รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การศึกษาผลของสภาวะเครียดที่มีต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวและยาสูบที่มีการแสดงออกของยีนสร้างแอนโทไซยานิน

Study on Effects of Stress on Anthocyanin Biosynthesis in Transgenic Rice and Tobacco Expressing a Gene for Production of Anthocyanin Pigment

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2555
จำนวน 250,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางสาวช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์
ผู้ร่วมโครงการ นายศรีเมฆ ชาวโพงพาง
นางสาวแสงทอง พงษ์เจริญกิต
นางสาววราภรณ์ แสงทอง

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์
27 ธันวาคม 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

นอกจากนี้ขอขอบคุณนางสาวพัชราภา หมื่นภิรมย์ นางสาวนิฤมล กาดีวงศ์ และนายวิษณุ แก้วการไร่ นักศึกษาปริญญาตรี สาขาพืชศาสตร์ (พืชผัก) คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ นางสาวพูนศรี อินต๊ะ และนางสาวรอยพิมพ์ สุขเกษม นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่มีส่วนสำคัญทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

คณะผู้วิจัย

ธันวาคม 2556

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	4
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
ตรวจเอกสาร	6
อุปกรณ์และวิธีการ	22
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	34
สรุปผลการวิจัย	61
เอกสารอ้างอิง	65

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ยีนที่ตรวจสอบการแสดงออกในต้นยาสูบ, Product size และ Annealing temperature ในการทำ PCR	31
ตารางที่ 2	ยีนที่ตรวจสอบการแสดงออกในข้าว, Product size และ Annealing temperature ในการทำ PCR	32
ตารางที่ 3	ปริมาณแอนโทไซยานินโดยเฉลี่ยในต้น WT และต้น TR เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนต่างๆ	38
ตารางที่ 4	ปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดจากต้น WT และ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่างๆ โดยการวัดค่าดูดกลืนแสง (A_{530} และ A_{657})	43
ตารางที่ 5	ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินที่สะสมในต้นยาสูบ WT และ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่าง ๆ	49

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ลักษณะของต้นและรวง ของข้าวเจ้าหอมนิล (ก.) และลักษณะเมล็ดข้าว (ข.)	8
ภาพที่ 2	กระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวลนอยด์	10
ภาพที่ 3	ลักษณะของต้นข้าวเหนียวดำ และเมล็ด	10
ภาพที่ 4	ตัวอย่างโครงสร้างและโมเลกุลของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)	12
ภาพที่ 5	รูปภาพทั่วไปของต้นยาสูบ	15
ภาพที่ 6	วิถีการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน	16
ภาพที่ 7	เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้น WT และต้น TR เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปกติ (MS-1) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์	34
ภาพที่ 8	การเจริญเติบโตของต้น WT และ ต้น TR เพาะเลี้ยงในขวดอาหารสภาวะเครียดที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนแตกต่างกัน (MS-1, MS-2, MS-3 และ MS-4) เป็นเวลา 3 สัปดาห์	35
ภาพที่ 9	ต้น WT และต้น TR ก่อนการสกัดอาร์เอ็นเอ และสกัดแอนโทไซยานิน เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS-1 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และย้ายต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยงในขวดอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นไนโตรเจนแตกต่างกัน (MS-1, MS-2, MS-3 และ MS-4) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (Scale bar = 1 เซนติเมตร)	36
ภาพที่ 10	ผลการสกัดแอนโทไซยานินจากต้น WT และต้น TR เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปกติ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และย้ายต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยงในขวดอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นไนโตรเจนแตกต่างกัน (MS-1, MS-2, MS-3 และ MS-4) เป็นเวลา 3 สัปดาห์	37
ภาพที่ 11	ปริมาณแอนโทไซยานินจากต้นยาสูบ TR เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และย้ายไปเพาะเลี้ยงในขวดอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นไนโตรเจนแตกต่างกัน (MS-1, MS-2, MS-3 และ MS-4) เป็นเวลา 3 สัปดาห์	39
ภาพที่ 12	ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pap1, CHS, CHI, F3H, F3′H, DFR และ ANS* โดยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR ของต้น WT และต้น TR เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปกติ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และย้ายต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยงในขวดอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นไนโตรเจนแตกต่างกัน (MS-1, MS-2, MS-3 และ MS-4)	40

หน้า

ภาพที่ 13	การเจริญเติบโตของต้น WT และ TR อายุ 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปกติ	41
ภาพที่ 14	ต้น WT และต้น TR เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่างๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์	42
ภาพที่ 15	ลักษณะสีของแอนโทไซยานินที่สกัดจากต้น WT และต้น TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่างๆ	43
ภาพที่ 16	ค่าเฉลี่ยของปริมาณแอนโทไซยานินของต้น WT และต้น TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ	44
ภาพที่ 17	ต้น WT และต้น TR ที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ อายุ 6 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS 4 สัปดาห์และย้ายเพาะเลี้ยงในขวด 2 สัปดาห์ ที่อาหารสูตร MS ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่างๆ	45
ภาพที่ 18	การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ในต้นยาสูบ WT และต้น TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่างๆ	46
ภาพที่ 19	ต้นยาสูบ WT และ TR อายุ 4 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปกติ	47
ภาพที่ 20	การแสดงออกของสีแดงในต้นและใบของต้นยาสูบ WT และ TR อายุ 4 สัปดาห์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS	47
ภาพที่ 21	การแสดงออกของสีแดงของต้นและใบของต้นยาสูบ WT และTR อายุ 6 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่าง ๆ ที่นำไปสกัดและวัดปริมาณแอนโทไซยานิน (bar เท่ากับ 1 cm)	48
ภาพที่ 22	ความเข้มของสีที่ได้จากสกัดแอนโทไซยานินจากต้นยาสูบ WT และ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่าง ๆ (การทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น)	49
ภาพที่ 23	ปริมาณแอนโทไซยานินที่สะสมของต้นยาสูบ WT และ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่างๆ	50
ภาพที่ 24	ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่าง ๆ โดยเทคนิค Semi – quantitative RT – PCR ของต้นยาสูบ WT และ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่าง ๆ คือ K-1 (0 mM), K-2 (0.625 mM) และ K-3 (1.25 mM)	51

หน้า

ภาพที่ 25	การเจริญเติบโตของต้น WT และต้น TR เพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์	52
ภาพที่ 26	การเจริญเติบโตของต้น WT และ ต้น TR เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงในขวดอาหารสภาวะเครียดที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนแตกต่างกัน (MS-1, MS-2, MS-3 และ MS	53
ภาพที่ 27	เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้น WT และ ต้น TR เพาะเลี้ยงในขวดอาหารสภาวะเครียดที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนแตกต่างกัน (MS-1, MS-2, MS-3 และ MS-4) เป็นเวลา 3 สัปดาห์	53
ภาพที่ 28	ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pap1, CHS, CHI, DFR* และ *ANS*โดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ของต้น WT และต้น TR เพาะเลี้ยงต้นอ่อนอายุ 2 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนแตกต่างกัน (MS-1, MS-2, MS-3 และ MS-4) เป็นเวลา 3 สัปดาห์	55
ภาพที่ 29	การเจริญเติบโตของต้น WT และ TR เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่างๆ	56
ภาพที่ 30	ต้น WT และต้น TR เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์	56
ภาพที่ 31	การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ในต้นข้าว WT และต้น TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่างๆ	57
ภาพที่ 32	การเจริญเติบโตของต้น WT และ TR เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่างๆ	58
ภาพที่ 33	ต้น WT และต้น TR เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์	59
ภาพที่ 34	ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่าง ๆ โดยเทคนิค semi – quantitative RT – PCR ของต้นข้าว WT และ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่าง ๆ คือ K-1(0 mM), K-2 (0.625 mM) และ K-3 (1.25 mM)	60

การศึกษาผลของสภาวะเครียดที่มีต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวและยาสูบที่มีการแสดงออกของยีนสร้างแอนโทไซยานิน

Study on Effects of Stress on Anthocyanin Biosynthesis in Transgenic Rice and Tobacco Expressing a Gene for Production of Anthocyanin Pigment

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

ยีน *pap1* (production of anthocyanin pigment) เป็นยีนสร้าง MYB transcription factor ที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในต้น *Arabidopsis* ในรายงานวิจัยก่อนหน้านี้คณะผู้วิจัยนี้ได้ทำการถ่ายยีน *pap1* เข้าสู่ยาสูบและข้าวและพบว่าทำให้ต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมสามารถสังเคราะห์แอนโทไซยานินและเกิดต้นสีแดง แต่ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมไม่เกิดสีแดง ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของสภาวะเครียดจากสารอาหารไนโตรเจน ซูโครสและฟอสฟอรัสที่มีต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในต้นยาสูบและข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน *pap1* โดยเพาะเลี้ยงต้นอ่อนของยาสูบและข้าวดัดแปลงพันธุกรรมบนอาหารที่มีระดับของสารอาหารไนโตรเจน ซูโครส และฟอสฟอรัสต่าง ๆ กัน สังเกตฟีโนไทป์ของต้นพืช วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pap1* และยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ได้แก่ ยีน *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3'H*, *DFR* และ *ANS* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่า ต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน หรือมีน้ำตาลซูโครสสูง หรือไม่มีฟอสฟอรัส พบว่า มีลักษณะใบสีแดงเข้มที่สุด มี

ปริมาณแอนโทไซยานินมากที่สุด และมีการแสดงออกของยีนโครงสร้าง คือ ยีน *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR* และ *ANS* เพิ่มขึ้นมาก ดังนั้น ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้แสดงว่า สภาวะเครียดจากการขาดไนโตรเจน การเพิ่มขึ้นของน้ำตาลซูโครส และการขาดฟอสฟอรัส มีผลต่อการชักนำให้มีการแสดงออกของยีนโครงสร้างซึ่งควบคุมโดยยีน *pap1* ในต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม ทำให้ส่งเสริมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในต้นยาสูบได้

ส่วนการทดลองในข้าวดัดแปลงพันธุกรรม พบว่า ในสภาวะเครียดที่ไม่มีไนโตรเจน หรือมีน้ำตาลซูโครสมากขึ้น หรือไม่มีฟอสฟอรัส ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมไม่เกิดสีแดง และพบว่ารูปแบบการแสดงออกของยีนโครงสร้างต่าง ๆ ไม่แตกต่างจากต้น wild-type ซึ่งคาดว่ายีน *pap1* จากต้น *Arabidopsis* ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ไม่สามารถไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้ ถึงแม้ว่าจะอยู่ในสภาวะเครียดจากสารอาหารก็ตาม ส่งผลให้ต้นข้าวไม่เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

คำสำคัญ: ข้าว, ยาสูบ, ยีน *pap1*, แอนโทไซยานิน, ไนโตรเจน, ซูโครส, ฟอสฟอรัส

Abstract

The *pap1* gene encodes MYB transcription factor which controls anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* plants. In the previous report, we transformed *pap1* gene into tobacco and rice. It was previously found that transgenic tobacco plants accumulated anthocyanin pigments in all tissues; however, transgenic rice plants did not show anthocyanin pigmentation. In this study, effects of stress conditions due to the amounts of nitrogen, sucrose and phosphorus on induction of anthocyanin biosynthesis in transgenic tobacco and rice plants expressing *pap1* gene were investigated. The *pap1* tobacco and rice seedlings were cultured on different growth conditions with various contents of nitrogen, sucrose and phosphorus on MS media. The phenotypes of these plants were observed. The determination of anthocyanin contents by absorbance measurements and semi-quantitative RT-PCR analysis of expression of *pap1* gene and structural genes involved in anthocyanin biosynthesis including, *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3'H*, *DFR* and *ANS* were studied. The results showed that the *pap1* tobacco plants grown on the medium without nitrogen

or with high sucrose or without phosphorus contents produced the highest contents of anthocaynin which were consistent with the dark red leaves of these plants compared with invisible anthocyanin pigmentation in wild-type plants. The transcript levels of structural genes, *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR* and *ANS*, in those tobacco plants were also increased. The results suggested that stress conditions due to nitrogen deficiency, increase in sucrose content and phosphorus deficiency resulted in induction of expression of the structural genes, probably mediated by *pap1* gene in transgenic plants, and also increased anthocyanin pigmentations in transgenic tobacco plants.

For *pap1* rice plants, the results showed that transgenic rice plants did not accumulate anthocyanin pigments under the stress conditions due to nitrogen deficiency, high sucrose content, or phosphorus deficiency. Transgenic rice plants showed expression patterns of structural genes at similar levels compared to those of wild-type plants. 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. These subsequently resulted in no anthocyanin biosynthesis in transgenic rice plants even though the plants were grown on the medium under stress conditions,

Keywords: rice, tobacco, *pap1* gene, anthocyanin, nitrogen, sucrose, phosphorus

คำนำ

แอนโทไซยานิน คือ รงควัตถุที่สังเคราะห์โดย secondary metabolic pathway จากกรดอะมิโน phenylalanine ทำให้เกิดสีต่างๆในพืช คือกลุ่มสีน้ำเงิน สีม่วง และสีแดง แอนโทไซยานินมีบทบาทสำคัญต่อพืช เช่น ช่วยชักนำให้แมลงเข้ามาผสมเกสร, ช่วยปกป้องพืชจากรังสี UV และช่วยในการเคลื่อนย้ายฮอร์โมนพืช ในด้านสุขภาพแอนโทไซยานินถือว่าเป็นสารต้านทานอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง มีส่วนช่วยป้องกันและยับยั้งโรคต่างๆ เช่น โรคเกี่ยวกับการทำงานของหัวใจ การมองเห็น ระบบประสาทและสมอง ปกป้องผิวหนังจากรังสีบางชนิด ต้านทานการอักเสบ และที่สำคัญคือช่วยยับยั้งการเกิดมะเร็งชนิดต่างๆได้

ยีน *pap1* (production of anthocyanin pigment 1) จากต้น *Arabidopsis* มีรหัสสร้างโปรตีน MYB transcription factor ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และยังมีผลทำให้ส่งเสริมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการของการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน มียีนที่เกี่ยวข้องหลายยีน เช่น *CHS, CHI, F3H, DFR และ ANS* สภาวะเครียดเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เช่น การขาดไนโตรเจน การขาดฟอสฟอรัส และการได้รับน้ำตาลมากขึ้น ส่งผลให้เกิดสภาวะเครียด ทำให้ยีน *pap1* มีการแสดงออกที่มาก ส่งเสริมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินให้เพิ่มขึ้น

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของสภาวะเครียดจากการขาดสารอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัส และผลของการเพิ่มน้ำตาลซูโครสที่มีต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในต้นยาสูบและต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน *pap1*

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของไนโตรเจน น้ำตาลซูโครส และฟอสฟอรัสที่มีต่อการแสดงออกของยีน *pap1* ในต้นยาสูบและต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม รวมทั้งศึกษาการแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และปริมาณแอนโทไซยานินในต้นยาสูบและต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่เจริญในสภาวะเครียดจากสารอาหารดังกล่าว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ทราบปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการควบคุมและทำให้มีการเพิ่มการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในยาสูบและข้าว เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชได้

การตรวจเอกสาร

ข้าว

ข้าวเป็นพืชอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก โดยเฉพาะประเทศในภูมิภาคเอเชียที่นิยมรับประทานข้าวเป็นอาหารประจำวันมากกว่าในภูมิภาคอื่นๆของโลก การผลิต บริโภคและการค้าข้าวส่วนใหญ่จึงกระจุกตัวอยู่ในทวีปเอเชีย แต่ข้าวที่ผลิตได้ส่วนใหญ่จะใช้ในการบริโภคภายในประเทศ ทำให้มีข้าวเพียงร้อยละ 6 เท่านั้นที่เข้าสู่ตลาดการค้าข้าวระหว่างประเทศ โดยประเทศที่มีบทบาทมากที่สุดในการส่งออกข้าว คือประเทศไทย รองลงมาคือ อินเดีย เวียดนาม จีน และพม่า 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 เพราะฉะนั้น ลักษณะที่สำคัญเกี่ยวกับการ 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) และส่วนที่เป็นคัพภะ ซึ่งห่อหุ้มไว้โดยเปลือกนอกใหญ่สองแผ่น เอ็นโดสเปิร์มเป็นแป้งที่เราบริโภค 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 เมล็ดข้าวสุกจะเกาะกัน ต่างจากข้าวอินดิกาที่ปริมาณอะไมโลสสูง เมื่อหุงเสร็จข้อนข้างร่วน ข้าวญี่ปุ่นใช้เวลา

เพาะปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวเพียง 3 เดือน เป็นข้าวที่ไม่ต้องการใช้น้ำมากจึงเหมาะสำหรับที่เพาะปลูกที่ขาดแคลนน้ำและอายุเพาะปลูกสั้น

ข้าวที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสี

ข้าวเจ้าหอมนิล (บริษัท สีนิลไรซ์ จำกัด : ระบบออนไลน์)

เป็นข้าวที่กลายพันธุ์จากข้าวเหนียวดำต้นเตี้ยของจีน โดยมีความสูงประมาณ 60-75 เซนติเมตร อายุวันเก็บเกี่ยว 95-105 วัน แตกกอดี ลำต้นและใบสีเขียวปนม่วง เมล็ดยาวมีสีม่วงเข้ม (ภาพที่ 1) กลิ่นหอม ผลผลิตประมาณ 400-700 กิโลกรัมต่อไร่ จากการศึกษาเอกลักษณ์พันธุกรรมโดยใช้ 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

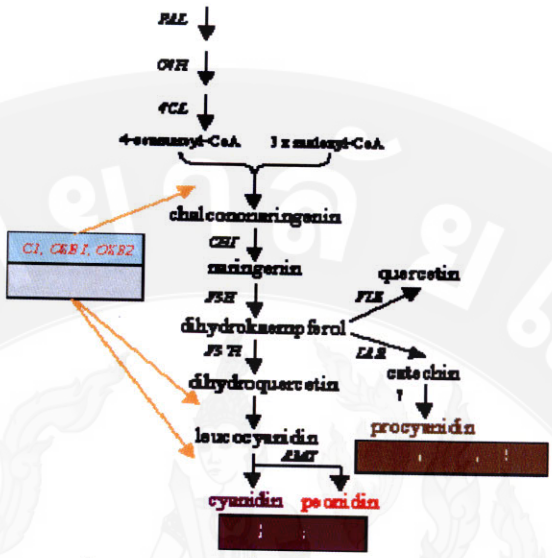
สารแอนโทไซยานิน มีรายงานวิจัยพบว่า สามารถช่วยลดการอักเสบของเนื้อเยื่อ ช่วยลดไขมันอุดตันในเส้นเลือดที่หัวใจ และสมอง บรรเทาโรคเบาหวาน ช่วยบำรุงสายตาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการมองเห็นเวลามองตอนกลางคืน สาร cyanidin มีประสิทธิภาพในการ antioxidation ได้ดีกว่าวิตามินอี หลายเท่า และยังยับยั้งการเจริญเติบโตของ epidermal 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

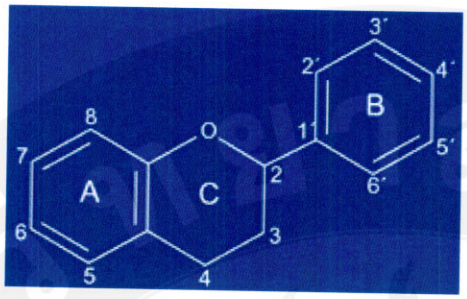
โดยทั่วไปข้าวเหนียวดำที่เกษตรกรปลูกเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมือง ที่มีการปลูกเฉพาะพื้นที่มาเป็นเวลานานแล้ว และเกษตรกรจะเก็บเมล็ดพันธุ์ไว้สำหรับปลูกในฤดูปลูกต่อไปเอง พันธุ์ข้าวเหนียวดำที่เกษตรกรใช้ปลูกเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตต่อพื้นที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับข้าวพันธุ์อื่นๆ นอกจากนี้ยังรวมถึงคุณภาพการหุงต้มของข้าวเหนียวดำยังไม่ดีพอ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

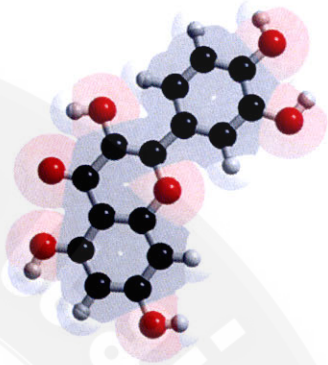
ข้าวเหนียวดำมีสารประกอบที่มีประโยชน์ต่อร่างกายที่สูงกว่าข้าวขาวกล่าวคือ มีสารแกมมา-โอไรซานอล (gamma oryzanol) ซึ่งเป็นสารประกอบที่พบในรำข้าวเหนียวดำปริมาณสูงถึง 2.70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับรำข้าวขาวซึ่งมีประมาณ 1.12 เปอร์เซ็นต์ (Teltathum, 2004) ตามภูมิปัญญาท้องถิ่นเชื่อกันว่าข้าวเหนียวดำเป็นสมุนไพร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

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

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

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





ภาพที่ 4 ตัวอย่างโครงสร้างและโมเลกุลของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)
ที่มา: นิตินุช 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 รวมทั้งการส่งผ่านสารอาหารให้กับเซลล์ประสาทอีกด้วยโดยปกติธรรมชาติอาจพบอนุพันธุ์ ฟลาโวนอยด์ในรูปของโพแอนโทไซยานิดิน (Proanthocyanidin) ในบิลเบอร์รี่ ซึ่งจะช่วยป้องกันการทำลายหลอดเลือดในดวงตา รวมทั้งยังช่วยส่งเสริมระบบไหลเวียนโลหิตอีกด้วยขณะที่ในชาเขียวจะพบสารฟลาโวนอยด์ที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการทำลายเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันแอลดีแอล

การต้านอนุมูลอิสระ

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

แอนโทไซยานิน

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

แอนโทไซยานินมีหน้าที่ปกป้องผักและผลไม้จากการทำลายของรังสีอัลตราไวโอเลต มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การวิจัยพบว่าสารกลุ่มแอนโทไซยานินมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของไขมันแอลดีแอล (LDL) และยังทำให้เซลล์บุผนังหลอดเลือดมีความอ่อนนิ่ม การกินผักและผลไม้ที่มีสีน้ำเงิน

และสีม่วงจึงสามารถชะลอการเกิดโรคไขมันอุดตัน ในหลอดเลือดและโรคหลอดเลือดหัวใจแข็งตัวได้ ในประเทศไทยมีการใช้น้ำดอกอัญชันช่วยปลูกผมปลูกคิ้ว เชื่อว่าน้ำคั้นจากดอกอัญชันทำให้ผมดกดำได้สารแอนโทไซยานินในดอกอัญชันเพิ่มความสามารถในการมองเห็นหรือชะลอความเสื่อมของดวงตา เนื่องจากสารดังกล่าวเพิ่มความสามารถในการไหลเวียนเลือดในหลอดเลือดเล็กๆ ส่วนปลาย ทำให้มีเลือดมาเลี้ยงรากผมและดวงตาได้ดีขึ้นนั่นเอง ดอกอัญชันสามารถกินสดแก้ลมน้ำพริกหรือต้มน้ำดื่มก็ได้

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

ยาสูบ

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

ชื่อสามัญ : Tobacco

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Nicotiana tabacum* L.

วงศ์ : Solanaceae เช่นเดียวกับมะเขือเทศ พริก มันฝรั่ง ผักต่างๆ ฯลฯ

สกุล : Nicotiana

ชื่ออื่นๆ : จะวั้ว (เขมร – สุรินทร์)

ชนิด : ยาสูบที่ปลูกกันทั่วไปมีมากกว่า 60 สายพันธุ์ 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 หมู่เกาะอินเดียตะวันตก 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)

ยีน *pap1*

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน แบ่งออกเป็น

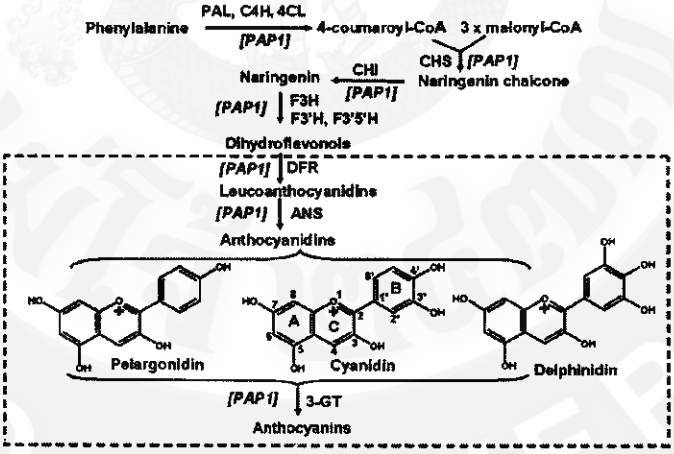
1. ยีนควบคุม คือยีนที่สร้าง Transcription factor ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

2. ยีนโครงสร้าง คือยีนที่สร้างเอนไซม์ใน pathway ของการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Lim *et al.* , 2012)

ยีน *pap1* (*production of anthocyanin pigment*) 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)

วิถีการสังเคราะห์สารแอนโทยานิน

ยีน *pap1* เป็นยีนควบคุมในการเปิดการทำงานของยีนสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ ในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 วิถีการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน
ที่มา Sullivan, 1998: ระบบออนไลน์

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

Zuluaga *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาการแสดงของยีน *MYB75/pap1* (*production of anthocyanin pigment*) ที่มีผลการสร้างแอนโทไซยานินในต้นมะเขือเทศที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม โดยได้ทำการตัดต่อยีนจาก *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. แล้วส่งถ่ายเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ GV3101 จากนั้นก็ทำการส่งถ่ายเข้าสู่เมล็ดมะเขือเทศ พบว่ามีการแสดงออกของ *AtMYB75* โดยเพิ่มการสร้างแอนโทไซยานินทั้งในใบ 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 เพื่อดูการแสดออกของยีน *pap1* เพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นระยะเวลา 25 วัน จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่ามี cyanidin, pelargonidin และ peonidin ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ anthocyanidins และในการทดลองครั้งนี้ยังได้ศึกษาผลของ ความมืด แหล่งไนโตรเจน และออกซิน ต่อการสร้างแอนโทไซยานินในแคลลัสด้วย และยังนำไปสู่การศึกษาความเหมาะสมในการทำงานของ *pap1* ต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยายนินในระดับ posttranscriptional ในเซลล์

Kim *et. al.* (2007) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และอุณหภูมิที่มีผลต่อการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ในข้าว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ Ilpum และพันธุ์ Heugjinju ซึ่งเขาพบว่า ในพันธุ์ Ilpum ไม่มีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน 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) ได้ทำการศึกษาการติดแท็กเพื่อระบุตัวควบคุม MYB ของการสังเคราะห์ Phenylpropanoid โดยได้ทำการใช้การติดแท็กโดยแท็กที่ใช้ได้จากการตัดต่อยีนอะโกรแบคทีเรียมเข้ากับ T – DNA ที่ประกอบ cauliflower mosaic virus 35S ซึ่งเมื่อติดแท็กนี้เข้ากับ *Arabidopsis* เขาก็ได้พบว่ามีการแสดงออกของสีม่วงที่มีความเข้มข้นสูงมากในส่วนต่างๆของต้นนั้น ผลจากการควบคุมให้มีการแสดงออกมากนี้เองทำให้เกิดลักษณะโดดเด่น จึงทำให้เกิดการเปิดใช้งานยีนในการสังเคราะห์ phenylpropanoid การเพิ่มการสะสมของลิกนิน, hydroxycinnamic acid esters และฟลาโวนอยด์ รวมถึงแอนโทไซยานินต่าง ๆ ที่สร้างสีม่วงด้วย ซึ่งเขากล่าวว่า ลักษณะที่เกิดขึ้นเหล่านี้เกิดจากการแทรกตัวของโปรโมเตอร์ในตำแหน่งยีนที่ใกล้กับ MYB transcription แสดงว่า การกระตุ้นโดยการติดแท็กสามารถควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการสะสมสารต่าง ๆ ในระหว่างการพัฒนาของพืช

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* ใช้ในการแยกต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าไปได้ซึ่งเป็นการแก้ไขข้อกังวลที่เกี่ยวกับการสารยีนต้านสารปราบวัชพืชและยีนต้านสารปฏิชีวนะได้ 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 transcription 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

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับผลของสภาวะเครียดจากสารอาหารที่มีต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

ผลของไนโตรเจนที่มีต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

ไนโตรเจนมีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของต้นยาสูบและมีอิทธิพลต่อคุณภาพของยาสูบมาก (Akehurust *et al*., 1981) โดยเป็นองค์ประกอบของโซโตพลาสซึม คลอโรฟิลล์ นิโคติน และสารที่สำคัญต่างๆ เช่น สารประกอบจำพวกโปรตีน เป็นต้น สำหรับการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในระดับที่สูง สามารถเพิ่มผลผลิตน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งได้ แต่จะทำให้คุณภาพของใยยาแห้งลดลง ใบยาสูบปกติจะมีธาตุไนโตรเจนอยู่ 2-5 เปอร์เซ็นต์ และในลำต้นมีไนโตรเจน 2.5-4.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เมื่อให้ธาตุไนโตรเจนแก่ต้นยาสูบน้อยองค์ประกอบของธาตุนี้ก็ลดต่ำลงด้วย และเมื่อลดลงถึง 1.5-2.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ต้นยาสูบจะแสดงอาการขาดธาตุไนโตรเจน

Lea *et al*. (2007) จากการศึกษาสภาวะการขาดไนโตรเจนที่มีผลต่อการแสดงของยีน *pap1D, pap2* และ *GL3* ซึ่งเป็นยีน transcription factors เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ ซึ่ง MYB และ bHLH จะเป็นตัวควบคุมในการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ ถูกชักนำในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนของต้น *Arabidopsis* ซึ่งการตอบสนองต่อการขาดไนโตรเจน ทำให้เกิดการสะสมของฟลาโวนอยด์ ที่เพิ่มขึ้น

Shi and Xie (2010) ได้การศึกษาการสังเคราะห์แอนโทไซยานินต้น *Arabidopsis* ในต้น wild- type (WT) และต้นกลายพันธุ์ *pap1-D* โดยให้พืชเจริญเติบโตในสภาพเงื่อนไขที่เพาะเลี้ยงของแสงและระดับไนโตรเจนแตกต่างกัน พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงต้น *Arabidopsis* บนอาหาร MS ที่มี 0 NH_4NO_3 และ 1/2 KNO_3 ซึ่งมีไนโตรเจนน้อยกว่าอาหารปกติ และสภาวะแสงที่เพาะเลี้ยง 500 µmol $m^{-2}s$-1 พบว่าต้น *Arabidopsis* ทั้ง WT และ *pap1-D* มีลักษณะต้นแดงมากกว่าต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาวะอื่นที่มีไนโตรเจนมากกว่าและความเข้มแสงน้อย ดังนั้นความเข้มแสงในสภาวะเพาะเลี้ยงและการขาดไนโตรเจนมีผลต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในต้น *Arabidopsis* ทั้ง WT และ *pap1-D* ซึ่งทำให้ต้นมีลักษณะแดง โดยเฉพาะต้น *pap1-D* มีลักษณะสีแดงกว่าต้น WT รวมทั้ง

ระดับการแสดงออกของยีน *pap1, PAL1, CHS, DFR และ ANS* ที่มีการแสดงออกอย่างมากในต้น *pap1-D* ซึ่งมากกว่าต้น WT

ผลของน้ำตาลซูโครสที่มีต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

Kwon *et al.* (2011) ได้ศึกษา sucrose boxes ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน *CHS* ในต้น *Arabidopsis* และน้ำตาลซูโครสจะเป็นตัวชักนำให้เกิดการสะสม flavonoid ที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่างๆโดยความเข้มข้นของซูโครสปานกลางจะมีการสะสมของระดับแอนโทไซยานินสูงขึ้นในการชักนำการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

Tang *et al* .(2005) ศึกษาการชักนำการสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยน้ำตาลซูโครสที่เป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีน *pap1*/MYB75 ทำให้เกิดการชักนำการสะสมแอนโทไซยานินในต้น *Arabidopsis* ในระดับความเข้มข้นต่างๆ น้ำตาลซูโครสเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแอนโทไซยานิน ในพืช *Arabidopsis* เมื่อน้ำตาลซูโครสสูงอาจก่อให้เกิดความเครียดและทำให้พืชมีการสะสมแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นและความเข้มข้นของซูโครสต่ำมากก็กระตุ้นให้เกิดการสะสมแอนโทไซยานินเช่นเดียวกัน

Cinzia *et al.* (2006) ได้ศึกษาน้ำตาลซูโครสเหนี่ยวนำการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในต้น *Arabidopsis* โดยน้ำตาลซูโครสชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนที่มีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และส่งเสริมการแสดงออกของยีน ทำให้มีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินสูงขึ้น

ผลของฟอสฟอรัสที่มีต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

Yin *et al.* (2012) ทำการศึกษาการขาดฟอสฟอรัสของการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการเพาะเลี้ยงเซลล์องุ่น เมื่อเซลล์องุ่นที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ขาดฟอสฟอรัสจะมีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเพิ่มมากขึ้น และมียีน *VvmybA1, UFGT* และ *CHS* แสดงออกมาก

Xie *et al.* (2006) ได้ศึกษาการถ่ายยีน *pap1* รวมกับยีน *ANR* เข้าไปในต้นยาสูบ พบว่ายีน *pap1* และยีน *ANR* สามารถส่งเสริมในต้นยาสูบมีสีแดงทั้งต้นแต่มีสีแดงน้อยน้อยกว่าต้นที่มีแต่ยีน *pap1* เพียงอย่างเดียว เพราะยีน *ANR* จะไปทำให้ต้นยาสูบมีการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิน ที่ไม่มีสี จึงทำให้มีสีที่แดงน้อยกว่า ต้นยาสูบที่มีแต่ยีน *pap1* เพียงอย่างเดียว ซึ่งยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน *pap1* การสังเคราะห์แอนโทไซยานิน Cynanidin มากที่สุด ส่วนการถ่ายยีนนั้นยีน

pap1 จากต้น *Arabidopsis* สามารถส่งเสริมให้ต้นยาสูบสังเคราะห์แอนโทไซยานินได้ ทำให้มีสารสีม่วง แดง

Tang *et al.* (2005) ศึกษาน้ำตาลซูโครสที่มีผลชักนำให้เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในต้น *Arabidopsis* โดยน้ำตาลซูโครสจะไปกระตุ้นยีน *pap1/MYB75* ให้แสดงออก น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่ำก่อให้เกิดสภาวะเครียดจะเป็นตัวกระตุ้นในยีน *pap1/MYB75* แสดงออกมาก และส่งผลให้มีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

พันธุ์ยาสูบที่ใช้ในการทดลอง

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

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง

ข้าวพันธุ์ Kitaake จัดอยู่ในสายพันธุ์ japonica ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Thomas W. Okita (Washington State University, USA)

พลาสมิด

พลาสมิด *pap1* คือ พลาสมิด pCAMBIA1390 ที่มียีน *hpt* เป็นเครื่องหมายต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและยีนที่สนใจคือยีน *pap*1 ย่อมาจาก *production of anthocyanin pigment 1* เป็นยีนที่สร้าง MYB Transcription factor ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินได้จากต้น *Arabidopsis thaliana*

สารเคมี

1. 10% Sodium hypochlorite (UNION Science, Thailand)
2. SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen , USA)
3. สารละลายสำหรับการละลายอาร์เอ็นเอ DEPC Treated water
4. Absolute ethanol (Merck, Germany)
5. Agarose (Invitrogen, USA)
6. Chloroform (LAB-SCAN, Thailand)
7. Trizol Rragent (Invitrogen, USA)
8. HCl (Merck, Germany)
9. Methanol (Merck, Germany)
10. liquid nitrogen
11. Supperscrip® III cDNA First – strand (Invitrogen, USA)
12. Red Dye Master Mix (Merck, Germany)
13. Propanol (Merck, Germany)

ดีเอ็นเอมาตรฐาน

1. GeneRuler™ 1 kb ladder Plus (Fermentas, USA)
2. λ/ *EcoR*I+ *Hind*III (Fermentas, USA)

เอนไซม์

DNase I (Biolad NEB, England)

สารปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดลอง

ไฮโกรมัยซิน (Hygromycin) (Caisson, USA)

วิธีทดลอง

แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. การทดลองเพาะเลี้ยงยาสูบ
2. การทดลองเพาะเลี้ยงต้นข้าว
3. การวัดปริมาณแอนโทไซยานิน
4. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

1. การทดลองเพาะเลี้ยงยาสูบ

อาหารที่ใช้ในการทดลอง

1. อาหารสำหรับเพาะเมล็ดยาสูบ อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ประกอบด้วยน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 7 กรัมต่อลิตร

2. อาหารที่ใช้ในการทดลอง คือ อาหารสูตร MS ที่มีสภาวะความเครียดที่แตกต่างกัน ที่ดัดแปลงมาจากสูตรอาหาร MS เพื่อใช้ในการทดลอง ดังนี้

สภาวะความเข้มข้นของไนโตรเจนโดยให้

MS-1 : NH_4NO_3 1:$KNO_3$1

MS-2 : $NH_4NO_3$1/2 : $KNO_3$1/2

MS-3 : $NH_4NO_3$0:$KNO_3$1/2

MS-4 : $NH_4NO_3$0:$KNO_3$0

สภาวะความเข้มข้นของซูโครสโดยให้

S-1 : Sucrose 0 mM

S-2 : Sucrose 50 mM

S-3 : Sucrose 100 mM

S-4 : Sucrose 200 mM

สภาวะความเข้มข้นของฟอสฟอรัสโดยให้

K-1 : KH_2PO_4 0 mM

K-2 : KH_2PO_4 0.625 mM

K-3 : KH_2PO_4 1.25 mM

หมายเหตุ สูตรอาหารสำหรับเพาะเมล็ดยาสูบ Transgenic (TR) ให้เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (Hygromycin) ในอาหารปริมาตร 600 ไมโครลิตรต่อลิตร (ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพื่อคัดเลือกต้นยาสูบที่มียีน *pap 1* สำหรับอาหารที่ใช้เพาะเมล็ดยาสูบที่เป็น Wild type (WT) ไม่ต้องเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (Hygromycin)

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงยาสูบบนสภาวะเครียดที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนแตกต่างกัน โดยนำต้นอ่อนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงบนเพลทอาหารสูตร MS ย้ายต้นอ่อนไปมาเพาะเลี้ยงในขวดอาหารที่มีที่มีความเข้มข้นไนโตรเจนต่าง ๆ ดังนี้

MS-1 : 1 NH_4NO_3: 1 KNO_3

MS-2 : 1/2 NH_4NO_3: 1/2 KNO_3

MS-3: 0 NH_4NO_3: 1/2 KNO_3

MS-4: 0 NH_4NO_3: 0 KNO_3

การทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงยาสูบบนสภาวะเครียดที่มีความเข้มข้นของซูโครสแตกต่างกัน โดยนำต้นอ่อนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ที่เพาะเลี้ยงบนเพลทอาหารสูตร MS ย้ายต้นอ่อนไปมาเพาะเลี้ยงในขวดอาหารที่มีที่มีความเข้มข้นซูโครสต่าง ๆ ดังนี้

S-1 : 0 mM Sucrose

S-2 : 50 mM Sucrose

S-3 : 100 mM Sucrose

S-4 : 200 mM Sucrose

การทดลองที่ 3 การเพาะเลี้ยงยาสูบบนสภาวะเครียดที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสแตกต่างกัน โดยนำต้นอ่อนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ที่เพาะเลี้ยงบนเพลทอาหารสูตร MS ย้ายต้นอ่อนไปมาเพาะเลี้ยงในขวดอาหารที่มีที่มีความเข้มข้นฟอสฟอรัสต่าง ๆ ดังนี้

K-1 : 0 mM KH_2PO_4

K-2 : 0.625 mM KH_2PO_4

K-3 : 1.25 mM KH_2PO_4

การทดลองทั้ง 3 การทดลองนี้ได้นำต้นยาสูบ WT และต้นยาสูบ TR มาทำการทดลอง โดยต้นยาสูบ WT ใช้เป็นต้นควบคุม และต้นยาสูบ TR เป็นต้นที่ทำการศึกษาการสร้างแอนโทไซยานิน

วิธีทดลอง

การเพาะเลี้ยงยาสูบบนสภาวะเครียดที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจน ซูโครสและฟอสฟอรัสที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยนำต้นอ่อนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ที่เพาะเลี้ยงบนเพลทอาหารสูตร MS ย้ายต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยงในขวดอาหารที่มีขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานทดลอง ดังต่อไปนี้

การเพาะเมล็ดยาสูบเพื่อเตรียมสำหรับการทดลอง

1. แกะเมล็ดยาสูบ WT และ TR ออกแล้วนำมาห่อด้วยผ้าขาวบาง
2. ฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 35 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นเทแอลกอฮอล์ทิ้ง
3. หลังจากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 35 มิลลิลิตร เขย่าโดยใช้เครื่องเขย่า ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เมื่อครบ 15 นาที ให้เทโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ทิ้ง แล้วเติมโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ นำไปเขย่าอีกครั้ง (ทำ 2 รอบ)

4. หลังจากครั้งที่ 2 ให้เทโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ทิ้ง (โดยขั้นตอนนี้ต้องทำในตู้ปลอดเชื้อ) แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 5 ครั้ง
5. นำเมล็ดยาสูบวางบนอาหาร MS ปกติ โดยวาง 30 เมล็ดต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 สัปดาห์
6. เมื่อต้นยาสูบอายุ 4 สัปดาห์ ทำการย้ายลงอาหารในสภาวะเครียดของสารอาหารไนโตรเจน น้ำตาลซูโครส และฟอสฟอรัส (ขวด 12 ออนซ์) หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์
7. หลังจากย้ายต้นยาสูบครบ 2 สัปดาห์ รวมเป็น 6 สัปดาห์ ทำการวัดแอนโทไซยานินและสกัด RNA เพื่อตรวจสอบการแสดงออกยีนต่างๆ ได้แก่ *actin, pap1, CHS, CHI, F3H, F3'H, DFR และ ANS*

2 การทดลองเพาะเลี้ยงต้นข้าว

การเตรียมอาหารสูตร MS สำหรับเพาะเลี้ยงต้นข้าว

1. อาหารที่ใช้เป็นอาหารสูตร MS ชักนำให้เมล็ดข้าวเกิด ยอด ราก และต้น

2. ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวดัดแปลงพันธุกรรม (TR) บนอาหารสูตร MS ที่เติมไฮโกรมัยซินโดยเติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงในอาหาร 500 มิลลิลิตร (ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของไฮโกรมัยซินเท่ากับ 30 มิลลิกรัม/ลิตร) ในการทำการทดลองได้แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงข้าวในสภาวะเครียดที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนแตกต่างกัน โดยทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารสูตร MS เป็นเวลาครบ 2 สัปดาห์ และย้ายต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในขวดอาหารที่มีที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนต่าง ๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ซึ่งมีระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน ดังนี้

MS-1 : 1 NH_4NO_3: 1 KNO_3

MS-2 : 1/2 NH_4NO_3: 1/2 KNO_3

MS-3: 0 NH_4NO_3: 1/2 KNO_3

MS-4: 0 NH_4NO_3: 0 KNO_3

การทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงข้าวในสภาวะเครียดที่มีความเข้มข้นของซูโครสแตกต่างกัน โดยทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารสูตร MS เป็นเวลาครบ 2 สัปดาห์ และย้ายต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในขวดอาหารที่มีความเข้มข้นของซูโครสต่าง ๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ซึ่งระดับความเข้มข้นของซูโครสมีดังนี้

S-1 : 0 mM Sucrose

S-2 : 50 mM Sucrose

S-3 : 100 mM Sucrose

S-4 : 200 mM Sucrose

การทดลองที่ 3 การเพาะเลี้ยงข้าวในสภาวะเครียดที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสแตกต่างกัน โดยทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารสูตร MS เป็นเวลาครบ 2 สัปดาห์ และย้ายต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในขวดอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสต่าง ๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ซึ่งระดับความเข้มข้นของฟอสฟอรัสที่ทำการทดลองมีดังนี้

K-1 : 0 mM KH_2PO_4

K-2 : 0.625 mM KH_2PO_4

K-3 : 1.25 mM KH_2PO_4

โดยทั้ง 3 การทดลองนั้น เพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวWild-type (WT) บนอาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน และเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวดัดแปลงพันธุกรรม (TR) บนอาหารสูตร MS ที่เติมไฮโกรมัยซินเพื่อทำการคัดเลือกต้นที่มียีน *pap1* และในขวดอาหารสูตร MS เพาะเลี้ยงต้นข้าวไม่มีการเติมไฮโกรมัยซิน เพราะไฮโกรมัยซิน มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าว ทำให้ต้นข้าว TR ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีไฮโกรมัยซินเล็กกว่าต้นข้าว WT ที่เพาะเลี้ยงในขวดอาหารสูตร MS จึงไม่เติมไฮโกรมัยซิน

การเพาะเลี้ยงต้นข้าว

การชักนำเมล็ดข้าว

1. แกะเมล็ดข้าว WT และ TR
2. ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70เปอร์เซ็นต์ในปริมาตร 35 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ 15 วินาที เสร็จแล้วเทแอลกอฮอล์ทิ้ง
3. หลังจากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ในปริมาณ 35 มิลลิลิตร เขย่าโดยใช้เครื่องเขย่า ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบ 15 นาที ให้เท

โซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ทิ้งแล้วเติมโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ นำไปเขย่าอีก (ทำ 2 รอบ)

4. หลังจากเขย่าครั้งที่ 2 เสร็จ ให้เทโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ทิ้ง (โดยขั้นตอนนี้ต้องทำในตู้ปลอดเชื้อ) แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 5 ครั้ง
5. นำเมล็ดข้าววางบนอาหารสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน โดยวาง 15 เมล็ดต่อ 1 จานเพาะ
6. นำไปวางในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซสเซียส ใช้แสง 16 ชั่วโมง/ วัน

การย้ายต้นข้าว

ทำการย้ายต้นอ่อนข้าวที่เพาะเลี้ยงบนเพลทอาหาร MS มาเพาะเลี้ยงในขวดอาหารสูตร MS (ขั้นตอนนี้ทำในตู้ปลอดเชื้อ เพื่อป้องกันต้นข้าวปนเปื้อนเชื้อต่างๆ) เมื่อเพาะเลี้ยงข้าวบนเพลทอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการย้ายต้นอ่อนไปข้าวเพาะเลี้ยงในขวดอาหารสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน ซูโครสหรือฟอสฟอรัส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ นำไปวางในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิอุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซสเซียส ใช้แสง 16 ชั่วโมง/ วัน จากนั้นจึงนำมาสกัดแอนโทไซยานินเพื่อวัดปริมาณแอนโทไซยานินและสกัดอาร์เอ็นเอ นำมาทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยใช้เทคนิค semi – quantitative RT - PCR

3. การวัดปริมาณแอนโทไซยานิน

1. ชั่งต้นยาสูบน้ำหนัก 100 - 200 กรัม
2. นำต้นยาสูบที่ชั่งไปบดในโกร่งให้ละเอียด
3. เมื่อละเอียดแล้วให้ละลายด้วย extraction buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (extraction buffer ประกอบด้วย 80% (v/v) methanol และ 1% (v/v) HCl) และย้ายไปยังหลอดไมโครทิวป์
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อให้ตกตะกอน
5. เมื่อตกตะกอนให้ดูดส่วนใส (supernatant) ใส่หลอดไมโครทิวป์ใหม่
6. เติม chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน (vortex)
7. นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
8. ดูดเก็บส่วนบน (aqueous / methanol phase) ใส่หลอดไมโครทิวป์
9. นำไปวัดโดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ค่าดูดกลืนแสง A_{530} และ A_{657}

10. นำค่าที่ได้คำนวณจากสูตร ปริมาณแอนโทไซยานิน $= \frac{A_{530} - A_{657}}{\text{น้ำหนักสด}}$

4. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA)

1. ขั้นตอน Homogenization

1.1. บดใบอ่อนหนัก 100-200 กรัม โดยใช้ไนโตรเจนเหลว

1.2. เติม Trizol® reagent 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครทิวป์

2. ขั้นตอน Phase separation

2.1. บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

2.2. เติม Chloroform 0.1 มิลลิลิตร

2.3. พลิกกลับหลอด เป็นเวลา 15 วินาที

2.4. บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 นาที

2.5. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที

3. ขั้นตอนตกตะกอนอาร์เอ็นเอ

3.1. ดูดส่วนใสชั้นบนใส่ในหลอดใหม่ประมาณ 500 ไมโครลิตร

3.2. จากนั้นเติม Isopropyl alcohol 500 ไมโครลิตร

3.3. บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

3.4. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที

4. ขั้นตอนล้างตะกอนอาร์เอ็นเอ

4.1. เทส่วนใสทิ้งจนหมด

4.2. เติม 75% ethanol 1 มิลลิลิตร

4.3. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

4.4. เทส่วนใสทิ้ง ทำเหมือนข้อ 4.1-4.3 ซ้ำอีกครั้ง

4.5. ตากตะกอนให้แห้ง เป็นเวลา 25-30 นาที

5. ขั้นตอนการละลายตะกอนอาร์เอ็นเอ

5.1. ละลายตะกอนกลับด้วย DEPC - treated water 30 ไมโครลิตร

5.2. ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

การสังเคราะห์ First Strand cDNA

1. นำอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้ ทำให้เป็น cDNA โดยใช้เทคนิค reverse transcription โดยใช้ Oligo(dT) เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ cDNA เตรียมส่วนประกอบ ดังต่อไปนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร/ปฏิกิริยา)
Total RNA	6
Primer (50 μM oligo(dT))	1
10 mM dNTP mix	1
DEPC - Treated water	2
Total	10

2. บ่ม ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเมื่อครบ 5 นาที นำหลอดออกมาจากเครื่อง PCR และวางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 1 นาที เตรียมปฏิกิริยา cDNA synthesis ดังต่อไปนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร/ปฏิกิริยา)
10X RT buffer	2
25mM $MgCl_2$	4
0.1M DTT	2
RNase Out (40 U/μl)	1
Superscript lll RT (200 U/μl)	1
Total	10

3. เติม cDNA synthesis Mix 10 ไมโครลิตร ในแต่ละหลอดที่เตรียมไว้ในข้อ 2 ผสม และ spin down จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที

4. หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และวางบนน้ำแข็งทันที

5. Spin down และเติม RNase H ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

6. cDNA ที่ได้ สามารถนำเก็บไว้ตู้เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยใช้เทคนิค semi – quantitative RT - PCR

ตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ได้แก่ ยีน *pap1, CHI, CHS, F3H, F3′H, DFR, ANS* และ *actin* ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนนั้น ๆ โดยใช้ Red Master Mix (Merck, Germany) ที่มีองค์ประกอบ ดังต่อไปนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร/ปฏิกิริยา)
Red Master Mix	10
Primer F 10 μM (ของยีนที่ทำการศึกษา)	1
Primer R 10 μM (ของยีนที่ทำการศึกษา)	1
dH_2O	7.5
cDNA	0.5
Total	20

ตารางที่ 1 ยีนที่ตรวจสอบการแสดงออกในต้นยาสูบ, Product size และ Annealing temperature ในการทำ PCR

ชื่อยีน	Product size (bp)	Annealing temperature (องศาเซลเซียส)
production of anthocyanin pigment 1 (pap1)	400	53
Chalone synthase (*CHS*)	215	54
Chalone isomerase (*CHI*)	222	54
Flavanone 3 – Hydroxylase (*F3H*)	206	54
Flavanone 3′– Hydroxylase (*F3′H*)	228	53
Dihydroflavonol reductase (*DFR*)	201	53
Anthocyanidin synthase (*ANS*)	222	54
Actin	231	48

สภาวะในการทำ PCR มีดังนี้

Initial denaturation	95	องศาเซลเซียส	3	นาที
Denaturation	95	องศาเซลเซียส	1	นาที
Annealing	xx	องศาเซลเซียส(อุณหภูมิตามตารางที่ 1)	1	นาที
Extension	72	องศาเซลเซียส	1	นาที
Final extension	72	องศาเซลเซียส	5	นาที

28 รอบ

จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยการทำ agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 2 ยีนที่ตรวจสอบการแสดงออกในข้าว, Product size และ Annealing temperature ในการทำ PCR

ชื่อยีน	Product size (bp)	Annealing Temp. (องศาเซลเซียส)
Osactin	276	53
OsANS	527	57
OsDFR	383	54
OsF3'H	479	55
OsF3H	469	52
OsCHI	337	54
OsCHS	365	53

สภาวะในการทำ PCR มีดังนี้

Initial denaturation	95	องศาเซลเซียส	3	นาที
Denaturation	95	องศาเซลเซียส	1	นาที
Annealing	xx	องศาเซลเซียส (อุณหภูมิตามตารางที่ 2)	1	นาที
Extension	72	องศาเซลเซียส	1	นาที
Final extension	72	องศาเซลเซียส	5	นาที

26 รอบ

การวิเคราะห์ผล semi-quantitative RT-PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

ชั่ง agarose 1 มิลลิกรัม เติม 0.5X TBE buffer 100 มิลลิลิตร หลอมเจลผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน รอให้อุณหภูมิลดลงพอเอามือจับได้จึงเติม SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA) เทใส่ถาดเจล ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เจลแข็งตัวในที่มืด เมื่อเจลแข็งตัวให้ย้ายถาดเจลใส่ใน chamber เท 0.5X TBE buffer ให้ท่วมเจล จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้จากการทำ semi-quantitative RT - PCR ใส่ลงในหลุม (well) เจล และใช้ DNA มาตรฐาน 1 kb DNA ladder (Fermentas, USA) เป็น DNA Marker แล้วให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 28 นาที จากนั้นจึงนำเจลที่ได้ไปตรวจสอบภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV Transilluminator

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

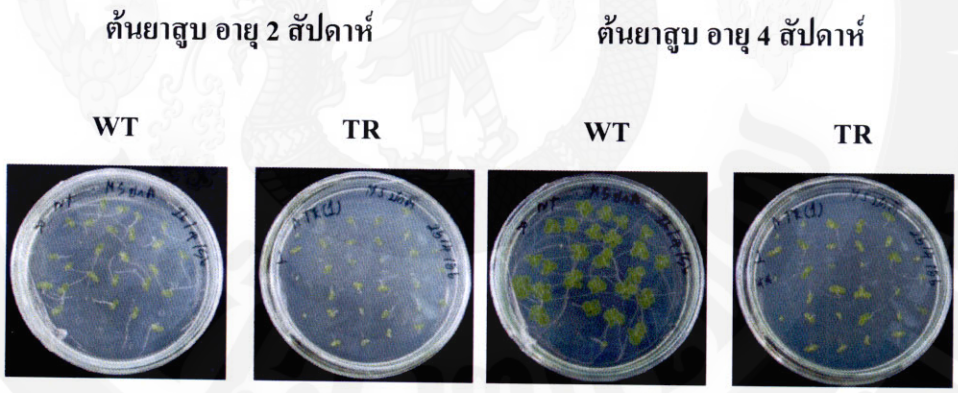
ผลการวิจัยยาสูบ

ผลการทดลองที่ 1

การเพาะเลี้ยงเมล็ดยาสูบบนอาหารสูตร MS ปกติ เป็นเวลาครบ 4 สัปดาห์ และย้ายต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นไนโตรเจนแตกต่างกัน

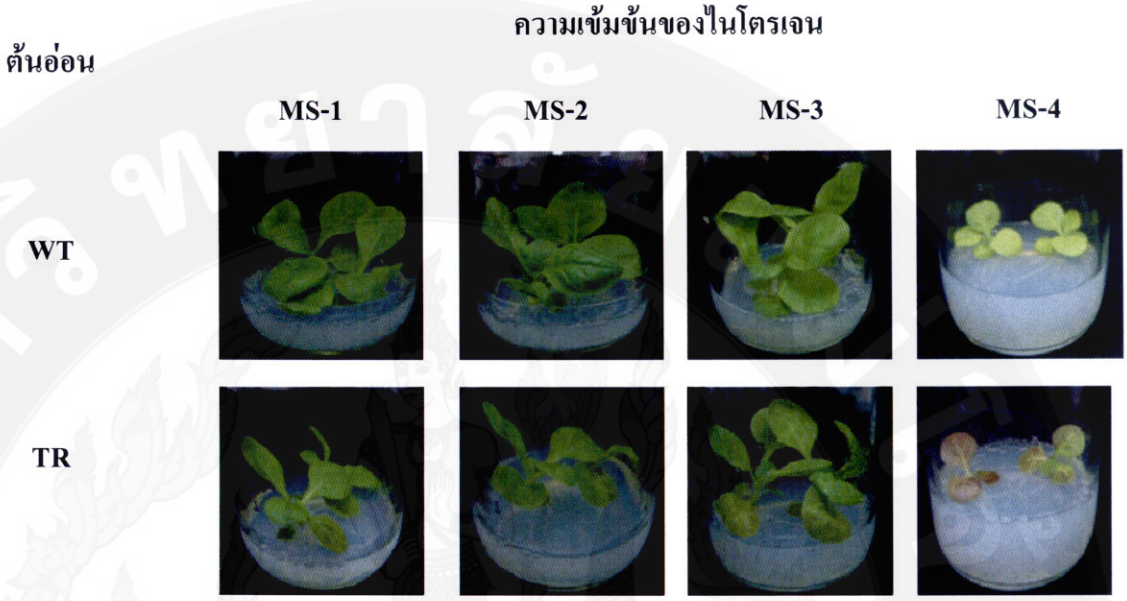
ฟีโนไทป์ของยาสูบ

เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดยาสูบบนอาหารสูตร MS ปกติ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าต้น WT และต้น TR มีการเจริญเติบโตที่ดีใบเริ่มงอกแต่ยังไม่มีความแตกต่างกันมาก เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง 4 สูตร ต้นยาสูบ WT และ TR พบว่าเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีการเจริญเติบโตที่ดีใบมีขนาดขยายใหญ่ขึ้น เมื่อความเข้มข้นของไนโตรเจนลดลงพบว่าต้น TR สังเกตเห็นสีแดงเพิ่มขึ้นตามลำดับ (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้น WT และต้น TR เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปกติ (MS-1) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์

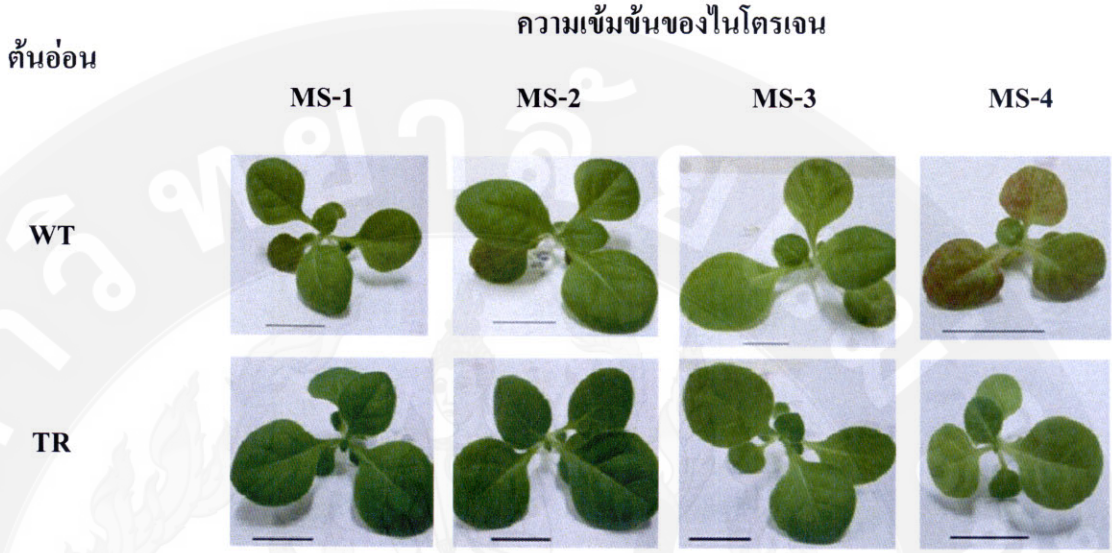
ทำการย้ายต้นอ่อน (อายุ 4 สัปดาห์) ไปเพาะเลี้ยงในขวดอาหารสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน 4 ระดับ คือ MS-1 (1 NH_4NO_3: 1 KNO_3), MS-2 (1/2 NH_4NO_3: 1/2 KNO_3), MS-3 (0 NH_4NO_3: 1/2 KNO_3) และ MS-4 (0 NH_4NO_3: 0 KNO_3) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าต้น TR ใบเป็นสีแดงและแดงมากขึ้น เมื่อระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนลดลง คือ MS-1 ใบมีสีแดงน้อยที่สุด และ MS-4 ใบมีสีแดงมากที่สุด โดยที่ต้น WT มีใบเป็นสีเขียว (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 การเจริญเติบโตของต้น WT และ ต้น TR เพาะเลี้ยงในขวดอาหารสภาวะเครียดที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนแตกต่างกัน (MS-1, MS-2, MS-3 และ MS-4) เป็นเวลา 3 สัปดาห์

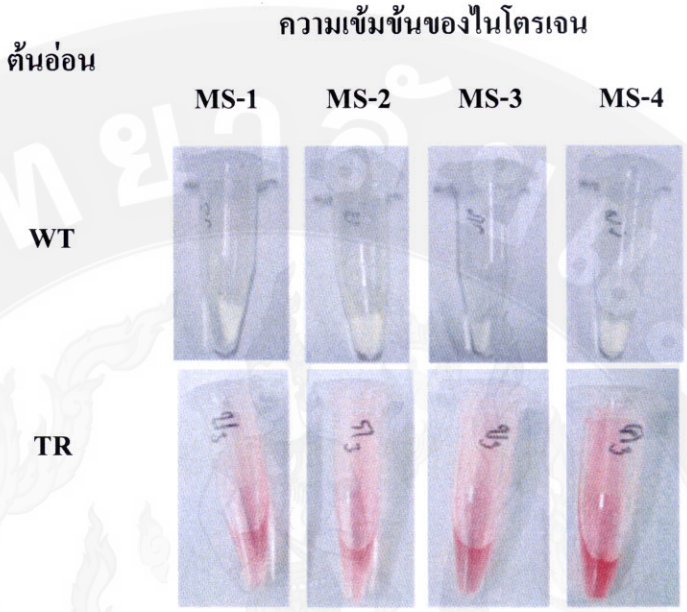
ปริมาณแอนโทไซยานิน

ต้น WT และต้น TR เพาะเลี้ยงในขวดอาหารสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนแตกต่างกัน คือ MS-1 (1 NH_4NO_3: 1 KNO_3), MS-2 (1/2 NH_4NO_3: 1/2 KNO_3), MS-3 (0 NH_4NO_3: 1/2 KNO_3) และ MS-4 (0 NH_4NO_3: 0 KNO_3) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ นำมาสกัดหาปริมาณแอนโทไซยานินของต้นยาสูบ ลักษณะต้นยาสูบที่นำมาสกัดแอนโทไซยานิน ต้น WT มีใบสีเขียวและเหลืองซีดลง เมื่อระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนลดลง ส่วนต้น TR ใบมีสีแดงและแดงเพิ่มขึ้น เมื่อระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนลดลง (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ต้น WT และต้น TR ก่อนการสกัดอาร์เอ็นเอ และสกัดแอนโทไซยานิน เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS-1 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และย้ายต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยงในขวดอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นไนโตรเจนแตกต่างกัน (MS-1, MS-2, MS-3 และ MS-4) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (Scale bar = 1 เซนติเมตร)

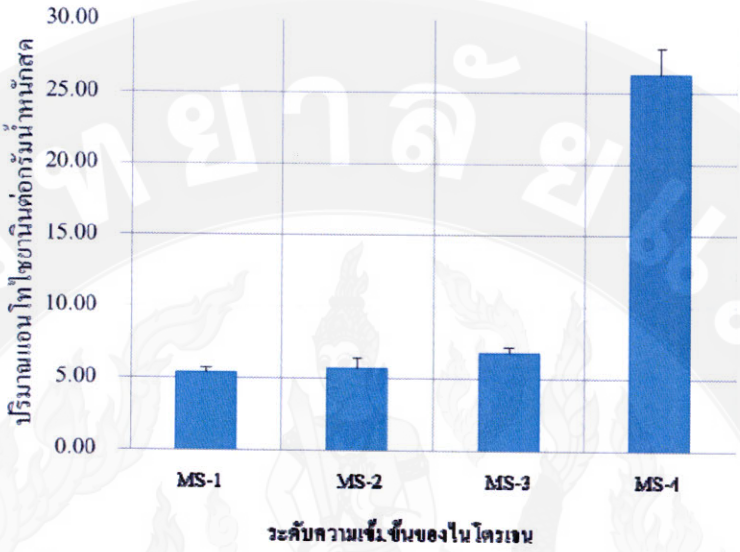
ปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากต้นยาสูบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะต้น TR สีที่เห็นมีลักษณะสีแดงที่เข้มขึ้น ตามลำดับ (ภาพที่ 10) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) โดยวัดค่า A_{530} และ A_{657} ได้ค่าเฉลี่ยของปริมาณแอนโทไซยานิน (ตารางที่ 3) และกราฟแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณแอนโทไซยานิน เมื่อระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนลดลงปริมาณแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 9 และภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ผลการสกัดแอนโทไซยานินจากต้น WT และต้น TR เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปกติเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และย้ายต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยงในขวดอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นไนโตรเจนแตกต่างกัน (MS-1, MS-2, MS-3 และ MS-4) เป็นเวลา 3 สัปดาห์

ตารางที่ 3 ปริมาณแอนโทไซยานินโดยเฉลี่ยในต้น WT และต้น TR เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนต่างๆ

ความเข้มข้นไนโตรเจน	**ปริมาณแอนโทไซยานินต่อกรัมน้ำหนักสด**	
	WT	**TR**
MS-1 NH_4NO_3: KNO_3 1: 1	0	5.39
MS-2 NH_4NO_3: KNO_3 1/2: 1/2	0	5.79
MS-3 NH_4NO_3: KNO_3 0: 1/2	0	6.86
MS-4 NH_4NO_3: KNO_3 0: 0	0	26.25

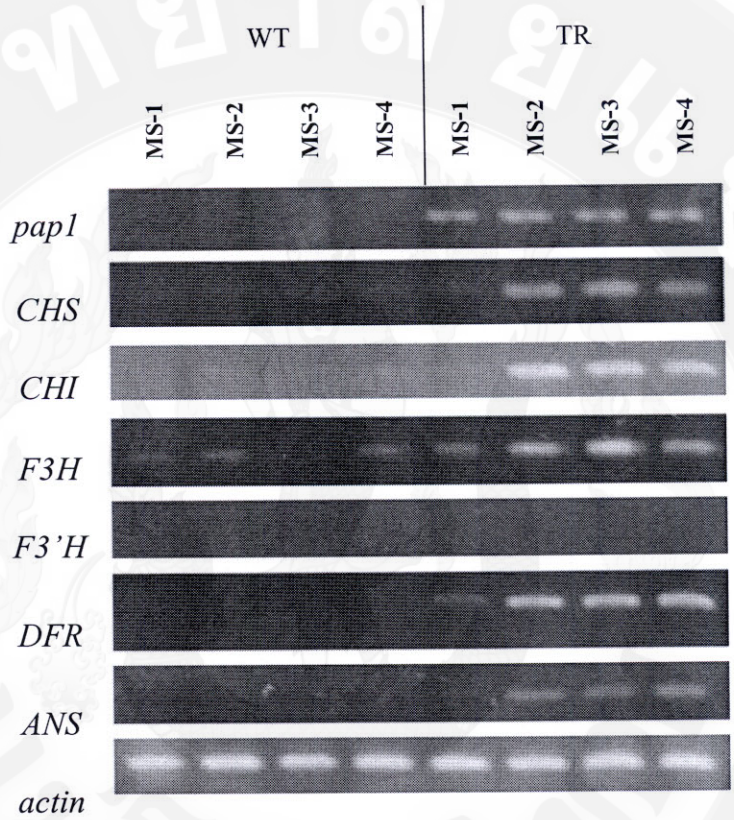


ภาพที่ 11 ปริมาณแอนโทไซยานินจากต้นยาสูบ TR เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และย้ายไปเพาะเลี้ยงในขวดอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นไนโตรเจนแตกต่างกัน (MS-1, MS-2, MS-3 และ MS-4) เป็นเวลา 3 สัปดาห์

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในต้นยาสูบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ MS-1 (1 NH_4NO_3: 1 KNO_3), MS-2 (1/2 NH_4NO_3: 1/2 KNO_3), MS-3 (0 NH_4NO_3: 1/2 KNO_3) และ MS-4 (0 NH_4NO_3: 0 KNO_3) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ นำต้น WT และต้น TR มาทำการสกัดอาร์เอ็นเอ ลักษณะของต้นยาสูบที่ใช้สกัดอาร์เอ็นเอ (ภาพที่ 9) นำอาร์เอ็นเอทั้งหมดมาสังเคราะห์ cDNA เพื่อเป็นแม่พิมพ์ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR และใช้ยีน *actin* เป็นยีนเปรียบเทียบ การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *pap1* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินอยู่ในต้น TR การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *CHS, CHI, F3H, F3′H, DFR และ ANS* ซึ่งเป็นยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน พบว่า ต้นยาสูบ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีไนโตรเจนความเข้มข้นต่างๆ มีการแสดงออกของยีน *pap1* ที่ใกล้เคียงกัน เมื่อทำการวิเคราะห์ยีน *CHS, CHI, F3H, DFR และ ANS* พบว่ามีการแสดงออกของยีนมากเมื่อมีความเข้มข้นไนโตรเจน

ลดลง และการแสดงออกน้อยหรือไม่มีการแสดงออกเลยของยีน *CHS, CHI, F3H, DFR และ ANS* ในต้น WT ยกเว้นยีน *F3 ′H* ที่ไม่มีการแสดงออกทั้งต้น WT และต้น TR (ภาพที่ 12)



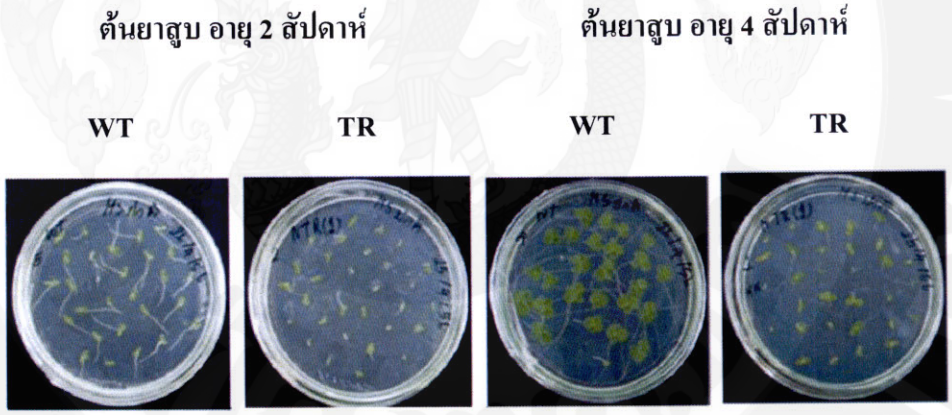
ภาพที่ 12 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pap1, CHS, CHI, F3H, F3 ′H, DFR และ ANS* โดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ของต้น WT และต้น TR เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปกติเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และย้ายต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยงในขวดอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นไนโตรเจนแตกต่างกัน (MS-1, MS-2, MS-3 และ MS-4)

ผลการทดลองที่ 2

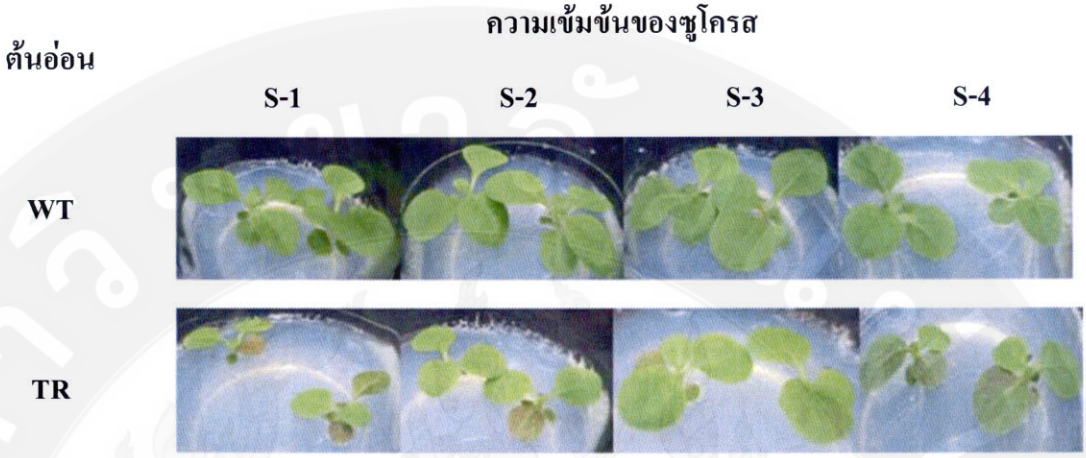
การเพาะเลี้ยงต้นยาสูบในสภาวะปกติและวางต้นอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ บนอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 4 ระดับคือ คือ S-1 (0 mM), S-2 (50 mM), S-3 (100 mM) และ S-4 (200 mM)

ฟีโนไทป์ของยาสูบ

การเพาะเลี้ยงต้นยาสูบในสภาวะปกติบนอาหารสูตร MS ต้นยาสูบอายุ 2 สัปดาห์ สังเกตเห็นใบเริ่มงอกแต่ยังไม่มีความแตกต่างกันมาก (ภาพที่ 13) เมื่อต้นยาสูบอายุ 4 สัปดาห์ มีการเจริญเติบโตที่เห็นได้ชัดเจน โดยใบมีขนาดใหญ่ขึ้น และสังเกตเห็นการแสดงออกของสีแดงเพิ่มขึ้น จากนั้นทำการย้ายต้นอ่อนเลี้ยงในขวดอาหารสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 4 ระดับ คือ S-1 (0 mM), S-2 (50 mM), S-3 (100 mM) และ S-4 (200 mM) ต้นอ่อนที่อายุ 2 สัปดาห์ หลังจากย้ายลงบนอาหารที่มีซูโครสระดับความเข้มข้นต่างๆ ต้น WT มีลักษณะใบสีเขียว ส่วนต้น TR ลักษณะใบล่างเป็นจุดสีแดงและเห็นสีแดงชัดเจนเมื่อเพาะเลี้ยงในความเข้มข้นซูโครสที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นซูโครส S-4 มีใบสีแดงเข้มมากที่สุด (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 13 การเจริญเติบโตของต้น WT และ TR อายุ 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปกติ

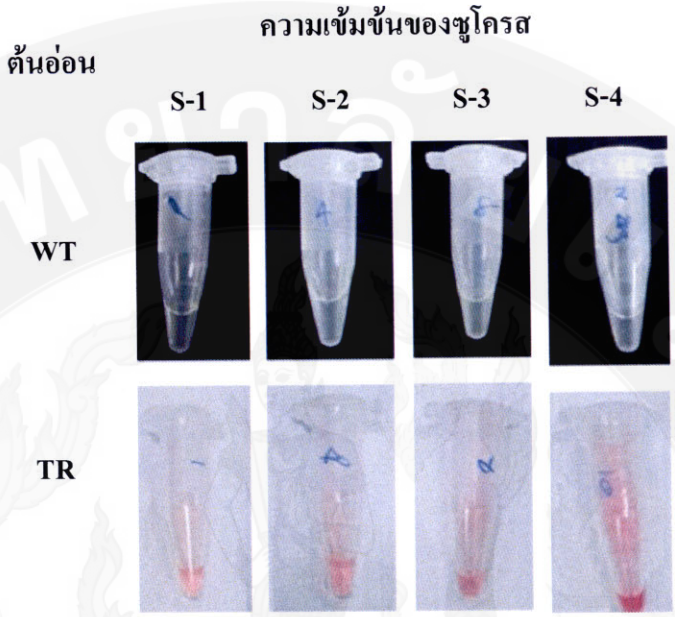


ภาพที่ 14 ต้น WT และต้น TR เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่างๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ปริมาณแอนโทไซยานิน

ต้นยาสูบอายุ 6 สัปดาห์ ที่ทำการเพาะเลี้ยงยาสูบในขวดบนอาหาร MS ที่มีซูโครสระดับต่างๆ นำมาสกัดปริมาณแอนโทไซยานิน (ภาพที่ 14) พบว่า ปริมาณแอนโทไซยานินในต้นยาสูบ TR เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของซูโครสสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องลักษณะสีของใบต้นยาสูบที่เพาะเลี้ยงบนขวดอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของซูโครสต่างๆที่ปรากฏ ทำให้ทราบว่าซูโครสมีผลต่อการส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์แอนโทไซนานินเช่นกันโดยเฉพาะเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีซูโครส 200 mM (S-4) (ภาพที่ 15)

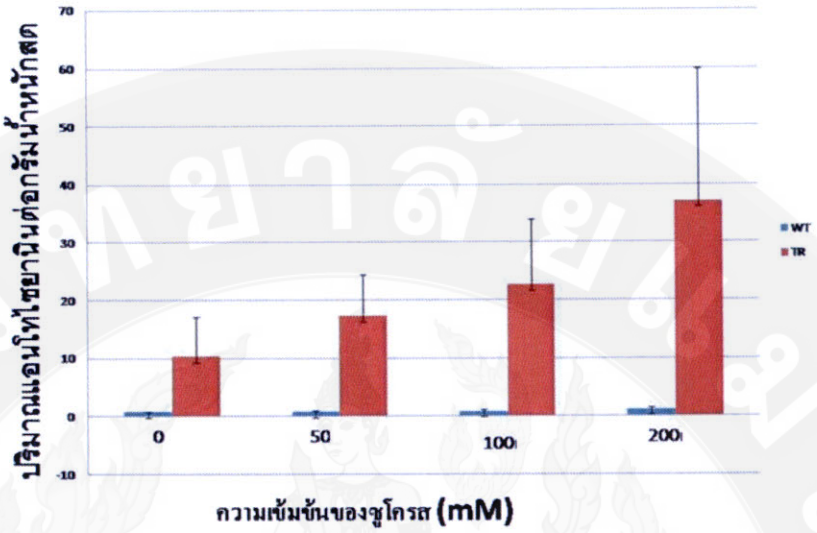
เมื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยวัดค่า A_{530} และ A_{657} (ตารางที่ 4) ซึ่งแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณแอนโทไซยานินเมื่อระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้นพบว่าปริมาณแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 15 ลักษณะสีของแอนโทไซยานินที่สกัดจากต้น WT และต้น TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่างๆ

ตารางที่ 4 ปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดจากต้น WT และ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่างๆ โดยการวัดค่าดูดกลืนแสง (A_{530} และ A_{657})

ความเข้มข้นของซูโครส (mM)	ค่าเฉลี่ยของปริมาณแอนโทไซยานินต่อกรัมน้ำหนักสดของ WT	ค่าเฉลี่ยของปริมาณแอนโทไซยานินต่อกรัมน้ำหนักสดของ TR
0	0.858	10.383
50	0.897	17.292
100	0.981	22.700
200	1.332	37.124



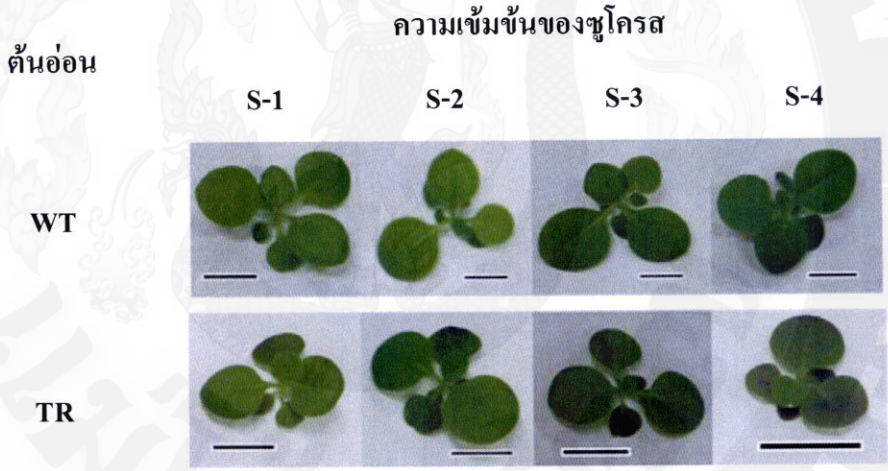
ภาพที่ 16 ค่าเฉลี่ยของปริมาณแอนโทไซยานินของต้น WT และต้น TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

เมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนของยาสูบอายุได้ 4 สัปดาห์ นำมาเพาะเลี้ยงในขวดอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของซูโครส S-1 (0 mM), S-2 (50 mM), S-3 (100 mM) และ S-4 (200 mM) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ นำมาสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (ภาพที่ 17) นำอาร์เอ็นเอมาทำการสังเคราะห์ cDNA เพื่อนำไปเป็นแม่พิมพ์ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *pap1*, *CHS, CHI, F3H, F3′H, DFR* และ *ANS* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ยีน *actin* เป็น internal control พบว่า ต้นยาสูบ TR ที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* ทุกต้นไม่ว่าจะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของซูโครสในระดับใดก็ตามยีน *pap1* มีการแสดงออกที่เท่ากัน และการแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน พบว่าต้นยาสูบ TR มีการแสดงออกของยีน *CHS, CHI, F3H, DFR* และ *ANS* มีระดับการแสดงออกมากกว่าต้น WT โดยเฉพาะต้นยาสูบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีซูโครส S-4 มีการแสดงออกของยีนมากที่สุด (ภาพที่ 18) การแสดงออกของยีน *CHI* มีการแสดงออกใกล้เคียงกันระหว่างต้น WT และต้น TR แต่ในต้น TR มีการแสดงออกของยีนมากกว่า ส่วนยีน *CHS, F3H, DFR* และ *ANS* มีการแสดงออกใกล้เคียงกัน แต่ในต้น WT มีการแสดงออกของยีน *CHS, F3H, DFR* และ *ANS* น้อยมาก แต่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส S-4 มีการแสดงออกของยีนมาก

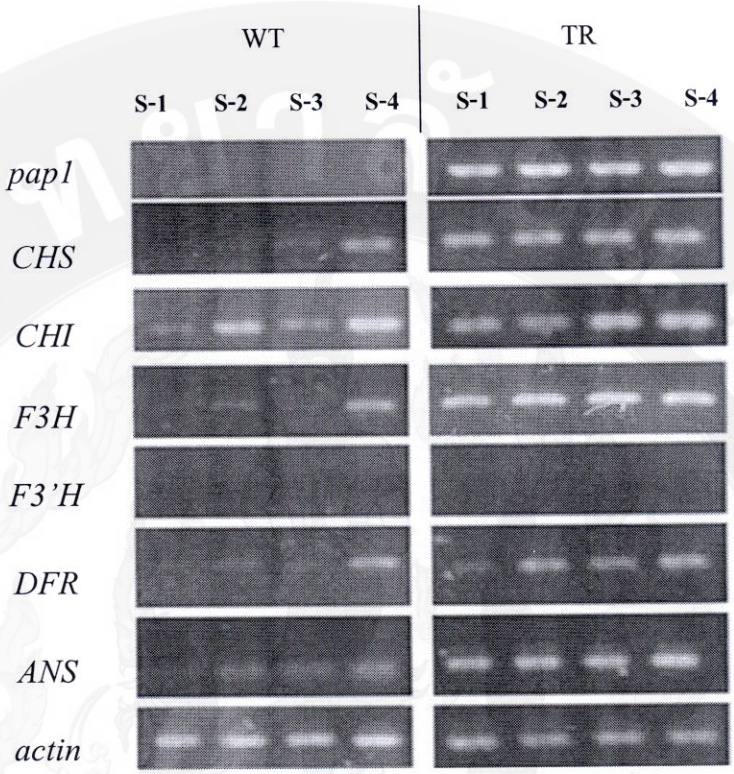
ที่สุด นอกจากนี้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3′H* ไม่พบการแสดงออกทั้งต้น WT และต้น TR

ถึงแม้ว่าต้น WT ที่ไม่มียีน *pap1* แต่พบการแสดงออกของยีน *CHS, CHI, F3H, DFR* และ *ANS* ซึ่งมีการแสดงออกมากเมื่อเพาะเลี้ยงในซูโครส S-4 ดังนั้นคาดว่าความเข้มข้นของซูโครสที่ต่างกันสามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนโครงสร้างเหล่านี้ไม่ว่าเป็นต้น WT และต้น TR แต่ในต้น TR ที่มียีน *pap1* การแสดงออกของยีนโครงสร้างเหล่านี้ พบมากกว่าต้น WT ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน *pap1* และซูโครสมีผลกระตุ้นให้ยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเพิ่มมากขึ้นและส่งผลให้ต้นยาสูบมีสีแดงเข้มขึ้น



ภาพที่ 17 ต้น WT และต้น TR ที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ อายุ 6 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS 4 สัปดาห์และย้ายเพาะเลี้ยงในขวด 2 สัปดาห์ ที่อาหารสูตร MS ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่างๆ

หมายเหตุ: bar คือ ขนาดความยาว 1 เซนติเมตร



ภาพที่ 18 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ในต้นยาสูบ WT และต้น TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่างๆ

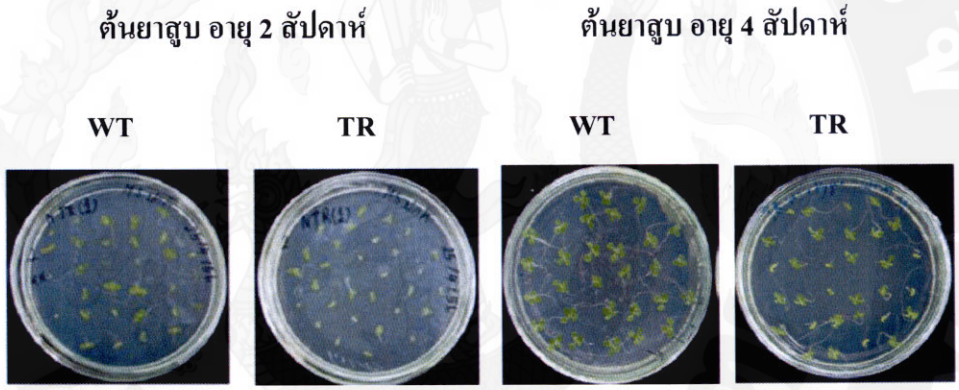
ผลการทดลองที่ 3

การเพาะเมล็ดยาสูบ wild-type (WT) และเมล็ดยาสูบ transgenic (TR) บนอาหารสูตร MS ปกติ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (เพาะใน Petri dish) จากนั้นย้ายต้นอ่อนเลี้ยงบนอาหารใหม่ที่มีระดับความเข้มข้นของฟอสฟอรัสต่าง ๆ คือ K-1 (0 mM), K-2 (0.625 mM) และ K-3 (1.25 mM) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ในขวด 12 ออนซ์)

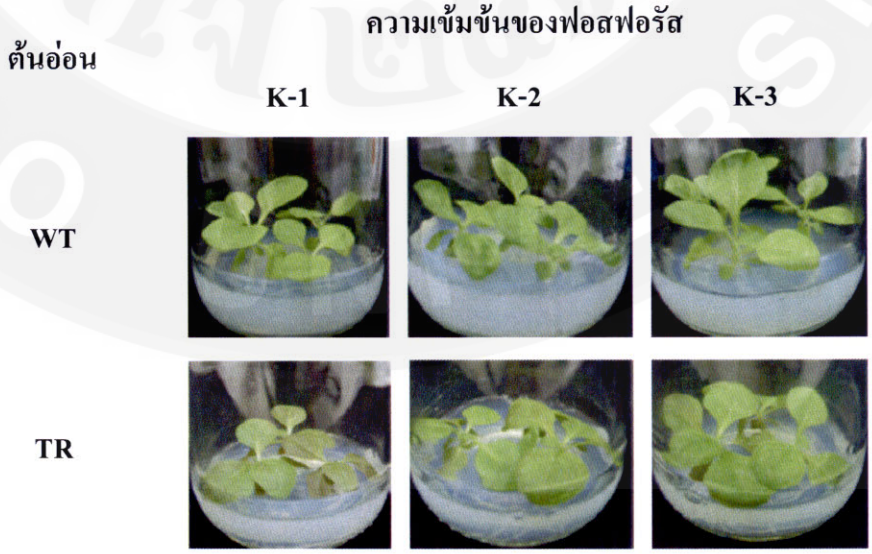
ฟีโนไทป์ของยาสูบ

การเกิดสีแดงที่เกิดจากการสังเคราะห์แอนโทไซยานินของต้นยาสูบ WT และ TR เพาะเมล็ดบนอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของฟอสฟอรัสที่แตกต่างกัน โดยเริ่มมีสีแดงเกิดขึ้นตั้งแต่ต้น

มีอายุประมาณ 2 สัปดาห์ แต่การแสดงออกไม่มากนัก เกิดสีแดงเป็นจุดบนส่วนของใบ บางต้นก็ยังไม่มีการแสดงออกของสีแดง (ภาพที่ 19) และเมื่อครบ 4 สัปดาห์ ทำการย้ายต้นยาสูบ WT และ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ปกติ ไปเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่าง ๆ พบว่าต้นยาสูบ WT ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่าง ๆ ไม่มีการเกิดสีแดง (ภาพที่ 20) ส่วนต้นยาสูบ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัส K-1 ใบมีการสร้างสีแดงเกิดขึ้นมากที่สุด รองลงมาคือ ต้นยาสูบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัส K-2 และ K-3 ตามลำดับ



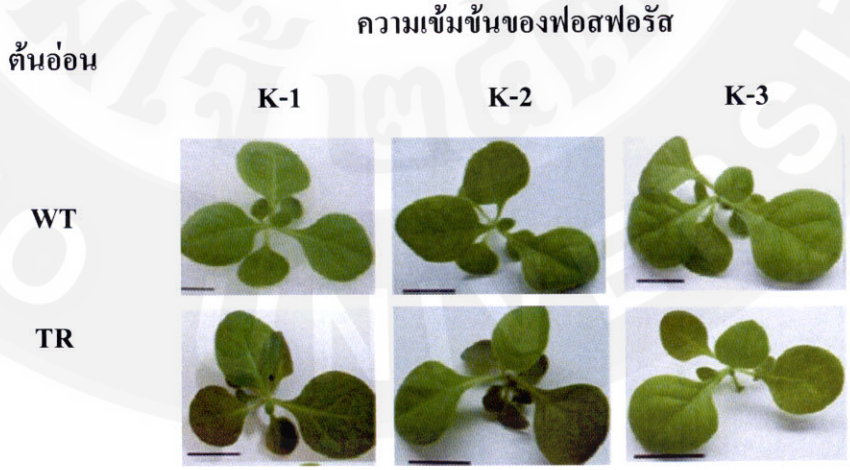
ภาพที่ 19 ต้นยาสูบ WT และ TR อายุ 4 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปกติ



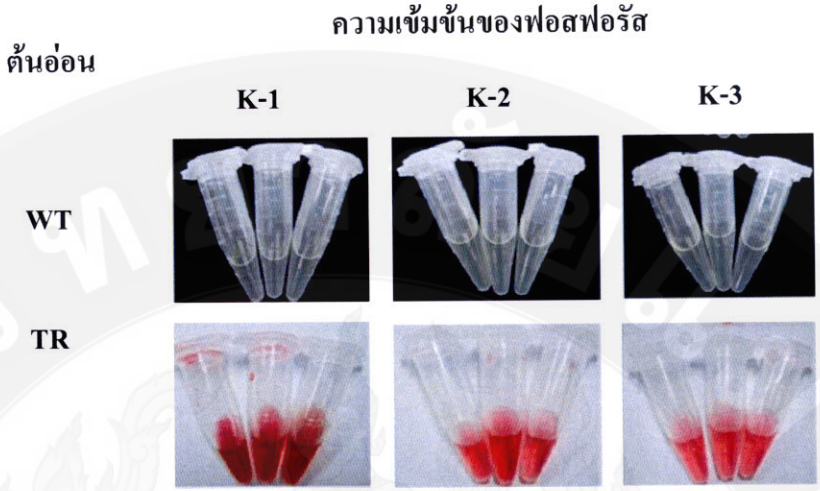
ภาพที่ 20 การแสดงออกของสีแดงในต้นและใบของต้นยาสูบ WT และ TR อายุ 4 สัปดาห์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS

ปริมาณแอนโทไซยานินที่สะสมในต้นยาสูบ

การวัดปริมาณแอนโทไซยานินที่สะสมในต้นยาสูบ หลังจากย้ายไปเลี้ยงบนอาหารในสภาวะเครียดที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่าง ๆ โดยต้นยาสูบ WT และ TR ที่นำมาสกัดและวัดปริมาณแอนโทไซยานินมีอายุ 6 สัปดาห์ (ภาพที่ 21) ความเข้มของสีแดงที่สังเกตได้จากสายตาหลังจากทำการสกัด (ภาพที่ 22) พบว่าต้นยาสูบ WT ไม่มีสีแดงเกิดขึ้นทั้ง 3 ระดับของความเข้มข้นของฟอสฟอรัสที่เพาะเลี้ยง ส่วนต้นยาสูบ TR เกิดสีแดงทั้ง 3 ระดับของความเข้มข้นของฟอสฟอรัสที่เพาะเลี้ยง คือ ต้นยาสูบ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัส K-1 มีสีแดงมาก รองลงมาคือ ต้นยาสูบ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัส K-2 และ K-3 ตามลำดับ เมื่อสกัดแล้วนำไปวัดปริมาณแอนโทไซยานินที่สะสมอยู่ในต้นยาสูบ ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) พบว่า ต้นยาสูบ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัส K-1 มีค่าเฉลี่ยของปริมาณแอนโทไซยานินปริมาณสูงมากที่สุด เท่ากับ 42.135 ต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือ ต้นยาสูบ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัส K-2 และ K-3 มีค่าเฉลี่ยแอนโทไซยานิน เท่ากับ 20.633 และ 12.768 ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ตารางที่ 5 และ ภาพที่ 23)



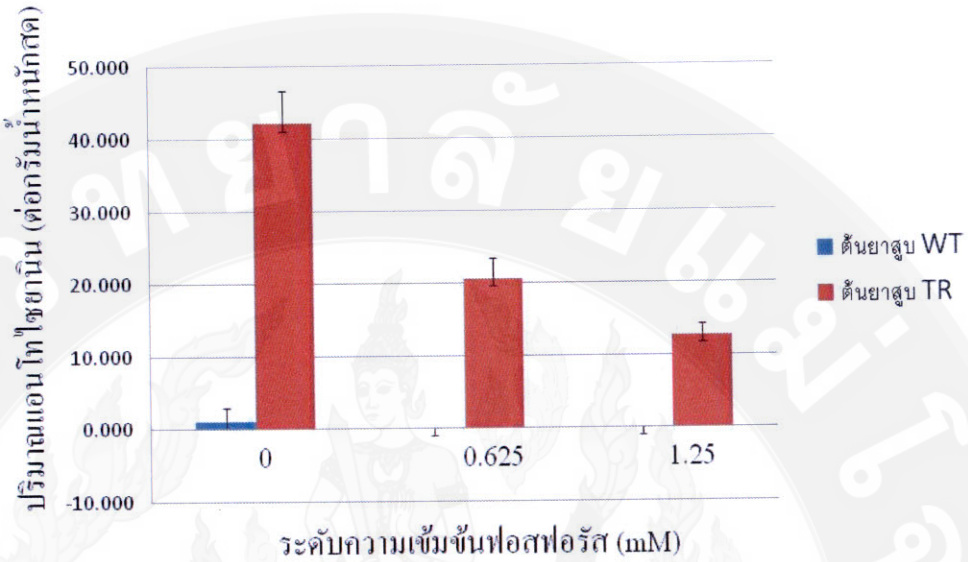
ภาพที่ 21 การแสดงออกของสีแดงของต้นและใบของต้นยาสูบ WT และTR อายุ 6 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่าง ๆ ที่นำไปสกัดและวัดปริมาณแอนโทไซยานิน (bar เท่ากับ 1 cm)



ภาพที่ 22 ความเข้มของสีที่ได้จากสกัดแอนโทไซยานินจากต้นยาสูบ WT และ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่างๆ (การทดลองทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น)

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินที่สะสมในต้นยาสูบ WT และ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่าง ๆ

ความเข้มข้นของฟอสฟอรัส (mM)	ปริมาณแอนโทไซยานินต่อกรัมน้ำหนักสด	
	WT	TR
0	1.121	42.135
0.625	0.021	20.633
1.25	0.008	12.768

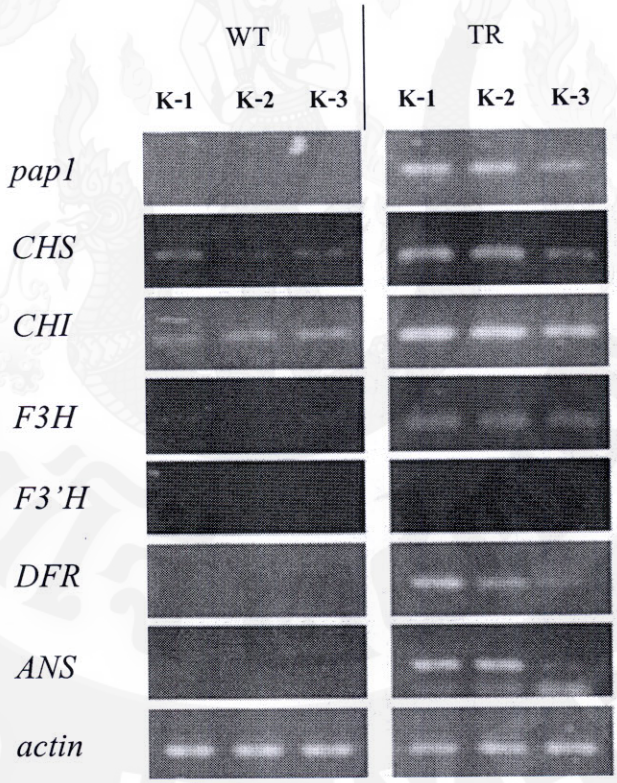


ภาพที่ 23 ปริมาณแอนโทไซยานินที่สะสมของต้นยาสูบ WT และ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่างๆ

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยเทคนิค semi – quantitative RT – PCR

การสกัดอาร์เอ็นเอของต้นยาสูบ WT และ TR ต้นยาสูบที่นำมาสกัดมีอายุ 6 สัปดาห์ จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาสังเคราะห์ให้เป็น cDNA เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pap1* ที่เป็นยีนควบคุมการสร้างแอนโทไซยานินที่ทำให้เกิดสีแดงในต้นยาสูบ รวมถึงยีนโครงสร้างอื่น ๆ ได้แก่ ยีน *CHS, CHI, F3H, F3'H, DFR* และ *ANS* ที่เกี่ยวข้องกับ pathway การสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ในต้นยาสูบ WT และ TR ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของฟอสฟอรัสต่างๆ การตรวจสอบการแสดงของยีน *pap1* พบว่า ต้นยาสูบ WT ถึงแม้ทำการเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสต่าง ๆ ก็ไม่มีการเกิดสีแดงและการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ในขณะที่ต้นยาสูบ TR มีการแสดงออกของยีน *pap1* และเกิดสีแดง และมีการสะสมของแอนโทไซยานินเกิดขึ้น โดยต้นยาสูบ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัส K-1 มีการแสดงออกของยีน *pap1* มากที่สุด รองลงมา คือ ต้นยาสูบ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัส K-2 และ K-3 ตามลำดับ และต้นยาสูบ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัส K-3 มีการแสดงออกของยีน *pap1* น้อยที่สุด และจากการตรวจสอบการ

แสดงออกของยีนโครงสร้าง ได้แก่ ยีน *CHS, CHI, F3H* , *DFR* และ *ANS* มีการแสดงออกของยีนเช่นเดียวกับยีน *pap1* ซึ่งต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสต่ำ มีการแสดงออกของยีน *CHS, CHI, DFR* และ *ANS* มาก แต่ยีน *F3H* มีการแสดงออกที่เท่ากันทุกระดับความเข้มข้นของฟอสฟอรัส สำหรับต้นยาสูบ WT ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่างๆ มีการแสดงออกของยีน *CHS, CHI* และ *F3H* ที่มีการแสดงออกในระดับที่น้อยมากสอดคล้องกับการแสดงออกของสีแดงในใบของต้นยาสูบ TR ซึ่งยิ่งมีการแสดงออกของยีน *pap1* มากเท่าไร ทำให้เกิดสะสมแอนโทไซยานินมากเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่าง ๆ โดยเทคนิค semi – quantitative RT – PCR ของต้นยาสูบ WT และ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่าง ๆ คือ K-1 (0 mM), K-2 (0.625 mM) และ K-3 (1.25 mM)

ผลการวิจัยข้าว

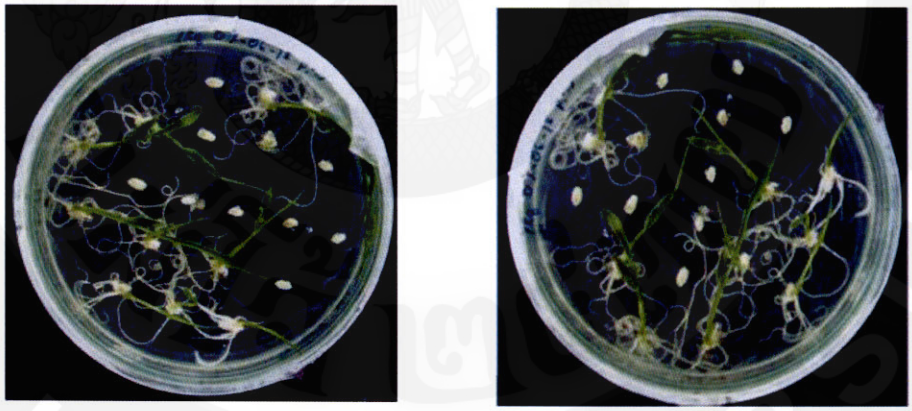
ผลการทดลองที่ 1

การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารสูตร MS เป็นเวลาครบ 2 สัปดาห์ และย้ายต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นไนโตรเจนแตกต่างกัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์

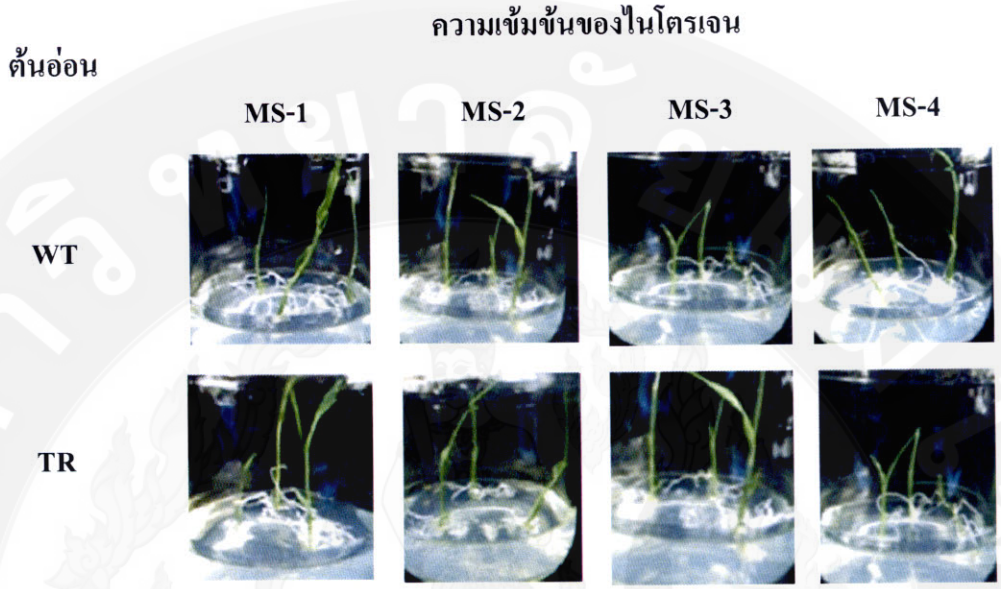
ฟีโนไทป์ของข้าว

เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารสูตร MS-1 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 25) แล้วทำการย้ายต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยงในขวดอาหารสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน 4 ระดับ (ภาพที่ 26) คือ MS-1 (1 NH_4NO_3: 1 KNO_3), MS-2 (1/2 NH_4NO_3: 1/2 KNO_3), MS-3 (0 NH_4NO_3: 1/2 KNO_3) และ MS-4 (0 NH_4NO_3: 0 KNO_3) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าต้น WT และต้น TR ที่ย้ายลงอาหารความเข้มข้นต่างๆ ใบมีสีเหลืองซีดและมีต้นเล็กลงมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ลดลง โดยพบว่า MS-1 ใบมียังสีเขียวมากที่สุด และมีการแตกกอมากที่สุด และ MS-4 ใบมีสีเหลืองซีดมากที่สุด และไม่มีการแตกกอ (ภาพที่ 27)

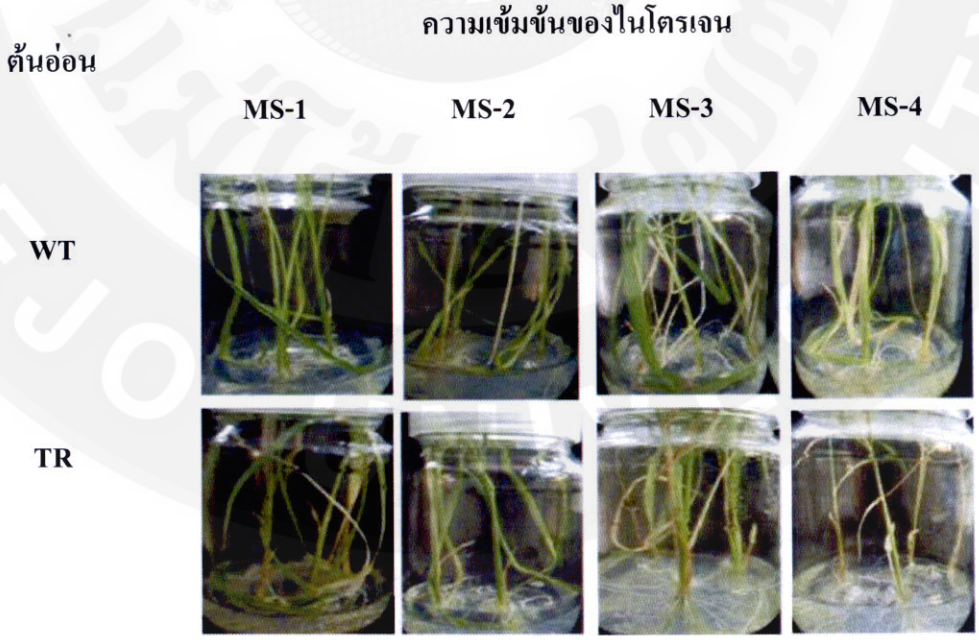
WT TR



ภาพที่ 25 การเจริญเติบโตของต้น WT และต้น TR เพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์



ภาพที่ 26 การเจริญเติบโตของต้น WT และ ต้น TR เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงในขวดอาหารสภาวะเครียดที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนแตกต่างกัน (MS-1, MS-2, MS-3 และ MS

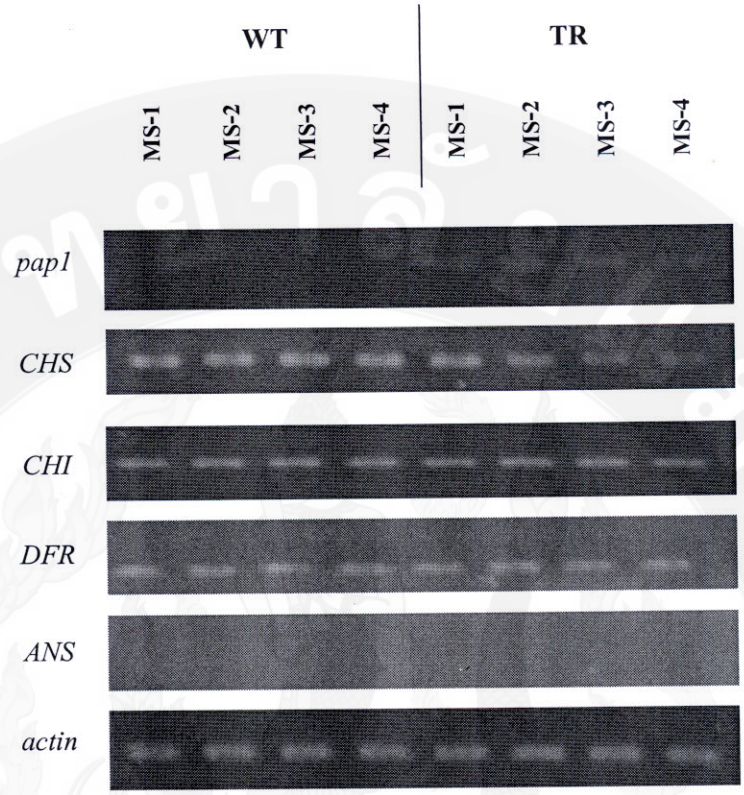


ภาพที่ 27 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้น WT และ ต้น TR เพาะเลี้ยงในขวดอาหารสภาวะเครียดที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนแตกต่างกัน (MS-1, MS-2, MS-3 และ MS-4) เป็นเวลา 3 สัปดาห์

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในต้นข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนที่แตกต่างกันคือ MS-1 (1 NH_4NO_3: 1 KNO_3), MS-2 (1/2 NH_4NO_3: 1/2 KNO_3), MS-3 (0 NH_4NO_3: 1/2 KNO_3) และ MS-4 (0 NH_4NO_3: 0 KNO_3) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ นำต้น WT และต้น TR มาทำการสกัดอาร์เอ็นเอลักษณะของต้นข้าวที่ใช้สกัดอาร์เอ็นเอ (ภาพที่ 27)

นำอาร์เอ็นเอทั้งหมดมาสังเคราะห์ cDNA เพื่อเป็นแม่พิมพ์ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR และใช้ยีน *actin* เป็นยีนเปรียบเทียบ การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *pap1* ในต้นข้าว TR ซึ่งยีน *pap1* เป็นยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน แต่ต้นข้าว TR มีฟีโนไทป์ที่ปรากฏมีลักษณะต้นสีเขียว จึงทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน พบว่า ต้น TR และต้น WT มีระดับการแสดงออกของยีนโครงสร้าง ได้แก่ ยีน *CHS, CHI* และ*DFR* แต่ยีน *ANS* ไม่มีการแสดงออกทั้งต้น WT และ TR การแสดงออกของยีนดังกล่าวสอดคล้องกับลักษณะทางฟีโนไทป์ที่มีลักษณะต้นสีเขียวที่ปรากฏในต้น TR ยีน *pap1* ไม่สามารถส่งเสริมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในข้าวได้ ทำให้ไม่มีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวถึงแม้ว่าจะอยู่ในสภาวะเครียดจากการขาดไนโตรเจน (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 28 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pap1, CHS, CHI, DFR* และ *ANS*โดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ของต้น WT และต้น TR เพาะเลี้ยงต้นอ่อนอายุ 2 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนแตกต่างกัน (MS-1, MS-2, MS-3 และ MS-4) เป็นเวลา 3 สัปดาห์

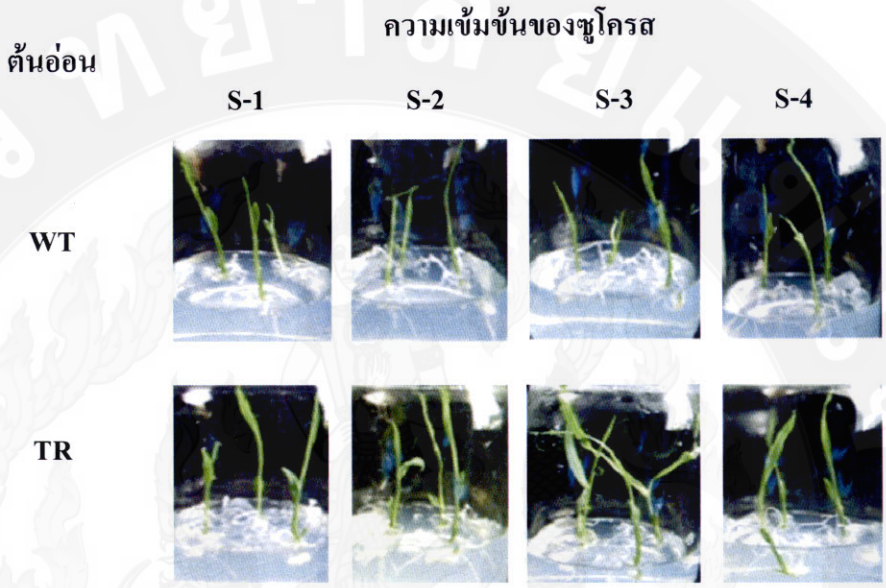
ผลการทดลองที่ 2

การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวบนอาหารสูตร MS เป็นเวลาครบ 2 สัปดาห์ และย้ายต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นซูโครสแตกต่างกัน

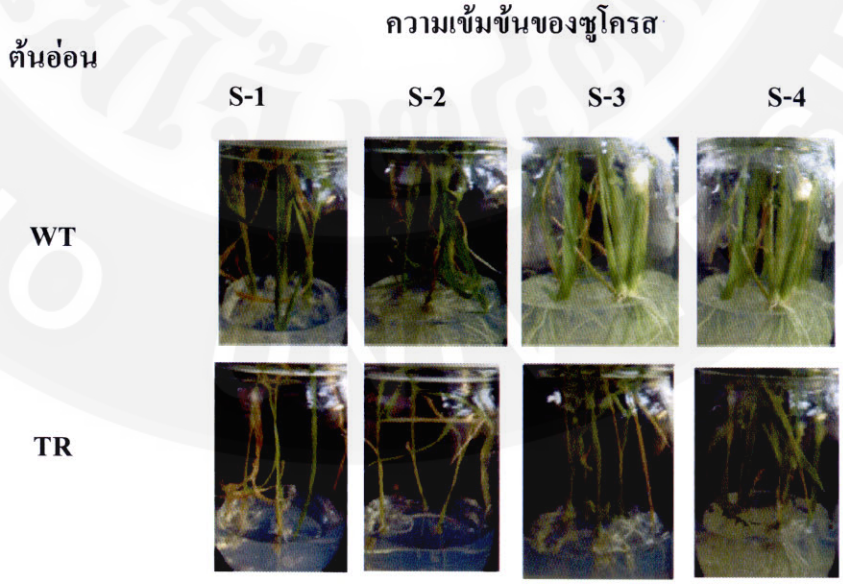
ฟีโนไทป์ของข้าว

จากการเพาะเลี้ยงต้นข้าวในสภาวะปกติอายุ 2 สัปดาห์ ทำการย้ายต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยงในขวดอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 4 ระดับ (ภาพที่ 29) คือ S-1 (0 mM), S-2 (50 mM), S-3 (100 mM) และ S-4 (200 mM) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* (TR) ที่ทำการเพาะเลี้ยงในระดับความเข้มข้นซูโครสต่างๆ เริ่มต้นมีลักษณะใบสีเขียว เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ความเข้มของสีบนใบและการแตกกอเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มของซูโครสที่เพิ่มขึ้นตาม

ไปด้วย โดยพบว่า S-1 ใบมียังสีเขียวน้อยที่สุด และ S-4 ใบมีสีเขียวมากที่สุด เมื่อความเข้มข้นของซูโครสเพิ่มขึ้น ข้าวมีใบสีเขียวเข้มขึ้นและแตกกอมากขึ้น (ภาพที่ 30)



ภาพที่ 29 การเจริญเติบโตของต้น WT และ TR เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่างๆ

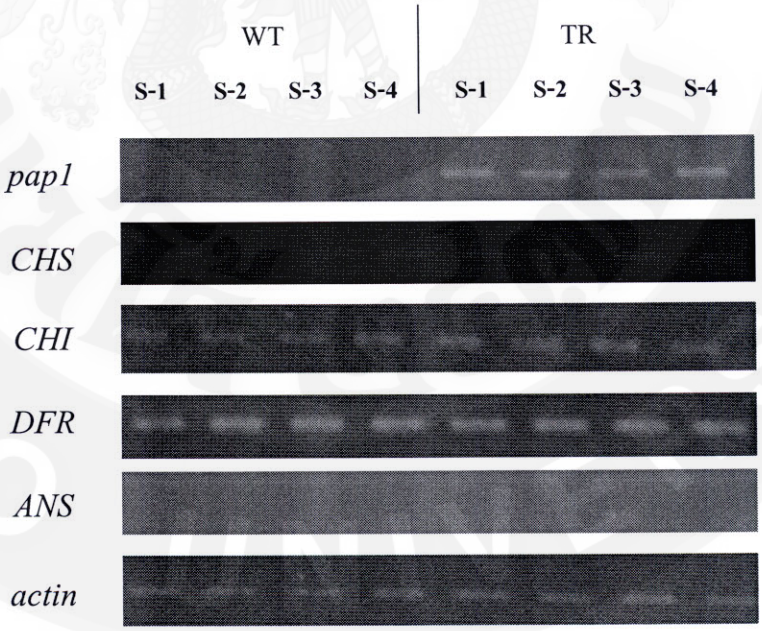


ภาพที่ 30 ต้น WT และต้น TR เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยเทคนิค semi – quantitative RT – PCR

เมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนของข้าวในขวดอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของซูโครส คือ S-1 (0 mM), S-2 (50 mM), S-3 (100 mM) และ S-4 (200 mM) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ นำมาสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (ภาพที่ 30)

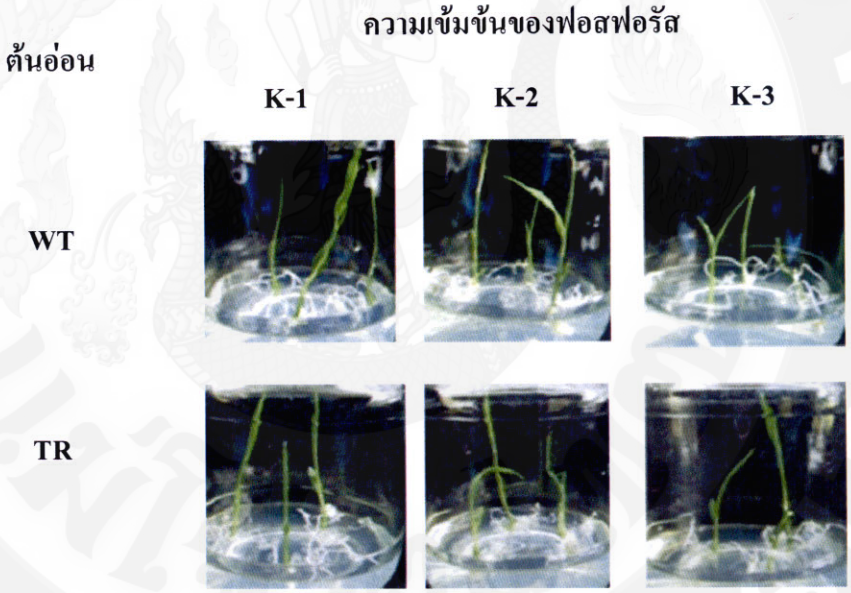
นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาทำการสังเคราะห์ cDNA เพื่อนำไปเป็นแม่พิมพ์ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *pap1*, *CHS, CHI, DFR*และ *ANS* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ยีน *actin* เป็น internal control พบว่า ต้นข้าว TR ที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* ทุกต้นไม่ว่าจะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของซูโครสในระดับใดก็ตามยีน *pap1* มีการแสดงออกที่เท่ากัน และการแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินพบว่าต้นข้าว TR มีการแสดงออกของยีน *CHS, CHI และ DFR* มีระดับการแสดงออกเท่ากับต้น WT แม้ว่าต้น WT ไม่มียีน *pap1* แต่พบการแสดงออกของยีน *CHS, CHI* และ *DFR* ส่วนยีน *ANS* ไม่พบการแสดงออก (ภาพที่ 31)



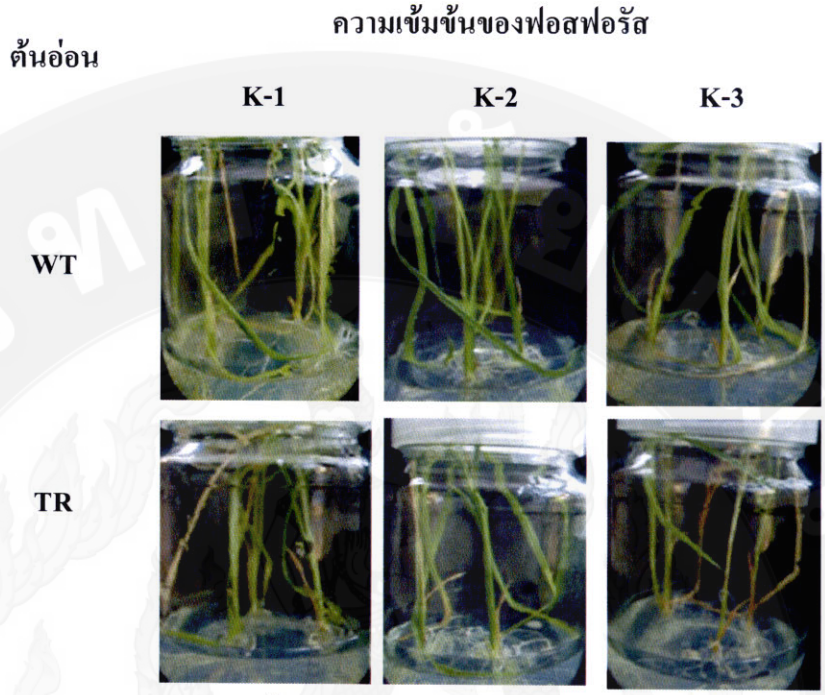
ภาพที่ 31 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ในต้นข้าว WT และต้น TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสระดับต่างๆ

ผลการทดลองที่ 3

จากการเพาะเมล็ดข้าว WT และเมล็ดข้าว TR บนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายต้นอ่อนเลี้ยงบนอาหารใหม่ที่มีระดับความเข้มข้นของฟอสฟอรัสต่าง ๆ (ภาพที่ 32) คือ K-1(0 mM), K-2 (0.625 mM) และ K-3 (1.25 mM) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ทั้งต้น WT และ TR ในฟอสฟอรัสระดับต่าง ๆ การเจริญเติบโตที่ K-1 มีการแตกกอที่เพิ่มขึ้นมากกว่า K-2 และK-3 ขณะที่ใบมีสีเหลือง ซึ่งไม่เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ตามระดับความเข้มของฟอสฟอรัสลดลง (ภาพที่ 33)



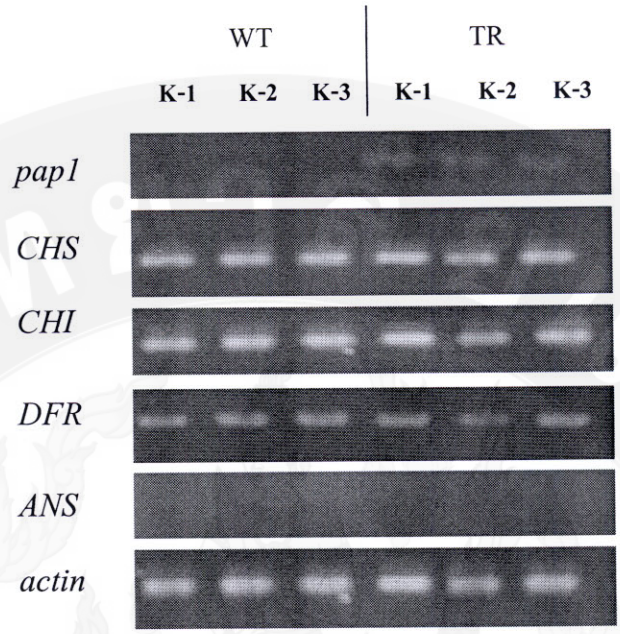
ภาพที่ 32 การเจริญเติบโตของต้น WT และ TR เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่างๆ



ภาพที่ 33 ต้น WT และต้น TR เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยเทคนิค semi – quantitative RT - PCR

การสกัดอาร์เอ็นเอของต้นข้าว WT และ TR ต้นข้าวที่นำมาสกัดมีอายุ 4 สัปดาห์ จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาสังเคราะห์ให้เป็น cDNA แล้วใช้เป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จำนวน 28 รอบ เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pap1* ที่เป็นยีนควบคุมการสร้างแอนโทไซยานินรวมถึงยีนโครงสร้างอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแอนโทไซยานิน ยีนโครงสร้างที่ทำการตรวจสอบมีดังนี้คือ *CHS, CHI, DFR* และ *ANS* ในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินของต้นข้าว WT และ TR ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของฟอสฟอรัส คือ K-1 (0 mM), K-2 (0.625 mM) และ K-3 (1.25 mM) พบว่าต้นข้าว TR มีการแสดงออกของยีน *pap1* แต่ไม่พบในต้น WT การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโครงสร้างต่างๆ ในต้นมีการแสดงออกเท่ากันกับต้นข้าว WT ยกเว้น ยีน *ANS* ที่ไม่มีการแสดงออกทั้งต้น WT และ TR (ภาพที่ 34)



ภาพที่ 34 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่าง ๆ โดยเทคนิค semi – quantitative RT – PCR ของต้นข้าว WT และ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่าง ๆ คือ K-1(0 mM), K-2 (0.625 mM) และ K-3 (1.25 mM)

สรุปผลการทดลอง

สรุปผลการวิจัยยาสูบ

ผลของไนโตรเจน

เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดยาสูบ WT และ TR ในขวดอาหาร MS ที่มีไนโตรเจนระดับความเข้มข้นต่างๆ ต้น WT ขนาดของต้นเล็กและความเข้มของสีบนใบลดลงตามระดับความเข้มของไนโตรเจนที่ลดลง ส่วนต้น TR มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ใบมีสีแดงเพิ่มขึ้น แต่ขนาดของต้นเล็กลง ในขณะที่ความเข้มของสีบนใบแดงเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ลดลง จากการสกัดหาปริมาณแอนโทไซยานิน ต้น TR ใบมีสีแดงและแดงเพิ่มขึ้น เมื่อระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนลดลง ในสภาวะขาดไนโตรเจนต้น TR มีปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 26.25 ต่อกรัมน้ำหนักสด และเมื่อทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ต้น TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไนโตรเจนความเข้มข้นต่าง ๆ มีการแสดงออกของยีน *pap1* ที่ใกล้เคียงกัน และเมื่อทำการวิเคราะห์ยีน *CHS, CHI, F3H, DFR* และ *ANS* พบว่ามีการแสดงออกของยีนมาก เมื่อความเข้มข้นของไนโตรเจนลดลง และต้น WT การแสดงออกของยีนน้อยหรือไม่มีการแสดงออกเลยของยีน *CHS, CHI, F3H, DFR* และ *ANS* ส่วนยีน *F3 ′H* ไม่มีการแสดงออกทั้งต้น WT และต้น TR

ดังนั้น ยีน *pap1* มีผลต่อการสร้างแอนโทไซยานิน เมื่อสภาวะเครียดที่การขาดไนโตรเจนต้นยาสูบ TR มีการสร้างสีแดงเพิ่มขึ้น การแสดงออกของยีน *pap1* สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนโครงสร้าง *CHS, CHI, F3H,* และ *DFR* ที่เกี่ยวข้องใน pathway การสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เนื่องจากยีน *pap1* เป็น transcription factor ที่ไปกระตุ้นการถอดรหัสของยีนโครงสร้าง ได้มากขึ้นในสภาวะเครียดจากการขาดไนโตรเจน

ผลของน้ำตาลซูโครส

การเพาะเลี้ยงต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน *pap1* (ต้นTR) บนอาหารสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่าง ๆ พบว่า เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้นมีผลทำให้ต้นยาสูบ TR มีสีแดงมากขึ้น โดยสังเกตเห็นจากใบเป็นสีแดง-ผลการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินที่แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพาะเลี้ยงต้นยาสูบ TR บนอาหารที่มีความเข้มข้นของซูโครส 200 mM ทำให้มีลักษณะใบที่มีสีแดงเข้มที่สุดเพราะมีปริมาณแอนโทไซยานินมากที่สุด

เมื่อทำการทดสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องใน pathway ในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินพบว่าต้น TR มีระดับการแสดงออกของยีน *pap1* เท่ากันทุกต้น และการทดสอบยีนโครงสร้างคือยีน *CHS, CHI, F3H, DFR* และ *ANS* ต้น TR มีการแสดงออกของยีนมากกว่าต้น WT โดยเฉพาะในการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ซูโครสมีความเข้มข้น 200 mM

ดังนั้น เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้นมีผลส่งเสริมการแสดงออกของยีน *CHS, CHI, F3H, DFR* และ *ANS* ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน *pap1* อาจเกิดจากสภาวะเครียดจากการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลซูโครส มีผลทำให้ยีน *pap1* ซึ่งเป็นยีนสร้าง transcription factor ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนโครงสร้างทำให้แสดงออกและมีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินมากขึ้นจึงทำให้ต้นยาสูบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีซูโครส 200 mM มีการแสดงออกของสีที่แดงเข้มและมีปริมาณแอนโทไซยานินมากขึ้น

ผลของฟอสฟอรัส

การเพาะเลี้ยงต้นยาสูบในสภาวะเครียดโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่างๆ พบว่า ต้นยาสูบ TR ซึ่งมียีน *pap1* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัส 0 mM มีการแสดงออกของสีแดงและการสะสมของปริมาณแอนโทไซยานินมากที่สุด ส่วนต้นยาสูบ WT ไม่มีการเกิดสีแดงและไม่พบการสะสมของปริมาณแอนโทไซยานิน

การแสดงออกของยีน *pap1* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน มีการแสดงออกเฉพาะในต้นยาสูบ TR มีการแสดงออกมาก เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะฟีโนไทป์ (สีแดง) และปริมาณแอนโทไซยานินที่เกิดขึ้นในต้นยาสูบ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสต่ำ จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ ดังนี้ *CHS, CHI, F3H , DFR* และ *ANS* ต้น TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสต่ำมีการแสดงออกของยีน *CHS, CHI, DFR* และ *ANS* มากที่สุด แต่ยีน *F3H* มีการแสดงออกที่เท่ากันทุกระดับความเข้มข้นของฟอสฟอรัส สำหรับต้นยาสูบ WT ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสระดับต่างๆ มียีนที่แสดงออก คือยีน *CHS, CHI* และ *F3H* ซึ่งมีการแสดงออกในระดับที่น้อย เนื่องจากต้นยาสูบ WT ไม่ยีน *pap1* ที่จะควบคุมและส่งเสริมที่จะทำให้เกิดการแสดงออกของยีนเหล่านี้

ดังนั้น การขาดฟอสฟอรัสซึ่งทำให้เกิดสภาวะเครียดแก่ต้นยาสูบ TR มีผลทำให้เกิดการแสดงออกของยีน *pap1* เพิ่มมากขึ้น และเมื่อการแสดงออกของยีน *pap1* เพิ่มมากขึ้นนั้นอาจจะไปควบคุมและส่งเสริมทำให้ยีน *CHS, CHI, DFR* และ *ANS* มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัส 0 mM ทำให้ต้นยาสูบมีสีแดงเกิดขึ้นมาก และมีการสะสมของปริมาณแอนโทไซยานินที่เพิ่มสูงขึ้น แต่สำหรับยีน *CHI* และ *CHS* ก็มีการแสดงออกในต้นยาสูบ WT อาจเพราะเป็นยีนที่มีการแสดงออกอยู่แล้วเพียงแต่การแสดงออกไม่มาก และเมื่อยีน *pap1* แสดงออกมากในต้นยาสูบ TR ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสต่ำ จะไปควบคุมและส่งเสริมทำให้ยีน *CHI, CHS, DFR* และ *ANS* มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้น

สรุปผลการวิจัยข้าว

ผลของไนโตรเจน

เมื่อเพาะเลี้ยงต้นข้าวในอาหารสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนต่าง ๆ กัน พบว่า ต้น WT และต้น TR ที่ย้ายลงอาหารความเข้มข้นต่างๆ มีการแสดงออกใบมีสีเหลืองซีดและมีต้นเล็กลงมากขึ้น เมื่อตามระดับความเข้มของไนโตรเจนที่ลดลง และตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่า ต้น TR และต้น WT มีระดับการแสดงออกของยีนโครงสร้าง ได้แก่ ยีน *CHS, CHI* และ *DFR* แต่ยีน *ANS* ไม่มีการแสดงออกทั้งต้น WT และ TR ในต้น TR ยีน *pap1* ไม่สามารถส่งเสริมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในข้าวได้ ถึงแม้ว่าอยู่ในสภาวะเครียดจากการขาดไนโตรเจน

ผลของน้ำตาลซูโครส

การเพาะเลี้ยงต้นข้าวในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่าง ๆ พบว่า ต้น TR ที่ทำการเพาะเลี้ยงในระดับความเข้มข้นซูโครสต่างๆ มีลักษณะใบสีเขียวและการแตกกอเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มของซูโครสที่เพิ่มขึ้น ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *pap1, CHS, CHI, DFR* และ *ANS* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่า ต้นข้าว TR ที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* ทุกต้นไม่ว่าจะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของซูโครสในระดับใดก็ตามยีน *pap1* มีการแสดงออกที่เท่ากัน และพบว่าต้นข้าว TR มีการแสดงออกของยีน *CHS, CHI และ DFR* ซึ่งมีระดับการแสดงออกเท่ากับต้น WT แม้ว่าต้น WT ไม่มียีน *pap1* ส่วนยีน *ANS* ไม่พบการแสดงออกทั้งในต้น

WT และ TR อาจเนื่องจากยีน *pap1* ไม่สามารถส่งเสริมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในข้าวได้ ถึงแม้ว่าอยู่ในสภาวะเครียดจากการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลซูโครส

ผลของฟอสฟอรัส

การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนของข้าวบนอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของฟอสฟอรัสต่าง ๆ พบว่า ทั้งต้น WT และ TR ไม่เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pap1* ที่เป็นยีนควบคุมการสร้างแอนโทไซยานินรวมถึงยีนโครงสร้างอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแอนโทไซยานิน ยีนโครงสร้างที่ทำการตรวจสอบมีดังนี้คือ *CHS, CHI, DFR* และ *ANS* พบว่าต้นข้าว TR มีการแสดงออกของยีน *pap1* ส่วนการแสดงออกของยีนโครงสร้างต่างๆ ในต้น TR มีการแสดงออกเท่ากันกับต้นข้าว WT ยกเว้น ยีน *ANS* ที่ไม่มีการแสดงออกทั้งต้น WT และ TR คาดว่ายีน *pap1* ในสภาวะขาดฟอสฟอรัสไม่สามารถส่งเสริมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในข้าวได้ ทำให้ต้นข้าวไม่เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

เอกสารอ้างอิง

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

สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่ม 3. 2556. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://kanchanapisek.or.th/kp6/BOOK3/chapter1/chap1.htm. (23 ธันวาคม 2553)

ลัดดาวัลย์ กรรณนุช. **ข้าวเหนียวดำ.** 2553. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www.rakbankerd.com/ preview. (23 ธันวาคม 2553)

สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง. **ยีนความหอมของข้าวหอมมะลิ.** 2546. Lab Today 9, 66-69.

Teltathum, T. Gamma oryzanal quantity in plant product. 2004. **Journal of Agriculture.** 20 (2): 111-119.

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.

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

Kwon Y., J.H. Oh, H.Noh, S. W. Hong, S.H. Bhoo and H. Lee. 2011. The ethylene signaling pathway has a negative impact on sucrose-induced anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. **J Plant Res** 124: 193–200.

Lea U.S., R.Slimestad, P. Smedvig and C. Lillo. 2007. Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway . **Planta** 225: 1245–1253.

Teng. S, J. Keurentjes, L. Bentsink, M. Koornneef and S. Smeekens. 2005 Sucrose-Specific Induction of Anthocyanin Biosynthesisin Arabidopsis Requires the MYB75/PAP1 Gene. **Plant Physiology** 139:1840–1852.

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

Xie, D.Y., S.B. Shashi, e. Wright, Z.Y. Wang and R.A.Dixon. 2006. Metabolic engineering of proanthocyanidins through co-expression of anthocyanidin reductase and the PAP1 MYB transcription factor. **The Plant Journal** 45: 895-907.

Yin.Y,G. Borges, M. Sakuta, A. Crozie, H. Ashihara. 2012. Effect of phosphate deficiency on the content and biosynthesis of anthocyanins and the expression of related genes in suspension- cultured grape (Vitis sp.) cells. **Plant Physiology and Biochemistry** 55:77-84.

Zhang W., Ning G., Lv H., Liao. And Bao M. 2009. Single MYB – type transcription factor AtCAPRICE: A new efficirnt 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.