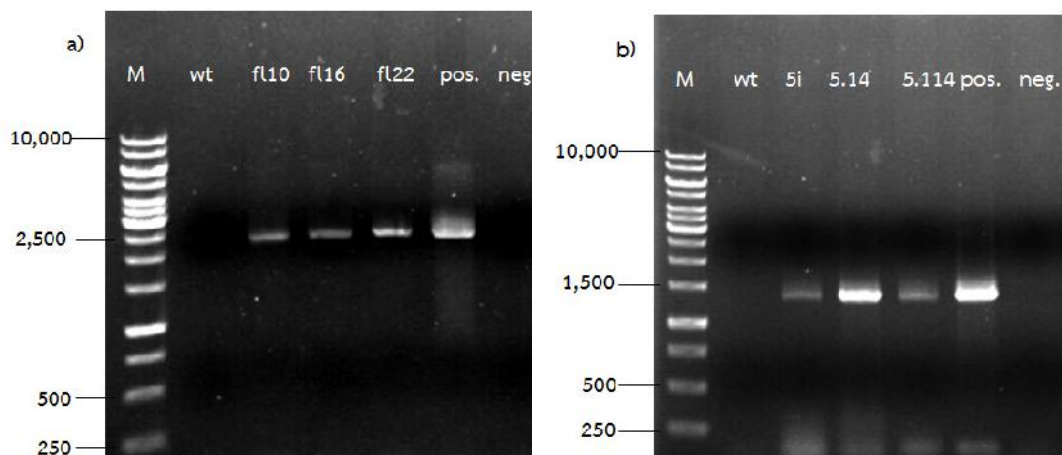
ภาพที่ 4.12 แถบ DNA ยืนยันชิ้นในต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมรุ่น  $T_0$   
 a) ชิ้น *full-length\_OsNUC1* ในต้นที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (I)  
 b) ชิ้น *N'\_OsNUC1* ในต้นที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (II)  
 c) ชิ้น *N'\_OsNUC1* ในต้นที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (III)  
 (M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, no. 1-32: ต้น  $T_0$  ที่นำมาเป็น template  
 pos.: พลาสมิด *N'\_OsNUC1* (b) หรือ *full-length\_OsNUC1* (c), neg.: น้ำกลั่น)



ภาพที่ 4.13 ภาพแสดงจำนวนต้น  $T_1$  ของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่ต้านทานต่อจำนวนต้นไม่ต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซินอัตราส่วนเป็น 3:1 ตามกฎของ Mendel



ภาพที่ 4.14 ภาพแสดงต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมรูปแบบ (III): *pJim19::35SCaMV::N'\_OsNUC1* รุ่น T<sub>1</sub> เมื่อคัดเลือกบนอาหารกึ่งแข็ง ½MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินและมีอัตราต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซินเป็นศูนย์



ภาพที่ 4.15 แถบ DNA ยืนยันชิ้นยีนในต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมรุ่น T<sub>2</sub>  
 a) ชิ้นยีน *full-length\_OsNUC1* ในต้นที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (I)  
 b) ชิ้นยีน *N'\_OsNUC1* ในต้นที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (II)  
 (M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, wt: wild-type Arabidopsis, fl10, fl16, fl22, 5i, 5.14, 5.114: สายพันธุ์รุ่น T<sub>2</sub> ที่เลือกมาทำการทดลอง, pos.: พลาสมิด *full-length\_OsNUC1* หรือ *N'\_OsNUC1* ใน TOPO® vector, neg: น้ำกลั่น)

ตารางที่ 4.2 จำนวนต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมรูปแบบ (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* ในรุ่น T<sub>1</sub> ของสายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อทดสอบด้วย  $\chi^2$

สายพันธุ์	จำนวนเมล็ด ที่งอก	จำนวนต้น ด้านทานสาร ปฏิชีวนะ	จำนวนต้น ที่ไม่ด้านทาน สารปฏิชีวนะ	*การตรวจสอบ อัตราส่วน 3:1 ด้วยสมการ $\chi^2$	
				ค่า $\chi^2$	ยอมรับ
rd_fl 1	266	149	117	51.133	
rd_fl 5	395	338	57	23.535	
rd_fl 7	480	460	20	111.111	
rd_fl 8	370	310	60	15.225	
rd_fl 10	410	311	99	0.159	●
rd_fl 14	150	131	19	12.169	
rd_fl 16	308	238	70	0.848	●
rd_fl 17	154	114	40	0.078	●
rd_fl 18	474	276	198	71.114	
rd_fl 19	276	168	108	29.391	
rd_fl 21	276	180	96	14.087	
rd_fl 22	390	293	97	0.003	●
rd_fl 26	120	75	45	10.000	
rd_fl 29	591	491	100	20.576	
rd_fl 30	600	559	41	105.609	

\* ค่า  $\chi^2$  ที่ความน่าจะเป็นเท่ากับ 0.05 และ df = 1 ที่ยอมรับได้มีค่า  $\chi^2 < 3.841$

ตารางที่ 4.3 จำนวนต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมรูปแบบ (II): *pJim19::rd29A::*

*N'\_OsNUC1* ในรุ่น T<sub>1</sub> ของสายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อทดสอบด้วย  $\chi^2$

สายพันธุ์	จำนวนเมล็ด ที่งอก	จำนวนต้น ด้านทานสาร ปฏิชีวนะ	จำนวนต้น ที่ไม่ด้านทาน สารปฏิชีวนะ	*การตรวจสอบ อัตราส่วน 3:1 ด้วยสมการ $\chi^2$	
				ค่า $\chi^2$	ยอมรับ
rd_5.1	271	204	67	0.011	●
rd_5.2	143	87	56	15.225	
rd_5.3	97	65	32	3.302	●
rd_5.4	444	254	190	74.967	
rd_5.5	113	84	29	0.027	●
rd_5.9	496	416	80	20.817	
rd_5.10	426	356	70	16.680	
rd_5.12	162	104	58	10.082	
rd_5.14	449	325	124	1.640	●
rd_5.16	346	137	209	231.310	
rd_5.18	199	161	38	3.700	●
rd_5.113	213	172	41	3.757	●
rd_5.114	170	123	47	0.635	●
rd_5i	676	502	174	0.197	●

\* ค่า  $\chi^2$  ที่ความน่าจะเป็นเท่ากับ 0.05 และ df = 1 ที่ยอมรับได้มีค่า  $\chi^2 < 3.841$

ตารางที่ 4.4 จำนวนต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมในแต่ละรุ่นที่สามารถยืนยันการถ่ายชุดโครงสร้างยีน

ชุดโครงสร้างยีน	T <sub>0</sub> ที่ยืนยันการแทรกตัวของชิ้นยีนด้วย PCR (ต้น)	T <sub>0</sub> ที่มีอัตราการต้านทานสารปฏิชีวนะของ T <sub>1</sub> เป็น 3:1 เมื่อใช้ $\chi^2$ (ต้น)	สายพันธุ์ที่ให้อัตราการต้านทานสารปฏิชีวนะของ T <sub>2</sub> เป็น 100 % (ต้น)
(I): <i>pJim19::rd29A::full-length_OsNUC1</i>	16	4	4
(II): <i>pJim19::rd29A::N'_OsNUC1</i>	19	8	6
(III): <i>pJim19::35SCaMV::N'_OsNUC1</i>	4	*	*

\* T<sub>1</sub> ไม่เจริญเติบโตบนอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 mg/L

### 3. ตรวจสอบการแสดงออกของชุดโครงสร้างยีนของ *OsNUC1* ในต้น *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็ม ด้วย quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

#### 3.1 การแสดงออกของยีน *full-length\_OsNUC1* ที่ถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *rd29A*

หลังจากคัดเลือกต้น *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* แบบ homozygous transgenic lines จำนวน 3 สายพันธุ์ที่เป็นอิสระต่อกัน ได้แก่ สายพันธุ์ *rd\_fl10* *rd\_fl16* และ *rd\_fl22* นำมาศึกษาการแสดงออกของยีนภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็มโดยย้ายปลูกบนอาหาร MS ที่เติม NaCl 100 mM ซึ่งจะกระตุ้นให้โปรโมเตอร์ *rd29A* ที่เป็นโปรโมเตอร์ที่แสดงออกเฉพาะเมื่อได้รับภาวะเครียดทำงาน ผลการทดลองพบว่า ถึงแม้ต้น *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 3 สายพันธุ์ จะมีระดับการแสดงออกของชุดโครงสร้างยีน *full-length\_OsNUC1* ที่แตกต่างกันแต่ยังคงรูปแบบที่ใกล้เคียงกัน โดยเมื่อให้การแสดงออกของยีน *full-length\_OsNUC1* ใน *rd\_fl10* ที่ชั่วโมงที่ 0 เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบ (control) คือ กำหนดให้มีระดับการแสดงออกของ *rd\_fl10* ที่ชั่วโมงที่ 0 มีค่าเป็น 1.0 พบว่าต้นสายพันธุ์ *rd\_fl10* และ *rd\_fl16* มีรูปแบบของระดับการแสดงออกที่คล้ายคลึงกันคือ มีระดับการแสดงออกสูงสุดที่ 3 ชั่วโมง โดยมีค่า 62.9 และ 35.8 เท่าตามลำดับเมื่อเทียบกับ control หลังจากนั้นระดับการแสดงออกของยีนจะลดต่ำลงตามระยะเวลาที่ได้รับภาวะเค็ม โดย *rd\_fl16* มีระดับการแสดงออกต่ำที่สุดที่ชั่วโมงที่ 0 (ไม่ได้รับภาวะเค็ม) ในขณะที่ *rd\_fl10* มีระดับการแสดงออกต่ำที่สุดที่ชั่วโมงที่ 6 (ภาพที่ 4.16 และตารางที่ ข-1)

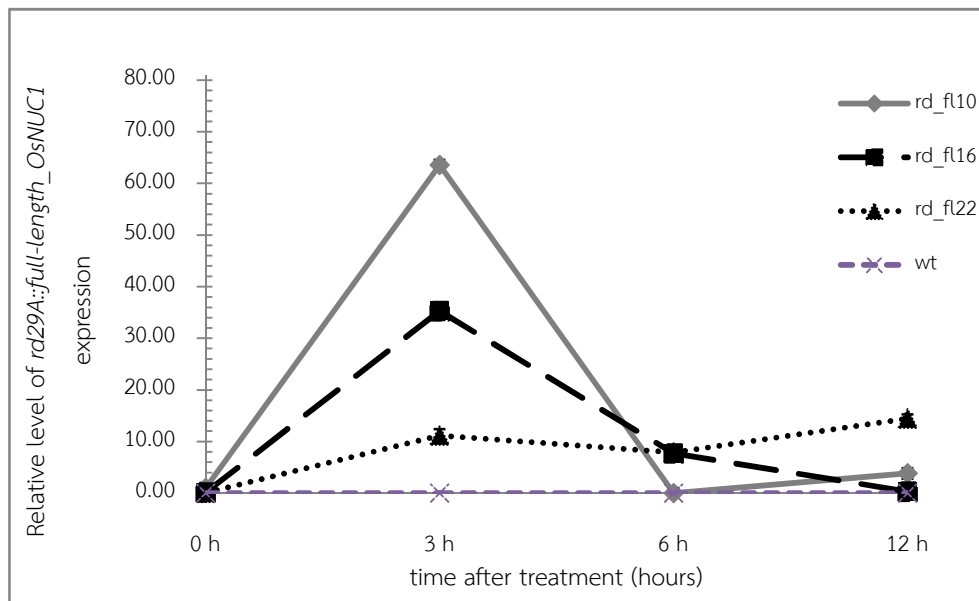
สำหรับต้นสายพันธุ์ *rd\_fl22* พบว่ามีลักษณะการแสดงออกที่แตกต่างไปจาก 2 สายพันธุ์ข้างต้น เนื่องจากมีระดับการแสดงออกของยีน *full-length\_OsNUC1* สูงที่สุดที่ 12 ชั่วโมง คือ 14.3 เท่าเมื่อเทียบกับตัวอย่าง control ซึ่งถือว่าเป็นการแสดงออกของยีนที่ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ *rd\_fl10* และ *rd\_fl16* อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีนใน *rd\_fl22* ที่เวลา 3 ชั่วโมง (11.1 เท่า) มีระดับไม่แตกต่างจากที่ 12 ชั่วโมงมากนัก ระดับการแสดงออกของยีนมีการลดลงเล็กน้อยที่ 6 ชั่วโมง และที่ 0 ชั่วโมงมีระดับการแสดงออกของยีนต่ำที่สุด (ภาพที่ 4.16 และตารางที่ ข-1) สำหรับต้น WT *Arabidopsis* ที่นำมาทำการทดลองร่วมด้วยปรากฏว่า ไม่พบการแสดงออกของยีน *full-length\_OsNUC1* ตลอดระยะเวลาทำการทดลองตามที่คาด (ตารางที่ ข-1)

### 3.2 การแสดงออกของยีน *N'\_OsNUC1* ที่ถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *rd29A*

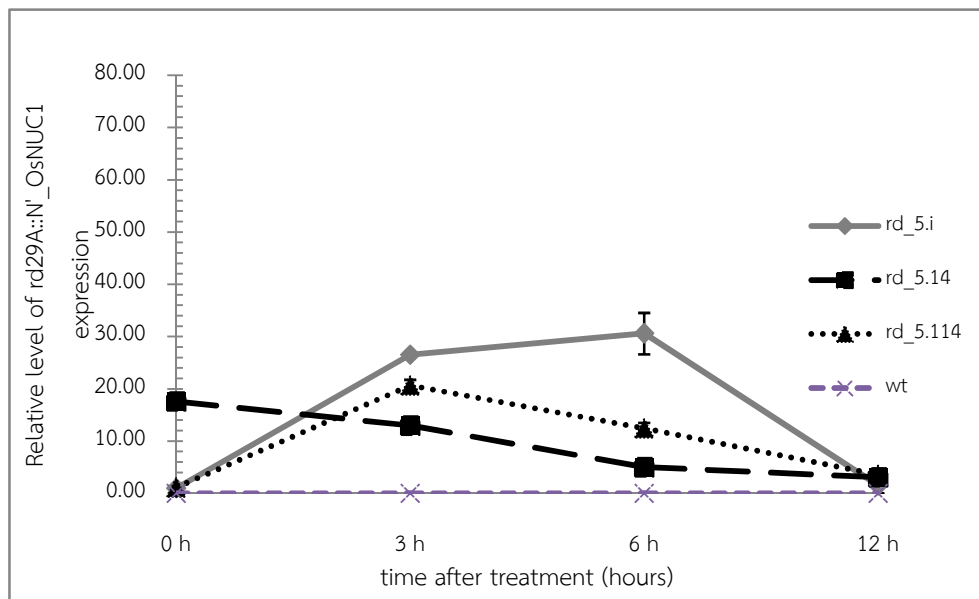
จากการศึกษาการแสดงออกของชุดโครงสร้างยีนในต้น *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* จำนวน 3 สายพันธุ์ที่เป็นอิสระต่อกัน ได้แก่ สายพันธุ์ *rd\_5i* *rd\_5.14* และ *rd\_5.114* ภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็มที่ได้จากอาหาร MS เติม NaCl 100 mM เมื่อกำหนดให้การแสดงออกของยีน *N'\_OsNUC1* ใน *rd\_5i* ที่ชั่วโมงที่ 0 เป็น control และให้ระดับการแสดงออกของยีนเป็น 1.0 เท่า พบว่าสายพันธุ์ *rd\_5i* มีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 ซึ่งเป็นระดับการแสดงออกของยีนที่สูงที่สุด (25.3 เท่า) แล้วลดลงเล็กน้อยที่ชั่วโมงที่ 6 (22.1 เท่า) หลังจากนั้นจึงลดต่ำลงตามระยะเวลาที่ได้รับภาวะเค็ม ซึ่งคล้ายคลึงกับ *rd\_5.114* ที่มีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงที่สุดที่ 3 ชั่วโมง (18.4 เท่า) หลังจากนั้นจึงลดต่ำลงตามระยะเวลาที่ได้รับภาวะเค็ม นอกจากนี้ทั้ง 2 สายพันธุ์ยังมีระดับการแสดงออกของยีนต่ำที่สุดที่ชั่วโมงที่ 0 เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 4.17 และตารางที่ ข-2)

สำหรับสายพันธุ์ *rd\_5.14* พบว่ามีลักษณะการแสดงออกของยีน *N'\_OsNUC1* ในภาวะเครียดจากความเค็มแตกต่างออกไปจากสองสายพันธุ์ข้างต้น เนื่องจากมีระดับการแสดงออกของยีนสูงที่สุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 3 คืออยู่ที่ประมาณ 12-13 เท่าเมื่อเทียบกับ control แล้วลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม โดยมีระดับการแสดงออกของยีนต่ำที่สุดที่ 12 ชั่วโมง ประมาณ 3.5 เท่า (ภาพที่ 4.17 และตารางที่ ข-2) สำหรับการแสดงออกของยีน *N'\_OsNUC1* ในต้น WT *Arabidopsis* ที่นำมาเปรียบเทียบไม่พบการแสดงออกของยีนตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง





ภาพที่ 4.16 ระดับการแสดงออกของยีน *full-length\_OsNUC1* ใน Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* หลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (bar = SE)



ภาพที่ 4.17 ระดับการแสดงออกของยีน *N'\_OsNUC1* ใน Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* หลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (bar = SE)

#### 4. ผลการเติบโตของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* ที่ต่างกัน

เพื่อศึกษาผลการเติบโตของ Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* ที่ต่างกัน ได้นำทั้ง 5 กลุ่มของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรม ได้แก่กลุ่ม (A) *rd29A::full-length\_OsNUC1* กลุ่ม (B) *rd29A::N'\_OsNUC1* กลุ่ม (C) *rd29A::C'\_OsNUC1* (Siriporn Sripinyowanich, 2011) กลุ่ม (D) *35SCaMV::full-length\_OsNUC1* (ธนิกันต์ อุดมโชโลทร, unpublished data) และกลุ่ม (E) *35SCaMV::C'\_OsNUC1* (Siriporn Sripinyowanich, 2011) ที่มีอายุ 7 วัน มาทำการทดลองย้ายปลูกลงอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 1% (w/v) sucrose (ภาวะปกติ) หรืออาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 1% (w/v) sucrose และ NaCl 100 mM (ภาวะเค็ม) เป็นเวลา 2 4 และ 6 วัน โดยมี WT Arabidopsis เป็นชุดควบคุม

##### 4.1 ภาวะปกติ

เมื่อเปรียบเทียบการเติบโตของ Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีนในกลุ่ม (A) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้โมทิฟ *full-length\_OsNUC1* และถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *rd29A* กับ WT Arabidopsis พบว่า สายพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยเฉพาะ *rd\_fl16* มีน้ำหนักสดมากกว่า WT ซึ่งเป็นชุดควบคุมในทุกวันที่ทำการศึกษามีนัยสำคัญทางสถิติ ถึงแม้ว่าเมื่อเริ่มทำการทดลอง (Day 0) ต้น WT จะให้ค่าน้ำหนักสดมากกว่าก็ตาม ขณะที่เมื่อพิจารณาค่าน้ำหนักแห้งและอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (Relative Growth Rate, RGR) รวมถึงความยาวรากแก้วในช่วง 4 วันแรก ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีเพียงในวันที่ 6 หลังทำการทดลองที่ต้น *rd\_fl22* มีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์และความยาวรากแก้วมากกว่า WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนต้น *rd\_fl10* ให้ค่าความยาวรากแก้วมากกว่า WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ไม่แตกต่างจาก WT ในขณะที่ *rd\_fl16* มีแนวโน้มที่ค่าความยาวรากแก้วมีค่ามากกว่า WT (ภาพที่ 4.18 และตารางที่ ข-3)

สำหรับต้น Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีนในกลุ่ม (B) ซึ่งจะถอดรหัส/แปลรหัสให้เฉพาะบริเวณปลายอะมิโนของ *OsNUC1* ภายใต้การทำงานของโปรโมเตอร์ *rd29A* เมื่อเปรียบเทียบกับต้น WT พบว่า ในช่วง 4 วันแรกในภาวะปกติ ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนทุกต้นมีน้ำหนักสดมากกว่าต้น WT ในขณะที่ *rd\_5i* และ *rd\_5.114* มีน้ำหนักแห้งและอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์สูงกว่าต้น WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับความยาวรากแก้วต้นที่ได้รับการถ่ายยีนทุกต้นมีแนวโน้มของความยาวรากยาวกว่าต้น WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.19 ตารางที่ ข-4) แต่ในวันที่ 6 หลังทำการทดลอง ต้น WT มีการปรับตัวและให้น้ำหนักสดที่ไม่แตกต่างจากต้นที่ได้รับการถ่ายยีน ส่วนน้ำหนักแห้งพบว่า น้ำหนักแห้งของ *rd\_5i* และ *rd\_5.14* ไม่แตกต่างจากน้ำหนักแห้งของ WT มีเพียง

rd\_5.114 เท่านั้นที่มีน้ำหนักแห้งสูงกว่า WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ของ WT มีค่าสูงกว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน rd\_5i และ rd\_5.14 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาค่าความยาวรากแก้วของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนพบว่า rd\_5i และ rd\_5.14 มีความยาวรากแก้วมากกว่า WT (ภาพที่ 4.19 และ ตารางที่ ข-4)

สำหรับต้น Arabidopsis ในกลุ่ม (C) ที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้โมทิฟ C'\_OsNUC1 ที่มี RRM 2 บริเวณร่วมกับ GAR และถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *rd29A* เมื่อเปรียบเทียบกับต้น WT ในภาวะปกติพบว่า ค่าน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งและอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนไม่สูงกว่าต้น WT มีเพียงความยาวรากแก้วของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนที่มีความยาวมากกว่าต้น WT โดยเฉพาะ rd\_3.9 ที่มีความยาวรากแก้วเป็น 1.5 เท่า ของต้น WT (ภาพที่ 4.20 และ ตารางที่ ข-5)

เมื่อทำการเปรียบเทียบการเติบโตของต้น WT กับต้นที่ได้รับการถ่ายยีนในกลุ่ม (D) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้โมทิฟ Full-length\_OsNUC1 ซึ่งประกอบไปด้วยบริเวณ N'\_OsNUC1 และ RRM และ GAR ในบริเวณปลาย C'\_OsNUC1 ภายใต้การทำงานของโปรโมเตอร์ *35SCaMV* ที่เป็นโปรโมเตอร์แบบแสดงออกตลอดเวลาพบว่า ต้น WT มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากกว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตลอดระยะเวลา 4 วันที่ทำการทดลอง สำหรับในวันที่ 6 ต้น WT มีน้ำหนักแห้งใกล้เคียงกับต้นอื่น ๆ ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับผลของอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ระหว่างวันที่ 4-6 ที่ต้น WT มีค่าน้อยกว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนโดยเฉพาะต้น *ox\_fl23* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับความยาวรากแก้วจะพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก็เมื่อทำการทดลองเป็นระยะเวลา 4 วัน โดยต้นที่ได้รับการถ่ายยีนทุกสายพันธุ์จะมีความยาวรากแก้วมากกว่าต้น WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.21 และ ตารางที่ ข -6)

เมื่อพิจารณาการเติบโตของ Arabidopsis ในกลุ่ม (E) ที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้โมทิฟ C'\_OsNUC1 ที่ถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *35SCaMV* เปรียบเทียบกับ WT พบว่า ช่วง 4 วันแรกทำการทดลอง ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีน้ำหนักสดมากกว่า WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในวันที่ 6 ต้น WT มีการปรับตัวและให้น้ำหนักสดใกล้เคียงกับต้นที่ได้รับการถ่ายยีน สำหรับน้ำหนักแห้ง ถึงแม้ว่าเมื่อเริ่มทำการทดลองต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *ox\_3.7* จะมีน้ำหนักแห้งมากกว่า WT และ *ox\_3.5* แต่ในวันที่ 6 ของการทดลองจะพบว่า *ox\_3.5* มีน้ำหนักแห้งมากที่สุด มากกว่า WT และ *ox\_3.7* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับค่าอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ระหว่างวันที่ 4 และ 6 ของ *ox\_3.5* ที่มีค่ามากที่สุดเช่นกัน สำหรับความยาวรากแก้วพบว่า ช่วงแรกของการทดลอง WT มีความยาวรากแก้วยาวกว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในวันที่ 4

ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเริ่มมีการปรับตัวและมีความยาวรากแก้วที่ใกล้เคียงกับ WT ซึ่งเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 6 จะพบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนทั้ง ox\_3.7 และ ox\_3.5 มีความยาวรากแก้วมากกว่า WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.22 และตารางที่ ข-7)

#### 4.2 ภาวะเค็ม

เมื่อเปรียบเทียบ WT กับต้นที่ได้รับการถ่ายยีนในกลุ่ม (A) ที่มี full-length\_OsNUC1 ซึ่งประกอบไปด้วยบริเวณ N'\_OsNUC1 และบริเวณปลาย C'\_OsNUC1 พบว่า น้ำหนักสดของ WT มีค่ามากกว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเกือบทุกสายพันธุ์ยกเว้น rd\_16 ที่มีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาค่าน้ำหนักแห้ง อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์และความยาวรากแก้ว พบว่า WT มีการเติบโตที่ไม่แตกต่างจากสายพันธุ์ rd\_10 และ rd\_22 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ rd\_16 เพียงสายพันธุ์เดียวเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วันพบว่า WT มีการเติบโตในภาวะเค็มในทุกพารามิเตอร์ต่ำกว่า rd\_16 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามความยาวรากแก้วของทุกต้นที่นำมาศึกษา พบความแตกต่างของความยาวรากแก้วในวันที่ 2 ที่ทำทดลองเท่านั้น ส่วนวันที่ 4 และ 6 หลังได้รับ NaCl ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 4.23 และตารางที่ ข-3)

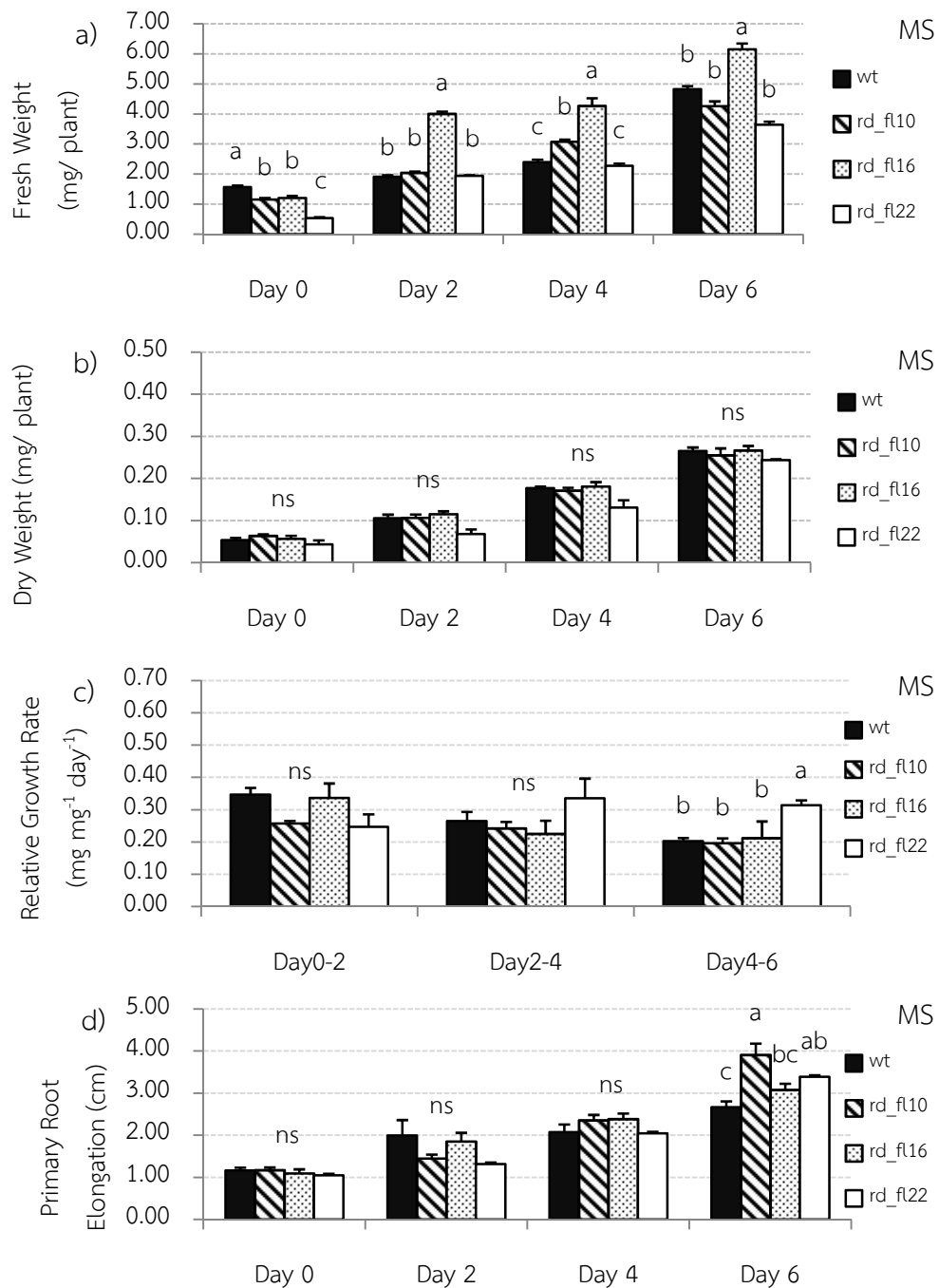
เมื่อพิจารณาผลของภาวะเค็มที่มีต่อการเติบโตของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมในกลุ่ม (B) ซึ่งถอดรหัส/แปลรหัสให้เฉพาะบริเวณปลายอะมิโนของ OsNUC1 ที่ควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *rd29A* เปรียบเทียบกับ WT พบว่า ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจะมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากกว่าต้น WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตลอดการทดลองที่พืชได้รับภาวะเค็ม มีเพียง rd\_5.14 ที่มีทั้งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งใกล้เคียงกับ WT สำหรับอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์พบว่า เฉพาะในระหว่างวันที่ 2 และ 4 หลังได้รับภาวะเค็ม ที่ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน rd\_5i มีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์มากกว่า WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนวันอื่น ๆ ที่ทำการทดลองไม่พบความแตกต่างของค่าอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ สำหรับความยาวรากแก้วพบว่า ต้นดัดแปรพันธุกรรมเกือบทุกสายพันธุ์มีความยาวรากแก้วมากกว่า WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อวัดความยาวในวันที่ 4 หลังได้รับภาวะเค็ม โดยมีเพียงต้น rd\_5.114 ที่มีค่าความยาวรากแก้วใกล้เคียงกับ WT อย่างไรก็ตามเมื่อวัดความยาวรากแก้วในวันที่ 6 หลังย้ายปลูกในภาวะเค็มไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง WT และต้นที่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่ 4.24 และ ตารางที่ ข-3)

สำหรับต้น Arabidopsis ในกลุ่ม (C) ที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้โมทิฟ C'\_OsNUC1 เมื่อเปรียบเทียบกับ WT พบว่า ในช่วง 4 วันแรกที่ได้รับ NaCl ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเกือบทุกสายพันธุ์มีน้ำหนักสดใกล้เคียงกับ WT มีเพียง rd\_3.10 สายพันธุ์เดียวที่มีน้ำหนักสดน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามหลังได้รับภาวะเค็มเป็นระยะเวลา 6 วันจะพบว่า WT มี

น้ำหนักสดมากกว่าทุกสายพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีน ผลการทดลองดังกล่าวใกล้เคียงกับค่าน้ำหนักแห้งและอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ของ WT เมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วันที่มีค่ามากกว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเกือบทุกสายพันธุ์ยกเว้น rd\_3.9 อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่า เมื่อพิจารณาความยาวรากแก้วของทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษา ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตลอดระยะเวลาทำการทดลอง (ภาพที่ 4.25 และตารางที่ ข-4)

เมื่อพิจารณาผลของ NaCl ที่มีต่อการเติบโตของต้น Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีนในกลุ่ม (D) Full-length\_OsNUC1 ซึ่งถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ 35SCaMV เปรียบเทียบกับต้น WT พบว่าต้น WT มีน้ำหนักสดมากกว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเกือบทุกระยะที่ทำการทดลอง ซึ่งเมื่อพิจารณาอย่างละเอียดจะพบว่า WT มีน้ำหนักสดมากกว่าต้นในกลุ่ม (D) ตั้งแต่ Day 0 อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาที่น้ำหนักแห้งพบว่ามีเพียงวันที่ 4 หลังได้รับภาวะเค็มเท่านั้นที่ต้น WT ให้ค่าน้ำหนักแห้งมากกว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน ox\_fl31 (แต่ก็ยังเป็นค่าที่น้อยกว่าต้น ox\_fl23) ส่วนวันอื่น ๆ ที่ทำการทดลองไม่พบความแตกต่างของน้ำหนักแห้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์และความยาวรากแก้วพบว่า ox\_fl31 มีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ระหว่างวันที่ 4 และ 6 มากกว่าต้น WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับความยาวรากแก้ว ถึงแม้ช่วงแรกต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจะมีความยาวรากแก้วไม่แตกต่างกับของ WT มากนัก แต่ก็มีแนวโน้มยาวกว่าเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นระยะเวลานานขึ้น โดยเห็นได้ชัดเจนในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็มที่ความยาวรากแก้วของ ox\_fl23 มีค่ามากกว่าความยาวรากแก้วของ WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ ox\_fl31 ก็มีแนวโน้มของความยาวรากแก้วมากกว่า WT เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 4.26 และตารางที่ ข-5)

สำหรับต้น Arabidopsis ในกลุ่ม (E) ที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้โมทิฟ C'\_OsNUC1 และถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ 35SCaMV เมื่อเปรียบเทียบกับ WT พบว่า ถึงแม้ช่วง 4 วันแรกที่ได้รับภาวะเค็มต้นสายพันธุ์ ox\_3.7 จะให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากกว่า WT แต่เมื่อได้รับภาวะเค็มนานขึ้นเป็น 6 วัน WT มีการปรับตัวให้ค่าน้ำหนักสดที่มากกว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนทั้ง 2 สายพันธุ์ สอดคล้องกับค่าน้ำหนักแห้งที่ WT มีการปรับตัวให้ค่าใกล้เคียงกับต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเช่นเดียวกัน สำหรับอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ช่วง 2 วันแรกพบว่า ox\_3.7 มีอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์มากกว่า WT และ ox\_3.5 แต่เมื่อได้รับความเค็มเป็นระยะเวลานาน 6 วัน พบว่า WT สามารถปรับตัวได้และให้อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์สูงกว่าต้นอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความยาวรากแก้วพบว่า ทั้ง WT และ ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีแนวโน้มของความยาวรากแก้วที่ค่าความยาวใกล้เคียงกันในวันที่ 6 หลังได้รับภาวะเค็ม โดยช่วง 4 วันแรกทำการทดลอง WT จะมีความยาวรากแก้วใกล้เคียงกับ ox\_3.7 (ภาพที่ 4.27 และตารางที่ ข-6)

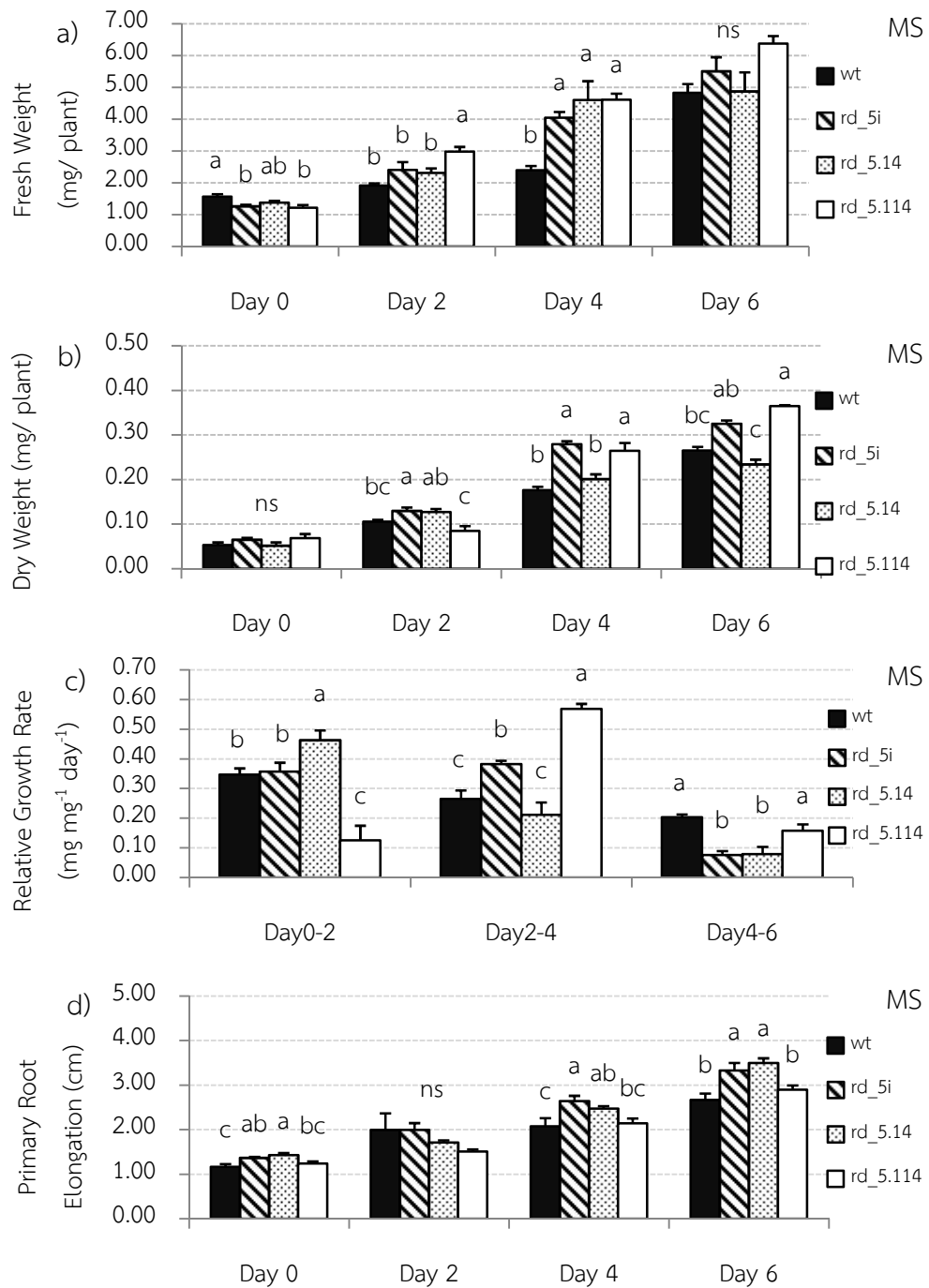


ภาพที่ 4.18 น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) และความยาวรากแก้ว (d) ของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรม (A): *rd29A::full-length\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกลงบนอาหาร MS เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ )

เปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้หลังจากย้ายปลูกลงเป็นระยะเวลาเดียวกันเท่านั้น

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

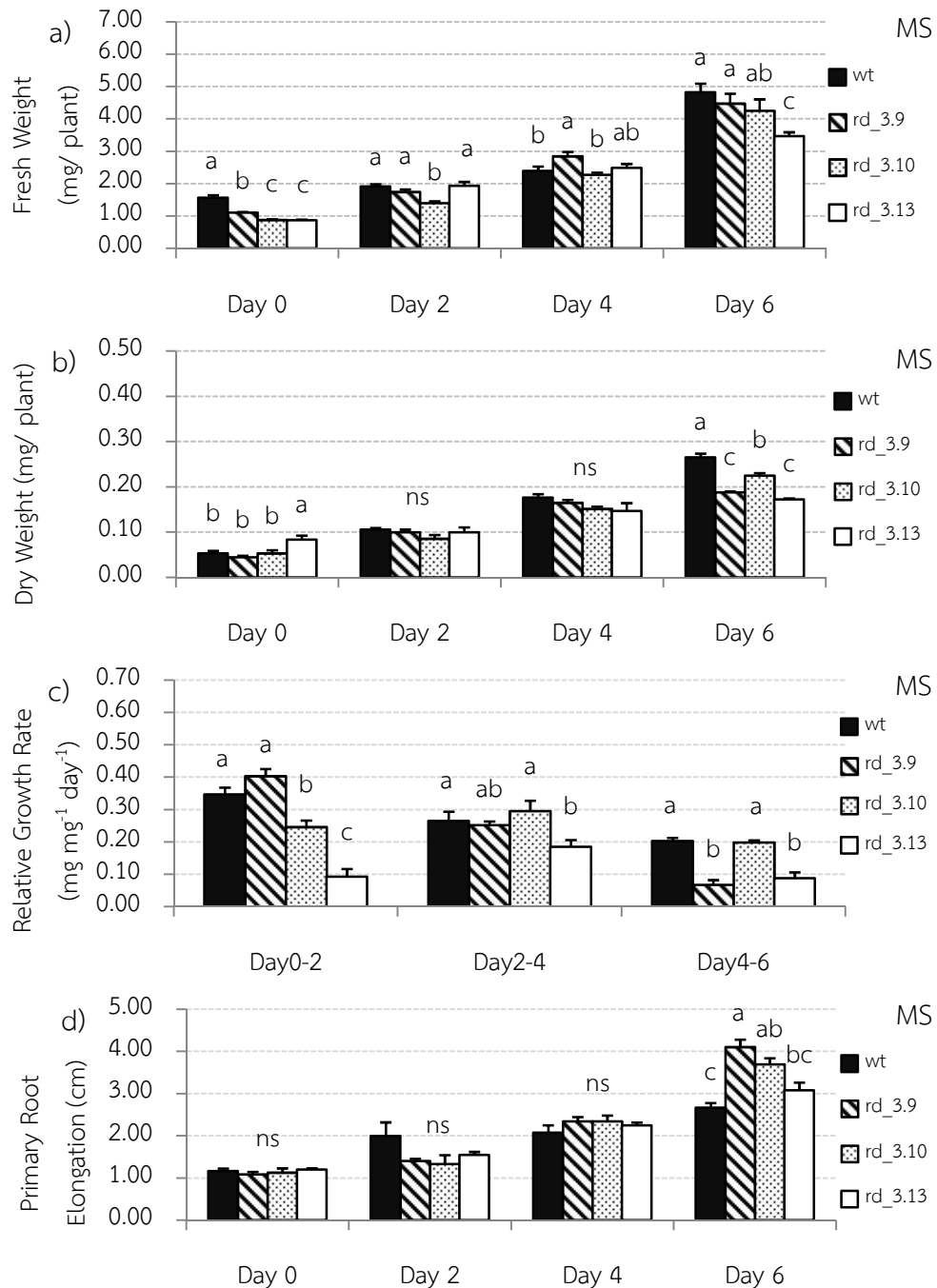


ภาพที่ 4.19 น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) และความยาวรากแก้ว (d) ของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรม (B): *rd29A::N'\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกลงอาหาร MS เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ )

เปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้หลังจากย้ายปลูกลงเป็นระยะเวลาเดียวกันเท่านั้น

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



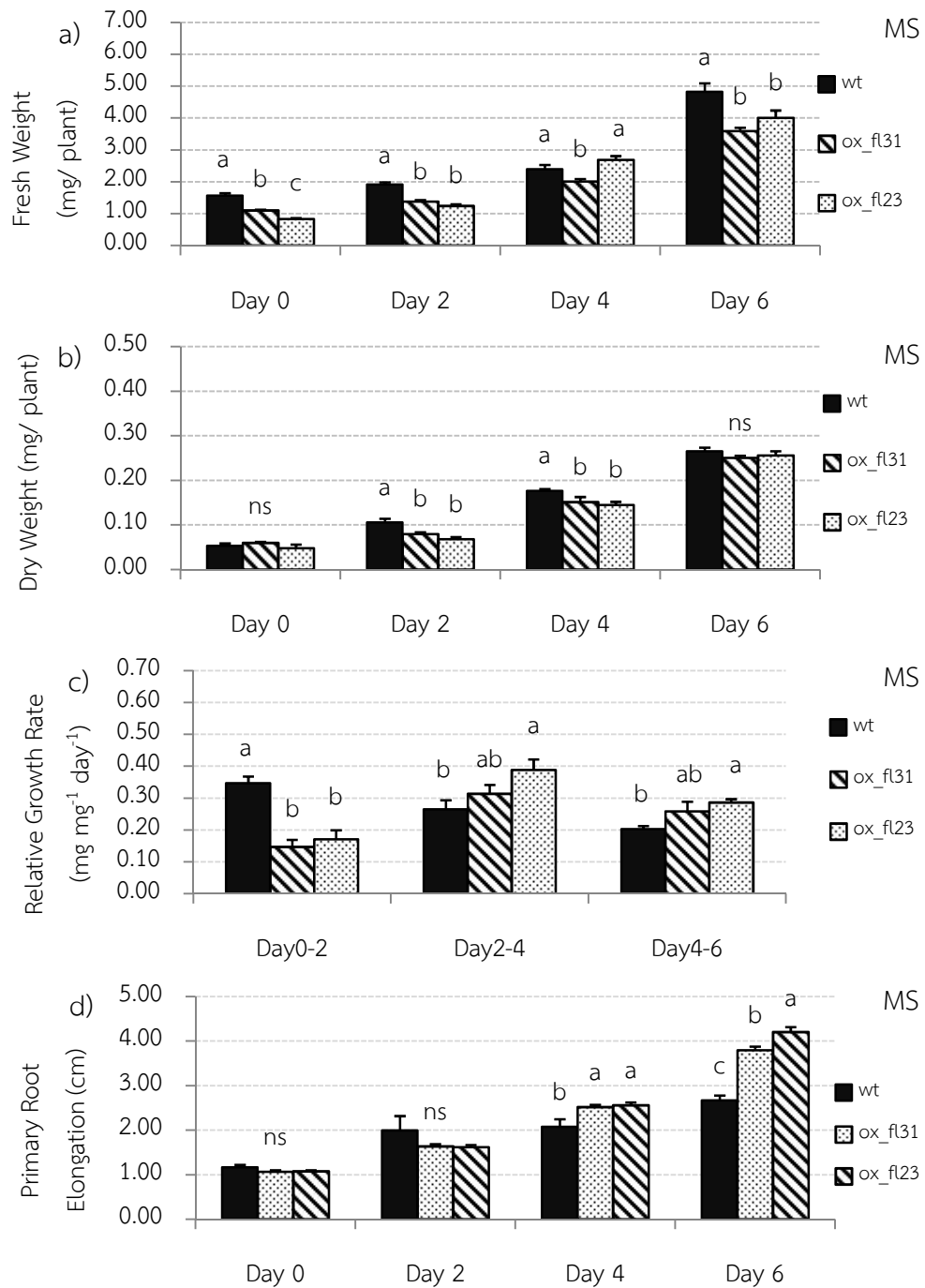
ภาพที่ 4.20 น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) และความยาวรากแก้ว (d) ของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรม (C): *rd29A::C'\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกลงอาหาร MS เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ )

เปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้หลังจากย้ายปลูกลงเป็นระยะเวลาเดียวกันเท่านั้น

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



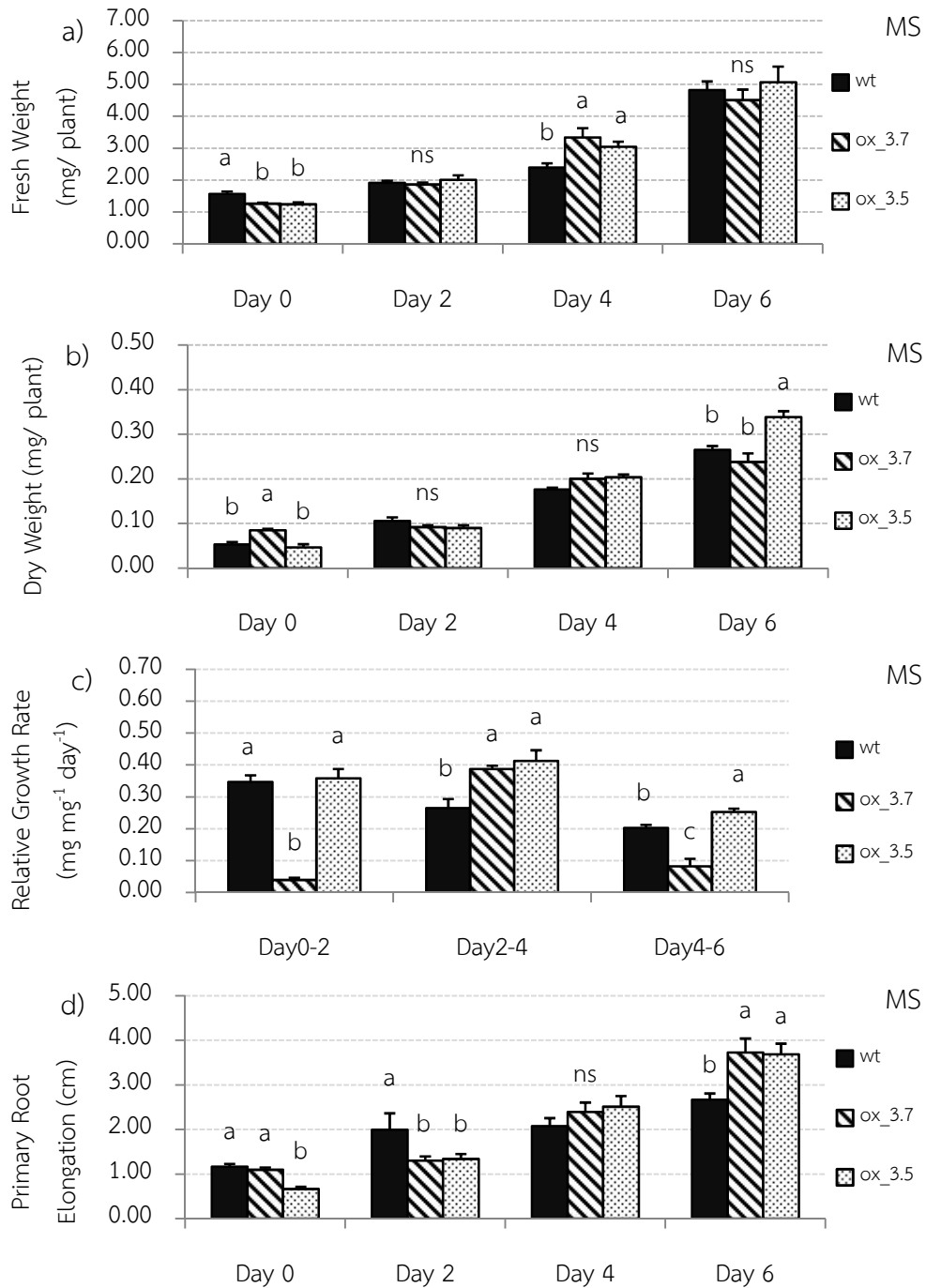


ภาพที่ 4.21 น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) และความยาวรากแก้ว (d) ของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรม (D): *35SCaMV::full-length\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกบนอาหาร MS เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ )

เปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้หลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลาเดียวกันเท่านั้น

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

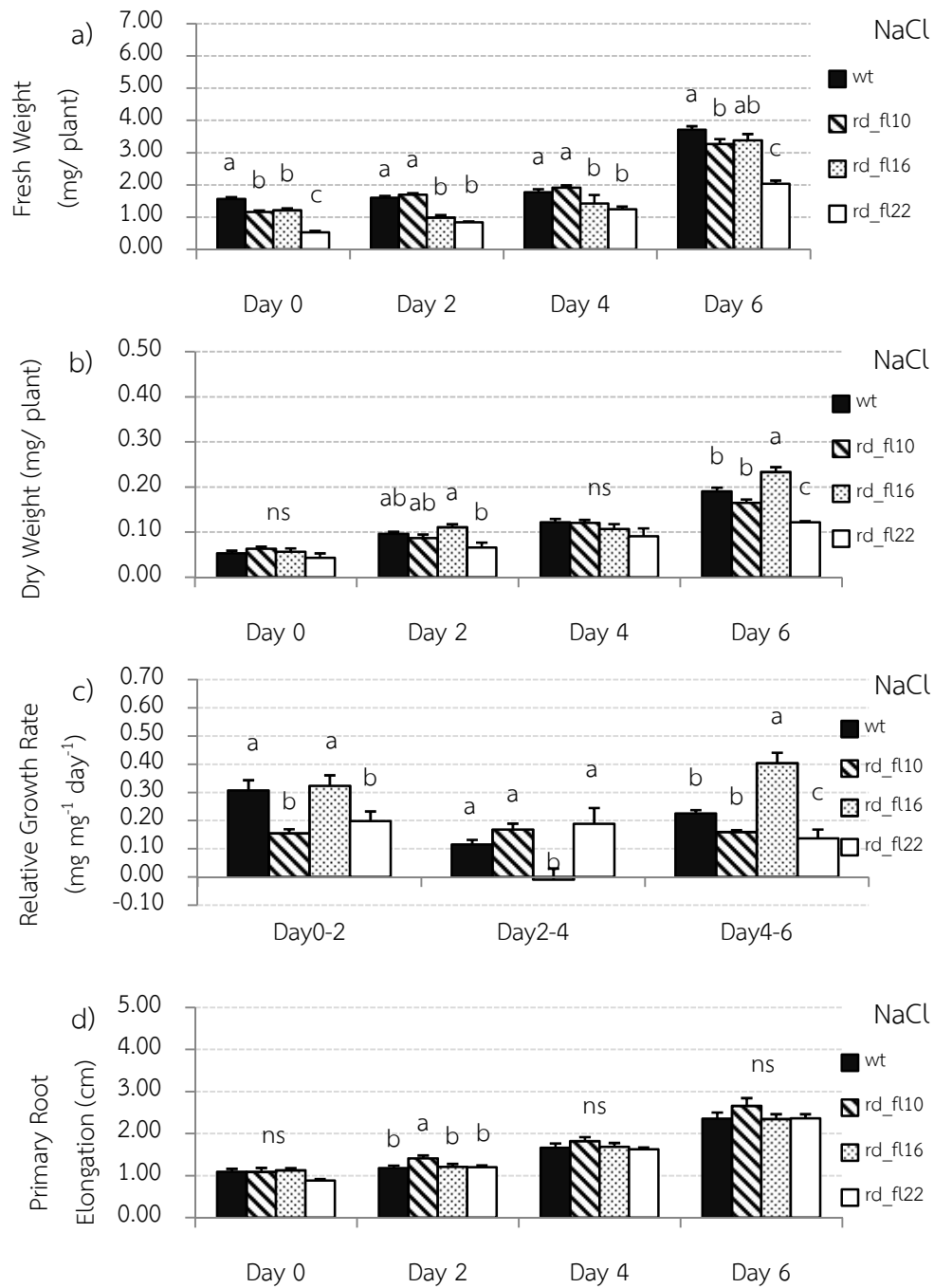


ภาพที่ 4.22 น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) และความยาวรากแก้ว (d) ของ *Arabidopsis* ตัดแปรพันธุกรรม (E): *35SCaMV::C'\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกลงอาหาร MS เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ )

เปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้หลังจากย้ายปลูกลงเป็นระยะเวลาเดียวกันเท่านั้น

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

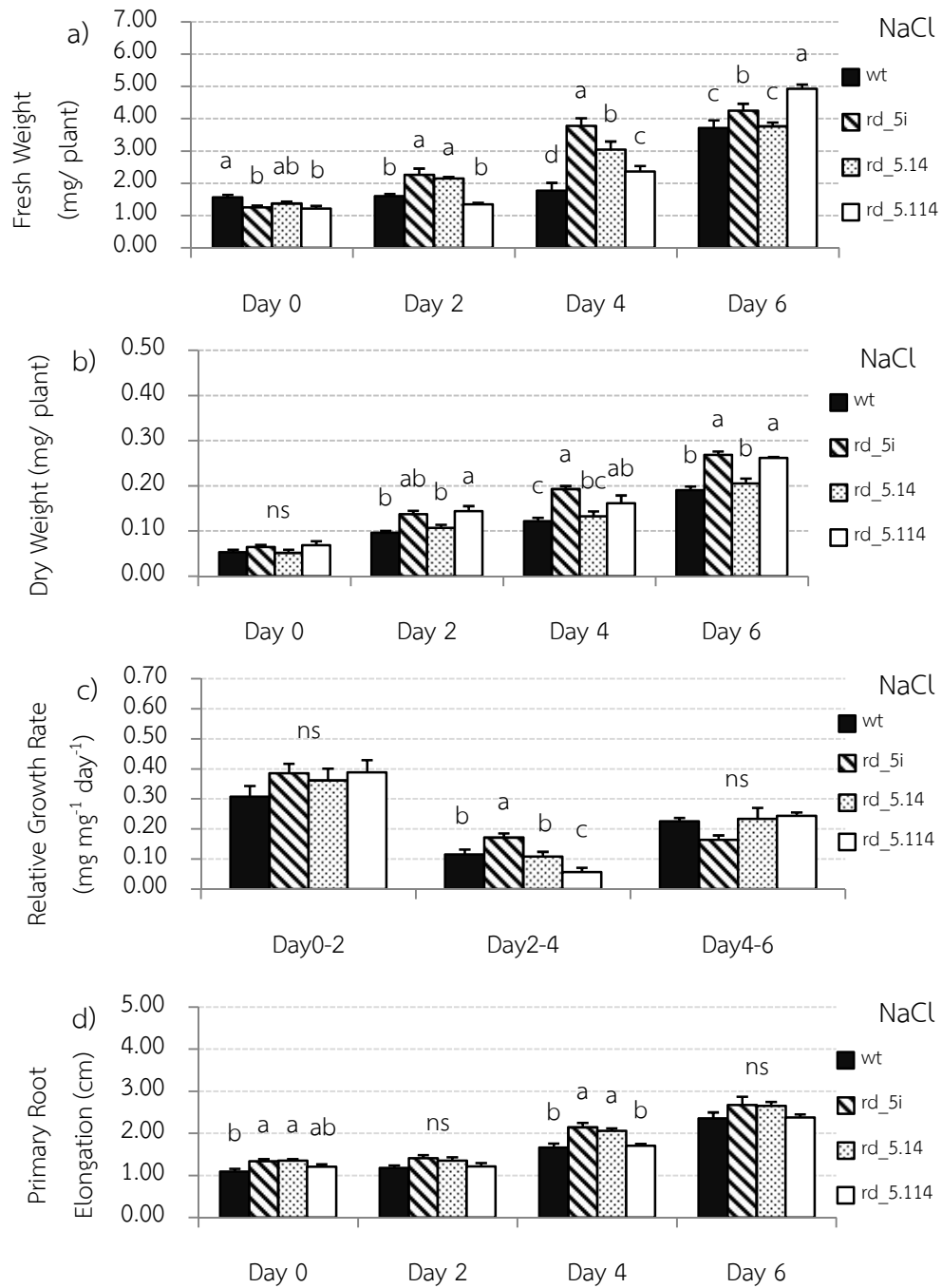


ภาพที่ 4.23 น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) ความยาวรากแก้ว (d) ของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรม (A): *rd29A::full-length\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกลงอาหาร MS ที่เติม NaCl 100 mM เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ )

เปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้หลังจากย้ายปลูกลงเป็นระยะเวลาเดียวกันเท่านั้น

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

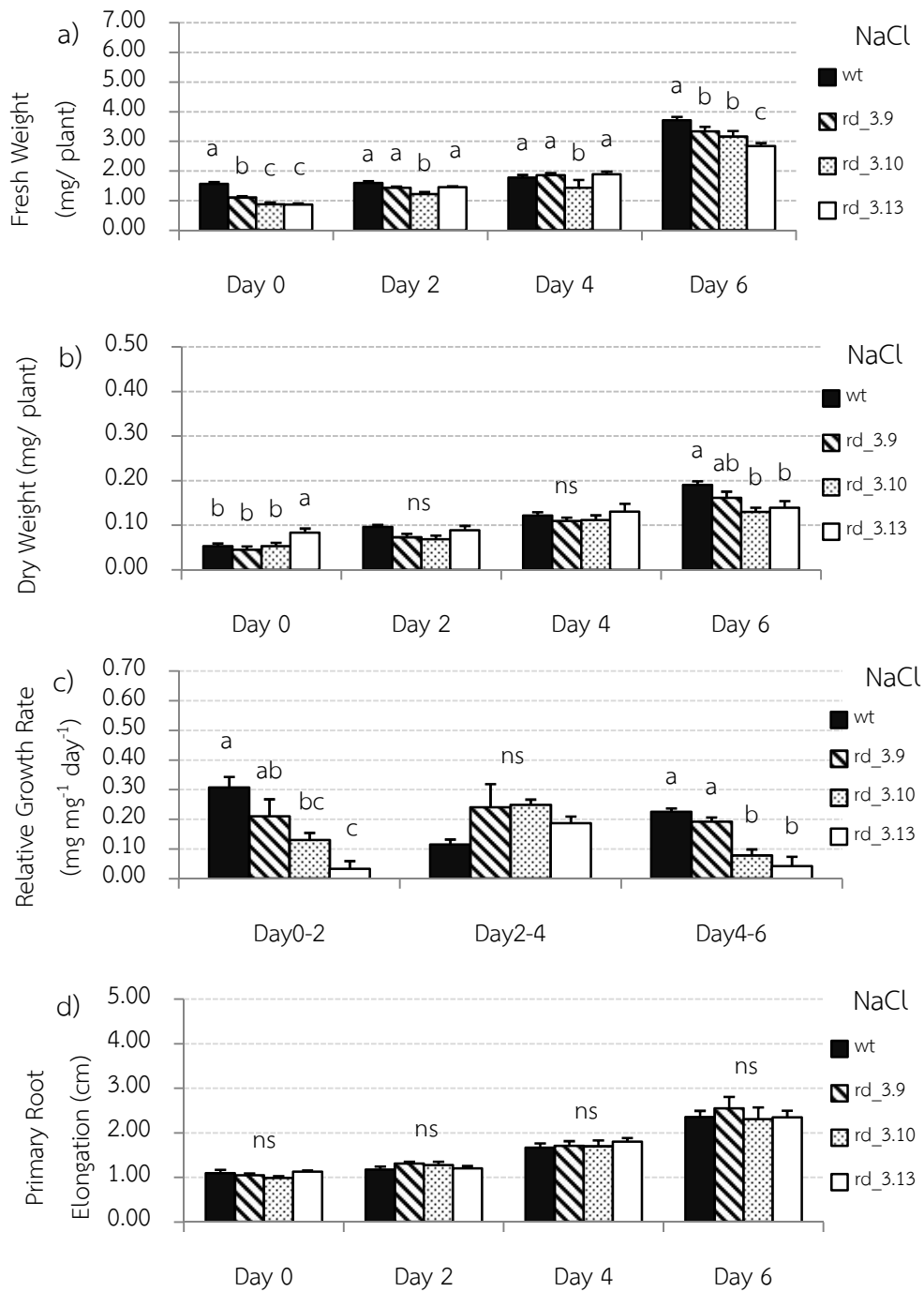


ภาพที่ 4.24 น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) ความยาวรากแก้ว (d) ของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรม (B): *rd29A::N'\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกลงบนอาหาร MS ที่เติม NaCl 100 mM เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ )

เปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้หลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลาเดียวกันเท่านั้น

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

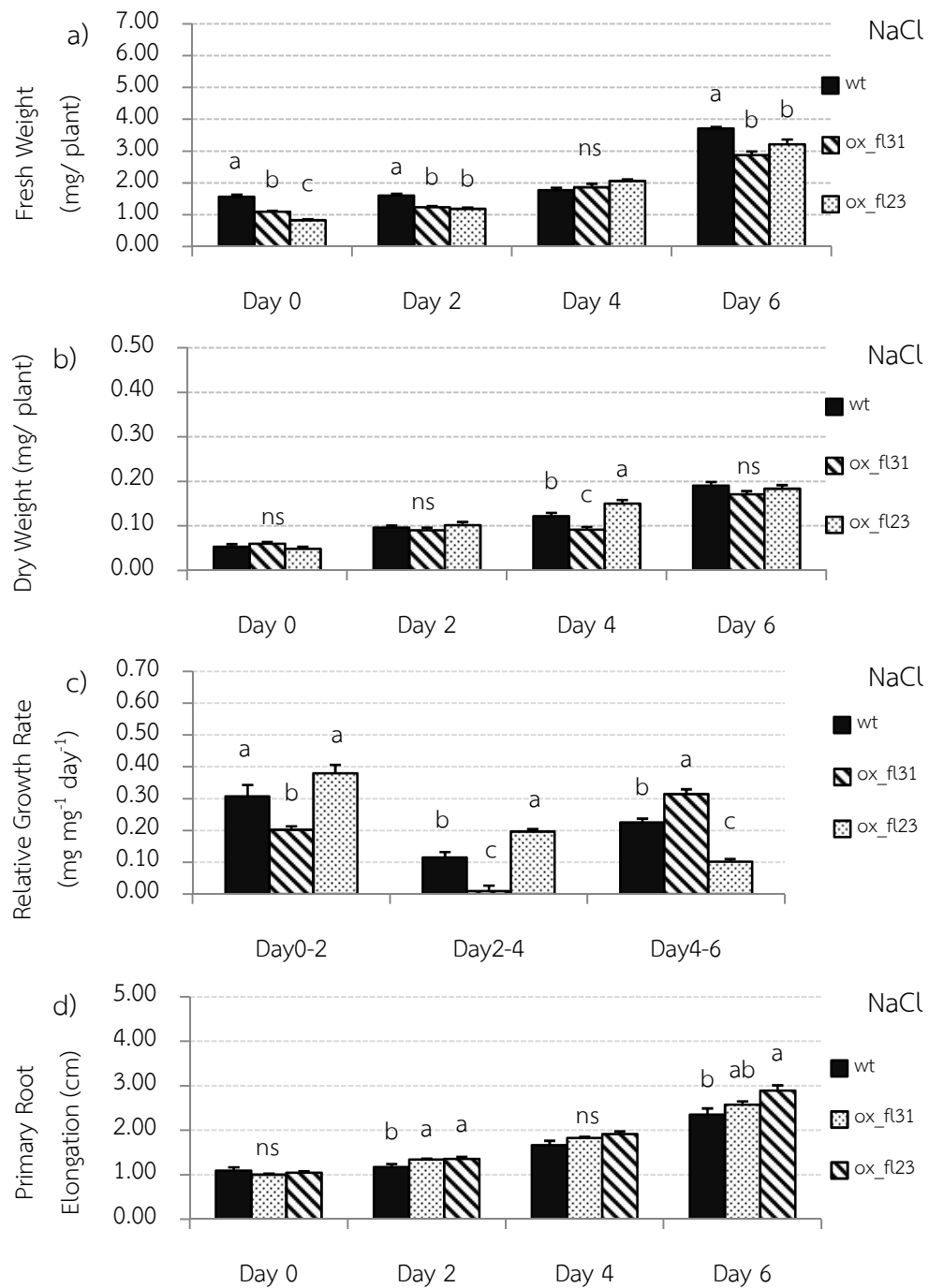


ภาพที่ 4.25 น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) ความยาวรากแก้ว (d) ของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรม (C): *rd29A::C'OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกลงบนอาหาร MS ที่เติม NaCl 100 mM เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ )

เปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้หลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลาเดียวกันเท่านั้น

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

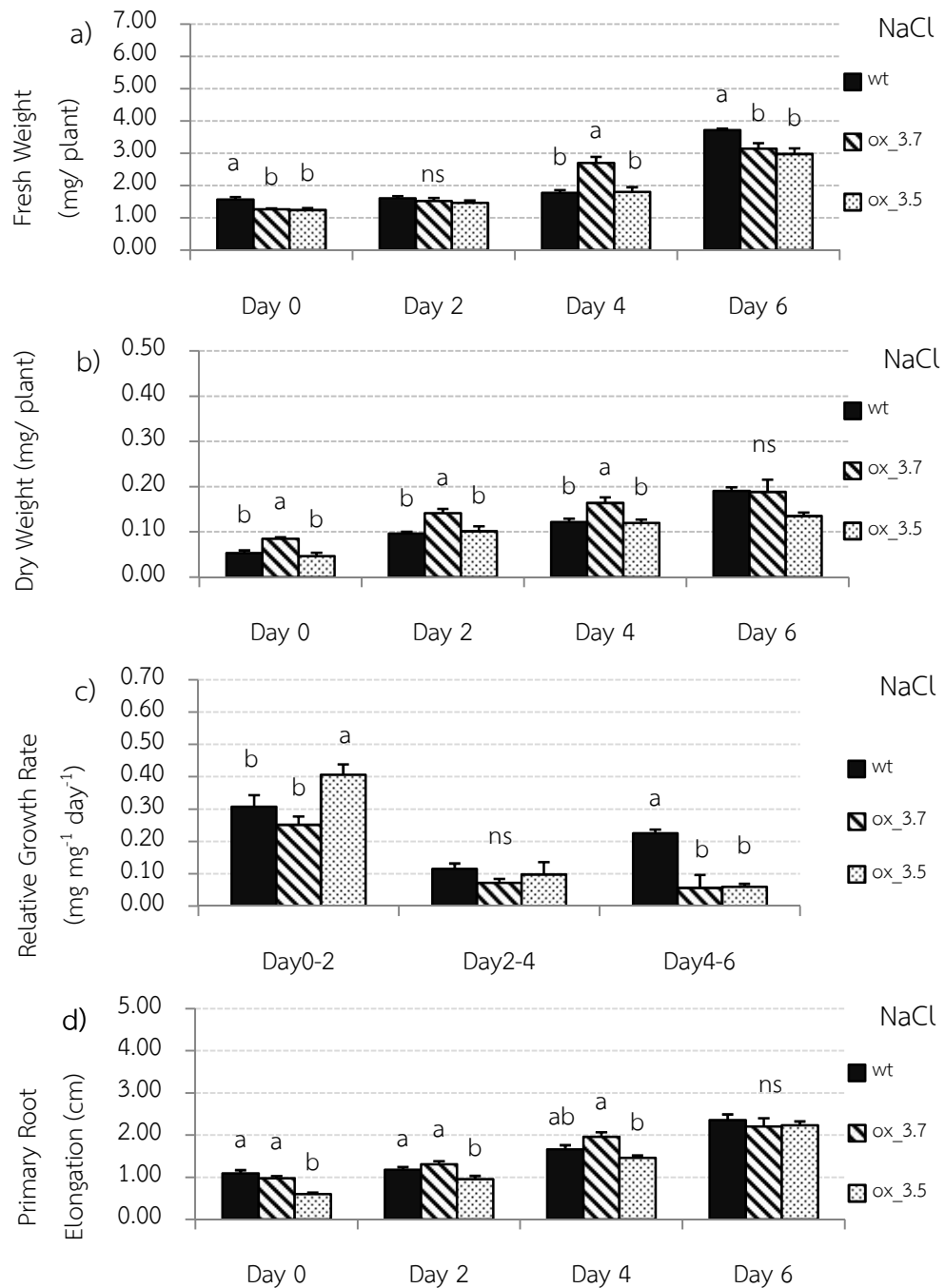


ภาพที่ 4.26 น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) ความยาวรากแก้ว (d) ของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรม (D): *35SCaMV::Full-length\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกบนอาหาร MS ที่เติม NaCl 100 mM เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ )

เปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้หลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลาเดียวกันเท่านั้น

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



ภาพที่ 4.27 น้ำหนักสด (a) น้ำหนักแห้ง (b) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (c) ความยาวรากแก้ว (d) ของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรม (E): *35SCaMV::C' - OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกบนอาหาร MS ที่เติม NaCl 100 mM เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน (bar = SE)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ )

เปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้หลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลาเดียวกันเท่านั้น

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการทดลอง

#### 1. สร้าง Arabidopsis คัดแปรพันธุกรรมที่มีโมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบต่างกัน

กลไกการปรับตัวของพืชซึ่งมีผลมาจากการแสดงออกของยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้โปรตีนที่สามารถลดความเสียหายที่พืชได้รับจากภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม ถือเป็นสิ่งสำคัญที่ช่วยให้พืชมีชีวิตรอดและให้ผลผลิตต่อไร่มากขึ้นใกล้เคียงกับในภาวะปกติ นอกเหนือจากการแสดงออกของยีน กระบวนการอย่าง post-transcription post-translation และ gene regulation รวมถึงการทำงานของ RNA ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่มีส่วนในการตอบสนองของพืชต่อสัญญาณที่เกิดจากภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมเช่นกัน (Ambrosone *et al.*, 2012; Lorković and Barta, 2002)

Lorković และ Barta (2002) รายงานว่า RNA-binding proteins (RBPs) ถือเป็นองค์ประกอบสำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ gene regulation ในระดับ post-transcription ทั้งทางตรงและทางอ้อม โมทิฟที่พบกระจายอยู่มากที่สุดใน RBPs คือกลุ่มของ RRM โดย RBPs ที่มีบริเวณ RRM อยู่ทางฝั่งปลายอะมิโนมักจะมีโดเมนอย่าง glycine-rich (GR) และ zinc finger อยู่ทางฝั่งคาร์บอกซิลเป็นส่วนประกอบ (Nakaminami *et al.*, 2012) ซึ่งโครงสร้างที่กล่าวมาข้างต้น คล้ายคลึงกับโครงสร้างของ *OsNUC1* ที่สมพร มณีประสพสุข (2547) ศึกษาพบการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับภาวะเค็ม โดย *OsNUC1* มีบริเวณ acidic-serine-rich และ NLS เพิ่มขึ้น

ในงานวิจัยนี้ต้องการที่จะศึกษาการทำงานของ *OsNUC1* ในแต่ละโมทิฟเมื่อได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม โดยเริ่มจากการสร้างชุดโครงสร้างยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้ *full-length\_OsNUC1* และ *N'\_OsNUC1* ภายใต้การควบคุมการทำงานของโปรโมเตอร์แบบแสดงออกเฉพาะเมื่อได้รับภาวะแล้ง (*rd29A*) ซึ่งให้ชื่อว่าชุดโครงสร้างยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* และชุดโครงสร้างยีน (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* ตามลำดับ สำหรับชุดโครงสร้างยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้ *N'\_OsNUC1* ที่เชื่อมต่อกับโปรโมเตอร์ *35SCaMV* (ชุดโครงสร้างยีน (III): *pJim19::35SCaMV::N'\_OsNUC1*) ได้รับความอนุเคราะห์ DNA ซึ่งเป็นชุดโครงสร้างยีนจาก ธนิกันต์ อุดมชโลทร (unpublished data)

หลังจากถ่ายชุดโครงสร้างยีนข้างต้นเข้าสู่ *Arabidopsis* พบว่า ประสิทธิภาพของการถ่ายชุดโครงสร้างยีนอยู่ระหว่าง 1.0 ถึง 1.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Clough และ Bent (1998) ที่มีประสิทธิภาพของการถ่ายยีนด้วยวิธี *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation อยู่ระหว่าง 0.5 ถึง 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทางผู้วิจัยได้นำเสนอว่าสิ่งสำคัญที่เป็นตัวกำหนดประสิทธิภาพของการถ่ายยีนมี 3 ประการ คือ 1) ระยะเวลาเจริญเติบโตของ *Arabidopsis*



ที่เหมาะสมที่นำมาใช้ในการถ่ายยีน ได้แก่ ต้นที่มีความยาวของ secondary bolt ประมาณ 5-10 cm โดยดอก Arabidopsis ที่ใช้จุ่มต้องมีลักษณะตูม (closed flower bud) ซึ่งจะให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีน 0.8 เปอร์เซ็นต์ 2) ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้ ซึ่งให้ผลคล้ายคลึงกันไม่ว่าจะใช้น้ำตาลกลูโคสหรือซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5 หรือ 5 เปอร์เซ็นต์ ก็ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนเป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 3) สารลดแรงตึงผิว Silwet L-77 ที่ความเข้มข้น 0.02% ซึ่งให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนที่ 1.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทั้ง 3 เงื่อนไขข้างต้นได้ถูกเลือกมาใช้ในงานวิจัยนี้

งานวิจัยของ Chung และคณะ (2000) กล่าวถึงระยะเวลาในการจุ่มดอก Arabidopsis ลงในสารแขวนลอย *Agrobacterium* ว่าเป็นอีกหนึ่งพารามิเตอร์ที่ส่งผลกับประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่ Arabidopsis แบบ in planta โดยพบว่าการจุ่มดอกลงในสารแขวนลอย *Agrobacterium* สายพันธุ์ GV3101 ที่มีชิ้นส่วน DNA ของยีน rice cytosolic CuZnSOD (*sod1*) เป็นเวลา 5 วินาที และ 5 นาทีจะมีอัตราความสำเร็จของการถ่ายยีนเป็น 0.92 และ 2.09 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้การให้ดอกสัมผัสกับสารแขวนลอย *Agrobacterium* หลายครั้งก็ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนด้วยเช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น จุ่มดอกลงในสารแขวนลอยทุก 6 วัน เป็นจำนวน 3 ครั้ง โดยใช้ระยะเวลาในการจุ่ม 5 วินาทีหรือ 5 นาทีจะให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนที่ประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ (Clough and Bent, 1998) หรือการหยดสารแขวนลอย *Agrobacterium* ลงไปที่ดอกตูมโดยตรงที่ละดอกเป็นเวลา 3 ครั้ง ทั้งระยะห่างครั้งละ 4 วัน จะให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนประมาณ 1.1 เปอร์เซ็นต์ (Martinez-Trujillo *et al.*, 2004) หรือการสเปรย์สารแขวนลอย *Agrobacterium* ลงบนดอกตูมโดยสเปรย์ซ้ำ 3 ครั้งก็ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงเช่นกัน (0.95–3.86 เปอร์เซ็นต์) (Chung *et al.*, 2000) ในงานวิจัยนี้แม้ว่าจะใช้วิธีจุ่มดอกตูมในสารแขวนลอย *Agrobacterium* เพียง 1 ครั้งแต่ก็ให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนอยู่ในเกณฑ์ที่ใกล้เคียงกับงานวิจัยอื่น ซึ่งอาจเกิดจากระยะเวลาที่ใช้ในการจุ่มดอก Arabidopsis ที่นานถึง 15 นาที ซึ่งคาดว่าระยะเวลาที่นานกว่าในงานวิจัยอื่นถึง 3 เท่านี้ จะก่อให้เกิดจำนวนบาดแผลตรงบริเวณเนื้อเยื่อของดอก Arabidopsis ที่สัมผัสกับ Silwet L-77 มากขึ้น ซึ่งน่าจะส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณ *Agrobacterium* ให้เข้าเกาะกับเซลล์พืชตรงบริเวณที่มีบาดแผลได้มากขึ้น

ทั้งนี้หากเปลี่ยนความเข้มข้นของสารแขวนลอย *Agrobacterium* ที่ใช้สำหรับถ่ายยีนเข้าสู่ Arabidopsis (inoculum OD<sub>600</sub>) ให้มีค่ามากกว่า 2.0 ก็ส่งผลให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนเข้าสู่ Arabidopsis ในงานวิจัยนี้เพิ่มสูงขึ้นได้อีก เนื่องจากมีรายงานว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารแขวนลอย *Agrobacterium* จากที่มีค่า OD<sub>600</sub> = 0.8 ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ในงานวิจัยนี้ตามวิธีของ Clough และ Bent (1998) ให้เป็น OD<sub>600</sub> มากกว่า 2.0 ช่วยเพิ่มอัตราความสำเร็จของการถ่ายยีนจาก 1.03 เป็น 2.57 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณ *Agrobacterium* ที่จะเข้าไปยัง ovary ของดอก Arabidopsis ให้มีมากขึ้น (Martinez-Trujillo *et al.*, 2004)

## 2. ตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนยีนใน *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่สร้างขึ้น

เนื่องจากความต้องการนำยีนที่ควบคุมลักษณะบางประการที่เป็นประโยชน์เข้าสู่จีโนมพืชเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะดีตามต้องการ ดังนั้นจำนวนของชิ้นยีน (transgene copy number) เพียง 1 ชิ้น (insert/copy) ที่ถูกถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมพืชจึงเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อที่ผู้วิจัยจะได้ศึกษาเฉพาะบทบาทและผลของยีนที่ทำการถ่ายยีนเข้าไปเท่านั้น การได้รับชิ้นยีน (transgene) หลายชิ้นในหลายตำแหน่งของจีโนม (multiple transgene copies) อาจนำไปสู่การแสดงออกของยีนที่มากกว่าปกติ ซึ่งบางครั้งอาจทำให้เกิด gene silencing ซึ่งมีผลต่อความเสถียรของชิ้นยีนและส่งผลต่อการถ่ายทอดพันธุกรรมในรุ่นลูกต่อไป (Honda *et al.*, 2002; Oltmanns *et al.*, 2010)

การศึกษาของ Ziemenowicz (2010) กล่าวว่า การถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* มักประสบความสำเร็จได้ชิ้นยีนจำนวน 1 copy (single-copy) แทรกตัวในจีโนมพืช โดยเป็นการแทรกตัวในจีโนมเพียงหนึ่งครั้ง หนึ่งตำแหน่ง (single-locus integration) ซึ่งแตกต่างกับวิธีการถ่ายยีนด้วยวิธี electroporation หรือการถ่ายยีนด้วยวิธี particle bombardment ที่มักให้ผลเป็นการถ่ายยีนแบบ multi-copy หรือ multi-locus integration ในงานวิจัยนี้จึงใช้วิธีคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีนแบบ single-copy โดยดูจากฟีโนไทป์ของต้นรุ่นลูก (progeny; T<sub>1</sub>) ที่คัดเลือกได้ด้วย selectable marker คือ ยีน *nptII* ให้มีอัตราส่วนต้นที่ต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซินต่อต้น ไม่ต้านทาน เป็น 3:1 โดยใช้การทดสอบทางสถิติแบบ Chi-square test ( $\chi^2$ ) มาทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าสังเกตกับค่าที่คาดหวังของจำนวนต้น T<sub>1</sub> ที่ต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซินและคัดเลือกต้นรุ่นลูกรุ่นถัดไป (T<sub>2</sub>) ที่สามารถต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซินได้ 100% ซึ่งสื่อถึงความเป็น homologous single insertion ตามกฎของ Mendel โดยทุกรุ่นที่ทำการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ จะมีการตรวจสอบชิ้นยีนที่ถ่ายเข้าไปด้วย PCR ควบคู่กันไป ทั้งนี้ไม่พบชิ้นยีนในต้น WT *Arabidopsis* ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

อย่างไรก็ตามผล PCR ที่ให้ค่าเป็นบวกแสดงถึงการมีชิ้นยีนในจีโนมของ *Arabidopsis* ก็อาจไม่สอดคล้องกับผลการทดลองเมื่อคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะเสมอไป เช่น ต้น *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมในกลุ่ม (III): *35SCaMV::N'\_OsNUC1* ที่มีแถบ DNA แสดงถึงชิ้นยีน *N'\_OsNUC1* ชัดเจนเมื่อทำ PCR (ภาพที่ 4.12 c) แต่เมื่อนำมาปลูกคัดเลือก T<sub>1</sub> บนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ไม่ปรากฏต้น *Arabidopsis* ที่สามารถต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซิน แม้ทำการทดลองซ้ำก็ให้ผลการทดลองเช่นเดิม สาเหตุที่เป็นเช่นนี้ อาจเนื่องมาจาก *OsNUC1* ที่พบในฐานข้อมูลของข้าว (*Oryza sativa*) มีเพียง 2 รูปแบบเท่านั้น ได้แก่ 1) รูปแบบที่ให้ cDNA แบบสายสั้นที่ประกอบไปด้วย 2 โดเมนหลักของ *OsNUC1* ที่มีเฉพาะบริเวณ RRM2 2 บริเวณและโดเมน GAR ซึ่งในงานวิจัยนี้เรียกรูปแบบดังกล่าวว่า C'\_*OsNUC1* และ 2) รูปแบบที่ให้ cDNA แบบสายยาวซึ่ง

ประกอบด้วย 3 โดเมนหลักของ *OsNUC1* มีบริเวณ acidic-serine-rich และ NLS เพิ่มเติมขึ้นมา นอกเหนือจากบริเวณ RRM และโดเมน GAR (*full-length OsNUC1*) สำหรับ *N'\_OsNUC1* เป็นโปรตีนที่ไม่มีอยู่จริงในธรรมชาติ (ไม่พบในฐานข้อมูล) ถูกสร้างขึ้นด้วยการออกแบบไพรเมอร์ให้สามารถ amplify บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คาดว่าจะถอดรหัส/แปลรหัสให้ *N'\_OsNUC1* ดังนั้นเมื่อทำให้ชิ้นยีนของบริเวณดังกล่าวมีการแสดงออกตลอดเวลาด้วย constitutive promoter จึงอาจเป็นการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน *N'\_OsNUC1* ซึ่งเป็นโปรตีนแปลกปลอมให้ทำงานมากขึ้น โดยไม่อาจทราบได้แน่ชัดว่า *N'\_OsNUC1* เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่อย่างไร ทำงานในบริเวณใด คาดเดาได้เพียงว่าอาจจะเป็นโปรตีนที่ทำงานในนิวเคลียสเนื่องจากชิ้นยีนดังกล่าวถอดรหัส/แปลรหัสให้บริเวณ NLS ที่เป็นตัวสัญญาณนำโปรตีนเข้าสู่นิวเคลียส ซึ่งการแสดงออกตลอดเวลาและการสะสมของโปรตีนแปลกปลอมจำนวนมากในเซลล์ น่าจะส่งผลกระทบต่อโปรตีนอื่นรวมถึงกระบวนการอื่น ๆ ในเซลล์จนอาจทำให้เซลล์ทำงานผิดปกติและเมื่อประกอบกับ *nptII* ซึ่งเป็น selectable marker ที่ถูกถ่ายยีนเข้าไปพร้อมกับ *N'\_OsNUC1* ถูกกระตุ้นให้ทำงานตลอดเวลา จึงอาจส่งผลให้พืชที่ได้รับการถ่ายยีนไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน

งานวิจัยของ Ondřej และคณะ (1999) พบว่า *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* จะให้รุ่นลูกที่มีอัตราส่วนเป็น 3:1 ตามกฎของ Mendel เพียง 50% จากรุ่นลูกทั้งหมด รุ่นลูกอีกประมาณ 25% จะให้อัตราส่วน 15:1 (ซึ่งแสดงถึงความน่าจะเป็นที่จะมีการแทรกของชิ้นยีนจำนวน 2 copy ในจีโนม) และรุ่นลูกส่วนที่เหลือจะให้อัตราส่วนที่ไม่เป็นไปตามกฎของ Mendel (non-Mendelian pattern) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลข้างต้นกับงานวิจัยนี้พบว่า มีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก จากจำนวนต้น  $T_0$  ที่สามารถยืนยันการแทรกตัวของชิ้นยีนชุดโครงสร้างยีน (A) และ (B) ได้ 20 และ 27 ต้นตามลำดับ เมื่อทำการคัดเลือกรุ่น  $T_1$  ที่มีอัตราส่วนเป็น 3:1 ตามกฎของ Mendel สามารถคัดได้เพียง 4 และ 8 สายพันธุ์เท่านั้น สายพันธุ์ที่เหลือโดยมากมีอัตราส่วนจัดอยู่ในกลุ่ม non-Mendelian pattern คือ มีอัตราส่วนต้นด้านทานต่อต้นไม่ด้านทานสารปฏิชีวนะ เป็น 6:1 7:1 หรือ 23:1 สำหรับอัตราส่วน 15:1 พบว่า มีเพียงสายพันธุ์ rd\_fl30 (ต้นด้านทานสารปฏิชีวนะ:ต้นไม่ด้านทาน เท่ากับ 559:41) ที่มีค่าใกล้เคียงพอจะจัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้ เนื่องจากมีอัตราส่วนเป็น 14:1 อย่างไรก็ตามการคัดเลือก homologous single insertion ด้วยอัตราส่วน 3:1 ก็ยังมีวิธีที่ดีที่สุด เพื่อให้สามารถยืนยันได้ว่าชิ้นยีนที่แทรกตัวอยู่ในจีโนมของพืชที่ได้รับการถ่ายยีนเป็น single-copy และ single-locus insertion อาจต้องทำการตรวจสอบเพิ่มเติมด้วย Southern blot ทั้งนี้รูปแบบ hybridization ของแต่ละสายพันธุ์ ยังสามารถยืนยันได้ถึงความเป็นอิสระต่อกันของแต่ละสายพันธุ์ที่เลือกมาทำการทดลองได้อีกด้วย

### 3. ตรวจสอบการแสดงออกของชุดโครงสร้างยีนของ *OsNUC1* ในต้น *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็ม ด้วย quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

การแสดงออกของยีน *full-length\_OsNUC1* หรือ *N'\_OsNUC1* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *rd29A* ในต้นกล้า *Arabidopsis* ที่เป็น homozygous transgenic lines อายุ 16 วัน ซึ่งมีชุดโครงสร้างยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* หรือ (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* แทรกอยู่ในจีโนมของ *Arabidopsis* พบว่า *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมจำนวน 5 สายพันธุ์ยกเว้น *rd\_5.14* มีการแสดงออกของยีนสูงขึ้นเมื่อได้รับภาวะเครียดจากความเค็ม (อาหาร MS ที่เติม NaCl 100 mM) เมื่อเปรียบเทียบกับภาวะปกติ (ชั่วโมงที่ 0 ไม่ได้รับ NaCl) ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากบริเวณ DRE (dehydration-responsive elements) ซึ่งเป็น *cis*-elements ที่มีอยู่ถึง 2 บริเวณในโปรโมเตอร์ *rd29A* และเป็นบริเวณเข้าจับของ transcription factor อย่าง DREBs (dehydration responsive element binding) ที่ควบคุมการทำงานของยีนหลายตัวใน pathway ที่เกี่ยวข้องกับ signal transduction ของพืชเมื่อถูกกระตุ้นจากภาวะเค็ม ภาวะขาดน้ำ และอุณหภูมิต่ำ ส่งผลให้ยีนเหล่านั้นมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นและทำให้พืชสามารถตอบสนองต่อภาวะเครียดดังกล่าวได้อย่างเหมาะสม (Lata and Prasad, 2011; Liu *et al.*, 2000; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1993)

*Arabidopsis* 4 จาก 6 สายพันธุ์ที่เลือกมาทำการทดลอง (*rd\_fl10 rd\_fl16 rd\_5i* และ *rd\_5.114*) มีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 3 หลังได้รับภาวะเค็ม ในขณะที่อีก 2 สายพันธุ์ที่เหลือ คือ *rd\_fl22* และ *rd\_5.14* ที่แม้ว่าจะมีระดับการแสดงออกของยีนสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 12 (14.3 เท่า) และชั่วโมงที่ 0 ตามลำดับ (13.1 เท่า) แต่เมื่อพิจารณาระดับการแสดงออกที่ 3 ชั่วโมงของทั้ง 2 สายพันธุ์ (11.1 เท่าสำหรับ *rd\_fl22* และ 12.0 เท่าสำหรับ *rd\_5.14*) พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีนใกล้เคียงกับระดับการแสดงออกที่สูงที่สุดเช่นกัน แสดงให้เห็นว่า ต้น *Arabidopsis* ไม่ว่าจะได้รับการถ่ายยีน *full-length\_OsNUC1* ที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้ทั้ง 3 บริเวณโมติฟของ *OsNUC1* (acidic serine ที่เชื่อมต่อกับ NLS RRM's จำนวน 2 โมติฟ และ GAR) หรือยีน *N'\_OsNUC1* ที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้เฉพาะบริเวณปลายอะมิโน (acidic serine และ NLS) เมื่อควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *rd29A* มีการแสดงออกสูงที่สุดที่ 3 ชั่วโมงหลังได้รับภาวะเค็ม ซึ่งถือว่าการแสดงออกที่เร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Siriporn Sripinyowanich (2010) ที่นำต้น *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีน *C'\_OsNUC1* ซึ่งถอดรหัส/แปลรหัสให้เฉพาะปลายคาร์บอกซิลที่มี RRM's และ GAR ย้ายปลูกบนอาหารที่เติม NaCl 100 mM

และพบการแสดงออกของ *C'\_OsNUC1* เพิ่มสูงขึ้นที่ 24 ชั่วโมงหลังได้รับภาวะเค็มแม้ว่าจะควบคุมการแสดงออกของยีนด้วยโปรโมเตอร์ *rd29A* เช่นเดียวกัน

อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Yamaguchi-Shinozaki และ Shinozaki (1993) ที่เป็นงานวิจัยแรกที่ศึกษาถึง activity ของโปรโมเตอร์ *rd29A* โดยตรง ด้วยการนำมาควบคุมการทำงานของยีน *GUS* ก็พบว่า ยีน *GUS* มีการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับภาวะเค็มแบ่งเป็น 2 ระยะ คือ ระยะแรก que แสดงออกอย่างรวดเร็ว (early induction) และระยะที่ 2 (secondary induction) ที่แสดงออกช้า เมื่อศึกษาใน *Arabidopsis* ที่ได้รับภาวะเค็ม (NaCl 250 mM) พบการแสดงออกของ *GUS* ภายใน 1 ชั่วโมงแรกที่ได้รับภาวะเค็มซึ่งเป็น early induction หลังจากนั้นมีการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับภาวะเค็ม และที่ชั่วโมงที่ 10 (secondary induction) และ 24 หลังได้รับ NaCl 250 mM จะมีการแสดงออกของ *GUS* เพิ่มสูงกว่าชั่วโมงแรกประมาณ 6 และ 10 เท่าตามลำดับรูปแบบการแสดงออกที่รวดเร็วของโปรโมเตอร์ *rd29A* ในภาวะเค็มนี้คล้ายคลึงกับเมื่อได้รับภาวะแล้ง คือ มีการแสดงออกของ *GUS* ภายใน 20 นาทีแรกที่ขาดน้ำและมีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นจากในภาวะปกติ จาก 10 เป็น 50 เท่า ผลการทดลองนี้ช่วยยืนยันสมมติฐานที่ว่า DRE ในโปรโมเตอร์ *rd29A* เป็นบริเวณที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มและภาวะแล้ง นอกจากนี้ ยังพบการแสดงออกของ *GUS* กระจายอยู่ในเนื้อเยื่อ vegetative tissue ของ *Arabidopsis* ที่ได้รับภาวะขาดน้ำอีกด้วย

ทั้งนี้ นอกเหนือจากโปรโมเตอร์และชิ้นยีนที่ถ่ายยีนเข้าสู่พืชแล้ว ตำแหน่งของชิ้นยีนบนจีโนมของ *Arabidopsis* หลังได้รับการถ่ายยีน (insertion effect) ก็เป็นอีกสิ่งหนึ่งส่งผลต่อการแสดงออกของยีน อาจส่งผลให้การแสดงออกของชิ้นยีนที่ถ่ายเข้าไปเป็นแบบ loss-of-function (ยีนไม่ทำงาน) หรือ gain-of-function (ยีนทำงานออกจนผิดปกติ) รวมถึงทำให้ coding sequence ของยีนบางยีนที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงกับชิ้นยีนได้รับอิทธิพลจาก regulatory element ในโปรโมเตอร์ที่ใช้ควบคุมการทำงานของชิ้นยีนจนเกิดเป็น sense transcript (mRNA ทำให้เกิด fusion protein อื่น) หรือ antisense transcript (RNAi ยับยั้งการแสดงออกของยีน) ซึ่งสิ่งเหล่านี้ล้วนส่งผลต่อการแสดงออกของชิ้นยีนและส่งผลต่อเนื่องไปยังฟีโนไทป์ของต้นที่ได้รับการถ่ายยีน (Wilson *et al.*, 2006; Ziemienowicz *et al.*, 2012) จากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น จึงอาจส่งผลให้ต้นตัดแปรพันธุกรรมในงานวิจัยนี้ ทั้งในกลุ่ม (I) และกลุ่ม (II) ที่ได้รับการถ่ายยีนแบบอิสระต่อกัน มีรูปแบบและระดับการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับภาวะเค็มแตกต่างกัน

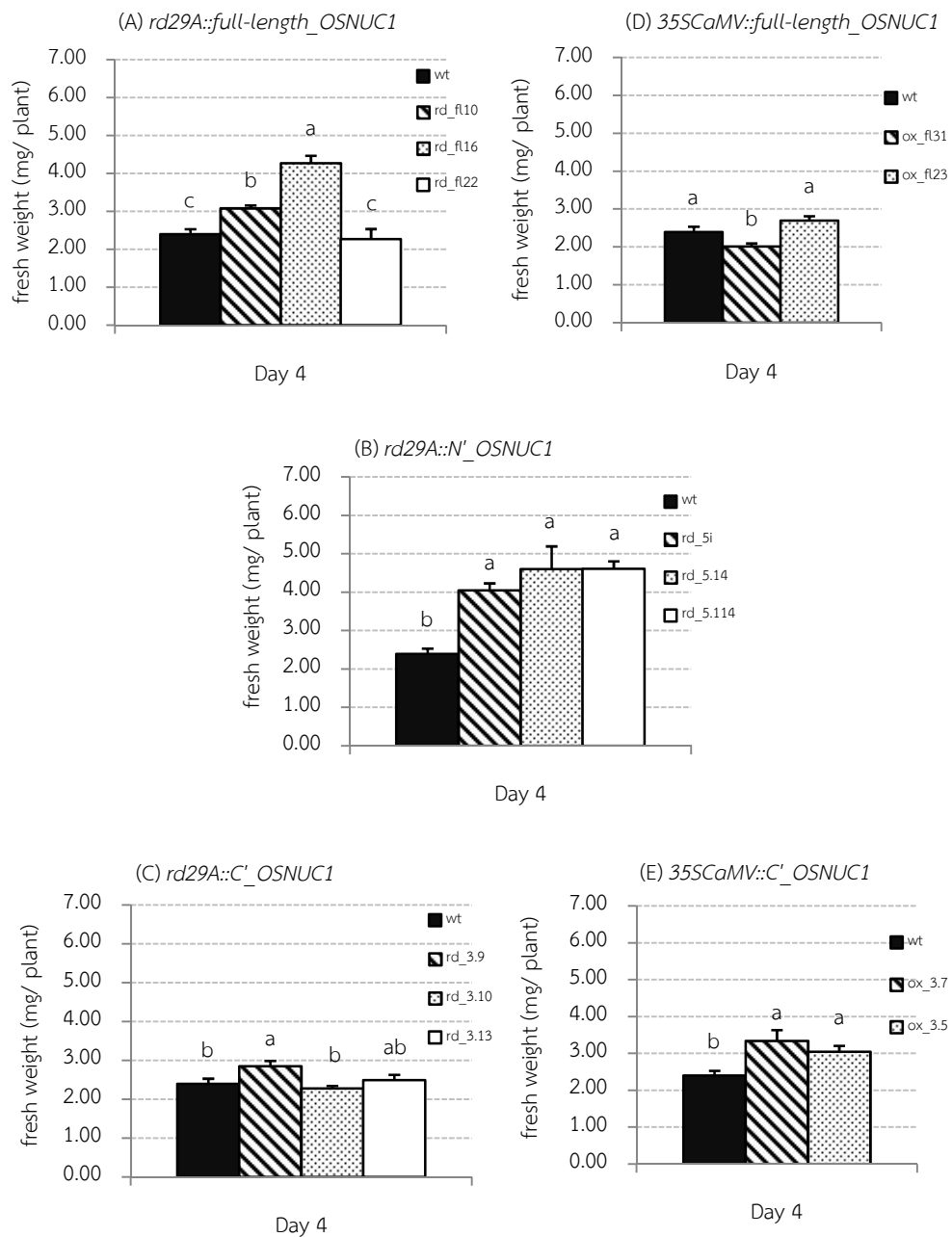
#### 4. ผลการเติบโตของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* ที่ต่างกัน

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ความเครียดจากภาวะเค็มชักนำให้ยีน *OsNUC1* มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 และ FL530-IL โดยมีการแสดงออกนานถึง 9 วัน ในสายพันธุ์ FL530-IL รวมทั้งมีการแสดงออกสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์ไม่ทนเค็ม LPT123 และ KDML105 ซึ่งมีพื้นฐานทางพันธุกรรมเดียวกันกับ LPT123-TC171 และ FL530-IL ตามลำดับ (Siriporn Sripinyowanich, 2010) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ยีน *OsNUC1* น่าจะเป็นยีนที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อภาวะเครียดจากความเค็มในข้าว ประกอบกับลักษณะทางโครงสร้างของ *OsNUC1* ที่ประกอบด้วยโดเมน 3 ส่วนซึ่งมีโมทิฟที่จำเพาะแตกต่างกัน จนส่งผลให้แต่ละโดเมนมีบทบาทแตกต่างกันในกระบวนการทำงานของเซลล์ (Ginisty *et al.*, 1999; Tuteja and Tuteja, 1998) งานวิจัยนี้จึงทำการเปรียบเทียบการเติบโตของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* ที่ต่างกัน เพื่อศึกษาว่าโปรโมเตอร์และโมทิฟที่มีรูปแบบต่างกันมีบทบาทในการทนทานต่อภาวะเครียดจากความเค็มอย่างไร

##### 4.1 ภาวะปกติ

จากผลการทดลอง เมื่อพิจารณาการเติบโตของ *Arabidopsis* ในกลุ่มต่าง ๆ ที่ละคู่เพื่อศึกษาการทำงานของโปรโมเตอร์จะเห็นว่าการเติบโตของ *Arabidopsis* หลังการย้ายปลูก 4 วันภายใต้ภาวะปกติในกลุ่ม (A) เปรียบเทียบกับกลุ่ม (D) ซึ่งได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้ full-length *OsNUC1* เช่นเดียวกันแต่ควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ต่างกัน พบว่า *Arabidopsis* กลุ่ม (A) ที่ควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *rd29A* มีค่าน้ำหนักสดสูงกว่าต้น WT ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ในขณะที่ต้นในกลุ่ม (D) ที่ควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *35SCaMV* มีค่าน้ำหนักสดน้อยกว่า WT (ภาพที่ 5.1 (A) และ (D)) สำหรับต้น *Arabidopsis* ในกลุ่ม (C) และกลุ่ม (E) ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้ C' *OsNUC1* ด้วยโปรโมเตอร์ *rd29A* หรือโปรโมเตอร์ *35SCaMV* ตามลำดับ พบว่า พืชในกลุ่ม (C) มีการเติบโตเมื่อพิจารณาจากน้ำหนักสดน้อยกว่า WT ในขณะที่ต้นในกลุ่ม (E) มีการเติบโตมากกว่า WT (ภาพที่ 5.1 (C) และ (E)) สำหรับพืชในกลุ่ม (B) ที่ได้รับการถ่ายยีน *rd29A::N' OsNUC1* ซึ่งไม่สามารถเปรียบเทียบการเติบโตกับ *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัส N' *OsNUC1* แต่ควบคุมด้วย constitutive promoter อย่างโปรโมเตอร์ *35SCaMV* เนื่องจากไม่สามารถคัดเลือกต้นดัดแปรพันธุกรรม *35SCaMV::N' OsNUC1* มาทำการทดลองได้ พบว่า พืชในกลุ่ม (B) ให้ค่าน้ำหนักสดที่แตกต่างจากน้ำหนักสดของ WT ชัดเจนกว่าพืชดัดแปรพันธุกรรมกลุ่มอื่น ๆ เนื่องจากมีน้ำหนักสดมากกว่า WT อย่างเห็นได้ชัด โดยโตกว่า WT ประมาณ

70-90% (ภาพที่ 5.1 (B)) สำหรับพารามิเตอร์ที่เป็นความยาวรากแก้วจะพบความแตกต่างระหว่าง WT และพืชที่ได้รับการถ่ายยีนค่อนข้างชัดเจนกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักสด โดยพบว่าพืชที่ได้รับการถ่ายยีนทุกกลุ่ม ((A) (B) (C) (D) และ (E)) มีความยาวรากแก้วมากกว่า WT อย่างเห็นได้ชัดและมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับการถ่ายยีนก็พบว่าทุกกลุ่มของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมมีความยาวรากแก้วใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 5.2) จากที่กล่าวมาข้างต้นอาจเป็นไปได้ว่า ในต้น *Arabidopsis* อายุประมาณ 2 สัปดาห์ที่นำมาทดลองไม่ว่าจะถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *rd29A* หรือโปรโมเตอร์ *35SCaMV* ต่างส่งผลต่อการทำงานของ *OsNUC1* ในบริเวณส่วนรากของ *Arabidopsis* มากกว่าจะส่งผลต่อลำต้นและน้ำหนักโดยรวม จึงมีความเป็นไปได้ว่า *OsNUC1* มีส่วนเกี่ยวข้องในการเจริญเติบโตของพืชโดยเฉพาะกระบวนการพัฒนาของราก ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Siriporn Sripinyowanich (2010) ที่ตรวจสอบการแสดงออกของ *OsNUC1* ในอวัยวะต่าง ๆ ของข้าวสายพันธุ์ไม่ทนเค็ม LPT123 ด้วย qRT-PCR และพบการแสดงออกของ *OsNUC1* สูงที่สุดในบริเวณรากและดอกซึ่งเป็นบริเวณที่มีการแบ่งเซลล์ (dividing cell) และพัฒนา (developing cell) จำนวนมาก งานวิจัยที่ศึกษาการแสดงออกของ *nucMs1* (*nucleolin of Medicago sativa*) ใน Alfalfa ซึ่งเป็น nucleolin-like gene ที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้โปรตีน NucMs1 ที่มีโมติฟ RRM 2 บริเวณและโมติฟ GAR เช่นเดียวกับ *OsNUC1* โดยใช้ RNA gel blot ก็ให้ผลการทดลองสนับสนุนอย่างเดียวกัน คือ มีการแสดงออกของ *nucMs1* มากที่สุดในบริเวณที่มีการแบ่งเซลล์และเมื่อทำการทดลองด้วยวิธี *in situ* hybridization ก็พบการแสดงออกของ *nucMs1* มากที่สุดในบริเวณ meristematic region ของรากเช่นเดียวกัน (Bögre *et al.*, 1996) ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Stepieński (2012) ที่พบว่าในเซลล์ meristematic cell ของรากถั่วเหลืองเมื่อทำการทดลองด้วยวิธี immunogold electron microscopy มีการแสดงออกของ *Nucleolin* กระจายอยู่ทั่วบริเวณ โดยเฉพาะใน dense fibrillar component (DFC) และ fibrillar centers (FCs) ในนิวคลีโอลัส จากที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่ามีการสะสมของ *OsNUC1* transcript จำนวนมากในบริเวณรากพืช ดังนั้น *OsNUC1* น่าจะมีบทบาทบางอย่างเกี่ยวข้องกับ cell growth ในบริเวณราก ซึ่งการศึกษาในส่วนของรากแขนงรวมไปถึงรากวิสามัญ (adventitious root) เพิ่มเติมจากการศึกษาความยาวรากแก้วเพียงอย่างเดียว อาจช่วยอธิบายกลไกการทำงานของ *OsNUC1* ได้ดีขึ้น เนื่องจากจำนวนและความหนาแน่นของรากแขนงมีผลต่อความยาวรากทั้งหมดของต้น (total root length) ส่งผลต่อการเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมน้ำของรากซึ่งเป็นกลไกสำคัญอย่างหนึ่งในการเจริญเติบโตของพืช



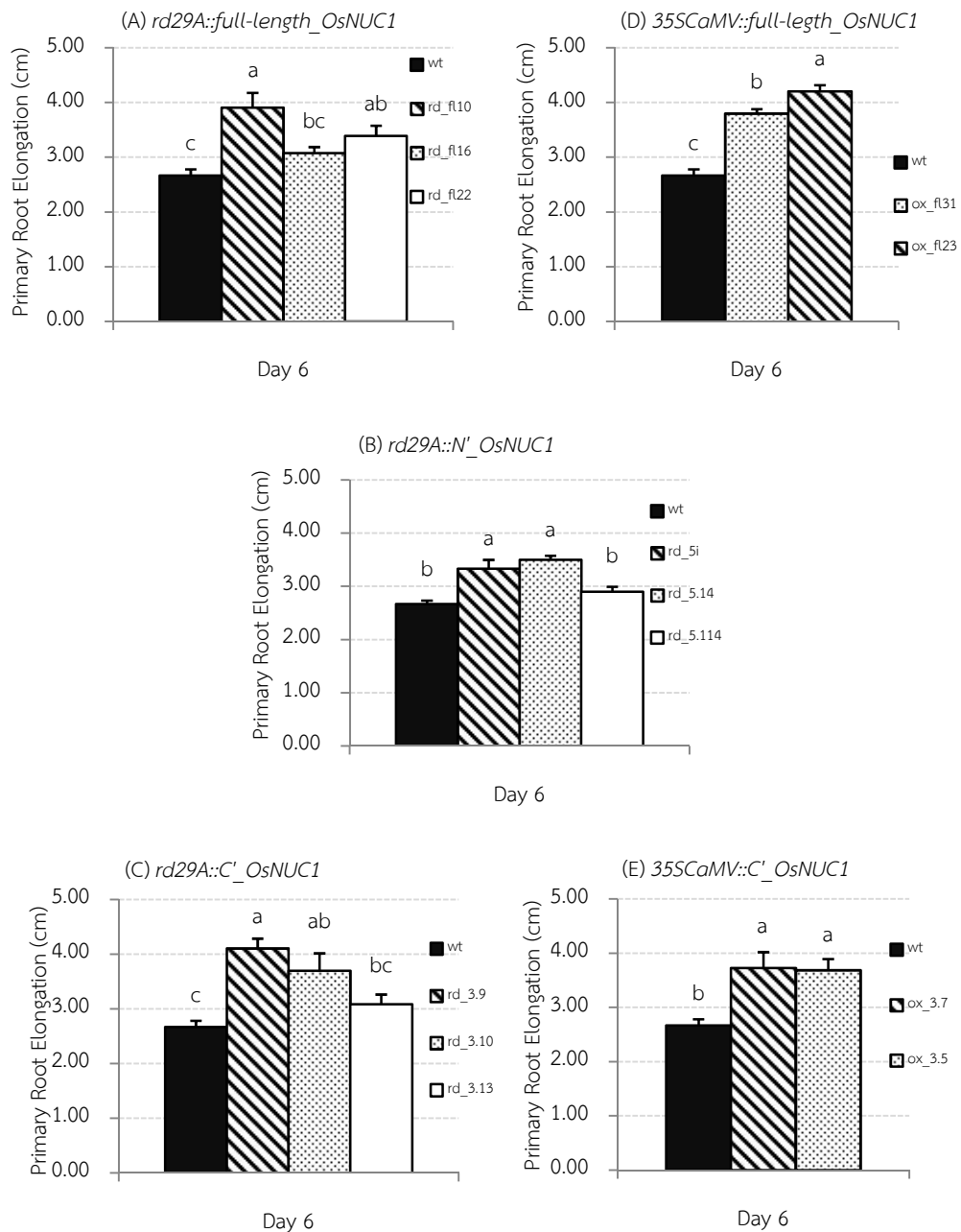
ภาพที่ 5.1 น้ำหนักสดของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรม (A): *rd29A::full-length\_OsNUC1* (B): *rd29A::N'\_OsNUC1* (C): *rd29A::C'\_OsNUC1* (D): *35SCaMV::full-length\_OsNUC1* และ (E): *35SCaMV::C'\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกลงบนอาหาร MS เป็นเวลา 4 วัน (bar = SE)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ )

เปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้หลังจากย้ายปลูกลงเป็นระยะเวลาเดียวกันเท่านั้น

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ





ภาพที่ 5.2 ความยาวรากแก้วของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรม (A): *rd29A::full-length\_OsNUC1* (B): *rd29A::N'\_OsNUC1* (C): *rd29A::C'\_OsNUC1* (D): *35SCaMV::full-length\_OsNUC1* และ (E): *35SCaMV::C'\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกลงบนอาหาร MS เป็นเวลา 6 วัน (bar = SE)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ )

เปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้หลังจากย้ายปลูกลงเป็นระยะเวลาเดียวกันเท่านั้น

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

#### 4.2 ภาวะเค็ม

เมื่อเปรียบเทียบการเติบโตของ *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีนในภาวะเค็มเมื่อทำการย้ายปลูกลงเป็นเวลา 4 วัน โดยพิจารณาที่ละคู่เช่นเดียวกับในภาวะปกติ พบว่าต้นในกลุ่ม (A) (โปรโมเตอร์ *rd29A*) และ (D) (โปรโมเตอร์ *35SCaMV*) ที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้ *full-length\_OsNUC1* มีการเติบโตที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับ WT โดยต้นที่ได้รับการถ่ายยีนในกลุ่ม (A) เกือบทุกสายพันธุ์มีน้ำหนักสดน้อยกว่า WT ยกเว้น *rd\_fl16* ในขณะที่ทุกสายพันธุ์ในกลุ่ม (D) มีน้ำหนักสดใกล้เคียงกับ WT (ภาพที่ 5.3 (A) และ (D)) สำหรับต้นในกลุ่ม (C) และ (E) ที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้ *C'\_OsNUC1* ที่ควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *rd29A* หรือโปรโมเตอร์ *35SCaMV* ตามลำดับ พบว่าต้นในกลุ่ม (C) เกือบทุกสายพันธุ์มีน้ำหนักสดใกล้เคียงกับ WT ในขณะที่มีเพียงสายพันธุ์ *ox\_3.7* ในกลุ่ม (E) ที่มีน้ำหนักสดมากกว่า WT (ภาพที่ 5.3 (C) และ (E)) และสำหรับต้นในกลุ่ม (B) ที่ได้รับการถ่ายยีน *rd29A::N'\_OsNUC1* พบว่าทุกสายพันธุ์มีน้ำหนักสดมากกว่า WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทำการย้ายปลูกลงในภาวะเค็ม (ภาพที่ 5.3 (B)) นอกจากนี้ น้ำหนักสดของต้นในกลุ่ม (B) ยังมากกว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนในกลุ่ม (A) (C) (D) และ (E) อีกด้วย ซึ่งจากผลการทดลองข้างต้นนี้ประกอบกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ที่ไม่สามารถคัดเลือกต้น  $T_1$  ซึ่งได้รับการถ่ายยีน *N'\_OsNUC1* ที่ถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *35SCaMV* อาจสรุปได้ว่า โปรโมเตอร์แบบแสดงออกเฉพาะเมื่อได้รับการกระตุ้นจากภาวะเครียด เช่น โปรโมเตอร์ *rd29A* น่าจะเป็นทางเลือกที่เหมาะสมในการนำมาใช้ศึกษาหน้าที่ของยีน *N'\_OsNUC1* เนื่องจากการแสดงออกแบบตลอดเวลาของ *N'\_OsNUC1* อาจทำให้เกิดการสะสมของโปรตีน *N'\_OsNUC1* ซึ่งเป็นโปรตีนแปลกปลอมจำนวนมากจนส่งผลเสียต่อกระบวนการทำงานในเซลล์ ซึ่งผลเสียดังกล่าวสามารถลดหรือชะลอได้เมื่อใช้โปรโมเตอร์ *rd29A* ซึ่งจะทำงานเฉพาะเมื่อได้รับการกระตุ้นจากภาวะเครียดเท่านั้นมาควบคุม ส่งผลให้การแสดงออกของ *N'\_OsNUC1* ในภาวะเครียดจากความเค็มเป็นไปอย่างเหมาะสม ยีนมีการแสดงออกเฉพาะเมื่อจำเป็น ทำให้พืชที่ได้รับการถ่ายยีน *rd29A::N'\_OsNUC1* สามารถเจริญเติบโตได้ อย่างไรก็ตาม *N'\_OsNUC1* เป็นโปรตีนที่ไม่มีอยู่จริงในข้าว การเจริญเติบโตของพืชในกลุ่ม (B) ที่เพิ่มขึ้นระหว่างได้รับภาวะเค็มจึงอาจเป็นผลมาจากการทำงานของโดเมนอื่นที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับโครงสร้างของ *N'\_OsNUC1* ซึ่งเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ *N'\_OsNUC1* ไปเทียบในฐานข้อมูล Rice Genome Annotation Project (Ouyang, *et al.*, 2007) พบว่ามีความใกล้เคียงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *gar2* ใน fission yeast ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตของเซลล์ เกี่ยวข้องกับการแบ่งไซโตพลาซึม (cytokinesis) และการแบ่งนิวเคลียส (nuclear division) (Leger-Silvestre, *et al.*, 1996)

สำหรับความยาวรากแก้วของ *Arabidopsis* ทุกกลุ่มเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน หลังย้ายปลูกลง พบว่าต้นในกลุ่ม (D) ที่ได้รับการถ่ายยีน *35SCaMV::full-length\_OsNUC1* เป็นกลุ่มเดียวที่มีความยาวรากแก้วมากกว่า WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 5.4) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้

ได้ว่า OsNUC1 มีบทบาทในการเจริญเติบโตของพืชเมื่อได้รับภาวะเค็มโดยเฉพาะในบริเวณราก เช่นเดียวกับในภาวะปกติ อย่างไรก็ตามที่ได้กล่าวไปข้างต้นว่า OsNUC1 มีการแสดงออกมากในบริเวณที่มีการแบ่งเซลล์ เช่น บริเวณราก (Siriporn Sripinyowanich, 2010) ดังนั้นการเพิ่มการแสดงออกของ OsNUC1 โดยใช้ constitutive promoter จึงมีแนวโน้มช่วยส่งเสริมการทำงานของเซลล์เหล่านั้นซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและพัฒนาของเซลล์ให้มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ที่ความยาวรากแก้วของพืชในกลุ่ม (D) 35SCaMV::full-length\_OsNUC1 มีการพัฒนาและมีความยาวรากแก้วมากกว่า WT และพืชตัดแปรพันธุกรรมกลุ่มอื่นอย่างเห็นได้ชัด

จากผลการศึกษาของ Kasuga และคณะ (1999) ที่พบว่าการใช้โปรโมเตอร์ rd29A ควบคุมการทำงานของ DREB1A ซึ่งเป็น transcription factor จะให้ต้น Arabidopsis ตัดแปรพันธุกรรมภายใต้ภาวะปกติที่มีการเติบโตมากกว่าต้นที่ใช้โปรโมเตอร์ 35SCaMV ควบคุม โดยโปรโมเตอร์ rd29A จะช่วยลดผลกระทบจากการชะลอการเจริญเติบโตของพืชจนส่งผลให้ได้ลักษณะต้นแคระแกร็น ซึ่งงานวิจัยอื่นที่ถ่ายยีนที่ควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ rd29A ก็ให้ผลการทดลองแบบเดียวกัน เช่น การถ่ายยีน rd29A::CBF1 เข้าสู่มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) (Hsieh et al., 2002) ถ่ายยีน rd29A::DREB1 เข้าสู่ต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) (Kasuga et al., 2004) หรือการถ่ายยีน rd29A::HVA1 (late embryogenesis abundant gene) ในต้นมัลเบอรี่ (*Morus indica* L.) (Checker et al., 2011) เมื่อพิจารณาอย่างละเอียดจะพบว่า ยีนในงานวิจัยดังกล่าวข้างต้นที่ประสบความสำเร็จในการใช้โปรโมเตอร์ rd29A ควบคุมการทำงานและสามารถลดลักษณะต้นแคระแกร็นของพืชที่เกิดจากการใช้โปรโมเตอร์ 35SCaMV ควบคุม มักเป็นยีนที่ทำงานเมื่อพืชเผชิญกับภาวะเครียดทั้งในทางตรงและทางอ้อม เช่น ยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้โปรตีน LEA หรือ transcription factor ที่มีบทบาทควบคุมการทำงานของยีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมอีกหลายยีน ซึ่งแตกต่างจาก Nucleolin ที่เป็นยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้โปรตีนที่พบมากในนิวเคลียสของเซลล์ทั่วไปไม่ว่าจะอยู่ในภาวะปกติหรือภาวะเครียด เนื่องจาก Nucleolin เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างไรโบโซมและมีส่วนช่วยในการคงความเสถียรของ mRNA ซึ่งเป็นกระบวนการพื้นฐานของเซลล์ (Tuteja and Tuteja, 1998) ดังนั้นการใช้โปรโมเตอร์แบบแสดงออกเฉพาะเมื่อได้รับภาวะเครียดมาควบคุมการแสดงออกของยีน Nucleolin จึงไม่เป็นการส่งเสริมหรือช่วยให้ยีน Nucleolin มีการแสดงออกที่เหมาะสมมากขึ้นกว่าเดิม แตกต่างจากการใช้โปรโมเตอร์ 35SCaMV มาควบคุมที่ช่วยส่งเสริมให้ยีน Nucleolin มีการแสดงออกของยีนตลอดเวลาและทำงานเต็มประสิทธิภาพซึ่งเห็นได้จากผลของความยาวรากแก้วของพืชในกลุ่ม (D) 35SCaMV::full-length\_OsNUC1 ข้างต้นที่มากกว่าความยาวรากแก้วของต้นอื่น ๆ อย่างชัดเจน

อย่างไรก็ตามน้ำหนักสดของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนที่ใช้โปรโมเตอร์ rd29A ควบคุมการทำงาน เช่น บางสายพันธุ์ในกลุ่ม (A) (B) และ (C) ในภาวะเค็มที่มากกว่าน้ำหนักสดของ WT อาจมีใช้ผลที่

เกิดจากสัญญาณภาวะเครียดจากความเค็มที่ทำการทดลองเท่านั้น แต่เป็นผลที่เกิดขึ้นร่วมกับผลจากสัญญาณภาวะเครียดจากบาดแผล (wounding stress) ได้เช่นกัน เนื่องจากวิธีดำเนินการทดลองที่ใช้ forceps คีบต้นกล้า *Arabidopsis* เพื่อย้ายปลูกบนอาหารกึ่งแข็ง MS อาจก่อให้เกิดบาดแผลที่นำไปสู่การเกิดสัญญาณความเครียดและกระบวนการส่งต่อสัญญาณความเครียด (signal induction pathway) รวมทั้งกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ *rd29A* ทำให้เกิดการแสดงออกของชิ้นยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* ทั้งที่อยู่ในภาวะปกติ

ผลการทดลองเปรียบเทียบการเติบโตของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 5 กลุ่มโดยมี WT เป็นชุดควบคุมแสดงให้เห็นว่า โปรโมเตอร์ *rd29A* เหมาะสมที่จะนำมาใช้ควบคุมการทำงานของชิ้นยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้ full-length\_*OsNUC1* รวมไปถึง N'\_*OsNUC1* ในขณะที่เมื่อนำโปรโมเตอร์ *35SCaMV* มาควบคุมการทำงานของชิ้นยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้ full-length\_*OsNUC1* น่าจะเป็นการบังคับให้ชิ้นยีนดังกล่าวทำงานมากเกินไปจนส่งผลชะลอการเติบโตสำหรับโปรโมเตอร์ *35SCaMV* ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์แบบแสดงออกตลอดเวลา เมื่อนำมาใช้ควบคุมการแสดงออกของชิ้นยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้ C'\_*OsNUC1* พบว่ามีความเหมาะสมมากกว่าโปรโมเตอร์ *rd29A* ที่ควบคุมให้มีการแสดงออกของยีนเฉพาะเมื่อถูกกระตุ้นจากภาวะเครียด ซึ่งการทำงานของชิ้นยีน C'\_*OsNUC1* เฉพาะเมื่อถูกกระตุ้นจากภาวะเครียดนั้นน่าจะเป็นการทำงานที่ยังไม่เพียงพอในการช่วยเพิ่มความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดจากความเค็มหรือเพิ่มการเติบโตให้ *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีนชิ้นดังกล่าว

จากการศึกษาของ Siriporn Sripinyowanich (2010) เกี่ยวกับ subcellular localization ของโมทิฟรูปแบบต่าง ๆ ของ *OsNUC1* พบว่า โมทิฟ full-length\_*OsNUC1* ที่เชื่อมต่อกับ GFP (green fluorescence protein) เมื่อถูกถ่ายยีนแบบชั่วคราว (transient expression) เข้าสู่เซลล์หอมใหญ่พบตำแหน่งของโปรตีนเฉพาะในบริเวณนิวเคลียส ซึ่งคล้ายคลึงกับการแสดงออกของ GFP ที่เชื่อมกับโมทิฟ N'\_*OsNUC1* อย่างไรก็ตามลักษณะการเรืองแสงของ GFP ในนิวเคลียสระหว่าง 2 โมทิฟดังกล่าวก็มีความแตกต่างกันตรงที่ในการทดลองของ GFP::full-length\_*OsNUC1* จะพบจุดเล็ก ๆ (bright spot) เรืองแสงในนิวเคลียส ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นการจับกันระหว่างโมเลกุล RNA กับโมทิฟ RRM's ที่อยู่ในบริเวณส่วนปลาย C'\_*OsNUC1* ของ full-length\_*OsNUC1* ซึ่งจุดเล็ก ๆ เรืองแสงเหล่านั้นไม่ปรากฏในการทดลองของ N'\_*OsNUC1* ซึ่งก็สอดคล้องกับลักษณะโครงสร้างของ N'\_*OsNUC1* ที่มีเพียงบริเวณ acidic serine เชื่อมต่อกับ NLS ที่ทำหน้าที่เป็นสัญญาณกำหนดให้โปรตีนเคลื่อนที่ไปยังนิวเคลียสเท่านั้น แต่ไม่มีบริเวณ RRM's ที่จะสามารถจับกับโมเลกุล RNA ในนิวเคลียสได้

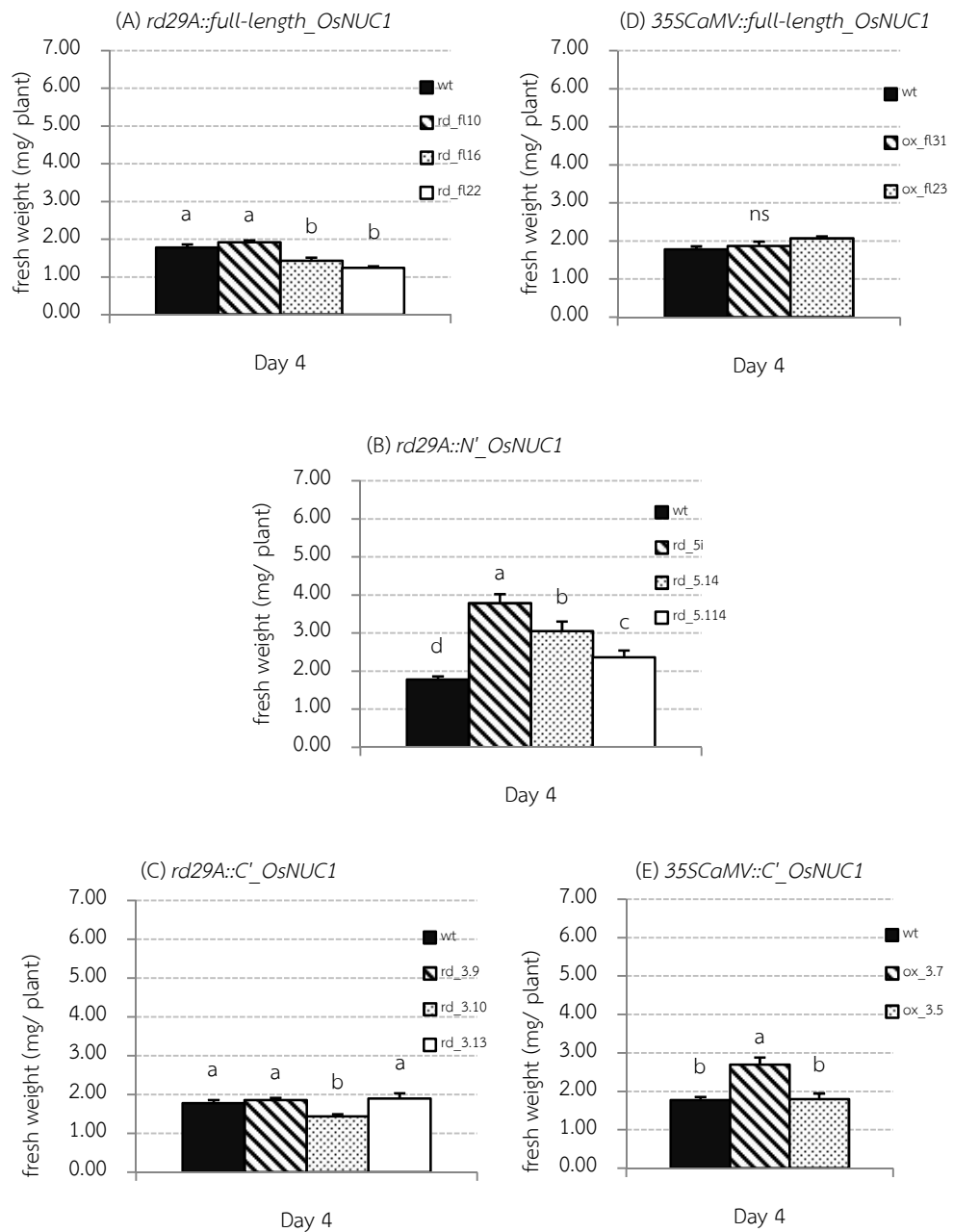
มีรายงานถึงความสามารถในการเข้าจับ RNA รวมไปถึงการส่งออก mRNA จากนิวเคลียสไปยังไซโทพลาซึมว่า มีส่วนช่วยเพิ่มความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมได้ งานวิจัยของ Kim และคณะ (2008) ทำการศึกษาตำแหน่งของ GRP7 ซึ่งเป็นสมาชิกในกลุ่ม glycine-rich RNA-binding proteins (GRPs) ใน *A. thaliana* โดยใช้ GFP และพบสัญญาณของ GFP::GRP7 ในบริเวณนิวเคลียสและไซโทพลาซึม โดยมีระดับความเข้มของสัญญาณสูงมากในนิวเคลียส ซึ่งแสดงให้เห็นว่า GRP7 น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมบางอย่างในนิวเคลียส และ/หรือเกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่ง mRNA (export) การเคลื่อนย้าย mRNA ระหว่างนิวเคลียสกับไซโทพลาซึม ซึ่งกระบวนการดังกล่าวถือเป็นทำงานในระดับ post-transcriptional gene regulation และมักเกิดขึ้นในบริเวณนิวเคลียส เพื่อจะศึกษาบทบาทเกี่ยวกับการ export mRNA ทางผู้วิจัยได้นำใบของ *Arabidopsis* สายพันธุ์ที่ไม่มีการแสดงออกของ *GRP7* (loss-of-function; *grp7*) และ WT มาทำปฏิกิริยากับ 45-mer oligo(dT) ที่เชื่อมกับ fluorescein ในภาวะปกติพบว่า ไม่ปรากฏสัญญาณของฟลูออเรสเซนซ์ในนิวเคลียสของทั้ง *grp7* และ WT แสดงให้เห็นว่า mRNA ในนิวเคลียสที่ได้จากกระบวนการ transcription ถูกส่งออกสู่ไซโทพลาซึมได้ตามปกติ และเมื่อทำการทดลองในภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม เช่น ในภาวะหนาวเย็น 1°C เป็นเวลา 2 วัน ก็ยังไม่พบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ใน WT ซึ่งตรงกันข้ามกับ *grp7* ที่พบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สูงมากในนิวเคลียส แสดงให้เห็นว่า ไม่สามารถส่ง mRNA จากนิวเคลียสออกสู่ไซโทพลาซึมได้ ซึ่งอาจเป็นผลจากภาวะหนาวเย็นที่ทำให้พืชสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนย้าย mRNA ทำให้มี mRNA จำนวนมากสะสมอยู่ในนิวเคลียส ซึ่งเมื่อนำพืชกลับสู่อุณหภูมิห้องซึ่งถือเป็นภาวะปกติ พบว่าการส่งออก mRNA ของ *grp7* ก็กลับมาทำงานปกติ (ไม่พบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในนิวเคลียส) ทางผู้วิจัยได้ทำการทดลองแบบเดียวกันกับ *Arabidopsis* สายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของ *GRP7* ตลอดเวลา (gain-of-function; *35S::GRP7*) พบว่า ในภาวะหนาวเย็น *35S::GRP7* ยังสามารถทำงานส่งออก mRNA ออกจากนิวเคลียสเนื่องจากไม่พบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่แสดงถึงการสะสมของ mRNA ในนิวเคลียส เช่นเดียวกับใน WT Ziemienowicz และคณะ (2003) รายงานว่า GRP7 เป็นโปรตีนขนส่ง (shuttle protein) ทำงานโดยเข้าจับกับ nuclear import receptor transportin1 และส่งออก mRNA ซึ่ง mRNA จะถูกสะสมมากขึ้นเมื่อพืชอยู่ในภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม Kim และคณะ (2008) ได้นำเสนอว่า การที่ GRP7 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการส่งออก mRNA ถือเป็นการทำงานในกระบวนการรักษา mRNA folding ในนิวเคลียสวิธีหนึ่ง การป้องกันและแก้ไข misfolded RNAs ซึ่งส่งผลต่อกระบวนการเคลื่อนย้าย mRNA จากนิวเคลียสไปยังไซโทพลาซึมให้ยังสามารถทำงานได้เป็นปกติ แม้อยู่ในภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมน่าจะเป็นการช่วยรักษาเสถียรภาพของโปรตีนบางกลุ่มที่ทำงานเมื่อได้รับภาวะเครียด ส่งผลให้พืชทนทานต่อภาวะเครียดได้มากขึ้น ซึ่งอาจถือได้ว่าเป็นการทำงานในระดับ post-transcriptional gene regulation

มีรายงานเพิ่มว่า ปากใบของต้น *35S::GRP7* จะหรีแคบลงเล็กน้อยเมื่อได้รับภาวะเครียดจากความหนาวเย็นเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในขณะที่ปากใบของต้น *grp7* จะเปิดกว้างเนื่องจากสูญเสียความสามารถในการปิดปากใบเพื่อรักษาน้ำในเซลล์ แสดงให้เห็นว่า *GRP7* มีบทบาทเกี่ยวข้องบางประการกับกระบวนการปิดปากใบเมื่อพืชได้รับภาวะเครียด มีงานวิจัยที่ทำการทดลองศึกษาอัตราการงอกของเมล็ด *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีน *grp2* เปรียบเทียบกับ *35S::GRP2* โดยมี WT เป็นชุดควบคุม ผลการทดลองพบว่า *35S::GRP2* จะให้อัตราการงอกของเมล็ดที่เร็วกว่า WT และ *grp2* เมื่อได้รับภาวะเค็มจาก NaCl 75 mM ทั้งนี้เมล็ดทั้งหมดของต้น *35S::GRP2* จะงอกสมบูรณ์ 100% ในวันที่ 4 ที่ทำการทดลอง แตกต่างจาก WT ที่งอกสมบูรณ์ทุกเมล็ดในวันที่ 6 ผลการทดลองนี้ช่วยสนับสนุนความคิดที่ว่า การทำให้เย็นในกลุ่ม *GRPs* มีการแสดงออกตลอดเวลาโดยใช้โปรโมเตอร์ *35SCaMV* อาจช่วยเพิ่มความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดของพืชได้ (Kim *et al.*, 2007) เมื่อพิจารณาโครงสร้างของโปรตีน GRP7 และ GRP2 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ OsNUC1 เนื่องจากมีบริเวณ glycine-rich อยู่ทางปลายคาร์บอกซิลและมี RRM's อย่างน้อย 1 บริเวณอยู่ในบริเวณใกล้เคียงถัดไปทางด้านปลายอะมิโน ทั้งยังทำหน้าที่เกี่ยวข้องของกระบวนการสร้างและปรับเสถียร (stabilization) ของไรโบโซมเช่นเดียวกัน (Sachetto-Martins *et al.*, 2000) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า OsNUC1 น่าจะมีลักษณะการตอบสนองเมื่อได้รับภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมในรูปแบบที่คล้ายกันและเมื่อนำโปรโมเตอร์ *35SCaMV* มาควบคุมการทำงานของ *OsNUC1* ก็อาจส่งผลให้พืชทนต่อภาวะเครียดได้มากขึ้นด้วย

อย่างไรก็ตามผลการเติบโตของต้น *Arabidopsis* คัดแปรพันธุกรรมที่ไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกันในกลุ่มเดียวกันนั้น ยกตัวอย่างเช่น กลุ่ม (E) ในภาวะปกติ หรือกลุ่ม (A) ในภาวะเค็ม ทำให้เป็นการยากที่จะศึกษาว่าโมติฟรูปแบบใดของ OsNUC1 และโปรโมเตอร์แบบใดมีความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดจากความเค็มได้มากกว่ากัน ซึ่งสาเหตุที่ผลการทดลองระหว่างพืชที่ได้รับการถ่ายยีนกลุ่มเดียวกันมีความแตกต่างกันมากนั้น อาจมีสาเหตุเนื่องจากทั้ง 3 สายพันธุ์ได้รับการถ่ายยีนด้วย event ที่ต่างกัน จึงทำให้ระดับการแสดงออกของยีนรวมถึงลักษณะทางฟีโนไทป์มีความหลากหลายแตกต่างกัน (variation) เมื่อนำอัตราการเติบโตของสายพันธุ์เหล่านี้ไปเปรียบเทียบกับ WT จึงให้ผลการเปรียบเทียบที่หลากหลาย ตั้งแต่สายพันธุ์ที่มีการเติบโตมากกว่าไปจนถึงสายพันธุ์มีการเติบโตน้อยกว่า WT

ถึงแม้ว่าการศึกษาความสามารถในการทนต่อภาวะเค็มของพืช โดยพิจารณาจากการเติบโต (น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความยาวรากแก้ว) จะเป็นสิ่งที่ศึกษาได้ง่ายในระยะเวลาอันสั้น แต่เพื่อให้สามารถยืนยันได้ชัดเจนว่า โมติฟที่ได้จากการถ่ายยีน *35SCaMv::full-length\_OsNUC1* มีความสามารถในการทนเค็มได้มากกว่าโมติฟรูปแบบอื่น หรือเมื่อถูกควบคุมการทำงานด้วยโปรโมเตอร์แบบอื่น อาจต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ที่ทราบหน้าที่แน่ชัดว่า

ทำงานเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะเค็ม เช่น ยีน *rd29* *COR15a* หรือ *P5SC1* ที่ใช้เป็น stress marker รวมถึงศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบที่พืชได้รับจากภาวะเค็มว่า โมทิฟใดช่วยลดผลกระทบจากภาวะเครียด เช่น chlorophyll bleaching (Tran *et al.*, 2007) ได้มากกว่า ทั้งนี้การศึกษาในภาวะเครียดออสโมติกรูปแบบอื่น อย่างเช่น ภาวะแล้ง ภาวะที่ได้รับ ABA จากภายนอก โดยพิจารณาจากบริเวณ *cis-element* ของโปรโมเตอร์ *rd29A* อาจทำให้สามารถเปรียบเทียบได้ชัดเจนว่า ระหว่างโปรโมเตอร์ *rd29A* และ โปรโมเตอร์ *35SCaMV* โปรโมเตอร์ใดส่งผลต่อการเติบโตของพืชได้มากกว่ากันเมื่ออยู่ในภาวะเครียด นอกจากนี้การคัดเลือกต้น *Arabidopsis* ที่จะนำมาทำการทดลองก็เป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึง จะเห็นได้ว่าในงานวิจัยนี้มีการเติบโตใน Day 0 ของแต่ละต้นที่นำมาทดลองไม่เท่ากัน ดังนั้นอาจต้องเพาะเมล็ด *Arabidopsis* ให้มากขึ้น เพื่อให้สามารถเลือกต้นที่มีความสมบูรณ์ใกล้เคียง มีการเติบโตเริ่มต้นเท่ากันมาทำการทดลอง เพื่อจะได้เห็นผลของการเติบโตของพืชแต่ละต้นที่นำมาเปรียบเทียบภายใต้ภาวะเค็มที่เวลาต่าง ๆ ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น



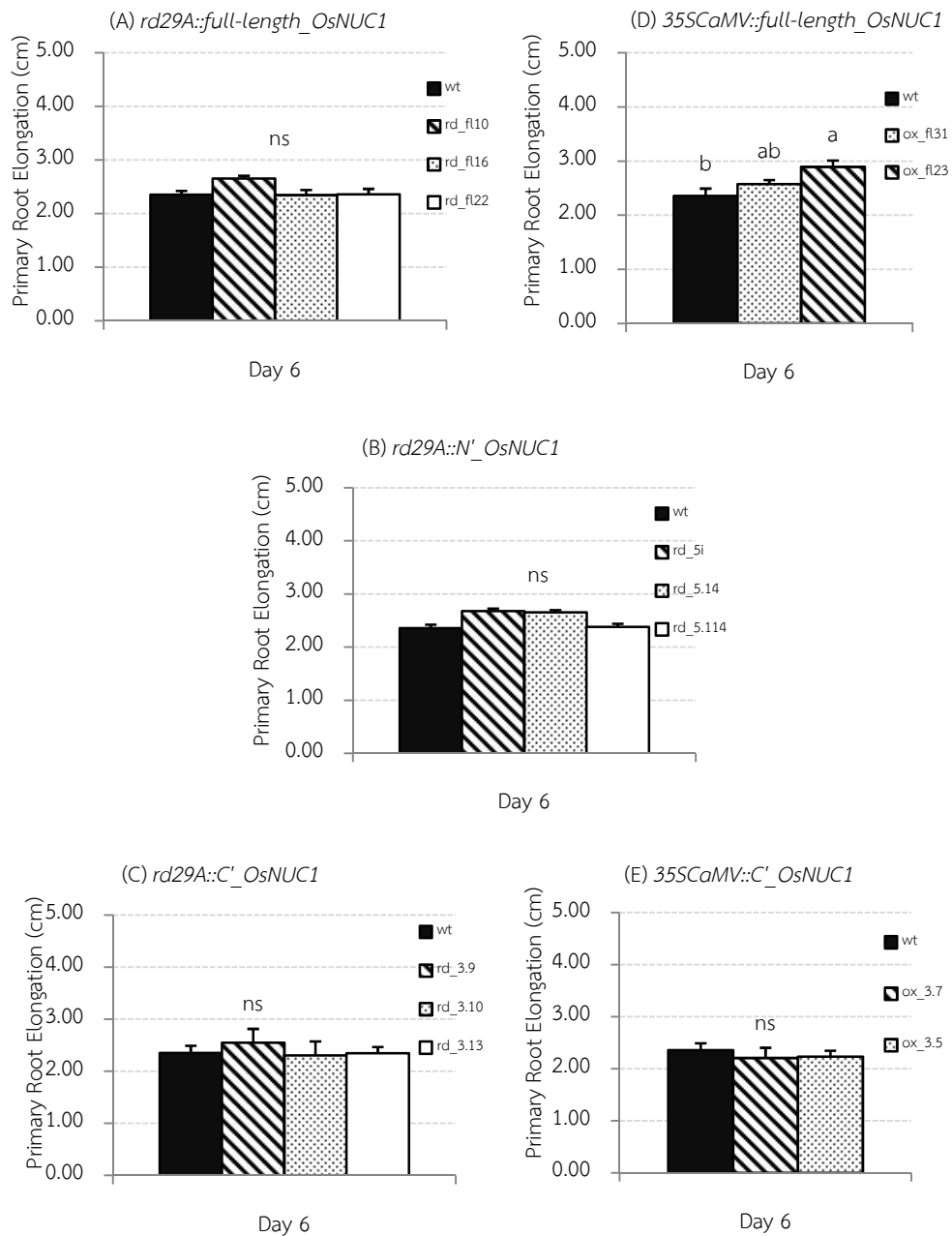
ภาพที่ 5.3 น้ำหนักสดของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรม (A): *rd29A::full-length\_OsNUC1* (B): *rd29A::N'\_OsNUC1* (C): *rd29A::C'\_OsNUC1* (D): *35SCaMV::full-length\_OsNUC1* และ (E): *35SCaMV::C'\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกลงอาหาร MS ที่เติม NaCl 100 mM เป็นเวลา 4 วัน (bar = SE)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ )

เปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้หลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลาเดียวกันเท่านั้น

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ





ภาพที่ 5.4 ความยาวรากแก้วของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรม (A): *rd29A::full-length\_OsNUC1* (B): *rd29A::N'\_OsNUC1* (C): *rd29A::C'\_OsNUC1* (D): *35SCaMV::full-length\_OsNUC1* และ (E): *35SCaMV::C'\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกบนอาหาร MS ที่เติม NaCl 100 mM เป็นเวลา 6 วัน (bar = SE)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ )

เปรียบเทียบเฉพาะค่าที่ได้หลังจากย้ายปลูกเป็นระยะเวลาเดียวกันเท่านั้น

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

## บทที่ 6

### สรุปผลการทดลอง

#### 1. สร้าง Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่มีโมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบต่างกัน

สร้างต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* หรือ (III): *pJim19::35SCaMV::N'\_OsNUC1* ด้วยวิธี *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation (Clough and Bent, 1998) ได้ต้นดัดแปรพันธุกรรมทั้งหมด 16 ต้น 19 ต้น และ 10 ต้น ตามลำดับ มีประสิทธิภาพของการถ่ายยีนอยู่ระหว่าง 1.0 ถึง 1.9 เปอร์เซ็นต์

#### 2. ตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นส่วนยีนใน Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่สร้างขึ้น

การใช้ PCR และกฎของ Mendel ที่ให้อัตราส่วนต้นด้านทานยาปฏิชีวนะต่อต้นไม่ด้านทานเป็น 3:1 ในการคัดเลือกต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายชุดโครงสร้างยีน พบว่าต้น Arabidopsis ในกลุ่ม (I) ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนแบบ homologous single insertion มีจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ rd\_fl10 rd\_fl16 rd\_fl17 และ rd\_fl22 และในกลุ่ม (II) มี 6 สายพันธุ์ได้แก่ rd\_5i rd\_5.3 rd\_5.5 rd\_5.14 rd\_5.113 และ rd\_5.114 ทั้งนี้ไม่พบชิ้นยีน *full-length\_OsNUC1* หรือ *N'\_OsNUC1* ในต้น WT Arabidopsis ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน สำหรับต้น Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมที่มีชุดโครงสร้างยีน (III): *pJim19::35SCaMV::N'\_OsNUC1* พบว่าไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก *N'\_OsNUC1* ซึ่งไม่มีจริงในธรรมชาติ เมื่อถูกควบคุมด้วย constitutive promoter ให้มีการแสดงออกมากเกินไป ความจำเป็น จะเกิดการสร้างและสะสมโปรตีน *N'\_OsNUC1* ซึ่งเป็นโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจนจำนวนมาก จนส่งผลกระทบต่อกระบวนการทำงานอื่น ๆ ในเซลล์จนส่งผลกระทบต่อเจริญเติบโตของพืช

### 3. ตรวจสอบการแสดงออกของชุดโครงสร้างยีนของ *OsNUC1* ในต้น *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็มด้วย quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

ต้น *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 6 สายพันธุ์จากกลุ่ม (I) และ (II) ที่นำมาทดสอบ แม้จะมีระดับการแสดงออกของยีน *full-length\_OsNUC1* หรือ *N'\_OsNUC1* แตกต่างกันบ้าง แต่ส่วนมากเกือบทุกสายพันธุ์ยกเว้นสายพันธุ์ rd\_5.14 มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับภาวะเครียดจากความเค็มเท่านั้นและไม่พบการแสดงออกของยีนในภาวะปกติที่ชั่วโมง 0 ทั้งนี้สายพันธุ์เหล่านั้นมีระดับการแสดงออกสูงที่สุดที่ 3 ชั่วโมงหลังได้รับภาวะเค็ม ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจาก DRE ซึ่งเป็น *cis-element* จำนวน 2 บริเวณในโปรโมเตอร์ *rd29A*

### 4. ผลการเติบโตของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* ที่ต่างกัน

จากการเปรียบเทียบการเติบโตระหว่างต้น *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* ต่างกัน ทั้งยังควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ที่ต่างกันพบว่า ภายใต้ภาวะปกติและภาวะเค็ม *Arabidopsis* กลุ่ม (B) ที่ได้รับถ่ายยีนที่ทำงานภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *rd29A* และถอดรหัส/แปลรหัสให้ *N'\_OsNUC1* มีแนวโน้มของการเติบโตดีกว่าต้น WT แต่เนื่องจาก *N'\_OsNUC1* เป็นโปรตีนที่ไม่พบอยู่จริงในธรรมชาติ ดังนั้นความสามารถในการทนเค็มและช่วยให้พืชเติบโตได้มากในภาวะเค็มจึงไม่น่าจะเกิดจากการทำงานของ *N'\_OsNUC1* เพียงอย่างเดียว น่าจะเป็นผลมาจากโดเมนอื่นที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับโครงสร้างของ *N'\_OsNUC1* ประกอบกัน อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณา *Arabidopsis* กลุ่ม (D) ที่ได้รับถ่ายยีน *35SCaMV::full-length\_OsNUC1* พบว่ามีแนวโน้มของการเติบโตดีกว่าต้น WT และต้นดัดแปรพันธุกรรมกลุ่มอื่น ๆ เมื่ออยู่ในภาวะเค็ม โดยเฉพาะเมื่อพิจารณาจากความยาวรากแก้ว แสดงให้เห็นว่า *OsNUC1* อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับบางประการในการเจริญเติบโตของพืชโดยเฉพาะกระบวนการพัฒนาของรากเมื่อได้รับภาวะเค็ม ทั้งนี้โปรโมเตอร์ *rd29A* เหมาะสมที่จะนำมาใช้ควบคุมการทำงานของยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้ *full-length\_OsNUC1* รวมไปถึง *N'\_OsNUC1* ในขณะที่โปรโมเตอร์ *35SCaMV* เหมาะสมที่จะนำมาใช้ควบคุมการทำงานของยีนที่ถอดรหัส/แปลรหัสให้ *C'\_OsNUC1*

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

ปารวี อิกาศ. 2546. เครื่องหมายทางพันธุกรรมของข้าว *Oryza sativa* L. พันธุ์เหลืองประทิวสายพันธุ์ทนเค็มที่ตรวจสอบโดยวิธีอาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมพร มณีประสพสุข. 2547. การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในข้าว *Oryza sativa* L. พันธุ์เหลืองประทิว 123 สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ทนเค็มในภาวะเค็ม. วิทยานิพนธ์ สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ปริญญาโทมหาบัณฑิต. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

### ภาษาอังกฤษ

Allain, F.H.T., Bouvet, P., Dieckmann, T., and Feigon, J. 2000. Molecular basis of sequence-specific recognition of pre-ribosomal RNA by nucleolin. *EMBO Journal* 19: 6870-6881.

Ambrosone, A., Costa, A., Leone, A., and Grillo, S. 2012. Beyond transcription: RNA-binding proteins as emerging regulators of plant response to environmental constraints. *Plant Science* 182: 12-18.

Barcelo, P., Rasco-Gaunt, S., Thorpe, C., and Lazzeri, P.A. 2001. Transformation and gene expression. *Advances in Botanical Research* 34: 59-126.

Bechtold, N., Ellis, J., and Pelletier, G. 1993. In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series III* 316: 1194-1199.

Bögge, L., et al. 1996. Developmental and cell cycle regulation of alfalfa *nucMs1*, a plant homolog of the yeast Nsr1 and mammalian nucleolin. *Plant Cell* 8: 417-428.

Borer, R.A., Lehner, C.F., Eppenberger, H.M., and Nigg, E.A. 1989. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56: 379-390.

- Checker, V.G., Chhibbar, A.K., and Khurana, P. 2011. Stress-inducible expression of barley *Hva1* gene in transgenic mulberry displays enhanced tolerance against drought, salinity and cold stress. **Transgenic Research** : 1-19.
- Chen, X., Zeng, Q.-c., Lu, X.-p., Yu, D.-q., and Li, W.-z. 2010. Characterization and Expression Analysis of Four Glycine-Rich RNA-Binding Proteins Involved in Osmotic Response in Tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi). **Agricultural Sciences in China** 9: 1577-1587.
- Chung, M.-H., Chen, M.-K., and Pan, S.-M. 2000. Floral spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis* transgenic plants. **Transgenic Research** 9: 471-486.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. 1998. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal** 16: 735-743.
- Dajic, Z. 2006. Salt Stress. In Rao, K.V.M., Raghavendra, A.S., and Reddy, K.J. (eds.), **Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants**. pp. 41-99. Netherlands : Springer.
- Feldmann, K.A., and David Marks, M. 1987. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. **MGG Molecular & General Genetics** 208: 1-9.
- Flowers, T.J., Troke, P.F., and Yeo, A.R. 1977. The Mechanism of Salt Tolerance in Halophytes. **Annual Review of Plant Physiology** 28: 89-121.
- GenBank. [online]. 1982. Available from : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [2009, September 21]
- Ghisolfi, L., Joseph, G., Amalric, F., and Erard, M. 1992. The glycine-rich domain of nucleolin has an unusual supersecondary structure responsible for its RNA-helix-destabilizing properties. **Journal of Biological Chemistry** 267: 2955-2959.
- Ginisty, H., Amalric, F., and Bouvet, P. 1998. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. **EMBO Journal** 17: 1476-1486.

- Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., and Bouvet, P. 1999. Structure and functions of nucleolin. **Journal of Cell Science** 112: 761-772.
- González-Camacho, F., and Medina, F.J. 2004. Nucleolins from different model organisms have conserved sequences reflecting the conservation of key cellular functions through evolution. **Journal of Applied Biomedicine** 2: 151-161.
- Greenway, H., and Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in Nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology** 31: 149-190.
- Hare, P.D., Cress, W.A., and Van Staden, J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant, Cell and Environment** 21: 535-553.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., and Bohnert, H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Biology** 51: 463-499.
- Honda, M., *et al.* 2002. Determination of gene copy number and genotype of transgenic *Arabidopsis thaliana* by competitive PCR. **Journal of Experimental Botany** 53: 1515-1520.
- Hong, B., *et al.* 2006. Heterologous expression of the *AtDREB1A* gene in chrysanthemum increases drought and salt stress tolerance. **Science in China, Series C: Life Sciences** 49: 436-445.
- Hsieh, T.H., Lee, J.T., Chang, Y.Y., and Chan, M.T. 2002. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. **Plant Physiology** 130: 618-626.
- Jia, H., Zhang, S., Ruan, M., Wang, Y., and Wang, C. 2012. Analysis and application of *RD29* genes in abiotic stress response. **Acta Physiologiae Plantarum**: 1-12.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature Biotechnology** 17: 287-291.

- Kasuga, M., Miura, S., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2004. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in Tobacco by gene transfer. **Plant and Cell Physiology** 45: 346-350.
- Khurts, S., *et al.* 2004. Nucleolin Interacts with Telomerase. **Journal of Biological Chemistry** 279: 51508-51515.
- Kim, J.S., *et al.* 2008. Glycine-rich RNA-binding protein7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal** 55: 455-466.
- Kim, J.Y., *et al.* 2007. Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. **The Plant Journal** 50: 439-451.
- Komori, T., *et al.* 2007. Current status of binary vectors and superbinary vectors. **Plant Physiology** 145: 1155-1160.
- Lapeyre, B., Bourbon, H., and Amalric, F. 1987. Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: An unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 84: 1472-1476.
- Lata, C., and Prasad, M. 2011. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. **Journal of Experimental Botany** 62: 4731-4748.
- Lee, L.Y., and Gelvin, S.B. 2008. T-DNA binary vectors and systems. **Plant Physiology** 146: 325-332.
- Léger-Silvestre, I., *et al.* 1997. Ultrastructural changes in the *Schizosaccharomyces pombe* nucleolus following the disruption of the *gar2+* gene, which encodes a nucleolar protein structurally related to nucleolin. **Chromosoma** 105: 542-552.
- Lischwe, M.A., Roberts, K.D., Yeoman, L.C., and Busch, H. 1982. Nucleolar specific acidic phosphoprotein C23 is highly methylated. **Journal of Biological Chemistry** 257: 14600-14602.

- Liu, Q., Zhao, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. 2000. Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. **Chinese Science Bulletin** 45: 970-975.
- Lorković, Z.J., and Barta, A. 2002. Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nucleic Acids Research** 30: 623-635.
- Martinez-Trujillo, M., Limones-Briones, V., Cabrera-Ponce, J., and Herrera-Estrella, L. 2004. Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. **Plant Molecular Biology Reporter** 22: 63-70.
- Medina, F.J., González-Camacho, F., Manzano, A.I., Manrique, A., and Herranz, R. 2010. Nucleolin, a major conserved multifunctional nucleolar phosphoprotein of proliferating cells. **Journal of Applied Biomedicine** 8: 141-150.
- Mongelard, F., and Bouvet, P. 2007. Nucleolin: a multiFACeTed protein. **Trends in Cell Biology** 17: 80-86.
- Msanne, J., Lin, J., Stone, J.M., and Awada, T. 2011. Characterization of abiotic stress-responsive *Arabidopsis thaliana* *RD29A* and *RD29B* genes and evaluation of transgenes. **Planta** 234: 97-107.
- Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473 – 497
- Nakaminami, K., Matsui, A., Shinozaki, K., and Seki, M. 2012. RNA regulation in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms** 1819: 149-153.
- Nakashima, K., *et al.* 2006. Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including *RD29B* and *RD29A* in seeds, germinating embryos, and seedlings of *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology** 60: 51-68.



- Nuccio, M.L., Rhodes, D., McNeil, S.D., and Hanson, A.D. 1999. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. **Current Opinion in Plant Biology** 2: 128-134.
- Oltmanns, H., *et al.* 2010. Generation of backbone-free, low transgene copy plants by launching T-DNA from the *Agrobacterium* chromosome. **Plant Physiology** 152: 1158-1166.
- Ondřej, M., Kocábek, T., Rakouský, S., and Wiesnerová, D. 1999. Segregation of T-DNA inserts in the offspring of *Arabidopsis thaliana* after *Agrobacterium* transformation. **Biologia Plantarum** 42: 185-195.
- Ohme-Takagi, M., Suzuki, K., and Shinshi, H. 2000. Regulation of Ethylene-Induced Transcription of defense genes. **Plant and Cell Physiology** 41: 1187-1192.
- Orrick, L.R., Olson, M.O.J., and Busch, H. 1973. Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 70: 1316-1320.
- Ouyang, S., *et al.* 2007. The TIGR Rice Genome Annotation Resource: improvements and new features. **Nucleic Acids Research** 35: 883-887
- Pellegrineschi, A., *et al.* 2004. Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana* *DREB1A* gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. **Genome** 47: 493-500.
- Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J.C., and Nigg, E.A. 1990. Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. **Cell** 60: 791-801.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research** 29.

- Roa-Rodríguez, C. 2007. **Promoter used to regulate gene expression**. [online]. Available from : <http://www.patentlens.net/daisy/promoters/768.html> [2009, April 14]
- Sachetto-Martins, G., Franco, L.O., and De Oliveira, D.E. 2000. Plant glycine-rich proteins: A family or just proteins with a common motif? **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression** 1492: 1-14.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2<sup>nd</sup> edition. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmidt-Zachmann, M.S., and Nigg, E.A. 1993. Protein localization to the nucleolus: A search for targeting domains in nucleolin. **Journal of Cell Science** 105: 799-806.
- Shinozaki, K., *et al.* 1998. Molecular Responses to Water Stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Research** 111: 345-351.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology** 115: 327-334.
- Siriporn Sripinyowanich. 2010. **Characterization of the novel salt stress responsive gene in Rice *Oryza sativa* L.** Doctoral Dissertation. Program in Biological Sciences. Chulalongkorn University.
- Smale, S.T., and Kadonaga, J.T. 2003. The RNA polymerase II core promoter. **Annual Review of Biochemistry** 72: 449-479.
- Sobrado, M.A. 2004. Influence of external salinity on the osmolality of xylem sap, leaf tissue and leaf gland secretion of the mangrove *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. **Trees - Structure and Function** 18: 422-427.
- Srivastava, M., and Pollard, H.B. 1999. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. **The FASEB Journal** 13: 1911-1922.
- Stepiński, D. 2012. Nucleolin level in plant root meristematic cells under chilling stress and recovery. **Micron** 43: 870-875.

- Taiz, L., and Zeiger, E. 1998. **Plant Physiology**, 4<sup>th</sup> edition. Massachusetts: Sinaure Associates.
- Tajrishi, M.M., Tuteja, R., and Tuteja, N. 2011. Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. **Communicative and Integrative Biology** 4: 267-275.
- Thikart, P., *et al.* 2005. Genetic variation and stress tolerance of somaclonal variegated Rice and its original cultivar. **Journal of Scientific Research of Chulalongkorn University** 30: 63-75.
- Tran, L.P., Nakashima, K., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2007. Plant gene networks in osmotic stress response: from genes to regulatory networks. **Methods in Enzymology** 428: 109-128.
- Tuteja, R., and Tuteja, N. 1998. Nucleolin: A multifunctional major nucleolar phosphoprotein. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology** 33: 407-436.
- Tzfira, T., and Citovsky, V. 2006. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology** 17: 147-154.
- Udomchalothorn, T., Maneeprasobsuk, S., Bangyeekhun, E., Boon-Long, P., and Chadchawan, S. 2009. The role of the bifunctional enzyme, fructose-6-phosphate-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase, in carbon partitioning during salt stress and salt tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science** 176: 334-341.
- White, B. 2007. **Recombinant DNA: Genes and genomes - A short course**. 3rd edition. San Francisco : W. H. Freeman.
- Wilson, A.K., Latham, J.R., and Steinbrecher, R.A. 2006. Transformation-induced mutations in transgenic plants: Analysis and biosafety implications. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews** 23: 209-237.
- Xiong, L., Schumaker, K.S., and Zhu, J.K. 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **Plant Cell** 14: S165-S183.

- Yamaguchi-shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S., and Shinozaki, K. 1992. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: Sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein **Plant and Cell Physiology** 33: 217-224.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. 1993. Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. **Molecular and General Genetics** 236: 331-340.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. 1994. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. **Plant Cell** 6: 251-264.
- Yokoi, S., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M. 2002. Salt stress tolerance of plants. **Japan International Research Center for Agricultural Sciences Working Report**: 25-33
- Yoshida, K.a.S., A. 2000. Transgene expression systems in plant, a natural bioreactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 90: 353-362.
- Zhu, J.K. 2001. Cell signaling under salt, water and cold stresses. **Current Opinion in Plant Biology** 4: 401-406.
- Zhu, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology** 53: 247-273.
- Ziemienowicz, A. 2010. Plant transgenesis. **Methods in molecular biology (Clifton, NJ)** 631: 253-268.
- Ziemienowicz, A., Haasen, D., Staiger, D., and Merkle, T. 2003. *Arabidopsis transportin1* is the nuclear import receptor for the circadian clock-regulated RNA-binding protein AtGRP7. **Plant Molecular Biology** 53: 201-212.

Ziemienowicz, A., Shim, Y.S., Matsuoka, A., Eudes, F., and Kovalchuk, I. 2012. A novel method of transgene delivery into triticales plants using the *Agrobacterium* transferred DNA-derived nano-complex. **Plant Physiology** 158: 1503-1513.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก





สารละลาย	ส่วนประกอบ
RNA extraction buffer	100 mM Tris pH 9.0 100 mM NaCl 20 mM EDTA 1.0% (w/v) Lauryl sarcosinate 0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol 0.1% (v/v) DEPC (diethyl pyrocarbonate)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Cloning และ bacterial transformation</b></li> </ul> LB medium  LB Agar medium	0.5% Bacto-yeast extract 1% Bacto-tryptone 1% NaCl  LB medium 1.5% LB Agar
<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Electrophoresis</b></li> </ul> 5X TBE  DNA/ RNA loading dye	54.0 g Tris-base 27.5 g Boric acid 20.0 ml EDTA pH 8.0 (0.5 M)  30% (v/v) Glycerol in water 0.25% (w/v) Bromophenol blue 0.25% (w/v) Xylene cyanol

สารละลาย	ส่วนประกอบ
<ul style="list-style-type: none"> <li>● ผลของภาวะเครียดจากความเค็มที่มีต่อการเติบโตของ Arabidopsis</li> </ul> <p>MS complete medium (Murashige and Skoog, 1962)</p> <p style="text-align: center;"><b>Inorganic salts</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Organic constituents</b></p>	<p>1650.0 mg Ammonium nitrate</p> <p>1900.0 mg Potassium nitrate</p> <p>180.0 mg Potassium Phosphate dibasic anhydrous</p> <p>380.0 mg Magnesium sulfate</p> <p>440.0 mg Calcium chloride dehydrate</p> <p>22.3 mg Manganese Sulfate</p> <p>27.8 mg Ferrous sulfate</p> <p>37.3 mg Disodium ethylenediaminetetraacetate</p> <p>8.6 mg Zinc sulfate</p> <p>6.2 mg Boric acid</p> <p>0.83 mg Potassium iodide</p> <p>0.0025 mg Cupric sulfate</p> <p>0.25 mg Sodium molybdate</p> <p>0.025 mg Cobalt chloride</p> <p>30.0 mg Sucrose</p> <p>2.0 mg Glycine</p> <p>100.0 mg Myo-Inositol</p> <p>0.5 mg Nicotine acid</p> <p>0.5 mg Pyridoxine</p> <p>0.1 mg Thiamine.HCl</p> <p>8.0 g Agar</p>

สารละลาย	ส่วนประกอบ
washing solution (10 ml)	5.5 ml น้ำกลั่น 4.5 ml Clorox® 2 $\mu$ l Triton X-100

## วิธีการทดลอง

### 1. การสกัดพลาสมิด DNA ตัดแปลงจาก Sambrook และคณะ (1989)

- 1.1 นำ frozen stock ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่มีชุดโครงสร้างยีนที่ต้องการ มา streak บนอาหารกึ่งแข็ง LB นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
- 1.2 เชี่ย single colony ลงในอาหารเหลว LB 10 มิลลิลิตร (ml) ที่เติม แล้วจึงนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าด้วยความเร็ว 200-220 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- 1.3 ปิเปิดอาหารเหลว LB ลงในหลอด microcentrifuge ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนใส (supernatant) ทิ้ง และเติม solution I 100 ไมโครลิตร ( $\mu$ l) นำไปเขย่าด้วย vortex หลังจากนั้นเติม solution II 200  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดเบา ๆ แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที
- 1.4 เติม solution III ปริมาตร 300  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดเบา ๆ หลังจากนั้นแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที
- 1.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เก็บส่วนใสซึ่งมีพลาสมิด DNA ย้ายลงในหลอด microcentrifuge และเติม absolute ethanol ที่แช่เย็นปริมาตรเป็น 2 เท่า นำไปแช่เย็นในน้ำแข็งหรือตู้แช่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อตกตะกอนพลาสมิด DNA
- 1.6 นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง หลังจากนั้นล้าง pellet ของพลาสมิด DNA ด้วย 70% ethanol และปล่อยให้แห้ง (air dry)
- 1.7 ละลาย pellet ของพลาสมิด DNA ในน้ำกลั่น 20  $\mu$ l วัดปริมาณความเข้มข้นของ DNA ด้วย electrophoresis แล้วเปรียบเทียบกับ DNA marker

### 2. การตัดพลาสมิด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme digestion)

- 2.1 ใช้พลาสมิด DNA ปริมาณ 0.5-1  $\mu$ g สำหรับการทำปฏิกิริยาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยาเป็น 20  $\mu$ l จะใส่ enzyme reaction buffer ปริมาตร 1X ใส่เอนไซม์ 2-5 units แตกต่างไปตามประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาของแต่ละเอนไซม์ เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย
- 2.2 นำไปบ่มทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกมาใช้ โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ระยะเวลาในการบ่มทำปฏิกิริยา 1-3 ชั่วโมง

- 2.3 ตรวจสอบพลาสมิด DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 0.8% (v/w) ถ้าต้องการพลาสมิด DNA ปริมาณมาก หลังจากบ่มทำปฏิกิริยาในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ให้รวมหลาย ๆ ปฏิกิริยาเข้าด้วยกัน และตกตะกอนพลาสมิด DNA (DNA precipitation) ด้วยการเติม phenol:chloroform (1:1) (v/v) ปริมาตรเท่ากันลงในปฏิกิริยา ผสมให้เข้ากันและปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสใส้หลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติม 3M NaOAc ปริมาตร 0.1 เท่า และ absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรส่วนใส นำไปแช่น้ำแข็งหรือตู้แช่ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสออก ล้าง pellet ด้วย 70% ethanol และปล่อยให้แห้ง แล้วจึงละลาย pellet ในน้ำกลั่นปริมาตร 20 µl ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย electrophoresis

### 3. การต่อชิ้นส่วน DNA เข้าด้วยกันโดยใช้ T4 DNA ligase (Ligation)

- 3.1 สกัดชิ้นส่วน DNA ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจาก agarose gel โดยใช้ Ultra Clean<sup>TM</sup> 15 DNA purification Kit (MO BIO Laboratories, Inc., USA) ตามวิธีในคู่มือ
- 3.2 นำชิ้นส่วน DNA ในที่นี้ได้แก่ เวกเตอร์ *pJim19* ชิ้นส่วนยีน *N'\_OsNUC1* หรือ *full-length\_OsNUC1* และโปรโมเตอร์ *rd29A* ไปวัดปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง spectrophotometer หรือ electrophoresis เทียบกับ DNA marker
- 3.3 คำนวณปริมาณ DNA ของเวกเตอร์ โปรโมเตอร์และชิ้นยีนที่จะนำมาทำปฏิกิริยา ligation โดยคำนึงถึงอัตราส่วนในระดับโมเลกุลของเวกเตอร์และชิ้นยีน (vector:insert molar ratio) ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert}}{\text{kb size of vector}} \times \text{insert: vector molar ratio} = \text{ng of insert}$$

ในการทดลองนี้ใช้อัตราส่วนระหว่างเวกเตอร์ต่อชิ้นยีน (vector:insert molar ratio) และ เวกเตอร์ต่อชิ้นส่วนโปรโมเตอร์ (vector:promoter molar ratio) ในการทำปฏิกิริยาเป็น 1:8 ซึ่งก็คือ vector:promoter:insert molar ratio เป็น 1:8:8 โดยมีปริมาณ DNA ของเวกเตอร์เท่ากับ 50 µg/µl

- 3.3 ทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยาเป็น 10 µl ซึ่งจะประกอบด้วย ligase buffer ปริมาตร 1 µl เอนไซม์ T4 DNA ligase (Takara, Japan) ปริมาตร 1 µl ชิ้นส่วน DNA ของเวกเตอร์ DNA ของชิ้นยีนและ DNA ของโปรโมเตอร์ โดยใช้ปริมาตร

ตามที่สามารถได้จากสมการด้านบนนำไปป่มทำปฏิกิริยาที่ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

4. การเตรียม competent cell (*Escherichia coli*) ดัดแปลงจาก Sambrook และคณะ (1989)
  - 4.1 นำ frozen stock ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  จากตู้แช่แข็ง มา steak บนอาหารกึ่งแข็ง LB นำไปป่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
  - 4.2 เชี่ย single colony ลงในอาหารเหลว LB 10 ml แล้วจึงนำไปป่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าด้วยความเร็ว 200-220 rpm เป็นเวลา 17 ชั่วโมง
  - 4.3 ดูดอาหารเหลว LB ที่มีเชื้อแบคทีเรีย 250  $\mu$ l ผสมกับอาหารเหลว LB 25 ml แล้วนำไปป่มเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200-220 rpm เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง จากนั้นเปิดอาหารเหลว LB ที่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตอยู่มาวัดค่า ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้อาหารเหลว LB ที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเป็น blank เลี้ยงเชื้อจนมีค่าดูดกลืนแสงประมาณ 0.6 - 0.8
  - 4.4 เทอาหารเหลว LB ที่มีเชื้อแบคทีเรียที่มีค่าดูดกลืนแสงตามต้องการ ใส่หลอด centrifuge ขนาด 50 ml แล้ววางบนน้ำแข็ง 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 1,600 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที เทส่วนใสออก หลังจากนั้นเติม 100 mM CaCl<sub>2</sub> 5 ml ที่ผ่านการแช่เย็น ใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง
  - 4.5 ปั่นเหวี่ยงที่ 1,100 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออกและเติม 100 mM CaCl<sub>2</sub> 5 ml ใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ แล้ววางบนน้ำแข็ง 30 นาที
  - 4.6 ปั่นเหวี่ยงที่ 1,100 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เติม 100 mM CaCl<sub>2</sub> 1 ml ใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ เติม 7% DMSO และแบ่งใส่หลอด microcentrifuge แช่ใน liquid nitrogen เก็บในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส

5. การนำ DNA เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* ด้วยวิธี heat shock
  - 5.1 นำ DNA ที่ได้จากการ ligation ปริมาตร 10  $\mu$ l มาผสมกับ *E. coli* competent cell ปริมาตร 200  $\mu$ l แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที
  - 5.2 แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 3-5 นาทีทันที
  - 5.3 เติมหาอาหารเหลว LB ปริมาตร 800  $\mu$ l นำไปบ่มเลี้ยงโดยเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm 1 นาที ปิเปิดส่วนใส (supernatant) ทิ้ง ให้เหลืออาหารเหลว LB ประมาณ 200  $\mu$ l
  - 5.4 ผสมอาหารเหลว LB ที่เหลือกับ pellet ของแบคทีเรียด้วยการปิเปิดขึ้นลง จากนั้นนำสารละลายเซลล์แบคทีเรียที่ได้เกลี่ยลงบนอาหารกึ่งแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 mg/L นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจสอบ colony ของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร
  
6. การเตรียม competent cell (*Agrobacterium tumefaciens*)
  - 6.1 นำ frozen stock ของเชื้อแบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ GV3101 มา streak บนอาหารกึ่งแข็ง LB นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
  - 6.2 เชี่ย single colony ลงในอาหารเหลว LB 5 ml ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 mg/L ไรแฟมพิซิน 20 mg/L และเจนตามัยซิน 50 mg/L แล้วจึงนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยเขย่าเป็นเวลา 18 ชั่วโมง
  - 6.3 ดูดอาหารเหลว LB ที่มีเชื้อแบคทีเรีย 500  $\mu$ l ผสมกับอาหารเหลว LB 50 ml ในขวดรูปชมพู่ แล้วนำไปบ่มเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสโดยเขย่าเป็นเวลา 18 ชั่วโมง
  - 6.4 นำขวดรูปชมพู่วางบนน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นเทอาหารเหลว LB ที่มีเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 45 ml ใส่หลอด centrifuge ปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ pellet หลังจากนั้นเติม 20 mM  $\text{CaCl}_2$  5 ml ที่ผ่านการแช่เย็นลงผสม
  - 6.5 ปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีเทส่วนใสทิ้ง เติม 20 mM  $\text{CaCl}_2$  ปริมาตร 1 ml ที่ผ่านการแช่เย็นลงผสม แบ่งใส่หลอด microcentrifuge แช่ใน liquid nitrogen เก็บในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส

7. การนำพลาสมิด DNA เข้าสู่แบคทีเรีย *A. tumefaciens* ด้วยวิธี freeze/ thaw

- 7.1 นำพลาสมิด 5  $\mu$ l (100 ng/ $\mu$ l) ผสมกับ *A. tumefaciens* competent cell 250  $\mu$ l แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที
- 7.2 นำไปแช่ใน liquid nitrogen 5 นาที หลังจากนั้นย้ายไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และย้ายไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที
- 7.3 เติมหาอาหารเหลว LB ปริมาตร 800  $\mu$ l นำไปปั่นเลี้ยงโดยเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 rpm 3 นาที ปิดเปิดส่วนใส่ทิ้งให้เหลือแต่ pellet
- 7.4 ปิดเปิดอาหารเหลว LB 200  $\mu$ l ผสมกับ pellet โดยการตีตลอด microcentrifuge เบา ๆ จากนั้นนำสารละลายปริมาตร 100  $\mu$ l เกลี่ยลงบนอาหารกึ่งแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ กานามัยซิน 50 mg/L ไรแฟมพิซิน 20 mg/L และเจนตามัยซิน 50 mg/L นำไปปั่นเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบ colony ของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร

8. การนำ *A. tumefaciens* เข้าสู่ *Arabidopsis* ด้วยวิธี *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation (Clough and Bent, 1998)

- 8.1 ฆ่าเชื้อเมล็ด *Arabidopsis thaliana* สายพันธุ์ปกติ ecotyp Columbia ด้วย washing solution แล้วนำไปเพาะบนอาหารกึ่งแข็งแข็งสูตร ½MS ที่มีการเติม 1% (w/v) sucrose ย้ายต้นกล้าอายุหนึ่งสัปดาห์ปลูกลงดินและวางไว้ในห้องไฟโตตรอนที่ควบคุมอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียสและมีระยะเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน
- 8.2 เมื่อต้น *Arabidopsis* อายุประมาณ 4 สัปดาห์หลังย้ายปลูก เตรียม *Agrobacterium* ที่ได้รับการถ่ายซึนยีนที่ต้องการ มา steak และเขี่ย single colony ลงในอาหารเหลว LB 40 ml ที่เติมสารปฏิชีวนะ กานามัยซิน 50 mg/L ไรแฟมพิซิน 20 mg/L และเจนตามัยซิน 50 mg/L แล้วจึงนำไปปั่นเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยเขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- 8.3 เทอาหารเหลว LB 40 ml ข้างต้นลงในอาหารเหลว LB 200 ml ที่เติมสารปฏิชีวนะ กานามัยซิน 50 mg/L ไรแฟมพิซิน 20 mg/L และเจนตามัยซิน 50 mg/L นำไปปั่นเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



- 8.4 เทออาหารเหลว LB 240 ml ที่มีค่า  $OD_{600} \sim 0.8$  แบ่งใส่หลอด centrifuge ขนาด 25 ml จำนวน 6 หลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง
- 8.5 เติมอาหารเหลว  $\frac{1}{2}MS$  ที่มีการเติม 5% (w/v) sucrose ปริมาตร 50 ml ลงผสมกับ pellet ดิบเบา ๆ ให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติม 0.02 % Silwet L-77
- 8.6 นำดอกของ Arabidopsis แช่ลงในสารละลายดังกล่าวเป็นเวลา 15 นาที โดยตัดดอกที่บานทิ้งให้เหลือแต่ดอกตูม หลังจากนั้นคลุมต้น Arabidopsis ด้วยพลาสติกใสวางในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้ายมาวางในห้องไฟโตตรอนให้แสงและน้ำตามปกติ
- 8.7 คัดเลือกเมล็ด Arabidopsis ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนด้วยการเพาะบนอาหารกึ่งแข็ง  $\frac{1}{2}MS$  ที่เติมสารปฏิชีวนะที่ใช้ตรวจสอบ marker gene
9. การตรวจสอบชิ้นส่วนยีนใน colony ของแบคทีเรีย ด้วยวิธี colony PCR
- 9.1 เชี่ย colony ของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารโดยใช้ micropipette tip ขนาด 10  $\mu$ l แล้วนำไปจุ่มในน้ำกลั่นปริมาตร 30  $\mu$ l ซึ่งอยู่ในหลอด microcentrifuge
- 9.2 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสไปใช้เป็น DNA แม่แบบ (template) ในการทำ PCR
- 9.3 ทำการแยกสาย DNA ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำ PCR โดยใช้จำนวนรอบ 40 รอบ ซึ่งแต่ละรอบประกอบด้วยอุณหภูมิและเวลาดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาทีสำหรับแยกสาย DNA ตามด้วยขั้นตอนการจับคู่ของไพรเมอร์กับ template ที่อุณหภูมิจำเพาะซึ่งแตกต่างกันไปตามไพรเมอร์ที่ใช้ (ตาราง 3.1) เป็นเวลา 1 นาทีและอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาทีเพื่อสังเคราะห์ DNA เมื่อครบจำนวนรอบแล้วคงอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ต่ออีก 7 นาที
- 9.4 วิเคราะห์ผลของ colony PCR ด้วย electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 0.8% (v/w)
10. การสกัด genomic DNA ด้วยวิธี CTAB
- 10.1 บดตัวอย่างใบของ Arabidopsis ที่แช่แข็งในโกร่งบด หลังจากนั้นตัดตัวอย่างพืชใส่หลอด microcentrifuge ที่ทำให้เย็นจัดด้วยไนโตรเจนเหลว เติม CTAB buffer 500  $\mu$ l ซึ่งอุ่นให้

ร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสผสมให้เข้ากันและบ่มให้ร้อนต่อที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที

10.2 เติมน้ำ phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 500  $\mu$ l นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่แล้วเติมน้ำ absolute ethanol แชน้ำปริมาตร 2 เท่าของสารละลายส่วนใสที่ดูตามาได้ ผสมให้เข้ากันและนำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

10.3 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสออก และล้าง pellet ด้วย 70% ethanol นำไป air dry จากนั้นละลาย pellet ในน้ำกลั่น 50  $\mu$ l เติมน้ำเอนไซม์ *RNAseI* 1  $\mu$ l ความเข้มข้น 1 mg/ml เพื่อกำจัด RNA โดยนำไปบ่มทำปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที

10.4 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 250  $\mu$ l และ phenol:chloroform:isoamyl (25:24:1) ปริมาตร 300  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไปเติมน้ำ absolute ethanol แชน้ำปริมาตร 2 เท่าและ 3M NaOAc ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรส่วนใส นำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

10.5 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้าง pellet ด้วย 70% ethanol ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลาย pellet ใน TE buffer 20  $\mu$ l วัดความเข้มข้นของสารละลายด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm หรือใช้ gel electrophoresis เก็บ genomic DNA ที่ -20 องศาเซลเซียส

## 11. การตรวจสอบชิ้นส่วนยีนใน *Arabidopsis* ด้วยวิธี PCR

11.1 นำ genomic DNA ปริมาณ 0.5-1 ng มาทำปฏิกิริยา PCR ที่มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 20  $\mu$ l

ซึ่งประกอบด้วย 10X PCR reaction buffer	1X
ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชิ้นยีนที่ต้องการตรวจสอบ	0.2 $\mu$ M
10 mM dNTPs mix	0.1 $\mu$ M
<i>Taq</i> DNA polymerase (5U/ $\mu$ l)	1.25 units
และน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 $\mu$ l	

11.2 ทำการแยกสาย DNA ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำ PCR โดยใช้จำนวนรอบ 35-40 รอบ ซึ่งแต่ละรอบประกอบด้วยอุณหภูมิและเวลาดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 วินาทีสำหรับแยกสาย DNA ตามด้วยขั้นตอนการจับคู่ของไพรเมอร์กับ template ที่อุณหภูมิจำเพาะซึ่งแตกต่างกันไปตามไพรเมอร์ที่ใช้ (ตาราง 3.1) เป็นเวลา 1 นาทีและอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาทีเพื่อสังเคราะห์ DNA เมื่อครบจำนวนรอบแล้วคงอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ต่ออีก 7 นาที

11.3 วิเคราะห์ผลของ PCR ด้วย electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 0.8% (v/w)

## 12. การสกัด RNA ด้วยวิธี Hot phenol (ดัดแปลงจากปารวี ธิกาศ (2546))

12.1 บดตัวอย่างต้นกล้า *Arabidopsis* แข็งจำนวน 20 ต้นในโถรงบดที่ผ่านการอบเพื่อทำลาย RNase ตักตัวอย่างพืชใส่หลอด microcentrifuge ที่ทำให้เย็นจัดด้วยไนโตรเจนเหลว เติม RNA extraction buffer และ phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) อย่างละ 500  $\mu$ l ซึ่งอุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันและแช่ลงในน้ำแข็งทันที

12.2 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่แล้วเติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายส่วนใสที่ดูมาได้ ผสมให้เข้ากันและนำไปตกตะกอนที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

12.3 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้าง pellet ด้วย 80% ethanol และนำไป air dry ที่อุณหภูมิห้องให้ ethanol ระเหยจนหมด หลังจากนั้นละลาย pellet ใน DEPC-treated TE buffer 160  $\mu$ l เติม 10 M LiCl<sub>2</sub> 40  $\mu$ l และนำไปตกตะกอนที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18 ชั่วโมง

12.4 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้าง pellet ด้วย 80% ethanol และนำไป air dry ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลาย pellet ใน DEPC treated TE 20  $\mu$ l วัดความเข้มข้นของสารละลายและตรวจสอบคุณภาพ total RNA ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm และ electrophoresis ตามลำดับ เก็บที่ -80 องศาเซลเซียส

### 13. การเตรียม cDNA สายแรกสำหรับทำ qRT-PCR

13.1 นำ total RNA ปริมาณ 20-50 µg มาเติมส่วนผสมของ DNaseI treatment (Takara, Japan) เพื่อกำจัด DNase โดยส่วนผสมของ DNaseI treatment มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 µl ซึ่งประกอบด้วย 10X DNaseI buffer 5 µl เอนไซม์ DNaseI 2 µl (10 units) และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย DEPC นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

13.2 หยุดการทำงานของเอนไซม์ DNaseI ด้วยการเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อด้วย DEPC ปริมาตร 150 µl และ phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากันและปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไปเติม absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าและ 3M NaOAc ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรส่วนใส นำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

13.3 ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออก ล้าง pellet ด้วย 80% ethanol ปล่อยให้แห้ง แล้วจึงละลาย pellet ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย DEPC ปริมาตร 10 µl นำไปวัดความเข้มข้นของสารละลายและตรวจสอบคุณภาพ RNA ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ electrophoresis

13.4 เพื่อสร้าง cDNA สายแรก นำ RNA ปริมาณ 3 µg มาเติมไพรเมอร์ Oligo(dT) 0.5 – 1 µg และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย DEPC ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 5 นาที

13.5 หลังจากนั้นใส่ส่วนผสมของปฏิกิริยา reverse transcription ปริมาตร 15 µl ซึ่งประกอบด้วย dNTPs 100 ng 1X M-MLV reverse transcriptase buffer และเอนไซม์ M-MLVRT (200 units) และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย DEPC ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง นำ cDNA สายแรกที่ได้ไปใช้เป็น template ในการทำ qRT-PCR

### 14. การตรวจสอบการแสดงออกของชุดโครงสร้างยีนด้วย qRT-PCR

14.1 นำ cDNA ที่สร้างได้มาใช้เป็น template ในการทำ qRT-PCR ด้วยเครื่อง iCycler<sup>TM</sup> Thermal Cycler (Bio-Rad) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อยีนอ้างอิง (*AtEF-1α*) หรือต่อชิ้นยีนที่ต้องการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน (*full-length OsNUC1* หรือ *N' OsNUC1*) ในการทำปฏิกิริยา

- 14.2 ในแต่ละปฏิกิริยาจะทำประกอบด้วย 5  $\mu$ l ของ iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Super Mix (Bio-Rad) 1  $\mu$ l ของ cDNA ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชิ้นยีน (5-10 mM) ทั้ง forward และ reverse อย่างละ 1  $\mu$ l และน้ำกลั่น 2  $\mu$ l มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 10  $\mu$ l ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งตัวอย่างของ cDNA
- 14.3 ทำปฏิกิริยาโดยเริ่มที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที แล้วทำ PCR อีก 49 รอบ ซึ่งแต่ละรอบประกอบด้วยอุณหภูมิและเวลาดังนี้ อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาทีสำหรับแยกสาย cDNA ตามด้วยขั้นตอนการจับคู่ของไพรเมอร์กับ cDNA ที่อุณหภูมิจำเพาะซึ่งแตกต่างกันไปตามไพรเมอร์ที่ใช้เป็นเวลา 10 วินาทีและอุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วินาที หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาเพื่อวิเคราะห์หาค่า melting curve โดยใช้อุณหภูมิในช่วง 65-95 องศาเซลเซียส เพิ่มอุณหภูมิครั้งละ 0.5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วินาที
- 14.4 เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนที่ต้องการศึกษา (*full-length\_OsNUC1* หรือ *N'\_OsNUC1*) ด้วยวิธีเปรียบเทียบการแสดงออกสัมพัทธ์ (relative quantification) ของยีนในตัวอย่างที่ต้องการศึกษากับตัวอย่างที่เลือกมาเป็น control (ในงานวิจัยนี้ เลือกตัวอย่างที่ 0 ชั่วโมงของ rd\_fl10 หรือ rd\_5i) โดยมียีนอ้างอิงคือ *AtEF1 $\alpha$*  ตามวิธีของ Pfaffl (2001)

$$R = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-sample)}}$$

ภาคผนวก ข

ตารางที่ ข-1 ระดับการแสดงออกของยีน *full-length\_OsNUC1* ใน Arabidopsis ดัดแปร พันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายชุดโครโมโซมยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* หลังจากได้รับภาวะเค็มที่เวลาต่าง ๆ (mean  $\pm$  SE)

Line	Time after treatment (hours)	Relative level of <i>rd29A::full-length_OsNUC1</i> expression $\pm$ SE	
rd_fl10	0	1.0	$\pm$ 0.16 <sup>b</sup>
	3	62.9	$\pm$ 5.59 <sup>a</sup>
	6	0.0	$\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
	12	4.0	$\pm$ 0.44 <sup>b</sup>
rd_fl16	0	0.1	$\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
	3	35.8	$\pm$ 4.75 <sup>a</sup>
	6	8.0	$\pm$ 0.86 <sup>b</sup>
	12	0.3	$\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
rd_fl22	0	0.1	$\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
	3	11.1	$\pm$ 0.40 <sup>b</sup>
	6	8.0	$\pm$ 0.68 <sup>c</sup>
	12	14.3	$\pm$ 1.27 <sup>a</sup>
WT	0	0.0	$\pm$ 0.00 <sup>ns</sup>
	3	0.0	$\pm$ 0.00 <sup>ns</sup>
	6	0.0	$\pm$ 0.00 <sup>ns</sup>
	12	0.0	$\pm$ 0.00 <sup>ns</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ ข-2 ระดับการแสดงออกของยีน *N'\_OsNUC1* ใน *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับ การถ่ายชุดโครโมโซมยีน (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* หลังจากได้รับ ภาวะเค็มที่เวลาต่าง ๆ (mean  $\pm$  SE)

Line	Time after treatment (hours)	Relative level of <i>rd29A::N'_OsNUC1</i> expression $\pm$ SE	
rd_5i	0	1.0	$\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
	3	25.3	$\pm$ 3.25 <sup>a</sup>
	6	22.1	$\pm$ 5.13 <sup>a</sup>
	12	1.4	$\pm$ 0.08 <sup>b</sup>
rd_5.14	0	13.1	$\pm$ 0.51 <sup>a</sup>
	3	12.0	$\pm$ 0.69 <sup>a</sup>
	6	3.2	$\pm$ 0.53 <sup>b</sup>
	12	2.4	$\pm$ 0.33 <sup>b</sup>
rd_5.114	0	0.9	$\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
	3	18.4	$\pm$ 1.03 <sup>a</sup>
	6	7.8	$\pm$ 0.96 <sup>b</sup>
	12	3.5	$\pm$ 0.46 <sup>b</sup>
WT	0	0.0	$\pm$ 0.00 <sup>ns</sup>
	3	0.0	$\pm$ 0.00 <sup>ns</sup>
	6	0.0	$\pm$ 0.00 <sup>ns</sup>
	12	0.0	$\pm$ 0.00 <sup>ns</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวนิ่งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน



ตารางที่ ข-3 น้ำหนักสดของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (A) *rd29A::full-length\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกในภาวะปกติ (MS) และภาวะเค็ม (NaCl) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean  $\pm$  SE)

Day of treatment	Line	Fresh weight, mg $\pm$ SE	
		MS	NaCl
Day 0	wt	1.57 $\pm$ 0.077 <sup>a</sup>	1.57 $\pm$ 0.077 <sup>a</sup>
	rd_fl10	1.16 $\pm$ 0.045 <sup>b</sup>	1.16 $\pm$ 0.045 <sup>b</sup>
	rd_fl16	1.21 $\pm$ 0.076 <sup>b</sup>	1.21 $\pm$ 0.076 <sup>b</sup>
	rd_fl22	0.53 $\pm$ 0.004 <sup>c</sup>	0.53 $\pm$ 0.004 <sup>c</sup>
Day 2	wt	1.91 $\pm$ 0.074 <sup>b</sup>	1.60 $\pm$ 0.067 <sup>a</sup>
	rd_fl10	2.04 $\pm$ 0.141 <sup>b</sup>	1.70 $\pm$ 0.042 <sup>a</sup>
	rd_fl16	4.01 $\pm$ 0.231 <sup>a</sup>	0.99 $\pm$ 0.059 <sup>b</sup>
	rd_fl22	1.94 $\pm$ 0.171 <sup>b</sup>	0.84 $\pm$ 0.027 <sup>b</sup>
Day 4	wt	2.40 $\pm$ 0.134 <sup>c</sup>	1.78 $\pm$ 0.082 <sup>a</sup>
	rd_fl10	3.08 $\pm$ 0.078 <sup>b</sup>	1.92 $\pm$ 0.050 <sup>a</sup>
	rd_fl16	4.27 $\pm$ 0.197 <sup>a</sup>	1.42 $\pm$ 0.085 <sup>b</sup>
	rd_fl22	2.27 $\pm$ 0.262 <sup>c</sup>	1.24 $\pm$ 0.037 <sup>b</sup>
Day 6	wt	4.83 $\pm$ 0.273 <sup>b</sup>	3.71 $\pm$ 0.052 <sup>a</sup>
	rd_fl10	4.27 $\pm$ 0.334 <sup>b</sup>	3.27 $\pm$ 0.150 <sup>b</sup>
	rd_fl16	6.16 $\pm$ 0.685 <sup>a</sup>	3.39 $\pm$ 0.140 <sup>ab</sup>
	rd_fl22	3.65 $\pm$ 0.273 <sup>b</sup>	2.03 $\pm$ 0.090 <sup>c</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ ข-3 (ต่อ) น้ำหนักแห้งของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (A) *rd29A::full-length\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกในภาวะปกติ (MS) และภาวะเค็ม (NaCl) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean  $\pm$  SE)

Day of treatment	Line	Dry weight, mg $\pm$ SE			
		MS		NaCl	
Day 0	wt	0.05	$\pm$ 0.006 <sup>ns</sup>	0.05	$\pm$ 0.006 <sup>ns</sup>
	rd_fl10	0.06	$\pm$ 0.004 <sup>ns</sup>	0.06	$\pm$ 0.004 <sup>ns</sup>
	rd_fl16	0.06	$\pm$ 0.006 <sup>ns</sup>	0.06	$\pm$ 0.006 <sup>ns</sup>
	rd_fl22	0.04	$\pm$ 0.006 <sup>ns</sup>	0.04	$\pm$ 0.006 <sup>ns</sup>
Day 2	wt	0.11	$\pm$ 0.009 <sup>ns</sup>	0.10	$\pm$ 0.004 <sup>ab</sup>
	rd_fl10	0.11	$\pm$ 0.008 <sup>ns</sup>	0.09	$\pm$ 0.008 <sup>ab</sup>
	rd_fl16	0.12	$\pm$ 0.019 <sup>ns</sup>	0.11	$\pm$ 0.016 <sup>a</sup>
	rd_fl22	0.07	$\pm$ 0.012 <sup>ns</sup>	0.07	$\pm$ 0.010 <sup>b</sup>
Day 4	wt	0.18	$\pm$ 0.004 <sup>ns</sup>	0.12	$\pm$ 0.007 <sup>ns</sup>
	rd_fl10	0.17	$\pm$ 0.007 <sup>ns</sup>	0.12	$\pm$ 0.007 <sup>ns</sup>
	rd_fl16	0.18	$\pm$ 0.026 <sup>ns</sup>	0.11	$\pm$ 0.015 <sup>ns</sup>
	rd_fl22	0.13	$\pm$ 0.009 <sup>ns</sup>	0.09	$\pm$ 0.006 <sup>ns</sup>
Day 6	wt	0.27	$\pm$ 0.008 <sup>ns</sup>	0.19	$\pm$ 0.008 <sup>b</sup>
	rd_fl10	0.26	$\pm$ 0.017 <sup>ns</sup>	0.17	$\pm$ 0.007 <sup>b</sup>
	rd_fl16	0.27	$\pm$ 0.031 <sup>ns</sup>	0.23	$\pm$ 0.015 <sup>a</sup>
	rd_fl22	0.24	$\pm$ 0.015 <sup>ns</sup>	0.12	$\pm$ 0.013 <sup>c</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ ข-3 (ต่อ) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (A) *rd29A::full-length\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกบนอาหารภายใต้ภาวะปกติและภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน (mean  $\pm$  SE)

Day of treatment	Line	Relative Growth Rate, mg mg <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> $\pm$ SE			
		MS		NaCl	
Day0-2	wt	0.35	$\pm$ 0.021 <sup>ns</sup>	0.31	$\pm$ 0.036 <sup>a</sup>
	rd_fl10	0.26	$\pm$ 0.007 <sup>ns</sup>	0.15	$\pm$ 0.014 <sup>b</sup>
	rd_fl16	0.34	$\pm$ 0.045 <sup>ns</sup>	0.32	$\pm$ 0.037 <sup>a</sup>
	rd_fl22	0.25	$\pm$ 0.039 <sup>ns</sup>	0.20	$\pm$ 0.034 <sup>b</sup>
Day2-4	wt	0.27	$\pm$ 0.029 <sup>ns</sup>	0.11	$\pm$ 0.017 <sup>a</sup>
	rd_fl10	0.24	$\pm$ 0.020 <sup>ns</sup>	0.17	$\pm$ 0.021 <sup>a</sup>
	rd_fl16	0.23	$\pm$ 0.041 <sup>ns</sup>	-0.01	$\pm$ 0.039 <sup>b</sup>
	rd_fl22	0.34	$\pm$ 0.061 <sup>ns</sup>	0.19	$\pm$ 0.057 <sup>a</sup>
Day4-6	wt	0.20	$\pm$ 0.009 <sup>b</sup>	0.23	$\pm$ 0.011 <sup>b</sup>
	rd_fl10	0.20	$\pm$ 0.015 <sup>b</sup>	0.16	$\pm$ 0.007 <sup>b</sup>
	rd_fl16	0.21	$\pm$ 0.052 <sup>b</sup>	0.40	$\pm$ 0.037 <sup>a</sup>
	rd_fl22	0.31	$\pm$ 0.015 <sup>a</sup>	0.14	$\pm$ 0.032 <sup>c</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ ข-3 (ต่อ) ความยาวรากแก้วของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่  
 ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (A) *rd29A::full-length\_OsNUC1* เมื่อ  
 ย้ายปลูกในภาวะปกติและภาวะเค็มที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean  $\pm$  SE)

Day of treatment	Line	Root length, cm $\pm$ SE			
		MS		NaCl	
Day 0	wt	1.17	$\pm$ 0.059 <sup>ns</sup>	1.09	$\pm$ 0.076 <sup>ns</sup>
	rd_fl10	1.17	$\pm$ 0.069 <sup>ns</sup>	1.09	$\pm$ 0.090 <sup>ns</sup>
	rd_fl16	1.09	$\pm$ 0.041 <sup>ns</sup>	1.12	$\pm$ 0.048 <sup>ns</sup>
	rd_fl22	1.05	$\pm$ 0.038 <sup>ns</sup>	0.88	$\pm$ 0.033 <sup>ns</sup>
Day 2	wt	2.00	$\pm$ 0.325 <sup>ns</sup>	1.17	$\pm$ 0.068 <sup>b</sup>
	rd_fl10	1.45	$\pm$ 0.103 <sup>ns</sup>	1.41	$\pm$ 0.062 <sup>a</sup>
	rd_fl16	1.85	$\pm$ 0.172 <sup>ns</sup>	1.21	$\pm$ 0.067 <sup>b</sup>
	rd_fl22	1.31	$\pm$ 0.005 <sup>ns</sup>	1.20	$\pm$ 0.047 <sup>b</sup>
Day 4	wt	2.08	$\pm$ 0.174 <sup>ns</sup>	1.66	$\pm$ 0.097 <sup>ns</sup>
	rd_fl10	2.35	$\pm$ 0.122 <sup>ns</sup>	1.82	$\pm$ 0.082 <sup>ns</sup>
	rd_fl16	2.38	$\pm$ 0.120 <sup>ns</sup>	1.68	$\pm$ 0.062 <sup>ns</sup>
	rd_fl22	2.04	$\pm$ 0.094 <sup>ns</sup>	1.63	$\pm$ 0.044
Day 6	wt	2.67	$\pm$ 0.115 <sup>c</sup>	2.36	$\pm$ 0.135 <sup>ns</sup>
	rd_fl10	3.91	$\pm$ 0.269 <sup>a</sup>	2.66	$\pm$ 0.048 <sup>ns</sup>
	rd_fl16	3.08	$\pm$ 0.109 <sup>bc</sup>	2.34	$\pm$ 0.097 <sup>ns</sup>
	rd_fl22	3.39	$\pm$ 0.189 <sup>ab</sup>	2.36	$\pm$ 0.099 <sup>ns</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT  
 ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลา  
 เดียวกัน

ตารางที่ ข-4 น้ำหนักสดของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (B) *rd29A::N'\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกในภาวะปกติ (MS) และภาวะเค็ม (NaCl) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean  $\pm$  SE)

Day of treatment	Line	Fresh weight, mg $\pm$ SE	
		MS	NaCl
Day 0	wt	1.57 $\pm$ 0.077 <sup>a</sup>	1.57 $\pm$ 0.077 <sup>a</sup>
	rd_5i	1.26 $\pm$ 0.055 <sup>b</sup>	1.26 $\pm$ 0.055 <sup>b</sup>
	rd_5.14	1.38 $\pm$ 0.056 <sup>ab</sup>	1.38 $\pm$ 0.056 <sup>ab</sup>
	rd_5.114	1.22 $\pm$ 0.081 <sup>b</sup>	1.22 $\pm$ 0.081 <sup>b</sup>
Day 2	wt	1.91 $\pm$ 0.074 <sup>b</sup>	1.60 $\pm$ 0.067 <sup>b</sup>
	rd_5i	2.41 $\pm$ 0.245 <sup>b</sup>	2.27 $\pm$ 0.193 <sup>a</sup>
	rd_5.14	2.31 $\pm$ 0.145 <sup>b</sup>	2.15 $\pm$ 0.050 <sup>a</sup>
	rd_5.114	2.98 $\pm$ 0.146 <sup>a</sup>	1.35 $\pm$ 0.050 <sup>b</sup>
Day 4	wt	2.40 $\pm$ 0.134 <sup>b</sup>	1.78 $\pm$ 0.082 <sup>d</sup>
	rd_5i	4.05 $\pm$ 0.180 <sup>a</sup>	3.78 $\pm$ 0.239 <sup>a</sup>
	rd_5.14	4.60 $\pm$ 0.590 <sup>a</sup>	3.05 $\pm$ 0.252 <sup>b</sup>
	rd_5.114	4.61 $\pm$ 0.192 <sup>a</sup>	2.36 $\pm$ 0.176 <sup>c</sup>
Day 6	wt	4.83 $\pm$ 0.273 <sup>ns</sup>	3.71 $\pm$ 0.052 <sup>c</sup>
	rd_5i	5.50 $\pm$ 0.442 <sup>ns</sup>	4.25 $\pm$ 0.214 <sup>b</sup>
	rd_5.14	4.87 $\pm$ 0.600 <sup>ns</sup>	3.77 $\pm$ 0.120 <sup>c</sup>
	rd_5.114	6.37 $\pm$ 0.237 <sup>ns</sup>	4.93 $\pm$ 0.134 <sup>a</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ ข-4 (ต่อ) น้ำหนักแห้งของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมติฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (B) *rd29A::N'\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกในภาวะปกติ (MS) และภาวะเค็ม (NaCl) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean  $\pm$  SE)

Day of treatment	Line	Dry weight, mg $\pm$ SE			
		MS		NaCl	
Day 0	wt	0.05	$\pm$ 0.006 <sup>ns</sup>	0.05	$\pm$ 0.006 <sup>ns</sup>
	rd_5i	0.07	$\pm$ 0.008 <sup>ns</sup>	0.07	$\pm$ 0.008 <sup>ns</sup>
	rd_5.14	0.05	$\pm$ 0.007 <sup>ns</sup>	0.05	$\pm$ 0.007 <sup>ns</sup>
	rd_5.114	0.07	$\pm$ 0.009 <sup>ns</sup>	0.07	$\pm$ 0.009 <sup>ns</sup>
Day 2	wt	0.11	$\pm$ 0.009 <sup>bc</sup>	0.10	$\pm$ 0.004 <sup>b</sup>
	rd_5i	0.13	$\pm$ 0.007 <sup>a</sup>	0.14	$\pm$ 0.008 <sup>a</sup>
	rd_5.14	0.13	$\pm$ 0.010 <sup>ab</sup>	0.11	$\pm$ 0.014 <sup>b</sup>
	rd_5.114	0.08	$\pm$ 0.004 <sup>c</sup>	0.14	$\pm$ 0.011 <sup>a</sup>
Day 4	wt	0.18	$\pm$ 0.004 <sup>b</sup>	0.12	$\pm$ 0.007 <sup>c</sup>
	rd_5i	0.28	$\pm$ 0.016 <sup>a</sup>	0.19	$\pm$ 0.007 <sup>a</sup>
	rd_5.14	0.20	$\pm$ 0.027 <sup>b</sup>	0.13	$\pm$ 0.016 <sup>bc</sup>
	rd_5.114	0.26	$\pm$ 0.016 <sup>a</sup>	0.16	$\pm$ 0.011 <sup>ab</sup>
Day 6	wt	0.27	$\pm$ 0.008 <sup>bc</sup>	0.19	$\pm$ 0.008 <sup>b</sup>
	rd_5i	0.33	$\pm$ 0.018 <sup>ab</sup>	0.27	$\pm$ 0.014 <sup>a</sup>
	rd_5.14	0.23	$\pm$ 0.029 <sup>c</sup>	0.21	$\pm$ 0.013 <sup>b</sup>
	rd_5.114	0.37	$\pm$ 0.026 <sup>a</sup>	0.26	$\pm$ 0.015 <sup>a</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ ข-4(ต่อ) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (B) *rd29A::N'\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกลงอาหารภายใต้ภาวะปกติและภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน (mean  $\pm$  SE)

Day of treatment	Line	Relative Growth Rate, mg mg <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> $\pm$ SE			
		MS		NaCl	
Day0-2	wt	0.35	$\pm$ 0.021 <sup>b</sup>	0.31	$\pm$ 0.036 <sup>ns</sup>
	rd_5i	0.36	$\pm$ 0.030 <sup>b</sup>	0.39	$\pm$ 0.032 <sup>ns</sup>
	rd_5.14	0.46	$\pm$ 0.033 <sup>a</sup>	0.36	$\pm$ 0.039 <sup>ns</sup>
	rd_5.114	0.13	$\pm$ 0.049 <sup>c</sup>	0.39	$\pm$ 0.040 <sup>ns</sup>
Day2-4	wt	0.27	$\pm$ 0.029 <sup>c</sup>	0.11	$\pm$ 0.017 <sup>b</sup>
	rd_5i	0.38	$\pm$ 0.011 <sup>b</sup>	0.17	$\pm$ 0.014 <sup>a</sup>
	rd_5.14	0.21	$\pm$ 0.042 <sup>c</sup>	0.11	$\pm$ 0.016 <sup>b</sup>
	rd_5.114	0.57	$\pm$ 0.017 <sup>a</sup>	0.06	$\pm$ 0.014 <sup>b</sup>
Day4-6	wt	0.20	$\pm$ 0.009 <sup>a</sup>	0.23	$\pm$ 0.011 <sup>ns</sup>
	rd_5i	0.08	$\pm$ 0.013 <sup>b</sup>	0.16	$\pm$ 0.015 <sup>ns</sup>
	rd_5.14	0.08	$\pm$ 0.024 <sup>b</sup>	0.23	$\pm$ 0.036 <sup>ns</sup>
	rd_5.114	0.16	$\pm$ 0.022 <sup>a</sup>	0.24	$\pm$ 0.012 <sup>ns</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ ข-4 (ต่อ) ความยาวรากแก้วของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (B) *rd29A::N' OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกในภาวะปกติและภาวะเค็มที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean  $\pm$  SE)

Day of treatment	Line	Root length, cm $\pm$ SE			
		MS		NaCl	
Day 0	wt	1.17	$\pm$ 0.059 <sup>c</sup>	1.09	$\pm$ 0.076 <sup>b</sup>
	rd_5i	1.37	$\pm$ 0.025 <sup>ab</sup>	1.34	$\pm$ 0.034 <sup>a</sup>
	rd_5.14	1.43	$\pm$ 0.051 <sup>a</sup>	1.35	$\pm$ 0.036 <sup>a</sup>
	rd_5.114	1.24	$\pm$ 0.048 <sup>bc</sup>	1.21	$\pm$ 0.047 <sup>ab</sup>
Day 2	wt	2.00	$\pm$ 0.325 <sup>ns</sup>	1.17	$\pm$ 0.068 <sup>ns</sup>
	rd_5i	1.99	$\pm$ 0.153 <sup>ns</sup>	1.41	$\pm$ 0.072 <sup>ns</sup>
	rd_5.14	1.71	$\pm$ 0.032 <sup>ns</sup>	1.35	$\pm$ 0.066 <sup>ns</sup>
	rd_5.114	1.51	$\pm$ 0.048 <sup>ns</sup>	1.21	$\pm$ 0.090 <sup>ns</sup>
Day 4	wt	2.08	$\pm$ 0.174 <sup>c</sup>	1.66	$\pm$ 0.097 <sup>b</sup>
	rd_5i	2.64	$\pm$ 0.115 <sup>a</sup>	2.15	$\pm$ 0.087 <sup>a</sup>
	rd_5.14	2.47	$\pm$ 0.033 <sup>ab</sup>	2.07	$\pm$ 0.033 <sup>a</sup>
	rd_5.114	2.14	$\pm$ 0.106 <sup>bc</sup>	1.70	$\pm$ 0.032 <sup>b</sup>
Day 6	wt	2.67	$\pm$ 0.115 <sup>b</sup>	2.36	$\pm$ 0.135 <sup>ns</sup>
	rd_5i	3.33	$\pm$ 0.166 <sup>a</sup>	2.68	$\pm$ 0.139 <sup>ns</sup>
	rd_5.14	3.50	$\pm$ 0.077 <sup>a</sup>	2.66	$\pm$ 0.040 <sup>ns</sup>
	rd_5.114	2.90	$\pm$ 0.094 <sup>b</sup>	2.38	$\pm$ 0.042 <sup>ns</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน



ตารางที่ ข-5 น้ำหนักสดของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (C) *rd29A::C'\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกในภาวะปกติ(MS) และภาวะเค็ม (NaCl) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean  $\pm$  SE)

Day of treatment	Line	Fresh weight, mg $\pm$ SE	
		MS	NaCl
Day 0	wt	1.57 $\pm$ 0.077 <sup>a</sup>	1.57 $\pm$ 0.077 <sup>a</sup>
	rd_3.9	1.11 $\pm$ 0.022 <sup>b</sup>	1.11 $\pm$ 0.022 <sup>b</sup>
	rd_3.10	0.88 $\pm$ 0.024 <sup>c</sup>	0.88 $\pm$ 0.024 <sup>c</sup>
	rd_3.13	0.87 $\pm$ 0.028 <sup>c</sup>	0.87 $\pm$ 0.028 <sup>c</sup>
Day 2	wt	1.91 $\pm$ 0.074 <sup>a</sup>	1.60 $\pm$ 0.067 <sup>a</sup>
	rd_3.9	1.74 $\pm$ 0.076 <sup>a</sup>	1.43 $\pm$ 0.043 <sup>a</sup>
	rd_3.10	1.40 $\pm$ 0.056 <sup>b</sup>	1.22 $\pm$ 0.059 <sup>b</sup>
	rd_3.13	1.93 $\pm$ 0.124 <sup>a</sup>	1.46 $\pm$ 0.055 <sup>a</sup>
Day 4	wt	2.40 $\pm$ 0.134 <sup>b</sup>	1.78 $\pm$ 0.082 <sup>a</sup>
	rd_3.9	2.85 $\pm$ 0.135 <sup>a</sup>	1.86 $\pm$ 0.057 <sup>a</sup>
	rd_3.10	2.28 $\pm$ 0.065 <sup>b</sup>	1.43 $\pm$ 0.060 <sup>b</sup>
	rd_3.13	2.49 $\pm$ 0.143 <sup>ab</sup>	1.89 $\pm$ 0.139 <sup>a</sup>
Day 6	wt	4.83 $\pm$ 0.273 <sup>a</sup>	3.71 $\pm$ 0.052 <sup>a</sup>
	rd_3.9	4.48 $\pm$ 0.308 <sup>a</sup>	3.34 $\pm$ 0.127 <sup>b</sup>
	rd_3.10	4.26 $\pm$ 0.357 <sup>ab</sup>	3.16 $\pm$ 0.139 <sup>b</sup>
	rd_3.13	3.47 $\pm$ 0.134 <sup>b</sup>	2.84 $\pm$ 0.096 <sup>c</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ ข-5 (ต่อ) น้ำหนักแห้งของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (C) *rd29A::C'\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกในภาวะปกติ (MS) และภาวะเค็ม (NaCl) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean  $\pm$  SE)

Day of treatment	Line	Dry weight, mg $\pm$ SE			
		MS		NaCl	
Day 0	wt	0.05	$\pm$ 0.006 <sup>b</sup>	0.05	$\pm$ 0.006 <sup>b</sup>
	rd_3.9	0.05	$\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	0.05	$\pm$ 0.003 <sup>b</sup>
	rd_3.10	0.05	$\pm$ 0.007 <sup>b</sup>	0.05	$\pm$ 0.007 <sup>b</sup>
	rd_3.13	0.08	$\pm$ 0.009 <sup>a</sup>	0.08	$\pm$ 0.009 <sup>a</sup>
Day 2	wt	0.11	$\pm$ 0.009 <sup>ns</sup>	0.10	$\pm$ 0.004 <sup>ns</sup>
	rd_3.9	0.10	$\pm$ 0.006 <sup>ns</sup>	0.07	$\pm$ 0.012 <sup>ns</sup>
	rd_3.10	0.09	$\pm$ 0.008 <sup>ns</sup>	0.07	$\pm$ 0.008 <sup>ns</sup>
	rd_3.13	0.10	$\pm$ 0.011 <sup>ns</sup>	0.09	$\pm$ 0.010 <sup>ns</sup>
Day 4	wt	0.18	$\pm$ 0.004 <sup>ns</sup>	0.12	$\pm$ 0.007 <sup>ns</sup>
	rd_3.9	0.17	$\pm$ 0.006 <sup>ns</sup>	0.11	$\pm$ 0.006 <sup>ns</sup>
	rd_3.10	0.15	$\pm$ 0.005 <sup>ns</sup>	0.11	$\pm$ 0.011 <sup>ns</sup>
	rd_3.13	0.15	$\pm$ 0.020 <sup>ns</sup>	0.13	$\pm$ 0.018 <sup>ns</sup>
Day 6	wt	0.27	$\pm$ 0.008 <sup>a</sup>	0.19	$\pm$ 0.008 <sup>a</sup>
	rd_3.9	0.19	$\pm$ 0.002 <sup>c</sup>	0.16	$\pm$ 0.009 <sup>a</sup>
	rd_3.10	0.23	$\pm$ 0.005 <sup>b</sup>	0.13	$\pm$ 0.010 <sup>b</sup>
	rd_3.13	0.17	$\pm$ 0.020 <sup>c</sup>	0.14	$\pm$ 0.015 <sup>b</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ ข-5 (ต่อ) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (C) *rd29A::C'\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกลงอาหารภายใต้ภาวะปกติและภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน (mean  $\pm$  SE)

Day of treatment	Line	Relative Growth Rate, mg mg <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> $\pm$ SE	
		MS	NaCl
Day0-2	wt	0.35 $\pm$ 0.021 <sup>a</sup>	0.31 $\pm$ 0.036 <sup>a</sup>
	rd_3.9	0.40 $\pm$ 0.023 <sup>a</sup>	0.21 $\pm$ 0.057 <sup>ab</sup>
	rd_3.10	0.25 $\pm$ 0.020 <sup>b</sup>	0.13 $\pm$ 0.024 <sup>bc</sup>
	rd_3.13	0.09 $\pm$ 0.024 <sup>c</sup>	0.03 $\pm$ 0.026 <sup>c</sup>
Day2-4	wt	0.27 $\pm$ 0.029 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.017 <sup>ns</sup>
	rd_3.9	0.25 $\pm$ 0.011 <sup>ab</sup>	0.24 $\pm$ 0.078 <sup>ns</sup>
	rd_3.10	0.30 $\pm$ 0.032 <sup>a</sup>	0.25 $\pm$ 0.017 <sup>ns</sup>
	rd_3.13	0.18 $\pm$ 0.021 <sup>b</sup>	0.19 $\pm$ 0.022 <sup>ns</sup>
Day4-6	wt	0.20 $\pm$ 0.009 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.011 <sup>a</sup>
	rd_3.9	0.07 $\pm$ 0.015 <sup>b</sup>	0.19 $\pm$ 0.014 <sup>a</sup>
	rd_3.10	0.20 $\pm$ 0.007 <sup>a</sup>	0.08 $\pm$ 0.020 <sup>b</sup>
	rd_3.13	0.09 $\pm$ 0.019 <sup>b</sup>	0.04 $\pm$ 0.032 <sup>b</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ ข-5 (ต่อ) ความยาวรากแก้วของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (C) *rd29A::C'\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกในภาวะปกติและภาวะเค็มที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean  $\pm$  SE)

Day of treatment	Line	Root length, cm $\pm$ SE			
		MS		NaCl	
Day 0	wt	1.17	$\pm$ 0.059 <sup>ns</sup>	1.09	$\pm$ 0.076 <sup>ns</sup>
	rd_3.9	1.09	$\pm$ 0.057 <sup>ns</sup>	1.05	$\pm$ 0.027 <sup>ns</sup>
	rd_3.10	1.13	$\pm$ 0.046 <sup>ns</sup>	0.99	$\pm$ 0.036 <sup>ns</sup>
	rd_3.13	1.20	$\pm$ 0.032 <sup>ns</sup>	1.13	$\pm$ 0.013 <sup>ns</sup>
Day 2	wt	2.00	$\pm$ 0.325 <sup>ns</sup>	1.17	$\pm$ 0.068 <sup>ns</sup>
	rd_3.9	1.41	$\pm$ 0.049 <sup>ns</sup>	1.31	$\pm$ 0.039 <sup>ns</sup>
	rd_3.10	1.34	$\pm$ 0.089 <sup>ns</sup>	1.28	$\pm$ 0.055 <sup>ns</sup>
	rd_3.13	1.54	$\pm$ 0.075 <sup>ns</sup>	1.20	$\pm$ 0.034 <sup>ns</sup>
Day 4	wt	2.08	$\pm$ 0.174 <sup>ns</sup>	1.66	$\pm$ 0.097 <sup>ns</sup>
	rd_3.9	2.34	$\pm$ 0.103 <sup>ns</sup>	1.71	$\pm$ 0.105 <sup>ns</sup>
	rd_3.10	2.35	$\pm$ 0.234 <sup>ns</sup>	1.70	$\pm$ 0.118 <sup>ns</sup>
	rd_3.13	2.25	$\pm$ 0.066 <sup>ns</sup>	1.80	$\pm$ 0.061 <sup>ns</sup>
Day 6	wt	2.67	$\pm$ 0.115 <sup>c</sup>	2.36	$\pm$ 0.135 <sup>ns</sup>
	rd_3.9	4.11	$\pm$ 0.179 <sup>a</sup>	2.55	$\pm$ 0.267 <sup>ns</sup>
	rd_3.10	3.70	$\pm$ 0.319 <sup>ab</sup>	2.31	$\pm$ 0.265 <sup>ns</sup>
	rd_3.13	3.08	$\pm$ 0.183 <sup>bc</sup>	2.35	$\pm$ 0.123 <sup>ns</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ ข-6 น้ำหนักสดของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (D) *35SCaMV::full-length\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกในภาวะปกติ (MS) และภาวะเค็ม (NaCl) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean  $\pm$  SE)

Day of treatment	Line	Fresh weight, mg $\pm$ SE	
		MS	NaCl
Day 0	wt	1.57 $\pm$ 0.077 <sup>a</sup>	1.57 $\pm$ 0.077 <sup>a</sup>
	ox_fl31	1.11 $\pm$ 0.020 <sup>b</sup>	1.11 $\pm$ 0.020 <sup>b</sup>
	ox_fl23	0.83 $\pm$ 0.032 <sup>c</sup>	0.83 $\pm$ 0.032 <sup>c</sup>
Day 2	wt	1.91 $\pm$ 0.074 <sup>a</sup>	1.60 $\pm$ 0.067 <sup>a</sup>
	ox_fl31	1.38 $\pm$ 0.047 <sup>b</sup>	1.24 $\pm$ 0.034 <sup>b</sup>
	ox_fl23	1.25 $\pm$ 0.054 <sup>b</sup>	1.19 $\pm$ 0.043 <sup>b</sup>
Day 4	wt	2.40 $\pm$ 0.134 <sup>a</sup>	1.78 $\pm$ 0.082 <sup>ns</sup>
	ox_fl31	2.01 $\pm$ 0.076 <sup>b</sup>	1.87 $\pm$ 0.115 <sup>ns</sup>
	ox_fl23	2.70 $\pm$ 0.116 <sup>a</sup>	2.07 $\pm$ 0.049 <sup>ns</sup>
Day 6	wt	4.83 $\pm$ 0.273 <sup>a</sup>	3.71 $\pm$ 0.052 <sup>a</sup>
	ox_fl31	3.60 $\pm$ 0.106 <sup>b</sup>	2.88 $\pm$ 0.113 <sup>b</sup>
	ox_fl23	4.013 $\pm$ 0.232 <sup>b</sup>	3.22 $\pm$ 0.152 <sup>b</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ ข-6 (ต่อ) น้ำหนักแห้งของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (D) *35SCaMV::full-length\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกในภาวะปกติ (MS) และภาวะเค็ม (NaCl) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean  $\pm$  SE)

Day of treatment	Line	Dry weight, mg $\pm$ SE			
		MS		NaCl	
Day 0	wt	0.05	$\pm$ 0.006 <sup>ns</sup>	0.05	$\pm$ 0.006 <sup>ns</sup>
	ox_fl31	0.06	$\pm$ 0.004 <sup>ns</sup>	0.06	$\pm$ 0.004 <sup>ns</sup>
	ox_fl23	0.05	$\pm$ 0.005 <sup>ns</sup>	0.05	$\pm$ 0.005 <sup>ns</sup>
Day 2	wt	0.11	$\pm$ 0.009 <sup>a</sup>	0.10	$\pm$ 0.004 <sup>ns</sup>
	ox_fl31	0.08	$\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	0.09	$\pm$ 0.006 <sup>ns</sup>
	ox_fl23	0.07	$\pm$ 0.008 <sup>b</sup>	0.10	$\pm$ 0.007 <sup>ns</sup>
Day 4	wt	0.18	$\pm$ 0.004 <sup>a</sup>	0.12	$\pm$ 0.007 <sup>b</sup>
	ox_fl31	0.15	$\pm$ 0.011 <sup>b</sup>	0.09	$\pm$ 0.006 <sup>c</sup>
	ox_fl23	0.15	$\pm$ 0.007 <sup>b</sup>	0.15	$\pm$ 0.008 <sup>a</sup>
Day 6	wt	0.27	$\pm$ 0.008 <sup>ns</sup>	0.19	$\pm$ 0.008 <sup>ns</sup>
	ox_fl31	0.25	$\pm$ 0.005 <sup>ns</sup>	0.17	$\pm$ 0.007 <sup>ns</sup>
	ox_fl23	0.26	$\pm$ 0.009 <sup>ns</sup>	0.18	$\pm$ 0.008 <sup>ns</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ ข-6 (ต่อ) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (D) *35SCaMV::full-length\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลุกบนอาหารภายใต้ภาวะปกติและภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน (mean  $\pm$  SE)

Day of		Relative Growth Rate, mg mg <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> $\pm$ SE	
treatment	Line	MS	NaCl
Day0-2	wt	0.35 $\pm$ 0.021 <sup>a</sup>	0.31 $\pm$ 0.036 <sup>a</sup>
	ox_fl31	0.15 $\pm$ 0.022 <sup>b</sup>	0.20 $\pm$ 0.011 <sup>b</sup>
	ox_fl23	0.17 $\pm$ 0.029 <sup>b</sup>	0.38 $\pm$ 0.026 <sup>a</sup>
Day2-4	wt	0.27 $\pm$ 0.029 <sup>b</sup>	0.11 $\pm$ 0.017 <sup>b</sup>
	ox_fl31	0.31 $\pm$ 0.028 <sup>ab</sup>	0.01 $\pm$ 0.017 <sup>c</sup>
	ox_fl23	0.39 $\pm$ 0.033 <sup>a</sup>	0.20 $\pm$ 0.008 <sup>a</sup>
Day4-6	wt	0.20 $\pm$ 0.009 <sup>b</sup>	0.23 $\pm$ 0.011 <sup>b</sup>
	ox_fl31	0.26 $\pm$ 0.030 <sup>ab</sup>	0.31 $\pm$ 0.015 <sup>a</sup>
	ox_fl23	0.29 $\pm$ 0.010 <sup>a</sup>	0.10 $\pm$ 0.008 <sup>c</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ ข-6 (ต่อ) ความยาวรากแก้วของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่  
 ถอดรหัสให้โมติฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (D) *35SCaMV::full-length\_OsNUC1*  
 เมื่อย้ายปลูกในภาวะปกติและภาวะเค็มที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean  $\pm$  SE)

Day of treatment	Line	Root length, cm $\pm$ SE	
		MS	NaCl
Day 0	wt	1.17 $\pm$ 0.059 <sup>ns</sup>	1.09 $\pm$ 0.076 <sup>ns</sup>
	ox_fl31	1.07 $\pm$ 0.028 <sup>ns</sup>	1.00 $\pm$ 0.019 <sup>ns</sup>
	ox_fl23	1.08 $\pm$ 0.020 <sup>ns</sup>	1.05 $\pm$ 0.027 <sup>ns</sup>
Day 2	wt	2.00 $\pm$ 0.325 <sup>ns</sup>	1.17 $\pm$ 0.068 <sup>b</sup>
	ox_fl31	1.64 $\pm$ 0.048 <sup>ns</sup>	1.34 $\pm$ 0.020 <sup>a</sup>
	ox_fl23	1.62 $\pm$ 0.048 <sup>ns</sup>	1.36 $\pm$ 0.042 <sup>a</sup>
Day 4	wt	2.08 $\pm$ 0.174 <sup>b</sup>	1.66 $\pm$ 0.097 <sup>ns</sup>
	ox_fl31	2.52 $\pm$ 0.051 <sup>a</sup>	1.83 $\pm$ 0.028 <sup>ns</sup>
	ox_fl23	2.56 $\pm$ 0.063 <sup>a</sup>	1.92 $\pm$ 0.057 <sup>ns</sup>
Day 6	wt	2.67 $\pm$ 0.115 <sup>c</sup>	2.36 $\pm$ 0.135 <sup>b</sup>
	ox_fl31	3.80 $\pm$ 0.082 <sup>b</sup>	2.58 $\pm$ 0.073 <sup>ab</sup>
	ox_fl23	4.21 $\pm$ 0.110 <sup>a</sup>	2.89 $\pm$ 0.120 <sup>a</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน



ตารางที่ ข-7 น้ำหนักสดของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (E) *35SCaMV::C'\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกในภาวะปกติ (MS) และภาวะเค็ม (NaCl) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean  $\pm$  SE)

Day of treatment	Line	Fresh weight, mg $\pm$ SE	
		MS	NaCl
Day 0	wt	1.57 $\pm$ 0.077 <sup>a</sup>	1.57 $\pm$ 0.077 <sup>a</sup>
	ox_3.7	1.26 $\pm$ 0.028 <sup>b</sup>	1.26 $\pm$ 0.028 <sup>b</sup>
	ox_3.5	1.24 $\pm$ 0.058 <sup>b</sup>	1.24 $\pm$ 0.058 <sup>b</sup>
Day 2	wt	1.91 $\pm$ 0.074 <sup>ns</sup>	1.60 $\pm$ 0.067 <sup>ns</sup>
	ox_3.7	1.87 $\pm$ 0.060 <sup>ns</sup>	1.52 $\pm$ 0.096 <sup>ns</sup>
	ox_3.5	2.01 $\pm$ 0.142 <sup>ns</sup>	1.46 $\pm$ 0.078 <sup>ns</sup>
Day 4	wt	2.40 $\pm$ 0.134 <sup>b</sup>	1.78 $\pm$ 0.082 <sup>b</sup>
	ox_3.7	3.34 $\pm$ 0.293 <sup>a</sup>	2.70 $\pm$ 0.189 <sup>a</sup>
	ox_3.5	3.05 $\pm$ 0.159 <sup>a</sup>	1.80 $\pm$ 0.148 <sup>b</sup>
Day 6	wt	4.83 $\pm$ 0.273 <sup>ns</sup>	3.71 $\pm$ 0.052 <sup>a</sup>
	ox_3.7	4.51 $\pm$ 0.331 <sup>ns</sup>	3.14 $\pm$ 0.171 <sup>b</sup>
	ox_3.5	5.07 $\pm$ 0.489 <sup>ns</sup>	2.98 $\pm$ 0.173 <sup>b</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ ข-7 (ต่อ) น้ำหนักแห้งของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้  
 โมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (E) *35SCaMV::C'\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกในภาวะ  
 ปกติ (MS) และภาวะเค็ม (NaCl) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean  $\pm$  SE)

Day of treatment	Line	Dry weight, mg $\pm$ SE	
		MS	NaCl
Day 0	wt	0.05 $\pm$ 0.006 <sup>b</sup>	0.05 $\pm$ 0.006 <sup>b</sup>
	ox_3.7	0.09 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>
	ox_3.5	0.05 $\pm$ 0.007 <sup>b</sup>	0.05 $\pm$ 0.007 <sup>b</sup>
Day 2	wt	0.11 $\pm$ 0.009 <sup>ns</sup>	0.10 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>
	ox_3.7	0.09 $\pm$ 0.004 <sup>ns</sup>	0.14 $\pm$ 0.010 <sup>a</sup>
	ox_3.5	0.09 $\pm$ 0.006 <sup>ns</sup>	0.10 $\pm$ 0.011 <sup>b</sup>
Day 4	wt	0.18 $\pm$ 0.004 <sup>ns</sup>	0.12 $\pm$ 0.007 <sup>b</sup>
	ox_3.7	0.20 $\pm$ 0.012 <sup>ns</sup>	0.16 $\pm$ 0.013 <sup>a</sup>
	ox_3.5	0.20 $\pm$ 0.006 <sup>ns</sup>	0.12 $\pm$ 0.007 <sup>b</sup>
Day 6	wt	0.27 $\pm$ 0.008 <sup>b</sup>	0.19 $\pm$ 0.008 <sup>ns</sup>
	ox_3.7	0.24 $\pm$ 0.019 <sup>b</sup>	0.19 $\pm$ 0.027 <sup>ns</sup>
	ox_3.5	0.34 $\pm$ 0.013 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.008 <sup>ns</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT  
 ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลา  
 เดียวกัน

ตารางที่ ข-7 (ต่อ) อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (E)35SCaMV::C'*\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกบนอาหารภายใต้ภาวะปกติและภาวะเค็มเป็นเวลา 6 วัน (mean  $\pm$  SE)

Day of		Relative Growth Rate, mg mg <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> $\pm$ SE			
treatment	Line	MS		NaCl	
Day0-2	wt	0.35	$\pm$ 0.021 <sup>a</sup>	0.31	$\pm$ 0.036 <sup>b</sup>
	ox_3.7	0.04	$\pm$ 0.007 <sup>b</sup>	0.25	$\pm$ 0.026 <sup>b</sup>
	ox_3.5	0.36	$\pm$ 0.055 <sup>a</sup>	0.41	$\pm$ 0.032 <sup>a</sup>
Day2-4	wt	0.27	$\pm$ 0.029 <sup>b</sup>	0.11	$\pm$ 0.017 <sup>ns</sup>
	ox_3.7	0.39	$\pm$ 0.010 <sup>a</sup>	0.07	$\pm$ 0.012 <sup>ns</sup>
	ox_3.5	0.41	$\pm$ 0.022 <sup>a</sup>	0.10	$\pm$ 0.038 <sup>ns</sup>
Day4-6	wt	0.20	$\pm$ 0.009 <sup>b</sup>	0.23	$\pm$ 0.011 <sup>a</sup>
	ox_3.7	0.08	$\pm$ 0.023 <sup>c</sup>	0.06	$\pm$ 0.040 <sup>b</sup>
	ox_3.5	0.25	$\pm$ 0.011 <sup>a</sup>	0.06	$\pm$ 0.009 <sup>b</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ ข-7 (ต่อ) ความยาวรากแก้วของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนที่ถอดรหัสให้โมทิฟของ *OsNUC1* รูปแบบ (E) *35SCaMV::C'\_OsNUC1* เมื่อย้ายปลูกในภาวะปกติและภาวะเค็มที่ระยะเวลาต่าง ๆ (mean  $\pm$  SE)

Day of treatment	Line	Root length, cm $\pm$ SE	
		MS	NaCl
Day 0	wt	1.17 $\pm$ 0.059 <sup>a</sup>	1.09 $\pm$ 0.076 <sup>a</sup>
	ox_3.7	1.10 $\pm$ 0.036 <sup>a</sup>	0.98 $\pm$ 0.008 <sup>a</sup>
	ox_3.5	0.67 $\pm$ 0.026 <sup>b</sup>	0.60 $\pm$ 0.023 <sup>b</sup>
Day 2	wt	2.00 $\pm$ 0.325 <sup>a</sup>	1.17 $\pm$ 0.068 <sup>a</sup>
	ox_3.7	1.30 $\pm$ 0.091 <sup>b</sup>	1.31 $\pm$ 0.036 <sup>a</sup>
	ox_3.5	1.34 $\pm$ 0.089 <sup>b</sup>	0.95 $\pm$ 0.056 <sup>b</sup>
Day 4	wt	2.08 $\pm$ 0.174 <sup>ns</sup>	1.66 $\pm$ 0.097 <sup>ab</sup>
	ox_3.7	2.39 $\pm$ 0.178 <sup>ns</sup>	1.96 $\pm$ 0.134 <sup>a</sup>
	ox_3.5	2.51 $\pm$ 0.253 <sup>ns</sup>	1.46 $\pm$ 0.070 <sup>b</sup>
Day 6	wt	2.67 $\pm$ 0.115 <sup>b</sup>	2.36 $\pm$ 0.135 <sup>ns</sup>
	ox_3.7	3.73 $\pm$ 0.291 <sup>a</sup>	2.21 $\pm$ 0.196 <sup>ns</sup>
	ox_3.5	3.69 $\pm$ 0.207 <sup>a</sup>	2.23 $\pm$ 0.113 <sup>ns</sup>

ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งแสดงถึงความเหมือนหรือแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

<sup>ns</sup> หมายถึง ค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลในช่วงเวลาเดียวกัน

ภาคผนวก ค

GATTACCTCCCGCCCGCGCACCTCGAGCCCCAGGTCCGCCTCGCCTCTCCGTCGCTTGCCGCCGCCCGCAGTGGTCGCCGGCCGCGGGG  
 GCTTCGCCGGTGT <sup>FL OsNUC1 (F), N OsNUC1 (R)</sup>CGCTTCCTCGTTTGGAAATTAATTAAGCAATACTTAATATGGGCAAGTCAAGCAAGAAATCTGCTGTTGAAGTT  
 GCACCTACCTCTGTCTCAGTCTCAGAGGGGAAATCTGGGAAGAAGGGAAAGAGAAATGCAGAAGATGAGATTGAGAAAGCTGTGA  
 GTGCCAAGAAACAAAAGACTGTACGTGAGAAGGTTGTGCCCTCAAAGGAGGAAGCCAAAAAAGTGAAGAAGCAGCCCCACCGA  
 AGAAGGTTGAGAGCAGCAGTCTCTGAGGAGGATTCTTTCAGAATCTGAAGAGGAGGTAAAGGCCCAACCAAAGAAGACTGTCCAAC  
 GAAGAAGGCTGCACAACCTGCTAAAGAGGAGTCAAGTGTATAGCAGTGTATAGCTCCTCAGATGATGAGCCTGCAAAAAA  
 CCTGTTGCTCGTCAAATAAGGCTGCACCTTCTACCAACAGTAGCAGCAGTGTATAGCAGTGTATGAGAGTTTATCAGATGATG  
 AACCTGTGAAAAAGCCTGCTGCCCTTTGAAGAAGCCAGTTGCACCTTGCTACCAATGGATCAAAAAAGTTGAGACAGACAGCAG  
 CAGCTCTGATAGCAGCTCTGATGAGGAGTCTGATGAGGATGATAAAAAACTGCTGCTCCAGTGAAGAAACCTTCAGTTGCTGCT  
 ATACAAAAGAAGACCCAGGAGTCTGACAGTCTGATAGTGACTCTGATTCTGAATCAGATGAGGATGTGCCACTAAAGCACCAG  
 CAGTAGCCAAGAAAAAGGAAGAATCCAGTGAAGCTCTGATTCTGAAAGTGATTCAGACTCTGATGATGAGGCTGCTGCTGTTAA  
 AAAGGAAGAAGAATCCAGTGTATAGCTCAGACAGTGTCTGAATCTGAGTCTGATTCTGATGAACCAGCAAAACCTACTATTCT  
 GCAAAAAGGCCACTGACAAAAGACACAAGAAGGGACAATCCAAGGATGAATCTGAAGATAGTTCTGATGAGAGTTCTGAGGAA  
 AGTGGTGTGAACCTCCGCAAAAAGAAGATTAAGGATTCTACAACCTCTGGTACTACCAAGCCTTCCCCTAAGGCTACCAAGAAAG  
 AAATCAGCAGTGTGACGAAAGTGTGAAGATGACAGTCTGATGAAAGCTCTGATGAGGATGTTAAGCAAAAACAACTCAAGC  
 TAAGAAGCAAGCACCAGTAGCACAAGAGAGTAGCAGCTCCGATGAATCTTCTGAAGAAGATAGTGACATGGAAAGTGTGAACCA  
 GCAAAAACCTCCCAAAAAGAAGGAAACT <sup>N OsNUC1 (R)</sup>GTCTGTGCTGTTGGTTCCGAATAAGTCTGCGACAAAACCGGGACAAGAGGAACCAAAAACGCC  
 TGCCAGCAACCAAAATCAAGCTACCGGGTCAAAGACTCTTTTTGTTGAAATTTACCATACAATGTGGAGCAAGAACAAGTGAAGCAATTTTTTC  
 CAGGAGGCAGGTGAAGTTGTTGATATTCGTTTCAGTACCTTTGAAGATGGGAACCTCAGGGGCTTTGGACATGTTGAATTTGCCACAGCGGAA  
 GCTGCTAAGAAGGCACTTGAACCTGCTGGTTCATGACCTGATGGGACGGCCGGTCAAGGCTTGACCTGGCTCGTGAGAGAGGCGGTATACTCCT  
 GGCAGCGGGAGGACAATAGTTCTTTCAAGAAGCCTGCTCAAAGCTCAGGAAACACTATATTTATAAAGGCTTTGATACTTCTTGTACATAC  
 ACCAGATCCGGAATCACTTGAAGAACATTTTGCTCGTGTGGAGAGATTACACGGGTTTCAATTCCAAAGGATTATGAAACCGGTGCAAGCA  
 AAGGGATGGCGTACATGGATTTTTCGCGACAACGGTTCCTTGTGAAAGCATAACGAATGAATGGATCTGACCTCGGTGGATACAGCTTGTATG  
 TTGATGAAGCGAGGCTAGGCCGATAACAACAGAGAGGGTGGCTTCAGCGGTGGAAGAGACTTTAACAGCAGTGGGAGAGGAGGAAGACGT  
 GGTGGACGTGGTGTGGTACCGTGGACCGGTGACCGTGGACGTGGTAGAGGCTTTGGTAGGGGTGACAGGGGCCATGGTGGACGGGGTAC  
 ACCGTTCAAGCAGAGCGCTGGTACACCTAGTGCAGGAAAGAAGACAACATTCGGTGGACGACTAGACGAACAATTTGAGCCGATTTGTTC  
 TAGTACTGTAGTAATCTCCATCCCCCTAATATATGCGATTCTAGTGTAGCCGTGAATGGCTACCTCCGGACTGTTACATTCTAGCCGTGTTAT  
 GTACTTTGTTGGCAGTTGGGACCGT <sup>FL OsNUC1 (R)</sup>GTGGTAAATTTGCCCGACAGATTTGGCAATTTTGG

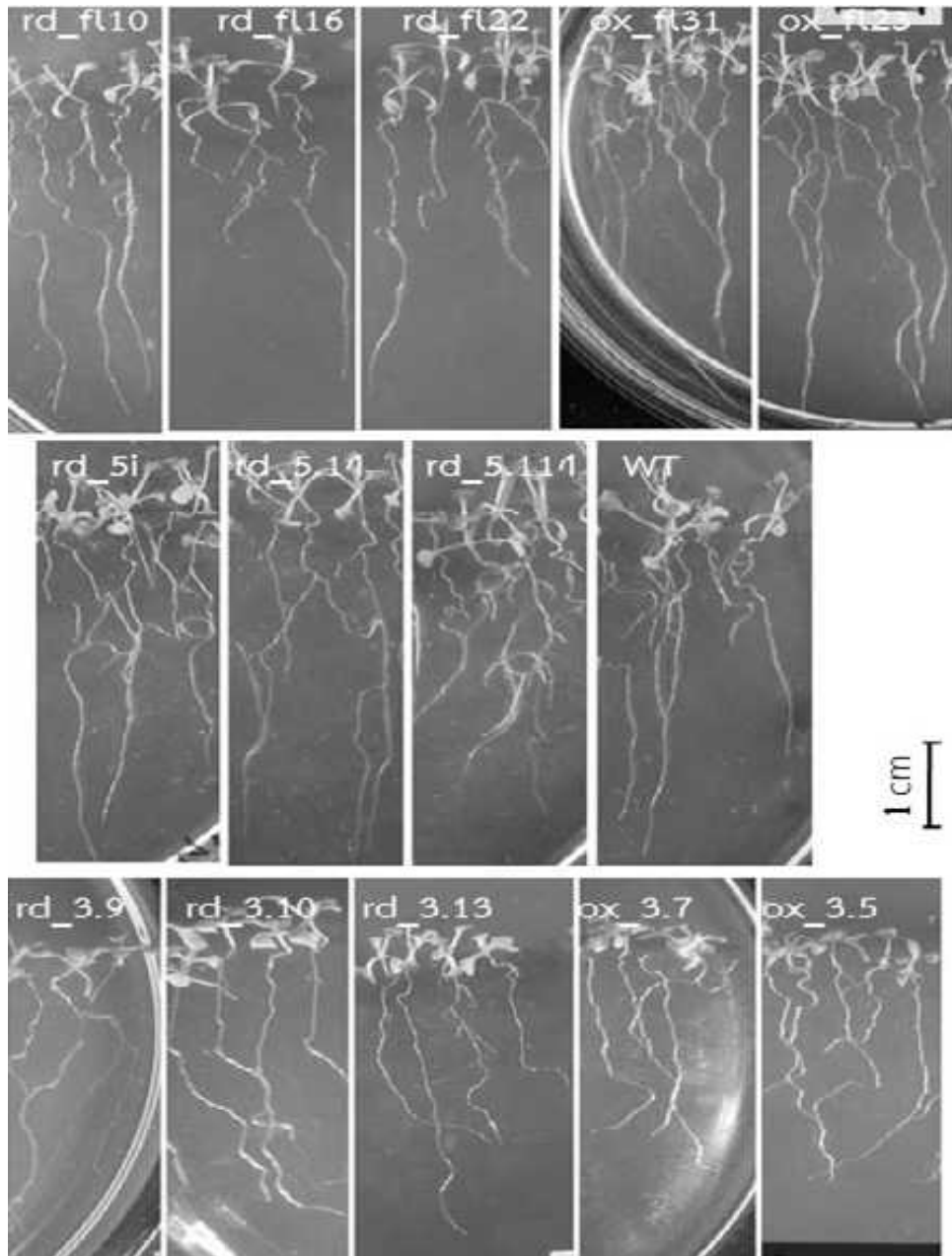
ภาพที่ ค-1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Full-length\_OsNUC1* cDNA (AK103446) และ *C'\_OsNUC1* cDNA (AK063918, ตัวหนา) ที่แสดงถึงตำแหน่งและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ FL\_OsNUC และ N\_OsNUC (ขีดเส้นใต้) ที่ใช้ในตรวจสอบชุดโครงสร้างยีน (I) และ (II) ตามลำดับ

ColonyE_FL_OsNUC1	CCCCACCGACTACTAATAATAGTAAGTTACATTTTAGGATGGAATAAATATCATACCGAC	60
ColonyB_N_OsNUC1	CCCCACCGACTACTAATAATAGTAAGTTACATTTTAGGATGGAATAAATATCATACCGAC	60
ColonyE_FL_OsNUC1	ATCAGTTTGAAGAAAAGGAAAAAAGAAAAAATAAATAAAGATATACTACCGACATG	120
ColonyB_N_OsNUC1	ATCAGTTTGAAGAAAAGGAAAAAAGAAAAAATAAATAAAGATATACTACCGACATG	120
ColonyE_FL_OsNUC1	AGTTCCAAAAAGCAAAAAAAGATCAAGCCGACACAGACACGCGTAGAGAGCAAAATGA	180
ColonyB_N_OsNUC1	AGTTCCAAAAAGCAAAAAAAGATCAAGCCGACACAGACACGCGTAGAGAGCAAAATGA	180
ColonyE_FL_OsNUC1	CTTTGACGTCACACCACGAAAACAGACGCTTCATACGTGTCCTTTATCTCTCAGTCT	240
ColonyB_N_OsNUC1	CTTTGACGTCACACCACGAAAACAGACGCTTCATACGTGTCCTTTATCTCTCAGTCT	240
ColonyE_FL_OsNUC1	CTCTATAAACTTAGTGAGACCCTCCTCTGTTTTACTCACAAATATGCAAACTAGAAAACA	300
ColonyB_N_OsNUC1	CTCTATAAACTTAGTGAGACCCTCCTCTGTTTTACTCACAAATATGCAAACTAGAAAACA	300
ColonyE_FL_OsNUC1	ATCATCAGGAATAAAGGGTTTGATTACTTCTATTGGAAGAAAAAATCTTTGGACCCGC	360
ColonyB_N_OsNUC1	ATCATCAGGAATAAAGGGTTTGATTACTTCTATTGGAAGAAAAAATCTTTGGACCCGC	360
ColonyE_FL_OsNUC1	TTCTCTGTTTGAATTAATTAAGCAATACTTAATATGGGCAAGTCAAGCAAGAAATCTGC	420
ColonyB_N_OsNUC1	TTCTCTGTTTGAATTAATTAAGCAATACTTAATATGGGCAAGTCAAGCAAGAAATCTGC	420
ColonyE_FL_OsNUC1	TGTTGAAGTTGCACCTACCTCTGCTCTCAGTCTCAGAGGGGAAATCTGGGAAGAGGGAAA	480
ColonyB_N_OsNUC1	TGTTGAAGTTGCACCTACCTCTGCTCTCAGTCTCAGAGGGGAAATCTGGGAAGAGGGAAA	480
ColonyE_FL_OsNUC1	GAGAAATGCAGAAGATGAGATTGAGAAAGCTGTGAGTCCCAAGAAAACAAAGACTGTACG	540
ColonyB_N_OsNUC1	GAGAAATGCAGAAGATGAGATTGAGAAAGCTGTGAGTCCCAAGAAAACAAAGACTGTACG	540
ColonyE_FL_OsNUC1	TGAGAAGGTTGTGCCCTCAAAGGAGGAAGCCAAAAAGTGAAGAAGCAGCCCCACCGAA	600
ColonyB_N_OsNUC1	TGAGAAGGTTGTGCCCTCAAAGGAGGAAGCCAAAAAGTGAAGAAGCAGCCCCACCGAA	600
ColonyE_FL_OsNUC1	GAAGGTTGAGAGCAGCAGTCTGAGGAGGATCTTCAGAAATCTGAAGAGGAGGTAAGGC	660
ColonyB_N_OsNUC1	GAAGGTTGAGAGCAGCAGTCTGAGGAGGATCTTCAGAAATCTGAAGAGGAGGTAAGGC	660
ColonyE_FL_OsNUC1	CCAACCAAGAAGACTGTCCAACCGAAGAGGCTGCACAACCTGCTAAAGAGGAGTCAAG	720
ColonyB_N_OsNUC1	CCAACCAAGAAGACTGTCCAACCGAAGAGGCTGCACAACCTGCTAAAGAGGAGTCAAG	720
ColonyE_FL_OsNUC1	TGATGATAGCAGTATGATAGTCTCAGATGATGAGCCTGCAAAAAACCTGTTGCTCG	780
ColonyB_N_OsNUC1	TGATGATAGCAGTATGATAGTCTCAGATGATGAGCCTGCAAAAAACCTGTTGCTCG	780
ColonyE_FL_OsNUC1	TCCAATAAAGGCTGCACCTTCTACCAACAGTAGCAGCAGTATGATAGCAGTATGAGAG	840
ColonyB_N_OsNUC1	TCCAATAAAGGCTGCACCTTCTACCAACAGTAGCAGCAGTATGATAGCAGTATGAGAG	840
ColonyE_FL_OsNUC1	TTTATCAGATGATGAACCTGTGAAAAAGCCTGCTGCCCTTTGAAGAAGCCAGTTGCACT	900
ColonyB_N_OsNUC1	TTTATCAGATGATGAACCTGTGAAAAAGCCTGCTGCCCTTTGAAGAAGCCAGTTGCACT	900
ColonyE_FL_OsNUC1	TGCTACCAATGGATCAAAAAAGGTTGAGACAGACAGCAGCAGCTCTGATAGCAGCTCTGA	960
ColonyB_N_OsNUC1	TGCTACCAATGGATCAAAAAAGGTTGAGACAGACAGCAGCAGCTCTGATAGCAGCTCTGA	960
ColonyE_FL_OsNUC1	TGAGGAGTCTGATGAGGATGATAAAAAACTGCTGCTCCAGTGAAGAAACCTTCAGTTGC	1020
ColonyB_N_OsNUC1	TGAGGAGTCTGATGAGGATGATAAAAAACTGCTGCTCCAGTGAAGAAACCTTCAGTTGC	1020
ColonyE_FL_OsNUC1	TGCTATACAAAAAGAACCCAGGAGTCTGACAGTCTGATAGTACTGATTCTGAATC	1080
ColonyB_N_OsNUC1	TGCTATACAAAAAGAACCCAGGAGTCTGACAGTCTGATAGTACTGATTCTGAATC	1080
ColonyE_FL_OsNUC1	AGATGAGGATGTGCCGACTAAAGCACCAGCAGTAGCCCAAGAAAAAGGAAGATCCAGTGA	1140
ColonyB_N_OsNUC1	AGATGAGGATGTGCCGACTAAAGCACCAGCAGTAGCCCAAGAAAAAGGAAGATCCAGTGA	1140
ColonyE_FL_OsNUC1	AAGCTCTGATTCTGAAGTATTGAGACTCTGATGATGAGGCTGCTGCTGTTAAAAAGGA	1200
ColonyB_N_OsNUC1	AAGCTCTGATTCTGAAGTATTGAGACTCTGATGATGAGGCTGCTGCTGTTAAAAAGGA	1200
ColonyE_FL_OsNUC1	AGAAGAATCCAGTATAGCTCAGACAGTACTCTGATCTGAGTCTGATTCTGATGAACC	1260
ColonyB_N_OsNUC1	AGAAGAATCCAGTATAGCTCAGACAGTACTCTGATCTGAGTCTGATTCTGATGAACC	1260
ColonyE_FL_OsNUC1	AGCAAAACCTACTATTCTGCAAAAAGGCCACTGACAAAAGACACAAAGAAGGGACAAATC	1320
ColonyB_N_OsNUC1	AGCAAAACCTACTATTCTGCAAAAAGGCCACTGACAAAAGACACAAAGAAGGGACAAATC	1320
ColonyE_FL_OsNUC1	CAAGGATGAATCTGAAGATAGTCTGATGAGAGTCTGAGGAAAGTGGTATGAACCTCC	1380
ColonyB_N_OsNUC1	CAAGGATGAATCTGAAGATAGTCTGATGAGAGTCTGAGGAAAGTGGTATGAACCTCC	1380
ColonyE_FL_OsNUC1	GCAAAAGAAGATTAAAGGATTCTACAACCTCTGGTACTACCAAGCCTTCCCTTAAGGCTAC	1440
ColonyB_N_OsNUC1	GCAAAAGAAGATTAAAGGATTCTACAACCTCTGGTACTACCAAGCCTTCCCTTAAGGCTAC	1440
ColonyE_FL_OsNUC1	CAAGAAAGAAATCAGCAGTATGACGAAAGTATGAAGTACAGTCTCTGATGAAAGCTC	1500
ColonyB_N_OsNUC1	CAAGAAAGAAATCAGCAGTATGACGAAAGTATGAAGTACAGTCTCTGATGAAAGCTC	1500
ColonyE_FL_OsNUC1	TGATGAGGATGTTAAGCAAAAACAACTCAAGCTAAGAAGCAAGCACCAGTAGCACAAAGA	1560
ColonyB_N_OsNUC1	TGATGAGGATGTTAAGCAAAAACAACTCAAGCTAAGAAGCAAGCACCAGTAGCACAAAGA	1560

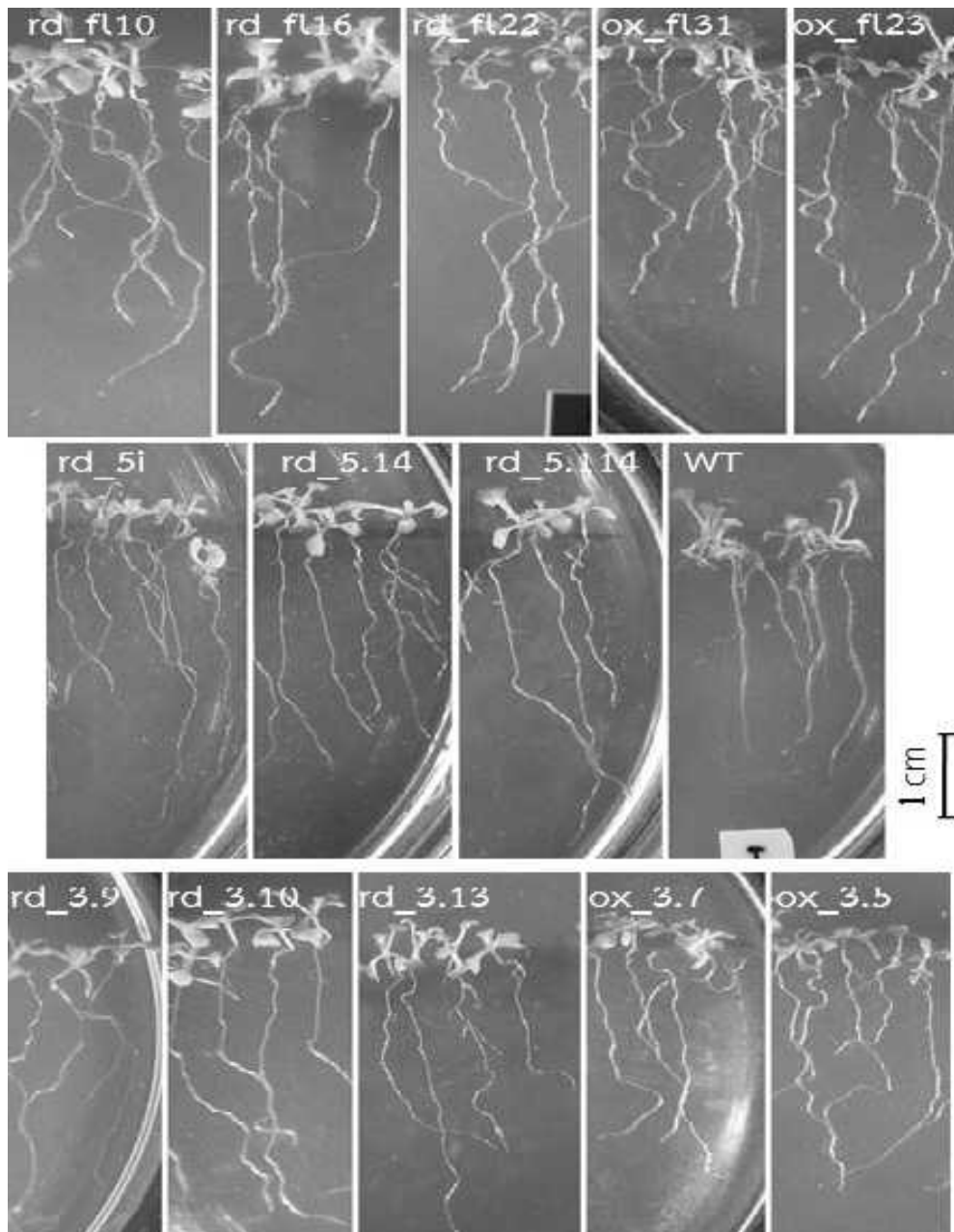
ภาพที่ ค-2 การเทียบเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (Pairwise sequence alignment) ของ colony E และ B ที่ใช้สำหรับถ่ายชุดโครงสร้างยีน (I): *pJim19::rd29A::full-length\_OsNUC1* และ (II): *pJim19::rd29A::N'\_OsNUC1* ตามลำดับ เข้าสู่ WT *Arabidopsis thaliana* L.







ภาพที่ ค-4 ความยาวรากแก้วของ Arabidopsis ดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ หลังย้ายปลูกลงอาหารกึ่งแข็ง MS (ภาวะปกติ) เป็นระยะเวลา 6 วัน



ภาพที่ ค-5 ความยาวรากแก้วของ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ หลังย้ายปลูกลงอาหารกึ่งแข็ง MS ที่เติม NaCl 100 mM (ภาวะเค็ม) เป็นระยะเวลา 6 วัน

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวรัฐธิภา ธนารักษ์ เกิดเมื่อวันที่ 10 ธันวาคม พ.ศ. 2523 ที่จังหวัดสุรินทร์ สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขา Molecular Biology (B.Sc.) จาก University of Applied Sciences Gelsenkirchen ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2551 โดยทั้งระดับปริญญาบัณฑิตและปริญญาโทได้รับการสนับสนุนจากทุน “ไทยพัฒนา” โดยการสนับสนุนของรัฐบาลไทยผ่านทางสำนักงานคณะกรรมการข้าราชการพลเรือน (ก.พ.)