รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของชนิดอาหารต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสะสมแป้งใน *Landoltia punctata*

นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณรายได้ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย
ประจำปีงบประมาณ 2561
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 7

บทที่ 4 ผลการวิจัย 10

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 15

บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย 16

สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย 20

ประวัตินักวิจัย 21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1	10
4.2	11
4.3	12
4.4	13
4.5	14
4.6	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ผลของชนิดอาหารต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสะสมแป้งใน *Landoltia punctata*

ประจำปีงบประมาณ 2561 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2560 ถึง 30 กันยายน 2561

หัวหน้าโครงการ: นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยชิ้นนี้มีคือการทดสอบผลของชนิดอาหารเพาะเลี้ยง 2 ชนิดต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แป้งใน *L. punctata* ซึ่งมีชื่อสามัญภาษาไทยคือแหน และภาษาอังกฤษคือ ducweed อาหารเพาะเลี้ยง 2 ชนิดที่ใช้ทดสอบคืออาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) และสูตร Hoagland ยีนที่ตรวจสอบคือยีน *LeAPL1* และ *LeAPS* ซึ่งกำหนดการสร้างโปรตีน ADP-glucosepyrophosphorylase large subunit 1 และ ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit ตามลำดับ การโคลนชิ้นส่วนของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนทั้ง 2 ชนิดพบว่าลำดับเบสของยีนที่โคลนได้มีความแตกต่างบางประการเมื่อเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล การเพาะเลี้ยงแหนในอาหารทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวพบว่าส่งผลให้แหนมีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ในภาพรวมแหนที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำกว่าแต่คงอัตราการเจริญเติบโตได้นานกว่าแหนที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Hoagland การตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน *LeAPL1* และ *LeAPS* พบว่าการแสดงออกของยีน 2 ยีนนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือยีนแสดงออกในระดับสูงในแหนที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Hoagland จนกระทั่งถึงวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยงจากนั้นการแสดงออกของยีนค่อยๆ ลดระดับลงจนอยู่ในระดับค่อนข้างคงที่ ในขณะที่การแสดงออกของยีนในแหนที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS มีการพิ่มขึ้นภายหลังจากวันที่ 28 ของการเพาะเลี้ยง ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าอาหารเพาะเลี้ยงมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต ปริมาณแป้ง และการแสดงออกของยีนใน *L. punctata*

คำสำคัญ : *Landoltia punctata,* การแสดงออกของยีน, ADP-glucosepyrophosphorylase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Effects of media on expression of genes involved in starch accumulation in *Landoltia punctata*

Researcher: Dr.Chokchai Kittiwongwattana

Faculty: Faculty of Science **Department:** Department of Biology

ABSTRACT

The main objective of this study was to determine the effects of two cultures media on the starch-biosynthesis genes in *L. punctata*, generally known as duckweed. The media used in this study were Murashige and Skoog's (MS) and Hoagland's medium. The starch-biosynthesis genes were *LeAPL1* and *LeAPS* that coded for ADP-glucosepyrophosphorylase large subunit 1 and ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit, respectively. Cloning and sequencing of the two genes showed that the sequences of both genes were relatively different from those found in the database. Duckweeds grown on the two media displayed different growth rates. Overall, duckweeds grown in MS medium showed a slower and steadier growth when compared to those in Hoagland's medium. Gene expression analysis of *LeAPL1* and *LeAPS* showed similar patterns. In Hoagland's medium, relatively higher transcriptionaly levels were observed until day 14 of the experiment. Subsequently, gene expression declined and became stable. In contrast, expression of both genes in MS medium increased after day 28 of the experiment. The results obtained in this study demonstrated the effects of culture media on growth rate, starch content and gene expression level in *L. punctata*.

Keywords : *Landoltia punctata,* gene expression, ADP-glucosepyrophosphorylase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ความเจริญก้าวหน้าทางเทคโนโลยี การคมนาคมขนส่งและการเพิ่มจำนวนของประชากรโลกส่งผลให้ความต้องการพลังงานเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ที่ผ่านมาแหล่งพลังงานที่สำคัญทางด้านการคมนาคมขนส่งคือเชื้อเพลิงปิโตรเลียมในรูปของน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลที่ใช้ในพาหนะประเภทต่างๆ ทั้งรถยนต์ รถบรรทุก รถไฟ เรือ และเครื่องบิน อย่างไรก็ดีเชื้อเพลิงปิโตรเลียมเป็นทรัพยากรประเภทที่ใช้แล้วหมดไป นอกจากนี้การเผาไหม้ของเชื้อเพลิงปิโตรเลียมยังก่อให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นก๊าซเรือนกระจกและเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้ภาวะโลกร้อนแย่ลง ด้วยเหตุนี้ในปัจจุบันจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับแหล่งพลังงานทางเลือกจากหลายแหล่งเพื่อนำมาลดปริมาณการใช้น้ำมัน ตัวอย่างเช่นการใช้ประโยชน์จากพืชในการนำมาเป็นวัตถุดิบเพื่อใช้ผลิตไบโอเอทานอลที่สามารถนำมาผสมกับน้ำมันเบนซินเพื่อผลิตน้ำมันแกสโซฮอล์ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอีกจำนวนมากที่ศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการสะสมน้ำมันโดยสาหร่ายขนาดเล็ก อย่างไรก็ดีข้อเสียของการนำพืชมาใช้ประโยชน์ในการเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกคือพืชหลายชนิดที่นิยมนำมาใช้นั้นเป็นพืชที่เป็นอาหารให้แก่มนุษย์ด้วย ตัวอย่างเช่นข้าวโพด อ้อย มันสำปะหลัง ดังนั้นการเพาะปลูกพืชดังกล่าวเพื่อเป็นแหล่งพลังงานจึงอาจก่อให้เกิดผลกระทบกับกำลังการผลิตอาหารให้แก่มนุษย์ การผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายก็มีข้อเสียเช่นกัน กล่าวคือการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจำเป็นต้องใช้พลังงานปริมาณมากเพื่อทำให้สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่ นอกจากนี้การเก็บรวบรวมเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กนั้นทำได้ค่อนข้างยาก เหตุผลเหล่านี้ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายสูงขึ้นจนไม่สามารถแข่งขันกับน้ำมันได้ในปัจจุบัน เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นจึงได้มีความพยายามค้นหาแหล่งพลังงานทางเลือกอื่นๆ เพิ่มเติม เช่นการนำพืชชนิดอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารให้แก่มนุษย์หรือการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาเป็นแหล่งผลิตไบโอเอทานอล

พืชชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจและถูกนำมาศึกษาเกี่ยวกับความเป็นไปได้ในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบผลิตไบโอเอทานอลคือพืชในวงศ์ Lemnaceae ตัวอย่างของพืชในวงศ์นี้ที่พบเห็นได้ในหลายพื้นที่ของประเทศไทยคือ แหนเป็ดเล็ก (*Lemna* sp.) แหนเป็ดใหญ่ (*Landoltia* sp.) และไข่น้ำ (*Wolffia*) เป็นต้น ในอดีตพืชกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้เป็นตัวอย่างเพื่อศึกษากระบวนการทางชีววิทยาของพืช พืชในวงศ์ Lemnaceae ยังถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นแหล่งผลิต recombinant protein ที่ใช้กับมนุษย์ด้วยเนื่องจากมีโอกาสต่ำที่จะเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในมนุษย์ นอกจากนี้พืชกลุ่มนี้ยังมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ดูดซับโลหะหนักที่ปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำด้วย ลักษณะสำคัญที่ทำให้พืชในวงศ์นี้เหมาะสมแก่การนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอลคืออัตราการเจริญเติบโตที่สูงและความสามารถในการเจริญเติบโตในแหล่งน้ำทิ้ง การศึกษาเบื้องต้นชิ้นหนึ่งแสดงให้เห็นว่า *Spirodella polyrhiza* ที่เพาะเลี้ยงในบ่อที่มีน้ำทิ้งจากการปศุสัตว์สามารถสะสมแป้งไว้ภายในได้มากถึงร้อยละ 45.8 ของน้ำหนักแห้งของพืช ซึ่งแป้งที่ได้นี้สามารถนำมาเข้าสู่กระบวนการย่อยสลายให้ได้น้ำตาลเพื่อนำไปใช้ผลิตเอทานอลโดยยีสต์ผ่านทางกระบวนการหมักต่อไปได้ ดังนั้นข้อได้เปรียบของพืชวงศ์นี้อีกประการหนึ่งคือการเพาะเลี้ยงพืชจะมีผลในการแย่งพื้นที่เพาะปลูกน้อยกว่าการใช้พืชชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ดีวงศ์ Lemnaceae ประกอบไปด้วยสกุลที่แตกต่างกัน 5 สกุลและ 38 ชนิด ดังนั้นการประยุกต์ใช้พืชวงศ์ Lemnaceae เป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกี่ยวกับกระบวนการสะสมแป้งซึ่งอาจมีความแตกต่างกันทั้งในระดับของชนิดและสายพันธุ์ที่จะนำมาใช้ ตลอดจนผลกระทบของสารอาหารในน้ำต่ออัตราการสะสมแป้งในต้นพืช ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจเกี่ยวกับอัตราการสะสมแป้งและผลกระทบของสารอาหารต่อกระบวนการดังกล่าวในระดับโมเลกุลของ *Landoltia punctata* สายพันธุ์ท้องถิ่นที่พบในประเทศไทย โดยผลการวิจัยที่ได้จะช่วยให้ได้รับความเข้าใจเกี่ยวกับพืชชนิดนี้มากขึ้นและสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการนำพืชชนิดนี้ไปประยุกต์ใช้ผลิตเอทานอลต่อไปได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- เพื่อโคลนชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสะสมแป้งใน *L. punctata*
- เพื่อตรวจสอบการสะสมแป้งใน *L. punctata* ที่เติบโตในอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน
- เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสะสมแป้งใน *L. punctata* ที่เจริญเติบโตในอาหารที่แตกต่างกัน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้จะคัดแยกพืช *L. punctata* ที่พบในธรรมชาติมาอย่างน้อย 1 สายพันธุ์เพื่อนำมาเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนในสภาพปลอดเชื้อ พืชที่ได้จะถูกนำมาเป็นตัวอย่างเพื่อโคลนชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสะสมแป้งได้แก่ยีนที่กำหนดการสร้าง large subunit และยีนที่กำหนดการสร้าง small subunit ของเอนไซม์ ADP-glucose pyrophosphorylase และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนดังกล่าวกับลำดับโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank พืชที่คัดแยกได้จะถูกนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกัน 2 ชนิดคือ Murashige and Skoog และ Hoagland's เพื่อศึกษาผลของสารอาหารที่มีต่อปริมาณแป้งที่สะสมในเซลล์พืชตลอดจนการแสดงออกของยีนดังกล่าวข้างต้น

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอน 3 ขั้นตอนได้แก่ การเพาะเลี้ยงแหน การโคลนยีน *LeAPL1* และ *LeAPS* การวัดอัตราการเจริญเติบโต และการวัดการแสดงออกของยีน

1.5 สมมติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

อาหารเพาะเลี้ยงต่างสูตรมีองค์ประกอบแตกต่างกัน ดังนั้นแหนที่เจริญในอาหารเพาะเลี้ยง MS และ Hoagland จึงควรมีอัตราการเจริญเติบโต และการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบลำดับเบสของยีน *LeAPL1* และ *LeAPS* ผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโต และการแสดงออกของยีนในแหน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พืชในวงศ์ Lemnaceae หรือที่รู้จักกันในชื่อทั่วไปว่าแหนหรือ duckweed เป็นพืชกลุ่มที่ได้รับความสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบเพื่อผลิตเอทานอล การแพร่กระจายของพืชในวงศ์นี้พบได้ในหลายประเทศทั่วโลกรวมไปถึงประเทศไทยด้วย ตัวอย่างของพืชในวงศ์ Lemnaceae ที่พบในประเทศไทยเช่น แหนเป็ดใหญ่ (*S. polyrhiza*), แหนเป็ดเล็ก (*Lemna minor*) และไข่น้ำหรือผำ (*Wolffia* sp.) เป็นต้น พืชกลุ่มนี้ถูกจัดจำแนกให้อยู่ในกลุ่มของพืชดอก (Angiosperms) และอยู่ในกลุ่มย่อยของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Monocotyledons) ในปัจจุบันพืชในวงศ์ Lemnaceae ถูกแบ่งออกเป็น 5 จีนัสได้แก่ *Spirodela, Landoltia, Lemna, Wolffia* และ *Wolffiela* และมีพืชที่ถูกจัดอยู่ในจีนัสต่างๆ เหล่านี้รวมจำนวน 38 สปีชีส์ (Les et al., 1997; Wang et al., 2010) พืชในวงศ์ Lemnaceae เป็นพืชน้ำทั้งหมดโดยต้นพืชลอยอยู่ที่เหนือผิวน้ำ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชกลุ่มนี้แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างต่างๆ ของต้นพืชมีการเปลี่ยนแปลงเป็นอย่างมากเมื่อเทียบกับพืชในกลุ่มอื่นๆ โดยโครงสร้างสีเขียวที่มีลักษณะคล้ายใบเรียกว่า frond ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ทำหน้าที่เหมือนกับใบและลำต้นของพืชทั่วๆ ไป ภายในเซลล์ของ frond มีคลอโรพลาสท์จำนวนมากที่ทำหน้าที่สังเคราะห์แสง นอกจากนี้ frond หนึ่งๆ สามารถสร้าง frond อันใหม่ขึ้นมาและอยู่ติดกันเป็นโคโลนี เมื่อ frond ลูกนี้เจริญเติบโตเต็มที่แล้วอาจแยกตัวออกแล้วเจริญเติบโตสร้างโคโลนีต่อไปได้ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า frond ทำหน้าที่เป็นอวัยวะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศให้กับพืชด้วย นอกจากนี้แหนหลายสปีชีส์สามารถสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า turion ในช่วงเวลาที่ไม่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตได้ด้วยเช่น ช่วงหน้าหนาวของประเทศในเขตอบอุ่น turion มีลักษณะพิเศษคือมีสีค่อนข้างคล้ำเมื่อเทียบกับ frond ปกติ และภายใน turion สะสมแป้งในปริมาณมากทำให้ turion มีน้ำหนักเพิ่มมากขึ้นและจมลงไปในน้ำช่วยให้แหนสามารถหลีกเลี่ยงอันตรายจากการที่น้ำกลายเป็นน้ำแข็งบริเวณผิวหน้าของน้ำด้วย จนกระทั่งสภาวะแวดล้อมเปลี่ยนกลับมาอยู่ในสภาพที่เหมาะสม turion จะเกิดการเจริญเติบโตเพื่อสร้าง frond ใหม่ขึ้นมาต่อไป ด้วยเหตุนี้ turion จึงนับได้ว่าเป็นเหมือนระยะพักตัวของแหนนั่นเอง (Wang and Messing, 2014)

พืชพลังงานที่ใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อนำมาใช้ผลิตไบโอเอทานอลสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มได้แก่

1.) พืชที่สะสมน้ำตาล เช่น อ้อย หัวบีท เป็นต้น

2.) พืชที่สะสมแป้ง เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง ข้าวสาลี เป็นต้น

3.) พืชที่มี lignocellulose สะสมอยู่มากที่ผนังเซลล์ เช่น หญ้า switchgrass กากอ้อยที่ผ่านการคั้นน้ำแล้ว เป็นต้น

กระบวนการปรับแต่งพืชพลังงานที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอลมีความแตกต่างกันไปตามแต่ละกลุ่มพืช โดยจุดประสงค์หลักคือจำเป็นต้องเปลี่ยนสารชีวโมเลกุลกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่สะสมในเซลล์ของพืชให้กลายเป็นน้ำตาล จากนั้นจึงนำน้ำตาลที่ได้ไปใช้เป็นแหล่งพลังงานให้กับจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเพื่อให้จุลินทรีย์เหล่านี้เปลี่ยนน้ำตาลให้กลายเป็นเอทานอล (Mousdale, 2010) รายละเอียดในการเตรียมวัตถุดิบของพืชแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันออกไป โดยแป้งที่สะสมในพืชพลังงานกลุ่มที่ 2 นั้นจัดเป็นโพลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมอร์ในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบขึ้นมาจากน้ำตาลกลูโคสที่เป็นหน่วยย่อยจำนวนมาก โดยน้ำตาลกลูโคสเหล่านี้เชื่อมกันด้วยพันธะไกลโคลซีดิก แป้งที่พบในพืชทั่วๆ ไปมีอยู่ 2 ชนิดได้แก่ amylose และ amylopectin สิ่งที่ทำให้ amylose แตกต่างจาก amylopectin คือ amylose มีน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมกันด้วยพันธะ α(1,4) เป็นสายยาวและไม่มีการแตกกิ่งก้านสาขา ในขณะที่ amylopectin นั้นมีการแตกกิ่งก้านสาขาโดยบริเวณที่เป็นสาขานั้นจะเชื่อมกับสายหลักด้วยพันธะ α(1,6) ที่ปลายหนึ่งของโมเลกุลของแป้งมีลักษณะเป็นปลาย reducing ตรงข้ามกับอีกปลายหนึ่งซึ่งเป็นปลาย non-reducing ความแตกต่างระหว่างปลายทั้ง 2 ด้านของโมเลกุลแป้งมีความสำคัญต่อกระบวนการย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลโดยการใช้เอนไซม์เป็นอย่างมาก (Cardona *et al*., 2010)

ปัจจัยหลายชนิดมีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตราการสะสมแป้งในพืชเป็นอย่างมาก ตัวอย่างเช่น ปริมาณของแร่ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ อุณหภูมิ ปริมาณแสง เป็นต้น โดยงานวิจัยชิ้นหนึ่งที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าปริมาณของแร่ธาตุมีผลกระทบโดยตรงต่อการเจริญเติบโตและการสะสมแป้งใน *L. punctata* โดยเมื่อเพาะเลี้ยงพืชในน้ำกลั่นพืชมีการสะสมแป้งเพิ่มมากขึ้นถึง 42 เท่า (Tao *et al*., 2013) แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืชคือธาตุอาหารหลักไนโตรเจนและฟอสฟอรัส โดยแร่ธาตุ 2 ชนิดนี้เป็นแร่ธาตุพื้นฐานที่พบในสารชีวโมเลกุลจำนวนมากภายในพืช เช่น ATP nucleic acid โปรตีน เป็นต้น อย่างไรก็ดีเมื่อพืชอยู่ในสภาวะขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสแล้วพืชจะเพิ่มอัตราการสะสมแป้งให้มากขึ้น (Nielsen *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของแร่ธาตุฟอสฟอรัสมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสงและการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสในพืชด้วย (Cai *et al*., 2013) งานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งโดย Kittiwongwattana and Vuttipongchaikij แสดงให้เห็นว่าเมื่อ *L. punctata* และ *Lemna aequinoctialis* ถูกนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่แตกต่างกัน 2 ชนิดคือ Murashige and Skoog (MS) และ Hoagland's พืชทั้ง 2 ชนิดจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่าง โดยพืชที่เจริญในอาหาร MS เจริญเติบโตได้น้อยกว่าพืชที่เลี้ยงในอาหาร Hoagland's แต่เมื่อพืชเหล่านี้ถูกย้ายมาเพาะเลี้ยงต่อในน้ำที่มีปริมาณแร่ธาตุอาหารจำกัดการเจริญเติบโตของพืชที่เคยอยู่ในอาหาร MS มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่าพืชที่เคยอยู่ในอาหาร Hoagland's สมมติฐานหนึ่งที่อาจเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตที่แตกต่างในอาหารสังเคราะห์และน้ำนี้อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสะสมแป้งภายในเซลล์ของพืช โดยอาหาร MS อาจที่จะสามารถส่งเสริมการสะสมแป้งในพืชซึ่งแป้งนี้ถูกเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลที่เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญเติบโตของพืชเมื่อมันถูกย้ายมาอยู่ในน้ำที่มีแร่ธาตุอาหารน้อยลงได้

เอนไซม์ ADP glucose pyrophosphorylase (AGPase) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่มีผลต่ออัตราการสะสมแป้งในกระบวนการสังเคราะห์แป้ง (Sakulsingharoj *et al*., 2004) เอนไซม์ AGPase ในพืชมีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ADP-glucose (Ballicola *et al*., 2004) มีองค์ประกอบสองส่วนคือหน่วยย่อย large subunit 2 หน่วย และหน่วยย่อย small subunit 2 หน่วย หน่วยย่อยแต่ละหน่วยนี้ถูกกำหนดการสร้างโดยยีนที่แตกต่างกัน โดยที่ส่วนของ large subunit ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ในลักษณะของ allosteric regulation โดยมี glycerate-3-phosphate (3-PGA) และหมู่ฟอสเฟต (Pi) เป็นตัวกระตุ้น (activator) และตัวยับยั้ง (inhibitor) การทำงานของเอนไซม์ตามลำดับ (Slattery *et al*., 2000) ส่วนหน่วยย่อย small subunit เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยา งานวิจัยที่ผ่านมา 2 ชิ้นแสดงให้เห็นถึงผลของหน่วยย่อย large subunit ต่อการสะสมแป้งในพืชคืองานวิจัยชิ้นหนึ่งพบว่าการเกิด overexpression ของยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่กำหนดการสร้างหน่วยย่อยนี้ในข้าวสาลีส่งผลให้เมล็ดข้าวสาลีมีปริมาณแป้งสูงขึ้น (Kang *et al*., 2013) ส่วนงานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์กลายของข้าวที่ไม่สามารถสร้างหน่วยย่อย large subunit มีปริมาณแป้งสะสมในใบลดลงเป็นอย่างมากเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (Tsai and Nelson, 1966) เอนไซม์อื่นในพืชก็มีความสำคัญต่อระดับปริมาณแป้งที่สะสมในเซลล์พืช ตัวอย่างเช่นเอนไซม์ soluble starch synthesis (SSS), alpha-amylase, beta-amylase เป็นต้น โดยเอนไซม์ alpha-amylase เป็นเอนไซม์หลักที่สามารถสลายพันธะ α(1,4) glycosidic และเอนไซม์ beta-amylase ทำหน้าที่หลักในการย่อยสลายเม็ดแป้ง (starch granules) ภายในเซลล์พืช (Zhao *et al*., 2015)

Wang and Messing (2012) รายงานผลการโคลนและการหาลำดับเบสของยีน 3 ยีนได้แก่ *APL1 APL2* และ *APL3* ที่กำหนดการสร้างหน่วยย่อย large subunit ของเอนไซม์ AGPase ใน *S. polyrhiza* การวิเคราะห์ลำดับเบสจากยีน 3 ยีนนี้พบว่ามีการอนุรักษ์ลำดับเบสระหว่างยีนทั้ง 3 ยีนในบริเวณที่เป็น exon ซึ่งมีรหัสพันธุกรรมอย่างไรก็ดีบริเวณ intron ของยีนเหล่านี้ซึ่งไม่มีรหัสพันธุกรรมอยู่มีความแปรปรวนค่อนข้างสูง เนื่องจากมีชิ้นส่วนของ inverted-repeat transposable elements แทรกแตกต่างกันในแต่ละยีน การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนทั้ง 3 ยีนนี้ด้วยวิธี quantitative RT-PCR พบว่ายีนแต่ละยีนมีการแสดงออกที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาของการสร้าง turion ใน *S. polyrhiza* โดยยีน *APL1* มีการแสดงออกต่ำตลอดระยะเวลาในการสร้าง turion ในขณะที่ยีน *APL2* และ *APL3* มีการแสดงออกสูงในช่วงต้นของการสร้าง turion

Zhao *et al*. (2015) ศึกษาการสังเคราะห์แป้งและการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แป้งใน *L. punctata* ภายใต้สภาวะขาดแคลนแร่ธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัส โดยพบว่าการขาดแร่ธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัสส่งเสริมให้พืชมีการสะสมแป้งเพิ่มมากขึ้นประมาณ 3 และ 4 เท่าตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ AGPase เพิ่มสูงขึ้นโดยเพิ่มขึ้นจาก 2.1 U เป็น 16.7 U ภายในระยะเวลา 168 ชั่วโมงในสภาวะขาดแร่ธาตุไนโตรเจนและเพิ่มขึ้นจาก 2.1 U เป็น 5.8 U ในสภาวะขาดแร่ธาตุฟอสฟอรัส การโคลนยีน *LeAPL1* และยีน *LeAPS* ใน *L. punctata* พบว่ายีน *LeAPL1* กำหนดการสร้างหน่วยย่อย large subunit ประกอบไปด้วยลำดับเบสจำนวน 1,554 คู่เบสและกำหนดการสร้างโปรตีนขนาด 57.7 kDa ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 517 กรดอะมิโน ส่วนยีน *LeAPS* กำหนดการสร้างหน่วยย่อย small subunit มีความยาวทั้งสิ้น 1,578 คู่เบสกำหนดการสร้างโปรตีนขนาด 57 kDa ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 525 กรดอะมิโน การศึกษาการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แป้งได้แก่ยีน *LeAPL1 LeAPL2 LeAPL3 LeAPS LeSSS, LeAMY* และ *LeBMY* ในสภาพขาดแคลนแร่ธาตุไนโตรเจนพบว่ายีน *LeAPL1* และ *LeAPL3* มีการแสดงออกสูงขึ้น 3.-6 และ 3.1 เท่าตามลำดับในช่วงระยะเวลา 0-2 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นการแสดงออกของยีน *LeAPL2* จึงเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 ถึง 72 โดยที่ชั่วโมงที่ 72 ยีน *LeAPL2* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 5.9 เท่าในขณะที่การแสดงออกของยีน *LeAPL1* และ *LeAPL3* ลดลง 0.72 และ 0.7 เท่าตามลำดับเมื่อเทียบกับการแสดงออกของยีนในชั่วโมงที่ 0 ในทางตรงกันข้ามการแสดงออกของยีน *LeAPS* นั้นเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 13-67 ตลอดระยะการทดลอง รูปแบบของการแสดงออกดังกล่าวนี้แตกต่างไปจากการแสดงออกของยีนชุดเดียวกันในสภาพขาดแร่ธาตุฟอสฟอรัส โดยในช่วง 2 ชั่วโมงแรกยีน *LeAPL1* และ *LeAPL3* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในขณะที่ยีน *LeAPL2* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในช่วงเวลาตั้งแต่ 2 ถึง 72 ชั่วโมง ในขณะที่ยีน *LeAPS* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเพียงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช่วงเวลา 2 ชั่วโมงแรกของการทดลองเท่านั้น ส่วนการแสดงออกของยีน *LeSSS* ที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ *SSS* นั้นพบว่าเพิ่มสูงขึ้นทั้งในสภาวะการขาดแร่ธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ส่วนการแสดงออกของยีน *LeAMY* และ *LeBMY* ที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ alpha-amylase และ beta-amylase นั้นพบว่ามีระดับที่สูงขึ้นในช่วง 2 ชั่วโมงแรกของการทดลองแล้วลดลงอย่างรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างพืช *L. punctata*

เก็บรวบรวมตัวอย่างพืช *L. punctata* ที่เจริญเติบโตในแหล่งน้ำธรรมชาติมาอย่างน้อย 1 ตัวอย่าง แล้วนำมาเพาะเลี้ยงไว้ในภาชนะที่บรรจุน้ำจากแหล่งตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อยืนยันชนิดของพืชก่อนที่จะนำตัวอย่างพืชนี้ไปดำเนินการทดลองต่อไป

การฟอกทำความสะอาดพื้นผิวภายนอกของ *L. punctata*

นำต้นพืชไปฟอกล้างทำความสะอาดในน้ำที่ผสมน้ำยาล้างจานเพื่อล้างสิ่งสกปรกภายนอกออก จากนั้นย้ายต้นพืชลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ปราศจากเชื้อแล้วเติมน้ำยาฆ่าเชื้อที่มีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10% ลงไปแล้วฟอกทำความสะอาดโดยการเขย่าหลอดอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลาประมาณ 3-5 นาที แล้วย้ายต้นพืชลงในหลอดทดลองใหม่ที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อบรรจุอยู่ ปิดฝาหลอดแล้วเขย่าหลอดซ้ำอีกครั้งเพื่อล้างน้ำยาฆ่าเชื้อออกจากพืช ล้างน้ำกลั่นซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยเอาต้นพืชไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์ MS ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)
KNO3	1900
MgSO4.7H2O	370
KH2PO4	170
NH4NO3	1650
CaCl2.2H2O	440
H3BO3	6.2
Na2MoO4.2H2O	0.25
MnSO4.H2O	16.9
ZnSO4.7H2O	8.6
CuSO4.5H2O	0.025
CoCl2.6H2O	0.025
FeSO4.7H2O	27.8
KI	0.83
Na2EDTA	37.2
Myo-inositol	100
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine.HCl	0.5
Glysine	2
Thiamine	0.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำต้นพืชไปเพาะเลี้ยงต่อในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส และให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงต่อเนื่องจนกระทั่งได้ต้นพืชจำนวนที่มากพอจึงนำต้นพืชไปดำเนินการศึกษาต่อในขั้นถัดไป

การทดสอบการเจริญเติบโตของ *L. punctata* ในอาหาร MS และ Hoagland's

นำต้นพืชที่เพิ่มปริมาณได้ย้ายลงในขวดแก้วที่บรรจุอาหารเหลว MS และ Hoagland's ปริมาตร 50 มิลลิลิตรโดยต้นพืชที่ย้ายจะประกอบด้วย frond จำนวน 2-3 frond ต่อต้น และเพาะเลี้ยงจำนวน 6 ต้นต่อขวด ชั่งน้ำหนักของต้นพืชในช่วงเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงแล้วเพาะเลี้ยงในอาหารในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส และให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 35 วัน จากนั้นนำต้นพืชทั้งหมดมาชั่งน้ำหนัก

การสกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อ *L. punctata*

ต้นพืชที่เก็บรวบรวมมาได้จะถูกนำมาใช้ในการสกัดแยกอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัด Favorprep Plant Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen) ตามวิธีการในคู่มือ ย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ RQ1 RNase-Free DNase (Promega) บนคอลัมน์ ตามวิธีการในคู่มือ จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอด้วย NanoDrop Spectrophotometer

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *LeAPL1* และ *LeAPS*

นำสารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้น 50 ng/µl มาเพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ (Zhao *et al.*, 2015) คือ

ยีน *LeAPL1*
ไพรเมอร์ LeAGPL1F 5'-ATGGCGCTGCGGATTGAG-3'
ไพรเมอร์ LeAGPL1R 5'-TCAGATGACAAGGCCATCCTT-3'
ยีน *LeAPS*
ไพรเมอร์ LeAPSF 5'-ATGGCGGCGACGAGCTTC-3'
ไพรเมอร์ LeAPSR 5'- TCATATGATGGTTCCGCTAGGG -3'
ปฏิกิริยา PCR ที่ใช้คือ
1.) 94 องศาเซลเซียส 5 นาที
2.) 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที
3.) 50 องศาเซลเซียส 45 วินาที
4.) 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที
ขั้นตอนที่ 2-4 ทำซ้ำ 40 รอบ
5.) 72 องศาเซลเซียส 10 นาที
จากนั้นนำผลที่ได้มาทดสอบโดยวิธี agarose gel electrophoresis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การโคลนชิ้นส่วนยีน *LeAPL1* และ *LeAPS*

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนทั้งสองยีนมาทำความสะอาดโดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป FavorPrep (Favorgen Inc.) แล้วนำไปบ่มร่วมกับพลาสมิด pGEMT-easy (Promega Inc.) จากนั้นถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5α ด้วยวิธี heat-shock transformation โดยบ่มแบคทีเรียในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสนาน 1 นาทีแล้วย้ายลงน้ำแข็ง 2 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรแล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสแล้วนำเชื้อแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 50 µg/ml นาน 18 ชั่วโมงแล้วนำโคโลนีของแบคทีเรียที่เติบโตมาตรวจสอบพลาสมิดสายผสมด้วยวิธี PCR โดยการใช้ไพรเมอร์ M13 forward และ M13 reverse จากนั้นเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีพลาสมิดสายผสมในอาหาร LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่เติมยาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 50 µg/ml แล้วนำเซลล์แบคทีเรียมาสกัดแยกพลาสมิดด้วยน้ำยาสำเร็จรูปเพื่อส่งหาลำดับเบสต่อไป ลำดับเบสที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนและเปรียบเทียบความคล้ายคลึงในฐานข้อมูลของ GenBank ต่อไป

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *LeAPL1* และ *LeAPS* ใน *L. punctata* ในอาหาร MS และ Hoagland's

นำเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS และ Hoagland's มาสกัด RNA ด้วยน้ำยา GeneZol (Geneaid) แล้วนำมาทำปฏิกิริยา reverse transcription ด้วยน้ำยา iscript supermix (Biorad) จากนั้นใช้ไพรเมอร์ต่างๆ ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative RT-PCR โดยการใช้เครื่อง Real-Time PCR system (BioRad) โดยมีไพรเมอร์ดังนี้

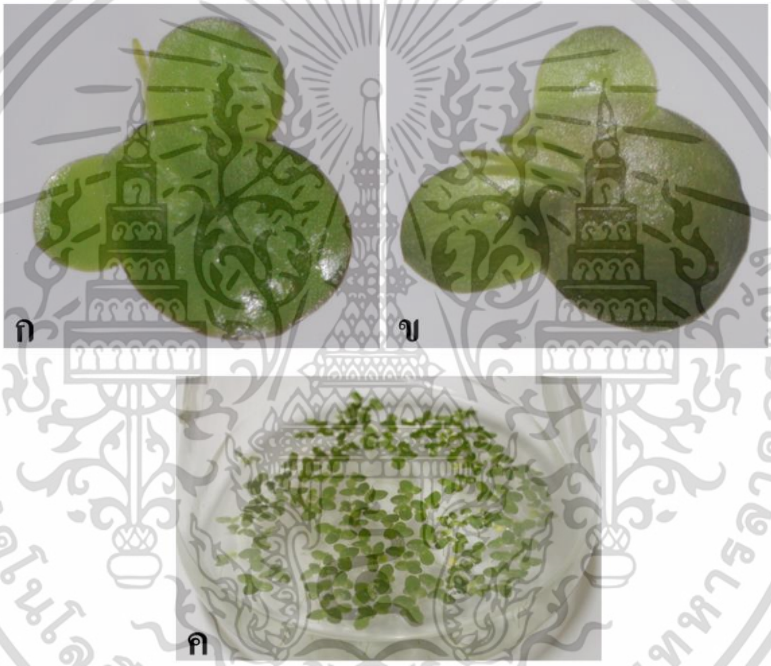
ยีน *LeAPL1*
ไพรเมอร์ APL1Q-F1 5'-AGAACTCGAAGATCAGGAACTGC-3'
ไพรเมอร์ APL1Q-R1 5'-TCTTTCGGCTTCTTGGATTCCCTC-3'
ยีน *LeAPS*
ไพรเมอร์ APSQ-F1 5'-TCCCAGATTTCAGCTTCTATGATCGG-3'
ไพรเมอร์ APSQ-R4 5'-TGAATCTTGCAGTTCTTAATCACGC-3'
ปฏิกิริยา PCR ที่ใช้คือ
1.) 95 องศาเซลเซียส 3 นาที
2.) 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที
3.) 60 องศาเซลเซียส 15 วินาที
ขั้นตอนที่ 2-3 ทำซ้ำ 40 รอบ

ผลการทดลองที่ได้นำมาวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *LeAPL1* และ *LeAPS* โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากสารละลาย cDNA ความเข้มข้น 1X, 0.1X, 0.01X และ 0.001X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

แหนตัวอย่างที่เก็บมาจากแหล่งน้ำธรรมชาติในบริเวณเขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานครฯ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สอดคล้องกับลักษณะของ *L. punctata* กล่าวคือ มี dorsal papillae ที่บริเวณด้านบนของ frond และด้านล่างของ frond มีรากจำนวนมากกว่า 1 ราก (ภาพที่ 4.1) ดังนั้นจึงนำแหนดังกล่าวไปล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ แล้วฟอกฆ่าเชื้อพื้นผิวภายนอก จนกระทั่งได้ frond ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS จากนั้นนำ daughter frond ที่เกิดจาก mother frond เดียวกันมาขยายพันธุ์ต่อไปโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร MS (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 ลักษณะด้านบน (ก) และด้านล่าง (ข) ของ frond และ *L. punctata* ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS (ค)

ต้นไม้ที่ปราศจากเชื้อถูกนำมาขยายพันธุ์เพิ่มจำนวน ต้นไม้บางส่วนแบ่งมาสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อใช้เป็นแม่แบบสังเคราะห์ cDNA จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *LeAPL1* และ *LeAPS* จาก cDNA ที่เตรียมได้โดยใช้ไพรเมอร์และวิธีการดังอธิบายในบทที่ 3 ผลการทดลองพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนของทั้ง 2 ยีนได้ โดยชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบสทั้ง 2 ยีน จากนั้นแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจลอะกาโรสเพื่อนำไปโคลนในพลาสมิด พลาสมิดลูกผสมที่ได้นำไปหาลำดับเบส ได้ผลเป็นลำดับเบสดังแสดงในภาพที่ 4.2 และ 4.3 เมื่อนำลำดับเบสที่ได้มานี้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนเดียวกันในฐานข้อมูล GenBank พบว่าชิ้นส่วนยีน *LeAPL1* ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีลำดับเบสที่แตกต่างไปจากฐานข้อมูลจำนวน 3 คู่เบส ได้แก่คู่เบสตำแหน่งที่ 563, 680 และ 754 ที่เป็นเบส C, A และ A ในชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่โคลนได้ ในขณะที่คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในตำแหน่งดังกล่าวในฐานข้อมูลเป็นเบส T, G และ G ตามลำดับ สำหรับยีน *LeAPS* พบว่ามีคู่เบสตำแหน่งที่ 575 และ 769 ที่เป็นเบส A และ C ในชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้ แต่เป็นเบส G และ G ในฐานข้อมูล ตามลำดับ

ATGGCGCTGCGGATTGAGGGGAGGATCACGCTGCCTGCCGCGCGTCTAGAGACGGAGC
GTGTAGGATGCTTCCGACGAGGGGAGATAATGGGAGAGAAGGTCAGGTGCGTGGATTT
CTCCGGCGCTGGCCATCGGAGAATGGGAGGGGTTTCTCTGCGCCGGAGTTTGCCGCGC
ATGTCCATCGCCACCGAGTTGCCGGACGAGATCGCGTTCAAGGATATAGAAATGGAAA
GGAGAAATCCTAGATCCGTCGTGGCGATCATCCTCGGCGGCGGCGCCGGAACCCGTCT
CTTCCCGCTTACCAAGCAGAGGGCCAAGCCAGCCGTGCCCATCGGCGGAGCATACAGA
CTGATCGACGTCCCGATGAGCAACTGCATCAACAGCGGTCTAAATAAAGTGTACATCC
TCACCCAGTTCAACTCCGCTTCACTCAACCGGCATCTGGCGAGGACCTACAACCTGGG
CAATGGAGTGAACTTCGGAGACGGTTTTGTGGAGGTTCTTGCAGCAACTCAGACTCCA
GGCGAAGCAGGGCAGAGGTGGTTCCAAGGAACTGCAGATGCAGTTCGCCAGTTTCACT
GGCTCTTTGAGGACGCAAGAGCTAAAGACATTGAGGACGTATTGATCCTCTCTGGTGA
TCATCTCTACCGTATGGATTATATGGACTTCGTTCAGAGACATCGACAAAGCGGAGCT
GACATCACTATTTCCTGCCTTCCCATGGACGACAGCCGTGCATCGGATTTCGGTTTGA
TGAAGATTGACAACAAAGGGAGGGTATTATCCTTCAGCGAAAAACCCAAAGGAGATGA
GCTGAAGGCAATGGAAGTGGATACGACTGTTCTGGGACTTTCGCGGGATGAGGCCCAA
AAGAAACCCTACATTGCCTCCATGGGCATATACGTCTTCAAAAAGGAGCTGCTTCTGA
ATCTGCTGAGATGGCGTTTTCCTACTGCAAATGATTTCGGGTCCGAAATCATCCCTGC
ATCTGCAAAGGAGTACTTCATTAAGGCATACTTGTTTAACGAGTACTGGGAGGACATA
GGGACGATCAAATCCTTCTTCGAAGCGAACCTCGCGCTCACCGCGCACCCGCCGCGCT
TCAGCTTCTATGACGCTGCAAAGCCCATCTATACATCGAGGAGGAATCTCCCGCCGTC
AAAGTTTGACAACAGCAAGATCGTGGACTCCATAGTCTCCCACGGCAGCTTCCTCGAC
AACTGCGTCGTGGAACATAGCGTCGTCGGCATCCGCTCTCGCATCAACGCAAACGTGC
ACTTGAAGGACGTCGTCATGCTCGGCGCGGACTACTACGAGACGGAAGATGAAGTGGC
CTCCTTGATCTCCGAAGGAAGGGTCCCCATAGGAATCGGAGAGAACTCGAAGATCAGG
AACTGCATCATCGACAAGAACGCGCGGATCGGAAAGAATGTCGATATTTCTAACACAG
AGGGAATCCAAGAAGCCGAAAGAACTTCGGAAGGGTTTTACATCCGGTCCGGCATTAC
CGTCGTCCTCAAGAACTCGACGATAAAGGATGGCCTTGTCATCTGA

ภาพที่ 4.2 ลำดับเบสของยีน *LeAPL1*

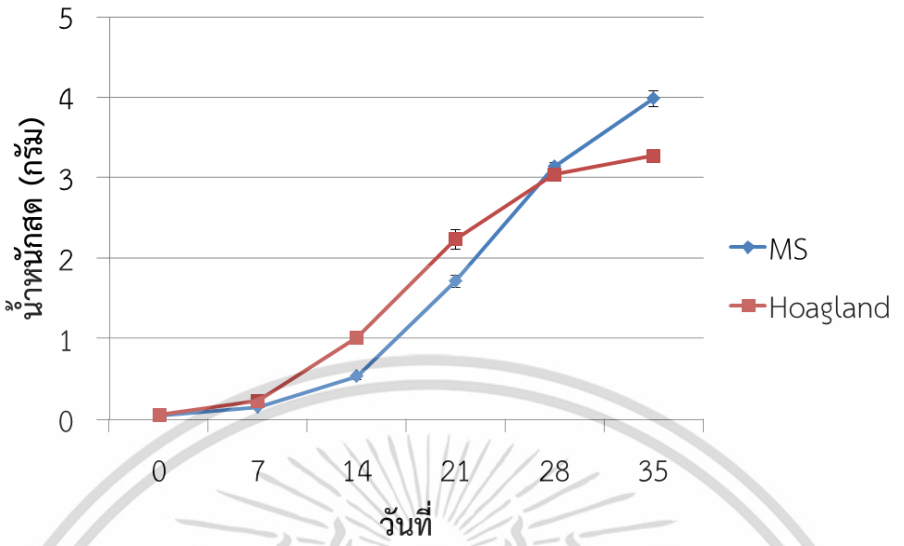
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ATGGCGGCGACGAGCTTCTCCGGCGTTGCGCCTCGCTTTGGCTCCGTTGATTCTACCTCCG
CTCGTACTGTCAGCGGCGGAGTCGCCTTCTTGAGATCTTCGAACCGGAATCTGTCGGCAGC
GTCGTCGTCGCTTGTTGCAGGGGAGTTGAGGCTTTCGTCATCTGTTTCTCGGAGCCGCGGG
AACGCGTCTGTTGTCCGTGCGCCGATCGTCGTCTCCCCTAAGGCTGTTTCTGACTCCAAAA
GCTCGCAGACTTGTCTCGATCCCGAGGCCAGCAAGAGTGTCTTGGGAATTATCCTTGGTGG
TGGAGCTGGAACTCGCCTGTATCCATTAACCAAGAAGAGAGCAAAGCCTGCCGTTCCATTG
GGAGCTAATTACCGTCTGATTGATATCCCTGTCAGCAACTGCTTGAACAGCAACATTTCAA
AAATATACGTGCTTACTCAATTCAACTCTGCTTCTCTCAACCGTCACCTTTCACGGGCATA
TGGTAACAACATTGGCGGATACAAGAATGAAGGTTTTGTGGAAGTCCTCGCCGCTCAGCAG
AGCCCAGAAAACCCTAACTGGTTTCAGGGAACGGCTGATGCAGTCAGACAGTATCTGTGGC
TTTTTGAGGAGCATGATGTGATGGAATTCTTAATTCTTGCTGGAGATCACTTGTATCGCAT
GGATTATGAGAGGTTTATTCAAGCCCACAGAGAAACAGATGCTGACATCACCGTAGCAGCC
CTCCCGATGGATGAAAAGCGGGCCACAGCATTTGGCCTGATGAAAATAGATGAAGAAGGGC
GGATCATTGAATTTGCCGAGAAGCCAAAGGGAGAGCACCTCAAAGCAATGAAGGTTGATAC
AACAATATTAGGCTTGGACGATGAGAGAGCTAAAGAACTGCCTTTCATTGCAAGTATGGGT
ATCTATGTTGTCAGCAAGGATGTGATGCTCAACCTTCTAAGTAATGAATTCCCTGGGGCAA
ATGACTTTGGAAGCGAAGTCATTCCCGGTGCAACTTCAATTGGGTTGAGAGTTCAAGCCTA
CTTGTTTGATGGGTACTGGGAAGACATTGGAACCATCGAAGCCTTCTACAACGCGAATCTT
GGGATCACTAAGAAACCCGTCCCAGATTTCAGCTTCTATGATCGGTCATCTCCAATCTACA
CTCAACCTCGATATCTCCCACCTTCCAAGATGCTCGATGCCGATGTCACCGACAGTGTGAT
TGGTGAAGGATGCGTGATTAAGAACTGCAAGATTCATCATTCTGTCGTCGGCCTTCGCTCC
TACATCTCTGAAGGTGCGGTCATAGAAGACACCCTGCTCATGGGAGCCGATTACTATGAGA
CGGATGCAGACAAGAGATTCCTTGCCGCAAAGGGCAGTGTCCCTATCGGAATAGGGAAGAA
CACACACATCAAGAAGGCAATTATCGATAAGAATGCTCGGATTGGGGAGAATGTGAAGATT
GTCAACGCGGACAACATACAGGAAGCTGCAAGGGAAACCGACGGATACTTCATCAAGAGCG
GGATTGTCACCATCATCAAGGATGCTCTGATCCCTAGCGGAACCATCATATA

ภาพที่ 4.3 ลำดับเบสของยีน *LeAPL1*

ต้นไม้ที่เพิ่มปริมาณได้ถูกนำมาทดสอบการเจริญเติบโตโดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และ Hoagland ผลการทดลองพบว่าในช่วงระยะเวลา 35 วันนั้นน้ำหนักสดของต้นไม้ในอาหารทั้ง 2 สูตรเพิ่มขึ้นไม่ต่างกันจนกระทั่งถึงวันที่ 7 ของการทดลอง หลังจากนั้นต้นไม้ในอาหารสูตร Hoagland มีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นมากกว่าต้นไม้ในอาหารสูตร MS อย่างไรก็ดีในวันที่ 28 ของการทดลองพบว่าต้นไม้ในอาหารทั้ง 2 สูตรมีน้ำหนักที่ไม่แตกต่างกัน ภายหลังจากนั้นการน้ำหนักสดของต้นไม้ในอาหาร Hoagland เพิ่มขึ้นอีกเพียงเล็กน้อยจนถึงวันที่ 35 ของการทดลอง ในขณะที่ต้นไม้ในอาหารสูตร MS ยังคงมีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นต่อเนื่องจนกระทั่งมีน้ำหนักสดสูงกว่าต้นไม้ในอาหารสูตร Hoagland ในวันที่ 35 ของการทดลอง (ภาพที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

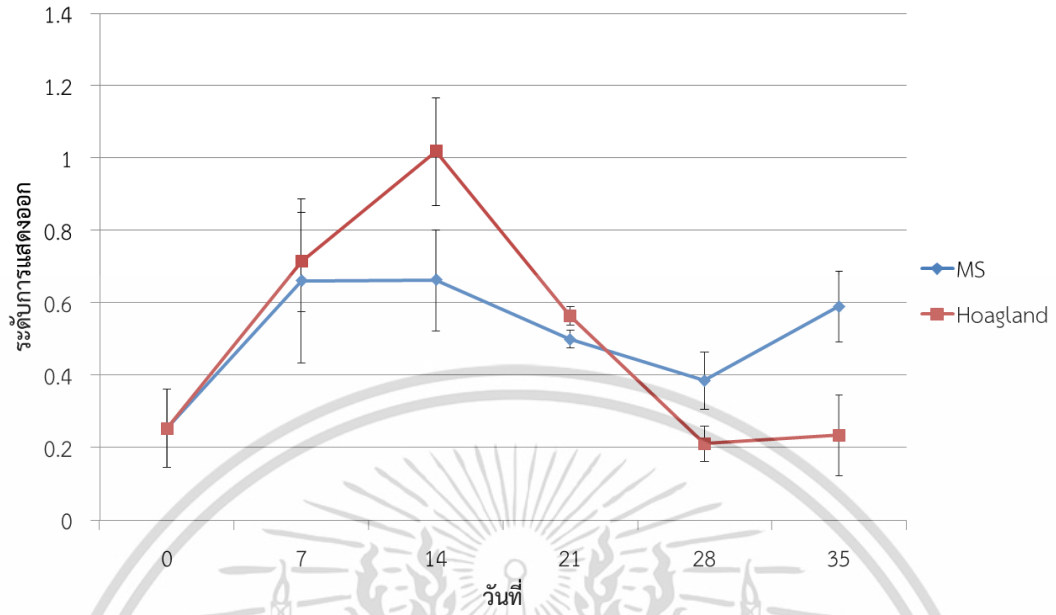


ภาพที่ 4.4 น้ำหนักสดของ *L. punctata* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS และ Hoagland error bar คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

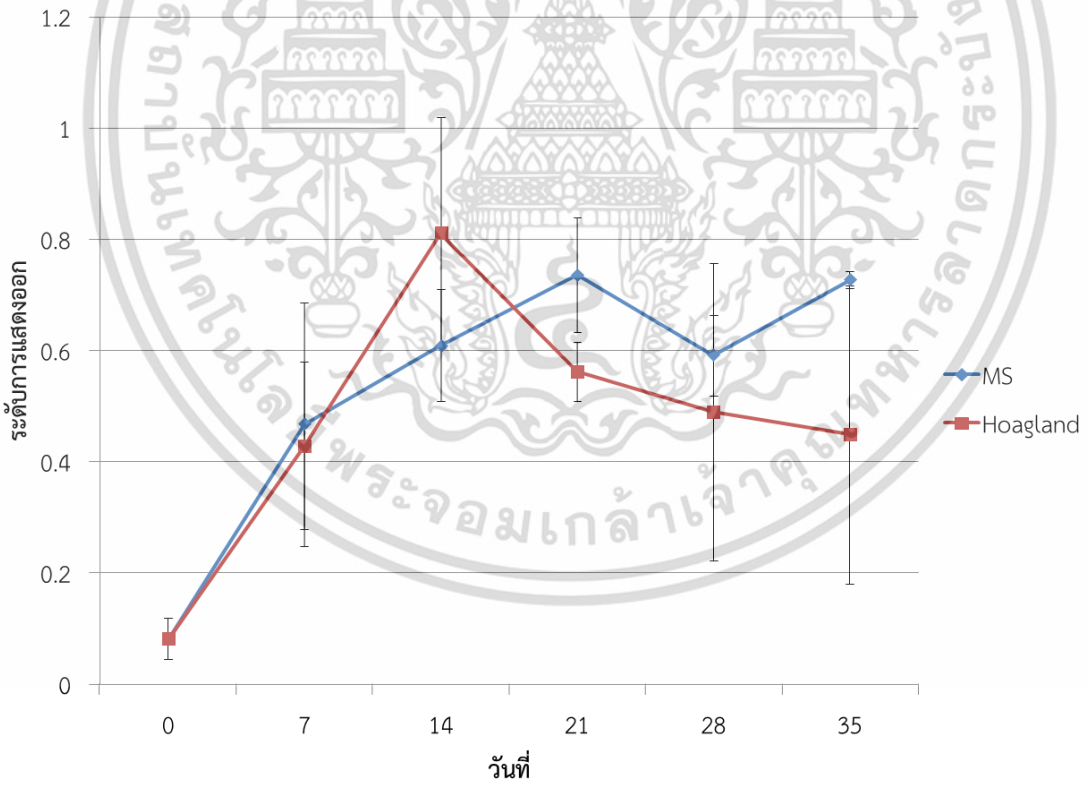
การทดลองต่อมาคือการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *LeAPL1* และ *LeAPS* ในต้นไม้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง 2 สูตรในช่วงเวลาการเพาะเลี้ยง 35 วัน ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีน *LeAPL1* ของต้นไม้ในอาหารเพาะเลี้ยง Hoagland และ MS ไม่แตกต่างกันจนถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง ต้นไม้ในอาหาร Hoagland มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวสูงกว่าในอาหาร MS จากนั้นการแสดงออกของยีนในต้นไม้ทั้ง 2 กลุ่มมีระดับลดลงจนกระทั่งถึงวันที่ 28 ของการทดลอง ที่วันนี้ระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่อยู่ในอาหาร MS กลับมามีระดับการแสดงออกที่สูงกว่ากลุ่มในอาหาร Hoagland และยังคงสูงกว่าจนกระทั่งถึงวันที่ 35 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 4.5)

ในส่วนของการแสดงออกของยีน *LeAPS* นั้นพบว่าระดับการแสดงออกมีลักษณะคล้ายคลึงกับการแสดงออกของยีน *LeAPL1* จนถึงวันที่ 14 กล่าวคือต้นไม้ในอาหารทั้ง 2 สูตรมีระดับการแสดงออกที่ใกล้เคียงกันจนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง จากนั้นพบว่ากลุ่มที่อยู่ในอาหาร Hoagland มีระดับการแสดงออกที่สูงกว่ากลุ่มในอาหาร MS ในวันที่ 14 อย่างไรก็ดีการแสดงออกของยีนนี้ในกลุ่มทดลองในอาหาร MS ยังคงมีระดับการแสดงออกที่สูงขึ้นจนถึงวันที่ 21 แล้วมีการแสดงออกลดลงในวันที่ 28 จากนั้นจึงมีการแสดงออกสูงขึ้นอีกครั้งจนถึงวันที่ 35 ในทางตรงกันข้ามกลุ่มที่อยู่ในอาหาร Hoagland มีการแสดงออกลดลงอย่างต่อเนื่องภายหลังจากวันที่ 14 จนถึงวันที่ 35 ของการเพาะเลี้ยง และมีระดับการแสดงออกที่ต่ำกว่ากลุ่มในอาหาร MS ในช่วงวันที่ 21 ถึงวันที่ 35 ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 ระดับการแสดงออกของยีน *LeAPL1* ของ *L. punctata* ในอาหารเพาะเลี้ยง MS และ Hoagland error bar คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 4.6 ระดับการแสดงออกของยีน *LeAPS* ของ *L. punctata* ในอาหารเพาะเลี้ยง MS และ Hoagland error bar คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

แหนที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติในงานวิจัยนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับลักษณะของพืชชนิด *L. punctata* การศึกษาลำดับเบสของยีน *LeAPL1* และ *LeAPS* พบว่ามีคู่เบสที่แตกต่างไปจากลำดับเบสในฐานข้อมูลจำนวน 3 และ 2 คู่เบสในยีนดังกล่าว ตามลำดับ การศึกษาผลของอาหารต่อน้ำหนักสดของต้นไม้พบว่าอาหาร Hoagland ช่วยให้ต้นไม้มีน้ำหนักสดสูงกว่าอาหาร MS จนถึงวันที่ 21 ของการทดลอง ในขณะที่อาหาร MS ช่วยให้ต้นไม้มีน้ำหนักสดสูงกว่าในวันที่ 32 ของการทดลอง การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *LeAPL1* และ *LeAPS* ของต้นไม้ทั้ง 2 กลุ่มพบว่าอาหารมีผลต่อระดับการแสดงออกของยีน โดยอาหาร Hoagland ช่วยให้ยีนมีการแสดงออกสูงขึ้นจนถึงวันที่ 14 แต่อาหาร MS ช่วยคงระดับการแสดงออกของยีนได้จนถึงวันที่ 35 ของการทดลอง

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาปริมาณแป้งในต้นไม้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง 2 สูตรเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโต ปริมาณแป้ง และระดับการแสดงออกของยีน *LeAPL1* และ *LeAPS* การศึกษาเพิ่มเติมนี้จะช่วยให้ทราบว่าปัจจัยทางด้านอาหารเพาะเลี้ยงมีความสัมพันธ์กับดัชนีชี้วัดทั้ง 3 ด้านนี้หรือไม่

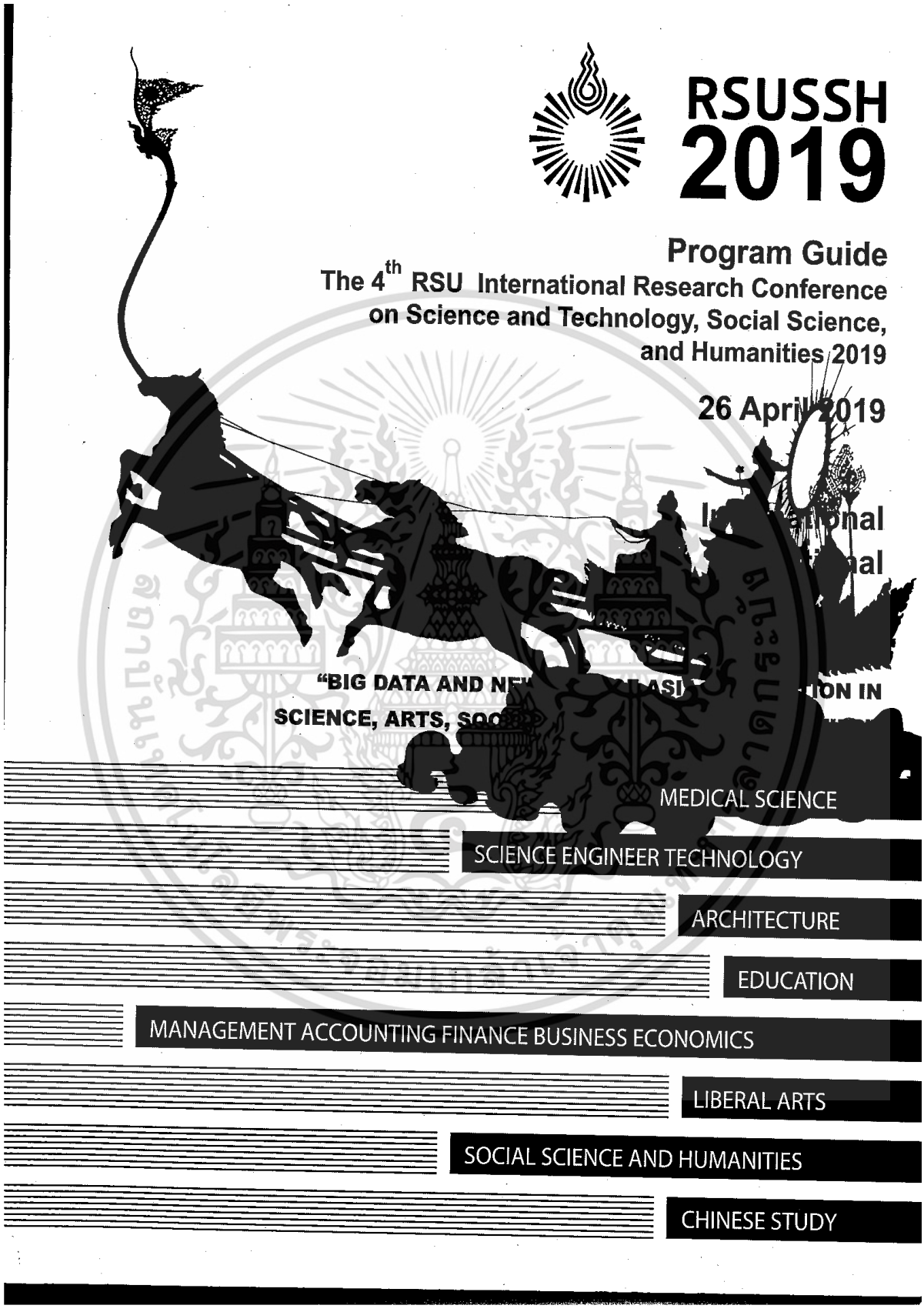
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลผลิตงานวิจัย

6.1 สรุปรายชื่อและรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้

6.1.1 การนำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ The 4th RSU National and International Research Conference on Science and Technology, Social Science, and Humanities 2019 ณ มหาวิทยาลัยรังสิต ในหัวข้อ New primer for quantitation of *Landoltia punctata ADP-glucose pyrophosphorylase 1* (*LeAPL1*) cDNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

RSUSSH 2019

RSUSSH 2019 POSTER PRESENTATION

	Presentation time	POSTER ID	POSTER SESSION (2nd Floor, Student Center)		
G2	10.30-12.45 am	P-IN19-068	Dyeing and Water Repellent Finishing of Thai Rice Straw Blended Fabric for Home Textile Products	**Srikanjana Jatuphatwarodom**	Faculty of Home Economics Technology,Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Thailand
G2	10.30-12.45 am	P-IN19-101	Effect of Plant Compounds on in vitro Tyrosinase Activity and Cell Viability of B16F10 Melanoma Cells	**Ponglada Sadangrit**, Preecha Phuwapraisirisan, Songchan Puthong, et al	Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand
G2	10.30-12.45 am	P-IN19-182	The Study of Dynamic Properties and Interactions of the Complex of L76V Mutant and Wild-type HIV-1 Protease with Curcumin	**Ornjira Aruksakunwong**	Faculty of Science, Rangsit University, Thailand
G4	10.30-12.45 am	P-IN19-023	New primers for quantitation of Landoltia punctata ADP-glucose pyrophosphorylase 1 (LeAPL1) cDNA	**Chokchai kittiwongwattana**	Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand
G4	10.30-12.45 am	P-IN19-041	Recombinant protein production of von Willebrand factor type D domain of Fenneropenaeus merguiensis vitellogenin	**Prapaporn Utarabhand**, Pattamaporn Kwankaew, Ratiporn Thongsoi, et al	Faculty of Science, Prince of Songkla University, Thailand
G4	10.30-12.45 am	P-IN19-058	The analysis of tartaric acid from non-fractionalized extract of the star fruits using HPLC-RI detector	**Arunrat Sunthtikawinsakul**, Rapeepan Kongtoom, Rungtiwa Chidthong	Faculty of Science and Technology, Nakhon Pathom Rajabhat University, Thailand
G4	10.30-12.45 am	P-IN19-070	Identifying Sensory Consumer Perceptions of Cooked Thai Jasmine Rice from Each Northeastern Provinces, Thailand	**Kritsda Khajarern**, Rapeepan Kongtoom, Rungtiwa Chidthong	Faculty of Applied Science and Engineering, Khon Kaen University, Thailand
G4	10.30-12.45 am	P-IN19-102	Antifungal and antioxidant activities of the extract of Stephania pierrei tubers	**Agarat Kamcharoen**, Sirilak Kamonwannasit, Quanjai Rupitak	Faculty of Agricultural Technology, Burapha University, Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

New primers for quantitation of *Landoltia punctata ADP-glucose pyrophosphorylase 1* (*LeAPL1*) cDNA

Chokchai Kittiwongwattana
Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand

Abstract

In this study, APL1Q-F1 and APL1Q-R1 primers were developed for the quantitative PCR (qPCR) assay of LeAPL1. Total RNA was extracted from axenically grown L. punctata and used for cDNA synthesis. The primers were used for the amplification of LeAPL1 with standard cDNA solutions at various concentrations in order to generate the standard curve for the determination of their efficiency. Based on the regression analysis, the slope was -3.296 while the R2 value equaled 0.999. The calculated efficiency of the primer pair was 102.21%. This level of efficiency fell in the acceptable range for the qPCR assay. It also suggested the primers were appropriate for the gene expression analysis of the LeAPL1 gene in future studies.

Introduction

When investigated, the sequences of *LeAPL1*-F and *LeAPL1*-R primers (Zhao et al., 2015) did not match with that of the cDNA sequence available on the database. This mismatch could be problematic during the amplification process since the primers may not bind to the target cDNA correctly. Additionally, the qPCR primer efficiency of *LeAPL1*-F and *LeAPL1*-R was not reported. In the present study, new primers APL1Q-F1 (5'-AGAACTC GAAGATCAGGAACTGC-3') and APL1Q-R1 (5'-TCTTTCGGCTTCTTGGATTCCCTC-3') were developed based on the sequence of the *LeAPL1* gene. Amplification of *LeAPL1* cDNA with the primers was tested, and the qPCR primer efficiency was determined. The results obtained in the present study indicated that the primers could be effectively used for further study in the gene expression analysis of *L. punctata*.

Materials and Methods

Morphological characterization of duckweed samples

↓

Establishment of axenic culture in Hoagland's medium

↓

Primer design, RNA extraction and cDNA synthesis

↓

Measurement of *LeAPL1* cDNA by quantitative PCR

↓

Determination of Primer efficiency from the formula below:

Primer efficiency = $-1+10^{(-1/\text{slope})}$

Results and Discussion

Collected duckweed produced fronds with dorsal paillae (Fig.1A) and multiple roots (Fig.1B) on the upper and lower sides, respectively. They were consistent with characteristics of *L. punctata* (Les et al., 1997). The axenic culture is shown in Figure 1C.

Figure 1 Frond characteristics (A,B) and the axenic culture of *L. punctata*

The new primers APL1Q-F1 and APLQ-R1 aligned to the 3' region of *LeAPL1* CDS (1,554 bp) at positions 1,376 to 1,398 and 1,450 to 1,473, respectively (Figure 2).

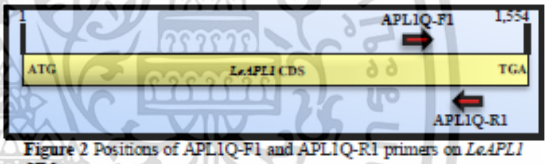


Figure 2 Positions of APL1Q-F1 and APL1Q-R1 primers on *LeAPL1* CDS

The amplification curve and the melt-curve analysis are shown in Figure 3A and 3B, respectively. The R^2 and calculated primer efficiency values were 0.999 and 102.21% based on the standard curve analysis (Figure 3C). These values were in the acceptable range for quantitative PCR assays (Bustin & Huggett, 2017).

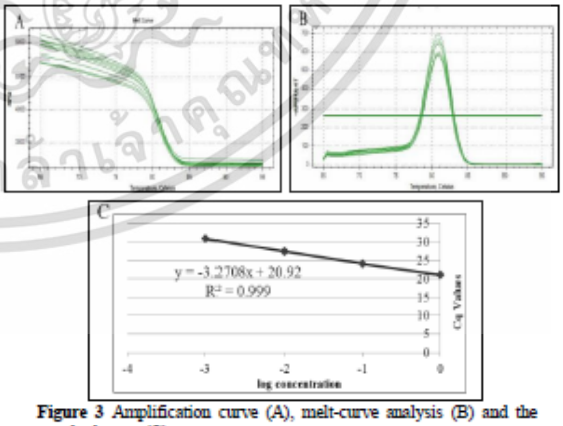


Figure 3 Amplification curve (A), melt-curve analysis (B) and the standard curve (C)

References

- Zhao et al. (2015). Plant Physiology and Biochemistry, 86, 72-81.
- Les et al. (1997). Plant Systematics and Evolution, 204, 161-177.
- Bustin, & Huggett. (2017). Biomolecular Detection and Quantification. 14, 19-28.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย

รายการ	จำนวนเงิน (บาท)
1. งบประมาณที่ได้รับการอนุมัติ	
1.1 จำนวนเงินที่ได้รับงวดที่ 1	42,500
1.2 จำนวนเงินที่ได้รับงวดที่ 2	7,500
1.3 ดอกเบี้ยรายรับ	61.07
รวม	**50,061.07**
2. ค่าใช้จ่าย	
2.1 ค่าใช้สอย	1,438.08
2.1 ค่าวัสดุ	48,614.52
รวม	**50,052.60**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Chokchai Kittiwongwattana
2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผศ.ดร.
3. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
   สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
   สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง
   ถ.ฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
   โทรศัพท์ 0-2329-8400 ต่อ 3600
   โทรสาร 0-329-8427
   E-mail: kkchokch@kmitl.ac.th
4. ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ.	ชีววิทยา	ม. เกษตรศาสตร์	2546
วท.ม.	พันธุศาสตร์	ม. เกษตรศาสตร์	2548
Ph.D.	Plant Biology	Rutgers University, USA	2553

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
พันธุศาสตร์ของพืชและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาทางชีววิทยาของพืชทั้งในเชิงพื้นฐานและเชิงประยุกต์ เช่น การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ การทำพันธุวิศวกรรม เป็นต้น การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในการถ่ายฝากยีน

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

3.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -

3.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

-การคัดแยกและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่พบในพืชวงศ์ Lemnaceae (1 กุมภาพันธ์ 2555 - 31 มกราคม 2557; กองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)

-การศึกษาการผลิตเอธานอลจาก *Spirodela polyrrhiza* (1 ตุลาคม 2555 – 30 กันยายน 2556; ทุนวิจัย วช. ประจำปีงบประมาณ 2556)

3.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kittiwongwattana C., Lutz K., Clark M., Maliga, P. (2007) Plastid marker gene excision by the phi C31 phage sitespecific recombinase. Plant Molecular Biology. 64: 137-143

สถานภาพ: ผู้ร่วมวิจัยระหว่างการศึกษาระดับปริญญาเอก

Kittiwongwattana C. and Vuttipongchaikij S. (2013). Effects of nutrient media on vegetative growth of *Lemna minor* and *Landoltia punctata*. Maejo International Journal of Science and Technology. 7: 60-69. (impact factor = 0.456)

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

Kittiwongwattana C. and Thawai C. (2013). *Rhizobium paknamense* sp. nov., isolated from lesser duckweed (*Lemna aequinoctialis*). International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology. (impact factor = 2.112)

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

Kittiwongwattana C. and Thawai C. (2013). Biodiversity assessment of endophytic bacteria isolated from duckweed (*Lemna aequinoctialis*). Proceedings of the 3rd International Conference on Engineering, Applied Sciences, and Technology (ICEAST). (Accepted)

Kittiwongwattana C. and Thawai C. (2014). *Rhizobium lemae* sp. nov., a bacterial endophyte of *Lemna aequinoctialis*. International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology. (impact factor = 2.112)

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

3.4 งานวิจัย:

-การคัดแยกและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่พบในพืชวงศ์ Lemnaceae

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

แหล่งทุน: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ระยะเวลาโครงการวิจัย: 1 ก.พ. 2555 - 31 ม.ค. 2557

-การศึกษาการผลิตเอธานอลจาก *Spirodela polyrrhiza*

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

แหล่งทุน: ทุนวิจัย วช. ประจำปีงบประมาณ 2556

ระยะเวลาโครงการวิจัย: 1 ตุลาคม 2555 – 30 กันยายน 2556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้