การโคลนบางส่วนของยีน*APETALA1 (AP1)* ในอ้อยและการทำนายเชิงหน้าที่ของยีนโดยวิธี *in siligo*

Partial Cloning and I*nsiligo*OntologyAnnotation of*APETALA1* (*AP1*) Transcription Factor in Sugarcane

ปัทมา ศรีน้ำเงิน[1,2,3] นงลักษณ์ เทียนเสรี[1,4] และสนธิชัย จันทร์เปรม[1,2,4,5*]

Pattama Srinamngoen[1,2,3] Nongluk Teinseree[1,4] and Sontichai Chanprame[1,2,4,5*]

Abstract

Flowering is an important process for both propagation and improvement of the plants. However, in some plant species, especially sugarcane, flowering is considered as a disadvantage trait. Because when sugarcane makes a transition from vegetative to reproductive stage, the sucrose content will decrease. The development of specific marker to assist selection of non-flowering or delay flowering is very crucial for sugarcane breeding program. In this study, partial of *APETALA 1*(*AP1*) was cloned from early flowering wild sugarcane using PCR technique. It was 397 bp and encodes for protein of 129 amino acid residues.This partial gene had high homology with *ZAP1* gene of *Zea mays* at 96%. The *in siligo* ontology annotation showed highly activities with *AP1* gene in biological process. The phylogram was used to study the genetic distance between partial *AP1* cloned gene and Grass species. The tree of genetic relationship showed that the region was shared at 78.62-96.64% and also conserved in many plant species.This partial *AP1*gene can be used as a molecular marker to assist in selection of the flowering related trait in sugarcane.

Keywords: sugarcane, *APETALA I*, flowering, *in siligo*

[1]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, NakhonPathom.73140

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

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

[3] คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี จ.จันทบุรี 22170

Faculty of Science and Arts, Burapha University, Chanthaburi Campus, Chanthaburi. 22170

[4] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at KamphaengSaen, Kasetsart University, NakhonPathom. 73140

[5]ศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Center for Advanced Studies forAgriculture and Food, Kasetsart University, Bangkok 10900

รับเรื่อง : กรกฎาคม 2557

*Corresponding auther: agrstc@ku.ac.th

บทคัดย่อ

กระบวนการออกดอกในพืชนั้น นับเป็นกระบวนการที่สำคัญในการขยายพันธุ์ หรือการปรับปรุงพันธุ์พืช แต่ในพืชบางชนิดโดยเฉพาะอ้อย การออกดอกนับเป็นลักษณะไม่ดีที่เกษตรกรไม่ต้องการ เนื่องจากจะทำให้ปริมาณน้ำตาลสะสมของอ้อยลดต่ำลง การพัฒนา specific marker เพื่อช่วยในการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงพันธุ์อ้อย โดยเฉพาะลักษณะไม่ออกดอก หรือออกดอกช้านับว่ามีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ในการทดลองนี้ ได้โคลนบางส่วนของยีน *APETALA1 (AP1)* จากอ้อยป่าสายพันธุ์ออกดอกเร็วด้วยเทคนิค PCR พบว่า ได้บางส่วนของยีน *AP1* ที่มีขนาด 397 คู่เบสหรือ 129 กรดอะมิโน โดยมีความเหมือนกับยีน *ZAP1* ที่เกี่ยวข้องกับการออกดอกในข้าวโพดที่ 96 เปอร์เซ็นต์สอดคล้องกับผลการทำนายเชิงหน้าที่โดยวิธี *in siligo* เพื่อทำนายหน้าที่ในกระบวนการทางชีวภาพ และเมื่อวิเคราะห์ Phylogram เพื่อหาความสัมพันธ์หรือระยะห่างทางพันธุกรรมของบางส่วนของยีน *AP1* ที่โคลนได้กับยีนในพืชตระกูลหญ้า พบว่ามีความสัมพันธ์กันที่ระดับ 78.62-96.64 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังปรากฏเป็นบริเวณอนุรักษ์ในพืชดอกทั่ว ๆ ไปอีกด้วย ดังนั้น บางส่วนของยีน *AP1* ที่โคลนได้จึงสามารถนำมาประยุกต์เป็นเครื่องหมายโมเลกุล เพื่อช่วยในการคัดเลือกในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์อ้อยในลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการออกดอกได้ในอนาคต

คำนำ

MADS-box motif จัดเป็นบริเวณอนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตชนิดยูคาริโอต มีขนาด 56 กรดอะมิโน และถูกใช้เป็นบริเวณ DNA-binding domain ของ transcription factor หลายชนิดหน้าที่ที่สำคัญอย่างหนึ่งของ MADS-box protein ในพืชคือ การควบคุมการพัฒนาการเกิดเป็นดอกโดยการทำงานร่วมกันของยีน หรือ transcription factor มากกว่า 20 ชนิด เช่น *APETALA1-3 (AP1-3)*, *AGAMOUS (AG)*, *AGAMOUS-like 1-9 (AGL1-6)* และ *PISTILLATA (PI)* (Shore and Sharrocks, 1995)

กระบวนการออกดอกของพืชเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับทั้งสภาพแวดล้อม และการแสดงออกของยีนหลายชนิด ได้มีการศึกษากลไกที่สำคัญในการออกดอกใน *Arabidopsis* โดยพบว่า ยีน *AP1* จะทำงานร่วมกับยีน *LEAFY (LFY)* โดยยีน *LFY* จะสร้างโปรตีนเพื่อมากระตุ้นให้ยีน *AP1* ทำงาน เพื่อกำหนดให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อเจริญไปเป็นตาดอก และพัฒนาไปเป็นดอกที่สมบูรณ์ ดังนั้นยีน *AP1* จึงมีบทบาทที่สำคัญเป็นอย่างมากต่อลักษณะการออกดอกเร็ว (early flowering) ในพืชหลายชนิด (Mendel *et al*., 1992; Gustafson-Brown *et al*., 1994; Wagner *et al*., 1999)ในขณะที่พืชบางชนิดที่ต้องอาศัยอุณหภูมิเย็นเป็นตัวกระตุ้นเพื่อให้เกิดการออกดอกหรือ vernalization เช่น อ้อย ข้าวฟ่าง และในข้าวสาลีชนิด winter wheat นั้นพบว่า ขบวนการ vernalization ถูกควบคุมโดยยีน *VRN1* ซึ่งเชื่อมโยงอย่างใกล้ชิดกับยีน *AP1* และ *AGLG1* โดยมีระยะห่างเพียง 0.03cM และจากการศึกษาทาง positional cloning ที่บริเวณเนื้อเยื่อเจริญหรือ shoot apex และบริเวณใบ พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *AP1* จะถูกควบคุมโดยขบวนการ vernalization และระดับการแสดงออกของยีน *AP1* จะเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นของการเข้าสู่ระยะการพัฒนาเป็นดอกที่สมบูรณ์ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่ายีน *AP1* ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาตาดอกและการเจริญของดอกถูกควบคุมด้วยยีน *VRN1* หรือขบวนการ vernalization (Yan *et al*., 2003)

อ้อยจัดเป็นพืช polyploidy และมีพันธุกรรมไม่คงตัว ด้วยเหตุที่อ้อยจัดเป็นพืชที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจของประเทศ เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาล และเอทานอล แต่ปัญหาอย่างหนึ่งของการปลูกอ้อยคือ การที่อ้อยเข้าสู่ระยะออกดอกก่อนที่จะถูกตัดเข้าสู่โรงงาน การออกดอกของอ้อย จัดเป็นลักษณะที่เกษตรกรไม่ต้องการ เนื่องจากเมื่ออ้อยเข้าสู่ระยะออกดอกแล้ว จะทำให้ปริมาณน้ำตาลในลำต้นอ้อยลดลงทันทีอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นการศึกษาครั้งจึงนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีน *AP1* จากอ้อยป่าซึ่งมีลักษณะการออกดอกเร็ว เพื่อมุ่งศึกษากลไก

การออกดอกในอ้อยโดยหวังเป็นอย่างยิ่งว่ายีนบางส่วนที่โคลนได้ หรือยีนที่สมบูรณ์ที่จะได้ในอนาคตจะเป็นประโยชน์ต่อโครงการปรับปรุงพันธุ์อ้อย โดยสามารถนำมาประยุกต์เพื่อการคัดเลือกลักษณะไม่ออกดอก หรือออกดอกช้าในอ้อยปลูกได้ในที่สุด

อุปกรณ์และวิธีการ

การสกัด total RNA

สกัด total RNA จากช่อดอกอ้อยป่า (*Saccharumspontaneum*) หมายเลขสายพันธุ์ 98-244 ที่ระยะความยาวช่อดอก 1 2 และ 3 เซนติเมตร และจาก shoot apex ของอ้อยป่าที่อายุ 4 เดือนเพื่อใช้เป็น external control ด้วยวิธี Pine Tree method (Chang*et al*. 1993)โดยการบดช่อดอกอ้อย 50-100 มิลลิกรัม ให้ละเอียด เติม extraction buffer (2 เปอร์เซ็นต์ CTAB [hexadecyltrimethylammonium bromide],2เปอร์เซ็นต์ PVP [polyvinylpyrrolidinone k30], 100 mMTris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA, 2.0 M NaCl และก่อนใช้ให้เติม 2 เปอร์เซ็นต์ β-mercaptoethanol) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นแยกโปรตีนที่เสียภาพออกจาก total RNA ด้วย chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ตกตะกอน total RNA ด้วย 8M LiCl ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2M บ่มไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายtotal RNA ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลาย SSTE (1 M NaCl, 0.5 เปอร์เซ็นต์ SDS, 10 mMTris-HCl pH 8.0 และ 1 mM EDTA pH 8.0)ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นเติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากันอย่างแรง ตกตะกอน total RNA ที่ได้ด้วย absolute ethanol และละลายตะกอน total RNA ที่ได้ด้วย nuclease free water ตรวจวัดคุณภาพและปริมาณของ total RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง NanoDrop 8000 UV-Vis spectrophotometer (Thermo scientific, USA) และการทำเจลอะกาโรส denatured electrophoresis เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ใน 1X NBC running buffer (20X NBC buffer ประกอบด้วย 1 M Boric acid, 20 mM Sodium citrate และ 100 mMNaOH, pH 7.5)

การสังเคราะห์ first strand cDNA

สังเคราะห์ first strand cDNA โดยการใช้ Superscript™ III First Strand Synthesis System kit (Cat.No: 18080-051, Invitrogen™) โดยนำ total RNA เข้มข้นประมาณ 400 นาโนกรัมผสมกับไพร์เมอร์ Oligo$(dT)_{20}$ เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ dNTPs เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มสารละลายปฏิกิริยาที่ได้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีและบ่มในน้ำแข็งนาน 1 นาทีจากนั้นเติมเอนไซม์ SuperSript™ RT เข้มข้น 200 unit ที่อยู่ในสารละลาย 10X RT buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร DTT เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ RNase OUT™ เข้มข้น 40 unit บ่มสารสะลายเพื่อสังเคราะห์สาย first strand cDNA ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที และหยุดการทำงานของเอนไซม์ทุกชนิดโดยการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำ first strand cDNA ที่ได้ไปวัดความเข้มข้นด้วย NanoDrop 8000 UV-Vis spectrophotometer (Thermo scientific, USA) และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้งานในขั้นตอนถัดไป

การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *AP1*

ออกแบบไพรเมอร์ชนิด degenerate ที่จำเพาะกับยีน *AP1* และยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการออกดอก ในMADS-box domain ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้คือ AP1-F 5’-AGCTSAAGCGGATMGAGAAC-3’ และ AP1-R 5’-TTATTCTCCTCCTGCAGTGAC-3’ โดย S หมายถึง G หรือ C และ M หมายถึง A หรือ C ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่จำเพาะกับยีน *AP1* ของพืชชนิดต่าง ๆ จำนวน 8 ชนิด ทั้งหมด 13 accession โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W (Thompson *et al.*,1994) ดังนี้ *Arabidopsis thaliana* ได้แก่ accession AF211171, U33473, AF116527, Z16421, L36925 *A. majus* ได้แก่ accession X63701 *Triticumaestivum* ได้แก่ accession AB007504, *T. monococcum* ได้แก่ accession

AY188331*Hordeumvulgare* ได้แก่ accession AJ249144, AJ249146 *Oryza sativa* ได้แก่ accession AB041020, *Zea mays* ได้แก่ accession L46400, *Sorghum bicolor*ได้แก่ accession U32110 โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จะให้ผลผลิตบางส่วนของยีน *AP1* ที่มีขนาด 397bp

การเพิ่มจำนวนบางส่วนของยีน*AP1*การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการทำนายเชิงหน้าที่

นำ first strand cDNA ของช่อดอกอ้อยที่ระยะต่าง ๆ ที่สังเคราะห์ได้มาใช้เป็นต้นแบบในการทำPCRและนำไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *AP1* ที่ออกแบบไว้ใช้เป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการเพิ่มปริมาณ cDNA ที่จำเพาะกับบางส่วนของยีน *AP1* โดยใช้เอนไซม์ *Taq*DNA polymerase (Invitrogen, #10342-020) ทำ PCR ที่สภาวะดังนี้ คือ pre-denatured ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย denatured ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตรวจผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยการทำเจลอะกาโรส electrophoresis เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCRที่มีขนาดที่ถูกต้องจะถูกสกัดออกมาจากเจล agarose จากนั้นสอดใส่ผลผลิต PCR ดังกล่าวซึ่งคาดว่าจะเป็นบางส่วนของยีน *AP1* เข้าสู่พลาสมิด pJET1.2/sticky-end (Thermo Scientific, #K1231) แล้ว transform เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α สุ่มเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่คาดว่าจะได้รับบางส่วนของยีน *AP1* มาสกัดพลาสมิด เพื่อส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท 1st BASE Pte Ltd (Singapore) แล้วจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาวิเคราะห์ความเหมือนของยีน *AP1* ผ่าน BlastX โดยมีค่า Expect Value ที่ 1.0E-3 และทำนายเชิงหน้าที่(annotation) โดยกำหนดค่า Expect Value Hit Filter ที่ 1.0E-6 ผ่านโปรแกรม Blast2Go® (Conesa*et al*., 2005) จากนั้นหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและบริเวณอนุรักษ์ในพืชตระกูลหญ้า ได้แก่ ข้าวฟ่าง (*SorghumBicolor*: Sbi) ข้าวโพด (*Zea mays*:Zma) foxtail millet (*Sefaria italic* : Sit) ข้าว (*Oryza sativa* : Ori) และ *Brachypodium distachyon*:Bdi ซึ่งอ้อยถูกจัดเป็นพืชในกลุ่มนี้เช่นกัน ผ่านโปรแกรม Phytozome V.9.1 (www.phytozome.org) และ Clustal Omega V.1.2.1 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)

ผลการทดลอง

การโคลนบางส่วนของยีน *AP1* ด้วยเทคนิค PCR

จากการโคลนบางส่วนของยีน *AP1* โดยการออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณอนุรักษ์ของยีน *AP1* ในพืชหลายชนิดและใช้ 1st stand cDNA เป็นแม่แบบโดยใช้เทคนิค PCR พบแถบ DNA2 แถบ ขนาด 397 คู่เบสและ 279 คู่เบสในทุกระยะความยาวของช่อดอกอ้อย โดยไม่พบใน external control (shoot apex ของอ้อยป่าอายุ 4 เดือน) ยกเว้น DNA ขนาด 279 คู่เบสที่พบใน external control ด้วย (ภาพที่ 1) เมื่อนำแถบ DNA ทั้ง 2 แถบมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้ววิเคราะห์ความเหมือน (alignment) ระหว่างแถบ DNA ทั้งสองด้วยโปรแกรม Clustal Omega พบว่า แถบ DNA ทั้งสองไม่ใช่ลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกัน จากนั้นจึงวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของแถบ DNA ที่โคลนได้กับยีนที่มีรายงานมาก่อนในฐานข้อมูล GenBank พบว่าแถบ DNA ขนาด 397 คู่เบสกำหนดการสร้าง 129 กรดอะมิโนมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันยีน *ZAP1* ในข้าวโพดและ MADS-box protein ในข้าวฟ่างถึง 96 เปอร์เซ็นต์ (accession no. DAA42679 และ AAB50181 ตามลำดับ) ดังนั้นจึงมีแนวโน้มว่าแถบ DNA ขนาด 397คู่เบสนี้ จะเป็นบางส่วนของยีน *AP1* ในอ้อย ในขณะที่แถบ DNA ขนาด 279 คู่เบสกำหนดการสร้าง 43 กรดอะมิโนไม่มีความเหมือนกับยีนชนิดใด ๆ

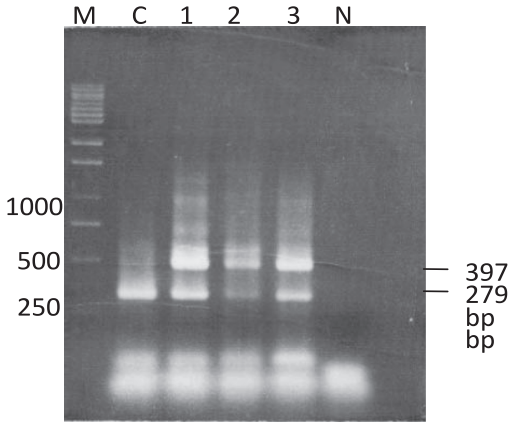
การทำนายเชิงหน้าที่

เมื่อทำนายหน้าที่ (annotation) บางส่วนของยีน *AP1*ที่โคลนได้นี้ พบว่า มีหน้าที่เชิงกระบวนการชีวภาพ (biological process) เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเนื้อเยื่อเจริญ (meristem development) การกำเนิดดอกหรือช่อดอก (maintenance of floral or inflorescences meristem

identity) และการพัฒนาดอกและผล (flower and fruit development) นอกจากนี้ยังพบว่าบางส่วนของยีน *AP1* นี้มีการทำนายเชิงหน้าที่ในด้านอื่น ๆ ที่สามารถเป็นไปได้ดังตารางที่ 1

การใช้บางส่วนของยีน *AP1* เพื่อศึกษาวิวัฒนาการและบริเวณอนุรักษ์

จากการศึกษาระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของยีน *AP1* ในพืชตระกูลหญ้า พบว่า บางส่วนของยีน *AP1* ที่โคลนได้มีความเหมือนกับกลุ่มยีนที่มีตำแหน่งบน MADS-box domain ที่เกี่ยวข้องกับการออกดอกในพืชตระกูลหญ้าที่ 96 เปอร์เซ็นต์ (*E-value* 3.2e-64) คือ มีความเหมือนกับ MADS-box transcription factor ที่ locus name Sb02g001090 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 2 ของข้าวฟ่าง locus name GRMZM2G 148693 และ GRMZM2G072582 ในข้าวโพด และ locus nameSi030802m LOC_Os07g01820 และ Bradig59250 ใน foxtail millet ข้าว และ *B. distachyon* ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ความเหมือนของกรดอะมิโนของบางส่วนของยีน *AP1* ที่โคลนได้ กับยีน *AP1* ในกลุ่มพืชตระกูลหญ้า พบว่ามีความเหมือนอยู่ระหว่าง 78.62-96.64 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2) จึงกล่าวได้ว่าบางส่วนของยีน *AP1* ที่โคลนได้เป็นบางส่วนของยีน *AP1* จริง สอดคล้องกับการวิเคราะห์ Phylogram เพื่อหาความใกล้ชิดทางพันธุกรรม หรือความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนในส่วนของยีน *AP1* ในพืชตัวอย่างหลายตระกูล เช่น Grass Asterids Brassicaceae และ Papilioideae พบว่า บางส่วนของยีน *AP1* ที่โคลนได้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับยีน *AP1* ของพืชทุกตระกูลที่ศึกษา จึงเป็นการบ่งชี้ได้ว่ายีน *AP1* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการออกดอก และมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ในพืชดอกทั่ว ๆ ไป (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 1แถบ DNA ที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ first strand cDNA จากช่อดอกของ *Saccharumspontaneum* ขนาด 1 2 และ 3 เซนติเมตร (lane หมายเลข 1 2 และ 3 ตามลำดับ) lane M; 1 kb DNA ladder (Thermo scientific, #SM0311),lane C; external control,และ lane N; negative control

วิจารณ์ผล

เนื่องจากการแสดงออกของยีน *AP1* เป็นกลไกลที่สำคัญต่อการออกดอกของพืช การศึกษาครั้งนี้ต้องการโคลนบางส่วนของยีนและทำนายหน้าที่การทำงานของยีน *AP1* ในอ้อยป่า เนื่องจากยีน *AP1* จะกำหนดการสร้าง transcription factor ใน MADS-box domain โดยจะพบการแสดงออกของยีน *AP1* ตั้งแต่ระยะที่เริ่มมีการพัฒนาของตาดอก ไปจนถึงระยะที่มีการกำหนดการสร้างกลีบเลี้ยงและกลีบดอก (Mendel *et al*., 1992)

เมื่อทำการโคลนบางส่วนของยีน *AP1* โดยใช้ไพรเมอร์แบบ degenerated พบว่าได้ DNA2 แถบขนาด 279 คู่เบสและ 397 คู่เบสแต่มีเพียง DNA ขนาด 397 คู่เบส หรือ 129 กรดอะมิโน ที่มีความเหมือนกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการออกดอกใน MADS-box domain ในพืชหลายชนิด เช่น *ZAP1* ที่พบในข้าวโพด เนื่องจากไพรเมอร์นี้ถูกออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ของยีน *AP1* ในพืชหลากหลายชนิด ในขณะที่แถบ DNA ขนาด 279 คู่เบส หรือ 43 กรดอะมิโน ไม่มีความเหมือนกับลำดับของกรดอะมิโนที่เกิดจากยีนชนิดใด ๆ ซึ่งอาจเกิดจากการเข้าจับหลายตำแหน่งหรือการจับคู่ผิดของไพรเมอร์ ชนิดที่เป็น degenerated ทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่จำเพาะมาด้วย (Linhart and Shamir, 2002) และการที่ไม่พบแถบ DNA ในอ้อยที่ใช้เป็นระยะควบคุม (external control) แสดงว่ายีน *AP1* ยังไม่มีการแสดงออก หรือกล่าวได้ว่าตาดอกของอ้อยป่ายังไม่เริ่มพัฒนาเมื่ออ้อยป่าอายุ 4 เดือน

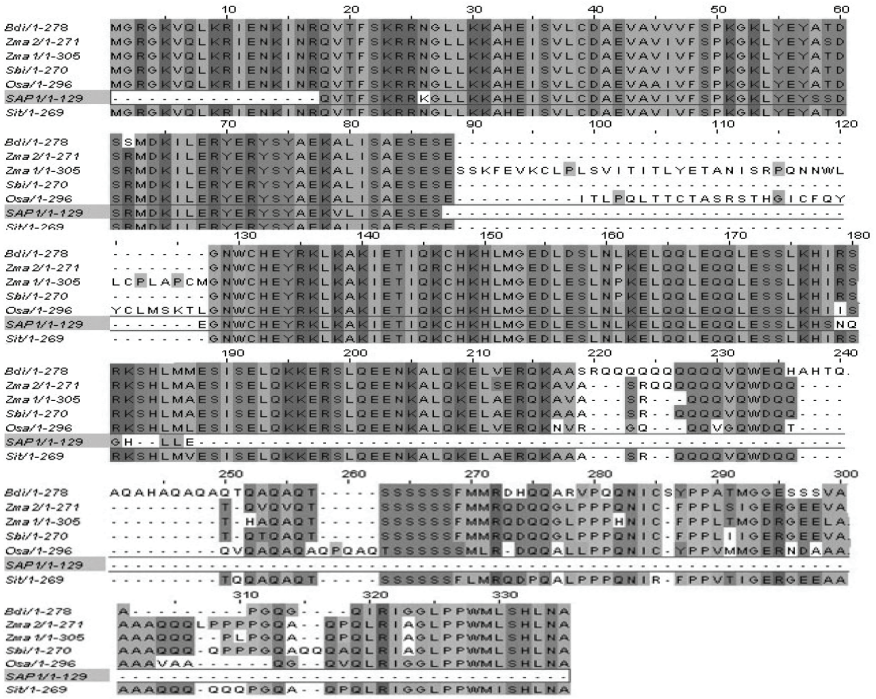
ตารางที่ 1 การทำนายเชิงหน้าที่ของบางส่วนของยีน *AP1* จาก *Saccharumspontaneum* หมายเลขสายพันธุ์ 98-244 โดยใช้โปรแกรม Blast2Go®

Gene OntologyTerm	Patents	Score*
Biological process		
Meristem development	Organ development, tissue development	1.25
Maintenance of floral meristem identity	Maintenance of meristem identity	1.0
Maintenance of inflorescence meristem identity	Maintenance of meristem identity	1.0
Floral meristem determinacy	Meristem determinacy, flower development, developmental process involved in reproduction	1.0
Fruit development	Reproductive structure development	1.0
Flower development	Reproductive structure development, post-embryonic development, shoot system development	0.6
Molecular function		
Sequence-specific DNA binding transcription factor activity	Nucleic acid binding transcription factor activity	1.0
Protein heterodimerization activity	Protein dimerization activity	1.0
Cellular component		
Nucleus	Intracellular membrane-bounded organelle	1.0
Intracellular membrane-bounded organelle	Intracellular organelle, membrane-bounded organelle	0.60

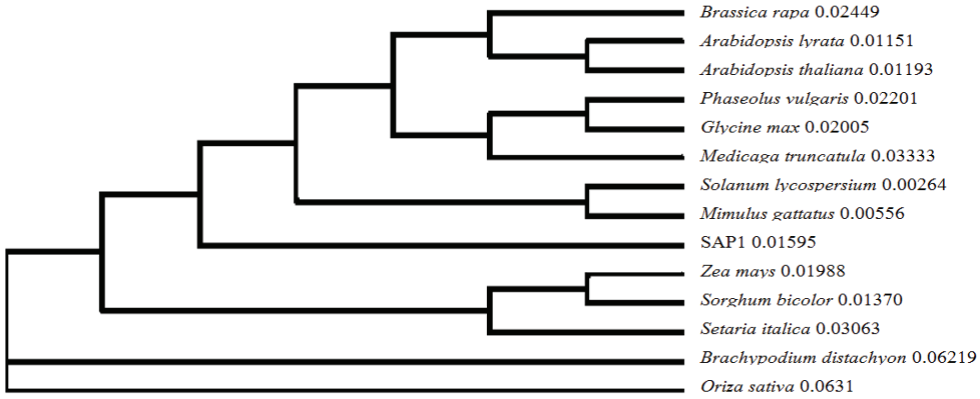
*Score:*E-value* hit filter = 1.0E-6, Annotation cut off = 55 and GO-weight = 5

การทำนายเชิงหน้าที่ของยีน (gene ontology annotation) เพื่อทำนายบทบาทหน้าที่การทำงานหรือกิจกรรมต่าง ๆ ในเซลล์ของบางส่วนของยีน *AP1* ที่โคลนได้ ได้แก่ หน้าที่เชิงโมเลกุล (molecular function) กระบวนการทางชีวภาพ (biological process) และตำแหน่งที่พบภายในเซลล์ (cellular function) นั้น การทำนายเชิงหน้าที่จะเน้นทางกระบวนการชีวภาพเป็นสำคัญ โดยพบว่า โดยส่วนใหญ่แล้วหน้าที่ของบางส่วนของยีน *AP1* ที่โคลนได้จะเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของตาดอก การออกดอก และการเปลี่ยนแปลงเป็นดอกที่สมบูรณ์ ซึ่งผลการวิเคราะห์นี้สามารถกล่าวได้ว่า บางส่วนของยีน *AP1* ที่โคลนได้เป็นบางส่วนของยีน *AP1* ที่กำหนดการสร้าง *AP1* transcription factor ในอ้อยป่าจริง

เมื่อยืนยันผลการทำนายอีกครั้งด้วยการวิเคราะห์ Phylogram พบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างบางส่วนของยีน *AP1* ที่โคลนได้ กับยีน *AP1* ใน MADS-box domain ในพืชหลากหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวฟ่าง ข้าวโพด ถั่วเหลือง กะหล่ำ มะเขือเทศ *Arabidopsis* ข้าวฟ่างหางกระรอก (foxtail millet) *Medicaga* และ *Brachy podium* Mendel *et al.* (1992) กล่าวว่ายีน *AP1* นั้น เป็นยีนที่มีความอนุรักษ์สูงในพืชดอกทั่ว ๆ ไป เนื่องจากเป็นยีนที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการออกดอก แต่เนื่องจากในฐานข้อมูล Phytozome นั้นปรากฏมีข้อมูลของยีน *AP1* ในพืชใบเลี้ยงคู่ (complete sequence *AP1* gene) มากกว่าพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (partial sequence *AP1* gene) ทำให้ผลการทำนายความเหมือนแสดงให้บางส่วนของยีน *AP1* ที่โคลนได้มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโน้มเอียงไปทางพืชใบเลี้ยงคู่มากกว่าใบเลี้ยงเดี่ยว



ภาพที่ 2 การเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปรรหัสจากบางส่วนของยีน *AP1* ที่โคลนได้จาก *Saccharumspontaneum* หมายเลขสายพันธุ์ 98-244 กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *AP1* ในกลุ่มพืชตระกูลหญ้าโดยใช้โปรแกรม Phytozome V9.1, โดย SAP1 หมายถึงบางส่วนของยีน *AP1* ที่โคลนได้จาก *S. spontaneum*



ภาพที่ 3 Phylogram ของความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างบางส่วนของยีน *AP1* ที่โคลนได้จาก *Saccharum spontaneum* หมายเลขสายพันธุ์ 98-244 กับพืชชนิดต่าง ๆ โดยใช้โปรแกรม Phytosome V9.1 และ Clustal Omega V 1.2.1 โดย SAP1 หมายถึงบางส่วนของยีน *AP1* ที่โคลนได้จาก *S. spontaneum*

นอกจากนี้ Monclus *et al.* (2012) ได้วาง 77 Quantitative Trait loci (QTLs) ที่เชื่อมโยงกับลักษณะการให้ผลผลิตของพืช Poplar ซึ่งเป็นพืชที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ทางชีวมวล จากนั้นจึงทำนายเชิงหน้าที่ของกระบวนการชีวภาพของทั้ง 77QTLs ผ่านโปรแกรม Phytozome โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลทางพันธุกรรมกับ *Arabidopsis*พบยีนเป้าหมาย (candidate gene) ที่เกี่ยวข้องกับการให้ผลผลิต เช่นยีนที่ควบคุมการแตกกิ่งก้าน และยีนที่ควบคุมการพัฒนา adventitious root ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันอีกทางหนึ่งถึงความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ในการทำนายเชิงบทบาทและหน้าที่การทำงานที่เกี่ยวข้องกับการออกดอกของบางส่วนของยีน *AP1* ที่โคลนได้ดังนั้นบางส่วนของยีน *AP1* ที่โคลนได้นี้อาจสามารถนำมาใช้เป็น specific marker เพื่อช่วยในการคัดเลือกอ้อยออกดอกเร็ว ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่ต้องการออกไปได้อย่างรวดเร็ว เพื่อช่วยลดระยะเวลาในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์อ้อยได้

สรุป

การโคลนบางส่วนของยีน *AP1* จากอ้อยป่าได้ DNA ขนาด 397 คู่เบสหรือ 129 กรดอะมิโน โดยมีความเหมือนกับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการออกดอกที่มีตำแหน่งอยู่บริเวณ MADS-box domain ที่ 96 เปอร์เซ็นต์เมื่อทำนายเชิงหน้าที่ทางกระบวนการชีวภาพ พบว่ามีบทบาทหน้าที่โดยตรงที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาไปเป็นดอกที่สมบูรณ์และยังพบเป็นบริเวณอนุรักษ์ในพืชดอกทั่ว ๆ ไปอีกด้วย ดังนั้นบางส่วนของยีน *AP1* ที่โคลนได้นี้ จะสามารถนำมาใช้เป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการค้นหายีน *AP1* ที่สมบูรณ์ของอ้อย และจะสามารถนำมาเป็นข้อมูลเพื่อออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบการเกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับ single nucleotide ของอ้อยสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้ เพื่อใช้เปรียบเทียบกับลักษณะการออกดอกช้าหรือเร็วที่แตกต่างกัน ผลที่ได้จะสามารถนำมาใช้ข้อมูลสำหรับการออกแบบ specific primer หรือ specific marker เพื่อช่วยในการคัดเลือกอ้อยที่ออกดอกเร็ว หรือช้าแล้วแต่กรณีได้ ซึ่งจะเป็นการประหยัดเวลาในการปรับปรุงและคัดเลือกพันธุ์อ้อยให้มีลักษณะออกดอกตามที่ต้องการได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากสำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตร

และอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษา และพัฒนามหาวิทยาลัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

Chang, S., J. Puryear and J. Cairney. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Mol. Biol. Rep. 11: 113-116.

Conesa, A., S. Gotz, J.M. Garcia-Gomez, J. Terol, M. Talon and M. Robles.2005. Blas2go: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. Bioinformatics 21: 3674-3676.

Gustafson-Brown, C., B. Savidge and M.F. Yanofsky. 1994. Regulation of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA1. Cell 76:131-43.

Linhart, C. and R. Shamir. 2002. The degenerate primer design problem. Bioinformatics18: S172-S180.

Mendel, M.A., C. Gustafson-Brown, B. Savidge and M.F. Yanofsky. 1992. Molecular characterization of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA1. Nature 360: 273-277.

Monclus, R., J-C.Leplé, C. Bastien, P-F. Bert, M.Villar, N. Marron, F. Brignolas and V. Jorge. 2012. Integrating genome annotation and QTL position to identify candidate genes for productivity, architecture and water-use efficiency in *Populus* spp. BMC Plant Biol. 12: 173.

Shore, P. and D.A. Sharrocks. 1995. The MADS-box family of transcription factor. Eur.J.Biochem. 229:1-13.

Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acid Res. 22:4673-4680.

Wagner, D., R.W. Sablowski and E.M. Meyerowitz. 1999. Transcriptional activation of *APETALA1* by *LEAFY*. Science 285:582-4.

Yan, L., A. Loukoianov, G. Tranquilli, M. Helguera, T. Fahima, and J. Dubcovsky. 2003. Positionalcloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 6263-6238.