

การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในดอกอ่อนเพศผู้และดอกอ่อนเพศเมียในสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) โดยใช้เทคนิค cDNA-AFLP

Comparison of gene expression in early male and female flower in *Jatropha curcas* L. using cDNA-AFLP technique

เกศินี กำพูฒ สมพิศ สามิภักดิ์*

Kesinee Kamput, Sompid Samipak*

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ ๑๐๙๐๐

Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding author: ssamipak@gmail.com

บทคัดย่อ

การค้นหายีนที่มีการแสดงออกต่างกัน ดอกอ่อนเพศผู้ และดอกอ่อนเพศเมีย แต่ไม่แสดงออกในยอดอ่อนหรือใบของสบู่ดำได้ดำเนินการด้วยเทคนิค cDNA-AFLP โดยตัด complementary DNA ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MseI* และใช้ไพรเมอร์ 64 คู่ ปริมาณชิ้นส่วนของยีน พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอ (transcript derived fragment-TDF) จำนวน 757 ชิ้น ที่ชัดเจนและทำซ้ำได้เหมือนเดิมจากไพรเมอร์จำนวน 41 คู่ โดยแบ่งเป็น TDFs ที่พบเฉพาะในใบอ่อนจำนวน 103 ชิ้น ที่พบเฉพาะในยอดอ่อน 117 ชิ้น ที่พบเฉพาะในดอกอ่อนเพศผู้ 112 ชิ้น และที่พบเฉพาะในดอกอ่อนเพศเมีย 68 ชิ้น โดยเฉลี่ยแล้วจะพบ TDFs จำนวน 18.5 ชิ้น ต่อไพรเมอร์ 1 คู่ ไพรเมอร์ A4C (M-CAT/E-AAC) เป็นคู่ไพรเมอร์ที่ให้ TDFs มากที่สุด คือ 30 ชิ้น ส่วนไพรเมอร์ D8C (M-CGT/E-AAC) ให้ TDFs น้อยที่สุด คือ 8 ชิ้น เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างดอกอ่อนเพศผู้และดอกอ่อนเพศเมียไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และตรวจสอบกับ expressed sequence tags database พบว่า TDFs มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างดอกในองุ่น *Vitis vinifera* ในต้นบีช *Fagus sylvatica* ในข้าวฟ่างหางหมา *Setaria italic* และในต้นเบิร์ช *Betula platyphylla*

ABSTRACT

To search for differentially expressed genes in male and female flowers that are not expressed in young stem or young leaf of *Jatropha curcas*, cDNA-AFLP was carried out. Using *EcoRI* and *MseI* enzymes and corresponding adaptors, Polymerase Chain Reactions were performed with 64 primer combinations but only 41 primer pairs were successfully amplified and gave consistent results across two replications. Total of 757 transcript derived fragments were received. Among these 103 TDFs were found only in young leaf, while 117 TDFs were found only in young stem. For the male flower, only 112 TDFs were found while as few as 68 TDFs were found only in female flower. On average one primer pair could detect 18.5 TDFs. The most informative primer pair was A4C (M-CAT/E-AAC) which could detect 30 TDFs while the least informative primer pair was A3C (M-CGT/E-AAC) which could detect only 8 TDFs. The TDF sequences were searched against the EST database and found high similarity to sequences involved with flower development in *Vitis vinifera*, *Fagus sylvatica*, *Setaria italic* and *Betula platyphylla*.

คำสำคัญ: สบู่ดำ; cDNA-AFLP; การสร้างดอก; ยีนที่แสดงออกต่างกัน; เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Keywords: *Jatropha curcas*; cDNA-AFLP; flower development; differentially expressed genes; DNA marker

บทนำ

สบู่ดำ (*Jatropha curcas*) หรือ physic nut เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เช่นเดียวกับพืชที่สำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยได้แก่ ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) และมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) (Makkar *et al.*, 1997) สบู่ดำเป็นพืชทนแล้งมีลักษณะเป็นไม้พุ่มหรือยืนต้นสูงได้ประมาณ 3-4 เมตร ในระยะเวลา 3 ปี (Augustus *et al.*, 2002) พบกระจายทั่วไปในพื้นที่เขตร้อน เช่น อเมริกาใต้ อเมริกากลาง แอฟริกา อินเดีย ไปจนถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สามารถขยายพันธุ์ได้ง่ายด้วยการปักชำ สมัยก่อนนิยมนำเมล็ดสบู่ดำมาบีบน้ำมันเพื่อใช้เติมตะเกียงหรือใช้ทำสบู่ ส่วนกากที่เหลือหลังจากการบีบน้ำมันแล้วสามารถนำไปใช้เลี้ยงสัตว์หรือทำปุ๋ยได้ (Gübitz *et al.*, 1999) ปัจจุบันความต้องการในการใช้เชื้อเพลิงมีมากขึ้น ประกอบกับจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้นแต่แหล่งน้ำมันดิบมีจำนวนจำกัด ทำให้ราคาน้ำมันขยับสูงขึ้น จึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนในการหาพลังงานในรูปแบบอื่นเพื่อมาเสริมการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล สบู่ดำเป็นพืชน้ำมันที่สามารถบีบน้ำมันออกจากเมล็ด และใส่เครื่องยนต์รถต่ำได้โดยตรง หากแต่การผลิตน้ำมันจากสบู่ดำยังไม่คุ้มต้นทุนในระดับอุตสาหกรรมเนื่องจากมีผลผลิตของเมล็ดสบู่ดำต่อไร่ต่ำและไม่แน่นอน โดยสามารถให้ผลผลิตได้ตั้งแต่ 62-1,847 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี (Achten *et al.*, 2008) ในขณะที่ปาล์มน้ำมันซึ่งเป็นพืชที่ผลิตน้ำมันที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งให้ปริมาณผลผลิตสูงสุดถึง 4,615 ตันต่อไร่ต่อปี (ในพันธุ์ Tenera) (Baryeh, 2001) ซึ่งมากกว่าสบู่ดำและพืชน้ำมันชนิดอื่น เช่น ถั่วเหลือง เมล็ดเรพ และทานตะวัน ประกอบกับราคาน้ำมันของพืชน้ำมันที่บริโภคได้เหล่านี้มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น (King *et al.*, 2009) จึงมีความเป็นไปได้ที่น้ำมันที่ไม่สามารถบริโภคได้จากสบู่ดำจะกลายเป็นทางเลือกสำคัญ (Openshaw, 2000) ดังนั้น

จึงจำเป็นต้องปรับปรุงสายพันธุ์สบู่ดำให้มีผลผลิตต่อไร่สูงขึ้น เพื่อพัฒนาไปสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้

สบู่ดำเป็นพืช monoecious โดยมีดอกเพศผู้และเพศเมียในช่อดอกเดียวกัน และในหนึ่งช่อดอกประกอบด้วยดอกเพศผู้มากกว่าเพศเมีย การที่ดอกเพศผู้และเพศเมียบานไม่พร้อมกัน ทำให้อัตราการผสมเกสรเกิดขึ้นได้น้อยและทำให้ได้ผลผลิตน้อยลงไปด้วย (Negussie *et al.*, 2014) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีกลุ่มของยีนควบคุมการเปลี่ยนจาก shoot apical meristem เป็น inflorescence meristem (IM) และไปกระตุ้นกลุ่มยีนที่เป็น floral meristem (FM) identity ที่ควบคุมการสร้างดอก ตัวอย่างยีนในกลุ่ม FM ได้แก่ LEAFY (LFY) และ APETALA1 (AP1) ยีนในกลุ่มนี้จะกระตุ้นยีนในกลุ่ม organ identity genes ให้เปลี่ยนแปลงจากเซลล์แรกเริ่มเป็นโครงสร้างของดอกสี่ส่วน ได้แก่ กลีบเลี้ยง กลีบดอก เกสรตัวผู้ และเกสรตัวเมีย การควบคุมส่วนต่าง ๆ ของดอกนั้นได้ถูกอธิบายด้วยโมเดล ABC การแบ่งเป็นวงต่างๆ ของดอกไม้อาศัยการทำงานร่วมกันของยีนสามกลุ่ม คือ ยีนกลุ่ม A ประกอบด้วยยีน (AP1) และ APETALA2 (AP2) ยีนกลุ่ม B ประกอบด้วยยีน APETALA3 (AP3) และ PISTILLATA (PI) ยีนกลุ่ม C คือยีน AGAMOUS (Bowman *et al.*, 1991; Coen and Meyerowitz, 1991) นอกเหนือจากยีน AP2 ที่เป็น ethylene response factor แล้วยีนในโมเดล ABC ทั้งหมดเป็น MICK^C-type MADS-domain transcription factors นอกจากนี้การทำงานของยีนเหล่านี้ยังขึ้นอยู่กับ MADS-domain transcription factor SEPALLATA1, 2, 3 และ 4 (SEP1 to SEP4) จึงได้มีการดัดแปลงโมเดลการสร้างดอกเป็นโมเดล ABCE ในภายหลัง (Ó'Maoiléidigh *et al.*, 2014)

ในแต่ละระยะของการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตพบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันไป โดยสามารถทราบได้จากการสร้างสาย mRNA ที่ต่างระยะเวลา ต่างปริมาณหรือในต่างเนื้อเยื่ออื่น ในปัจจุบันมีหลากหลายเทคนิคที่ใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน เช่น cDNA-amplified fragment length polymorphism (cDNA-AFLP), differential display หรือ cDNA-micro array โดยเทคนิค cDNA-AFLP นี้มีข้อดีคือ ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลของจีโนมมาก่อน สามารถทำได้รวดเร็ว

และใช้ในการตรวจหา ยีนที่แสดงออกในระยะต่างๆ หรือในภาวะต่างกันได้ (Bachem *et al.*, 1996) ที่ผ่านมามีการใช้เทคนิค cDNA-AFLP นี้ในการวิเคราะห์หา ยีนที่ถูกกระตุ้นด้วยอะลูมิเนียม โดยทำการสกัด RNA จากรากของข้าวพันธุ์ Azucena ซึ่งทนต่ออะลูมิเนียม และเปรียบเทียบกับรากของข้าวพันธุ์ IR1552 ที่อ่อนแอต่ออะลูมิเนียม พบว่า ยีนที่แสดงออกต่างกันคือ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลิกนิน และสารอื่นๆ เกี่ยวกับการสร้างผนังเซลล์ ในราก (Mao *et al.*, 2004) นอกจากนี้ในข้าวบาร์เลย์ ยังใช้เทคนิคนี้ในการวิเคราะห์หา ยีนที่เกี่ยวข้องกับการพักตัวของเมล็ด โดยทำการเปรียบเทียบ cDNA ที่สกัดจากเมล็ดที่อยู่และไม่อยู่ในระยะพักตัว โดยเมล็ดทั้งสองชนิดที่ถูกนำไปแช่น้ำ เพื่อกระตุ้นการงอกพบยีน 7 ยีนที่แสดงออกในปริมาณที่ต่างกันระหว่างเมล็ดที่อยู่และไม่อยู่ในระยะพักตัว (Leymarie *et al.*, 2007) ในงานวิจัยนี้เทคนิค cDNA-AFLP ได้ถูกนำมาใช้เพื่อศึกษา ยีนที่แสดงออกต่างกัน ในดอกอ่อนเพศผู้และดอกอ่อนเพศเมีย แต่ไม่พบในใบอ่อนและยอดอ่อนของสับดูต้า โดยคาดหวังว่าจะค้นพบยีนที่จำเพาะต่อการพัฒนาเป็นดอกเพศผู้หรือเพศเมีย แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของส่วนอื่นๆ ในต้น ข้อมูลเหล่านี้เป็นข้อมูลสำคัญ เพื่อจะนำไปพัฒนาสายพันธุ์สับดูต้าในอนาคตโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างและการสกัดอาร์เอ็นเอ

จากแปลงปลูกสับดูต้าที่ อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม ได้เก็บตัวอย่างของเนื้อเยื่อสับดูต้าสายพันธุ์ Anna-16 จากสับดูต้า 3 ต้นที่เป็นกิ่งปักชำ มีการปลูกในที่โล่ง มีการให้น้ำเพิ่มเติมอย่างพอเพียง โดยมีรายละเอียด ดังนี้ ดอกอ่อนเพศผู้ขนาด 1-3 มิลลิเมตร ดอกอ่อนเพศเมียขนาด 1-3 มิลลิเมตร ใบอ่อนขนาด 0-1 เซนติเมตร และยอดอ่อนขนาด 1-5 มิลลิเมตร โดยตัดด้วยใบมีดและแช่ตัวอย่างในไนโตรเจนเหลว จากนั้นสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างด้วย GF-1 Total RNA Extraction Kit (Vivantis, Eco-Life Science, Kowloon, Hong Kong) แล้วละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ใน RNase free water หลังจากนั้นตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis (Sambrook and Russell, 2001)

การสังเคราะห์ cDNA และตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างโดยเทคนิค cDNA-AFLP

สังเคราะห์ cDNA โดยใช้ Oligo d(T)₁₈ ไพริเมอร์ในชุด Viva 2-steps RT-PCR Kit (Vivantis) แล้วตรวจสอบคุณภาพของ cDNA ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพริเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน actin แล้วตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis (ไม่ได้แสดงผล) หลังจากนั้นตัด cDNA ด้วยเอนไซม์ EcoRI และ MseI (Fermentas, USA) และเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดกับ EcoRI adaptor และ MseI adaptor (ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงใน Table 1 และ 2) จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอชิ้นแรก (preselective amplification) ด้วยการทำ PCR โดยใช้ preselective primers (MseI+C และ EcoRI+A) ในเครื่อง Lifepro Thermal cycler (Bioer, USA) โดยมีรายละเอียดดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส 60 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที และนำผลผลิตจาก PCR นี้มาใช้เป็นต้นแบบในการทำ selective amplification โดยใช้ selective primers (EcoRI+3 และ MseI+3 ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงใน Table 1 และ 2) โดยสลับคู่ไพริเมอร์ได้ไพริเมอร์จำนวน 64 คู่ดังแสดงใน Table 3 โดยทำ PCR แบบ touch down ที่ลดอุณหภูมิในขั้น annealing ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียสจาก annealing ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็น 56 องศาเซลเซียส แล้วต่อด้วย 23 รอบของ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จากนั้นตรวจสอบผล PCR ด้วย 6% polyacrylamide gel electrophoresis และย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ในการวิจัยนี้ได้ทำการ PCR 2 ครั้ง จากตัวอย่างเดียวกัน

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่มี การแสดงออกแตกต่างกันในดอกอ่อนเพศผู้และดอกอ่อนเพศเมีย

จากการตรวจสอบบน polyacrylamide gel พบชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันระหว่างดอกอ่อนเพศผู้และดอกอ่อนเพศเมีย แต่ไม่พบในใบอ่อนและยอดอ่อนที่มีขนาดมากกว่า 100 bp จะตัดออกมา แล้วสกัดดีเอ็นเอออกจากชิ้นเจลเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ PCR ร่วมกับ preselective primers ตามด้วย

Table 1 Sequence information of *MseI* adaptor and corresponding primers.

frequent cutter (<i>MseI</i>)	Nucleotide sequence
<i>MseI</i> adaptor	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3'
<i>MseI</i> +C	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3'
<i>MseI</i> +CAA	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACAA-3'
<i>MseI</i> +CAC	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACAC-3'
<i>MseI</i> +CAG	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACAG-3'
<i>MseI</i> +CAT	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACAT-3'
<i>MseI</i> +CGA	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACGA-3'
<i>MseI</i> +CGC	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACGC-3'
<i>MseI</i> +CGG	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACGG-3'
<i>MseI</i> +CGT	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACGT-3'

Table 2 Sequence information of *EcoRI* adaptor and corresponding primers.

rare cutter (<i>EcoRI</i>)	Nucleotide sequence
<i>EcoRI</i> adaptor	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3'
<i>EcoRI</i> +A	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'
<i>EcoRI</i> +AAC	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAAC-3'
<i>EcoRI</i> +ACC	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CACC-3'
<i>EcoRI</i> +AAG	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAAG-3'
<i>EcoRI</i> +ACA	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CACA-3'
<i>EcoRI</i> +AGC	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAGC-3'
<i>EcoRI</i> +AGA	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAGA-3'
<i>EcoRI</i> +AGT	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAGT-3'
<i>EcoRI</i> +AGG	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAGG-3'

Table 3 Selective PCR primer combination. Clear cells are combinations that were successfully amplified. Dark shaded cells are combinations that were not amplified or gave inconsistent results between two repetitions.

Combination	M-CAC	M-CAA	M-CAG	M-CAT	M-CGA	M-CGC	M-CGG	M-CGT
E-AAC	A1C	A2C	A3C	A4C	A5C	A6C	A7C	A8C
E-AAG	B1C	B2C	B3C	B4C	B5C	B6C	B7C	B8C
E-ACA	C1C	C2C	C3C	C4C	C5C	C6C	C7C	C8C
E-ACC	D1C	D2C	D3C	D4C	D5C	D6C	D7C	D8C
E-AGA	E1C	E2C	E3C	E4C	E5C	E6C	E7C	E8C
E-AGC	F1C	F2C	F3C	F4C	F5C	F6C	F7C	F8C
E-AGG	G1C	G2C	G3C	G4C	G5C	G6C	G7C	G8C
E-AGT	H1C	H2C	H3C	H4C	H5C	H6C	H7C	H8C

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เข้ากับ pGEM®-T Easy (Promega, Madison, USA) เวกเตอร์และถ่ายพลาสมิดเข้าไปใน *Escherichia coli* DH5 alpha ด้วยการทำ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ทำการเลี้ยงบนอาหารแข็ง LA ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ได้มีการเกลี่ย IPTG และ X-Gal ไว้แล้ว เลือกโคโลนีสีขาวมาสกัดพลาสมิดโดยใช้ AxyPrep™ Plasmid Extraction Kit (Axygen, USA) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Macrogen, Inc., Seoul, South Korea) และนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตรวจสอบในฐานข้อมูล GenBank

ผลการทดลองและวิจารณ์

ในการศึกษาความแตกต่างของการแสดงออกของยีนโดยวิธี cDNA-AFLP ใน ใบอ่อน ยอดอ่อน ดอกอ่อนเพศผู้ และดอกอ่อนเพศเมียของสบู่ดำ ด้วยไพรเมอร์ 64 คู่ พบว่า มีไพรเมอร์ 41 คู่ ที่ให้ผลชัดเจน และเหมือนกันในทั้งสองซ้ำของการทดลองดังแสดงใน Figure 1 ซึ่งเป็นการทำ PCR 2 ครั้งโดยไพรเมอร์คู่ B6C ของตัวอย่างดอกอ่อนเพศเมีย เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีการแสดงออกจำเพาะในเนื้อเยื่อนี้ ส่วนตัวอย่างชิ้นดีเอ็นเอที่

เป็น monomorphic นั้นพบในทุกตัวอย่าง จะเห็นได้ว่าผลของการทำ PCR ทั้งสองครั้งให้ผลใกล้เคียงกัน โดยได้ TDFs ทั้งหมด 757 ชิ้น แบ่งเป็น TDFs ที่พบเฉพาะในยอดอ่อนจำนวนมากที่สุดคือ 117 ชิ้น ที่พบเฉพาะในใบอ่อน คือ 103 ชิ้น ที่พบเฉพาะในดอกอ่อนเพศผู้ 112 ชิ้น และที่พบเฉพาะในดอกอ่อนเพศเมียจำนวนน้อยที่สุดคือ 68 ชิ้น โดยเฉลี่ยแล้วจะพบ 18.5 TDFs ต่อไพรเมอร์ 1 คู่ ในจำนวนทั้งหมดพบ monomorphic TDFs ระหว่างส่วนของใบอ่อน ยอดอ่อน ดอกอ่อนเพศผู้และดอกอ่อนเพศเมียจำนวน 110 ชิ้น และมี TDFs ที่พบเฉพาะในใบอ่อนและยอดอ่อนจำนวน 38 ชิ้น TDFs พบเฉพาะในดอกอ่อนเพศผู้และดอกอ่อนเพศเมียจำนวน 19 ชิ้น ไพรเมอร์ โดย A4C (M-CAT/E-AAC) เป็นคู่ไพรเมอร์ที่ให้ TDFs มากที่สุดคือ 30 ชิ้น ส่วนไพรเมอร์คู่ D8C (M-CGT/E-AAC) ให้ TDFs น้อยที่สุดคือ 9 ชิ้นดีเอ็นเอ

เพื่อหาข้อมูลยีนที่แสดงออกแตกต่างกันระหว่างดอกอ่อนเพศผู้และดอกอ่อนเพศเมีย จึงคัดเลือกตัด TDFs ที่มีเฉพาะในดอกอ่อนเพศผู้หรือดอกอ่อนเพศเมียที่มีความชัดเจนและขนาดใหญ่กว่า 100 bp พบทั้งสิ้น 231 ชิ้น แบ่งเป็น TDFs ที่มีเฉพาะในดอกอ่อนเพศผู้จำนวน 106 ชิ้น และ TDFs ที่มีเฉพาะในดอกอ่อนเพศเมียจำนวน 125

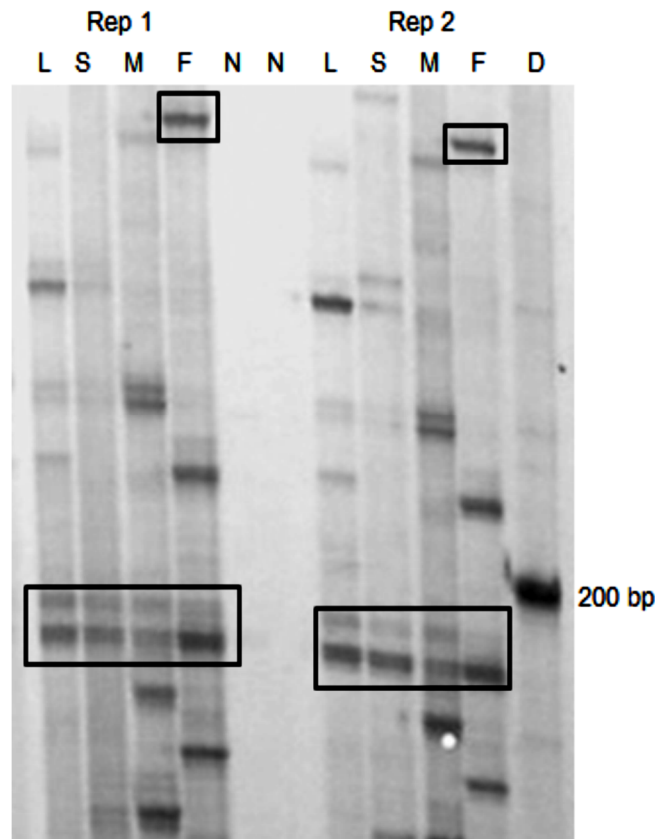


Figure 1 Polyacrylamide gel showing TDFs from B6C primer pair from 2 repetitions. L = young leaf, S = young stem, M = young male flower, F = young female flower, N = No sample loaded, D = 100 bp DNA ladder (Vivantis)

ชั้นแล้วสกัดชั้น DNA จากเจลและเพิ่มปริมาณ พบว่า TDFs ที่มีเฉพาะในดอกอ่อนเพศผู้สามารถเพิ่มปริมาณได้ 22 TDFs และ TDFs ที่มีเฉพาะในดอกอ่อนเพศเมียสามารถเพิ่มปริมาณได้ 31 TDFs หลังจากเชื่อมต่อกับเอ็นเอกับพลาสมิด pGEM®-T Easy และถ่ายฝากในแบคทีเรีย *E. coli* แล้วตรวจด้วยการทำโคลน PCR พบว่าได้ 3 โคลนจากกลุ่ม TDFs ที่มีเฉพาะในดอกอ่อนเพศผู้และ 14 โคลนจากกลุ่ม TDFs ที่มีเฉพาะในดอกอ่อนเพศเมีย ทำให้ได้ชั้นดีเอ็นเอ 17 ชั้นที่ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 10 ชั้นที่มีความคล้ายคลึงกับข้อมูลของ ESTs ในฐานข้อมูล Genbank จำนวน 15 accessions ดังแสดงใน Table 4

ผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชั้นดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในดอกอ่อนเพศผู้หรือดอกอ่อนเพศเมียในสปีดกับข้อมูล ESTs ใน Genbank พบว่ามีความใกล้เคียงกับ cDNA ของพืชจำนวน 11 ชนิด ได้แก่ องุ่น *Vitis vinifera* (พบ 2 ชั้นและเกี่ยวข้องกับการสร้างช่อดอกและผลอ่อน), ต้นบีช *Fagus sylvatica* (พบ 1 ชั้น

และเกี่ยวข้องกับการสร้างตาดอก), ข้าวฟ่างหางหมา *Setaria italic* (พบ 1 ชั้นและเกี่ยวข้องกับการช่อดอก), ข้าวฟ่างหางช้าง *Sorghum bicolor* (พบ 1 ชั้นและมีการแสดงออกในต้นกล้า), ต้นโมก *Wrightia tinctoria* (พบ 1 ชั้นและเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของต้นอ่อน), เปะก๊วย *Ginkgo biloba* (พบ 1 ชั้นและมีการแสดงออกในใบ), มันสำปะหลัง *Manihot esculenta* (พบ 2 ชั้นและเกี่ยวข้องกับการสร้างรากสะสมอาหาร), ต้นเบิร์ช *Betula platyphylla* (พบ 1 ชั้นและมีการแสดงออกในช่วงแรกของการสร้างช่อดอกเพศผู้), ต้นไม้ในทะเลทราย *Cistus incanus* (พบ 1 ชั้นและมีการแสดงออกเมื่อมีการเข้าอยู่ของ mycorrhiza ในราก), ส้ม *Citrus reticulata* (พบ 1 ชั้นและมีการแสดงออกในใบเมื่อมีการเป็นโรคจากแบคทีเรีย), ชะเอมจีน *Glycyrrhiza uralensis* (พบ 1 ชั้น) นอกจากนี้ชั้นดีเอ็นเอมีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา 2 ชนิดคือ *Thermomyces lanuginosus* (E-value 0.056) ซึ่งเป็นเชื้อราที่เจอทั่วไปในดินและต้นไม้ สามารถเข้าทำลายต้นไม้โดยการย่อยผนังเซลล์ และ *Saitoella complicate*

Table 4 Nucleotide homology of TDFs with reported sequences in public database.

TDF#	AFLP fragment	dbEST_Id	GenBank acc. #	Similarity	E-value
1	F2C2C9-20	77577874	DV217687.1	cDNA library from <i>Vitis vinifera</i> immature inflorescences at stage 12	2.4
		30298005	CB974799.1	cDNA library from <i>Vitis vinifera</i> Cabernet Sauvignon berries stage I (17 days after blooming)	2.4
		299860549	FR602185.1	cDNA library from <i>Fagus sylvatica</i> (บีช) setting buds harvested on 3 adult plants located in the Ciron Valley (France)	8.4
2	F3G7C4-18	349684482	JK607521.1	cDNA library from <i>Setaria italic</i> cv. Yugu1 (Foxtail millet หรือข้าวฟ่างหางหมา) from floral spike	0.69
		6859183	AW287259.2	cDNA library from <i>Sorghum bicolor</i> (ข้าวฟ่างหางช้าง หรือ ข้าวฟ่างสมุทรโคดม) 10- to 14-day-old light-grown (greenhouse) seedlings	8.4
3	F5C8C9-5	315400113	HS564453.1	cDNA library from <i>Wrightia tinctoria</i> (ต้นโมก) developing embryos	8.4
4	F3G1C9-12	158985385	EX936877.1	cDNA from <i>Ginkgo biloba</i> (แปะก๊วย) male leaf	2.4
5	F3B6C10-4	282661176	GH571895.1	cDNA-AFLP <i>Manihot esculenta</i> clone TDFD116 from the onset of storage root formation	0.2
6	F3B6C10-8	313138930	HS107119.1	cDNA-AFLP library <i>Betula platyphylla</i> (เบิร์ช) of Birch male inflorescences early development	2.4
	F3B6C10-4, 8	110273485	EC907792.1	<i>Cistus incanus</i> (plant in rockrose family) differentially expressed cDNA-AFLP fragment at two stages leading to mycorrhiza establishment between two isolates	0.056
		282661177	GH571896.1	cDNA-AFLP <i>Manihot esculenta</i> (มันสำปะหลัง) clone TDFD117 from the onset of storage root formation	0.2
7	F7C2C10	90629771	EB063214.1	<i>Thermomyces lanuginosus</i> (เชื้อรา) cDNA clone TlanSEQ5375	0.056
8	M4B6C3-3	110118151	EC811554.1	<i>Saitoella complicata</i> (เชื้อรา) cDNA from Advantage polymerase library (lib1_sc_adv)	7.6
9	M1A6C3-4	188325908	EY774538.1	<i>Citrus reticulata</i> (ส้ม) leaf cDNA after infection with <i>Xylella fastidiosa</i> bacterium	7.6
10	M1D2C9-10	422289403	FS988780.1	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> (ชะเอมจีน) whole plant cDNA clone	0.051

(E- value 7.6) ซึ่งเป็นเชื้อราที่ย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ จากข้อมูลนี้ เป็นไปได้ว่าในช่วงการเก็บตัวอย่างอาจมีการปนเปื้อนจากราเหล่านี้ที่อยู่บนเนื้อเยื่อพืช เพราะการเก็บเนื้อเยื่อเป็นช่วงเช้าในฤดูฝน ที่เจริญเติบโตของเชื้อราได้ดี ข้อมูล TDFs ที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้มีข้อมูลเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของดอกจำนวน 5 ชั้น ได้แก่ ในอองุ่น 2 ชั้นและมีการแสดงออกในช่วงการสร้างช่อดอก และแสดงออกในช่วงการสร้างผลระยะที่ 1, ในต้นบีช 1 ชั้นและมีการแสดงออกในตาดอกระยะแรกเริ่ม, ในข้าวฟ่างหางหมา *Sorghum bicolor* 1 ชั้น และมีการแสดงออกในการสร้างช่อดอก, ในต้นเบิร์ช *Betula platyphylla* และมีการแสดงออกในการสร้างดอกช่อดอ

นอกจากข้อมูล cDNA ที่ได้กล่าวไว้แล้ว ในการค้นหาจีโนมที่แสดงออกแตกต่างกันระหว่างดอกอ่อนเพศผู้และดอกอ่อนเพศเมียในสับปะรดด้วยวิธี cDNA-AFLP ในครั้งนี้ไม่พบ TDFs จากสับปะรด หรือ TDFs ที่เป็นยีนในกลุ่มโมเดล ABCE อาจเป็นไปได้ว่า จำนวนจีโนมที่ตัดออกมาจากเจล (231 ชิ้น) ได้รับการเพิ่มปริมาณ (53 ชิ้น) และทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิดและส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (17 ชิ้น) นั้นเป็นจำนวนที่น้อย ดังนั้นเป็นไปได้ว่ายีนในกลุ่ม ABCE อาจไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ โดยเฉพาะการเลือกตัดจีโนมที่เอ็นเอออกจากเจลนั้น จะเลือกตัดเฉพาะแถบที่เห็นชัดเจนและมีขนาดใหญ่กว่า 100 bp ยีนในกลุ่ม ABCE ในสับปะรดอาจมีการแสดงออกที่ในระดับต่ำ หรือมีขนาดชิ้นที่เล็กทำให้ไม่ได้ถูกคัดเลือก หรือเป็นไปได้ว่า คูเอนไซม์หรือไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองอาจไม่เหมาะสม โดยเอนไซม์ที่ใช้ (*MseI* และ *EcoRI*) พร้อมกับไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้อาจไม่สามารถทำให้เกิดความแตกต่างได้ในยีนกลุ่มนี้ นอกจากนี้ เนื้อเยื่อที่เก็บมาสกัดอาร์เอ็นเอ อาจไม่สอดคล้องกับระยะการแสดงออกของยีนที่ต้องการค้นหา ในครั้งนี้ได้เก็บเนื้อเยื่อจากดอกขนาดประมาณ 1-3 มิลลิเมตร และแยกดอกเพศผู้หรือเพศเมียโดยการแกะดูโครงสร้างภายในดอก เป็นไปได้ว่าในระยะที่เก็บตัวอย่างนี้ ยีนควบคุมเพศของดอกสับปะรดมีการแสดงออกเท่ากันในดอกอ่อนเพศผู้และดอกอ่อนเพศเมีย หรืออาจเป็นไปได้ว่ายีนควบคุมการพัฒนาเป็นเพศผู้หรือเพศเมียได้มีการแสดงออกและทำหน้าที่ไปเรียบร้อยแล้ว และเมื่อตรวจสอบงานวิจัยที่ผ่านมาได้พบว่าในปี 2005 Sangtae

et al. ได้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนควบคุมดอกในพืช 5 ชนิดในดอกระยะต่าง ๆ และพบว่า ยีน *AP1*, *AP3* และ *PI* homologs มีการแสดงออกในทุกส่วนของดอก แต่มียีน *AG* เท่านั้นที่พบการแสดงออกตรงตามโมเดล ABCE คือในส่วนเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย (Sangtae *et al.*, 2005) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าในสับปะรดมีการแสดงออกคล้ายกับพืชเหล่านี้ จึงทำให้ไม่พบ TDFs ของยีนในโมเดล ABCE ที่แสดงออกแตกต่างกันในดอกอ่อนเพศผู้หรือดอกอ่อนเพศเมีย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จากคณะวิทยาศาสตร์ และจากศูนย์วิทยาการขั้นสูงด้านนาโนเทคโนโลยีเพื่ออุตสาหกรรมเคมีอาหารและการเกษตร ขอขอบคุณคำปรึกษาจาก ดร.จตุพร กุลอึ้ง และ รศ.ดร. วิชา หงส์ตระกูล

เอกสารอ้างอิง

- Achten WMJ, Verchotb L, Frankenc YJ, Mathijs E, Singhe VP, Aertsa R, Muysa B (2008) *Jatropha* biodiesel production and use. *Biomass Bioenerg* 32: 1063–1084.
- Augustus GDPS, Jayabalan M, Seilerb GJ (2002) Evaluation and bioinduction of energy components of *Jatropha curcas*. *Biomass Bioenerg* 23: 161–164.
- Bachem CWB, Van der Hoeven RS, Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RGF (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J* 9: 745–753.
- Baryeh EA (2001) Effects of palm oil processing parameters on yield. *J Food Eng* 48: 1–6.
- Bowman JL, Smyth DR, Meyerowitz EM (1991) Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 112: 1–20.
- Coen ES, Meyerowitz EM (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower

- development. *Nature* 353: 31–37.
- Gübitz GM, Mittelbach M, Trabic M (1999) Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technol* 67: 73–82.
- King AJ, He W, Cuevas JA, Freudenberger M, Ramaramanana D, Graham IA (2009) Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. *J Exp Bot* 60: 2897–2905.
- Leymarie J, Bruneaux E, Gibot-Leclerc S, Corbinau F (2007) Identification of transcripts potentially involved in barley seed germination and dormancy using cDNA-AFLP. *J Exp Bot* 58: 425–437.
- Makkar HPS, Becker K, Sporer F, Wink M (1997) Studies on Nutritive Potential and Toxic Constituents of Different Provenances of *Jatropha curcas*. *J Agric Food Chem* 45: 3152–3157.
- Mao C, Yi K, Yang L, Zheng B, Wu Y, Liu F, Wu P (2004) Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L) aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall components. *J Exp Bot* 55: 137–143.
- Negussie A, Achten WMJ, Verboven HAF, Hermly M, Muys B (2014) Floral display and effects of natural and artificial pollination on fruiting and seed yield of the tropical biofuel crop *Jatropha curcas* L. *GCB Bioenergy* 6: 210–218.
- Ó'Maoiléidigh DS, Graciet E, Wellmer F (2014) Tansley review: gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development. *New Phytol* 201: 16–30.
- Openshaw K (2000) A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass Bioenergy* 19: 1–15.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sangtae K, Koh J, Yoo H, Hu Y, Hong M, Soltis PS, Soltis DE (2005) Expression of floral MADS-box genes in basal angiosperms: implications for the evolution of floral regulators. *Plant J* 43: 724–744.