รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การใช้ยีนสร้างแอนโทไซยานินเป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการถ่ายยีนในพืชและเป็นยีนเป้าหมายเพื่อเพิ่มมูลค่าพืชเศรษฐกิจ

The use of a gene for production of anthocyanin pigment as a marker gene in plant transformation and as a target gene for increased value in crop plants

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2555
จำนวน 350,000 บาท

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร. ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์
ผู้ร่วมโครงการ อ.ดร. ศรีเมฆ ชาวไพงพาง
ผศ.ดร. แสงทอง พงษ์เจริญกิต
ผศ.ดร. วราภรณ์ แสงทอง

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

30 / 9 / 2556

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยแก่คณะผู้วิจัย ในปีงบประมาณ 2555 ขอขอบพระคุณ Professor Dr. Thomas W. Okita จาก Institute of Biological Chemistry, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้ออะโกรแบคทีเรียม และ binary vector และขอขอบพระคุณ ดร.เจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์ จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำหรับการเป็นที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่ให้คำแนะนำเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณสาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือสำหรับการทำวิจัยเป็นอย่างดี และขอขอบพระคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำหรับการให้ใช้บริการโรงเรือนกระจกสำหรับปลูกพืช

นอกจากนี้ขอขอบคุณนายธวัชชัย บุญกลาง และนายพงศกร คันธรส นักศึกษาปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ นางสาววารุณี เหิมหาญ นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ นางสาวพูนศรี อินต๊ะ และนางสาวรอยพิมพ์ สุขเกษม นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่มีส่วนสำคัญทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2556

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ง
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	4
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
ตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	20
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	37
สรุปผลการวิจัย	70
เอกสารอ้างอิง	73

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	องค์ประกอบของพีซีอาร์ ในการวิเคราะห์ต้นข้าวและยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*	23
ตารางที่ 2	องค์ประกอบของพีซีอาร์ ในการวิเคราะห์ต้นข้าวและยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*	29
ตารางที่ 3	องค์ประกอบของพีซีอาร์ ในการวิเคราะห์ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน	30
ตารางที่ 4	ไพรเมอร์สำหรับวิเคราะห์ต้นข้าวจาก Shih et al. (2008)	31
ตารางที่ 5	ไพรเมอร์สำหรับวิเคราะห์ยาสูบจาก Zhang et al.,2009	32
ตารางที่ 6	องค์ประกอบของ Real time-PCR ในการวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*	33
ตารางที่ 7	องค์ประกอบของ Real time-PCR ในการวิเคราะห์ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *actin*	34
ตารางที่ 8	องค์ประกอบของ Real time-PCR การวิเคราะห์ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*	35
ตารางที่ 9	ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *pap1* ในข้าวโดยเทียบกับยีน *actin* โดยใช้เทคนิค Real-Time PCR	46
ตารางที่ 10	การทดสอบการกระจายตัวของเมล็ดข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ผ่านการถ่ายยีน *pap1* ในการต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน	47
ตารางที่ 11	การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Chi square ของต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ต้นที่ 3.1.1.1 และ 3.1.1.3	47
ตารางที่ 12	การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Chi square ของต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ต้นที่ 5.1.1.1	48
ตารางที่ 13	สรุปต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีน และการตรวจสอบต้นข้าวด้วยเทคนิคต่างๆ	55
ตารางที่ 14	สรุปผลการวิเคราะห์ต้นยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*	59
ตารางที่ 15	สรุปต้นยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีน และการตรวจสอบด้วยเทคนิคต่างๆ	64
ตารางที่ 16	ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *pap1* ในยาสูบ โดยใช้เทคนิค Real-Time PCR	66

ตารางที่ 17 การทดสอบการกระจายตัวของต้นยาสูบรุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีน *pap1* ใน การต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 67

ตารางที่ 18 ปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากต้นยาสูบที่มีสีเขียว สีเขียวปนแดงและ ต้นแดง 69

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ลักษณะของต้นและรวง ของข้าวเจ้าหอมนิล (ก.) และลักษณะเมล็ดข้าว (ข.)	7
ภาพที่ 2	กระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวลนอยด์	9
ภาพที่ 3	ลักษณะของต้นข้าวเหนียวดำ และเมล็ด	9
ภาพที่ 4	ตัวอย่างโครงสร้างและโมเลกุลของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)	11
ภาพที่ 5	รูปภาพทั่วไปของต้นยาสูบ	17
ภาพที่ 6	วิถีการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน	18
ภาพที่ 7	แผนที่พลาสมิด pCAMBIA 1390	20
ภาพที่ 8	แผนที่ T – DNA ของพลาสมิด pCAMBIA 1390	21
ภาพที่ 9	ลักษณะต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนในระยะออกรวง	37
ภาพที่ 10	การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ได้จากการถ่ายยีน ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส	38
ภาพที่ 11	การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*	38
ภาพที่ 12	การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีน ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส	39
ภาพที่ 13	การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ครั้งที่ 2 โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*	40
ภาพที่ 14	ผลการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอข้าวและยาสูบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และวิเคราะห์ด้วย 0.8% gel eleetrophoresis และเจลหลังย้ายดีเอ็นเอไปบนเมมเบรน	41
ภาพที่ 15	ผลการทำ southern bolt ข้าวและยาสูบ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Eco*RI + *Hin*dIII และ1 Kb DNA Ladder	42
ภาพที่ 16	การตรวจสอบอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีน ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส	43
ภาพที่ 17	ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *pap1* ในต้นข้าวที่ได้จาการถ่ายยีนด้วยเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*	44

หน้า

ภาพที่ 18	ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ *pap1* ในข้าว ด้วยเทคนิค semi - quantitative RT-PCR	44
ภาพที่ 19	การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *pap1* และยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR	45
ภาพที่ 20	การแสดงออกของยีน *pap1* ในข้าวด้วยเทคนิค Real-Time PCR	46
ภาพที่ 21	การทดสอบการกระจายตัวของเมล็ดข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน	48
ภาพที่ 22	การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ต้นที่ 3.1.1.1 ที่ได้จากการถ่ายยีน ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส	50
ภาพที่ 23	การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ต้นที่ 3.1.1.3 ที่ได้จากการถ่ายยีน ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส	50
ภาพที่ 24	การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ต้นที่ 3.1.1.3 ที่ได้จากการถ่ายยีน ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส	51
ภาพที่ 25	การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ต้นที่ 5.1.1.1 ที่ได้จากการถ่ายยีน ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส	51
ภาพที่ 26	การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ต้นที่ 3.1.1.3 รุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*	52
ภาพที่ 27	การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ต้นที่ 3.1.1.3 รุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*	53
ภาพที่ 28	การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ต้นที่ 5.1.1.1 รุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ครั้งที่ 2 โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*	53
ภาพที่ 29	การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ต้นที่ 3.1.1.1 รุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*	54
ภาพที่ 30	การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ต้นที่ 3.1.1.1 รุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* ตามลำดับ และ W คือ น้ำกลั่น	54

หน้า

ภาพที่ 31	ลักษณะต้นยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีนในส่วนของใบ ดอก ฝัก และราก	56
ภาพที่ 32	การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีน ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส	58
ภาพที่ 33	การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*	58
ภาพที่ 34	ผลการตัดดีเอ็นเอข้าละยาสูบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และวิเคราะห์ด้วย 0.8% gel electrophoresis และเจลหลังย้ายดีเอ็นเอไปบนเมมเบรน	60
ภาพที่ 35	ผลการทำ southern bolt ข้าวและยาสูบ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Eco*RI + *Hin*dIII และ1 Kb DNA Ladder	61
ภาพที่ 36	ผลการสกัด Total RNA จากใบยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pPAP1 ช่องที่ 1 คือ Marker Mass ruler ช่องที่ 2-3 คือ Total RNA จากใบยาสูบที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ช่องที่ 4-11 คือ RNA จากใบยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pPAP1 และมีผลพีซีอาร์เป็นบวก	62
ภาพที่ 37	ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *pap1* ในต้นยาสูบที่ได้จาการถ่ายยีนด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* ครั้งที่ 2 ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่อง P คือ พลาสมิด pPAP1 (Positive control) ช่อง N คือ cDNA จากต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (Negative control)	63
ภาพที่ 38	การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *pap1* และยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR	65
ภาพที่ 39	ผลการแสดงออกของยีน *pap1* ในต้นยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-Time PCR	66
ภาพที่ 40	ต้นยาสูบที่เพาะจากเมล็ดรุ่น T1 บนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร	68
ภาพที่ 41	ปริมาณแอนโทไซยานินในต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม	69

การใช้ยีนสร้างแอนโทไซยานินเป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการถ่ายยีนในพืชและเป็นยีนเป้าหมายเพื่อเพิ่มมูลค่าพืชเศรษฐกิจ

The use of a gene for production of anthocyanin pigment as a marker gene in plant transformation and as a target gene for increased value in crop plants

ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์[1] ศรีเมฆ ชาวโพงพาง[2] แสงทอง พงษ์เจริญกิต[1]
และ วราภรณ์ แสงทอง แสงทอง[1]

Chotipa Sakulsingharoj[1], Srimek Chowpongpang[2], Saengtong Pongjaroenkit[1]
and Varaporn Sangtong[1]

[1]สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290
[2]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กทม. 10900

บทคัดย่อ

การถ่ายยีนเข้าสู่พืชส่วนใหญ่มีการใช้ยีนด้านสารปฏิชีวนะเข้ามาช่วยในการคัดเลือกชิ้นส่วนพืชที่ได้รับยีน ซึ่งทำให้เกิดความวิตกกังวลในเรื่องการถ่ายทอดยีนออกสู่สิ่งแวดล้อมรวมทั้งความเสี่ยงต่อมนุษย์และสัตว์ งานวิจัยนี้จึงได้ทดลองใช้ยีนสร้างสีมาช่วยคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยได้ทำการถ่ายยีนควบคุมการสร้างแอนโทไซยานิน ซึ่งคือยีน *pap1* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kitaake โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม พบว่า ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนมีลักษณะสีเขียวเช่นเดียวกับต้น wide-type เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส แสดงว่าเป็นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน *pap1* แทรกอยู่ในจีโนม จากนั้นยืนยันผลด้วยเทคนิค Southern blot พบว่า ข้าวทั้ง 3 ต้นที่วิเคราะห์มีการแทรกตัวของยีน *pap1* จำนวน 1 ชุด และมีตำแหน่งต่างกัน เมื่อตรวจสอบการถ่ายทอดยีนด้านสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินไปสู่รุ่นลูก T_1 พบว่า ได้อัตราส่วน 3:1 ซึ่งเป็นไปตามกฎของมนเดลเมื่อยีนแทรกในจีโนม 1 ชุด เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pap1* โดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR และ Real time RT-PCR พบว่า ต้นข้าวทั้ง 3 ต้นมีการแสดงออกของยีนใกล้เคียงกัน และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องใน pathway การสังเคราะห์แอนโทไซยานิน พบว่า ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมมีการแสดงออกของยีนโครงสร้างเหล่านี้ไม่แตกต่างจากต้น wide-type ซึ่งคาดว่ายีน

pap1 ไม่สามารถทำหน้าที่ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้ ส่งผลให้ต้นข้าวไม่เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

นอกจากนี้ได้ถ่ายยีน *pap1* เข้าสู่ยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ด้วยอะโกรแบคทีเรียม ได้ยาสูบที่มีต้นสีเขียว เขียวปนแดง และแดง เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า ต้นยาสูบเหล่านี้มียีน *pap1* และยืนยันผลด้วย southern blot พบว่า ต้นเขียวและต้นเขียวปนแดงมียีน *pap1* แทรกในจีโนม 1 ชุด แต่ตำแหน่งต่างกัน ส่วนต้นแดงมียีนแทรกในจีโนม 3 ชุด เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pap1* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR และ Real time RT-PCR พบว่า ต้นยาสูบสีแดงมีการแสดงออกของยีน *pap1* มากที่สุดสอดคล้องกับผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินด้วยเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์ พบว่า ต้นยาสูบสีแดงมีการแสดงออกของยีนโครงสร้างต่างๆ มากกว่าต้นเขียวปนแดง ต้นเขียว และต้น wide-type ซึ่งส่งผลให้ต้นยาสูบเกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน จากงานวิจัยนี้พบว่า สามารถนำยีน *pap1* ซึ่งควบคุมการสร้างแอนโทไซยานินไปใช้เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือกยาสูบที่ได้รับยีน แทนการใช้ยีนต้านสารปฏิชีวนะได้โดยการคัดเลือกจากการเกิดสีแดง เนื่องมาจากการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

คำสำคัญ: ข้าว, ยาสูบ, ยีน *pap1*, แอนโทไซยานิน, ยีนเครื่องหมาย, การถ่ายยีน

Abstract

Antibiotic resistant genes were generally used in plant gene transfer system to select transgenic cells or tissues. There are public concerns about those genes in human health and environments. In this research, a gene for production of anthocyanin pigment (*pap1*) was investigated for the use as selectable marker gene in transformation of rice. Transformation of rice CV. Kitaake with *pap1* gene was conducted by *Agrobacterium*. The results showed that transformed rice plants had no anthocyanin pigmentation phenotypes as wild-type plants. Transformed plants showed PCR products of 400 bp, indicating the presence of *pap1* gene in their genome. Southern blot analysis confirmed that three transgenic plants were independent lines containing a single copy of *pap1* gene in their genome. Segregation analysis indicated the phenotypic ratio of T_1 plants were 3:1, following Mendelian law for a single gene insertion site at

a locus. Gene expression levels were investigated by semi-quantitative RT-PCR and Real time RT-PCR. Three rice lines expressed *pap1* gene and other structural genes involved in anthocyanin biosynthesis pathway at similar levels compared to wild-type plants. Transgenic rice plants had no accumulation of anthocyanin and also showed no increase in expression of structural genes. These results were probably due to *pap1* gene cloned from *Arabidopsis*, which is dicot, may not be able to activate structural genes in rice, which is monocot, and subsequently resulted in no anthocyanin biosynthesis in transgenic rice plants.

In this study, leaf explants of tobacco cv. burley were transformed with *pap1* gene by *Agrobacterium* method. Transformed tobacco plants showed different phenotypes of anthocyanin pigmentation including green, green-red and red color in their leaves. These transformed tobacco plants were analyzed by PCR technique to investigate the integration of *pap1* gene in plant genome. The PCR positive results were confirmed by Southern blot analysis. It was found that the green and green-red tobacco plants analyzed had a single copy of *pap1* gene in their genome but the red plants had 3 copies of *pap1* gene in the genome. Analysis of gene expression by semi-quantitative RT-PCR and Real time RT-PCR showed that the red tobacco plants revealed the highest levels of expression of *pap1* gene and also structural genes in anthocyanin pathway. Expression results were consistent with anthocyanin contents in the red transgenic tobacco plants appearing the most accumulation of anthocyanin level. Overall results from this research suggested that the *pap1* gene, which controls anthocyanin production, can be used as a selectable marker gene in transformation of tobacco but not rice.

Keywords: rice, tobacco, *pap1* gene, anthocyanin, marker gene, transformation

คำนำ

ระบบการส่งถ่ายยีนในปัจจุบัน มีการใช้ยีนต้านสารปฏิชีวนะและยีนต้านสารปราบวัชพืช มาใช้เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือกอย่างกว้างขวางซึ่งมีข้อกังวลในหลายด้าน เช่น การบริโภคยีนต้านสารปฏิชีวนะ และยีนต้านสารปราบวัชพืชอาจเป็นอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ และระบบนิเวศต่าง ๆ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาระบบการถ่ายยีนเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้ยีนต้านสารปฏิชีวนะและยีนต้านสารปราบวัชพืช เช่น การใช้ยีนสร้างสีเพื่อช่วยในการคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับยีน

แอนโทไซยานิน คือรงควัตถุที่สังเคราะห์โดย secondary metabolic pathway จากกรดอะมิโน phenylalanine ทำให้เกิดสีต่าง ๆ ในพืช ในกระบวนการของการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน มียีนที่เกี่ยวข้องหลายยีน ยีน *pap1* (production of anthocyanin pigment) เป็นยีนสร้าง MYB transcription factor ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และยังมีผลทำให้ส่งเสริมการแสดงออกของยีนหลายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์

การพัฒนาในส่วนของยีนคัดเลือก ในการถ่ายยีนอาจใช้ยีนสร้างแอนโทไซยานินซึ่งก็คือยีนสีเข้ามาช่วยในการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับยีน แทนการใช้ยีนต้านสารปฏิชีวนะและยีนต้านสารปราบวัชพืชเป็นยีนคัดเลือก ซึ่งจะเป็นการลดข้อวิตกกังวลในเรื่องของการถ่ายทอดยีนต้านสารปฏิชีวนะและสารปราบวัชพืช ในพืชที่ทำการดัดแปลงพันธุกรรมออกไปสู่สิ่งแวดล้อม

ในการทดลองนี้จึงได้ทำการถ่ายยีน *pap1* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการสร้างแอนโทไซยานินเข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kitaake และยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ด้วยอะโกรแบคทีเรียม เพื่อใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกพืชดัดแปลงพันธุกรรมได้โดยง่าย โดยดูได้จากการเกิดสีของแอนโทไซยานิน และเป็นยีนรายงานผลสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวและยาสูบ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการใช้ยีนสร้างแอนโทไซยานินเป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถใช้ยีน *pap1* เป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการคัดเลือกพืชที่ได้รับยีนได้โดยง่ายจากการเกิดสีแดง

การตรวจเอกสาร

ข้าว

ข้าวเป็นพืชอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก โดยเฉพาะประเทศในภูมิภาคเอเชียที่นิยมรับประทานข้าวเป็นอาหารประจำวันมากกว่าในภูมิภาคอื่นๆของโลก การผลิต บริโภคและการค้าข้าวส่วนใหญ่จึงกระจุกตัวอยู่ในทวีปเอเชีย แต่ข้าวที่ผลิตได้ส่วนใหญ่จะใช้ในการบริโภคภายในประเทศ ทำให้มีข้าวเพียงร้อยละ 6 เท่านั้นที่เข้าสู่ตลาดการค้าข้าวระหว่างประเทศ โดยประเทศที่มีบทบาทมากที่สุดในการส่งออกข้าว คือประเทศไทย รองลงมาคือ อินเดีย เวียดนาม จีนและพม่า ตามลำดับ โดยไทยส่งออกข้าวปีละประมาณ 7 ล้านตัน เป็นสัดส่วนประมาณร้อยละ 30 ของการส่งออกข้าวทั้งหมดทั่วโลก

พันธุ์ข้าว (เศรษฐกิจการเกษตร,2542: ระบบออนไลน์)

ข้าวที่นำมาปลูกเป็นอาหารนั้นแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ ข้าว *Oryza saiva* ปลูกในทวีปเอเชียและ *Oryza glaberrima* ปลูกในทวีปแอฟริกา แต่ข้าวที่ค้าขายกันในตลาดโลกเกือบทั้งหมดเป็นข้าวที่ปลูกจากแถบเอเชีย ซึ่งข้าวชนิดดังกล่าวยังสามารถแบ่งได้ตามแหล่งปลูกอีก คือ

1.) ข้าวอินดิกา (Indica) มีลักษณะเมล็ดยาวรี ต้นสูง เป็นข้าวที่ปลูกในเอเชียเขตมรสุม ตั้งแต่ จีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไทย อินโดนีเซีย อินเดีย และศรีลังกา ข้าวพันธุ์นี้ค้นพบครั้งแรกในอินเดียและต่อมาได้พัฒนาไปปลูกที่ทวีปอเมริกา

2.) ข้าวจาปอนิกา (Japonica) เป็นข้าวที่ปลูกในเขตอบอุ่น เช่น จีน ญี่ปุ่น เกาหลี มีลักษณะเมล็ดป้อม กลมรี ต้นเตี้ย

3.) ข้าวจาวานิกา (Javanica) ปลูกในอินโดนีเซียและฟิลิปปินส์ มีเมล็ดป้อมใหญ่ แต่ไม่ได้รับความนิยมเพราะให้ผลผลิตต่ำ

สำหรับข้าวที่ปลูกในไทยเป็นพันธุ์ข้าวเมล็ดยาว คือ ข้าวอินดิกา แต่ประกอบด้วยหลายพันธุ์ทั้งที่มีการพัฒนาขึ้นใหม่ และข้าวพันธุ์พื้นเมืองซึ่งมีอยู่ประมาณ 3,500 พันธุ์ ซึ่งมีข้าวป่า ข้าวพื้นเมือง และข้าวที่ผสมโดยมนุษย์ขึ้นมาใหม่

ลักษณะที่สำคัญของข้าว (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่ม 3: ระบบออนไลน์)

ลักษณะที่สำคัญของข้าวแบ่งออกได้เป็นลักษณะที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโต และลักษณะที่เกี่ยวกับการขยายพันธุ์ ดังนี้

1. ลักษณะที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโต

ลักษณะที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของต้นข้าว ได้แก่ ราก ลำต้น และใบ

1.1 ราก รากเป็นส่วนที่อยู่ใต้ผิวดิน ใช้ยึดลำต้นกับดินเพื่อไม่ให้ต้นล้ม แต่บางครั้งก็มีรากพิเศษเกิดขึ้นที่ข้อซึ่งอยู่เหนือพื้นดินด้วย ต้นข้าวไม่มีรากแก้ว แต่มีรากฝอยแตกแขนงกระจายแตกแขนงอยู่ใต้ผิวดิน

1.2 ลำต้น มีลักษณะเป็นโพรงตรงกลางและแบ่งออกเป็นปล้องๆ โดยมีข้อกั้นระหว่างปล้อง ความยาวของปล้องนั้นแตกต่างกัน จำนวนปล้องจะเท่ากับจำนวนใบของต้นข้าว ปกติมีประมาณ 20-25 ปล้อง

1.3 ใบ ต้นข้าวมีใบไว้สำหรับสังเคราะห์แสง เพื่อเปลี่ยนแร่ธาตุ อาหาร น้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ให้เป็นแป้ง เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและ สร้างเมล็ดของต้นข้าว ใบประกอบด้วย กาบใบและแผ่นใบ

2. ลักษณะที่เกี่ยวกับการขยายพันธุ์

ต้นข้าวมีการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย เพราะฉะนั้นลักษณะที่สำคัญเกี่ยวกับการ ขยายพันธุ์ ได้แก่ รวง ดอกข้าวและเมล็ดข้าว

2.1 รวงข้าว (panicle) หมายถึงช่อดอกของข้าว (inflorescence) ซึ่งเกิดขึ้นที่ข้อของปล้องอันสุดท้ายของต้นข้าว ระยะระหว่างข้ออันบนของปล้องอันสุดท้ายกับข้อต่อของใบธง เรียกว่า คอรวง

2.2 ดอกข้าว หมายถึง ส่วนที่เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียสำหรับผสมพันธุ์ ดอกข้าวประกอบด้วยเปลือกนอกใหญ่สองแผ่นประสานกัน เพื่อห่อ หุ้มส่วนที่อยู่ภายในไว้ เปลือกนอกใหญ่แผ่นนอกเรียกว่า เลมมา (lemma) ส่วนเปลือกนอกใหญ่แผ่นใน เรียกว่า พาเลีย (palea) ทั้งสองเปลือกนี้ภายนอกของมันอาจมีขนหรือไม่มีขนก็ได้

2.3 เมล็ดข้าว หมายถึง ส่วนที่เป็นแป้งที่เรียกว่า เอ็นโดสเปิร์ม (endosperm) และส่วนที่เป็นคัพภะซึ่งห่อหุ้มไว้โดยเปลือกนอกใหญ่สองแผ่น เอ็น โดสเปิร์มเป็นแป้งที่เราบริโภค คัพภะเป็นส่วนที่มีชีวิตและงอกออกมาเป็นต้นข้าวเมื่อเอาไปเพาะ

ข้าวพันธุ์ Kitaake

ข้าวพันธุ์ Kitaake จัดอยู่ในสายพันธุ์จาปอนิกา (Toki, 1997) มีโครโมโซมเป็น 2n = 2x = AA = 24 (สมศักดิ์ และคณะ, 2542) ลำต้นเตี้ย ความสูงประมาณ 60 – 100 เซนติเมตร ใบสั้นและแคบ เมล็ดป้อมสั้น ลักษณะพิเศษของข้าวญี่ปุ่น คือ ข้าวสารสุกได้อุณหภูมิต่ำประมาณ 65 – 85 องศาเซลเซียส ปริมาณอะไมโลสต่ำ ทำให้ข้าวสุกนุ่ม นวล ยืดหยุ่น และเหนียวคล้ายมียาง เมล็ดข้าวสุกจะเกาะกันต่างจากข้าวอินดิกาที่ปริมาณอะไมโลสสูง เมื่อหุงเสร็จข้อนข้างร่วนซุย ข้าวญี่ปุ่นใช้เวลาเพาะปลูก

จนถึงเก็บเกี่ยวเพียง 3 เดือน เป็นข้าวที่ไม่ต้องการใช้น้ำมากจึงเหมาะสำหรับที่เพาะปลูกที่ขาดแคลนน้ำและอายุเพาะปลูกสั้น

ข้าวที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสี

ข้าวเจ้าหอมนิล (บริษัท สีนิลไรซ์ จำกัด : ระบบออนไลน์)

เป็นข้าวที่กลายพันธ์จากข้าวเหนียวดำต้นเตี้ยของจีน โดยมีความสูงประมาณ 60-75 เซนติเมตร อายุวันเก็บเกี่ยว 95-105 วัน แตกกอดี ลำต้นและใบสีเขียวปนม่วง เมล็ดยาวมีสีม่วงเข้ม (ภาพที่ 1) กลิ่นหอม ผลผลิตประมาณ 400-700 กิโลกรัมต่อไร่ จากการศึกษาเอกลักษณ์พันธุกรรม โดยใช้ microsatellite จำนวน 48 ตำแหน่ง ชี้ให้เห็นว่า ข้าวเจ้าหอมนิลมีความแตกต่างข้าว Hei Bao และ Xua Bue Huq จากจีน แสดงให้เห็นว่า ข้าวทั้ง 3 ไม่ได้เป็นข้าวพันธุ์เดียวกัน

(ก.) (ข.)

ภาพที่ 1 ลักษณะของต้นและรวง ของข้าวเจ้าหอมนิล (ก.) และลักษณะเมล็ดข้าว (ข.)
ที่มา: บริษัท สีนิลไรซ์ จำกัด, 2553: ระบบออนไลน์

ข้าวเจ้าหอมนิลนับเป็นข้าวที่มีโภชนาการสูง โดยมีโปรตีนอยู่ในช่วงประมาณ 10-12.5 % มีแคลเซียม 4.2 มิลลิกรัมต่อ100 กรัม ธาตุเหล็กแปรปรวนระหว่าง 2.25-3.25 มิลิกรัมต่อ 100 กรัม และธาตุสังกะสีประมาณ 2.9 มิลลิกรัม มีปริมาณ antioxidation สูงประมาณ 293 ไมโครโมลต่อกรัม จากข้อมูลทางโภชนาการนับได้ว่าข้าวเจ้าหอมนิล เป็นข้าวที่มีศักยภาพในการแปรรูปทางอุตสาหกรรมอาหารสูง เช่น cracker หรือ cooky

คุณประโยชน์ของสีม่วงในข้าวเจ้าหอมนิล

ข้าวเจ้าหอมนิลมีเมล็ดสีม่วงดำ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสีของเมล็ด สีม่วงดำประกอบไปด้วย สีม่วงเข้ม (cyanidin) สีชมพูอ่อน (peonidin) และสีน้ำตาล (procyanidin) ผสมกัน ซึ่งสีที่เห็นนั่นเป็นสารประกอบกลุ่ม flavonoid ที่เรียกว่า สารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ที่ประกอบไปด้วยสาร

cyanidin กับ สาร peonidin สารโปรแอนโทไซยานิดิน (proanthocyanidin) ประกอบด้วยสาร procyanidin (ภาพที่ 2) ซึ่งสารดังกล่าวทั้งหมดนี้เป็นสาร antioxidant ที่ทำหน้าจับกับอนุมูลอิสระแล้วช่วยทำให้กลไกลการทำงานของร่างกายมีประสิทธิภาพมากขึ้นกว่าปกติ

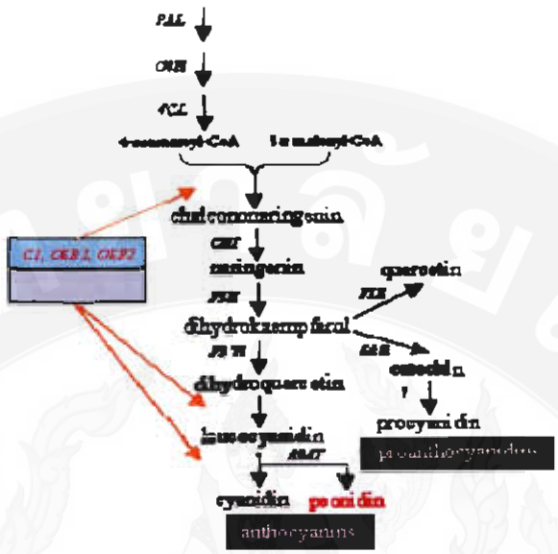
สารแอนโทไซยานิน มีรายงานวิจัยพบว่า สามารถช่วยลดการอักเสบของเนื้อเยื่อ ช่วยลดไขมันอุดตันในเส้นเลือดที่หัวใจ และสมอง บรรเทาโรคเบาหวาน ช่วยบำรุงสายตาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการมองเห็นเวลามองตอนกลางคืน สาร cyanidin มีประสิทธิภาพในการ antioxidation ได้ดีกว่าวิตามินอี หลายเท่า และยังยับยั้งการเจริญเติบโตของ epidermal growth factor receptor ในเซลล์มะเร็ง สารโปรแอนโทไซยานิดิน หรือเรียกว่าสาร condensed tannins มีรายงานวิจัยพบว่า สารโปรแอนโทไซยานิดิน ทำการ antioxidation ได้ดีกว่าวิตามินซี วิตามินอี และ เบต้าแคโรทีน (beta-carotene) สาร โปรแอนโทไซยานิดิน ยังไปจับกับอนุภาคของกัมมันตภาพรังสีทำให้เซลล์ในร่างกายทำงานได้อย่างปกติ และช่วยลดไขมันอุดตันในเส้นเลือดป้องกันโรคหัวใจ และโรคความดันโลหิตสูง ยังยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม ปอด กระเพาะอาหาร และเม็ดเลือดขาว และยังป้องกันไวรัส HSV-1 และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase ใน ไวรัส HIV

การศึกษายีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สีในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิล

ข้าวเจ้าหอมนิลมีเมล็ดข้าวกล้องสีดำ แต่ที่จริงคือสีม่วงเข้มที่สะสมอยู่ในส่วนของรำ (pericarp) ซึ่งประกอบไปด้วยทั้งหมดสามสี คือ สีน้ำตาลอ่อน (procyanidin), สีแดง (peonidin), และสีม่วง (cyanidin) (ภาพที่ 2) สีทั้งหมดของข้าวเป็นรงควัตถุ (pigments) ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ flavonoid ในต้นข้าวซึ่งอาศัย 2 ปัจจัยหลักคือ

1.) ปัจจัยของพันธุกรรม (genetic factor) เช่น ระบบการทำงานของยีนควบคุม (regulatory genes) และยีนโครงสร้าง

2.) ปัจจัยของสภาพแวดล้อม (Environment factor) เช่น สภาพของดิน แร่ธาตุ สารอาหาร pH อุณหภูมิ และแสง



ภาพที่ 2 กระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวลนอยด์
ที่มา: บริษัท สีนิลไรซ์ จำกัด, 2553: ระบบออนไลน์

ในข้าวสีดำจะมีการแสดงออกของยีนควบคุมการสังเคราะห์สี OSB1 ถูกแปลรหัสสารพันธุกรรม (translational) ไปเป็นโปรตีนที่ควบคุม การแสดงออกยีนโครงสร้าง (transcriptional activator) ส่วนในข้าวสีขาวไม่มีการแสดงออกยีนนี้

ข้าวเหนียวดำหรือข้าวก่ำ

ข้าวเหนียวดำหรือข้าวก่ำ (ภาพที่ 3) คือข้าวเหนียวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ด (pericarp) สีม่วงแดงจนถึงสีดำ รวมทั้งการมีรงควัตถุ (pigment) ที่ปรากฏสีในส่วนต่างๆ ของต้นข้าว ซึ่งเป็นลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวชนิดนี้ รงควัตถุที่มีสีส่วนใหญ่พบในส่วนของลำต้น ใบ และเกือบทุกส่วนของช่อดอก (floral part) ยกเว้นในส่วนของ embryo หรือ endosperm ที่ไม่พบการกระจายตัวของรงควัตถุ

ภาพที่ 3 ลักษณะของต้นข้าวเหนียวดำ และเมล็ด
ที่มา: ลัดดาวัลย์ กรรณนุช, 2553. ระบบออนไลน์

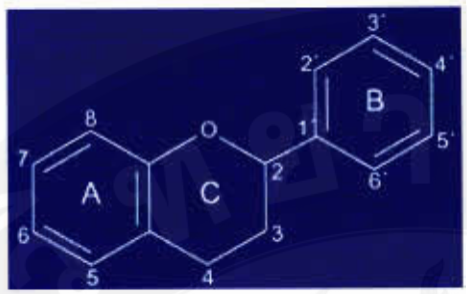
โดยทั่วไปข้าวเหนียวดำที่เกษตรกรปลูกเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมือง ที่มีการปลูกเฉพาะพื้นที่มาเป็นเวลานานแล้ว และเกษตรกรจะเก็บเมล็ดพันธุ์ไว้สำหรับปลูกในฤดูปลูกต่อไปเอง พันธุ์ข้าวเหนียวดำที่เกษตรกรใช้ปลูกเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตต่อพื้นที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับข้าวพันธุ์อื่นๆ นอกจากนี้ยังรวมถึงคุณภาพการหุงต้มของข้าวเหนียวดำยังไม่ดีพอ เช่น หลังจากหุงต้มแล้วข้าวแข็งและร่วนจนเกินไป และกลิ่นไม่หอม เป็นต้น ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพผลผลิตของข้าวเหนียวดำ โดยเฉพาะคุณภาพการหุงต้มจึงมีความจำเป็น การรวบรวมพันธุ์ข้าวเหนียวดำและนำมาปลูกเพื่อประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการให้ผลผลิตของข้าวเหนียวดำพันธุ์พื้นเมืองจึงมีความสำคัญ เพราะข้อมูลจากการศึกษาจะเป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวดำต่อไป

ข้าวเหนียวดำมีสารประกอบที่มีประโยชน์ต่อร่างกายที่สูงกว่าข้าวขาวกล่าวคือ มีสารแกมมา-โอไรซานอล (gamma oryzanol) ซึ่งเป็นสารประกอบที่พบในรำข้าวเหนียวดำปริมาณสูงถึง 2.70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับรำข้าวขาวซึ่งมีประมาณ 1.12 เปอร์เซ็นต์ (Teltathum, 2004) ตามภูมิปัญญาท้องถิ่นเชื่อกันว่าข้าวเหนียวดำเป็นสมุนไพร สารแกมมา-โอไรซานอลในน้ำมันรำข้าวมีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ ที่ดีกว่าวิตามินอี วิตามินซีและเบต้าแคโรทีน (สมวงษ์, 2546) นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถลดการดูดซึมคอเรสเตอรอลจากอาหารสู่ร่างกาย ลดการสังเคราะห์คอเรสเตอรอลในตับ ลดปริมาณคลอเรสเตอรอลในพลาสมา (DeJian et al., 2002) ลดอาการผิดปกติในสตรีวัยที่กำลังจะหมดประจำเดือน (Zu et al., 2001)

นอกจากนั้นแล้ว ข้าวเหนียวดำยังมีรงควัตถุที่สำคัญคือ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งมีคุณสมบัติในการด้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidation) ช่วยการหมุนเวียนของกระแสโลหิด ชะลอการเสื่อมของเซลล์ร่างกาย โดยเฉพาะแอนโทไซยานินชนิดที่พบในข้าวสีม่วงกลุ่มอินดิกา (indica type) (ซึ่งก็รวมข้าวเหนียวดำไทย) คือ cyanindin 3-glucoside มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดได้อีกด้วย

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) (นิดินุช สุดหนองบัว. 2553, ระบบออนไลน์)

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) เป็นสารกลุ่มที่รู้จักกันทั่วไปเกี่ยวกับความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (สารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชัน) พบในธรรมชาติโดยเฉพาะในผลไม้ตระกูลส้ม เบอรี่ หัวหอม ชา โดยเฉพาะชาขาวและชาเขียว ไวน์แดง เป็นต้น



ภาพที่ 4 ตัวอย่างโครงสร้างและโมเลกุลของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)
ที่มา: นิดินุช สุดหนองบัว. 2553, ระบบออนไลน์

ตัวอย่างสารฟลาโวนอยด์ (ภาพที่ 4)

สารฟลาโวนอยด์ที่น่าสนใจหลายกลุ่มที่มีบทบาทที่สำคัญ Anthocyanidins, Catechins, Flavones, Isoflavones, Lignin, Tannins

สำหรับฟลาโวนอยด์หลายชนิดที่มีสี ที่จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์จะมีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกัน แต่ก็มีคุณสมบัติแตกต่างกันมาก อาจแบ่งฟลาโวนอยด์ออกเป็นกลุ่ม 3 กลุ่ม คือ

1.) แอนโธซานติน มีสีเหลืองนวล

2.) แอนโทไซยานิน มีสีม่วงแดง

3.) แทนนิน ไม่มีสีแต่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลได้ง่าย

กลุ่มสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoid)

เป็นสารที่มีอยู่ในกลุ่มโพลีฟีนอล (สารประกอบฟีโนลิก) มีบทบาทในการช่วยชะลอความแก่ต่อต้านการเกิดมะเร็ง และหัวใจได้

สมบัติเฉพาะของสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoid)

เป็นกลุ่มสารที่ให้สีสันแก่พืช รวมถึงสีสันสวยงามของกลีบดอกไม้ สารกลุ่มนี้สามารถดูดซับรังสีอุลตร้าไวโอเลตได้ดีและเปล่งออกมา เป็นแสงสีต่างๆของดอกไม้ พืชได้พัฒนากระบวนการสร้างฟลาโวนอยด์ขึ้นเพื่อป้องกันอันตรายจากรังสีอุลตร้าไวโอเลต

การทำงานของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

สามารถทำงานร่วมกับวิตามินซี โดยสามารถเปลี่ยนให้เป็นรูปแบบที่ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีได้ นอกจากนี้ฟลาโวนอยด์ยังสัมพันธ์กับการควบคุมการสร้างไนตริกออกไซด์ (Nitric Oxide) ที่จำเป็นต่อการไหลเวียนโลหิต รวมทั้งการส่งผ่านสารอาหารให้กับเซลล์ประสาทอีกด้วย โดยปกติธรรมชาติอาจพบอนุพันธุ์ ฟลาโวนอยด์ในรูปของโพแอนโทไซยานิดิน (Proanthocyanidin) ในบิลเบอร์รี่ ซึ่งจะช่วยป้องกันการทำลายหลอดเลือดในดวงตา รวมทั้งยังช่วยส่งเสริมระบบไหลเวียนโลหิตอีกต้วยขณะที่ในชาเขียวจะพบสารฟลาโวนอยด์ที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการทำลายเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันแอลดีแอล

การต้านอนุมูลอิสระ

สามารถป้องกันความเสื่อมของเซลล์ต่าง ๆ อันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระที่ได้มาจากปฏิกิริยา Oxidation โดยสามารถเลือกทานผักและผลไม้สด ชา หัวหอม ถั่วเหลือง ไวน์แดง ซึ่งอุดมไปด้วยสารฟลาโวนอยด์ หรืออาจรับประทานสารสกัดฟลาโวนอยด์เสริมร่วมไปกับสารสกัดเมล็ดองุ่น, สารสกัดเปลือกสนฝรั่งเศส, ไลโคปีน หรือสารสกัดชาเขียว ก็ได้ขนาดรับประทานที่แนะนำ สารฟลาโวนอยด์ 2-6 กรัม ร่วมกับสารสกัดเมล็ดองุ่นหรือสารสกัดเปลือกสนฝรั่งเศส 50 มิลลิกรัม และน้ำชาเขียว 3 ถ้วย หรือชาเขียวสกัด 300-400 มิลลิกรัม ทุกวัน

แอนโทไซยานิน

สาร Anthocyanin (แอนโทไซยานิน) เป็นสารที่มีสีตั้งแต่สีน้ำเงินเข้มในสภาพวะเป็นด่าง (pH>7) มีสีม่วงเมื่อเป็นกลาง (pH 7) และจะเปลี่ยนเป็นสีแดงถึงส้มได้ในสภาวะเป็นกรด (pH< 7) เป็นสารสีที่พบได้ทั่วไปในดอกไม้ ผลไม้บางชนิด ใบหรือลำต้นของพืชบางชนิดที่มีสีจัด ในปริมาณเพียงน้อยนิดก็สามารถแสดงสีได้ในความเข้มสูง มนุษย์ในบางพื้นที่รู้จักใช้สารดัวนี้มาเป็นเวลานานแล้วในกิจกรรมต่างๆ เช่น ไทยใช้สีจากดอกอัญชันทำขนม จีนใช้สีของเปลือกไม้และใบไม้บางชนิดในการย้อมผ้าให้มีสีต่างๆ ยุโรปใช้ผลไม้ป่า (Wild Berry) ในการทำเครื่องสำอางและทำขนม ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะเป็นอนุพันธ์หนึ่งของ Anthocyanin ที่พบได้ในธรรมชาติซึ่งให้สีน้ำเงิน สีม่วง และสีแดงบางชนิด เกิดจากสารกลุ่มแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) เป็นโมเลกุลให้สีที่มีส่วนประกอบสองส่วนคือ แอนโทไซยานิดิน (Anthocyanidin) และน้ำตาล

แอนโทไซยานินมีหน้าที่ปกป้องผักและผลไม้จากการทำลายของรังสีอัลตราไวโอเลต มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การวิจัยพบว่าสารกลุ่มแอนโทไซยานินมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของไขมันแอล

ตีแอล (LDL) และยังทำให้เซลล์บุผนังหลอดเลือดมีความอ่อนนิ่ม การกินผักและผลไม้ที่มีสีน้ำเงินและสีม่วงจึงสามารถชะลอการเกิดโรคไขมันอุดตัน ในหลอดเลือดและโรคหลอดเลือดหัวใจแข็งตัวได้ ในประเทศไทยมีการใช้น้ำดอกอัญชันช่วยปลูกผมปลูกคิ้ว เชื่อว่าน้ำคั้นจากดอกอัญชันทำให้ผมดกดำได้สารแอนโทไซยานินในดอกอัญชันเพิ่มความสามารถในการมองเห็นหรือชะลอความเสื่อมของดวงตา เนื่องจากสารดังกล่าวเพิ่มความสามารถในการไหลเวียนเลือดในหลอดเลือดเล็กๆ ส่วนปลาย ทำให้มีเลือดมาเลี้ยงรากผมและดวงตาได้ดีขึ้นนั่นเอง ดอกอัญชันสามารถกินสดแก้ลมน้ำพริกหรือต้มน้ำดื่มก็ได้

แอนโทไซยานินสีม่วงจากพืชตระกูลบลูเบอร์รี่ ถูกใช้เพื่อเสริมสมรรถภาพการมองเห็นและลดปัญหาที่เกิดกับระบบหมุนเวียนของเลือด ในลักษณะเดียวกับการใช้น้ำคั้นอัญชันมาเป็นเวลานาน มีการใช้ในผู้ป่วยเบาหวานและแผลในกระเพาะอาหาร จึงมีคุณสมบัติด้านการเกิดโรคมะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตายและด้านการเกิดสารก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง พืชที่มีแอนโทไซยานินมักพบสารกลุ่มโพลีฟีนอลด้วย สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระและช่วยชะลอสภาวะเสื่อมของเซลล์ อาหารที่มีสีน้ำเงินและสีม่วง ได้แก่ กะหล่ำปลีม่วง มันสีม่วง องุ่นแดง ชมพู่มะเหมี่ยว ชมพู่แดงอื่นๆ ลูกหว้า ลูกไหน ลูกพรุน ลูกเกด ข้าวแดง ข้าวนิล ข้าวเหนียวดำ ถั่วแดงและถั่วดำ มะเขือม่วง หอมแดง หอมหัวใหญ่สีม่วง บลูเบอร์รี่ น้ำดอกอัญชัน น้ำว่านกาบหอย มันต้มสีม่วง และเผือก

ยีน *pap1*

ในการคัดเลือกพืชดัดแปลงพันธุกรรม โดยมีการใช้ยีนเครื่องหมายที่เป็นยีนด้านสารปฏิชีวนะ หรือยีนด้านสารปราบวัชพืช อาจทำให้ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชได้ และยังเป็นข้อจำกัดในการกีดกันทางด้านการค้า ดังนั้นการนำยีนเครื่องหมายที่ได้จากพืชมาใช้เป็นยีนคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับยีน จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งจะไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช และไม่กระทบต่อสิ่งแวดล้อม รวมทั้งยังลดข้อกังวลด่างๆ ที่เกิดจากการใช้สารปฏิชีวนะ หรือยีนด้านสารปราบวัชพืชอีกด้วย

ยีน *pap1* (production of anthocyanin pigment) เป็นยีนที่ส่งเสริมการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินซึ่งทำให้เกิดสีต่างๆ ในพืช หากนำไปใช้เป็นยีนคัดเลือกต้นพืชที่ได้รับยีนจะทำให้ง่ายต่อการคัดเลือก โดยการสังเกตจากสีที่แสดงออก

ยีน *pap1* เป็นยีนสร้าง MYB75 transcription factor ที่ควบคุมการส่งเสริมการสังเคราะห์สาร anthocyanin ซึ่งยีน *pap1* แยกได้จากต้น mutant *Arabidopsis* ที่มีการแสดงออกอย่างมาก

(overexpression) ของยีน *pap1* การถ่ายยีน *pap1* เข้าสู่ *Arabidopsis* ทำให้เกิดต้น transgenic ที่มีการแสดงออกเป็นสีม่วงอ่อนจนถึงสีม่วงเข้ม แสดงว่ายีน *pap1* ส่งเสริมการสร้าง anthocyanin และการ overexpression ของยีน *pap1* ทำให้ต้น *Arabidopsis* แสดงออก phenotype เป็นสีม่วงเข้ม และพบสีม่วงในทุกชิ้นส่วนของต้นพืชตลอดการพัฒนาการของพืช (Borevitz *et al.*, 2000)

การศึกษาการใช้ยีน *pap1* เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกและรายงานผล เป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ในการถ่ายยีน *pap1* ที่ส่งเสริมการสังเคราะห์ anthocyanin เข้าสู่พืช เพื่อสามารถทำให้การคัดเลือกพืชดัดแปลงพันธุกรรมทำได้ง่ายโดยดูจากการเกิดสีของ anthocyanin และเพิ่มความปลอดภัยทางชีวภาพของการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Zuluaga *et. al.* (2008) ได้ทำการศึกษาการแสดงของยีน *MYB75/PAP1* (*PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1*) ที่มีผลการสร้างแอนโทไซยานินในต้นมะเขือเทศที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม โดยได้ทำการตัดต่อยีนจาก *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. แล้วส่งถ่ายเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ GV3101 จากนั้นก็ทำการส่งถ่ายเข้าสู่เมล็ดมะเขือเทศ ผลที่ได้พบว่ามีการแสดงออกของ *AtMYB75* โดยมีการเพิ่มการสร้างแอนโทไซยานินทั้งในใบ ลำต้น รากและดอก รวมถึงผลภายใต้สภาวะการเจริญเติบโตตามปกติ แต่การแสดงออกนี้จะแสดงออกเฉพาะในส่วนของเซลล์ที่อยู่ใน Epidermal หรือเปลือกหุ้มด้านนอก หรือในกลุ่มของท่อลำเลียงเท่านั้น แต่ยังพบอีกว่ามีการสะสมของ DFR (dihydroflavonol 4-reductase) อีกด้วย

Zhou *et. al.* (2008) ได้ศึกษากระบวนการพัฒนาของแคลลัสของยาสูบ ซึ่งมีการแสดงออกของยีน *PAP1/MYB75* ที่มีผลต่อการ transcription และการแสดงออกของลักษณะ โดยได้ทำการถ่ายยีน *pap1* เข้าสู่แคลลัสทำให้แคลลัสเกิดเป็น 2 ลักษณะ คือ แคลลัสที่เป็นสีแดง และแคลลัสที่เป็นสีขาว จากนั้นทำการตรวจสอบความคล้ายกันของแคลลัสที่ได้ด้วยเทคนิค RT – PCR เพื่อดูการตอบสนองต่อการควบคุมของยีน *pap1* เพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นระยะเวลา 25 วัน จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่ามี cyanidin, pelargonidin และ peonidin ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ anthocyanidins และในการทดลองครั้งนี้ยังได้ศึกษาผลของ ความมืด แหล่งไนโตรเจน และออกซินต่อการสร้างแอนโทไซยานินในแคลลัสด้วย และยังนำไปสู่การศึกษาความเหมาะสมในการทำงานของ PAP1 ต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยายนินในระดับposttranscriptional ในเซลล์

Kim *et. al.* (2007) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และตรวจสอบอุณหภูมิที่มีผลต่อการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ในข้าว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ Ilpum และพันธุ์ Heugjinju ซึ่งเขาพบว่า ในพันธุ์ Ilpum ไม่มีการสังเคราะห์

แอนโทไซยานิน ส่วนในพันธุ์ Heugjinju พบว่า มีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินได้ 3 ประเภท คือ cyanidin, cyanidin 3 - glucoside - O, และ peonidin 3 - glucoside – O นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนสร้างแอนโทไซยานินในการสังเคราะห์เอนไซม์ต่าง ๆ เช่น phenylalanine ammonia lyase (PAL), chalcone synthase (CHS), flavanone 3[3-hydroxylase (F3H), dihydroflavonol reductase (DFR), และ anthocyanin synthase (ANS) ซึ่งพบว่าในใบและเมล็ดของข้าวพันธุ์ Heugjinju จะมีการแสดงออกมากกว่าในข้าวพันธุ์ Ilpum และยังพบอีกว่าข้าวพันธุ์ Heugjinju มียีน 2 ยีน ที่มีระดับการแสดงออกที่ค่อนข้างสูงและมีความจำเพาะสำหรับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน นั้นคือยีน DFR และ ANS นอกจากนี้การแสดงออกของยีน *CHS*, *F3H*, *DFR*, และ *ANS* ยังได้มีการเพิ่มขึ้นในระหว่างการสุกแก่เมล็ดพันธุ์ และมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิในช่วงการเจริญเติบโตของต้นกล้าอีกด้วย

Borevitz *et. al.* (2000) ได้ทำการศึกษาการดิดแท็กเพื่อระบุตัวควบคุม MYB ของการสังเคราะห์ Phenylpropanoid โดยได้ทำการใช้การดิดแท็กโดยแท็กที่ใช้ได้จากการดัดต่อยีนอะโกรแบคทีเรียมเข้ากับ T – DNA ที่ประกอบ cauliflower mosaic virus 35S ซึ่งเมื่อดิดแท็กนี้เข้ากับ *Arabidopsis* เขาก็ได้พบว่ามีการแสดงออกของสีม่วงที่มีความเข้มข้นสูงมากในส่วนต่างๆของต้นนั้น ผลจากการควบคุมให้มีการแสดงออกมากนี้เองทำให้เกิดลักษณะโดดเด่น จึงทำให้เกิดการเปิดใช้งานยีนในการสังเคราะห์ phenylpropanoid การเพิ่มการสะสมของลิกนิน, hydroxycinnamic acid esters และฟลาโวนอยด์ รวมถึงแอนโทไซยานินต่าง ๆ ที่สร้างสีม่วงด้วย ซึ่งเขากล่าวว่า ลักษณะที่เกิดขึ้นเหล่านี้เกิดจากการแทรกตัวของโปรโมเตอร์ในตำแหน่งยีนที่ใกล้กับ MYB transcription แสดงว่า การกระตุ้นโดยการติดแท็กสามารถควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการสะสมสารต่าง ๆ ในระหว่างการพัฒนาของพืช

Endo *et. al.* (2002) ได้ศึกษาการถ่ายยีนขั้นตอนเดียวสำหรับการสร้างข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนเครื่องหมายโดยใช้ระบบ MAT ชนิด *ipt* พบว่าระบบนี้ไม่เหมาะสำหรับพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุดเนื่องจากกระบวนการสร้างเอ็มบริโอจะขึ้นกับฮอร์โมนออกซิน ทำการทดลองโดยนำเนื้อเยื่อบริเวณ scutellum ของเมล็ดข้าวที่มีมีการเพาะเลี้ยงก่อนแล้ว 5 วัน มาทำการถ่ายยีน พบว่าข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนเครื่องหมายสามารถที่จะเกิดเป็นต้นโดยตรงได้ 25.5 เปอร์เซ็นต์ จากเนื้อเยื่อทั้งหมดที่ทำการเพาะเลี้ยงร่วม โดยพบว่าปราศจากรูปแบบยอดกระจุกภายใน 4 สัปดาห์หลังจากการเพาะเลี้ยงร่วม โดยลักษณะยอดกระจุกที่หายไปเกิดจากการตัดยีน *ipt* ออกทำให้ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมเกิดเป็นต้นที่ปราศจากยีนเครื่องหมายผ่านทางเนื้อเยื่อเอ็มบริโอได้ ดังนั้นระบบนี้จึงไม่จำเป็นต้องมีสารที่ใช้ในการคัดเลือก และไม่มีการผสม

ข้ามของพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ไม่มียีนเครื่องหมาย ระบบนี้จะมีประสิทธิภาพสูงในการเริ่มต้นสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนเครื่องหมายในพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

ToKi *et.al* (1997) ได้ปรับปรุงระบบการถ่ายยีนในข้าว โดยทำการปรับปรุงสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พลาสมิด สายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียม และขั้นตอนการถ่ายยีนของ Hiei *et.al* (1994) และ Rashid *et.al* (1996) โดยใช้อาหารสูตร N6D สำหรับชักนำเมล็ดข้าวให้เกิดแคลลัส อาหาร 2N6-AS สำหรับเพาะเลี้ยงร่วมแคลลัสกับอะโกรแบคทีเรียม อาหารสูตร N6D ที่มีไฮโกรมัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน อาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนอาหารชักนำให้เกิดรากเป็นอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และมีไฮโกรมัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งวิธีการและสูตรอาหารเหล่านี้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนให้ดีขึ้น และสามารถชักนำให้แคลลัสเป็นยอดได้ในระยะเวลาเพียง 2 เดือน

ยาสูบ

ยาสูบ หรือ จะวั้ เป็นไม้ล้มลุก ลำต้นมีขนอ่อนนุ่มปกคลุม สูงประมาณ 1 - 1.5 เมตร ใบลักษณะเป็นรูปไข่กลับ โคนใบแคบ ใบโตหนามีขนอ่อนปกคลุม (ภาพที่ 5) ดอกออกเป็นช่อยาวที่ปลายยอด สีชมพูอ่อนหรือแดงเรื่อ ออกผลลักษณะเป็นแคปซูล ใช้ใบตากแห้งเป็นส่วนประกอบในบุหรี่ หรือยาเส้น

ชื่อสามัญ : Tobacco

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Nicotiana tabacum* L.

วงศ์ : ยาสูบเป็นพืชในวงศ์โซลานาซีอี (Solanaceae) เช่นเดียวกับมะเขือเทศ พริก มันฝรั่ง ผักต่างๆ ฯลฯ

สกุล : ยาสูบอยู่ในสกุลนิโคเทียน่า (Nicotiana)

ชื่ออื่นๆ : จะวั้ (เขมร – สุรินทร์)

ชนิด : ยาสูบที่ปลูกกันทั่วไปมีมากกว่า 60 พันธุ์ หรือ 60 ชนิด แต่ที่ปลูกเป็นการค้าเกือบทั้งหมดเป็นพันธุ์ทาบาคัม (tabacum) มีบ้างที่ปลูกพันธุ์รัสติกา (rustica) ทางแถบยุโรปตะวันออกและเอเชียไมเนอร์

ภาพที่ 5 รูปภาพทั่วไปของต้นยาสูบ

ที่มา Eco-agrotech, 2550 : ระบบออนไลน์

ยาสูบถูกใช้เป็นพืชต้นแบบ (Model plant) ที่นำมาใช้ในการทดลองอย่างแพร่หลาย เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ซึ่งมีประสิทธิภาพการถ่ายยีนที่สูง ถ่ายยีนง่าย เจริญเติบโตได้รวดเร็ว เพราะฉะนั้นจึงเหมาะสมในการนำมาถ่ายยีนในปัจจุบัน

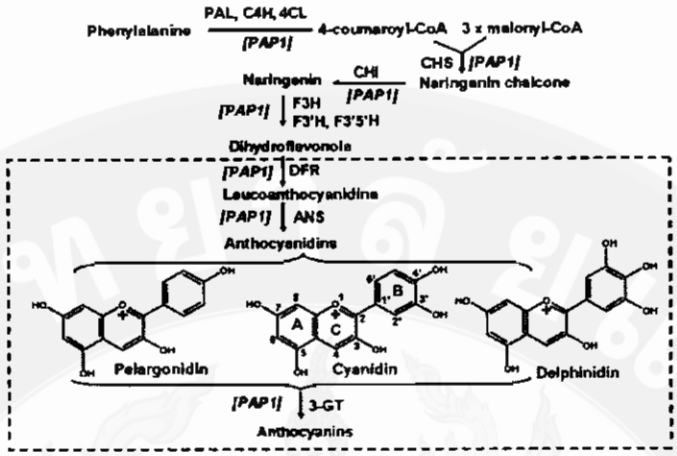
ลักษณะทางพันธุกรรม

สามารถจำแนกยาสูบออกเป็น 60 สปีชีส์ ซึ่ง 36 สปีชีส์ มีการปลูกอยู่ในแถบอเมริกาใต้ 36 สปีชีส์ มีการปลูกอยู่ในแถบอเมริกาเหนือ และ 9 สปีชีส์ มีการปลูกอยู่ในแถบออสเตรเลีย และหมู่เกาะแปซิฟิกตอนใต้ ในจำนวน 15 สปีชีส์ ทั้งหมดของยาสูบมีอยู่ 2 สปีชีส์ ที่นิยมใช้ปลูกเป็นอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน คือ *N. tabacum* และ *N. rustica* ซึ่งใช้ปลูกเพื่อผลิตเป็นยาสูบและยาเคี้ยว ยาสูบทั้งสองสปีชีส์ นี้มีการปลูกกันทั่วไปในแถบอเมริกาใต้ อเมริกากลาง หมู่เกาะอินเตียตะวันตก บริเวณแถบตะวันตกเฉียงใต้และภาคเหนือของเม็กซิโก

จำนวนโครโมโซมของยาสูบอยู่ในระหว่าง n = 9 ถึง n = 24 แต่ส่วนมากจะมีโครโมโซม n = 12 และ n = 24 ยาสูบพวก *N. tabacum* และ *N. rustica* มีจำนวนโครโมโซม n = 24 (2n=4x=48)

วิธีการสังเคราะห์สารแอนโทยานิน

ยีน *pap1* เป็นยีนควบคุมในการเปิดการทำงานของยีนสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ ในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน



ภาพที่ 6 วิถีการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน

ที่มา Jack Sullivan, 1998 : ระบบออนไลน์

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Geekiyanage *et. al.* (2007) ได้ใช้ยีน *VlmybA2* ในองุ่นให้แสดงออกในต้นยาสูบ และต้น *Arabidopsis* โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นยาสูบและต้น *Arabidopsis* สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นยาสูบ มีการเติมฮอร์โมน BA และ NAA ด้วย พบว่าต้นยาสูบและต้น *Arabidopsis* มีสีม่วงแดง ทั้งต้น ใบ ดอก เมล็ด และราก และยังพบว่า การ over-expression ของ *VlmybA2* เพียงอย่างเดียวใน tobacco และ *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีน สามารถสร้างแอนโทไซยานินได้ ดังนั้น *VlmybA2* อาจจะมีความสามารถในการทำงานอย่างหลากหลายในพืชใบเลี้ยงคู่ สำหรับการ over-expression ของ *VlmybA2* ใช้ในการแยกต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าไปได้ซึ่งเป็นการแก้ไขข้อกังวลที่เกี่ยวกับการสารยีนด้านสารปราบวัชพืชและยีนด้านสารปฏิชีวนะได้ ส่วนสีของเมล็ด *Arabidopsis* ทำให้เกิด phenotype ที่แตกต่าง จึงใช้ในการแยกเมล็ดที่ได้รับการถ่ายยีนได้

Xie *et. al.* (2006) ได้ใช้ anthocyanidin reductase และ PAP1 MYB transcription factor ให้แสดงออกร่วมกันใน metabolic engineering ของ proanthocyanidins พบว่า ต้นที่มีเฉพาะยีน *pap1* มีการแสดงออกของฟีโนไทป์มากกว่า ซึ่งจะเห็นเป็นสีม่วงแดงมากกว่า ไม่ว่าจะเป็นใบ ลำต้น ดอก และราก ก็มีสีม่วงแดง สำหรับต้นที่มีการแสดงออกร่วมกันของ anthocyanidin reductase และ PAP1 MYB transeription factor จะให้สีม่วงแดงน้อยกว่าซึ่งจะมีสีเขียวปนด้วย ส่วนต้นที่มีแต่ยีน anthocyanidin reductase จะให้ต้นที่มีสีเขียวเหมือนต้นควบคุม (control)

Zhang *et. al.* (2009) ได้ใช้ยีน *AtCPC* จากต้น *Arabidopsis thaliana* ให้แสดงออกในยาสูบ โดยใช้ ใช้ยาสูบพันธุ์ Xanthi ในการถ่ายยีน *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA 105 และใช้ hygromycin เป็นสารคัดเลือกบนอาหาร ซึ่งผลที่ได้คือ ยาสูบจะมีสีเขียว สีเขียวอมชมพู และสีชมพู

ซึ่งสรุปได้ว่า โปรตีน MYB ถึงจะมาจากหลายพืชที่แตกต่างสปีชีส์กัน แต่ก็มีส่วนในการควบคุม phenylpropanoid metabolism และ pathways ที่เป็นกิ่งก้านสาขา เป็นพวกที่มีการสังเคราะห์ flavonoid งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า *AtCPC* สามารถที่จะควบคุมการผลิต anthocyanin ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง

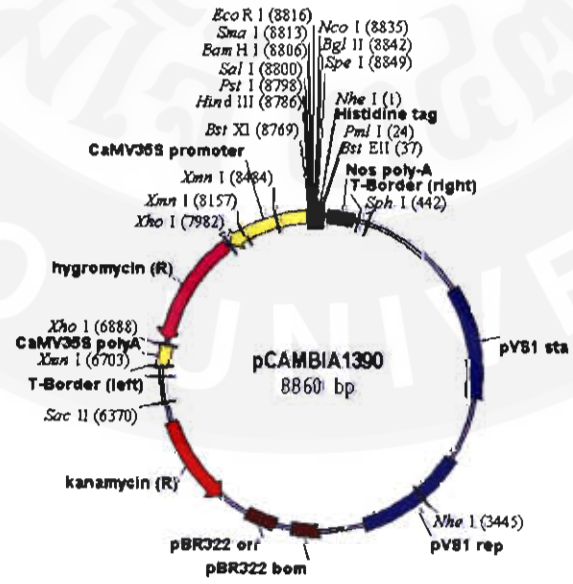
ข้าวพันธุ์ Kitaake จัดอยู่ในสายพันธุ์ japonica (Toki, 1997) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Thomas W. Okita (Washington state university, USA)

ต้นยาสูบที่ใช้ในการทดลอง

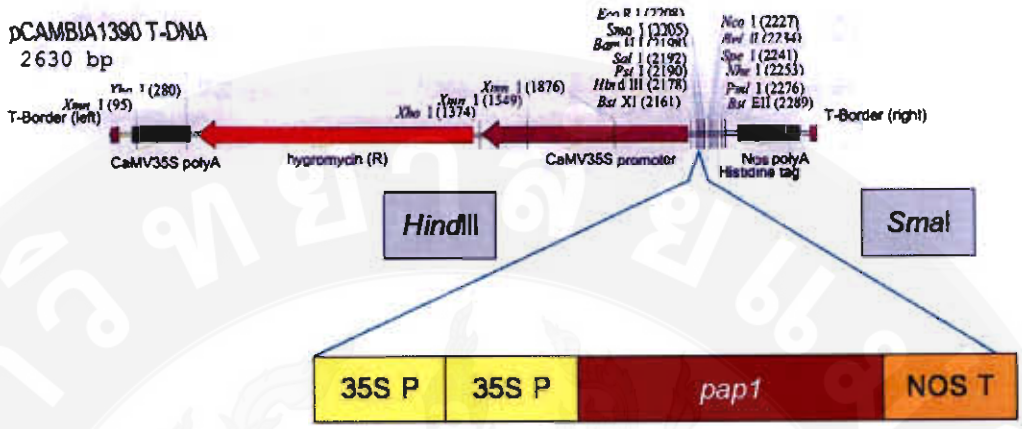
ยาสูบสายพันธุ์เบอร์เลย์ (Burley) ได้รับความอนุเคราะห์จาก อ.ดร.กนกวรรณ รมยานนท์ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สวทช.) และ อ.ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน) กรุงเทพมหานคร

สายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียมและพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

ใช้อะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pPAP1 ซึ่งมีชุดยีนประกอบด้วยยีน *pap1* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35S และเทอมิเนเตอร์ *nos* ชุดยีนนี้ถูกโคลนอยู่ที่ HindIII/*Sma*I-*Pme*I sites ของ pCAMBIA 1390 (ภาพที่ 7) มียีน *hpt*II เป็นยีนเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับยีน



ภาพที่ 7 แผนที่พลาสมิด pCAMBIA 1390



ภาพที่ 8 แผนที่ T – DNA ของพลาสมิด pCAMBIA 1390

ยีน *pap1* มีขนาด 747 bp (บริเวณ จาก start codon - stop codon) อยู่ภายใต้การควบคุมของ 35S double promoter และ *nos* terminator และชุดยีนนี้ถูกโคลนอยู่ที่ MCS ของ pCAMBIA 1390 ที่บริเวณ *Hin*dIII และ *Sma*I-*Pme*I (ภาพที่ 8)

วิธีการทดลอง

แบ่งเป็น 5 ขั้นตอนได้แก่

I. การตรวจสอบการแทรกของยีน *pap1* ในโครโมโซมของพืชโดยวิธีพีซีอาร์
2. การตรวจสอบจำนวนชุดของยีนในโครโมโซมพืชด้วยเทคนิค Southern blot
3. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอโดยวิธีอาร์ทีพีซีอาร์
4. การศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีนไปสู่รุ่นลูก
5. การวิเคราะห์แอนโทไซยานินในต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม

1. การตรวจสอบการแทรกของยีน *pap1* ในโครโมโซมของพืชโดยวิธีพีซีอาร์

ตอนที่ 1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าวและยาสูบ ด้วยวิธี mCTAB

1. บดใบข้าวและยาสูบให้ละเอียดและแช่บนน้ำแข็ง
2. เติมสารสะลาย mCTAB ซึ่งมี 1% (v/v) 2-mercaptoethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปรับตามสัดส่วนปริมาณใบ ถ้าเติม mCTAB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จะต้องเติม mercaptoethanol ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยผสมให้เข้ากันทุก 10 และ 20 นาที
4. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
5. ย้ายเอาส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ โดยห้ามเอาตะกอนออกมา จากนั้น
    1.1 เติม RNase A ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อสารละลาย 300 ไมโครลิตร
    1.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที
6. เติม chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือ 1 เท่าของปริมาตรสารละลาย mCTAB แล้วทำการ Vortex เล็กน้อย
7. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
8. ย้ายชั้นน้ำด้านบนใส่ในหลอดใหม่ (ทำซ้ำในข้อที่ 6-7 จนกระทั่งชั้นของโปรตีนเหลือน้อยที่สุด) ซึ่งการทำซ้ำที่ 2 ถ้าย้ายชั้นน้ำมาปริมาตรเท่าไหร่ ให้เติม Chloroform ในปริมาตรที่เท่ากัน
9. เติม 3 M Na-acetate, pH 5.2 ปริมาตร 1/10 เท่า แล้วเติม absolute ethanol เย็น ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย (จะสังเกตเห็นตะกอนสีขาวขุ่น) แล้วผสมให้เข้ากัน
10. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
11. เท absolute ethanol ทิ้ง แล้วเติม ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็น เพื่อล้างตะกอน (ล้างตะกอน จำนวน 2 ครั้ง)
12. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
13. ตาก pellet ให้แห้ง แล้วละลายกลับด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ถ้ายังมีความหนืดของสารละลายมาก ให้เติมเพิ่ม)

ตอนที่ 2 การวิเคราะห์ต้นข้าวและยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของพีซีอาร์ ในการวิเคราะห์ต้นข้าวและยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร
2X GoTaq	1X	10 µl
10 µM F_PAP1	0.5 µM	1 µl
10 µM R_PAP1	0.5 µM	1 µl
DNA Template	-	1 µl
dH_2O	-	7 µl
Total	-	**20 µl**

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์พีซีอาร์ ของต้นข้าวและยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* ด้วยพลาสมิด pPAP1 คือ F_PAP1 [5'CTA AAC CGG TGC AGG AAA AG3']

R_PAP1 [5' GTC CAA GGC ATG GAG GAT TA 3']

ตั้งโปรแกรมเครื่องพีซีอาร์ดังนี้

Initial Denaturation	94°C	3 min	
Denaturation	95°C	1 min	35 รอบ
Annealing	55°C	1 min	
Extention	72°C	1 min	
Final Extention	72°C	10 min	
Set	20°C	12 hr	

2. การตรวจสอบจำนวนชุดของยีนในโครโมโซมพืชด้วยเทคนิค Southern blot

ตอนที่ 1 การตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

1. สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าวและยาสูบ
2. นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยผสมส่วนประกอบของปฏิกิริยาในการตัด คือ dH_2O, 10X buffer และจีโนมิกดีเอ็นเอ เติมลงในหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. ปิเปตเอนไซม์ตัดจำเพาะผสมในหลอดโดยการปิเปตขึ้นลง (เอนไซม์ต้องอยู่ในที่เย็น)
4. ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อสารละลายมารวมกันข้างล่างทั้งหมด
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

ตอนที่ 2 การตกตะกอนจีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

1. เติม 1/10 ของ 3 M Sodium acetate (NaOAc), pH 5.2 ทำการขยับกรอกให้เข้ากัน แล้วเติม Absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่า ของสารละลาย
2. นำไปแช่ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที
3. ทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
4. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ทำการดีดให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุด) ทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที (ทำซ้ำในขั้นตอน 3 และ 4 อีกครั้ง)
5. ดากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งประมาณ 30 นาที
6. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 15 ไมโครลิตร
7. แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส ใช้ 0.8% agarose gel ใช้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที
8. ถ่ายรูปเจลเพื่อดูการตัดของเอนไซม์ว่าสมบูรณ์หรือไม่ และดูปริมาณดีเอ็นเอก่อนนำไป Blot โดยทาบไม้บรรทัดข้างเจล

ตอนที่ 3 การ blotting

1. หลังจากการถ่ายรูปเจล นำแผ่นเจลที่มีดีเอ็นเอมาแช่ในสารละลาย Denaturation และเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง
2. ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้ไหลผ่านเจล

3. นำแผ่นเจลที่มีดีเอ็นเอมาแช่ในสารละลาย Neutralization และเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง

4. แช่เจลเป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที ใน 20X SSC

5. ตัดกระดาษกรอง แผ่นไนลอนเมมเบรน ให้พอดีกับแผ่นเจล และตัดสะพานกระดาษ

6. นำกระดาษกรอง แผ่นไนลอนเมมเบรน สะพานกระดาษ มาจุ่มใน 20X SSC ให้ชุ่ม

7. วางสะพานที่ชุ่มไปด้วย 20X SSC และแช่อยู่ใน 20X SSC ก่อน ตามด้วยวางกระดาษกรองที่ชุ่มด้วย 20X SSC ว่างเจลคว่ำลงบนกระดาษกรอง ไล่ฟองอากาศออกให้หมด ประกบด้วยเมมเบรนที่ชุ่มด้วย 20X SSC ทับด้านบน ไล่ฟองอากาศ ปิดทับด้วยกระดาษกรองที่แห้งและชั้นกระดาษแล้วกดทับด้วยน้ำหนักประมาณ 200-500 กรัม เพื่อให้เกิดการย้ายดีเอ็นเอจากเจลไปยังเมมเบรนโดยทิ้งไว้ข้ามคืน

ตอนที่ 4 Hybridization

1. นำเจลไปแช่เอทธิเดียมโบรไมด์ เพื่อตรวจสอบการย้ายดีเอ็นเอจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน และถ่ายรูปเจลหลัง blot

2. ทำให้ดีเอ็นเอติดแน่นบนแผ่นเมมเบรนโดยล้างด้วย 2X SSC แล้วนำแผ่นเมมเบรนไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3. นำแผ่นเมมเบรนมา Pre - hybridization ในสารละลาย hybridization เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และ Pre - hybridization สารละลาย hybridization ไปพร้อมกันด้วย

4. ใส่ prob ที่ติดฉลากด้วย DIG – prob ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ต้มเป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที

5. ผสม prob ที่แยกสายแล้วลงในสารละลาย hybridization ที่ผ่านการบ่มแล้ว เท Pre - hybridization ทิ้ง แล้วเทสารละลาย hybridization ที่ผสม probe แล้วลงใน hybridization bottom

6. บ่ม blot ร่วมกับ prob ทิ้งไว้เป็นเวลา 6 – 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และหมุนตลอดเวลา

ตอนที่ 5 การล้างแผ่นเมมเบรน

1. ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย Low stringency ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
2. ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย Hight stringency ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที
3. ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย Washing Buffer เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที
4. บ่มแผ่นเมมเบรนด้วย Blocking Solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที แต่ไม่เกิน 3 ชั่วโมง
5. บ่มแผ่นเมมเบรนด้วย Antibody Solution เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
6. ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย Washing Buffer ปริมตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที
7. แช่แผ่นเมมเบรนใน Detection Buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 นาที
8. เติม Chemiluminescent substrate (Enhancer กับ Substrate ในอัตราส่วน 1 : 100) ใส่ให้ทั่วแผ่นเมมเบรน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ในที่มืด
9. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
10. ประกบฟิล์ม CL-X Posure™ Film (PIERCE) เป็นเวลา 1 – 24 ชั่วโมง ใน Kodak Medical X-Ray Cassette 8×10 inch (Kodak)
11. นำแผ่นฟิล์มที่ได้มาแช่ในน้ำยา Kodak GBX Developer ที่เจือจางด้วยน้ำ 5 เท่า เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ
12. นำแผ่นฟิล์มที่ได้มาแช่ในน้ำยา Kodak GBX Fixer ที่เจือจางด้วยน้ำ 5 เท่า เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ
13. ตากแผ่นฟิล์มให้แห้ง

3. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ RNA โดยวิธีอาร์ทีพีซีอาร์

ตอนที่ 1 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบข้าวและยาสูบ

ขั้นตอน Homogenization

1. บดใบข้าวและยาสูบให้ละเอียด
2. ใส่ TRIzol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครทิวบ์

ขั้นตอน Phase separation

3. บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

4. เติม Chloroform ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร
5. พลิกกลับหลอด เป็นเวลา 5 วินาที
6. บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 นาที
7. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

ขั้นตอน RNA precipitation

8. ย้ายชั้นน้ำใส่หลอดใหม่ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร
9. เติม Isopropyl alcohol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
10. บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
11. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

ขั้นตอน RNA wash

12. ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วล้าง pellet ด้วย Ethanol ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
13. Vortex อีกครั้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
12. ทำข้อ 12-13 อีกครั้งหนึ่ง

ขั้นตอน Redissolving the RNA

13. ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วตากให้แห้ง
14. เติม DEPC Water (free RNase) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร
15. ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

ตอนที่ 2 การกำจัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNase (DNase treatment)

1. เติมส่วนประกอบของปฏิกิริยาการทำ DNase treatment ดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
อาร์เอ็นเอทั้งหมด	25
10X Reaction buffer with $MgCl_2$	3
DEPC treated water	1
DNaseI	1
ปริมาตรสุดท้าย	30

2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
3. เติม 25 mM EDTA ปริมาตร 6 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. วิเคราะห์ผลด้วยวิธีเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส

ตอนที่ 3 การสังเคราะห์ cDNA โดยกระบวนการ reverse transcription โดยใช้ไพรเมอร์ oligo (dT)

1. นำอาร์เอ็นที่สกัดได้มาสังเคราะห์ cDNA โดยกระบวนการ reverse transcription โดยใช้ไพรเมอร์ oligo (dT) โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Superscript II Reverse Transcriptase syntem (Invitrogen, USA) โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา First-Strand cDNA Synthesis ดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
อาร์เอ็นเอทั้งหมด	6
ไพรเมอร์ (50 µM Oligo (dT))	1
10 mM dNTP mix	1
DEPC-treat water	2
ปริมาตรสุดท้าย	10

2. บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำหลอดมาวางบนน้ำแข็งทันที อย่างน้อย 1 นาที
3. เตรียม cDNA synthesis Mix โดยมีองค์ประกบดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10X RT buffer	2
25 mM $Mgcl_2$	4
0.1 M DTT	2
RNase OUT (40 U/µl)	1
Superscript III RT (200 U/µl)	1
ปริมาตรสุดท้าย	10

4. เติมองค์ประกอบ cDNA synthesis Mix ในข้อ 3 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และผสมเบาๆ
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที

6. หยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำออกมาวางบนน้ำแข็งทันที
7. นำหลอดมา Spin down และเติม RNaseH 1 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
8. เก็บอาร์เอ็นเอที่ – 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้หรือนำไปทำพีซีอาร์ต่อ

ตอนที่ 4 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *pap1* ในต้นข้าวและยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*

นำ Total RNA ที่ได้มาสังเคราะห์เส้น cDNA จากนั้นนำ cDNA มาเป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จำนวน 35 รอบ โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของพีซีอาร์ ในการวิเคราะห์ต้นข้าวและยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร) / ปฏิกิริยา
2X Go Taq	1X	10
10µM F-PAP1	0.5µM	1
10µM R-PAP1	0.5µM	1
Template cDNA	-	1
dH_2O	-	7
Total	**-**	**20**

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์พีซีอาร์ ของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* คือ

F_PAP1 [5'CTA AAC CGG TGC AGG AAA AG3']

R_PAP1 [5' GTC CAA GGC ATG GAG GAT TA 3']

ตั้งโปรแกรมเครื่องพีซีอาร์สำหรับยีน *pap1* ดังนี้

Initial Denaturation	94°C	3 min	
Denaturation	95°C	1 min	35 รอบ
Annealing	55°C	1 min	
Extention	72°C	1 min	
Final Extention	72°C	10 min	
Set	20°C	12 hr	

ตอนที่ 5 การวิเคราะห์ต้นข้าวและยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* และยีนโครงสร้างด้วยเทคนิค semi - quantitative RT-PCR

นำ Total RNA ที่ได้มาสังเคราะห์เส้น cDNA จากนั้นนำ cDNA มาเป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จำนวน 28 รอบ โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* และยีนโครงสร้าง โดยต้องทำ semi quantitative RT-PCR ยีน *actin* ก่อน เพื่อใช้เป็น internal control

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของพีซีอาร์ ในการวิเคราะห์ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl) ปฏิกิริยา
2X Go Taq	1X	10
10µM Forward	0.5µM	1
10µM Reverse	0.5µM	1
Template cDNA	-	1
dH_2O	-	7
Total	**-**	**20**

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์สำหรับวิเคราะห์ต้นข้าวจาก Shih et al. (2008)

ชื่อยีน	Primers	Product size (bp)	Annealing Temp. (องศาเซลเซียส)
Osactin	OsActin F 5'-TGA TGC GCC CAG GGC TGT CT-3' OsACtin R 5'-CGA TTG GCC TTG GGG TTG AG-3'	276	53
OsANS	OANS F 5'- GAA GAG GGA GTG GGA GGA CT -3' OANS R 5'- CAG AAG ACG ACC CAG GAG AG -3'	527	57
OsDFR	ODFR F 5'- GTT CAG GTT CAG GTA CA -3' ODFR R 5'- TGA AAC CGG AGG GAG TAA C -3'	383	54
OsF3'H	OF3'H F 5'- CCG CTA CAG TAC CAG CCT TC -3' OF3'H R 5'- TGC CAC CAT TTC TAG AGT TCC -3'	479	55
OsF3H	OF3H F 5'- GAG CAA TGG GAG GTT CAA GA -3' OF3H R 5'- CTT CGA TTT TCG ACG GAA GA -3'	469	52
OsCHI	OCHI F 5'- TCC ATC CTC TTC ACC CAC TC -3' OCHI R 5'- TGT CAA ACA CGA GGG CAG TA -3'	337	54
OsCHS	OCHS F 5'- CGG ACT GGA ACT CCA TCT TC -3' OCHS R 5'- TAA AAG ATG ACG TGT GGC GTA -3'	365	53

ตารางที่ 5 ไพรเมอร์สำหรับวิเคราะห์ยาสูบจาก Zhang et al. (2009)

ชื่อยีน	primers	Product size (bp)	Annealing Temp. (องศาเซลเซียส)
NtCHS	NtCHS F 5'-TTTGGATTGCTCACCCAGGT-3' NtCHS R 5'-AAGTACACCCCAATCAAGGCC-3'	215	52
NtCHI	NtCHI F 5'-TCAAAAAGAGCTATGCCGACG-3' NtCHI R 5'-ACAAGCCAGAAAAGCCTAGGC-3'	222	52
NtF3H	NtF3H F 5'-CAGAATCCAGCACCAGAAGCT-3' NtF3H R5'-GGCTTGGTTTTCAACTTGGC-3'	206	51
NtF3'H	NtF3'H F 5'-TGTGCACCACGAATGCACTT-3' NtF3'H R 5'-TCAAGAACGCGTCGAAACG-3'	228	52
NtDFR	NtDFR F5'-TCGATGCCCAAGAACACCA-3' NtDFR R 5'-TGAGGAATGGACCAACAACCA-3'	201	52
NtANS	NtANS F 5'-TCCATCTGGCCTAAAATCCCT-3' NtANS R 5'-AACGCCAAGTGCTAGTTCTGG-3'	222	52
Ntactin	NtAct F 5'-GATTGGAATGGAAGCTG-3' NtAct R 5'-CCTCCAATCCAAACACT-3'	231	43.4

ตอนที่ 6 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *pap1* ในต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Real time-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*

สกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบข้าวและนำมาสังเคราะห์ cDNA จากนั้นนำ cDNA มาเป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Real time-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* ซึ่งใช้ยีน *actin* เป็น reference gene ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของ Real time-PCR ในการวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)/ ปฏิกิริยา
2X Master mix	1X	10
10µM F-PAP1	0.125µM	0.25
10µM R-PAP1	0.125µM	0.25
Template cDNA	-	2
dH_2O	-	7.5
Total	-	20

ใช้ cDNA ที่ dilution 1:4 (cDNA: dH_2O)

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ซึ่งจำเพาะต่อยีน *pap1* คือ

F_PAP1 [5'CTA AAC CGG TGC AGG AAA AG3']

R_PAP1 [5' GTC CAA GGC ATG GAG GAT TA 3']

ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *actin* คือ

OsActin F [5' TGA TGC GCC CAG GGC TGT CT3']

OsActin R [5' CGA TTG GCC TTG GGG TTG AG3']

ตั้งโปรแกรมเครื่อง Real time PCR สำหรับการวิเคราะห์ยีน *pap1* และ *actin* ดังนี้

Pre-incubation	95°C	10 นาที	
Amplication			
Denaturation	95°C	15 วินาที	45 รอบ
Annealing	60°C	20 วินาที	
Extention	72°C	30 วินาที	

ตอนที่ 7 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *pap1* ในต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Real time-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*

สกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากยาสูบและนำมาสังเคราะห์ cDNA จากนั้นนำ cDNA มาเป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Real time-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* ซึ่งใช้ยีน *actin* เป็น reference gene ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง

ตารางที่ 7 องค์ประกอบของ Real time-PCR ในการวิเคราะห์ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *actin*

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)/ ปฏิกิริยา
2X Master mix	1X	10
10µM F-actin	0.125µM	0.25
10µM R-actin	0.125µM	0.25
Tcmplate cDNA ใช้ cDNA ที่ dilution 1:4 (cDNA: dH_2O)	-	2
dH_2O	-	7.5
Total	-	20

ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *actin* คือ

NtAct F [5'-GAT TGG AAT GGA AGC TG-3']

NtAct R [5'-CCT CCA ATC CAA ACA CT-3']

ตั้งโปรแกรมเครื่อง Real time PCR สำหรับยีน *actin* ในยาสูบดังนี้

Pre-incubation	95°C	10 นาที	
Amplication			
Denaturation	95°C	15 วินาที	45 รอบ
Annealing	55°C	15 วินาที	
Extention	72°C	20 วินาที	
melting	95°C	5 วินาที	
	72°C	1 นาที	
cooling	40°C	30 วินาที	

ตารางที่ 8 องค์ประกอบของ Real time-PCR การวิเคราะห์ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)/ ปฏิกิริยา
2X Master mix	1X	10
10µM F-PAP1	0.125µM	0.25
10µM R-PAP1	0.125µM	0.25
Template cDNA ใช้ cDNA ที่ dilution 1:4 (cDNA: dH_2O)	-	2
dH_2O	-	7.5
Total	-	20

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ซึ่งจำเพาะต่อยีน *pap1* คือ

PAP1_ F [5'CTA AAC CGG TGC AGG AAA AG3']

PAP1_R [5' GTC CAA GGC ATG GAG GAT TA 3']

ตั้งโปรแกรมเครื่อง Real time PCR สำหรับยีน *pap1* ในยาสูบดังนี้

Pre-incubation	95°C	10 นาที	
Amplication			
Denaturation	95°C	15 วินาที	45 รอบ
Annealing	60°C	20 วินาที	
Extention	72°C	30 วินาที	
melting	95°C	5 วินาที	
	72°C	1 นาที	
cooling	40°C	30 วินาที	

4. การศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีนไปสู่รุ่นลูก

ทดสอบการกระจายตัวเมล็ดข้าวพันธุ์ Kitaake และเมล็ดยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีน ในการต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน จำนวน 3 ต้น วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Chi square เพื่อทดสอบต้นข้าวทั้งหมดมีอัตราส่วนฟีโนไทป์รุ่น T_1 คือต้านไฮโกรมัยซิน : ไม่ต้านไฮโกรมัยซิน เท่ากับ 3:1 เป็นไปตามค่าทฤษฎีที่ยีนมีการแทรกตัวในจีโนม และเกิดการกระจายตัวในรุ่น T_1

ตอนที่ 1 ตรวจสอบการกระจายตัวเมล็ดข้าวพันธุ์ Kitaake

1. เพาะเมล็ดข้าวประมาณ 30 เมล็ด ในน้ำเป็นเวลาประมาณ 3-5 วัน เพื่อให้ข้าวงอกเพียงเล็กน้อย
2. นำต้นข้าวที่งอกมาตรวจสอบการกระจายตัวของยีนดดยแช่ในน้ำที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงประมาณ 7-10 วัน
3. นับจำนวนต้นข้าวที่รอดและต้นข้าวที่ตาย

ตอนที่ 2 ตรวจสอบการกระจายตัวเมล็ดข้าวยาสูบ

1. ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดยาสูบด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อประมาณ 5 ครั้ง
2. เพาะเมล็ดยาสูบบนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงประมาณ 1 เดือน
3. นับจำนวนเมล็ดที่งอกแล้วต้นสามารถเจริญเติบโตได้ และต้นยาสูบที่งอกแล้วตาย

การวิเคราะห์ anthocyanin ในต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม

1. นำใบยาสูบประมาณ100 มิลลิกรัม บดด้วยไนโตรเจนเหลวให้เป็นผง
2. ละลายใน extraction buffer 1 ml [80% (v/v) methanol and 1% (v/v) HCl]
3. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที และเก็บส่วนใส่
4. จากนั้นเติม chloroform 1 ml (ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย) ผสมด้วยการ vortex
5. เหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที และย้ายส่วนใส่ด้านบนไปยังหลอดใหม่
6. นำชั้นน้ำด้านบน (methanol–water phase) มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A530 และ A657 โดยค่าที่ได้ต้องนำมาปรับให้เป็นมาตรฐานโดยเทียบกับน้ำหนักสดของแต่ละตัวอย่าง และคำนวณปริมาณแอนโทไซยานินจาก $\frac{A530 - A657}{\text{น้ำหนักใบสด}}$

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ผลการวิจัยข้าว

ลักษณะต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีน

จากการถ่ายยีน *pap1* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kiatake พบว่า ต้นที่ได้รับจาการถ่ายยีนมีลักษณะต้นสีเขียวทั้งต้น และเมล็ดสีขาวเช่นเดียวกับต้น wild - type (ภาพที่ 9) ซึ่งถึงแม้จะได้รับยีน *pap1* แต่คาดว่ายีนไม่ทำหน้าที่ในข้าวซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ดังนั้นคาดว่ายีน *pap1* จาก *Arabidopsis* ไม่สามารถทำงานได้ในข้าวโดยไม่สามารถกระตุ้นให้ข้าวเกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินได้

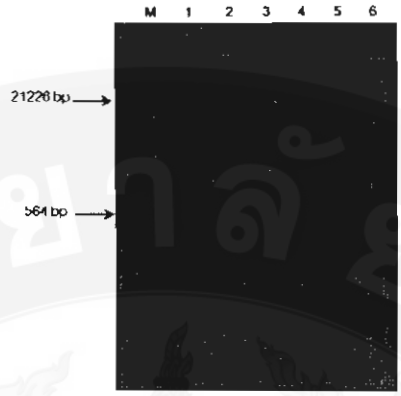
Control **ต้น 3.1.1.1** **ต้น 3.1.1.3** **ต้น 5.1.1.1**

ภาพที่ 9 ลักษณะต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนในระยะออกรวง

การตรวจสอบการแทรกของยีน *pap1* ในโครโมโซมของพืชโดยวิธี PCR

1. **การสกัดดีเอ็นเอต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ผ่านการถ่ายยีน *pap1* รุ่น T_0**

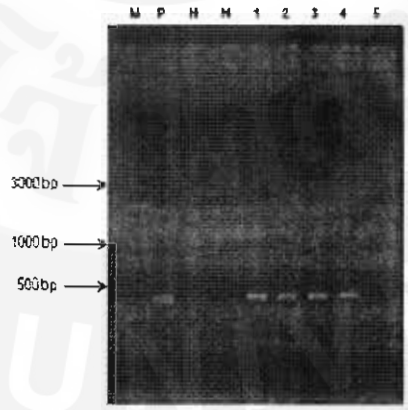
การตรวจสอบต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_0 จำนวน 5 ต้น คือ ต้นที่ 10.3.1.1, 11.1.1.2, 11.2.1.2, 11.2.3.2 และ 9.3.1.1 ตามลำดับ โดยนำต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนมาสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งดีเอ็นเอที่สกัดได้มีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 10) แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี และสามารถนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ต่อไป



ภาพที่ 10 การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ได้จากการถ่ายยีน ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Eco*RI + *Hin*dIII ช่องที่ 1 คือ ต้นข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และช่องที่ 2 – 6 คือต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน ต้นที่ 10.3.1.1, 11.1.1.2, 11.2.1.2, 11.2.3.2 และ 9.3.1.1 ตามลำดับ

2. การวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนรุ่น T_0 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

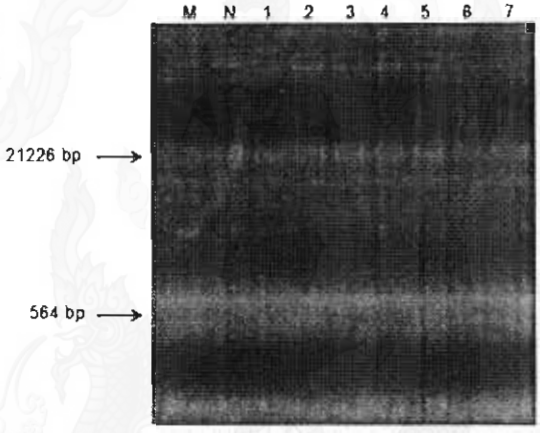
เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอของต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ได้จากการถ่ายยีน *pap1* จำนวน 5 ต้น มาตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนม ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* พบว่ามีต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ทั้งหมดจำนวน 5 ต้น เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder ช่อง P คือ พลาสมิด pPAP1 (Positive control) ช่อง N คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (Negative control) ช่องที่ 1-5 คือต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน ต้นที่ 10.3.1.1, 11.1.1.2, 11.2.1.2, 11.2.3.2 และ 9.3.1.1 ตามลำดับ และช่อง H คือ น้ำกลั่น

3. **การสกัดดีเอ็นเอต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ที่ผ่านการถ่ายยีน *pap1***

ตรวจสอบต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ต้นที่ 10.3.1.1 จำนวน 2 ต้น, ต้นที่ 11.2.3.2 จำนวน 4 ต้น และ ต้นที่ 11.1.1.2 จำนวน 1 ต้น รวมทั้งหมด 7 ต้น โดยนำต้นข้าวรุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีนมาสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งดีเอ็นเอที่สกัดได้ มีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 12) แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี และสามารถนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ต่อไป



ภาพที่ 12 การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีน ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Eco*RI + *Hin*dIII ช่องที่ N คือ ต้นข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และช่องที่ 1– 7 ต้นข้าวรุ่น T_1 ต้นที่ 10.3.1.1 ต้น 1, 10.3.1.1 ต้น 2, 11.2.3.2 ต้น 1, 11.2.3.2 ต้น 2, 11.2.3.2 ต้น 3, 11.2.3.2 ต้น 4 และ11.1.1.2 ตามลำดับ

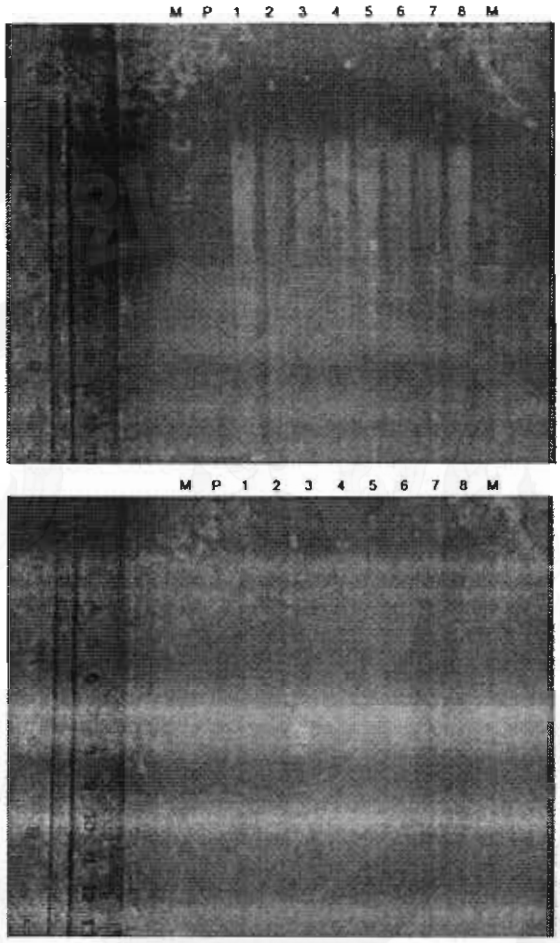
4. **การวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนรุ่น T_1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์**

เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอของต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ต้นที่ 10.3.1.1 จำนวน 2 ต้น, ต้นที่ 11.2.3.2 จำนวน 4 ต้น และ ต้นที่ 11.1.1.2 จำนวน 1 ต้น ที่ได้จากการถ่ายยีน *pap1* มาตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ทั้งหมดจำนวน 7 ต้น เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตราฐาน (ภาพที่ 13)

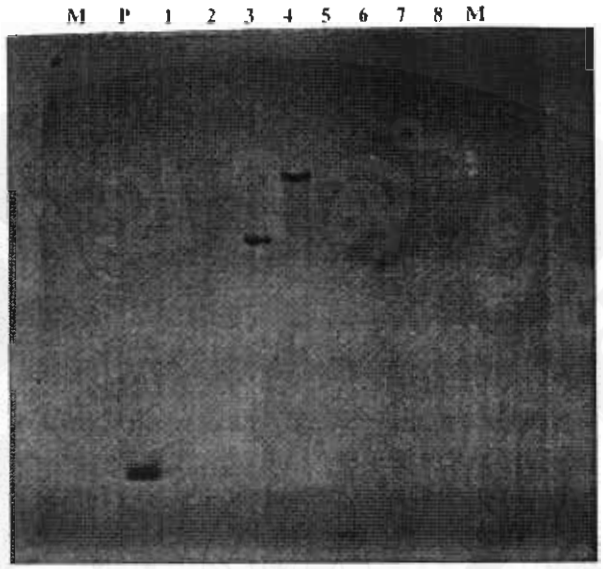
ภาพที่ 13 การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ครั้งที่ 2 โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder ช่อง P คือ พลาสมิด pPAP1 (Positive control) ช่อง N คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (Negative control) ช่องที่ 1-7 คือต้นข้าวรุ่น T_1 ต้นที่ 10.3.1.1 ต้น 1, 10.3.1.1 ต้น 2, 11.2.3.2 ต้น 1, 11.2.3.2 ต้น 2, 11.2.3.2 ต้น 3, 11.2.3.2 ต้น 4 และ11.1.1.2 ตามลำดับตามลำดับ และช่อง H คือ น้ำกลั่น

การตรวจสอบจำนวนชุดของยีนในโครโมโซมพืชด้วยเทคนิค Southern blot

สกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวและนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII เพื่อวิเคราะห์การแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมข้าวด้วยเทคนิค Southern bolt พบว่า ข้าวทั้ง 3 ต้น มีการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนม เพียงหนึ่งชุด และมีตำแหน่งแตกต่างกัน (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 14 ผลการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอข้าวและยาสูบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และวิเคราะห์ด้วย 0.8% gel electrophoresis และเจลหลังย้ายดีเอ็นเอไปบนเมมเบรน ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Eco*RI + *Hin*dIII และ1 Kb DNA Ladder ช่องที่ P คือ PCR Product 1:1000 (positive) ช่องที่ 1 คือ ต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ช่องที่ 2-4 คือ ต้นข้าวต้นที่ 1-3 ช่องที่ 5 คือ ต้นยาสูบต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ช่องที่ 6-8 คือ ต้นยาสูบต้นเขียว ต้นเขียวปนแดง และต้นแดง ตามลำดับ

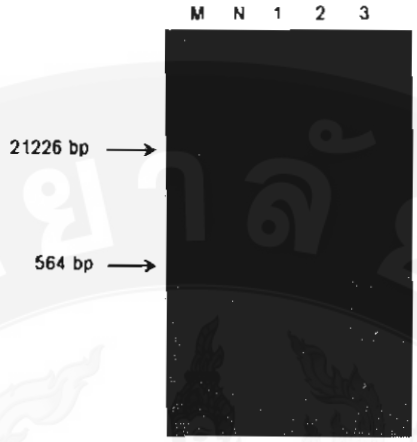


ภาพที่ 15 ผลการทำ southern bolt ข้าวและยาสูบ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Eco*RI + *Hin*dIII และ1 Kb DNA Ladder ช่องที่ P คือ PCR Product 1:1000 (positive) ช่องที่ 1 คือ ต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ช่องที่ 2-4 คือ ต้นข้าวต้นที่ 3.11.1 3.11.3 และ 5.1.1.1 ตามลำดับ ช่องที่ 5 คือ ต้นยาสูบต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ช่องที่ 6-8 คือ ต้นยาสูบต้นเขียว ต้นเขียวปนแดง และต้นแดง ตามลำดับ

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอโดยวิธีอาร์ทีพีซีอาร์

1. **การสกัดอาร์เอ็นเอข้าวเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pap1***

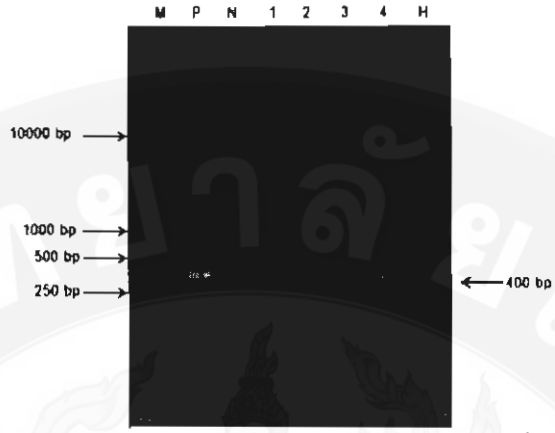
ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pap1* ในระดับอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์ โดยสกัดอาร์เอ็นเอข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ต้นที่ 3.1.1.1, 3.1.1.3 และ 5.1.1.1 พบว่าได้อาร์เอ็นเอปริมาณมาก คุณภาพดี และมีแถบอาร์เอ็นเอขนาด 18S และ 28S สามารถนำไปใช้ในการทำอาร์ทีพีซีอาร์ได้ (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 การตรวจสอบอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Eco*RI + *Hin*dIII ช่องที่ N คือ ต้นข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และช่องที่ 1–3 คือ ต้นข้าวรุ่น T1 ต้นที่ 3.1.1.1, 3.1.1.3 และ 5.1.1.1 ตามลำดับ

2. **การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *pap1* ในต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์**

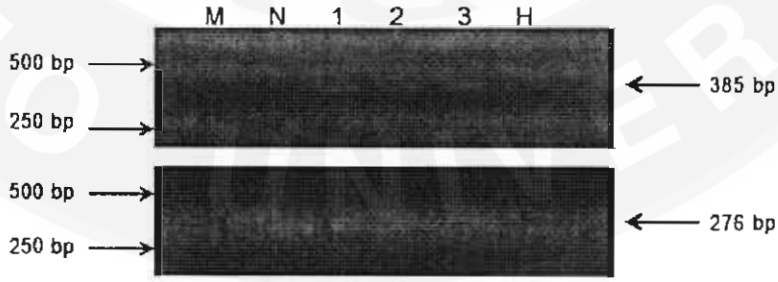
จากการตรวจสอบการแสดงออกยีน *pap1* ในต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์ พบว่ายีน *pap1* มีการแสดงออกในต้นข้าวที่ทดสอบทั้งหมดคือ ต้น 3.1.1.1 3.1.1.3 และ 5.1.1.1 (ภาพที่ 17) แต่ข้าวทั้งสามต้นมีลักษณะต้นสีเขียว จึงต้องทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินต่อไป



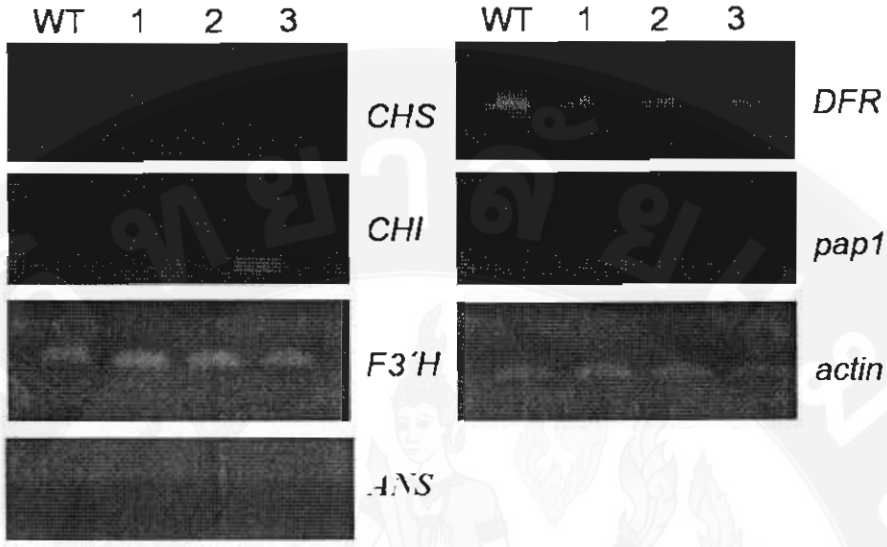
ภาพที่ 17 ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *pap1* ในต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่อง P คือ พลาสมิด pPAP1 (Positive control) ช่อง N คือ cDNA จากต้นข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (Negative control) ช่องที่ 1-4 คือ cDNA จากต้นข้าว ต้นที่ 1-4 คือ ต้นที่ 3.1.1.1-1, 3.1.1.1-2, 3.1.1.3 และ 5.1.1.1 และช่อง H คือ น้ำกลั่น

3. **การวิเคราะห์การแสดงออกของ *pap1* ในข้าว ด้วยเทคนิค semi - quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1***

เมื่อนำอาร์เอ็นเอทั้งหมดมาสังเคราะห์เส้น cDNA จากนั้นนำ cDNA มาเป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จำนวน 28 รอบ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* พบว่า ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนทั้ง 3 ต้น มีระดับการแสดงออกใกล้เคียงกันทั้งยีน *pap1* และยีนโครงสร้าง ได้แก่ ยีน *CHS CHI F3'H* และ *DFR* ส่วยยีน ANS ไม่พบทั้งต้น wild - type และต้นที่ได้จากการถ่ายยีน (ภาพที่ 18 และ 19)



ภาพที่ 18 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ *pap1* ในข้าว ด้วยเทคนิค semi - quantitative RT-PCR ด้านบน คือ ยีน *pap1* ด้านล่าง คือ ยีน *actin* ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่อง N คือ ต้นข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ช่องที่ 1-3 คือต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนต้น 3.11.1 3.11.3 และ 5.1.1.1 ตามลำดับ ช่อง H คือ น้ำกลั่



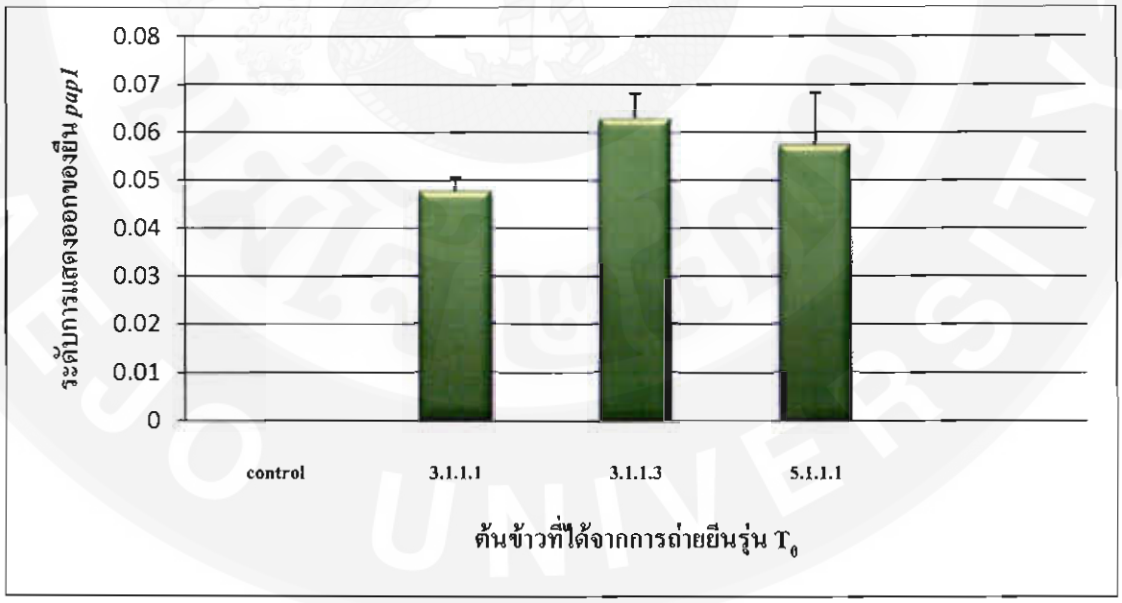
ภาพที่ 19 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *pap1* และยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR ช่อง WT คือ wild - type ช่องที่ 1-3 คือต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนต้น 3.11.1 3.11.3 และ 5.1.1.1 ตามลำดับ

4. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *pap1* ในข้าวด้วยเทคนิค Real Time RT-PCR

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *pap1* ในข้าวจำนวน 3 ต้น พบว่า ต้นข้าวมีการแสดงออกของยีนใกล้เคียงกัน ต้นข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *pap1* มากที่สุด คือ ต้นที่ 3.1.1.3 รองลงมาคือต้น 5.1.1.1 และ 3.1.1.1 โดยมีระดับการแสดงออก คือ 0.0968 0.0697 และ 0.0697 ตามลำดับ แสดงเป็นระดับการแสดงออกเปรียบเทียบระหว่างต้นข้าวดังกราฟ (ภาพที่ 19)

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *pap1* ในข้าวโดยเทียบกับยีน *actin* โดยใช้เทคนิค Real Time RT-PCR

ตัวอย่าง	ยีนที่ตรวจสอบ		อัตราส่วน *pap1 / OsActin*				
	Targets	references	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	SD
3.1.1.1	*pap1*	*OsActin*	-	6.97 ×10-2	6.97 ×10-2	0.0478	0.00277
3.1.1.3	*pap1*	*OsActin*	8.97×10-2	8.97 ×10-2	8.97 ×10-2	0.0631	0.00507
5.1.1.1	*pap1*	*OsActin*	9.68×10-2	9.68×10-2	9.68×10-2	0.0576	0.0106



ภาพที่ 20 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *pap1* ในข้าวด้วยเทคนิค Real Time RT-PCR

การศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีนไปสู่รุ่นลูก

1. **การทดสอบการกระจายตัวเมล็ดข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ได้จากการถ่ายยีน ในการต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน**

จากการทดสอบการกระจายตัวเมล็ดข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ได้จากการถ่ายยีน ในการต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน จำนวน 3 ต้น ซึ่งจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Chi square ต้นข้าวทั้งหมดมีอัตราส่วนฟีโนไทป์รุ่น T_1 คือต้านไฮโกรมัยซิน : ไม่ต้านไฮโกรมัยซิน เท่ากับ 3:1 เป็นไปตามค่าทฤษฎีที่ยีนมีการแทรกตัวในจีโนม และเกิดการกระจายตัวในรุ่น T_1 (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 การทดสอบการกระจายตัวของเมล็ดข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ผ่านการถ่ายยีน *pap1* ในการต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake	จำนวนเมล็ดที่ต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน	จำนวนเมล็ดที่ไม่ต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน	อัตราส่วนอย่างต่ำ	อัตราส่วนคาดหมาย ต้าน:ไม่ต้าน	χ^2
3.1.1.1	16	9	1.78: 1	3:1	1.6133
3.1.1.3	16	9	1.78: 1	3:1	1.6133
5.1.1.1	17	8	2.13: 1	3:1	0.6534

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Chi square ของต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ต้นที่ 3.1.1.1 และ 3.1.1.3

อัตราส่วนฟีโนไทป์ที่คาดหมายรุ่น T_1 คือต้านไฮโกรมัยซิน : ไม่ต้านไฮโกรมัยซิน เท่ากับ 3:1

ฟีโนไทป์ของรุ่น T_1	ค่าสังเกต (O)	ค่าคาดหมายทางทฤษฎี (E)	O -E	$(O-E)^2$	$(O-E)^2/E$
ต้านไฮโกรมัยซิน	16	3/4×25 = 18.75	–2.75	7.5625	0.4033
ไม่ต้านไฮโกรมัยซิน	9	1/4×25 = 6.25	2.75	7.5625	1.21
รวม	25				χ^2 = 1.6133

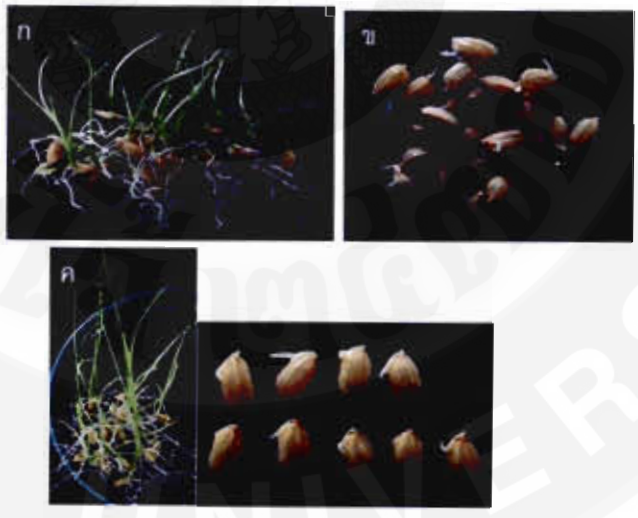
เมื่อ df = 1 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 มีค่า 3.841 จากการคำนวณค่า χ^2 = 1.6133 มีค่าน้อยกว่า แสดงว่าเป็นไปตามสมมุติฐาน คือรุ่น T_1 มีอัตราส่วนฟีโนไทป์ ต้านไฮโกรมัยซิน : ไม่ต้านไฮโกรมัยซิน เท่ากับ 3:1

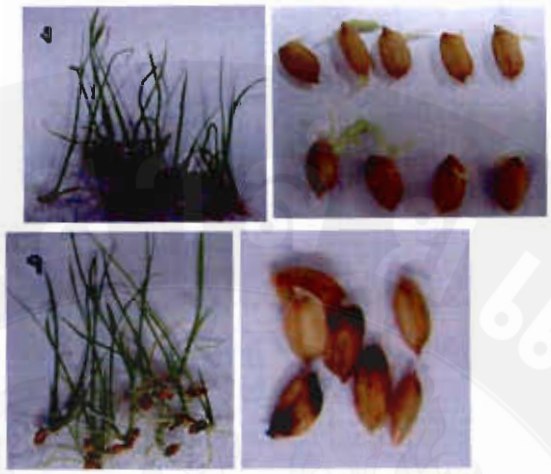
ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Chi square ของต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ต้นที่ 5.1.1.1

อัตราส่วนฟีโนไทป์ที่คาดหมายรุ่น T_1 คือด้านไฮโกรมัยซิน : ไม่ด้านไฮโกรมัยซิน เท่ากับ 3:1

ฟีโทไทป์ของรุ่น T_1	ค่าสังเกต (O)	ค่าคาดหมายทางทฤษฎี (E)	O -E	$(O-E)^2$	$(O-E)^2/E$
ด้านไฮโกรมัยซิน	17	3/4×25 = 18.75	–1.75	3.0625	0.1634
ไม่ด้านไฮโกรมัยซิน	8	1/4×25 = 6.25	1.75	3.0625	0.49
รวม	25				$\chi^2 = 0.6534$

เมื่อ df = 1 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 มีค่า 3.841 จากการคำนวณค่า $\chi^2 = 0.6534$ มีค่าน้อยกว่า แสดงว่าเป็นไปตามสมมุติฐาน คือรุ่น T_1 มีอัตราส่วนฟีโนไทป์ ด้านไฮโกรมัยซิน : ไม่ด้านไฮโกรมัยซิน เท่ากับ 3:1



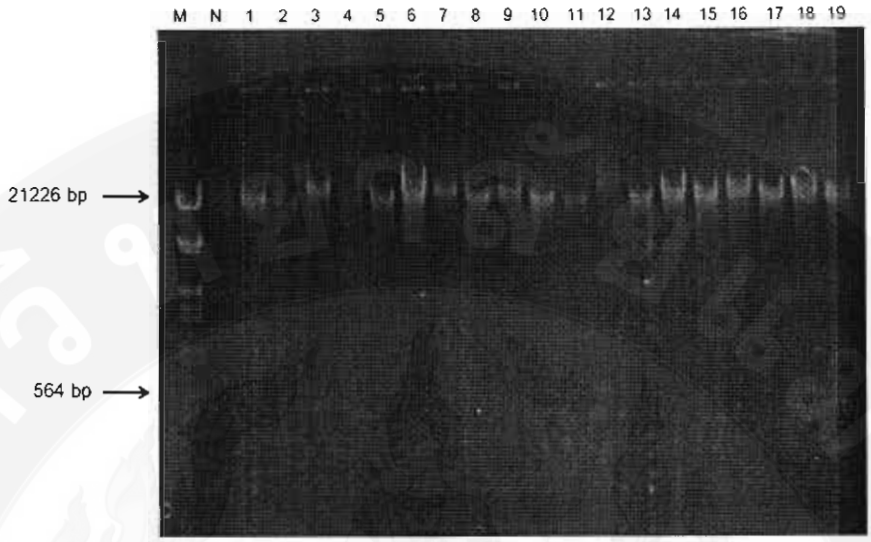


ภาพที่ 21 การทดสอบการกระจายตัวของเมล็ดข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (ก) เมล็ดจากต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนหลังจากที่แช่ในน้ำ (ข) เมล็ดจากต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนหลังจากแช่ในน้ำมีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมล็ดรุ่น T_1 ที่ได้จากต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนหลังจากแช่น้ำที่มีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลาประมาณ 10 วัน (ค) ต้นที่ 3.1.1.1 (ง) ต้นที่ 3.1.1.3 และ (จ) 5.1.1.1

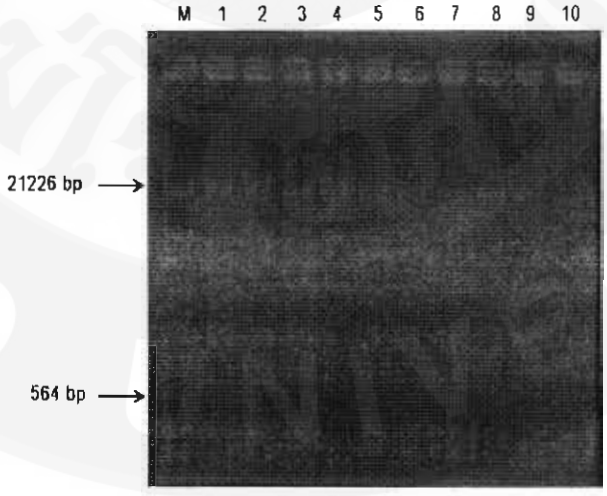
2. การตรวจสอบต้นข้าวที่ต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซินโดยเทคนิคพีซีอาร์

2.1. ผลการสกัดดีเอ็นเอต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ที่ผ่านการถ่ายยีน *pap1*

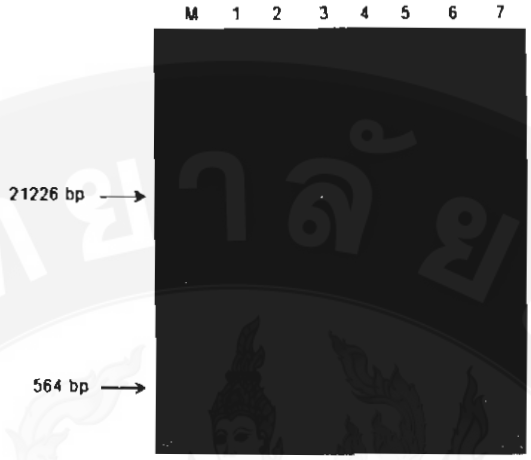
การตรวจสอบต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ต้นที่ 3.1.1.3 จำนวน 16 ต้น ต้นที่ 5.1.1.1 จำนวน 12 ต้น และต้นที่ 3.1.1.1 จำนวน 19 โดยนำต้นข้าวรุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีนมาสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งดีเอ็นเอที่สกัดได้ มีขนาดใหญ่ แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี และสามารถนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ต่อไป (ภาพที่ 22-25)



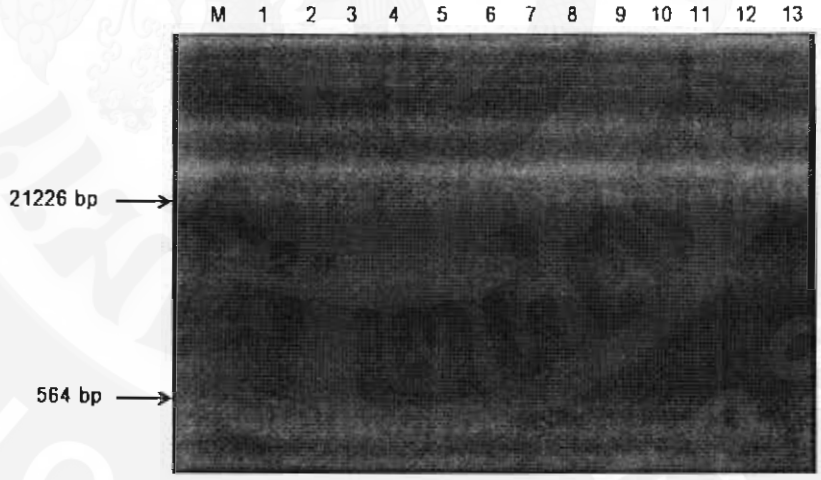
ภาพที่ 22 การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ต้นที่ 3.1.1.1 ที่ได้จากการถ่ายยีน ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Eco*RI + *Hin*dIII ช่องที่ N คือ ต้นข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และช่องที่ 1– 19 ต้นข้าวรุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีน ต้นที่ 1-19ตามลำดับ



ภาพที่ 23 การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ต้นที่ 3.1.1.3 ที่ได้จากการถ่ายยีน ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Eco*RI + *Hin*dIII ช่องที่ 1 คือ ต้นข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และช่องที่ 2 – 10 ต้นข้าวรุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีน ต้นที่ 1-9 ตามลำดับ



ภาพที่ 24 การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ต้นที่ 3.1.1.3 ที่ได้จากการถ่ายยีน ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Eco*RI + *Hin*dIII ช่องที่ 1-7 คือต้นข้าวรุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีน ต้นที่ 10-16 ตามลำดับ



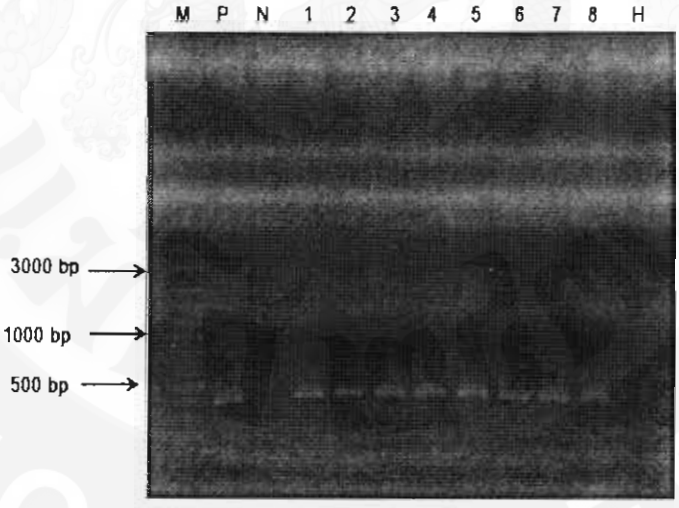
ภาพที่ 25 การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ต้นที่ 5.1.1.1 ที่ได้จากการถ่ายยีน ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Eco*RI + *Hin*dIII ช่องที่ 1 คือ ต้นข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และช่องที่ 2 – 13 คือต้นข้าวรุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีน ต้นที่ 1-12 ตามลำดับ

2.2 การวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์

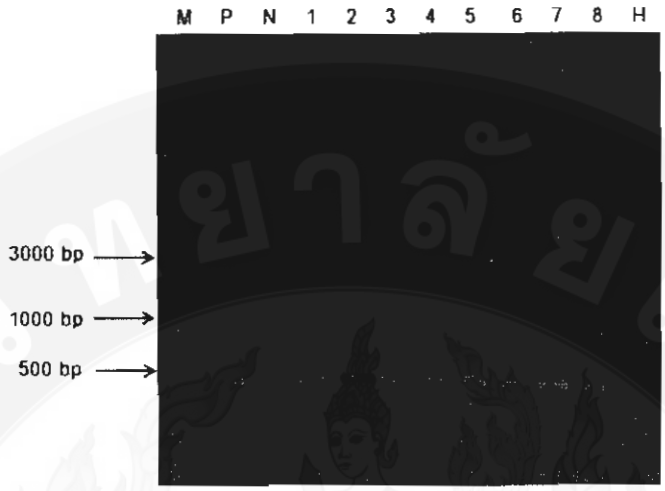
เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอของต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ต้นที่ 3.1.1.3 ที่ได้จากการถ่ายยีน *pap1* จำนวน 16 ต้น มาตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนม ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* พบว่าต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ทั้งหมดจำนวน 16 ต้น เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตราฐาน (ภาพที่ 26 และ 27)

เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอของต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_1 ต้นที่ 5.1.1.1 ที่ได้จากการถ่ายยีน *pap1* จำนวน 12 ต้น มาตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* พบว่าต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ทั้งหมดจำนวน 11 ต้น เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตราฐาน (ภาพที่ 28)

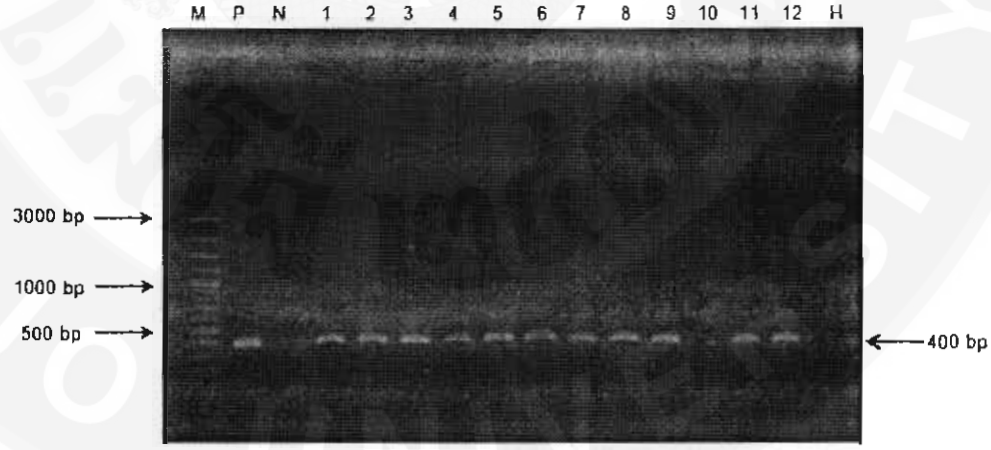
ส่วนการตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมข้าวรุ่น T_1 ต้นที่ 3.1.1.1 จำนวน 19 ต้น พบว่า ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ทั้งหมด 19 ต้น เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส (ภาพที่ 26 และ 29)



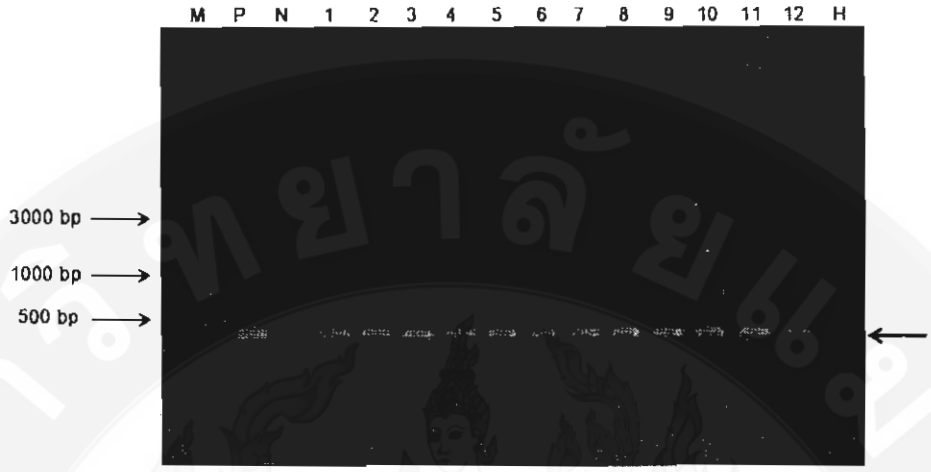
ภาพที่ 26 การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ต้นที่ 3.1.1.3 รุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder ช่อง P คือ พลาสมิด pPAP1 (Positive control) ช่อง N คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (Negative control) ช่องที่ 1-8 คือต้นข้าวรุ่น T_1 ต้นที่ 1-8 ตามลำดับ และช่อง H คือ น้ำกลั่น



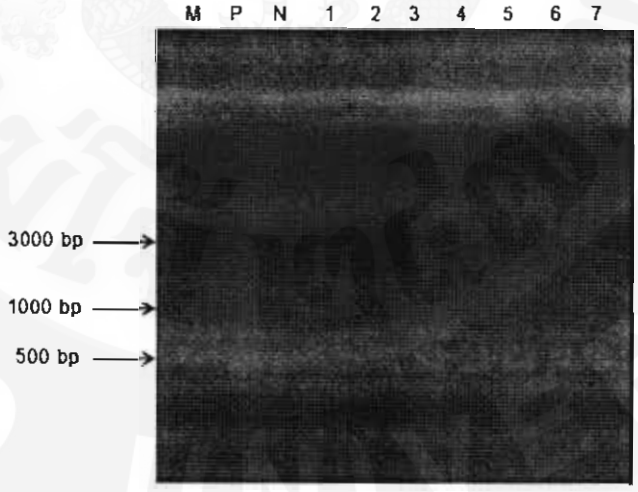
ภาพที่ 27 การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ต้นที่ 3.1.1.3 รุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder ช่อง P คือ พลาสมิด pPAP1 (Positive control) ช่อง N คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (Negative control) ช่องที่ 1-8 คือต้นข้าวรุ่น T_1 ต้นที่ 9-16 ตามลำดับ และช่อง H คือ น้ำกลั่น



ภาพที่ 28 การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ต้นที่ 5.1.1.1 รุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ครั้งที่ 2 โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder ช่อง P คือ พลาสมิด pPAP1 (Positive control) ช่อง N คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (Negative control) ช่องที่ 1-12 คือต้นข้าวรุ่น T_1 ต้นที่ 1-12 ตามลำดับ และช่อง H คือ น้ำกลั่น



ภาพที่ 29 การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ต้นที่ 3.1.1.1 รุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder ช่อง P คือ พลาสมิด pPAP1 (Positive control) ช่อง N คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (Negative control) ช่องที่ 1-12 คือต้นข้าวรุ่น T_1 ต้นที่ 1-12 ตามลำดับ และช่อง H คือ น้ำกลั่น



ภาพที่ 30 การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ต้นที่ 3.1.1.1 รุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder ช่อง P คือ พลาสมิด pPAP1 (Positive control) ช่อง N คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (Negative control) ช่องที่ 1-7 คือต้นข้าวรุ่น T_1 ต้นที่ 13-19 ตามลำดับ

ตารางที่ 13 สรุปต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีน และการตรวจสอบต้นข้าวด้วยเทคนิคต่างๆ

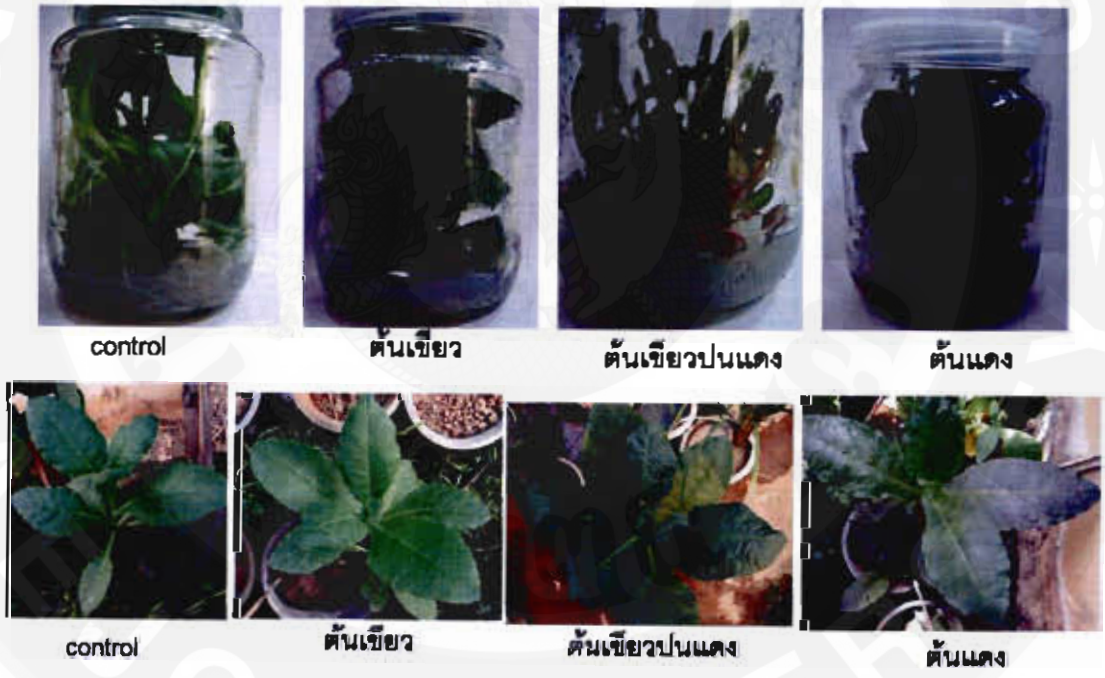
ต้นข้าว	PCR รุ่น T_0	RT-PCR รุ่น T_0	segregation	จำนวนต้น รุ่น T_1	PCR รุ่น T_1	RT-PCR รุ่น T_1
3.1.1.1	+	+	+	19	+	+
3.1.1.3	+	+	+	16	+	+
5.1.1.1	+	+	+	12	+	+
10.3.1.1	+	ไม่ได้ตรวจสอบ	ไม่ได้ตรวจสอบ	2	+	ไม่ได้ตรวจสอบ
11.2.3.2	+	ไม่ได้ตรวจสอบ	ไม่ได้ตรวจสอบ	4	+	ไม่ได้ตรวจสอบ
11.1.1.2	+	ไม่ได้ตรวจสอบ	ไม่ได้ตรวจสอบ	1	+	ไม่ได้ตรวจสอบ

หมายเหตุ ไม่ได้ตรวจสอบ เนื่องจากได้เมล็ดจำนวนน้อยไม่พอต่อการวิเคราะห์

ผลการวิจัยยาสูบ

ลักษณะต้นยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีน

จากการถ่ายยีน *pap1* เข้าสู่ยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนใบยาสูบรอดบนอาหารคัดเลือกสูงสุดคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบยาสูบบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 4 – 6 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนใบเกิดตายอดสูงสุดคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ และเกิดตายอดสีแดงสูงสุดคิดเป็น 44.44 เปอร์เซ็นต์ และหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ตายอดสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์โดยลักษณะต้นยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีนมีลักษณะต้นสีเขียว สีเขียวปนแดง และสีแดงทั้งต้น ซึ่งต้นยาสูบสีแดงมีราก ดอก และฝักเป็นสีแดงอีกด้วย (ภาพที่ 31)

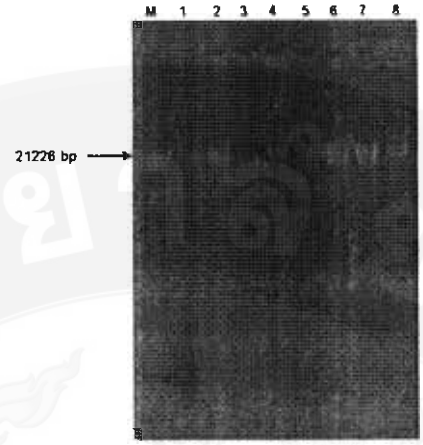


ภาพที่ 31 ลักษณะต้นยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีนในส่วนของใบ ดอก ฝัก และราก

การตรวจสอบการแทรกของยีน *pap1* ในโครโมโซมของพืชโดยวิธีพีซีอาร์

1. **การสกัดดีเอ็นเอต้นยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีน *pap1***

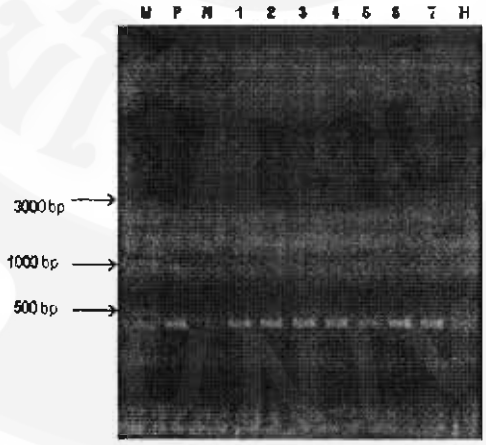
การตรวจสอบต้นยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีนโดยการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากต้นยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีนจำนวน 7 ต้น คือ ต้นที่ 7.3.1.1, 7.3.1.3, 10.9.2.1, 10.9.1, 10.9.1.1, 10.9.1.2 และ 10.9.2.2 ตามลำดับ พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีนาดใหญ่ และมีการแตกหักของดีเอ็นเอบางส่วน ซึ่งสามารถนำดีเอ็นเอไปเป็นแม่พิมพ์ในการทำพีซีอาร์ต่อไปได้ (ภาพที่ 32)



ภาพที่ 32 การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีน ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Eco*RI + *Hin*dIII ช่องที่ 1 คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และช่องที่ 2 – 8 คือต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน ต้นที่ 7.3.1.1, 7.3.1.3, 10.9.2.1, 10.9.1, 10.9.1.1, 10.9.1.2 และ 10.9.2.2 ตามลำดับ

2. **การวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์**

เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอของต้นยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีน *pap1* จำนวน 7 ต้น มาตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนม ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* พบว่ามีต้นยาสูบทั้งหมด 7 ต้น เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 33)



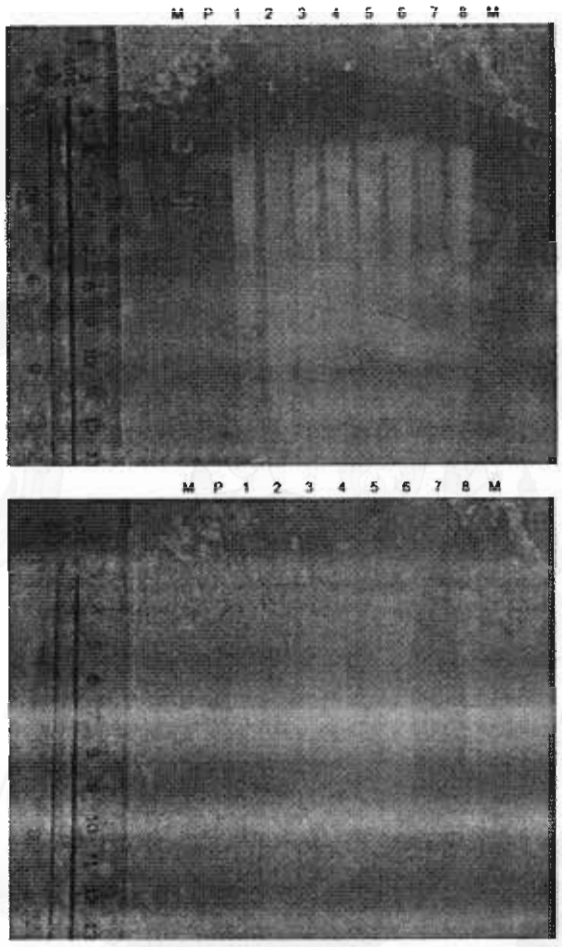
ภาพที่ 33 การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder ช่อง P คือ พลาสมิด pPAP1 (Positive control) ช่อง N คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (Negative control) ช่องที่ 1– 7 คือ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน ต้นที่ 7.3.1.1, 7.3.1.3, 10.9.2.1, 10.9.1, 10.9.1.1, 10.9.1.2 และ 10.9.2.2 ตามลำดับ และช่อง H คือ น้ำกลั่น

ตารางที่ 14 สรุปผลการวิเคราะห์ต้นยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*

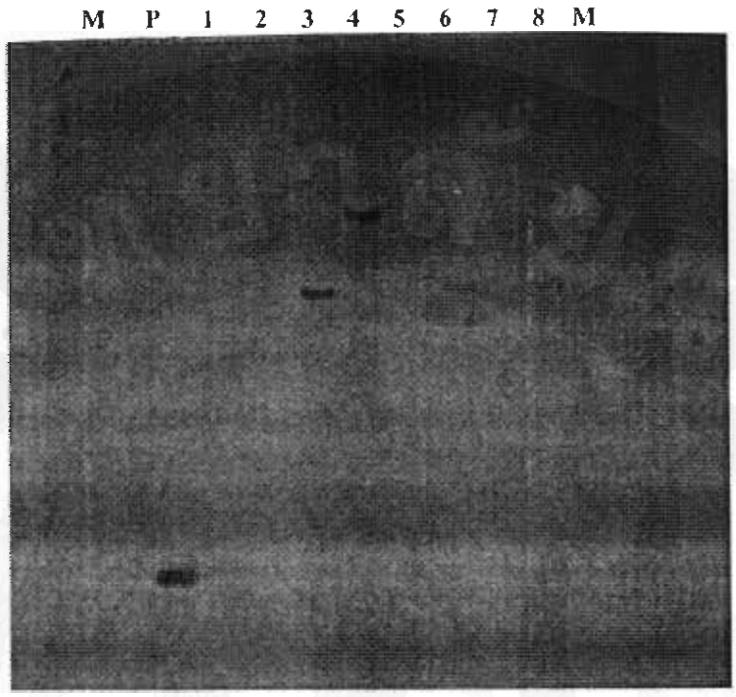
ต้นที่ทำพีซีอาร์	ลักษณะสีต้นยาสูบ	ผลพีซีอาร์ (เจือจางความเข้มข้นดีเอ็นเอตัวอย่าง 5 เท่า)
7.3.1.1	เขียว	+
7.3.1.3	เขียว	+
10.9.2.1	แดง	+
10.9.1	แดง	+
10.9.1.1	แดง	+
10.9.1.2	แดง	+
10.9.2.2	แดง	+

การตรวจสอบจำนวนชุดของยีนในโครโมโซมพืชด้วยเทคนิค Southern blot

สกัดดีเอ็นเอจากใบยาสูบและนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII เพื่อวิเคราะห์การแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมข้าวด้วยเทคนิค Southern bolt พบว่า ยาสูบต้นเขียว และต้นเขียวปนแดงมีการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมเพียงหนึ่งชุด และมีตำแหน่งแตกต่างกัน ส่วนต้นแดงคาดว่ามีการแทรกตัวของยีน 3 ชุด (ภาพที่ 35)



ภาพที่ 34 ผลการตัดดีเอ็นเอข้าวและยาสูบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII และวิเคราะห์ด้วย 0.8% gel electrophoresis และเจลหลังย้ายดีเอ็นเอไปบนเมมเบรน ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Eco*RI + *Hin*dIII และ1 Kb DNA Ladder ช่องที่ P คือ PCR Product 1:1000 (positive) ช่องที่ 1 คือ ต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ช่องที่ 2-4 คือ ต้นข้าวต้นที่ 1-3 ช่องที่ 5 คือ ต้นยาสูบต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ช่องที่ 6-8 คือ ต้นยาสูบต้นเขียว ต้นเขียวปนแดง และต้นแดง ตามลำดับ

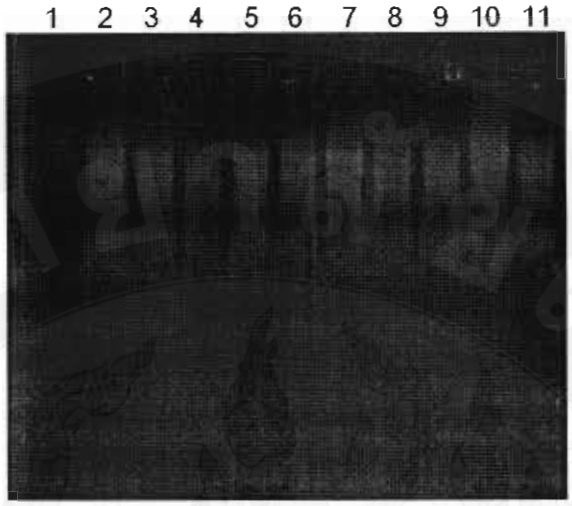


ภาพที่ 35 ผลการทำ southern bolt ข้าวและยาสูบ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Eco*RI + *Hin*dIII และ1 Kb DNA Ladder ช่องที่ P คือ PCR Product 1:1000 (positive) ช่องที่ 1 คือ ต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ช่องที่ 2-4 คือ ต้นข้าวต้นที่ 1-3 ช่องที่ 5 คือ ต้นยาสูบต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ช่องที่ 6-8 คือ ต้นยาสูบต้นเขียว ต้นเขียวปนแดง และต้นแดง ตามลำดับ

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอโดยวิธีอาร์ทีพีซีอาร์

1. ผลการสกัด Total RNA จากใบยาสูบและใบข้าว

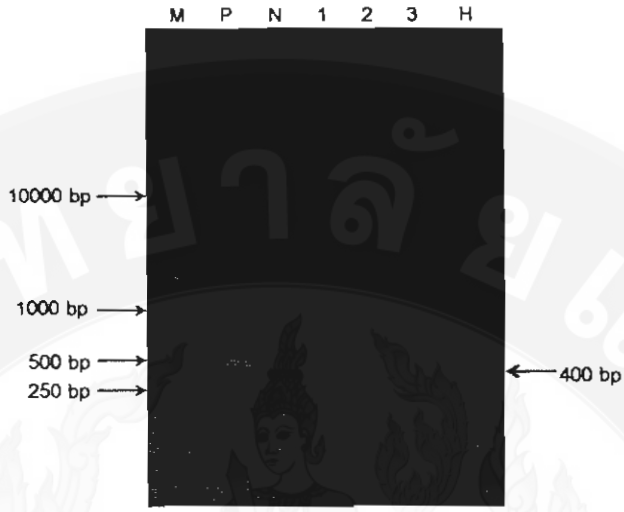
ผลการสกัด Total RNA จากใบยาสูบและใบข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pPAP1 ด้วยวิธี Trizol พบว่าได้ Total RNA ที่มีคุณภาพดีมีแถบอาร์เอ็นเอขนาด 18S และ 28S ชัดเจน (ภาพที่ 36)



ภาพที่ 36 ผลการสกัด Total RNA จากใบยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pPAP1 ช่องที่ 1 คือ Marker Mass ruler ช่องที่ 2-3 คือ Total RNA จากใบยาสูบที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ช่องที่ 4-11 คือ RNA จากใบยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pPAP1 และมีผลพีซีอาร์เป็นบวก

2. **การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *pap1* ในต้นยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์**

เมื่อนำอาร์เอ็นเอทั้งหมดของต้นยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีนที่มีต้นสีแดง สีเขียวปนแดง และสีเขียว มาตรวจสอบการระดับการแสดงออกของยีน *pap1* ในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR โดยนำอาร์เอ็นเอมาสังเคราะห์เส้น cDNA จากนั้นนำ cDNA มาเป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* พบว่า ต้นยาสูบต้นสีแดง สีเขียวปนแดง และสีแดง ต้นที่ 10.9.1, 19.34.1 และ 7.4.2 ตามลำดับ เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 400 bp แสดงว่า มีระดับการแสดงออกของยีน *pap1* ในต้นยาสูบทั้งต้นสีแดง และสีเขียว (ภาพที่ 37)



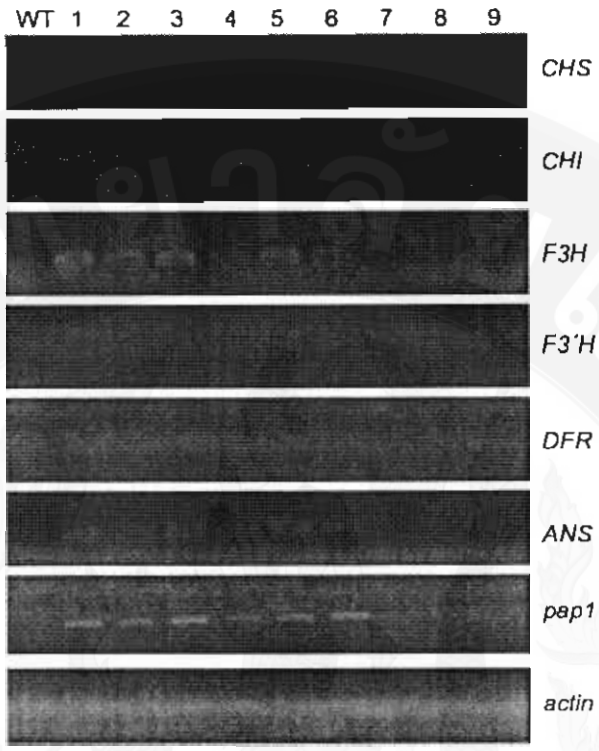
ภาพที่ 37 ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *pap1* ในต้นยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* ครั้งที่ 2 ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่อง P คือ พลาสมิด pPAP1 (Positive control) ช่อง N คือ cDNA จากต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (Negative control) ช่องที่ 1-3 คือ cDNA จากต้นยาสูบต้นสีแดง สีเขียวปนแดง และสีแดง ต้นที่ 10.9.1, 19.34.1 และ 7.4.2 ตามลำดับ (ผลการสกัดอาร์เอ็นเอช่องที่ 4, 6 และ 9 ตามลำดับ) และช่อง H คือ น้ำกลั่น

ตารางที่ 15 สรุปต้นยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีน และการตรวจสอบด้วยเทคนิคต่างๆ

ต้นยาสูบ	สีต้นยาสูบ	PCR รุ่น T_0	RT-PCR รุ่น T_0
10.9.2	แดง	+	+
15.1.1.1	แดง	+	+
9.2.7.1	แดง	+	+
15.18.2	เขียวปนแดง	+	+
19.24.1	เขียวปนแดง	+	+
10.2.12.3	เขียวปนแดง	+	+
7.4.5	เขียว	+	+
7.4.2	เขียว	+	+
7.3.1	เขียว	+	+
7.3.7	เขียว	+	+
7.3.1.1	เขียว	+	-
7.3.1.3	เขียว	+	-
10.9.2.1	แดง	+	+
10.9.2.1	แดง	+	-
10.9.1	แดง	+	-
10.9.1.1	แดง	+	-
10.9.1.2	แดง	+	-
10.9.2.2	แดง	+	-

3. การวิเคราะห์การแสดงออกของ *pap1* ในยาสูบด้วยเทคนิค semi quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*

เมื่อนำอาร์เอ็นเอทั้งหมดมาสังเคราะห์เส้น cDNA จากนั้นนำ cDNA มาเป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จำนวน 28 รอบ โดยใช้ไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* พบว่า ต้นยาสูบต้นแดงมีการแสดงออกของยีน *pap1* มากกว่าต้นเขียวปนแดง และต้นเขียว อีกทั้งยีนโครงสร้างต่างๆ ได้แก่ยีน *CHS, CHI, F'3H, DFR* และ *ANS* มีการแสดงออกมากในต้นแดงมากที่สุด รองลงมาในต้นเขียวปนแดง ซึ่งสอดคล้องกับฟีโนไทป์และการแสดงออกของยีน *pap1* ที่แสดงออกมากในต้นแดง (ภาพที่ 38)



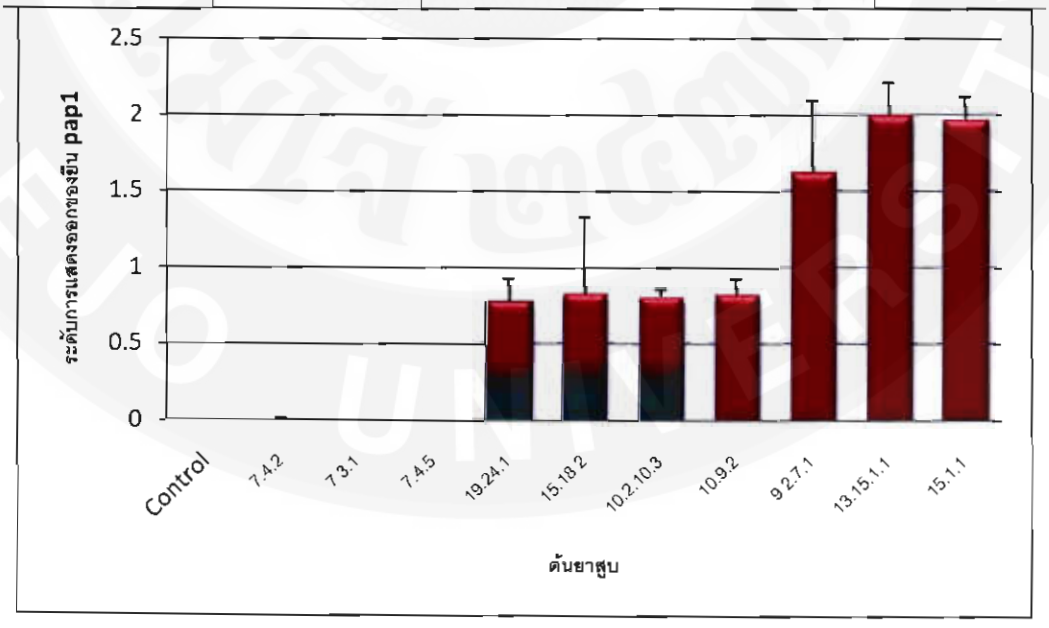
ภาพที่ 38 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *pap1* และยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR ช่อง WT คือ wild - type ช่อง 1-3 คือต้นยาสูบสีแดง ต้นที่ 10.9.2, 9.2.7.1 และ 15.1.1 ตามลำดับ ช่อง 1-3 คือต้นยาสูบสีเขียวปนแดง ต้นที่ 19.24.1, 15.18.2 และ 10.2.12.3 ตามลำดับ ช่อง 1-3 คือต้นยาสูบสีเขียว ต้นที่ 7.3.1, 7.4.2 และ 7.4.5 ตามลำดับ

4. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *pap1* ในยาสูบด้วยเทคนิค Real Time RT-PCR

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *pap1* ในยาสูบจำนวน 11 ต้น ที่มีลักษณะต้นสีแดง สีเขียวปนแดง และสีเขียว พบว่า ต้นยาสูบมีการแสดงออกของยีนต่างกัน โดยต้นยาสูบที่มีลักษณะต้นสีแดงมีการแสดงออกของยีน *pap1* มากที่สุด รองลงมาคือต้นที่มีสีเขียวปนแดง และสีเขียว ตามลำดับ (ตารางที่ 16) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะสีของต้นยาสูบ โดยในต้นสีแดงจะมีการแสดงออกของยีน *pap1* มาก ซึ่งช่วยส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินมากกว่าในต้นที่มีสีเขียวปนแดงหรือสีเขียว (ภาพที่ 39)

ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *pap1* ในยาสูบ โดยใช้เทคนิค Real Time RT-PCR

ต้นยาสูบ	สีต้นยาสูบ	อัตราส่วน *pap1/Ntactin*	SD
Control	เขียว	0	0
7.4.2	เขียว	0.0130	0.0027
7.3.1	เขียว	0	0
7.4.5	เขียว	0	0
19.24.1	เขียวปนแดง	0.7784	0.1493
15.18.2	เขียวปนแดง	0.8286	0.4984
10.2.10.3	เขียวปนแดง	0.8125	0.0421
10.9.2	แดง	0.8278	0.0973
9.2.7.1	แดง	1.6220	0.4734
13.15.1.1	แดง	2	0.2120
15.1.1	แดง	1.9720	0.1465



ภาพที่ 39 ผลการแสดงออกของยีน *pap1* ในต้นยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real Time RT-PCR

การศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีนไปสู่รุ่นลูก

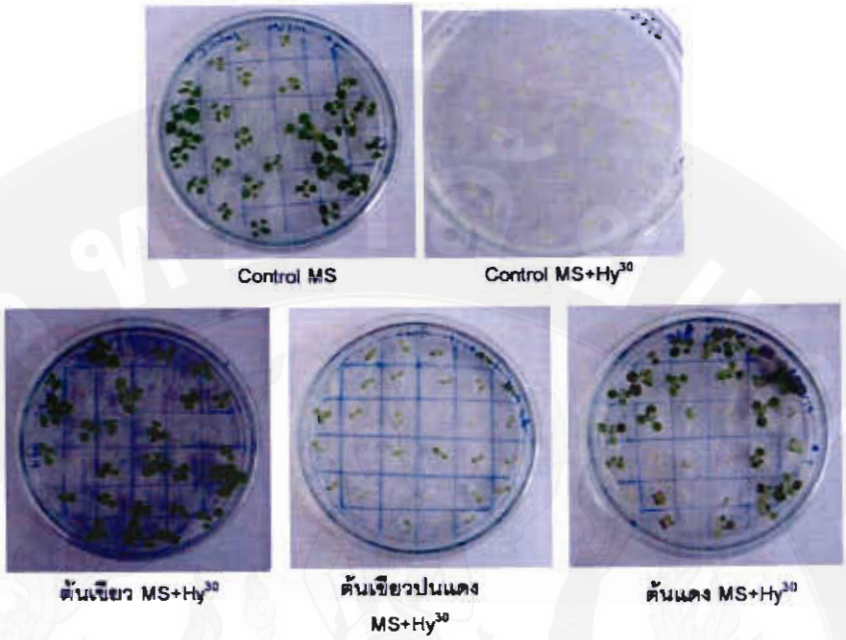
1. การทดสอบการกระจายตัวของต้นยาสูบข้ารุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีน ในการต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

จากการทดสอบการกระจายตัวของต้นยาสูบรุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีน ในการต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ได้แก่ต้นเขียว เขียวปนแดง และต้นแดง ซึ่งจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Chi square ต้นยาสูบทั้งหมดมีอัตราส่วนฟีโนไทป์รุ่น T_1 คือด้านไฮโกรมัยซิน : ไม่ต้านไฮโกรมัยซิน เท่ากับ 3:1 เป็นไปตามค่าทฤษฎีที่ยีนมีการแทรกตัวในจีโนม และเกิดการกระจายตัวในรุ่น T_1 (ตารางที่ 17 และภาพที่ 40)

ตารางที่ 17 การทดสอบการกระจายตัวของต้นยาสูบรุ่น T_1 ที่ได้จากการถ่ายยีน *pap1* ในการต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

ต้นยาสูบ	จำนวนต้นยาสูบที่ต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน	จำนวนต้นยาสูบที่ไม่ต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน	อัตราส่วนอย่างต่ำ	อัตราส่วนคาดหมาย ด้าน:ไม่ต้าน	χ^2
ต้นเขียว	26	6	4.3:1	3:1	0.667
ต้นเขียวปนแดง	25	4	6.25	3:1	1.95
ต้นแดง	21	7	3:1	3:1	0

เมื่อ df = 1 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 มีค่า 3.841 จากการคำนวณค่า χ^2 = 0.6534,1.95 และ 0 มีค่าน้อยกว่า แสดงว่าเป็นไปตามสมมุติฐาน คือรุ่น T_1 มีอัตราส่วนฟีโนไทป์ ต้านไฮโกรมัยซิน : ไม่ต้านไฮโกรมัยซิน เท่ากับ 3:1



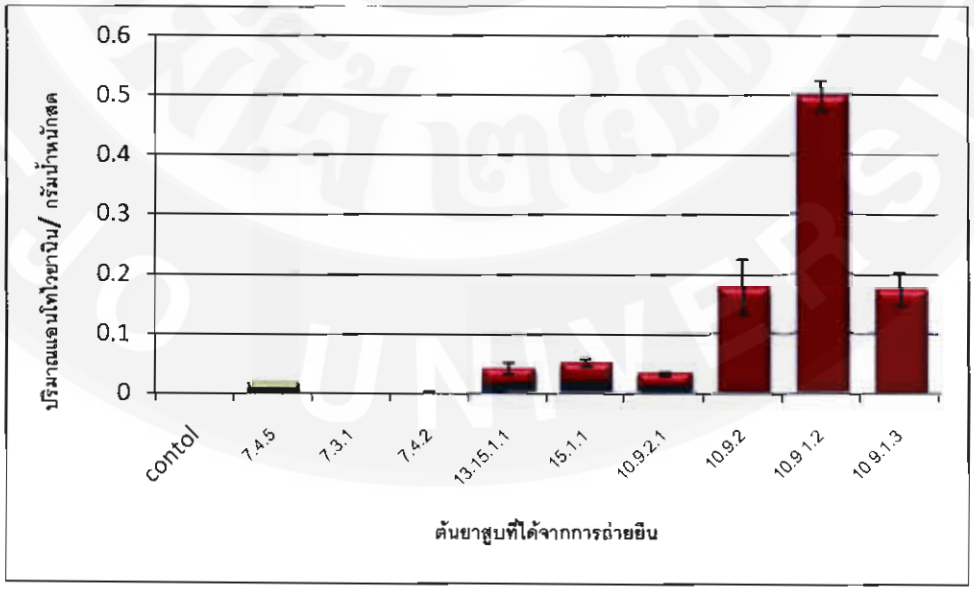
ภาพที่ 40 ต้นยาสูบที่เพาะจากเมล็ดรุ่น T_1 บนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

การวิเคราะห์แอนโทไซยานินในใบยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม

จากการถ่ายยีน *pap1* เข้าสู่ต้นยาสูบ ได้ต้นยาสูบที่มีลักษณะฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันคือ ต้นที่มีลักษณะสีเขียวเหมือนกับต้น wild - type ต้นเขียวปนแดง และต้นแดง เพื่อยืนยันว่าลักษณะสีแดงเกิดจากการสะสมของแอนโทไซยานินจึงได้ทำการสกัดแอนโทไซยานินและวัดปริมาณแอนโทไซยานินต่อกรัมน้ำหนักสด พบว่า ต้นยาสูบสีแดงมีการสะสมของแอนโทไซยานินมากที่สุด รองลงมาคือต้นเขียวปนแดง ส่วนต้นสีเขียวบางต้นยังคงมีการสะสมของแอนโทไซยานินแต่มีในปริมาณน้อยมากซึ่งอาจไม่แสดงให้เห็นชัดเจนบนใบยาสูบ ซึ่งผลการตรวจสอบปริมาณแอนโทไซยานินจะสอดคล้องกับลักษณะสีที่ปรากฏ (ตารางที่ 18 และภาพที่ 41)

ตารางที่ 18 ปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากต้นยาสูบที่มีสีเขียว สีเขียวปนแดงและต้นแดง

ต้นยาสูบ	สีต้นยาสูบ	ปริมาณแอนโทไซยานินต่อกรัมน้ำหนักสด				SD
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	
contol	เขียว	0	0	0	0	0
7.4.5	เขียว	0	0.0022	0.0025	0.0184	0
7.3.1	เขียว	0.0024	0	0.0010	0.0011	0.0006
7.4.2	เขียว	0.0042	0.0016	0.0039	0.0032	0.0008
13.15.1.1	เขียวปนแดง	0.0612	0.0297	0.0356	0.04218	0.0095
15.1.1	เขียวปนแดง	0.0622	0.0381	0.0550	0.05175	0.0068
10.9.2.1	เขียวปนแดง	0.0298	0.0385	0.0289	0.03239	0.0031
10.9.2	แดง	0.1539	0.1088	0.2731	0.17860	0.0473
10.9.1.2	แดง	0.5280	0.4454	0.5203	0.49787	0.0263
10.9.1.3	แดง	0.1178	0.2304	0.1753	0.17451	0.0283



ภาพที่ 41 ปริมาณแอนโทไซยานินในต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม

สรุปผลการทดลอง

1. **การตรวจสอบการแทรกของยีน *pap1* ในโครโมโซมของพืชโดยวิธีพีซีอาร์**

การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมข้าวด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ F_PAP1 และ R_PAP1 ซึ่งจำเพาะต่อยีน *pap1* จากต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน พบว่า ให้ผลพีซีอาร์บวก คือ เห็นแถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส จึงอาจกล่าวได้ว่า ต้นข้าวที่ได้นั้นมีการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมของข้าว จากการวิเคราะห์ต้นข้าวมีการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมซึ่งตามสมมติฐานต้นข้าวที่ได้จะต้องเกิดสีแดงจากการสร้างรงควัตถุแอนโทไซยานิน เนื่องจากว่ายีน *pap1* จะเข้าไปเปิดการทำงานของยีนหลายยีน แต่ผลการทดลองที่ได้พบว่าได้ต้นข้าวที่มีฟีโนไทป์ปกติสีเขียว และผิดปกติได้ต้นสีขาว ในต้นข้าวสีเขียวที่มีผลพีซีอาร์บวก แต่ไม่มีการแสดงออกของการสร้างแอนโทไซยานิน อาจเป็นผลมาจากยีน *pap1* เข้าไปในแทรกจีโนมโดยที่ตำแหน่งของยีนในจีโนมข้าวที่ยีน *pap1* เข้าไปแทรก อาจจะไม่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดการแสดงออกของยีน *pap1* หรืออีกประการหนึ่งยีนที่ส่งถ่ายเข้าไปไม่สามารถกระตุ้น pathway ในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ซึ่งอาจเนื่องมาจากยีน *pap1* เป็นยีนที่ได้จาก *Arabidopsis* ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ เมื่อนำมาทดสอบในข้าวซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวยีน *pap1* จึงอาจไม่สามารถทำงานได้

เมื่อตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมยาสูบที่ได้รับจากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* พบว่า ต้นยาสูบที่มีสีเขียว สีเขียวปนแดง และสีแดงให้ผลพีซีอาร์บวก คือ เห็นแถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส ซึ่งคาดว่าต้นเหล่านี้ได้รับยีน *pap1* แต่ที่มีหลายฟีโนไทป์อาจเนื่องจากการทำงานและการแสดงออกของยีน *pap1* ซึ่งได้ศึกษาต่อไปด้วยเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์

2. **การตรวจสอบจำนวนชุดของยีนในโครโมโซมพืชด้วยเทคนิค Southern blot**

จากการตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมข้าวด้วยเทคนิค Southern bolt พบว่าข้าวทั้ง 3 ต้น มีการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนม เพียงหนึ่งชุด และมีตำแหน่งแตกต่างกัน แสดงว่าข้าวทั้ง 3 ต้นได้รับยีน *pap1*

เมื่อตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมยาสูบ พบว่า ต้นยาสูบสีเขียว และต้นเขียวปนแดงมีการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมเพียงหนึ่งชุด และมีตำแหน่งแตกต่างกัน ส่วนต้นยาสูบสีแดงมีการแทรกตัวของยีน 3 ชุด ซึ่งคาดว่าต้นแดงที่มีการสะสมแอนโทไซยานินมากอาจเกิดจากมียีนแทรกในจีโนมหลายชุดทำให้ยีน *pap1* สามารถทำงานโดยกระตุ้นการสังเคราะห์แอนโทไซ

ยานินในยาสูบได้ดี ส่วนต้นเขียวนั้นอาจเนื่องจากยีนแทรกในจีโนมในตำแหน่งที่ไม่เหมาะสมทำให้ยีนไม่สามารถแสดงออกและไม่สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในยาสูบได้

3. **การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอโดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR และ Real Time RT-PCR**

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pap1* ในข้าว ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR และ Real Time RT-PCR พบว่า ต้นข้าวทั้ง 3 ต้น มีการแสดงออกของยีน *pap1* ใกล้เคียงกัน ส่วนการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องใน pathway การสังเคราะห์แอนโทไซยานินด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่า ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมมีการแสดงออกของยีนโครงสร้างไม่แตกต่างกับต้น wild-type ซึ่งคาดว่ายีน *pap1* มีการแสดงออกแต่ไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนโครงสร้างในข้าวได้และส่งผลให้ต้นข้าวไม่เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินทำให้ต้นข้าวมีลักษณะสีเขียวเช่นเดียวกับต้น wild-type

สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pap1* ในต้นยาสูบด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR และ Real Time RT-PCR พบว่า ยาสูบต้นเขียว เขียวปนแดงและแดง มีการแสดงออกของยีน *pap1* ใกล้เคียงกัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real Time RT-PCR พบว่า ต้นแดงมีระดับการแสดงออกของยีน *pap1* มากที่สุด รองลงมาคือเขียวปนแดงและต้นเขียว ตามลำดับ ซึ่งต้นยาสูบสีเขียวไม่เกิดการสังเคราะห์แอนโทยานินเนื่องจากยีน *pap1* มีการแสดงออกน้อยหรือไม่แสดงออกในต้นเหล่านั้นทำให้ต้นยาสูบไม่มีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เนื่องจากไม่มี transcription factorไปกระตุ้นการถอดรหัสของยีนโครงสร้าง สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโครงสร้างที่พบว่าต้นยาสูบสีแดงมีการแสดงออกของยีนโครงสร้างมากกว่าต้นเขียวปนแดง ต้นเขียว และ wild-type แสดงว่ายีน *pap1* จากต้น *Arabidopsis* สามารถทำงานในต้นยาสูบได้โดยไปกระตุ้นยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินให้มีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นและส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในต้นยาสูบสีแดง

4. **การศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน *pap1* ไปสู่รุ่นลูก**

จากการวิเคราะห์การถ่ายทอดยีน *pap1* ไปสู่รุ่นลูกในข้าวรุ่น T_1 พบว่าการถ่ายทอดของยีนมีอัตราส่วน 3:1 จากต้นที่รอด : ไม่รอดเมื่อเพาะเมล็ดข้าวในน้ำที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน และคาดว่าการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเป็นไปตามกฎของเมนเดลเมื่อยีนแทรกในจีโนม 1 ชุด

สำหรับการวิเคราะห์ในยาสูบ พบว่าเมื่อเพาะเมล็ดยาสูบบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน พบว่าต้นที่รอด : ไม่รอด เป็นอัตราส่วน 3:1 ซึ่งเป็นไปตามอัตราส่วนคาดหมายตามกฎของเมน

เดลเมื่อยีนแทรกในจีโนม 1 ชุด แต่ในต้นสีแดงเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Southern blot ยีนมีการแทรกตัว 3 ชุด ซึ่งผลการเพาะเมล็ดบนอาหารที่มีไฮโกรมัยซินอาจเกิดความคลาดเคลื่อนเนื่องจากจำนวนเมล็ดที่ทดสอบมีน้อย

5. **การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินในต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม**

ต้นข้าวที่ได้รับจากการถ่ายยีนมีลักษณะต้นสีเขียวทั้งต้นเนื่องจากไม่มีการสร้างรงควัตถุแอนโทไซยานินจึงไม่สามารถสกัดและวัดปริมาณแอนโทไซยานินได้

ต้นยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีนมีลักษณะต้นสีเขียว สีเขียวปนแดง และแดง เมื่อนำมาสกัดแอนโทไซยานินและหาปริมาณแอนโทไซยานินต่อกรัมน้ำหนักสด พบว่า ต้นยาสูบสีแดงมีปริมาณแอนโทไซยานินมากที่สุด รองลงมา คือ ต้นสีเขียวปนแดง และสีเขียว ตามลำดับ ซึ่งต้นสีเขียวบางต้นมีการสร้างรงควัตถุแอนโทไซยานินเช่นกันแต่ในปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถสังเกตเห็นบนใบยาสูบ อีกทั้งต้นสีเขียวบางต้นก็ไม่เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน จากผลการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินในต้นยาสูบเหล่านี้สอดคล้องกับลักษณะฟีโนไทป์ที่ปรากฏ คือ ต้นแดงจะมีการสะสมหรือสังเคราะห์แอนโทไซยานินในปริมาณที่มากที่สุด

เอกสารอ้างอิง

สีนิลไรซ์. ม. ป. ป. **ข้าวสีนิล.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.sininrice.com/insight_sinin.html (25 มกราคม 2554)

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน). **ม. ป. ป. ประวัติความเป็นมาของข้าว.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://kasetinfo.arda.or.th/rice/rice-histories.html (7 มกราคม 2554).

ศูนย์วิจัยข้าวชุมแพ. ม. ป. ป. **"ข้าวเหนียวดำ" หลากประโยชน์ หลายแนวคิด เสริมเศรษฐกิจไทย สู่สากล.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.brrd.in.th/main/document/Pattaya52%20report/25.pdf (3 กุมภาพันธ์ 2554).

สุทธิพร ศิริพาณิช. 2549. **ประวัติยาสูบ.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://kanchanapisek.or.th/kp6/BOOK15/chapter3/t15-3-l1.htm. (23 ธันวาคม 2553)

ธรรมนูญ ฤทธิเมธี. 2550. **ประวัติยาสูบ.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www.ubon.ricethailand.org/document/warapong/gep.htm. (23 ธันวาคม 2553)

อุทิศ เกตุทัต. 2542. **สาราณุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ เล่มที่ 25 ประวัติยาสูบ.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://kanchanapisek.or.th/kp6/New/sub/book/book.php?book=15&chap=3&page=chap3.htm. (23 ธันวาคม 2553)

Borevitz J. O., Xia Y. Blount J., Dixon R. A. and Lamb C. 2000. Activation Tagging Identifies a Conserved MYB Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis. **The Plant Cell.** 12: 2383–2393.

Endo S., Sugita K., Sakai M., Tanaka H. and Ebinuma H. 2002. Single-step transformation for generating marker-free transgenic rice using the ipt-type MAT vector system. The Plant Journal. 30(1): 115 – 122.

Geekiyanage S., Takase T., Ogura Y. and Kiyosue T. 2007. Anthocyanin production by over-expression of grape transcription factor gene VlmybA2 in transgenic tobacco and Arabidopsis. **Plant Biotech Rep.** 1:11–18

Kim B. G., Kim J. H., Min S. Y., Shin K., Kim J. H., Kim H. Y., Ryu S. N. and Ahn J. 2007. Anthocyanin Content in Rice Is Related to Expression Levels of Anthocyanin Biosynthetic Genes. **Journal of Plant Biology.** 50(2) : 156-160

Shih C. H., H. Chu, L. K. Tang, W. Sakamoto, M. Maekawa, I. K. Chu, M. Wang and C. Lo. 2008. Functional characterization of key structural genes in rice favonoid biosynthesis. **Planta** 228: 1043–1054.

Toki S. 1997. Rapid and Efficient Agrobacterium-Mediated Transformation in Rice. **Plant Molecular Biology Reporter.**15 (1): 16 – 21.

Xie D., Sharma B. S., Wright E.,Wang Z. and Dixon A. R. 2006. Metabolic engineering of proanthocyanidins through co-expression of anthocyanidin reductae and the PAP1 MYB transcription factor. **Plant Journal.** Vol. 45, 895 - 907

Zhang W., Ning G., Lv H., Liao. And Bao M. 2009. Single MYB – type transcription factor AtCAPRICE: A new efficimt tool to engineer the production of anthocyanin in tobacco. **Biochemical and Biophysical Research.** 742 – 747

Zhou L., Zeng H., Shi M. and Xie D. 2008. Development of tobacco callus cultures over expressing Arabidopsis PAP1/MYB75 transcription factor and characterization of anthocyanin biosynthesis. Planta. 229: 37–51.

Zuluaga D. L., Gonzali S., Loreti G. S., Pucciariello C., Innocentic E. D., Guidic L., Alpi A. and Perata P. 2008. Arabidopsis thaliana MYB75/PAP1 transcription factor induces anthocyanin production in transgenic tomato plants. **Functional Plant Biology.** 35: 606 – 618.