



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรแอนโทไซยานิดินในเมล็ดข้าวเพื่อใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว

Cloning and characterization of genes involved in proanthocyanidin biosynthesis in rice seeds for the use as molecular markers for rice improvement

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย

ประจำปี 2558

จำนวน 273,000 บาท

หัวหน้าโครงการ

นางสาวช่อทิพา สกุกสิงหาโรจน์

ผู้ร่วมโครงการ

นายศรีเมฆ ขาวโพพาง

นางสาวแสงทอง พงษ์เจริญกิต

นางสาววราภรณ์ แสงทอง

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

22 สิงหาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยแก่คณะผู้วิจัย ในปีงบประมาณ 2558 ขอขอบพระคุณ Professor Dr. Thomas W. Okita จาก Institute of Biological Chemistry, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้ออะโกรแบคทีเรียและ binary vector

ขอขอบพระคุณสาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือสำหรับการทำวิจัยเป็นอย่างดี และขอขอบพระคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำหรับการให้ใช้บริการโรงเรือนกระจกสำหรับปลูกพืช

นอกจากนี้ขอขอบคุณนางสาวรอยพิมพ์ สุขเกษม นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่มีส่วนสำคัญทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2559

สารบัญ

	หน้า
สารบัญภาพ	๗
บทคัดย่อ	1
Abstract	3
คำนำ	5
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	7
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
การตรวจเอกสาร	8
อุปกรณ์และวิธีการ	24
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	50
สรุปผลการวิจัย	73
เอกสารอ้างอิง	75
ภาคผนวก	
บทความวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์	
- การขาดหายของนิวคลีโอไทด์ 14 คู่เบสในยีน <i>Rc</i> ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบเฟรมชิฟท์ในข้าวขาวและดำ	
- การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีน <i>OsDFR</i> ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานินในข้าวดำพันธุ์ลัมพัว	

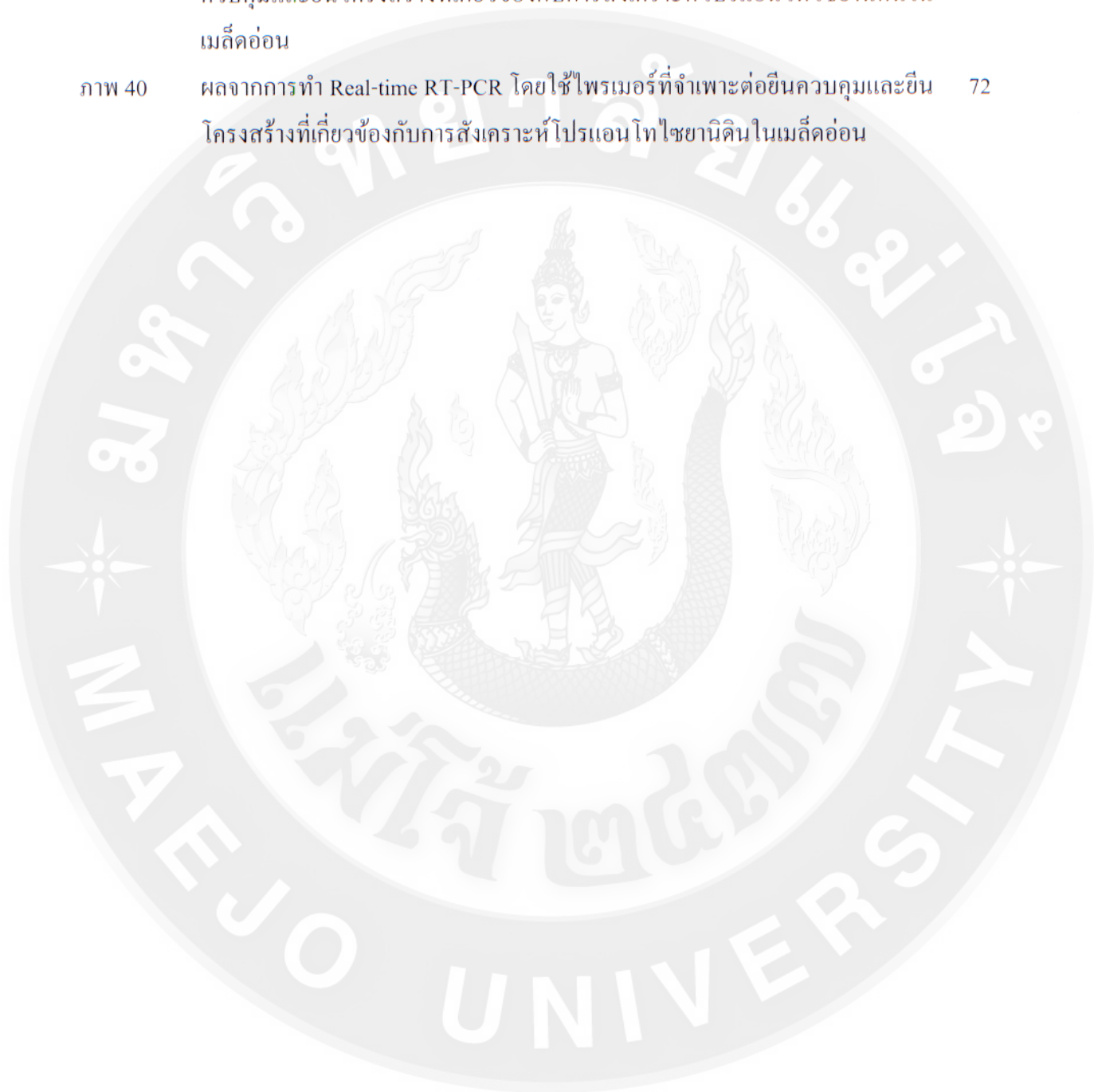
สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 โครงสร้างของต้นข้าว	11
ภาพ 2 ส่วนต่าง ๆ ของรวง	12
ภาพ 3 ส่วนต่าง ๆ ของดอกข้าว	13
ภาพ 4 โครงสร้างของเมล็ด	14
ภาพ 5 โครงสร้างของฟลาไวโนยด์	16
ภาพ 6 การสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิน	17
ภาพ 7 โครงสร้างของโปรแอนโทไซยานิน	18
ภาพ 8 โครงสร้างของยีน <i>Rc</i>	20
ภาพ 9 โครงสร้างของยีน <i>Rd</i>	20
ภาพ 10 แผนผังแสดงตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว	21
ภาพ 11 แผนที่พลาสมิด pJET1.2	25
ภาพ 12 แผนที่พลาสมิด pBluescript SK+	25
ภาพ 13 การวิเคราะห์การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าว	50
ภาพ 14 ผลการตรวจสอบยีน <i>Rc</i> ในจีโนมข้าวด้วยเทคนิค PCR	51
ภาพ 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน <i>Rc</i> บริเวณเอกซอนที่ 7 ของข้าว 6 พันธุ์	52
ภาพ 16 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>Rc</i> บริเวณเอกซอนที่ 7 ของข้าว 6 พันธุ์	53
ภาพ 17 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อนของข้าว	54
ภาพ 18 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเมล็ดอ่อนของข้าว	54
ภาพ 19 ผลการตรวจสอบยีน <i>actin</i> โดยใช้ cDNA จากใบอ่อนของข้าว	55
ภาพ 20 ผลการตรวจสอบยีน <i>actin</i> โดยใช้ cDNA จากเมล็ดอ่อนของข้าว	56
ภาพ 21 ผลการแสดงออกของยีน <i>Rc</i> ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ cDNA จากใบอ่อน (L) และเมล็ดอ่อนของข้าว (S)	57
ภาพ 22 ผลการแสดงออกของยีน <i>Rc</i> ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ cDNA จากเมล็ดอ่อนของข้าวที่อายุ 5, 14 และ 25 วัน หลังดอกบาน เป็นแม่พิมพ์	58
ภาพ 23 ผลการเพิ่มปริมาณยีน <i>Rc</i> โดยใช้ cDNA จากเมล็ดอ่อนของข้าวด้วยเทคนิค PCR	59

	หน้า
ภาพ 24 ผลการแยกบริสุทธิ์ขึ้น <i>Rc</i> จากเจล	59
ภาพ 25 ผลการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ <i>E. coli</i> DH5 α ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิ ลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร	60
ภาพ 26 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด จากการเชื่อมต่อยีน <i>Rc</i> จาก เมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ Kitaake กับเวกเตอร์ pBluescrip SK+	61
ภาพ 27 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด จากการเชื่อมต่อยีน <i>Rc</i> จาก เมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ Kasalath กับเวกเตอร์ pJET1.2	62
ภาพ 28 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด จากการเชื่อมต่อยีน <i>Rc</i> จาก เมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ สุโขทัยหอมแดงกับเวกเตอร์ pJET1.2	62
ภาพ 29 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด จากการเชื่อมต่อยีน <i>Rc</i> จาก เมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ หอมมะลิแดงกับเวกเตอร์ pJET1.2	63
ภาพ 30 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bgl</i> /II	64
ภาพ 31 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI	64
ภาพ 32 แผนที่ยีน <i>Rc</i> ใน pBluescrip SK+ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI กรณีที่มี ทิศที่ถูกต้อง (ทิศ sense)	65
ภาพ 33 แผนที่ยีน <i>Rc</i> ใน pBluescrip SK+ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI กรณีที่มี ทิศที่ไม่ถูกต้อง (ทิศ antisense)	65
ภาพ 34 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI/ <i>Nco</i> I	66
ภาพ 35 แผนที่ยีน <i>Rc</i> ใน pJET 1.2 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI/ <i>Nco</i> I กรณีที่มีทิศ ที่ถูกต้อง (ทิศ sense)	66
ภาพ 36 แผนที่ยีน <i>Rc</i> ใน pJET 1.2 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI/ <i>Nco</i> I กรณีที่มี ทิศที่ไม่ถูกต้อง (ทิศ antisense)	67
ภาพ 37 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน <i>Rc</i> บริเวณ ORF ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ กับลำดับเบสของยีน <i>Rc</i> จากข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดงใน GenBank	68
ภาพ 38 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>Rc</i> ที่ได้จากการแปลรหัสของบริเวณ coding sequence ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ กับลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>Rc</i> ใน GenBank	70

หน้า

- ภาพ 39 ผลจากการทำ semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 71
ควบคุมและยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานินใน
เมล็ดอ่อน
- ภาพ 40 ผลจากการทำ Real-time RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนควบคุมและยีน 72
โครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานินในเมล็ดอ่อน



การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดิน
ในเมล็ดข้าวเพื่อใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว

**Cloning and characterization of genes involved in proanthocyanidin biosynthesis in
rice seeds for the use as molecular markers for rice improvement**

ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์¹ ศรีเมฆ ชวโพงพาง² แสงทอง พงษ์เจริญกิต¹
และ วราภรณ์ แสงทอง แสงทอง¹

Chotipa Sakulsingharoj¹, Srimek Chowpongpan², Saengtong Pongjaroenkit¹
and Varaporn Sangtong¹

¹สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

²ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กทม. 10900

บทคัดย่อ

โปรแอนโทไซยานิดินเป็นรงควัตถุอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ช่วยปกป้องพืชจากการทำลายของรังสีอัลตราไวโอเลต และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ข้าวเมล็ดสีแดงและน้ำตาลมีโปรแอนโทไซยานิดินในปริมาณสูงสะสมอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดชั้นนอก (pericarp) ในข้าวมียีน *Rc* เป็นยีนควบคุมที่สำคัญซึ่งเป็นรหัสของโปรตีน ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในวิถีการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดิน ทำให้เกิดสีน้ำตาลหรือแดงของเมล็ดข้าว ยีนควบคุมจึงมีความสำคัญมากในการทำให้เกิดสีในข้าว อย่างไรก็ตาม กลไกการควบคุมการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินโดยการทำงานของยีนควบคุมและยีนโครงสร้างในข้าวยังไม่ทราบแน่ชัด ดังนั้น งานวิจัยนี้ได้ศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนควบคุมการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินเพื่อทำให้เข้าใจการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินในข้าว การตรวจสอบยีน *Rc* บางส่วนบริเวณเอกซอนที่ 7 จากจีโนมข้าว 6 พันธุ์ แล้วทำการเปรียบเทียบลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีน *Rc* พบว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงดำและขาว เกิดการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ 14 คู่เบส ที่ตำแหน่ง 1408-1421 และเกิดการแทนที่จากเบส G เป็น A ที่ตำแหน่ง 1191 ส่งผลกระทบบให้ข้าวขาวและข้าวดำเกิดการกลายพันธุ์แบบ frameshift ทำให้เกิด premature stop codon สายโพลีเพปไทด์จึงสั้นลง จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *Rc* ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของข้าวทั้งข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว สีแดง และ

สีม่วงดำ พบว่า ยีน *Rc* มีการแสดงออกเฉพาะในเมล็ดอ่อนของข้าวอายุ 5 วัน เท่านั้น แสดงว่า ยีน *Rc* อาจมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสร้างโปรแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว

เมื่อทำการค้นหายีน *Rc* แบบ full-length ด้วยเทคนิค RT-PCR จากเมล็ดอ่อนของข้าวแดง 3 พันธุ์ ได้แก่ Kasalath สุโขทัยหอมแดง และหอมมะลิแดง พบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 2,000 bp แล้วนำไปโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ เพื่อส่งหาลำดับเบส จากการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโนของยีน *Rc* ที่โคลนได้กับลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีน *Rc* จากข้าวสีแดงในฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความเหมือนถึง 99 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า บริเวณที่ต่างนั้น ไม่มีผลกระทบต่อบริเวณ DNA binding motif ชนิด basic helix loop helix (bHLH) ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีน Myc-type transcription factor

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *Rc* และยีน โครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิน โดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR และ Real-time RT-PCR ในเมล็ดข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีขาว แดง และดำ พบว่า ข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดง มีระดับการแสดงออกของยีน *Rc*, *OsCHS*, *OsCHI*, *OsDFR*, และ *OsANR* สูงกว่าข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำ ส่วนยีน *OsANS* พบระดับการแสดงออกในข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีดำสูงกว่าในข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีขาวและแดง ในขั้นตอนต่อไป จะได้นำยีน *Rc* ที่โคลนได้จากข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดง ไปสร้าง construct สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีน ทดสอบการใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการถ่ายยีน และประยุกต์ใช้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป

คำสำคัญ: ยีน *Rc*, ข้าว, โปรแอนโทไซยานิน, การแสดงออกของยีน

Abstract

Proanthocyanidins belong to a class of flavonoids, that protect plants against UV radiation. For human, it has health benefits and delays cancer growth. Proanthocyanidin was accumulated in pericarp of red and brown rice grains. *Rc* gene encodes a Myc-type basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor that regulates expression of structural genes in proanthocyanidin biosynthesis pathway in rice. However, the mechanism of proanthocyanidin biosynthesis is not yet clearly understood. Therefore, this study aims to clone and characterize the function of *Rc* gene controlling proanthocyanidin biosynthesis. Genomic sequences of *Rc* gene at 7th exon from 6 rice varieties were investigated. Comparison of nucleotide and deduced amino acid sequences revealed that white and black rice had 14-bp deletion at the position 1408-1421 and base substitution at the position 1191 from G (red rice) to A (white and black rice), causing frameshift and premature stop codon, leading to shorter polypeptides in white and black rice. Expression of *Rc* gene in rice tissues was also determined. It was found that *Rc* gene expressed only in 5-day-old developing seeds of all studied rice varieties, suggesting that *Rc* gene might play an important role in regulation of proanthocyanidins pigmentation in rice seeds.

The full-length *Rc* genes from developing seeds of three red rice varieties (Kasalath, Sukhothai Hom Daeng and Hom Mali Daeng) were identified by RT-PCR. The expected fragments of about 2,000 bp were amplified and cloned into cloning vector for DNA sequencing analysis. Comparison of nucleotide and deduced amino acid sequences of *Rc* gene from this study with the gene from red rice in GenBank indicated 99 % identity. The differences in positions had no effect on the region of DNA binding motif, basic helix loop helix (bHLH), which is conserved among Myc-type transcription factors.

Expression of regulatory *Rc* gene and structural genes involved in proanthocyanidin biosynthesis in developing rice seeds of white, red and black rice varieties was investigated using semi-quantitative RT-PCR and real-time RT-PCR. The results indicated that in red rice varieties the expression levels of *Rc*, *OsCHS*, *OsCHI*, *OsDFR* and *OsANR* were higher than those of white and black rice varieties. However, the expression of *OsANS* gene was found at the higher level in black rice varieties than that of white and red rice varieties. The cloned *Rc* gene from red rice varieties will be further constructed for transformation of rice to study gene functions, examine the

use as marker gene or molecular marker and apply this gene for future rice breeding or variety improvement.

Keywords: *Rc* gene, Rice (*Oryza sativa*), Proanthocyanidins, Gene expression



คำนำ

ในปัจจุบันประชากรโลกมีการเปลี่ยนแปลงการดำเนินชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งการบริโภคทำให้เกิดภาวะเสี่ยงต่อการเกิดโรค ข้าวที่มีสีในเยื่อหุ้มเมล็ดมีสารแอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานินถือว่าเป็นอาหารสุขภาพและได้รับความนิยมแก่กลุ่มผู้บริโภคที่รักสุขภาพ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีต่าง ๆ เช่น น้ำตาล แดง และม่วงดำหรือเข้ม (Sweeney et al., 2006) มีคุณสมบัติในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant) ช่วยเสริมการหมุนเวียนของกระแสโลหิต ด้านอนุมูลอิสระชะลอการเสื่อมของเซลล์ร่างกาย ช่วยป้องกันโรคหัวใจและทำให้ดูอ่อนกว่าวัย นอกจากนี้ ยังสามารถลดโคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง และยังมีผลต่อการทำงานของต่อมใต้สมอง ยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร และยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือด ลดน้ำตาลในเลือด และเพิ่มระดับของฮอร์โมนอินซูลินของคนเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระเพาะ และช่วยป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ตหรือยูวี ช่วยลดแมลงในการผสมเกสรพืช (นิรนาม, 2557)

ข้าวที่มีสีมีสารแอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานินเป็นส่วนประกอบซึ่งจัดเป็นสารฟลาโวนอยด์ที่ถูกสังเคราะห์โดย secondary metabolites กระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์แบ่งออกเป็นการสังเคราะห์สารกลุ่มแอนโทไซยานิน ได้แก่ cyanidin และ peonidin นอกจากนี้ ยังมีการสังเคราะห์สารกลุ่มโปรแอนโทไซยานิน ได้แก่ procyanidin โดยเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นที่สะสมสารสีในข้าว ซึ่งมีทั้งหมด 3 สี คือ สีน้ำตาลอ่อน (procyanidin) สีแดง (peonidin) และสีม่วงเข้ม (cyanidin) โดยในเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง และม่วงดำจะพบโปรแอนโทไซยานินและแอนโทไซยานินในเมล็ด 0.16 % และ 1.36 % ตามลำดับ (Escribano-Bailon et al., 2004)

การสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิน ทำให้เกิดสีน้ำตาลของเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวถูกควบคุมด้วยยีน *Rc* นอกจากนี้ การเกิดสีแดงของเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวได้นั้น จะต้องมียีน *Rd* ร่วมทำงานควบคู่กับยีน *Rc* โดยยีน *Rd* ช่วยส่งเสริมในการเพิ่มขึ้นของสีในเยื่อหุ้มเมล็ด ยีน *Rc* จัดว่าเป็นรหัสของ transacting regulatory factor ที่มี bHLH motif และยีน *Rd* เป็นรหัสของเอนไซม์ DFR (dihydroflavonol 4-reductase) โดยยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิน ให้ลักษณะปรากฏหรือฟีโนไทป์ (phenotype) ที่ได้นำมาใช้เป็น morphological markers เพื่อระบุพันธุ์ข้าวและการปรับปรุงพันธุ์ข้าว

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีในเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว คือ ยีนควบคุม และยีนโครงสร้าง โดยยีนควบคุมเป็นรหัสของทรานสคริปชัน แฟกเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้าง ซึ่งเกี่ยวข้อง

กับการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดิน ส่วนอื่นโครงสร้างเป็นรหัสของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องใน pathway การสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดิน ดังนั้น ยีนควบคุมจึงมีความสำคัญมากในการทำให้เกิดสีในเนื้อหุ้มเมล็ดข้าว เนื่องจากไปควบคุมการแสดงออกของยีน โครงสร้างหลายยีน อย่างไรก็ตาม กลไกการควบคุมการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินโดยการทำงานของยีนควบคุมและยีนโครงสร้างในข้าวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จะได้ศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนควบคุมการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดิน เพื่อให้เข้าใจกลไกการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินในข้าว ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ และมูลค่าทางเศรษฐกิจให้กับข้าวที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี อีกทั้งยังถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้ โดยใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการระบุพันธุ์ข้าวทำให้สามารถคัดเลือกข้าวได้ตั้งแต่ยังไม่ออกดอกติดเมล็ด นอกจากนี้ ยังสามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกในระบบการถ่ายยีน โดยสังเกตเห็นได้จากการสร้างรงควัตถุในพืชที่ได้รับการถ่ายยีน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อโคลนยีนควบคุมการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานินดินในข้าวไทย
2. เพื่อศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนควบคุมการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิน

ดินในข้าวไทย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถโคลนยีนควบคุมการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานินดินในข้าวไทยได้
2. ได้ทราบโครงสร้างของยีนและความต่างของลำดับดีเอ็นเอของยีนควบคุมการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานินดินในข้าวขาวและข้าวสี

การตรวจเอกสาร

ปัจจุบันความต้องการข้าวในการบริโภคของโลกมีประมาณ 417.7 ล้านตัน สำหรับประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตอาหารที่สำคัญของโลก โดยเฉพาะประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งออกข้าวมากที่สุดในโลก ด้วยสัดส่วนการส่งออก ร้อยละ 36 รองลงมา คือ เวียดนาม ร้อยละ 20 อินเดีย ร้อยละ 18 สหรัฐอเมริกา ร้อยละ 14 ปากีสถาน ร้อยละ 12 ตามลำดับ (วิธิพีเดีย, 2557) การบริโภคข้าวเป็นอาหารหลักและเป็นแหล่งของอาหารที่สำคัญในการให้พลังงานในแต่ละวันของคนไทยอีกทั้งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากการเกษตรส่วนใหญ่ของประเทศปลูกข้าวเป็นพืชหลัก และข้าวยังเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในประเทศและต่างประเทศโดยเฉพาะประเทศในภูมิภาคเอเชียที่นิยมรับประทานข้าวเป็นอาหารหลักมากกว่าในภูมิภาคอื่นของโลก

ประเทศไทยมีพื้นที่ทำการเกษตรส่วนใหญ่เหมาะสมกับการทำนาปลูกข้าว โดยมีพื้นที่นาปีและนาปรังรวมกันประมาณ 65 ล้านไร่ หรือ ร้อยละ 57 ของพื้นที่ทำการเกษตรทั้งหมด มีครัวเรือนเกษตรกรทำนา 3.7 ล้านครัวเรือน หรือ ร้อยละ 66 ของครัวเรือนเกษตรกรทุกประเภท ในแต่ละปีผลิตข้าวเปลือกได้ประมาณ 27 ล้านตันข้าวเปลือก โดยมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย ร้อยละ 3 ต่อปี ในจำนวนนี้นำไปใช้บริโภคภายในประเทศร้อยละ 57 ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารสัตว์และแปรรูปผลิตภัณฑ์อื่น 3.4 ล้านตัน และส่งออก 10.2 ล้านตัน ข้าวสารต่อปี มูลค่า 128,000 ล้านบาท จัดอยู่ในลำดับที่ 3 ของสินค้าภาคเกษตรแต่เป็นอันดับ 1 ของโลก มีส่วนแบ่งการตลาด ร้อยละ 27 แม้แต่องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติได้ให้ความสำคัญกับประเทศไทยในการเป็นผู้นำในด้านการส่งออกข้าวเพื่อป้อนพลเมืองโลกในอีก 20 ปีข้างหน้า ด้านสถานการณ์การบริโภคและใช้ประโยชน์จากข้าวของโลก ปีการผลิต 2555/56 กระทรวงเกษตร สหรัฐอเมริกา ได้ประเมินเบื้องต้นว่าทั่วโลกจะมีปริมาณการบริโภคและใช้ประโยชน์จากข้าวรวม 467.069 ล้านตันข้าวสาร ปริมาณเพิ่มขึ้นจากการผลิต 2554/55 (ที่ระดับ 460.045 ล้านตันข้าวสาร) ปริมาณ 7.024 ล้านตันข้าวสาร หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.53 สำหรับประเทศไทยปริมาณการส่งออกข้าวในปีการค้า 2557 จะมีปริมาณ 8.500 ล้านตันข้าวสารเพิ่มขึ้นจากปีที่ผ่านมา 1.800 ล้านตันข้าวสาร หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 26.87 โดยไทยส่งออกข้าวสูงเป็นลำดับที่ 2 รองจากอินเดีย ส่วนการนำเข้าข้าวสารในปีการค้า 2556 (ปีการผลิต 2555/56) ประเทศที่มีการนำเข้าสูงสุดคือ จีน รองลงไปได้แก่ ไนจีเรีย อิหร่าน อิรัก สหภาพยุโรป ราชอาณาจักรอียิปต์ และฟิลิปปินส์ ตามลำดับ (กรมการข้าว, 2557) จะเห็นได้ว่าปัจจุบันมีการผลิตข้าวเพิ่ม

มากขึ้นจากปีก่อน ปริมาณการส่งออกและการนำเข้าข้าวในแต่ละประเทศมากขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประชากรโลกมีความต้องการบริโภคและใช้ประโยชน์จากข้าวในปริมาณเพิ่มขึ้น

ชีววิทยาของข้าว

ข้าว (*Oryza sativa*) เป็นพืชล้มลุกตระกูลหญ้าสามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น จำนวนชนิด (species) ทั้งหมดที่พบในสกุลออไรซาของข้าวนั้นมีประมาณ 20 ชนิด โดยส่วนใหญ่จะเป็นพวกที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2 ชุด (diploid, $2n = 24$) และส่วนน้อยเป็นพวกที่มีโครโมโซม 4 ชุด (tetraploid $2n = 48$) ในสภาพธรรมชาติ ข้าวที่นิยมบริโภคมีอยู่ 2 สปีชีส์ใหญ่ ๆ คือ (มูลนิธิข้าวไทยในพระบรมราชูปถัมภ์, 2552)

1. *Oryza glaberrima* ปลูกเฉพาะในเขตร้อนแอฟริกาเท่านั้น
2. *Oryza sativa* ปลูกทั่วไปทุกประเทศ ข้าวชนิด *Oryza sativa* ยังแยกออกได้เป็น 3 ชับสปีชีส์ได้แก่
 - 2.1 *indica* มีลักษณะของเมล็ดยาว เรียว นิยมปลูกมากในเขตร้อน เช่น ประเทศไทย อินเดีย ฟิลิปปินส์
 - 2.2 *japonica* มีลักษณะของเมล็ดค่อนข้างป้อม สั้น นิยมปลูกมากในเขตอบอุ่น เช่น ประเทศญี่ปุ่นเกาหลี
 - 2.3 *javanica* เป็นข้าวที่มีลักษณะของเมล็ดอยู่ระหว่าง *indica* และ *japonica* เมล็ดสั้น นิยมปลูกมากในประเทศอินโดนีเซีย

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว

ลักษณะที่สำคัญของข้าวแบ่งออกได้เป็นลักษณะที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโต (ภาพ 1) และลักษณะที่เกี่ยวกับการขยายพันธุ์ (ภาพ 2 และ 3) (ประพาส, 2529)

1. ลักษณะที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของต้นข้าว

ราก (Roots)

รากเป็นส่วนที่อยู่ใต้ผิวดิน ใช้ยึดลำต้นกับดินเพื่อไม่ให้ต้นล้ม ต้นข้าวไม่มีรากแก้วแต่มีรากฝอยแตกแขนงกระจายอยู่ใต้ผิวดินกระจายอยู่ใต้ผิวดิน แต่ละแขนงของรากฝอยจะมีรากขนอ่อน และรากอาจเกิดขึ้นที่ข้อซึ่งอยู่ใต้ดินและอยู่ใต้น้ำด้วย เมื่อเมล็ดงอกรากชุดแรกเรียกว่า รากชั่วคราว (primary หรือ seminal root) ต่อมาจะมีรากแขนง (lateral roots) ขึ้น ๆ เมื่อกล้ามีข้อ รากชุดแรกและรากแขนงหายไปแล้วเกิดรากชุดใหม่ขึ้นมาแทนบริเวณข้อใต้ดิน เรียก crown roots ต้นข้าวใช้รากสำหรับดูดอาหารจากดิน ได้แก่ แร่ธาตุต่าง ๆ และน้ำ อาหารเหล่านี้จะถูกส่งไปที่ใบ เพื่อเปลี่ยนเป็นแป้งโดยวิธีการที่เรียกว่า สังเคราะห์แสง

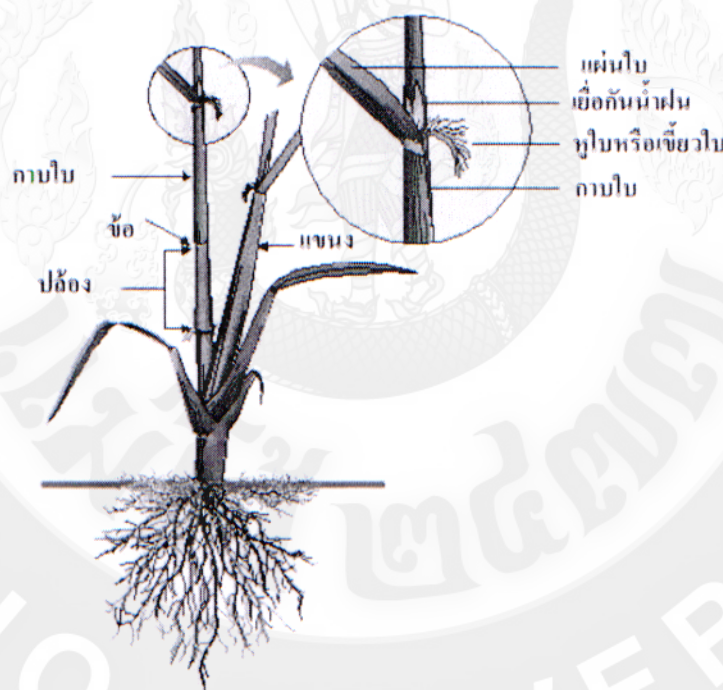
ลำต้น (Stem or culm)

มีลักษณะเป็นโพรงตรงกลางและแบ่งออกเป็นปล้อง ๆ โดยมีข้อกั้นระหว่างปล้อง ความยาวของปล้องนั้นต่างกัน จำนวนปล้องจะเท่ากับจำนวนใบของต้นข้าว ปกติมีประมาณ 20-25 ปล้อง ปล้องซึ่งอยู่ที่โคนต้นจะสั้นกว่าและหนากว่าปล้องซึ่งอยู่ที่ปลายลำต้น ปล้องที่อยู่ใกล้ผิวน้ำจะโตกว่าที่อยู่ลึกลงไปใต้น้ำ ที่ข้อเป็นส่วนที่แบ่งลำต้นออกเป็นปล้อง ๆ นั้น มีตาสำหรับเจริญเติบโตออกมาเป็นหน่อข้อละหนึ่งตาและอยู่สลับกันไปจากข้อหนึ่งไปอีกข้อหนึ่ง สีของข้อก็ต่างกันไปตามพันธุ์กรรมของพันธุ์ข้าว ซึ่งอาจจะเป็นสีเหลืองหรือสีม่วงก็ได้ ส่วนความยาวของปล้องนั้นก็ต่างไปตามพันธุ์ พันธุ์ต้นสูงจะมีปล้องยาวกว่าพันธุ์ต้นเตี้ย ต้นข้าวถูกห่อด้วยกาบใบ จึงทำให้ไม่สามารถมองเห็นลำต้นหรือปล้องของต้นข้าวในระยะแตกกอ แต่ต้นข้าวมีการยืดลำต้นสูงในระยะออกรวงจนสามารถมองเห็นลำต้นได้

ใบ (Leaves)

ต้นข้าวมีใบไว้สำหรับทำการสังเคราะห์แสง แลกเปลี่ยนแร่ธาตุ อาหาร น้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ให้เป็นแป้ง เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างเมล็ดของต้นข้าว ใบประกอบด้วยกาบใบและแผ่นใบเชื่อมติดกันด้วยข้อต่อของใบ

กาบใบ (leaf sheath) คือ ส่วนที่ติดอยู่กับข้อของลำต้นและห่อหุ้มต้นข้าวไว้ แต่ละข้อมีเพียงหนึ่งกาบใบเท่านั้น แผ่นใบ (leaf blade) คือ ส่วนที่อยู่เหนือข้อต่อของใบ มีลักษณะเป็นแผ่นแบนบาง ๆ พันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์จะมีความยาว ความกว้าง รูปร่าง สีของใบ ตลอดจนการทำมุมของใบกับลำต้นไม่เหมือนกัน เส้นใบของข้าวมองเห็นได้ชัดจากด้านบนของแผ่นใบ เส้นใบจะขนานกันเพราะข้าวเป็นพืชพวกใบเลี้ยงเดี่ยว ใบข้าวใบสุดท้าย ซึ่งหมายถึงใบที่ติดกับรวงข้าว เรียกว่า ใบธง ปกติใบธงจะมีลักษณะสั้นและทำมุมกับลำต้นต่างจากใบอื่น ๆ ที่อยู่ข้างล่างที่ข้อต่อของใบ ซึ่งเป็นส่วนที่เชื่อมต่อระหว่างกาบใบและแผ่นใบ ต้นข้าวต้นเดียวอาจแตกออกเป็นหน่อใหม่ประมาณ 5-15 หน่อ หน่อใหม่ที่เกิดขึ้นจะมีจำนวนใบน้อยกว่าต้นแรกของมัน และบางหน่ออาจไม่มีรวง



ภาพ 1 โครงสร้างของต้นข้าว

ที่มา: ดัดแปลงจาก HubPages (2015: ระบบออนไลน์)

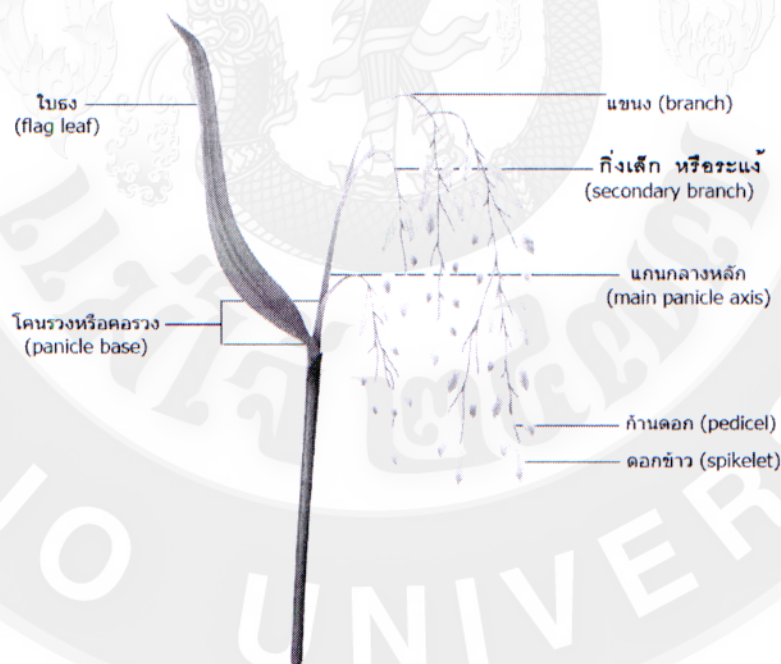
2. ลักษณะที่เกี่ยวกับการขยายพันธุ์

ข้าวขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย ลักษณะที่สำคัญเกี่ยวกับการขยายพันธุ์ ได้แก่ รวง ดอกข้าว และเมล็ดข้าว (ประพาส, 2529)

รวงหรือช่อ (Panicle or inflorescence)

รวง หมายถึง ช่อดอกของข้าว (inflorescence) หรือช่อเมล็ดข้าว ซึ่งเกิดขึ้นที่ข้อของปล้องอันสุดท้ายของต้นหรือหน่อข้าว ระยะระหว่างข้ออันบนของปล้องสุดท้ายกับข้อต่อของใบธง เรียกว่า โคนรวงหรือคอรวง (panicle base) ดังนั้น คอรวงจะสั้นหรือยาวขึ้นอยู่กับระยะระหว่างข้ออันบนของปล้องสุดท้ายกับข้อต่อของใบธง

รวงข้าวประกอบด้วยก้านรวงอันใหญ่ต่อจากคอรวงขึ้นไป แล้วแตกแขนงออกไปมากมาย โดยแต่ละข้อของก้านที่แตกแขนงออกไปเรียกว่า แขนงที่หนึ่ง (primary branches) และแต่ละข้อของแขนงที่หนึ่ง จะแตกแขนงออกไปอีกเป็นแขนงที่สอง (secondary branches) ซึ่งมีก้านดอกข้าวติดอยู่ แขนงที่สองของรวงข้าว (ภาพ 2)



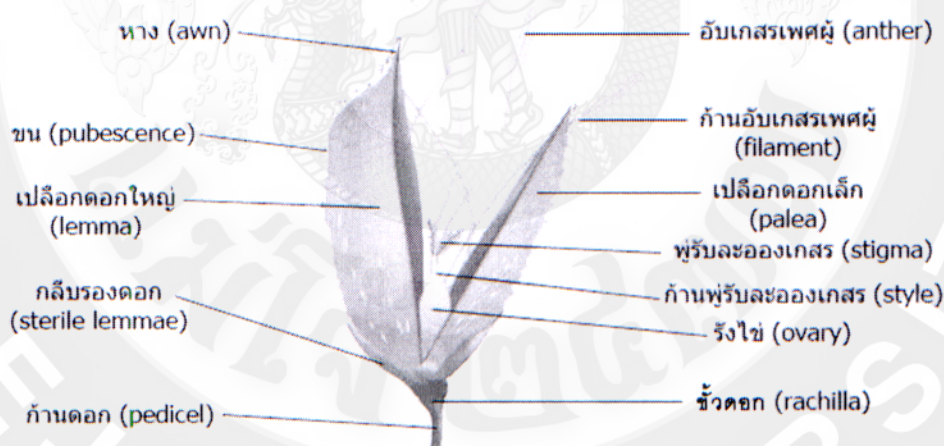
ภาพ 2 ส่วนต่าง ๆ ของรวง

ที่มา: องค์ความรู้เรื่องข้าว (2556: ระบบออนไลน์)

ดอกข้าว (Spikelet)

ดอกข้าวประกอบด้วยเปลือกนอกใหญ่สองแผ่นประสานกัน เพื่อห่อหุ้มส่วนที่อยู่ภายในไว้ เรียกว่า เลมมา (lemma) ส่วนเปลือกนอกใหญ่แผ่นใน เรียกว่า พาเลีย (palea) ที่ปลายสุดของเปลือกนอกจะมีหาง (awn) เป็นปลายแหลมยื่นออกมา ส่วนใหญ่ห่อหุ้มเกสรตัวผู้ (stamen) และเกสรตัวเมีย (pistil) ไว้ภายใน เกสรตัวผู้ประกอบด้วย อับเกสรหรืออับเรณู (anther) สีเหลือง ซึ่งภายในมีละอองเกสร (pollen grains) ขนาดเล็กจำนวนมาก อับนี้ติดอยู่บนก้านยาวและเชื่อมติดอยู่กับฐานของดอก ดอกข้าวแต่ละดอกจะมีอับเกสร 6 อัน ส่วนเกสรตัวเมียนั้น ประกอบด้วยพู่ที่รับละอองเกสร (stigma) 2 อัน แต่ละอันมีก้าน (style) เชื่อมติดอยู่กับรังไข่ (ovary) ในรังไข่จะมีไข่ เมื่อถูกผสมเกสรแล้วจะกลายเป็นเมล็ด (ภาพ 3)

ดอกข้าวเป็นดอกชนิดสมบูรณ์เพศ (perfect flower) เพราะมีเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน ดังนั้น การผสมเกสรหรือการถ่ายเรณู (pollination) ส่วนใหญ่จึงเป็นแบบการผสมตัวเอง (self-pollination or fertilization) ปกติการผสมเกสรเกิดขึ้นภายในดอกเดียวกัน ดอกข้าวจะเริ่มบานจากปลายรวงลงมาสู่โคนรวงข้าว



ภาพ 3 ส่วนต่าง ๆ ของดอกข้าว

ที่มา: องค์ความรู้เรื่องข้าว (2556: ระบบออนไลน์)

เมล็ดข้าว (Fruit)

เมล็ดข้าวหรือเนื้อในเมล็ดข้าว หมายถึง ส่วนที่กะเทาะเอากาบหรือเปลือกนอก (เรียกว่า แกลบ) ออกไปแล้ว เป็นส่วนที่ใช้เป็นอาหารพวกคาร์โบไฮเดรต เรียกกันว่าแป้ง ส่วนที่เป็นแป้ง

เรียกว่า เอนโดสเปิร์ม (endosperm) และส่วนที่เป็นคัพภะหรือเอ็มบริโอ (embryo) ซึ่งถูกห่อหุ้มไว้โดยกาบหรือเปลือกนอกส่วนใหญ่สองแผ่น เอ็มบริโอเป็นส่วนที่มีชีวิตและงอกออกมาเป็นต้นข้าว หลังจากการผสมเกสร ละอองเกสรก็จะงอกลงไปในก้านของที่รับละอองเกสร เพื่อจะได้ให้นิวเคลียสจากละอองเกสรลงไปผสม โดยรวมตัวกับไข่และนิวเคลียสอื่น ๆ ในรังไข่ นิวเคลียสที่ได้รวมตัวกับไข่จะเจริญเติบโตเป็นเอ็มบริโอ ส่วนนิวเคลียสที่ได้รวมตัวกับนิวเคลียสอื่น ๆ (polar nuclei) ก็จะเจริญเติบโตเป็นเนื้อในเมล็ดหรือแป้งที่เรียกว่า เอนโดสเปิร์ม หลังจากการผสมเกสรประมาณ 30 วัน เมล็ดข้าวก็จะแก่พร้อมที่จะเก็บเกี่ยวได้ (ภาพ 4)



ภาพ 4 โครงสร้างของเมล็ด

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Sabarudin Sahari (2013: ระบบออนไลน์)

ข้าวที่เยื่อหุ้มเมล็ดมีสี

ข้าวปลูกเพื่อบริโภคโดยทั่วไปนั้น หลังจากการสีหรือกะเทาะครั้งแรกเพื่อเอากาบหรือเปลือกหุ้มเมล็ดออก จะมีลักษณะของเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ขณะที่ในข้าวป่าบางพันธุ์ เยื่อหุ้มเมล็ดมีสีหลากหลาย บางพันธุ์มีใบสีม่วงหรือสีเขียว ในขณะที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง สีแดงและสีน้ำตาล การเกิด

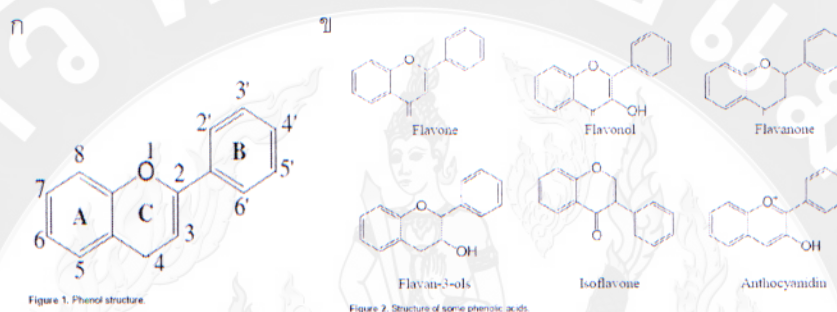
สีในส่วนเชื้อหุ้มเมล็ดของข้าวมาจากการสะสมรงควัตถุ โดยข้าวเมล็ดสีม่วงดำเกิดจากการสะสมรงควัตถุแอนโทไซยานิน ส่วนข้าวเมล็ดสีแดงเกิดจากการสะสมรงควัตถุโปรแอนโทไซยานินรงควัตถุเหล่านี้เป็น secondary metabolites ที่อยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ (Furukawa *et al.*, 2007) โดยรงควัตถุทั้งสองมีวิธีการสังเคราะห์และสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ร่วมกัน แต่มียีนควบคุม (regulatory genes) ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานินที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามจากการศึกษามีรายงานว่า ในเชื้อหุ้มเมล็ดข้าวสีมีการสร้างรงควัตถุที่มี phytochemicals เช่น phenolics, flavonoids, carotenoids, tocots และ c-oryzanols มากกว่าในเชื้อหุ้มเมล็ดข้าวขาว ซึ่งสารเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Lim and Ha, 2013) จึงเป็นที่สนใจในหมู่ของนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวและผู้บริโภคซึ่งให้ความสำคัญต่อพันธุ์ข้าวที่สร้างรงควัตถุเหล่านี้เนื่องจากมีประโยชน์ต่อมนุษย์

ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นสาร secondary metabolites อยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic rings) ที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ในโมเลกุล สามารถละลายน้ำได้ ส่วนใหญ่มักพบอยู่ร่วมกับน้ำตาลในรูปของสารประกอบกลูโคไซด์ฟลาโวนอยด์ เป็นกลุ่มสารที่มีคาร์บอน 15 ตัว จัดเรียงในระบบ 3-ring เรียก A-, B-, C-ring (ภาพ 5ก) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ C-ring ทำให้แยกฟลาโวนอยด์ออกเป็นชนิดต่าง ๆ และ hydroxylation ที่ A- และ B-ring ตามตำแหน่งต่าง ๆ ทำให้เกิดอนุพันธุ์ของฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ ฟลาโวนอยด์ถูกสังเคราะห์โดย polypropanoid pathway และเริ่มต้นจากโมเลกุล phenylalanine มีโครงสร้างพื้นฐานคือ C6-C3-C6 ประกอบด้วยสองวงแหวนอะโรมาติก C6 rings (A and B) และ heterocyclic ring (C) ที่มีออกซิเจน 1 อะตอมซึ่งถูกจัดกลุ่มเป็น 6 กลุ่ม (ภาพ 5ข) (Ghasemzadeh and Ghasemzadeh, 2011) คือ

1. Flavones (luteonin, apigenin, tangeritin)
2. Flavonols (quercetin, kaempferol, myricetin, isorhamnetin, pachypodol)
3. Flavanones (hesperetin, naringenin, eriodictyol)
4. Flavan-3-ols (catechins and epicatechins)
5. Isoflavones (genistein, daidzein, glycitein)
6. Anthocyanidins compounds (cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin, petunidin)

ฟลาโวนอยด์พบได้ทั่วไปในพืชและพวกโปรคาริโอต มีฟลาโวนอยด์มากกว่า 6,500 ชนิด ฟลาโวนอยด์ปกป้องพืชจากความเครียดทั้ง biotic และ abiotic stresses และ ดูดซับรังสี UV ที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ ฟลาโวนอยด์ไม่จำเป็นสำหรับการอยู่รอดของพืช แต่ช่วยในการขนส่งหรือเคลื่อนย้ายสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือฮอร์โมนออกซิน นอกจากนี้ทำให้เกิดสีในดอกไม้และปกป้องพืชจากจุลินทรีย์และแมลง (Samanta *et al.*, 2011)

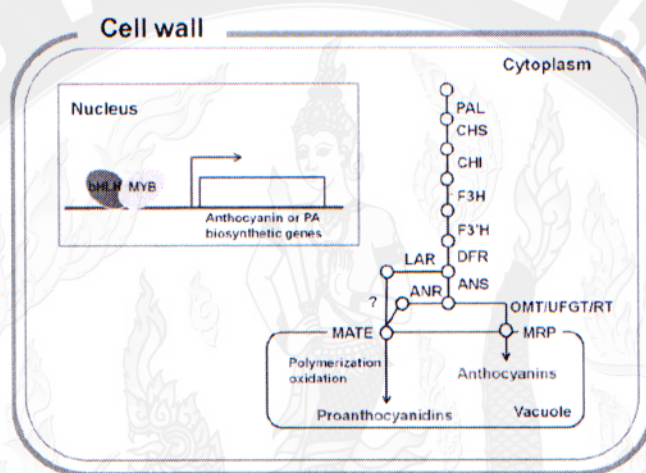


ภาพ 5 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์ โดยที่ ก. โครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์เป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic rings) ข. โครงสร้างของสารที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์
ที่มา: Ghasemzadeh and Ghasemzadeh , 2011

รงควัตถุในเมล็ดข้าว

การเกิดสีที่เชื่อมุมเมล็ดของข้าว มักพบการสะสมรงควัตถุ 2 ชนิด คือข้าวเมล็ดสีม่วงดำเกิดจากการสะสมแอนโทไซยานิน ส่วนข้าวเมล็ดสีแดงเกิดจากการสะสมโปรแอนโทไซยานิน ข้าวบางพันธุ์มีใบสีม่วง มีเมล็ดสีม่วง สีแดงหรือสีน้ำตาลโดยสีเมล็ดที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สีม่วงและแดงมีแอนโทไซยานิน และโปรแอนโทไซยานิน (Furukawa *et al.*, 2007) สารเหล่านี้มีหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น นักปรับปรุงพันธุ์ข้าวและผู้บริโภคจึงให้ความสำคัญในข้าวที่สร้างรงควัตถุ เนื่องจากมีประโยชน์ต่อสุขภาพ แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานินเป็น secondary metabolites ที่อยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ ที่ได้จาก phenylpropanoid pathway การสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานินใช้สารตั้งต้นในการสังเคราะห์หรือใช้ pathway ร่วมกัน การสังเคราะห์แอนโทไซยานินถูกเร่งปฏิกิริยาด้วย anthocyanidin synthase (ANS) โดยใช้ leucoanthocyanidin เป็นสารตั้งต้น หลังจากนั้นแอนโทไซยานินที่ถูกผลิตขึ้นจะถูกขนส่งเข้าสู่แวคิวโอลหลังกระบวนการดัดแปลง (modification) ได้แก่ glycosylation, methylation และ malonylation

(Lim and Ha, 2013) ส่วนการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินถูกเร่งปฏิกิริยาโดย leucoanthocyanidin reductase และ anthocyanidin reductase เพื่อสร้าง catechins ที่เป็นสารตั้งต้นของโปรแอนโทไซยานิดิน ซึ่งโปรแอนโทไซยานิดินจะถูกขนส่งไปยังแวคิวโอลเช่นกัน (Furukawa *et al.*, 2007) (ภาพ 6)

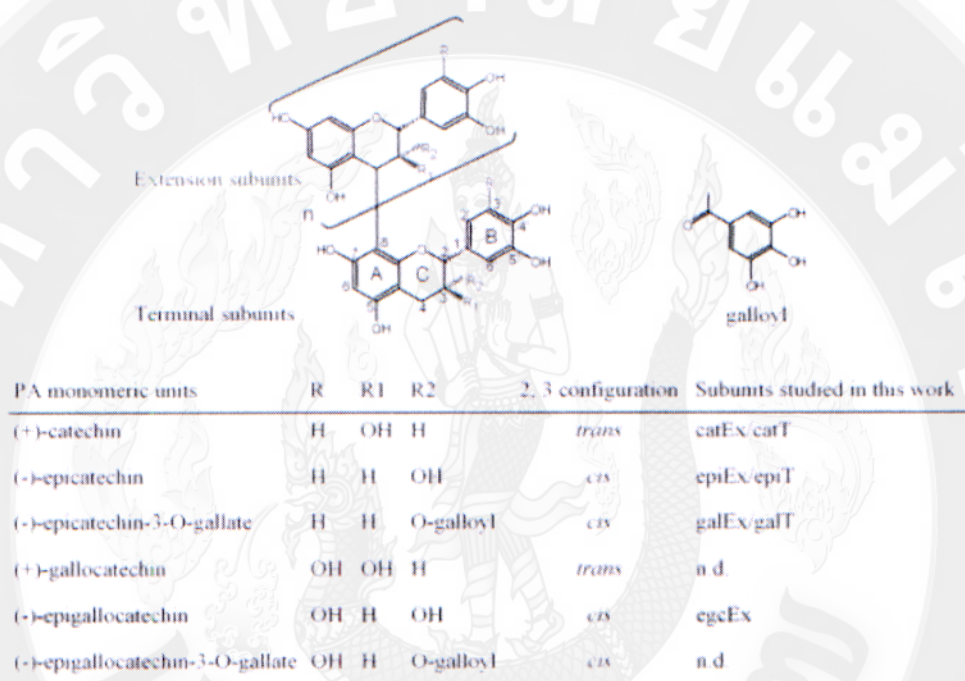


ภาพ 6 การสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดิน
ที่มา: Lim and Ha, 2013

โปรแอนโทไซยานิดิน

โปรแอนโทไซยานิดินเป็น secondary metabolites ที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เป็นสารสีน้ำตาลและแดง พบการสะสมในอวัยวะและเนื้อเยื่อพืชที่ต่างกัน พบได้ในผักผลไม้เปลือกแข็ง ดอกเปลือก และเมล็ดของพืชบางชนิด เช่น เชื้อหุ้มเมล็ดข้าวดำ (แดงเข้ม) หรือเชื้อหุ้มเมล็ดข้าวสีนิล (น้ำเงินแก่หรือม่วงดำ) ข้าวโพดสี (ม่วง หรือม่วงแดง) โปรแอนโทไซยานิดินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระประสิทธิภาพสูง ทั้งยังมีฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะที่สามารถต้านไวรัส ต้านมะเร็ง ต้านอักเสบ ต้านภูมิแพ้ ขยายหลอดเลือด รวมทั้งต้านไขมันหืน (inhibit lipid peroxidation) ลดการจับตัวของเกล็ดเลือด ลดการซึมผ่านผนังหลอดเลือด และลดความเปราะบางของหลอดเลือด มีผลกับระบบน้ำย่อย ทำให้โปรแอนโทไซยานิดินมีประโยชน์หลากหลาย

โปรแอนโทไซยานิดิน หรือ oligomeric proanthocyanidin (OPC) ถูกสร้างขึ้นจาก flavan-3-OLS flavan-3-ols, (-)-catechin-(2,3-trans-flavan-3-ol) และ (-)-epicatechin-(2,3-cis-flavan-3-ol) (Furukawa *et al.*, 2007; Oki *et al.*, 2002) (ภาพ 7)



ภาพ 7 โครงสร้างของโปรแอนโทไซยานิดิน

ที่มา: Huang *et al.*, 2012

ประโยชน์ของโปรแอนโทไซยานิดิน

โปรแอนโทไซยานิดิน มีบทบาทสำคัญในการป้องกันแสงยูวี (ultraviolet, UV) และช่วยในการผสมเกสร (pollination and fertilization) ดอกไม้ยังเป็นประโยชน์ต่อต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน และโรคมะเร็งอีกด้วย (Lim and Ha, 2013) ได้มีการสำรวจการบริโภคอาหารของประชาชนไทยพ.ศ. 2552 สัดส่วนของการบริโภคข้าวกล้อง (ข้าวที่ยังไม่ได้ขัด ยังมีเยื่อหุ้มเมล็ดอยู่) ทุกวันเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2 เป็น ร้อยละ 7 และนักวิจัยแห่ง American Health Foundation ได้ทำงานวิจัยระดับนานาชาติ เกี่ยวกับโรคเรื้อรังต่าง ๆ พบว่าเพียงบริโภคข้าวกล้องเพิ่มขึ้น และบริโภคผักและผลไม้เพิ่มขึ้น จะลดไขมันลง 20% โดยเมล็ดข้าวพันธุ์ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ด

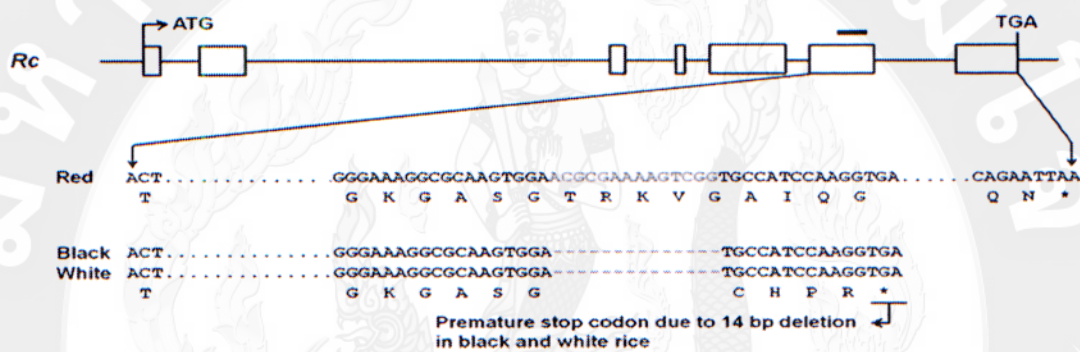
สีเข้ม แดง ม่วงดำ รวมทั้งข้าวกล้องนั้น ล้วนเป็นแหล่งสะสมสารอาหารและยาป้องกันรักษาโรคชั้นเยี่ยมที่มีมากกว่าข้าวขาวประมาณ 2-3 เท่า สามารถลดความเสี่ยงของการเจ็บป่วยด้วยโรคร้ายดังกล่าวได้ ลดความเสี่ยงของมะเร็งกระเพาะอาหาร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผู้บริโภคให้ความสำคัญกับสุขภาพและการบริโภคกันมากขึ้น และยังมีการศึกษาถึงสารสกัดโปรแอนโทไซยานิดิน ว่ามีประโยชน์ต่อสุขภาพหลายประการจัดเป็น functional food เพราะสารนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน และโรคมะเร็ง (นิรนาม, 2557)

การสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดิน

การสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินเกี่ยวข้องกับยีน 2 กลุ่ม คือ ยีน โครงสร้าง และยีนควบคุมซึ่งเปลี่ยนกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนไปเป็นโปรแอนโทไซยานิดินที่มีสีน้ำตาลหรือแดง ในการสร้างรงควัตถุโปรแอนโทไซยานิดินในข้าวจำเป็นต้องมียีนควบคุมที่เป็นรหัสของ transcription factor คือ ยีน *Rc* (basic helix-loop-helix) และเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน คือ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) (Furukawa *et al.*, 2007; Nagao and Takahashi 1963; Saitoh *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2001) จึงจะทำให้ข้าวสามารถสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินได้ นอกจากยีนหลักทั้ง 2 ยีนแล้วในวิถีการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินเกี่ยวข้องกับยีนโครงสร้างอื่นอีกหลายยีน เพื่อเปลี่ยนกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนไปเป็นโปรแอนโทไซยานิดิน ยีนโครงสร้างที่สำคัญ ได้แก่ ยีนสร้างเอนไซม์ chalcone synthase (*CHS*), chalcone isomerase (*CHI*), flavanone 3-hydroxylase (*F3H*), flavonoid 3'-hydroxylase (*F3'H*), dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*), anthocyanidin synthase (*ANS*), flavonoid 3-glucosyl - transferase (*3GT*) และ phenylalanine ammonia lyase (*PAL*) (Furukawa *et al.*, 2007; Nagao and Takahashi, 1947)

ยีน *Rc* เป็นรหัสของโปรตีนที่มีบริเวณจับกับดีเอ็นเอแบบ bHLH ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 7 ทำหน้าที่ในการควบคุมให้เกิดการสะสมของรงควัตถุใน pericarp ของเมล็ดข้าวสีน้ำตาลและแดง ในยีน *Rc* เกิด 14-bp deletion (ภาพ 8) ของข้าวพันธุ์ที่มีเมล็ดม่วงดำและขาว ทำให้เกิด premature stop codon ทำให้สายโพลีเปปไทด์สั้นลงจึงไม่มีส่วนของโปรตีน bHLH domain ทำงานไม่ได้ในข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดขาวและม่วงดำ จากการศึกษาลำดับเบสของ cDNA ของ *Rc-bHLH* ในข้าวพันธุ์ Nipponbare ใน exon ที่ 7 เกิด 14-bp deletion ซึ่งทำให้เกิด frameshift ของ open reading frame ส่วน exon ที่ 8 เกิด 6-bp insertion และ 9-bp deletion แต่ไม่เกิดการเปลี่ยนของ reading frame ในข้าวพันธุ์ Nipponbare ดังนั้น ทำให้เกิด stop codon ที่ downstream 15 nucleotides ของบริเวณ 14-bp deletion ในบริเวณ

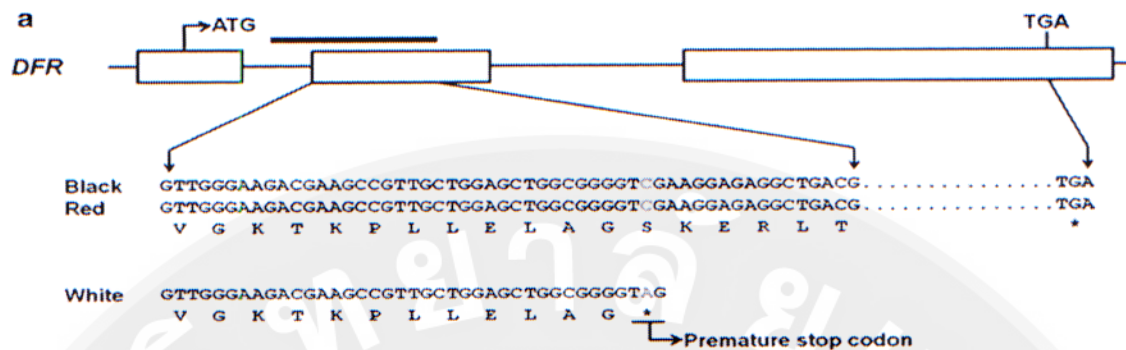
exon ที่ 7 นอกจากนี้การขาดบริเวณ bHLH domain ในข้าวพันธุ์ Nipponbare ทำให้เชื้อหุ้มเมล็ดไม่มีสี เนื่องจาก transacting regulatory factor สูญเสียหน้าที่ โดยการเกิด 14-bp deletion ของยีน *Rc-bHLH* ซึ่งไม่พบในข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดแดงและน้ำตาลที่นำมาวิเคราะห์ ขณะที่พบในข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดขาว ทั้งหมดที่ทำการวิเคราะห์ (Furukawa *et al.*, 2007) แสดงให้เห็นว่า เมล็ดข้าวแดงและน้ำตาลเกิดจากการสะสมของรงควัตถุ โพรแอนโทไซยานิดินที่ควบคุมโดยยีน *Rc-bHLH* โดยความหลากหลายของอัลลีลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีเป็นผลมาจากการกลายพันธุ์ใน coding region ของยีน *Rc* (Lim and Ha, 2013)



ภาพ 8 โครงสร้างของยีน *Rc*

ที่มา: Lim and Ha, 2013

ยีน *Rd* หรือยีน *DFR* เป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ DFR อยู่บนโครโมโซมที่ 1 ยีน *Rd* เกี่ยวข้องในการสร้างรงควัตถุสีแดงในเชื้อหุ้มเมล็ดข้าว ยีน *Rd* ประกอบด้วย 3 exons และ 2 introns ในการศึกษา ยีน *Rd* พบว่าเชื้อหุ้มเมล็ดข้าวขาว *japonica* พันธุ์ Koshihikari มีลำดับเบส GAG ใน exon ที่ 1 ถูกแทนที่ด้วย TAG ซึ่งเป็น premature stop codon ส่วนในเชื้อหุ้มเมล็ดข้าวขาวพันธุ์ Toride ที่มี TCG ใน exon ที่ 2 ถูกแทนที่ด้วย TAG ซึ่งเป็น premature stop codon (ภาพ 9) จึงทำให้ยีน *Rd* อาจสูญเสียหน้าที่ในการสร้างสีน้ำตาลในเชื้อหุ้มเมล็ดข้าวทำให้ข้าวมีเชื้อหุ้มเมล็ดสีขาว (Furukawa *et al.*, 2007; Nagao and Takahashi, 1947)

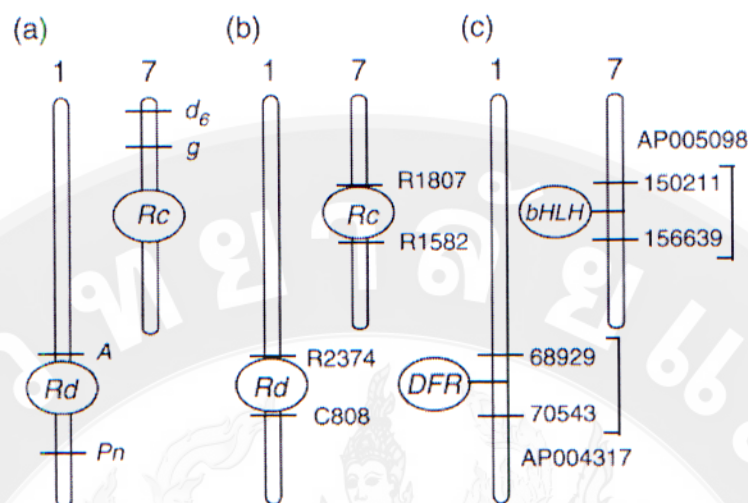


ภาพ 9 โครงสร้างของยีน *Rd* (ยีน *DFR*)

ที่มา: Lim and Ha, 2013

การควบคุมการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิน

ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงและน้ำตาลมีปริมาณของส่วนประกอบสำคัญ คือ catechin, catechol, tannin และ phlobaphene การเกิดสีแดงในเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวถูกควบคุมโดยยีน *Rc* และ *Rd* ที่ทำงานร่วมกัน ซึ่งยีน *Rc* เป็นรหัสของ transacting regulatory factor ที่มี bHLH motif และยีน *Rd* เป็นรหัสของโปรตีน DFR จากการศึกษาของ Furukawa *et al.* (2007) ซึ่งได้ทำการถ่ายยีน *Rc* เข้าสู่ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว (*rcrcrd*) ทำให้เปลี่ยนสีของเยื่อหุ้มเมล็ดจากสีขาวเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในข้าวคัดแปลงพันธุกรรม ทำให้เกิดการสะสมของรงควัตถุในเยื่อหุ้มเมล็ด (pericarp) และได้ทำการถ่ายยีน *Rd* เข้าสู่ข้าวที่มีจีโนไทป์ *RcRc* ทำให้สีของเยื่อหุ้มเมล็ดเปลี่ยนจากสีน้ำตาลเป็นสีแดงในข้าวคัดแปลงพันธุกรรม ในเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวสีแดงเกิดจากการควบคุมของยีน *Rc* ที่ไปกระตุ้นให้ยีน *Rd* เพิ่มปริมาณของรงควัตถุ การเกิดสีแดงในเมล็ดข้าวถูกควบคุมโดยยีน *Rc* และ *Rd* ที่ทำงานร่วมกัน ยีน *Rc* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 7 ทำให้เกิดการสะสมของรงควัตถุใน pericarp ของเมล็ดข้าวสีน้ำตาล (ภาพ 10) ส่วนในเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวสีแดงเกิดจากการควบคุมของยีน *Rd* เพื่อเพิ่มปริมาณของรงควัตถุ ดังนั้น ยีน *Rc* และ *Rd* เกี่ยวข้องในการสร้างรงควัตถุสีแดงและสีน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว แต่เมื่อจีโนไทป์อยู่ในสภาพโฮโมไซกัสรีเซสซีฟ *rcrcrd* หรือสภาพโฮโมไซกัสของยีน *rc* (*rcrcRdRd*) จะทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดข้าวมีสีขาว (Nagao *et al.*, 1957)



ภาพ 10 แผนผังแสดงตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานินดินในเมล็ดข้าว (a) ตำแหน่งยีน *Rc* และ *Rd* ถูกศึกษาโดย Nagao and Takahashi (1963) *A*, *Pn*, *d6* และ *g* คือ ตำแหน่งของ anthocyanin activator, purple node, lop-leaved dwarf และ recessive long empty glumes ตามลำดับ (b) Physical map ของยีน *Rc* และ *Rd* (c) ตำแหน่งของยีน dihydroflavonol-4-reductase (*DFR*) และ basic helix-loop-helix (*bHLH*) ที่ศึกษาในการทดลองของ Furukawa *et al.*, (2007) โดยยีน *Rd* เป็นรหัสของโปรตีน DFR ส่วนยีน *Rc* เป็นรหัสของโปรตีนที่มีบริเวณ *bHLH* ที่มา: Lim and Ha (2013)

เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนจากข้าว Nipponbare ที่มีจีโนไทป์ *rcrcrdrd* ซึ่งเชื้อหุ้มเมล็ดไม่มีสี (ข้าวขาว) ในข้าว Nipponbare โปรตีน *Rc-bHLH* ไม่ทำงาน (dysfunctional sequence) และลำดับเบสของยีนจากข้าว Kasalath มีจีโนไทป์ *RcRcRdRd* ที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดมีสีแดง โปรตีน *Rc-bHLH* จากข้าว Kasalath ทำหน้าที่ได้ (functional sequence) โดย *Rc-bHLH* cDNA จาก Kasalath เป็นรหัสของกรดอะมิโน 673 ตัว และมี 8 exons และ 7 introns ส่วนลำดับเบสของ *Rc-bHLH* cDNA จาก Nipponbare ที่ exon 7 เกิด 14 bp deletion ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิด frameshift ของ open reading frame ทำให้เกิด stop codon ที่ 15 nucleotides downstream ของ 14-bp deletion ใน exon ที่ 7 โดย *Rc-bHLH* cDNA จาก Nipponbare เป็นรหัสของกรดอะมิโน 478 ตัว แต่สร้าง polypeptide ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนเพียง 215 ตัว สั้นกว่า polypeptide ที่สร้างจาก *Rc-bHLH* ของข้าว Kasalath นอกจากนี้ DNA binding motif ของ *bHLH* มีรหัสระหว่างกรดอะมิโนตัวที่ 501st และ 538th ใน exon ที่ 8 ดังนั้น *Rc-bHLH* cDNA จาก Nipponbare มีจีโนไทป์ *rcrd* ไม่มี *bHLH* domain และไม่มีบทบาทเป็น

transacting regulatory factor โดยการเกิด 14-bp deletion ของยีน *Rc-bHLH* แต่ไม่พบในข้าวเมล็ดแดง และน้ำตาล แสดงให้เห็นว่า ข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดงและน้ำตาลเกิดจากการสะสมของรงควัตถุโปรแอนโทไซยานิดินที่ควบคุมโดยยีน *Rc-bHLH* โดยความหลากหลายของอัลลีลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีเป็นผลมาจากการกลายพันธุ์ใน coding region ของยีน *Rc* (Furukawa *et al.*, 2007)

ส่วนของ pericarp สีแดงของเมล็ดข้าวจะถูกกำหนดโดยยีนสองชนิดคือ *Rc* และ *Rd* (Furukawa *et al.*, 2007; Nagao and Takahashi, 1947) และแต่ละยีนนี้จะถูกถ่ายทอดเป็น monogenetically ยีน *Rc* เป็นยีนที่สะสมรงควัตถุในเชื้อหุ้มของเมล็ดสีน้ำตาล ซึ่งการเกิดเชื้อหุ้มเมล็ดข้าวสีแดงจะต้องมียีน *Rd* ควบคู่กับยีน *Rc* ด้วยจึงจะมีการเพิ่มขึ้นของสีเมล็ด ดังนั้น ยีน *Rc* และ *Rd* มีส่วนที่ทำให้เกิดสีแดงในเชื้อหุ้มเมล็ดข้าว (Furukawa *et al.*, 2007; Nagao and Takahashi, 1947)

การโคลนยีน *Rc* และยีน *Rd* และศึกษาความสัมพันธ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสะสมของโปรแอนโทไซยานิดิน และศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินที่ควบคุมการสร้างสีของเชื้อหุ้มเมล็ด โดยการเปรียบเทียบยีนในข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดขาวกับข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีพันธุ์ต่าง ๆ จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาเครื่องหมายสำหรับการระบุสีของเชื้อหุ้มเมล็ดข้าว ซึ่งจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้คัดเลือกข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดที่มีสีได้ก่อนที่ข้าวจะเจริญเติบโตจนออกดอกและติดเมล็ด และอาจเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายสำหรับการถ่ายยีนในข้าวในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

พันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษา

พันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษาได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Thomas W. Okita จาก Institute of Biological, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ผศ. ดร. วรากรณ์ แสงทอง สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และ อ.ดร.ศรีเมฆ ชาวโพรงพาง ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน) กรุงเทพมหานคร

พันธุ์ข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีขาวได้แก่ ข้าวพันธุ์ Kitaake Taichung 65 Sasanishiki Nipponbare กข6 และข้าวดอกมะลิ 105

พันธุ์ข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดงได้แก่ ข้าวพันธุ์ Kasalath หอมมะลิแดง สังข์หยด พัทลุง และสุโขทัยหอมแดง

พันธุ์ข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีม่วงดำได้แก่ ข้าวพันธุ์ลิ้มฟัว หอมนิล และก่ำ

พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

พลาสมิด pJET1.2 (Thermo Scientific, USA) สำหรับโคลนยีน *Rc* จากข้าวพันธุ์ต่างๆ ที่ศึกษา เพื่อนำไปหาลำดับเบส (ภาพ 11)

ที่มา: <http://www.mywallpaper.top/pbluescript-sk-vector-map.html>, 2016

วัสดุและอุปกรณ์

1. ที่วางหลอดทดลอง
3. กระบอกตวง
4. กระตักน้ำแข็ง
5. กระดาษทิชชู
6. ขวดแก้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 12 ออนซ์
7. ขวดรูปชมพู่ (flask)
10. จานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Petri dish)
11. ซ้อนตักสาร
12. ตะเกียงแอลกอฮอล์
13. ตะแกรง
14. ถ้วยใส่สาร
15. ทัพพี
16. ทิป (Tip)
18. บีกเกอร์ (Becker)
19. ปากคีบ (forcep)
20. ปิเปตแก้ว
21. ไมโครปิเปต (micropipette)
22. พลาสติกแรป (Plastic wrap)
23. หลอดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
24. ห่วงเช็ยเชื่อ (loop)
25. หลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
26. หลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

เครื่องมือ

1. กล้องสเตอริโอ SD 3045 (Olympus, Japan)

2. เครื่อง spectrophotometer (Perkin Elmer, USA)
3. เครื่อง Thermal Cycler ยี่ห้อ BIO-RAD รุ่น T100 (BioRad, USA)
4. เครื่อง Vortex GENIE-2 (Scientific industry, USA)
5. เครื่องกวนสารและให้ความร้อน (Jenway 1000, UK)
6. เครื่องเขย่า Mini Rocker MR-1 (Bio san, USA)
7. เครื่องเขย่า Innova 2100 (New Brunswick Scientific, USA)
8. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ Orbital Shaking Incubation (Shall Lab, USA)
9. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น PG802-S (Mettler Toledo, Switzerland)
10. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AG285 (Mettler Toledo, Switzerland)
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง แบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น Harrier 18/80 Refrigerated (Sanyo, UK)
12. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Biofuge Pico (Sorvall, Germany)
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Universal 32R (Hettich, Germany)
14. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง Sartorius Professional Meter PP-50 (Sartorius, Germany)
15. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส MyRun Intelligent Electrophoresis Unit (Tokyo, Japan)
16. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส Mupid-exu Submarine Electrophoresis system (Advance, Japan)
17. ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส (Haier, Thailand)
18. ตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส
19. ตู้ปลอดเชื้อ ClassIIA/B3 biology safety (Forma scientific, USA)
20. ตู้อบแห้ง ED115 (E2) (BINDER, Norway)
21. ไมโครเวฟ รุ่น Intell wave (LG, China)
22. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
23. อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (Julabo, Germany)

สารเคมี

1. Absolute ethanol (MERCK, Germany)
2. Acetic acid (Merck, Germany)
3. Agarose (Invitrogen, USA)
4. Alkaline lysis solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl PH 8.0, 10 mM EDTA)
5. Alkaline lysis solution II (0.2 N NaOH, 1% w/v SDS)
6. Alkaline lysis solution III (3M Na-Acetate pH 5.8 with glacial acetic acid)
7. Ammonium nitrate (QReC, New Zealand)
8. Ammonium peroxydisulfate (VWR BDH Prolabo, EC)
9. Ammonium sulphate (Ajax finechem, New Zealand)
10. A-Naphthaleneacetic acid (NAA) (phytotechnology, USA)
11. Boric acid (Fisher scientific, UK)
12. Bromophenol blue (Fisher scientific, UK)
13. Calcium chloride dehydrate (Merck, Germany)
14. Cassamino acids powder (Bio Basic Inc., Canada)
15. Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (Bio Basic Inc., Canada)
16. Chloroform (LAB-SCAN, Thailand)
17. Cobalt (II) chloride (Ajax finechem, New Zealand)
18. Copper (II) Sulfate (Fisher scientific, UK)
19. Diaminoethanetetra-acid disodium salt (EDTA) (Fisher scientific, UK)
20. Diethy pyrocarbonate (DEPC) (Euro clone, Italy)
21. Dimethyl sulfoxid (DMSO) (Merck, Germany)
22. di-Potassium hydrogen orthophosphate anhydrous (Fisher scientific, UK)
23. di-Sodium hydrogen orthophosphate anhydrous (Fisher scientific, UK)
24. D-Glucose anhydrous (Fisher scientific, UK)
25. D-Sorbitol (Bio Basic Inc., Canada)

26. Gelzan-CM (Phytotechnology, USA)
27. Glycine (Fisher scientific, UK)
28. Glycerol (Merck, Germany)
29. Hydrochloric acid (Merck, Germany)
30. IPTG (Isopropylthio- β -D-galactoside) (Bio Basic Inc., Canada)
31. Iron (II) sulfate (Fisher scientific, UK)
32. Isopropanol (Merck, Germany)
33. Kinetin (6-furfurylaminopurine) (Phytotechnology, USA)
34. L-Arginine (Fluka, Switzerland)
35. L-Asparagine (Sigma, Germany)
36. L-Aspartic acid (Sigma, Germany)
37. L-Glutamine (Fluka, Switzerland)
38. L-Proline (Phytotechnology, USA)
39. Lysis buffer (5 mM EDTA, 10% w/v sucrose, 0.2% w/v SDS, 100 mM NaOH, 60 mM KCl, 0.05w/v bromophenol blue)
40. Magnesium chloride Hexahydrate (Bio Basic Inc, Canada)
41. Magnesium sulfate (Fisher scientific, UK)
42. Magnesium (II) sulphate, monohydrate (Ajax finechem, New Zealand)
43. Maltose (Monohydrate) (Merck, Germany)
44. Myo-Inositol (Bio Basic Inc., Canada)
45. Nicotinic acid (Fluka, Switzerland)
46. Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) (Phytotechnology, USA)
47. Potassium chloride (Merck, Germany)
48. Potassium dichromate (Fisher scientific, UK)
49. Potassium dihydrogen orthophosphate (Fisher scientific, UK)
50. Potassium hexacyanoferrate(II) (Ferrocyanide) (Fisher scientific, UK)
51. Potassium hexacyanoferrate(III) (Ferrocyanide) (Fisher scientific, UK)
52. Potassium hydroxide (Merck, Germany)
53. Potassium iodide (Ajax finechem, New Zealand)
54. Potassium nitrate (Merck, Germany)

55. Pyridoxine hydrochloride (Fluka, Switzerland)
56. Sodium chloride (Merck, Germany)
57. Sodium dihydrogen orthophosphate dehydrate (Fisher scientific, UK)
58. Sodium hydroxide (Merck, Germany)
59. Sodium-L-Ascorbate (Bio Basic Inc, Canada)
60. Sodium pyrophosphate tatrebasic decahydrate (Sigma Aldrich, Japan)
61. Sucrose (BDH Laboratory, England)
62. Tri-Sodium citrate dehydrate (VWR BDH Prolabo, EC)
63. Trizol (Invitrogen, USA)
64. Vitamin B1 Hydrochloride (Thiamine. HCl) (Fluka, UK)
65. X-gal (Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-b-D-galactopyranoside) (Bio Basic Inc., Canada)
66. X-Gluc (100 mM X-Gluc in Dimethylformamide) (Bio Basic Inc, Canada)
67. Yeast extract (Bio Basic Inc, Canada)
68. Zinc sulphate (Ajax finechem, New Zealand)
69. 2-mercaptoethanol (BIO BASIC INC, Thailand)
70. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (Phytotechnology, USA)
71. 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-acetophenone (acetosyringone) (Sigma Aldrich, Germany)
72. 10 % Sodium hypochlorite (UNION Science, Thailand)
73. สีย้อมดีเอ็นเอ SYBR saft DNA gel stain (Invitrogen, USA)

สารปฏิชีวนะที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Ampicillin) (Sigma, Germany)

ดีเอ็นเอมาตรฐาน

1. GeneRuler™ 100 bp Ladder Plus (Fermentas, USA)

2. 1 kp DNA leader (Fermentas, USA)

เอนไซม์ที่ใช้ในการวิจัย

1. *EcoRI* - HF (New England Biolab, USA)
2. *NcoI* - HF (New England Biolab, USA)
3. *SmaI* – HF (New England Biolab, USA)
4. *HindIII* – HF (New England Biolab, USA)
5. *BglII* (New England Biolab, USA)

ชุดทดลองสำเร็จรูป (Kit) ที่ใช้ในงานวิจัย

1. ชุดสังเคราะห์ cDNA High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA)
2. ชุดแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเซลล์ Nucleospin Extract II Kit (Machery-Nagel, Germany)
3. ชุดสกัดพลาสมิด Nucleospin Plasmid (Machery-Nagel, Germany)
4. ชุดโคลนสำเร็จรูป pJET1.2 Kit (Thermo Scientific, USA)
5. ชุด PCR Master Mix สำเร็จรูป Phusion Green High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA)

วิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 6 ขั้นตอน ดังนี้

1. การตรวจสอบยีน *Rc* โดยเทคนิค PCR
 - 1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว
 - 1.2 การตรวจสอบยีน *Rc* ด้วยเทคนิค PCR
 - 1.3. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *Rc* บริเวณเอกซอนที่ 7
2. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Rc* โดยเทคนิค RT-PCR
 - 2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าว
 - 2.2 การสังเคราะห์ first strand cDNA ด้วยชุด High Capacity cDNA reverse transcription kit โดยใช้ไพรเมอร์ oligo (dT)
 - 2.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Rc* โดยเทคนิค RT-PCR
3. การค้นหายีน *Rc* ด้วยเทคนิค RT-PCR
4. การโคลนยีน *Rc* เข้าสู่เวกเตอร์ pJET1.2 และ pBluescript SK+
 - 4.1 การแยกบริสุทธิ์ยีน *Rc* จากเจล
 - 4.2 การเชื่อมชิ้นยีน *Rc* เข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 และ pBluescript SK+ และส่งถ่ายเข้าสู่ *E. coli* competent cells
 - 4.3 การคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยขนาด (Rapid size screening)
 - 4.4 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
5. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *Rc* จากโคโลนีสายผสมที่ถูกคัดเลือก
6. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Rc* และยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนโทไซยานินโดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR และ Real-time RT-PCR

การดำเนินการดังกล่าว มีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

1. การตรวจสอบยีน *Rc* โดยเทคนิค PCR

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว

- บดใบข้าวให้ละเอียดโดยการใช้ไนโตรเจนเหลวและลูกปัด ร่วมกับการ vortex

- เติมสารละลาย mCTAB (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide) ที่มี 1 % (v/v) 2-mercaptoethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นผสมโดยใช้เครื่อง vortex
- นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยผสมให้เข้ากันที่ 10 และ 20 นาที
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- ย้ายส่วนใสไปยังหลอดใหม่ และเติม RNase A ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ต่อสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที
- เติมกลอโรฟอร์มปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือ 1 เท่า ของปริมาตรสารละลาย mCTAB และผสมให้เข้ากันโดยการ vortex
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- ย้ายส่วนใสไปยังหลอดใหม่ และเติมกลอโรฟอร์มอีกครั้ง จากนั้นปั่นเหวี่ยง แล้วย้ายส่วนใสด้านบนไปหลอดใหม่
- เติม 3 M sodium acetate, pH 5.2 ปริมาตร 1/10 เท่าของสารละลาย และเติม cold-absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย จากนั้นผสมให้เข้ากันเพียงเล็กน้อย จะสังเกตเห็นตะกอนขุ่นสีขาว หากไม่พบตะกอน อาจแช่สารละลายในหลอดไมโครทิวป์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามขั้น
- ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- เทส่วนใสทิ้ง และเติมเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างตะกอน
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง
- ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

1.2 การตรวจสอบยีน *Rc* ด้วยเทคนิค PCR

เตรียมปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบยีน *Rc*

สังเกตแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส จึงทำการตัดแถบดีเอ็นเอดังกล่าวเพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน OSRc คือ OsRc1049_F: GCCTTGTCACCTCTTGGCATT, OsRc1450_R: GGTTGGCACTGAAATCACCT โดยใช้ Phusion Green High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA) ที่มีองค์ประกอบ ดังนี้

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา)
2x Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	10
10 μ M Forward primer	1
10 μ M Reverse primer	1
DNA (1:30)	1
dH ₂ O	7
Total	20

สถานะในการทำ PCR

Initial Denaturation	98 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Denaturation	98 องศาเซลเซียส	10 วินาที	} 40 รอบ
Annealing	58 องศาเซลเซียส	15 วินาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	3 นาที	

จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose ให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ใช้ 1 kb DNA ladder เป็น DNA Marker แล้วทำตัดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส จากการตรวจสอบยีน *Rc* โดยเทคนิค PCR ที่เอกซอน 7 เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส

1.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *Rc* จากการตรวจสอบยีน *Rc* โดยเทคนิค PCR ที่เอกซอน 7

เมื่อตัดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส จากการตรวจสอบยีน *Rc* โดยเทคนิค PCR ที่เอกซอน 7 นำไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท 1st Base DNA Sequencing (Malaysia) นำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยนำลำดับดีเอ็นเอของยีนจากข้าวแต่ละพันธุ์มาเปรียบเทียบกับโปรแกรม ClustalX (version 1.83) และ GeneDoc (version 2.7)

2. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Rc* โดยเทคนิค RT-PCR

2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าว

2.1.1 ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอ

ขั้นตอน Homogenization

บดใบข้าวหลังเพาะอายุ 4 สัปดาห์ และเมล็ดอ่อนในระยะน้ำนมหลังจากออกดอกประมาณ 5, 15, 25 วัน ให้ละเอียดโดยใช้ในไตรเจนเหลว แล้วเติม Trizol Reagent (Invitrogen, USA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครทิวบ์

ขั้นตอน Phase separation

บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนใส่หลอดใหม่แล้วทำการเติมคลอโรฟอร์ม 200 ไมโครลิตร พลิกกลับหลอด เป็นเวลา 5 วินาที แล้วบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

ขั้นตอน RNA precipitation

ย้ายชั้นน้ำใส่หลอดใหม่ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติมน Isopropyl alcohol ปริมาตร 0.5 มิลลิตร บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที spin down คูณส่วนใสใส่หลอดใหม่ แล้วปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

ขั้นตอน RNA wash

คูณส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ (ที่เย็น) ปริมาตร 1 มิลลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และล้างตะกอนอีกครั้งหนึ่ง

ขั้นตอน Redissolving the RNA

คูณส่วนใสทิ้ง แล้วตากตะกอนให้แห้งแล้วเติมน DEPC treat water (free RNase) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

2.1.2 การกำจัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNaseI (New England Biolab, USA) เมื่อสกัดอาร์เอ็นเอจากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนแล้วทำการกำจัดดีเอ็นเอโดยเติมส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
อาร์เอ็นเอที่สกัดได้	25
10X Reaction buffer with MgCl ₂	3
DEPC-treated water	1
DNaseI	1
รวม	30

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 25 mM EDTA ปริมาตร 6 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 5 mM EDTA) บ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วย agarose gel electrophoresis

2.2 การสังเคราะห์ first strand cDNA ด้วยชุด High Capacity cDNA reverse transcription kit โดยใช้ไพรเมอร์ oligo (dT)

2.2.1 นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาสังเคราะห์ cDNA โดยกระบวนการ reverse transcription โดยใช้ไพรเมอร์ oligo (dT) โดยใช้ชุดสำเร็จรูป High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA) โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา High Capacity cDNA synthesis Mix ดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10x RT Buffer	2.0
ไพรเมอร์ (50 μ M Oligo (dT))	2.0
25x dNTP Mix (100 mM)	0.8
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0
Nuclease-free H ₂ O	4.2
Total	10

2.2.2 เติมอาร์เอ็นเอทั้งหมด 10 ไมโครลิตร (ที่ทำการคำนวณความเข้มข้น) แล้วทำการเติม High Capacity cDNA synthesis Mix (ที่ทำการเตรียมไว้ในข้อ 2.2.1) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และผสมเบา ๆ นำหลอดมา Spin down วางบนน้ำแข็ง

2.2.3 นำหลอดตัวอย่างทำการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยมีสภาวะในการทำ High Capacity cDNA Reverse Transcription ดังนี้

	Step 1	Step 2	Step 3
อุณหภูมิ	25°C	37°C	85°C
เวลา	10 นาที	120 นาที	5 นาที

2.2.4 เก็บอาร์เอ็นเอที่ – 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้หรือนำไปทำพีซีอาร์

ต่อ

2.3. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Rc* โดยใช้เทคนิค RT-PCR

2.3.1 นำ cDNA ที่ผ่านขบวนการสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription (RT) โดยใช้ oligo (dT) มาเป็นแม่พิมพ์ที่มาจากใบอ่อนและเมล็ดอ่อน ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Rc* ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วนหนึ่งของยีน *Rc* OsRc1049_F: GCCTTGTCACCTCTTGGCATT, OsRc1450_R: GGTGGCACTGAAATC ACCT โดยใช้ 2x Go Taq® Green Master Mix (Promega, USA) ซึ่งมี PCR product ขนาดประมาณ 400 bp โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ดังนี้

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา(ไมโครลิตร)
2x Go Taq® Green Master Mix	10
10 µM OsRc1049_F	1
10 µM OsRc1450_R	1
cDNA	1
dH ₂ O	7
รวม	20

สภาวะในการทำ PCR

Initial Denaturation	95 องศาเซลเซียส	3 นาที	} 35 รอบ
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Annealing	58 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	

วิเคราะห์ผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายรูปลงกระดาษได้แสงยูวี ซึ่งแถบที่เด่นชัดที่คาดหวังขนาดประมาณ 400 คู่เบส

2.3.2 นำ cDNA ที่มาจากเมล็ดอ่อนที่อายุต่างกันเป็นแม่พิมพ์ ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Rc* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วนหนึ่งของยีน OsRc - 49_F และ OsRc +45-47-27_R โดยใช้ 2x Go Taq® Green Master Mix (Promega, USA) ซึ่งมี PCR product ขนาดประมาณ 2,000 bp โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ดังนี้

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา(ไมโครลิตร)
2x Go Taq® Green Master Mix	10
10 µM OsRc-49_F	1
10 µM OsRc +45-47-27_R	1
cDNA Template	1
dH ₂ O	7
รวม	20

สภาวะในการทำ PCR

Initial Denaturation	95 องศาเซลเซียส	3 นาที	} 35 รอบ
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Annealing	58 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	

วิเคราะห์ผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายรูปลงกระดาษได้แสงยูวี

3 การค้นหายีน *Rc* ด้วยเทคนิค RT-PCR

ค้นหายีน *Rc* จาก cDNA ที่มาจากเมล็ดอ่อนของข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ สุโขทัยหอมแดง Kasalath และ หอมมะลิแดง โดยใช้ไพรเมอร์ OsRc - 49_F และ OsRc +45-47-27_R ซึ่งจำเพาะต่อ coding sequence ของยีน *Rc* โดยมีองค์ประกอบ ดังนี้

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา)
2x Phusion Green High-Fidelity Mix	10
10 μ M Forward primer	1
10 μ M Reverse primer	1
cDNA	1
dH ₂ O	7
Total	20

สภาวะในการทำ PCR

Initial Denaturation	98 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Denaturation	98 องศาเซลเซียส	10 วินาที	} 34 รอบ
Annealing	58 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1.15 วินาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	3 นาที	

จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose ให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอขนาด 2,000 bp

4. การโคลนยีน *Rc* เข้าสู่เวกเตอร์ pJET1.2 และ pBluescript SK+

4.1 การแยกบริสุทธิ์ยีน *Rc* จากเจล

หลังจากทำ RT-PCR แล้วทำการแยกดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที จากนั้นแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอขนาด 2,000 bp โดยใช้ Nucleospin Extract II Kit (Machery-Nagel, Germany) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- ตัดเจลที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่ต้องการจากการทำ RT-PCR ใส่ในหลอดไมโครทิวป์
- ชั่งน้ำหนักเจล แล้วเติม Buffer NT (อัตราส่วนน้ำหนักเจล 100 มิลลิกรัม: buffer NT 200 ไมโครลิตร)
- บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการผสมด้วยการพลิกหลอดทุก ๆ 5 นาที เพื่อช่วยให้เจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- หลังจากที่เจลละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว นำ column ใส่ใน collection tube จากนั้นดูดสารละลายเจลที่ละลายแล้วใส่ column ครึ่งละ 750 ไมโครลิตร บ่ม 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทำซ้ำจนกว่าสารละลายหมด
- ทิ้งสารละลายที่ผ่าน column ใน collection tube ทิ้ง
- จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที
- เทส่วนใสที่ไหลผ่าน column ทิ้ง
- เติม Buffer NT3 600 ไมโครลิตร (NT3: Absolute ethanol = 1:4) บ่ม 3 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสที่ไหลผ่านทิ้ง
- ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อทำให้ column แห้งและกำจัด Buffer NT3 จนหมด
- จากนั้นย้ายคอลัมน์มาวางใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Buffer NE 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที
- นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที
- นำดีเอ็นเอที่แยกบริสุทธิ์ได้ไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pJET1.2 ต่อไป

4.2 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *Rc* เข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 และ pBluescript SK+ ส่งถ่าย

เข้าสู่ *E. coli* competent cell

4.2.1 การเตรียม competent cell ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยวิธี CaCl₂

- นำ glycerol stock ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α มา streak ลงบนอาหารแข็งสูตร LB ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน (ประมาณ 15-17 ชั่วโมง)

- เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เข้าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน
- นำเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนได้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.55
- ปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเทอาหารออกให้หมด
- ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 50 μ M CaCl_2 (ที่เย็น) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปตขึ้นลง จากนั้นเติม 50 μ M CaCl_2 (เย็น) อีก 16 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปต จากนั้นบ่มในน้ำแข็งนาน 20 นาที
- ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสทั้งหมด ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 50 μ M CaCl_2 (เย็น) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติม glycerol เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ (ผ่านการฆ่าเชื้อ) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปต จากนั้นแบ่งเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 200 ไมโครลิตร เก็บเซลล์ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

4.2.2 การเชื่อมชิ้นยีน Rc เข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 เมื่อคำนวณอัตราส่วน

PCR Product (insert)

$$\frac{V}{I} = \frac{1}{3} \times \frac{\text{ความยาวดีเอ็นเอพาหะ (bp)} \times 660}{\text{ความยาว insert (bp)} \times 660}$$

เตรียมองค์ประกอบปฏิกิริยา ligation ดังนี้

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
2X Rapid Ligation buffer T4 DNA Ligase	10
pJET1.2 vector	1
PCR Product	ตามความเข้มข้นที่คำนวณได้
T4 DNA Ligase	1
dH ₂ O	เติมให้ครบปริมาตร
รวม	20

บ่มข้ามคืน อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และส่งถ่ายเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* DH5 α และ spread บนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อ บ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.2.3 การเชื่อมชิ้นชิ้น Rc เข้ากับเวกเตอร์ pBluescript SK+ เตรียมองค์ประกอบปฏิกิริยา ligation ดังนี้

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาณต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
2X Rapid Ligation buffer T4 DNA Ligase	10
pBluescript SK+ vector	ตามความเข้มข้นที่คำนวณได้
PCR Product	ตามความเข้มข้นที่คำนวณได้
T4 DNA Ligase	1
dH ₂ O	เติมให้ครบปริมาตร
รวม	20

บ่มข้ามคืน อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส และส่งถ่ายเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* DH5 α และ spread บนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร X-gal และ IPTG 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.2.4 การส่งถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat Shock

- นำปฏิกิริยา ligation ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมในหลอดที่มี competent cell ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α แล้วนำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
- บ่มใน water bath อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที
- บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที
- เติมหาอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร
- จากนั้นนำเชื้อมาเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที
- ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อที่ 11,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที

- ปิเปตส่วนใสทิ้ง 800 ไมโครลิตร แล้วละลายตะกอนเซลล์ จากนั้นทำการ spread เชื้อบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ spread ด้วย X-gal (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ IPTG (20 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
- ทำการบันทึกผลจำนวนโคโลนีสีฟ้าและสีขาวที่ได้จากการถ่ายฝากพลาสมิด และคัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวมาทำการตรวจสอบต่อไป

4.3 การคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยขนาด (Rapid size screening)

นำโคโลนีสีขาวที่ได้จากการเชื่อมชิ้นยีนกับดีเอ็นเอพาหะมาคัดเลือกด้วยขนาด โดยเปรียบเทียบกับโคโลนีสีฟ้า โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- นำโคโลนีที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที
- ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วทิ้งส่วนใส
- เติม Lysis buffer 50 ไมโครลิตร (5mM EDTA, 10% w/v sucrose, 0.25% w/v SDS, 100 mM NaOH, 60 mM KCl, 0.05% w/v bromophenol blue) ผสมด้วยการ vortex
- นำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- เมื่อครบเวลาย้ายไปปั่นในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที
- จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
- นำสารละลายที่ได้ 20 ไมโครลิตร มาแยกด้วย 1% agarose gel electrophoresis ให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบโคโลนีสีขาว

4.4 การคัดเลือกโคโลนีสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

5.4.1 การเตรียมพลาสมิดสำหรับปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยสกัดพลาสมิดด้วยวิธี CTAB Mini Plasmid Preparation ดังนี้

- เตรียมอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
- นำปากกิบไปเผา แล้วกิบไม้จิ้มฟันไปจิ้ม โคโลนีสีขาว แล้วนำไม้จิ้มฟันไปใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ที่เตรียมไว้
- นำไปเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

- คัดเชื้อที่เลี้ยงไว้ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง
- เติม STET Buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร lysozyme ปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้วนำไป vortex เพื่อผสมตะกอนเซลล์
- บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และบ่มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย้ายส่วนใส ไปไว้ใน หลอดใหม่ (ทิ้งหลอดเก่า)
- เติม 5% CTAB ปริมาตร 20 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเพื่อผสม แล้วบ่มที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนน้ำ
- เติม 1.2 M NaCl ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม RNase (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- เติมกลอโรฟอร์ม 1 ปริมาตร (510 ไมโครลิตร) ผสม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว รอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที คัดส่วนบนไว้ในหลอดใหม่ (400 ไมโครลิตร) ทิ้งหลอดเก่า
- เติม 3 M Sodium acetate pH 5.2 0.1 ปริมาตร (40 ไมโครลิตร) และเติม 95% เอทานอล 2 ปริมาตร (880 ไมโครลิตร)
- บ่มที่อุณหภูมิ -80 °C เป็นเวลา 20 นาที หรือค้างคืน
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งส่วนน้ำ ระวังอย่าให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุด
- เติม 70% เอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำ ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ
- ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง และละลายตะกอนดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วย 5 mM Tris-HCl pH 8.5 ปริมาตร 20-30 ไมโครลิตร

4.4.2 ปฏิบัติการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมที่มีชิ้นยีน *Rc* เข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 เข้าสู่ *E. coli* competent cell คัดเลือกดีเอ็นเอสายผสม โดยนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี CTAB Mini Plasmid Preparation และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II เมื่อได้โคลนที่มีชิ้นยีน *Rc* ขนาดประมาณ 2,000 bp โดยมีปฏิบัติการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนี้

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
10X NEB buffer 3.1	1
<i>Bgl</i> III	1
พลาสมิด	3
dH ₂ O	5
รวม	10

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน แล้วทำการวิเคราะห์ผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis ภายใต้แรงดันไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายรูปลงฟิล์มภายใต้แสงยูวี สังเกตแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2,000 คู่เบส และ 3000 คู่เบส

นอกจากนี้ทำการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสม ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Sma*I เนื่องจากชิ้นยีน *Rc* บริเวณที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I ตัดได้ จึงทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I โดยที่ชิ้นยีน *Rc* เชื่อมถูกทิสแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังขนาดประมาณ 1600 และ 2,000 bp กรณีที่ผิดทิส แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังขนาดประมาณ 400 และ 2,600 bp เพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอสายผสมที่คัดเลือก โดยมีปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนี้

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
10X NEB buffer 4	1
<i>Nco</i> I	0.5
<i>Sma</i> I	0.5
พลาสมิด	3
dH ₂ O	5
รวม	10

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน แล้วทำการวิเคราะห์ผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis ภายใต้แรงดันไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายรูปลงฟิล์มภายใต้แสงยูวี

ในขณะที่ดีเอ็นเอสายผสมที่มีชั้นยีน *Rc* เข้ากับเวกเตอร์ pBluescript SK+ เข้าสู่ *E. coli* competent cell คัดเลือกดีเอ็นเอสายผสม โดยนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี CTAB Mini Plasmid Preparation การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมยังทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เนื่องจากชั้นยีน *Rc* บริเวณที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ตัดได้ จึงทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* โดยที่ชั้นยีน *Rc* เชื่อมถูกทิศแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังขนาดประมาณ 1200 และ 2,000 bp กรณีที่ผิดทิศ แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังขนาดประมาณ 800 และ 2,400 bp เพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอสายผสมที่คัดเลือก โดยมีปฏิบัติการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนี้

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
10X NEB cutsmart buffer	1
<i>EcoRI</i>	1
พลาสมิด	3
dH ₂ O	5
รวม	10

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน แล้วทำการวิเคราะห์ผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis ภายใต้แรงดันไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายรูปเจลภายใต้แสงยูวี

5. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *Rc* จากโคลนีสายผสมที่ถูกคัดเลือก

เมื่อนำพลาสมิดที่คัดเลือกไปวิเคราะห์ลำดับเบส บริษัท 1st Base DNA Sequencing (Malaysia) นำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยนำลำดับดีเอ็นเอของยีนจากข้าวแต่ละพันธุ์มาเปรียบเทียบกับด้วยโปรแกรม ClustalX (version 1.83) และ GeneDoc (version 2.7)

6. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Rc* และยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิน โดยเทคนิค semi quantitative RT-PCR และ Real-time RT PCR

นำ cDNA ที่ผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription (RT) โดยใช้ oligo (dT) มาเป็นแม่พิมพ์ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Rc* ด้วยเทคนิค semi quantitative RT-PCR และ Real-time RT PCR โดยใช้ไพรเมอร์ดังต่อไปนี้

ใช้ MyTaq™ Red Mix . (Bioline, USA) ในเทคนิค semi quantitative RT-PCR มีองค์ประกอบ ดังนี้

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา		ปริมาตร (ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา)
2x MyTaq™ Red Mix		10
10 μ M Primer_F		1
10 μ M Primer_R		1
cDNA		1
dH ₂ O		7
Total		20
สภาวะในการทำ PCR		
Initial Denaturation	98 องศาเซลเซียส	30 วินาที
Denaturation	98 องศาเซลเซียส	10 วินาที
Annealing	55-58 องศาเซลเซียส	10 วินาที
Extension	72 องศาเซลเซียส	20 วินาที
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	3 นาที

} 28 รอบ

ส่วนในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Rc* ด้วยเทคนิค Real-time RT PCR ใช้ Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). โดยมีองค์ประกอบ ดังนี้

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา)
2x Power SYBR Green Master Mix	5
10 μ M Primer_F	0.5
10 μ M Primer_R	0.5
cDNA	1
dH ₂ O	3
Total	10

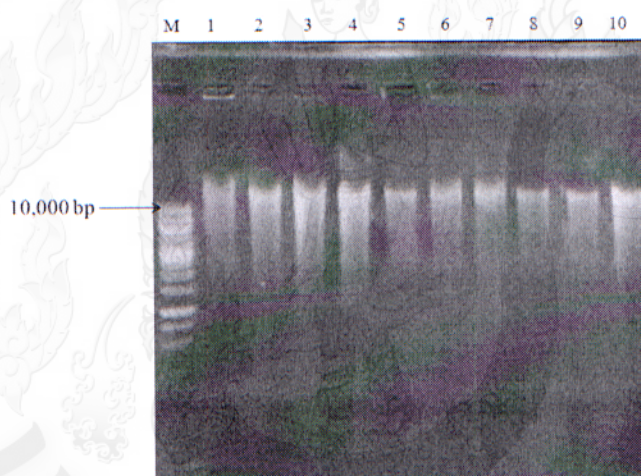
จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose ให้แรงดันไฟฟ้า สัก 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ใช้ 1 kb DNA ladder เป็น DNA Marker

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การตรวจสอบยีน *Rc* โดยเทคนิค PCR

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าว

การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าว 10 พันธุ์ พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีขนาดใหญ่ แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี และสามารถนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบยีน *Rc* ในจีโนมข้าวต่อไป (ภาพ 13)



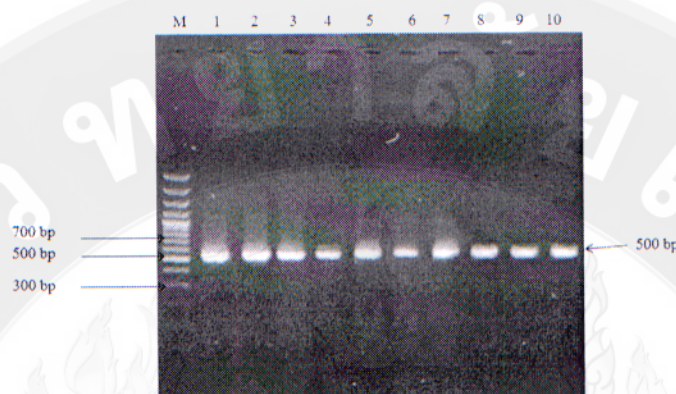
ภาพ 13 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าว

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA Ladder ช่องที่ 1-10 คือ ข้าวพันธุ์ Taichung65 Sasanishiki กข6 ข้าวดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง สังกะหัดพัทลุง Kasalath ถิ่นผัว หอม นิล และกำ ตามลำดับ

1.2 การตรวจสอบยีน *Rc* ด้วยเทคนิค PCR

เมื่อสกัดดีเอ็นเอแล้วทำการตรวจสอบยีน *Rc* จากจีโนมข้าว 6 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OsRc1049_F และ OsRc1450_R ที่จำเพาะบริเวณเอกซอนที่ 7 ของยีน *Rc* พบว่า ในข้าวทุกพันธุ์ที่นำมาศึกษา มีแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังขนาดประมาณ 500 bp (ภาพ 14) แสดงว่า ข้าวทุกพันธุ์ที่ศึกษามี

ยีน *Rc* อยู่ในจีโนม จึงนำไปสู่การทดลองต่อไปคือการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *Rc* บริเวณเอกซอน ที่ 7 ในขั้นต่อไป



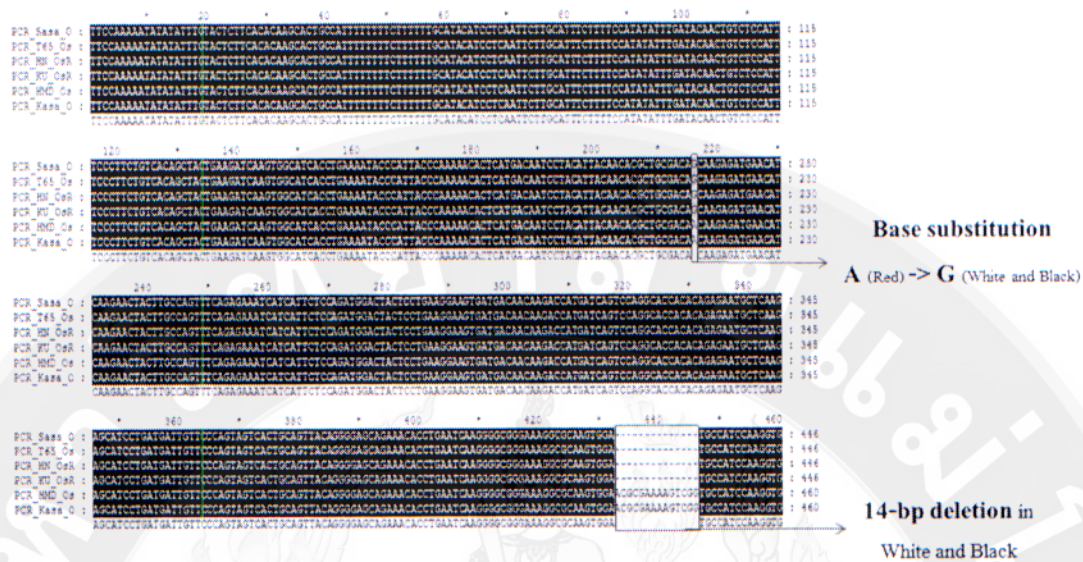
ภาพ 14 ผลการตรวจสอบยีน *Rc* ในจีโนมข้าวด้วยเทคนิค PCR

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 100 bp Ladder Plus ช่องที่ 1-10 คือ ข้าวพันธุ์ Taichung65 Sasanishiki กข6 ขาวดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง สังข์หยดพัทลุง Kasalath ลิ้มฟัว หอมนิล และกำ ตามลำดับ

จากการตรวจสอบยีน *Rc* จากจีโนมข้าว พบว่า ในข้าวทุกพันธุ์ที่ตรวจสอบทั้งข้าวขาวและข้าวสีมียีน *Rc* อยู่ในจีโนม เนื่องจากเกิดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 500 bp ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Preecha *et al.* (2006) ทำการศึกษาข้าวไทยที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดที่มีสีต่างกัน พบว่า มีการแสดงของยีน *Rc* ในข้าวทุกพันธุ์ ทั้งในข้าวขาว แดง และดำ แต่ข้าวที่มีสีและไม่มีสีมีความต่างที่ลำดับเบส

1.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีน *Rc* บริเวณเอกซอนที่ 7

จากการตรวจสอบยีน *Rc* จากจีโนมข้าว โดยพบทั้งในข้าวขาว แดง และดำ จากนั้นจึงทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Rc* บริเวณเอกซอน ที่ 7 ในข้าว 6 พันธุ์ พบว่าข้าวดำ และข้าวขาว เกิดการขาดหายไป 14 bp และเกิดการแทนที่จากเบส G เป็น A (ภาพ 15) สอดคล้องกับรายงานของ Gu *et al.* (2011) ที่พบการแสดงออกของยีน *Rc* ที่เมล็ดในข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดง ขาวและดำ และพบว่า ในข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำเกิดการขาดหายไป 14 bp และและเกิดการแทนที่จากเบส G เป็น A



ภาพ 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Rc* บริเวณเอกซอนที่ 7 ของข้าว 6 พันธุ์

หมายเหตุ PCR_Sasa คือ ลำดับเบสของยีน *Rc* บริเวณเอกซอน ที่ 7 ในข้าว Sasanishiki
 PCR_T65 คือ ลำดับเบสของยีน *Rc* บริเวณเอกซอน ที่ 7 ในข้าว Taichung65
 PCR_KU คือ ลำดับเบสของยีน *Rc* บริเวณเอกซอน ที่ 7 ในข้าว ลิ้มผั่ว
 PCR_HN คือ ลำดับเบสของยีน *Rc* บริเวณเอกซอน ที่ 7 ในข้าว หอมนิล
 PCR_Kasa คือ ลำดับเบสของยีน *Rc* บริเวณเอกซอน ที่ 7 ในข้าว Kasalath
 PCR_HMD คือ ลำดับเบสของยีน *Rc* บริเวณเอกซอน ที่ 7 ในข้าว หอมมะลิแดง

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของยีน *Rc* บริเวณเอกซอน ที่ 7 ในข้าว 6 พันธุ์ พบว่าข้าวดำ และข้าวขาว เกิด Frameshift ทำให้เกิด premature stop codon สายโพลิเพปไทด์จึงสั้นลง (ภาพ 16) ซึ่งผลดังกล่าวตรงกับการศึกษาของ Lim and Ha (2013) ที่พบว่าข้าวขาวและดำเกิด Frameshift ทำให้เกิด premature stop codon สายโพลิเพปไทด์จึงสั้นลง อาจจะส่งผลให้การสังเคราะห์โปรตีนไฮยาดินินไม่สามารถทำงานได้และไม่เกิดสีแดงในเยื่อหุ้มเมล็ดในข้าวขาว

```

PCR_Sasa_C : FCKYIFVLFTQALPFFFFFAYILNSCISFPYIYNCLHFPSTATEDQVASPENTHYPKTLMTILHYNTLRCCEMNIKNYL : 80
PCR_T65_Cs : FCKYIFVLFTQALPFFFFFAYILNSCISFPYIYNCLHFPSTATEDQVASPENTHYPKTLMTILHYNTLRCCEMNIKNYL : 80
PCR_KU_CsR : FCKYIFVLFTQALPFFFFFAYILNSCISFPYIYNCLHFPSTATEDQVASPENTHYPKTLMTILHYNTLRCCEMNIKNYL : 80
PCR_HN_CsR : FCKYIFVLFTQALPFFFFFAYILNSCISFPYIYNCLHFPSTATEDQVASPENTHYPKTLMTILHYNTLRCCEMNIKNYL : 80
PCR_Kasa_C : FCKYIFVLFTQALPFFFFFAYILNSCISFPYIYNCLHFPSTATEDQVASPENTHYPKTLMTILHYNTLRCCEMNIKNYL : 80
PCR_HMD_Cs : FCKYIFVLFTQALPFFFFFAYILNSCISFPYIYNCLHFPSTATEDQVASPENTHYPKTLMTILHYNTLRCCEMNIKNYL : 80
FCKYIFVLFTQALPFFFFFAYILNSCISFPYIYNCLHFPSTATEDQVASPENTHYPKTLMTILHYNTLRCCEMNIKNYL

PCR_Sasa_C : PVSEKSSFSRWTTPEGSDCNKTMISPGTTCRMLKSIILMIVPSSHCSYRGAETPESRGGKGASGCHPR----- : 147
PCR_T65_Cs : PVSEKSSFSRWTTPEGSDCNKTMISPGTTCRMLKSIILMIVPSSHCSYRGAETPESRGGKGASGCHPR----- : 147
PCR_KU_CsR : PVSEKSSFSRWTTPEGSDCNKTMISPGTTCRMLKSIILMIVPSSHCSYRGAETPESRGGKGASGCHPR----- : 147
PCR_HN_CsR : PVSEKSSFSRWTTPEGSDCNKTMISPGTTCRMLKSIILMIVPSSHCSYRGAETPESRGGKGASGCHPR----- : 147
PCR_Kasa_C : PVSEKSSFSRWTTPEGSDCNKTMISPGTTCRMLKSIILMIVPSSHCSYRGAETPESRGGKGASGTRKVGAIQGD- : 153
PCR_HMD_Cs : PVSEKSSFSRWTTPEGSDCNKTMISPGTTCRMLKSIILMIVPSSHCSYRGAETPESRGGKGASGTRKVGAIQGD- : 153
PVSEKSSFSRWTTPEGSDCNKTMISPGTTCRMLKSIILMIVPSSHCSYRGAETPESRGGKGASG

```

Frameshift
mutation

Premature stop codon in White and Black

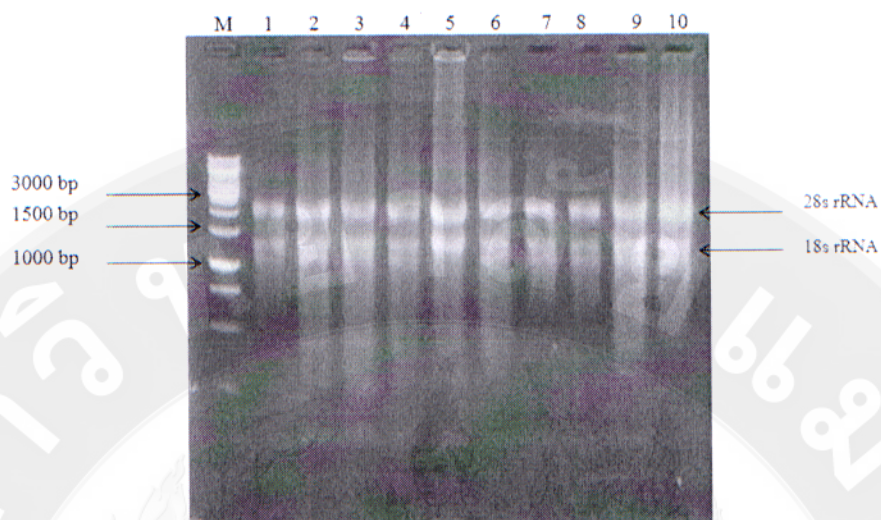
ภาพ 16 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *Rc* บริเวณเอกซอนที่ 7 ของข้าว 6 พันธุ์

หมายเหตุ PCR_Sasa คือ ลำดับกรดอะมิโนของยีน *Rc* บริเวณเอกซอน ที่ 7 ในข้าว Sasanishiki
 PCR_T65 คือ ลำดับกรดอะมิโนของยีน *Rc* บริเวณเอกซอน ที่ 7 ในข้าว Taichung65
 PCR_KU คือ ลำดับกรดอะมิโนของยีน *Rc* บริเวณเอกซอน ที่ 7 ในข้าว ลิ้มฟัว
 PCR_HN คือ ลำดับกรดอะมิโนของยีน *Rc* บริเวณเอกซอน ที่ 7 ในข้าว หอมนิล
 PCR_Kasa คือ ลำดับกรดอะมิโนของยีน *Rc* บริเวณเอกซอน ที่ 7 ในข้าว Kasalath
 PCR_HMD คือ ลำดับกรดอะมิโนของยีน *Rc* บริเวณเอกซอน ที่ 7 ในข้าว หอมมะลิ
 แดง

2. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *Rc* โดยเทคนิค RT-PCR

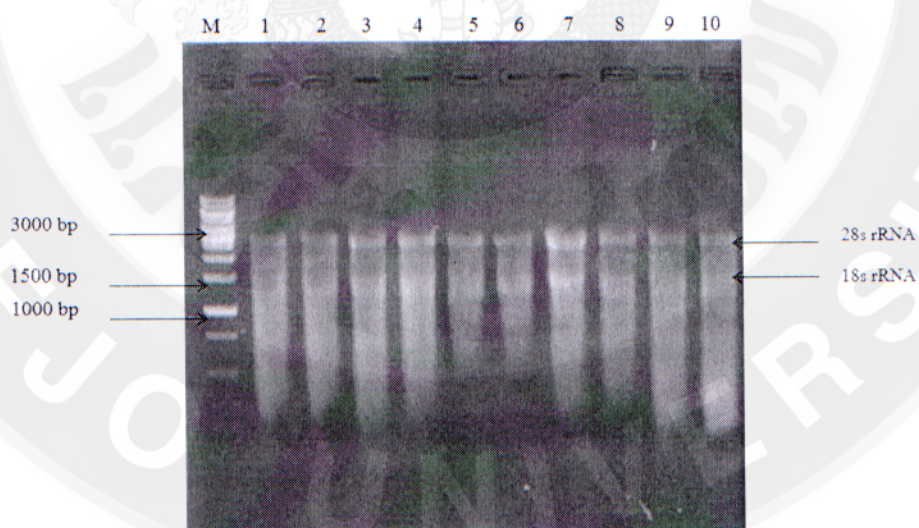
2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าว

สกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อนหลังเพาะเมล็ดอายุ 2 สัปดาห์ และเมล็ดอ่อนในระยะน้ำนม หลังออกดอกประมาณ 15 วัน ของข้าว 10 พันธุ์ ได้แก่ Taichung 65 Sasanishiki กข6 ขาวดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง สังข์หยดพัทลุง Kasalath ลิ้มฟัว หอมนิล และก่ำ พบแถบอาร์เอ็นเอ (rRNA) ที่สกัดจากใบอ่อนและเมล็ดขนาด 18S และ 28S ที่ชัดเจน แสดงว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนมีคุณภาพดี (ภาพ 17-18) ดังนั้น อาร์เอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนสามารถนำไปเป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์ cDNA เพื่อใช้ในการโคลนยีนต่อไปได้



ภาพ 17 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อนของข้าว

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA Ladder ช่องที่ 1-10 คือ ข้าวพันธุ์ Taichung65 Sasanishiki กข6 ข้าวดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง สังกะหัดพัทลุง Kasalath ลิ้มผัว หอม นิล และกำ ตามลำดับ

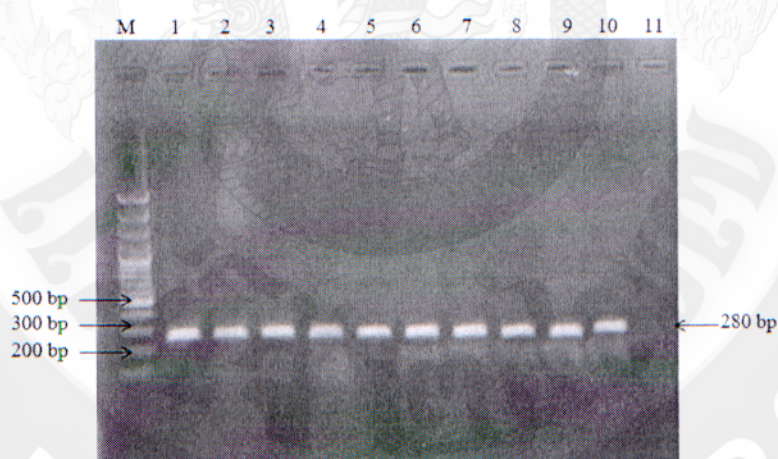


ภาพ 18 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเมล็ดอ่อนของข้าว

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA Ladder ช่องที่ 1-10 คือ ข้าวพันธุ์ Taichung65 Sasanishiki กข6 ข้าวดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง สังข์หยดพัทลุง Kasalath ลิ้มผั่ว หอมนิล และกำ ตามลำดับ

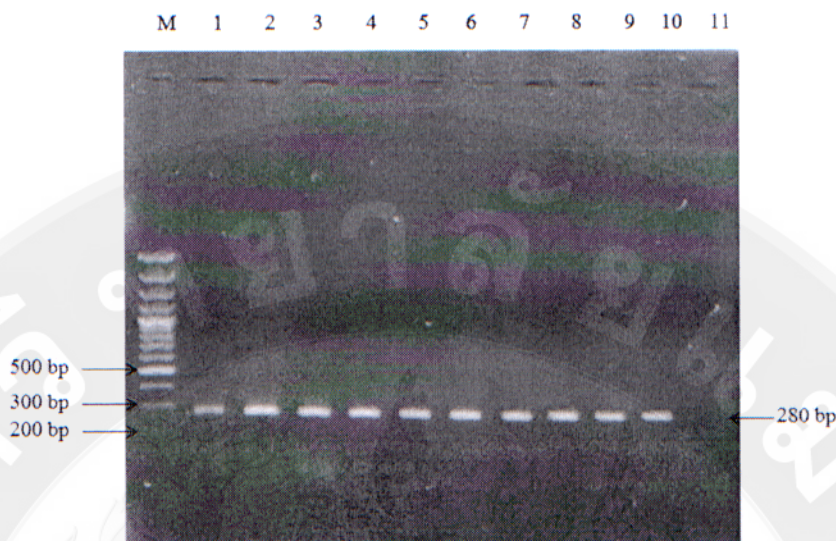
2.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *Rc* ด้วยเทคนิค RT-PCR

เมื่อสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนจากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ 10 พันธุ์ จากนั้นทำการสังเคราะห์ first strand cDNA โดยใช้ชุด High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits โดยปฏิกิริยา reverse transcription (RT) และตรวจสอบ cDNA ที่ใช้เป็นแม่พิมพ์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *actin* พบว่า cDNA จากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าวทุกพันธุ์เกิดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังมีขนาดประมาณ 280 bp (ภาพ 19 และ 20) แสดงว่าพบการแสดงออกของยีน *actin* ในใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าวทุกพันธุ์ที่ศึกษา ดังนั้น จึงนำ cDNA เหล่านี้ไปเป็นแม่พิมพ์ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *Rc* ด้วยเทคนิค RT-PCR ต่อไป



ภาพ 19 ผลการตรวจสอบยีน *actin* โดยใช้ cDNA จากใบอ่อนของข้าวเป็นแม่พิมพ์ด้วยเทคนิค PCR

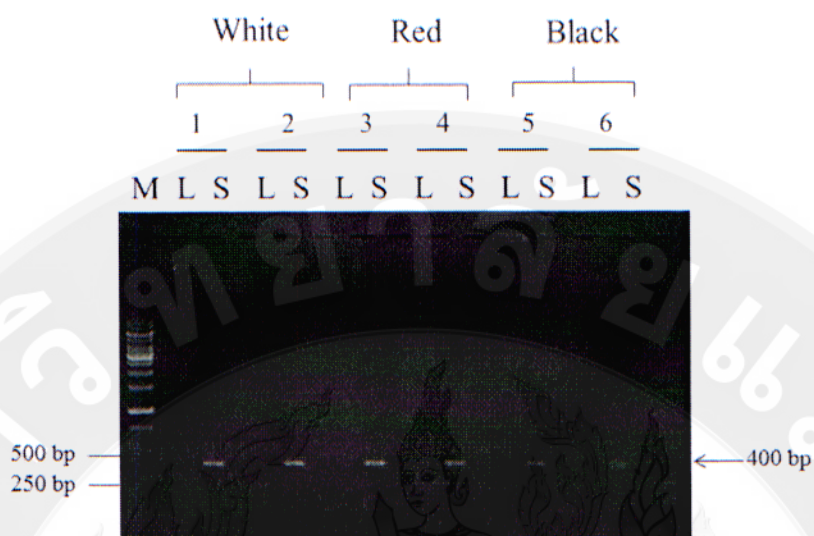
หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 100 bp Ladder Plus ช่องที่ 1-10 คือ ข้าวพันธุ์ Taichung65 Sasanishiki กข6 ข้าวดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง สังข์หยดพัทลุง Kasalath ลิ้มผั่ว หอมนิล และกำ ตามลำดับ



ภาพ 20 ผลการตรวจสอบยีน *actin* โดยใช้ cDNA จากเมล็ดอ่อนของข้าวเป็นแม่พิมพ์ด้วยเทคนิค PCR

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 100 bp Ladder Plus ช่องที่ 1-10 คือ ข้าวพันธุ์ Taichung65 Sasanishiki กข6 ขาวดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง สังข์หยดพัทลุง Kasalath ลิ้มฟัว หอมนิล และกำ ตามลำดับ

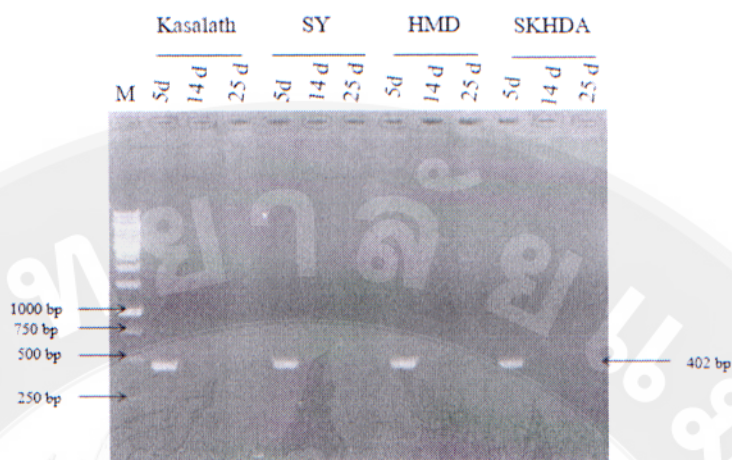
จากนั้นทำการตรวจสอบการแสดงออกยีน *Rc* ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ cDNA เป็นแม่พิมพ์ และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อของยีน *Rc* บางส่วนพบว่า cDNA จากใบอ่อนข้าวทั้ง 6 สายพันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์ Taichung65 ขาวดอกมะลิ 105 Kasalath หอมมะลิแดง หอมนิล และลิ้มฟัว ตามลำดับ ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังมีขนาดประมาณ 400 bp ส่วน cDNA จากเมล็ดอ่อน เกิดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังมีขนาดประมาณ 400 bp ดังนั้นจึงพบการแสดงออกของยีน *Rc* ในเมล็ดเท่านั้น (ภาพ 21) เช่นเดียวกับ Sweeney *et al.* (2006) ที่ทำการศึกษาใน *Rc* พบว่ามีการแสดงออกที่เมล็ดเท่านั้นในข้าวพันธุ์ *Oryza rufipogon* (เชื้อหุ้มเมล็ดสีแดง) และ *Oryza sativa* cv Jefferson (เชื้อหุ้มเมล็ดสีขาว) นอกจากนี้พบว่าในข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีขาวเกิดการขาดหายไป 14 bp และเกิดการแทนที่จากเบส G เป็น A จึงนำไปสู่การทดลองต่อไปคือ การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *Rc* บางส่วนต่อไป



ภาพ 21 ผลการแสดงผลการออกของยีน *Rc* ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ cDNA จากใบอ่อน (L) และเมล็ดอ่อนของข้าว (S) เป็นแม่พิมพ์

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1-6 คือ ข้าวพันธุ์ Taichung65 ขาวดอกมะลิ 105 Kasalath หอมมะลิแดง หอมนิล และส้มผั้ว ตามลำดับ

เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงผลการออกของยีน *Rc* ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ cDNA ที่สังเคราะห์จากเมล็ดอ่อนที่มีอายุต่างกัน ได้แก่ 5, 14 และ 25 วัน หลังดอกบาน เป็นแม่พิมพ์ และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อของยีน *Rc* พบว่า cDNA จากข้าวทั้ง 4 พันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath หอมมะลิแดง ส้มห้วยพิบูลย์ สุโขทัยหอมแดง ที่อายุของเมล็ดอ่อน 5 วัน หลังจากดอกบาน ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังขนาดประมาณ 400 bp แสดงว่าที่อายุของเมล็ดอ่อน 5 วัน มีการแสดงผลการออกของยีน *Rc* (ภาพ 22)

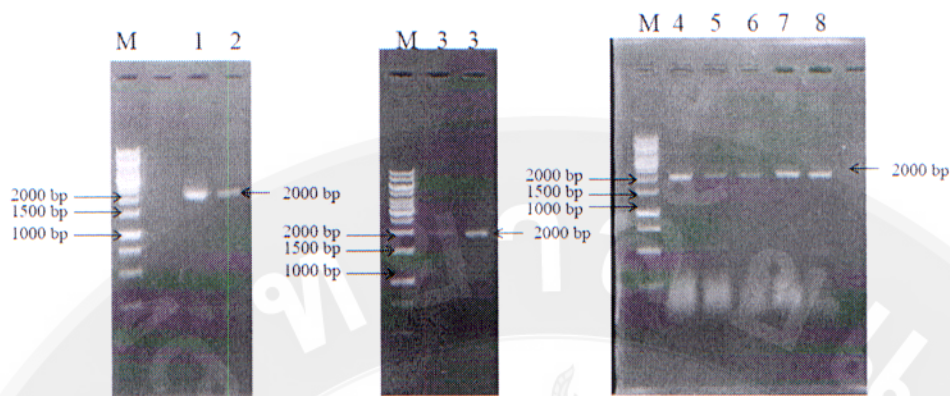


ภาพ 22 ผลการแสดงผลของยีน *Rc* ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ cDNA จากเมล็ดอ่อนของข้าวที่อายุ 5, 14 และ 25 วัน หลังดอกบาน เป็นแม่พิมพ์

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder
 ช่อง Kasalath คือ cDNA จากเมล็ดอ่อนของข้าว Kasalath
 ช่อง SY คือ cDNA จากเมล็ดอ่อนของข้าวสังข์หยดพัทลุง
 ช่อง HMD คือ cDNA จากเมล็ดอ่อนของข้าวหอมมะลิแดง
 ช่อง SKHDA คือ cDNA จากเมล็ดอ่อนของข้าวสุโขทัยหอมแดง

3. การค้นหายีน *Rc* โดยเทคนิค RT-PCR

เมื่อทำการค้นหายีนด้วยเทคนิค RT-PCR และทำการเพิ่มปริมาณยีน *Rc* จากเมล็ดอ่อนของข้าว 8 พันธุ์ ได้แก่ Kitaake ข้าวดอกมะลิ 105 Kasalath สุโขทัยหอมแดง สังข์หยดพัทลุง หอมมะลิแดง ลิ้มฟัว MJU และ หอมนิล พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2,000 bp จึงทำการตัดเจลขนาดดังกล่าว เพื่อทำการแยกบริสุทธิ์ยีน *Rc* จากเจล และโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pJET1.2 และ pBluescript SK+ ต่อไป (ภาพ 23)



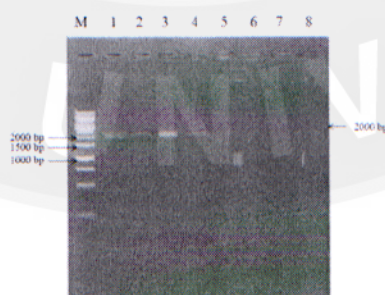
ภาพ 23 ผลการเพิ่มปริมาณยีน *Rc* โดยใช้ cDNA จากเมล็ดอ่อนของข้าวด้วยเทคนิค PCR

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1-8 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake ข้าวดอกมะลิ 105 Kasalath สุโขทัยหอมแดง สังข์หยดพัทลุง หอมมะลิแดง ลิ้มผั่ว MJU และหอมนิล ตามลำดับ

4 การโคลนยีน *Rc* เข้าสู่เวกเตอร์ pJET1.2 และ pBluescript SK+

4.1 การแยกบริสุทธิ์ยีน *Rc* จากเจล

หลังจากการค้นหายีนด้วยเทคนิค RT-PCR และทำการเพิ่มปริมาณยีน *Rc* จากเมล็ดอ่อนของข้าวจำนวน 8 พันธุ์ ได้แก่ Kitaake ข้าวดอกมะลิ 105 Kasalath สุโขทัยหอมแดง สังข์หยดพัทลุง หอมมะลิแดง ลิ้มผั่ว MJU และหอมนิล พบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 2,000 bp แล้วทำการแยกบริสุทธิ์ยีน *Rc* จากเจล เพื่อใช้โคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pJET1.2 และ pBluescript SK+ สำหรับวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป (ภาพ 24)

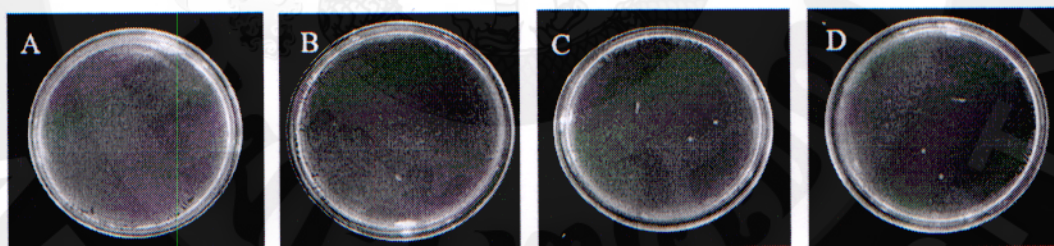


ภาพ 24 ผลการแยกบริสุทธิ์ยีน *Rc* จากเจล

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1-8 คือ ขั้วพันธุ์ Kitaake Kasalath สุโขทัยหอมแดง หอมมะลิแดง สังข์หยดพัทลุง ขาวดอกมะลิ 105 ลิ้มผั่ว MJU และ หอมนิล ตามลำดับ

4.2 การเชื่อมชิ้นยีน *Rc* เข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 และ pBluescript SK+ และส่งถ่ายเข้าสู่ *E. coli* competent cells

เมื่อทำการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 2,000 bp แล้วนำมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pJET1.2 และ pBluescript SK+ ซึ่งการเชื่อมชิ้นยีน *Rc* จากเมล็ดอ่อนของขั้วพันธุ์ Kitaake เข้ากับเวกเตอร์ pBluescript SK+ ในขณะที่การเชื่อมชิ้นยีน *Rc* จากเมล็ดอ่อนของขั้วพันธุ์ Kasalath สุโขทัยหอมแดง สังข์หยดพัทลุง และหอมมะลิแดง เข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 จากนั้นส่งถ่ายเข้าสู่ competent cells แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีแอมพิซิลิน เพื่อคัดเลือกโคลนที่ได้รับ พลาสมิดพบว่า ได้โคโลนีสีขาวจำนวนมากในขั้วพันธุ์ Kitaake Kasalath สุโขทัยหอมแดง และหอมมะลิแดง ยกเว้นขั้วพันธุ์สังข์หยดพัทลุงที่ไม่พบโคโลนี (ภาพ 25) จึงทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวเหล่านี้แล้วทำการคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยขนาด (Rapid size screening) ในขั้นตอนต่อไป



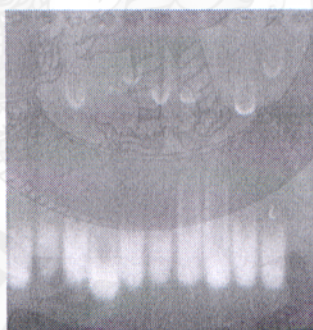
ภาพ 25 ผลการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *E. coli* DH5 α ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร X-gal 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ IPTG 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

หมายเหตุ A. คือ ยีน *Rc* เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pBluescript SK+ จากเมล็ดอ่อนของขั้วพันธุ์ Kitaake, B. คือ ยีน *Rc* เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 จากเมล็ดอ่อนของขั้วพันธุ์ Kasalath, C. คือ ยีน *Rc* เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 จากเมล็ดอ่อนของขั้วพันธุ์สุโขทัยหอมแดง D. คือ ยีน *Rc* เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 จากเมล็ดอ่อนของขั้วพันธุ์หอมมะลิแดง

4.3 การคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยขนาด (Rapid size screening)

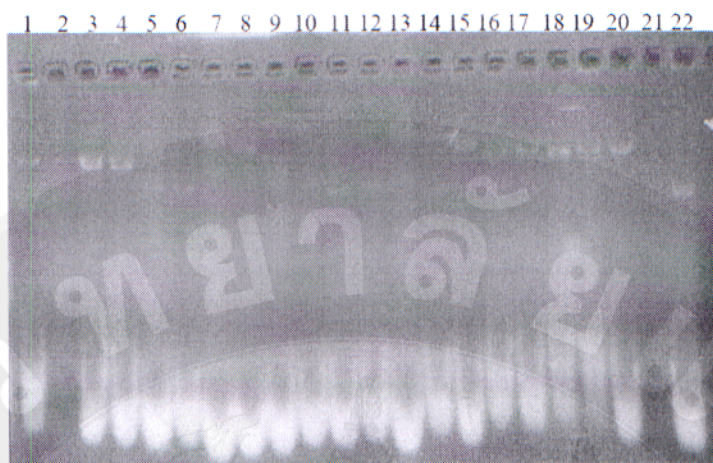
จากการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมโดยนำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ จากการเชื่อมต่อยีน *Rc* จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ Kitaake ได้โคโลนี 10 โคโลนี, ส่วนพันธุ์ Kasalath, สุโขทัยหอมแดงและหอมมะลิแดง ได้พันธุ์ละ 22 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลิน จากนั้นคัดเลือkd้วยขนาด โดยเปรียบเทียบกับโคโลนีสีฟ้า โดยโคลนที่คัดเลือกมีพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่กว่าดีเอ็นเอที่ไม่มีชั้นยีน *Rc* พบว่า โคโลนีสายผสมจากพันธุ์ Kitaake คัดเลือกได้ 3 โคโลนี คือ โคโลนีที่ 1, 4, 10 (ภาพ 26) พันธุ์ Kasalath คัดเลือกได้ 12 โคโลนี คือ โคโลนีที่ 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17 (ภาพ 27) พันธุ์สุโขทัยหอมแดง คัดเลือกได้ 10 โคโลนี คือ โคโลนีที่ 2, 4, 7, 8, 9, 12, 17, 18, 20, 21 (ภาพ 28) และพันธุ์หอมมะลิแดง คัดเลือกได้ 10 โคโลนี คือ โคโลนีที่ 8, 10, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22 (ภาพ 29) คาดว่าโคโลนีสีขาวเหล่านี้อาจได้รับยีน *Rc* จึงนำมาสกัดพลาสมิดและคัดเลือkd้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป

B 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 B



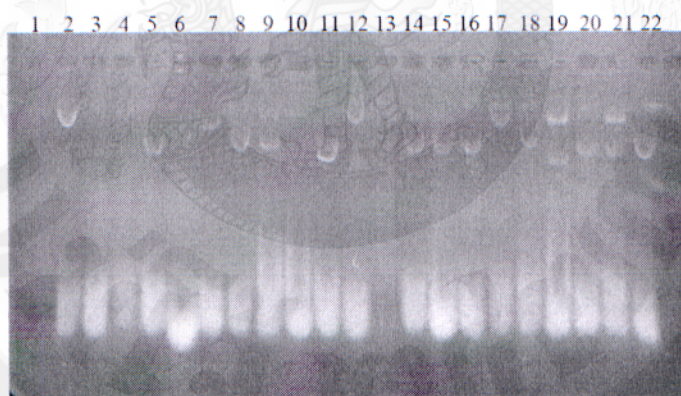
ภาพ 26 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด

หมายเหตุ ช่องที่ B คือ โคโลนีที่ไม่มีชั้นยีน *Rc* ช่องที่ 1-10 คือ โคโลนีที่คัดเลือกจากการเชื่อมต่อยีน *Rc* จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ Kitaake กับเวกเตอร์ pBluescript SK+



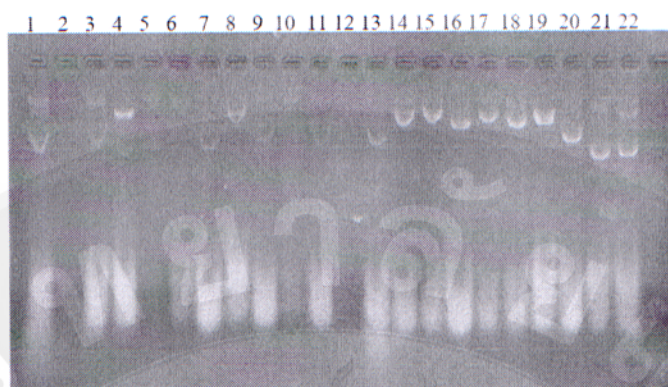
ภาพ 27 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด

หมายเหตุ ช่องที่ 1-22 คือ โคลนที่คัดเลือกจากการเชื่อมต่อยีน Rc จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ Kasalath กับเวกเตอร์ pJET1.2



ภาพ 28 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด

หมายเหตุ ช่องที่ 1-22 คือ โคลนที่คัดเลือกจากการเชื่อมต่อยีน Rc จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ สุโขทัยหอมแดงกับเวกเตอร์ pJET1.2

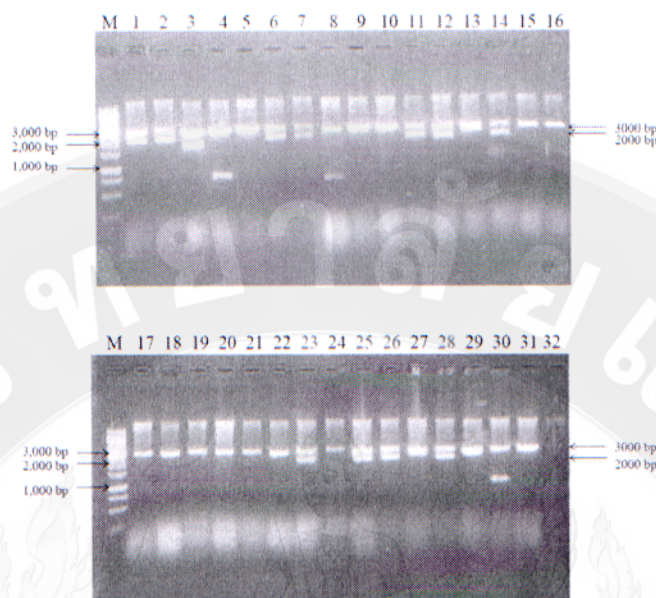


ภาพ 29 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด

หมายเหตุ ช่องที่ 1-22 คือ โคลนที่คัดเลือกจากการเชื่อมต่อยีน R_c จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์หอมมะลิแดงกับเวกเตอร์ pJET1.2

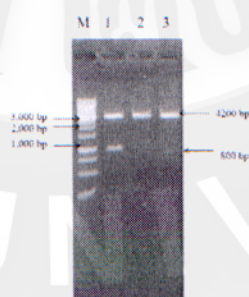
4.4 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เมื่อคัดเลือกโคลนที่คาดว่าจะมีดีเอ็นเอสายผสมจากการคัดด้วยขนาด ทำการสกัดพลาสมิด pJET1.2 และ pBluescript SK+ ที่คาดว่าจะมียีน R_c จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ Kitaake Kasalath สุโขทัยหอมแดง และหอมมะลิแดง คัดเลือกได้ทั้งหมด 35 โคลน ทำการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*/II จากพลาสมิด pJET 1.2 ที่คาดว่าจะมีดีเอ็นเอสายผสม เพื่อตรวจสอบขนาดขึ้นยีน พบว่า พลาสมิดที่คัดเลือกจากโคลนที่มียีน R_c จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ Kasalath สุโขทัยหอมแดง และหอมมะลิแดง เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกับที่คาดหวังประมาณ 2,000 bp และขนาดประมาณ 3,000 bp ซึ่งเป็นเวกเตอร์ pJET1.2 (ภาพ 30) ส่วนพลาสมิดที่คัดเลือกจากโคลนที่มียีน R_c เชื่อมเข้ากับเป็นเวกเตอร์ pBluescript SK+ ทำการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 800 และ 4,200 bp มีทิศที่ถูกด้อง (ทิศ sense) (ภาพ 32) หรือ 1,200 และ 3,800 bp ไม่ถูกทิศ (ทิศ antisense) (ภาพ 33) เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป



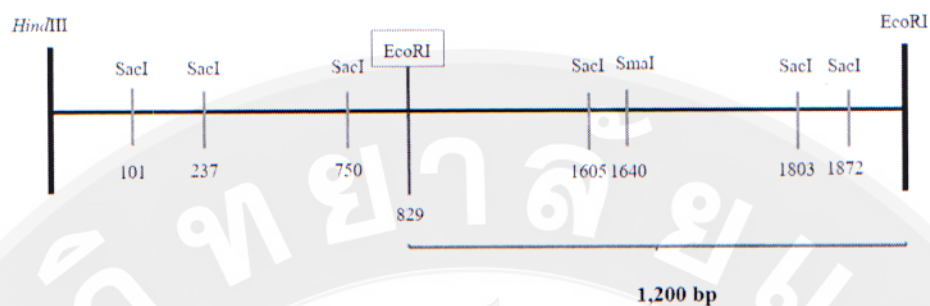
ภาพ 30 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมโดยใช้เวกเตอร์ pJET 1.2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่อง 1-10 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกจากโคลนที่มียีน *Rc* จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์สุโขทัยหอมแดง โคลนที่ 3, 4, 7, 8, 9, 12, 17, 18, 20, 21 ช่อง 11-22 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกจากโคลนที่มียีน *Rc* จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ Kasalath โคลนที่ 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17 ช่อง 23-32 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกจากโคลนที่มียีน *Rc* จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง โคลนที่ 17, 22, 8, 10, 14, 15, 16, 18, 19, 20

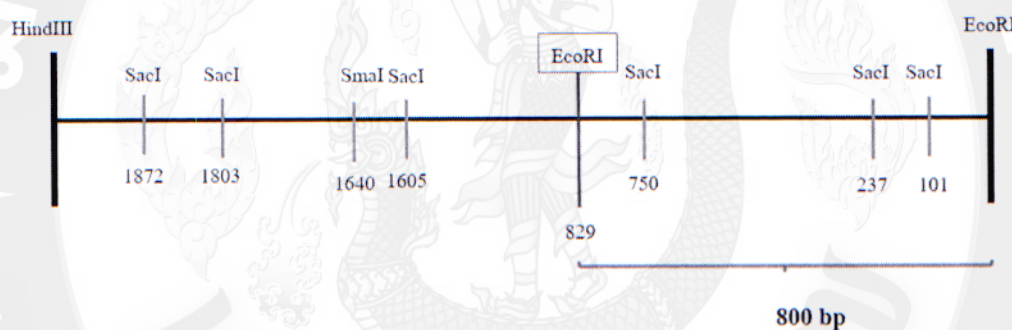


ภาพ 31 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมโดยใช้เวกเตอร์ pBluescript SK+ ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่อง 1-3 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกจากโคลนที่มียีน *Rc* จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ Kitaake โคลนที่ 1, 4, 10

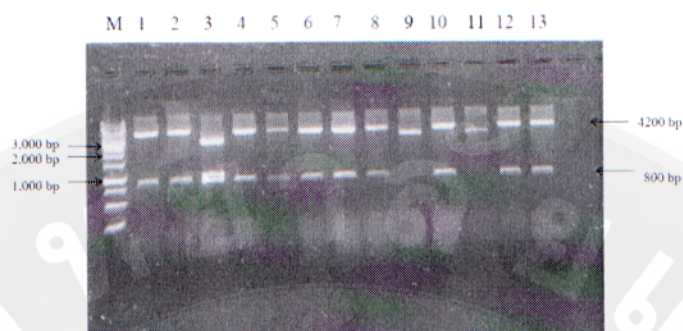


ภาพ 32 แผนที่ยีน *Rc* ใน pBluescript SK+ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* กรณีที่มีทิศที่ถูกต้อง (ทิศ sense) ได้แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 1,200 และ 3,800 bp



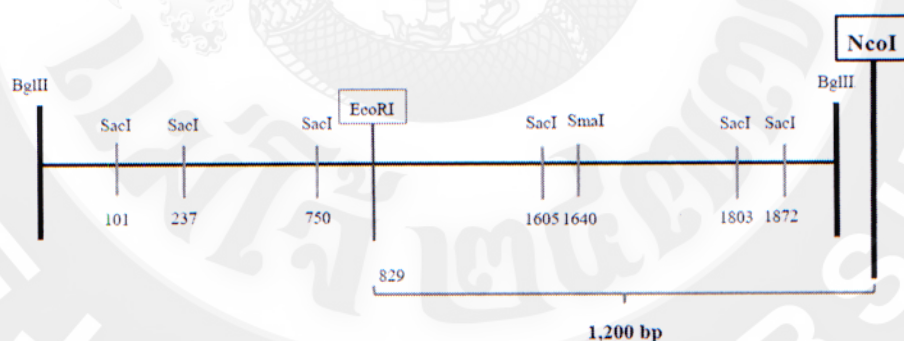
ภาพ 33 แผนที่ยีน *Rc* ใน pBluescript SK+ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* กรณีที่มีทิศที่ไม่ถูกต้อง (ทิศ antisense) ได้แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 800 และ 4,200 bp

นอกจากนั้น ยังทำการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัดภายในชิ้นยีน และ *NcoI* เพื่อตรวจสอบว่าดีเอ็นเอสายผสมที่คัดเลือกมีชิ้นยีน *Rc* หรือไม่ จึงทำการตัดในพลาสมิดที่คัดเลือกจากโคลนที่มียีน *Rc* เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 พบว่าสามารถคัดเลือกพลาสมิดที่คัดเลือกจากโคลนที่มียีน *Rc* จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์สุโขทัยหอมแดง ได้ 4 โคลนี ได้แก่ โคลนที่ 2, 4, 12, 17 พันธุ์ Kasalath ได้ 3 โคลนี ได้แก่ โคลนที่ 3, 4, 8 และข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง ได้ 3 โคลนี ได้แก่ โคลนที่ 8, 15, 17 (ภาพ 34) โดยขนาดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ในกรณีที่ 1 มีทิศที่ถูกต้อง (ทิศ sense) พบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 1,200 และ 3,800 bp (ภาพ 35) กรณีที่ 2 มีทิศที่ไม่ถูกต้อง (ทิศ antisense) แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 800 และ 4,200 bp (ภาพ 36)

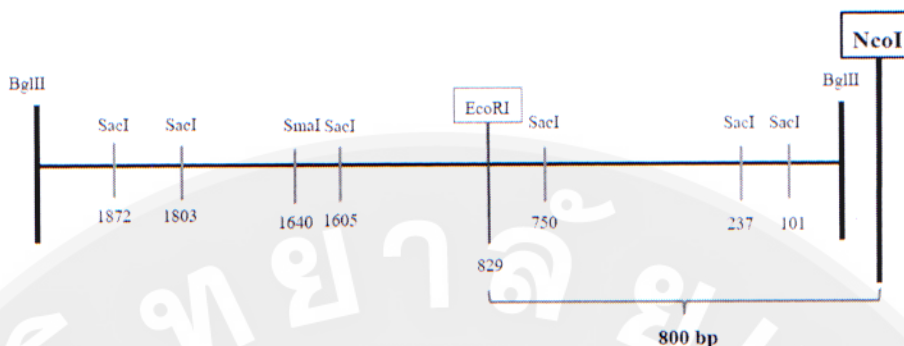


ภาพ 34 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมโดยใช้เวกเตอร์ pJET 1.2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI/NcoI*

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่อง 1-5 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกจากโคลนที่มียีน *Rc* จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์สุโขทัยหอมแดง โคลนที่ 2, 4, 7, 12, 17 ช่อง 6-9 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกจากโคลนที่มียีน *Rc* จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ Kasalath โคลนที่ 3, 4, 8, 7 ช่อง 10-13 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกจากโคลนที่มียีน *Rc* จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง โคลนที่ 8, 10, 15, 17



ภาพ 35 แผนที่ยีน *Rc* ใน pJET 1.2 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI/NcoI* กรณีที่มีทิศที่ถูกต้อง (ทิศ sense) ได้แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 1,200 และ 3,800 bp



ภาพ 36 แผนที่ยีน *Rc* ใน pJET 1.2 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI/NcoI* กรณีที่มีทิศที่ไม่ถูกต้อง (ทิศ antisense) ได้แถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 800 และ 4,200 bp

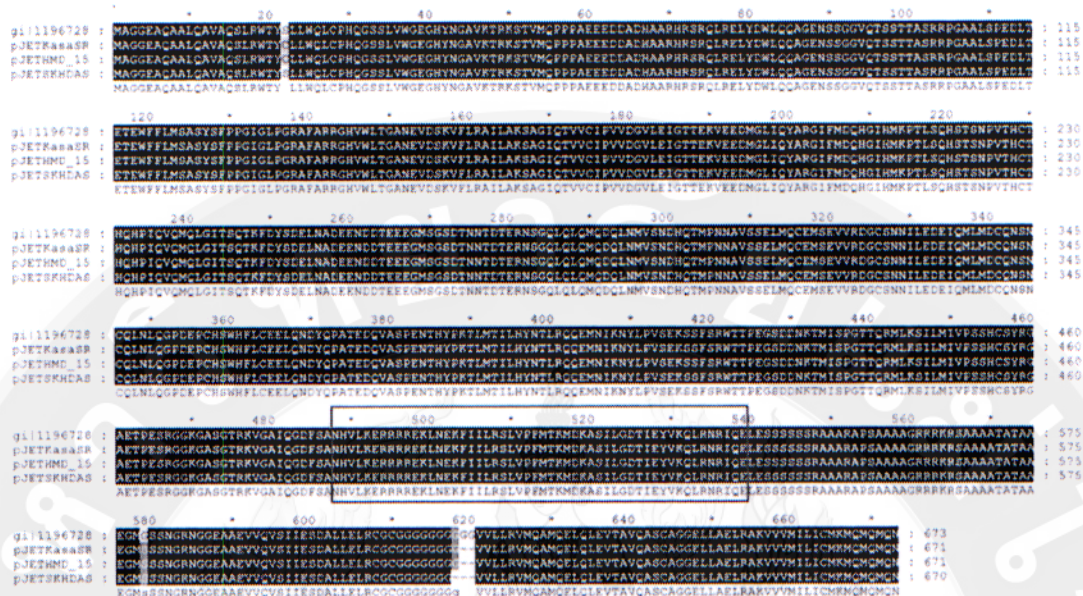
5. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *Rc* จากโคลนสายผสมที่ถูกคัดเลือก

จากการวิจัยนี้สามารถโคลนยีน *Rc* จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง สุโขทัย หอมแดง และ Kasalath ขนาดประมาณ 2,000 bp จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ coding region ของยีน *Rc* ที่โคลนได้เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Rc* จากข้าวสีในฐานข้อมูล GenBank (accession no. AB247503.1) พบว่ายีน *Rc* ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ open reading frame (ORF) ขนาด 2,022 bp ซึ่งมีความเหมือนกับยีนในฐานข้อมูลถึง 99 เปอร์เซ็นต์ โดยในแต่ละพันธุ์ต่างจากยีนในฐานข้อมูลจำนวน 6 ตำแหน่ง โดยพบการแทนที่เบส 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 64 (A->T) ในข้าวพันธุ์ Kasalath และหอมมะลิแดง ตำแหน่งที่ 96 (T->G) ในข้าวทั้ง 3 พันธุ์ ตำแหน่งที่ 675 (A->G) ในข้าวพันธุ์สุโขทัยหอมแดง ตำแหน่งที่ 909 (C->A) ในข้าวทั้ง 3 พันธุ์ ตำแหน่งที่ 1735 (G->A) ในข้าวทั้ง 3 พันธุ์ นอกจากนี้ยังพบการขาดหายไป 6 bp ในข้าวพันธุ์ Kasalath และหอมมะลิแดง และขาดหายไป 9 bp ในข้าวพันธุ์สุโขทัยหอมแดง การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *Rc* จากข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดง 3 พันธุ์ ข้าวพันธุ์ Kasalath และหอมมะลิแดง มีลำดับเบส 2,016 bp ส่วนสุโขทัยหอมแดง มีลำดับเบสขนาด 2,013 bp เหมือนกับยีน *Rc* จากข้าว Kasalath ในฐานข้อมูล GenBank (Furukawa et al., 2007) (ภาพ 37) โดยคาดว่าจะการกลายพันธุ์ของลำดับเบสดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อลำดับกรดอะมิโน จึงทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนต่อไป



ภาพ 37 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Rc* บริเวณ ORF ขนาด 2,016 และ 2,013 bp ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ กับลำดับเบสของยีน *Rc* จากข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดงพันธุ์ Kasalath ใน GenBank (accession no. AB247503.1)

จากนั้นวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Rc* ที่โคลนได้เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนจากข้าวสีแดงพันธุ์ Kasalath ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งมีขนาด 2,022 bp และมีลำดับกรดอะมิโน 673 หน่วย พบว่า ข้าวพันธุ์ Kasalath (ที่โคลนได้ในงานวิจัยนี้) และหอมมะลิแดง มียีนขนาด 2,016 bp ส่วนสุโขทัยหอมแดง มียีนขนาด 2,013 bp มีลำดับกรดอะมิโนยาว 671 และ 670 หน่วย ตามลำดับ (ภาพ 38) ซึ่งลำดับกรดอะมิโนที่วิเคราะห์จากข้าวทั้ง 3 พันธุ์ คล้ายกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *Rc* จากข้าวสีแดงพันธุ์ Kasalath ในฐานข้อมูล (accession no. BAF42667) ถึง 98 เปอร์เซ็นต์ มีเพียง 3 ตำแหน่ง ต่างกันในแต่ละพันธุ์โดยในข้าวพันธุ์ Kasalath และหอมมะลิแดง ทำให้เกิดกรดอะมิโนเปลี่ยนจาก S เป็น C ที่ตำแหน่ง 22 นอกจากนี้ ที่ตำแหน่ง 579 มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก G เป็น S และพบว่าข้าวพันธุ์ Kasalath และหอมมะลิแดง ที่โคลนได้ ถึงแม้ว่าบริเวณตำแหน่ง 618 จะมีกรดอะมิโนหายไป 2 หน่วย และ สุโขทัยหอมแดงจะมีกรดอะมิโนหายไป 3 หน่วย ซึ่งการขาดหายไป 2 และ 3 หน่วย แต่ไม่ใช้บริเวณ bHLH จึงอาจทำให้ยีน *Rc* สามารถทำงานได้และทำให้เกิดเมล็ดสีแดงได้ โดยคาดว่าบริเวณดังกล่าวไม่มีผลกระทบต่อบริเวณ basic helix-loop-helix (bHLH) domain ซึ่งส่วนที่เป็น bHLH อยู่ที่บริเวณตำแหน่ง 488-538 ซึ่งเป็นบริเวณที่จับกับดีเอ็นเอ และเป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์สำหรับโปรตีน transcription factor



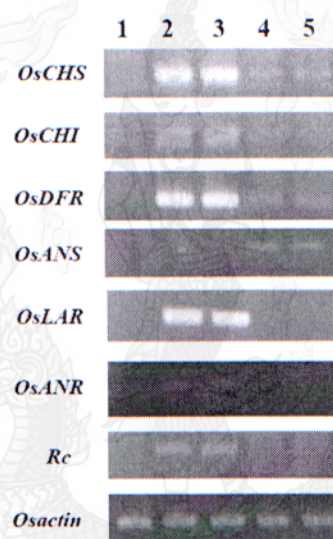
ภาพ 38 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *Rc* ที่ได้จากการแปลรหัสของบริเวณ coding sequence จำนวน 671 และ 672 กรดอะมิโนของยีนขนาด 2,016 และ 2,013 bp ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *Rc* ใน GenBank (accession no. BAF42667)

หมายเหตุ บริเวณที่แรเงาสีดำแสดงให้เห็นลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันของข้าวแต่ละพันธุ์และบริเวณ bHLH domain ที่ตำแหน่ง 488-538 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในข้าวทุกพันธุ์ ลำดับกรดอะมิโนในกรอบสีแดง คือ ตำแหน่ง bHLH domain

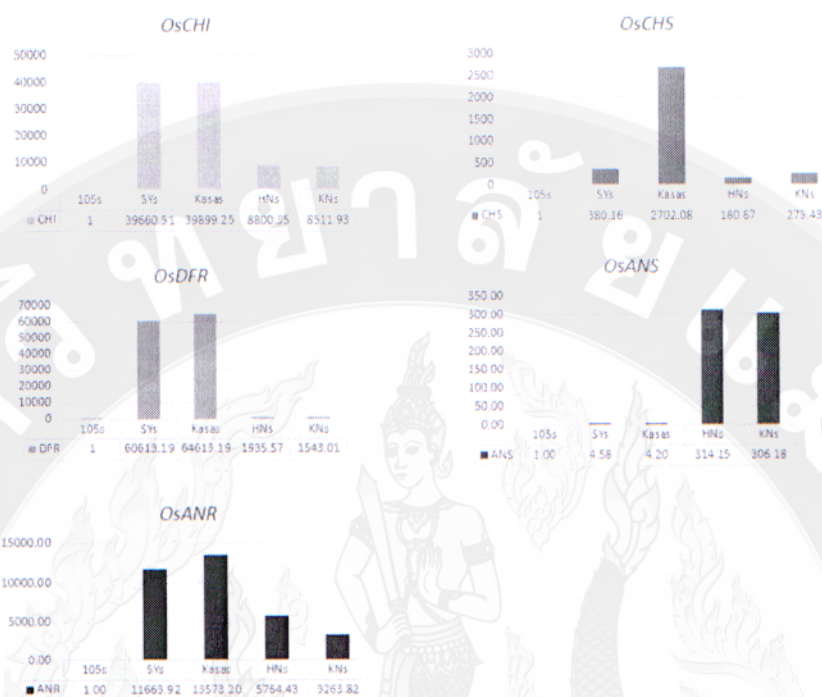
6. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Rc* และยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานินโดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR และ Real-time RT-PCR

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *Rc* ซึ่งเป็นยีนควบคุมและยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิน ได้แก่ *OsCHS*, *OsCHI*, *OsDFR*, *OsANS*, *OsLAR* และ *OsANR* ด้วยเทคนิค semi quantitative RT-PCR และ Real-time RT-PCR โดยข้าวเชื่อมุ้มเมล็ดสีขาวได้แก่ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ข้าวเชื่อมุ้มเมล็ดสีแดงได้แก่ สังข์หยดพัทลุงและ Kasalath ข้าวเชื่อมุ้มเมล็ดสีดำได้แก่ หอมนิล และกำหนดค่าค่า พบว่าทั้งเทคนิค semi-quantitative RT-PCR และ Real-time RT-PCR ในข้าวเชื่อมุ้มเมล็ดสีแดง มีการแสดงออกของยีนเกือบทุกยีนมากกว่าข้าวที่มีเชื่อมุ้มเมล็ดสีขาวและสีดำ ยกเว้นยีน *OsANS* ที่มีการแสดงออกในข้าวที่มีเชื่อมุ้มเมล็ดสีดำมากกว่าข้าวที่มีเชื่อมุ้มเมล็ดสีขาวและสีแดง (ภาพ 39) ในส่วนของเทคนิค Real-time RT PCR ยีน *Rc* และ *OsLAR* อยู่ในช่วง

ปรับสภาวะของปฏิกิริยาจึงยังไม่ได้ผลการทดลอง (ภาพ 40) จากงานวิจัยนี้พบว่าสอดคล้องกับการศึกษาของ Chen *et al.* (2014) ที่ศึกษาการแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิน โดยใช้ cDNA ที่สังเคราะห์จากเมล็ดอ่อนอายุต่างกัน พบว่าในข้าวเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดง มีการแสดงออกของยีน *OsCHS*, *OsCHI*, *OsDFR*, *OsLAR* มากกว่าข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีขาวและสีดำ ยกเว้นในยีน *OsANS* ที่มีการแสดงออกในข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีดำมากกว่าข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีขาวและแดง



ภาพ 39 ผลจากการทำ semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนควบคุมและยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานินในเมล็ดอ่อนของข้าวอายุ 5 วันหลังดอกบาน ช่องที่ 1-5 คือ ขาวดอกมะลิ 105 , สังข์หยดพัทลุง, Kasalath, หอมนิล และกำหนองเต้าดำตามลำดับ



ภาพ 40 ผลจากการทำ Real-time RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนควบคุมและยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินในเมล็ดอ่อนของข้าวอายุ 5 วันหลังดอกบาน

หมายเหตุ 105s คือ ข้าวดอกมะลิ 105, SYs คือ สังข์หยดพัทลุง, Kasas คือ Kasalath, HNs คือ หอมนิล, KNs คือ กำนองเต้าคำ

สรุปผลการวิจัย

การตรวจสอบยีน *Rc* จากจีโนมของข้าว 10 พันธุ์ด้วยเทคนิค PCR พบว่า ทั้งข้าวขาวแดง และดำ มียีน *Rc* อยู่ในจีโนมข้าวทุกพันธุ์ที่ตรวจสอบ จากนั้นตรวจสอบยีน *Rc* บางส่วนบริเวณเอกซอนที่ 7 จากจีโนมข้าว 6 พันธุ์ แล้วทำการเปรียบเทียบลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีน *Rc* พบว่า ข้าวดำ และข้าวขาว เกิดการขาดหายไป 14 คู่เบส ที่ตำแหน่ง 1408-1421 และเกิดการแทนที่จากเบส G เป็น A ที่ตำแหน่ง 1191 ส่งผลกระทบบั่วยีน *Rc* ในข้าวขาวและข้าวดำ เกิด frameshift ทำให้เกิด premature stop codon สายโพลีเพปไทด์จึงสั้นลง

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Rc* โดยเทคนิค RT-PCR ในเนื้อเยื่อใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าว 6 พันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์ Taichung65 ขาวดอกมะลิ 105 Kasalath หอมมะลิแดง หอมนิล และลิ้มพัว พบการแสดงออกของยีน *Rc* เฉพาะในเมล็ดอ่อนของข้าวที่ศึกษาเท่านั้น แสดงว่า ยีน *Rc* อาจมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสร้างโปรแอนโทไซยานิดินในเมล็ดข้าว

นอกจากนี้ เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Rc* ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ cDNA ที่สังเคราะห์จากเมล็ดอ่อนที่มีอายุต่างกัน ได้แก่ 5, 14 และ 25 วัน หลังดอกบาน พบว่า cDNA จากข้าว 4 พันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath หอมมะลิแดง สังข์หยดพัทลุง สุโขทัยหอมแดง จากเมล็ดอ่อนอายุ 5 วัน เท่านั้นที่มีการแสดงออกของยีน *Rc*

เมื่อทำการค้นหายีน *Rc* แบบ full-length ด้วยเทคนิค RT-PCR จากเมล็ดอ่อนของข้าวแดง 3 พันธุ์ ได้แก่ Kasalath สุโขทัยหอมแดง และหอมมะลิแดง มีแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 2,000 bp ดังนั้น จึงเชื่อมชิ้นยีน *Rc* เข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 และส่งถ่ายเข้าสู่ *E. coli* competent cells และคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดสายผสม

จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ coding region ของยีน *Rc* จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง สุโขทัยหอมแดง และ Kasalath ขนาดประมาณ 2,000 bp ที่โคลนได้เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Rc* จากข้าวสีแดงพันธุ์ Kasalath ในฐานข้อมูล GenBank (accession no. AB247503.1) พบว่า มีความเหมือนกับยีนในฐานข้อมูลถึง 99 เปอร์เซ็นต์ โดยพบการแทนที่เบส 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 64 (A->T) ในข้าวพันธุ์ Kasalath และหอมมะลิแดง ตำแหน่งที่ 96 (T->G)

ในข้าวทั้ง 3 พันธุ์ ตำแหน่งที่ 675 (A->G) ในข้าวพันธุ์สุโขทัยหอมแดง ตำแหน่งที่ 909 (C->A) ในข้าวทั้ง 3 พันธุ์ ตำแหน่งที่ 1735 (G->A) ในข้าวทั้ง 3 พันธุ์ นอกจากนี้ยังพบการขาดหายไป 6 bp ในข้าวพันธุ์ Kasalath และหอมมะลิแดง และขาดหายไป 9 bp ในข้าวพันธุ์สุโขทัยหอมแดง เมื่อพิจารณาลำดับเบสของยีน *Rc* จากข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดง 3 พันธุ์ ข้าวพันธุ์ Kasalath และหอมมะลิแดง มีลำดับเบสขนาด 2,016 bp ส่วนสุโขทัยหอมแดง มีลำดับเบสขนาด 2,013 bp

ในการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Rc* ที่โคลนได้เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนจากข้าวสีแดงพันธุ์ Kasalath ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่วิเคราะห์จากข้าวทั้ง 3 พันธุ์ คล้ายกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *Rc* จากข้าวสีแดงพันธุ์ Kasalath ในฐานข้อมูล (accession no. BAF42667) ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ มีเพียง 3 ตำแหน่ง ต่างกันในแต่ละพันธุ์ โดยในข้าวพันธุ์ Kasalath และหอมมะลิแดง ทำให้เกิดกรดอะมิโนเปลี่ยนจาก S เป็น C ที่ตำแหน่ง 22 นอกจากนี้ ที่ตำแหน่ง 579 มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก G เป็น S และพบว่าข้าวพันธุ์ Kasalath และหอมมะลิแดง ที่โคลนได้ ถึงแม้ว่าบริเวณตำแหน่ง 618 จะมีกรดอะมิโนหายไป 2 หน่วย และ สุโขทัยหอมแดงจะมีกรดอะมิโนหายไป 3 หน่วย แต่การขาดหายไป 2 และ 3 หน่วย ไม่ส่งผลกระทบต่อบริเวณ DNA binding domain ชนิด basic helix-loop-helix motif (bHLH) ของ Myc-type transcription factor

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *Rc* ซึ่งเป็นยีนควบคุมและยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิน พบว่าทั้งเทคนิค semi-quantitative RT-PCR และ Real-time RT-PCR ในข้าวเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดง มีการแสดงออกของยีนมากกว่าข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีขาวและสีดำ ในเกือบทุกยีน ยกเว้นยีน *OsANS* ที่มีการแสดงออกในข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีดำมากกว่าข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีขาวและสีแดง

ในขั้นตอนต่อไปจะสร้าง construct ซึ่งประกอบด้วยชุดของยีน *Rc* โดยให้ยีนทำงานภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ dual 35s และเทอร์มินเตอร์ *nos* โดยใช้ T-DNA vector คือ pCAMBIA 1305.1 สำหรับถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ข้าวพันธุ์ที่มีเมล็ดสีขาว เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนในการควบคุมการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานินในข้าว ทดสอบการใช้เป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการถ่ายยีนในข้าว และนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้นในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- กรมการข้าว. 2557. การผลิตและตลาดข้าวของโลก. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.ricethailand.go.th/home/index.php?option=com_content&view=article&id=34. (20 กันยายน 2557).
- นิรนาม. 2557. **Proanthocyanidin (โพรแอนโทไซยานิดิน)**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://http://beautyfacebesthealth.lnwshop.com/article/สาร-antioxidant-ที่ควรรู้จัก-proanthocyanidin-โพรแอนโทไซยานิดิน> (20 กันยายน 2557).
- นิรนาม. 2556. **ลักษณะที่สำคัญของข้าว**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://guru.sanook.com/484/>. (20 กันยายน 2557).
- ประพาส วิระแพทย์. 2529. **ความรู้เรื่องข้าว**. เล่มที่ 3. กรุงเทพฯ: ไทยวัฒนาพานิช. น. 115-123.
- มูลนิธิข้าวไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์. 2552. **จุดกำเนิดและประวัติข้าวไทย**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.thairice.org/html/aboutrice/about_rice1.htm. (20 กันยายน 2557)
- องค์ความรู้เรื่องข้าว. 2556. **สรีรวิทยาของข้าว**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.rakbankerd.com/agriculture/page.php?id=5220&s=tblrice>. (20 กันยายน 2557)
- Chen, X., T. Itani, X. Wu, Y. Chikawa and K. Irifune. 2013. Physiological factors affecting transcription of genes involved in the flavonoid biosynthetic pathway in different rice varieties. **Plant signaling & behavior**, 8(12), e27555.
- Escribano-Bailón, M. T., C. Santos-Buelga and J. C. Rivas-Gonzalo. 2004. Anthocyanins in cereals. **Journal of Chromatography A**, 1054(1), 129-141.
- Furukawa, T., M. Maekawa, T. Oki, I. Suda, S. Iida, H. Shimada, I. Takamure and K.i. Kadowaki. 2007. The Rc and Rd genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp. **The Plant Journal**, 49(1), 91-102.
- Ghasemzadeh, A. and N. Ghasemzadeh. 2011. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. **Journal of medicinal plants research**, 5(31), 6697-6703.
- Gu, X. Y., M. E. Foley, D. P. Horvath, J. V. Anderson, J. Feng, L. Zhang, C R. Mowry, H. Ye, J. C. Suttle, K-i Kadowaki and Z. Chen. 2011. Association between seed dormancy and pericarp

- color is controlled by a pleiotropic gene that regulates abscisic acid and flavonoid synthesis in weedy red rice. **Genetics**, 189(4), 1515-1524.
- Hubpages. 2015. **Facts about the Rice Plant**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://hubpages.com/education/All-About-Rice>. (20 กันยายน 2557)
- Lim, S. H., and S. H. Ha. 2013. Marker development for the identification of rice seed color. **Plant Biotechnology Reports**, 7(3), 391-398.
- Nagao, S. and M. Takahashi. 1947. Ein Beitrag zu einer genotypischen Analyse der Farbeigenschaften der Spelze und der anderen Pflanzenteile bei der Reis pflanze. **Jap. J. Genet.(Supp. 1)**, 1-27.
- Nagao, S. and M.-e. Takahashi. 1963. Trial Construction of Twelve Linkage Groups in Japanese Rice:(Genetical Studies on Rice Plant, XXVII). **Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University** 53(1): 72-130.
- Nagao, S., M.-e. Takahashi and T. Miyamoto. 1957. Genetical studies on rice plant, XXI. **Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University** 32(4): 124-128.
- Prathepha P. 2009. Pericarp Color and Haplotype Diversity in Weedy Rice (*O. sativa* f. spontanea) from Thailand. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. 12(15):1075.
- Sabarudin Sahari. 2013. **MENCARI KEBAHAGIAAN**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://dharma kesuma.blogspot.com/2013/12/ada-apa-pada-bran-beras.html>. (13 ตุลาคม 2555)
- Saitoh, K., K. Onishi, I. Mikami, K. Thidar and Y. Sano. 2004. Allelic diversification at the C (*OsCI*) Locus of wild and cultivated rice nucleotide changes associated with phenotypes. **Genetics** 168(2): 997-1007.
- Sakamoto, W., T. Ohmori, K. Kageyama, C. Miyazaki, A. Saito, M. Murata, K. Noda and M. Maekawa. 2001. The Purple leaf (Pl) locus of rice: The Plw allele has a complex organization and includes two genes encoding basic helix-loop-helix proteins involved in anthocyanin biosynthesis. **Plant and Cell Physiology**, 42(9), 982-991.
- Samanta, A., G. Das and S.K. Das. 2011. Roles of flavonoids in plants. **International Journal of Pharmacy and Technology** 6(1): 12-35.

- Shih, C. H., H. Chu, L. K. Tang, W. Sakamoto, M. Maekawa, I. K. Chu, M. Wang and C. Lo. 2008. Functional characterization of key structural genes in rice flavonoid biosynthesis. **Planta** 228(6): 1043-1054.
- Sweeney, M.T., M.J. Thomson, B.E. Pfeil and S. McCouch. 2007. Caught red-handed: *Rc* encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice. **The Plant Cell** 18(2): 283-294.
- Oki, T., M. Masuda, M. Kobayashi, Y. Nishiba, S. Furuta, I. Suda, and Sato, T. 2002. Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(26), 7524-7529.



การขาดหายของนิวคลีโอไทด์ 14 คู่เบสในยีน *Rc* ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบเฟรมชิฟท์ในข้าวขาวและดำ

The 14-bp Deletion in *Rc* Gene Causes a Frameshift Mutation in Black and White Rice

รอยพิมพ์ สุขเกษม¹ แสงทอง พงษ์เจริญกิจ¹ ศรีเมฆ ขาวโพงพาง² วราภรณ์ แสงทอง¹ ยุกเพียว คบพิมาย¹ และ ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์^{1*}

Roypim SUKKASEM¹, Saengtong PONGJAROENKIT¹, Srimek CHOWPONGPANG², Varaporn SANGTONG¹, Yuppayao KOPHIMAI¹ and Chotipa SAKULSINGHAROJ^{1*}

¹สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

²ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

¹Program in Genetics, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand; ²Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding author; e-mail: chotipa.cs@gmail.com, chotipas@mju.ac.th

บทคัดย่อ โปรแอนโทไซยานิดินเป็นรงควัตถุในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ข้าวเมล็ดสีแดงและน้ำตาลมีโปรแอนโทไซยานิดินในปริมาณสูงสะสมอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดชั้นนอก (pericarp) ในข้าวยีน *Rc* เป็นยีนควบคุมที่เป็นรหัสของโปรตีนทรานสคริปชัน แฟกเตอร์ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในวิถีการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดิน ทำให้เมล็ดข้าวเกิดสีน้ำตาลและสีแดง ดังนั้นยีน *Rc* จึงมีความสำคัญมากในการทำให้เกิดสีในเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *Rc* ในข้าวไทยทั้งข้าวขาว แดงและดำทั้งหมด 9 สายพันธุ์ พบว่ายีน *Rc* มีการแสดงออกเฉพาะในเมล็ดข้าวทั้งในข้าวขาว ข้าวแดงและข้าวดำ ไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในเนื้อเยื่อใบ และจากการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Rc* บริเวณ Exon ที่ 7 ในข้าวพันธุ์ลิ้มผั่ว ซึ่งเป็นข้าวเมล็ดสีดำ กับยีน *Rc* ของข้าวพันธุ์อื่น ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับข้าวขาวถึง 100% ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *Rc* จากข้าวขาว แดง และดำ พบว่ายีน *Rc* ในข้าวขาวและข้าวดำ เกิดการขาดหายไป 14 คู่เบส ในบริเวณ Exon ที่ 7 ทำให้เกิดรหัสหยุดก่อนกำหนดซึ่งมีผลต่อบริเวณ DNA-binding domain ที่เป็น basic helix-loop-helix (bHLH) ของ transcription factor ทำให้ยีน *Rc* ทำหน้าที่ไม่ได้ในข้าวขาวและข้าวดำ ในขณะที่ยีน *Rc* สามารถทำงานได้ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงเท่านั้น ผลจากการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อคัดเลือกข้าวได้ตั้งแต่ยังไม่ออกดอกติดเมล็ด

ABSTRACT Proanthocyanidins are flavonoid pigments. They are accumulated in pericarp of red and brown rice grains. *Rc* gene encodes a transcription factor that regulates expression of structural genes in proanthocyanidin biosynthesis pathway in rice. Therefore, the aim of this study was to characterize the function of *Rc* gene in proanthocyanidin biosynthesis. Initially, expression of *Rc* in various rice tissues was determined in white, red and black rice varieties (nine varieties). It was found that *Rc* gene was expressed in seeds of all rice grains but not in leaves. The correspondence of *Rc* sequence from Lerm Poa (black rice) and the sequences

of six rice varieties in GenBank was determined. This showed that 100% nucleotide identity was observed between sequences of black and white rice. Moreover, the sequences of black rice, including Lerm Poa, and white rice showed 14-bp deletion in 7th exon comparing with red rice. The 14-bp deletion, which should cause frameshift of the open reading frame, affected the DNA-binding domain of the basic helix-loop-helix (bHLH) of transcription factor. As consequence, *Rc* gene in white and black rice may lose its function. The result from this study may reveal understanding in proanthocyanidin biosynthesis pathway and provides a marker gene for the improvement of rice varieties through molecular breeding and genetic engineering in the future.

คำสำคัญ: ยีน *Rc* ข้าว โปรแอนโทไซยานิดิน

Keywords: *Rc* gene, rice, proanthocyanidin

บทนำ

สีในส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าวเกิดจากการสะสมรงควัตถุ [1] โดยข้าวเมล็ดสีแดง และน้ำตาลเกิดจากการสะสมรงควัตถุโปรแอนโทไซยานิดินที่เยื่อหุ้มเมล็ด รงควัตถุเหล่านี้เป็น secondary metabolites ที่อยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ที่สามารถละลายน้ำได้ [2] มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ช่วยชะลอความเสื่อมของเซลล์ ช่วยลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและเส้นเลือดอุดตันในสมอง ด้วยการยับยั้งไม่ให้เลือดจับตัวเป็นก้อน ชะลอความเสื่อมของดวงตา ช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค [3]

การสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และโปรแอนโทไซยานิดินใช้สารตั้งต้นในการสังเคราะห์หรือใช้ pathway ร่วมกัน แต่การสังเคราะห์แอนโทไซยานินใช้ leucoanthocyanidin เป็นสารตั้งต้นและถูกเร่งปฏิกิริยาด้วย anthocyanidin synthase (ANS) หลังจากนั้นแอนโทไซยานินที่ถูกผลิตขึ้นจะถูกขนส่งเข้าสู่แวคิโอล หลังกระบวนการ modification ได้แก่ glycosylation, methylation และ malonylation ส่วนการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินใช้ leucoanthocyanidin เป็นสารตั้งต้นเช่นเดียวกัน แต่ถูกเร่งปฏิกิริยาโดย leucoanthocyanidin reductase (LAR) และ anthocyanidin reductase (ANR) เพื่อสร้าง catechin ที่เป็นสารตั้งต้นของโปรแอนโทไซยานิดินซึ่งโปรแอนโทไซยานิดินจะถูกขนส่งไปยังแวคิโอลเช่นกัน [2]

การสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินเกี่ยวข้องกับยีน 2 กลุ่ม คือ ยีนควบคุม และยีนโครงสร้าง ยีนควบคุมที่สำคัญเป็นรหัสของ transcription factor คือ ยีน *Rc* ซึ่งอยู่ในกลุ่มของยีน *R/B* ประกอบด้วย 8 Exon โดย Exon ที่ 8 กำหนดรหัสของโปรตีนบริเวณ basic helix-loop-helix (bHLH) โปรตีนที่สังเคราะห์ได้จากยีน *Rc* เป็น transcription factor ที่อยู่ในกลุ่ม MYC-like protein พบทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ [4] มีหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสของยีนโครงสร้างซึ่งจะถูกแปลรหัสให้เป็นเอนไซม์ นอกจากนี้ยีน *Rc* ยังควบคุมให้เกิดการสะสมของรงควัตถุในเยื่อหุ้มเมล็ดชั้นนอก (pericarp) ของเมล็ดข้าวสีแดงและน้ำตาล ยีน *Rc* ในข้าวขาวและข้าวดำ เกิดการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์จำนวน 14 คู่เบส (14-bp deletion) ทำให้เกิดรหัสหยุดก่อนกำหนดทำให้โปรตีนสายสั้นลงและไม่สามารถทำงานได้ [2], [5], [6], [7], [8]

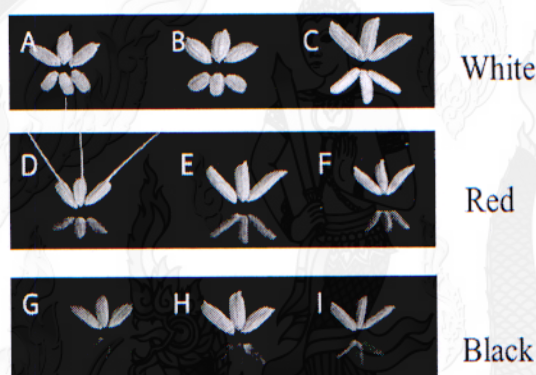
ในปัจจุบันประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตข้าวขนาดใหญ่และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว โดยทั่วไปข้าวที่นิยมปลูกและรับประทานมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว แต่มีข้าวบางชนิดที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ แดงและน้ำตาลซึ่งเป็นรงควัตถุที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้เยื่อหุ้มเมล็ดมีสี จำเป็นต้องเข้าใจกลไกการสังเคราะห์รงควัตถุในเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ศึกษาโครงสร้างและการแสดงออกของยีน

Rc ที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินในข้าว ซึ่งอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกข้าวที่เยื่อหุ้มเมล็ดมีสีได้

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

การสกัดอาร์เอ็นเอจากใบและเมล็ดข้าว

สกัดอาร์เอ็นเอจากใบอ่อนอายุ 2 สัปดาห์ และเมล็ดข้าวระยะน้ำนมอายุ 14 วัน หลังดอกบาน ของข้าว 9 สายพันธุ์ ประกอบด้วย ข้าวขาว ได้แก่ Nipponbare Sasanishiki และ กข 6 ข้าวแดง ได้แก่ Kasalath หอมมะลิแดง และ สังข์หยด และ ข้าวดำ ได้แก่ หอมนิล สีม่วง (ได้จากการเก็บรวบรวมพันธุ์จากมหาวิทยาลัยแม่โจ้ (MJU)) และ ก่ำพะเยา (รูปที่ 1) โดยใช้ไนโตรเจนเหลวและสกัดตามวิธี TRIzol reagent (Invitrogen, USA) จากนั้นกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนโดยเติมเอนไซม์ DNase (New England Biolab, USA)



รูปที่ 1 ลักษณะฟีโนไทป์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าว 9 สายพันธุ์ โดย ข้าวขาว ได้แก่ (A) Nipponbare (B) Sasanishiki (C) กข 6 ข้าวแดง ได้แก่ (D) Kasalath (E) หอมมะลิแดง (F) สังข์หยด และข้าวดำ ได้แก่ (G) หอมนิล (H) สีม่วง และ (I) ก่ำพะเยา

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Rc* โดยใช้เทคนิค RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้และผ่านการกำจัดดีเอ็นเอแล้วมาสังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription (RT) โดยใช้ oligo (dT) ตามขั้นตอนของชุดสำเร็จรูป Superscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA) นำ cDNA ที่เตรียมจากข้าวพันธุ์ต่างๆ มาเป็นแม่พิมพ์ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Rc* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ Red dye PCR Master Mix (Merch, USA) ไพรมเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *Rc* คือ OsRc1049_F: GCCTTGCTCACTCTTGGCATT, OsRc1450_R: GGTTGGCACTGAAATCACCT [8] สภาวะปฏิกิริยาคือ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วย 35 รอบ ของ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 60 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที แล้วทำปฏิกิริยาสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที [9] จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แลบบอริเอตของยีน *Rc* บริเวณ Exon ที่ 7 ที่คาดหวังมีขนาดประมาณ 400 bp

การแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจล

แยกแถบดีเอ็นเอของยีน *Rc* บริเวณ Exon ที่ 7 ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR บนเจลอะกาโรส ตัดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดตามที่คาดห้วงมาแยกบริสุทธิ์ โดยการหลอมเจลและแยกดีเอ็นเอจากเจลตามวิธีของ NucleoSpin Extraction Kit (Macherey-Nagel, Germany)

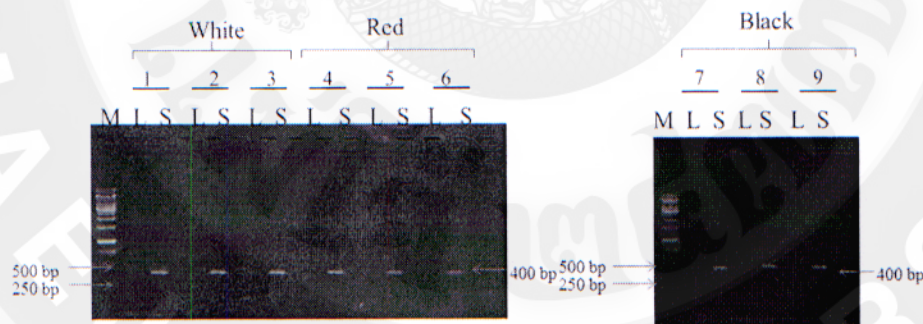
การวิเคราะห์และการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Rc*

นำยีน *Rc* บริเวณ Exon ที่ 7 ที่ได้จาก RT-PCR แล้วแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจลส่งวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท 1st BASE (Malaysia) จากนั้นเปรียบเทียบลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีน *Rc* ที่ได้จากข้าวไทยกับข้าวที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม ClustalX 1.83 และ GeneDoc เพื่อศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสและโครงสร้างของยีนในข้าวขาว ข้าวแดง และข้าวดำ

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Rc*

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Rc* ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *Rc* ในเนื้อเยื่อที่ต่างกันของข้าว 9 สายพันธุ์ ประกอบด้วย ข้าวขาว ได้แก่ Nipponbare Sasanishiki และ กข 6 ข้าวแดง ได้แก่ Kasalath หอมมะลิแดง และ สังข์หยด และ ข้าวดำ ได้แก่ หอมนิล ลิ้มผั่ว และ กำพะเยา โดยใช้ cDNA จากเมล็ดอ่อนอายุ 14 วัน หลังดอกบาน และใบอ่อนอายุ 2 สัปดาห์ เป็นแม่พิมพ์ พบว่า เมื่อใช้ cDNA จากเมล็ดอ่อนเป็นแม่พิมพ์ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 bp ในขณะที่ใช้ cDNA จากใบอ่อนเป็นแม่พิมพ์ไม่พบการแสดงออกของยีน *Rc* (รูปที่ 2) แสดงว่ายีน *Rc* มีการแสดงออกที่เมล็ดข้าวเท่านั้น โดยพบการแสดงออกทั้งข้าวขาว แดง และดำ ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Sweeney et al. [8] ที่พบการแสดงออกของยีน *Rc* ที่เมล็ดในข้าวสายพันธุ์ *Oryza rufipogon* (เยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง) และ *O. sativa* cv Jefferson (เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว) และไม่พบการแสดงออกของยีน *Rc* ในใบ



รูปที่ 2 ผล RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *Rc* และใช้ cDNA จากเมล็ดอ่อน (S) และใบอ่อน (L) เป็นแม่พิมพ์ โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder

- | | | |
|--------------------------|---------------------------|------------------------|
| ช่องที่ 1 คือ Nipponbare | ช่องที่ 2 คือ Sasanishiki | ช่องที่ 3 คือ กข 6 |
| ช่องที่ 4 คือ Kasalath | ช่องที่ 5 คือ หอมมะลิแดง | ช่องที่ 6 คือ สังข์หยด |
| ช่องที่ 7 คือ กำพะเยา | ช่องที่ 8 คือ ลิ้มผั่ว | ช่องที่ 9 คือ หอมนิล |

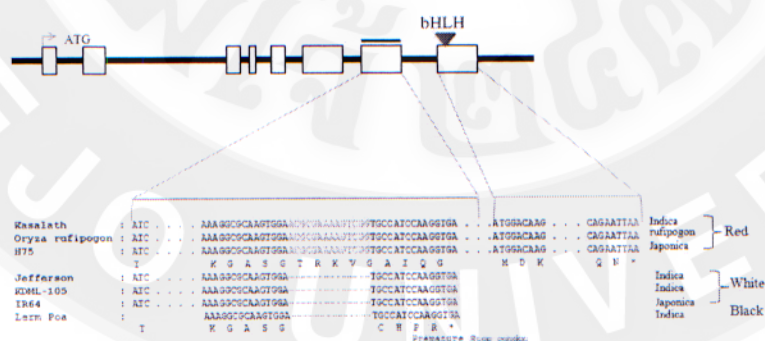
การวิเคราะห์และการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Rc* ในข้าวไทยกับข้าวในฐานข้อมูล GenBank

เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *Rc* บริเวณ Exon ที่ 7 ที่ได้จาก cDNA ของเมล็ดข้าวสายพันธุ์ลิ้มผั่ว เทียบกับลำดับเบสในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีรายงานมาก่อนในฐานข้อมูล GenBank พบว่ายีน *Rc* บริเวณ Exon ที่ 7 จากข้าวพันธุ์ลิ้มผั่ว มีลำดับเบสเหมือนกับยีนจากข้าวขาว (JF303060.1) ถึง 100%

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสระหว่าง subspecies โดยข้าวสายพันธุ์ลิ้มผั่ว มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำซึ่งเป็น *Indica* พบว่า ไม่มีความแตกต่างกับลำดับเบสในข้าวขาวทั้ง *Indica* (DQ885813, GU261561) และ *Japonica* (DQ204736) แต่ลำดับเบสของข้าวสายพันธุ์ลิ้มผั่ว เกิดการขาดหายไป 14 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวแดง Kasalath ซึ่งเป็น *Indica* (AB250059) และ *Japonica* (DQ204735) และข้าวป่า *O. rufipogon* (JF303058) (รูปที่ 3)

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของยีน *Rc* บริเวณ Exon ที่ 7 ของข้าวสายพันธุ์ลิ้มผั่ว มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำซึ่งเป็น *Indica* เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *Rc* ในข้าวขาวทั้ง *Indica* และ *Japonica* ใน GenBank (ADI59464) 100% แต่ข้าวสายพันธุ์ลิ้มผั่วเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวแดง *Indica* และ *Japonica* ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเกิด Frameshift ทำให้เกิด premature stop codon สายโพลิเพปไทด์จึงสั้นลง

จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสและกรดอะมิโน แสดงว่ายีน *Rc* บริเวณ Exon ที่ 7 ในข้าวขาวและข้าวดำ เกิดการขาดหายไปของลำดับเบสจำนวน 14 คู่เบส ทำให้เกิด Frameshift และเกิด premature stop codon ทำให้สายโพลิเพปไทด์สั้นลง ดังนั้นข้าวขาวและข้าวดำจึงไม่มี bHLH domain ซึ่งอยู่ที่ Exon ที่ 8 ส่งผลให้ยีน *Rc* ทำงานไม่ได้ในข้าวขาวและดำ (รูปที่ 3) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Lim and Ha [3] ซึ่งการขาดหายไปของลำดับเบสจำนวน 14 คู่เบส ทำให้เกิด Frameshift และเกิด premature stop codon ในข้าวขาวและข้าวดำ นอกจากนี้การศึกษาของ Furukawa et al. [2] ที่ศึกษาลำดับเบสของ cDNA ของยีน *Rc* ในข้าวพันธุ์ Nipponbare ซึ่งเป็นข้าวขาว พบ 14-bp deletion ทำให้เกิด Frameshift และเกิด premature stop codon ในขณะที่ไม่พบการเกิด premature stop codon ในข้าวเมล็ดแดงและน้ำตาล ในข้าวดำพบว่ายีน *Rc* ไม่สามารถทำงานได้ แต่การเกิดสีดำในเมล็ดข้าวเกิดจากการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ซึ่งถูกควบคุมด้วย ยีนควบคุม 2 กลุ่ม คือ *R/B* และ *C1/Pl* gene families ยีนในกลุ่มของ *R/B* gene family เช่น *OsB1* และ *OsB2* เป็นรหัสของ basic helix-loop-helix (bHLH) myc-type protein ส่วนยีนในกลุ่มของ *C1/Pl* gene family เช่น *OsC1* เป็นรหัสของ myb-related regulatory protein [3]



รูปที่ 3 ผลเปรียบเทียบลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของ Exon ที่ 7 ของยีน *Rc* ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง ข้าว และดำ จำนวน 7 สายพันธุ์ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง ได้แก่ Kasalath, *Oryza rufipogon* และ H75 ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ได้แก่ Jefferson, KMDL-105 และ IR64 ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ ได้แก่ Lerm Poa

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *Rc* ในเนื้อเยื่อที่ต่างกันของข้าว 9 สายพันธุ์ ประกอบด้วย ข้าวขาว ได้แก่ Nipponbare Sasanishiki และ กข6 ข้าวแดง ได้แก่ Kasalath หอมมะลิแดง และ สังข์หยด และ ข้าวดำ ได้แก่ หอมนิล ลิ้มผิว และ กำพะเยา พบว่า ไม่พบการแสดงออกของยีน *Rc* ในใบอ่อน แต่พบการแสดงออกที่เมล็ดข้าวเท่านั้น และจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Rc* บริเวณ Exon ที่ 7 พบว่าข้าวดำสายพันธุ์ลิ้มผิว เกิดการขาดหายไป 14 คู่เบส ซึ่งเหมือนกับที่พบในข้าวขาวทั้ง *Indica* และ *Japonica* ทำให้เกิด Frameshift และเกิด premature stop codon ทำให้สายโพลีเปปไทด์สั้นลง ส่งผลให้ยีน *Rc* ไม่สามารถทำงานได้ในข้าวขาวและข้าวดำ ในขณะที่ยีน *Rc* สามารถทำงานได้ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงเท่านั้น ดังนั้น ยีน *Rc* น่าจะมีบทบาทที่สำคัญในการควบคุมการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานินในเยื่อหุ้มเมล็ด งานวิจัยต่อไปจะศึกษาการโคลนยีน *Rc* full-length coding sequence และศึกษาโครงสร้างหน้าที่ของยีน เพื่อให้เข้าใจกลไกการควบคุมการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานินในข้าวซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ และจากผลการทดลองจะทำให้เพิ่มความเข้าใจความแตกต่างของสีเยื่อหุ้มเมล็ดและลำดับเบสของยีน *Rc* ในข้าวไทย ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง สีขาว และ สีดำ หรือข้าวป่าและข้าวปลูกได้และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้โดยใช้เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อคัดเลือกข้าวได้ตั้งแต่ยังไม่ออกดอกติดเมล็ด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประเภทบัณฑิตศึกษา ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนการศึกษาแก่นางสาวรอยพิมพ์ สุขเกษม

เอกสารอ้างอิง

- [1] Oki T, Masuda M, Kobayashi M, Nishiba Y, Furuta S, Suda I, et al. Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(26):7524-9.
- [2] Furukawa T, Maekawa M, Oki T, Suda I, Iida S, Shimada H, et al. The *Rc* and *Rd* genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp. *The Plant Journal*. 2007;49(1):91-102.
- [3] Lim S-H, Ha S-H. Marker development for the identification of rice seed color. *Plant biotechnology reports*. 2013;7(3):391-8.
- [4] Ramsay NA, Walker AR, Mooney M, Gray JC. Two basic-helix-loop-helix genes (*MYC-146* and *GL3*) from *Arabidopsis* can activate anthocyanin biosynthesis in a white-flowered *Matthiola incana* mutant. *Plant molecular biology*. 2003;52(3):679-88.
- [5] Nagao S, Takahashi M-e. Trial Construction of Twelve Linkage Groups in Japanese Rice:(Genetical Studies on Rice Plant, XXVII). *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University*. 1963;53(1):72-130.
- [6] Saitoh K, Onishi K, Mikami I, Thidar K, Sano Y. Allelic diversification at the *C* (*OsC1*) Locus of wild and cultivated rice nucleotide changes associated with phenotypes. *Genetics*. 2004;168(2):997-1007.

- [7] Sakamoto W, Ohmori T, Kageyama K, Miyazaki C, Saito A, Murata M, et al. The Purple leaf (*Pl*) locus of rice: The *Pl^w* allele has a complex organization and includes two genes encoding basic helix-loop-helix proteins involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*. 2001;42(9):982-91.
- [8] Sweeney MT, Thomson MJ, Pfeil BE, McCouch S. Caught red-handed: *Rc* encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice. *The Plant Cell Online*. 2006;18(2):283-94.
- [9] Prathepha P. Pericarp Color and Haplotype Diversity in Weedy Rice (*O. sativa* f. *spontanea*) from Thailand. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2009;12(15):1075.

การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีน *OsDFR* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานินในข้าวดำพันธุ์ลิ้มผั่ว

Cloning and Characterization of *OsDFR* Gene Involved in Anthocyanin and Proanthocyanidin Biosynthesis in Thai Black Rice Lerm Pao

กนกภรณ์ คำโมนะ¹, รอยพิมพ์ สุขเกษม¹, แสงทอง พงษ์เจริญกิต¹, ศรีเมฆ ขาวโพงพาง², วรารักษ์ แสงทอง¹ และ ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์^{1*}
 Kanogporn KHAMMONA¹, Roypim SUKKASAM¹, Saengtong PONGJAROENKIT¹, Srimek CHOWPONGPANG², Varaporn SANGTONG¹ and Chotipa SAKULSINGHAROJ^{1*}

¹สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

²ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

¹Program in Genetics, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290 Thailand; ²Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900 Thailand

*Corresponding author; e-mails: chotipa.cs@gmail.com, chotipas@mju.ac.th

บทคัดย่อ ยีน *OsDFR* เป็นรหัสของยีนโครงสร้างในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิน ตั้งอยู่บนโครโมโซม 1 ที่ตำแหน่ง *Rd* ในข้าว ซึ่งทำหน้าที่ส่งเสริมการแสดงออกของสีเยื่อหุ้มเมล็ด งานวิจัยนี้ได้ค้นหายีน *OsDFR* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ coding sequence (cds) ของยีน *OsDFR* และใช้ cDNA ที่สังเคราะห์มาจาก mRNA ที่สกัดจากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ลิ้มผั่ว ซึ่งเป็นข้าวเมล็ดสีดำ พบว่ายีน *OsDFR* มี open reading frame (ORF) ขนาด 1,119 คู่เบส ซึ่งมีความเหมือนกับยีน *OsDFR* ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (Y07956) ถึง 99% ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของ ORF ขนาด 1,119 คู่เบส พบว่า ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 372 หน่วย ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *OsDFR* ในฐานข้อมูล GenBank (CAA69253) ถึง 97% แต่ยีน *OsDFR* จากข้าวสีมีความแตกต่างจากข้าวขาวที่เบส 164 ในเอกซอนที่ 2 โดยพบว่าในข้าวสีจะพบเป็นเบส C แต่เฉพาะข้าวขาวเท่านั้นที่มีการเปลี่ยนไปเป็น A ทำให้เกิด premature stop codon ในข้าวขาว ในงานวิจัยต่อไปจะทำการศึกษาลำดับของยีนที่โคลนได้ เพื่อให้เข้าใจการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานินในข้าว

ABSTRACT *OsDFR* gene encodes structural gene involved with anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in rice. In this study, the complete coding sequences (cds) of *OsDFR* genes were isolated from young leaves of rice by RT-PCR. Nucleotide sequencing analysis revealed black rice variety, Lerm Pao, had a single open reading frame (ORF) of 1,119 bp which were 99% identical to *OsDFR* gene reported in GenBank (Y07956). The deduced amino acid sequences of the 1,119 bp ORF consisted of 372 amino acid residues which showed 97% similarity to that of *OsDFR* (CAA69253). The results found that the *OsDFR* gene sequence displayed a single nucleotide substitution (C→A) within the 2nd exon to form

a premature stop codon in white rice comparing to all the pigmented rice varieties. The cloned *OsDFR* genes will be further analyzed for structure and gene function to understand anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in colored rice.

คำสำคัญ : ยีน *OsDFR* (dihydroflavonol 4-reductase) ข้าว (*Oryza sativa* L.) แอนโทไซยานิน โปรแอนโทไซยานิดิน

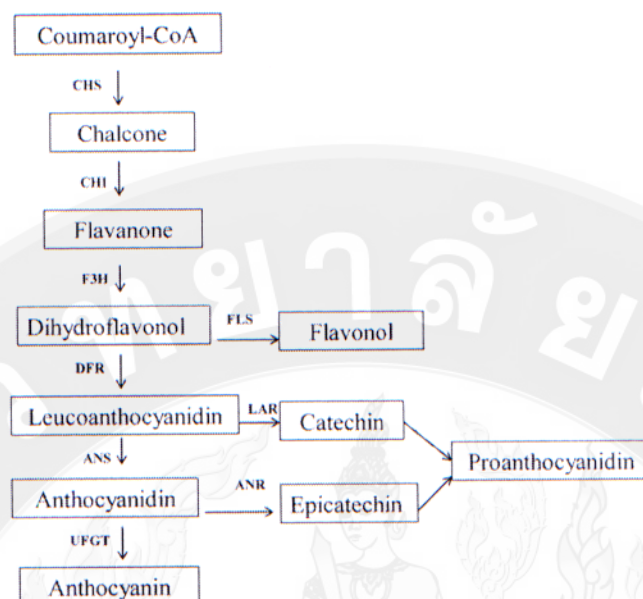
Keywords: *OsDFR* gene, rice, anthocyanin, proanthocyanidin

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นธัญพืชที่บริโภคเป็นอาหารหลักในทวีปเอเชีย ซึ่งมีการปลูกมากที่สุดเป็นอันดับสองของโลกรองจากข้าวโพด [8] โดยทั่วไปจะจำแนกข้าวตามสีเยื่อหุ้มเมล็ดคือสีแดง ดำ และขาว เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าข้าวสีดำและสีแดงประกอบไปด้วยสารแอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดิน ซึ่งสารทั้งสองตัวนี้อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยสารโปรแอนโทไซยานิดิน มีบทบาทเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพการทำงานดีกว่าวิตามินซี วิตามินอี และเบต้าแคโรทีน ในขณะที่สารแอนโทไซยานิน เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ทำงานได้ดีกว่าวิตามินอีถึง 5 เท่า เมื่อร่างกายได้รับสารนี้เพียงพอที่จะไปทำหน้าที่จับกับอนุมูลอิสระ (free radical) ที่ไปรบกวนระบบการทำงานของเซลล์ในร่างกาย [9]

สารฟลาโวนอยด์ได้รับการรายงานไว้ว่ามีมากกว่า 1,000 ชนิด อยู่ในกลุ่มขนาดใหญ่ของ secondary metabolic compounds [1] และ ผลิตภัณฑ์หลักของวิถีการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ ได้แก่ สารแอนโทไซยานิน และโปรแอนโทไซยานิดิน ซึ่งจะมีขั้นตอนการสังเคราะห์สารในช่วงต้นและกลางของวิถีการสังเคราะห์เหมือนกันแต่จะเกิดจุดแยกหลังจากขั้นตอนการสังเคราะห์ที่เร่งโดยเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) ซึ่งสารโปรแอนโทไซยานิดินจะถูกสังเคราะห์โดยสองวิถีหลักคือวิถีแรกผ่านการเร่งปฏิกิริยาโดย leucoanthocyanidin reductase (LAR) และวิถีที่สองเร่งปฏิกิริยาโดย anthocyanidin synthase (ANS) และ anthocyanidin reductase (ANR) ในขณะที่แอนโทไซยานินจะถูกสังเคราะห์โดยการเร่งปฏิกิริยาของ anthocyanidin synthase (ANS) และ UFGT ดังแสดงใน รูปที่ 1 [2], [3], [4]

ยีน dihydroflavonol 4-reductase (DFR) ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 ของข้าว ซึ่งเป็นรหัสของยีนโครงสร้างที่ตำแหน่ง *Rd* จากการศึกษาของ Furukawa et al. [5] พบว่าในข้าวสีแดงที่มีการสะสมของสารโปรแอนโทไซยานิดินเกิดจากการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในตำแหน่ง *Rd* ที่ทำหน้าที่ในการส่งเสริมการแสดงออกของข้าวสีแดงร่วมกับการแสดงออกของยีน *Rc* ทำหน้าที่เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ ซึ่งอยู่ในกลุ่มของโปรตีน basic helix-loop-helix (bHLH) [5], [6] การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหายีนและโคลนยีน *OsDFR* ในข้าวไทยเพื่อศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีน



รูปที่ 1 วิธีการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ประกอบไปด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ ดังนี้ chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI), flavanone 3 hydroxylase (F3H), dihydroflavonol 4-reductase (DFR), leucoanthocyanidin reductase (LAR), anthocyanidin reductase (ANR), anthocyanidin synthase (ANS), flavonol synthase (FLS) และ UDP-glucose flavonoid 3-o-glucosyl transferase (UFGT) [2]

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

การสกัดอาร์เอ็นเอจากใบข้าว

สกัดอาร์เอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวสีดำพันธุ์ลิ้มผิวที่ได้จากการเก็บรวบรวมพันธุ์จากมหาวิทยาลัยแม่โจ้ (MJU) อายุ 4 สัปดาห์ โดยใช้ไนโตรเจนเหลวและสกัดตามวิธี TRIzol reagent (Invitrogen, USA) จากนั้นกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนโดยเติมเอนไซม์ DNase (New England Biolabs, UK)

การค้นหายีนโดยเทคนิค RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้และผ่านการกำจัดดีเอ็นเอ มาสังเคราะห์ cDNA โดยปฏิกิริยา reverse transcription (RT) โดยใช้ oligo(dT) ทำตามขั้นตอนของชุดสำเร็จรูป Superscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA) นำ cDNA ที่เตรียมจากข้าวพันธุ์ลิ้มผิว มาเป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ GeneAmp™ Red dye PCR Master Mix (Merck, USA) โพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* มีลำดับเบสของโพรเมอร์ดังนี้ *OsDFR*cds-38_F: 5' GAATCCAACACAAGCAGATC3' และ *OsDFR*cds+25_R: 5' GTTCTCTGGACTCACTAGTC 3' โดยทำปฏิกิริยาทั้งหมดจำนวน 35 รอบ กำหนดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิแต่ละขั้นตอนดังนี้ เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นตามด้วยการทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลา denaturation 95°C เป็นเวลา 1 นาที annealing 52 °C เป็นเวลา 1 นาที extension 72 °C เป็นเวลา 1.30 นาที ตามด้วย final extension 72 °C เป็นเวลา 7 นาที เก็บตัวอย่างไว้ที่ -20°C จนกว่า จะนำไปวิเคราะห์ผลขั้นต่อไป

การแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจล

แยกแถบดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR บนเจลอะกาโรส ตัดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดตามที่คาดหวังมาแยกบริสุทธิ์ ลอสมเจลและแยกดีเอ็นเอจากเจลด้วยวิธี Nucleospin Extraction Kit (Macherey-Nagel, Germany) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่แยกบริสุทธิ์ไปโคลนเข้าเวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, USA)

การโคลนยีนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM-T Easy

เตรียม competent cells ของแบคทีเรีย *E. coli* ด้วยวิธีใช้สารเคมี CaCl_2 นำยีน *OsDFR* ที่แยกบริสุทธิ์มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy และถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cells จากนั้นนำเข้ามา spread บนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลลิน IPTG และ X-Gal บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำคืนคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยสีของโคโลนี และคัดเลือกโคโลนีสีขาวมาตรวจสอบพลาสมิทสายผสมตามขนาดหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วส่งพลาสมิทสายผสมไปวิเคราะห์ลำดับเบส

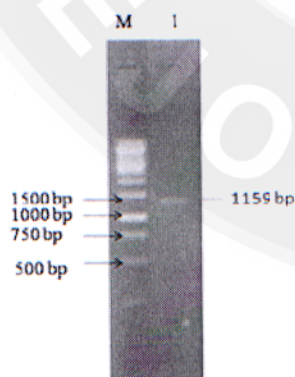
การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน

ส่งพลาสมิทสายผสมไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่ บริษัท 1st Base DNA Sequencing (Malaysia) นำลำดับเบสของยีน *OsDFR* ที่ได้จาก cDNA ของข้าวพันธุ์ลิ้มผั่ว มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน *OsDFR* ที่มีรายงานมาก่อนในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม ClustalX version 1.83 และ GeneDoc

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

การค้นหาลำดับและโคลนยีน *OsDFR* บริเวณ coding sequence ด้วยเทคนิค RT-PCR

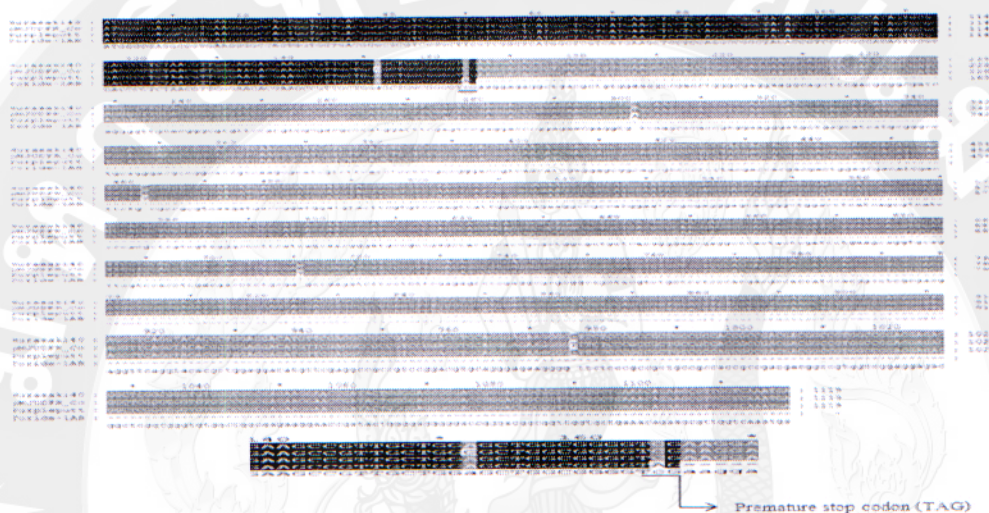
จากการค้นหายีน *OsDFR* ที่เป็นบริเวณ complete coding sequence (cds) โดยใช้ cDNA จากใบเป็นแม่พิมพ์ ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,159 คู่เบสตามที่คาดหวัง ในข้าวสายพันธุ์ลิ้มผั่ว ซึ่งเป็นข้าวสีดำ (Figure 2) แสดงว่าในข้าวพันธุ์ลิ้มผั่ว มีการแสดงออกของยีน *OsDFR* ตรงกับในงานวิจัยของ Chen et al. [2] ที่พบว่าการแสดงออกของยีน *OsDFR* สูงในเมล็ดข้าวสีแดงพันธุ์ Tsukushiakamochi (Japan) รองลงมาในข้าวสีดำพันธุ์ Chinakuromai (China) และยังพบมีการแสดงออกในรากและกาบใบของข้าวสีเขียวนพันธุ์ Akunemochi (Japan) แต่มีการแสดงออกที่ต่ำในข้าวสีขาวพันธุ์ Nipponbare (Japan) ทั้งนี้ยังพบการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในใบธงของข้าวทุกสายพันธุ์ที่กล่าวมา ยกเว้นในข้าวสีดำพันธุ์ Chinakuromai (China)



รูปที่ 2 การวิเคราะห์ RT-PCR ของบริเวณ coding sequence (cds) ของยีน *OsDFR* ในข้าวดำพันธุ์ลิ้มผั่วโดยใช้ cDNA ที่เตรียมจากใบเป็นแม่พิมพ์ กำหนดให้ช่อง M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder และช่อง 1 คือ ข้าวดำพันธุ์ลิ้มผั่ว

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OsDFR*

เมื่อนำยีน *OsDFR* ขนาด 1,159 คู่เบส ที่ได้จากใบมาหาลำดับเบส พบว่าประกอบด้วยบริเวณ open reading frame (ORF) ขนาด 1,119 คู่เบส จากข้าวพันธุ์ลิ้มผั่ว ทำการเปรียบเทียบกับยีน *OsDFR* จากข้าว nearly isogenic Purpleputtu ที่เป็นข้าวสีดำในฐานข้อมูล (Y07956) พบว่าเป็นบริเวณ open reading frame (ORF) ขนาด 1,119 คู่เบส และมีลำดับเบสเหมือนกัน 99 % โดยมีลำดับเบสต่างกันเพียงบางตำแหน่งเท่านั้น และในตำแหน่งที่ 164 ยังให้ผลตรงกับที่ได้มีรายงานไว้ในงานของ Lim and Ha [7] พบว่าในข้าวสีจะพบเบส C แต่เฉพาะข้าวขาวเท่านั้นที่มีการเปลี่ยนไปเป็น A ทำให้เกิด premature stop codon (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 การวิเคราะห์เปรียบเทียบบริเวณ ORF ของข้าวดำพันธุ์ลิ้มผั่วที่มีขนาด 1,119 คู่เบส กับข้าวแดงพันธุ์ Murasaki (AB003496) ข้าวดำพันธุ์ Purpleputtu (Y07956) และข้าวขาวพันธุ์ Toride-1 (AB010745) ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank

จาก รูปที่ 3 พบว่าลำดับเบสของยีน *OsDFR* ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์ลิ้มผั่ว มีความแตกต่างจากลำดับเบสของข้าวขาวพันธุ์ Toride-1 จากฐานข้อมูล (AB010745) อยู่ 2 ตำแหน่งคือ 152 และ 164 คู่เบส และแตกต่างกับข้าวแดงพันธุ์ Murasaki จากฐานข้อมูล (AB003496) อีก 2 ตำแหน่งคือ 152 และ 976 คู่เบส และแตกต่างจากข้าวดำพันธุ์ Purpleputtu จากฐานข้อมูล (Y07956) จำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ 152, 301, 462, 711 และ 976 คู่เบส ตามลำดับ

เมื่อนำ ORF ของยีน *OsDFR* ขนาด 1,119 คู่เบส ซึ่งโคลนได้จากข้าวพันธุ์ลิ้มผั่ว มาแปลรหัส พบว่าได้ลำดับกรดอะมิโนขนาด 372 หน่วย เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *OsDFR* จากฐานข้อมูลใน GenBank พบว่า ข้าวสีขาวซึ่งเกิด premature stop codon ทำให้ได้สายกรดอะมิโนที่มีความยาวเพียง 54 หน่วย ทำให้ขาดบริเวณ active site และบริเวณ substrate binding site ซึ่งเป็นบริเวณที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนต่างๆ กระจายอยู่ที่ตำแหน่ง 89-294 ของเอนไซม์ DFR ทำให้ยีน *OsDFR* ในข้าวขาวไม่ทำงาน จึงทำให้ไม่สามารถส่งเสริมการสร้างสีในข้าวขาวได้ และในลำดับโปรตีนของข้าวพันธุ์ลิ้มผั่ว พบว่ามีเพียง 2 กรดอะมิโนที่แตกต่างกับกับข้าวสีที่ตำแหน่ง 51 จาก E-->G และที่ตำแหน่ง 326 จาก L-->F แต่เมื่อทำการ

เปรียบเทียบบริเวณสำคัญของกรดอะมิโนกับข้าวดำพันธุ์ Purpleputtu ในฐานข้อมูล GenBank (CAA69253) พบว่าไม่กระทบต่อบริเวณ active site และบริเวณ substrate binding site ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล (รูปที่ 4)

Purpleputtu For 100-5A8 Accession: CAA69253.1	117 118 119
OsDFR Accession: U00001.1	117 118 119
Purpleputtu For 100-5A8 Accession: CAA69253.1	234 235 236
OsDFR Accession: U00001.1	234 235 236
Purpleputtu For 100-5A8 Accession: CAA69253.1	351 352 353
OsDFR Accession: U00001.1	351 352 353
Purpleputtu For 100-5A8 Accession: CAA69253.1	372 373 374
OsDFR Accession: U00001.1	372 373 374

รูปที่ 4 การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของ ORF ของยีน *OsDFR* จากข้าวดำพันธุ์ลิ้มผัวขนาด 372 หน่วย กับข้าวแดงพันธุ์ Murasaki (BAA36183) ข้าวดำพันธุ์ Purpleputtu (CAA69253) และข้าวขาวพันธุ์ Toride-1 (AB010745) ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank

สรุปผลการวิจัย

จากการค้นหายีน *OsDFR* ในข้าวพันธุ์ลิ้มผัว ที่ได้จากใบโดยวิธี RT-PCR พบบริเวณที่เป็น coding sequence ขนาด 1,159 คู่เบส เมื่อนำลำดับเบสของยีน *OsDFR* ที่โคลนได้มาเปรียบเทียบกับยีนที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความเหมือนกับยีน *OsDFR* จากฐานข้อมูล GenBank ในข้าวสีดำพันธุ์ Purpleputtu (Y07956) ที่มีบริเวณ open reading frame (ORF) ขนาด 1,119 คู่เบส และมีลำดับเบสต่างกันเพียงบางตำแหน่งเท่านั้น และเมื่อนำไปแปลรหัสเป็นโปรตีน พบว่ามีกรดอะมิโนต่างกันเพียง 2 ตำแหน่งเท่านั้นและไม่ส่งผลกระทบต่อบริเวณบริเวณ active site และบริเวณ substrate binding site บนสายโพลีเปปไทด์

ในงานวิจัยต่อไปจะศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีน *OsDFR* จากข้าวไทยพันธุ์อื่นๆ ที่มีสีขา สีสแดง และสีดำ เพื่อให้เข้าใจกลไกการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานินในข้าว และประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- [1] Kim J, Cheon Y, Kim B-G, Ahn J-H. Analysis of flavonoids and characterization of the *OsFNS* gene involved in flavone biosynthesis in Rice. *J Plant Biol.* 2008;101-97:(2)51
- [2] Chen X, Itani T, Wu X, Chikawa Y, Irifune K. Physiological factors affecting transcription of genes involved in the flavonoid biosynthetic pathway in different rice varieties. *Plant signaling & behavior.* 2013;12(8):e27555
- [3] Marles MA, Ray H, Gruber MY. New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry.* 2003;63-367:(2)64

- [4] Winkel-Shirley B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology*. 2001;:93-485:(2)126
- [5] Furukawa T, Maekawa M, Oki T, Suda I, Iida S, Shimada H, et al. The Rc and Rd genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 2007;:102-91:(1)49
- [6] Chandler VL, Radicella JP, Robbins TP, Chen J, Turks D. Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous: isolation of B utilizing R genomic sequences. *The Plant Cell*. 1989;:83-1175:(12)1
- [7] Lim S-H, Ha S-H. Marker development for the identification of rice seed color. *Plant Biotechnol Rep*. 2013;:8-391:(3)7
- [8] The analysis of Thai rice problem: Ph.d. Aat Pisanwanich and others History of Thai rice: In-depth
- Institutional Repository of Rice The position of Thai rice in AEC: Post Today: <http://www.fao.org/economic/ess/en/#.VVAcePmUdPY>
- [9] บริษัท สีนิลไรซ์ จำกัด. 2558. กรุงเทพฯ. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <http://www.sininrice.com/insightsub5.html>. 28 พฤษภาคม 2558