การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีน *OsDFR* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดินในข้าวไทย

กนกภรณ์ คำโมนะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2560

การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีน *OsDFR* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดินในข้าวไทย

กนกภรณ์ คำโมนะ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์

พิจารณาเห็นชอบโดย **อาจารย์ที่ปรึกษา**

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์)
วันที่ 12 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2560

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต)
วันที่ 12 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2560

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(อาจารย์ ดร.สุภารัตน์ ลีธนัชอุดม)
วันที่ 12 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2560

ประธานอาจารย์ประจำหลักสูตร .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต)
วันที่ 12 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2560

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่ 12 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2560

ชื่อเรื่อง การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีน *OsDFR* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดินในข้าวไทย

ชื่อผู้เขียน นางสาวกนกภรณ์ คำโมนะ

ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์

บทคัดย่อ

แอนโทไซยานิน และโปรแอนโทไซยานิดินเป็นสารในกลุ่มของฟลาโวนอยด์พบในระยะการพัฒนาขั้นต่าง ๆ ในพืช และในเมล็ดธัญพืช ซึ่งมีบทบาทช่วยต้านอนุมูลอิสระในมนุษย์ และมีความสามารถในการป้องกันมะเร็งชนิดต่าง ๆ กระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ในข้าวจะประกอบไปด้วยยีน 2 ชนิดคือ ยีนควบคุมซึ่งมีรหัสสร้างทรานสคริพชันแฟกเตอร์ และยีนโครงสร้าง มีรหัสสร้างเอนไซม์ซึ่งยีนโครงสร้างที่มีความสำคัญในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดินคือยีน *OsDFR* ซึ่งมีรหัสสร้างเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) ในงานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีนเพื่อศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีน *OsDFR* ที่มีต่อการสังเคราะห์สีของเยื่อหุ้มเมล็ดในข้าวไทย จากการทดลองได้ทำการค้นหายีน *OsDFR* จากต้นอ่อนของข้าวดำพันธุ์ก่ำโดยเทคนิค RT-PCR พบว่า ยีน *OsDFR* ประกอบไปด้วย open reading frame (ORF) ขนาด 1,119 คู่เบส ซึ่งมีความเหมือนกันกับยีน *OsDFR* ของข้าวดำพันธุ์ Purpleputtu ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (Y07956) ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำ ORF ของยีน *OsDFR* จากข้าวพันธุ์ก่ำ มาแปลรหัสพบว่า ได้ลำดับกรดอะมิโนขนาด 372 หน่วย จากนั้นทำการเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความเหมือนกับข้าวดำพันธุ์ Purpleputtu (CAA69253) และข้าวดำพันธุ์ Murasaki (BAA36183) ทุกตำแหน่ง จากนั้นทำการโคลนยีน *OsDFR* ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ dual 35S promoter และ *nos* terminator และถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวแดงพันธุ์ Kasalath พบว่าแคลลัสข้าวพันธุ์ Kasalath มีการเจริญเติบโตและเกิดจุดเขียว เมื่อนำต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนมาตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่า ให้ผลเป็นบวก 77.78 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดสอบการกระจายตัวของยีน *gusA* ในข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_0 พบว่า มีการกระจายตัวของยีนไปสู่รุ่นลูก T_1 เป็นไปตามกฎของเมนเดลคือ อัตราส่วน 3 : 1 นอกจากนี้ ได้วิเคราะห์การแสดงออกของยีน *OsDFR* ในเนื้อเยื่อใบของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 พบว่า มีการแสดงออกของยีน *OsDFR* ที่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับต้น wild-type อย่างไรก็ตาม ข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนมีลักษณะสีเขียวเหมือนกับต้น

wild-type แสดงว่า จากผลการวิจัยนี้ ยีน *OsDFR* จากข้าวสีเพียงหนึ่งยีนไม่สามารถทำให้เกิดการเพิ่มการสังเคราะห์สีในข้าวแดงได้ อาจเนื่องมาจากกลไกการเกิดสีในข้าวมาจากการทำงานร่วมกันของยีนหลายชนิด ดังนั้น ควรทำการถ่ายยีน *OsDFR* ร่วมกับยีนควบคุมชนิดอื่นเข้าสู่ข้าว เพื่อให้เข้าใจกลไกการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดินในข้าวมากยิ่งขึ้น และมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวระดับโมเลกุลในอนาคต

คำสำคัญ: ข้าว, แอนโทไซยานิน, โปรแอนโทไซยานิดิน, ยีน *OsDFR*

Title	Cloning and Characterization of *OsDFR* Gene Involved in Anthocyanin and Proanthocyanidin Biosynthesis in Thai Rice
Author	Miss Kanogporn Khammona
Degree	Master of Science in Genetics
Advisor Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Chotipa Sakulsingharoj

ABSTRACT

Anthocyanins and proanthocyanidins are found in developmental stages of many plants and seeds. They are functional foods that play an important role as anti-oxidants and anti-cancer. Anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis is controlled by regulatory genes encoding transcription factors, and structural genes encoding enzymes in the pathway. *OsDFR* gene encoding dihydroflavonol 4-reductase is important in biosynthesis of anthocyanins and proanthocyanidins in rice. This study was carried out to find the *OsDFR* gene from seedlings of several rice varieties with colored pericarp by RT-PCR. The results showed that the *OsDFR* gene was found in the Thai black rice varieties Khum. The *OsDFR* gene was cloned from Khum. Nucleotide sequence analysis showed the open reading frame of *OsDFR* gene was 1,119 bp and 100 % identity with that of black rice, Purpleputtu reported in GenBank (Y07956). In addition, the deduced amino acid sequence was 372 residues with 100 % similarity to those of two black rice varieties, Purpleputtu (CAA69253) and Murasaki (BAA36183). Furthermore, the *OsDFR* from Khum was constructed to obtain the gene cassette containing cloned *OsDFR* under the control of dual 35S promoter and *nos* terminator. The cassette was cloned into binary vector pCAMBIA1305.1 for transformation into rice. The transformed calli showed *gusA* positive, but no red or purple pigmentation was observed on surviving calli. The regenerated plants were subjected to PCR analysis and showed positive PCR, indicating the *OsDFR* was present in their genome. It was found that production of transgenic plants was 77.78 %, showing the integration of *OsDFR* in genome. Furthermore, the segregation of *gusA* gene showed the ratio of 3:1 in T_1 generation, indicating a single insertion site of a gene in transgenic rice. Expression analysis revealed the T_1 transgenic rice plants overexpressed *OsDFR* gene in leaf tissues. However, the phenotypes of transgenic rice plants were similar to those of wild-type. The results suggested that

overexpression of *OsDFR* gene could not affect anthocyanin and proanthocyanidin pigmentation. Other genes including regulatory genes that encode transcription factors might be required to complement effect with *OsDFR*. Further studies of these genes will provide understanding of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis and be useful for application in rice breeding programs in the future.

Keywords Rice, *OsDFR* gene, Anthocyanins and Proanthocyanidins, Transformation

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นผลงานที่ผู้วิจัยได้ทุ่มเทความตั้งใจ ในการศึกษาและวิจัย จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยได้รับความอนุเคราะห์ คำแนะนำและความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งขอกราบขอบพระคุณท่านผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่คอยอบรมสั่งสอน แนะนำแนวทางการเรียนรู้ คอยให้คำปรึกษาและใส่ใจเป็นอย่างดีเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต และอาจารย์ ดร.สุภารัตน์ ลีธนัชอุดม กรรมการที่ปรึกษา ที่ได้คอยให้คำปรึกษา รับฟังปัญหา และเสนอแนวทางในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นทุกครั้ง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน) กรุงเทพมหานคร และ Professor Dr. Thomas W. Okita จาก Institute of biological chemistry, Washington state university ประเทศสหรัฐอเมริกาที่ให้ความอนุเคราะห์พลาสมิดที่ใช้ในการวิจัยรวมทั้งพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ทั้งนี้ ขอขอบพระคุณสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้มอบทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปีการศึกษา 2559 จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีมา ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การอบรมเลี้ยงดู เป็นกำลังใจที่ดี คอยให้คำปรึกษาตลอดจนช่วยสนับสนุนทั้งในด้านการศึกษาและการดำเนินชีวิต และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุก ๆ ท่านในสาขาวิชาพันธุศาสตร์ และพี่ ๆ น้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่คอยให้คำปรึกษาอย่างดีตลอดมา สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบคุณตัวเองที่ผ่านอุปสรรค และไม่ว่าจะเจอปัญหาเล็กหรือใหญ่ แต่ก็ตั้งใจใฝ่เรียนรู้ และผ่านมาถึงจบการศึกษาได้แต่โดยดี

กนกภรณ์ คำโมนะ

ตุลาคม 2560

สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง

สารบัญภาพ

สารบัญตารางผนวก

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ข้าว (*Oryza sativa* L.) ถือเป็นอาหารหลักมาตั้งแต่กาลโบราณ (ทองดี, 2538) จากหลักฐานทางภูมิศาสตร์และโบราณคดีบางอย่างทำให้สันนิษฐานได้ว่าข้าวได้ถือกำเนิดมาเป็นเวลา 230 - 500 ล้านปีมาแล้ว และได้มีการสันนิษฐานว่าข้าวที่ปลูกกันอยู่ในปัจจุบันนี้มาจากการวิวัฒนาการของข้าวป่าข้ามปี (perennial wild rice) มาเป็นข้าวป่าปีเดียว (annual wild rice) และข้าวปลูกปีเดียว (annual cultivated rice) ตามลำดับ โดยมนุษย์โบราณในยุค 9,000 ปีที่แล้ว ได้นำข้าวป่าเข้ามาปลูกและทำการคัดเลือกพันธุ์ (บุญหงษ์, 2557) กระทั่งในปัจจุบันนี้ พบว่ามีข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีต่าง ๆ ปลูกกันอยู่ทั่วไป และพบว่าข้าวสีเหล่านั้นประกอบไปด้วยสารแอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดินทำหน้าที่เป็นสารที่ทำให้เกิดสีในเยื่อหุ้มเมล็ด ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าสารแอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดินที่พบในข้าวสีจัดเป็น functional food เพราะสารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน และโรคมะเร็ง (Lazze et al., 2004) และยังสามารถลดอาการอักเสบ (anti-inflammatory) โดยเพิ่มความแข็งแรงของเส้นใยโปรตีนในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) และกระดูกอ่อน (cartilage) จึงลดการทำลายจากอนุมูลอิสระอันตรายที่สำคัญ ได้แก่ 2,2–diphenyl–1–picrylhydrazyl (DPPH), $O_2\cdot$, OH· และ $H_2O_2\cdot$ (Changlian et al., 2006) นอกจากนี้ ยังช่วยปกป้องหลอดเลือด (vasoprotective) โดยการขยายหลอดเลือดและกระตุ้นการไหลเวียนของเลือด และลดคอเลสเตอรอลในเลือดโดยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (lipid peroxidation) (Francis, 2002) ซึ่งถ้าหากเรามีอาหารหลักที่ใช้บริโภคมีคุณสมบัติที่สำคัญทางยาก็อาจจะช่วยแก้ปัญหาไปได้ในระดับหนึ่ง

สารแอนโทไซยานิน (anthocyanins) และสารโปรแอนโทไซยานิดิน (proanthocyanidins) จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งสารแอนโทไซยานินมีชื่อย่อมาจากรากศัพท์เดิมของกรีก คือ anthos แปลว่า ดอกไม้ และ kyanos แปลว่า สีน้ำเงิน แอนโทไซยานิน จึงหมายถึง ดอกไม้สีน้ำเงิน แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ (water-soluble pigments) สีของแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553) ปัจจุบันมีการค้นพบแอนโทไซยานินมากกว่า 300 ชนิด จากสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบมากกว่า 7,000 ชนิด แต่ละชนิดจะมีสีสันและคุณสมบัติแตกต่างกันไป แม้ว่าแอนโทไซยานินจะมีด้วยกันหลายชนิดแต่ทุกชนิดจะมีโครงสร้างหลักเป็นสารชนิดเดียวกันที่เรียกว่า แอนโทไซยานิดิน

(anthocyanidins) ที่มีคาร์บอน 15 อะตอมอยู่ภายในโมเลกุล (สัมพันธ์, 2546) ส่วนสารโปรแอนโทไซยานิดิน พบว่ามีการแสดงออกสูงในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง ซึ่งในการที่ข้าวจะเกิดการสังเคราะห์สีของเยื่อหุ้มเมล็ดได้จะต้องมียีนอยู่ 2 ชนิดหลัก ๆ ชนิดแรกคือ ยีนควบคุมที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างซึ่งจะมีอยู่ 2 กลุ่มได้แก่ MYC Type หรือ basic helix-loop-helix (bHLH) และ MYB Type ยีนอีกชนิดคือ ยีนโครงสร้างทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนของวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดิน ซึ่งสารแอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดินเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากวิถีการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์เหมือนกันแต่จะมีความแตกต่างกันตรงกลางของวิถีการสังเคราะห์ที่ตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) (Lim and Ha, 2013)

ยีน Os*DFR* เป็นรหัสสำหรับสร้างเอนไซม์ DFR ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 ของข้าว ซึ่งเป็นยีนโครงสร้างที่ตำแหน่ง *Rd* ประกอบด้วย 3 เอกซอน และ 2 อินทรอน จากการศึกษาของ Furukawa et al. (2007) พบว่าในข้าวสีแดงที่มีการสะสมของสารโปรแอนโทไซยานิดินเกิดจากการแสดงออกของยีน *OsDFR* ที่ทำหน้าที่ในการส่งเสริมการสังเคราะห์สีร่วมกับการแสดงออกของยีน *Rc* ทำหน้าที่สร้างทรานสคริพชันแฟกเตอร์ ซึ่งอยู่ในกลุ่มของโปรตีน basic helix-loop-helix (bHLH) ทั้งนี้จากผลการทดลองยังพบอีกว่าในข้าวขาวจะเกิดการแทนที่ของลำดับเบสของยีน *OsDFR* ในเอกซอนที่ 2 ทำให้เกิด premature stop codon ส่งผลให้ยีน *OsDFR* ในข้าวขาวไม่ทำงาน ข้าวขาวจึงไม่เกิดการสังเคราะห์ของสีในเยื่อหุ้มเมล็ด ในงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหายีนและโคลนยีน *OsDFR* ในข้าวไทย และศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนเพื่อทำให้เข้าใจการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดิน และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อค้นหายีนและโคลนยีน *OsDFR* ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดินในข้าวไทย

2. เพื่อศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีน *OsDFR* ที่มีต่อการสังเคราะห์สีของเยื่อหุ้มเมล็ดในข้าว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถค้นหายีนและโคลนยีน *OsDFR* ในข้าวไทยได้

2. ทราบโครงสร้างและหน้าที่ของยีน *OsDFR* เพื่อเข้าใจวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดินในข้าวไทยได้เพิ่มขึ้น

3. สามารถประยุกต์ใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อใช้คัดเลือกข้าวในระยะต้นกล้า

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ข้าว

ข้าวมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Oryza sativa* ข้าวเป็นธัญพืชซึ่งประชากรโลกบริโภคเป็นอาหารสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทวีปเอเชีย จากข้อมูลเมื่อปี 2553 ข้าวเป็นธัญพืชซึ่งมีการปลูกมากที่สุดเป็นอันดับสองทั่วโลก รองจากข้าวโพด ข้าวเป็นธัญพืชสำคัญที่สุดในด้านโภชนาการและการได้รับแคลอรีของมนุษย์ เพราะข้าวโพดส่วนใหญ่ปลูกเพื่อจุดประสงค์อื่น มิใช่ให้มนุษย์บริโภค ทั้งนี้ ข้าวคิดเป็นพลังงานกว่าหนึ่งในห้าที่มนุษย์ทั่วโลกบริโภค

หลักฐานพันธุศาสตร์แสดงว่าข้าวมาจากการนำมาปลูกเมื่อราว 8,200 – 13,500 ปีก่อน ในภูมิภาคหุบแม่น้ำจูเจียงของจีน ก่อนหน้านี้ หลักฐานโบราณคดีเสนอว่า ข้าวมีการนำมาปลูกในเขตหุบแม่น้ำแยงซีในจีน ข้าวแพร่กระจายจากเอเชียตะวันออกไปยังเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียใต้ ข้าวถูกนำมายังทวีปยุโรปผ่านเอเชียตะวันตก และทวีปอเมริกาผ่านการยึดอาณานิคมของยุโรป

ปกติการปลูกข้าวเป็นแบบปีต่อปี ทว่าในเขตร้อน ข้าวสามารถมีชีวิตอยู่ได้หลายปีและสามารถไว้ตอ (ratoon) ได้นานถึง 30 ปี ต้นข้าวสามารถโตได้ถึง 1 – 1.8 เมตร ขึ้นอยู่กับพันธุ์และความอุดมสมบูรณ์ของดินเป็นหลัก มีใบเรียว ยาว 50 – 100 เซนติเมตร และกว้าง 2 – 2.5 เซนติเมตร ช่อดอกห้อยยาว 30 - 50 เซนติเมตร เมล็ดกินได้เป็นผลธัญพืชยาว 5 – 12 มิลลิเมตร และหนา 2 – 3 มิลลิเมตร (Smith, 1998) ซึ่งลักษณะโดยรวมของข้าวได้แสดงไว้ดังภาพที่ 1

ในประเทศไทยข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของไทยมาอย่างยาวนาน เป็นสินค้าเกษตรส่งออกที่สำคัญของประเทศอย่างต่อเนื่องและเป็นพืชอาหารหลักที่สำคัญของคนในชาติและทวีปเอเชียอีกด้วย ซึ่งในปัจจุบันนี้ได้มีทั้งผู้บริโภคที่ใส่ใจสุขภาพและนักวิจัยจำนวนมากหันมาสนใจในข้าวพื้นเมืองพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดทั้งสีดำและแดง เนื่องจากพบว่าสารที่อยู่ในเมล็ดข้าวเหล่านี้เป็นประโยชน์อย่างมากต่อสุขภาพ ทั้งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และ ช่วยปกป้องหลอดเลือด (vasoprotective) โดยการขยายหลอดเลือดและกระตุ้นการไหลเวียนของเลือด ลดคอเลสเตอรอลในเลือดโดยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (lipid peroxidation) (Francis, 2002) ลดความเสี่ยงของโรคมะเร็งและต้านไวรัส (Zhao et al., 2009) ซึ่งจะเป็นการดีอย่างยิ่งถ้าอาหารหลักที่เราใช้บริโภคมีสรรพคุณทางเภสัชไปด้วย และจะทำให้ผู้บริโภคมั่นใจว่าได้บริโภคอาหารที่มีประโยชน์ต่อ

สุขภาพอย่างแท้จริง ในด้านของการวิจัยปรับปรุงพันธุ์ข้าวมีนักวิจัยให้ความสนใจอย่างมากโดยเฉพาะในการปรับปรุงด้านคุณภาพโภชนาการและผลผลิต

ภาพที่ 1 ลักษณะโดยรวมของข้าว

ที่มา: ศูนย์การเรียนรู้การเกษตรตำบลสาคู (2558)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว

พืชตระกูลข้าวพบมีมากถึง 120,000 สายพันธุ์ แต่พันธุ์ที่รู้จักและนำมาปลูกสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ *Oryza sativa* ที่นิยมเพาะปลูกในทวีปเอเชีย และ *Oryza glaberrina* ที่นิยมเพาะปลูกในทวีปแอฟริกา แต่ข้าวที่ปลูกและซื้อขายกันในตลาดโลกเกือบทั้งหมดจะเป็นข้าวจากทวีปเอเชีย แบ่งเป็น 3 กลุ่มตามลักษณะและพื้นที่ปลูกได้ดังนี้

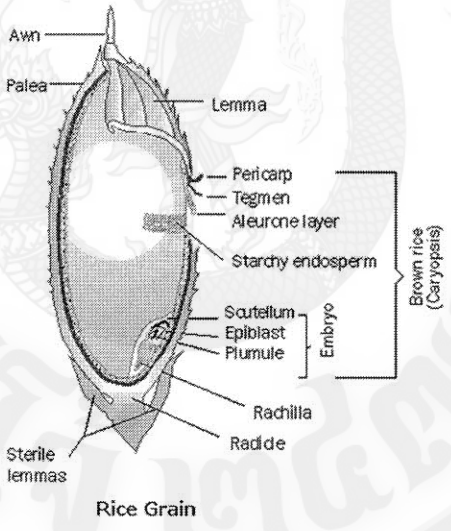
1. ข้าวอินดิกา (*Indica*) หรือข้าวเจ้า เป็นข้าวที่มีลักษณะเม็ดเรียวยาวรี ลำต้นสูง ตั้งชื่อมาจาก แหล่งที่ ค้นพบครั้งแรกในประเทศอินเดีย เป็นข้าวที่นิยมเพาะปลูกในทวีปเอเชียเขตมรสุม ตั้งแต่จีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไทย อินโดนีเซีย ไปจนถึงอินเดียและศรีลังกา และแพร่กระจายไปทั่งเขตอุษาอาคเนย์ตั้งแต่หลัง พ.ศ. 1000 ทั้งเขตลุ่มน้ำอิระวดี และต่อมาแพร่ขยายเพาะปลูกในทวีปอเมริกา เฉพาะในเมืองไทยข้าวอินดิกานิยมเพาะปลูกในบริเวณที่ราบลุ่มตอนใต้ของแม่น้ำเจ้าพระยาเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วแทนข้าวเหนียวที่เคยปลูก

2. ข้าวจาปอนิกา (*Japonica*) เป็นข้าวเหนียวเมล็ดป้อม กลมรี มีแหล่งกำเนิดจากทางภาคเหนือแล้วผ่านมาทางลุ่มแม่น้ำโขง ในสมัยก่อนพุทธศตวรรษที่ 20 หลังจากนั้นลดจำนวนลงไปแพร่หลายในเขตอบอุ่นที่ ญี่ปุ่น เกาหลี รัสเซีย ยุโรป และอเมริกา

3. ข้าวจาวานิกา (*Javanica*) เป็นข้าวลักษณะเมล็ดป้อมใหญ่สันนิษฐานว่า เป็นข้าวพันธุ์ผสม ระหว่าง ข้าวอินดิกาและจาปอนิกา นิยมเพาะปลูกใน อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน หมู่เกาะริวกิว และญี่ปุ่น แต่ไม่ค่อยได้รับความนิยมนักเพราะให้ผลผลิตต่ำ ประเทศต่าง ๆ ในโลกต่างก็มีการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวใหม่เพิ่มพื้นที่การเพาะปลูกข้าวและวิธีการปลูกข้าวให้ได้ปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้น (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2558)

1. ส่วนประกอบต่าง ๆ ที่สำคัญของข้าว

1.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว



ภาพที่ 2 โครงสร้างของเมล็ดข้าว

ที่มา: Hari (2011)

เมล็ดของข้าวเรียกว่า คารีออฟซิส (caryopsis) หรือข้าวกล้อง (brown rice) ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยกลีบดอกใหญ่ (lemma) และกลีบดอกเล็ก (palea) ทำให้เป็นโครงสร้างของเมล็ดข้าวเปลือกที่สมบูรณ์ กลีบดอกทั้งสองชนิดนี้เมื่อแก่เต็มที่จะมีลักษณะเป็นเนื้อไม้ที่ค่อนข้างเปราะและประกอบด้วยธาตุซิลิกา (silica) เป็นจำนวนมาก เมื่อนำข้าวกล้องไปผ่าตัดตามยาวและศึกษาภาพใต้

กล้องจุลทรรศน์จะพบว่าชั้นนอกสุดของข้าวกล้องจะมีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อบาง ๆ เรียกว่า เยื่อชั้นนอก (pericarp) ซึ่งเป็นชั้นที่กำหนดสีของข้าวกล้องเป็นสีน้ำตาลอ่อน (ภาพที่ 2) ถัดจากเนื้อเยื่อด้านนอกเข้าไปด้านในจะเป็นเนื้อเยื่อชั้นกลางจำนวน 2 ชั้น ได้แก่ เยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat) และนิวเซลลัส (nucellus) หุ้มคัพภะ (embryo) ไว้

ส่วนของแป้งขาวที่เรียกว่า เอ็นโดสเปิร์มนั้นจะเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ (ประมาณ 83 เปอร์เซ็น) ของข้าวกล้อง เอ็นโดสเปิร์มจะถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มชั้นใน (aleurone layer) และตัวเอ็นโดสเปิร์มเองจะประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma cells) ที่มีผนังบางซึ่งบรรจุเมล็ดแป้ง (compound starch granules) ไว้เต็ม โดยมีโปรตีนแทรกอยู่รอบนอกใกล้ ๆ กับชั้นของเยื่อหุ้มชั้นใน ในเมล็ดข้าวเจ้า (non-glutinous rice) จะมีเมล็ดแป้งอัดแน่นในส่วนของเอ็นโดสเปิร์ม ทำให้เนื้อข้าวสารมีลักษณะใสกว่าในข้าวเหนียว (glutinous rice) ซึ่งมีเม็ดแป้งอัดกันค่อนข้างหลวม อย่างไรก็ตามในเมล็ดข้าวเจ้าก็ยังมีส่วนที่ขาวขุ่นซึ่งเรียกว่า ท้องไข่ หรือท้องปลาซิว (white abdomen or chalkiness) อันเนื่องมาจากการอัดตัวของเม็ดแป้งไม่แน่นพอ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากลักษณะประจำพันธุ์ หรือสภาพแวดล้อมในแปลงปลูกไม่เหมาะสม

ส่วนของต้นอ่อนหรือคัพภะนั้นมีขนาดเล็กมาก ตั้งอยู่ตรงฐานของเมล็ดข้าวกล้องด้านที่มีกลีบดอกใหญ่ห่อหุ้มไว้ คัพภะประกอบด้วยส่วนของใบอ่อน (plumule) และส่วนของรากแรกเกิด (radicle) โดยมีส่วนของลำต้นอ่อนสั้น ๆ (mesocotyl) เชื่อมอยู่ตรงกลางระหว่างส่วนของใบและรากดังกล่าว ส่วนของใบจะถูกห่อหุ้มด้วยปลอกหุ้มต้นอ่อน (coleoptile) และส่วนของรากก็จะถูกห่อหุ้มด้วยกลุ่มของเนื้อเยื่อที่มีลักษณะอ่อนนุ่มเรียกว่าปลอกหุ้มรากอ่อน (coleorhiza) ด้านนอกสุดของคัพภะจะอยู่ติดกับชั้นของเยื่อหุ้มชั้นใน ส่วนปลอกหุ้มต้นอ่อนนั้น จะถูกล้อมรอบด้วยชั้นของเซลล์ที่มีชื่อว่าสคิวเทลลัม (scutellum) และอีพิบลาสต์ (epiblast)

1.2 ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตทางลำต้น

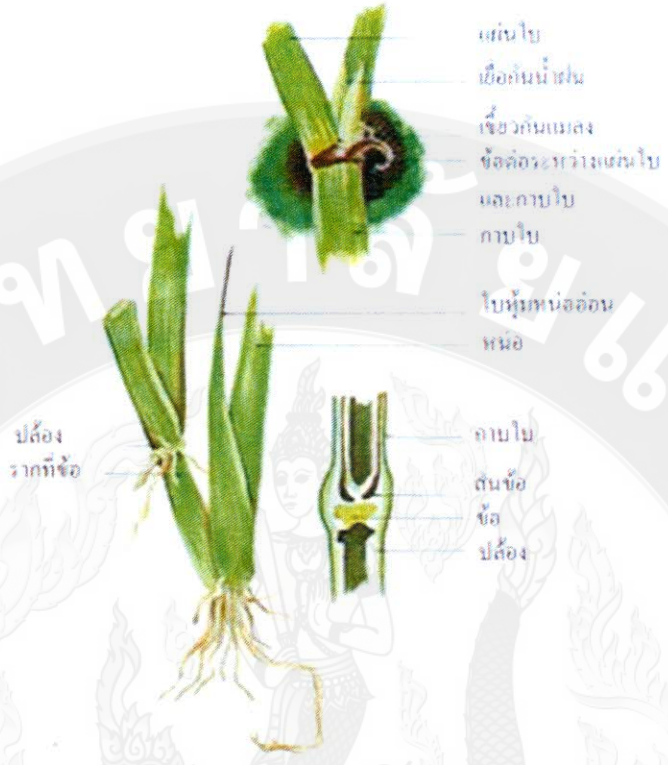
1.2.1 ราก (root) ข้าวมีระบบรากเป็นระบบรากฝอย (fibrous root system) ซึ่งประกอบไปด้วยราก 2 ชนิด ได้แก่ รากปฐมภูมิ (primary root) ที่มีชื่อเรียกว่า รากแรกเกิด (seminal root) ซึ่งงอกออกมาจากส่วนของเรดิเคิล (radicle) รากชนิดนี้เป็นรากชั่วคราว มีลักษณะโคนโตและปลายเรียวยาวไม่เกิน 15 ซม. ทิศทางของรากจะพุ่งสู่ใต้ดินในแนวดิ่ง ทำหน้าที่รองรับส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าวให้ทรงตัวอยู่ได้ และรากทุติยภูมิ (secondary root) มีชื่อเรียกว่า รากเสริม (adventitious root) รากชนิดนี้จะงอกออกมาจากส่วนของข้อล่าง ๆ ใต้ดินของลำต้นใหม่ในทิศทางขนานกับผิวดิน และมีการแตกแขนงอย่างอิสระ เป็นรากที่เกิดขึ้นเพื่อทดแทนรากแรกเกิดเมื่อต้นข้าว

เจริญเติบโตและมีอายุมากขึ้น อาจมีรากเสริมค้ำจุน (adventitious prop roots) เกิดขึ้นโดยรอบข้อเหนือระดับดิน และรากชนิดนี้อาจเกิดขึ้นบริเวณส่วนปลายของลำต้นบริเวณใกล้ผิวน้ำในพันธุ์ข้าวขึ้นน้ำ ในการปลูกหรือหยอดข้าวลึกเกินไป อาจมีรากพิเศษเกิดขึ้นบนส่วนของลำต้นยืดตัวที่อยู่ระหว่างรากแรกเกิด และปลอกหุ้มต้นอ่อน เรียกรากชนิดนี้ว่า รากมีโซโคทิล (mesocotyl roots) เมื่อนำเมล็ดข้าวเปลือกไปเพาะในที่มีแสงสว่าง ส่วนของรากอ่อนจะงอกออกมาจากคัพภะก่อน โดยมีปลอกหุ้มรากอ่อนหุ้มส่วนของรากนี้ไว้ และในเวลาต่อมาส่วนใบของต้นอ่อน (plumule) จึงจะงอกออกมา ในทางกลับกันเมล็ดข้าวเปลือกที่ถูกเพาะในที่มืดก็จะมีส่วนของต้นอ่อนงอกออกมาก่อนส่วนของรากอ่อนโดยมีปลอกหุ้มต้นอ่อนหุ้มส่วนของต้นอ่อนไว้ การงอกของต้นกล้าในที่มืดนี้จะสามารถมองเห็นส่วนของลำต้นที่ยืดตัว (mesocotyl) ได้ชัดเจนดังภาพที่ 3

ภาพที่ 3 ลักษณะรากและต้นอ่อนของข้าว

ที่มา: สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ (2015)

1.2.2 ลำต้น (stem or culm) ลำต้นของข้าวมีลักษณะทรงกลม ส่วนกลางกลวงตรงส่วนของปล้อง (internode) และตรงส่วนของข้อ (node) โดยทั่วไปลำต้นจะมีลักษณะตั้งตรง แต่ในข้าวป่า (wild rice) และข้าวขึ้นน้ำ (floating or deepwater rice) นั้น ลำต้นอาจมีลักษณะเลื้อยหรือล้มราบโดยชูเฉพาะส่วนของยอดขึ้นตั้งตรง ในระยะการเจริญเติบโตทางลำต้น (vegetative growth) ของข้าว อาจมองเห็นรูปร่างของลำต้นไม่ชัดเจน เนื่องจากมีส่วนของกาบใบ (leaf sheath) หุ้มไว้ แต่ในช่วงออกรวงของข้าวก็จะมองเห็นข้อปล้องของต้นข้าวได้ชัดเจนขึ้นดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ลักษณะข้อและลำต้นของข้าว

ที่มา: สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ (2015)

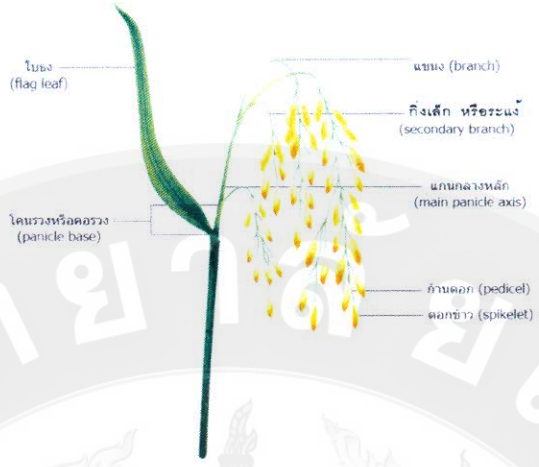
1.2.3 ใบ (leaf) ใบของข้าวจัดเป็นใบเดี่ยว (simple leaf) ที่เป็นใบแท้ มีลักษณะเป็นแผ่นใบแบนบางค่อนข้างยาวรูปหอก ใบข้าวประกอบด้วยตัวใบ (leaf blade) และกาบใบ (leaf sheath) โดยมีข้อต่อใบ (leaf collar) เป็นตัวแบ่งให้กาบใบแยกออกจากตัวใบอย่างเห็นได้ชัด ตัวใบจะยื่นออกจากลำต้นโดยทำมุมกว้างหรือแคบกับลำต้น ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์ข้าว เส้นใบของข้าวจะขนานกันตั้งแต่โคนถึงปลายใบ และมีเส้นกลางใบ (midrib) แบ่งตัวออกเป็น 2 ซีกเท่า ๆ กัน พันธุ์ข้าวส่วนใหญ่มักมีขนอ่อน (pubescence) บนใบทำให้รู้สึกสากมือเมื่อสัมผัสที่ใบ กาบใบจะทำหน้าที่ลำเลียงน้ำและแร่ธาตุจากรากและลำต้นไปยังตัวใบเพื่อใช้ปรุงอาหาร และลำเลียงอาหารสังเคราะห์จากตัวใบไปยังส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าว นอกจากนั้นกาบใบยังช่วยสะสมอาหารไว้สำหรับรวงและช่วยเสริมให้ลำต้นแข็งแรงขึ้นอีกด้วย ตรงบริเวณด้านในของข้อต่อใบจะปรากฏเยื่ออ่อนบาง ๆ รูปสามเหลี่ยมมีปลายแยกเป็น 2 แฉก แนบติดกับส่วนของลำต้น เรียกว่า เยื่อกันน้ำฝน (ligule) นอกจากนี้ที่บริเวณนี้ยังมีเขี้ยวกันแมลง (auricles) 2 อัน ซึ่งมีลักษณะเป็นขนรูปร่างโค้งคล้ายเคียวติด

อยู่ข้างละอันของข้อต่อใบ การที่ใบข้าวมีทั้งเยื่อกันน้ำฝนและเขี้ยวกันแมลงอยู่ด้วยกันจึงทำให้แตกต่างจากใบของต้นหญ้า ซึ่งมักมีอวัยวะดังกล่าวเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งหรืออาจไม่มีเลยก็ได้ อย่างไรก็ตาม ในใบข้าวที่แก่แล้ว อาจไม่ปรากฏเขี้ยวกันแมลงให้เห็น เพราะได้ร่วงหล่นไปก่อนแล้ว

1.3 ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์

ส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์หรือสืบพันธุ์ของข้าว ได้แก่ เมล็ดซึ่งก่อนที่จะได้เมล็ดมานั้นต้นข้าวก็จะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเพศผู้และเพศเมียขึ้นภายในช่อดอกข้าว หลังจากนั้นจะมีการผสมระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสองเพศจนได้เมล็ดในที่สุด

1.3.1 ช่อดอกหรือรวงข้าว (inflorescence or panicle) ช่อดอกหรือดอกข้าว (spikelets) หลาย ๆ ดอกที่รวมกันเป็นช่อโดยติดอยู่บนระแง้ (rachis) หรือแขนง (branches) ที่แตกออกไปจากแกนกลาง (main axis) ของช่อดอก เมื่อมีการผสมพันธุ์ในดอกข้าวระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ของเพศผู้และเพศเมียก็จะมีการพัฒนาเกิดขึ้นเป็นเมล็ดภายในแต่ละดอก ดังนั้นจึงเรียกช่อดอกที่พัฒนาไปเป็นช่อเมล็ดว่า รวงข้าว ส่วนล่างสุดของรวงข้าวได้แก่ ฐานรวง (panicle base or neck) ซึ่งมีลักษณะเป็นวงแหวนที่มีขนสีขาวสั้น ๆ ล้อมรอบฐานรวงเป็นจุดกำเนิดแขนงหรือระแง้แรก (primary branch) ก่อนที่ระแง้แรกจะแตกแขนงไปเป็นระแง้ที่สอง (secondary branch) และระแง้ที่สาม (tertiary branch) ต่อไป โดยปกติที่ฐานรวงจะมีระแง้แรกเกิดขึ้นเพียงอันเดียว ยกเว้นในกรณีที่สภาพแวดล้อมในการปลูกอุดมสมบูรณ์มาก ก็อาจจะมีระแง้แรกเกิดขึ้นมากกว่าหนึ่งระแง้ได้ โดยมีชื่อเรียกว่า รวงข้าวตัวเมีย (female panicle) ที่ปลายของระแง้ที่สองหรือสามจะเป็นที่เกิดของดอกข้าว ซึ่งก้านดอกย่อย (pedicel) แสดงไว้ในภาพที่ 5



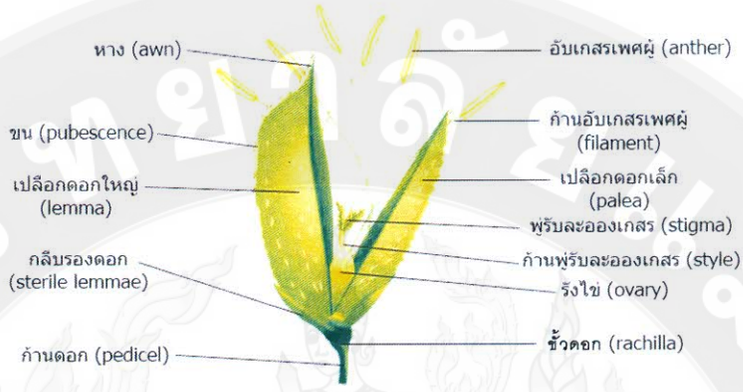
ภาพที่ 5 ลักษณะของรวงข้าว

ที่มา: สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว (2556)

1.3.2 ดอกข้าว (spikelet) ประกอบด้วยกลีบดอกใหญ่ (lemma) และกลีบดอกเล็ก (palea) ประกบกัน ที่ผิวกลีบดอกทั้งสองชนิดอาจจะมีขนหรือไม่มีขนก็ได้ เป็นที่น่าสังเกตุว่าในพันธุ์ข้าวที่ไม่มีขนบนใบก็จะไม่มีขนบนเปลือกด้วย ที่ปลายสุดของกลีบดอกใหญ่จะมีลักษณะแหลมคมที่ยื่นออกมาเรียกว่า หาง (awn) ในข้าวพันธุ์ป่ามักจะมีหางยาว แต่ในพันธุ์ข้าวปลูกที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์มาแล้วมักจะไม่มีหางหรือมีหางสั้นมาก ส่วนของกลีบดอกใหญ่และกลีบดอกเล็กจะประสานกันตรงเฉพาะส่วนฐานซึ่งติดกันอยู่เรียกว่า ขั้วดอก (rachilla) โดยมีแผ่นบาง ๆ 2 แผ่นที่เรียกว่า เยื่อรองรังไข่ อยู่บนขั้วดอกเพื่อทำหน้าที่บังคับให้กลีบดอกทั้ง 2 ชนิดเปิดหรือปิดได้ ที่ฐานของขั้วดอกจะมีเปลือกบาง ๆ ที่ค่อนข้างยาวอีก 2 แผ่นซึ่งมีขนาดเล็กกว่ากลีบเปลือกทั้ง 2 ชนิด เรียกว่า กลีบรองดอก (sterile lemmas) ทำหน้าที่รองรับฐานของกลีบดอกทั้งสองไว้โดยมีกลีบฝ่อ (rudimentary glumes) ซึ่งมีลักษณะเป็นปุ่มเล็ก ๆ 2 ปุ่ม อยู่ตรงข้ามกับกลีบรองดอก ส่วนที่ยืดระหว่างกลีบฝ่อและระแง้ที่สองหรือระแง้ที่สามเรียกว่าก้านดอกย่อย (pedicel) ซึ่งจะรองรับดอกแต่ละดอกไว้

เกสรเพศผู้ (stamen) และเกสรเพศเมีย (pistil) จะอยู่ภายในดอกข้าวโดยมีกลีบดอกใหญ่และกลีบดอกเล็กหุ้มไว้ ในแต่ละดอกจะมีเกสรเพศผู้จำนวน 6 อัน ส่วนอันบนสุดของเกสรเพศผู้จะเป็นกระเปาะสีเหลืองเรียกว่า อับเรณู (anther) ซึ่งภายในมีละอองเกสร (pollen grains) ขนาดเล็กเป็นจำนวนมาก อับเรณูนี้จะติดอยู่บนก้านเกสรเพศผู้ (filament) และเชื่อมติดอยู่กับฐานดอก ส่วนเกสรเพศเมียนั้นจะอยู่ใกล้กับฐานดอกด้านใน ประกอบด้วยยอดเกสรเพศเมีย (stigma) ซึ่งอยู่ส่วนบนมีลักษณะคล้ายขนนกขนาดเล็กจำนวน 2 อัน ทำหน้าที่รองรับละอองเกสรเพศผู้ และตั้งอยู่บนก้านเกสรเพศเมีย (style) ซึ่งเชื่อมอยู่ติดกับรังไข่ (overy) ภายในรังไข่จะมีไข่ (ovule) ซึ่งเมื่อได้รับการ

ผสมจากละอองเกสรเพศผู้แล้วก็จะกลายเป็นเมล็ดในที่สุด ส่วนต่าง ๆ ของดอกข้าวได้แสดงไว้ในภาพที่ 6 (บุญหงษ์, 2557)



ภาพที่ 6 โครงสร้างภายในของดอกข้าว

ที่มา: โรงสีนราพิมล (2556)

ข้าวสี

ภาพที่ 7 ลักษณะของเยื่อหุ้มเมล็ดสีต่าง ๆ

ข้าวที่พบโดยทั่วไปจะประกอบด้วย 3 สีหลัก ๆ คือ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว แดง และดำ ซึ่งข้าวขาวยังเป็นข้าวที่มีการเพาะปลูกและค้าขายกันสูงที่สุด แต่ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีต่าง ๆ ก็ได้รับความสนใจจากผู้บริโภคเช่นกัน พบว่าข้าวสีที่มีขายอยู่ตามท้องตลาดจะมีราคาที่สูงกว่าข้าวขาว

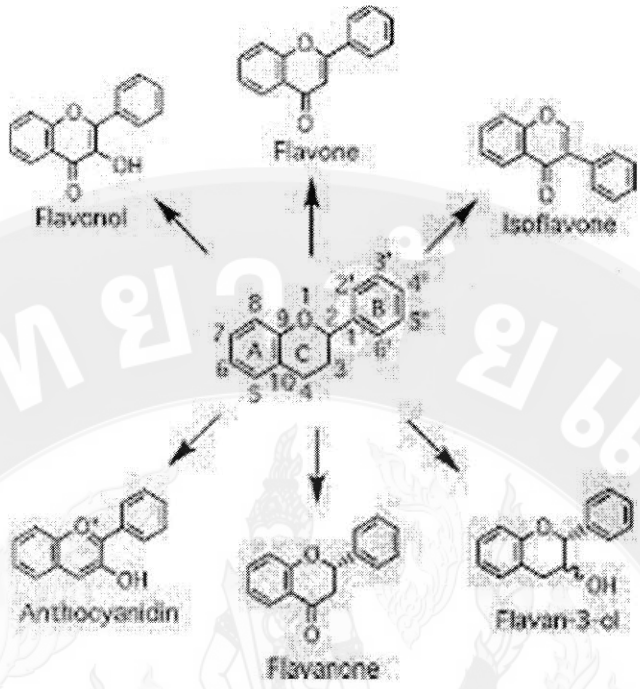
มีการค้นพบว่าในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำและแดงเป็นที่สะสมของรงควัตถุแอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดินในส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ด (Chen et al., 2013; Oki et al., 2002; Furukawa et al., 2006; Kim et al., 2007) ซึ่งรงควัตถุทั้งสองชนิดนี้สังเคราะห์มาจากวิถีการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์และมีบทบาทในการลดความเสี่ยงต่อการพัฒนาของโรคเรื้อรังต่าง ๆ โรคหัวใจและหลอดเลือดและมะเร็งบางชนิด (Ling et al., 2001; Toyokuni et al., 2002; Hu et al., 2003; Xia et al., 2003; Liu, 2007; Yawadio et al., 2007 ; Yafang et al., 2011) ซึ่งจากประโยชน์ของข้าวสีที่กล่าวมาในข้างต้น จึงทำให้มีนักวิจัยจำนวนมากให้ความสนใจต่อพันธุ์ข้าวที่สร้างรงควัตถุเหล่านี้เนื่องจากมีประโยชน์ต่อมนุษย์มากมาย

ฟลาโวนอยด์

สารฟลาโวนอยด์ได้มีการรายงานไว้กว่า 10,000 ชนิด จัดอยู่ในกลุ่มของสาร secondary metabolites ขนาดใหญ่ (Kim et al., 2008) ส่วนใหญ่จะมีโครงสร้างหลักเป็น C_6-C_3-C_6 ประกอบด้วยคาร์บอน 15 ตัว กับวงแหวน 2 วง ที่เชื่อมกับสะพานคาร์บอน 3 แห่ง (Jaganath and Crozier, 2011) (ภาพที่ 8) สามารถแบ่งกลุ่มของฟลาโวนอยด์ตามโครงสร้างได้ 6 กลุ่ม ดังนี้

- Flavonols ได้แก่ myricetin, kaempferol, quercetin และ isorhamnetin
- Flavones ได้แก่ luteonin, apigenin และ tangeritin
- Flavanones ได้แก่ hesteretin, naringenin และ eriodictyol
- Flavan-3-ols ได้แก่ catechins และ epicatechins
- Isoflavones ได้แก่ genistein, daidzein และ glycitein
- Anthocyanidins ได้แก่ cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin และ petunidin (Lepiniec et al., 2006)

สารในกลุ่มของฟลาโวนอยด์จะเกิดการสังเคราะห์ในระยะการพัฒนาขั้นต่าง ๆ ในพืช และที่พบมีการสังเคราะห์ในเมล็ดธัญพืช ได้แก่ กลุ่มฟลาโวนอล (flavonols), แอนโทไซยานิน (anthocyanins) และโปรแอนโทไซยานิดิน (proanthocyanidins) (Zehou et al., 2013) ซึ่งทำหน้าที่ปกป้องพืชจากโรคและความเครียดต่าง ๆ ป้องกันรังสี UV (Kootatra, 1994; Agati et al., 2011; Kim et al., 2012) ต้านทานแมลง (Abdel-Aal et al., 2001) การสังเคราะห์สีในเนื้อเยื่อต่าง ๆ (Gu et al., 2011; Himi et al., 2011) และยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมการสังเคราะห์ออกซินอีกด้วย (Muphy et al., 2000; Buer and Muday, 2004)



ภาพที่ 8 โครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์

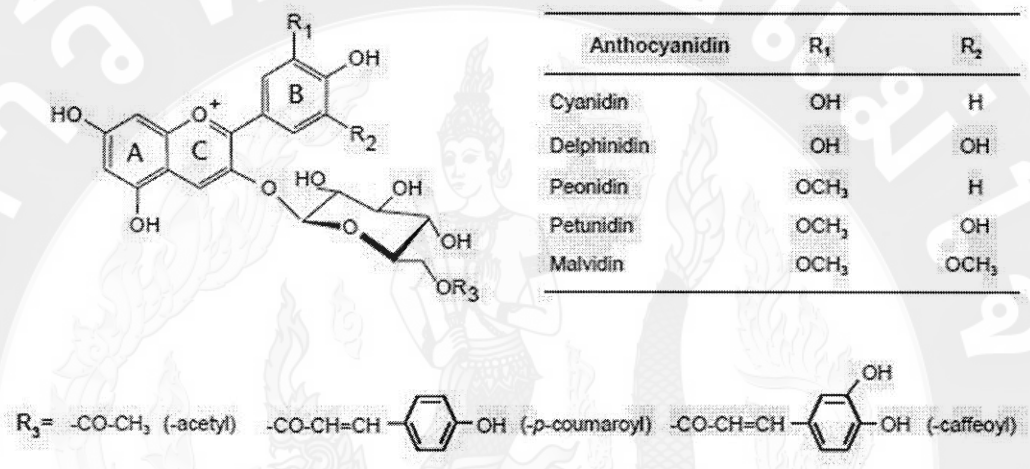
ที่มา: Jaganath and Crozier (2011)

รงควัตถุในเมล็ดข้าว

1. แอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานิน (anthocyanins) มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย คาร์บอนเชื่อมต่อกันในรูป C_6-C_3-C_6 (ภาพที่ 9) เป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ (water-soluble pigments) จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สีของแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะความเป็นกรด-ด่าง ในสภาวะที่เป็นด่าง (pH มากกว่า 7) จะเกิดสีน้ำเงินเข้ม เมื่อเป็นกลาง (pH 7) เกิดสีม่วง และจะเกิดเป็นสีแดงส้มในสภาวะที่เป็นกรด (pH น้อยกว่า 7) (กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553) สารในกลุ่มแอนโทไซยานินมีอยู่ 6 ชนิดที่พบบ่อย ได้แก่ เพลาโกนิดิน (pelargonidin), ไซยานิดิน (cyanidin), เดลฟินิดิน (delphinidin), พีโอนิดิน (peonidin), เพทูนิดิน (petunidin) และ มาลวิดิน (malvidin) ซึ่งในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำจะพบสารแอนโทไซยานินอยู่ 2 ชนิด คือ ไซยานิดิน และ พีโอนิดิน ซึ่งมีบทบาทช่วยต้านอนุมูลอิสระ มีการวิจัยพบว่าแอนโทไซยานินมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าวิตามินซีและอีถึง 2 เท่า ลดอาการอักเสบ ช่วยปกป้องหลอดเลือด กระตุ้นการ

ไหลเวียนของเลือด ลดความเสี่ยงในการเป็นโรคหัวใจหลอดเลือดได้ สามารถลดคอเลสเตอรอลในเลือด ป้องกันมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งลำไส้และตับ มะเร็งเม็ดเลือดขาวและ มะเร็งของระบบสืบพันธุ์ และยังสามารถยับยั้งเชื้ออีโคไลในทางเดินอาหารที่ทำให้เกิดท้องเสียได้ (Pascual and Sanchez, 2008; นิศารัตน์, ม.ป.ป.)



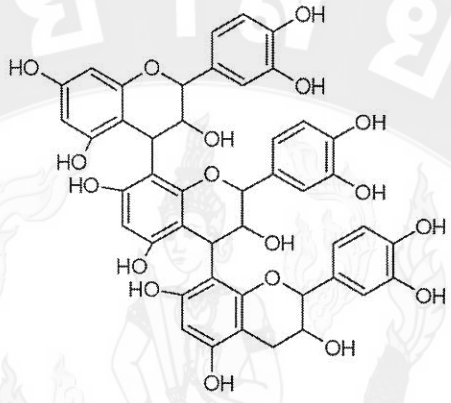
ภาพที่ 9 โครงสร้างของสารแอนโทไซยานิน

ที่มา: Fournier et al. (2010)

2. โปรแอนโทไซยานิดิน

สารโปรแอนโทไซยานิดิน (proanthocyanidins) พบสะสมอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของพืช ประกอบด้วย Oligomers หรือ polymers ของ flavan-3-ol ซึ่งโปรแอนโทไซยานิดินส่วนใหญ่ถูกสังเคราะห์จาก flavan-3-ols, (+) catechin-(2,3-*trans*-flavav-3-ol) และ (-)-epicatechin-(2,3-*cis*-flavan-3-ol) (ภาพที่ 10) (Furukawa et al., 2006) โดยเป็นสารที่ได้จากวิถีการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ มีคุณสมบัติเป็นสาร antioxidant ที่มีประสิทธิภาพการทำงานดีกว่าวิตามินซี วิตามินอี และเบต้าคาโรทีน สามารถยับยั้งการเกิดโรค atherosclerosis ได้โดยไปยับยั้งการเกิด oxidized ใน low-density lipoproteins (LDL) ซึ่งทำความเสียหายกับเซลล์ที่ผนังเส้นเลือด ก่อให้เกิดการอักเสบของเซลล์ smooth muscle เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเกิดกลไกการจับตัวของเลือด (clotting) ซึ่งเป็นสาเหตุนำไปสู่โรค atherosclerosis และยังป้องกันการเกิดมะเร็งโดยจะไปฆ่าเซลล์มะเร็งหรือยับยั้งไม่ให้เจริญเติบโตได้ทั้งใน โพรงจมูก ปอด กระเพาะอาหาร และเซลล์เม็ดเลือดขาว นอกจากนี้

ยังพบว่าสารโปรแอนโทไซยานิดิน ยังป้องกันไวรัส จากการทดลอง (*in vitro*) พบว่าสารโปรแอนโทไซยานิดินสามารถฆ่าไวรัส HSV-1 และมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase ในไวรัส HIV-1 ได้ นอกจากป้องกันโรคแล้ว สารโปรแอนโทไซยานิดินยังสามารถบำรุงผิวพรรณให้ดูอ่อนกว่าวัย (บริษัท สีนิลไรซ์, 2558)

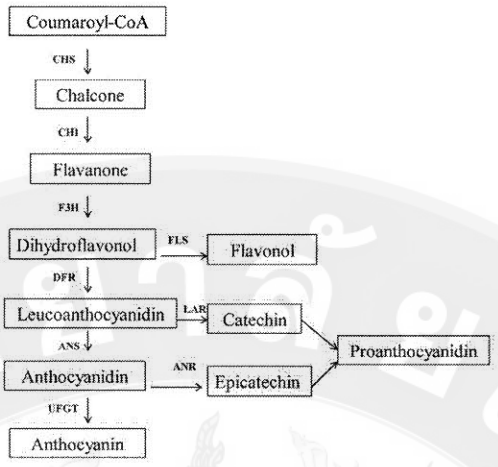


ภาพที่ 10 โครงสร้างของสารโปรแอนโทไซยานิดิน

ที่มา: Wikimedia (2010)

การสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดิน

สารแอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดิน มีขั้นตอนการสังเคราะห์สารในช่วงต้นและกลางของวิถีการสังเคราะห์เหมือนกัน แต่จะเกิดจุดแยกหลังจากขั้นตอนการสังเคราะห์ที่เร่งโดยเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) ซึ่งสารโปรแอนโทไซยานิดินจะถูกสังเคราะห์โดยสองวิถีหลักคือวิถีแรกผ่านการเร่งปฏิกิริยาโดย leucoanthocyanidin reductase (LAR) และวิถีที่สองเร่งปฏิกิริยาโดย anthocyanidin synthase (ANS) และ anthocyanidin reductase (ANR) ในขณะที่แอนโทไซยานินจะถูกสังเคราะห์โดยการเร่งปฏิกิริยาของ anthocyanidin synthase (ANS) และ UFGT ดังแสดงใน ภาพที่ 11 (Winkel, 2001; Marles et al., 2003; Chen et al., 2013)



ภาพที่ 11 วิถีการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์

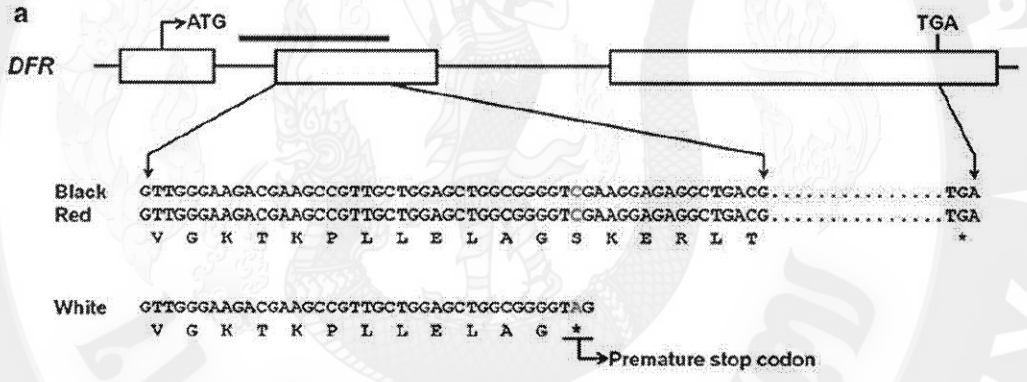
ที่มา: Chen et al. (2013)

ยีน *OsDFR*

ในกระบวนการสังเคราะห์สีในข้าวจะเกิดขึ้นได้จะต้องประกอบด้วยการทำงานของยีน 2 กลุ่ม ได้แก่ ยีนที่ทำหน้าที่ควบคุม (transcription factor gene) และยีนโครงสร้าง (structural gene) ซึ่งยีนโครงสร้างที่สำคัญคือ ยีน *OsDFR* หรือ *Rd* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 ของข้าว ที่ตำแหน่ง 83 cM (Kinoshita, 1995) ประกอบด้วย 3 เอกซอน และ 2 อินทรอน (Nakai et al., 1998) เป็นยีนโครงสร้างที่มีรหัสสร้างเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) จากการศึกษาของ Furukawa et al. (2006) พบว่าในข้าวสีแดงที่มีการสะสมของสารโปรแอนโทไซยานิดินเกิดจากการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในตำแหน่ง *Rd* ที่ทำหน้าที่ในการส่งเสริมการการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินร่วมกับการแสดงออกของยีน *Rc* ทำหน้าที่เป็นทรานสคริพชันแฟกเตอร์ จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน basic helix-loop-helix (bHLH) ซึ่งจากการศึกษาโดยการโคลนยีน *DFR* ที่มีจีโนไทป์ *rcRd* จากข้าวพันธุ์ Murasakiine แล้วทำการถ่ายยีนไปสู่ข้าวสายพันธุ์ tRc ที่มีจีโนไทป์เป็น *Rcrd* พบว่าข้าวที่มีจีโนไทป์แบบ *RcRd* ทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดของข้าวเกิดเป็นสีแดง ถ้าเกิดการกลายพันธุ์ที่ยีน *Rd* จะได้จีโนไทป์แบบ *Rcrd* มีผลทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีน้ำตาล และหากเกิดการกลายพันธุ์ที่ยีน *Rc* จะได้จีโนไทป์อยู่ 2 แบบ คือ *rcRd* และ *rcrd* มีผลทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีขาว ซึ่งพบว่ายีน *DFR* เป็นเอนไซม์สำคัญ (key enzyme) ในวิถีการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดิน (Chandler et al., 1989; Furukawa et al., 2006)

จากการรายงานของ Chen et al. (2013) ที่ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *DFR* ในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันในข้าวจาปอนิกา 4 สายพันธุ์ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว แดง ดำ และเขียว ด้วยเทคนิค qRT-PCR พบว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงมีการแสดงออกของยีน *DFR* สูงที่สุดในเมล็ดที่อายุ 5 วันหลังดอกบาน รองลงมาในราก ต้นอ่อน ใบธง และกาบใบต่ำที่สุด ในขณะที่ข้าวสีขาวพบการแสดงออกที่ต่ำมากหรืออาจไม่มีการแสดงออกเลยในทุกเนื้อเยื่อ

จากการศึกษาของ Lim and Ha (2013) ที่ได้ทำการศึกษายีน *DFR* ในข้าว 34 สายพันธุ์ พบว่าในเอกซอนที่ 2 เกิดการแทนที่ของลำดับเบส โดยในข้าวสีจะพบเบส Cytosine (C) แต่เฉพาะข้าวขาวเท่านั้นที่มีการเปลี่ยนไปเป็นเบส Adenine (A) ทำให้เกิด premature stop codon ดังภาพที่ 12 จึงทำให้ยีน *DFR* ในข้าวขาวอาจสูญเสียการทำงานได้ จึงทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์สีในเยื่อหุ้มเมล็ด



ภาพที่ 12 โครงสร้างของยีน *OsDFR*

ที่มา: Lim and Ha (2013)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หมายถึง การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช (explant) หรืออาจหมายถึง การเพาะเลี้ยงเซลล์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือการเพาะเลี้ยงอวัยวะ ในการสังเคราะห์อาหารสูตรต่าง ๆ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและปลอดเชื้อ นักวิทยาศาสตร์พบว่าเซลล์ของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความสามารถที่จะเติบโตเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ โดยที่เซลล์จะมีรูปร่างคล้ายไซโกต (zygote) และทำหน้าที่เป็นไซโกตได้ โดยมีการแสดงออกของยีน (gene) เหมือนเดิม ความสามารถของเซลล์เช่นนี้

เรียกว่า โททิโปเทนซี (totipotency) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวนี้เองทำให้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการขยายพันธุ์พืช การปรับปรุงพันธุ์ร่วมกับเทคโนโลยีทางพันธุศาสตร์โมเลกุลเพื่อการตัดต่อยีนให้ได้ต้นพืชที่มีลักษณะที่ต้องการ ในปัจจุบันมีผลผลิตพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก ซึ่งจะประสบผลสำเร็จเช่นในขณะนี้ต้องผ่านการศึกษาวิจัย พัฒนาความรู้มาเป็นระยะ ๆ (สมพร, 2549)

1. ประวัติของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ความสำเร็จแรกของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มในปี ค.ศ. 1902 เมื่อ Gottlieb Haberlandt รายงานการทดลองของเขาโดยนำเซลล์จากใบเลี้ยงมาเลี้ยงเพื่อให้เซลล์มีการแบ่งตัว และเจริญเติบโตไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ทั้งต้นโดยอาศัยคุณสมบัติโททิโปเทนซี แต่ Haberlandt ยังไม่ประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลล์จากใบพืชนี้ เหตุผลที่การทดลองครั้งนี้ยังไม่ประสบผลสำเร็จอาจเป็นเพราะยังไม่มีการค้นพบสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators; PGRs) ซึ่งมีส่วนช่วยให้มีการแบ่งตัวของเซลล์ เมื่อมีการนำสารควบคุมการเจริญเติบโตใส่ลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์พืช

ความพยายามของนักวิทยาศาสตร์ในการหาเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ทำกันมาอย่างต่อเนื่อง ในปี ค.ศ. 1940 Hanning ได้ทดลองการเลี้ยงคัพภะ (embryo) ของพืชสกุลผักกาด (crucifer) เป็นผลสำเร็จ ยิ่งกว่านั้นในปี ค.ศ. 1922 Kotte ได้พยายามพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่อจาก Haberlandt โดยใช้เนื้อเยื่อเจริญ (meristem) จากรากของต้นหญ้ามาเลี้ยงในอาหารเหลว (liquid medium) แทนการใช้เซลล์เดี่ยวอย่างที่ Haberlandt ใช้ในการศึกษา พบว่าปลายรากมีการเจริญได้ระยะหนึ่ง ในปีเดียวกันนี้เอง Robbins ประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงปลายรากเช่นกัน

จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1934 White รายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงปลายรากของมะเขือเทศ และสามารถทำให้ปลายรากเจริญต่อไปได้โดยการย้ายลงอาหารใหม่ (subculture) ที่ประกอบด้วยเกลืออนินทรีย์ (inorganic salt) ยีสต์สกัด (yeast extract) และน้ำตาลซูโครส (sucrose) ซึ่งต่อมาได้มีการค้นพบวิตามินบี คือ ไทอามีน (thiamine) ไพรีดอกซิน (pyridoxin) และกรดนิโคตินิก (nicotinic acid) วิตามินบีดังกล่าวนำมาใช้แทนยีสต์สกัดซึ่งให้ผลต่อการเจริญของรากเป็นอย่างดี การค้นพบสูตรอาหารของ White ทำให้มีการเพาะเลี้ยงปลายรากของพืชอีกหลายชนิด ในปีเดียวกัน Gautheret ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อแคมเบียม (cambium) ของต้นหลิว

ทำให้เกิดแคลลัส (callus) บนอาหารที่มีวิตามินบี และสารควบคุมการเจริญเติบโตกรดอินโดลอะซิติก (indole acetic acid; IAA)

ถัดมาในปี ค.ศ. 1936 La Rue ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงคัพภะของพืชได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงคัพภะโดย Hanning ที่ได้ทำการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ ต่อมาประมาณปี ค.ศ. 1939 Nobecourt สามารถเลี้ยงแคลลัสของแครอทที่ชักนำมาจากส่วนรากได้สำเร็จ และ White ชักนำให้เกิดกลุ่มเซลล์ของยาสูบ จากความสำเร็จที่ผ่านมาทำให้มีการตื่นตัวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากขึ้น

ระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 (ปี ค.ศ. 1939 ถึง ปี ค.ศ. 1945) ยังมีความก้าวหน้าของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดย Johannes Van Overbeek และเพื่อนร่วมงาน ได้รายงานถึงการเกิดต้นจากคัพภะรูปหัวใจ (heart-shaped embryo) ในอาหารที่มีน้ำมะพร้าว สารอาหารและวิตามินต่าง ๆ หลังปี ค.ศ. 1950 เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชพัฒนาอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการค้นพบสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ไปมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชเช่น ออกซิน (auxin) และไซโทไคนิน (cytokinin)

ประมาณปี ค.ศ. 1954 Muir และคณะสามารถชักนำให้เกิดต้นพืชจากเซลล์เดี่ยว ๆ ได้ โดยการแยกเซลล์เดี่ยว ๆ มาเลี้ยงบนกระดาษกรองที่วางอยู่บนแคลลัส ซึ่งแคลลัสจะทำหน้าที่เป็นเซลล์พี่เลี้ยงให้กับเซลล์เดี่ยว ๆ นอกจากนี้มีการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลวได้เป็นผลสำเร็จ ในปี ค.ศ. 1956 โดย Nickell เลี้ยงเซลล์ของถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris*) ได้สำเร็จ

ต่อมาในปี ค.ศ. 1960 Bergmann ได้พัฒนาเทคนิคการแยกเซลล์เดี่ยวแล้วนำไปเลี้ยงในอาหารที่ผสมวุ้น (agar) เซลล์เดี่ยวสามารถแบ่งตัวและเจริญเป็นแคลลัสได้ ต่อจากนั้นในปี ค.ศ. 1962 Murashige และ Skoog พัฒนาสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงแคลลัสของยาสูบเรียกสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงว่าสูตรอาหาร Murashige and Skoog medium (MS medium)

สำหรับรายงานการสร้างพืชแฮพลอยด์ (hapliod) เริ่มปรากฏครั้งแรกจากรายงานของ Guha และ Muheshwari ในปี ค.ศ. 1966 ซึ่งศึกษาในพืช Datura และในปี ค.ศ. 1967 Bourgin และ Nitch สร้างพืชแฮพลอยด์จากการเลี้ยงเรณูของยาสูบ

ในปี ค.ศ. 1971 Takeba และคณะได้ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์เป็นเซลล์ซึ่งไม่มีผนังเซลล์ (cell wall) จึงเหมาะที่จะทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอหรือสร้างลูกผสมจากพืช (somatic hybridization) ทำให้งานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก้าวหน้า

ไปอย่างมาก ด้วยอาศัยคุณสมบัติโททิโปเทนซี ความสามารถในการถ่ายโอนดีเอ็นอ ทำให้เกิดพืชการค้าที่เกิดจากการดัดแปลงยีน ที่เรียกว่า พืช GMO (genetically modified organism)

ในปี ค.ศ. 1998 มากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ของพืช GMO มักมีการถ่ายโอนยีนที่ต้านทานต่อยาฆ่าแมลง และสารกำจัดวัชพืช เทคนิค GMO นำมาใช้ในการเพิ่มผลผลิตของพืช การปรับปรุงพันธุ์พืช เป็นต้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในปัจจุบันมีความสำคัญซึ่งเป็นเครื่องมือในการพัฒนาพืชตามที่เราต้องการ จะได้เห็นจากมีการศึกษาและวิจัยทางด้านนี้อย่างต่อเนื่อง (สมพร, 2549)

2. ประโยชน์ของการเพาะลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. การขยายพันธุ์ (propagation) เป็นการนำชิ้นส่วนใด ๆ ของพืชมาเพาะเลี้ยงในอาหารเทียมในสภาพปลอดเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณ เช่น การขยายพันธุ์กล้วยไม้ ไม้ดอกไม้ประดับ รวมถึงพืชผักบางชนิด ปัจจุบันใช้เพื่อผลิตพืชในเชิงการค้าอย่างกว้างขวาง

2. การผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) สารเคมีที่ใช้เป็นยารักษาโรคต่าง ๆ ในอดีตจนถึงปัจจุบันได้มาจากพืชเป็นส่วนใหญ่ สารเคมีดังกล่าวที่พืชผลิตได้ไม่เป็นประโยชน์โดยตรงต่อพืช จึงถือว่าเป็นสารทุติยภูมิ ซึ่งประมาณว่ามีมากกว่า 5 หมื่นชนิด บางชนิดก็ผลิตโดยพืชบางกลุ่มเท่านั้น แม้ว่าสารทุติยภูมิหลายชนิดสามารถผลิตได้โดยการสังเคราะห์ แต่ได้ในปริมาณที่น้อย ตัวอย่างของสารเคมีที่มนุษย์นำมาจากพืชเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ที่รู้จักกันดี เช่น ควินิน ใช้เป็นยา วานิลลา เป็นสารให้กลิ่นและไพรีธริน สำหรับปราบแมลงศัตรูพืช เป็นต้น

3. การแปรปรวนทางพันธุกรรม (somaclonal variation) ในขั้นตอนของการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเทียม อาจมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ได้สายพันธุ์เซลล์ที่กลายไป บางครั้งจะเป็นลักษณะที่เป็นประโยชน์ เช่น การพบสายพันธุ์มะเขือเทศที่มีปริมาณน้ำในผลน้อยลงกว่าพันธุ์เดิม ทำให้เป็นผลดีต่ออุตสาหกรรมการผลิตซอสมะเขือเทศเพราะลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการลดปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์

4. การคัดเลือกสายพันธุ์กลาย (mutant selection) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชในอาหารจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในระดับเซลล์ใดเซลล์หนึ่ง เมื่อสภาวะต่าง ๆ ลงในอาหารก็จะสามารถคัดเลือกได้สายพันธุ์กลาย เช่น การคัดเลือกเพื่อให้เกิดความต้านทานโรคบางชนิด โดยการใส่ toxin ที่เชื้อโรค ผลิตลงในอาหารคัดเลือก หรือใส่สารเคมีกำจัดวัชพืช เพื่อคัดเลือกให้ได้สายพันธุ์กลายที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช

5. การผลิตสายพันธุ์แท้ (inbred production) การนำเอาละอองเรณู หรืออับเรณูของพืชมาเลี้ยงในอาหารจนเกิดเป็นเนื้อเยื่อที่มีจำนวนโครโมโซมครึ่งหนึ่งของโครโมโซมปกติ เมื่อทำการเพิ่มชุดโครโมโซมให้เป็น 2n ก็จะได้สายพันธุ์แท้ทันทีจึงเป็นวิธีการผลิตสายพันธุ์แท้ที่รวดเร็ว

6. การศึกษาทางชีวเคมี (biochemical study) เนื่องจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารก็ทำหน้าที่เช่นเดียวกับเซลล์ในต้นพืชจริง ๆ แต่เซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร เช่น เซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงในอาหารและจะมีลักษณะและอายุใกล้เคียงกัน หรือสามารถทำให้ประชากรเซลล์มีวัฏจักรของเซลล์เหมือนกัน จึงทำให้การศึกษาถึงกระบวนการต่าง ๆ ทางชีวเคมีมีประสิทธิภาพดี เพราะเซลล์อยู่ในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน ได้รับอาหารเหมือนกันและปราศจากเชื้อโรค เป็นต้น

7. การผสมเซลล์ (cell fusion) เมื่อย่อยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์จะได้เซลล์ไร้ผนัง สามารถนำเซลล์ของพืชต่างพันธุ์ หรือแม้แต่ต่างชนิดกันมาผสมกันได้ ซึ่งจะได้สายพันธุ์เซลล์ใหม่ เป็นการผสมพันธุ์พืชวิธีหนึ่งโดยใช้เทคโนโลยีขั้นสูง

8. การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม (genetic transformation) เป็นขั้นตอนของการถ่ายทอดยีนที่ต้องการ โดยอาศัยวิธีทางพันธุวิศวกรรม ยีนดังกล่าวนั้นอาจจะได้มาจากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ แล้วอาศัยให้แบคทีเรียชนิดหนึ่งเป็นพาหะนำยีนเข้าสู่เซลล์พืช หรืออาจใช้อุปกรณ์พิเศษนำยีนนั้นเข้าไปยังเซลล์พืชที่ต้องการ

การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของพืชด้วยเทคนิคสมัยใหม่นี้ สามารถทำได้หลายวิธี ขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องคือการเลี้ยงเซลล์ในอาหารตลอดจนการชักนำกลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงได้ให้กลายเป็นต้นพืช

9. การชักนำให้เกิดต้น (plant regeneration) การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชให้เป็นแคลลัส แล้วเลี้ยงในอาหาร เพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้น เป็นเป้าหมายสุดท้ายที่จะได้มาซึ่งพืชที่ต้องการ ดังนั้นชนิดของอาหารและเทคนิคต่าง ๆ ในขั้นตอนนี้มีความสำคัญที่จะทำให้กระบวนการต่าง ๆ ที่กล่าวถึงทั้งหมดประสบผลสำเร็จ

10. การเก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง (cryopreservation) เป็นกระบวนการหนึ่งที่ใช้สำหรับเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมไว้ในระยะยาว โดยการเก็บเนื้อเยื่อแช่เย็นจัดเพื่อหยุดยั้งกระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์ เมื่อนำมาชักนำให้เกิดเป็นต้น ก็จะได้พืชพันธุ์นั้นกลับคืนมา (อารีย์, 2541)

พันธุวิศกรรมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

พันธุวิศวกรรม (สมพร, 2549) หมายถึง การตัดต่อสายดีเอ็นเอในหลอดทดลองเพื่อสร้างยีนใหม่ในสิ่งมีชีวิต โดยสายดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นจะถูกใส่กลับเข้าไปในสิ่งมีชีวิตเพื่อให้มีการแสดงออกของยีนใหม่ที่ใส่เข้าไป โดยขั้นตอนของพันธุวิศวกรรม มีดังนี้

1. การตัดต่อสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีรหัสพันธุกรรมตามที่ต้องการ

2. การตัดดีเอ็นเอพาหะ (vector) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอพาหะเข้ากับสายดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเอนไซม์เชื่อมต่อ (ligase enzyme) การต่อเข้ากับพาหะเพื่อเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอที่ต้องการ เพราะพาหะสามารถเพิ่มจำนวนได้ และสามารถนำดีเอ็นเอที่ต้องการเข้าสู่เซลล์และคงสภาพอยู่ได้ภายในเซลล์

3. การนำสายดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) ที่ผ่านการตัดต่อเข้าสู่สิ่งมีชีวิตเพื่อเพิ่มจำนวนและให้มีการแสดงออกของรหัสพันธุกรรมขึ้น

1. คุณสมบัติของเอนไซม์ที่ใช้ในการตัดต่อสายดีเอ็นเอ

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เป็นเอนไซม์ที่ตัดสายดีเอ็นเอตรงบริเวณที่มีลำดับเบสอย่างจำเพาะเจาะจง (specific recognition sites) ทำให้มีประโยชน์โดยตรงต่องานพันธุวิศวกรรม เอนไซม์ตัดจำเพาะจะตัดสายดีเอ็นเอพร้อมกันทั้งสองสาย ปลายสายดีเอ็นเอที่ถูกตัดเป็นไปได้ 2 แบบ คือ ปลายเหนียว (sticky end) และปลายทู่ (blunt end) ขึ้นอยู่กับจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะว่าจะอยู่ระหว่างเบสตัวใดของบริเวณที่มีลำดับเบสอย่างจำเพาะเจาะจง โดยที่บริเวณนี้จะประกอบไปด้วยเบสมีจำนวนเป็นคู่ มีลักษณะเป็นลำดับพาลินโดรม (palindromic sequence) กล่าวคือ ครึ่งแรกของลำดับเบสใน recognition site จะเป็นเบสคู่สมกับเบสในครึ่งหลัง

เอนไซม์ไลเกส (ligase enzyme) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเชื่อมสายดีเอ็นเอ โดยมีการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (phosphodiester bond) เชื่อมระหว่างนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) โดยปลายหนึ่งจะต้องเป็นหมู่ฟอสเฟส (PO_4^-) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของนิวคลีโอไทด์ และอีกปลายหนึ่งเป็นหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของอีกโมเลกุลหนึ่ง

2. พาหะ

พลาสมิด (Plasmid) เป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่อยู่เป็นอิสระภายในเซลล์ไม่ใช่ chromosomal DNA ซึ่งมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในงานด้านพันธุวิศวกรรม ดังนี้คือ

1. จุดเริ่มต้นของการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (origin of replication)
2. บริเวณที่แทรกของชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจ (multiple cloning site)
3. บริเวณคัดเลือก (selectable marker)

3. การย้ายยีนเข้าสู่สิ่งมีชีวิต

การใช้พันธุวิศวกรรมช่วยในการย้ายยีน สามารถนำยีนที่แสดงออกตามลักษณะที่เราต้องการเท่านั้นเข้าสู่เซลล์พืช พืชที่ได้รับการสอดแทรกยีนเข้าไปจะเรียกว่า พืชดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic plant) การสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมนี้จำเป็นต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมด้วย ในที่นี้จะกล่าวถึงการย้ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium*)

Agrobacterium tumefaciens เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดิน แบคทีเรียนี้สามารถทำให้เกิดการสร้างปุ่มปมในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะในพืชใบเลี้ยงคู่ เซลล์พืชที่เป็นปุ่มปมนี้จะผลิตสารประกอบกลุ่มหนึ่ง ชื่อว่า opines ซึ่งจะไม่พบสารนี้ในพืชปกติธรรมดา สาร opines ได้รับการศึกษาอย่างละเอียดแล้ว คือ octopine ซึ่งเป็นสารประกอบของกรดอะมิโน arginine และ pyruvic acid ส่วน nopaline เป็นสารประกอบของ arginine กับ alphaketo-glutaric acid แบคทีเรียนี้เข้าทำลายพืชโดยการถ่าย T-DNA ของ Ti-plasmid เข้าสู่เซลล์พืช T-DNA จะเข้าไปเชื่อมอยู่ใน DNA ของพืช ทำให้เกิดปุ่มปมเพราะ T-DNA มียีนควบคุมการสังเคราะห์ฮอร์โมน เมื่อมีปริมาณฮอร์โมนมากกว่าปกติจึงเกิดลักษณะปุ่มปมขึ้นลักษณะเป็นก้อนเรียกว่า tumor (Ti มาจาก Tumor inducing) สำหรับเชื้อ *A. tumefaciens* ที่นำมาใช้ในการถ่ายยีนจะมีการตัดยีนควบคุมการสร้างฮอร์โมนออกโดยไม่ทำให้พืชเกิดโรค แต่สามารถนำยีนที่ต้องการเข้าสู่เซลล์พืชได้

4. การคัดเลือกเซลล์หรือแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน

เพื่อจะให้ทราบว่าตัวอย่างที่นำไปเลี้ยงมียีนที่ได้รับการถ่ายเข้าไปภายในตัวอย่างพืชจริง จำเป็นต้องทำการตรวจสอบ วิธีการตรวจสอบมีวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

1. การตรวจสอบด้วยสายตาโดยอาศัยยีนรายงานผล (reporter gene)

โดยอาศัยยีนรายงานผลที่เป็นโครงสร้างของกลุ่มยีนที่ใส่เข้าไปในพืช เป็นยีนที่ใช้ตรวจสอบความสำเร็จของการถ่ายยีน ซึ่งก็คือยีน *gus* เมื่อพืชได้รับยีนนี้เข้าไปจะทำปฏิกิริยากับสาร X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid) จะทำให้เกิดสีน้ำเงินขึ้น เมื่อนำตัวอย่างพืชมาทำปฏิกิริยากับสาร X-Gluc แล้วเกิดจุดสีน้ำเงินขึ้นแสดงว่าตัวอย่างพืชได้รับการถ่ายยีนเข้าไป

2. การตรวจสอบด้วยยีนคัดเลือก (selectable marker)

โดยใช้ยีนเครื่องหมายที่มีคุณสมบัติต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ เมื่อนำตัวอย่างพืชไปเลี้ยงในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ หากตัวอย่างทนทานและมีการพัฒนาต่อไปได้แสดงว่าตัวอย่างพืชได้รับการถ่ายยีนที่ใส่เข้าไป

การทดสอบต้นพืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (อังกฤษ: Polymerase chain reaction; ตัวย่อ: PCR) เป็นกระบวนการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ซึ่งกระบวนการนี้เลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต ผู้คิดค้นเทคนิคพีซีอาร์ คือ Kary Mullis (Mullis, 1987) พีซีอาร์ประกอบไปด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (Denaturation) ใช้อุณหภูมิ ประมาณ 94 องศาเซลเซียส เมื่อเริ่มต้นดีเอ็นเอแม่แบบ จะอยู่ในลักษณะที่เป็นเกลียวคู่ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึงประมาณ 94 องศาเซลเซียส จะทำให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอถูกทำลาย ทำให้เส้นดีเอ็นเอแยกออกจากกัน โดยขั้นตอนนี้จะแตกต่างจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในธรรมชาติ คือ ในสิ่งมีชีวิตจะมีเอนไซม์เฮลิเคส (Helicase) ช่วยในการแยกสายและคลายเกลียวดีเอ็นเอ

2. การจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing) ใช้อุณหภูมิประมาณ 40 - 62 องศาเซลเซียส เมื่อแยกสายดีเอ็นเอออกจากกันแล้ว จะลดอุณหภูมิลงเหลือ 40 - 62 องศาเซลเซียส เพื่อให้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ขนาดสั้นประมาณ 15 - 25 เบส ที่เรียกว่า ไพรเมอร์ (Primer) เข้ามาจับบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมกัน ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ไม่สามารถที่จะเริ่มได้เนื่องจากเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ต้องการปลาย -OH ทางด้าน 3' เพื่อนำ นิวคลีโอไทด์ตัวต่อไปมาต่อ ซึ่งในสิ่งมีชีวิตจะมีเอนไซม์ที่มีชื่อว่า ไพรเมส (Primase) เป็นตัวสร้างอาร์เอ็นเอไพรเมอร์ขึ้น

3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (Extension) ใช้อุณหภูมิ ประมาณ 68 - 72 องศาเซลเซียส ในขั้นตอนนี้จะเป็นการสร้างสายดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ โดยอุณหภูมิที่ใช้จะพอเหมาะกับ การทำงานของ DNA polymerase

องค์ประกอบที่สำคัญในการทำ PCR ได้แก่

1. ดีเอ็นเอแม่แบบ (Template DNA)
2. ไพรเมอร์ Primer
3. เอนไซม์ DNA Polymerase ชนิดทนความร้อน (*Taq* DNA polymerase)
4. Deoxynucleoside triphosphate (dNTP)
5. บัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (PCR Buffer)
6. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)
7. เครื่องมือที่สำคัญในการทำพีซีอาร์ได้แก่ Thermal cycler หรือ PCR machine

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการวิจัย

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาทดลองในครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์มาจาก Prof. Dr. Thomas W. Okita จาก Institute of Biological Chemistry, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ผศ. ดร. วราภรณ์ แสงทอง สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และ ผศ. ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน) กรุงเทพมหานคร

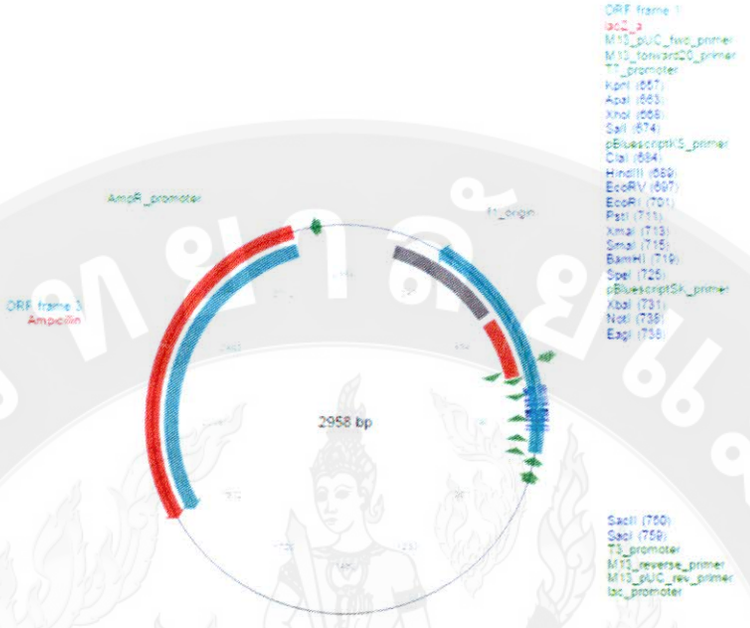
1. พันธุ์ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 กข6 Taichung 65 และ Kitaake
2. พันธุ์ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง ได้แก่ สังข์หยด หอมมะลิแดง และ Kasalath
3. พันธุ์ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ ได้แก่ ลืมผัว (มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่) ก่ำ (หมู่บ้านหนองเต่าคำ จ. เชียงใหม่) และ หอมนิล

อะโกรแบคทีเรียม

อะโกรแบคทีเรียม ชื่อวิทยาศาสตร์ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Thomas W. Okita จาก Institute of Biological Chemistry, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา

พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

พลาสมิด pBluescript II SK (+) สำหรับโคลนยีน *OsDFR* จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อนำไปหาลำดับเบส (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 แผนที่พลาสมิด pBluescript II SK (+)

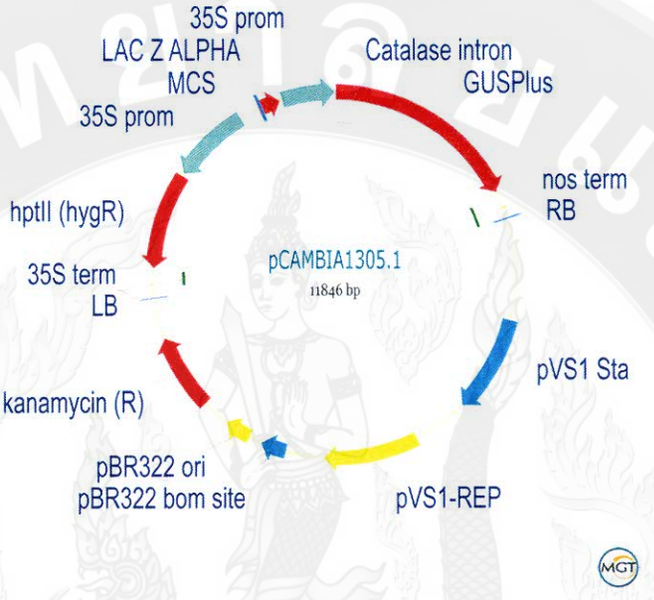
ที่มา: addgene (2017)

พลาสมิด p2CA สำหรับสร้างชุดยีนได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน) กรุงเทพมหานคร พลาสมิด p2CA ประกอบด้วยชุดยีน *npt*II ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos* terminator ภายในพลาสมิด pUC19 (ภาพที่ 14)

ภาพที่ 14 แผนที่พลาสมิด p2CA

หมายเหตุ H คือ บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII, X คือ *Xba*I, B คือ *Bam*HI, S คือ *Sac*I, E คือ *Eco*RI, CaMV35S คือ 35S Promoter, *nptII* คือ ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซิน และ T*nos* คือ *nos* Terminator

พลาสมิด pCAMBIA1305.1 ซึ่งเป็น T-DNA vector เพื่อใช้สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 แผนที่พลาสมิด pCAMBIA1305.1

ที่มา: Markergene Technologies (2017)

วัสดุและอุปกรณ์

1. ที่ตั้งหลอดทดลอง
2. กล้อง Stereo
3. กระบอกตวง
4. กระติกน้ำแข็ง
5. กระดาษทิชชู่
6. ขวดแก้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 12 ออนซ์
7. ขวดรูปชมพู่ (Flask)
8. เครื่อง vortex
9. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณภูมิ
10. จานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Petri dish)
11. ช้อนตักสาร
12. ตะเกียงแอลกอฮอล์
13. ตะแกรง
14. ถ้วยใส่สาร
15. ทัพพี
16. ทิป (Tip)
17. นาฬิกาจับเวลา
18. บีกเกอร์ (Beaker)
19. ปากคีบ (Forcep)
20. ปิเปตแก้ว
21. ไมโครปิเปต (Micropettes)
22. พลาสติกแรป (Plastic wrap)
23. หลอดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
24. ห่วงเขี่ยเชื้อ (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 T1000 (BioRad, USA)
4. เครื่อง Vortex GENIE-2 (Scienctific industry, USA)
5. เครื่องกวนสารและให้ความร้อน (Jemway 1000, UK)
6. เครื่องเขย่า Mini Rocker MR-1 (Bip san, USA)
7. เครื่องเขย่า Innova 2100 (New Brunswick Scientific, USA)
8. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ Orbital Shakering 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. เครื่องปั่นความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Universal 32R (Hettich, Germany)
14. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง Sartorius Professional Meter PP-50 (Sartorius, Germany)
15. เครื่องอิเล็คโทรฟอริซิส My Rn Intelligent Electrophoresis Unit (Tokyo, Japan)
16. เครื่องอิเล็คโทรฟอริซิส 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, Chaina)
22. หม้อนึ่งความดันไอ
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 (2.0 /n NaOH, 1% w/v SDS)
6. Alkaline lysis solution III (3M Na-Acetase pH 5.8 with glacial acetic acid)
7. Ammonium nitrate (QRec, New Zealand)
8. Ammonium peroxydisufate (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 pyrocabonate (DEPC) (Euro clone, Italy)
21. Dimethylsulfoxid (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. Gelzen-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-furturylaminopurine) (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, 0.05 w/v bromophenol blue)
40. Magnesium choride Hexahydrate (Bio Basic Inc, Canada)
41. Magnesium sulfate (Fister scientific, UK)
42. Magnesium (II) sulfate, monohydrate (Ajax finechem, New Zealand)
43. Montose (Monohydrate) (Merck, Germany)
44. Myo-inositol (Bio Basic Inc, Canada)
45. Nicotinic acid (Fluka, Switzerland)
46. Polyvinylpyrolidone (PVP-40) (Phytotechnology, USA)
47. Potassium chloride (Merck, Germany)
48. Potassium dichromate (Fisher scientific, UK)
49. Potassium dihydrogen orthophosphate (Fisher scientific, UK)
50. Potassium hexaacyanoferrate (II) (Ferrocyanide) (Fisher scientific, UK)
51. Potassium hexaacyanoferrate (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 (Fluku, Switzerland)
56. Sodium chloride (Merck, Germany)
57. Sodium dinydrogen orthophosphate dehydrate (Fisher scientific, UK)
58. Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Bio-Red, USA)

59. Sodium hydroxide (Merck, Germany)

60. Sodium-L-Ascorbate (Bio Basic Inc, Canada)

61. Sodium pyrophosphate tatrebasic decahydrate (Sigma Aldrich, Japan)

62. Sucrose (BDH Laboratory, England)

63. Tris (hydroxymethyl) aminomethane, Ultra pure, molecular biology grade (Research Organics, USA)

64. Tri-Sodium citrate dehydrate (VWR BDH Prolabo, EC)

65. Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific, USA)

66. Vitamin B1 Hydrochloride (Thiamine. HCl) (Fluka, UK)

67. X-gel (Bromo-4-chloro-3-Indolyl-b-D-galactopyranoside) (Bio Basic Inc, Canada)

68. X-Gluc (100 mM X-Gluc in Dimethylformamide) (Bio Basic Inc, Canada)

69. Yeast extract (Bio Basic Inc, Canada)

70. Zing sulphate (Ajax finechem, New Zealand)

71. β-Nicotinamide ademine dinucleotide phosphate hydrate (Bio Basic Inc, Canada)

72. 2-mercaptoethanol (Bio Basic Inc, Canada)

73. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (Phytotechnology, USA)

74. 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-acetophenone (acetosyringone) (Sigma Aldrich, Germany)

75. 5-Bromo-4-cgloro-3-indolyl-glucuronide (X-gluc) (Phytotechnology, USA)

76. 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronide (Bio Basic, Canada)

77. 10% Sodium hypocholoride (UNION Science, Thailand)

78. สีย้อมดีเอ็นเอ SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen, USA)

สารปฏิชีวนะที่ใช้

1. สารปฏิชีวนะกานามัยซิน (Kanamycin) (Bio scientific, USA)
2. สารปฏิชีวนะไทเมนทิน (Timentin) (Caisson, USA)
3. สารปฏิชีวนะไรแฟมพิซิน (Rifampicin) (Siam Bheasach, Thailand)
4. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicillin) (Sigma, Germany)

5. สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (Hygromycin) (Caisson, USA)

ดีเอ็นเอมาตรฐาน

1. GeneRuler ™ 100 bp Ladder Plus (Thermo Scientific, USA)
2. 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)

เอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. *Bam*HI - HF (New England Biolab, USA)
2. *Eco*RI – HF (New England Biolab, USA)
3. *Hin*dIII – HF (New England Biolab, USA)
4. *Sac*I – HF (New England Biolab, USA)
5. *Eco*RV – HF (New England Biolab, USA)
6. *Sma*I (New England Biolab, USA)

ชุดทดลองสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย

1. ชุด Superscript III Reverse Transcriptase system for RT-PCR (Thermo Fisher Scientific, USA)
2. ชุดแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจล Nucleospin Extract II Kit (Machery-Nagel, Germany)
3. ชุดสกัดพลาสมิด Nucleospin Plasmid (Machery-Nagel, Germany)
4. บัพเฟอร์สำเร็จรูป MyTaq HS Red Mix, 2x (BIOLINE, USA)
5. Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA)

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 6 ขั้นตอน

1. การค้นหายีน *OsDFR* จากข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวโดยวิธี mCTAB (Cetytrimethyl Ammonium Bromide)

1.2 การตรวจสอบยีน *OsDFR* ด้วยเทคนิค PCR

2. การค้นหายีน *OsDFR* โดยเทคนิค RT-PCR

2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบข้าว

2.2 การสังเคราะห์ First Strand cDNA โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Superscript III First-Strand Synthesis System

2.3 การค้นหายีน *OsDFR* โดยเทคนิค RT-PCR

3. การโคลนยีน *OsDFR* เข้าสู่พลาสมิด pBluescript II SK (+)

3.1 การเตรียมดีเอ็นเอพาหะ pBluescript II SK (+)

3.2 การแยกบริสุทธิ์ยีน *OsDFR* จากเจล

3.3 การเชื่อมชิ้นยีน *OsDFR* เข้ากับพลาสมิด pBluescript II SK (+) และส่งถ่ายเข้าสู่ *E. coli* competent cells

3.3.1 การเตรียม competent cells ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 alpha โดยวิธี $CaCl_2$

3.3.2 การคำนวณความเข้มข้นและหาอัตราส่วนระหว่าง vector และ insert ในปฏิกิริยาการเชื่อม

3.3.3 การเชื่อมชิ้นยีน *OsDFR* เข้ากับพลาสมิด pBluescript II SK (+)

3.4 การคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยขนาด (Rapid size screening)

3.5 วิธีการสกัดพลาสมิดด้วย CTAB mini plasmid preparation

3.6 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

3.7 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OsDFR* จากโคโลนีสายผสมที่ถูกคัดเลือก

4. การสร้างชุดยีน *OsDFR* ภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos* Terminator

4.1 การเตรียมพลาสมิด p2CA และชิ้นยีน *OsDFR*

4.1.1 การเตรียมพลาสมิด p2CA

4.1.2 การเตรียมชิ้นยีน *OsDFR*

4.2 การเชื่อมชิ้นยีน *OsDFR* เข้ากับพลาสมิด p2CA แล้วถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* competent cells

4.2.1 คำนวณความเข้มข้นและหาอัตราส่วนระหว่าง vector และ insert ในปฏิกิริยาการเชื่อม

4.3 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมจากการเชื่อมชิ้นยีน *OsDFR* เข้ากับพลาสมิด p2CA ด้วยขนาด (Rapid size screening)

4.4 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมจากการเชื่อมชิ้นยีน *OsDFR* เข้ากับพลาสมิด p2CA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

4.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OsDFR* จากโคโลนีสายผสมที่คัดเลือก

5. การสร้างพลาสมิดที่มีชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::T*nos* สำหรับถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว

5.1 การเตรียมพลาสมิด pCAMBIA1305.1 และชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::T*nos*

5.2 การเชื่อมชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::T*nos* เข้าสู่ pCAMBIA1305.1

5.3 การส่งถ่ายพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ที่มีชิ้นยีน *OsDFR* (pCAMBIAKNLDFR-1) เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105

5.3.1 การเตรียม competent cells ของอะโกรแบคทีเรียม

5.3.2 การส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียม

5.3.3 การคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยเทคนิค PCR

6. การถ่ายยีน *OsDFR* เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Kasalath แล้ววิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน

6.1 การชักนำเมล็ดข้าวให้เกิดแคลลัส

6.2 การเตรียมแคลลัสเพื่อการถ่ายยีน

6.3 การเตรียมอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIAKNLDFR-1

6.4 การเพาะเลี้ยงอะโกรแบคทีเรียมเพื่อทำการถ่ายยีน

6.5 การทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวโดยวิธี GUS assay

6.6 การคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน และชักนำให้เกิดต้น

6.7 การวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับจากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR

6.8 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *OsDFR* ในต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมโดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

วิธีการดำเนินงานวิจัย

วิธีการดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 6 ขั้นตอน ดังนี้

1. การค้นหายีน *OsDFR* จากข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวโดยวิธี mCTAB (Cetytrimethyl Ammonium Bromide)

1.1.1 นำใบข้าวอายุประมาณ 2 สัปดาห์มาบดในโกร่งที่ผ่านการแช่เย็น จากนั้นเติมสารละลาย mCTAB (Cetytrimethyl Ammonium Bromide) ที่มี 1 % (v/v) 2-mercapto ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตรแล้วบดต่อจนละเอียด

1.1.2 เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex

1.1.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยผสมให้เข้ากันทุก 10 นาที

1.1.4 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

1.1.5 ย้ายส่วนใสไปยังหลอดใหม่ และเติม RNase A ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ต่อสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที

1.1.6 เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 300 ไมโครลิตร หรือ 1 เท่า ของปริมาตรสารละลาย mCTAB และผสมให้เข้ากันโดยการ vortex

1.1.7 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

1.1.8 ย้ายส่วนใสไปยังหลอดใหม่ และเติมคลอโรฟอร์มอีกครั้ง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแล้วย้ายส่วนใสด้านบนไปหลอดใหม่

1.1.9 เติม 3 M somdium acetate, pH 5.2 ปริมาตร 1/10 เท่าของสารละลาย และเติม cold –absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หรือข้ามคืน

1.1.10 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

1.1.11 เทส่วนใสทิ้ง และเติมเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอน

1.1.12 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง

1.1.13 ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วย 10 mM Tris-HCL, pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

1.2 การตรวจสอบยีน *OsDFR* ด้วยเทคนิค PCR

การเตรียมปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบยีน *OsDFR* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* ซึ่งมี PCR product ขนาดประมาณ 400 bp โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ดังนี้

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบยีน *OsDFR*

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
MyTaq HS Red Mix, 2X PCR Master Mix	1X	5
10 µM ODFR_F	0.5 µM	0.5
10 µM ODFR_R	0.5 µM	0.5
DNA Template (dilute 1:60)	-	1
dH_2O	-	3
Total		10

สภาวะในการทำ PCR

Initial Denaturation	94 องศาเซลเซียส	3 นาที	
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	0.30 นาที	35 รอบ
Annealing	55 องศาเซลเซียส	0.30 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	0.30 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	

วิเคราะห์ผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่มี SYBR safe DNA gel stain เป็นส่วนประกอบ ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายรูปเจลภายใต้แสงยูวี สังเกตแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 bp

2. การค้นหายีน *OsDFR* โดยเทคนิค RT-PCR

2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบข้าว

2.1.1 ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอ

ขั้นตอน Homogenization

1. ทำการบดใบข้าวที่อายุ 14 วัน โดยใช้โกร่งบดให้ละเอียดร่วมกับการใช้ไนโตรเจนเหลว จากนั้นเติม Trizol Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครทิวบ์

ขั้นตอน Phase separation

2. บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม 0.2 มิลลิลิตร พลิกกลับหลอด เป็นเวลา 5 วินาที แล้วบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 นาที จากนั้นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซสเซียส ที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

ขั้นตอน RNA precipitation

3. ย้ายชั้นน้ำใส่หลอดใหม่ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Isopropyl alcohol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

ขั้นตอน RNA wash

4. ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ (เย็น) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างตะกอนอีกครั้งหนึ่ง

ขั้นตอน Redissolving the RNA

5. ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วตากตะกอนให้แห้งจากนั้นเติม DEPC treat water (free RNase) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

2.1.2 การกำจัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNaseI (New England Biolab, USA) เมื่อได้อาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อนของข้าวแล้วทำการกำจัดดีเอ็นเอปนเปื้อนโดยเติมส่วนประกอบของปฏิกิริยา ดังนี้

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการกำจัดดีเอ็นเอปนเปื้อน

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
อาร์เอ็นเอที่สกัดได้	25
10X Reaction buffer with $MgCl_2$	3
DEPC-treated water	1
DNaseI	1
Total	**30**

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม 25 mM EDTA ปริมาตร 6 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 5 mM EDTA) บ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วย 1 % agarose gel electrophoresis ที่มี SYBR safe DNA gel stain เป็นส่วนประกอบ ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

2.2 การสังเคราะห์ First Strand cDNA โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Superscript III First-Strand Synthesis System

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาสังเคราะห์ cDNA โดยกระบวนการ reverse transcription โดยใช้ไพรเมอร์ oligo (dT) ตามวิธีการของชุดสำเร็จรูป Superscript III First-stand synthesis system (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา First-Strand cDNA Synthesis ดังนี้

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA (รอบที่ 1)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
อาร์เอ็นเอทั้งหมด	8
ไพรเมอร์ (50 uM Oligo (dT))	1
10 mM dNTP mix	1
DEPC-treated water	-
Total	**10**

บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำหลอดมาวางบนน้ำแข็งทันที อย่างน้อย 1 นาที แล้วเตรียม cDNA synthesis Mix โดยมีองค์ประกอบดังนี้

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA (รอบที่ 2)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10X RT buffer	2
25 M $MgCl_2$	4
0.1 M DTT	2
RNase OUT (40 U/ul)	1
Superscript III RT (200 U/ul)	1
Total	10

เติมองค์ประกอบ cDNA synthesis Mix ลงในหลอดทดลองจากรอบที่ 1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และผสมเบา ๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำออกมาวางบนน้ำแข็งทันที นำหลอดมา Spin down และเติม RNaseH 1 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเก็บ cDNA ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้หรือนำไปทำพีซีอาร์ต่อไป

2.3 การค้นหายีน *OsDFR* โดยเทคนิค RT-PCR

การเตรียมปฏิกิริยา PCR เพื่อค้นหายีน *OsDFR* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* ซึ่งมี PCR product ขนาดประมาณ 1,100 bp โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิรียา PCR ดังนี้

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ในการวิเคราะห์

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	1X	10
10 μM OsDFRcds-38F	0.5 μM	1
10 μM OsDFRcds+25R	0.5 μM	1
cDNA	-	0.5
dH_2O	-	7.5
Total		20

สภาวะในการทำ PCR

Initial Denaturation	98 องศาเซลเซียส	0.30 นาที	
Denaturation	98 องศาเซลเซียส	0.10 นาที	35 รอบ
Annealing	53.3 องศาเซลเซียส	0.30 นาที	35 รอบ
Extension	72 องศาเซลเซียส	1.15 นาที	35 รอบ
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	

วิเคราะห์ผลด้วย 1 % agarose gel electrophoresis ที่มี SYBR safe DNA gel stain เป็นส่วนประกอบ ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายรูปเจลภายใต้แสงยูวี สังเกตแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,100 bp

3. การโคลนยีน *OsDFR* เข้าสู่พลาสมิด pBluescript II SK (+)

3.1 การเตรียมดีเอ็นเอพาหะ pBluescript II SK (+)

นำพลาสมิด pBluescript II SK (+) ที่ทำการสกัดโดยวิธี CTAB mini plasmid preparation มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RV-HF โดยปฏิกิริยาดังนี้

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการตัดเพื่อเตรียมพลาสมิด pBluescript II SK (+)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10x NEB buffer cutsmart	1
*Eco*RV-HF	1
พลาสมิด	3
dH_2O	5
Total	10

วิเคราะห์ผลด้วย 1 % agarose gel electrophoresis ที่มี SYBR safe DNA gel stain เป็นส่วนประกอบ ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการตัดเจลและทำการแยกบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

3.2 การแยกบริสุทธิ์ยีน *OsDFR* จากเจล

แยกแถบดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* ที่ได้มาจากเทคนิค RT-PCR บนเจลอะกาโรส ตัดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดตามที่คาดหวังมาแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ หลอมเจลและแยกดีเอ็นเอจากเจลด้วยวิธี Nucleospin Extraction Kit (Macherey-Nagel, Germany) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ทำการตัดเจลที่มีแถบดีเอ็นเอ ที่ต้องการ เทียบกับ DNA Marker ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. จากนั้นชั่งน้ำหนักเจลที่ตัดได้เพื่อคำนวณหาปริมาตรเจล (0.1 กรัม ของเจล เท่ากับ 100 ไมโครลิตร) หาน้ำหนักเจล

3. แล้วใส่สารละลาย NIT ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อ 100 มิลลิกรัมของเจล หรือปริมาตร กรัม (g) เท่ากับปริมาตรเจลในหลอด คิดเป็นมิลลิกรัม (mg)

4. จากนั้นบ่มใน Water bath อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้เจลละลาย

5. เมื่อเจลละลายหมด นำหลอดออกจาก Water bath ดูดส่วนใสทั้งหมดใส่ Column ใหม่ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

6. เติมสารละลาย NI3 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

7. ปั่นเหวี่ยง column เปล่า ๆ ที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็น เวลา 2 นาที (เปลี่ยนใส่หลอดธรรมดา)

8. เติม NE 10 - 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm 1 นาที (2 ครั้ง) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่แยกบริสุทธิ์ไปโคลนเข้าพลาสมิด pBluescript II SK (+)

3.3 การเชื่อมชิ้นยีน *OsDFR* เข้ากับพลาสมิด pBluescript II SK (+) และส่งถ่ายเข้าสู่ *E. coli* competent cells

3.3.1 การเตรียม competent cells ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 alpha โดยวิธี $CaCl_2$

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

2. เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน

3. นำเชื้อมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนได้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.3 - 0.5 นาโนเมตร

4. ปั่นเก็บเซลล์ด้วยความร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทอาหารออก

5. ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 50 μM $CaCl_2$ (เย็น) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปตขึ้นลง จากนั้นเติม 50 μM $CaCl_2$ (เย็น) อีก 16 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปต จากนั้นบ่มในน้ำแข็งนาน 20 นาที

6. ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 50 μM $CaCl_2$ (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

3.3.2 การคำนวณความเข้มข้นและหาอัตราส่วนระหว่าง vector และ insert ในปฏิกิริยาการเชื่อม

เมื่อแยกบริสุทธิ์พลาสมิด pBluescript II SK (+) (vector) และชิ้นยีน *OsDFR* (insert) เสร็จแล้ว จากนั้นทำการคำนวณความเข้มข้นดีเอ็นเอจากเจล เพื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณอัตราส่วนความเข้มข้นของ vector และ insert ในปฏิกิริยาการเชื่อม (ligation) จากสูตร

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

ขนาดพลาสมิด pBluescript II SK (+) เท่ากับ 3,000 bp
ขนาดชิ้นยีน *OsDFR* เท่ากับ 1,100 bp

$$\frac{V}{I} = \frac{1}{3} \times \frac{3000\ \text{bp}}{1100\ \text{bp}} \times \frac{660}{660} = \frac{1}{0.8}$$

ดังนั้น ถ้าใช้ insert ความเข้มข้น 1.1 นาโนกรัม ต้องใช้ vector 1 นาโนกรัม
ถ้าใช้ insert ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ต้องใช้ vector = 91 นาโนกรัม

3.3.3 การเชื่อมชิ้นยีน *OsDFR* เข้ากับพลาสมิด pBluescript II SK (+) โดยมีปฏิกิริยาดังนี้

ตารางที่ 7 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมชิ้นยีน *OsDFR* เข้ากับพลาสมิด pBluescript II SK (+)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10x T4 DNA Ligase	1
pBluescript II SK (+)	5
insert	3
T4 DNA Ligase	1
Total	10

บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส แล้วส่งถ่ายเข้าสู่ competent cells E. *coli* DH5 alpha และ spread บนอาหารแข็ง LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การทำ Transformation

1. นำ ligation mixture 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด competent cells ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ในน้ำแข็งนาน 20 นาที

2. นำอาหารแข็ง LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มาวางรอไว้บนโต๊ะให้แห้ง Spread X-gal และ IPTG ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

3. นำหลอดมาบ่มใน water bath อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

4. ครบเวลา แช่ลงในน้ำเข็งทันที แล้วเติมอาหารเหลว (ไม่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มและเขย่าหลอดที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

5. ปั่นเชื้อที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูดเชื้อด้านบนทิ้งให้เหลือประมาณ 200 ไมโครลิตร ละลายตะกอนดูดส่วนใสเพลท spread ให้แห้ง

6. บ่มไว้ในตู้เลี้ยงเชื้อ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืนจากนั้นนำเพลทเข้าเก็บที่ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

3.4 การคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยขนาด (Rapid size screening)

1. เลือกโคโลนีสีขาว และสีฟ้า 2 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงข้ามคืน 37 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที

2. นำเชื้อมา 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

3. เติม 50 ไมโครลิตร ของ Lysis buffer (5 mM EDTA, 10 % w/v sucrose, 0.25 % w/v SDS 100 mM NaOH, 60 Mm KCl, 0.05 % w/v bromophenol blue) ผสมด้วยการ vortex

4. นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และย้ายไปบ่มในน้ำแข็ง 5 นาที

5. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 นาที

6. ดูดเฉพาะส่วนน้ำด้านบนมา 20 ไมโครลิตร มาเป็นตัวอย่างในการวิเคราะห์ด้วย 1 % agarose gel ที่มี SYBR safe DNA gel stain เป็นส่วนประกอบ ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

3.5 วิธีการสกัดพลาสมิดด้วย CTAB mini plasmid preparation

1. เตรียมอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. นำปากคีมไปเผาแล้วคีบไม้จิ้มฟันไปจิ้มโคโลนีสีขาวแล้วนำไปใส่อาหารเหลว LB ที่เตรียมไว้

3. นำไปเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

4. ดูดเชื้อที่เลี้ยงไว้ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง

5. เติม STET buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม lysozyme ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้วนำไป vortex เพื่อผสมตะกอนเซลล์

6. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และบ่ม 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยตะกอนออกมาทิ้ง

8. เติม 5 เปอร์เซ็นต์ CTAB ปริมาตร 200 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเพื่อผสมแล้วแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

9. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา15 นาที เทส่วงใสทิ้ง

10. เติม 1.2 NaCl ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม RNase (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

11. เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 510 ไมโครลิตร ผสมกันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนบนไปไว้ในหลอดใหม่ ประมาณ 400 ไมโครลิตร (ทิ้งหลอดเดิม)

12. เติม 3M Na Acetate pH 5.2 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้วเติม Absolute ethanol ปริมาตร 880 ไมโครลิตร (ปรับปริมาตรให้เท่ากัน)

13. บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งส่วนน้ำ หรือข้ามคืน (บ่มข้ามคืนจะช่วยให้ตกตะกอนได้ดีกว่า)

14. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งส่วนน้ำ ระวังอย่าให้ตะกอน DNA หลุด

15. เติม 75 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำ ทำเช่นนี้ 2 รอบ เพื่อล้างตะกอน DNA

16. ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งแล้วละลายกลับด้วย 10 mM Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วนำมาดีดผสมกัน

3.6 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิดจากตัวอย่างต่าง ๆ ที่ทำการสกัดโดยวิธี CTAB mini plasmid preparation มาทำการตัดตรวจสอบชิ้นยีน *OsDFR* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII โดยปฏิกิริยาดังนี้

ตารางที่ 8 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการตัดชิ้นยีน *OsDFR* ที่อยู่ในพลาสมิด pBluescript II SK (+)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10x NEB buffer cutsmart	1
*Eco*RI	0.5
*Hin*dIII	0.5
พลาสมิด	3
dH_2O	5
Total	10

3.7 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OsDFR* จากโคโลนีสายผสมที่ถูกคัดเลือก

ทำการส่งพลาสมิดที่คัดเลือกไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท 1st Base DNA Sequencing (Malaysia) แล้วนำลำดับเบสที่ได้ มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และนำลำดับเบสของยีน *OsDFR* จากข้าวแต่ละสายพันธุ์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalX (version 1.83) และ GeneDoc (version 2.7)

4. การสร้างชุดยีน *OsDFR* ภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos* Terminator

4.1 การเตรียมพลาสมิด p2CA และชิ้นยีน *OsDFR*

4.1.1 การเตรียมพลาสมิด p2CA

นำพลาสมิด p2CA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I เพื่อตัดชิ้นยีนเดิมออก ซึ่งโคลนอยู่ระหว่าง *Bam*HI/*Sac*I sites แล้วจึงแยกบริสุทธิ์พลาสมิด p2CA ที่ตัดแล้วจากเจลเพื่อนำไปเชื่อมกับยีน *OsDFR* ต่อไป โดยตัดพลาสมิดตามปฏิกิริยาดังนี้

ตารางที่ 9 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิด p2CA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อเตรียมพลาสมิด

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10x NEB buffer cutsmart	2
*Bam*HI	1
*Sac*I	1
พลาสมิด	6
dH_2O	10
Total	20

4.1.2 การเตรียมชิ้นยีน *OsDFR*

เตรียมชิ้นยีน *OsDFR* โดยนำพลาสมิด pBluescript II SK (+) ที่มียีน *OsDFR* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII แล้วจึงแยกบริสุทธิ์ชิ้นยีน *OsDFR* ขนาดประมาณ 1,100 bp ออกจากพลาสมิด pBluescript II SK (+) เพื่อนำไปเชื่อมกับพลาสมิด p2CA ต่อไป โดยตัด พลาสมิดตามปฏิกิริยาดังนี้

ตารางที่ 10 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการตัดเพื่อนำชิ้นยีน *OsDFR* ออกจาก pBluescript II SK (+)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10x NEB buffer cutsmart	2
*Eco*RI	1
*Hin*dIII	1
พลาสมิด	6
dH_2O	10
Total	20

หลังจากตัดพลาสมิดทั้งสองด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำการแยกดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1 % agarose gel ที่มี SYBR safe DNA gel stain เป็นส่วนประกอบ ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตัดเจลที่มีขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอโดยใช้ Nucleospin Extraction Kit (Macherey-Nagel, Germany) แล้วทำการสร้างปลายพลาสมิด p2CA และชิ้นยีน *OsDFR* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้เป็นปลายทู่ สำหรับปฏิกิริยา ligation เพื่อเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับพลาสมิด โดยมีขั้นตอนตามชุดสำเร็จรูป NEB Next End Repair Kit (New England Biolab, USA) ดังนี้

ตารางที่ 11 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการทำ blunt end ที่ปลายดีเอ็นเอ

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
DNA to end-repair	8.5
NEB Next End Repair Reaction Buffer (10X)	1
NEB Next End Repair Enzyme Mix	0.5
Total	**10**

บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำชิ้นยีน *OsDFR* เชื่อมเข้ากับพลาสมิด p2CA ในขั้นตอนต่อไป

4.2 การเชื่อมชิ้นยีน *OsDFR* เข้ากับพลาสมิด p2CA แล้วถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* competent cells

4.2.1 คำนวณความเข้มข้นและหาอัตราส่วนระหว่าง vector และ insert ในปฏิกิริยาการเชื่อม

เมื่อแยกบริสุทธิ์พลาสมิด p2CA (vector) และชิ้นยีน *OsDFR* (insert) เสร็จแล้ว จากนั้นทำการคำนวณความเข้มข้นดีเอ็นเอจากเจล เพื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณอัตราส่วนความเข้มข้นของ vector และ insert ในปฏิกิริยาการเชื่อม (ligation) จากสูตร

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

ขนาดพลาสมิด p2CA เท่ากับ 3,000 bp

ขนาดชิ้นยีน *OsDFR* เท่ากับ 1,100 bp

$$\frac{V}{I} = \frac{1}{3} \times \frac{3000\ bp}{1100\ bp} \times \frac{660}{660} = \frac{1}{0.8}$$

ดังนั้น ถ้าใช้ insert ความเข้มข้น 0.8 นาโนกรัม ต้องใช้ vector 1 นาโนกรัม

ถ้าใช้ insert ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ต้องใช้ vector = 125 นาโนกรัม

4.2.2 การเชื่อมชิ้นยีน *OsDFR* กับพลาสมิด p2CA และถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* competent cells

เมื่อคำนวณอัตราส่วนระหว่างพลาสมิดและ insert แล้ว จากนั้นเชื่อมชิ้นยีนกับดีเอ็นเอพาหะ p2CA โดยมีปฏิกิริยา ดังนี้

ตารางที่ 12 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมชิ้นยีน *OsDFR* กับพลาสมิด p2CA

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10X buffer T4 DNA Ligase	1
พลาสมิด p2CA (ความเข้มข้น 56 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2
ยีน *OsDFR* (ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	6
T4 DNA Ligase	1
Total	**10**

บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส จากนั้นส่งถ่ายเข้าสู่ *E. coli* DH5 alpha competent cells ด้วยวิธี Heat shock และ spread บนอาหารแข็ง LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.3 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมจากการเชื่อมชิ้นยีน *OsDFR* เข้ากับพลาสมิด p2CA ด้วยขนาด (Rapid size screening)

นำโคโลนีที่ได้จากการเชื่อมชิ้นยีนกับดีเอ็นเอพาหะมาคัดเลือกด้วยขนาด โดยเปรียบเทียบกับพลาสมิด p2CA ที่ตัดชิ้นยีน *npt*II ขนาด 790 bp ออกแล้ว self-ligation โดยมีวิธีการตามขั้นตอนที่ 3.4

4.4 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมจากการเชื่อมชิ้นยีน *OsDFR* เข้ากับพลาสมิด p2CA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *E. coli* competent cells คัดเลือกดีเอ็นเอสายผสม โดยนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี CTAB mini plasmid preparation และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII เมื่อได้โคโลนีที่มีชิ้นยีน *OsDFR* ที่ประกอบด้วย dual 35S Promoter และ *nos* Terminator ขนาดประมาณ 2,100 bp ทำการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี CTAB mini plasmid preparation และส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

4.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OsDFR* จากโคโลนีสายผสมที่คัดเลือก

เมื่อนำพลาสมิดที่คัดเลือกไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท 1st Base DNA Sequencing (Malaysia) แล้วนำลำดับเบสที่ได้ ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank เพื่อวิเคราะห์ว่าโคลนนั้นมียีน *OsDFR* ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos* Terminator ด้วยโปรแกรม ClustalX (version 1.83) และ GeneDoc (version 2.7)

5. การสร้างพลาสมิดที่มีชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::T*nos* สำหรับถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว

เมื่อคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมที่ถูกต้องซึ่งมียีน *OsDFR* ภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos* Terminator จากนั้นสร้าง construct ซึ่งประกอบไปด้วยชุดยีน *OsDFR* โดยให้ยีนทำงานภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos* Terminator โดยใช้ T-DNA vector คือ pCAMBIA1305.1 เพื่อใช้สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม โดยทำการสกัดพลาสมิด p2CA ที่มียีน *OsDFR* และ pCAMBIA1305.1 จากนั้นทำการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII เพื่อเตรียมชิ้น insert และพลาสมิดสำหรับปฏิกิริยา ligation ต่อไป

5.1 การเตรียมพลาสมิด pCAMBIA1305.1 และชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::T*nos*

เตรียมพลาสมิด pCAMBIA1305.1 และชิ้นยีน *OsDFR* จาก p2CA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII จากนั้นนำมาแยกขนาดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส โดยใช้ 1 % agarose gel electrophoresis จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจล ตามวิธีการของ Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Germany) แล้วนำชิ้นยีนมาเชื่อม ต่อเข้ากับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ต่อไป

5.2 การเชื่อมชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::Tnos เข้าสู่ pCAMBIA1305.1

เมื่อแยกบริสุทธิ์พลาสมิด pCAMBIA1305.1 (vector) และชิ้นยีน *OsDFR* (insert) คำนวณความเข้มข้นดีเอ็นเอจากเจล เพื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณหาอัตราส่วนความเข้มข้นของ vector และ insert ในปฏิกิริยาการเชื่อม (ligation) จากสูตร

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

ขนาดพลาสมิด pCAMBIA1305.1 เท่ากับ 11,846 bp

ขนาดชุดยีน *OsDFR* เท่ากับ 2,100 bp

$$\frac{V}{I} = \frac{1}{3} \times \frac{11846 \text{ bp}}{2100 \text{ bp}} \times \frac{660}{660} = \frac{1.9}{1}$$

ดังนั้น ถ้าใช้ insert ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม ต้องใช้ vector 1.9 นาโนกรัม

เมื่อคำนวณอัตราส่วนระหว่างพลาสมิดและ insert แล้ว จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาการเชื่อมระหว่างชิ้นยีนกับดีเอ็นเอพาหะ ดังนี้

ตารางที่ 13 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมชิ้นยีน *OsDFR* กับพลาสมิด pCAMBIA1305.1

ส่วนประกอบ	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
10X buffer T4 DNA Ligase	1
พลาสมิด pCAMBIA1305.1	ตามความเข้มข้นที่คำนวณ
ยีน *OsDFR* ที่มี Promoter และ *nos* Terminator	ตามความเข้มข้นที่คำนวณ
T4 DNA Ligase	1
Total	**10**

บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส จากนั้นส่งถ่ายเข้าสู่ competent cells ของ *E. coli* DH5 alpha ด้วยวิธี Heat shock และ Spread บนอาหาร LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.3 การส่งถ่ายพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ที่มีชิ้นยีน *OsDFR* (pCAMBIAKNLDFR-1) เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105

5.3.1 การเตรียม competent cells ของอะโกรแบคทีเรียม

1. นำเชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ EHA105 มา streak ลง บนอาหารแข็งสูตร LB ที่มีสารปฏิชีวนะไรแฟมพิซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

2. เลือกโคโลนีเดี่ยว จำนวน 1 โคโลนี เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่มีสารปฏิชีวนะไรแฟมพิซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืน

3. นำเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่มีสารปฏิชีวนะไรแฟมพิซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 17 ชั่วโมง จนได้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.55

4. ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่ออุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเทอาหารออกให้หมด

5. ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 50 μM $CaCl_2$ (ที่เย็น) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปตขึ้นลง จากนั้นเติม 50 μM $CaCl_2$ (ที่เย็น) อีก 16 มิลลิลิตร บ่มในน้ำแข็ง เป็นเวลา 20 นาที

6. ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเทสารละลายออกให้หมด

7. เติม 50 μM $CaCl_2$ (ที่เย็น) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติม 80 % Glycerol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปต

8. แบ่งเก็บใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 200 มิลลิลิตร โดยเมื่อทำการปิเปตเสร็จให้รีบแช่หลอดในไนโตรเจนเหลว จากนั้นจึงนำไปเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน

5.3.2 การส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียม

1. นำสารละลายพลาสมิด ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมในหลอดที่มี competent cell ของอะโกรแบคทีเรียม ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

2. แช่หลอดในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 90 วินาที

3. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4. เติมอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5. ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที

6. ปิเปตส่วนใสทิ้ง 800 ไมโครลิตร แล้วละลายตะกอนเซลล์กับสารละลายให้เข้ากัน ทำการ spread สารละลายตะกอนเซลล์ลงบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มีสารปฏิชีวนะไรแฟมพิซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และกานามัยซินเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

7. นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

5.3.3 การคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยเทคนิค PCR

ทำการคัดเลือกโคโลนีสายผสมโดยสกัดพลาสมิดด้วยวิธี CTAB mini plasmid preparation โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* โดยมีปฏิกิริยาดังนี้

ตารางที่ 14 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ในการคัดเลือกโคโลนีสายผสมอะโกรแบคทีเรียม

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
MyTaq HS Red Mix, 2X PCR Master Mix	1X	5
10 µM OsDFRcds-38F	0.5 µM	0.5
10 µM OsDFRcds+25R	0.5 µM	0.5
พลาสมิด	-	0.5
dH_2O	-	7.5
Total		10

สภาวะในการทำ PCR

Initial Denaturation	95 องศาเซลเซียส	5 นาที	
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	1.30 นาที	35 รอบ
Annealing	53.3 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1.45 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	7 นาที	

วิเคราะห์ผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่มี SYBR safe DNA gel stain เป็นส่วนประกอบ ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายรูปเจลภายใต้แสงยูวี สังเกตแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,100 bp จากนั้นคัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นยีน *OsDFR* แล้วทำการสกัดพลาสมิดเพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท 1st Base DNA Sequencing (Malaysia) แล้วนำพลาสมิดที่มียีนไปใช้สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath ต่อไป

6. การถ่ายยีน *OsDFR* เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Kasalath แล้ววิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน

6.1 การชักนำเมล็ดข้าวให้เกิดแคลลัส

1. ลอกเปลือกออกจากเมล็ดแก่ของข้าว
2. นำเมล็ดที่ลอกเปลือกออกแล้วใส่ในหลอดพลาสติก และเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 - 30 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าประมาณ 30 วินาที เทเอทานอลทิ้ง และเติม sodium hypochlorite ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 25 - 30 มิลลิลิตร
3. ทำการฟอกฆ่าเชื้อโดยนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า ประมาณ 15 นาที หลังจากนั้นเทสารละลายทิ้ง
4. ทำการฟอกฆ่าเชื้อซ้ำอีกรอบ โดยเติม sodium hypochlorite ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ใหม่ ปริมาตร 15 - 20 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 15 นาที และเทสารละลายทิ้ง
5. ล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 4 ครั้ง ครั้งละประมาณ 30 - 35 มิลลิลิตร
6. วางเมล็ดที่ล้างแล้วลงบนอาหารสูตร N6D โดยให้ส่วนของเอมบริโออยู่บนผิวของอาหาร ใช้เมล็ด 10 เมล็ด / เพลท
7. ทำการปิดเพลทโดยใช้ plastic wrap
8. นำไปเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิประมาณ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 - 6 สัปดาห์

6.2 การเตรียมแคลลัสเพื่อการถ่ายยีน

1. นำแคลลัสที่มีอายุประมาณ 4 - 5 สัปดาห์ มาทำการคัดเลือกแคลลัสชนิด embryogenic ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 - 4 มม. และมีลักษณะสีเหลืองอ่อน กลม แน่น
2. ย้ายแคลลัสที่มีลักษณะดังกล่าวไปบนอาหารใหม่สูตร N6D
3. ทำการเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิประมาณ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

6.3 การเตรียมอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA KNLDFR-1

1. นำ glycerol stock ของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIAKNLDFR-1 (pCAMBIAKNLDFR7-17.1)

2. ใช้ loop เขี่ยเชื้อจาก glycerol stock แล้ว streak ลงบนอาหารสูตร LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และไรแฟมพิซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว

3. ทำการเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิประมาณ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

6.4 การเพาะเลี้ยงอะโกรแบคทีเรียมเพื่อทำการถ่ายยีน

1. เทอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว และเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติมอะซิโตไซริงกอน ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ทำการเขย่าให้เข้ากัน

2. เทลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมมาเลี้ยงในอาหาร

3. นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิประมาณ 28±2 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืน (24 ชั่วโมง)

4. นำเชื้อที่ได้มาหาความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600})

5. ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

6. เทส่วนใสทิ้งแล้วละลายตะกอนด้วยอาหารเหลวสูตร 2N6 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

7. เจือจางความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมให้ได้ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.15 ด้วยอาหารเหลวสูตร 2N6 ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 35 มิลลิลิตร ที่มีอะซิโตไซริงกอน ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์

8. ย้ายแคลลัสที่ subculture ไว้ ลงบนตะแกรงที่ฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งวางบนเพลทเปล่าที่ฆ่าเชื้อแล้ว

9. เติมสารแขวนลอยอะโกรแบคทีเรียมจากข้อ 5 ลงบนแคลลัส แล้วทำการปลูกเชื้อ (infection) เป็นเวลาประมาณ 90 วินาที

10. วางตะแกรงลงซับบนกระดาษทิชชู่ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อซับอะโกรแบคทีเรียมส่วนเกินออกไป

11. ย้ายแคลลัสมาวางบนอาหารสูตร 2N6-AS แล้วทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันของแคลลัสและเชื้ออะโกรแบคทีเรียมในที่มืด ที่อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

6.5 การทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวโดยวิธี GUS assay

1. นำแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมเป็นเวลา 3 วัน และล้างเอาอะโกรแบคทีเรียมส่วนเกินออกแล้ว ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย X-gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-glucuronide) ให้ท่วมเนื้อเยื่อแคลลัส

2. นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. เก็บข้อมูลและบันทึกผลการดำเนินงานโดยบันทึกจำนวนแคลลัสที่ทดสอบทั้งหมดและจำนวนแคลลัสที่เกิดสีฟ้า แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่พบจุดสีฟ้า

6.6 การคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน และชักนำให้เกิดต้น

คัดเลือกแคลลัสหลังจากการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกสูตร N6D ที่มีไทเมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และย้ายแคลลัสที่รอดไปยังอาหารใหม่สูตร N6D ที่มีไทเมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มีแสง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และบันทึกจำนวนแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือก

ชักนำแคลลัสให้เป็นต้น โดยการย้ายแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 ไปยังอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น ซึ่งเป็นอาหารสูตร MS ดัดแปลง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วย้ายแคลลัสไปยังอาหารใหม่สูตรเดิม ทุก ๆ 2 สัปดาห์ จนกว่าจะได้ต้น

เมื่อได้ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีน ย้ายไปยังอาหารสูตร MS ดัดแปลง เพื่อชักนำให้เกิดราก เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้น ย้ายต้นข้าวลงปลูกในกระถาง เพาะเลี้ยงในโรงเรือนกระจก

6.7 การวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับจากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR

ทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าว แล้วนำมาเป็นแม่พิมพ์ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* คือ OsDFRcds-38F และ Tnos_R ซึ่งได้ PCR product ขนาดประมาณ 1,400 bp โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ดังนี้

ตารางที่ 15 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ในการวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับจากการถ่ายยีน

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
MyTaq HS Red Mix, 2X PCR Master Mix	1X	5
10 μM OsDFRcds-38F	0.5 μM	0.5
10 μM Tnos_R	0.5 μM	0.5
DNA Template (dilute 1:60)	-	1
dH_2O	-	3
Total		10

สภาวะในการทำ PCR

Initial Denaturation	94 องศาเซลเซียส	3 นาที	
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	0.30 นาที	35 รอบ
Annealing	67 องศาเซลเซียส	0.30 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	

วิเคราะห์ผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่มี SYBR safe DNA gel stain เป็นส่วนประกอบ ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายรูปเจลภายใต้แสงยูวีสังเกตแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 bp

6.8 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *OsDFR* โดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากใบอ่อนของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมในรุ่น T_1 ตามวิธีการในขั้นตอนที่ 2.1 และผ่านการกำจัดดีเอ็นเอมาสังเคราะห์ cDNA โดยปฏิกิริยา reverse transcription (RT) โดยใช้ oligo (dT) ทำตามขั้นตอนของชุดสำเร็จรูป Superscript III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific, USA) ตามวิธีการในขั้นตอนที่ 2.2 โดยนำ cDNA ที่เตรียมจากใบของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม มาเป็นแม่พิมพ์ในการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *OsDFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิกริยา ดังนี้

ตารางที่ 16 องค์ประกอบของปฏิกิริยา RT-PCR ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *OsDFR* ในต้นข้าวที่ได้รับจากการถ่ายยีน

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
MyTaq HS Red Mix, 2X PCR Master Mix	1X	10
10 µM OSDFR-RT_F	0.5 µM	1
10 µM OSDFR-RT_R	0.5 µM	1
cDNA	-	1
dH_2O	-	7
Total		20

สภาวะในการทำ PCR

Initial Denaturation	95 องศาเซลเซียส	5 นาที	
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	29 รอบ
Annealing	57 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	

และใช้ยีน *actin* เป็นยีนเปรียบเทียบ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่มี SYBR safe DNA gel stain เป็นส่วนประกอบ ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายรูปเจลภายใต้แสงยูวี สังเกตแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 bp

สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย

1. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์โมเลกุล หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

โรงเรือนกระจก สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2. ระยะเวลาเวลาการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ใช้ระยะเวลา 2 ปี โดยเริ่มจากเดือนตุลาคม พ.ศ.2558 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ.2560

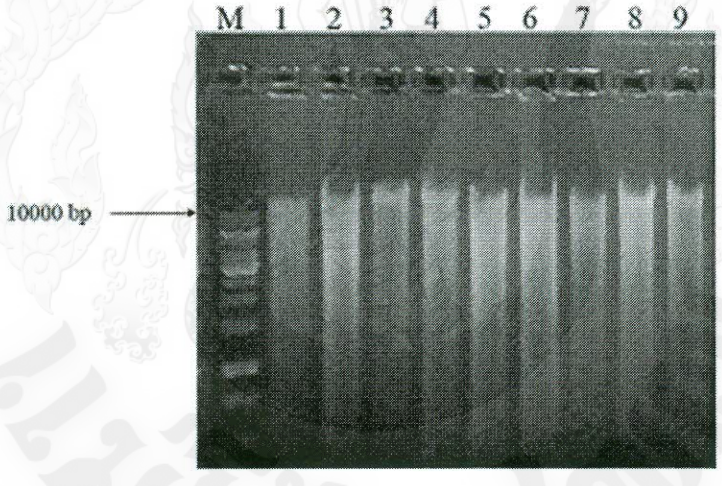
บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

การตรวจสอบยีน *OsDFR* โดยเทคนิค PCR

1. การสกัดดีเอ็นเอจากต้นอ่อนของข้าว

จากการสกัดดีเอ็นเอจากต้นอ่อนของข้าว 9 พันธุ์ พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีขนาดใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน แสดงว่า ดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดี และสามารถนำไปค้นหายีน *OsDFR* โดยเทคนิค PCR ในขั้นต่อไปได้ (ภาพที่ 16)

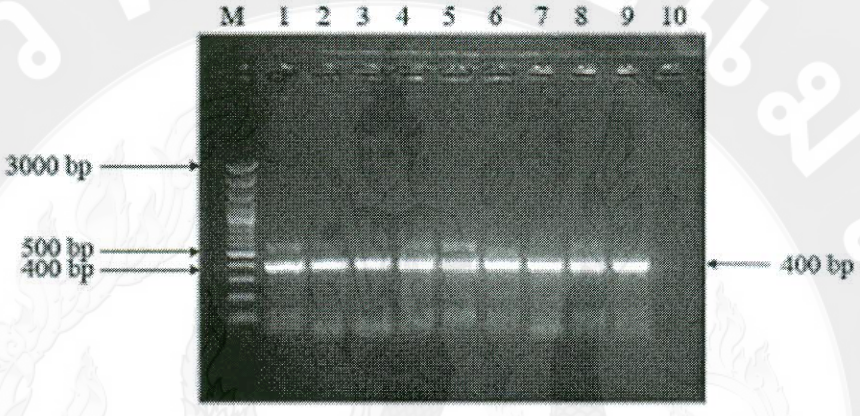


ภาพที่ 16 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากต้นอ่อนของข้าว

หมายเหตุ ช่อง M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์กข49 ช่องที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ช่องที่ 3 คือ ข้าวพันธุ์กข6 ช่องที่ 4 คือ ข้าวพันธุ์สังข์หยด ช่องที่ 5 คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ช่องที่ 6 คือ ข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง ช่องที่ 7 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำ ช่องที่ 8 คือ ข้าวพันธุ์ ลืมผัว และช่องที่ 9 คือ ข้าวพันธุ์หอมนิล

2. การตรวจสอบยีน *OsDFR* ด้วยเทคนิค PCR

การสกัดดีเอ็นเอจากข้าวจำนวน 9 พันธุ์ จากนั้นนำมาทำการค้นหายีนเบื้องต้น โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วนหนึ่งของยีน *OsDFR* โดยใช้เทคนิค PCR พบว่า ข้าวทุกพันธุ์ที่นำมาศึกษาพบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 400 bp (ภาพที่ 17) แสดงว่า ในข้าวทุกพันธุ์ที่นำมาทำการค้นหามีบริเวณของยีน *OsDFR* ในขั้นตอนต่อไปจะทำการค้นหายีนที่เป็นบริเวณ coding region



ภาพที่ 17 ผลการตรวจสอบยีน *OsDFR* ในจีโนมข้าวด้วยเทคนิค PCR

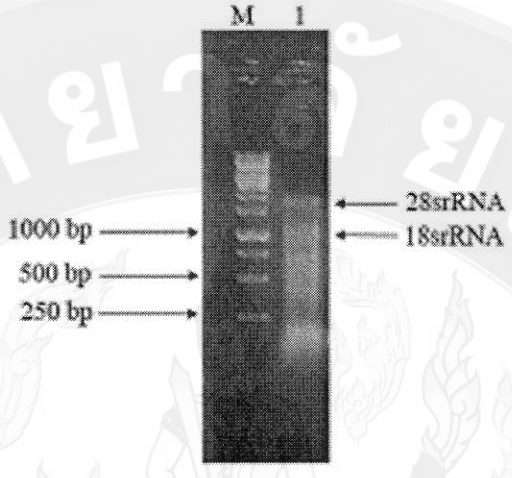
หมายเหตุ ช่อง M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder Plus ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์กข49 ช่องที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ช่องที่ 3 คือ ข้าวพันธุ์กข6 ช่องที่ 4 คือ ข้าวพันธุ์สังข์หยด ช่องที่ 5 คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ช่องที่ 6 คือ ข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง ช่องที่ 7 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำ ช่องที่ 8 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว ช่องที่ 9 คือ ข้าวพันธุ์หอมนิล และช่องที่ 10 คือ น้ำ

การค้นหายีน *OsDFR* โดยเทคนิค RT-PCR

1. การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบข้าว

สกัดอาร์เอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวอายุ 2 สัปดาห์ โดยใช้ไนโตรเจนเหลวและสกัดตามวิธี TRIzol® reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) ของข้าวพันธุ์ก่ำ พบแถบอาร์อาร์เอ็นเอ (rRNA) มีขนาด 18S และ 28S ที่ชัดเจน แสดงว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี (ภาพที่ 18) ดังนั้น

อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนอายุ 2 สัปดาห์ สามารถนำไปเป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์ cDNA เพื่อใช้ในการโคลนยีนต่อไป

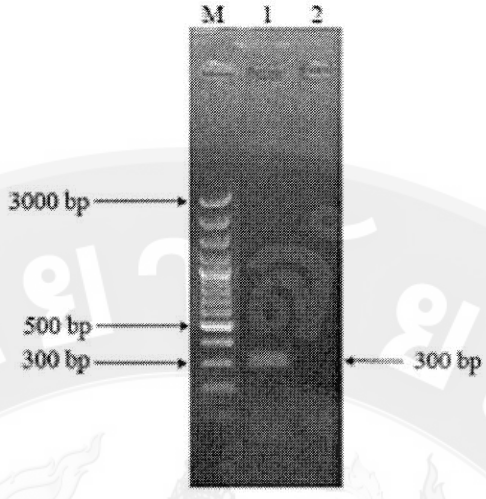


ภาพที่ 18 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำ

หมายเหตุ ช่อง M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำ

2. การค้นหายีน *OsDFR* โดยเทคนิค RT-PCR

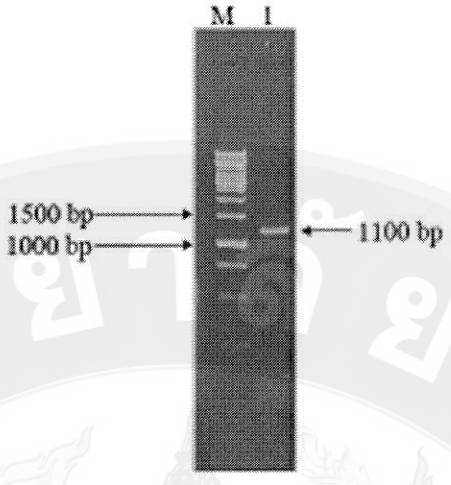
เมื่อสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อนอายุ 2 สัปดาห์ จากข้าวพันธุ์ก่ำ จากนั้นทำการสังเคราะห์ First Strand cDNA โดยปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ทำการตรวจสอบคุณภาพของ cDNA โดยการทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *actin* พบว่า cDNA จากข้าวทุกพันธุ์ที่นำมาศึกษา พบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 300 bp แสดงว่า ข้าวทุกพันธุ์มีการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในขั้นตอนต่อไปจะนำ cDNA ที่ได้เหล่านี้ไปทำการค้นหาบริเวณ coding region ของยีน *OsDFR* (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 ผลการตรวจสอบยีน *actin* โดยใช้ cDNA จากใบอ่อนของข้าวดำพันธุ์ก่ำ เป็นแม่พิมพ์โดยเทคนิค RT-PCR

หมายเหตุ ช่อง M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder Plus ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำ และช่องที่ 2 คือ น้ำ

จากนั้นทำการค้นหายีน *OsDFR* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้เป็นแม่พิมพ์ และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณของ coding region ของยีน *OsDFR* พบว่า สามารถค้นหายีน *OsDFR* ได้ในข้าวดำพันธุ์ก่ำ ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,100 bp (ภาพที่ 20) จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอและทำการโคลนเข้าพลาสมิด pBluescript II SK (+) ต่อไป



ภาพที่ 20 การค้นหาบริเวณ coding sequence (cds) ของยีน *OsDFR* โดยเทคนิค RT-PCR

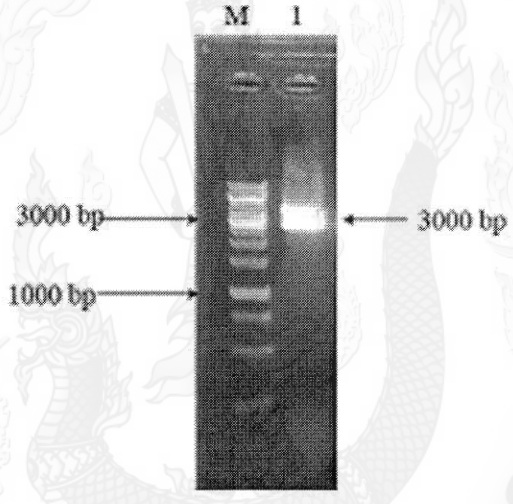
หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 และ 2 คือ ข้าวดำพันธุ์ก่ำ โดยใช้ cDNA ที่เตรียมจากใบอ่อนเป็นแม่พิมพ์

จากการค้นหายีน *OsDFR* ที่เป็นบริเวณ complete coding sequence (cds) โดยใช้ cDNA จากใบเป็นแม่พิมพ์ ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,100 bp ตามที่คาดหวัง ในข้าวพันธุ์ก่ำ ซึ่งเป็นข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ (ภาพที่ 20) แสดงว่า ในข้าวพันธุ์ก่ำ มีการแสดงออกของยีน *OsDFR* สอดคล้องกับงานวิจัยของ Shih et al. (2008) ที่ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในต้นอ่อนของข้าวขาวพันธุ์ T65 เปรียบเทียบกับข้าวสีม่วงพันธุ์ T65-Plw ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่า มีการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในต้นอ่อนของข้าวสีม่วงพันธุ์ T65-Plw แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในข้าวขาวพันธุ์ T65 และ Chen et al. (2013) ที่พบว่า มีการแสดงออกของยีน *OsDFR* สูงในเมล็ดข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง (Tsukushiakamochi, Japan) รองลงมาในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ (Chinakuromai, China) และยังพบว่า มีการแสดงออกในรากและกาบใบของข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีเขียวพันธุ์ Akunemochi (Japan) แต่มีการแสดงออกที่ต่ำในข้าวสีขาวพันธุ์ Nipponbare (Japan) ทั้งนี้ยังพบการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในใบธงของข้าวทุกสีที่กล่าวมา ยกเว้นในใบธงของข้าวสีดำพันธุ์ Chinakuromai (China)

การโคลนยีน *OsDFR* เข้าสู่พลาสมิด pBluescript II SK (+)

1. การเตรียมดีเอ็นเอพาหะ pBluescript II SK (+)

ทำการสกัดพลาสมิด pBluescript II SK (+) โดยวิธี CTAB mini plasmid preparation จากนั้นนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RV เพื่อให้พลาสมิดเป็นเส้นตรงที่มีลักษณะปลายทู่ (ภาพที่ 21) จากนั้นนำไปทำการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอออกจากเจล เพื่อที่จะนำไปทำปฏิกิริยาการเชื่อมกับชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจต่อไป



ภาพที่ 21 พลาสมิด pBluescript II SK (+) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RV

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 คือ พลาสมิด pBluescript II SK (+) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RV

2. การเชื่อมชิ้นยีน *OsDFR* เข้ากับพลาสมิด pBluescript II SK (+) และส่งถ่ายเข้าสู่ *E. coli* competent cells

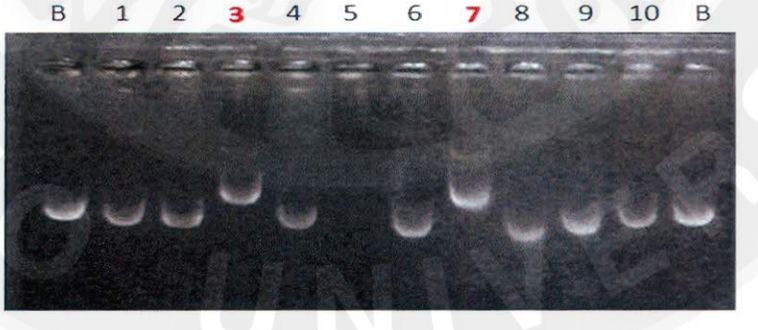
นำยีน *OsDFR* จากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำ ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์จากเจลขนาดประมาณ 1,100 bp มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pBluescript II SK (+) จากนั้นส่งถ่ายเข้าสู่ competent cells แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินเพื่อคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิด พบว่า โคโลนี

ที่ขึ้นบนอาหารมีทั้งสีฟ้าและสีขาว (ภาพที่ 22) จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เกิดขึ้นแล้วนำไปคัดเลือกด้วยขนาดและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ภาพที่ 22 ผลการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *E. coli* DH5 alpha ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร X-gal 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยขนาด

ทำการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมที่มียีน *OsDFR* จากใบของข้าวพันธุ์ก่ำ ขนาดประมาณ 1,100 bp พบว่า ได้โคโลนีสายผสมที่คาดว่ามียีน *OsDFR* แทรกอยู่ และได้ทำการคัดเลือกมาจำนวน 2 โคลน (ภาพที่ 23) จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดและคัดเลือกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป

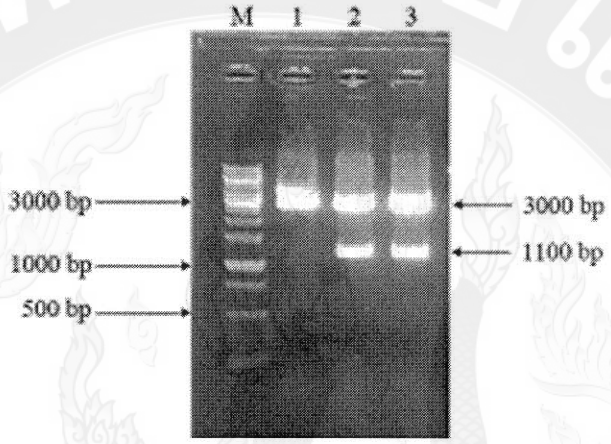


ภาพที่ 23 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด

หมายเหตุ B คือ โคโลนีที่มีสีฟ้า (ไม่มียีน) และโคลนที่ 1 - 10 คือ โคโลนีที่คัดเลือกจากข้าวพันธุ์ก่ำ โคลนที่ถูกคัดเลือกคือ โคโลนีที่ 3 และ 7

4. การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

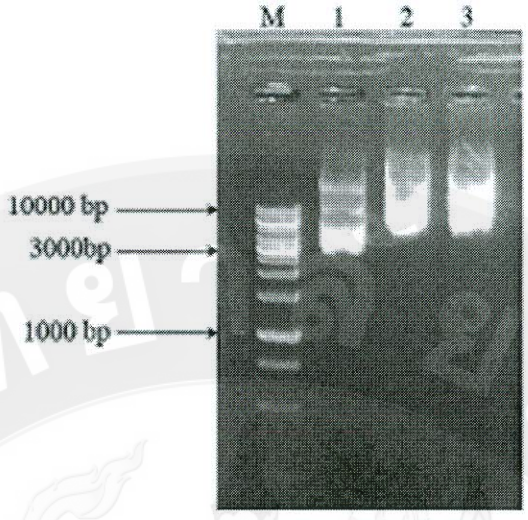
จากการฝากถ่ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ pBluescript II SK (+) แล้วคัดเลือกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบว่า โคโลนีที่คัดเลือกทั้งหมดเกิดแถบดีเอ็นเอเป็นไปตามที่คาดหวังประมาณ 1,100 bp ที่จะนำไปเชื่อมกับโปรโมเตอร์และเทอร์มิเนเตอร์ และมีบางส่วนเกิดแถบดีเอ็นเอ ที่ขนาดปริมาณ 3,000 bp ซึ่งคาดว่าเป็นชิ้นส่วนของพลาสมิด pBluescript II SK (+) (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 ผลจากการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมจากข้าวพันธุ์ก่ำ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 คือ พลาสมิด pBluescript II SK (+) ที่ไม่มียีน ช่องที่ 2 และ 3 คือ พลาสมิดที่คาดว่าได้รับยีน *OsDFR* โคลนที่ 3 และ 7 ตามลำดับ

เมื่อคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมและคาดว่ามียีน *OsDFR* จากการตรวจสอบด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดสายผสมจากโคลนที่คัดเลือก เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 ผลการสกัดพลาสมิด pBluescript II SK (+) ที่คาดว่ามียีน *OsDFR* จากข้าวดำพันธุ์ก่ำ

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 คือ พลาสมิด pBluescript II SK (+) ที่ไม่มียีน ช่องที่ 2 และ 3 คือ พลาสมิดที่คาดว่าได้รับยีน *OsDFR* โคลนที่ 3 และ 7 ตามลำดับ

จากงานวิจัยนี้สามารถโคลนยีน *OsDFR* ได้จากข้าวดำพันธุ์ก่ำ มีขนาดประมาณ 1,100 bp ได้จากโคลนที่คัดเลือกจำนวน 2 โคลน ซึ่งจะทำการวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

5. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OsDFR* จากโคโลนีสายผสมที่ถูกคัดเลือก

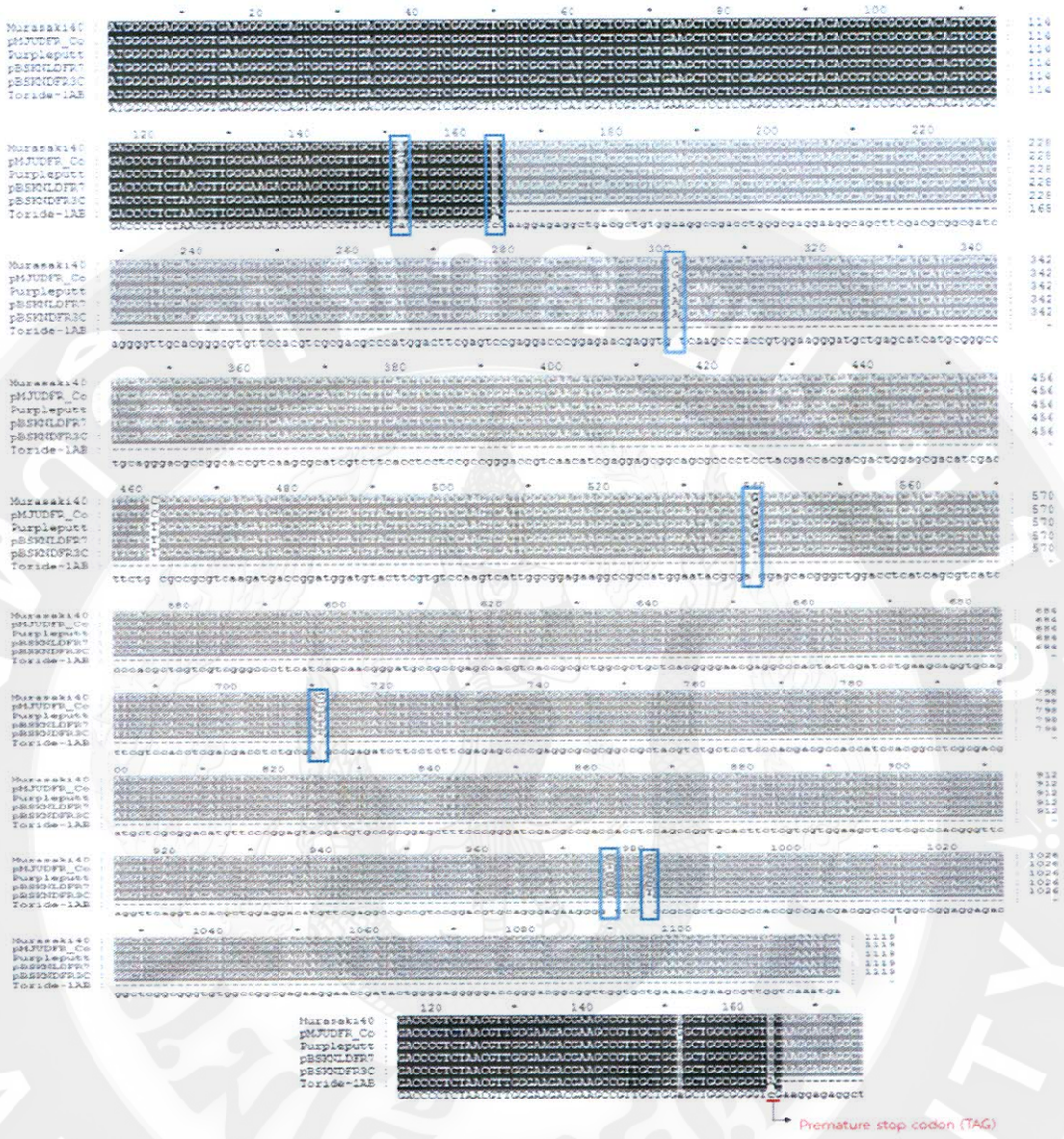
เมื่อนำยีน *OsDFR* ที่ได้จากการสกัดอาร์เอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวดำ *indica* พันธุ์ก่ำ มาวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่า ประกอบด้วยบริเวณ open reading frame (ORF) ขนาด 1,119 bp จากนั้นทำการเปรียบเทียบกับยีน *OsDFR* จากข้าว nearly isogenic Purpleputtu ที่เป็นข้าวดำในฐานข้อมูล (Y07956) พบว่าบริเวณ open reading frame (ORF) ขนาด 1,119 bp มีลำดับเบสเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 26)

จากภาพที่ 26 พบว่า ลำดับเบสของยีน *OsDFR* ที่โคลนได้จากข้าวดำ *indica* พันธุ์ก่ำ โคลนที่ 3 มีความแตกต่างจากลำดับเบสของข้าวขาว *japonica* พันธุ์ Toride-1 จากฐานข้อมูล (AB010745) อยู่ 1 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งที่ 164 แตกต่างกับข้าวดำ *japonica* พันธุ์ Murasaki จากฐานข้อมูล (AB003496) อยู่ 5 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 301, 462, 539, 711 และ 981 แตกต่าง

กับข้าวดำ *indica* พันธุ์ลืมผัว (กนกภรณ์ และคณะ, 2558ก) 7 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 152, 301, 462, 539, 701, 976 และ 981 และแตกต่างกับข้าวดำ *indica* พันธุ์ Purpleputtu จากฐานข้อมูล (Y07956) อยู่ 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 539 และ 981

โคลนที่ 7 มีความแตกต่างจากลำดับเบสของข้าวขาว *japonica* พันธุ์ Toride-1 จากฐานข้อมูล (AB010745) อยู่ 1 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 164 แตกต่างกับข้าวดำ *japonica* พันธุ์ Murasaki จากฐานข้อมูล (AB003496) อยู่ 3 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งที่ 301, 460 และ 711 แตกต่างกับข้าวดำ *indica* พันธุ์ลืมผัว (กนกภรณ์ และคณะ, 2558ก) 5 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 152, 301, 462, 711 และ 976 และเหมือนกับข้าวดำ *indica* พันธุ์ Purpleputtu จากฐานข้อมูล (Y07956) ทุกตำแหน่ง

ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *OsDFR* ที่โคลนได้จากข้าวดำพันธุ์ก่ำโคลนที่ 3 พบว่ามีความแตกต่างจากโคลนที่ 7 อยู่ 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 539 และ 381 และพบว่าในตำแหน่งที่ 164 ไม่เกิดการแทนที่ของลำดับเบส ให้ผลสอดคล้องกับการรายงานของ Nakai et al. (1998) และ Lim and Ha (2013) โดยมีลำดับเบสในตำแหน่งที่ 164 ที่พบว่า ในข้าวสีจะพบเบส C แต่เฉพาะข้าวขาวเท่านั้นที่มีการเปลี่ยนไปเป็น A ทำให้เกิด premature stop codon แล้วได้สายโพลีเพปไทด์สั้นกว่าปกติ



ภาพที่ 26 การวิเคราะห์เปรียบเทียบบริเวณ ORF ของข้าวดำ *indica* พันธุ์ก่ำ โคลนที่ 3 และ 7 (pBSKNLDFR3C และ pBSKNLDFR7) ที่มีขนาด 1,119 bp กับข้าวดำ *japonica* พันธุ์ Murasaki (AB003496) ข้าวดำ *indica* พันธุ์ Purpleputtu (Y07956) ข้าวขาว *japonica* พันธุ์ Toride-1 (AB010745) ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank และข้าวดำ *indica* พันธุ์ลืมผัว (pMJUDFR_Co)

หมายเหตุ กล่องสีน้ำเงิน คือ ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่าง

ที่มา: กนกภรณ์ และคณะ (2558ก)

เมื่อนำ ORF ของยีน *OsDFR* ขนาด 1,119 bp ซึ่งโคลนได้จากข้าวดำ *indica* พันธุ์ก่ำ มาแปลรหัสพบว่า ได้ลำดับกรดอะมิโนขนาด 372 หน่วย เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *OsDFR* จากฐานข้อมูลใน GenBank พบว่า ข้าวสีขาวซึ่งเกิด premature stop codon ทำให้ได้สายกรดอะมิโนที่มีความยาวเพียง 54 หน่วย ทำให้ขาดบริเวณ active site และบริเวณ substrate binding site ซึ่งเป็นบริเวณที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนต่าง ๆ กระจายอยู่ที่ตำแหน่ง 89 - 294 ของเอนไซม์ DFR (ฐานข้อมูลโปรตีนใน GenBank CAA69253) ทำให้ยีน *OsDFR* ในข้าวขาวไม่ทำงาน จึงทำให้ไม่สามารถส่งเสริมการสร้างสีในข้าวขาวได้ ในลำดับกรดอะมิโนของยีน *OsDFR* ของข้าวดำพันธุ์ก่ำ พบว่า โคลนที่ 7 มีความเหมือนกับข้าวดำพันธุ์ Purpleputtu (CAA69253) และข้าวดำพันธุ์ Murasaki (BAA36183) ในฐานข้อมูลทุกตำแหน่ง แตกต่างจากข้าวดำพันธุ์ลืมผัว 1 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 327 ส่วนโคลนที่ 3 พบว่ามีความแตกต่างกับข้าวดำพันธุ์ Purpleputtu (CAA69253) และข้าวดำพันธุ์ Murasaki (BAA36183) อยู่ 1 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งที่ 180 แตกต่างจากข้าวดำพันธุ์ลืมผัว (กนกภรณ์ และคณะ, 2558ก) อยู่ 2 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งที่ 180 และ 327 ซึ่งพบว่าตำแหน่งที่เกิดการแตกต่างไปในข้าวดำไม่ส่งผลกระทบต่อบริเวณ active site และบริเวณ substrate binding site ซึ่งเป็นบริเวณที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนต่าง ๆ กระจายอยู่ที่ตำแหน่ง 89 - 294 ของเอนไซม์ DFR (ภาพที่ 27)

ภาพที่ 27 การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของบริเวณ ORF ของยีน *OsDFR* จากข้าวดำพันธุ์ก่ำโคลนที่ 3 และ 7 (pBSKNDFR3a และ pBSKNLDFR7) ขนาด 372 หน่วย กับข้าวดำพันธุ์ Murasaki (BAA36183) ข้าวดำพันธุ์ Purpleputtu (CAA69253) ข้าวขาวพันธุ์ Toride-1 (AB010745) ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank และข้าวดำพันธุ์ลืมผัว (pMJUDFR_1)

หมายเหตุ รูปดาวสีแดง (★) คือ บริเวณ active site รูปดาวสีเขียว (★) คือ บริเวณ chemical binding site และกล่องสีน้ำเงิน คือ ตำแหน่งกรดอะมิโนที่แตกต่าง

ที่มา: กนกภรณ์ และคณะ (2558ก)

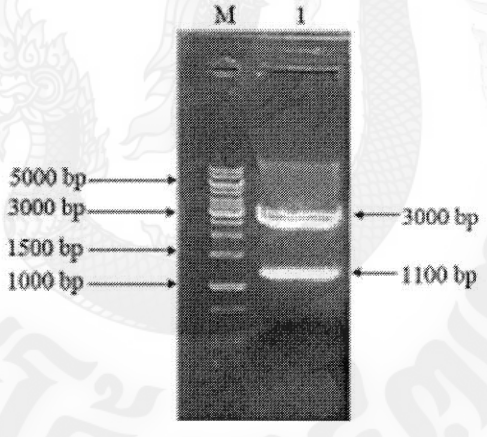
การสร้างชุดยีน *OsDFR* ภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos* Terminator

1. การเตรียมพลาสมิด p2CA และชิ้นยีน *OsDFR*

เตรียมชิ้นยีน *OsDFR* ที่โคลนได้จากใบอ่อนข้าวดำพันธุ์ก่ำ ขนาด 1,119 bp จากพลาสมิด pBluescript II SK (+) เพื่อสร้างชุดยีนที่ประกอบด้วย dual 35S Promoter และ *nos* Terminator โดยตัดชิ้นยีนออกจากพลาสมิด pBluescript II Sk (+) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Eco*RI ได้ชิ้นยีน *OsDFR* ขนาดตามที่คาดหวังประมาณ 1,100 bp (ภาพที่ 28) จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์ดี

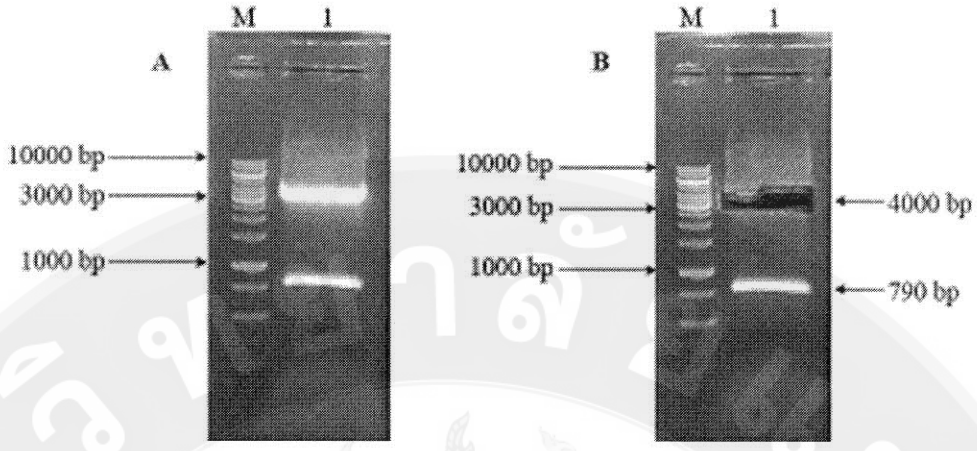
เอ็นเอแล้วทำให้ปลายชิ้นยีน *OsDFR* เกิดเป็นปลายทู่ เพื่อจะทำการเชื่อมชิ้นยีนเข้าสู่พลาสมิด p2CA ต่อไป

สำหรับการเตรียมพลาสมิด p2CA ซึ่งเป็นพลาสมิด pUC19 ที่มีชุดยีนที่ประกอบไปด้วยยีน *hpt*II ขนาด 790 bp โคลนอยู่ที่ *Bam*HI/*Sac*I site ภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter ขนาดประมาณ 630 bp และ *nos* Terminator มีขนาดประมาณ 250 bp ทำการเตรียมพลาสมิดเพื่อสร้างชุดยีน *OsDFR* ให้อยู่ภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos* Terminator โดยการตัดชิ้นยีนเดิมออกจากพลาสมิด p2CA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I จากนั้นทำให้ปลายพลาสมิดเกิดเป็นปลายทู่แล้วแทนที่ด้วยยีน *OsDFR* จากปฏิกิริยาการตัดพลาสมิด p2CA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบชิ้นยีน *hpt*II ขนาด 790 bp และพลาสมิดขนาดประมาณ 4,000 bp ซึ่งก็คือ pUC19 ที่มี dual 35S Promoter และ *nos* Terminator แล้วจึงทำการแยกบริสุทธิ์เฉพาะพลาสมิดขนาดประมาณ 4,000 bp เพื่อใช้ในปฏิกิริยาการเชื่อมเข้ากับยีน *OsDFR* ต่อไป (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 28 ผลการตัดพลาสมิด pBluescript II SK (+) ที่มีชิ้นยีน *OsDFR* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Eco*RI

หมายเหตุ ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder และ ช่องที่ 1 คือ พลาสมิด pBluescript II SK (+) ที่มียีน *OsDFR*



ภาพที่ 29 ผลการตัดพลาสมิด p2CA ที่มีชิ้นยีน *npt*II ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I

หมายเหตุ ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder และ A และ B คือ ภาพเจลก่อนและหลังตัดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4,000 bp

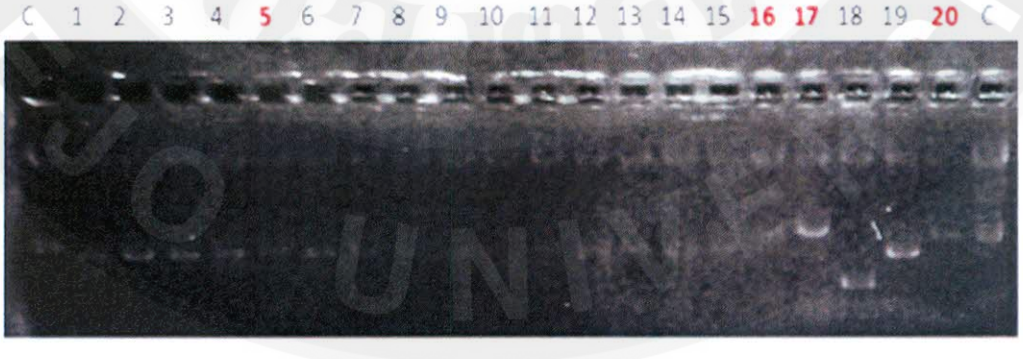
2. การเชื่อมชิ้นยีน *OsDFR* เข้ากับพลาสมิด p2CA แล้วถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* competent cells

เชื่อมยีน *OsDFR* เข้ากับพลาสมิด p2CA ที่ตัดยีน *hpt*II ออกแล้วและส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ competent cells เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินพบว่า ได้โคโลนีสีขาวเกิดขึ้นบนเพลทอาหาร (ภาพที่ 30) จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด (Rapid size screening)

ภาพที่ 30 การเชื่อมชิ้นยีน *OsDFR* เข้ากับพลาสมิด p2CA แล้วถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* competent cells จากนั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมจากการเชื่อมชิ้นยีน *OsDFR* เข้ากับพลาสมิด p2CA ด้วยขนาด

จากการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมที่มียีน *OsDFR* จากใบของข้าวดำพันธุ์ก่ำ เชื่อมอยู่ในพลาสมิด p2CA ที่ตัดยีน *hpt*II ออกแล้ว ขนาดประมาณ 2,100 bp พบว่า ได้โคโลนีสายผสมที่คาดว่ามียีน *OsDFR* แทรกอยู่ และได้ทำการคัดเลือกมาจำนวน 4 โคลน (ภาพที่ 31) จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดและคัดเลือกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป

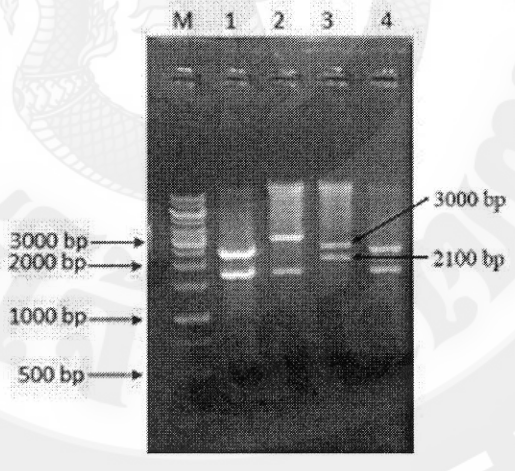


ภาพที่ 31 ผลจากการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาดจาก p2CA

หมายเหตุ C คือ พลาสมิด p2CA ที่ตัดชิ้นยีนออกแล้ว self-ligation และโคลนที่ 1 - 20 คือ โคโลนีสีขาวที่คัดเลือกจากการโคลนยีน *OsDFR* จากข้าวดำพันธุ์ก่ำ เข้าสู่พลาสมิด p2CA ที่ตัดยีน *hpt*II ออกแล้ว และโคลนที่ถูกคัดเลือกด้วยขนาดคือ โคโลนีที่ 5, 16, 17 และ 20

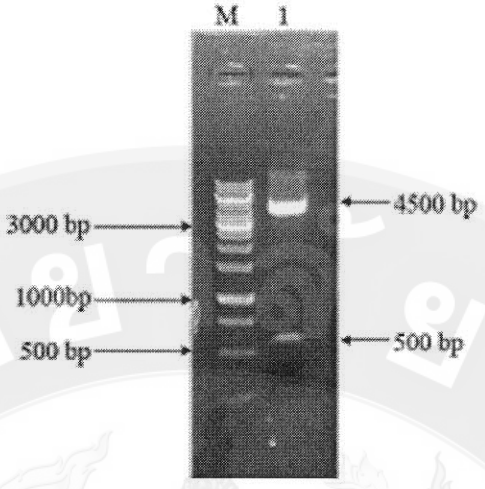
4. การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมจากการเชื่อมชิ้นยีน *OsDFR* เข้ากับพลาสมิด p2CA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตัดพลาสมิดสายผสมจากโคโลนีที่คัดเลือกทั้งหมด 4 โคโลนี ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Eco*RI พบว่าโคลนที่ 17 มีขนาดชิ้น insert เป็นไปตามที่คาดหวัง คือ ขนาดประมาณ 2,100 bp (ภาพที่ 32 ช่องที่ 3) จากนั้นทำการตัดด้วย *Eco*RI และ *Sma*I เพื่อยืนยันทิศที่ถูกต้อง (ทิศ sense) ซึ่งผลจากการตัดคาดว่าโคโลนีที่ 17 อาจเป็นโคโลนีที่มีพลาสมิดที่มีชิ้นยีน *OsDFR* ในทิศที่ถูกต้อง เนื่องจากได้แถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ ขนาดประมาณ 4,477 bp และ 522 bp (ภาพที่ 33) จากนั้นทำการสกัดพลาสมิด (ภาพที่ 34) และวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป



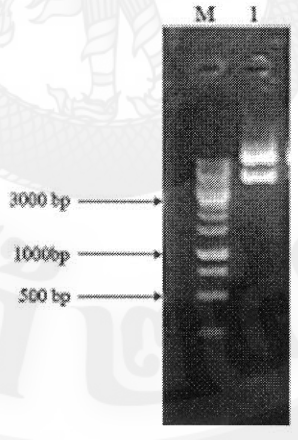
ภาพที่ 32 ผลการตัดพลาสมิด p2CA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Eco*RI ที่คาดว่ามียีน *OsDFR* จากข้าวดำพันธุ์ก่ำ

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 - 4 คือ โคลนที่ 5, 16, 17 และ 20 ตามลำดับ



ภาพที่ 33 ผลการตรวจสอบทิศที่ถูกต้องของพลาสมิดสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Sma*I

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 คือ โคลนที่ 17

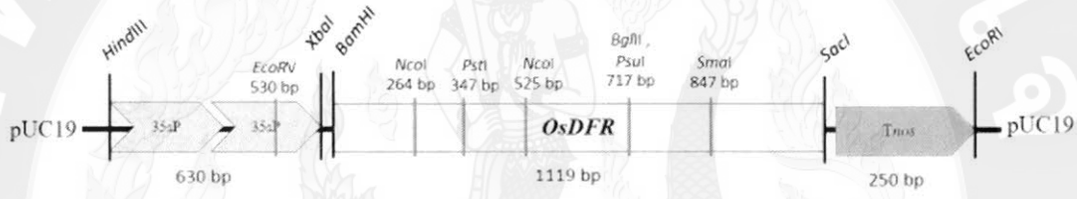


ภาพที่ 34 ผลการสกัดพลาสมิด p2CA ที่มีชิ้นยีน *OsDFR*

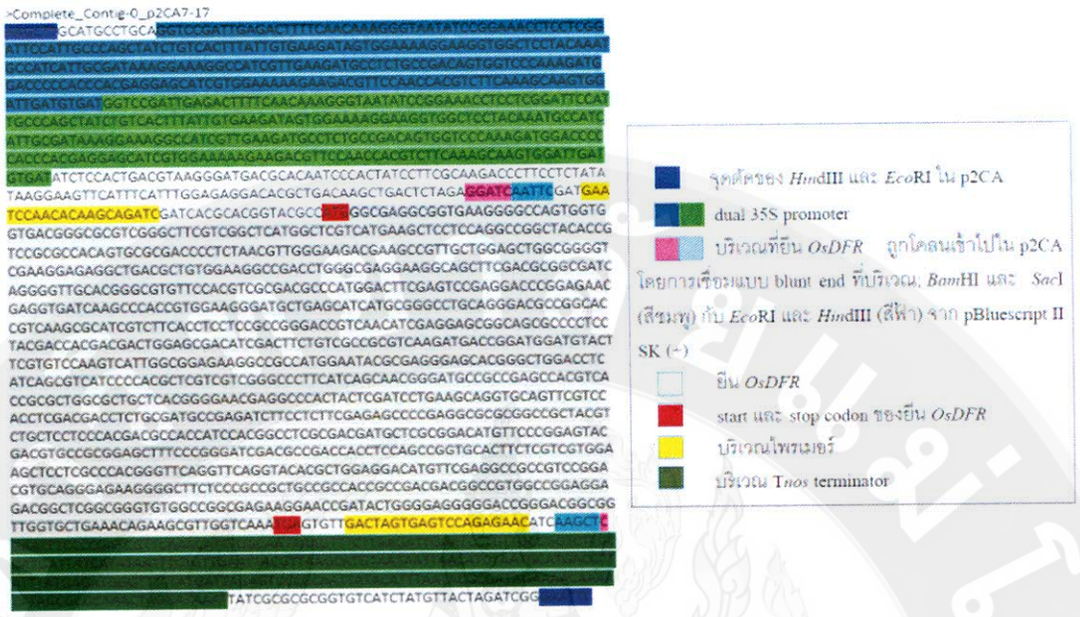
หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 คือ โคลนที่ 17

5. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OsDFR* จากโคโลนีสายผสมที่คัดเลือก

จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่า โคลนที่ 17 มียีน *OsDFR* ที่เชื่อมต่อกับ dual 35S Promoter และ *nos* Terminator โดยชิ้นยีนอยู่ในทิศทางที่ถูกต้องโดย start codon อยู่ทางด้านโปรโมเตอร์ เมื่อนำลำดับเบสของยีน *OsDFR* ไปเปรียบเทียบกับยีน *OsDFR* ของข้าวพันธุ์ Purpleputto (Y07956) ในฐานข้อมูล GenBank อีกครั้งหนึ่งพบว่า ยีน *OsDFR* ที่ทำการเชื่อมกับ พลาสมิด p2CA ที่ได้มีลำดับเบสถูกต้องและอยู่ภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos* Terminator ซึ่งถือว่าเป็นโคลนที่ถูกต้องทำให้ได้ชุดยีนที่ประกอบไปด้วย dual 35SP::*OsDFR*::T*nos* (ภาพที่ 35 และ 36) และได้ทำการโคลนชุดยีนนี้เข้าสู่พลาสมิด pCAMBIA1305.1 เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวต่อไป



ภาพที่ 35 โครงสร้างพลาสมิด p2CA ที่มียีน *OsDFR* ที่มีขนาด 1,119 bp ภายใต้การควบคุมของของ dual 35S Promoter (35SP) ที่มีขนาด 630 bp และ *nos* Terminator (T*nos*) ที่มีขนาด 250 bp

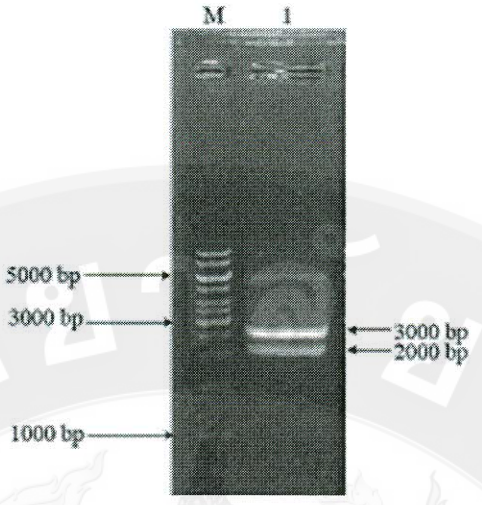


ภาพที่ 36 ลำดับเบสของชุดยีน *OsDFR* ภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos* Terminator

การสร้างพลาสมิดที่มีชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::T*nos* สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว

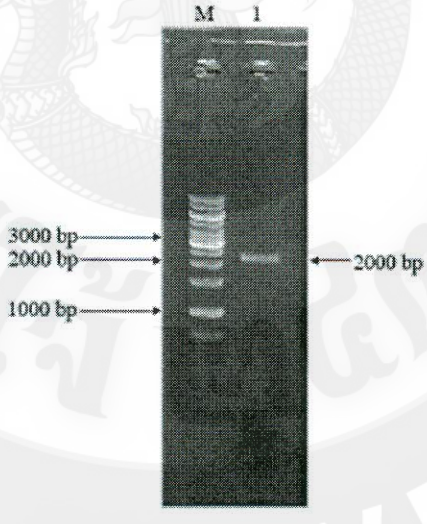
1. การเตรียมพลาสมิด pCAMBIA1305.1 และชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::T*nos*

จากการคัดเลือกโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมที่ประกอบไปด้วยชุดยีน *OsDFR* ภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos* Terminator จากพลาสมิด p2CA พบว่าได้จำนวน 1 โคลน คือ โคลนที่ 17 จากนั้นทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 และถ่ายฝากสู่ *E. coli* competent cells โดยทำการเตรียมชิ้น insert จากการตัดชุดยีน *OsDFR* ซึ่งประกอบไปด้วย dual 35SP::*OsDFR*::T*nos* จากพลาสมิด p2CA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Eco*RI จากผลการทดลองพบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขึ้น 2 แถบ ซึ่งประกอบไปด้วยแถบที่คาดหวังที่มีขนาดประมาณ 2,000 bp ซึ่งเป็นชุดยีน *OsDFR* และอีกแถบหนึ่งที่มีขนาดประมาณ 3,000 bp ซึ่งเป็นส่วนของพลาสมิดที่ถูกเชื่อมกับชุดยีน *OsDFR* (ภาพที่ 37) จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์แล้วนำไปเชื่อมกับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ที่ได้ทำการสกัดพลาสมิดและผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Eco*RI ขนาดประมาณ 11,000 bp ต่อไป (ภาพที่ 38 และ 39)



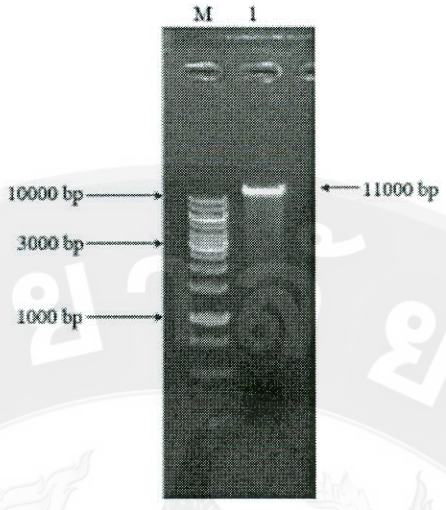
ภาพที่ 37 ผลการตัดพลาสมิดที่ประกอบด้วยชุดยีน *OsDFR* (dual 35SP::*OsDFR*::T*nos*) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ*Eco*RI

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 คือ โคลนที่ 17



ภาพที่ 38 ผลการแยกบริสุทธิ์ชุดยีน *OsDFR* (dual 35SP::*OsDFR*::T*nos*) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Eco*RI

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 คือ โคลนที่ 17



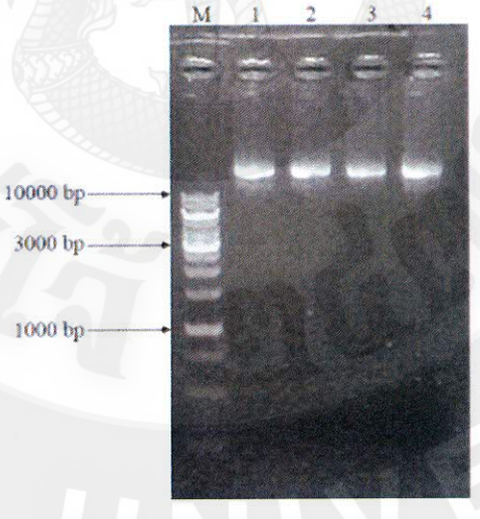
ภาพที่ 39 ผลการสกัดและตัดพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Eco*RI

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 คือ พลาสมิด pCAMBIA 1305.1

2. การเชื่อมชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::T*nos* เข้าสู่ pCAMBIA1305.1

เมื่อเชื่อมต่อชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::T*nos* กับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 จากนั้นทำการส่งถ่ายเข้าสู่ *E. coli* competent cells และ spread บนอาหารแข็ง LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิด พบว่า มีโคโลนีสีขาวขึ้นจำนวน 4 โคโลนี (ภาพที่ 40) จากนั้นนำโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินเหล่านี้มาเลี้ยงในอาหารเหลว และทำการสกัดพลาสมิด (ภาพที่ 41)

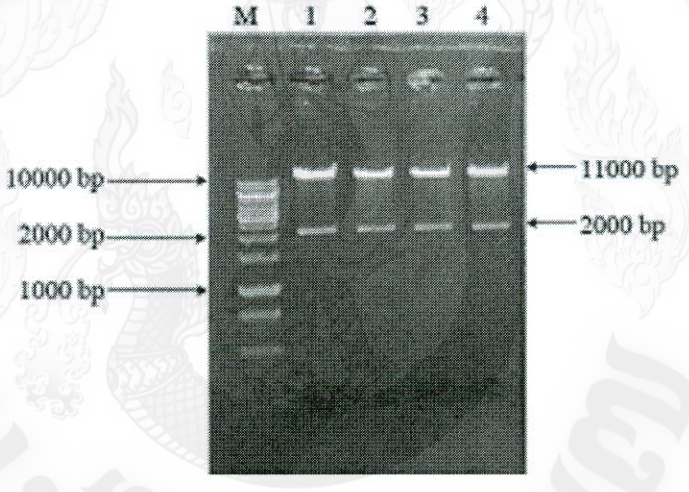
ภาพที่ 40 ผลการส่งถ่ายดีเอ็นเอสายผสมจากการเชื่อมต่อชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::T*nos* เข้ากับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 เข้าสู่ *E. coli* competent cells เพาะเลี้ยงบนอาหาร LB ที่มีกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 41 ผลการสกัดพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ที่คาดว่ามีชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::T*nos* ของโคลนที่ถูกคัดเลือก

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 - 4 คือ พลาสมิด pCAMBIA1305.1 ที่คาดว่าได้รับเชื่อมต่อชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::T*nos* โคลนที่ 1 - 4 ตามลำดับ

เมื่อทำการคัดเลือกพลาสมิดสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Eco*RI พบว่า โคโลนีที่ทำการคัดเลือกมาทั้ง 4 โคลน มีขนาดเป็นไปตามที่คาดหวังประมาณ 2,000 bp (ภาพที่ 42) จากนั้นจึงทำการคัดเลือกโคโลนีที่ 1 เพื่อทำการส่งวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสและความสมบูรณ์ของชุดยีน *OsDFR* อีกครั้งหนึ่ง หลังจากนั้นทำการส่งถ่ายเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ต่อไป



ภาพที่ 42 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมที่มีชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::T*nos* เชื่อมกับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และ *Eco*RI

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 - 4 คือ พลาสมิด pCAMBIA1305.1 ที่คาดว่าได้รับเชื่อมต่อชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::T*nos* โคลนที่ 1 - 4 ตามลำดับ

เมื่อเชื่อมต่อชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::T*nos* เข้าสู่พลาสมิด pCAMBIA1305.1 จะได้ construct ซึ่งให้ชื่อว่า pCAMBIAKNLDFR-1 ดังแสดงในภาพที่ 43 ซึ่งภายในบริเวณ LB และ RB ประกอบไปด้วยชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::T*nos* ซึ่งมียีน *gusA* เป็นยีนรายงานผล และยีน *hpt*II

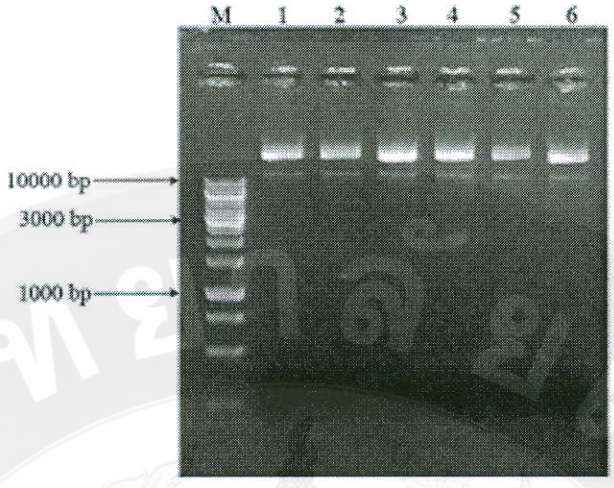
(ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน) เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก ซึ่งบริเวณเหล่านี้จะถูกส่งผ่านไปสู่จีโนมของข้าวต่อไป

ภาพที่ 43 โครงสร้างพลาสมิด pCAMBIAKNLDFR-1 ซึ่งเป็น binary vector สำหรับการถ่ายยีน *OsDFR* เข้าสู่ข้าว

หมายเหตุ LB คือ Left border, RB คือ Right border, 35SP คือ 35S Promoter, 35ST คือ 35S Terminator, dual 35SP คือ dual 35S Promoter, *OsDFR* คือ ยีนที่สนใจ, *Tnos* คือ *nos* Terminator, *GUS Plus* คือยีน รายงานผล *gusA*, และ *hptII* คือ ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

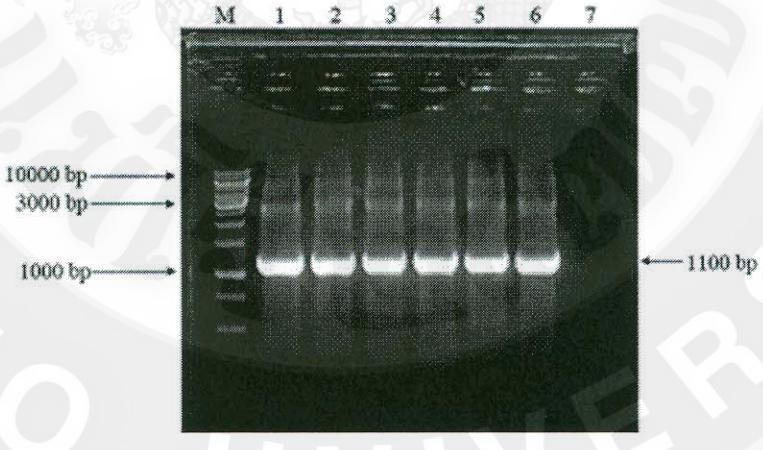
3. การส่งถ่ายพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ที่มีชิ้นยีน *OsDFR* เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105

จากการคัดเลือกโคโลนีของ *E. coli* DH5 alpha ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ซึ่งมีชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::*Tnos* (พลาสมิด pCAMBIAKNLDFR-1) ทำการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีที่ 1 และส่งถ่ายเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ด้วยวิธี heat shock และเลี้ยงบนอาหารที่มีไรแฟมพิซินและกานามัยซิน นำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะไรแฟมพิซินและกานามัยซิน จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี CTAB mini plasmid preparation (ภาพที่ 44) และนำพลาสมิดที่สกัดได้ไปเป็นแม่พิมพ์ในการทำ PCR เพื่อคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิด pCAMBIAKNLDFR-1 พบว่า ทั้ง 6 โคลนที่ทำการคัดเลือกมาเกิดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังของยีน *OsDFR* ที่ขนาดประมาณ 1,100 bp ดังนั้นอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่คัดเลือกทั้งหมดได้รับพลาสมิด pCAMBIAKNLDFR-1 ที่มียีน *OsDFR* (ภาพที่ 45)



ภาพที่ 44 ผลการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีสายผสม (pCAMBIAKNLDFR-1) ที่มีชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::T*nos* เชื่อมกับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 จากอะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ EHA105 ด้วยวิธี CTAB mini plasmid preparation

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 - 6 คือ พลาสมิดที่ทำการคัดเลือกจากโคโลนีที่ 1 - 6 ตามลำดับ



ภาพที่ 45 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสม (pCAMBIAKNLDFR-1) ที่มีชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::T*nos* เชื่อมกับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 จากอะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ EHA105 ด้วยเทคนิค PCR

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 - 6 คือ พลาสมิดสาย-ผสม (pCAMBIAKNLDFR-1) ที่ทำการคัดเลือกจากโคโลนีที่ 1 - 6 ตามลำดับ ช่อง 7 คือ น้ำกลั่น

การถ่ายยีน *OsDFR* เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Kasalath และการวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน

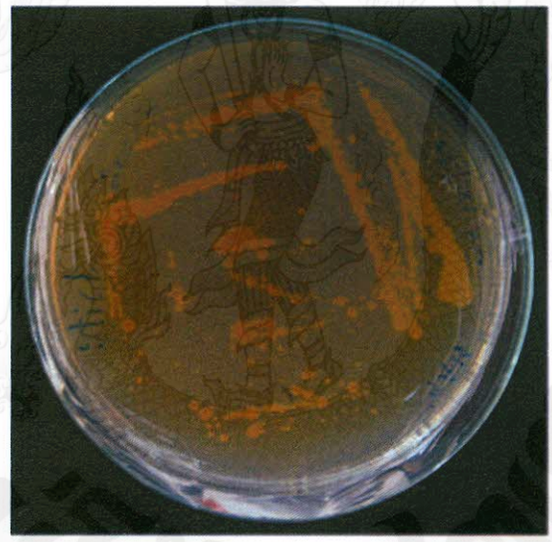
1. การชักนำเมล็ดข้าวให้เกิดแคลลัส

หลังจากการชักนำเมล็ดแก่ของข้าวพันธุ์ Kasalath ให้เกิดแคลลัส บนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคคลัส N6D เป็นระยะเวลา 4 - 6 สัปดาห์ พบว่า เนื้อเยื่อบริเวณ scutella มีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสที่สมบูรณ์ มีลักษณะเกาะตัวกันแน่น มีสีเหลือง (ภาพที่ 46) ซึ่งพบว่าเป็นแคลลัสที่มีลักษณะที่ดีเหมาะแก่การถ่ายยีน และมีการแบ่งเซลล์อย่างดี จากนั้น นำแคลลัสที่ได้นี้ไปทำการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIAKNLDFR-1 ซึ่งมียีน *OsDFR* โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมต่อไป

ภาพที่ 46 ลักษณะแคลลัสข้าวพันธุ์ Kasalath ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร N6D ดัดแปลง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

2. การเตรียมอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIAKNLDFR-1

จากการนำ glycerol stock ของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIAKNLDFR- 1 ซึ่งประกอบด้วยยีน *OsDFR* เป็นยีนเป้าหมาย ยีน *gusA* เป็นยีนรายงานผล และยีนต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (*hptII*) เป็นยีนคัดเลือก ทำการ streak เชื้อลงบนอาหารสูตร LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินและไรแฟมพิซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน ทำการเลือกโคโลนีเดี่ยวของอะโกรแบคทีเรียม ที่มีลักษณะกลมนูน และมีสีครีม (ภาพที่ 47) เพื่อนำไปเลี้ยงเชื้อเพื่อทำการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่เตรียมไว้



ภาพที่ 47 ลักษณะโคโลนีของอะโกรแบคทีเรียมที่เจริญบนอาหาร LB ที่มีสารปฏิชีวนะไรแฟมพิซินและกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน

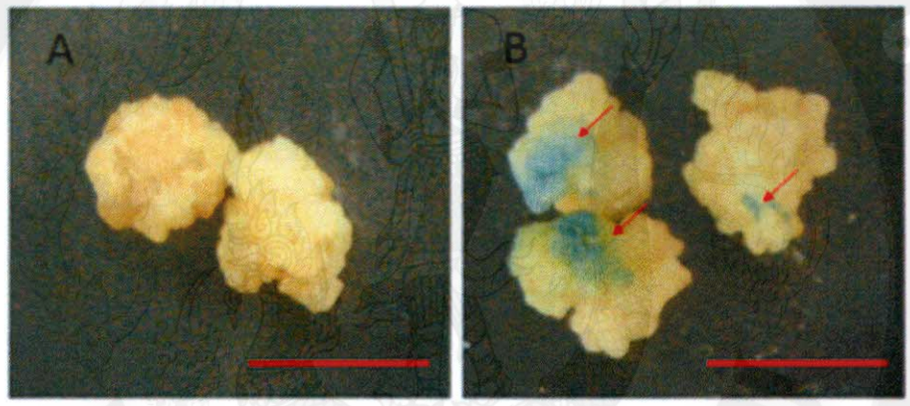
3. การทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวโดยวิธี GUS assay

จากการเพาะเลี้ยงร่วมระหว่างแคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath กับอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIAKNLDFR-1 เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการล้างแคลลัสและทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนด้วยวิธี GUS assay พบว่าแคลลัสข้าวพันธุ์ Kasalath มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Prodhan and Komamine

(2007) ที่พบว่า ในข้าวพันธุ์ Kasalath มีการแสดงออกสูงถึง 97 - 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 16 และภาพที่ 48)

ตารางที่ 17 ประสิทธิภาพการถ่ายยีน *OsDFR* เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Kasalath โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gusA*

ครั้งที่ถ่ายยีน	จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	จำนวนแคลลัสที่เกิดสีฟ้า	เปอร์เซ็นต์การเกิดสีฟ้า
1	10	6	60
2	10	8	80



ภาพที่ 48 การตรวจสอบแคลลัสข้าวพันธุ์ Kasalath ด้วยวิธี GUS assay ภายหลังเพาะเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมเป็นเวลา 3 วัน (bar = 0.5 cm)

หมายเหตุ (A) แคลลัสชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (B) แคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน

4. เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือก และเปอร์เซ็นต์การเกิดต้น

หลังจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIAKNLDFR-1 บนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 1 ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 15 มิลลิกรัมต่อลิตร และไทเมนทิน 150 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แคลลัสทุกกลุ่มยังคงมีการเจริญเติบโต มีลักษณะเป็นสีเหลืองและรอดตายทั้งหมด จากนั้นทำการย้ายแคลลัสที่รอดตายจากการวางบนอาหารคัดเลือกครั้งที่

1 (ภาพที่ 49) ไปบนอาหารสูตรคัดเลือกครั้งที่ 2 ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่มีความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แคลลัสมีเปอร์เซ็นต์รอดบนอาหารคัดเลือกสูงที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 17) และมีแคลลัสบางส่วนมีการเจริญเติบโตเริ่มมีการหยุดชะงัก และพบว่า แคลลัสบางกลุ่มไม่มีการเจริญเติบโต กลายเป็นสีน้ำตาล และตายไปในที่สุด (ภาพที่ 50 และ 51) จากนั้นทำการย้ายแคลลัสที่รอดตายไปบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสที่สามารถต้านสารปฏิชีวนะได้จะมีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นและพัฒนาต่อไปจนเกิดจุดเขียวและพัฒนาเป็นต้นได้

ตารางที่ 18 เปอร์เซ็นต์การรอดของแคลลัสหลังการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมที่มีพลาสมิด pCAMBIAKNLDFR-1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตรและไทเมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

ครั้งที่ถ่ายยีน	จำนวนกลุ่มแคลลัสทั้งหมด	จำนวนแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 [(a)]	จำนวนกลุ่มแคลลัสที่เกิดจุดเขียว[(b)]	จำนวนต้นทั้งหมด[(c)]
1	24	24/24 (100)	17/24 (70.83)	11/24 (45.83)
2	53	52/53 (98.1)	30/53 (56.66)	22/53 (41.50)

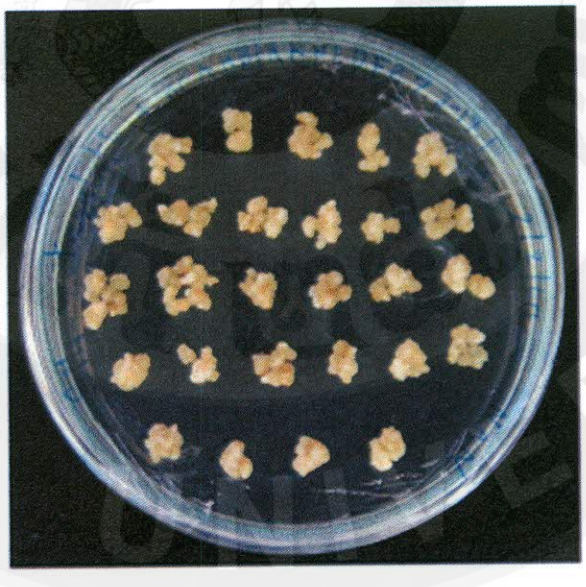
หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บ หมายถึง แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์

(a) = (จำนวนแคลลัสที่รอด/จำนวนแคลลัสเริ่มต้น) x 100

(b) = (จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียว/จำนวนแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2) x 100

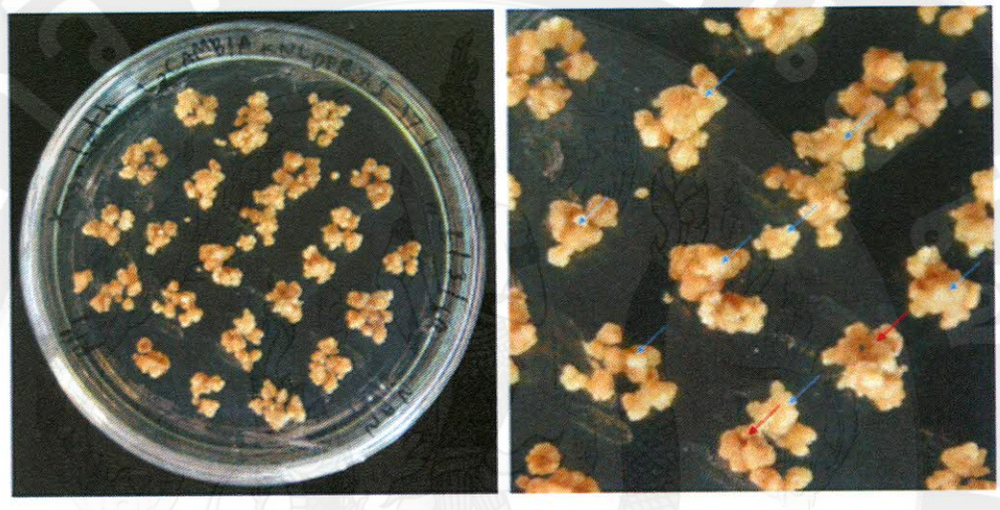
(c) = (จำนวนต้น/จำนวนแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2) x 100

ภาพที่ 49 ลักษณะแคลลัสข้าวพันธุ์ Kasalath หลังการถ่ายยีนเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารคัดเลือก (N6D) ครั้งที่ 1 ที่มีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร และไทเมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์



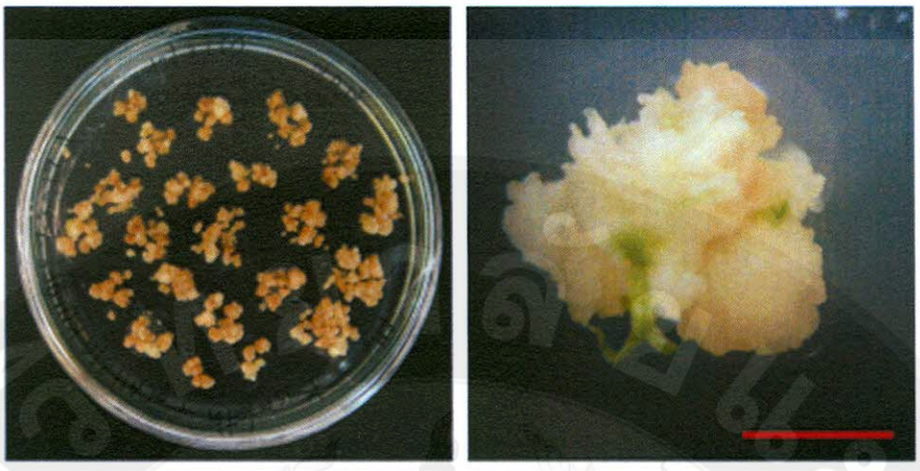
ภาพที่ 50 ลักษณะแคลลัสข้าวพันธุ์ Kasalath หลังการถ่ายยีนเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารคัดเลือก (N6D) ครั้งที่ 2 ที่มีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และไทเมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์

จากการย้ายแคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่รอดตายจากการวางบนอาหารสูตรคัดเลือกครั้งที่ 2 ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ไปสู่อาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น พบว่าแคลลัสเริ่มมีการเจริญเติบโตอีกครั้ง มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว แคลลัสเริ่มเป็นสีเหลืองและมีความชุ่มชื่นขึ้น (ภาพที่ 51) และพบว่าแคลลัสเริ่มเกิดจุดเขียวหลังจากวางบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 52)



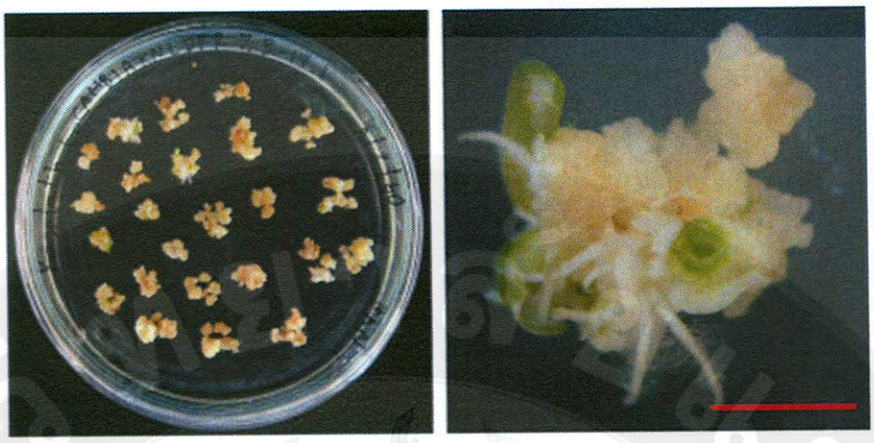
ภาพที่ 51 ลักษณะแคลลัสข้าวพันธุ์ Kasalath ที่รอดและตาย เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น (MS) ที่มี NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และไทเมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์

หมายเหตุ ลูกศรสีน้ำเงินคือ แคลลัสที่รอดตาย และลูกศรสีแดงคือ แคลลัสที่ตายบนอาหารคัดเลือกที่มีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

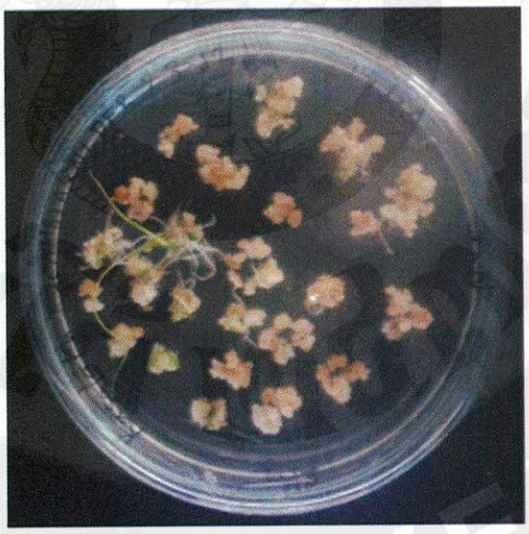


ภาพที่ 52 ลักษณะการเกิดจุดเขียวบนแคลลัสข้าวพันธุ์ Kasalath ที่รอด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น (MS) ที่มี NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และไทเมนทิน ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (bar = 0.5 cm)

หลังจากที่วางแคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีนแล้ววางบนอาหารชักนำให้เกิดต้นที่มี NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และไทเมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่เกิดจุดเขียว เริ่มมีการพัฒนาไปเป็นยอด และเริ่มมีรากเกิดขึ้น (ภาพที่ 53) และในสัปดาห์ที่ 6 พบว่าแคลลัสดังกล่าวพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 54) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นสูงสุดที่ 45.83 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 17) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Saika and Toki (2010) ที่ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ใช้เป็นข้าว *indica* ต้นแบบในการถ่ายยีน ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพการเกิดต้นอยู่ที่ 66.9 เปอร์เซ็นต์ ทำการย้ายต้นพืชไปบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดรากและเจริญเติบโตเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์และแข็งแรง (ภาพที่ 55) จากนั้นทำการย้ายต้นพืชลงปลูกในกระถางต่อไป



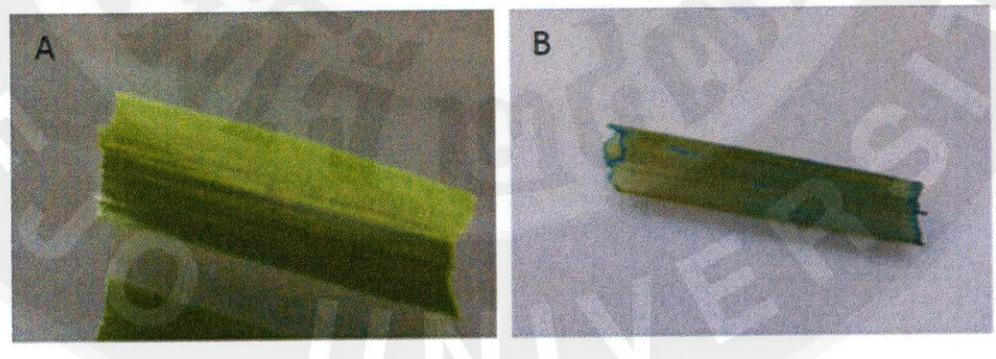
ภาพที่ 53 ลักษณะการเกิดจุดเขียวบนแคลลัสข้าวพันธุ์ Kasalath ที่รอด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น (MS) ที่มี NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และไทเมนทิน ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 สัปดาห์ (bar = 0.5 cm)



ภาพที่ 54 ลักษณะการเกิดยอดบนแคลลัสข้าวพันธุ์ Kasalath ที่รอด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น (MS) ที่มี NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และไทเมนทิน ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ภาพที่ 55 ลักษณะต้นสมบูรณ์ของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้จากการถ่ายยีน *OsDFR* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 1 สัปดาห์

เมื่อได้ต้นข้าวจากการถ่ายยีนทั้งหมดจำนวน 11 ต้น และทำการเพาะเลี้ยงพบว่ามีต้นที่มีการเจริญเติบโตทั้งหมด 9 ต้น จากนั้นนำใบข้าวมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gusA* พบว่า ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่นำมาตรวจสอบทั้งหมดจำนวน 9 ต้น เกิดเป็นสีฟ้าจำนวน 9 ต้น คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 56) ซึ่งต้นข้าวที่ได้รับยีนเหล่านี้จะต้องนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

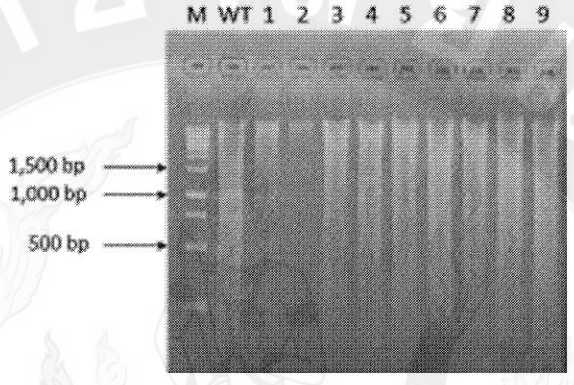


ภาพที่ 56 การตรวจสอบใบข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้จากการถ่ายยีน ด้วยวิธี GUS assay

หมายเหตุ (A) คือ ใบจากต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (B) ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน

5. การวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR

การตรวจสอบต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้จากการถ่ายยีนจำนวน 9 ต้น โดยนำต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนมาสกัดดีเอ็นเอพบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 57) แสดงว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี และสามารถนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค PCR ต่อไป



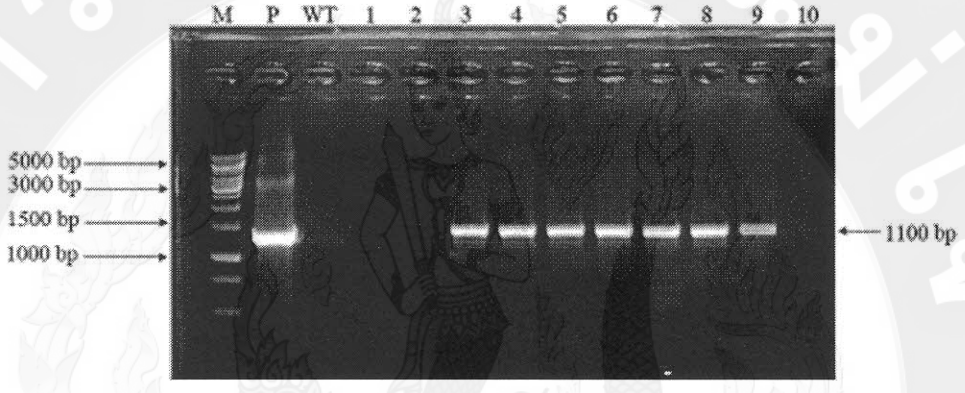
ภาพที่ 57 การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็เอที่สกัดได้จากต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรฟอริซิส

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ WT คือ ดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ช่องที่ 1 - 9 คือ ดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 1 - 9 ตามลำดับ

เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับการถ่ายยีนจำนวน 9 ต้น มาตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *OsDFR* ในจีโนม ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* พบว่ามีต้นข้าวพันธุ์ Kasalath จำนวน 7 ต้นที่เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 bp แสดงว่า ต้นข้าวที่นำมาตรวจสอบมีการแทรกตัวของชุดยีน *OsDFR* ที่ใส่เข้าไปในจีโนมของข้าว คิดเป็น 77.78 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 18 ภาพที่ 58) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *gusA* ที่พบว่า ทุกต้นที่นำใบมาตรวจสอบเกิดสีฟ้า ดังนั้น ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนทั้งหมด 7 ต้น ได้รับยีน *OsDFR* แต่ลักษณะต้นข้าวที่ได้มีลักษณะสีเขียวไม่มีลักษณะสีม่วงแดงของแอนโทไซยานิน

ตาราง 19 ผลการวิเคราะห์ต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR

พันธุ์ข้าว	จำนวนต้นที่ทำ PCR ทั้งหมด	จำนวนต้นที่ได้ผล PCR บวก	ต้นที่ได้ผล PCR บวก	เปอร์เซ็นต์ต้นที่ได้ PCR บวก
Kasalath	9	7	1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8 และ 1-9	77.78

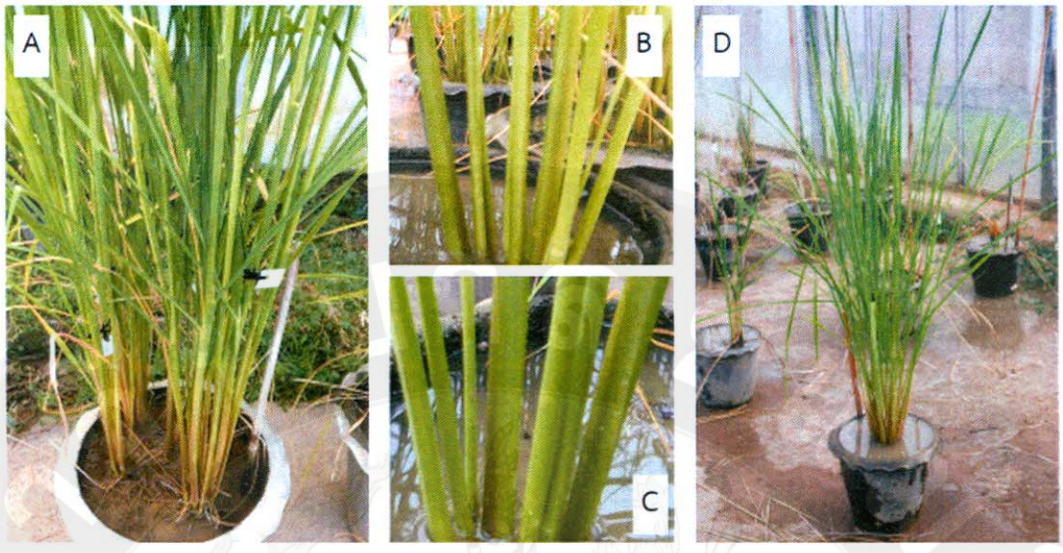


ภาพที่ 58 การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *OsDFR* ในข้าวพันธุ์ Kasalath ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR*

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่อง P คือ พลาสมิด pCAMBIAKNLDFR-1 ช่อง WT คือ ดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ช่องที่ 1 - 9 คือ ดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 1 - 9 ตามลำดับ ช่องที่ 10 คือ น้ำกลั่น

6. การตรวจสอบฟีโนไทป์ของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม

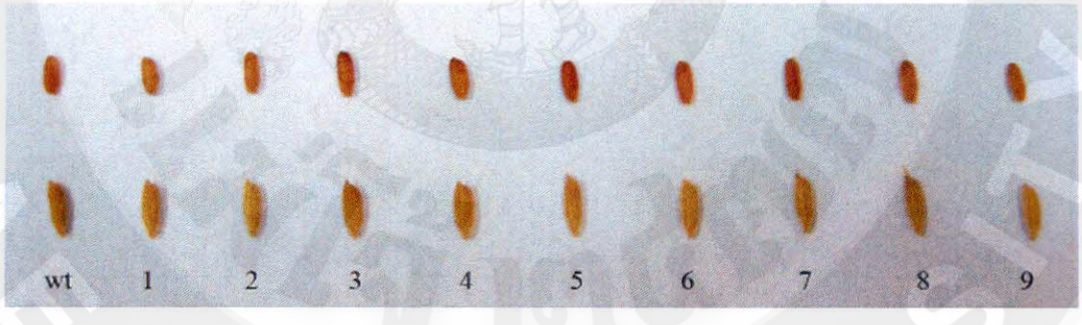
จากผลการทดสอบต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR พบว่า ได้ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมทั้งหมด 7 ต้น เมื่อตรวจสอบลักษณะฟีโนไทป์ของลำต้นและใบ พบว่า ไม่มีความแตกต่างจาก wild-type (ภาพที่ 59) และลักษณะสีของเยื่อหุ้มเมล็ดของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมไม่มีความแตกต่างจาก wild-type และต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนที่มีผล PCR ลบ (ภาพที่ 60)



ภาพที่ 59 การตรวจสอบฟีโนไทป์ของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีนในรุ่น T_0

หมายเหตุ A และ B คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน

C และ D คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน



ภาพที่ 60 การตรวจสอบฟีโนไทป์ของเมล็ด T_1 ในข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีนในรุ่น T_0

หมายเหตุ wt คือ wild-type

1 – 2 คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีนแต่ไม่มียีน *OsDFR* แทรกอยู่ในจีโนมต้นที่ 1 – 2

3 - 9 คือ ต้นดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน *OsDFR* ต้นที่ 3 – 9

7. การทดสอบการกระจายตัวของยีน

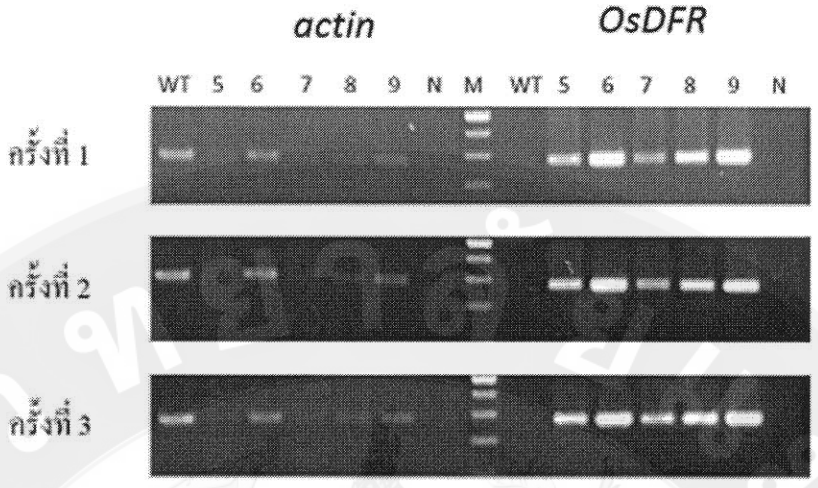
จากรุ่น T_0 ได้ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมทั้งหมด 7 ต้น จากนั้นนำมาทดสอบการกระจายตัวของยีน *gusA* จำนวน 5 ต้น เนื่องจากเมล็ด T_1 จากต้นที่ 3 และ 4 เมื่อนำมาเพาะแล้วพบว่า เมล็ดไม่งอก จากตารางที่ 19 พบว่าผลจากการวิเคราะห์ค่า χ^2 ที่ได้ ให้ผลต่ำกว่าค่า χ^2 จากตาราง ที่ df เท่ากับ 1 ซึ่งมีค่า 3.841 แสดงว่า มีการกระจายตัวของยีนไปสู่รุ่นลูก T_1 เป็นไปตามกฎของเมนเดลคือ อัตราส่วน 3 : 1 ดังนั้น ผลการทดสอบต้น T_0 ทุกต้นมียีนแทรกอยู่หนึ่งตำแหน่ง (single insertion site)

ตารางที่ 20 ผลการทดสอบการกระจายตัวของยีน *gusA* ในต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_0 ที่มียีน *OsDFR*

ต้น T_0	จำนวนต้น T_1 ทั้งหมด	จำนวนต้น T_1 ที่เกิดสีฟ้า	จำนวนต้น T_1 ที่ไม่เกิดสีฟ้า	χ^2
5	18	12	6	0.667
6	22	18	4	0.545
7	24	20	4	0.887
8	25	16	9	1.613
9	22	17	5	0.06

8. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *OsDFR* ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1

นำต้น T_1 ที่ได้จากต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_0 ทั้ง 5 ต้น มาทำการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด และทำการเปลี่ยน cDNA จากนั้นนำมาทดสอบการแสดงออกของยีน *OsDFR* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* และใช้ยีน *actin* เป็นยีนควบคุม พบว่า ในต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 มีการแสดงออกของยีน *OsDFR* ทุกต้น และพบว่าต้นที่ 5 มีการแสดงออกของยีน *OsDFR* สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกับการแสดงออกของยีน *actin*



ภาพที่ 61 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในใบข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR*

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA Ladder ช่อง WT คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ช่องที่ 5 - 9 คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 5 - 9 ตามลำดับ ช่องที่ N คือ น้ำกลั่น

จากการถ่ายยีน *OsDFR* ซึ่งเป็นยีนโครงสร้างที่สำคัญในวิถีการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินและแอนโทไซยานินจากข้าวดำพันธุ์ก่ำ ไปสู่ข้าวแดงพันธุ์ Kasalath ซึ่งจากการรายงานของ Furukawa et al. (2006) พบว่ามียีน *OsDFR* ที่เป็นอัลลีลเด่น และวัตถุประสงค์ในการถ่ายยีนครั้งนี้เพื่อทำการทดสอบว่าการถ่ายยีน *OsDFR* ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos* Terminator จะสามารถเพิ่มการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินได้หรือไม่ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ไม่มีเพิ่มการสังเคราะห์สีในข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับยีน ลักษณะแคลลัสและต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนมีลักษณะปกติเหมือน wild-type แคลลัสมีลักษณะสีเหลือง เมื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นแคลลัสจะเกิดจุดสีเขียว ต้นที่ได้มีลักษณะต้นและใบสีเขียว ซึ่งไม่มีการสร้างรงควัตถุสีแดงในส่วนต่าง ๆ ของใบและลำต้นได้เมื่อเปรียบเทียบกับต้น wild-type (ภาพที่ 59) นอกจากนี้พบว่า ต้นที่ได้รับยีน *OsDFR* มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงเช่นเดียวกับต้น wild-type และพบว่า ลักษณะความเข้มของสีไม่มีความแตกต่างกับ wild-type เมื่อมองด้วยตาเปล่า (ภาพที่ 60) และจากการศึกษาผลการแสดงออกของยีน

OsDFR โดยเทคนิค RT-PCR พบว่า มีการแสดงออกของยีน *OsDFR* ที่สูงในต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมต้นที่ 6 - 9 ในขณะที่ต้น wild-type มีการแสดงออกของยีน *OsDFR* ที่ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับยีน *actin* สอดคล้องกับการรายงานผลของ กนกภรณ์ และคณะ (2558ข) ที่ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในใบและเมล็ดของข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำ พบว่ายีน *OsDFR* ไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนเมื่อเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน *actin* แต่พบการแสดงออกทั้งในใบและเมล็ดของข้าวดำที่นำมาศึกษา อาจเนื่องมาจากในบริเวณส่วนต่าง ๆ ของลำต้นและใบไม่มีการแสดงออกของยีน *Rc* ซึ่งทำหน้าที่เป็นทรานสคริพชันแฟกเตอร์ จากการศึกษาของ Furukawa et al. (2006) พบว่าในข้าวสีแดงที่มีการสะสมของสารโปรแอนโทไซยานิดินเกิดจากการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในตำแหน่ง *Rd* ที่ทำหน้าที่ในการส่งเสริมการแสดงออกของข้าวสีแดงร่วมกับการแสดงออกของยีน *Rc* ทำหน้าที่เป็นทรานสคริพชันแฟกเตอร์ ซึ่งอยู่ในกลุ่มของโปรตีน basic helix-loop-helix (bHLH) (Chandler et al., 1989; Furukawa et al., 2006) ทั้งนี้ไม่พบการเพิ่มการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินในข้าว อาจเนื่องมาจากการเพิ่มการแสดงออกเฉพาะยีนโครงสร้างอย่างเดียวอาจไม่ทำให้ฟีโนไทป์ของต้นข้าวเปลี่ยนแปลงได้ ต้องทำการเพิ่มการแสดงออกของยีนสร้างทรานสคริพชันแฟกเตอร์ด้วย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การโคลนยีน *OsDFR*

การตรวจสอบยีน *OsDFR* จากจีโนมของข้าวจำนวน 9 พันธุ์ ด้วยเทคนิค PCR พบว่าทั้งข้าวขาวและข้าวสีมียีน *OsDFR* เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *OsDFR* โดยเทคนิค RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในใบอ่อนของข้าวดำพันธุ์ก่ำ

จากการทดลองสามารถโคลนยีน *OsDFR* ได้จากใบอ่อนของข้าวดำพันธุ์ก่ำ ที่มีขนาดประมาณ 1,100 bp เมื่อทำการวิเคราะห์ พบว่า ประกอบด้วยบริเวณ open reading frame (ORF) ขนาด 1,119 คู่เบส จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนที่มีลำดับเบสถูกต้องคือ มีบริเวณตั้งแต่ start ไปถึง stop มาเปรียบเทียบกับยีน *OsDFR* จากข้าว nearly isogenic Purpleputtu ที่เป็นข้าวดำในฐานข้อมูล (Y07956) พบว่าเป็นบริเวณ open reading frame (ORF) ขนาด 1,119 คู่เบส และมีลำดับเบสเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำ ORF ของยีน *OsDFR* จากข้าวพันธุ์ก่ำมาแปลรหัส พบว่า ได้ลำดับกรดอะมิโนขนาด 372 หน่วย จากนั้นทำการเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความเหมือนกับข้าวดำพันธุ์ Purpleputtu (CAA69253) และข้าวดำพันธุ์ Murasaki (BAA36183) ในฐานข้อมูลทุกตำแหน่ง

การสร้างชุดยีน 35SP::*OsDFR*::T*nos* ที่มียีน *OsDFR* จากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำ ขนาด 1,119 bp ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos* Terminator เพื่อใช้สำหรับถ่ายยีนไปสู่ข้าว ทำการคัดเลือกได้ดีเอ็นเอสายผสมที่มีขนาดประมาณ 2,000 bp เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่าเป็นยีน *OsDFR* ที่ประกอบไปด้วย dual 35S Promoter และ *nos* Terminator ในทิศทางของยีนที่ถูกต้อง จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับเบสและกรดอะมิโนของยีน *OsDFR* พบว่ามีความถูกต้อง (in frame) จึงทำการโคลนชุดยีนเข้าสู่พลาสมิด pCAMBIA1305.1 ซึ่งเป็น binary vector ที่มียีน *gusA* เป็นยีนรายงานผล และยีน *hpt*II เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก แล้วส่งถ่ายเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวต่อไป

การถ่ายยีน *OsDFR* เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Kasalath

การถ่ายยีนในครั้งนี้ ได้ทำการถ่ายยีนไปสู่ข้าวแดงพันธุ์ Kasalath ซึ่งมียีน *Rc* และ *Rd* เป็นอัลลีลเด่น วัตถุประสงค์ของการถ่ายยีนในครั้งนี้เพื่อ การเพิ่มการแสดงออกของยีน *OsDFR* ซึ่งอาจมีผลต่อการเกิดสีแดงที่เข้มขึ้นในเยื่อหุ้มเมล็ดและเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ หรืออาจเกิดการลดหรือยับยั้งการเกิดสีแดงที่เยื่อหุ้มเมล็ดของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม เพื่อศึกษาหน้าที่และความสำคัญของยีน *OsDFR* ในวิถีการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์

การถ่ายยีน *OsDFR* เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Kasalath และตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนด้วยวิธี GUS assay พบว่า การถ่ายยีน 2 ครั้ง มีประสิทธิภาพการถ่ายยีน 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน พบว่าการรอดของแคลลัสบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์สูงสุด 100 และ 98.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการย้ายแคลลัสไปสู่อาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน พบว่า มีการเกิดจุดสีเขียวบนแคลลัสสูงคิดเป็น 70.83 และ 56.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการถ่ายยีนครั้งที่ 1 พบว่า ได้ต้นจำนวน 11 ต้น และเมื่อทำการย้ายปลูกลงดินพบว่ามีจำนวน 9 ต้น ที่มีการเจริญเติบโต ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gusA* พบว่าเกิดสีฟ้าจำนวน 9 ต้น คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำต้นข้าวทั้ง 9 ต้นที่ได้มาทำการตรวจสอบยีน *OsDFR* ด้วยเทคนิค PCR พบว่า มีต้นข้าวจำนวน 7 ต้นที่ให้ผล PCR เป็นบวก แสดงว่า ต้นข้าวทั้ง 7 ต้น มียีน *OsDFR* จากข้าวพันธุ์ก่ำ เข้าไปแทรกอยู่ในจีโนม

การถ่ายยีน *OsDFR* ซึ่งเป็นยีนโครงสร้างที่สำคัญวิถีการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินและแอนโทไซยานินจากข้าวดำพันธุ์ก่ำไปสู่ข้าวแดงพันธุ์ Kasalath ซึ่งมียีน *OsDFR* ที่เป็นอัลลีลเด่น พบว่า ไม่มีการสร้างรงควัตถุสีแดงในแคลลัสและต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีน โดยแคลลัสมีลักษณะสีเหลือง เมื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นแคลลัสเกิดจุดสีเขียวและพัฒนาไปเป็นยอด ต้นที่ได้มีลักษณะต้นและใบสีเขียว พบว่า ไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับต้น wild-type ทั้งนี้พบข้าวดัดแปลงพันธุกรรมมีการเกิดสีแดงเฉพาะที่เยื่อหุ้มเมล็ดเท่านั้น และพบว่าลักษณะความเข้มของสีไม่มีความแตกต่างกับ wild-type เมื่อมองด้วยตาเปล่า อาจเนื่องมาจากในบริเวณส่วนต่าง ๆ ของลำต้นและใบไม่มีการแสดงออกของยีน *Rc* ซึ่งทำหน้าที่สร้างทรานสคริพชันแฟกเตอร์และทำงานร่วมกับยีน *DFR* เพื่อการสร้างสี จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์การกระจายตัวของยีน *gusA* ในข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 พบว่า มีการกระจายตัวของยีนไปสู่รุ่นลูก เป็นไปตามกฎของเมนเดลคือ อัตราส่วน 3 : 1 แสดงว่าต้น

ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมมียีนที่ถ่ายเข้าไปแทรกอยู่หนึ่งตำแหน่งในจีโนม (single insertion site) นอกจากนี้ ได้วิเคราะห์การแสดงออกของยีน *OsDFR* ในข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 พบว่า มีการแสดงออกของยีน *OsDFR* ที่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับต้น wild-type อย่างไรก็ตาม พบว่าไม่เกิดการสังเคราะห์สีในเยื่อต่าง ๆ เพิ่มขึ้น ในงานวิจัยต่อไปควรศึกษาการแสดงออกของยีนสร้างทรานสคริพชันแฟกเตอร์ที่ควบคุมการสังเคราะห์สีในข้าว ร่วมกับการศึกษาการแสดงออกของยีน *OsDFR* โดยอาจทำการถ่ายยีน *OsDFR* ซึ่งเป็นยีนโครงสร้าง ร่วมกับยีน *Rc* ซึ่งทำหน้าที่สร้างทรานสคริพชันแฟกเตอร์ในวิถีการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินไปสู่ข้าวขาว หรือทำการถ่ายยีน *OsDFR* ร่วมกับยีน *OsC1* และ *OsB2* หรือ *OsB1* ซึ่งเป็นยีนสร้างทรานสคริพชันแฟกเตอร์ในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวต่อไป

บรรณานุกรม

กนกภรณ์ คำโมนะ รอยพิมพ์ สุขเกษม แสงทอง พงษ์เจริญกิต ศรีเมฆ ชาวโพงพาง วราภรณ์ แสงทอง และช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์. 2558ก. การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีน *OsDFR* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดินในข้าวดำพันธุ์ลืมผัว. น. 232 - 238. ใน **รายงานการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติภาคโปสเตอร์ ครั้งที่ 19 15-17 กรกฎาคม 2558**. ขอนแก่น: โรงแรมเซ็นทารา แอนด์ คอนเนชั่นเซนเตอร์.

กนกภรณ์ คำโมนะ รอยพิมพ์ สุขเกษม แสงทอง พงษ์เจริญกิต ศรีเมฆ ชาวโพงพาง วราภรณ์ แสงทอง และช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์. 2558ข. การวิเคราะห์การแสดงออกและลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsDFR* ในข้าวขาวและข้าวสี. น. 25 - 26. ใน **รายงานการประชุมวิชาการภาคบรรยาย ประจำปี 2558 มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 8-9 ธันวาคม 2558**. เชียงใหม่: ศูนย์การศึกษาและฝึกอบรมนานาชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

กรมการข้าว. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว 2556. **พันธุ์ข้าว**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.brrd.in.th/rkb/varieties/index.php-file=content.php&id=112.htm. (10 สิงหา คม 2558).

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กรมวิทยาศาสตร์บริการ สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2553. **แอนโทไซยานิน**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://siweb.dss.go.th /repack/ fulltext/IR21.pdf. (10 สิงหาคม 2558).

นิศารัตน์ ศิริวัฒนเมธานนท์. 2553. **อาหารหลากสี มีประโยชน์หลากหลาย (ตอนที่ 3): สารเคมีที่มีประโยชน์จากผักผลไม้ที่มีสีม่วงและสีน้ำเงิน**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.pharmacy.mahidol.ac.th /knowledge/files/0152.pdf. (10 สิงหาคม 2558).

บริษัท สีนิลไรซ์ จำกัด. 2558. **โปรแอนโทไซยานิดิน**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.sininrice.com/insightsub5.html. (15 สิงหาคมคม 2558).

บุญหงษ์ จงคิด. 2557.”**ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต.**” พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

พูนศรี อินต๊ะ, พงศธร คันธรส, วารุณี เหิมหาญ, ศรีเมฆ ชาวโพงพาง และ ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์. 2554. การถ่ายยีนสร้างแอนโทไซยานินเข้ายาสูบเพื่อใช้เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก. น. 131-137. ใน **รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยแม่โจ้**. 1-2 ธันวาคม 2554 ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติ. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

โรงสีนราพิมล. 2556. **ส่วนประกอบของข้าว**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://narapimon .com/. (10 สิงหาคม 2558).

ศูนย์การเรียนรู้การเกษตรตำบลสาคู. 2554. **ลักษณะและส่วนประกอบของต้นข้าว**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.sakhu.go.th/multimedia/learning/article.Shtml ?id=12. (10 สิงหาคม 2558).

สัมพันธ์ คัมภิรานนท์. 2546. แอนโทไซยานิน สีสันเพื่อโลกสวย.UPDATE, 18 (186), 53-56.

สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ. 2555. **ลักษณะที่สำคัญของข้าว**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.php?book=3&chap=1&page=t3 -1-infodetail01.html. (10 สิงหาคม 2558).

สมพร ประเสริฐส่งสกุล. 2549. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ: โฟร์เพซ.

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร. 2558. **ประวัติความเป็นมาของข้าว**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.arda.or.th/kasetinfo/rice/rice-histories.html. (10 สิงหาคม 2558).

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ: อติสรรค์.

Abdel-Aal, E.-S., Hucl, P., Sosulski, F., Graf, R., Gillott, C. & Pietrzak, L. 2001. Screening spring wheat for midge resistance in relation to ferulic acid content. **Journal of agricultural and food chemistry**, 49(8), 3559-3566.

Agati, G., Biricolti, S., Guidi, L., Ferrini, F., Fini, A. & Tattini, M. 2011. The biosynthesis of flavonoids is enhanced similarly by UV radiation and root zone salinity in L. vulgare leaves. **Journal of plant physiology**, 168(3), 204-212.

Ashihara, H., Crozier, A. & Komamine, A. 2010. **Plant metabolism and biotechnology**.Sussex : John Wiley & Sons.

Buer, C. S. & Muday, G. K. 2004. The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of Arabidopsis roots to gravity and light. **The Plant Cell**, 16(5), 1191-1205.

Chandler, V. L., Radicella, J. P., Robbins, T. P., Chen, J. & Turks, D. 1989. Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous: isolation of B utilizing R genomic sequences. **The Plant Cell**, 1(12), 1175-1183.

Chen, X., Itani, T., Wu, X., Chikawa, Y. & Irifune, K. 2013. Physiological factors affecting transcription of genes involved in the flavonoid biosynthetic pathway in different rice varieties. **Plant signaling & behavior**, 8(12), e27555.

de Pascual-Teresa, S. & Sanchez-Ballesta, M. T. 2008. Anthocyanins: from plant to health. **Phytochemistry reviews**, 7(2), 281-299.

Fournier, A., Hugueney, P., Verries, C., This, P. & Ageorges, A. 2010. **Chemical structure of anthocyanins from grape berries (Vitis vinifera L.)**. [Online]. Available https://www.researchgate.net/figure/51881755 _fig1_Chemical-structure-of-anthocyanins-from-grape-berries-Vitis-vinifera-L. (10 August 2015).

Furukawa, T., Maekawa, M., Oki, T., Suda, I., Iida, S., Shimada, H., Takamure, I. & Kadowaki, K. i. 2007. The Rc and Rd genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp. **The Plant Journal**, 49(1), 91-102.

Gu, X.-Y., Foley, M. E., Horvath, D. P., Anderson, J. V., Feng, J., Zhang, L., Mowry, C. R., Ye, H., Suttle, J. C. & Kadowaki, K.-i. 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.

Hari Prasad. 2011. **Parts of a Rice Seed**. [Online]. Available http://www.rkmp .co.in/category/eistags/eis/production-know-how/hybrid-rice-seed-production-techniques-hrspt?page=6. (10 August 2015).

Himi, E., Maekawa, M., Miura, H. & Noda, K. 2011. Development of PCR markers for Tamyb10 related to R-1, red grain color gene in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, 122(8), 1561-1576.

Hu, C., Zawistowski, J., Ling, W. & Kitts, D. D. 2003. Black rice (Oryza sativa L. indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. **Journal of agricultural and food chemistry**, 51(18), 5271-5277.

Kim, B.-G., Lee, E.-R. & Ahn, J.-H. 2012. Analysis of flavonoid contents and expression of flavonoid biosynthetic genes in Populus euramericana Guinier in response to abiotic stress. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, 55(1), 141-145.

Kim, M., Kim, H., Koh, K.., Kim, H., Lee, Y. S. & Kim, Y. H. 2008. Identification and quantification of anthocyanin pigments in colored rice. **Nutrition Research and Practice**, 2(1), 46-49.

Kootstra, A. 1994. Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids. **Plant Molecular Biology**, 26(2), 771-774.

Lazzè, M. C., Savio, M., Pizzala, R., Cazzalini, O., Perucca, P., Scovassi, A. I., Stivala, L. A. & Bianchi, L. 2004. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. **Carcinogenesis**, 25(8), 1427-1433.

Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J.-M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N. & Caboche, M. 2006. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 57, 405-430.

Lim, S. & Ha, S. 2013. Marker development for the identification of rice seed color. **Plant biotechnology reports**, 7(3), 391-398.

Ling, W. H., Cheng, Q. X., Ma, J. & Wang, T. 2001. Red and black rice decrease atherosclerotic plaque formation and increase antioxidant status in rabbits. **The Journal of nutrition**, 131(5), 1421-1426.

Liu, R. H. 2007. Whole grain phytochemicals and health. **Journal of Cereal Science**, 46(3), 207-219.

Liu, Z., Liu, Y., Pu, Z., Wang, J., Zheng, Y., Li, Y. & Wei, Y. 2013. Regulation, evolution, and functionality of flavonoids in cereal crops. **Biotechnology letters**, 35(11), 1765-1780.

MacDougall, D. B. 2002. **Colour in food: improving quality**. Abington: Woodhead Publishing.

Marles, M. S., Ray, H. & Gruber, M. Y. 2003. New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. **Phytochemistry**, 64(2), 367-383.

Mullis. 1987. **Process for amplifying nucleic acid sequences** [Online]. Available http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect2=PTO1&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsearchbool.html&r=1&f=G&l=50&d=PALL&RefSrch=yes& Query=PN%2F4683202. (10 August 2015).

Murphy, A., Peer, W. A. & Taiz, L. 2000. Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. **Planta**, 211(3), 315-324.

Oki, T., Masuda, M., Kobayashi, M., Nishiba, Y., Furuta, S., Suda, I. & Sato, T. 2002. Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(26), 7524-7529.

Peng, C., Lin, Z., Lin, G. & Chen, S. 2006. The anti-photooxidation of anthocyanins-rich leaves of a purple rice cultivar. **Science in China Series C: Life Sciences**, 49(6), 543-551.

Shao, Y., Jin, L., Zhang, G., Lu, Y., Shen, Y. & Bao, J. 2011. Association mapping of grain color, phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity in dehulled rice. **Theoretical and applied genetics**, 122(5), 1005-1016.

Shih, C. H., Chu, H., Tang, L. K., Sakamoto, W., Maekawa, M., Chu, I. K., Wang, M. & Lo, C. 2008. Functional characterization of key structural genes in rice flavonoid biosynthesis. **Planta**, 228(6), 1043-1054.

Smith, Bruce D. 1998 **The Emergence of Agriculture.** Scientific American Library, A Division of HPHLP, New York, ISBN 0-7167-6030-4.

Toyokuni, S., Itani, T., Morimitsu, Y., Okada, K., Ozeki, M., Kondo, S., Uchida, K., Osawa, T., Hiai, H. & Tashiro, T. 2002. Protective effect of colored rice over white rice on Fenton reaction-based renal lipid peroxidation in rats. **Free radical research**, 36(5), 583-592.

Wikimedia. 2010. **Proanthocyanidin C1.PNG**. [Online]. Available https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Proanthocyanidin_C1.PNG. (10 August 2015).

Winkel-Shirley, B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant physiology**, 126(2), 485-493.

Xia, M., Ling, W. H., Ma, J., Kitts, D. D. & Zawistowski, J. 2003. Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein e deficient mice. **The Journal of nutrition**, 133(3), 744-751.

Yawadio, R., Tanimori, S. & Morita, N. 2007. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductase inhibitory activities. **Food Chemistry**, 101(4), 1616-1625.

Zhao, C. L., Guo, H. C., Dong, Z. Y. & Zhao, Q. 2009. Pharmacological and nutritional activities of potato anthocyanins. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 3(10), 463-468.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง และผลการวิเคราะห์ลำดับเบส

ตารางผนวกที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ยีน	GenBank Accession No.	ชื่อไพรเมอร์	Product Size cDNA (bp)	DNA contamination (bp)	หมายเหตุ
*OsDFR*cds	AB003496.1	OsDFRcds-38F = 5'- GAA TCC AAC ACA AGC AGA TC -3'	1,119	1,681	Full length
		OsDFRcds+25R = 5'- GTT CTC TGG ACT CAC TAG TC -3'			
OsDFR	AB003496.1	OSDFR-RT F= 5'- GCC CAC TAC TCG ATC CTG AA -3'	276	-	ไม่คร่อม Intron
		OSDFR-RT_R = 5'- CAG CGT GTA CCT GAA CCT GA-3'			
OsDFRex1,2	AB003496.1	OsDFRex1,2_F 5'- CCA TCA CCA AGT GCA AGG TA -3'	580	692	คร่อม Intron 1
		OsDFRex1,2_ R 5'- AGT CGT CGT GGT CGT AGG AG -3'			
OsActin	X15865	OsActinF = 5'- TGA TGC GCC CAG GGC TGT CT -3'	276	-	ไม่คร่อม Intron
		OsActinR = 5'- CTC AAC CCC AAG GCC AAT CG -3'			
Tnos		Tnos_R = 5'- GCG TAT TAA ATG TAT AAT TGC GGG AC -3'	-	-	-

หมายเหตุ ไพรเมอร์ OSDFR-RT และ OSDFR-RT_R ใช้ในการวิเคราะห์ Semi-quantitative RT-PCR

ไพรเมอร์ OsDFRcds-38F และ OsDFRcds+25R ใช้ในการโคลนยีนแบบ full-length

ไพรเมอร์ OsDFRex1,2_ R ใช้ในการส่งวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing)

ไพรเมอร์ OsActinF และ OsActinR ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของ cDNA

ลำดับเบสของยีน *OsDFR* ที่ถูกโคลนในเวคเตอร์ pBluescript II SK (+)

>pBSKNLDFR7

ATGGGCGAGGCGGTGAAGGGGCCAGTGGTGGTGACGGGCGCGTCGGGCTTCGTCGGCTCATGG
CTCGTCATGAAGCTCCTCCAGGCCGGCTACACCGTCCGCGCCACAGTGCGCGACCCCTCTAACG
TTGGGAAGACGAAGCCGTTGCTGGAGCTGGCGGGGTCGAAGGAGAGGCTGACGCTGTGGAAGG
CCGACCTGGGCGAGGAAGGCAGCTTCGACGCGGCGATCAGGGGTTGCACGGGCGTGTTCCACG
TCGCGACGCCCATGGACTTCGAGTCCGAGGACCCGGAGAACGAGGTGATCAAGCCCACCGTGG
AAGGGATGCTGAGCATCATGCGGGCCTGCAGGGACGCCGGCACCGTCAAGCGCATCGTCTTCA
CCTCCTCCGCCGGGACCGTCAACATCGAGGAGCGGCAGCGCCCCTCCTACGACCACGACGACT
GGAGCGACATCGACTTCTGTCGCCGCGTCAAGATGACCGGATGGATGTACTTCGTGTCCAAGTC
ATTGGCGGAGAAGGCCGCCATGGAATACGCGAGGGAGCACGGGCTGGACCTCATCAGCGTCAT
CCCCACGCTCGTCGTCGGGCCCTTCATCAGCAACGGGATGCCGCCGAGCCACGTCACCGCGCT
GGCGCTGCTCACGGGGAACGAGGCCCACTACTCGATCCTGAAGCAGGTGCAGTTCGTCCACCT
CGACGACCTCTGCGATGCCGAGATCTTCCTCTTCGAGAGCCCCGAGGCGCGCGGCCGCTACGT
CTGCTCCTCCCACGACGCCACCATCCACGGCCTCGCGACGATGCTCGCGGACATGTTCCCGGA
GTACGACGTGCCGCGGAGCTTTCCCGGGATCGACGCCGACCACCTCCAGCCGGTGCACTTCTC
GTCGTGGAAGCTCCTCGCCCACGGGTTCAGGTTCAGGTACACGCTGGAGGACATGTTCGAGGC
CGCCGTCCGGACGTGCAGGGAGAAGGGGCTTCTCCCGCCGCTGCCGCCACCGCCGACGACGGC
CGTGGCCGGAGGAGACGGCTCGGCGGGTGTGGCCGGCGAGAAGGAACCGATACTGGGGAGGG
GGACCGGGACGGCGGTTGGTGCTGAAACAGAAGCGTTGGTCAAATGA

หมายเหตุ ATG คือ start codon

TGA คือ stop codon

ลำดับเบสของยีน *OsDFR* ที่ถูกโคลนในเวคเตอร์ p2CA

>Complete_Contig-0_p2CA7-17

TATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGAT
GCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAG
GGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGC
GATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAA
GCTTGCATGCCTGCAGGTCCGATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCG
GATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTA
CAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCC
AAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAA
AGCAAGTGGATTGATGTGATGGTCCGATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCT
CCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGC
TCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTG
GTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTC
TTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTAT
CCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGACACGCTGACAAG
CTGACTCTAGAGGATCAATTCGATGAATCCAACACAAGCAGATCGATCACGCACGGTACGCCAT
GGGCGAGGCGGTGAAGGGGCCAGTGGTGGTGACGGGCGCGTCGGGCTTCGTCGGCTCATGGCT
CGTCATGAAGCTCCTCCAGGCCGGCTACACCGTCCGCGCCACAGTGCGCGACCCCTCTAACGTT
GGGAAGACGAAGCCGTTGCTGGAGCTGGCGGGGTCGAAGGAGAGGCTGACGCTGTGGAAGGCC
GACCTGGGCGAGGAAGGCAGCTTCGACGCGGCGATCAGGGGTTGCACGGGCGTGTTCCACGTC
GCGACGCCCATGGACTTCGAGTCCGAGGACCCGGAGAACGAGGTGATCAAGCCCACCGTGGAA
GGGATGCTGAGCATCATGCGGGCCTGCAGGGACGCCGGCACCGTCAAGCGCATCGTCTTCACC
TCCTCCGCCGGGACCGTCAACATCGAGGAGCGGCAGCGCCCCTCCTACGACCACGACGACTGG
AGCGACATCGACTTCTGTCGCCGCGTCAAGATGACCGGATGGATGTACTTCGTGTCCAAGTCAT
TGGCGGAGAAGGCCGCCATGGAATACGCGAGGGAGCACGGGCTGGACCTCATCAGCGTCATCC
CCACGCTCGTCGTCGGGCCCTTCATCAGCAACGGGATGCCGCCGAGCCACGTCACCGCGCTGG
CGCTGCTCACGGGGAACGAGGCCCACTACTCGATCCTGAAGCAGGTGCAGTTCGTCCACCTCGA

CGACCTCTGCGATGCCGAGATCTTCCTCTTCGAGAGCCCCGAGGCGCGCGGCCGCTACGTCTG
CTCCTCCCACGACGCCACCATCCACGGCCTCGCGACGATGCTCGCGGACATGTTCCCGGAGTAC
GACGTGCCGCGGAGCTTTCCCGGGATCGACGCCGACCACCTCCAGCCGGTGCACTTCTCGTCG
TGGAAGCTCCTCGCCCACGGGTTCAGGTTCAGGTACACGCTGGAGGACATGTTCGAGGCCGCC
GTCCGGACGTGCAGGGAGAAGGGGCTTCTCCCGCCGCTGCCGCCACCGCCGACGACGGCCGTG
GCCGGAGGAGACGGCTCGGCGGGTGTGGCCGGCGAGAAGGAACCGATACTGGGGAGGGGGAC
CGGGACGGCGGTTGGTGCTGAAACAGAAGCGTTGGTCAAATGAGTGTTGACTAGTGAGTCCAG
AGAACATCAAGCTCGAATTTCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAA
TCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAA
TTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATAC
ATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGT
CATCTATGTTACTAGATCGGGAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTAT
CCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAAT
GAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTC
GTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTC
TTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCT
CACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAG
CAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCT
CCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAG

หมายเหตุ ATG คือ start codon

TGA คือ stop codon

ลำดับเบสของยีน *OsDFR* ที่ถูกโคลนในเวคเตอร์ pCAMBIA1305.1

>Complete_Contig-0_pCAMBIAKNL7-17.1

AAGCTTGCATGCCTGCAGGTCCGATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGG
ATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAAT
GCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATG
GACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGG
ATTGATGTGATGGTCCGATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCAT
TGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATC
ATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCC
CACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGAT
GTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATA
TAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGACACGCTGACAAGCTGACTCTAGAGGATCAATTCGATGAA
TCCAACACAAGCAGATCGATCACGCACGGTACGCCATGGGCGAGGCGGTGAAGGGGCCAGTGGTG
GTGACGGGCGCGTCGGGCTTCGTCGGCTCATGGCTCGTCATGAAGCTCCTCCAGGCCGGCTACACCG
TCCGCGCCACAGTGCGCGACCCCTCTAACGTTGGGAAGACGAAGCCGTTGCTGGAGCTGGCGGGGT
CGAAGGAGAGGCTGACGCTGTGGAAGGCCGACCTGGGCGAGGAAGGCAGCTTCGACGCGGCGATC
AGGGGTTGCACGGGCGTGTTCCACGTCGCGACGCCCATGGACTTCGAGTCCGAGGACCCGGAGAAC
GAGGTGATCAAGCCCACCGTGGAAGGGATGCTGAGCATCATGCGGGCCTGCAGGGACGCCGGCAC
CGTCAAGCGCATCGTCTTCACCTCCTCCGCCGGGACCGTCAACATCGAGGAGCGGCAGCGCCCCTCC
TACGACCACGACGACTGGAGCGACATCGACTTCTGTCGCCGCGTCAAGATGACCGGATGGATGTACT
TCGTGTCCAAGTCATTGGCGGAGAAGGCCGCCATGGAATACGCGAGGGAGCACGGGCTGGACCTC
ATCAGCGTCATCCCCACGCTCGTCGTCGGGCCCTTCATCAGCAACGGGATGCCGCCGAGCCACGTCA
CCGCGCTGGCGCTGCTCACGGGGAACGAGGCCCACTACTCGATCCTGAAGCAGGTGCAGTTCGTCC
ACCTCGACGACCTCTGCGATGCCGAGATCTTCCTCTTCGAGAGCCCCGAGGCGCGCGGCCGCTACGT
CTGCTCCTCCCACGACGCCACCATCCACGGCCTCGCGACGATGCTCGCGGACATGTTCCCGGAGTAC
GACGTGCCGCGGAGCTTTCCCGGGATCGACGCCGACCACCTCCAGCCGGTGCACTTCTCGTCGTGGA
AGCTCCTCGCCCACGGGTTCAGGTTCAGGTACACGCTGGAGGACATGTTCGAGGCCGCCGTCCGGA
CGTGCAGGGAGAAGGGGCTTCTCCCGCCGCTGCCGCCACCGCCGACGACGGCCGTGGCCGGAGGA
GACGGCTCGGCGGGTGTGGCCGGCGAGAAGGAACCGATACTGGGGAGGGGGACCGGGACGGCGG
TTGGTGCTGAAACAGAAGCGTTGGTCAAATGAGTGTTGACTAGTGAGTCCAGAGAACATCAAGCTC
GAATTCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGC
GATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTT
ATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAA
TATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCGGGAATTC

หมายเหตุ ■ คือ จุดตัดของ *Hin*dIII และ *Eco*RI ใน p2CA

■ คือ dual 35S promoter

■ บริเวณที่ยีน *OsDFR* ถูกโคลนเข้าไปใน p2CA โดยการเชื่อมแบบ blunt end ที่บริเวณ; *Bam*HI และ *Sac*I (สีชมพู) กับ *Eco*RI และ *Hin*dIII (สีฟ้า) จาก pBluescript II SK (+)

■ คือ ยีน *OsDFR*

คือ start และ stop codon ของยีน *OsDFR*

คือ บริเวณไพรเมอร์

คือ บริเวณ *Tnos* terminator

ภาคผนวก ข

สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ *E. coli* และอะโกรแบคทีเรียม

ตารางผนวกที่ 2 อาหารสูตร LB Medium (Luria – Bertani Medium)

องค์ประกอบ	250 ml	500 ml	1000 ml
Tryptone	2.5 g	5 g	10 g
Yeast extract	1.25 g	2.5 g	5 g
NaCl	2.5 g	5 g	10 g
วุ้นแบคทีเรีย	3.75 g	7.5 g	15 g
pH 7			

หมายเหตุ - อาหาร LB (แข็ง) ที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *E. coli* หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อ รอให้อาหารอุ่นลง จึงเติมสารปฏิชีวนะ ก่อนเทลงเพลท ดังนี้ แอมพิซิลิน (stock 100 mg/ml); (final 100 mg/L) หรือ กานามัยซิน (stock 50 mg/ml); (final 50 mg/L)

- อาหาร LB (แข็ง) ที่ใช้เลี้ยงอะโกรแบคทีเรียม หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อ จึงเติมสารปฏิชีวนะ ก่อนเทลงเพลท ดังนี้ กานามัยซิน (stock 50 mg/ml); (final 50 mg/L) และ ไรแฟมพิซิน (stock 50 mg/ml); (final 50 mg/L)
- อาหาร LB (เหลว) จะไม่เติมวุ้น และทำการเติมสารปฏิชีวนะก่อนนำไปใช้

สูตรอาหารสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว

ตารางผนวกที่ 3 อาหารสูตร N6D สำหรับการชักนำเมล็ดข้าวให้เกิดแคลลัส และเพาะเลี้ยงแคลลัสก่อนการถ่ายยีน

องค์ประกอบ	500 ml	1000 ml
N6 stock		
Stock1	10 ml	20 ml
Stock2	2.5 ml	5 ml
Stock3	2.5 ml	5 ml
Stock4	2.5 ml	5 ml
N6 vitamin (x1000)	0.5 ml	1 ml
2,4-D (0.2 mg/ml)	5 ml	10 ml
KNO_3	1.415 g	2.830 g
Sucrose	15 g	30 g
Myo-inositol	50 mg	100 mg
Casamino acid	150 mg	300 mg
L-proline	1.439 g	2.878 g
pH 5.8		

ตารางผนวกที่ 4 อาหารสูตร 2N6-AS สำหรับปลูกเชื้อและการเพาะเลี้ยงร่วม

องค์ประกอบ	500 ml	1000 ml
N6 stock		
Stock1	10 ml	20 ml
Stock2	2.5 ml	5 ml
Stock3	2.5 ml	5 ml
Stock4	2.5 ml	5 ml
N6 vitamin (x1000)	0.5 ml	1 ml
2,4-D (0.2 mg/ml)	5 ml	10 ml
KNO_3	1.415 g	2.830 g
Sucrose	15 g	30 g
Glucose	5 g	10 g
Myo-inositol	50 mg	100 mg
Casamino acid	150 mg	300 mg
pH 5.8		
Acetosyringone (AS) (stock 500 μM); (final 100 μM)	100 μl	200 μl
วุ้น	2 g	4 g

หมายเหตุ - อาหารเพาะเลี้ยงร่วมหลังจากนึ่งฆ่าเชื้อ รอให้อาหารอุ่นแล้วจึงเติม Acetosyringone (AS) (stock 500 μM); (final 100 μM)

อาหารปลูกเชื้อ จะไม่เติมวุ้น และเติม AS ก่อนนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 5 อาหารสูตร 2N6 สำหรับล้างเนื้อเยื่อ

องค์ประกอบ	500 ml	1000 ml
N6 stock		
Stock1	10 ml	20 ml
Stock2	2.5 ml	5 ml
Stock3	2.5 ml	5 ml
Stock4	2.5 ml	5 ml
N6 vitamin (x1000)	0.5 ml	1 ml
2,4-D (0.2 mg/ml)	5 ml	10 ml
KNO_3	1.415 g	2.830 g
Sucrose	15 g	30 g
Myo-inositol	50 mg	100 mg
Casamino acid	150 mg	300 mg
pH 5.8		

หมายเหตุ สำหรับอาหารล้างเนื้อเยื่อจะไม่เติมวุ้น และเติมสารปฏิชีวนะไทเมนทิน (stock 150 mg/ml); (final 150 mg/L) ก่อนนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 6 อาหารสูตร SM1 และ SM2 (สูตรอาหาร N6D) สำหรับคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน

องค์ประกอบ	500 ml	1000 ml
N6 stock		
Stock1	10 ml	20 ml
Stock2	2.5 ml	5 ml
Stock3	2.5 ml	5 ml
Stock4	2.5 ml	5 ml
N6 vitamin (x1000)	0.5 ml	1 ml
2,4-D (0.2 mg/ml)	5 ml	10 ml
KNO_3	1.415 g	2.830 g
Sucrose	15 g	30 g
Myo-inositol	50 mg	100 mg
Casamino acid	150 mg	300 mg
L-proline	1.439 g	2.878 g
pH 5.8		

หมายเหตุ - อาหาร SM1 หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อ รอให้อาหารอุ่นลง จึงเติมสารปฏิชีวนะ ก่อนเทลงเพลท ดังนี้ ไฮโกรมัยซิน (stock 50 mg/ml); (final 15 mg/L) และ ไทเมนทิน (stock 150 mg/ml); (final 150 mg/L)

- อาหาร SM2 หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อ รอให้อาหารอุ่นลง จึงเติมสารปฏิชีวนะ ก่อนเทลงเพลท ดังนี้ ไฮโกรมัยซิน (stock 50 mg/ml); (final 30 mg/L) และ ไทเมนทิน (stock 150 mg/ml); (final 150 mg/L)

ตารางผนวกที่ 7 อาหารสูตร Regeneration (RM) สำหรับชักนำแคลลัสให้เกิดยอด

องค์ประกอบ	500 ml	1000 ml
MS stock		
Stock1	10 ml	20 ml
Stock2	2.5 ml	5 ml
Stock3	2.5 ml	5 ml
Stock4	2.5 ml	5 ml
B5 vitamin (x1000)	0.5 ml	1 ml
Sucrose	15 g	30 g
Sobitol	15 g	30 g
Casamino acid	1 g	2 g
NAA (stock 100 mg/L); (final 1 mg/L)	5 ml	10 ml
Kinetin (stock 2.5 mg/ml); (final 2.5 mg/L)	500 µl	1000 µl
pH 5.8		

หมายเหตุ อาหาร RM หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อ รอให้อาหารอุ่นลง จึงเติมสารปฏิชีวนะ ก่อนเทลงเพลท ดังนี้ ไฮโกรมัยซิน (stock 50 mg/ml); (final 30 mg/L) และ ไทเมนทิน (stock 150 mg/ml); (final 150 mg/L)

ตารางผนวกที่ 8 อาหารสูตร MS สำหรับชักนำแคลลัสให้เกิดราก

องค์ประกอบ	500 ml	1000 ml
MS stock		
Stock1	10 ml	20 ml
Stock2	2.5 ml	5 ml
Stock3	2.5 ml	5 ml
Stock4	2.5 ml	5 ml
B5 vitamin (x1000)	2.5 ml	5 ml
Sucrose	15 g	30 g
pH 5.8		

หมายเหตุ อาหาร MS หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อ รอให้อาหารอุ่นลง จึงเติมสารปฏิชีวนะ ก่อนเทลงเพลท ดังนี้ ไฮโกรมัยซิน (stock 50 mg/ml); (final 30 mg/L) และ ไทเมนทิน (stock 150 mg/ml); (final 150 mg/L)

ภาคผนวก ค

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล นางสาวกนกภรณ์ คำโมนะ

เกิดเมื่อ 4 กุมภาพันธ์ 2534

ประวัติการศึกษา พ.ศ.2551 ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ.2547 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนพญาเม็งราย

ทุนวิจัยและทุนการศึกษา ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีการศึกษา 2559

ผลงานวิจัยเผยแพร่ การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมทางวิชาการ ประจำปี 2558 มหาวิทยาลัยแม่ โจ้ (ภาคบรรยาย) เรื่อง การวิเคราะห์การแสดงออกและลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsDFR* ในข้าวขาวและข้าวสี วันที่ 9 ธันวาคม 2558 ณ ศูนย์การศึกษาและ ฝึกอบรมนานาชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่

การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 19 ประจำปี 2558 (ภาคโปสเตอร์) เรื่อง การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีน *OsDFR* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดินในข้าวดำพันธุ์ลืมผัว วันที่ 15 กรกฎาคม 2558 ณ โรงแรมเซ็นทารา แอนด์ คอนเวนชั่น เซนเตอร์ จ.ขอนแก่น