รายงานเรื่องเต็ม ผลการทดลองสิ้นสุด ปีงบประมาณ 2560

1. **แผนงานวิจัย** : แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

2. **โครงการวิจัย** : โครงการการวิจัยการค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การโคลนยีน PIS (Phosphatidyl Inositol (Pdlns) Synthase) ที่มีผลต่อลักษณะทนแล้งในพืชยาสูบ

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : PIS (Phosphatidyl Inositol (Pdlns) Synthase) Gene Cloning for drought tolerance traits study in tobacco plant.

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง	นายพยุงศักดิ์ รวยอารี	**สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางสาวภรณี สว่างศรี	**สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ	**สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวสุภาวดี ง้อเหรียญ	**สังกัด** สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. **บทคัดย่อ**

บทคัดย่อ

รวบรวมลำดับเบสของยีน PIS (Phosphatidyl (pdlns) Inositol Synthase) จากฐานข้อมูลชีวภาพสากล (NCBI) ออกแบบและสังเคราะห์ยีน PIS ด้วยวิธี GeneArt Gene Synthesis ที่ประกอบด้วย 3 คู่ จุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) ที่ปลายด้าน 5’ และ 3’ ได้แก่ XbaI-BamHI, XbaI-EcoRI, และ XbaI-KpnI โคลนยีน PIS ที่สังเคราะห์ได้เข้าสู่ TOPO cloning vector และ pUC19 ทรานส์ฟอร์มเข้าสู่แบคทีเรีย *E .coli* DH5 alpha เพื่อเพิ่มจำนวน ตรวจสอบความถูกต้องด้วยวิธีการหาลำดับเบส จากนั้น ตัดพลาสมิดไบนารีเวคเตอร์ pCAMBIA2300 ที่ประกอบด้วย CaMV35S promoter และ Nos Terminator และ pRI909/pRI910 ที่ประกอบด้วย Nos promoter และ Nos terminator พร้อมด้วยยีน PIS ใน TOPO cloning vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตามสามคู่จุดตัดเอนไซม์เดียวกัน (compatible restriction sites) ทำการทดลองระหว่าง

ปี 2559 ถึงปี 2560 ที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ การเชื่อมต่อยีน PIS เข้ากับ pCAMBIA2300, pRI909, และ pRI910 ทั้งสามคู่จุดตัดเอนไซม์ ด้วย T4 DNA ligase ผลการทดลองพบว่า สามารถสร้างคอนส์ตรักส์ของยีน PIS เข้ากับไบนารีเวคเตอร์ทั้งสามชนิดพลาสมิดได้ อีกทั้ง ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นยาสูบเพื่อเตรียมไว้สำหรับการถ่ายฝากยีนด้วยวิธี Agrobacterium transformation ด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ ELEXTROMAX LBA4404 และเตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียมตามความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อไป ผลการทดลองการถ่ายฝากยีนในเบื้องต้น ยังไม่ได้ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายฝากยีน อาจต้องมีการปรับสภาวะการทดลองเพื่อให้ได้ต้นยาสูบที่ประกอบด้วยยีน PIS ต่อไป ส่วนการทดลองควบคุม และเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการทรานส์ฟอร์เมชั่นด้วยสายพันธุ์ LBA4404 ให้ผล 100 เปอร์เซ็นต์ และได้ต้นต้นยาสูบสมบูรณ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อใช้ในการถ่ายฝากยีนต่อไป

Abstract

PIS DNA base sequences were retrieved from National Centre for Bioinformatics Information (NCBI Database). The open reading frame of PIS gene has been designed and synthesized by GeneArt gene synthesis method. The full-length of PIS gene contains 648 base pairs comprising 3 pairs of restriction sites at their 5’ and 3’-ends which are *XbaI-BamHI*, *XbaI-EcoRI*, and *XbaI-KpnI*. The PIS gene then was cloned into TOPO cloning system and pUC19 for gene amplification and for transformation into tobacco plant. DNA sequencing was used to confirm the identity of the correction of DNA bases. The DNA sequencing and blast search results showed homology with other PIS plant genes in the database. The plant expression vector, pCAMBIA2300, pRI909 and pRI910 were cut with the same sites of their compatible restriction enzymes. The experiments were conducted between 2016 and 2017. The results showed that the construction of PIS gene with all three plant expression vectors has been successful. The agrobacterium-mediated transformation of PIS gene constructs using LBA4404 were under studied. Furthermore, the tobacco plant tissue culture was succeeded for further gene transformation. The preliminary results

showed that the appropriate conditions of gene transformation need to be adjusted for successful transformation.

6. คำนำ :

ปัจจุบัน เป็นที่ทราบกันดีว่าอุณหภูมิของโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอันเนื่องมาจากกิจกรรมของมนุษย์ ทั้งภาคเกษตรกรรมและภาคอุตสาหกรรม จำนวนประชากรมนุษย์ที่เพิ่มสูง จำนวนพื้นที่เพาะปลูกหรือภาคการเกษตรลดลงเพื่อใช้ในกิจกรรมอย่างอื่นที่ไม่ใช่ภาคเกษตร บวกกับเทคโนโลยีใหม่ๆที่มนุษย์สร้างขึ้น จนทำให้โลกต้องประสบกับปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นในชั้นบรรยากาศ (ชั้นบรรยากาศบางลง) รังสี ความเค็ม และความเครียดทางสิ่งแวดล้อมอื่นๆ (Environmental stresses) ที่ส่งผลต่อพืช (Levitt, 1980) ทำให้เป็นที่คาดการณ์กันว่า มนุษย์ต้องเผชิญกับภาวะโลกร้อน ภาวะเรือนกระจกหรือสภาพการเปลี่ยนแปลงของภูมิอากาศ (climate change) อย่างมากในอนาคตอันใกล้และปัจจุบันได้เกิดขึ้นแล้ว (Sun *et al*., 2014) โดยจะส่งผลกระทบต่อทั้งธรรมชาติและมนุษย์ ปัจจุบันผลที่เกิดจากภาวะโลกร้อนได้ทำให้มนุษย์เห็นแล้วว่าส่งผลกระทบและมีความสำคัญอย่างแท้จริง เช่น ทำให้สภาพแวดล้อมของโลกเปลี่ยนแปลงไป เช่น ฝนตกไม่ถูกต้องตามฤดูกาล พืชเกิดสภาวะขาดน้ำจากภาวะโลกร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในภาคการเกษตร พืชต้องประสบกับปัญหาภัยแล้งในบางฤดูกาล เพราะฝนไม่ตกตามช่วงเวลาที่เหมาะสม ทำให้พืชประสบปัญหาภัยแล้ง และพืชบางพันธุ์อ่อนแอต่อสภาวะขาดน้ำ ทำให้เกษตรกรสูญเสียรายได้เพราะปริมาณพืชที่คาดหวังภายหลังการเพาะปลูกลดลง ทั้งมีสาเหตุมาจากไม่สามารถเพาะปลูกพืชได้ตามที่ต้องการหรือสูญเสียผลผลิตพืชที่ได้เพาะปลูกไป (yield loss) กล่าวโดยทั่วไปว่า ภัยแล้งจัดเป็นปัญหาทางกายภาพที่สำคัญที่สุดที่ทั่วโลกเผชิญ และทำให้การเพิ่มปริมาณผลผลิตของพืช (Hezky, 2008) เท่าที่ผ่านมา นอกเหนือจากวิธีการทางภาคเกษตรตามปกติแล้ว ได้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว โดยการพัฒนาพืชให้มีความทนทานแล้ง ทนต่อสภาวะขาดน้ำ หรือทนต่อสภาวะเครียดในช่วงการเพาะปลูกได้ (drought stress tolerance) โดยการศึกษาหายีนทนแล้งต่างๆ และนำยีนต่างๆ เหล่านั้นเข้าสู่จีโนมของพืชที่ต้องการให้มีสรีรวิทยาตามต้องการ อย่างไรก็ตาม การศึกษาตามวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพดังกล่าว ต่างให้ผลลัพธ์ที่แตกต่างกันออกไป เช่น ระดับการตอบสนองต่อการขาดน้ำหลังการได้รับยีนที่ผันแปรไปตามแต่ละชนิดยีนหรือชนิดพืช เป็นต้น ด้วยเหตุนี้ ในงานวิจัยนี้ มุ่งเน้นการศึกษาหายีน PIS (Phosphatidylinositol (PtdIns) synthase) ซึ่งเป็นยีนที่ได้ผ่านการศึกษามาแล้วว่ามีผลต่อคุณลักษณะทนแล้งในพืชทนแล้ง ในอนาคต อาจนำไปใช้ในต่อยอดและทดสอบกับพืชต้นแบบต่อไป แม้ว่าการศึกษาเกี่ยวกับยีนทนแล้งจะมีอยู่ก็ตาม แต่ก็มีอยู่อย่างจำกัด ส่วนมากเป็นรายงานการศึกษาจากต่างประเทศ ด้วยเหตุนี้ วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้

เพื่อเป็นการหาข้อมูลการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำกับพืชสำคัญในประเทศไทย อาจเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในประเทศต่อไปในอนาคต

นอกจากเนื่องจากอุณหภูมิโลกมีแนวโน้มสูงขึ้น หรือที่เรียกกันว่าภาวะโลกร้อน ดังกล่าวนั้น ทำให้จำนวนพื้นที่การเพาะปลูกและผลผลิตของพืชลดลง เกษตรกรทั่วโลกสูญเสียรายได้ โดยปกติแล้ว เมื่อพืชต้องประสบปัญหาในการเจริญเติบโตในสภาวะขาดน้ำ พืชจะมีกลไกควบคุมภายในเซลล์อย่างเป็นระบบเพื่อตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมนั้นๆ ตามธรรมชาติ ตัวอย่างเช่น การมีองค์ประกอบโครงสร้างสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ ที่ประกอบด้วยเอ็นไซม์สำคัญในวิถีฟอสโฟลิปิด (phospholipid pathways) ชื่อว่า PIS (Phosphatidylinositol (PtdIns) synthase) ที่ถูกสร้างขึ้นมาจากแหล่งเริ่มต้นสำคัญในการสร้างลิปิดที่ประกอบด้วยอินอสซิทอล (inositol-containing lipid precursor) ชื่อว่า Phosphatidylinositol (PtdIns) นี้ โดยสามารถถูกสร้างขึ้นมาได้ทั้งจาก cytidine-diphosphodiacylglycerol (CDP-DG) และ myo-inositol โดย PtdIns synthase (PIS) พบได้ทั่วไปทั้งในเซลล์พืชและสัตว์ทุกชนิด

PtdIns พบที่เยื่อหุ้มเซลล์ และเป็นตัวช่วยสำคัญในกระบวนการเมตาบอลึซึม อีกทั้ง เป็นโมเลกุลตัวส่งสัญญาณ (signal molecules) เพื่อควบคุมการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในพืช ที่ควบคุมการตอบสนองต่อสภาวะเครียดทางสิ่งแวดล้อม (Zhai *et al*., 2012; Lie *et al*., 2013)

จากการศึกษายีน PIS ในยีสต์มิวแตนท์ ชื่อว่า BY4743 ยืนยันว่ายีน ZmPIS และ ZmPIS2 ในข้าวโพด มีการแสดงออกในระดับทรานส์คริปชั่นที่เพิ่มสูงขึ้น (transcriptional up-regulated) เพื่อตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำ (drought stress) และภายใต้สภาวะดังกล่าว ข้าวโพดจะมีการแสดงออกของยีน *ZmPIS* ที่สูงขึ้น ก่อให้เกิดระดับที่เพิ่มขึ้นของฟอสโฟลิปิดและกาแลคโคลิปิด (galactolipids) ในใบเทียบกับระดับของยีนดังกล่าวในพันธุ์ปกติ โดยพบมีการเชื่อมโยงการปิดของปากใบเมื่อพืชอยู่ในสภาวะขาดน้ำ (stomatal closure)

ต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายฝากยีนจากข้าวโพด ZmPIS มีระดับลิปิดเพิ่มขึ้นที่ส่วนใบอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายฝากยีน ทำให้มีความแข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell integrity) เพิ่มขึ้น อีกทั้ง เซลล์สามารถเก็บรักษาน้ำและสารอาหารต่างๆ (solutes) ต่างๆ ให้อยู่ภายในเซลล์ได้นานขึ้นภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Liu *et al*., 2013; Zhai *et al*., 2012)

7. วิธีดำเนินการ :

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สารเคมีและเอนไซม์

สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ น้ำยาคลอรอกซ์สำหรับใช้ทำความสะอาด เอทานอล

- เจลอะกาโลส (gel electrophoresis and gel apparatus)
- ถุงมือ
- กระดาษฟอยล์
- กระดาษ Kimwipe
- สารเคมีในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น อาหาร Basic Agar, IAA (Indole Acetic Acid), เป็นต้น

-เอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆ ได้แก่ XbaI, BamHI, SacI และ EcoRI

2. เครื่องมือ

- ชุดถ่ายภาพพร้อมเครื่องมือวิเคราะห์สารพันธุกรรม รุ่น Gel Doc 2000 (เครื่อง Gel documentation, BIORAD)
- กระดาษถ่ายภาพพร้อมเครื่องถ่ายภาพ (MITSUBISHI P91)
- เครื่องหาลำดับเบส (DNA Sequencer)
- เครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (PCR) โปรแกรมอ่านและวิเคราะห์
- ตู้เก็บสารเคมีอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น IUF1816A
- ไมโครไปเปต ทิปขนาด 10 20 200 1000 ไมโครลิตร
- เครื่องแก้ว ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขนาดปริมาตรต่างๆ เป็นต้น

3. จุลินทรีย์ พลาสมิด และอาหารเลี้ยงเชื้อ

- pMAT-vector (Invitrogen, USA)

- LBA4404 agrobacterium
- Agrobacterium A10460 strain
- Stellar ElectroCompetent cell (Invitrogen, USA)
- *E .coli* DH5 alpha

4.พันธุ์พืชที่ใช้ในงานวิจัย

ต้นยาสูบพันธุ์เวอร์จิเนีย

5.ชุดโคลนนิ่งคิท (cloning kit)

-TOPO cloning kit

- PIS gene string (GeneArt Gene Synthesis, Invitrogen, USA)

วิธีการทดลอง

ออกแบบไพรเมอร์ PIS พร้อมจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ด้านปลาย 5’ และ 3’

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน PIS โดยเพิ่มจำนวน 3 คู่ จุดตัดเอนไซม์ ที่ด้านปลาย 5’ และ 3’ XbaI-BamHI, XbaI-KpnI, XbaI-SacI สำหรับเติมเข้า pMAT – vector โดยวิธีการออกแบบและสังเคราะห์ยีน (Invitrogen, USA) (ภาพที่ 1)

(ก)

XbaI-BamHI

PIS-XbaI(forward) 5’- TAAGCATCTAGAATGCCATCAGTTTATCTTTAC -3’

PIS-BamHI(reverse) 5’-TGCTTAGAATCCTCATTTGCTGCGCTTCAGATC-3’

XbaI-KpnI

PIS-XbaI(forward) 5’- TAAGCATCTAGAATGCCATCAGTTTATCTTTAC -3’

PIS-KpnI(reverse) 5’- TGCTTAGGTACCTCATTTGCTGCGCTTCAGATC-3’

XbaI-SacI

PIS-XbaI(forward) 5’- TAAGCATCTAGAATGCCATCAGTTTATCTTTAC-3’

PIS-SacI(reverse) 5’- TCTAGAGAGCTCTCATTTGCTGCGCTTCAGATC-3’

(ข)

: PIS gene screening primers

PIS(scr)-Fv : ATGCCATCAGTTTATCTTTACATCCCTAACATT (33)

PIS(scr)-Rv : TCATTTGCTGCGCTTCAGATCATACACG (31)

ภาพที่ 1 แสดงคู่จุดตัดเอนไซม์และตำแหน่งไพรเมอร์ของ PIS gene ที่ด้านปลาย 3’ และ 5’ พร้อมไพรเมอร์ตรวจสอบชิ้นยีน (Screening primers) เพื่อให้ได้ยีน PIS แบบเต็มยีน (Full-length) จำนวน 3 เส้น ความยาวของยีนประมาณ 650 เบส โดยยีน PIS ที่ได้ประกอบด้วยตำแหน่งจุดตัดบริเวณปลาย 5’ และปลาย 3’ จำนวน 3 ชุดตำแหน่งจุดตัดเอนไซม์ ได้แก่ XbaI-KpnI , XbaI-SacI และ XbaI-BamHI (ก) และ PIS gene screening primers (ข)

การออกแบบและสังเคราะห์ยีน PIS แบบเต็มสายยีน

รวบรวมข้อมูลลำดับเบสของยีน PIS มาออกแบบและสังเคราะห์โดยวิธีการออกแบบและสังเคราะห์ยีน (GeneArt and GeneSynthesis, Invitrogen, USA) ตามคู่ไพรเมอร์ ให้ได้แบบเต็มสายยีน (full-length) พร้อมตำแหน่งจุดตัดเอ็นไซม์ที่เพิ่มลงไปทั้งด้านปลาย 5’ และ ปลาย 3’ ของยีน

การเชื่อมต่อยีนเข้ากับเวคเตอร์ดีเอ็นเอ

ทำปฏิกิริยาไลเกชันโดยการนำเวคเตอร์ดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร อินเสิร์ตดีเอ็นเอ (3 คู่ จุดตัดเอนไซม์) (xbaI-KpnI. xbaI-sacI, xbaI-bamHI) 1 ไมโครลิตร T4 DNA ligase (Promega) 0.5 ไมโครลิตร ไลเกสบัฟเฟอร์ 1 ไมโครลิตร เติมน้ำ ปริมาตรสุดท้าย 10 ไมโครลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ทำการถ่ายฝากเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia col*i บน วุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ LB โดยวิธี Heat shock หรือใช้ TOPO cloning kit ต่อไป

การทำทรานส์ฟอร์เมชั่น

เติม 2 ไมโครลิตรของปฏิกิริยาไลเกชั่นข้างต้น ลงในหลอด competent cells บ่มบนน้ำแข็ง นาน 50 นาที ทำปฏิกิริยา Heat Shock นาน 30 นาที ที่ 42 องศาเซลเซียส วางหลอดลงบนน้ำแข็ง เติมอาหารเหลว S.O.C. 250 ไมโครลิตร ลงในหลอด แล้วเขย่านาน 2.5 ชั่วโมง ที่ 200 rpm ทำการเพลทจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 ไมโครลิตร ถึง 100 ไมโครลิตร บนวุ้นอาหาร LB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

การคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ประกอบด้วยรีคอมบิแนนต์ที่ถูกต้อง

คัดเลือกโคโลนีที่ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบสารปฏิชีวนะ เพื่อนำมาหายีนสอดแทรกหรืออินเสิร์ทยีน (inserted gene) ที่ต้องการด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 สาย ได้แก่ PIS(scr)-Fv และ PIS(scr)-Rv และ/หรือตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อเก็บไว้เป็น glycerol stock (อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส) ตรวจสอบความถูกต้องด้วยการหาลำดับเบส

สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบอินเสิร์ทดีเอ็นเอ

ทำพลาสมิดดีเอ็นเอมินิเพรพของโคโลนี เพื่อให้ได้ยีนจำนวนมาก พร้อมโคลนเข้าสู่ไบนารี่เวคเตอร์ (vector construct) ในขั้นตอนต่อไป นำดีเอ็นเอมินิเพรพที่ได้จากข้อ 2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ตามตำแหน่งที่เข้ากันได้กับตำแหน่งจุดตัดจำเพาะของพลาสมิดไบนารี่เวคเตอร์ และเชื่อมต่อเข้ากันด้วยเอนไซม์ DNA ligase ตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้

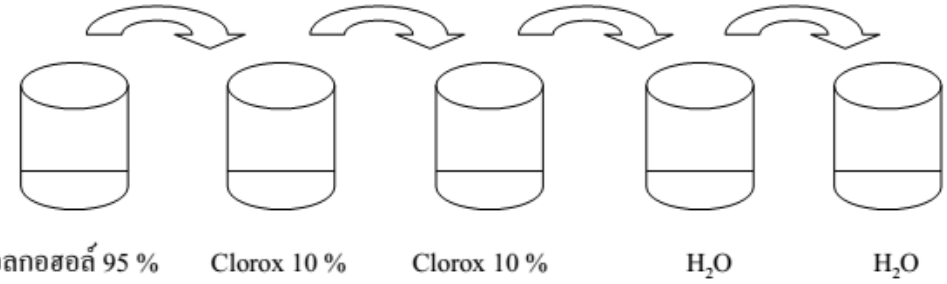
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ

เตรียมต้นยาสูบด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ขั้นตอนการเพาะเมล็ดยาสูบ

<u>วัสดุอุปกรณ์</u>

1.ขวดพร้อมอาหาร MS Murashige and Skoog
2.ขวดอาหารเปล่า
3.Clorox 10 %
4.ปากคีบ
5.จานอาหาร (Plate) พร้อมกระดาษทิชชู่
6.ผ้าขาวบาง
7.แอลกอฮอล์ 95 %
8.น้ำ ที่ Autoclave แล้ว
9.ตะเกียงแอลกอฮอล์
10.เมล็ดยาสูบ



ขั้นตอนการปฏิบัติ (ทุกอย่างทำในตู้ปลอดเชื้อ)

1.ห่อเมล็ดยาสูบด้วยผ้าขาวบาง

2.เตรียมขวดตามลำดับ

3.นำปากคีบลนไฟที่ตะเกียงแอลกอฮอล์ ทิ้งไว้ให้เย็น

4.ใช้ปากคีบ คีบห่อเมล็ดยาสูบลงไปในขวดที่เตรียมไว้

5.ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95 % 5 นาที เขย่าขวดด้วยมือ

6.ล้างด้วย Clorox 10 % ครั้งละ 10 นาที 2 ครั้ง เขย่าขวดด้วยมือ

7.ล้างด้วย H_2O ครั้งละ 5 นาที 2 ครั้ง เขย่าขวดด้วยมือ

8.ใช้ปากคีบ คีบห่อเมล็ดยาสูบออกจากขวด วางลงในจานอาหาร (Plate) ที่มีกระดาษทิชชู่ เพื่อซับน้ำ

9.เปิดผ้าขาวบางออก ผึ่งเมล็ด

10.นำปากคีบ คีบเมล็ดวางบนขวดอาหาร MS

11.ปิดฝาขวดวางในที่ควบคุมแสงและอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

12.เมล็ดใช้เวลางอก 1 เดือน

13.ทำการย้ายใส่ขวดอาหารใหม่ เพื่อลดการปนเปื้อน จากขวดเพาะเมล็ดที่ไม่งอก

14.รอจนต้นยาสูบโต แล้วทำในขั้นตอนต่อไป

15. เตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ซึ่งมี origin of replication ต่ำกว่า E. coli เพื่อเตรียมไว้ใช้ในการถ่ายฝากยีนด้วยวิธีการ Electrotransformation

16. ถ่ายฝากยีนด้วยวิธีการ ยิงยีน (ELEXTROMAX LBA4404) และตรวจสอบการถ่ายฝากยีน เปรียบเทียบกับการทำเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ไม่ได้ทำการถ่ายฝากยีน (control)

การถ่ายฝากเข้าสู่พืชต้นแบบยาสูบ

ทำการถ่ายฝากเข้าสู่พืชต้นแบบ (ยาสูบ) โดยวิธีการ *Agrobacterium*-mediated transformation ด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม (ELECTROMAX LBA4404)

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลาทำการทดลอง ตุลาคม 2559 – กันยายน 2560

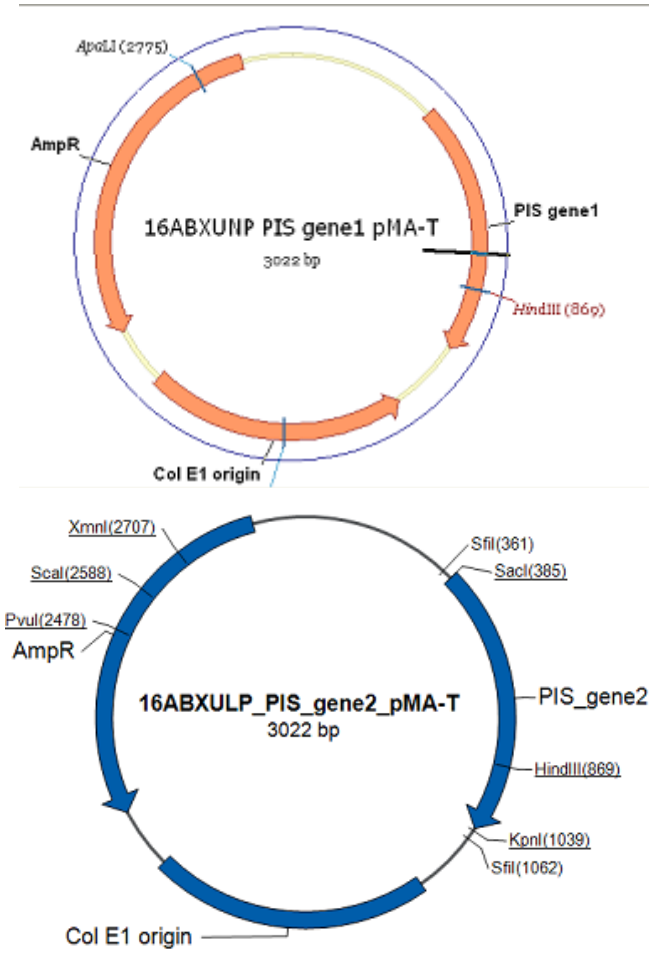
สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การสังเคราะห์สายไพรเมอร์ พร้อม 3 คู่ จุดตัดเอนไซม์และท่อนยีน PIS โดยวิธีการสังเคราะห์ยีน ทำให้ลำดับเบสและความยาวของยีนประมาณ 648 คู่เบส (bp) และเชื่อมต่อเข้าสู่ pMAT vector (ภาพที่ 2)

ถ่ายยีนเข้าสู่ pMAT- vector เพื่อเพิ่มจำนวนสำเร็จ โดย pMAT vector ประกอบด้วย ยีนต้านทานปฏิชีวนะแอมพิซิลิน สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของ พลาสมิดดีเอ็นเอกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล (ภาพที่ 3) ลำดับเบสของยีน PIS (ขนาด 648 คู่เบส) และ 2 คู่จุดตัดเอนไซม์ที่ด้านปลาย 5’ และ 3’ ได้แก่ (XbaI-KpnI และ XbaI-BamHI) (ภาพที่ 4) พบว่า มีค่า alignment scores ที่ match กับยีน PIS ที่ปรากฏในฐานข้อมูลชีวภาพสากล (ภาพที่ 5) ภาพที่ 6 แสดงค่า Sequences producing significant alignments ของยีน PIS ที่ 100%

เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน PIS กับยีน PIS ของสิ่งมีชีวิตที่ปรากฏในฐานข้อมูลชีวภาพสากล พบว่า มีความสัมพันธ์อย่างสูง (ภาพที่ 7) และความสัมพันธ์ระหว่างยีน PIS ของพืช Dicot และ Monocot (ภาพที่ 8) ภาพที่ 9 แสดงลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน PIS แบบเต็มสายยีน (full-length) ภาพที่ 10 ภาพแสดงต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเตรียมไว้ใช้ในการถ่ายฝากยีน



ภาพที่ 2 แสดงแผนที่การถ่ายยีน PIS เข้าสู่ pMAT- vector >Sense strand, 5’-3’ : Sequence length: 648 bp

ATGCCATCAGTTTATCTTTACATCCCTAACATTATCGGGTATTTTAGGATCATCATAAATTTCAT

TGCATTTGCGGTTTGCTATTCCAACAAGGCTCTCTTTGCTATCCTGTACTTCATCAGCTTTGTCC

TTGATGGTGTGGATGGTTGGTTTGCAAGGAAGTTCAATCAAGCATCAACCTTTGGAGCTGTGTTA

GACATGGTTACAGATAGGGTTAGCACTGCTTGTTTGTTGGCCCTTCTCTCCCAGTTTTACAGACC

TGGTTTAGTCTTCTTGATATTGCTTGGATTGGATATTACGAGCCACTGGTTTCAAATGTACAGTT

CTTTCTTGTCAGGTAAGACTAGCCACAAGGATGTAAAACACACAGGCAATTGGCTTCTGAAATTA

TATTATGGGTACAGGCCATTCATGGCCTTCTGCTGTGTTTCTTGTGAGGTTTTATATATTTTCCT

GTTTCTCTTTGCTGATGAGGAGTCAACAAGCTTGCTTAGTGTATGCAAAGGCATCCTGAACCAAA

GTCCCGTCGTTATCTTGGTGTTTGTTTCCACTCTAGTTGGCTGGGCAGTGAAGCAAGCCACCAAC

GTCATCCAGATGAAAACTGCTGCGGACGCATGCGTGGTGTATGATCTGAAGCGCAGCAAATGA

ภาพที่ 3 แสดงลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน PIS

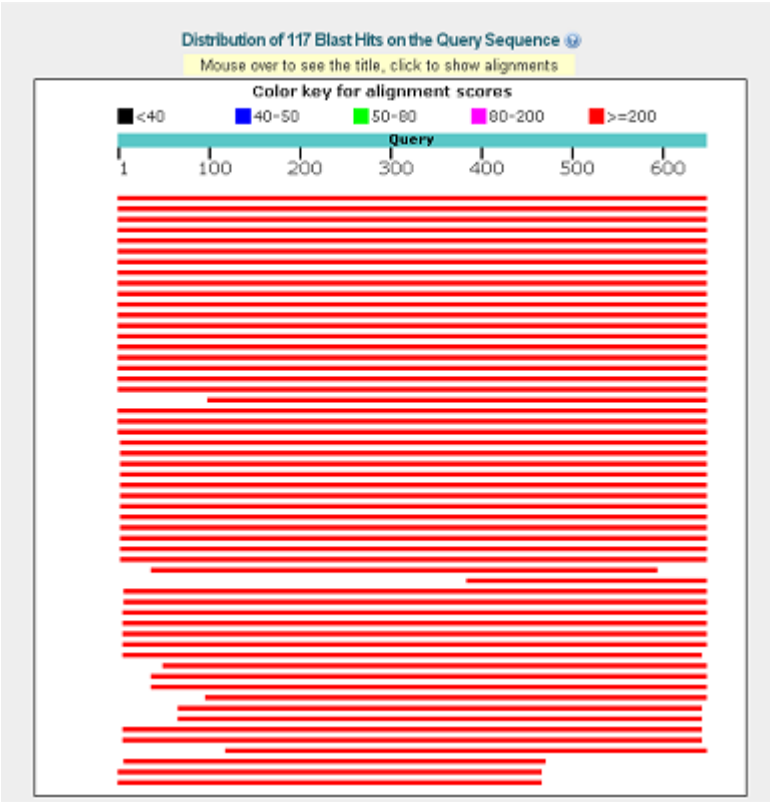
>เส้นที่ 1

5′- XbaI-
atgccatcagtttatctttacatccctaacattatcgggtattttaggatcatcataaatttcattgcatttgcggtttg
ctattccaacaaggctctctttgctatcctgtacttcatcagctttgtccttgatggtgtggatggttggtttgcaagga
agttcaatcaagcatcaacctttggagctgtgttagacatggttacagatagggttagcactgcttgtttgttggcccttt
ctctcccagttttacagacctggtttagtcttcttgatattgcttggattggatattacgagccactggtttcaaatgta
cagttctttcttgtcaggtaagactagccacaaggatgtaaaacacacaggcaattggcttctgaaattatattatgggt
acaggccattcatggccttctgctgtgtttcttgtgaggttttatatattttcctgtttctctttgctgatgaggagtca
acaagcttgcttagtgtatgcaaaggcatcctgaaccaaagtcccgtcgttatcttggtgtttgtttccactctagttgg
ctgggcagtgaagcaagccaccaacgtcatccagatgaaaactgctgcggacgcatgcgtggtgtatgatctgaagcgca
gcaaatga-KpnI -3′

>เส้นที่ 2

5′- XbaI -
atgccatcagtttatctttacatccctaacattatcgggtattttaggatcatcataaatttcattgcatttgcggtttg
ctattccaacaaggctctctttgctatcctgtacttcatcagctttgtccttgatggtgtggatggttggtttgcaagga
agttcaatcaagcatcaacctttggagctgtgttagacatggttacagatagggttagcactgcttgtttgttggcccttt
ctctcccagttttacagacctggtttagtcttcttgatattgcttggattggatattacgagccactggtttcaaatgta
cagttctttcttgtcaggtaagactagccacaaggatgtaaaacacacaggcaattggcttctgaaattatattatgggt
acaggccattcatggccttctgctgtgtttcttgtgaggttttatatattttcctgtttctctttgctgatgaggagtca
acaagcttgcttagtgtatgcaaaggcatcctgaaccaaagtcccgtcgttatcttggtgtttgtttccactctagttgg
ctgggcagtgaagcaagccaccaacgtcatccagatgaaaactgctgcggacgcatgcgtggtgtatgatctgaagcgca
gcaaatga-BamHI-3′

ภาพที่ 4 แสดงลำดับเบสของยีน PIS (ขนาด 648 คู่เบส) และ 2 จุดตัดเอนไซม์ที่ด้านปลาย 5’ และ 3’ ได้แก่ (XbaI-KpnI และ XbaI-BamHI)

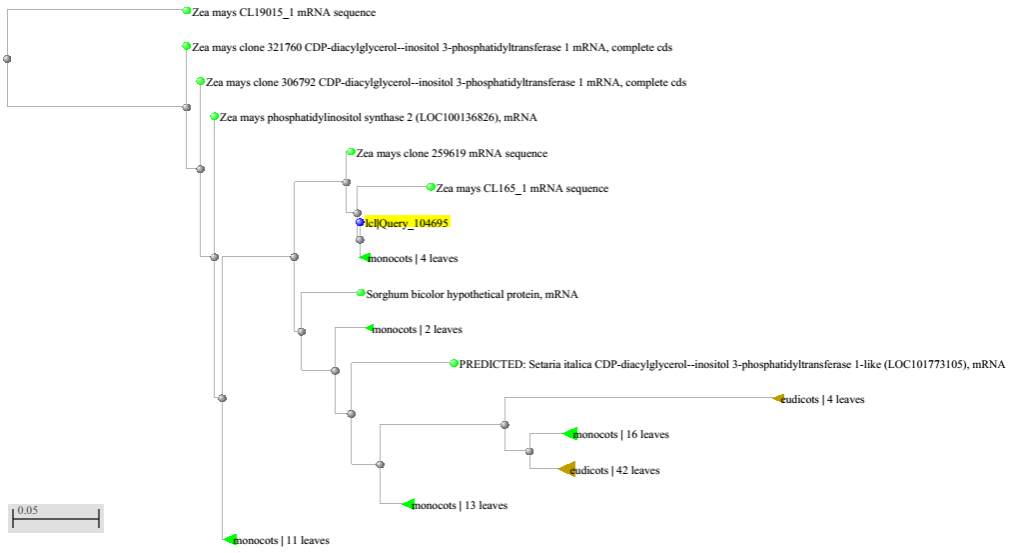


ภาพที่ 5 แสดงการ match จากการทำ blast search ของยีน PIS เทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล NCBI database

Description	score	score	cover	value	Ident	Accession
Zea mays clone 284101 CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase 1 mRNA, complete cds	1169	1169	100%	0.0	100%	EU965146.1
Zea mays full-length cDNA clone ZM_BFb0298A12 mRNA, complete cds	1169	1169	100%	0.0	100%	BT038618.1
Zea mays phosphatidylinositol synthase (PIS), mRNA	1164	1164	100%	0.0	99%	NM_001112089.1
Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA	1047	1047	100%	0.0	96%	XM_002438786.1
Zea mays CL165_1 mRNA sequence	1043	1043	100%	0.0	95%	AY112475.1
PREDICTED: Zea mays phosphatidylinositol synthase 2 (LOC100136826), transcript variant X9, mRNA	1007	1007	100%	0.0	94%	XM_008649053.1
PREDICTED: Zea mays phosphatidylinositol synthase 2 (LOC100136826), transcript variant X9, mRNA	1007	1007	100%	0.0	94%	XM_008649052.1
PREDICTED: Zea mays phosphatidylinositol synthase 2 (LOC100136826), transcript variant X7, mRNA	1007	1007	100%	0.0	94%	XM_008649051.1
PREDICTED: Zea mays phosphatidylinositol synthase 2 (LOC100136826), transcript variant X6, mRNA	1007	1007	100%	0.0	94%	XM_008649050.1
PREDICTED: Zea mays phosphatidylinositol synthase 2 (LOC100136826), transcript variant X5, mRNA	1007	1007	100%	0.0	94%	XM_008649049.1
PREDICTED: Zea mays phosphatidylinositol synthase 2 (LOC100136826), transcript variant X4, mRNA	1007	1007	100%	0.0	94%	XM_008649048.1
PREDICTED: Zea mays phosphatidylinositol synthase 2 (LOC100136826), transcript variant X3, mRNA	1007	1007	100%	0.0	94%	XM_008649047.1
PREDICTED: Zea mays phosphatidylinositol synthase 2 (LOC100136826), transcript variant X2, mRNA	1007	1007	100%	0.0	94%	XM_008649046.1
PREDICTED: Zea mays phosphatidylinositol synthase 2 (LOC100136826), transcript variant X1, mRNA	1007	1007	100%	0.0	94%	XM_008649045.1
Zea mays full-length cDNA clone ZM_BFb0350F04 mRNA, complete cds	1007	1007	100%	0.0	94%	BT062021.1
Zea mays clone 321760 CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase 1 mRNA, complete cds	1007	1007	100%	0.0	94%	EU968519.1
Zea mays clone 396792 CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase 1 mRNA, complete cds	1007	1007	100%	0.0	94%	EU967880.1

ภาพที่ 6 แสดง Sequences producing significant alignments ของยีน PIS

ภาพที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน PIS (Phylogenetic tree) ที่ได้กับยีน PIS ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในฐานข้อมูลชีวภาพสากล (NCBI)



ภาพที่ 8 แสดง Phylogenetic tree ของยีน PIS ระหว่าง monocot และ eudicot

```
1       CTAAATTGTA AGCGTTAATA TTTTGTTAAA ATTCGCGTTA AATTTTTGTT AAATCAGCTC ATTTTTTAAC CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT
        GATTTAACAT TCGCAATTAT AAAACAATTT TAAGCGCAAT TTAAAAACAA TTTAGTCGAG TAAAAAATTG GTTATCCGGC TTTAGCCGTT TTAGGGAATA
101     AAATCAAAAG AATAGACCGA GATAGGGTTG AGTGGCCGCT ACAGGGCGCT CCCATTCGCC ATTCAGGCTG CGCAACTGTT GGGAAGGGCG TTTCGGTGCG
        TTTAGTTTTC TTATCTGGCT CTATCCCAAC TCACCGGCGA TGTCCCGCGA GGGTAAGCGG TAAGTCCGAC GCGTTGACAA CCCTTCCCGC AAAGCCACGC
201     GGCCTCTTCG CTATTACGCC AGCTGGCGAA AGGGGGATGT GCTGCAAGGC GATTAAGTTG GGTAACGCCA GGGTTTTCCC AGTCACGACG TTGTAAAACG
        CGGGAGAAGC GATAATGCGG TGGACCGCTT TCCCCCTACA CGACGTTCCG CTAATTCAAC CCATTGCGGT CCCAAAAGGG TCAGTGCTGC AACATTTTGC
301     ACGGCCAGTG AGCGCGACGT AATACGACTC ACTATAGGGC GAATTGGCGG AAGGCCGTCA AGGCCACGTG TCTTGTCCAG AGCTCATGCC ATCAGTTTAT
        TGCCGGTCAC TCGCGCTGCA TTATGCTGAG TGATATCCCG CTTAACCGCC TTCCGGCAGT TCCGGTGCAC AGAACAGGTC TCGAGTACGG TAGTCAAATA
401     CTTTACATCC CTAACATTAT CGGGTATTTT AGGATCATCA TAAATTTCAT TGCATTTGCG GTTTGCTATT CCAACAAGGC TCTCTTTGCT ATCCTGTACT
        GAAATGTAGG GATTGTAATA GCCCATAAAA TCCTAGTAGT ATTTAAAGTA ACGTAAACGC CAAACGATAA GGTTGTTCCG AGAGAAACGA TAGGACATGA
501     TCATCAGCTT TGTCCTTGAT GGTGTGGATG GTTGGTTTGC AAGGAAGTTC AATCAAGCAT CAACCTTTGG AGCTGTGTTA GACATGGTTA CAGATAGGGT
        AGTAGTCGAA ACAGGAACTA CCACACCTAC CAACCAAACG TTCCTTCAAG TTAGTTCGTA GTTGGAAACC TCGACACAAT CTGTACCAAT GTCTATCCCA
601     TAGCACTGCT TGTTTGTTGG CCCTTCTCTC CCAGTTTTAC AGACCTGGTT TAGTCTTCTT GATATTGCTT GGATTGGATA TTACGAGCCA CTGGTTTCAA
        ATCGTGACGA ACAAACAACC GGGAAGAGAG GGTCAAAATG TCTGGACCAA ATCAGAAGAA CTATAACGAA CCTAACCTAT AATGCTCGGT GACCAAAGTT
701     ATGTACAGTT CTTTCTTGTC AGGTAAGACT AGCCACAAGG ATGTAAAACA CACAGGCAAT TGGCTTCTGA AATTATATTA TGGGTACAGG CCATTCATGG
        TACATGTCAA GAAAGAACAG TCCATTCTGA TCGGTGTTCC TACATTTTGT GTGTCCGTTA ACCGAAGACT TTAATATAAT ACCCATGTCC GGTAAGTACC
                                                                                HindIII
                                                                                ~~~~~~~
801     CCTTCTGCTG TGTTTCTTGT GAGGTTTTAT ATATTTTCCT GTTTCTCTTT GCTGATGAGG AGTCAACAAG CTTGCTTAGT GTATGCAAAG GCATCCTGAA
        GGAAGACGAC ACAAAGAACA CTCCAAAATA TATAAAAGGA CAAAGAGAAA CGACTACTCC TCAGTTGTTC GAACGAATCA CATACGTTTC CGTAGGACTT
901     CCAAAGTCCC GTCGTTATCT TGGTGTTTGT TTCCACTCTA GTTGGCTGGG CAGTGAAGCA AGCCACCAAC GTCATCCAGA TGAAAACTGC TGCGGACGCA
        GGTTTCAGGG CAGCAATAGA ACCACAAACA AAGGTGAGAT CAACCGACCC GTCACTTCGT TCGGTGGTTG CAGTAGGTCT ACTTTTGACG ACGCCTGCGT
1001    TGCGTGGTGT ATGATCTGAA GCGCAGCAAA TGAGGTACCT GGAGCACAAG ACTGGCCTCA TGGGCCTTCC GCTCACTGCC CGCTTTCCAG TCGGGAAACC
        ACGCACCACA TACTAGACTT CGCGTCGTTT ACTCCATGGA CCTCGTGTTC TGACCGGAGT ACCCGGAAGG CGAGTGACGG GCGAAAGGTC AGCCCTTTGG
1101    TGTCGTGCCA GCTGCATTAA CATGGTCATA GCTGTTTCCT TGCGTATTGG GCGCTCTCCG CTTCCTCGCT CACTGACTCG CTGCGCTCGG TCGTTCGGGT
        ACAGCACGGT CGACGTAATT GTACCAGTAT CGACAAAGGA ACGCATAACC CGCGAGAGGC GAAGGAGCGA GTGACTGAGC GACGCGAGCC AGCAAGCCCA
1201    AAAGCCTGGG GTGCCTAATG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACG
        TTTCGGACCC CACGGATTAC TCGTTTTCCG GTCGTTTTCC GGTCCTTGGC ATTTTTCCGG CGCAACGACC GCAAAAAGGT ATCCGAGGCG GGGGGACTGC
1301    AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC
        TCGTAGTGTT TTTAGCTGCG AGTTCAGTCT CCACCCGCTTT GGGCTGTCCT GATATTTCTA TGGTCCGCAA AGGGGGACCT TCGAGGGAGC ACGCGAGAGG
1401    TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAT AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG
        ACAAGGCTGG GACGGCGAAT GGCCTATGGA CAGGCGGAAA GAGGGAAGCC CTTCGCACCG CGAAAGAGTA TCGAGTGCGA CATCCATAGA GTCAAGCCAC
                                ApaLI
                                ~~~~~~
1501    TAGGTCGTTC GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACTATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA
        ATCCAGCAAG CGAGGTTCGA CCCGACACAC GTGCTTGGGG GGCAAGTCGG GCTGGCGACG CGGAATAGGC CATTGATAGC AGAACTCAGG TTGGGCCATT
1601    GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA
        CTGTGCTGAA TAGCGGTGAC CGTCGTCGGT GACCATTGTC CTAATCGTCT CGCTCCATAC ATCCGCCACG ATGTCTCAAG AACTTCACCA CCGGATTGAT
1701    CGGCTACACT AGAAGAACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC
        GCCGATGTGA TCTTCTTGTC ATAAACCATA GACGCGAGAC GACTTCGGTC AATGGAAGCC TTTTTCTCAA CCATCGAGAA CTAGGCCGTT TGTTTGGTGG
1801    GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC
        CGACCATCGC CACCAAAAAA ACAAACGTTC GTCGTCTAAT GCGCGTCTTT TTTTCCTAGA GTTCTTCTAG GAAACTAGAA AAGATCGCCC AGACTGCGAG
1901    AGTGGAACGA AAACTCACGT TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA AAATGAAGTT TTAAATCAAT
        TCACCTTGCT TTTGAGTGCA ATTCCCTAAA ACCAGTACTC TAATAGTTTT TCCTAGAAGT GGATCTAGGA AAATTTAATT TTTACTTCAA AATTTAGTTA
2001    CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTCATC CATAGTTGCC
        GATTTCATAT ATACTCATTT GAACCAGACT GTCAATGGTT ACGAATTAGT CACTCCGTGG ATAGAGTCGC TAGACAGATA AAGCAAGTAG GTATCAACGG
2101    TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGAACC ACGCTCACCG GCTCCAGATT
        ACTGAGGGGC AGCACATCTA TTGATGCTAT GCCCTCCCGA ATGGTAGACC GGGGTCACGA CGTTACTATG GCGCTCTTGG TGCGAGTGGC CGAGGTCTAA
2201    TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGGAAGCTAG
        ATAGTCGTTA TTTGGTCGGT CGGCCTTCCC GGCTCGCGTC TTCACCAGGA CGTTGAAATA GGCGGAGGTA GGTCAGATAA TTAACAACGG CCCTTCGATC
2301    AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG CAACGTTGTT GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC
        TCATTCATCA AGCGGTCAAT TATCAAACGC GTTGCAACAA CGGTAACGAT GTCCGTAGCA CCACAGTGCG AGCAGCAAAC CATACCGAAG TAAGTCGAGG
2401    GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG
        CCAAGGGTTG CTAGTTCCGC TCAATGTACT AGGGGGTACA ACACGTTTTT TCGCCAATCG AGGAAGCCAG GAGGCTAGCA ACAGTCTTCA TTCAACCGGC
2501    CAGTGTTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC
        GTCACAATAG TGAGTACCAA TACCGTCGTG ACGTATTAAG AGAATGACAG TACGGTAGGC ATTCTACGAA AAGACACTGA CCACTCATGA GTTGGTTCAG
2601    ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT
        TAAGACTCTT ATCACATACG CCGCTGGCTC AACGAGAACG GGCCGCAGTT ATGCCCTATT ATGGCGCGGT GTATCGTCTT GAAATTTTCA CGAGTAGTAA
                                                                                ApaLI
                                                                                ~~~~~~
2701    GGAAAACGTT CTTCGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT
        CCTTTTGCAA GAAGCCCCGC TTTTGAGAGT TCCTAGAATG GCGACAACTC TAGGTCAAGC TACATTGGGT GAGCACGTGG GTTGACTAGA AGTCGTAGAA
2801    TTACTTTCAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTTGAATAC TCATACTCTT
        AATGAAAGTG GTCGCAAAGA CCCACTCGTT TTTGTCCTTC CGTTTTACGG CGTTTTTTCC CTTATTCCCG CTGTGCCTTT ACAACTTATG AGTATGAGAA
2901    CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGCGC
        GGAAAAAGTT ATAATAACTT CGTAAATAGT CCCAATAACA GAGTACTCGC CTATGTATAA ACTTACATAA ATCTTTTTAT TTGTTTATCC CCAAGGCGCG
3001    ACATTTCCCC GAAAAGTGCC AC
        TGTAAAGGGG CTTTTCACGG TG
```

ภาพที่ 9 แสดงลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน PIS

ภาพที่ 10 ภาพแสดงต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเตรียมไว้ใช้ในการถ่ายฝากยีน

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

1. ชุดยีน PIS construct ที่ได้จากการวิจัยนี้ ได้มาจากการออกแบบไพรเมอร์ที่ด้านปลาย 5’ และ 3’ และจากการสังเคราะห์ยีน ทำให้ประหยัดเวลาในการโคลนนิ่งและตรวจสอบทิศทางของยีน ทำให้ความถูกต้องและความแม่นยำในทิศทางของยีนในเวคเตอร์สูงขึ้น
2. คอนส์ตรักส์ของยีน PIS ที่ได้ มีจำนวน 2 คอนส์ตรักส์ ได้แก่ ยีน PIS1 และ ยีน PIS2 ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการออกแบบและสังเคราะห์ยีนที่มีความสำคัญทางการเกษตรอื่นๆต่อไปได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

งานวิจัยนี้ เป็นการสร้างคอนส์ตรักส์ของยีน PIS ซึ่งเป็นยีนทนแล้งในพืช เข้าสู่เวคเตอร์ โดยวิธีการสังเคราะห์ยีน ทำให้ประหยัดเวลาในการโคลนนิ่งและการคัดเลือกโคลน งานต่อไปคือการออกแบบยีน PIS หรือยีนทางการเกษตรอื่นๆจากพืชใหม่ๆ เพื่อหาหน้าที่ของยีนและทดสอบการถ่ายฝากเข้าสู่เพื่อพัฒนาพืชทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อไป อีกทั้งสามารถถ่ายทอด หรือเผยแพร่เป็นผลงานทางวิชาการ ให้แก่กลุ่มเป้าหมายที่เป็นนักวิชาการด้านโมเลกุลชีววิทยาด้านพืช และนักปรับปรุงพันธุ์ได้ รวมทั้ง ผลงานที่ได้จากการวิจัย สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับยีนที่มีลักษณะสำคัญทางการเกษตรอื่นๆ ได้ โดยวิธีเดียวกันนี้

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณวิภาวรรณ วงศ์สุทธิ์ ที่ช่วยงานวิจัยในครั้งนี้

12. เอกสารอ้างอิง :

Hezky, L. 2008. Challenges of Plant Breeding early in 21th century. Hungarian Agricultural Research. 4 Pages.

Levitt, 1980. Responses of plants to environment stresses. Academic Press. Vol 2. : 607 pages.

Liu, X., Zhai, H., Zhao, Y., Sun, B., Liu, C., Yang, A., and Zhang, J. 2013.

Overexpression of the phosphatidylinositol synthase gene (*ZmPIS*) conferring drought stress tolerance by altering membrane lipid composition and increasing ABA synthesis in maize. Plant Cell and Environment. 36(5): 1037-1055.

Sun Q, Kong D, Miao C, Duan Q, Yang T, Ye A, Di Z, Gong W. 2014**.** Variations in global temperature and precipitation for the period of 1948 to 2010. Environ Monit Assess. May 16. [Epub ahead of print].

Zhai, S.M., Gao, Q., Xue, H.W., Sui, Z.H, Yue, G.D, Yang, A.F., and Zhang, J.R. 2012. Overexpression of the phosphatidylinositol synthase gene from *Zea mays* in tobacco plants alters the membrane lipids composition and improves drought stress tolerance. Planta; 235(1):69-84.