การศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน ammonium transporter (*AMT2*) และ inorganic phosphate transporter (*PT1*) จากมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80

Preliminary Study on Characterization of Partial Ammonium Transporter (*AMT2*) and Inorganic Phosphate Transporter (*PT1*) Genes from Cassava (cv. HB80)

ธนวรรธห์ บำรุงเศรษฐพงษ์[1,2] วิจารณ์ วิชชุกิจ[3] และสุตเขตต์ นาคะเสถียร[1,3*]

Tanawat Bamrungsetthapong[1,2], Vichan Vichukit[3] and Sutkhet Nakasathien[1,3*]

Abstract

Ammonium transporter gene (*AMT*) and inorganic phosphate transporter gene (*PT*) are known to involve in controlling the major steps of nitrogen and phosphorous uptake affecting on growth and development of plants. In this study, *AMT2* and *PT1* cDNA of cassava (*Manihot esculenta* Crantz var. HB80) were isolated from developing cassava roots obtained under tissue culture condition. The partial *MeAMT2* and *MePT1* cDNA comprised 730 and 763 bp in length, and showed 65-77% and 71-74% identity with other plant species, respectively. The phylogenetic tree analysis of these partial *AMT2* and *PT1* genes can be divided into clusters and amino acid sequences were highly homologous with those from other plant species.

Keywords: Nutrients uptake, ammonium transporter, inorganic phosphate transporter, cassava

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

Center for Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Thailand

[3] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ 10900

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

รับเรื่อง: มีนาคม 2553

* Corresponding author: agrskn@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การเคลื่อนย้ายธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัส เป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโตของมันสำปะหลัง โดยการเคลื่อนย้ายธาตุดังกล่าวจะถูกควบคุมด้วยยีน ammonium transporter(*AMT2*) และยีน inorganic phosphate transporter(*PT1*) ตามลำดับ ในการทดลองนี้เป็นการศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของยีน ammonium transporter (*AMT2*) และ inorganic phosphate transporter(*PT1*) ซึ่งเกี่ยวข้องในกระบวนการเคลื่อนย้ายธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ผลจากการศึกษาสามารถโคลน ช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *AMT2* และยีน *PT1* ที่มีขนาด 730 และ 763 คู่เบสได้ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *AMT2* และ *PT1* มีความคล้ายคลึงกับมันฝรั่ง ถั่วฝักยาว มะเขือเทศ ยาสูบ พริก ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และ *Arabidopsis* อยู่ถึง 65-77% และ 71-74% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *AMT2* และ *PT1* จากมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 กับพืชชนิดอื่นๆ รวมถึง phylogenetic tree สามารถจัดกลุ่มยีน *AMT2* และ *PT1* ได้ตามความใกล้เคียงของพืชชนิดนั้นๆ

คำนำ

ขบวนการดูดธาตุอาหารของพืช เป็นขบวนการเคลื่อนย้ายธาตุอาหารไปยังบริเวณรากพืช จัดว่าเป็นขั้นตอนแรก การเคลื่อนย้ายธาตุอาหารไปยังรากพืชจะเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของธาตุอาหารในสารละลายดิน คุณสมบัติของธาตุอาหารความชื้นในดินและความสามารถในการดูดธาตุอาหารของรากพืช ความเข้มข้นของธาตุอาหารในสารละลายบริเวณที่ติดอยู่กับรากพืช เป็นตัวชี้วัดที่ดีที่สุด ที่จะบอกถึงความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารที่รากพืชจะสามารถดูดไปใช้ได้ แม้ว่าอาจมีปัจจัยอื่น ๆ เช่น ปัจจัยภายในพืชเอง และปัจจัยเกี่ยวกับความเข้มข้นของธาตุอาหารตัวอื่นๆ ในสารละลายในดิน อาจจะมีผลต่ออัตราการดูดธาตุอาหาร (Russell, 1977) และหลังจากรากพืชดูดธาตุอาหารเข้าไปแล้ว ธาตุอาหารจะถูกเคลื่อนย้ายส่งไปยังส่วนต่างๆของพืชเพื่อใช้ในขบวนการเมตาโบลิซึม (metabolism)ต่างๆ สำหรับการดูดธาตุอาหารในมันสำปะหลังก็เช่นเดียวกับพืชทั่วไป โดยที่ธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัสนั้น มีบทบาทสำคัญยิ่งต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของมันสำปะหลัง กล่าวคือ ไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญ เกี่ยวข้องกับการเสริมสร้างส่วนที่เจริญเติบโต ถ้าพืชขาดจะแสดงอาการแคระแกรน แต่ถ้ามากไปพืชจะแสดงอาการต้น ใบ มีสีเขียวเข้ม ขนาดใหญ่ เก็บเกี่ยวได้ช้ากว่าปกติและมักหักล้มง่ายซึ่งรูปที่เป็นประโยชน์ซึ่งพืชดูดไปใช้ได้มีอยู่ 3 อย่างคือไนเตรตไอออน แอมโมเนียมไอออน และยูเรีย(Mengel and Kirkby, 2001) โดยไนเตรตไอออน เป็นรูปที่พืชมักดูดไปใช้ในการเจริญเติบโต โดยยีนที่มีบทบาทต่อการดูดซึมธาตุคือ nitrate transporter (*NRT*) และ ammonium transporter (*AMT*) (Buchanan et al., 2000) สำหรับฟอสฟอรัสบทบาทสำคัญต่อการสังเคราะห์แสงสร้างแป้งและน้ำตาล ถ้าพืชขาดส่งผลต่อการไม่เจริญของราก ต้นเตี้ย โดยรูปที่พืชสามารถดูดและนำไปใช้ประโยชน์ง่ายสุดคือรูปแอนไอออน โดยที่ phosphate transporter ก็เป็นกลุ่มยีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการดูดซึมธาตุ โดยยีนที่มักสนใจมากคือ *LePT1* และ *LePT2* (Buchanan *et al*., 2000) ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกมากในส่วนรากของพืช

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ เป็นรายงานเบื้องต้นเกี่ยวกับช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *AMT2* และยีน *PT1* ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเคลื่อนย้ายธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ตามลำดับ

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพาะเลี้ยงมันสำปะหลัง

ปลูกมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 โดยใช้ส่วนตาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชไร่ ภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

เก็บตัวอย่างใบและรากมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 ที่อายุ 1 เดือนหลังการ subculture เพื่อใช้ในการสกัด

อาร์เอ็นเอ โดยแช่ไว้ในไนโตรเจนเหลวทันที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °ซ จนกว่าจะทดลองขั้นต่อไป

การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากตัวอย่างพืช

สกัดอาร์เอ็นเอรวมจากตัวอย่างพืช 1.0 กรัม จากใบและรากมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 ที่อายุ 1 เดือนหลังการ subculture โดยใช้วิธีของ Salzman *et al*. (1999) จากนั้นนำอาร์เอ็นเอมาตรวจสอบความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอทั้งหมดโดยใช้ Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

การออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์ โดยนำลำดับเบสของยีน *PT1* และ *AMT2* จากพืชชนิดต่างๆ *เช่น Lycopersicon esculentum LePT1* (AF022873), *Solanum tuberosum PT1* (X98890), *Lotus japonicus AMT2* (AF187962) และ *Arabidopsis thaliana AtAMT2* (AF182039) ในฐานข้อมูลลำดับเบสของ GeneBank มาเทียบเรียงเพื่อหาช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีนทั้งสองโดยใช้โปรแกรม ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html) จากนั้นจึงทำการออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม FastPCR (http://primerdigital.com/fastpcr.html)

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอด้วยวิธีอาร์ทีพีซีอาร์ (RT-PCR)

นำอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้มาเป็นต้นแบบ ในการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ด้วย RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (บริษัท Fermentas) โดยเติม Oligo(dT)$_{18}$ ไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.5 µg/µl จำนวน 1 µl, อาร์เอ็นเอ 0.1 pg-5 µg และ DEPC-treated water จนครบ 12 µl จากนั้นผสมแล้วนำไป incubate ที่ 70 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เมื่อเสร็จแล้วนำมาแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นก็เติม 5X Reaction buffer 4 µl, RiboLock™ Ribonuclease inhibitor (20u/µl) จำนวน 1 µl และ 10mM dNTP mix จำนวน 2 µl จากนั้นผสมแล้วนำไป incubate ที่ 37 °ซ เป็นเวลา 5 นาทีหลังเสร็จแล้วเติมเอนไซม์ RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200u/µl) 1 µl ปริมาตรรวม 20 µl จากนั้นนำไป incubate ที่ 42 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและหยุดปฏิกิริยาที่ 70 °ซ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำ cDNA ที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งแบ่งเป็น 3 ช่วง คือ ช่วงที่ 1 ใช้อุณหภูมิ 94 °ซ เป็นเวลา 5 นาที ช่วงที่ 2 มี 40 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย denaturing ที่อุณหภูมิ 95 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที; annealing ที่อุณหภูมิ 58 °ซ เป็นเวลา 1 นาที; polymerizing ที่อุณหภูมิ 72°ซ เป็นเวลา 1 นาที และช่วงที่ 3 ใช้อุณหภูมิ 72 °ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจะตรวจสอบช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *PT1* และ *AMT2* ที่ได้จากการทำ PCR โดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีสใน 1% อะกาโรสเจล ใน TAE buffer

การโคลนช่วงอนุรักษ์ของยีน *PT1* และ *AMT2*

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ RT-PCR มาสกัดให้ได้เฉพาะช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *PT1* และ *AMT2* ที่ขนาดประมาณ 763 และ 730 คู่เบส ตามลำดับ โดยใช้ PCR clean up kit (Geneaid) เพื่อกำจัดนิวคลีโอไทด์ขนาดเล็กที่ไม่ต้องการ โปรตีน และเกลือออก จากนั้นนำช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *PT1* และ *AMT2* มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM-T Easy Vector System (บริษัท Promega) และถ่ายยีนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี heat shock แล้วจึงคัดเลือกโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่มี ampicilin 100 ug/ml สกัดพลาสมิดโดยใช้ High-speed plasmid mini kit (Geneaid) ซึ่งจะส่งตัวอย่างพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกไว้ไปส่งวิเคราะห์เพื่อหาลำดับเบสของช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *PT1* และ *AMT2* โดยบริษัท 1st_BASE ประเทศมาเลเซีย

การวิเคราะห์สายลำดับเบส

นำลำดับเบสของช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *PT1* และ *AMT2* ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับยีนในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BlastN (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) และใช้

โปรแกรม GeneDoc (Nicholas and Nicholas, 1997) ในการเทียบเรียงลำดับเบสช่วงอนุรักษ์ของยีน *PT1* และ *AMT2* ของมันสำปะหลังพันธุ์ ห้วยบง 80 กับพืชชนิดอื่นๆ

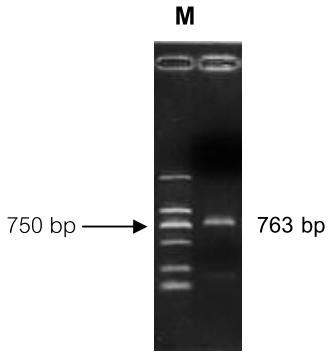
ใช้โปรแกรม MEGA4 (Tamura *et al*., 2007) ในการสร้าง phylogenetic tree ของยีน *PT1* และ *AMT2* โดยใช้วิธี Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) และทดสอบความเชื่อมั่นของ phylogenetic tree ด้วยวิธีทดสอบ bootstrap ทั้งหมด 1000 ครั้ง

ผลและวิจารณ์

1. การโคลนและวิเคราะห์สายลำดับเบสของช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *PT1*

จากการทดลอง พบว่า ช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *PT1* ที่สังเคราะห์ได้จาก RT-PCR มีขนาดประมาณ 760 bp (Figure 1) และเมื่อส่งตัวอย่าง plasmid DNA ไปวิเคราะห์เพื่อหาลำดับเบสของ partial ยีน *PT1* ที่โคลนได้จากรากมันสำปะหลังพันธุ์ ห้วยบง 80 พบว่ามีขนาด 763 คู่เบส (Figure 2) ซึ่งส่วน complete coding sequences ของยีน *PT1* ในพืชชนิดต่างๆ ที่มีรายงานใน GeneBank นั้นจะมีขนาด ประมาณ 1,812 คู่เบส แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ 540 เรสซิดิว โดยช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *PT1* ที่โคลนได้จากรากมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 นั้นอยู่บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 343-1,108 เมื่อเปรียบเทียบกับ complete coding sequences ของยีน *PT1* ของมันฝรั่ง (X98890) ใน GeneBank

เมื่อนำลำดับเบสช่วงอนุรักษ์ของยีน *PT1* มาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับยีนในฐานข้อมูล Gene Bank โดยใช้โปรแกรม BlastN พบว่า ช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *PT1* มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับพืชชนิดอื่น ๆ เช่น *Lycopersicon esculentum* (AF022873) 74%, *Solanum tuberosum* (X98890) 74%, *Phaseolus vulgaris* (EF472461) 73%, *Capsicum frutescens* (EF091663) 73% และ *Arabidopsis thaliana* (AK226783) 71% ตามลำดับ (Table1)



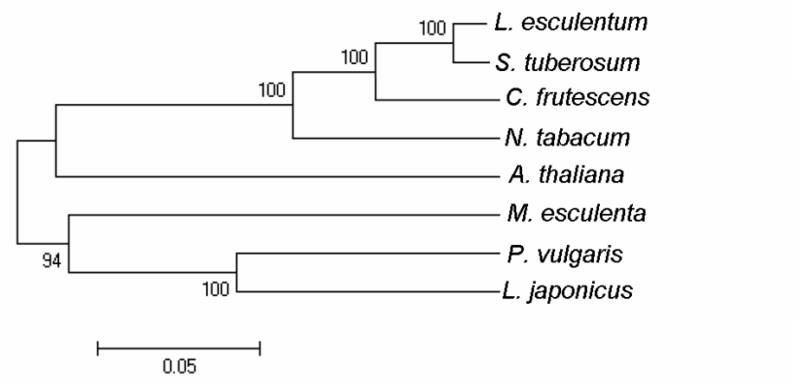
ภาพที่ 1 partial ยีน *PT1* ที่สังเคราะห์โดยวิธี RT-PCR จากใบมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80

```
   1 GCTGGACAGTTGTTCTTCGGATGGCTTGGTGACAAATTAGGCAGGAAAAAAGTGTATGGA
     A  G  Q  L  F  F  G  W  L  G  D  K  L  G  R  K  K  V  Y  G
  61 ATGACCCTCATGCTTATGGTGGTCTGTTCTGTTGCCTCAGGACTTTCGTTTGGACATTCT
     M  T  L  M  L  M  V  V  C  S  V  A  S  G  L  S  F  G  H  S
 121 GCAAAGGGTGTTATAGCCACACTTTGTTTCTTCAGATTTTGGCTTGGTTTTGGCATTGGA
     A  K  G  V  I  A  T  L  C  F  F  R  F  W  L  G  F  G  I  G
 181 GGTGACTACCCTCTCTCTGCAACAATCATGTCTGAATATGCTAATAAAAAGACTCGTGGG
     G  D  Y  P  L  S  A  T  I  M  S  E  Y  A  N  K  K  T  R  G
 241 GCATTTATCGCCGCAGTGTTTGCAATGCAAGGATTTGGGATTCTAGCTGGTGGGATCGTT
     A  F  I  A  A  V  F  A  M  Q  G  F  G  I  L  A  G  G  I  V
 301 GCTCTGATTGTGTCGGCTTCCTTTGATCATGCCTACAGTGCCCCTACTTATGAAGTTGAT
     A  L  I  V  S  A  S  F  D  H  A  Y  S  A  P  T  Y  E  V  D
 361 CCGTTAGGCTCAACAGTGCCGGAAGCAGACTATATTTGGCGAATCATTTTGATGTTTGGA
     P  L  G  S  T  V  P  E  A  D  Y  I  W  R  I  I  L  M  F  G
 421 GCCGTACCAGCAGCTATGACTTACTACTGGCGAATGAAGATGCCTGAGACAGCTCGTTAC
     A  V  P  A  A  M  T  Y  Y  W  R  M  K  M  P  E  T  A  R  Y
 481 ACAGCTCTGGTTGCGAAGAACGCTAAGCAAGCAGCTTCAGACATGTCTAGAGTACTGCAG
     T  A  L  V  A  K  N  A  K  Q  A  A  S  D  M  S  R  V  L  Q
 541 GTTGAGCTTGAAGCAGAAGAGCACAAGATAGAGCAGATATCTCAGGACCCATCCAATTCA
     V  E  L  E  A  E  E  H  K  I  E  Q  I  S  Q  D  P  S  N  S
 601 TTTGGACTTTTTAGTAAGGAATTTGCTCGCAGACATGGGGTTCACTTGCTTGGAACCACC
     F  G  L  F  S  K  E  F  A  R  R  H  G  V  H  L  L  G  T  T
 661 GTGTGCTGGTTCTTACTAGACATAGCTTATTACAGTTCAAATCTTTTCCAGAAGGATATC
     V  C  W  F  L  L  D  I  A  Y  Y  S  S  N  L  F  Q  K  D  I
 721 TTTAGCGCAATCGGTTGGATTCCACCAGCACAAACCATGAAC
     F  S  A  I  G  W  I  P  P  A  Q  T  M  N
```

ภาพที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ partial ยีน *PT1* จากมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 ขนาด 763 คู่เบส

ตารางที่ 1 แสดง % ระดับนิวคลีโอไทด์ ของ partial ยีน *PT1* จากใบมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 กับพืชชนิดอื่นๆ

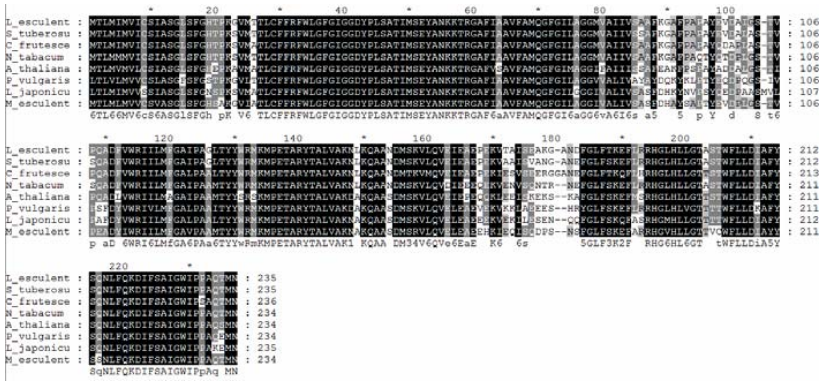
ชนิดพืช	% Identity ที่ระดับ นิวคลีโอไทด์
Manihot esculenta (partial *PT1* cDNA)	100
Lotus japonicus (AB257212)	74
Solanum tuberosum (X98890)	74
Lycopersicon esculentum (AF022873)	74
Phaseolus vulgaris (EF472461)	73
Nicotina tabacum (AF156696)	73
Capsicum frutescens (EF091663)	73
Arabidopsis thaliana (AK226783)	71



ภาพที่ 3 Phylogenetic tree แสดงระดับความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของ partial ยีน *PT1* จากมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 กับยีน *PT1* ในพืชชนิดอื่นๆ

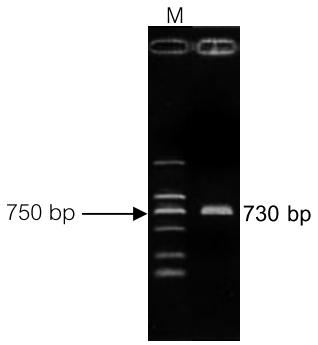
การศึกษาเชิงวิวัฒนาการของช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *PT1* โดยแสดงความสัมพันธ์ในรูปของ phylogenetic tree พบว่า phylogenetic tree ที่ได้นั้นแยกช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *PT1* ตามชนิดของพืช (Figure 3) โดยช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *PT1* จากมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 นั้นมีความใกล้เคียงกับ *Lotus japonicus* (AB257212) และ *Phaseolus vulgaris* (EF472461) มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับ % Identity ที่ระดับนิวคลีโอไทด์เช่นกัน ในขณะที่ยีน *PT1* ของ *Solanum tuberosum* (X98890), *Lycopersicon esculentum* (AF022873), *Capsicum frutescens* (EF091663), *Nicotina tabacum* (AF156696) และ *Arabidopsis thaliana* (AK226783) ก็มีความสัมพันธ์รองลงมา

จากผลการทดลองเปรียบเทียบช่วงลำดับอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโน *PT1* ของมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 กับกรดอะมิโน *PT1* ของพืชต่างๆ โดยใช้โปรแกรม GeneDoc แสดงให้เห็นบริเวณที่ conserve อยู่หลายตำแหน่ง ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการสังเคราะห์หา complete coding sequences ของยีน *PT1* ของมันสำปะหลังต่อไป



ภาพที่ 4 การวิเคราะห์ multiple alignments ระหว่าง partial ของลำดับกรดอะมิโน *PT1* ในมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 กับกรดอะมิโนของ *PT1* ในพืชดังต่อไปนี้ โดยแสดงคำย่อของแต่ละตัวอย่างดังนี้: *M. esculenta, L. esculentum, S. tuberosum, P. vulgaris, L. japonicus, N. tabacum, C. frutescens* และ *A. thaliana*.

2. การโคลนและวิเคราะห์สายลำดับเบสของช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *AMT2*



ภาพที่ 5 partial ยีน *AMT2* ที่สังเคราะห์โดยวิธี RT-PCR จากใบมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80

จากการทดลอง พบว่า ช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *AMT2* ที่สังเคราะห์ได้จาก RT-PCR มีขนาดประมาณ 750 bp (Figure 5) และเมื่อส่งตัวอย่าง plasmid DNA ไปวิเคราะห์เพื่อหาลำดับเบสช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *AMT2* ที่โคลนได้จากใบของมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 พบว่ามีขนาด 730 คู่เบส (Figure 6)

โดยการรายงานส่วนของ complete coding sequences ของยีน *AMT2* ใน *Lotus japonicus* (AF187962) มีขนาด 1,655 คู่เบส แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ 486 เรสซิดิว ซึ่งแตกต่างกับ ยีน *AMT2* ที่รายงานได้ใน *Arabidopsis thaliana* (AF182039), *Cryptomeria japocica* (AB211692) และ *Taxodium distichum* (AB211839) ซึ่งมีขนาด 1,658 1,467 และ 1,464 คู่เบส ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ายีน *AMT2* นั้นมีความหลากหลายในพืชต่างชนิดกัน จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิคลีโอไทด์ ช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *AMT2* ที่โคลนได้จากใบของมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 นั้นอยู่บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 666-1,397 เมื่อเปรียบเทียบกับ complete coding sequences ของยีน *AMT2* ของ *Lotus japonicus* (AF187962)

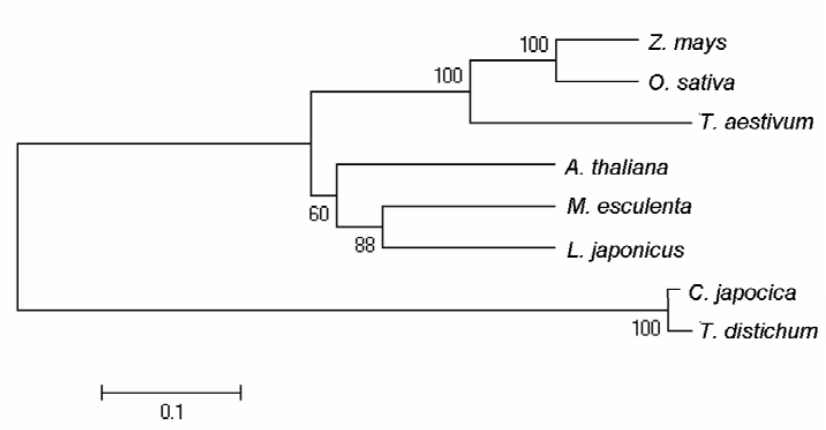
```
  1 GCTGCTTACTGGGTAGGACCAAGGCTAAAGAGCGATAGAGAAAGATTTCCTCCAAATAAC
    A  A  Y  W  V  G  P  R  L  K  S  D  R  E  R  F  P  P  N  N
 61 GTGTTGCTGATGCTTGCCGGTGCTGGGCTGCTGTGGATGGGCTGGTCTGGCTTCAACGGA
    V  L  L  M  L  A  G  A  G  L  L  W  M  G  W  S  G  F  N  G
121 GGAGCACCGTATGCAGCTAATCTAAATGCTTCGATTGCGATATTAAACACCAACATAAGT
    G  A  P  Y  A  A  N  L  N  A  S  I  A  I  L  N  T  N  I  S
181 GCAGCAACAAGCCTGCTTGTGTGGACGTCGCTGGATGTTGTGTTCTTTGGTAAACCATCA
    A  A  T  S  L  L  V  W  T  S  L  D  V  V  F  F  G  K  P  S
241 GTGATCGGGGCTGTTCAGGGTATGGTGACAGGACTAGCTTGCGTTACCCCAGGAGCAGGG
    V  I  G  A  V  Q  G  M  V  T  G  L  A  C  V  T  P  G  A  G
301 CTGGTTCAATCGTGGGCGGCTATTGTGATGGGAGCTCTTTCTGGAAGCATTCCATGGGTG
    L  V  Q  S  W  A  A  I  V  M  G  A  L  S  G  S  I  P  W  V
361 TCTATGATGGTGCTTCACAAAAAGTCTTCGCTGCTACAGCAGGTGGAACGACACACTAGG
    S  M  M  V  L  H  K  K  S  S  L  L  Q  Q  V  E  R  H  T  R
421 CGTGTTTCACACTCACGCGGTGGCTGGGCTATTAGGTGGCCTCCTCACAGGGCTTCTAGC
    R  V  S  H  S  R  G  G  W  A  I  R  W  P  P  H  R  A  S  S
481 AGAGCCAGATCTTTGCGACCTTATTCTACCGAAGAAAACACGAGGCGCATTTTACGGCGG
    R  A  R  S  L  R  P  Y  S  T  E  E  N  T  R  R  I  L  R  R
541 AAATGGTGGACGGCAATTCTTGAAGCAATTGGTTGCTGCTTGCTTTATTATAGTTTGGAA
    K  W  W  T  A  I  L  E  A  I  G  C  C  L  L  Y  Y  S  L  E
601 CATAGTCTCCACCACCATAATCCTTTTAGCTATAAGATTGTTCATACCCTTGAGAATGCC
    H  S  L  H  H  H  N  P  F  S  Y  K  I  V  H  T  L  E  N  A
661 GGAAGAGCAACTGGTAATCGGAGACGATGCCGTTCATGGAGAGGAAGCTTATGCTCTTTG
    G  R  A  T  G  N  R  R  R  C  R  S  W  R  G  S  L  C  S  L
721 GGGAGATGG
    G  R  W
```

ภาพที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ partial ยีน *AMT2* จากมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 ขนาด 730 คู่เบส

เมื่อนำลำดับเบสช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *AMT2* มาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับยีน ในฐานข้อมูล GeneBank โดยใช้โปรแกรม BlastN และใช้โปรแกรม GeneDoc ในการเทียบเรียงลำดับเบสช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *AMT2* ของมันสำปะหลังพันธุ์ ห้วยบง 80 กับพืชชนิดอื่นๆ พบว่า ช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *AMT2* มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับ *Lotus japonicus* (AF187962) 77%, *Cryptomeria japocica* (AB211692) 72%, *Taxodium distichum* (AB211839) 72%, *Arabidopsis thaliana* (AF182039) 71%, *Oryza sativa* (AB051864) 71%, *Zea mays* (EU956588) 69% และ *Triticum aestivum* (AY428038) 65% (Table 2)

ตารางที่ 2 แสดง % ระดับนิวคลีโอไทด์ ของ partial ยีน *AMT2* จากใบมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 กับพืชชนิดอื่นๆ

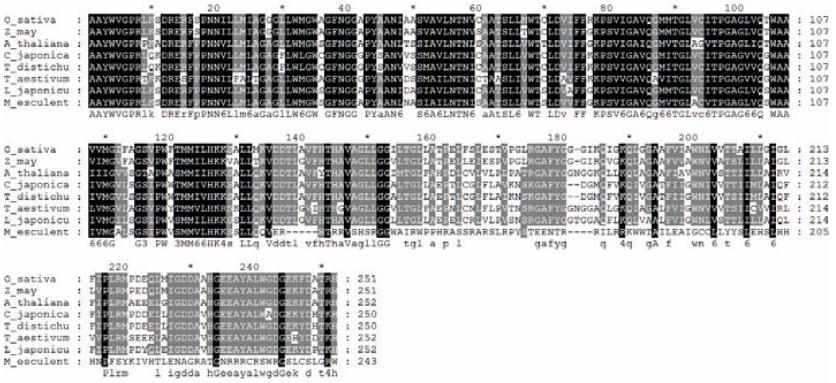
ชนิดพืช	% Identity ที่ระดับนิวคลีโอไทด์
Manihot esculenta (partial *AMT2* cDNA)	100
Lotus japonicus (AF187962)	77
Cryptomeria japocica (AB211692)	72
Taxodium distichum (AB211839)	72
Arabidopsis thaliana (AF182039)	71
Oryza sativa (AB051864)	71
Zea mays (EU956588)	69
Triticum aestivum (AY428038)	65



ภาพที่ 7 Phylogenetic tree แสดงระดับความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของ partial ยีน *AMT2* จากมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 กับยีน *AMT2* ในพืชชนิดอื่นๆ

การศึกษาเชิงวิวัฒนาการโดยแสดงความสัมพันธ์ในรูปของ phylogenetic tree ระหว่าง ช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *AMT2* ของมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 กับ ยีน *AMT2* ในพืชชนิดอื่นๆ ผลการทดลองพบว่า phylogenetic tree ที่ได้แบ่งยีนออกตามชนิดของพืช (Figure 7) โดยกลุ่มแรก *Oryza sativa* (AB051864), *Zea mays* (EU956588) และ *Triticum aestivum* (AY428038) อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ในขณะที่ *Manihot esculenta*, Arabidopsis thaliana (AF182039) และ *Lotus japonicus* (AF187962) ก็จัดอยู่อีกกลุ่มหนึ่ง ซึ่งความสัมพันธ์ในรูปของ phylogenetic tree และ %Identity ที่ระดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับอนุรักษ์ของยีน *AMT2* ของมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 ใกล้เคียงกับ *Lotus japonicus* (AF187962) มากที่สุด

จากผลการทดลองเปรียบเทียบลำดับอนุรักษ์ ของกรดอะมิโน *AMT2* ของมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 กับกรดอะมิโน AMT2 ของพืชต่างๆ แสดงให้เห็นบริเวณที่ conserve อยู่หลายตำแหน่ง แสดงว่ามีความสัมพันธ์ของยีนดังกล่าวระหว่างมันสำปะหลังกับพืชชนิดอื่นๆ โดยจากส่วนลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันนั้น สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการหา complete coding sequences ของยีน *AMT2* ของมันสำปะหลังต่อไปได้ สำหรับในส่วนลำดับกรดอะมิโนที่ต่างกันนั้น สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในแง่ของการศึกษาวิวัฒนาการในระหว่างพันธุ์ของมันสำปะหลังต่างๆรวมถึงเปรียบเทียบกับพืชต่างชนิดกันก็ได้



ภาพที่ 8 การวิเคราะห์ multiple alignments ระหว่าง partial ของลำดับกรดอะมิโน AMT2 ในมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 กับกรดอะมิโนของ *AMT2* ในพืชดังต่อไปนี้ โดยแสดงคำย่อของแต่ละตัวอย่างดังนี้: *M. esculenta, L. japonicus, C. japocica, T. distichum, A. thaliana, O. sativa, Z. mays* และ *T. aestivum*

สรุป

การทดลองครั้งนี้สามารถเพิ่มปริมาณ และโคลนยีน ช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *PT1* และ *AMT2* ได้สำเร็จ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *PT1* และ *AMT2* ที่โคลนได้จากมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 มีขนาด 763 และ 730 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *PT1* ของ *Lotus japonicus* (AB257212) และยีน *AMT2* ของ *Lotus japonicus* (AF187962) ที่รายงานอยู่ในฐานข้อมูล GeneBank ตามลำดับ และผลจากการสร้าง phylogenetic tree ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *PT1* และ *AMT2* แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของทั้งสองยีน โดยช่วงลำดับอนุรักษ์ของยีน *PT1* และยีน *AMT2* สามารถจัดกลุ่มได้ตามชนิดของพืช ดังนั้น ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้จัดเป็นข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยาโมเลกุลของยีน *PT1* และ *AMT2* ในมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 และสามารถจะไปใช้ในการสังเคราะห์ complete coding sequences มันสำปะหลัง โดยใช้วิธี 3'RACE และ 5'RACE ต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับงบสนับสนุนส่วนหนึ่งจาก (1) ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี (สบว) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ(2) ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน(3) ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชไร่ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

เอกสารอ้างอิง

Buchanan, B.B., W. Gruissem and R.L. Jones. 2000. Biochemistry & Molecular Biology of plants. American Society of Plant Physiologists Rockville, Maryland.

Mengel, K. and Kirkby, E.A. 2001. Principles of Plant Nutrition. 5th ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Nicholas, K. B. and Nicholas, H. B. Jr. 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiples alignments.Distributed by the author.

Russell, R. S. 1977. The soil environment, pp. 143 – 168. *In* Plant root systems. McGraw Hill, London.

Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology Evolution. 4: 406-425.

Salzman, R.A., T. Fujita, K. Zhu-Salzman, P.M. Hasegawa and R.A. Bressan. 1999. An improved RNA isolation method for plant tissue containing high level of phenolic compounds or carbohydrates.Plant Molecular Biology.17:11-17.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology Evolution. 24: 1596-1599.