รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวเพื่อใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้น

Molecular Characterization of Genes Controlling Anthocyanin Biosynthesis in Rice for Use as Marker Genes in Rice Improvement for Enhanced Nutritional Values

โดย

ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ และคณะ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2557

รหัสโครงการวิจัย มจ. 1-56-014

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง **การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวเพื่อใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้น**

Molecular Characterization of Genes Controlling Anthocyanin Biosynthesis in Rice for Use as Marker Genes in Rice Improvement for Enhanced Nutritional Values

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2556
จำนวน 350,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางสาวช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์
ผู้ร่วมโครงการ นายศรีเมฆ ชาวโพงพาง
นางสาวแสงทอง พงษ์เจริญกิต
นางสาววราภรณ์ แสงทอง

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์
29 กันยายน 2557

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยแก่คณะผู้วิจัย ในปีงบประมาณ 2556 ขอขอบพระคุณ Professor Dr. Thomas W. Okita จาก Institute of Biological Chemistry, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้ออะโกรแบคทีเรียม และ binary vector

ขอขอบพระคุณสาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือสำหรับการทำวิจัยเป็นอย่างดี และขอขอบพระคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำหรับการให้ใช้บริการโรงเรือนกระจกสำหรับปลูกพืช

นอกจากนี้ขอขอบคุณนายวิศิษฎ์ พงศ์บุรพัฒน์ นักศึกษาปริญญาตรี สาขาพืชศาสตร์ (พืชผัก) คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ นางสาวพูนศรี อินต๊ะ และนางสาวรอยพิมพ์ สุขเกษม นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่มีส่วนสำคัญทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2557

สารบัญ

สารบัญภาพ

หน้า

หน้า

หน้า

หน้า

หน้า

การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวเพื่อใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้น

Molecular Characterization of Genes Controlling Anthocyanin Biosynthesis in Rice for Use as Marker Genes in Rice Improvement for Enhanced Nutritional Values

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

การสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวมียีนควบคุมที่สำคัญซึ่งเป็นรหัสของโปรตีนทรานสคริพชันแฟคเตอร์ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ศึกษายีนควบคุมจากใบและเมล็ดอ่อนของข้าวเมล็ดสีขาว แดง และดำ จำนวน 3 ยีน ได้แก่ ยีน *OSB1* *OSB2* และ *OSC1* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ coding sequence (cds) จากการศึกษายีน *OSB1* พบการแสดงออกทั้งในข้าวเมล็ดขาวและข้าวสี ขนาดประมาณ 1800 bp แต่ยีนจากข้าวขาว เกิด 1 bp deletion ส่งผลให้กรดอะมิโนหายไป 14 หน่วยทางด้าน C-terminus ส่วนยีน *OSB2* สามารถโคลนได้เฉพาะข้าวพันธุ์สีดำซึ่งประกอบด้วย open reading frame (ORF) ขนาด 1356 bp มีความเหมือนกับยีน *OSB2* ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (accession no. AB021080) ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ และ ORF ขนาด 1101 bp ซึ่งมีบริเวณ exon ที่ 2 ขาดหายไป (255 คู่เบส) ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของ ORFs ขนาด 1356 bp และ 1101 bp พบว่า ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 451 และ 366 หน่วย

ตามลำดับ ซึ่งมีความคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSB2* ในฐานข้อมูล GenBank (accession no. BAB64302) ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน แสดงว่ายีน *OSB2* ที่โคลนได้ในงานวิจัยนี้อาจมี 2 รูปแบบ หรืออาจมียีนรูปแบบเดียวในจีโนมข้าวแต่เกิดการเลือกตัดอินทรอน (alternative splicing) สำหรับการศึกษายีน *OSC1* พบยีนแสดงออกทั้งในข้าวเมล็ดขาวและสี โดยสามารถโคลนยีนได้จากข้าวเมล็ดขาวและแดงที่ประกอบด้วย ORF ขนาด 809 bp ซึ่งมีลำดับเบสหายไป 10 bp ที่ตำแหน่งเดียวกัน ส่งผลให้เกิด stop codon ทำให้กรดอะมิโนสั้นกว่ากรดอะมิโนจากข้าวสีในฐานข้อมูล (accession no. Y15219) การเข้าใจโครงสร้างของยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวขาวและข้าวสี จะเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์ระดับโมเลกุลและเทคนิคพันธุวิศวกรรมได้ในอนาคต

คำสำคัญ: ข้าว, แอนโทไซยานิน, ยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

Abstract

The regulatory genes encode transcription factors that regulate expression of structural genes in anthocyanin biosynthesis pathway in rice. In this study, cloning of regulatory genes from young leaves and developing seeds of white, red and black rice varieties was performed by RT-PCR. The complete coding sequences (cds) of *OSB1* genes were isolated from white and black rice varieties. The 1 bp deletion was found in *OSB1* genes of white rice varieties, resulting in the occurrence of a premature stop codon and leading to the truncation of 14 amino acids at the C-terminus. The complete coding sequences (cds) of *OSB2* genes were isolated from young leaves and developing seeds of rice by RT-PCR. Nucleotide sequencing analysis revealed that all 5 black rice varieties showed a single open reading frame (ORF) of 1356 bp which was 99 % identity with *OSB2* gene reported in GenBank (accession no. AB021080). These rice varieties also had *OSB2* gene containing a single ORF of 1101 bp with 99 % identity with 1356 bp fragments except the deletion of 2ndexon (255 bp deletion). The deduced amino acid sequences of the 1356 and 1101 bp ORFs consisted of 451 and 366 amino acid residues, respectively which

showed 99 % similarity to that of *OSB2* reported in GenBank (accession no. BAB64302). The results suggested that the *OSB2* genes from this study may have 2 forms. Alternatively, the 1356 bp and 1101 bp ORFs may be due to alternative splicing of mRNA transcribed from a single *OSB2* gene in rice genomes of these black rice varieties. The coding sequences of *OSC1* gene in white and red rice varieties had a single ORF of 809 bp. The 10 bp deletion was found in both sequences resulting in the occurrence of a premature stop codon and leading to the polypeptides shorter than those of black rice varieties from GenBank (accession no. Y15219). The understanding of structure of regulatory genes in anthocyanin biosynthesis in white and colored rice varieties will be beneficial to use as marker genes for improvement of rice by molecular breeding and genetic engineering in the future.

Keywords: rice, anthocyanin, regulatory genes in anthocyanin biosynthesis

คำนำ

แอนโทไซยานิน (anthocyanin) คือรงควัตถุที่พบในดอกไม้และผลไม้ และเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระที่เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ในการป้องกันโรคมะเร็ง เส้นเลือดอุดตัน และลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (Geekiyanage et al., 2007) ในข้าวสีที่มีแอนโทไซยานินได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเพราะจากประโยชน์ดังกล่าว ทำให้ข้าวเป็นแหล่งแอนโทไซยานินที่หาง่ายและราคาไม่แพง

ข้าวประกอบด้วยฟลาโวนอยด์ (flavonoid) 3 กลุ่ม คือ แอนโทไซยานิน (รงควัตถุสีแดงถึงม่วง) ฟลาโวนอล (flavonols) (รงควัตถุไม่มีสีถึงเหลืองอ่อน) และโปรแอนโทไซยานิดิน (proanthocyanidin) (รงควัตถุสีแดงและสีน้ำตาล) แอนโทไซยานินจะถูกสังเคราะห์ในเนื้อเยื่อพืช (vegetative parts) และโปรแอนโทไซยานิดินถูกสังเคราะห์ในเยื่อหุ้มเมล็ด (pericarp) ส่วนการสังเคราะห์ฟลาโวนอลเกิดขึ้นทั้งในเนื้อเยื่อพืชและเยื่อหุ้มเมล็ด (Raddy et al., 1995) สำหรับข้าวสีเป็นข้าวที่มีแอนโทไซยานินในปริมาณที่สูงสะสมอยู่บริเวณชั้นของเยื่อหุ้มเมล็ด โดยแอนโทไซยานินหลักที่พบในพืชมี 6 ชนิด ได้แก่ delphinidin, cyanidin, pelargonidin, petunidin, peonidin และ malvidin ซึ่งรงควัตถุแอนโทไซยานินหลักที่พบในข้าวดำคือ cyanidin และมี peonidin รองลงมา ดังนั้นจึงทำให้ข้าวสีมีคุณค่าทางอาหารมากกว่าข้าวขาว ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีในข้าวคือยีนควบคุม (regulatory genes) และยีนโครงสร้าง (structural genes) โดยยีนควบคุมเป็นรหัสของทรานสคริปชันแฟคเตอร์ (transcription factor) ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ส่วนยีนโครงสร้างเป็นรหัสของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ดังนั้นยีนควบคุมจึงมีความสำคัญมากในการทำให้เกิดสีในข้าว เนื่องจากไปควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างหลายยีน อย่างไรก็ตามกลไกการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยการทำงานของยีนควบคุมและยีนโครงสร้างในข้าวยังไม่ทราบแน่ชัด ดังนั้นงานวิจัยนี้จะได้ศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเพื่อทำให้เข้าใจกลไกการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ และเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจให้กับข้าวที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีอยู่แล้ว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อโคลนยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว
2. เพื่อศึกษาโครงสร้างของยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถโคลนยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินจากข้าวได้
2. ได้ทราบโครงสร้างของยีน และทราบความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอของยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวเมล็ดสีขาว แดง และดำ

การตรวจเอกสาร

ความสำคัญทางเศรษฐกิจของข้าว

ข้าวจัดเป็นอาหารหลักที่มีความสำคัญต่อประชากรโลก ประชากรกว่าครึ่งโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก ประเทศไทยนั้นมีการบริโภคข้าวเป็นอาหารหลักและเป็นแหล่งของอาหารที่ให้พลังงานที่สำคัญ อีกทั้งข้าวยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในประเทศและต่างประเทศโดยเฉพาะประเทศในภูมิภาคเอเชียที่นิยมรับประทานข้าวเป็นอาหารหลักมากกว่าในภูมิภาคอื่นของโลก

ดังนั้นการผลิต การบริโภค และการค้าข้าวส่วนใหญ่จึงกระจายตัวอยู่ในทวีปเอเชีย โดยปีการผลิต 2556/57 ทั่วโลกมีผลผลิตข้าวสารรวม 471.51 ล้านตัน ปริมาณผลผลิตรวมที่คาดว่าจะได้รับมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากปีที่แล้ว 2.01 ล้านตันข้าวสาร หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 0.43 ประเทศที่มีปริมาณผลผลิตรวมมากที่สุด คือ จีน (ร้อยละ 30.46) รองลงมาได้แก่ อินเดีย (ร้อยละ 22.24) อินโดนีเซีย (ร้อยละ 7.78) บังคลาเทศ (ร้อยละ 7.20) เวียดนาม (ร้อยละ 5.90) ไทย (ร้อยละ 4.30) ฟิลิปปินส์ (ร้อยละ 2.43) และพม่า (2.27) ตามลำดับ ซึ่งไทยมีผลผลิตข้าวอยู่ที่อันดับ 6 สำหรับสถานการณ์การบริโภคและใช้ประโยชน์จากข้าวของโลก ปีการผลิต 2555/56 กระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา ได้ประเมินเบื้องต้นว่า ทั่วโลกจะมีปริมาณการบริโภคและใช้ประโยชน์จากข้าวรวม 467.069 ล้านตันข้าวสาร ปริมาณเพิ่มขึ้นจากปีการผลิต 2554/55 (ที่ระดับ 460.045 ล้านตันข้าวสาร) จำนวน 7.024 ล้านตันข้าวสาร หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.53

สำหรับประเทศไทยปริมาณการส่งออกข้าวในปีการค้า 2557 จะมีปริมาณ 8.500 ล้านตันข้าวสาร เพิ่มขึ้นจากปีที่ผ่านมา 1.800 ล้านตันข้าวสาร หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 26.87 โดยไทยส่งออกข้าวเป็นลำดับที่ 2 รองจากอินเดีย ส่วนการนำเข้าข้าวสารในปีการค้า 2556 (ปีการผลิต 2555/56) ประเทศที่มีการนำเข้าสูงสุดคือ จีน รองลงไปได้แก่ ไนจีเรีย อิหร่าน อิรัก สหภาพยุโรป ไอวอรี่โคสต ซาอุดิอาระเบีย เซเนกัล และฟิลิปปินส์ ตามลำดับ (กรมการข้าว, 2557) ซึ่งจะเห็นได้ว่าปัจจุบันทั่วโลกมีการผลิตข้าวเพิ่มมากขึ้นจากปีก่อน อีกทั้งมีการเติบโตของปริมาณการส่งออกและการนำเข้าข้าวในแต่ละประเทศมากขึ้นในแต่ละปี ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประชากรโลกมีความต้องการบริโภคและใช้ประโยชน์จากข้าวในปริมาณเพิ่มขึ้น

ประวัติและความเป็นมาของข้าว

ข้าวเป็นพืชล้มลุกตระกูลหญ้าที่จัดอยู่ในสกุลออไรซา (Genus Oryza) ของวงศ์เกรมินี (Family Paoceae หรือ Gramineae) สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น

จำนวนชนิด (species) ทั้งหมดที่พบในสกุลออไรซาของข้าวนั้นมีประมาณ 20 ชนิด โดยส่วนใหญ่จะเป็นพวกที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2 ชุด (diploid, 2n = 24) และส่วนน้อยเป็นพวกที่มีโครโมโซม 4 ชุด (tetraploid 2n = 48) เนื่องจากความแตกต่างทางสภาพพื้นที่และภูมิอากาศของแหล่งปลูกข้าว จึงเป็นสาเหตุให้มีการแบ่งข้าว *Oryza sativa* L. เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1. ข้าวอินดิกา (*indica*) เป็นข้าวที่มีเมล็ดยาวเรียว เจริญเติบโตได้ดีในบริเวณเขตร้อน เช่น ศรีลังกา จีนตอนใต้และตอนกลาง อินเดีย อินโดนิเซีย บังกลาเทศ ไทย ฟิลิปปินส์ เป็นต้น

2. ข้าวจาปอนิกา (*japonica*) เป็นข้าวเมล็ดสั้นป้อม มีเปอร์เซ็นต์อะไมโลสต่ำ เจริญเติบโตได้ดีในเขตอบอุ่น เช่น ประเทศจีนตอนเหนือและตะวันออก ญี่ปุ่น เกาหลี ยุโรปตอนใต้ รัสเซีย อเมริกาใต้ เป็นต้น

3. ข้าวจาวานิกา (*javanica*) เป็นข้าวต้นสูง เมล็ดป้อมใหญ่ สันนิษฐานว่าเกิดขึ้นจากการคัดเลือกพันธุ์มาจากข้าวอินดิกาและได้นำเข้ามาปลูกในประเทศอินโดนิเซียครั้งแรกในระยะเวลามากกว่า 1,800 ปีก่อนศริสตกาล และต่อมาก็ได้มีการนำเข้ามาปลูกในประเทศฟิลิปปินส์ ไต้หวัน และญี่ปุ่น อย่างไรก็ตามข้าวจาวานิกานี้ส่วนใหญ่จะปลูกในประเทศอินโดนิเซีย (บุญหงส์, 2547)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว

ส่วนต่างๆ ของต้นข้าวที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตทางลำต้น ได้แก่ ราก ลำต้น และใบ มีลักษณะสำคัญคือ

1. ราก (Root) ข้าวมีระบบรากเป็นระบบรากฝอย (Fibrous root system) ซึ่งประกอบด้วยราก 2 ชนิด ได้แก่ รากปฐมภูมิ (Primary root) ที่มีชื่อเรียกว่า รากแรกเกิด (Seminal root) ซึ่งงอกออกมาจากส่วนของเรดิเคิล (Radical) รากชนิดนี้เป็นรากชั่วคราวทำหน้าที่รองรับส่วนต่างๆ ของต้นข้าวให้ทรงตัวอยู่ได้ และรากทุติยภูมิ (Secondary root) ที่มีชื่อเรียกว่า รากเสริม (Adventitious root) รากชนิดนี้จะงอกออกมาจากส่วนของข้อล่างๆ ใต้ดินของลำต้นใหม่ ในทิศทางขนานกับผิวดิน และมีการแตกแขนงข้อรากอย่างอิสระ เป็นรากที่เกิดขึ้นเพื่อทดแทนรากแรกเกิดเมื่อต้นข้าวเจริญเติบโตและมีอายุมากขึ้น อาจมีรากค้ำจุน (Prop roots) เกิดขึ้นโดยรอบข้อเหนือระดับดิน และรากชนิดนี้อาจเกิดขึ้น บริเวณส่วนปลายของลำต้น บริเวณใกล้ผิวน้ำในพันธุ์ข้าวขึ้นน้ำ

รากข้าวนอกจากจะทำหน้าที่ดูดน้ำและแร่ธาตุ ยังช่วยในการยึดลำต้นข้าวไว้กับพื้นดินเพื่อไม่ให้ล้ม นอกจากนั้นอาจทำหน้าที่สะสมอาหารที่เหลือใช้ไว้ให้ต้นข้าวใช้ในช่วงขาดแคลน และอาจทำหน้าที่ช่วยในการหายใจได้อีกด้วย โดยนำออกซิเจนไปใช้ ทั้งนี้เป็นเพราะเซลล์

ต่างๆ ในชั้นเนื้อเยื่อคอร์เท็กซ์ (Cortex) ที่อยู่ถัดจากชั้นผิวราก (Epidermis) เข้ามาข้างในมีการสลายตัวเป็นช่องอากาศขนาดใหญ่ (Lysigemous intercellular space) ทำให้รากข้าวสามารถแช่อยู่ในน้ำขังได้

2. ลำต้น (Stem or culm) ลำต้นของข้าวมีลักษณะทรงกลม ส่วนกลางกลวงตรงส่วนของปล้อง (Internode) และต้นตรงส่วนของข้อ (Node) โดยทั่วไปลำต้นจะมีลักษณะตั้งตรง เช่น ในข้าวนาสวน (Lowland rice) ลำต้นข้าวอาจมีลักษณะเลื้อยหรือล้มราบ โดยชูเฉพาะส่วนของยอดขึ้นตั้งตรง ในระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นของข้าว

ปล้อง (Internode) ลักษณะของปล้องที่โคนต้นจะสั้น และหนากว่าปล้องที่อยู่ตรงส่วนปลายของลำต้น โดยปกติต้นข้าวจะมีปล้องยาวประมาณ 25-30 ปล้อง ขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวและสภาพแวดล้อม ปล้องสุดท้ายที่อยู่บนสุดใต้รวงข้าว จะมีความยาวมากที่สุด

ข้อ (Node) ของลำต้นซึ่งทำหน้าที่แบ่งลำต้นออกเป็นปล้องๆ นั้นจะมีตาเกิดขึ้นข้อละ 1 ตา ที่บริเวณซอกใบของแต่ละใบซึ่งเกิดขึ้นสลับกันในแต่ละข้อของลำต้น ความสูงของลำต้นอาจอยู่ระหว่าง 100-200 เซนติเมตร ซึ่งขึ้นอยู่กับพันธุ์และสภาพแวดล้อมต้นข้าวจะมีการยืดปล้อง (Internode elongation) ในเวลาที่เริ่มสร้างช่อดอก โดยเกิดขึ้นที่ปล้อง 2-3 ใต้ร่วงข้าวลงมา

3. ใบ (Leaf) ใบของข้าวจัดเป็นใบเดี่ยว (Simple leaf) ที่เป็นใบแท้ มีลักษณะเป็นแผ่นแบนบาง ค่อนข้างยาวรูปหอก ใบข้าวประกอบด้วยตัวใบ (Leaf blade) และกาบใบ (Leaf sheath) โดยมีข้อต่อใบ (Leaf collar) เป็นตัวแบ่งให้กาบใบแยกออกจากตัวใบอย่างเห็นได้ชัด ตัวใบจะยืดออกจากลำต้นโดยทำมุมกว้างหรือแคบกับลำต้น ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์ข้าว เส้นใบของข้าวจะขนานกันตั้งแต่โคนถึงปลายใบ และมีเส้นกลางใบ (Midrib) แบ่งตัวใบออกเป็น 2 ซีกเท่าๆ กัน พันธุ์ข้าวส่วนใหญ่มักมีขนอ่อนบนใบ กาบใบจะทำหน้าที่ลำเลียงน้ำ และแร่ธาตุจากราก และลำต้นไปยังใบเพื่อใช้ปรุงอาหาร และลำเลียงอาหารสังเคราะห์จากตัวใบไปยังส่วนต่างๆ ของต้นข้าว นอกจากนั้นกาบใบยังช่วยสะสมอาหารไว้สำหรับรวงข้าวและช่วยเสริมให้ลำต้นแข็งแรงขึ้นอีกด้วย ตรงบริเวณด้านในข้อต่อใบจะปรากฏเยื่อบางๆ รูปสามเหลี่ยมมีปลายแยกออกเป็นสองแฉก แนบติดกับส่วนของลำต้น เรียกว่า เยื่อกันน้ำฝน (Ligule) นอกจากนี้ที่บริเวณนี้ยังมี เขี้ยวกันแมลง (Auricles) 2 อัน ซึ่งมีลักษณะเป็นขนรูปร่างโค้งคล้ายเคี้ยวติดอยู่ข้างละอันของข้อต่อใบ การที่ใบข้าวมีทั้งเยื่อกันน้ำฝน และเขี้ยวกันแมลงอยู่ด้วยกัน จึงทำให้แตกต่างจากใบของต้นหญ้า ซึ่งมักมีอวัยวะดังกล่าวเพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง หรืออาจจะไม่มีเลยก็ได้ อย่างไรก็ตามในใบข้าวที่แก่แล้ว อาจไม่ปรากฏเขี้ยวกันแมลงให้เห็น เพราะได้ร่วงหล่นไปก่อนแล้ว (บุญหงส์, 2547)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว

ประเทศไทยอยู่ในเขตศูนย์กลางแหล่งกำเนิดและการแพร่กระจายของข้าว ประกอบกับสภาพพื้นที่และภูมิอากาศมีความแตกต่างกันในแต่ละภาค จึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวในแหล่งปลูกข้าวต่างๆ ทั่วประเทศไทย ทั้งในข้าวปลูกและข้าวป่า ข้าวปลูกมีอยู่ด้วยกันมากมายหลายพันธุ์ซึ่งเหมาะสมกับแต่ละพื้นที่ โดยจำแนกตามนิเวศการปลูกข้าวออกเป็นข้าวไร่ ข้าวนาสวนน้ำฝน ข้าวนาสวนนาชลประทาน ข้าวน้ำลึก และข้าวขึ้นน้ำ (กรมการข้าว, 2557) นอกจากนี้ยังมีข้าวที่มีเมล็ดสีแดงซึ่งเป็นข้าวป่าหรือข้าวพื้นเมืองที่มีการสะสมแอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดินในส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ด โดยข้าวเมล็ดม่วงดำเกิดจากการสะสมของแอนโทไซยานิน ส่วนข้าวเมล็ดสีแดงเกิดจากการสะสมโปรแอนโทไซยานิดิน ซึ่งสารทั้งสองมีวิถีการสังเคราะห์และสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ร่วมกัน ในข้าวเมล็ดม่วงดำมียีน *OSB1* ซึ่งเป็นยีนควบคุม (regulatory gene) ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินที่สามารถทำงานได้ ส่วนในข้าวเมล็ดแดงและขาวไม่พบการทำงานของยีนดังกล่าว (Lim and Ha, 2013) ส่วนในข้าวเมล็ดแดงมียีน *Rc* และ *Rd* ควบคุมการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดินโดยยีน *Rc* เป็นยีนควบคุม (regulatory gene) ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในวิถีการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิดิน ซึ่งในข้าวม่วงดำและข้าวขาวเป็นอัลลีลด้อย ส่วน *Rd* เป็นรหัสของเอนไซม์ DFR ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดิน ซึ่งไม่ทำงานเฉพาะในข้าวขาว (Lim and Ha, 2013) ข้าวที่มีการสะสมแอนโทไซยานิน ได้แก่ ข้าวหอมนิลซึ่งลักษณะสีม่วงเข้มเกือบดำ (บริษัท สีนิล ไรซ์ จำกัด, ระบบออนไลน์: 2556) ข้าวก่ำหรือข้าวเหนียวดำที่มีลักษณะเด่นคือมีสีม่วงดำทั้งลำต้นและเมล็ด (ผู้จัดการออนไลน์, ระบบออนไลน์: 2557)

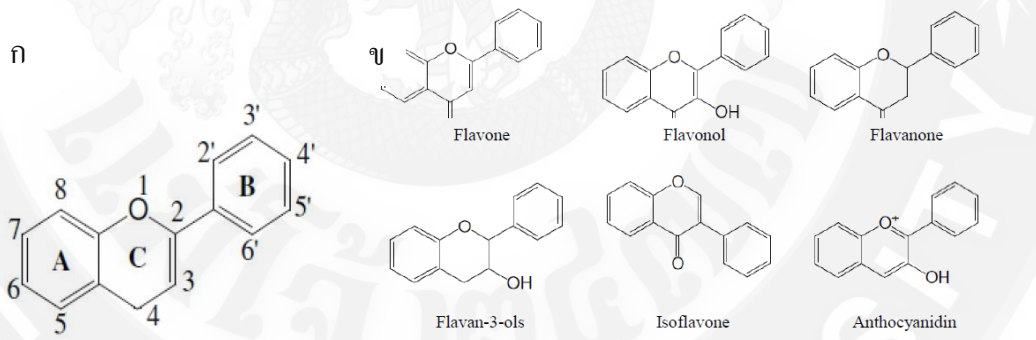
ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นสาร secondary metabolites อยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิค (phenolic compounds) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ในโมเลกุล สามารถละลายน้ำได้ ส่วนใหญ่มักพบอยู่รวมกับน้ำตาลในรูปของสารประกอบกลูโคไซด์ ฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มสารที่มีคาร์บอน 15 ตัว จัดเรียงในระบบ 3-ring เรียก A-, B-, C-ring การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ C-ring ทำให้แยกฟลาโว - นอยด์ออกเป็นชนิดต่างๆ และ hydroxylation ที่ A- และ B-ring ตามตำแหน่งต่างๆ ทำให้เกิดอนุพันธุ์ของฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ (ภาพที่ 1) ฟลาโวนอยด์ถูกสังเคราะห์โดย polypropanoid pathway และเริ่มต้นจากโมเลกุล phenylalanine มีโครงสร้างพื้นฐานคือ C6-C3-C6 ประกอบด้วยสอง

วงแหวนอะโรมาติก C6 rings (A และ B) และ heterocyclic ring (C) ที่มี 1 oxygen atom ซึ่งถูกจัดกลุ่มเป็น 6 กลุ่ม (Ghasemzadeh and Ghasemzadeh, 2011) คือ

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

ฟลาโวนอยด์พบทั่วไปในพืชและพวกโปรคาริโอต มีฟลาโวนอยด์มากกว่า 6,500 ชนิด ฟลาโวนอยด์ปกป้องพืชจากความเครียดทั้ง biotic และ abiotic stresses และ ดูดซับรังสี UV ที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ ฟลาโวนอยด์ไม่จำเป็นสำหรับการอยู่รอดของพืชแต่ช่วยในการขนส่งฮอร์โมนออกซิน นอกจากนี้ทำให้เกิดสีในดอกไม้และปกป้องพืชจากจุลินทรีย์และแมลง (Samanta et al., 2011)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์

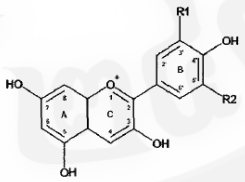
หมายเหตุ (ก) โครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์ และ (ข) โครงสร้างของสารในกลุ่มฟลาโว-นอยด์

ที่มา: Ghasemzadeh and Ghasemzadeh, 2011

แอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานินเป็นสารที่ละลายน้ำได้อยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ ทำให้เกิดสีแดง ม่วง ฟ้า ในใบ ดอก และผลไม้ มีความคงตัวดี แอนโทไซยานินหลักที่พบในพืชมี 3 ชนิด ในรูปของกลูโคไซด์ ได้แก่ delphinidin 3-glucoside, palargonidin 3-glucoside และ cyanidin 3-glucoside (ภาพที่ 2) (อ้อมบุญ, 2536)

แอนโทไซยานินเป็นสารที่มีสีน้ำเงินเข้มในสภาวะเป็นด่าง สีม่วงเมื่อเป็นกลาง และเปลี่ยนเป็นสีแดงถึงส้มในสภาวะเป็นกรด เป็นสารสีที่พบได้ทั่วไปในดอกไม้ ผลไม้บางชนิด ใบหรือลำต้นของพืชบางชนิดที่มีสีจัด แอนโทไซยานินพบได้ในพืชเกือบทุกชนิดแต่จะมีน้อยมากในพืชที่มีสีเขียวเป็นหลัก แต่ผลไม้ที่มีสีเข้มจัดหรือดอกไม้สีจัดจะมีแอนโทไซยานินอยู่สูง และมากขึ้นตามระดับความเข้มของสีในผลไม้ พืชที่มีแอนโทไซยานิน ได้แก่ องุ่น สตอเบอรี่ บลูเบอร์รี่ เชอร์รี่ หม่อน ชมพู่มะเหมี่ยว ทับทิม ลูกหว้า ลูกไหน ลูกพรุน เผือก และ กระเจี๊ยบแดง เป็นต้น ส่วนในดอกไม้ ได้แก่ ดอก pansy, dandelion และ ดอกอัญชัน เป็นต้น และในผัก ได้แก่ หัวผักกาด มันเทศ มะเขือม่วง และ กะหล่ำปลีสีม่วง เป็นต้น ส่วนในข้าวที่มีแอนโทไซยานิน เช่น ข้าวหอมนิล และข้าวเหนียวดำ เป็นต้น (บริษัท แช็ท ฟอร์ เฮลท์ จำกัด, ระบบออนไลน์: 2555) สำหรับในข้าว (*Oryza sativa* L.) โดยทั่วไปมีใบสีเขียวและเมล็ดสีขาว แต่พันธุ์ข้าวป่ามีสีเมล็ดที่หลากหลาย จากการศึกษารายงานว่าเมล็ดข้าวที่สร้างรงควัตถุมี phytochemicals เช่น phenolics, flavonoids, carotenoids, tocols และ c-oryzanols มากกว่าข้าวขาว ซึ่งสารเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Lim and Ha, 2013) ดังนั้นนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวและผู้บริโภคจึงให้ความสำคัญต่อพันธุ์ข้าวที่สร้างรงควัตถุเหล่านี้เนื่องจากมีประโยชน์ต่อมนุษย์



Anthocyanidins	R1	R2
Delphinidin	OH	OH
Cyanidin	OH	H
Pelargonidin	H	H
Petunidin	OCH_3	OH
Peonidin	OCH_3	H
Malvidin	OCH_3	OCH_3

ภาพที่ 2 โครงสร้างของแอนโทไซยานิน

ที่มา: Kim et al., 2007

ประโยชน์ของแอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานินมีบทบาททำให้เกิดรงควัตถุในดอกไม้และผลไม้เพื่อดึงดูดให้แมลงช่วยในการผสมเกสร และยังปกป้องพืชจากการการทำลายของเชื้อโรค การบุกรุกของแมลง และรังสี UV อีกทั้งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ในการป้องกันโรคมะเร็ง และเส้นเลือดอุดตัน (Geekiyanage et al., 2007) รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ ต้านจุลินทรีย์ ป้องกันการอักเสบ และป้องกันความดันโลหิตสูง (Lim and Ha., 2013) ในข้าวสีนิลมีรงควัตถุพวกแอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดิน สารทั้งสองชนิดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเซลล์มะเร็ง ป้องกันไวรัส ลดอัตราการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน แก่ช้าลง ผิวดูอ่อนวัย และลดอาการผมหงอกก่อนวัย (บริษัทสีนิล ไรซ์ จำกัด, ระบบออนไลน์: 2555) สำหรับแอนโทไซยานินในดอกอัญชัน และจากพืชตระกูลบลูเบอร์รี่ สามารถเพิ่มความสามารถในการมองเห็นหรือชะลอความเสื่อมของดวงตา เนื่องจากเพิ่มความสามารถในการไหลเวียนเลือดในหลอดเลือด ลดปัญหาที่เกิดกับระบบหมุนเวียนของเลือด (บริษัท แซ็ท ฟอร์ เฮลท์ จำกัด, ระบบออนไลน์: 2555)

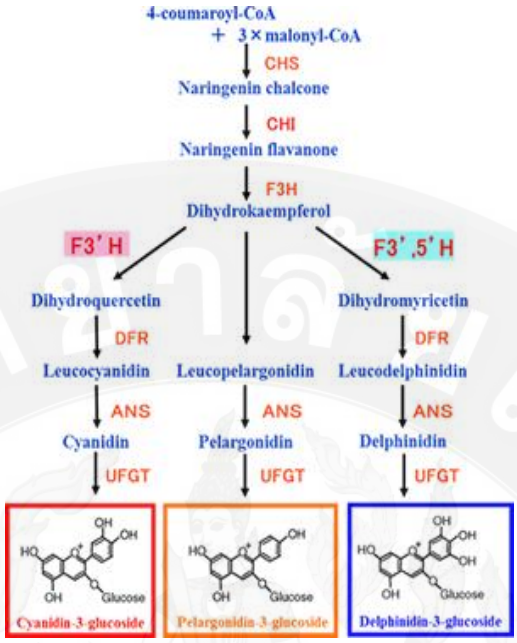
การสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

การสังเคราะห์แอนโทไซยานินเกี่ยวข้องกับยีน 2 กลุ่ม คือ ยีนโครงสร้าง และยีนควบคุม ซึ่งเปลี่ยนกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนไปเป็นแอนโทไซยานินที่มีสีม่วงแดง (ภาพที่ 3) การสร้างรงควัตถุแอนโทไซยานินในข้าวจำเป็นต้องมียีนเด่น 3 กลุ่ม ที่เป็นรหัสของ transcription factor 2 กลุ่ม คือ *B1* หรือ *B2* (basic helix-loop-helix) และ *C1* (R2R3-Myb) และเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน คือ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) (Furukawa et al. 2007; Nagao and Takahashi 1963; Saitoh et al., 2004 และ Sakamoto et al., 2001) จึงจะทำให้ข้าวสามารถสังเคราะห์แอนโทไซยานินได้

ยีนโครงสร้าง (structural genes)

ในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเกี่ยวข้องกับยีนโครงสร้างหลายยีน เพื่อเปลี่ยนกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนไปเป็นแอนโทไซยานิน ยีนโครงสร้างที่สำคัญ ได้แก่ ยีนสร้างเอนไซม์ chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI), flavonoid 3-hydroxylase (F3H), dihydroflavonol 4-reductase (DFR), anthocyanidin synthase (ANS), flavonoid 3-glucosyl - transferase (3GT) และ phenyl alanine ammonia lyase (PAL) (Schijlen et al., 2004)

สารตั้งต้นของการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน คือ malonyl-CoA และ *p*-coumaroyl-CoA ซึ่งมาจาก carbohydrate metabolism และ phenylpropanoid pathway ในการสังเคราะห์ฟลาโวนอย์เอนไซม์ตัวแรกในปฏิกิริยาที่ทำงาน คือ chalcone synthase (CHS) เร่งปฏิกิริยาให้ malonyl-CoA 3 โมเลกุล รวมกับ *p*-coumaroyl-CoA ได้เป็น naringenin chalcone จากนั้นเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) เปลี่ยนโครงสร้าง naringenin chalcone ไปอยู่ในรูปของ flavanone naringenin เอนไซม์ flavonoid 3-hydroxylase (F3H) เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ OH (hydroxylation) ที่ตำแหน่ง C-3 ของ flavanone ได้เป็น dihydroflavonoid ซึ่ง flavanone naringenin จะถูกเปลี่ยนเป็น dihydrokaempferol (DHK) จากนั้นเอนไซม์ flavonoid 3′-hydroxylase (F3′H) เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ OH (hydroxylation) ที่ตำแหน่ง 3′ หรือทั้งตำแหน่ง 3′ และ 5′ ของ B-ring ทำให้เปลี่ยน dihydrokaempferol (DHK) ไปเป็น dihydroquerectin (DHQ) ที่จะถูกเปลี่ยนไปเป็น cyanidin อีกทั้งสามารถเปลี่ยนรูป DHK ไปเป็น dihydromyricetin (DHM) สำหรับการสร้าง delphinidin จากนั้นเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) เร่งปฏิกิริยา reduction โดยเปลี่ยน dihydroflavonoid ได้เป็น leucoanthocyanidins (flavan-3,4-dilo) โดยใช้ NADPH เป็น co-factor ซึ่ง leucoanthocyanidins เป็นสารตั้งต้นโดยตรงสำหรับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน โดยเอนไซม์ anthocyanidin synthase (ANS) เปลี่ยน leucoanthocyanidins ไปเป็น anthocyanidins และเอนไซม์ flavonoid 3-glucosyl - transferase (3GT/FGT/GT) จะเร่งปฏิกิริยาการขนส่งกลูโครสจาก UDP-glucose ไปยัง hydroxyl group ในตำแหน่งที่ 3 ของ C-ring ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายที่ทำให้ anthocyanidins มีความสเถียร ซึ่ง 3GT เป็นเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Schijlen et al., 2004)



ภาพที่ 3 วิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืช

ที่มา: Mizuta, 2014

ยีนโครงสร้างที่สำคัญในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว คือ ยีน *DFR* ซึ่งเป็นยีนใน late biosynthetic steps ของวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ยีน *DFR* ประกอบด้วย 3 เอกซอน และ 2 อินทรอน ในข้าวเมล็ดขาวยีน *DFR* เกิดการแทนที่เบสจาก C เป็น A ในเอกซอนที่ 2 ทำให้เกิด premature stop codon ซึ่งการกลายพันธุ์นี้อาจส่งผลทำให้เมล็ดข้าวมีสีขาวเนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดินได้ (Furukawa et al., 2007) นอกจากนี้มีการศึกษาถ่ายยีน *OSB2* จากข้าวร่วมกับยีน *C1* จากข้าวโพด เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath ซึ่งมียีน *DFR* ที่สามารถทำหน้าที่ได้ เพื่อใช้สำหรับเป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีนจากลักษณะของการสร้างสีม่วงของแอนโทไซยานินแทนการใช้สารปฏิชีวนะในการคัดเลือกได้สำเร็จ ซึ่งแคลลัสข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนมีจุดสีม่วงเกิดขึ้น (Saika et al., 2011)

ยีนควบคุม (regulatory genes)

ยีนควบคุมเป็นรหัสของ transcription factor ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินที่สำคัญมี 2 กลุ่มคือ MYB transcription factor ซึ่งประกอบด้วยบริเวณกรดอะมิโนซ้ำ 2 บริเวณ (R2 และ R3) บริเวณ R2 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 53 ตัว และ R3 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 51 ตัว ซึ่งมี DNA binding domain เป็นแบบ helix-turn-helix (HTH) (Zhou et al., 2008) และอีกกลุ่มหนึ่งคือ MYC transcription factor มี DNA binding domain เป็นแบบ helix-loop-helix (Geekiyanage et al., 2007)

ในข้าวโพดมียีนควบคุม 2 กลุ่ม คือ *R/B* และ *C1/Pl* gene families สมาชิกกลุ่มของ *R/B* gene families (*R, Lc, Sn* และ *B*) เป็นรหัสของ helix-loop-helix (bHLH) myc-type protein ส่วนสมาชิกของ *C1/Pl* gene families เป็นรหัสของ myb-related reguratory protein การกระตุ้นยีนโครงสร้างในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับการทำงานของยีนในกลุ่ม *R/B* และ *C1/Pl* อย่างน้อยหนึ่งยีนที่ทำหน้าที่ (active functional gene) จากแต่ละ gene family ต่อการสังเคราะห์รงควัตถุในเนื้อเยื่อ (Sakamoto et al., 2001) มีการศึกษาการถ่ายยีน *C1* (MYB–type transcription factor) และ *R-S* (bHLH–type transcription factor) จากข้าวโพด ซึ่งเป็นยีนควบคุมในการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ เข้าสู่ข้าวโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม พบว่ามีการแสดงออกของยีน *C1* และ *R-S* ในเมล็ดข้าวโดยเมล็ดของต้น homozygous transgenic lines รุ่น T_2 และ T_3 มีสีน้ำตาลเข้มและเมล็ดเล็กกว่าเมล็ดรุ่น T_1 และเมล็ดจากต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน เนื่องจากต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมมีการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์หลายชนิด (Shin et al., 2006) แสดงว่ายีนเหล่านี้จากข้าวโพดสามารถทำงานได้ในข้าว

การสร้างแอนโทไซยานินในข้าวสี

ข้าว (*Oryza sativa*) ที่บริโภคส่วนมากมีเยื้อหุ้มเมล็ดสีขาวและใบสีเขียว แต่ข้าวบางพันธุ์มีเยื่อหุ้มเมล็ดที่เป็นสีน้ำตาล แดง ม่วง และใบสีม่วง ข้าวที่มีเมล็ดสีม่วงและน้ำตาลมีแอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดิน ตามลำดับ (Sweeney et al., 2006) การเกิดสีโดยแอนโทไซยานินถูกควบคุมโดยยีนโครงสร้างและยีนควบคุม จากรายงานของ Kinoshita (1995) ได้สรุปว่ามี 26 ยีน ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีจากแอนโทไซยานิน และ 5 ยีน ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีจากสารประกอบอื่น เช่น โปรแอนโทไซยานิดิน โดยยีนในตำหน่ง *C* และ *A* เกี่ยวข้องกับการสร้างรงควัตถุแอนโทไซยานินที่ประกอบด้วยหลายอัลลีลของยีน ได้แก่ ใน *C* locus พบ 6 อัลลีล และ *A* locus พบ 4 อัลลีล โดยยีน *A1* เป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ dihydroflavonol-4-reductase (DFR) มีตำแหน่งที่ 198 cM บนโครโมโซม 3 ของข้าวโพด ในข้าวตำแหน่งของยีน *A1* มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 1 (Kinoshita, 1995) ส่วน *Pl* และ *C* loci มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 4 และ 6 ในข้าวตามลำดับ

(Nagao et al., 1957) ส่วนยีน *Rc* และ *Rd* เกี่ยวข้องในการสร้างรงควัตถุสีแดงในเมล็ดข้าว สำหรับ *Rc* และ *rd* เกี่ยวข้องในการสร้างสีน้ำตาลในเมล็ดข้าว (Furukawa et al., 2007)

Puple leaf (Pl) locus ของข้าวควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน คล้ายกับกลุ่มของ *R/B* loci ของข้าวโพด ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ basic helix-loop-helix (bHLH) protein โดยตำแหน่งนี้เป็นที่ตั้งของยีน *OSB1* ที่มีรายงานก่อนหน้านี้คือยีน *Ra1* แต่แตกต่างที่ C-terminus เนื่องจากยีน *OSB1* เกิดการขาดหายไปของเบส 2 bp ส่วน *OSB2* อยู่ทางด้าน downstream ของ *OSB1* coding region ประมาณ 10 Kb ในตำแหน่ง *Pl* มี 3 อัลลีล คือ Pl^{i} Pl^{i} และ Pl^{w} โดยแต่ละอัลลีลทำหน้าที่ชักนำการสังเคราะห์รงควัตถุในรูปแบบแตกต่างกัน โดย Pl^{w} กระตุ้นการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเนื้อเยื่อพืชส่วนเหนือดินยกเว้นข้อของลำต้น และทำให้เกิดสีโดยสร้างรงควัตถุในเยื่อหุ้มเมล็ด ส่วน Pl^{i} และ Pl^{i} ควบคุมการสังเคราะห์รงควัตถุสีม่วงในใบ ซึ่งส่งผลให้ใบข้าวมีสีม่วงมากกว่าพันธุ์ข้าวที่มี Pl^{w} นอกจากนี้ Pl^{i} ทำให้เกิดรงควัตถุในแผ่นใบ กาบใบ รอยต่อระหว่างแผ่นใบและกาบใบ และข้อของลำต้น จากการศึกษา nearly isogenic Pl^{w}/Pl^{w} line ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์ Taichung65 (T65) ที่มี Pl^{w} จากข้าว *javanica* พันธุ์ Pirurutong ใน genetic background ของข้าว T65 พบว่าตำแหน่ง Pl^{w} locus ประกอบด้วยยีน *OSB1* และ *OSB2* คล้ายกับยีนในกลุ่ม *R* gene family ของข้าวโพด โดย cDNA ของ *OSB1* มีขนาด 2.2 kb ประกอบด้วย open reading frame (ORF) ที่เป็นรหัสของกรดอะมิโน 588 ตัว ซึ่งคล้ายกับยีน *Ra1* ของข้าว (99.2%) แต่เกิดการขาดหายไปของเบส 2 bp ในยีน *OSB1* ทำให้เกิด frame shift มีผลต่อกรดอะมิโน 44 ตัว ที่ C-terminus นอกจากการขาดหายไปของลำดับเบสยังมี 11 single nucleotide ที่แตกต่างกันระหว่างยีน *OSB1* และ *Ra1* ซึ่งมีผลในการแทนที่กรดอะมิโน 4 ตัว ด้าน upstream ของ frame shift ส่วน cDNA ของ *OSB2* มีขนาด 1.8 Kb ประกอบด้วย ORF ที่มีกรดอะมิโน 451 ตัว ซึ่งสั้นกว่า *OSB1* และ *Ra1* แต่ก็ยังคงมี bHLH domain ที่ C-terminus การเปรียบเทียบ cDNA ในบริเวณ ORF ของยีน *OSB1* และ *OSB2* ของข้าวกับยีน *B-Peru* และ *Lc* ของข้าวโพด พบว่า มีความคล้ายกัน (Sakamoto et al., 2001)

ยีน *OSB1* จากข้าวเมล็ดสีแดงและข้าวขาวแตกต่างจากข้าวเมล็ดดำ คือยีนในข้าวเมล็ดแดงและขาวเกิดการแทนที่ของ ACG codon เป็น ATG (C เปลี่ยนเป็น T) ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 191 การเพิ่มของลำดับเบส TG ที่ตำแหน่ง 1,632 และเกิดการขาดหายไปของหนึ่งเบสที่ตำแหน่ง 1,721 bp ทำให้เกิด premature stop codon จึงส่งผลให้กรดอะมิโนหายไป 12 ตัวที่ C-terminus ซึ่งเป็นบริเวณ DNA binding domain ทำให้ยีน *OSB1* ไม่ทำหน้าที่ในข้าวเมล็ดขาวและเมล็ดแดง สำหรับยีน *OSB2* ไม่พบการแสดงออกในต้นอ่อนของข้าวใบเขียวที่มีเมล็ดสีขาว โดยมีการศึกษาการแสดงออกของข้าวเมล็ดขาวพันธุ์ Nipponbare, Tainong 67 และ Zhonghua 11 ด้วยเทคนิค RT-PCR ไม่พบการแสดงออกของยีน *OSB2* ในข้าวเหล่านี้ อีกทั้งไม่พบการแสดงออกของ

ยีนโครงสร้าง *OsF3H, OsDFR และ OsANS1* ในต้นข้าว *japonica* ที่เป็นข้าวเมล็ดขาว เมื่อเทียบกับข้าวพันธุ์ T65-Pl^{w} ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์ Taichung 65 ที่มีใบสีม่วงเนื่องจากมี Pl^{W} locus จากข้าว *javanica* พันธุ์ Pirurutong ซึ่งมีการแสดงออกของยีนโครงสร้างเหล่านี้ (Shih et al., 2008)

ตำแหน่ง *C* locus ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 6 ในข้าวเป็นตำแหน่งของยีน *OSC1* ซึ่งคล้ายกับยีน *C1* ในข้าวโพด ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ R2R3-Myb transcription factors ยีน *OSC1* ของข้าวพันธุ์ T65 ประกอบด้วย 3 เอกซอน และ 2 อินทรอน และเป็นรหัสสำหรับโปรตีนที่มีกรดออะมิโน 272 ตัว ประกอบด้วย DNA-binding Myb domain ที่ตำแหน่ง N-terminus ซึ่งถูกอนุรักษ์ไว้ในข้าวและข้าวโพด มีการศึกษาในข้าวสี near isogenic lines T65 (C^{B}) ซึ่งมี C^{B} allele (functional allele) โดยข้าวพันธุ์ T65 ปกติจะมี C^{+} allele ที่ทำให้ไม่เกิดสีในข้าว โดยเปรียบเทียบกับข้าวขาวพันธุ์ IR36 (C^{+}) และ 868 (C^{+}) ที่มี C^{+} allele พบว่า พันธุ์ข้าวเมล็ดขาว (IR36 และ 868) มีลำดับเบสแตกต่างจากข้าวพันธุ์ T65 (C^{B}) คือ เกิดการขาดหายไปของลำดับเบส 10 bp (ที่ตำแหน่ง 795-804 จากตำแหน่งเริ่มต้นการแปลรหัส) และเกิดการแทนที่เบส (ที่ตำแหน่ง 918) ทั้ง 2 มีตำแหน่งอยู่ใน R3 repeat ภายในเอกซอนที่ 3 คาดว่าการขาดหายไปของลำดับเบสทำให้เกิด frame shift ทำให้ *OSC1* allele ของข้าวพันธุ์ IR36 และ 868 สูญเสียหน้าที่ ดังนั้นความแตกต่างระหว่างข้าวขาวกับข้าวสีคือในข้าวขาวยีน *OSC1* เกิดการขาดหายไปของเบสและเกิดการแทนที่เบสทำให้โปรตีนสูญเสียหน้าที่ โดยเฉพาะเกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสใน R3 repeat ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการจับดีเอ็นเอจึงทำให้สูญเสียหน้าที่และไม่สามารถควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินได้ (Saitoh et al., 2004)

รูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OSC1* มีความแตกต่างกันในข้าวแต่ละพันธุ์ เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของลำดับเบสจะส่งผลให้ฟีโนไทป์เปลี่ยนแปลงซึ่งมีผลต่อการสร้างรงควัตถุแอนโทไซยานิน จากการศึกษาอัลลีล *OSC1* พบว่า พันธุ์ข้าวที่มีอัลลีล C^{+} (108 และ 414; *indica* type) มีลำดับเบสเหมือนยีนจากข้าวพันธุ์ IR36 และ 868 เนื่องจากเกิด 10 bp deletion ในเอกซอนที่ 3 นอกจากนี้ข้าวพันธุ์ 734 ซึ่งเป็นข้าว *japonica* จากจีน มีอัลลีล C^{+} ซึ่งเกิด 2 bp deletion ในเอกซอนที่ 3 (ตำแหน่ง 786-787) โดยทั้งสองตำแหน่งเกิดขึ้นในตำแหน่งที่คาดว่าเป็นบริเวณสำคัญของ transcription factor และทำให้เกิด frame shift ซึ่งทำให้ยีนสูญเสียหน้าที่ สำหรับในข้าว *indica* และ *japonica* มีการขายหาดไปของลำดับเบสต่างกัน โดยในข้าว *indica* พบ 10 bp deletion ในขณะที่ข้าว *japonica* พบ 2 bp deletion โดยข้าวพันธุ์ T65 และ A58 มีอัลลีล C^{B} ซึ่งมีลำดับเบส (haplotype SA1) ที่เกิดการแทนเบสที่ในเอกซอนที่ 3 เมื่อเทียบกับ functional allele ของข้าวพันธุ์ Purpleputtu (Reddy et al., 1988) สำหรับ C^{Bt} เกิดการแทนที่เบสที่ตำแหน่ง 968 และ 34 bp deletion ที่ตำแหน่ง 973 bp ซึ่งทำให้เกิด frame shift หลังกรดอะมิโนตำแหน่ง 166 ส่วน C^{Br} allele ของข้าวพันธุ์ A56 เกิดการแทนที่เบส 2 ตำแหน่ง ที่ตำแหน่ง 744 และ 918 ในเอกซอนที่ 3 นอกจากนี้มีรายงานว่า

อัลลีล C^{Bd}, C^{Bk} และ C^{Bc} เกิดการแทนที่เบสที่ตำแหน่ง 122 ใน R2 แม้ว่า C^{Bd} จะมี silent substitution บริเวณอื่น คือในอินทรอนที่ 2 แต่การเปลี่ยนแปลงในบริเวณอื่นนอกเหนือตำแหน่งของ sequence region อาจมีความเกี่ยวข้องในการเปลี่ยนแปลงของฟีโนไทป์ด้วยเช่นกัน (Saitoh et al., 2004)

ดังนั้นสำหรับข้าวประกอบด้วยยีนควบคุมสองกลุ่มที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเช่นกันคือ basic helix-loop-helix (bHLH) type R/B family โดยตำแหน่ง Pl^{w} locus ในข้าว isogenic lines T65-Pl^{w} ที่มีสีม่วง พบยีนที่อยู่ตำแหน่งนี้ในกลุ่มของ *R /B* type bHLH 2 ยีน คือ *OSB1* และ *OSB2* โดย *OSB1* เป็นยีน *Ra1* ของข้าวที่ถูกรายงานก่อนหน้านี้โดย Hu et al. (1996) ยีนทั้งสองสามารถชักนำให้เกิดการสร้างแอนโทไซยานินโดยไปกระตุ้นยีนโครงสร้าง ได้แก่ ยีน *OsF3H*, *OsDFR*, และ *OsANS* อีกกลุ่มคือ MYB type *C1* family ประกอบด้วยยีน *OSC1* คล้ายกับยีน *C1* ของข้าวโพดซึ่งอยู่ในกลุ่มนี้ (Shih et al., 2008) และสามารถส่งเสริมให้ข้าวสามารถสร้างแอนโทไซยานินโดยไปกระตุ้นยีนโครงสร้าง โดยสามารถจับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *OsDFR* และ *OsANS* ให้มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น (Ithal and Reddy, 2004)

การใช้ยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเป็นยีนเครื่องหมาย

การถ่ายยีนเข้าสู่พืชต้องมีการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนโดยใช้ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะหรือสารปราบวัชพืชเป็นยีนคัดเลือก หากพืชได้รับยีนก็สามารถเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะเหล่านั้นได้ แต่ก็มักเกิดความกังวลในหลายด้าน เช่น การบริโภคยีนต้านสารปฏิชีวนะหรือยีนต้านสารปราบวัชพืชที่อาจเป็นอันตรายต่อมนุษย์ และสัตว์ อีกทั้งการกระจายของยีนไปสู่จุลินทรีย์ หรือสิ่งแวดล้อมทำให้กังวลว่าจะเกิดการดื้อยาในจุลินทรีย์หรือการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมในพืชท้องถิ่น นอกจากนี้สารปฏิชีวนะอาจส่งผลต่อการเจริญของเซลล์พืชหรือลดการพัฒนาเป็นต้นของเซลล์พืชในระบบการถ่ายยีน ดังนั้นจึงมีการพัฒนาระบบการถ่ายยีนเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้ยีนต้านสารปฏิชีวนะและยีนต้านสารปราบวัชพืช เช่น การพัฒนาระบบการถ่ายยีนโดยปราศจากยีนเครื่องหมาย *ipt*-type MAT vector system โดยคัดเลือกพืชที่ได้รับยีนจากลักษณะยอดกระจุกเนื่องจากมียีนสร้างไซโตไคนิน ต้นพืชที่ได้หลังการถ่ายยีนจะไม่มียีนคัดเลือก (Endo et al., 2002) จากปัญหาเหล่านี้จึงมีการพัฒนาระบบการถ่ายยีนโดยใช้ยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือกทำให้ไม่ต้องใช้สารปฏิชีวนะและง่ายต่อการคัดเลือกจากลักษณะสีของพืชที่ปรากฏแทนการใช้ยีนต้านสารปฏิชีวนะและยีนต้านสารปราบวัชพืช ซึ่งจะลดข้อวิตกกังวลในเรื่องของการถ่ายทอดยีนในพืชดัดแปลงพันธุกรรมออกไปสู่สิ่งแวดล้อมหรือสิ่งมีชีวิตอื่น โดยมีการถ่ายยีน *OSB2* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath เพื่อเป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือกข้าวดัดแปลง

พันธุกรรมจากสีที่ปรากกฏ โดยแคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้จากการถ่ายยีนมีลักษณะสีแดงจากการแสดงออกของยีน *OSB2* (Saika et al., 2011)

นอกจากนี้มีรายงานการใช้ยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเป็นยีนตรวจตามการปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมโดยศึกษาการถ่ายยีน *OSB2* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *OsPR1.1* ที่เป็นโปรโมเตอร์ที่ตอบสนองต่อสารเคมีหรือสารเคมีเป็นตัวชักนำการแสดงออกของยีน โดยถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว isogenic Taichung 65 พบว่าข้าวที่ได้รับยีนมีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินมากขึ้นทำให้ยอดมีสีแดงเมื่อได้รับสารเคมีสอดคล้องกับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นของยีน *OSB2* และยีน *anthocyanidin synthase (ANS)* ดังนั้นสามารถใช้ประโยชน์จากยีน *OSB2* เป็นยีนรายงานผลในการติดตามการปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมจากการแสดงลักษณะสีในข้าวที่ได้รับยีน (Kawahigashi et.al., 2007) และการใช้ยีน *OSB2* ภายใต้การควบคุมของโปรเมอร์เตอร์ *CYP72A21* ที่สารกำจัดวัชพืชเป็นตัวชักนำให้โปรโมเตอร์แสดงออกของยีน ทำให้ข้าว isogenic line Taichung-65 $C^{B}A$ มีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และต้นมีลักษณะสีแดง สามารถใช้ต้นดัดแปลงพันธุกรรมเป็นตัวติดตามการปนเปื้อนของสารกำจัดวัชพืชในสิ่งแวดล้อมและสามารถตรวจสอบได้ง่ายจากสีของพืช (Hirose et al., 2008)

อุปกรณ์และวิธีการ

พันธุ์ข้าวที่ใช้ทดลอง

พันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษาได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Thomas W. Okita (Washington State University, USA) ผศ.ดร.วราภรณ์ แสงทอง สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และ อ.ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน) กรุงเทพมหานคร

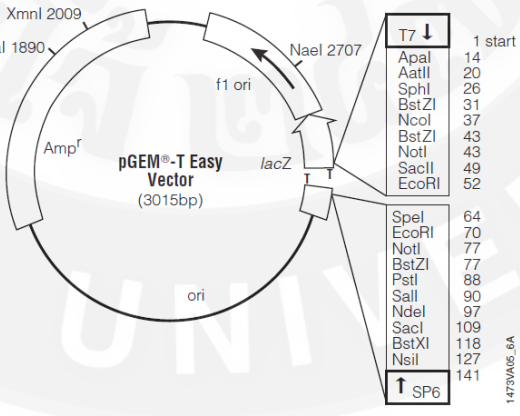
พันธุ์ข้าวเมล็ดสีขาวได้แก่ ข้าวพันธุ์ Kitaake Sasanishiki Nipponbare Taichung 65 กข6 และขาวดอกมะลิ 105

พันธุ์ข้าวเมล็ดสีแดงได้แก่ ข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง และสังข์หยด

พันธุ์ข้าวเมล็ดสีดำได้แก่ ข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ลืมผัว MJU หอมนิล ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา

พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

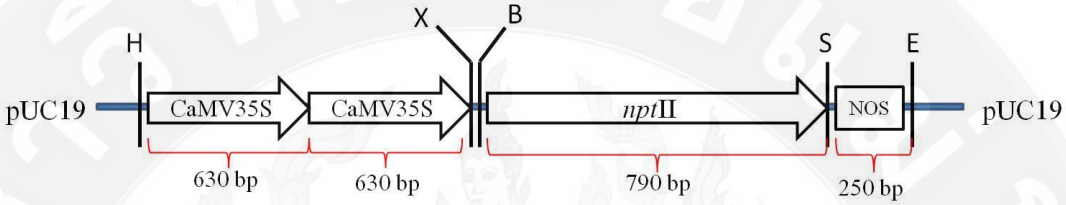
พลาสมิด pGEM-T Easy (Promega, USA) สำหรับโคลนยีน *OSB1 OSB2* และ *OSC1* จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อนำไปหาลำดับเบส (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แผนที่พลาสมิด pGEM-T Easy

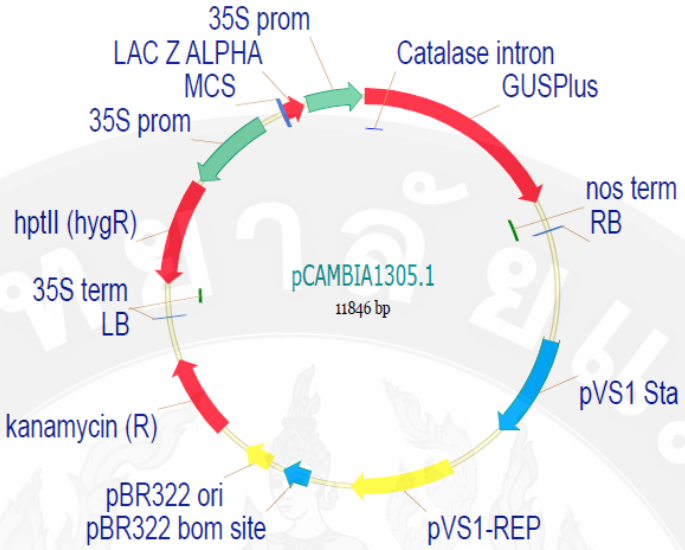
ที่มา: www.promega.com, 2009

พลาสมิด p2CA สำหรับสร้างชุดยีนได้รับความอนุเคราะห์จาก อ.ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน) กรุงเทพมหานคร พลาสมิด p2CA ประกอบด้วยชุดยีน *npt*II ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ 35s Promoter และ *nos* Terminator ภายในพลาสมิด pUC19 (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 แผนที่พลาสมิด p2CA สัญลักษณ์ H คือ บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dII, X คือ *Xba*I, B คือ *Bam*HI, S คือ *Sac*I และ E คือ *Eco*RI

พลาสมิด pCAMBIA1305.1 ซึ่งประกอบด้วยชุดของยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยให้ยีนทำงานภายใต้การควบคุมของ dual 35s Promoter และ *nos* Terminator ซึ่งเป็น T-DNA vector เพื่อใช้สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แผนที่พลาสมิด pCAMBIA1305.1

ที่มา: Yrgene., 2014

วิธีการทดลอง

1.สกัดอาร์เอ็นเอจากใบและเมล็ดข้าว

1.1 ขั้นตอน Homogenization

บดใบข้าวอายุ 2 สัปดาห์ และเมล็ดอ่อนระยะน้ำนมอายุ 4 สัปดาห์ ให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว แล้วเติม Trizol Reagent (Invitrogen, USA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครทิวบ์

1.2 ขั้นตอน Phase separation

บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร พลิกกลับหลอด เป็นเวลา 5 วินาที แล้วบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

1.3 ขั้นตอน RNA precipitation

ย้ายชั้นน้ำใส่หลอดใหม่ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติม Isopropyl alcohol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

1.4 ขั้นตอน RNA wash

ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยเอทานอลที่เย็น ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้ว Vortex อีกครั้ง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และล้างตะกอนอีกครั้งหนึ่ง

1.5 ขั้นตอน Redissolving the RNA

ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วตากให้แห้ง เติม DEPC treat water (free RNase) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

1.6 การกำจัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNaseI (NEB, USA)

เติมส่วนประกอบของปฏิกิริยาการทำ DNase treatment ดังนี้

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

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

2. การสังเคราะห์ First Strand cDNA โดยกระบวนการ reverse transcription โดยใช้ไพรเมอร์ oligo (dT)

2.1 นำอาร์เอ็นที่สกัดได้มาสังเคราะห์ cDNA โดยกระบวนการ reverse transcription โดยใช้ไพรเมอร์ oligo (dT) และชุดสำเร็จรูป Superscript III First-Stand Synthesis System (Invitrogen, USA) โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา First-Strand cDNA Synthesis ดังนี้

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

2.2 บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำหลอดมาวางบนน้ำแข็งทันที อย่างน้อย 1 นาที

2.3 เตรียม cDNA synthesis Mix โดยมีองค์ประกอบดังนี้

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

2.4 เติมองค์ประกอบ cDNA Synthesis Mix ในข้อ 2.3 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และผสมเบา ๆ

2.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที

2.6 หยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำออกมาวางบนน้ำแข็งทันที

2.7 นำหลอดมา Spin down และเติม RNaseH 1 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2.8 เก็บ cDNA ที่ – 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้หรือนำไปทำพีซีอาร์ต่อ

3. การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR

การเพิ่มจำนวนยีน *OSB1* *OSB2* และ *OSC1* โดยใช้ Go Taq® Green Master Mix (Promega, USA) ที่มีองค์ประกอบ ดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา)
Go Taq® Green Master Mix	10
10 µM Forward	1
10 µM Reverse	1
cDNA	1
dH_2O	7
Total	20

สภาวะในการทำ PCR

Initial Denaturation	95 องศาเซลเซียส	3 นาที	
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	40 รอบ
Annealing	68 องศาเซลเซียส	3 นาที	
Extension	68 องศาเซลเซียส		
Final Extension	68 องศาเซลเซียส	5 นาที	

จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophorsis โดยใช้ 1% agarrose ให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ใช้ 1 kb DNA ladder เป็น DNA Marker

4. การแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจลด้วย NucleoSpin Extraction Kit (Macherey-Nagel, Germany)

หลังจากทำ RT-PCR แล้วทำการแยกดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophorsis โดยใช้ 1% agarose gel ให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอโดยใช้ QIAquick Gel Extraction purification Kit ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

4.1. ตัดเจลที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่ต้องการจากการทำ RT-PCR ใส่ในหลอดไมโครทิวป์

4.2. ชั่งน้ำหนักเจล แล้วเติม Buffer NT (อัตราส่วนน้ำหนักเจล 100 มิลลิกรัม : buffer NT 200 ไมโครลิตร)

4.3. บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการผสมด้วยการพลิกหลอดทุก ๆ 2-3 นาที เพื่อช่วยให้เจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

4.4. หลังจากที่เจลละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว นำ column ใส่ใน collection tube จากนั้นดูดสารละลายเจลที่ละลายแล้วใส่ column ครั้งละ 750 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทำซ้ำจนกว่าสารละลายหมด

4.5. ทิ้งสารละลายที่ผ่าน column ใน collection tube ทิ้ง

4.6. จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

4.7. เทส่วนใสที่ไหลผ่าน column ทิ้ง

4.8. เติม Buffer NT3 600 ไมโครลิตร (NT3: Absolute ethanol = 1:4)

4.9 แล้วจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสที่ไหลผ่านทิ้ง

4.10. ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อทำให้ column แห้งและกำจัด Buffer NT3 จนหมด

4.11. จากนั้นย้ายคอลัมน์มาวางใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Buffer NE 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที

4.12. นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

4.13. เก็บดีเอ็นเอที่ทำการแยกบริสุทธิ์ไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส

5. การเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับเวคเตอร์ pGEM-T Easy และถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* competent cell

5.1. การเตรียม competent cell ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยวิธี $CaCl_2$

- นำ Glycerol stock ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α มา streak ลงบนอาหารแข็งสูตร LB ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน (ประมาณ 15-17 ชั่วโมง)

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

- นำเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนได้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.55

- ปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเทอาหารออกให้หมด

- ละลายตะกอนเซลล์ด้วย $CaCl_2$ (ที่เย็น) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปตขึ้นลง จากนั้นเติม $CaCl_2$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (เย็น) อีก 16 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปต จากนั้นบ่มในน้ำแข็งนาน 20 นาที

- ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสทิ้งทั้งหมด ละลายตะกอนเซลล์ใน $CaCl_2$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (เย็น) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติม glycerol 80 เปอร์เซ็นต์ (ผ่านการฆ่าเชื้อ) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสม

ด้วยการปิเปต จากนั้นแบ่งเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 200 ไมโครลิตร เก็บเซลล์ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

5.2. การเชื่อมชิ้นยีน *OSB2* เข้ากับเวคเตอร์ pGEM-T Easy

- เตรียมองค์ประกอบปฏิกิริยา ligation ดังนี้

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร/ปฏิกิริยา)
2X Rapid Ligation buffer T4 DNA Ligase	5
pGEM-T Easy vector	0.5
PCR Product	3.5
T4 DNA Ligase	1
Total	10

- บ่มข้ามคืน อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และส่งถ่ายเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* DH5 α และ spread บนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร X-gal และ IPTG 20 มิลลิกัมต่อลิตร บ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลลเซียส

5.3. การถ่ายฝากพลาสมิดสายผสมเข้ากับเวกเตอร์เข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock

- นำปฏิกิริยา ligation ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมในหลอดที่มี competent cell ของ *E. coli* DH5 α แล้วนำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

- บ่มใน water bath อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที

- บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที

- เติมอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร

- จากนั้นนำเชื้อมาเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที

- เมื่อครบเวลาทำการปั่นเหวี่ยงเชื้อเพื่อตกตะกอนที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที

- ปิเปตสารส่วนใสทิ้งปริมาตร 800 ไมโครลิตร แล้วละลายตะกอนเซลล์ จากนั้นทำการ spread เชื้อบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ spread ด้วย X-gal (20 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ IPTG (20 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

- เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

- ทำการบันทึกผลจำนวนโคโลนีสีฟ้าและสีขาวที่ได้จากการถ่ายฝากพลาสมิด และคัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวมาทำการตรวจสอบต่อไป

6. การคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยขนาด (Rapid size screening)

นำโคโลนีสีขาวที่ได้จากการเชื่อมชิ้นยีนกับดีเอ็นเอพาหะมาคัดเลือกด้วยขนาด โดยเปรียบเทียบกับโคโลนีสีฟ้า โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

6.1 นำโคโลนีที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที

6.2 เก็บเซลล์ *E. coil* จากข้อ 6.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตส่วนใสออกให้หมดเก็บเฉพาะเซลล์ (cell pellet) ไว้

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

6.4 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

6.5 เมื่อครบเวลาย้ายไปบ่มในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที

6.6 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

6.7 ดูดเฉพาะของเหลวด้านบนมา 20 ไมโครลิตร มาแยกโดย agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose ให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบโคโลนีสีฟ้า

7. การคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

7.1 การเตรียมพลาสมิดสำหรับปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis

- นำ Glycerol stock ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pGEM-T Easy ที่มีชิ้นยีน *OSB2* มา streak ลงบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน (12-16 ชั่วโมง)

- เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิด มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น100 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืน

- เก็บเซลล์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยการปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ทำ 2 รอบ รอบละ 1.5 มิลลิลิตร

- เทอาหารออกให้หมด เก็บเซลล์ที่ได้ไปทำการสกัดพลาสมิด

- ละลายเซลล์ ที่ได้ด้วย Alkaline lysis solution 1 (แช่เย็น) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการ vortex

- เติม Alkaline lysis solution ll ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดกลับไปมา 4-6 ครั้ง จนกระทั่งสารละลายหนืดและใส (ห้าม Vortex) แช่หลอดในน้ำแข็ง 5 นาที

- เติม Alkaline lysis solution lll ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดกลับไปมา

- เติมคลอโลฟอร์ม 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดกลับไปมา แช่หลอดในน้ำแข็ง 5 นาที

- ปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้ายส่วนใส (supernatant) ใส่หลอดใหม่

- เติมสารละลายเอทานอล 2 ปริมาตร ของส่วนใสทั้งหมด (ประมาณ 450 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดกลับไปมา แช่ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที

- ปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10-15 นาที

- ปิเปตส่วนใสทิ้งด้วยไมโครไปเปต (ระวังอย่าให้ DNA pellet ที่อยู่ก้นหลอดหลุด) ล้าง DNA pellet โดยเติมเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมด้วยการพลิกหลอดกลับไปมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นปิเปตส่วนน้ำทิ้ง (ระวังอย่าให้ DNA pellet ที่อยู่ก้นหลอดหลุด) ล้างเช่นนี้ 2 ครั้ง

- เปิดฝาหลอดแล้วคว่ำบนกระดาษซับ จนกระทั่ง DNA pellet แห้ง สังเกตจาก DNA pellet จากสีขาวขุ่น เมื่อแห้งจะใส

- ละลายดีเอ็นเอกลับด้วยน้ำกลั่นที่มีเอนไซม์ RNase แล้วเก็บพลาสมิดที่ -20 องสาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

7.2 ปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII

จากการถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* DH5 α คัดเลือกดีเอ็นเอสายผสม โดยนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร/ปฏิกิริยา)
10X NEB buffer 4	2
*Eco*RI-HF	0.5
*Hin*dIII-HF	0.5
พลาสมิด	10
dH_2O	6.5
รวม	20

เมื่อได้โคโลนที่มีชิ้นยีน *OSB2* ที่ประกอบด้วย dual 35s Promoter และ *nos* Terminator ขนาดประมาณ 2300 bp ทำการสกัดพลาสมิดด้วย Nucleospin® Plasmid และส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบส

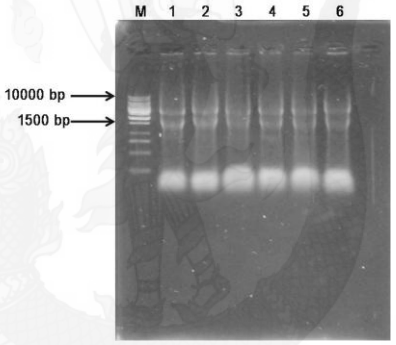
8. การวิเคราะห์ลำดับเบสของโคโลนีสายผสมที่ถูกคัดเลือก

เมื่อนำพลาสมิดที่คัดเลือกไปวิเคราะห์ลำดับเบส บริษัท 1st Base DNA Sequencing (Malaysia) แล้วนำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBlank และนำลำดับดีเอ็นเอของยีนจากข้าวแต่ละพันธุ์มาเปรียบเทียบด้วยด้วยโปรแกรม ClustalX (version 1.83) และ GeneDoc (version 2.7)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การสกัดอาร์เอ็นเอจากทั้งหมดใบและเมล็ดข้าว

จากการโคลนยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินจากข้าวเมล็ดขาวและสี ทำการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบและเมล็ดในระยะน้ำนมของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ทั้ง 13 สายพันธุ์ ได้แก่ Sasanishiki Kitaake Niponbare Taichung 65 (T65) กข6 ขาวดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง สังข์หยด ลืมผัว MJU ลืมผัว KU หอมนิล ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา พบว่า อาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดีมีแถบอาร์อาร์เอ็นเอขนาด 18S และ 28S ที่ชัดเจน (ภาพที่ 7-9) ดังนั้นอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้สามารถนำไปเป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์ cDNA เพื่อใช้ในการโคลนยีนต่อไปได้



ภาพที่ 7 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบข้าว ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder

ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ สังข์หยด

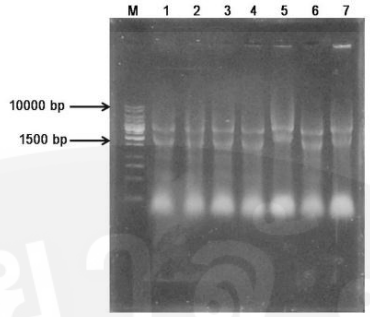
ช่องที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU

ช่องที่ 3 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว KU

ช่องที่ 4 คือ ข้าวพันธุ์หอมนิล

ช่องที่ 5 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ

ช่องที่ 6 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา



ภาพที่ 8 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบข้าว ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder

ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake

ช่องที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki

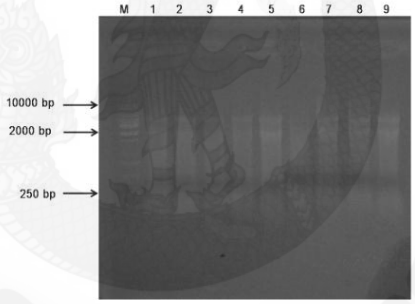
ช่องที่ 3 คือ ข้าวพันธุ์ Nipponbare

ช่องที่ 4 คือ ข้าวพันธุ์ กข6

ช่องที่ 7 คือ ข้าวหอมมะลิแดง

ช่องที่ 8 คือ ข้าวพันธุ์ T65

ช่องที่ 9 คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105



ภาพที่ 9 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเมล็ดข้าว ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder

ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake

ช่องที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki

ช่องที่ 3 คือ ข้าวพันธุ์ Nipponbare

ช่องที่ 4 คือ ข้าวพันธุ์ หอมมะลิแดง

ช่องที่ 5 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU

ช่องที่ 6 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว KU

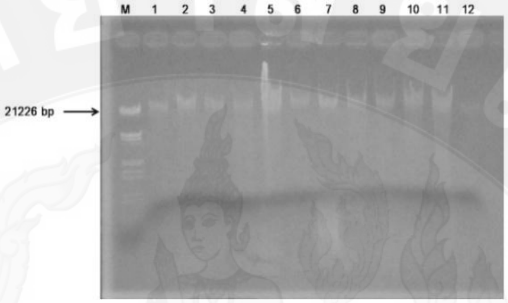
ช่องที่ 7 คือ ข้าวพันธุ์หอมนิล

ช่องที่ 8 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ

ช่องที่ 9 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา

การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว

จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว 13 พันธุ์ พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีขนาดใหญ่ แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี และสามารถนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบยีนต่าง ๆ ต่อไป (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ผลการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากใบข้าว ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Eco*RI + *Hin*dIII

ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake

ช่องที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki

ช่องที่ 3 คือ ข้าวพันธุ์ Nipponbare

ช่องที่ 4 คือ ข้าวพันธุ์ กข6

ช่องที่ 5 คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ช่องที่ 6 คือ ข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง

ช่องที่ 7 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU

ช่องที่ 8 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว KU

ช่องที่ 9 คือ ข้าวพันธุ์สังข์หยด

ช่องที่ 10 คือ ข้าวพันธุ์หอมนิล

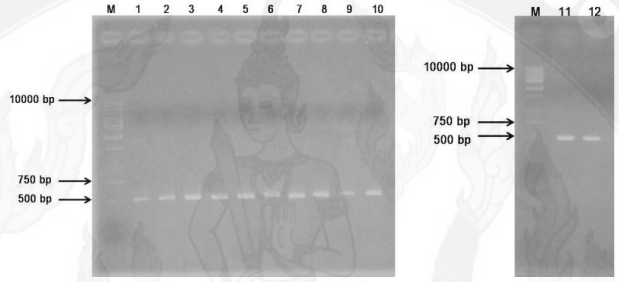
ช่องที่ 11 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ

ช่องที่ 12 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา

การโคลนยีน *OSB1*

1.1. การวิเคราะห์ยีน *OSB1* จากจีโนมข้าวด้วยเทคนิค PCR

จากการทำ PCR โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอเป็นแม่พิมพ์และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วนหนึ่งของยีน *OSB1* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 491 bp ในข้าวทั้ง 13 พันธุ์ (ภาพที่ 11) ดังนั้นข้าวทุกพันธุ์ที่ศึกษามียีน *OSB1* จึงทำการค้นหายีนในส่วนที่เป็น coding sequence ต่อไป

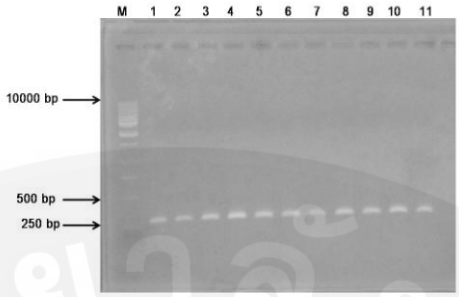


ภาพที่ 11 ผลการทำ PCR ยีน *OSB1* จากจีโนมิกดีเอ็นเอของใบข้าว ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder

ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake
ช่องที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki
ช่องที่ 3 คือ ข้าวพันธุ์ Nipponbare
ช่องที่ 4 คือ ข้าวพันธุ์ กข6
ช่องที่ 5 คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105
ช่องที่ 6 คือ ข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง
ช่องที่ 7 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว KU
ช่องที่ 8 คือ ข้าวพันธุ์หอมนิล
ช่องที่ 9 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ
ช่องที่ 10 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา
ช่องที่ 11 คือ ข้าวพันธุ์สังข์หยด
ช่องที่ 12 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU

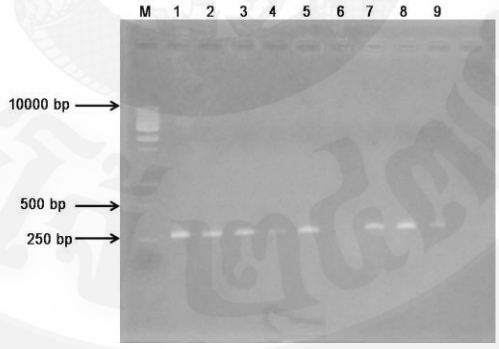
1.2. การสังเคราะห์ First Strand cDNA

เมื่อสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบและเมล็ดอ่อนจากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ จากนั้นทำการสังเคราะห์ First Strand cDNA แล้วทำการตรวจสอบ cDNA ที่ใช้เป็นแม่พิมพ์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *actin* พบว่า cDNA จากใบและเมล็ดทุกพันธุ์เกิดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 276 bp จึงนำ cDNA เหล่านี้ไปเป็นแม่พิมพ์ในการทำ RT-PCR ต่อไป (ภาพที่ 12 และ 13)



ภาพที่ 12 ผลการทำ PCR ยีน *actin* โดยใช้ cDNA จากใบเป็นแม่พิมพ์ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder

ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki
ช่องที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์ Nipponbare
ช่องที่ 3 คือ ข้าวพันธุ์ กข6
ช่องที่ 4 คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105
ช่องที่ 5 คือ ข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง
ช่องที่ 6 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU
ช่องที่ 7 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว KU
ช่องที่ 8 คือ ข้าวพันธุ์สังข์หยด
ช่องที่ 9 คือ ข้าวพันธุ์หอมนิล
ช่องที่ 10 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ
ช่องที่ 11 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา

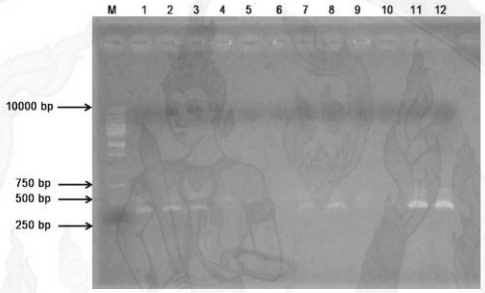


ภาพที่ 13 ผลการทำ PCR ยีน *actin* โดยใช้ cDNA จากเมล็ดเป็นแม่พิมพ์ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder

ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake
ช่องที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki
ช่องที่ 3 คือ ข้าวพันธุ์ Nipponbare
ช่องที่ 4 คือ ข้าวพันธุ์ กข6
ช่องที่ 5 คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105
ช่องที่ 6 คือ ข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง
ช่องที่ 7 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU
ช่องที่ 8 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว KU
ช่องที่ 9 คือ ข้าวพันธุ์หอมนิล

1.3. การค้นหายีนและเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *OSB1* ด้วยเทคนิค RT-PCR

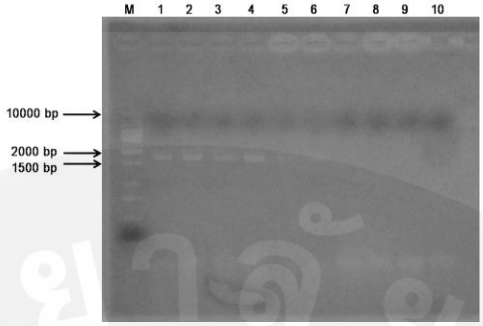
เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCRโดยใช้ cDNA ที่สังเคราะห์จากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากใบเป็นแม่พิมพ์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วนหนึ่งของยีน *OSB1* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 342 bp ในข้าวทุกพันธุ์ที่ศึกษา (ภาพที่ 14) แสดงว่าข้าวพันธุ์เหล่านี้มีการแสดงออกของยีน *OSB1* จึงทำการค้นหายีน *OSB1* โดยใช้ cDNA เป็นแม่พิมพ์เพื่อโคลนยีนจากข้าวเหล่านี้และเปรียบเทียบลำดับเบสในข้าวแต่ละพันธุ์ต่อไป



ภาพที่ 14 ผลการค้นหายีน *OSB1* จาก cDNA ของใบข้าวด้วยเทคนิค RT-PCR ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder

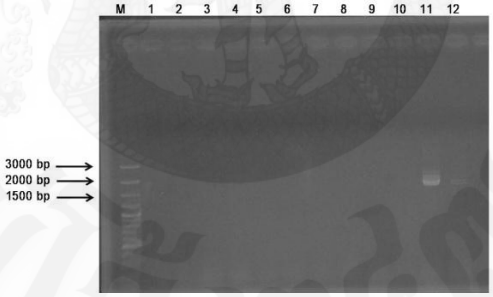
ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake
ช่องที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki
ช่องที่ 3 คือ ข้าวพันธุ์ Nipponbare
ช่องที่ 4 คือ ข้าวพันธุ์ กข6
ช่องที่ 5 คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105
ช่องที่ 6 คือ ข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง
ช่องที่ 7 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU
ช่องที่ 8 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว KU
ช่องที่ 9 คือ ข้าวพันธุ์สังข์หยด
ช่องที่ 10 คือ ข้าวพันธุ์หอมนิล
ช่องที่ 11 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ
ช่องที่ 12 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา

จากการทำ RT-PCR โดยใช้ cDNA ที่สังเคราะห์จากอาร์เอ็นเอเป็นแม่พิมพ์ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OSB1* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 1800 bp ในใบข้าวพันธุ์ Kitaake Sasanishiki Nipponbare กข6 ขาวดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง (ภาพที่15) ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา (ภาพที่ 16) ส่วนอาร์เอ็นเอที่สกัดจากเมล็ดไม่พบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวัง (ภาพที่17) ซึ่งจะทำการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนและโคลนเข้าสู่ pGEM-T Easy ต่อไป



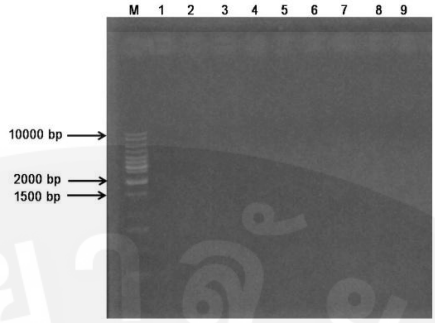
ภาพที่ 15 ผลการทำ PCR ยีน *OSB1* โดยใช้ cDNA จากใบ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder

ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake
ช่องที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki
ช่องที่ 3 คือ ข้าวพันธุ์ Nipponbare
ช่องที่ 4 คือ ข้าวพันธุ์ กข6
ช่องที่ 5 คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105
ช่องที่ 6 คือ ข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง
ช่องที่ 7 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU
ช่องที่ 8 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว KU
ช่องที่ 9 คือ ข้าวพันธุ์สังข์หยด
ช่องที่ 10 คือ ข้าวพันธุ์หอมนิล



ภาพที่ 16 ผลการทำ RT-PCR ยีน *OSB1* โดยใช้ cDNA จากใบ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus

ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake
ช่องที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki
ช่องที่ 3 คือ ข้าวพันธุ์ Nipponbare
ช่องที่ 4 คือ ข้าวพันธุ์ กข6
ช่องที่ 5 คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105
ช่องที่ 6 คือ ข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง
ช่องที่ 7 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU
ช่องที่ 8 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว KU
ช่องที่ 9 คือ ข้าวพันธุ์สังข์หยด
ช่องที่ 10 คือ ข้าวพันธุ์หอมนิล
ช่องที่ 11 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ
ช่องที่ 12 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา

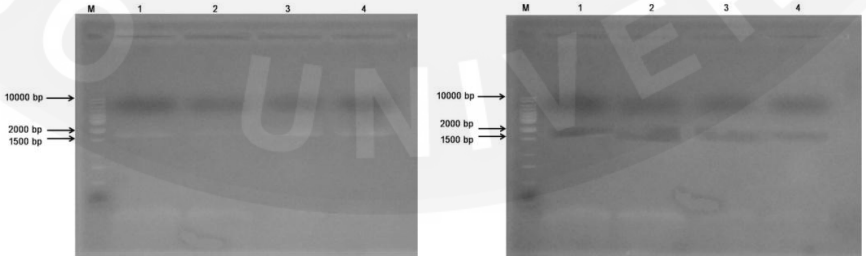


ภาพที่ 17 ผลการทำ RT-PCR ยีน *OSB1* โดยใช้ cDNA จากเมล็ด ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder

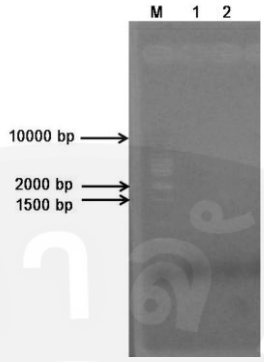
ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake
ช่องที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki
ช่องที่ 3 คือ ข้าวพันธุ์ Nipponbare
ช่องที่ 4 คือ ข้าวพันธุ์ หอมมะลิแดง
ช่องที่ 5 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU
ช่องที่ 6 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว KU
ช่องที่ 7 คือ ข้าวพันธุ์หอมนิล
ช่องที่ 8 คือ ข้าวพันธุ์กำหนองเต่าคำ
ช่องที่ 9 คือ ข้าวพันธุ์กำพะเยา

1.4. การแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจล

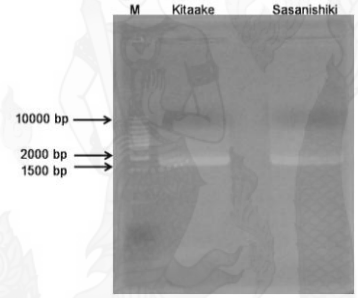
จากผลการทำ RT-PCR ทำการแยกดีเอ็นเอจากเจลขนาดตามที่คาดหวังของยีน *OSB1* ประมาณ 1800 bp โดยใช้ cDNA จากใบข้าว Kitaake และ Sasanishiki เป็นแม่พิมพ์ แล้วทำการแยกบริสุทธิ์จากเจล จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณอีกครั้งด้วยเทคนิค PCR เนื่องจากความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มข้นน้อย แล้วจึงแยกบริสุทธิ์จากเจลอีกครั้งเพื่อทำการโคลนเข้าสู่พลาสมิด pGEM-T Easy ต่อไป (ภาพที่ 18 -21)



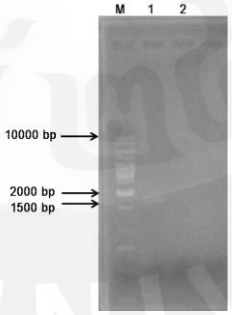
ภาพที่ 18 การทำ PCR ยีน *OSB1* โดยใช้ cDNA จากใบเป็นแม่พิมพ์ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1-2 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake ช่องที่ 3-4 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki



ภาพที่ 19 ผลการแยกบริสุทธิ์ยีน *OSB1* จากเจล โดยใช้ cDNA จากใบ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake ช่องที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki

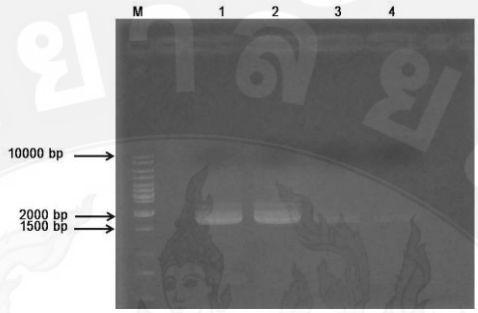


ภาพที่ 20 ผลการทำ PCR ยีน *OSB1* จากใบข้าวพันธุ์ Kitaake และ Sasanishiki โดยใช้ตัวอย่างที่แยกบริสุทธิ์เป็นแม่พิมพ์ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder

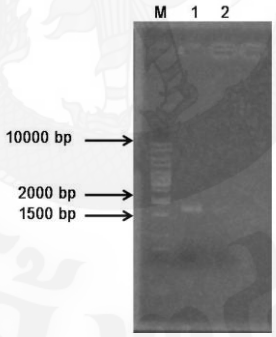


ภาพที่ 21 ผลการแยกบริสุทธิ์ยีน *OSB1* จากเจล ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 ข้าวพันธุ์ Kitaake ช่องที่ 2 ข้าวพันธุ์ Sasanishiki

นอกจากนี้ทำการแยกดีเอ็นเอจากเจลที่มีแถบดีเอ็นเอของยีน *OSB1* ที่คาดหวังขนาดประมาณ 1800 bp โดยใช้ cDNA จากข้าวก่ำหนองเต่าคำและก่ำพะเยาเป็นแม่พิมพ์ เพื่อทำการโคลนเข้าสู่พลาสมิด pGEM-T Easy ด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 22 และ 23)



ภาพที่ 22 ผลการทำ RT-PCR ของยีน *OSB1* โดยใช้ cDNA จากใบเป็นแม่พิมพ์ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1-2 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ และช่องที่ 3-4 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา ตามลำดับ

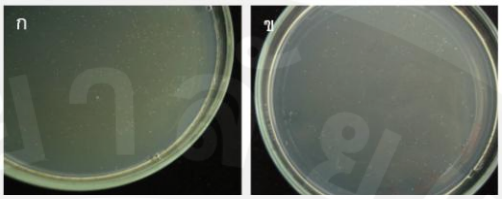


ภาพที่ 23 ผลการแยกบริสุทธิ์ยีน *OSB1* จากเจล ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1-2 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา ตามลำดับ

1.5. การเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับเวคเตอร์ pGEM-T Easy และถ่ายฝากเข้าสู่ *E.coli* competent cell ครั้งที่ 1

จากการทำ RT-PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *OSB1* โดยใช้ cDNA จากใบข้าวพันธุ์ Kitaake และ Sasanishiki เป็นแม่พิมพ์ ทำการโคลนเข้าสู่ pGEM-T Easy เพื่อหาลำดับเบสของข้าวทั้งสองพันธุ์ โดยทำการเชื่อมต่อยีน *OSB1* เข้ากับ pGEM-T Easy แล้วส่งถ่ายเข้าสู่ *E. coli*

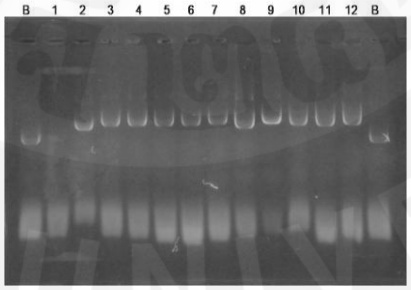
competemt cell ด้วยวิธี heat shock จากนั้นคัดเลือกโคลนที่คาดว่าได้รับดีเอ็นเอสายผสมโดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่ต้านสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 ผลการถ่ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* DH5 alpha บนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร X-gal และ IPTG ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก. ข้าวพันธุ์ Kitaake ข. Sasanishiki

1.6. การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมด้วย Rapid size screening ครั้งที่ 1

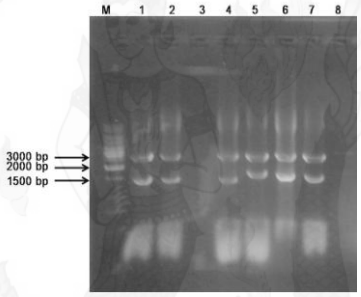
จากการถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* คัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมจากใบข้าวพันธุ์ Kitaake และ Sasanishiki ที่เชื่อมต่อเข้ากับเวคเตอร์ pGEM-T Easy โดยนำโคโลนีเดี่ยวจำนวนตัวอย่างละ 6 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วคัดเลือกด้วยขนาดโดยเปรียบเทียบกับโคโลนีฟ้า พบว่า โคโลนีที่คัดเลือกทั้งหมดมีขนาดใหญ่กว่า ซึ่งคาดว่าเป็นดีเอ็นเอสายผสมที่มียีน *OSB1* (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วย Rapid size screening ช่อง B คือ โคโลนีสีฟ้า ช่องที่ 1-6 คือโคโลนีที่คัดเลือกจากใบข้าวพันธุ์ Kitaake โคโลนีที่ 1-6 และช่องที่ 7-12 คือโคโลนีที่คัดเลือกจากใบข้าวพันธุ์ Sasanishiki โคโลนีที่ 1-6

1.7. การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ครั้งที่ 1

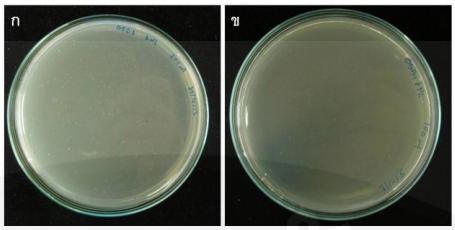
จากการคัดเลือกพลาสมิดที่ทำการเชื่อมต่อยีน *OSB1* จากใบข้าวพันธุ์ Kitaake และ Sasanishiki จำนวน 4 โคโลนี พบว่า พลาสมิดที่คัดเลือกจากข้าวพันธุ์ Kitaake โคโลนีที่ 1, 2 และ 4 จากข้าวพันธุ์ Sasanishiki โคโลนีที่ 1, 2 และ 3 เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดที่คาดหวังจำนวน 2 แถบ คือ พลาสมิด pGEM-T Easy ประมาณ 3000 bp และยีน *OSB1* ขนาด 1800 bp (ภาพที่ 26) ซึ่งคาดว่าเป็นดีเอ็นสายผสมที่มียีน *OSB1* จึงทำการสกัดพลาสมิดและนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป



ภาพที่ 26 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมที่เชื่อมกับพลาสมิด pGEM-T Easy ครั้งที่ 1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1-4 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกจากข้าวพันธุ์ Kitaake โคโลนีที่ 1-4 และ ช่องที่ 5-8 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกจากข้าวพันธุ์ Sasanishiki โคโลนีที่ 1-4

1.8. การเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับเวคเตอร์ pGEM-T Easy และถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* competent cell ครั้งที่ 2

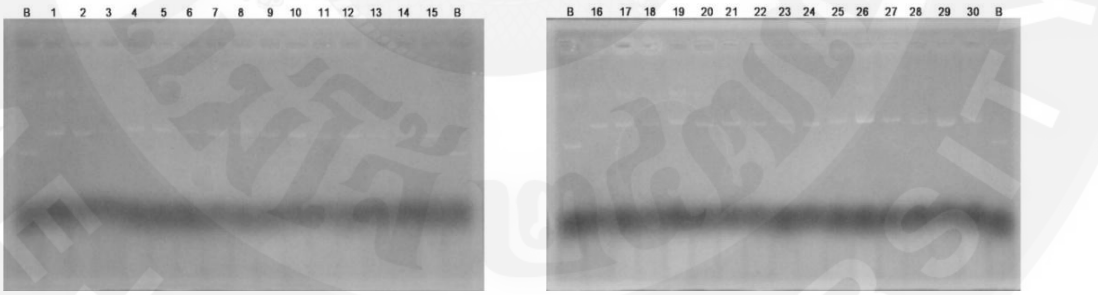
นอกจากนี้ทำการเพิ่มปริมาณยีน *OSB1* โดยใช้ cDNA จากข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำและก่ำพะเยาเป็นแม่พิมพ์ แล้วทำการโคลนเข้าสู่ pGEM-T Easy เพื่อหาลำดับเบสของข้าวสีทั้งสองพันธุ์ เมื่อทำการ ligation และส่งถ่ายเข้าสู่ *E. coli* competemt cell ด้วยวิธี heat shock คัดเลือกโคลนที่คาดว่าได้รับดีเอ็นเอสายผสมโดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวต้านสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินบนอาหารเช่นกัน (ภาพที่ 27)



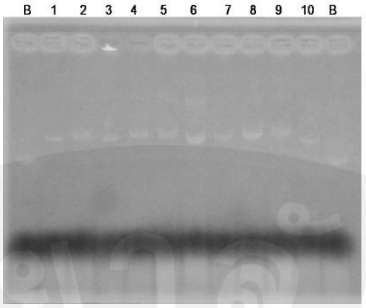
ภาพที่ 27 ผลการถ่ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 alpha บนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร X-gal และ IPTG ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ก) ข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ (ข) ข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา

1.9. การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมด้วย Rapid size screening ครั้งที่ 2

นำโคโลนีสีขาวที่ได้จากการส่งถ่ายปฏิกิริยา ligation เข้าสู่ *E. coli* competent cell มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินเพื่อทำการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมด้วยวิธี Rapid size screening โดยเปรียบเทียบกับโคโลนีสีฟ้า พบว่า จากการคัดเลือกโคโลนีของข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ จำนวน 30 โคโลนี และก่ำพะเยา 10 โคโลนี พบว่า ทุกโคลนมีขนาดใหญ่กว่าโคโลนีสีฟ้าที่คัดเลือก ซึ่งคาดว่าโคโลนีสีขาวเหล่านี้ได้รับยีน *OSB1* (ภาพที่ 28 และ 29)



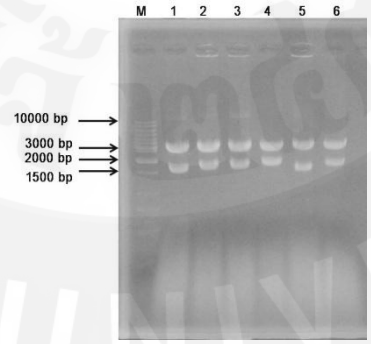
ภาพที่ 28 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาดโดยวิธี Rapid size screening ช่อง B โคโลนีสีฟ้า ช่อง 1-30 คือ โคโลนีสีขาวที่ทำการคัดเลือกจากใบข้าวก่ำหนองเต่าคำ โคโลนีที่ 1-30



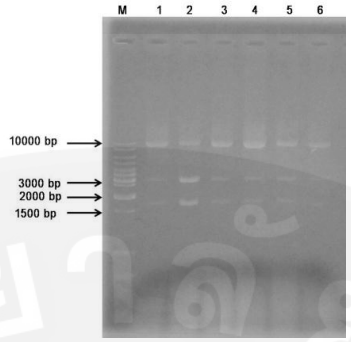
ภาพที่ 29 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาดโดยวิธี Rapid size screening ช่อง B โคโลนีสีฟ้า ช่อง 1-10 คือ โคโลนีสีขาวที่ทำการคัดเลือกจากใบก่ำพะเยา โคโลนีที่ 1-10

1.10. การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ครั้งที่ 2

ทำการคัดเลือกยีน *OSB1* จากข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำและก่ำพะเยา โดยสกัดพลาสมิดเพื่อคัดเลือกโคโลนีสายผสมโดยวิธี Alkaline lysis จำนวน 6 โคลน แล้วตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบว่า พลาสมิดที่คัดเลือกทั้งหมดเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเกิดแถบดีเอ็นเอสองแถบที่มีขนาดใกล้เคียงกับที่คาดหวังคือขนาดของยีน *OSB1* ประมาณ 1800 bp และ pGEM-T Easy ขนาดประมาณ 3000 bp แสดงว่าพลาสมิดที่คัดเลือกเป็นดีเอ็นเอสายผสมที่มียีน *OSB1* จากนั้นจึงต้องทำการสกัดพลาสมิดและส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป (ภาพที่ 30 และ 31)



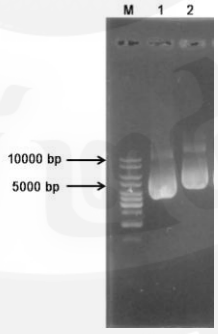
ภาพที่ 30 ผลการคัดเลือกพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซด์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1-6 คือ พลาสมิดที่ทำการคัดเลือกยีนจากใบข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ โคโลนีที่ 1-6



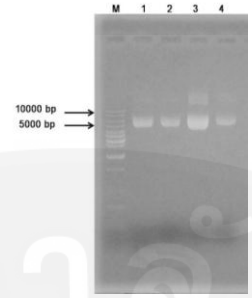
ภาพที่ 31 ผลการคัดเลือกพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซด์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1-2 คือ พลาสมิดที่ทำการคัดเลือกยีนจากใบข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา โคโลนีที่ 1-6

1.11. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OSB2* ที่โคลนจากข้าวพันธุ์ต่างๆ

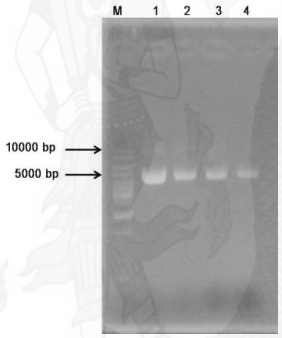
เมื่อคัดเลือกโคลนที่ถูกต้องจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ทำการสกัดพลาสมิดด้วย NucleoSpin Plasmid เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OSB1* โดยคัดเลือกโคลนที่ถูกต้องซึ่งมี*ยีน OSB1* จากใบข้าวพันธุ์ Kitaake Sasanishiki ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา เพื่อนำไปหาลำดับเบสและเปรียบเทียบระหว่างยีน *OSB1* ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์ต่างๆ และยีนจากฐานข้อมูล GenBank (ภาพที่ 32-34)



ภาพที่ 32 ผลการสกัดพลาสมิด ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่อง 1 คือ พลาสมิดที่มียีนจากข้าวพันธุ์ Kitaakeโคโลนีที่ 2 และช่องที่ 2 คือ พลาสมิดที่มียีนจากข้าวพันธุ์ Sasanishiki โคโลนีที่ 3



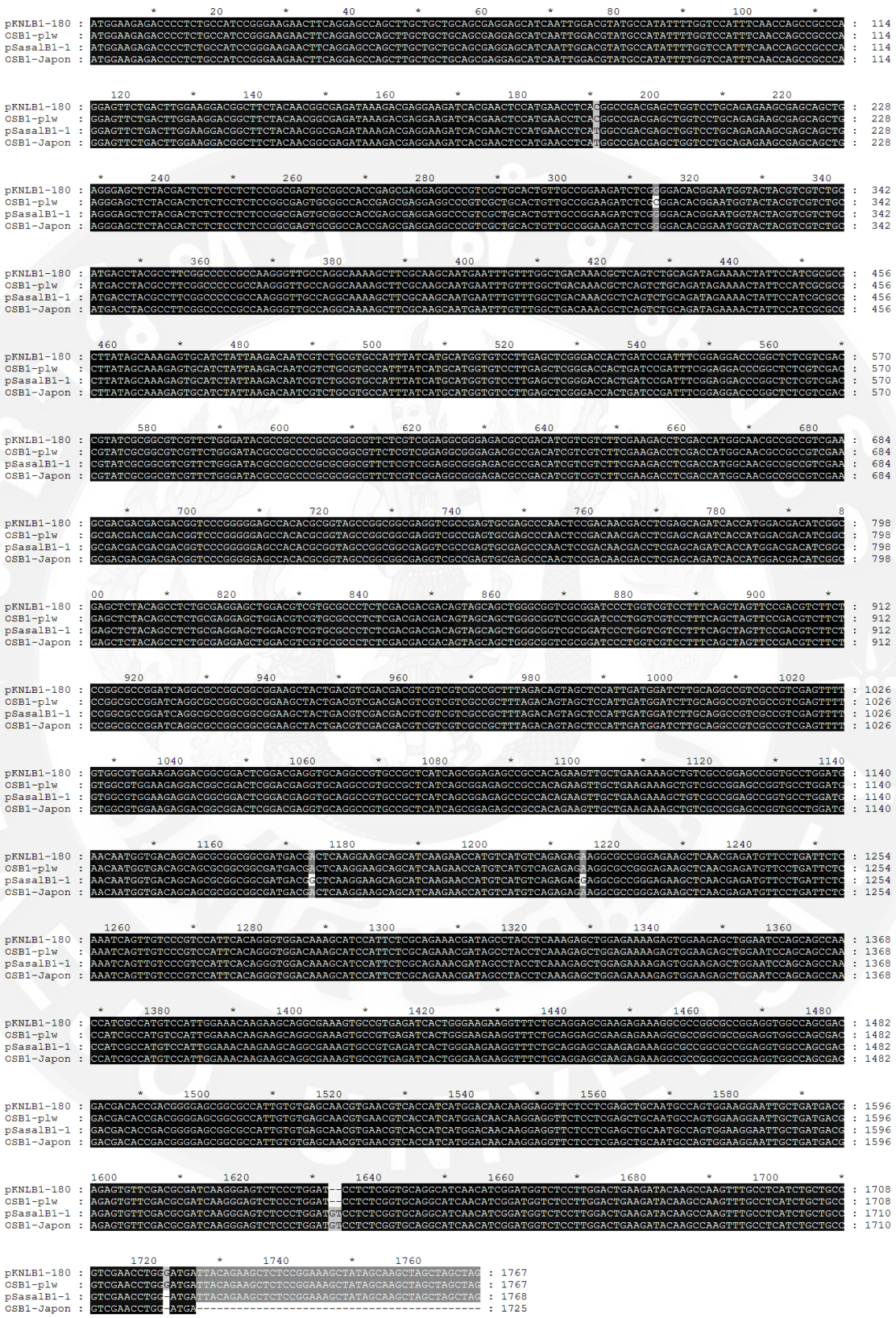
ภาพที่ 33 ผลการสกัดพลาสมิด pGEM-T Easy ที่มียีน *OSB1* ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1-2 คือ พลาสมิดที่ทำการคัดเลือกยีนจากใบข้าวก่ำหนองเต่าคำ elute 1 ช่องที่ 3-4 คือ elute 2



ภาพที่ 34 ผลการสกัดพลาสมิด pGEM-T Easy ที่มียีน *OSB1* ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1-2 คือ พลาสมิดที่ทำการคัดเลือกยีนจากใบข้าวก่ำพะเยา elute 1 ช่องที่ 3-4 คือ elute 2

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้ขนาด 1800 bp จากข้าวขาวพันธุ์ Sasanishiki และข้าวสีพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ โดยเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OSB1* ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ที่เป็นข้าวขาว (Nipponbare, accession no. NM_001060067) และข้าวสี (Plw-*OSB1* mRNA for R-type basic helix-loop-helix protein, accession no. AB021079) พบว่า ยีน *OSB1* ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์ Sasanishiki เหมือนกับยีนจาก Nipponbare ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank เนื่องจากเกิด 1 bp deletion ที่ตำแหน่ง 1722 bp ทำให้เกิด stop codon ส่งผลให้กรดอะมิโนด้าน C-terminus หายไปบางส่วน ส่วนยีน *OSB1* จากข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำที่โคลนได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีนจากข้าวสีในฐานข้อมูล ซึ่งเกิด 2 bp deletion ที่ตำแหน่ง 1633 bp

เหมือนกัน แต่การขาดหายไปของลำดับเบสไม่ส่งผลให้เกิด stop codon ในข้าวสี (ภาพที่ 35) ดังนั้น ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OSB1* จากข้าวสีและข้าวขาวที่ส่งผลต่อการควบคุมสังเคราะห์แอนโทไซยานิน คือยีนจากข้าวขาวเกิด 1 bp deletion แล้วทำให้เกิด stop codon ส่งผลให้โปรตีน MYC transcription factor ไม่สามารถทำหน้าที่ในการส่งเสริมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินได้


pKNLB1-180
OSB1-plw
pSasalB1-1
OSB1-Japon

ภาพที่ 35 การเปรียบเทียบลำดับเบสของบริเวณ coding sequence ของยีน *OSB1* ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ กับยีน *OSB1* จากข้าวขาวในฐานข้อมูล GenBank (Nipponbare, accession no. NM_001060067) และข้าวสี (Plw-*OSB1* mRNA for R-type basic helix-loop-helix protein, accession no. AB021079) ซึ่งบริเวณที่แรเงาสีดำ แสดงให้เห็นลำดับเบสที่เหมือนกันของข้าวแต่ละพันธุ์

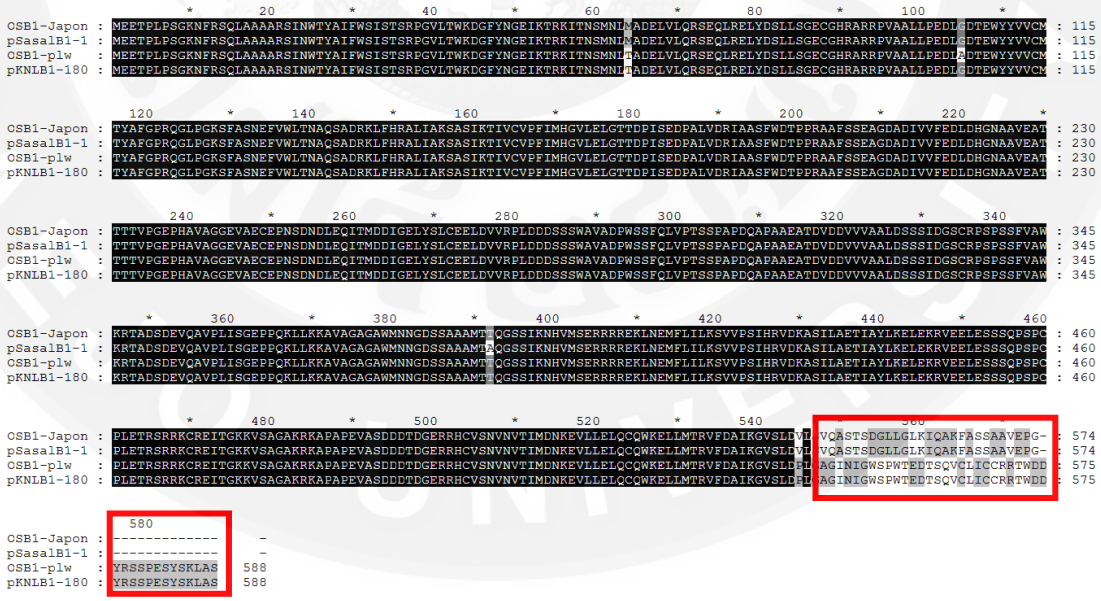
หมายเหตุ pSasaLB1 คือ ยีน *OSB1* จากใบข้าวพันธุ์ Sasanishiki

pKNLB1 คือ ยีน *OSB1* จากใบข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ

OSB1-plw คือ ยีน *OSB1* จากใบข้าวสีในฐานข้อมูล GenBank

OSB1-Japon คือ ยีน *OSB1* จากใบข้าวขาวในฐานข้อมูล GenBank

จากนั้นวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OSB1* พบว่า ยีนจากข้าวพันธุ์ Sasanishiki เป็นรหัสของกรดอะมิโน 574 หน่วย ส่วนยีนจากข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำเป็นรหัสของกรดอะมิโน 588 หน่วย ซึ่งยีนจากข้าวขาวมีกรดอะมิโนสั้นกว่าข้าวสีจำนวน 14 หน่วย ซึ่งเป็นผลมาจากยีนในข้าวขาวเกิด 1 bp deletion ทำให้เกิด stop codon ส่งผลต่อกรดอะมิโนในส่วนของ C-terminus ซึ่งเป็นบริเวณสำคัญของโปรตีน transcription factor (ภาพที่ 36)



ภาพที่ 36 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSB1* ที่ได้จากการแปลรหัสของบริเวณ coding sequence ของข้าวพันธุ์ Sasanishiki และก่ำหนองเต่าคำ จำนวน 574 และ 588 กรดอะมิโนตามลำดับ เทียบกับกรดอะมิโนของยีน *OSB1* ในฐานข้อมูล GenBank (accession no.

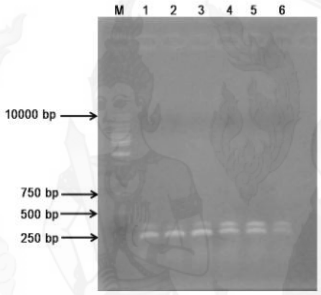
NM_001060067 และ AB021079) ซึ่งบริเวณที่แรเงาสีดำ แสดงให้เห็นลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันของข้าวแต่ละพันธุ์

หมายเหตุ ลำดับกรดอะมิโนในกรอบสีแดง แสดงตำแหน่งของ Helix-loop-helix domain

การโคลนยีน *OSB2*

1.1. การค้นหาและเพิ่มปริมาณยีน *OSB2* ด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยใช้ cDNA ที่สังเคราะห์จากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากใบเป็นแม่พิมพ์และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วนหนึ่งของยีน *OSB2* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 334 bp ในทั้งข้าวขาวและข้าวสี แสดงว่าพันธุ์เหล่านี้มีการแสดงออกของยีน *OSB2* (ภาพที่ 37)



ภาพที่ 37 ผลการทำ PCR ยีน *OSB2* จาก cDNA ของใบข้าว ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder

ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake

ช่องที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki

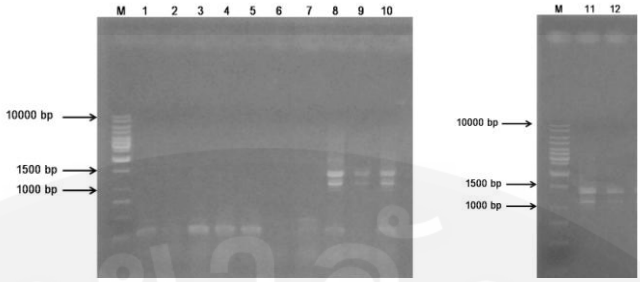
ช่องที่ 3 คือ ข้าวพันธุ์ กข 6

ช่องที่ 4 คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ช่องที่ 5 คือ ข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง

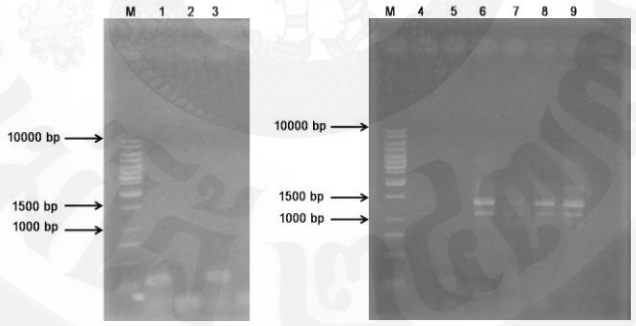
ช่องที่ 5 คือ ข้าวพันธุ์สังข์หยด

จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *OSB2* ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ cDNA ที่สังเคราะห์จากอาร์เอ็นเอเป็นแม่พิมพ์ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ coding region ของยีน *OSB2* พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 1300 bp ในใบข้าวพันธุ์ ลืมผัว MJU ลืมผัว KU หอมนิล ก่ำหนองเต่าคำและก่ำพะเยาเท่านั้น ซึ่งข้าวพันธุ์อื่นไม่พบแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 9) ส่วนอาร์เอ็นเอที่สกัดจากเมล็ดพบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังในข้าวพันธุ์ลืมผัว KU หอมนิล ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยาเท่านั้น (ภาพที่ 38 และ 39)



ภาพที่ 38 ผลการทำ RT-PCR ยีน *OSB2* จากใบข้าว ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder

ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake
ช่องที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki
ช่องที่ 3 คือ ข้าวพันธุ์ Nipponbare
ช่องที่ 4 คือ ข้าวพันธุ์ กข6
ช่องที่ 5 คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105
ช่องที่ 6 คือ ข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง
ช่องที่ 7 คือ ข้าวพันธุ์สังข์หยด
ช่องที่ 8 คือ ข้าวพันธุ์หอมนิล
ช่องที่ 9 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ
ช่องที่ 10 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา
ช่องที่ 11 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU
ช่องที่ 12 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว KU

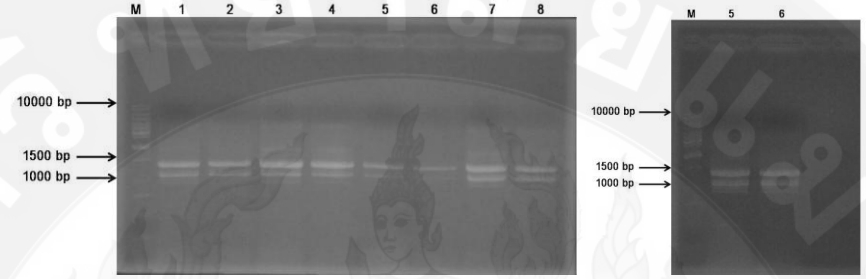


ภาพที่ 39 ผลการทำ RT-PCR ยีน *OSB2* จากเมล็ดข้าว ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder

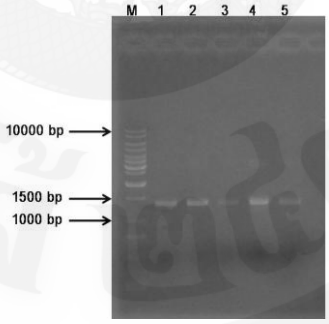
ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake
ช่องที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki
ช่องที่ 3 คือ ข้าวพันธุ์ Nipponbare
ช่องที่ 4 คือ ข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง
ช่องที่ 5 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU
ช่องที่ 6 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว KU
ช่องที่ 7 คือ ข้าวพันธุ์หอมนิล
ช่องที่ 8 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ
ช่องที่ 9 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา

1.2. การแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจล

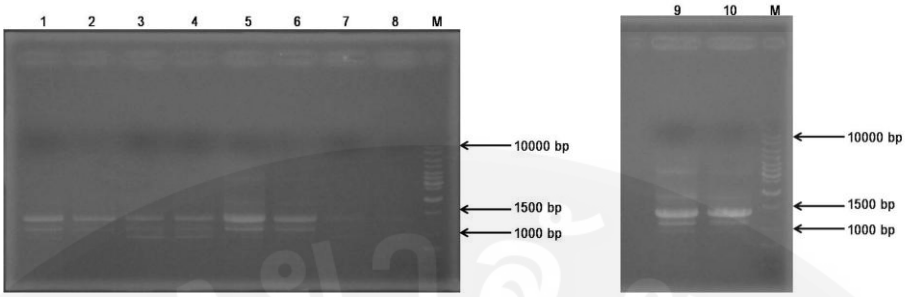
เมื่อค้นหายีนด้วยเทคนิค RT-PCR ทำการเพิ่มปริมาณยีนจากข้าวพันธุ์ต่างๆ แล้วแยกดีเอ็นเอจากเจลที่มีแถบดีเอ็นเอตามคาดหวังขนาดประมาณ 1300 และ 1100 bp จากเจล เพื่อโคลนเข้าสู่ pGEM-T Easy ต่อไป (ภาพที่ 40 – 43)



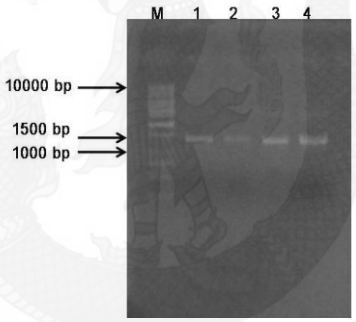
ภาพที่ 40 ผลการทำ RT-PCR ยีน *OSB2* โดยใช้ cDNA ที่สังเคราะห์จากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากใบข้าว ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1-2 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU ช่องที่ 3-4 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ช่องที่ 5-6 คือ ข้าวพันธุ์หอมนิล ช่องที่ 7-8 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ และช่องที่ 9-10 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา



ภาพที่ 41 ผลการแยกบริสุทธิ์ยีน *OSB2* จากเจล ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU ช่องที่ 2 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ ช่องที่ 3 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ช่องที่ 4 คือ ข้าวพันธุ์หอมนิล ช่องที่ 5 คือ ข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา



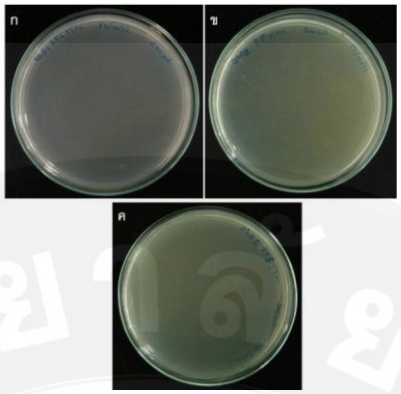
ภาพที่ 42 ผลการทำ RT-PCR ยีน *OSB2* โดยใช้ cDNA ที่สังเคราะห์จากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากใบและเมล็ดข้าว ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1-2 คือ ใบข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ช่องที่ 3-4 คือ เมล็ดข้าวพันธุ์หอมนิล ช่องที่ 5-6 คือ เมล็ดข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ช่องที่ 7-8 คือ เมล็ดข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ และช่องที่ 9-10 คือ เมล็ดข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา



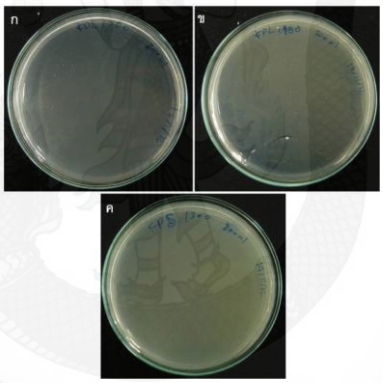
ภาพที่ 43 ผลการแยกบริสุทธิ์ยีน *OSB2* จากเจล ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1 คือ จากใบข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ช่องที่ 2 คือ เมล็ดข้าวพันธุ์หอมนิล ช่องที่ 3 คือ เมล็ดข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ช่องที่ 4 คือ เมล็ดข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ ช่องที่ 5 คือ เมล็ดข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา

1.3. การเชื่อมชิ้นยีน *OSB2* เข้ากับเวคเตอร์ pGEM-T Easy และส่งถ่ายเข้าสู่ *E. coli* competent cell

เมื่อทำการแยกบริสุทธิ์ยีน *OSB2* จากเจล แล้วนำมาเชื่อมต่อกับ pGEM-T Easy จากนั้นส่งถ่ายเข้าสู่ competent cell แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีแอมพิซิลินเพื่อคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิด จากนั้นทำการคัดเลือกพลาสมิดจากโคโลนีเหล่านี้ต่อไป (ภาพที่ 44 และ 45)



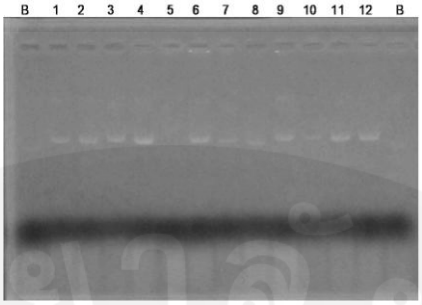
ภาพที่ 44 ผลการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *E. coli* DH5 alpha บนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร X-gal และ IPTG 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ก) ใบพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำยืนขนาด 1300 bp (ข) ใบพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำยืนขนาด 1100 bp (ค) เมล็ดพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำยืนขนาด 1300 bp



ภาพที่ 45 ผลการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* DH5 alpha บนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร X-gal และ IPTG 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ก) ใบพันธุ์ก่ำพะเยายืนขนาด 1300 bp (ข) ใบพันธุ์ก่ำพะเยายืนขนาด 1100 bp (ค) เมล็ดพันธุ์ก่ำพะเยายืนขนาด 1300 bp

1.4. การคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยขนาด (Rapid size screening)

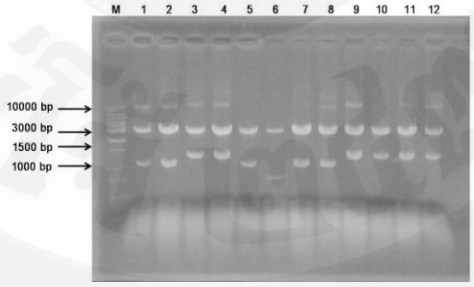
จากการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมด้วยวิธี Rapid size screening จากใบข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำและก่ำพะเยาขนาด 1300 กับ 1100 bp และจากเมล็ดพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำและก่ำพะเยา ขนาด 1300 bp อย่างละ 4 โคโลนี พบว่า ดีเอ็นเอสายผสมทุกโคลนที่คัดเลือกมีขนาดใหญ่กว่าโคโลนีสีฟ้า (ภาพที่ 46) คาดว่าโคโลนีสีขาวเหล่านี้ได้รับยีน *OSB2* จึงนำมาสกัดพลาสมิดและคัดเลือกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป



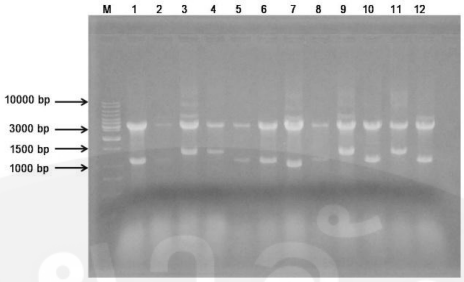
ภาพที่ 46 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาดโดยวิธี Rapid size screening ช่อง B คือ โคโลนีสีฟ้า ช่องที่ 1-4 คือ โคโลนีที่คัดเลือกจากใบพันธุ์กำหนองเต่าคำขนาด 1300 bp โคโลนีที่ 1-4 ช่องที่ 5-8 คือ โคโลนีที่คัดเลือกจากใบพันธุ์กำพะเยาขนาด 1100 bp และช่องที่ 9-12 คือ โคโลนีที่คัดเลือกจากเมล็ดพันธุ์กำหนองเต่าคำขนาด 1300 bp โคโลนีที่ 1-4

1.5. การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

จากการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่า พลาสมิดที่คัดเลือกจากโคลนที่มาจากใบและเมล็ดข้าวพันธุ์กำหนองเต่าคำ กำพะเยา มีขนาดใกล้เคียงกับที่คาดหวังคือ ยีน *OSB2* ประมาณ 1300 bp กับ 1100 bp และเวคเตอร์ pGEM-T Easy ขนาดประมาณ 3000 bp ดังนั้นโคโลนีที่คัดเลือกทั้งหมดที่มียีน *OSB2* (ภาพที่ 47 และ 48)

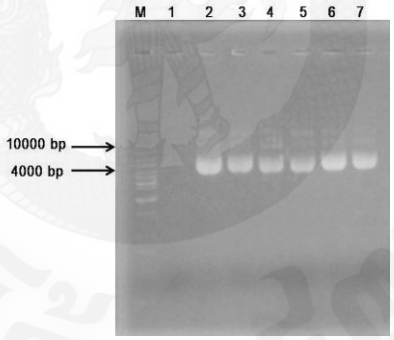


ภาพที่ 47 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาดโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ช่องที่ 1-4 คือ ใบข้าวพันธุ์กำหนองเต่าคำขนาด 1300 bp โคโลนีที่ 1-4 ช่องที่ 5-8 คือ ใบขนาด 1100 bp โคโลนีที่ 1-4 และช่องที่ 9-12 คือ เมล็ดขนาด 1300 bp โคโลนีที่ 1-4

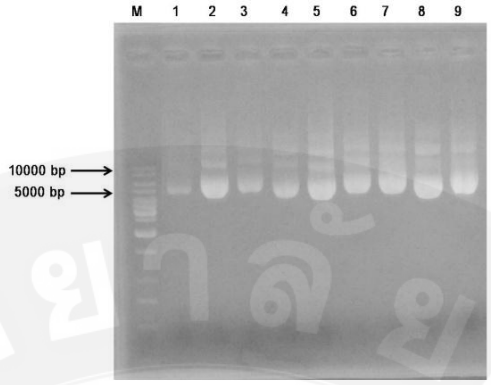


ภาพที่ 48 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาดโดยใช้เอนไซด์ตัดจำเพาะ ช่องที่ 1-4 คือ จากใบข้าวพันธุ์กำพะเยาขนาด 1300 bp โคโลนีที่ 1-4 ช่องที่ 5-8 คือ จากใบขนาด 1100 bp โคโลนีที่ 1-4 และช่องที่ 9-12 คือ จากเมล็ดขนาด 1300 bp โคโลนีที่ 1-4

เมื่อคัดเลือกโคลนที่ถูกต้องจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นทำการสกัดพลาสมิด pGEM-T Easy ที่มียีน *OSB2* จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งขนาด 1100 และ 1300 bp เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป (ภาพที่ 49 และ 50)



ภาพที่ 49 ผลการสกัดพลาสมิด pGEM-T Easy ที่มียีน *OSB2* จากกำหนองเต่าคำ ช่องที่ 1-3 คือ โคโลนีที่ 1-3 จากใบขนาด 1300 bp ช่องที่ ที่ 4-5 คือ โคโลนีที่ 1-2 จากใบขนาด 1100 bp และช่องที่ 6-7 คือ โคโลนีที่ 1-2 จากเมล็ดขนาด 1300 bp

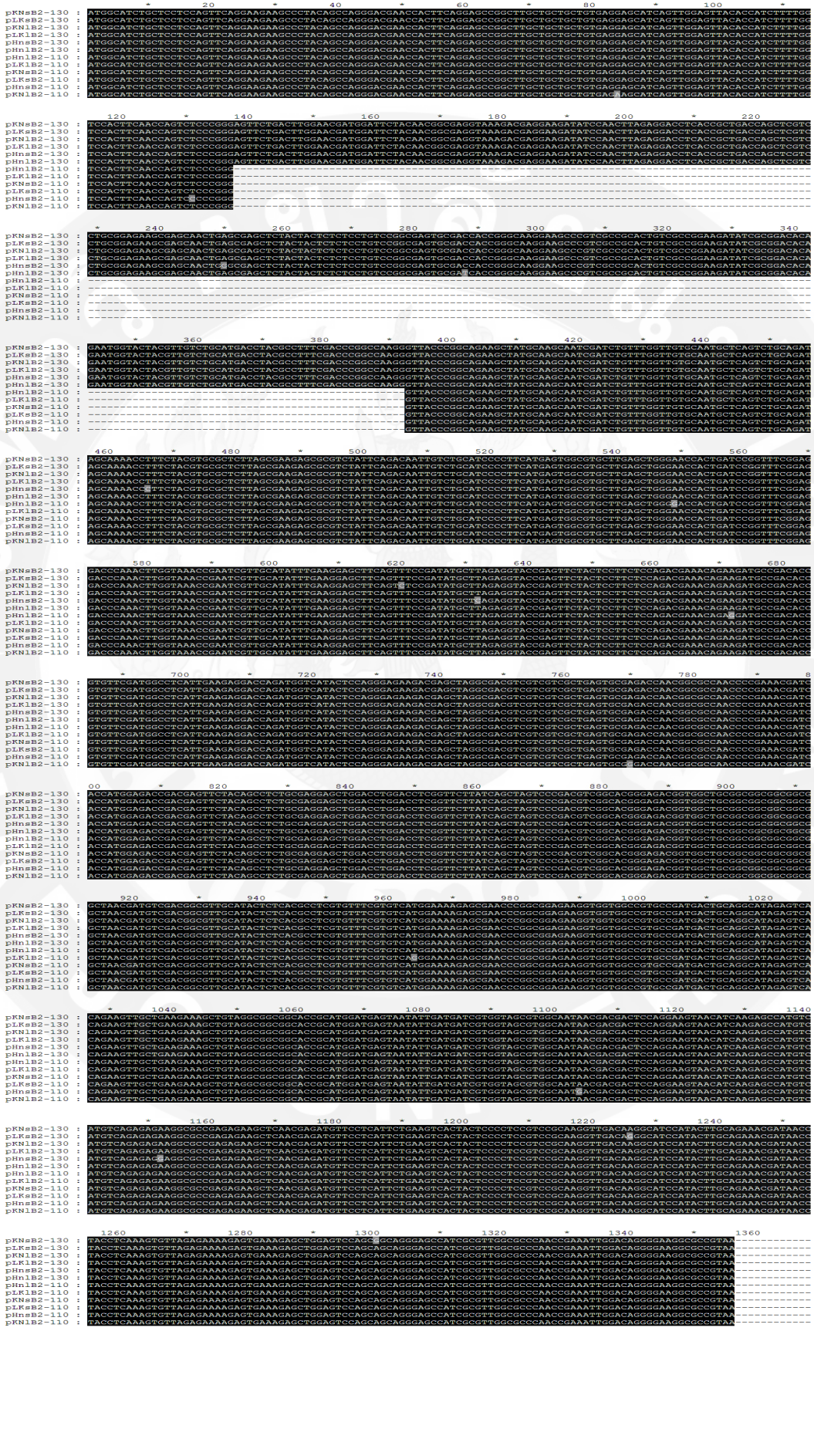


ภาพที่ 50 ผลการสกัดพลาสมิด pGEM-T Easy ที่มียีน *OSB2* ยีนจากก่ำพะเยา ช่องที่ 1-3 คือ โคโลนี 1-3 จากใบขนาด 1300 bp ช่องที่ 4-6 คือ โคโลนีที่ 4-6 จากใบขนาด 1100 bp และช่องที่ 7-9 คือ โคโลนีที่ 1-2 จากเมล็ดขนาด 1300 bp

1.6. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OSB2* จากโคโลนีสายผสมที่ถูกคัดเลือก

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ coding region ของยีน *OSB2* ที่โคลนได้จากใบข้าวที่มีเมล็ดสีดำพันธุ์ลืมผัว MJU ลืมผัว KU หอมนิล ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา ขนาด 1300 bp และ 1100 bp เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OSB2* จากข้าวสีในฐานข้อมูล GenBank (accession no. AB021080) พบว่า ยีน *OSB2* ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ open reading frame (ORF) ขนาด 1356 bp ซึ่งมีความเหมือนกับยีนในฐานข้อมูล 99 เปอร์เซ็นต์ โดยในแต่ละพันธุ์แตกต่างจากยีนในฐานข้อมูลจำนวน 10 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 51) ส่วนยีน *OSB2* ขนาด 1100 bp ประกอบด้วย ORF ขนาด 1101 bp ซึ่งพบว่า มีบริเวณลำดับเบสบางส่วนขาดหายไปในชิ้นยีนขนาด 1101 bp (ภาพที่ 52)

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OSB2* ที่โคลนจากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ขนาด 1356 bp และ1101 bp กับจีโนมิกดีเอ็นเอของยีน *OSB2* ของข้าว *japonica* ในฐานข้อมูลพบว่ายีนขนาด 1101 bp มีลำดับเบสของเอกซอนที่ 2 หายไป 255 bp แสดงว่า ยีน *OSB2* ในข้าวที่ศึกษาในงานวิจัยนี้อาจมี 2 รูปแบบ ที่มี ORFs ขนาด 1356 bp และ 1101 bp หรือ อาจมียีนเดียวแต่มีการดัดแปลง mRNA โดยเกิดการเลือกตัดอินทรอนแตกต่างกัน (alternative splicing) ทำให้เกิด mRNA 2 รูปแบบที่มีขนาดต่างกัน (ภาพที่ 52)



ภาพที่ 51 การเปรียบเทียบลำดับเบสของบริเวณ coding sequence ของยีน *OSB2* ขนาด 1300 bp และ 1100 bp ที่โคลนได้จากข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ กับยีน *OSB2* ใน GenBank (accession no. AB021080) ซึ่งบริเวณที่แรเงาสีดำ แสดงให้เห็นลำดับเบสที่เหมือนกันของข้าวแต่ละสายพันธุ์

หมายเหตุ pLMlB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากใบข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU ขนาด 1300 bp

pLMlB2-1100 คือ ยีน *OSB2* จากใบข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU ขนาด 1100 bp

pLKlB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากใบข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ขนาด 1300 bp

pLKlB2-1100 คือ ยีน *OSB2* จากใบข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ขนาด 1100 bp

pHnlB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากใบข้าวพันธุ์หอมนิล ขนาด 1300 bp

pHnlB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากใบข้าวพันธุ์หอมนิล ขนาด 1300 bp

pKNlB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากใบข้าวพันธุ์หอมนิล ขนาด 1300 bp

pKNlB2-1100 คือ ยีน *OSB2* จากใบข้าวพันธุ์หอมนิล ขนาด 1100 bp

pLKsB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากเมล็ดข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ขนาด 1300 bp

pLKsB2-1100 คือ ยีน *OSB2* จากเมล็ดข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ขนาด 1100 bp

pHnsB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากเมล็ดข้าวพันธุ์หอมนิล ขนาด 1300 bp

pHnlsB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากเมล็ดข้าวพันธุ์หอมนิล ขนาด 1300 bp

pKNsB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากเมล็ดข้าวพันธุ์หอมนิล ขนาด 1300 bp

pKNsB2-1100 คือ ยีน *OSB2* จากเมล็ดข้าวพันธุ์หอมนิล ขนาด 1100 bp

จากนั้นวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OSB2* เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีนขนาด 1356 bp และ 1101 bp มีลำดับกรดอะมิโนยาว 451 และ 366 หน่วย ตามลำดับ (ภาพที่ 51 และ 52) โดยมีลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากพันธุ์ต่าง ๆ คล้ายกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSB2* ในฐานข้อมูล (accession no. AB021080.1) ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ มีเพียงจำนวน 7 กรดอะมิโนที่แตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ และพบบริเวณส่วนที่เป็น basic helix-loop-helix (bHLH) domain ซึ่งเป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์สำหรับโปรตีน transcription factor

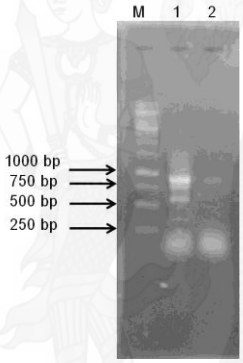
ภาพที่ 52 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ ของยีน *OSB2* ที่ได้จากการแปลรหัสของบริเวณ coding sequence จำนวน 452 กรดอะมิโน ของยีนขนาด 1356 bp ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ กับกรดอะมิโนของยีน *OSB2* ใน GenBank (accession no. AB021080.1) ซึ่งบริเวณที่แรเงาสีดำ แสดงให้เห็นลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันของข้าวแต่ละพันธุ์ และบริเวณ bHLH domain ที่ตำแหน่ง 377-428 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในข้าวทุกพันธุ์

หมายเหตุ ลำดับกรดอะมิโนในกรอบสีแดง คือ ตำแหน่ง bHLH domain

การโคลนยีน *OSC1*

1.1. การค้นและเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *OSC1* ด้วยเทคนิค RT-PCR

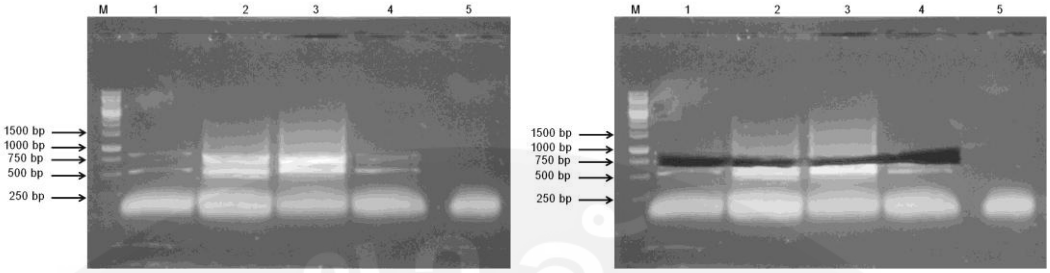
ตรวจสอบยีน *OSC1* จาก cDNA ที่สังเคราะห์จาก mRNA ที่สกัดได้จากใบและเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่ากิดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 800 bp ในทั้งข้าวขาว แดงและดำ ซึ่งยีน *OSC1* มีการแสดงออกทั้งในข้าวขาวและข้าวสี จึงทำการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *OSC1* และโคลนเข้าสู่ pGEM-T Easy เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป (ภาพที่ 53)



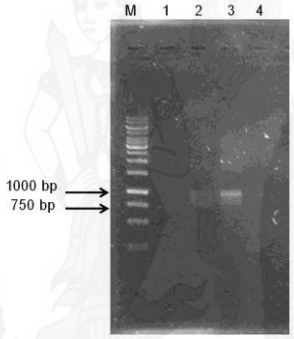
ภาพที่ 53 ผลการตรวจสอบยีน *OSC1* โดยใช้ cDNA จากใบ ด้วยเทคนิค RT-PCR ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1-2 คือ ใช้ cDNA จากใบข้าวพันธุ์ กข6 และก่ำพะเยา

1.2. การแยกบริสุทธิ์ยีน *OSC1* จากเจล

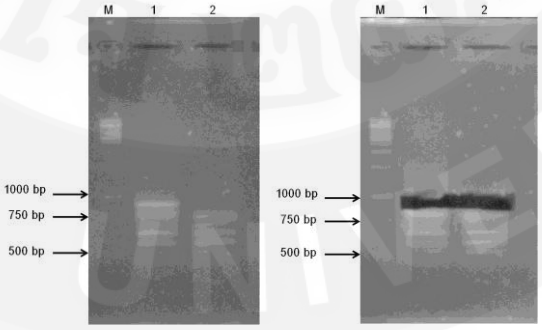
เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *OSC1* ด้วยเทคนิค RT-PCR จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *OSC1* แล้วแยกบน 1% Agarose gel ซึ่งเกิดแถบดีเอ็นเอขึ้นหลายแถบดังภาพจึงตัดเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดตามที่คาดหวังประมาณ 800 bp เพื่อทำการแยกบริสุทธิ์จากเจล (ภาพที่ 54-57)



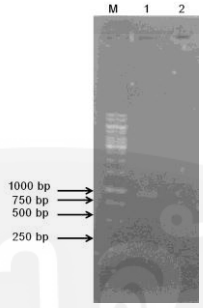
ภาพที่ 54 ผลการทำ PCR ยีน *OSC1* ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1-5 คือ ใช้ cDNA จากใบข้าวพันธุ์ กข6 ขาวดอกมะลิ 105 สังข์หยด และ T65



ภาพที่ 55 ผลการแยกบริสุทธิ์ยีน *OSC1* จากเจล โดยใช้ cDNA จากใบ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1-4 คือ ใช้ cDNA จากใบข้าวพันธุ์ กข6 ขาวดอกมะลิ 105 สังข์หยด และ T65



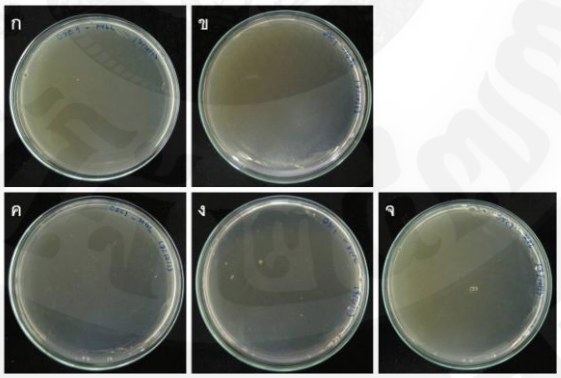
ภาพที่ 56 ผลการทำ PCR ยีน *OSC1* ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1-2 คือ ใช้ cDNA จากใบข้าวพันธุ์ Sasanishiki และ Nipponbare



ภาพที่ 57 ผลการแยกบริสุทธิ์ยีน *OSC1* จากเจล โดยใช้ cDNA จากใบ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่องที่ 1-2 คือ ใช้ cDNA จากใบข้าวพันธุ์ Sasanishiki และ Nipponbare

1.3. การเชื่อมชิ้นยีน *OSC1* จากข้าวพันธุ์ กข6 ขาวดอกมะลิ 105 หอมนิล ก่ำหนองเต่าคำและก่ำพะเยา เข้ากับ pGEM-T Easy และถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* competent cell

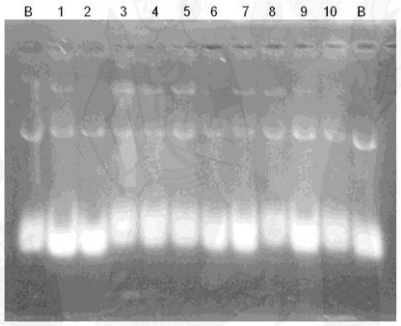
เมื่อเพิ่มปริมาณยีน *OSC1* ด้วยเทคนิค RT-PCR แล้วทำการแยกบริสุทธิ์ยีนที่มีขนาดตามที่คาดหวังประมาณ 800 bp แล้วนำมาเชื่อมเข้ากับ pGEM-T Easy แล้วคัดเลือกโคโลนีบนอาหารที่มีแอมพิซิลิน จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาทำการคัดเลือกด้วยขนาดต่อไป (ภาพที่ 58)



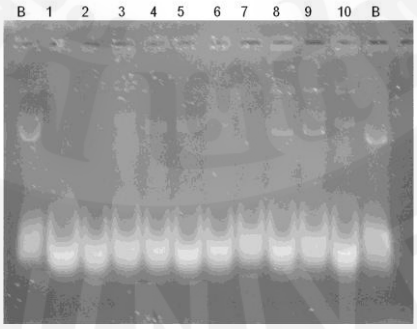
ภาพที่ 58 ผลการถ่ายดีเอ็นเอสายผสมที่มียีน *OSC1* เข้าสู่ *E. coli* DH5 alpha บนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ก. ยีนจากข้าวพันธุ์ กข6 ข. พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ค. พันธุ์หอมนิล ง. พันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ จ. พันธุ์ก่ำพะเยา

1.4. การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมจากการเชื่อมชิ้นยีน ด้วย Rapid size screening

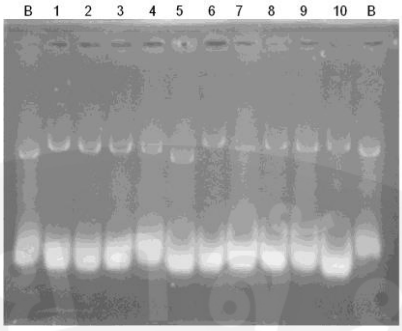
คัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมโดยนำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อจากการเชื่อมต่อยีน *OSC1* จากข้าวพันธุ์ กข6 ขาวดอกมะลิ 105 หอมนิล ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา เข้ากับพลาสมิด pGEM-T Easy จำนวน 10 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลิน จากนั้นคัดเลือกด้วยขนาด โดยเปรียบเทียบโคโลนีสีฟ้า พบว่า โคโลนีที่คัดเลือกทุกโคลนจากข้าวพันธุ์ กข6 ขาวดอกมะลิ 105 และหอมนิล มีขนาดใหญ่กว่าโคโลนีสีฟ้า จึงทำการสกัดพลาสมิดเพื่อนำไปคัดเลือกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ต่อไป ส่วนโคโลนีจากข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำเลือกสกัดโคโลนีที่ 1, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 พันธุ์ก่ำพะเยาเลือกโคโลนีที่ 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 และ 10 (ภาพที่ 59-63)



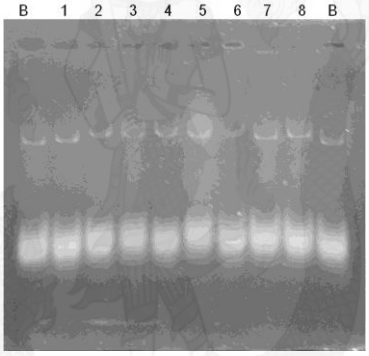
ภาพที่ 59 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมยีน *OSC1* จากใบข้าวพันธุ์ กข6 ด้วย Rapid size screening ช่อง B คือ โคโลนีสีฟ้า ช่อง 1-10 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกโคโลนีที่ 1 – 10



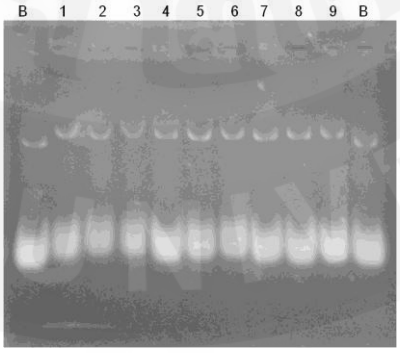
ภาพที่ 60 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมยีน *OSC1* จากใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วย Rapid size screening ช่อง B คือ โคโลนีสีฟ้า ช่อง 1-10 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกโคโลนีที่ 1 – 10



ภาพที่ 61 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมยีน *OSC1* จากใบข้าวพันธุ์หอมนิลด้วย Rapid size screening ช่อง B คือ โคโลนีสีฟ้า ช่อง 1-10 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกโคโลนีที่ 1 – 10



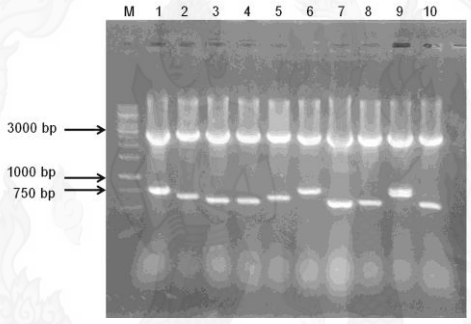
ภาพที่ 62 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมยีน *OSC1* จากใบข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำด้วย Rapid size screening ช่อง B คือ โคโลนีสีฟ้า ช่อง 1-8 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกโคโลนีที่ 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9



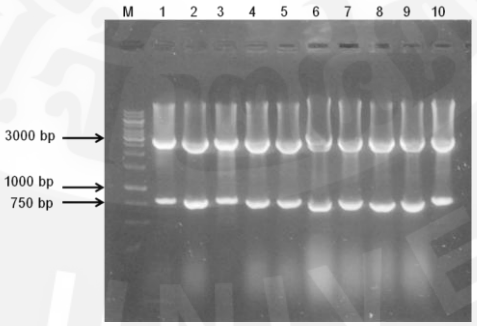
ภาพที่ 63 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมยีน *OSC1* จากใบข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำด้วย Rapid size screening ช่อง B คือ โคโลนีสีฟ้า ช่อง 1-9 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกโคโลนีที่ 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 และ 10

1.5. การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

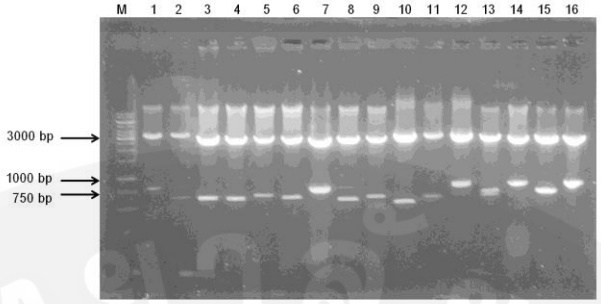
เมื่อคัดเลือกพลาสมิดสายผสมจากการเปรียบเทียบกับพลาสมิดจากโคโลนีสีฟ้า ทำการสกัดพลาสมิดและนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบว่า แต่ละโคลนที่คัดเลือกมีแถบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกับที่คาดหวังประมาณ 800 bp จึงคัดเลือกโคลนที่มีขนาดใกล้เคียงกับยีน *OSC1* มากที่สุดในแต่ละพันธุ์เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส โดยจากใบข้าวพันธุ์ กข 6 เลือกโคโลนีที่ 1 ขาวดอกมะลิ 105 โคโลนีที่ 1 หอมนิล โคโลนีที่ 1 หอมนิล โคโลนีที่ 7 ก่ำหนองเต่าคำโคโลนีที่ 5 และก่ำพะเยา โคโลนีที่ 4 (ภาพที่ 64-67)



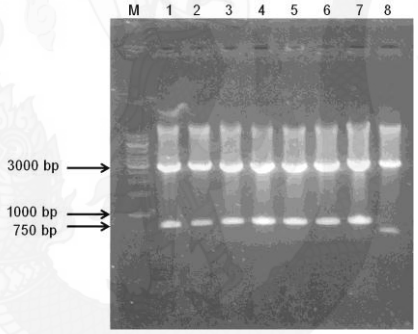
ภาพที่ 64 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมยีน *OSC1* จากใบข้าวพันธุ์ กข6 ที่เชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่อง 1-10 คือ โคโลนีที่ต้องการคัดเลือกโคโลนีที่ 1-10



ภาพที่ 65 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมยีน *OSC1* จากใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่เชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่อง 1-10 คือ โคโลนีที่ต้องการคัดเลือกโคโลนีที่ 1-10

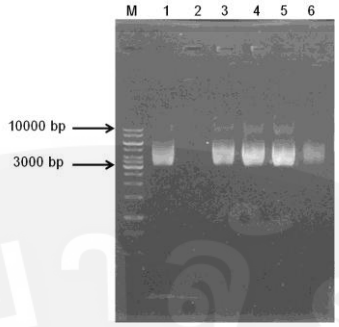


ภาพที่ 66 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมยีน *OSC1* ที่เชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่อง 1-10 คือ ยีน *OSC1* จากใบข้าวพันธุ์หอมนิล โคโลนีที่ 1-10 ช่อง 11-16 คือ ยีน *OSC1* จากใบข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำโคโลนีที่ 1, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9



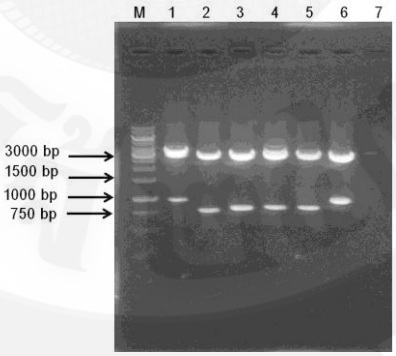
ภาพที่ 67 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมยีน *OSC1* จากใบข้าวพันธุ์พะเยาที่เชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่อง 1-8 คือ โคโลนีที่ต้องการคัดเลือกโคโลนีที่ 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 และ 10

เมื่อคัดเลือกโคลนที่ถูกต้อง ทำการสกัดพลาสมิด pGEM-T Easy ที่มีชิ้นยีน *OSC1* จากข้าวพันธุ์ กข6 ขาวดอกมะลิ 105 หอมนิล ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป (ภาพที่ 68)

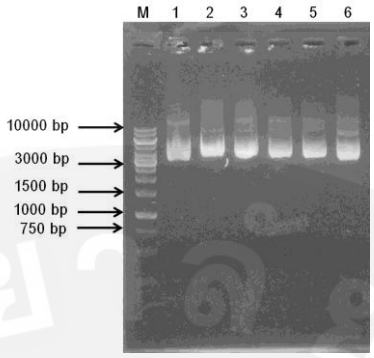


ภาพที่ 68 ผลการสกัดพลามิด pGEM-T Easy ที่มีชิ้นยีน *OSC1* เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่อง 1-6 คือ ยีน *OSC1* จากใบข้าวพันธุ์ กข6 โคโลนีที่ 1 ขาวดอกมะลิ 105 โคโลนีที่ 1 หอมนิล โคโลนีที่ 1 หอมนิล โคโลนีที่ 8 ก่ำหนองเต่าคำ โคโลนีที่ 5 และก่ำพะเยา โคโลนีที่ 4

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OSC1* จากข้าวพันธุ์ต่างๆ พบว่า มีลำดับเบสบางส่วนขาดหายไปจึงทำการเชื่อมต่อยีน *OSC1* จากข้าวพันธุ์สังข์หยด และ T65 เข้ากับพลาสมิด pGEM-T Easy อีกครั้ง รวมทั้งคัดเลือกโคลนอื่นจากปฏิกิริยา ligation เดิม และคัดเลือกโคลนที่ถูกต้องโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (ภาพที่ 69-70)



ภาพที่ 69 ผลการคัดเลือกพลาสมิดสายผสมจากการถ่ายฝากพลาสมิดจากใบข้าวสังข์หยดและ T65 ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่อง 1-3 คือ พลาสมิดจากใบข้าวพันธุ์สังข์หยด โคโลนีที่ 2, 13 และ 12 ช่อง 4-5 คือ พลาสมิดจากใบข้าวพันธุ์ T65 โคโลนีที่ 15, 12 และ ช่อง 6 คือ พลาสมิดจากใบข้าวพันธุ์สังข์หยดโคโลนีที่ 9



ภาพที่ 70 ผลการสกัดพลาสมิดสายผสมจากการถ่ายฝากพลาสมิดจากใบข้าวสังข์หยดและ T65 ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder ช่อง 1-3 คือ พลาสมิดจากใบข้าวพันธุ์สังข์หยดโคโลนีที่ 2, 13 และ 12 ช่อง 3-6 คือ พลาสมิดจากใบข้าวพันธุ์ T65 โคโลนีที่ 15, 9 และ 12

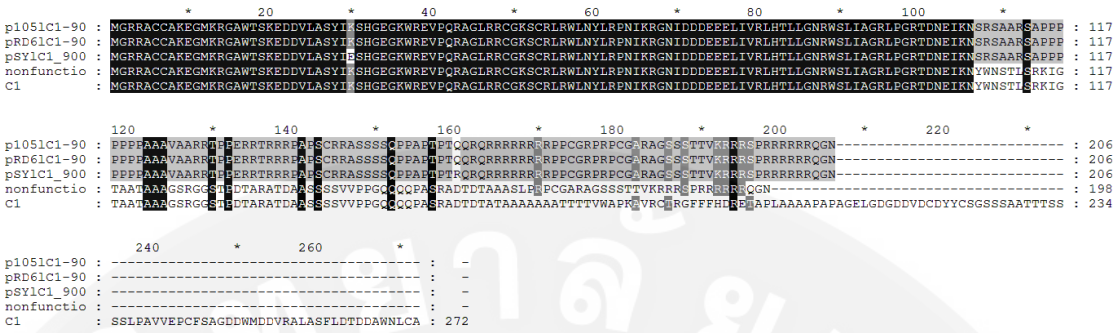
1.6. ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสยีน *OSC1* จากโคโลนีสายผสมที่ถูกคัดเลือก

จากการค้นหายีน *OSC1* ที่เป็นบริเวณ coding sequence โดยวิธี RT-PCR เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 800 bp ทั้งในข้าวขาวและข้าวสี เนื่องจากยีนมีการแสดงออกทั้งในข้าวขาวและข้าวสีแต่ลำดับเบสมีความแตกต่างกัน โดยยีนที่โคลนได้จากข้าวขาวพันธุ์ กข6 ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวแดงพันธุ์สังข์หยด มีลำดับเบสเหมือนกันคือเกิด 10 bp deletion ที่ตำแหน่ง 319 – 329 bp ใน exon ที่ 3 ทำให้เกิด frame shift ในตำแหน่งสำคัญซึ่งเป็นตำแหน่งของ R3 repeat ของ R2R3-Myb transcription factor เช่นเดียวกับรายงานก่อนหน้านี้ของ Saitoh et al. (2004) ในข้าวเมล็ดขาวพันธุ์ IR36 และ 868 ส่งผลให้เกิด stop codon และกรดอะมิโนหายไป 28 ตัว ส่งผลให้ยีนในข้าวขาวและขาวแดงสูญเสียหน้าที่ ซึ่งต้องทำการเปรียบเทียบโครงสร้างของยีน *OSC1* กับข้าวที่มี pericarp สีม่วงแดงต่อไป (ภาพที่ 71) ซึ่งจะต้องโคลนยีน *OSC1* จากข้าวที่มีเมล็ดสีดำเพื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับยีน *OSC1* จากข้าวเมล็ดขาวและแดงต่อไป อีกทั้งนำยีนจากข้าวดำมาสร้างชุดยีนที่ประกอบด้วย 35s Promoter และ *nos* Terminator สำหรับถ่ายยีนร่วมกับยีน *OSB2* ต่อไป

ภาพที่ 71 การเปรียบเทียบลำดับเบสของบริเวณ coding sequence ของยีน *OSC1* ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ กับยีน *OSC1* จากข้าวสีใน GenBank (accession no. Y15219) และ nonfunctional C1 Japonica (accession no. HQ379701)

p105LC1 = ขาวดอกมะลิ 105 ใบ, pRD6 = กข6 ใบ และ pSYLC1 = สังข์หยด ใบ

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSC1* ที่ได้จากการแปลรหัสของข้าวพันธุ์ กข6 ขาวดอกมะลิ 105 และสังข์หยด พบว่า ได้ลำดับกรดอะมิโนขนาด 206 หน่วย ซึ่งสั้นกว่ายีน *OSC1* จากข้าวสีใน GenBank ซึ่งมีขนาด 234 bp จำนวน 28 bp (accession no. Y15219) เนื่องจากยีนในทั้งข้าวขาวและข้าวแดงเกิด 10 bp deletion ทำให้เกิด stop codon จึงทำให้กรดอะมิโนสั้นกว่าในข้าวสี เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้จากข้าวแดงพันธุ์สังข์หยดในตำแหน่งที่นิวคลีโอไทด์ต่างกับข้าวขาวพันธุ์กข6 และขาวดอกมะลิ 105 ตำแหน่งที่ 88 bp และ 489 bp พบว่าทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนในสองตำแหน่งเช่นกัน (ภาพที่ 72)



ภาพที่ 72 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSC1* ที่ได้จากการแปลรหัสของบริเวณ coding sequence ที่โคลนได้จากข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSC1* จากข้าวสีใน GenBank (accession no. Y15219) และ nonfunctional C1 Japonica (accession no. HQ37970)

สรุปผลการทดลอง

ยีน *OSB1*

จากการโคลนยีน *OSB1* จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า ยีน O*SB1* มีการแสดงออกทั้งในข้าวที่มีเมล็ดขาว แดง และดำ เมื่อวิเคราะห์ยีนที่มาจากใบข้าวเมล็ดสีขาวพันธุ์ Sasanishiki พบว่า มีลำดับเบสเหมือนยีนจากข้าวพันธุ์ Nipponbare ที่อยู่ในฐานข้อมูล คือมีการขาดหายไปของลำดับเบสจำนวน 1 bp ทำให้เกิด frame shift ส่งผลให้เกิด stop codon และกรดอะมิโนหายไปบางส่วนทางด้าน C-terminus ซึ่งเป็นบริเวณสำคัญของ transcription factor ส่วนยีนที่โคลนได้จากข้าวก่ำหนองเต่าคำมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน *OSB1* จากข้าวสีในฐานข้อมูล 99 เปอร์เซ็นต์ และเกิด 2 bp deletion ที่ตำแหน่งเดียวกันซึ่งแตกต่างจากข้าวขาวที่ไม่เกิด deletion ที่ตำแหน่งตรงกันนี้ แต่อย่างไรก็ตามการเกิด 2 bp deletion ไม่ส่งผลกระทบต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนในข้าวสี

ยีน *OSB2*

จากการโคลนยีน *OSB2* จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ สามารถโคลนยีนได้จากใบและเมล็ดข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU ลืมผัว KU หอมนิล ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา (ยกเว้นลืมผัว MJU ที่พบแถบดีเอ็นเอเฉพาะในใบข้าวเท่านั้น) ซึ่งจากการทำ RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ coding region ของยีน *OSB2* พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 1300 bp และ 1100 bp เมื่อนำลำดับเบสของยีนขนาด 1300 bp จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ มาเปรียบเทียบกับยีน *OSB2* จากข้าว nearly isogenic *Pi*^{w} Taichung 65 ที่เป็นข้าวสีในฐานข้อมูล (accession no. AB021080) พบว่าเป็นบริเวณ open reading frame (ORF) ขนาด 1356 bp และมีลำดับเบสเหมือนกัน 99 เปอร์เซ็นต์ โดยมีลำดับเบสต่างกันเพียงบางตำแหน่งเท่านั้น ส่วนการเปรียบเทียบยีน 1100 bp กับลำดับเบสของจีโนมิกดีเอ็นเอของยีน *OSB2* ของข้าว *japonica* ในฐานข้อมูล GenBank (accession no. AL606682) พบว่า เกิดลำดับเบสหายไป 255 bp ซึ่งเป็นส่วนของบริเวณเอกซอนที่ 2 ส่วนลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSB2* ที่ได้จากการแปลรหัส มีขนาด 451 และ 366 หน่วย ของยีนขนาด 1356 และ 1101 bp ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้จากข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ กับยีน *OSB2* จากข้าวสีใน GenBank (accession no. BAB64302) พบว่ามีความคล้ายกัน 99 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน และพบบริเวณที่เป็น basic helix-loop-helix (bHLH) domain ที่ตำแหน่ง 377-428 ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์สำหรับโปรตีน transcription factor และได้ตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสาร Thai Journal of Genetics (Inta et al., 2013)

ยีน *OSC1*

สำหรับการโคลนยีน *OSC1* เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า ยีนมีการแสดงออกในข้าวขาว แดง และดำ เช่นเดียวกับยีน *OSB1* แต่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันระหว่างข้าวขาว แดง และดำ โดยสามารถโคลนยีนได้จากข้าวขาวพันธุ์ กข6 ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวแดงพันธุ์สังข์หยด พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OSC1* จากข้าวขาวและข้าวแดงเหมือนกัน คือเกิดการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ 10 bp ซึ่งส่งผลให้เกิด frame shift ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจนเกิด stop codon ซึ่งทำให้กรดอะมิโนที่ได้มีขนาดสั้นกว่าปกติซึ่งมีการขาดหายไปบางส่วนของ R3 repeat ใน basic helix-turn-helix domain

เมื่อได้บริเวณรหัส (full-length coding sequences) ของยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินแล้ว ในขั้นตอนต่อไปซึ่งได้รับการสนับสนุนต่อเนื่องปีที่ 2 จากทุนอุดหนุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติผ่านมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปี 2557 ได้ทำการสร้างชุดยีนที่มียีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินที่โคลนได้โดยให้ยีนทำงานภายใต้การควบคุมของ dual 35s Promoter และ *nos* Terminator แล้วโคลนชุดยีนที่ได้เข้าสู่ binary vector โดยจะใช้ pCAMBIA1305.1 ซึ่งมียีนต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นยีนเครื่องหมายและมียีน *gusA* เป็นยีนรายงานผล หลังจากนั้น ถ่ายฝากพลาสมิดสายผสมเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียม แล้วถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวเพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในการควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างซึ่งมีรหัสสำหรับสร้างเอนไซม์ ต่าง ๆ ในวิถีของการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว และศึกษาการใช้ประโยชน์เป็นยีนรายงานผลหรือเป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการคัดเลือกแคลลัสหรือต้นพืชที่ได้รับยีนโดยสังเกตจากการเกิดสีแดงหรือม่วงที่เกิดจากการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน นอกจากนี้ การเข้าใจโครงสร้างและหน้าที่ของยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินยังจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงขึ้น ทำให้เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของข้าวได้

เอกสารอ้างอิง

กรมการข้าว. 2557. **การผลิตและตลาดข้าวของโลก.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.ricethailand.go.th/home/index.php?option=com_content&view=article&id=34. (20 พฤษภาคม 2557).

กรมการข้าว. 2557. **องค์ความรู้เรื่องข้าว.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.ricethailand.go.th/home// (20 พฤษภาคม 2557).

บุญหงส์ จงคิด. 2547. **ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต.** กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 184 น.

บริษัท แช็ท ฟอร์ เฮลท์ จำกัด. 2555. **แอนโทไซยานิน.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.chat4health.com/?name=faq&file=readfaq&id=2 (1 สิงหาคม 2555).

บริษัท สีสีนิล ไรซ์ จำกัด. **ข้าวหอมนิล.** 2557. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.sininrice.com/insightsub3.html. (1 สิงหาคม 2555).

ผู้จัดการออนไลน์. 2557. **ข้าวก่ำ.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.manager.co.th/campus/viewnews.aspx?NewsID=9550000038309. (20 พฤษภาคม 2557).

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

Furukawa, T., M. Maekawa, T. Oki, I. Suda, S. Iida, H. Shimada, I. Takamure and K. Kadowak. 2007. The Rc and Rd genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp. **The Plant Journal** 49: 91–102.

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

Ghasemzadeh, A. and N. Ghasemzadeh. 2011. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. **Journal of Medicinal Plants Research** 5(31): 6697-6703.

Hirose, S., H. Kawahigashi, A. Tagiri and Y. Ohawa. 2008. Herbicide-induced anthocyanin accumulation in transgenic rice by expression of rice OSB2 under the control of rice CYP72A21 promoter. **J Agric Food Chem** 56(4): 1259-63.

Hu, J., B. Anderson and S.R. Wessler. 1996. Isolation and characterization of rice *R* gene: Evidence for distinct evolutionary paths in rice and maize. **Genetics** 142: 1021-1031.

Inta, P., W. Phongburaphat, S. Pongjareankit, S. Chowpongpang, V. Sangtong and C. Sakulsingharoj. 2013. Cloning and characterization of *OSB2* gene controlling anthocyanin biosynthesis in rice. **Thai J. Genet**. 6 (1): 25-29.

Ithal, N. and A. R. Reddy. 2004. Rice flavonoid pathway genes, *OsDfr* and *OsAns*, are induced by dehydration, high salt and ABA, and contain stress responsive promoter elements that interact with the transcription activator, OsC1-MYB. **Plant Science** 166: 1505–1513**.**

Kawahigashi, H., S. Hirose, T. Iwai, Y. Ohashi, W. Sakamoto, M. Maekaw and Y. Ohkawa. 2007. Chemically Induced Expression of Rice OSB2 under the Control of the OsPR1.1 Promoter Confers Increased Anthocyanin Accumulation in Transgenic Rice. **J. Agric. Food Chem** 55: 1241-1247.

Kinoshita, T. 1995. Report of committee on gene symbolization,nomenclature and linkage groups. **Rice Genet. Newsl** 12: 9–153.

Lim, S. H. and S. H. Ha. 2013. Marker development for the identification of rice seed color. **Plant Biotechnol Rep** 7; 391–398.

Nagao, S. and M.E. Takahashi. 1963. Trial Construction of twelve linkage groups in Japanese. **J. Facul. Agr. Hokkaido Univ** 53: 72-139**.**

NCBI. 2557. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.ncbi.nlm.nih.gov. (20 พฤษภาคม 2557).

Reddy, V. S., S. Dash and A. R. Reddy. 1995 .Anthocyanin pathway in rice (*Oryza sativa* L): identification of a mutant showing dominant inhibition of anthocyanins in leaf and accumulation of proanthocyanidins in pericarp. **Theor Appl Genet** 91(2): 301-312.

Saika, H., W. Sakamoto, M. Maekawa and S. Toki. 2011. Highly efficient visual selection of transgenic rice plants using green fluorescent protein or anthocyanin synthetic genes**.** **Plant Biotechnology** 28: 107–110.

Sakamoto, W., T. Ohmori, K. Kageyama, C. Miyazaki, A. Saito, M. Murata, K. Noda and M. Maekawa. 2001. The *Purple leaf (Pl)* Locus of Rice: the Pl^{w} Allele has a complex

Organization and Includes Two Genes Encoding Basic Hlix-Loop-Helix Proteins Involved in Anthocyanin Biosynthesis. **Plant Cell Physiol** 42(9): 982-991.

Saitoh, K, K. Onishi, I. Mikami, K. Thidar and Y. Sano. 2004. Allelic Diversification at the *C (OsC1)* Locus of Wild and Cultivated Rice:Nucleotide Changes Associated With Phenotypes. **Genetics Society of America** 168: 997–1007.

Samanta, A., G. Das and S. K. Das. 2011. Roles of flavonoids in plants. **Int J Pharm Sci Tech** 6(1): 12-35.

Schijlen, E. G., C. R. Vos, A. J. Tunen and A. G. Bovy. 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. **Phytochemistry** 65: 2631–2648.

Seitz, C., M. Vitten, P. Steinbach, S. Hartl, J. Hirsche, W. Rathje, D. Treutter and G. Forkmann. 2007. Redirection of anthocyanin synthesis in Osteospermum hybrid by a two-enzyme manipulation strategy. **Phytochemistry** 68: 824–833.

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

Shin, Y.M., H. J. Park, S. D. Yim, N. I. Baek, C. H. Lee, G. An and Y. M. Woo. 2006. Transgenic rice lines expressing maize *C1* and *R-S* regulatory genes produce various flavonoids in the endosperm. **Plant Biotechnology Journal** 4**:** 303–315**.**

Sweeney, M. T., M. J. Thomson, B. E. Pfeilb and S. McCoucha. 2006. Caught Red-Handed: Rc Encodes a Basic Helix-Loop-Helix Protein Conditioning Red Pericarp in Rice. **Plant Cell** 18: 283–294.

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

การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีน *OSB2* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว

Cloning and characterization of *OSB2* gene controlling anthocyanin biosynthesis in rice

พูนศรี อินต๊ะ[1] วิศิษฏ์ พงศ์บุรพัฒน์[2] แสงทอง พงษ์เจริญกิต[1] ศรีเมฆ ชาวโพงพาง[3] วราภรณ์ แสงทอง[1] และ ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์[1]*

Poonsri Inta[1], Wisit Phongburaphat[2], Saengtong Pongjareankit[1], Srimek Chowpongpang[3], Varaporn Sangtong[1] and Chotipa Sakulsingharoj[1]*

[1]สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[2]สาขาวิชาพืชผัก คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[3]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ 10900

[1]Program in Genetics, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290

[2]Division of Vegetable Technology, Faculty of Agriculture Production, Maejo University, Chiang Mai 50290

[3]Program in Plant Science, Kasetsart University, Bangkok 10900

**Corresponding author: chotipas@mju.ac.th*

บทคัดย่อ

ยีน *OSB2* เป็นรหัสของ *myc* transcription factor ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว งานวิจัยนี้ได้ค้นหายีน *OSB2* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ coding sequence (cds) ของยีน *OSB2* โดยใช้ cDNA ที่สังเคราะห์มาจาก mRNA ที่สกัดจากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ลืมผัว หอมนิล และก่ำ พบยีน *OSB2* ที่มี open reading frame (ORF) ขนาด 1356 bp ซึ่งมีความเหมือนกับยีน *OSB2* ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (accession no. AB021080) ถึง 99 % และพบยีน *OSB2* ที่ประกอบด้วย ORF ขนาด 1101 bp ซึ่งมีบริเวณ exon ที่ 2 ขาดหายไป (255 คู่เบส) ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของ ORFs ขนาด 1356 bp และ 1101 bp พบว่า ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 451 และ 366 หน่วย ตามลำดับ ซึ่งมีความคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSB2* ในฐานข้อมูล GenBank (accession no. BAB64302) ถึง 99 % จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนแสดงว่า ยีน *OSB2* ที่โคลนได้ในงานวิจัยนี้อาจมี 2 รูปแบบ หรืออาจมียีนรูปแบบเดียวในจีโนมข้าว แต่เกิดการเลือกตัดอินทรอน (alternative splicing) ในงานวิจัยต่อไปจะศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนที่โคลนได้ เพื่อให้เข้าใจการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว

ABSTRACT

The *OSB2* gene encodes *myc* transcription factor which regulates expression of several structural genes involved with anthocyanin biosynthesis in rice. In this study, the complete coding sequences (cds) of *OSB2*

genes were isolated from young leaves and developing seeds of rice by RT-PCR. Nucleotide sequencing analysis revealed that all 3 black rice varieties, Lerm-Poa, Hom-nin and Khum had a single open reading frame (ORF) of 1356 bp which were 99 % identical to the *OSB2* gene reported in GenBank (accession no. AB021080). These rice varieties also had an *OSB2* gene containing a single ORF of 1101 bp with 99 % identity with the 1356 bp fragments except for the deletion of the 2nd exon (255 bp deletion). The deduced amino acid sequences of the 1356 and the 1101 bp ORFs are composed of 451 and 366 amino acid residues, respectively, which showed 99 % similarity to those of OSB2 (accession no. BAB64302). The results suggested that the *OSB2* genes from this study may have 2 forms. Alternatively, the 1356 bp and 1101 bp ORFs may be due to alternative splicing of mRNA transcribed from a single *OSB2* gene in rice genomes of these black rice varieties. The cloned *OSB2* genes will be further analyzed for structure and gene functions to understand the regulation of anthocyanin biosynthesis in colored rice.

คำสำคัญ: ยีน *OSB2*, ข้าว, แอนโทไซยานิน
Keyword: *OSB2* gene, rice, anthocyanin

บทนำ

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุในดอกไม้และผลไม้ เพื่อดึงดูดให้แมลงช่วยในการผสมเกสร ปกป้องผักและผลไม้จากการทำลายของรังสี UV-B และเป็น anti-oxidant ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ในการป้องกันและลดความเสี่ยง ต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตันและโรคมะเร็ง (Geekiyanage *et al*., 2007)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีในข้าวคือ ยีนควบคุม (regulatory gene) และยีนโครงสร้าง (structural gene) โดยยีนควบคุมเป็นรหัสของ transcription factor ที่สำคัญ 2 กลุ่มคือ MYB transcription factor และ MYC transcription factor ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้าง ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ส่วนยีนโครงสร้างเป็นรหัสของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในpathway การสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Geekiyanage *et al*., 2007) ยีนควบคุมที่สำคัญได้แก่ ยีนในตำแหน่ง *Puple leaf (Pl)* ซึ่งคล้ายกับกลุ่มของ *R/B* loci ของข้าวโพด และอยู่ในกลุ่มของ MYC transcription factor (basic helix-loop-helix (bHLH) protein) พบว่า ตำแหน่งนี้เป็นที่ตั้งของยีน *OSB1* และ *OSB2* (Sakamoto *et al*., 2001) โดย *OSB2* มีรายงานว่าเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าไม่แสดงออกในข้าว *japonica* ที่มีเมล็ดขาว (Shih *et al*., 2008) ส่วนตำแหน่ง *C* locus ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 6 เป็นตำแหน่งของยีน *OSC1* ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ R2R3-Myb transcription factors (Saitoh *et al*., 2004)

อย่างไรก็ตามกลไกของยีนในการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน โดยการทำงานของยีนควบคุมและยีนโครงสร้างในข้าวยังไม่ทราบแน่ชัด ดังนั้นงานวิจัยนี้จะได้โคลนยีนและศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เพื่อทำให้เข้าใจกลไกการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบและเมล็ดข้าว

พันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษาคือ ข้าวเมล็ดขาว ได้แก่ พันธุ์ Kitaake กข6 และหอมมะลิ 105 ข้าวเมล็ดแดง ได้แก่ พันธุ์หอมมะลิแดง และข้าวเมล็ด

ดำ ได้แก่ พันธุ์ลืมผัว หอมนิล และก่ำ โดยทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากใบอ่อนและเมล็ดข้าวในระยะน้ำนมด้วย TRIzol reagent (invitrogen, USA)

การโคลนยีน *OSB2* โดยเทคนิค RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้มาสังเคราะห์ cDNA โดยปฏิกิริยา reverse transcription โดยใช้ oligo (dT) ทำตามขั้นตอนของชุดสำเร็จรูป Superscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA) จากนั้นนำ cDNA ไปเป็นแม่พิมพ์ในการโคลนยีน *OSB2* ในข้าวพันธุ์ต่างๆ โดยเทคนิค RT-PCR

การเชื่อมต่อชิ้นยีน *OSB2* กับเวกเตอร์ pGEM-T Easy และคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสม

นำยีน *OSB2* ที่โคลนได้มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, USA) และถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *E. coli* คัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสม และส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท 1st BASE (Malaysia)

กาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *OSB2*

เปรียบเทียบลำดับเบสและลำดับของกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้ กับยีนที่มีรายงานมาก่อนในฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม ClustalX 2.1 และ GeneDoc และวิเคราะห์ motif ของลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม motif scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การค้นหาและโคลนยีนบริเวณ coding sequence ของยีน *OSB2* ด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการค้นหายีน *OSB2* ที่เป็นบริเวณ complete coding sequence (cds) โดยใช้ cDNA เป็นแม่พิมพ์ ด้วยวิธี RT-PCR พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1100 และ 1300 bp เฉพาะในข้าวสีทั้งใบและเมล็ด ได้แก่ ข้าวพันธุ์ลืมผัว หอมนิล และก่ำ (Figure 1) เมื่อนำลำดับเบสของยีนขนาด 1300 bp จากข้าวพันธุ์ต่างๆ มาเปรียบเทียบกับยีน *OSB2* จากข้าว nearly isogenic *Pi*^{w} Taichung 65 ที่เป็นข้าวสีในฐานข้อมูล (accession no. AB021080) พบว่าเป็นบริเวณ open reading frame (ORF) ขนาด 1356 bp และมีลำดับเบสเหมือนกัน 99% โดยมีลำดับเบสต่างกันเพียงบางตำแหน่งเท่านั้น (Figure 2) ส่วนการเปรียบเทียบยีน 1100 bp กับลำดับเบสของจีโนมิกดีเอ็นเอของยีน *OSB2* ของข้าว Japonica ในฐานข้อมูล GenBank (accession no. AL606682) พบว่า เกิดลำดับเบสหายไป 255 bp ซึ่งเป็นส่วนของบริเวณเอกซอนที่ 2 (Figure 2)

ลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSB2* ที่ได้จากการแปลรหัส พบว่า ได้ลำดับกรดอะมิโนขนาด 451 และ 366 หน่วย ของยีนขนาด 1356 และ 1101 bp ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้ จากข้าวสายพันธุ์ต่างๆ กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSB2* ใน GenBank

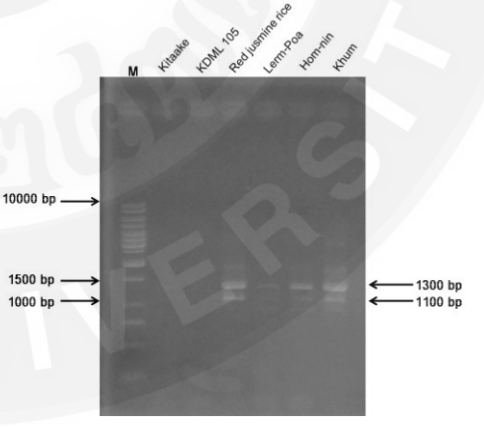


Figure 1 RT-PCR analysis of coding sequences (cds) of *OSB2* gene in rice varieties (Kitaake, KDML 105, Red jasmine rice, Lerm-Poa, Hom-nin and Khum) using cDNA prepared from rice leaves. Lane M; 1 Kb DNA Ladder.

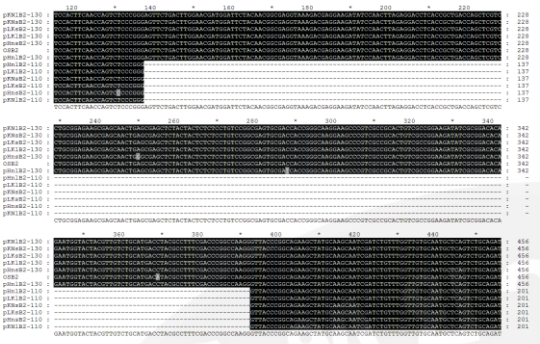


Figure 2 Alignment of 1300-bp and 1100-bp coding sequences of *OSB2* genes cloned from various rice varieties and *OSB2* gene from GenBank (accession no. AB021080). The figure shows deletion of the 2nd exon of the 1101-bp ORFs. pLKlB2 and pLKsB2 = leaves and seeds from Lerm-Poa. pHnlB2 and pHnsB2 = leaves and seeds from Hom-nin. pKnlB2 and pKnsB2 = leaves and seeds from Khum. *OSB2* = *OSB2* gene from GenBank.

(accession no. BAB64302) พบว่ามีความคล้ายกัน 99% เช่นกัน มีเพียง 8 กรดอะมิโนที่แตกต่างกัน และพบบริเวณที่เป็น basic helix-loop-helix (bHLH) domain ที่ตำแหน่ง 377-428 ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์สำหรับโปรตีน transcription factor (Figure 3)

สรุปผลการทดลอง

จากการค้นหายีน *OSB2* ที่เป็นบริเวณ coding sequence โดยวิธี RT-PCR เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 1100 และ 1300 bp เฉพาะในข้าวสีแต่ไม่พบในข้าวขาวอาจเนื่องจากในข้าวขาวมีการแสดงออกของยีน *OSB2* น้อย หรือไพรเมอร์ที่ออกแบบไม่สามารถจับลำดับเบสของยีน *OSB2* จากข้าวขาวได้ ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนในบริเวณ coding sequence

เมื่อนำลำดับเบสของชิ้นยีนขนาด 1300 bp ไปเปรียบเทียบกับยีนที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความเหมือนกับยีน *OSB2* จากฐานข้อมูลที่บริเวณ open reading frame (ORF) ขนาด 1356 bp และมีลำดับเบสต่างกันเพียงบางตำแหน่งเท่านั้น และยีนขนาด 1100 bp เกิดลำดับเบสหายไป 255 bp ในบริเวณ exon ที่ 2 ของยีน อาจเนื่องจากยีนในข้าวที่ศึกษาในงานวิจัยนี้อาจมี 2 รูปแบบ ที่มี ORFs ขนาด 1356 และ 1101 bp หรืออาจมียีนเดียวแต่มีการดัดแปลง mRNA โดยเกิดการเลือกตัดอินทรอนแตกต่างกัน (alternative splicing) ทำให้เกิด mRNA 2 รูปแบบที่มีขนาดต่างกัน โดยลำดับดีเอ็นเอที่หายไปสอดคล้องกับกรดอะมิโนที่หายไป 85 หน่วย และพบบริเวณที่

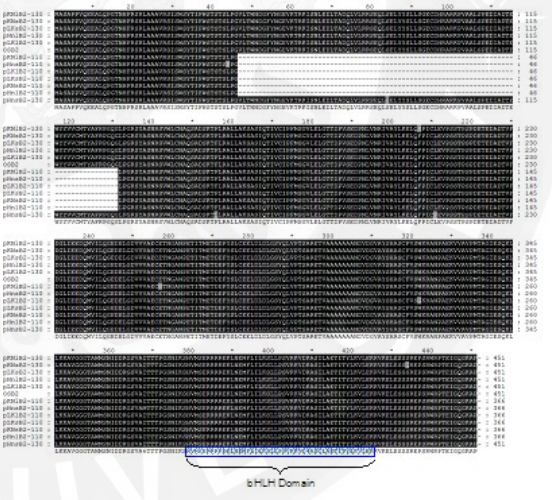


Figure 3 Alignment of deduced amino acid sequences from ORFs of *OSB2* genes cloned from various rice varieties and OSB2 amino acid sequences from GenBank (accession no.BAB64302). The bHLH domains are highlighted in blue at 377-428 amino acid positions.

เป็น basic helix-loop-helix (bHLH) domain ในยีน *OSB2* ทั้งขนาด 1356 และ 1101 bp ในบริเวณ C terminus ซึ่งเป็นบริเวณ DNA binding domain ที่มีความสำคัญต่อการทำงานของโปรตีน transcription factor จากการวิเคราะห์ motif ของลำดับกรดอะมิโน พบว่า ยีนขนาด 1101 bp มีการขาดหายของ exon ที่ 2 และขาดกรดอะมิโน 85 หน่วย ทำให้มีบริเวณ phosphorylation site บางส่วนหายไปซึ่งอาจมีผลต่อกลไกควบคุมการทำงานของ transcription factor ในการควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

ในงานวิจัยขั้นต่อไปจะศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีน *OSB2* ที่โคลนได้เพื่อให้เข้าใจการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว และประยุกต์ใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการวิจัยครั้งนี้ และทุนการศึกษาประเภททุนศิษย์เรียนดี บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปี 2555 ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนการศึกษาแก่นางสาวพูนศรี อินต๊ะ

เอกสารอ้างอิง

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.

Saitoh K, Onishi K, Mikami I, Thidar K and Sano Y (2004) Allelic diversification at the *C (OsC1)* locus of wild and cultivated rice: Nucleotide changes associated with phenotypes. Gen Soc America 168: 997–1007.

Sakamoto W, Ohmori T, Kageyama K, Miyazaki C, Saito A, Murata M, Noda K and Maekawa M (2001) The *Purple leaf (Pl)* locus of rice: the Pl^{w} allele has a complex organization and includes two genes encoding basic helix-loop-helix proteins involved in anthocyanin biosynthesis. Plant Cell Physiol 42: 982–991.

Shih CH, Chu H, Tang LK, Sakamoto W, Maekawa M, Chu IK, Wang M and Lo C (2008) Functional characterization of key structural genes in rice xavonoid biosynthesis. Planta 228: 1043–1054.