

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- ครรชิต ธรรมศิริ. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. กรุงเทพมหานคร. อัมรินทร์พรินต์ติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.
- นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. โรคของกล้วยไม้และการป้องกันกำจัด. เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่องกล้วยไม้ไทยเพื่อการส่งออก. หน้า 73-93. 20-21 มกราคม 2544 ณ โรงแรมวังใต้ จ. สุราษฎร์ธานี.
- รัฐ พิษณุางกูร. 2547. สมบัติที่สำคัญของโคโตซานในการคัดเลือกใช้สำหรับใช้เพาะเลี้ยงกล้วยไม้. เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่องการใช้โคโตซานในไม้ดอก. หน้า 1-6. 29-30 เมษายน 2547 ณ อาคารสถาบันวิจัยโลหะ และวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เสมอ นิมเจริญ. 2544. ปัญหาการส่งออกดอกกล้วยไม้และมาตรการการแก้ปัญหา. เอกสารประกอบการสัมมนา เรื่องกล้วยไม้ไทยเพื่อการส่งออก. หน้า 25. 20-21 มกราคม 2544 ณ โรงแรมวังใต้ จ.สุราษฎร์ธานี.
- สุภਾਲย์ ไชยสุด. 2548. จำนวนรอบของการทำ PCR ที่เหมาะสมในการศึกษาการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล' ที่ไม่ได้รับโคโตซาน และได้รับโคโตซาน. รายงานวิชา Experimental Genetics. (เอกสารไม่ตีพิมพ์)
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2548.

### ภาษาอังกฤษ

- Agrawal, G. K., Jwa, N.-S., Agrawal S. K., Tamogami, S., Iwahashi, H. and Rakwal, R. 2003. Cloning of novel rice allene oxide cyclase (OsAOC): mRNA expression and comparative analysis with allene oxide synthase (OsAOS) gene provides insight into the transcriptional regulation of octadecanoid pathway biosynthetic genes in rice. Plant Science. 164: 979-992.
- Agrawal, G. K., Rakwal, R., Tomogami, S., Yonekura M., Kubo, A. and Saji, H. 2002. Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedling. Plant Physiology and Biochemistry. 40: 1061-1069.

- Ainsworth, C. 1994. Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (Sorrel). Plant Molecular Biology Reporter. 12: 198-203.
- Akimoto, C., Aoyagi, H., and Tanaka, H. 1999. Endogenous elicitor-like effects of alginate on physiological activities of plant cells. Applied Microbiology and Biotechnology. 52: 429-436.
- Ben-Shalom, N., Ardi, R., Pinto, R., Aki, C. and Fallik, E. 2003. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerae* in cucumber plants by means of chitosan. Crop Protection. 22: 285-290.
- Bittelli, M., Flury, M., Campbell, G. S. and Nichols, E. J. 2001. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. Agricultural and Forest Meteorology. 107: 167-175.
- Burpo, F. J. 2001. A critical review of PCR primer design algorithms and cross-hybridization case study. Biochemistry. 218: 1-11.
- Campos - Vargas, R. and Saltveit, M. E. 2002. Involvement of putative chemical wound signals in the induction of phenolic metabolism in wounded lettuce. Physiologia Plantarum. 14: 73.
- Cascardo, J. C. M., Buzeli, R. A. A., Almeida, R. S., Otoni, W. C. and Fontes, E. P. B. 2001. Differential expression of the soybean BiP gene family. Plant Science. 160: 273-281.
- Cho, Y. - J., Prezioso, V. R. and Liang, P. 2002. Systematic analysis of intrinsic factors affecting differential display. Biotechniques. 32: 762-766.
- Clark, J. M. 1988. Novel non - templated nucleotide addition reactions prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase. Nucleic Acids Research. 16: 9677-9686.
- Dalwoo, B. L. S. 2002. Dalwoo-chitosan [online]. Available from: [www.dalwoo.com/chitosan/structure.gif.html](http://www.dalwoo.com/chitosan/structure.gif.html) [ 2004, November 26]
- De Moreno, M. R., Smith, J. F. and Smith, R. V. 1985. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: Increased sensitivity through a combined coomassie blue-silver stain procedure. Analytical Biochemistry. 151: 466-470.
- Dean, J. D., Goodwin, P. H. and Hsiang, T. 2002. Comparison of relative RT-PCR and northern blot analyses to measure expression of  $\beta$ -1,3-glucanase in *Nicotiana*

- benthamiana* infected with *Colletotrichum destructivum*. Plant Molecular Biology Reporter. 20: 347-356.
- Drescher, A., Ruf, S., Calsa Jr, T., Carrer, H. and Bock, R. 2000. The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. Plant Journal. 22: 97-104.
- Fang, G., Hammar, S. and Grumet, R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from genomic DNA. Biotechniques. 13: 52-54.
- Freepons, D. 1997. Enhancing food production with chitosan seed-coating technology. Goosen(ed). Applications of Chitin and Chitosan. PA. USA.: Technomic Publishing.
- Hirano, S. 1997. Applications of chitin and chitosan in the ecology and environmental fields. In Mattheus F.A. Goosen(ed). Applications of Chitin and Chitosan. PA. USA.: Technomic Publishing.
- Hirano, S., Yamamoto, T., Hayashi, M., Nishida, T. and Inui, H. 1990. Chitinase activity in seeds coated with chitosan derivatives. Agricultural and Biological Chemistry. 54: 2719-2720.
- Ichihara, Y. and Kurosawa, Y. 1993. Construction of new T vector for direct cloning of PCR product. Gene. 130: 153-154.
- Jiang, Y. and Li, Y. 2001. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit.. Food Chemistry. 73: 139-143.
- Jwa, N.-S., Agrawal, G. K., Rakwal, R., Kim, J.-A. and Agrawal, V. P. 2002. Differential regulation of and early and late responsive rice endosperm kinase mRNA in seedling leaves. Plant Physiology and Biochemistry. 1025- 1031.
- Klessing, D. F. and Malamy, J. 1994. The salicylic acid signal in plants. Plant Molecular Biology. 26: 1439-1458.
- Kocher, T. D. and Wilson, A. C. 1993. DNA amplification by the polymerase chain reaction. T. A. Brown(ed). Essential Molecular Biology. A Practical Approach Vol II. New York: Oxford University Press Inc.,
- Köhle, H., Jeblick, W., Poten, F., Blaschek, W. and Kauss, H. 1985. Chitosan -elicited callose synthesis in soybean cells as a  $Ca^{2+}$ -dependent process. Plant Physiology. 77: 544-551.

- Lal, L. Sahoo, R., Gupta, R. K., Sharma, P. and Kumar, S. 2001. RNA isolation from high-phenolic tea leaves and apical buds. Plant Molecular Biology Reporter. 19: 181a-181f.
- Lee, S., Choi, H., Suh, S., Doo, I. -S., Oh, K. -Y., Choi, E. J., Schroeder, T. A. T., Low, P. S. and Lee, Y. 1999. Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. Plant Physiology. 121: 147-152.
- Li, F., Barnathan, E. S. and Kariko, K. 1994. Rapid method for screening and cloning cDNA generated in differential mRNA display: application of northern blot for affinity capturing of cDNA. Nucleic Acids Research. 21: 3269-3275.
- Li, H. and Yu, T. 2001. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. Journal of the Science of Food and Agriculture. 81: 269-274.
- Li, Q., Dunn, E.T., Grandmaison, E. W. and Goosen, M. F. A. 1997. Applications and properties of chitosan. F. A. Goosen(ed). Applications of Chitin and Chitosan. PA. USA.: Technomic Publishing.
- Liang, P. 1998. Factors ensuring successful use of differential display. Methods: A Companion to Methods in Enzymology. 16: 361-364.
- Liang, P. 2002. Review a decade of differential display. Biotechniques. 33: 338-346.
- Liang, P. and Pardee, A. B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science. 257: 967-971.
- Limpanavech, P., Pichyanagkura, R., Khunwasi, C., Chadchawan, S., Lotrakul, P., Bunjongrat, R., Chaidee, R., and Akaraeakpanya, T. 2003. The Effect of polymer type, concentration, and % DD of biocatalyst modified chitosan on floral production of *Dendrobium* 'EISKUL'. The National Chitin and Chitosan Conference, p.p. 60-64. July 17-18 2003. Meeting Room, Insitute Building III, Chulalongkorn University.
- Lodhi, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F. and Reisch, B. I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. Plant Molecular Biology Reporter. 12: 6-13.

- Loomis, W. D. 1974. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. Methods in Enzymology. 31: 528-545.
- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A. and Collins, F. S. 1990. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR product. Nucleic Acids Research. 19: 5.
- Mason, E. and Davis M. 1997. Defense response in slash pine: chitosan treatment alters the abundance of specific mRNAs. Molecular Plant-Microbe Interactions. 10: 135-137.
- Mateos, M., Ke, D., Cantwell, M. and Kader, A. A. 1993. Phenolic metabolism and ethanolic fermentation of intact and cut lettuce exposed to CO<sub>2</sub> - enriched atmospheres. Postharvest Biology and Technology. 3: 225-233.
- Notsu, S., Saito, N., Kosaki, H., Inui, H. and Hirano, S. 1994. Stimulation of phenylalanine ammonia-lyase and lignification in the rice callus treated with chitin, chitosan, and their derivative. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 58: 552-553.
- Ohta, K., Tanguchi, A., Konishi, N. and Hosoki, T. 1999. Chitosan treatment affects plant growth and flower quality in *Eustoma grandiflorum*. Hort Science. 34: 233-234.
- Park, J.-A., Cho, S. K., Kim, J. E., Chung, H. S., Hong, J. -P., Hwang, B., Hong, C. B. and Kim, W. T. 2003. Isolation of cDNAs differentially expressed in response to drought stress and characterization of the *Ca-LEAL1* gene encoding a new family of atypical LEA-like protein homologue in hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang). Plant Science. 165: 471-481.
- Porat, R., Pavoncello, D., Ben-Hayyim, G. and Lurie, S. 2002. A heat treatment induced the expression of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport gene (*cNHX1*) in citrus fruit. Plant Science. 162: 957-963.
- Pospieszny, H. 1997. Antiviral activity of chitosan. Crop Protection. 16: 105-106.
- Raeymaekers, L. 1999. General principles of quantitative PCR. Method in Molecular Medicine. Vol 26. Quantitative PCR Protocols. Kochanowski B and Reischl, U. (ed). Totowa: Humana Press Inc.
- Roux, C., Bilang, J., Theunissen, B. H. and Rechenmann, C. P. 1998. Identification of new early auxin markers in tobacco by mRNA differential display. Plant Molecular Biology. 37: 385-389.

- Salzman, R. A., Fujita, T., Zhu - Salzman, K., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. 1999. An improved RNA isolation method for plant tissues contaminating high levels of phenolics compounds or carbohydrates. Plant Molecular Biology Reporter. 17: 11-17.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sathiyabama, M. and Balasubramanain, R. 1998. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg.. Crop Protection. 17: 307-313.
- Skipper, M., Pedersen, K. B., Johansen, L. B., Frederiksen, S., Johansen, B. B. and Irish, V. F. 2005. Identification and quantification of expression levels of three FRUITFULL-like MADS box genes from the orchid *Dendrobium thyrsiflorum* (Reichb. f.). ACCESSION AY928013. In NCBI.
- Struszczyk, H. and Pospieszny, H. 1997. New applications of chitin and its derivatives in plant protection. F.A. Goosen(ed). Applications of Chitin and Chitosan. PA. USA.: Technomic Publishing.
- Stürzenbaum, S. R. and Kille, P. 2001. Review control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. Comparative Biochemistry and Physiology Part B. 130: 281-289.
- Tel-Zur, N., Abbo, S., Myslabodski, D. and Mizrahi, Y. 1999. Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic Cacti of the Genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). Plant Molecular Biology Reporter. 17: 249-254.
- Tesniere, C. and Vayda, M. E. 1991. Method for isolation of high-quality RNA from grapeberry tissues without contaminating tannins or carbohydrates. Plant Molecular Biology Reporter. 9: 242-251.
- Thikart, P., Kowanij, D., Selanan, T., Vajrabhaya, M., Bangyeekhum, T., Chadchawan, S. 2005. Genetic variation and stress tolerance of somaclonal variegated rice and its original cultivar. Journal of Scientific Research of Chulalongkorn University. (In press)

- Vankatachalam, P., Thanseem, I. and Thulaseedharan, A. 1999. A rapid and efficient method for isolation of RNA from bark tissues of *Hevea brasiliensis*. Current Science. 77: 635-367.
- Vögeli-Lange, R., Bürckert, N., Boller T. and Wiemken, A. 1996. Rapid selection and classification of positive clones generated by mRNA differential display. Nucleic Acids Research. 24: 1385-1386.
- Wada, I., Rindress, D., Cameron, P.H., Ou, W.-J., Doherty, J.J., Louvard, D., Bell, A.W., Dignard, D., Thomas, D.Y. and Bergeron, J.J.M. 1991. SSR and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. Journal of Biological Chemistry. 266: 19599-19610.
- Wakasugi, T, Nagai, T., Kapoor, M., Sugita, M., Ito, M., Ito, S., Tsudzuki, J., Nakashima, K., Tsudzuki, T., Suzuki, Y., Hamada, A., Ohta, T., Inamura, A., Yoshinaga, K. and Sugiura, M. 1997. Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: the existence of genes possibly involved in chloroplast division. Proceeding of the National Academy of Sciences, USA. 94: 5967-5972.
- Wu, H., Echt, C. S., Popp, M. P. and Davis, J. M. 1997. Molecular cloning, structure and expression of an elicitor-inducible chitinase gene from pine trees. Plant Molecular Biology. 33: 979-987
- Yamazaki, M. and Saito, K. 2002. Differential display analysis of gene expression in plants. Cellular and Molecular Life Sciences. 59: 1246-1255.
- Yu, H. and Goh, C. J. 2000. Identification and characterization of three orchid MADS-Box gene of the AP1/AGL9 subfamily during floral transition. Plant Physiology. 123: 1325-1336.
- Zeng, Y. and Yang, T. 2002. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. Plant Molecular Biology Reporter. 20: 417a-417e.
- Zhang, D. and Quantick, C. 1997. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis Sonn.*) fruit. Postharvest Biology and Technology. 12: 195-202.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

## 1. สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

สารละลาย	ส่วนประกอบ
วิธีของ Thikart และคณะ (2005)	100 mM Tris (pH9.0) 100 mM NaCl 20 mM EDTA 0.1% (v/v) $\beta$ -mercaptoethanol 1% (v/v) lauryl sarcosinate 0.1% (v/v) DEPC (diethyl pyrocarbonate)
วิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 1	100 mM Tris-HCl (pH7.5) 2 M NaCl 20 mM EDTA 2% (v/v) $\beta$ -mercaptoethanol 2% (w/v) CTAB 1% (w/v) PVP 0.1% (v/v) DEPC
วิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2	100 mM Tris-HCl (pH7.5) 2 M NaCl 20 mM EDTA 2% (v/v) $\beta$ -mercaptoethanol 2% (w/v) CTAB 1% (w/v) PVPP 0.1% (v/v) DEPC
TE buffer (Tris-EDTA buffer) pH 8.0	10 mM Tris pH 8.0 1 mM EDTA pH 8.0
DEPC-treated water	น้ำกลั่น 0.1% (v/v) DEPC

สารละลาย	ส่วนประกอบ
RNA และ DNA loading dye	30% (v/v) glycerol in water 0.25% (w/v) bromophenol blue 0.25% (w/v) xylene cyanol
5X TBE (Tris-Borate-EDTA buffer)	54 g Tris-base 27.5 g Boric acid 20 ml 0.5 M EDTA pH8.0
30% acrylamide	29 g acrylamide 1 g N,N' – methylenebisacrylamide Sterile, distilled water to 100 ml
6% polyacrylamide gel (35 ml)	7 ml 30% acrylamide 7 ml 5X TBE 0.25 ml 10% ammonium persulfate Sterile, distilled water to 35 ml Add 13 $\mu$ l TEMED
Elution buffer	0.5 M ammonium acetate 10mM magnesium acetate 1mM EDTA (pH 8.0)
อาหารเหลวเลี้ยงแบคทีเรียสูตร LB (liquid)	1%(w/v) bacto-tryptone 0.5% (w/v) bacto-yeast extract 1% (w/v) NaCl
อาหารกึ่งแข็งเลี้ยงแบคทีเรียสูตร LB (semi-solid)	อาหารเหลวเลี้ยงแบคทีเรียสูตร LB 1.5% (w/v) LB agar
อาหารเลี้ยงแบคทีเรียสูตร SOB	2% (w/v) bacto-tryptone 0.5% (w/v) bacto-yeast extract 0.05% (w/v) NaCl 2.5 mM KCl

สารละลาย	ส่วนประกอบ
อาหารเลี้ยงแบคทีเรียสูตร SOC	อาหารเลี้ยงแบคทีเรียสูตร SOB 0.02 M glucose
solution I	50 mM glucose 25 mM Tris (pH 8.0) 10 mM EDTA
solution II	0.2 N NaOH 1% (w/v) SDS
solution III	60 ml 5 M potassium acetate 11.5 ml glacial acetic acid Sterile, distilled water to 100 ml

ภาคผนวก ข



1. ขั้นตอนการสกัด total RNA ด้วยวิธีของ Thikart และคณะ (2005)
  - 1.1 ตัดเนื้อเยื่อจากบริเวณใบอ่อนของกล้วยไม้มาแช่ในไนโตรเจนเหลว
  - 1.2 บดเนื้อเยื่อให้ละเอียดเป็นผงในโถรงบดที่ผ่านการทำลาย RNase ตักผงเนื้อเยื่อใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ที่ทำให้เย็นจัดด้วยไนโตรเจนเหลว
  - 1.3 เท extraction Buffer (ภาคผนวก ก) และ phenol:chloroform (1:1) อย่างละ 800 ไมโครลิตร ( $\mu\text{l}$ ) ซึ่งแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นำไป vortex และแช่ลงในน้ำแข็งทันที
  - 1.4 บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
  - 1.5 ปิเปตสารละลายส่วนใสด้านบน (supernatant) แล้วเติม phenol:chloroform ปริมาณเท่ากับสารละลายส่วนลอยที่ปิเปตได้
  - 1.6 บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
  - 1.7 ปิเปตสารละลายส่วนใสด้านบน ตกตะกอนด้วย 95% ethanol ปริมาตร 2 เท่า เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
  - 1.8 บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
  - 1.9 ทำความสะอาดตะกอน (pellet) ด้วย 80% ethanol และปล่อยให้ ethanol ระเหยจนหมด
  - 1.10 ละลายตะกอนด้วย DEPC-treated TE buffer 100 ไมโครลิตร
  - 1.11 เติม DEPC-treated TE buffer 60 ไมโครลิตร และ 10 M LiCl 40 ไมโครลิตร (ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 M LiCl) เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
  - 1.12 บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
  - 1.13 ละลายตะกอน ด้วย DEPC-treated TE buffer 20 ไมโครลิตร
  - 1.14 วัดคุณภาพ และปริมาณของ total RNA ที่สกัดได้ โดยวิธี spectrophotometric measurement (Sambrook และคณะ, 1989) และตรวจสอบคุณภาพของ total RNA ที่ได้ โดยวิธี gel electrophoresis

## 2. ขั้นตอนการสกัด RNA ด้วยวิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 1 และแบบที่ 2

- 2.1 ตัดเนื้อเยื่อจากบริเวณใบอ่อนของกล้วยไม้มาแช่ในไนโตรเจนเหลว
- 2.2 บดเนื้อเยื่อให้ละเอียดเป็นผง ในโถงที่ผ่านการทำลาย RNase ตักผงเนื้อเยื่อใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ที่ทำให้เย็นจัดด้วยไนโตรเจนเหลว
- 2.3 เท extraction buffer (ภาคผนวก ก) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (ก่อนใช้ extraction buffer ควรแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-30 นาที เพื่อให้ CTAB ละลาย)
- 2.4 vortex ทันที เพื่อให้เนื้อเยื่อที่บดผสมเป็นเนื้อเดียวกับ extraction buffer
- 2.5 บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 2.6 ปิเปตแยกสารละลายส่วนใสด้านบนใสในหลอดใหม่ เติม chloroform:isoamyl-alcohol (24:1, v/v) ปริมาณเท่ากับสารละลายส่วนใสที่ปิเปตได้
- 2.7 บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 2.8 ทำตามขั้นตอนที่ 2.6 และ 2.7 ซ้ำ อย่างน้อย 2 ครั้ง
- 2.9 ปิเปตแยกสารละลายส่วนใสด้านบน นำมาตกตะกอนด้วย 10 M LiCl ปริมาตร 0.25 เท่า ของสารละลายส่วนใสที่ปิเปตได้
- 2.10 เก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน
- 2.11 บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 2.12 เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ทำความสะอาดตะกอน ด้วย 70% ethanol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร
- 2.13 บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
- 2.14 ทำตามขั้นตอนที่ 2.12 และ 2.13 ซ้ำอีกครั้ง
- 2.15 เท 70% ethanol ออกให้หมด ปล่อยให้แห้ง
- 2.16 ละลายตะกอน ด้วย DEPC-treated water 20 ไมโครลิตร
- 2.17 วัดคุณภาพ และปริมาณของ total RNA ที่สกัดได้ โดยวิธี spectrophotometric measurement (Sambrook และคณะ, 1989) และตรวจสอบคุณภาพของ total RNA ที่ได้ โดยวิธี gel electrophoresis

### 3. วิธีการย้อมแถบ cDNA บน 6% nature DNA polyacrylamide gel ด้วยวิธี silver stain ที่ดัดแปลงจาก De Moreno และคณะ (1985)

- 3.1 นำ polyacrylamide gel มาแช่ใน 40% methanol เป็นเวลา 15 นาที
- 3.2 ล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 30 วินาที
- 3.3 แช่ใน 160 mM HNO<sub>3</sub> เป็นเวลา 6 นาที
- 3.4 ล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 30 วินาที
- 3.5 แช่ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที
- 3.6 แช่ใน 15 mM AgNO<sub>3</sub> ในที่มืด เป็นเวลา 20 นาที (สารละลายนี้ควรเตรียมเมื่อต้องการใช้)
- 3.7 แช่ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทออก
- 3.8 แช่แผ่นเจลใน developer เย็นจัด (0.28 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ผสมกับ 0.05% ของ 37% formaldehyde) เขย่าจนเห็นแถบ DNA เวลาประมาณ 30-40 นาที
- 3.9 หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.1 M citric acid เป็นเวลา 2-3 นาที
- 3.10 ล้างด้วยน้ำกลั่น

### 4. วิธีการแยก cDNA ออกจาก polyacrylamide gel ด้วยวิธี crush and soak (Sambrook และคณะ, 1989)

- 4.1 ตัดแถบ cDNA ที่สนใจออกจาก polyacrylamide gel ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ แล้วอบด้วยปลายไมโครปิเปตทิป
- 4.2 เติม elution buffer ปริมาตร 2 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดมา
- 4.3 ปิดฝาหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ วางบนเครื่อง rotaring wheel ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง
- 4.4 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- 4.5 ปิเปตแยกสารละลายส่วนใสด้านบนใสในหลอดใหม่ (หลีกเลี่ยงชิ้นส่วนของ polyacrylamide gel)
- 4.6 เติม elution buffer ปริมาตร 0.5 เท่าของน้ำหนักเจลครั้งแรกที่ตัดมา ลงในหลอดเก่าที่มีชิ้นส่วน polyacrylamide gel
- 4.7 vortex และปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็ว



- 4.8 บีเปิดแยกสารละลายส่วนใสด้านบน ใสในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ที่ได้จากข้อ 4.5 และตกตะกอนด้วย 100% ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลายส่วนใสทั้งหมด
- 4.9 เก็บในช่องแช่แข็งของตู้เย็น เป็นเวลา 30 นาที
- 4.10 บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 4.11 ละลายตะกอนด้วย TE (pH 7.6) 200 ไมโครลิตร
- 4.12 เติม 3M sodium acetate (pH 5.2) และ 100% ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลายส่วนใส
- 4.13 ทำตามขั้นตอน 4.9-4.10 อีกครั้ง
- 4.14 ทำความสะอาดตะกอน ด้วย 70% ethanol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร
- 4.15 ทำตามขั้นตอน 4.10
- 4.16 เท 70% ethanol ออกให้หมด ปล่อยให้แห้ง
- 4.17 ละลายตะกอนด้วย TE (pH 7.6) 10 ไมโครลิตร

## 5. วิธีการเตรียมแบคทีเรียให้อยู่ในสภาพพร้อมรับ DNA จากภายนอก (competent cell) (Sambrook และคณะ, 1989)

- 5.1 นำ frozen stock ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 มา streak บนอาหารกึ่งแข็งเลี้ยงแบคทีเรียสูตร LB ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 ชั่วโมง (*E. coli* สายพันธุ์ JM109 เป็นแบคทีเรียที่เหมาะสมในการทำ cloning ที่ใช้เวกเตอร์ pGEM-T ของบริษัท Promega)
- 5.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ มาเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงแบคทีเรียสูตร SOB ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มี 2 M  $MgCl_2$  (0.5 มิลลิลิตร ต่อ SOB 100 มิลลิลิตร) เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- 5.3 บีเปิดเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงแบคทีเรียสูตร SOB 250 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงแบคทีเรียสูตร SOB ใหม่อีกครั้ง ซึ่งมีปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มี 2 M  $MgCl_2$  (0.5 มิลลิลิตรของ 2 M  $MgCl_2$  ต่อ SOB 100 มิลลิลิตร) เพื่อให้เซลล์ของเชื้อมีความเป็น competent เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.50 ชั่วโมง

- 5.4 วัดค่าความดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าประมาณ 0.6-0.7
- 5.5 นำเชื้อที่เลี้ยงมาใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ ขนาด 50 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที
- 5.6 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 2500 RCF ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- 5.7 เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอน ด้วยสารละลาย TB 1.25 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที
- 5.8 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 2500 RCF ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 5.9 เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TB 1 มิลลิลิตร และ DMSO 70 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที
- 5.10 เก็บสารละลาย 100 ไมโครลิตร ต่อ 1 หลอดไมโครเซนตริฟิวส์
- 5.11 แช่ในไนโตรเจนเหลว เพื่อเก็บ competent cell
- 5.12 เก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาความเป็น competent cell

## 6. การนำโคลนที่สนใจ (DNA plasmid) เข้าสู่แบคทีเรีย (competent cell) โดยวิธี heat shock transformation (Sambrook และคณะ, 1989)

- 6.1 นำ competent cell 100 ไมโครลิตร และ DNA plasmid 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที
- 6.2 แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (heat shock) แช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 3 นาที
- 6.3 เติมหอาหารเหลวเลี้ยงแบคทีเรียสูตร SOC 800 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
- 6.4 ปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วเพื่อให้ตกตะกอน ปิเปตส่วนใสทิ้งประมาณ 750 ไมโครลิตร
- 6.5 นำสารละลายที่เหลือมา spread บนอาหารกึ่งแข็งเลี้ยงแบคทีเรียสูตร LB (semi-solid) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีสาร X-gal 40 ไมโครลิตร กับ IPTG 4 ไมโครลิตร
- 6.6 บ่มเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

7. สกัด DNA plasmid ด้วยวิธี small-scale preparation of plasmid DNA by lysis in alkali solution (Sambrook และคณะ, 1989)

- 7.1 เชื้อโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย (*E. coli*) ลงบนอาหารเหลวเลี้ยงแบคทีเรียสูตร LB (liquid) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร
- 7.2 นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่า เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- 7.3 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- 7.4 เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เติม solution I 100 ไมโครลิตร vortex ทันที
- 7.5 เติม solution II 200 ไมโครลิตร invert 4-5 ครั้ง แขนบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที
- 7.6 เติม solution III 150 ไมโครลิตร invert 4-5 ครั้ง แขนบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที
- 7.7 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 7.8 ปิเปตสารละลายส่วนใส ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ใหม่ และตกตะกอนด้วย 95% ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายส่วนใส vortex
- 7.9 เก็บในช่องแช่แข็งของตู้เย็น เป็นเวลา 10 นาที
- 7.10 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 7.11 เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เติม 70% ethanol 250 ไมโครลิตร
- 7.12 ปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็ว เท 70% ethanol ทิ้ง ปล่อยให้แห้ง
- 7.13 ละลายตะกอนด้วย TE (pH 8.0) 50 ไมโครลิตร

8. การทำ frozen stock (Sambrook และคณะ, 1989)

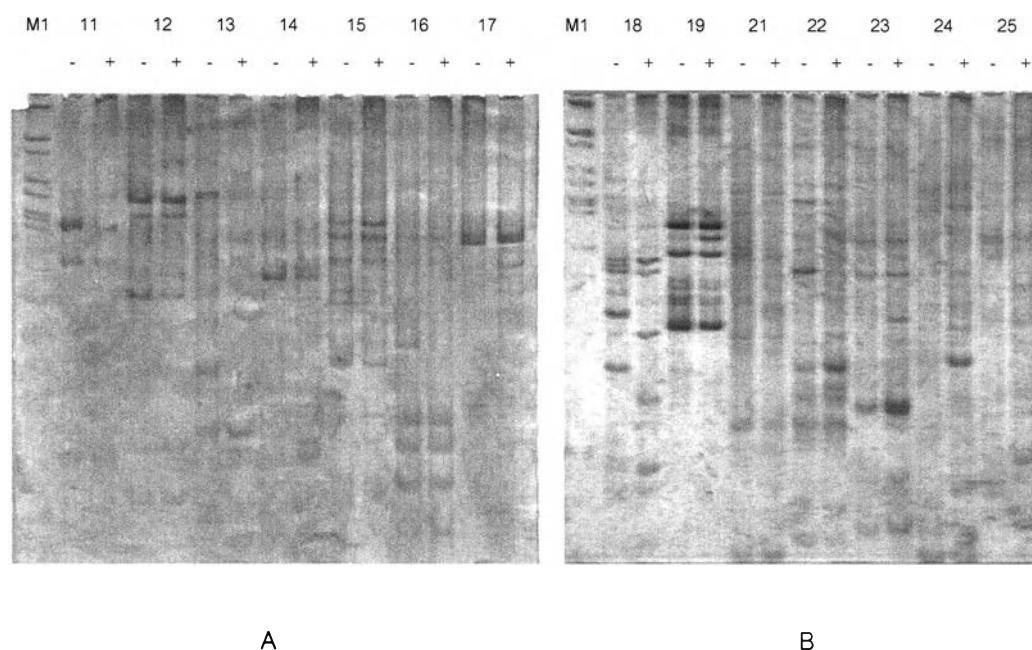
- 8.1 streak เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีเวกเตอร์ลูกผสม บนอาหารกึ่งแข็งเลี้ยงแบคทีเรีย สูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- 8.2 บ่มเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- 8.3 เชื้อโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหารเหลวเลี้ยงแบคทีเรียสูตร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มี ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 8.4 นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่า เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

- 8.5 บีบเปิดอาหารเหลวเลี้ยงแบคทีเรียสูตร LB ที่มีเชื้อแบคทีเรีย 1 มิลลิลิตร จากขั้นตอน 8.4 ใส่ vial ที่มี 87.7% glycerol 1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ผสมให้เข้ากัน
- 8.6 นำ vial ดังกล่าว แช่ไนโตรเจนเหลว และนำไปเก็บที่ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง (deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

## 1. ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน โดยวิธี differential display

จากการศึกษาความแตกต่างในการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล' ชุดควบคุม และชุดที่ได้รับโคโตซาน โดยวิธี differential display (Liang และ Pardee, 1992) โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 72 คู่ไพรเมอร์ พบความแตกต่างของแถบ cDNA ของกล้วยไม้สกุลหวาย ทั้ง 2 ชุดการทดลอง บน polyacrylamide gel ดังรูปที่ 8 (A-K) สำหรับการกำหนดการเรียกคู่ไพรเมอร์ มีรายละเอียดดังตารางที่ 6



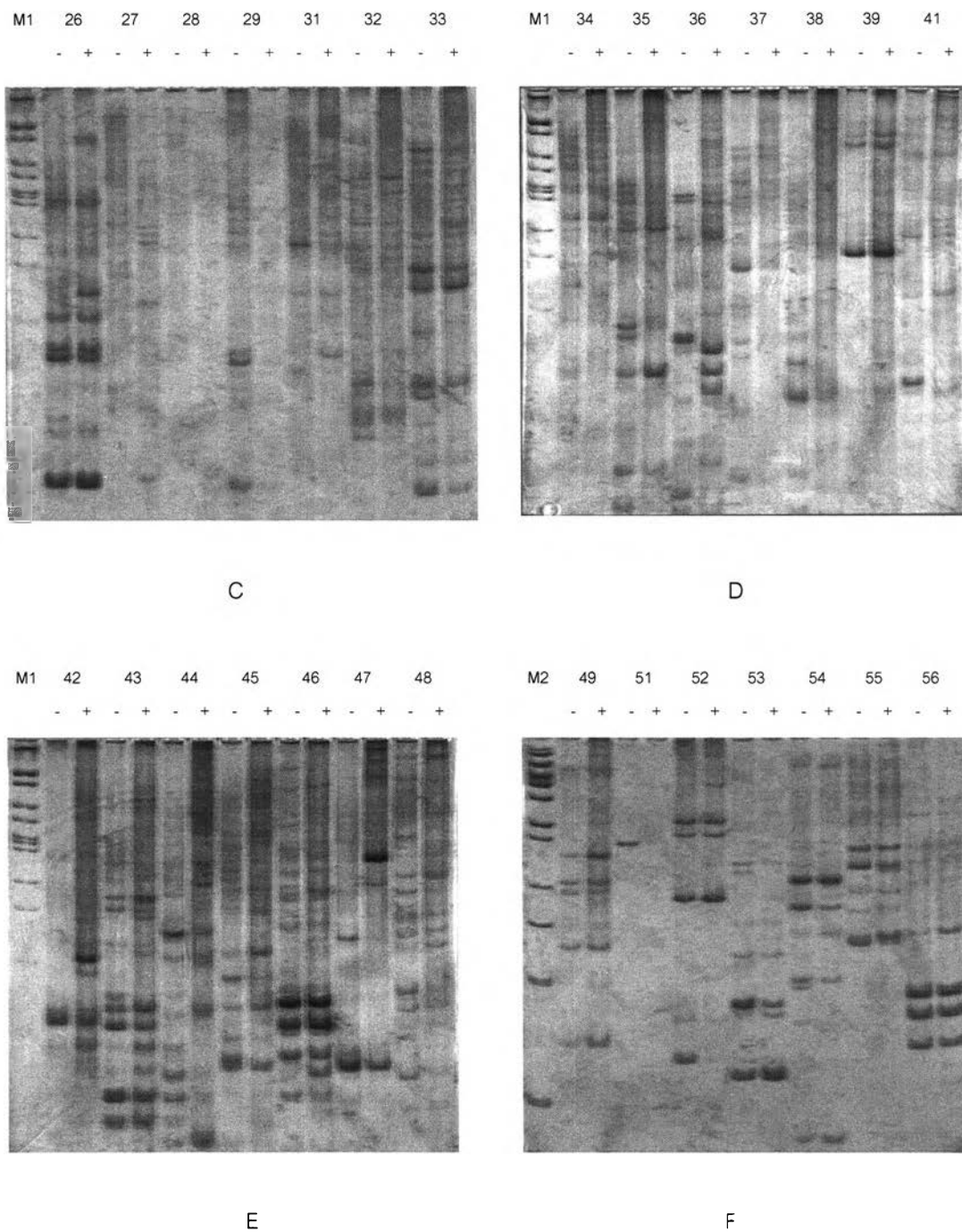
รูปที่ 8 ความแตกต่างของแถบ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากกล้วยไม้สกุลหวายชุดควบคุม และชุดที่ได้รับโคโตซาน ระหว่างคู่ไพรเมอร์ต่างๆ ที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้า ในตัวกลาง คือ 6% polyacrylamide gel ใน 1X TBE บัฟเฟอร์ ที่กระแสไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลา 7 ชั่วโมง

- : กล้วยไม้ที่ไม่ได้รับโคโตซาน    + : กล้วยไม้ที่ได้รับโคโตซาน

M1 = DNA marker (Lamda DNA digest with *EcoRI* and *HindIII* incomplete)

A = คู่ไพรเมอร์ 11, 12, 13, 14, 15, 16 และ 17

B = คู่ไพรเมอร์ 18, 19, 21, 22, 23, 24 และ 25



### รูปที่ 8 (ต่อ)

M1 = DNA marker (Lamda DNA digest with *EcoRI* and *HindIII* incomplete)

M2 = DNA marker (1Kb DNA ladder)

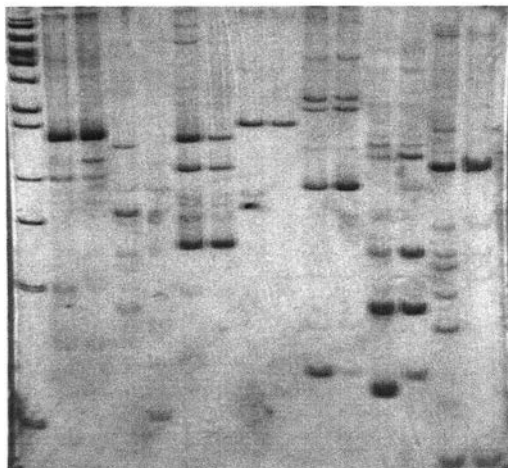
C = คู่ไพรเมอร์ 26, 27, 28, 29, 31, 32 และ 33

D = คู่ไพรเมอร์ 34, 35, 36, 37, 38, 39 และ 41

E = คู่ไพรเมอร์ 42, 43, 44, 45, 46, 47 และ 48

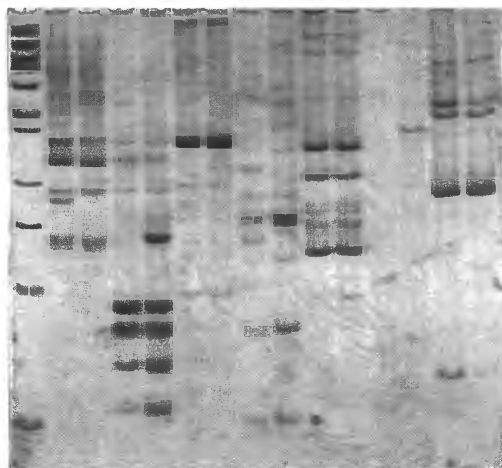
F = คู่ไพรเมอร์ 49, 51, 52, 53, 54, 55 และ 56

M2 57 58 59 61 62 63 64  
- + - + - + - + - + - + - +



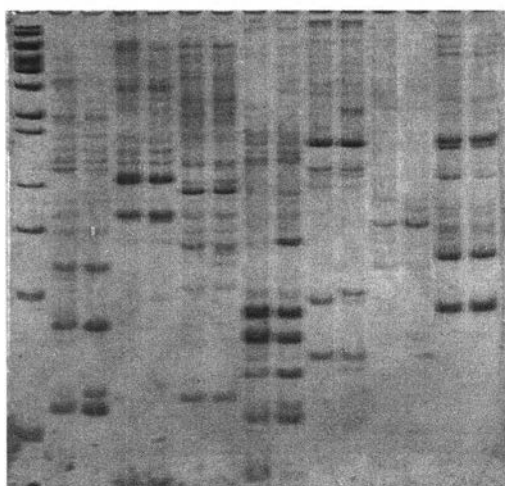
G

M2 65 66 67 68 69 71 72  
- + - + - + - + - + - + - +



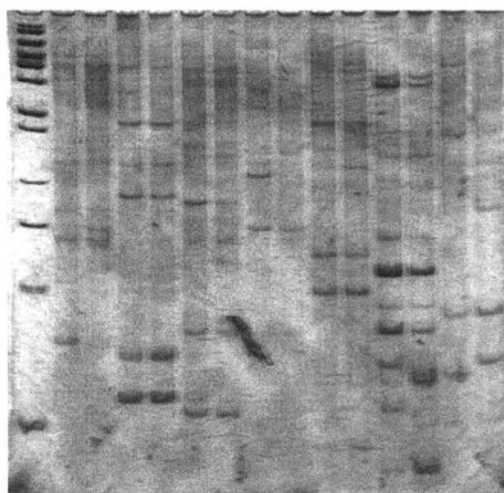
H

M2 73 74 75 76 77 78 79  
- + - + - + - + - + - + - +



I

M2 81 82 83 84 85 86 87  
- + - + - + - + - + - + - +



J

รูปที่ 8 (ต่อ)

M2 = DNA marker (1Kb DNA ladder)

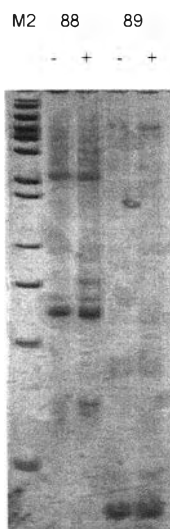
G = คู่มือเมอร์ 57, 58, 59, 61, 62, 63 และ 64

H = คู่มือเมอร์ 65, 66, 67, 68, 69, 71 และ 72

I = คู่มือเมอร์ 73, 74, 75, 76, 77, 78 และ 79

J = คู่มือเมอร์ 81, 82, 83, 84, 85, 86 และ 87





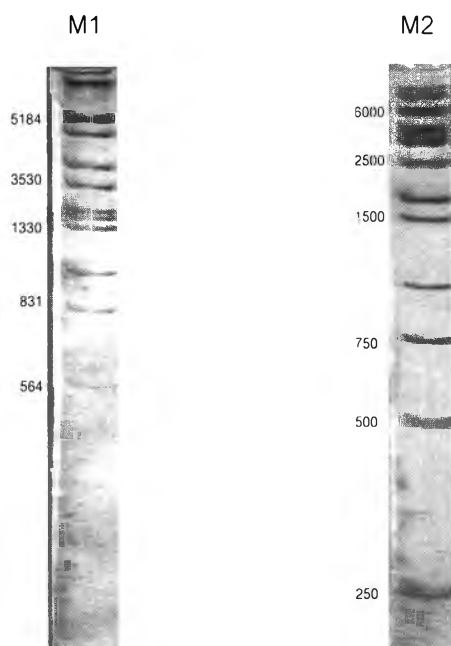
รูปที่ 8 (ต่อ)

M2 = DNA marker (1Kb DNA ladder)

K = คู่มือเมอร์ 88 และ 89

K

ขนาดของแถบ DNA ของ DNA marker (Lamda DNA digest with *EcoRI* and *HindIII* และ 1Kb DNA ladder) เป็นดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 ขนาดของแถบ DNA ของ DNA marker ที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้า ในตัวกลาง คือ 6% polyacrylamide gel ใน 1X TBE บัฟเฟอร์ ที่กระแสไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลา 7 ชั่วโมง

M1 = DNA marker (Lamda DNA digest with *EcoRI* and *HindIII* incomplete)

M2 = DNA marker (1Kb DNA ladder)

2. ผลการวิเคราะห์ชนิดของยีนที่มีการตอบสนองต่อโคโคซานในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอื้องสกุล'

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสากล GenBank ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม blastn ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

- De164 มีความคล้ายคลึงกับ *Calycanthus fertilis* var. *ferax* complete chloroplast genome 96% (86/89) 2 บริเวณ

```
Query 3
AGACCCGTATCAATAATTATGATCTTACATATGGACAATTCCTCAATATCTTGTCCATTC 62
|||||
Sbjct 90662
AGACCCGTATCAATAATTATGATCTTACATATGGACAATTCCTCAATATCTTGTTCATTC 90721

Query 63   GCGACAAAATCTTTTCTTTGTGCGTCGGT 91
|| ||
Sbjct 90722   GCAACAAAATATTTTCTTTGTGCGTCGGT 90750
```

และ

```
Query 3
AGACCCGTATCAATAATTATGATCTTACATATGGACAATTCCTCAATATCTTGTCCATTC 62
|||||
Sbjct 149620
AGACCCGTATCAATAATTATGATCTTACATATGGACAATTCCTCAATATCTTGTTCATTC 149561

Query 63   GCGACAAAATCTTTTCTTTGTGCGTCGGT 91
|| ||
Sbjct 149560   GCAACAAAATATTTTCTTTGTGCGTCGGT 149532
```

- De362 มีความคล้ายคลึงกับ *Oryza sativa* genomic DNA, chromosome7, complete sequence 87% (63/72)

```
Query 189
AATAGCTGCAGAAGCTTCGGCAGCCAAAGCTATCTCAAATACACGGCTGAAGCGTTCTCC 248
||||| ||| ||||| ||||||| |||||||
Sbjct 27026396
AATAGCTGAAGACGCTTCAACAGCCAGAGCTATTTCAAATACACGGCTGAAGCGATCCCC
27026337

Query 249   AAGAGCTTCTTT 260
||||| ||
Sbjct 27026336   AAGAGCATCTTT 27026325
```



## Query 374

CTTTTCTGACACCTCTAGCTTCAAATTCCGAATGACTAAAGGATCGATAGGCCACGCTTT 433

|||||

## Sbjct 2799

CTTTTCTGACACCTCTAGCTTCAAATTCCGAAGGTCTAAAGGATCGATAGGCCACGCTTT 2740

## Query 434

CACGGTTTCGTATTTCGCACTGGAAATCAGAATCAAACAAGCTTTTACCCTTTTGTCCACA 493

|||||

## Sbjct 2739

CACGGTTTCGTATTTCGTACTIONGAAATCAGAATCAAACGAGCTTTTACCCTTTTGTCCACA 2680

## Query 494

CGAGATTTCTGTTCTCGTTGAGCTCATCTTAGGACACCTGCGTTATCTTTAACAGATGT 553

|||||

## Sbjct 2679

CGAGATTTCTGTTCTCGTTGAGCTCATCTTAGGACACCTGCGTTATCTTTAACAGATGT 2620

## Query 554 GCCGCC 560

|||||

## Sbjct 2619 GCCGCC 2613

และ De541 มีความคล้ายคลึงกับ *Drimys winteri* large subunit 26S ribosomal RNA gene, partial 97% (534/547)

## Query 14

AACGACGGGCTCAGGCGCCGATTTTTAGCGCGGATTCTGACTTAGAGGCGTTCAGTCAT 73

|||||

## Sbjct 3179

AACGACGGGCTCAGGCGCCGCTTCTTTAGCTTGGATTCTGACTTAGAGGCGTTCAGTCAT 3120

## Query 74

AATCCTGCACACGGTAGCTTCGCGCCACTGGCTTTTCAACCAAGCGCGATGACCAATTGT 133

|||||

## Sbjct 3119

AATCCGACACACGGTAGCTTCGCGCCACTGGCTTTTCAACCAAGCGCGATGACCAATTGT 3060

## Query 134

GTGAATCAACGGTTCCTCTCGNACTAGGTTGAATTACTIONATCGCGGCACGATCATCAGTA 193

|||||

## Sbjct 3059 GTGAATCAACGGTTCCTCTCG-

TACTAGGTTGAATTACTIONATCGCGGCACGATCATCAGTA 3001

## Query 194

GGGTAAAACCTAACCTGTCTCACGACGGTCTAAACCCAGCTCACGTTCCCTATTGGTGGGT 253

|||||

## Sbjct 3000

GGGTAAAACCTAACCTGTCTCACGACGGTCTAAACCCAGCTCACGTTCCCTATTGGTGGGT 2941

## Query 254

GAACAATCCAACACTTGGTGAATTCTGCTTCACAATGATAGGAAGAGCCGACATCGAAGG 313

|||||

## Sbjct 2940

GAACAATCCAACACTTGGTGAATTCTGCTTCACAATGATAGGAAGAGCCGACATCGAAGG 2881

## Query 314

ATCAAAAAGCAACGTCGCTATGAACGCTTGGCTGCCACAAGCCAGTTATCCCTGTGGTAA 373

|||||

## Sbjct 2880

ATCAAAAAGCAACGTCGCTATGAACGCTTGGCTGCCACAAGCCAGTTATCCCTGTGGTAA 2821

## Query 374

CTTTTCTGACACCTCTAGCTTCAAATTCCGAATGACTAAAGGATCGATAGGCCACGCTTT 433

|||||

## Sbjct 2820

CTTTTCTGACACCTCTAGCTTCAAATTCCGAAGGTCTAAAGGATCGATAGGCCACGCTTT 2761

## Query 434

CACGGTTCGTATTTCGCACTGGAAATCAGAATCAAACAAGCTTTTACCCTTTTGTTCACA 493

|||||

## Sbjct 2760

CACGGTTCGTATTTCGTACTIONGGAAATCAGAATCAAACGAGCTTTTACCCTTTTGTTCACA 2701

## Query 494

CGAGATTTCTGTTCTCGTTGAGCTCATCTTAGGACACCTGCGTTATCTTTAACAGATGT 553

|||||

## Sbjct 2700

CGAGATTTCTGTTCTCGTTGAGCTCATCTTAGGACACCTGCGTTATCTTTAACAGATGT 2641

## Query 554 GCCGCC 560

|||||

## Sbjct 2640 GCCGCC 2634

- De642 มีความคล้ายคลึงกับ *Glycine max* Gm cnx-1 mRNA for calnexin,

complete cds 83% (117/140)

## Query 11

GAGATTCCAAATCCTAATTATTTTATCTTGACAAGCCTGAATTTGAGCCTATTGCTGCC 70

|||||

## Sbjct 1162

GAGATTCCAAACCCTGAATACTTTGAACTCGCAAAACCTGATTTTGAAGCCTATTGCTGCT 1221

## Query 71

ATTGGCATCGAAATATGGACCATGCAAGATGAAATCTTATTTGACAATATTCTGATAGTT 130

|||||

## Sbjct 1222

ATTGGCATTGAGATTTGGACAATGCAGGATGGCATCCTATTTGACAATGTTCTGATAGCT 1281

## Query 131 AATGATGAGAAAGTTGCAGA 150

|| |||

## Sbjct 1282 AACGATGATAAAGTTGCAGA 1301

และ De642 มีความคล้ายคลึงกับ *Glycine max* calnexin mRNA, complete cds 83%  
(117/140)

Query 11

GAGATTCCAAATCCTAATTATTTTGATCTTGACAAGCCTGAATTTGAGCCTATTGCTGCC 70

||||| ||| | || |||| | | || ||||| ||||| |||||

Sbjct 1102

GAGATTCCAAACCCTGAATACTTTGAACTCGCAAACCTGATTTTGAGCCTATTGCTGCT 1161

Query 71

ATTGGCATCGAAATATGGACCATGCAAGATGAAATCTTATTTGACAATATTCTGATAGTT 130

|||||| | | |||| | |||| | || | ||||| ||||| |

Sbjct 1162

ATTGGCATTGAGATTTGGACAATGCAGGATGGCATCCTATTTGACAATGTTCTGATAGCT 1221

Query 131 AATGATGAGAAAGTTGCAGA 150

|| |||| | |||||

Sbjct 1222 AACGATGATAAAGTTGCAGA 1241

- De7696 มีความคล้ายคลึงกับ *Calycanthus fertilis* var. *ferax* complete  
chloroplast genome 97% (87/89) 2 บริเวณ

Query 87

ACCGACGCACAAAGAAAAGATTTTGTGCGAATGGACAAGATATTGAGGAATTGTCCATA 146

||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

Sbjct 90750

ACCGACGCACAAAGAAAATATTTTGTGCGAATGAACAAGATATTGAGGAATTGTCCATA 90691

Query 147 TGTAAGATCATAATTATTGATACGGGTCT 175

||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

Sbjct 90690 TGTAAGATCATAATTATTGATACGGGTCT 90662

และ

Query 87

ACCGACGCACAAAGAAAAGATTTTGTGCGAATGGACAAGATATTGAGGAATTGTCCATA 146

||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

Sbjct 149532

ACCGACGCACAAAGAAAATATTTTGTGCGAATGAACAAGATATTGAGGAATTGTCCATA 149591

Query 147 TGTAAGATCATAATTATTGATACGGGTCT 175

||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

Sbjct 149592 TGTAAGATCATAATTATTGATACGGGTCT 149620

และ De7696 มีความคล้ายคลึงกับ *Calycanthus fertilis* var. *ferax* complete chloroplast genome 96% (64/66) 2 บริเวณ

Query 8

CGTTAGGTATGAAGATGTCAGATACCTGTGACTCGATTGGTCAAATAGTCTCTCTCTCCn 67

|||||

Sbjct 90829

CGTTAGGTATGAATATGTCAGATACCTGTGACTCGATTGGTCAAATAGTATCTCTCTCCA 90770

Query 68 nnnnnn 73

|||||

Sbjct 90769 AAAAAA 90764

และ

Query 8

CGTTAGGTATGAAGATGTCAGATACCTGTGACTCGATTGGTCAAATAGTCTCTCTCTCCn 67

|||||

Sbjct 149453

CGTTAGGTATGAATATGTCAGATACCTGTGACTCGATTGGTCAAATAGTATCTCTCTCCA 149512

Query 68 nnnnnn 73

|||||

Sbjct 149513 AAAAAA 149518

ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของcDNA ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลสากล EMBL โดยใช้โปรแกรม Swiss-Prot / TrEMBL ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

- *De161* (5'3' Frame 1) มีความคล้ายคลึงกับ Hypothetical outer membrane usher protein yhcD [Precursor] ของ *Escherichia coli* 55% (48/85)

Query: 32 ICSRQPQXQSGKHETYQLGLFESGLNLDWLLRSRHTVSYSDGTRRSQRLTYTVQKTFQS  
91  
+ S + + +G + Q L E G+N+NDW+LRS ++ ++GT +Q TY+Q+TF  
Sbjct: 159 LMSSRAEFSNGSSDYSQAAL-EGGININDWMLRSHQFLTQTNGTFSNQNSSTYLQRTFTD  
217

Query: 92 LQQTFQAGETYARQTLAIPGLTGL 116  
L+ +AGE ++L + G+  
Sbjct: 218 LKTLMRAGEVNLNNSVLEGASTYGI 242

- *De164* (5'3' Frame 3) มีความคล้ายคลึงกับ Orf204 protein ของ *Beta vulgaris L.* 80% (43/53)

Query: 7 MILHMDNSSISCPFATKSFLCASVKKNLFFWRERLFHQSSHRYLTSSYLTGLQ 59  
MIL +DNSSISC F TK FLC SVKKN+ FWRE LFHQSSHRYLT SYLT Q  
Sbjct: 1 MILRIDNSSISCSFTTKDFLCVSVKKNMLFWREILFHQSSHRYLTYSYLTIFQ 53

- *De182* (5'3' Frame 2) มีความคล้ายคลึงกับ Hypothetical protein OSJNBa0055N24.35 -ของ *Oryza sativa* 64% (113/173)

Query: 37 WLACFWLFLVSFERLGPVSLVLLTA---GLFLAGPTASAV--RYASFN-AGRQSKYGSSY 90  
WLA +LFL+ +RLG +++L A F A P S+ R A S AGR +  
Sbjct: 175 WLASSFLFLLLLDRLGTATALVLLALSIAFFAASPSSFLSRAASSRIAGRTPSSRCLF 234

Query: 91 LTAGILRNLKTXXXXXXXXXXXXXXXXXXSAFFSYKIGLEGKDAVMSLKSHMESSNYAEKI  
150  
LT GILR+LKT S FFSYKIGLEGKDAVMSLKSH+E+ NY+EKI  
Sbjct: 235 LTGGILRHLKTLVAVGLMLGMILGFLSGSVFFSYKIGLEGKDAVMSLKSHVENGNYSSEKI  
294

Query: 151 GFKQWVNENDVPGLVDKYSAQLYETVWEHLDLGAQYNSTESVNGLRHFMISK 203  
G K+W+++ND+PGLVD+YSA+LY+TVWE +D L QYN T+ +G RHF+IS+  
Sbjct: 295 GLKKWLDDNDIPGLVDQYSAKLYDVTWEQIDQLAVQYNLTDFTSGFRHFLISQ 347



- De183 (5'3' Frame 3) มีความคล้ายคลึงกับ Hypothetical protein

OSJNBa0055N24.35 ของ *Oryza sativa* 62% (62/99)

Query: 65 RPPPFATLASMPEKKSXYGSS---YLTAGILRNLKTXXXXXXXXXXXXXXXXXXNAFFSYK 121  
+P F + A+ + SS +LT GILR+LKT + FFSYK

Sbjct: 210 KPSSFLSRAASSRIAGRTPSSRCLFLTGGILRHLKTLVAVGLMLGMILGFLSGSVFFSYK 269

Query: 122 IGLEGKDAVMSLKSHMESSNYAEKIGFKQWVNENDVPVL 160  
IGLEGKDAVMSLKSH+E+ NY+EKIG K+W+++ND+P L

Sbjct: 270 IGLEGKDAVMSLKSHVENGNYSEKIGLKKWLDNDIPGL 308

- De192 (5'3' Frame 1) มีความคล้ายคลึงกับ Hypothetical protein ของ

*Xylella fastidiosa* 44% (36/80)

Query: 4 FLHVVSPLYHLQFPNACFPFWKLF--FLSRTNLLMVYKDCSVQRLCCWGADGFNSNFLH 61  
F+ VYS Y L FPF LF FL LLM+ C V + GF FLH

Sbjct: 9 FIQSVYSKYALIRSFYFPFATLFINFLFSCFLML-ACVCLVLLVLVQSTSGFQDYFLH 67

Query: 62 NIRAGIPSKIAGGYCYSTSF 81

++ + S + A Y+ +F

Sbjct: 68 SVSHSLSSPVASLCLYTFAF 87

- De362 (3'5' Frame 1) มีความคล้ายคลึงกับ A\_IG005110.24

protein(synonym F5110.24 protein Hypothetical protein AT4g00450) ของ *Arabidopsis thaliana* 55% (71/127)

Query: 5 SVVKVPDFINCN-YQNLSSSSTSFNCVRYIYIHIISLCLLKEALGERFSRVFXXXXXXX 63  
SV ++ DF N YQN S S N RYIL IHI LCLLKEALGER SRVF

Sbjct: 1216 SVARITDFSLGNIYQNHPSGVDSSNIARYILRIHITCLCLLKEALGERQSRVFEIALATE  
1275

Query: 64 XXXXXXXXXXXXVKSHRNPYQQSPEAHDISP NHSTEILNNSANVVGL-RVAKATAALSALI  
122

VK R +Q SPE++D + N+ST ++N + L R K TAA+SAL+

Sbjct: 1276 SSTALTGVFAPVKGSRGQHQLSPESYDSNANNSTIDMSNGTGKMALSRATKITAAVSALV  
1335

Query: 123 LGVIVHG 129

+G I HG

Sbjct: 1336 IGSITHG 1342

- De441 (5'3' Frame 2) มีความคล้ายคลึงกับ Hypothetical protein ของ *Acinetobacter sp.* 45% (103/223)

Query: 9 LLLRSSHLITLALRGRXFGEDYFSSLGLDVLFCFKPKRNIWYQDITVGMIEHYCRAVLKQY 68  
L++ LIT A E +VL PK W++++ + +L +

Sbjct: 24 LVISFGDLITRAKGLSINAESLVKYDYNVLGIMPKLKSWFPEASMQNMVQVAPILADF 83

Query: 69 SRRISYGSSMGAYAALYFAHALDVKVIAISQYSPRPADTSFEDR----WRDVRCRMGY 124

SR + YG SMG YAA+ ++ L +++VIA PQY+ P + EDR + DV

Sbjct: 84 SRIVGYGGSMGGYAAIKYSGLLKMNRVIAFVPQYTIDPQEV--EDRRYAEFFDVNIHRDM 141

Query: 125 SHRWREPVGQYAHXI-YDSRMTSDRRHVECLKLVFPNHNDIALPFGHPSATALFECRRL 183

+ + + Q + I YD DR H +K + P + LPF+GH + + L L

Sbjct: 142 QIQTDVSEQAQYIIVYDPYHEDREHYRKKIKLQMLTLHLPFTGHEALSVLASSLL 201

Query: 184 STLIRDLIEDAPISVRQLRADIRNGSQHYARSLLSAERHGS 226

+ IR +E +Q+R+ ++ S+ Y R+++ RH +

Sbjct: 202 NDFIRHPLEQR-YFYQQMRS-VKKNKSFYRTVINNLMRHS 242

- De642 (5'3' Frame 2) มีความคล้ายคลึงกับ Calnexin [Fragment] ของ *Zea mays* 64% (80/123)

Query: 1 KRREIPNPNYFDLDPKPEFEPIAAIGIEIWTMQDEILFDNIIIVNDEKVAESYREKASKPK 60  
K +EIPNP YF+LD+P+F+PIAAIGIEIWTMQD ILFDNILI +DEKVA S EK KPK

Sbjct: 234 KPQEIPNPEYFELDRPDFDPIAAIGIEIWTMQDGILFDNIIADDEKVATSILEKTWKPK 293

Query: 61 YELEKAKEKVQDAPVGLSGIQVIFQCSFPYTRXXXXXXXXXXXXXXXXXNMQKKIFDVLYQV 120

Y++EK KEK ++A G G+ + QKKIFDVLY++

Sbjct: 294 YDVEKEKEKAEAAAAGADGL-----SDFQKKIFDVLYKI 327

Query: 121 ADV 123

AD+

Sbjct: 328 ADI 330

- De7625 (5'3' Frame 1) มีความคล้ายคลึงกับ Putative sensor histidine kinase/response regulator ของ *Photobacterium profundum* 70% (51/72)

Query: 2 DPYRLSQILLNLISNAVKFTEKGSITVTAKVNWEENDNIEIGFSITDTGIGIAKDKLVQI 61  
 DP R+ Q++ NLI NAVKFTE+G I V+ ++ +++ IE+ F++ DTGIGI++ + Q+  
 Sbjct: 378 DPLRIQQVVTNLIGNAVKFTERGNIDVSVELKASKDESIELQFTVRDTGIGISERQQAQL  
 437

Query: 62 FDPFVQAKADIS 73  
 F F QA A IS  
 Sbjct: 438 FQAFSQADASIS 449

- De7696 (3'5' Frame 3) มีความคล้ายคลึงกับ Orf204 protein ของ *Beta vulgaris* L. 84% (42/50)

Query: 8 MILHMDNSSISCPFATKSFLCASVKKNLFFWRERLFHQSSHRYLTSSYLT 57  
 MIL +DNSSISC F TK FLC SVKKN+ FWRE LFHQSSHRYLT SYLT  
 Sbjct: 1 MILRIDNSSISCSFTTKDFLCVSVKKNMLFWREILFHQSSHRYLTYSYLT 50

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุภาลัย ไชยสุด เกิดวันที่ 3 เมษายน พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2544 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545 และสำเร็จการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ในภาคต้น ปีการศึกษา 2548 ในระหว่างการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ได้รับทุนสนับสนุนนิติตระดับปริญญามหาบัณฑิต เพื่อไปเสนอผลงานทางวิชาการในการประชุม Biology in Asia International Conference 2004 แบบบรรยาย (oral presentation) ณ ประเทศสิงคโปร์ และได้เสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ (poster presentation) ในการประชุม XVII International Botanical Congress 2005 ณ กรุงเวียนนา ประเทศออสเตรีย

