

การถ่ายยีนและวิเคราะห์การแสดงออกของยีนควบคุมการสังเคราะห์
แอนโทไซยานินในข้าว



ลลิตา ณ ราชสีมา

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2563

การถ่ายยีนและวิเคราะห์การแสดงออกของยีนควบคุมการสังเคราะห์
แอนโทไซยานินในข้าว



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์

สำนักบริหารและพัฒนาระบบราชการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การถ่ายยีนและวิเคราะห์การแสดงออกของยีนควบคุมการสังเคราะห์
แอนโทไซยานินในข้าว

ลลิตา ณ ราชสีมา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกกุลสิงหาโรจน์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร.นฤมล เข้มกลัดเงิน)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร

(รองศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)

รักษาการแทนรองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน

อธิการบดีมหาวิทยาลัยแม่โจ้

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ชื่อเรื่อง	การถ่ายยีนและวิเคราะห์การแสดงออกของยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว
ชื่อผู้เขียน	นางสาวลลิตา ณ ราชสีมา
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกกุลสิงหาโรจน์

บทคัดย่อ

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสามารถพบสารดังกล่าวได้บริเวณเนื้อเยื่อของพืช เช่น เมล็ดข้าวที่มีสี การสังเคราะห์แอนโทไซยานินมียีนที่เกี่ยวข้องหลัก 2 ชนิด คือ ยีนควบคุมและยีนโครงสร้าง ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการถ่ายยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเข้าสู่ข้าว ศึกษาการทำงานร่วมกันของยีนควบคุมสองชนิดในข้าว และตรวจสอบการใช้ยีนควบคุมเป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกแคลลัสในขั้นตอนการถ่ายยีน จากการศึกษาการถ่ายยีนที่โคลนได้จากข้าวดำพันธุ์เก่า ได้แก่ ยีน *OsC1* และ *OsB2* และถ่ายยีน *OsC1*, *OsB2* และ *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง พบว่ามีต้นข้าวที่ได้รับยีนจำนวน 8, 59 และ 10 ต้น ตามลำดับ โดยพีโนไทป์ของต้นข้าวที่ได้รับยีน *OsC1* และยีนร่วมจะมีลักษณะกาบใบ ขอบ เขียวกันแมลง ปลายกลีบดอกใหญ่ และหางข้าวเป็นสีแดง นอกจากนี้ยังพบว่ายอดเกสรเพศเมียเป็นสีม่วง ส่วนต้นข้าวที่ได้รับยีน *OsB2* มีพีโนไทป์เหมือนกับต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน แต่จะพบว่าเมล็ดอ่อนและเมล็ดแก่มีการสะสมรงควัตถุสีม่วง และข้าวที่ได้รับยีน *OsC1* ร่วมกับ *OsB2* มีพีโนไทป์ของต้นเหมือนกับต้นที่ได้รับยีน *OsC1* เมล็ดมีการสะสมรงควัตถุสีม่วงเหมือนต้นที่ได้รับยีน *OsB2* การวิเคราะห์ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 ที่ได้รับการถ่ายยีน *OsC1*, *OsB2* และยีนร่วม ไปสู่รุ่นลูก พบว่ามีการกระจายตัวของยีนได้อัตราส่วน 3 : 1 และ 15:1 ในต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *OsC1* และ *OsB2* แสดงว่าอาจมียีนแทรกในจีโนมข้าว 1 หรือ 2 ตำแหน่ง และพบอัตราส่วน 9 : 3 : 3 : 1 ในต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีนร่วมระหว่าง *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* แสดงว่ามียีนแทรกในจีโนมข้าว 2 ตำแหน่ง จากการสร้างข้าวลูกผสมโดยผสมต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน *OsC1* เป็นต้นแม่ กับต้นที่มียีน *OsB2* เป็นต้นพ่อ พบว่าได้ลูก F_1 ที่มียีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่ามีต้นที่ได้รับยีนร่วมจำนวน 8 ต้น โดยมีพีโนไทป์สีม่วงทั้งต้นซึ่งเกิดจากการสะสมแอนโทไซยานิน นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่าต้นข้าวรุ่น T_1 ที่ได้รับยีน *OsC1*, *OsB2* ยีนร่วม และลูกผสม F_1 มีการแสดงออกของยีน *OsC1* *OsB2* และยีน

โครงสร้างที่สำคัญในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินสูงกว่าต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน เมล็ดแก่ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 ที่ได้รับยีน *OsB2* มีปริมาณแอนโทไซยานินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเมล็ดแก่ของข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *OsC1* และข้าวที่ได้รับยีนร่วม งานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเป็นยีนคัดเลือกหรือยีนเครื่องหมายในขั้นตอนการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าว และนำไปพัฒนาในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ข้าวพันธุ์ดีที่มีแอนโทไซยานินสูงในอนาคต

คำสำคัญ : ข้าว, แอนโทไซยานิน, การถ่ายยีน, ยีน *OsB2*, ยีน *OsC1*



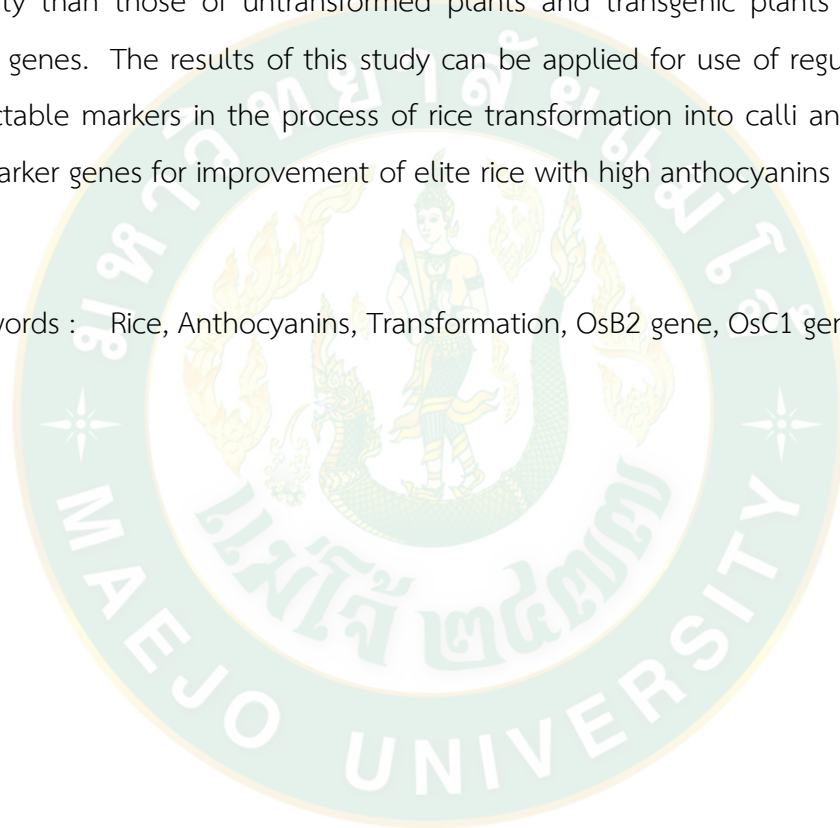
Title	TRANSFORMATION AND EXPRESSION ANALYSIS OF REGULATORY GENE IN ANTHOCYANIN BIOSYNTHETIC PATHWAY IN RICE
Author	Miss Lalita Na-rachasima
Degree	Master of Science in Genetics
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Chotipa Sakulsingharoj

ABSTRACT

Anthocyanins are water soluble pigments, classified in the flavonoid group and have high antioxidant activity. They can be found in the tissues of plants, including pericarp of colored rice. Anthocyanin biosynthesis in rice involves two major classes of genes, the regulatory genes and the structural genes. In this study, transformation of genes controlling anthocyanin synthesis into rice was studied for complementary effects of two regulatory genes to be used as markers for callus selection in rice transformation. Transformation of *OsC1* and *OsB2* genes which were cloned from Thai black rice, Kham and co-transformation of both genes into red pericarp rice, Kasalath were investigated. The results showed that transgenic rice plants containing *OsC1*, *OsB2*, and both *OsC1* and *OsB2* genes were 8, 59 and 10 plants respectively. The phenotypic traits of *OsC1* transgenic rice were red in some tissues including leaf sheath, node, apiculus and awn. The high accumulation of purple pigments in stigma were also found. The phenotypic traits of *OsB2* transgenic rice were similar to those of wild-type but developing and mature seeds showed purple pigmentation on their pericarp. Transgenic rice containing both genes, had similar phenotypes to *OsC1* transgenic rice. However, the seeds accumulated purple pigment similar to those of *OsB2* transgenic rice. Segregation analysis of *OsC1* and *OsB2* transgenic rice showed 3 : 1 and 15 : 1 ratios in T₁ generation, possibly suggesting one or two gene insertion sites in the rice genome. Transgenic rice plants containing both genes showed the ratio of 9 : 3 : 3 : 1 in T₁ generation, indicating two insertion sites of transgenes in the rice genome. The cross between

T₁ generation plants of *OsC1* transgenic plants as a female plant and *OsB2* transgenic plants as a male plant produced 8 F₁ hybrids which had both transgenes and high accumulation of anthocyanins in purple seedlings. In addition, semi-quantitative RT-PCR analysis revealed that overexpression of *OsC1*, *OsB2* and important structural genes in anthocyanin biosynthetic pathway was found in T₁ seedlings of transgenic plants with *OsC1*, *OsB2* and both genes as well as F₁ hybrids. Mature seeds of *OsB2* transgenic rice plants in T₁ contained higher anthocyanin contents and antioxidant activity than those of untransformed plants and transgenic plants with *OsC1* and both genes. The results of this study can be applied for use of regulatory genes as selectable markers in the process of rice transformation into calli and development of marker genes for improvement of elite rice with high anthocyanins in the future.

Keywords : Rice, Anthocyanins, Transformation, *OsB2* gene, *OsC1* gene



กิตติกรรมประกาศ

ในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความรู้ อบรมแนะแนวทางในการเรียน การดำเนินการวิจัย รวมทั้งช่วยเหลือในส่วนของวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมีในการทำวิจัย ค่าใช้จ่ายในด้านต่าง ๆ รวมทั้งให้คำปรึกษาและตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องจนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. แสงทอง พงษ์เจริญกิต กรรมการที่ปรึกษา และ อาจารย์ ดร. นฤมล เข้มกลัดเงิน กรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาและคอยให้คำแนะนำต่าง ๆ ระหว่างการวิจัย รวมทั้งแก้ไขข้อบกพร่องจนวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล 2 สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย ปทุมธานี ประเทศไทย และ Professor Dr. Thomas W. Okita จาก Chemistry, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกาที่ให้ความอนุเคราะห์พลาสติกที่ใช้ในการวิจัยรวมทั้งพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2561 จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้มอบทุนอุดหนุนงานวิจัยสำหรับค่าสารเคมีที่ใช้การวิจัย ทำให้การทดลองนี้สำเร็จได้ด้วยดี ทุนศิษย์ก้นกุฏิ ประจำปี 2559 จากมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนการศึกษาแก่นางสาวลลิตา ณ ราชสีมา สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2561

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยเป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนด้านค่าใช้จ่ายต่าง ๆ ทำให้การศึกษาครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณบุคลากร และเจ้าหน้าที่ในสาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ทุกท่านที่ได้อำนวยความสะดวกในหลาย ๆ เรื่อง ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์โมเลกุลทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร.....	4
สถานการณ์ข้าวไทย.....	4
สถานการณ์ข้าวโลก.....	5
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว.....	6
การเจริญเติบโตและพัฒนาทางลำต้นของข้าว	12
การเจริญเติบโตและพัฒนาทางการสืบพันธุ์ของข้าว.....	13
การเจริญเติบโตและพัฒนาของเมล็ด.....	14
คุณค่าทางอาหารของข้าว.....	15
ข้าวสี.....	16
สารต้านอนุมูลอิสระ	16
ฟลาโวนอยด์.....	18

รงค์วัตถุในเมล็ดข้าว	19
ยีนโครงสร้าง.....	21
ยีนควบคุม	22
การถ่ายยีน	25
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	27
พันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษา.....	27
อะไอร์แบคทีเรีย.....	27
พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง.....	27
ยีนที่ใช้ศึกษา	28
วัสดุอุปกรณ์.....	29
เครื่องมือ.....	29
สารเคมี.....	30
สารปฏิชีวนะที่ใช้ในงานวิจัย.....	32
ดีเอ็นเอมาตรฐาน.....	32
ชุดสำเร็จรูป.....	32
วิธีการดำเนินการวิจัย	33
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์.....	44
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....	85
บรรณานุกรม.....	88
ภาคผนวก.....	98
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	100
ภาคผนวก ข ประวัติผู้วิจัย.....	124
ประวัติผู้วิจัย.....	125

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ประสิทธิภาพการถ่ายยีน <i>OsC1</i> ที่ตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay.....	46
2 ประสิทธิภาพการถ่ายยีน <i>OsB2</i> ที่ตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay.....	46
3 ประสิทธิภาพการถ่ายยีน <i>OsC1</i> ร่วมกับยีน <i>OsB2</i> ที่ตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay	46
4 จำนวนแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน <i>OsC1</i> ที่รอดบนอาหารคัดเลือกและพัฒนาไปเป็นต้น	50
5 จำนวนแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน <i>OsB2</i> ที่รอดบนอาหารคัดเลือกและพัฒนาไปเป็นต้น.....	51
6 จำนวนแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนร่วมระหว่างยีน <i>OsC1</i> ร่วมกับยีน <i>OsB2</i> รอดบนอาหารคัดเลือก และพัฒนาไปเป็นต้น.....	52
7 การตรวจสอบต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน <i>OsC1</i> ร่วมกับยีน <i>OsB2</i> รุ่น T_0	59
8 ผลการทดสอบการกระจายตัวของยีน <i>gus</i> โดยวิธี GUS assay ในข้าวพันธุ์ Kasalath ตัดแปลง พันธุกรรมรุ่น T_1	65
9 ผลการทดสอบการกระจายตัวของยีน <i>OsC1</i> และ <i>OsB2</i> โดยวิธีพีซีอาร์ในข้าวพันธุ์ Kasalath ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1	65
10 ผลการทดสอบการกระจายตัวของยีน <i>OsC1</i> และ <i>OsB2</i> โดยวิธีพีซีอาร์ในข้าวพันธุ์ Kasalath ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 ที่ได้รับยีน <i>OsC1</i> ร่วมกับยีน <i>OsB2</i>	66
11 คู่ผสมระหว่างต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่มียีน <i>OsC1</i> และ <i>OsB2</i>	71
12 การวิเคราะห์คุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยวิธีนาโนดรอป.....	75
13 ปริมาณแอนโทไซยานินของเมล็ดข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ ได้รับยีน <i>OsC1</i> , <i>OsB2</i> และ <i>OsC1</i> ร่วมกับ <i>OsB2</i>	82
14 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน และข้าวพันธุ์ Kasalath ตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน <i>OsC1</i> , <i>OsB2</i> และ <i>OsC1</i> ร่วมกับ <i>OsB2</i>	84

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว	6
2 รากต้นข้าว.....	7
3 ลำต้นข้าว.....	8
4 ลักษณะใบของข้าว.....	9
5 ลักษณะดอกของข้าว	10
6 ลักษณะดอกย่อย	11
7 เมล็ดข้าว.....	12
8 การเจริญเติบโตและพัฒนาทางการสืบพันธุ์ของข้าว	14
9 เมล็ดข้าวที่อายุต่างกัน	15
10 ฟลาโวนอยด์.....	19
11 โครงสร้างแอนโทไซยานิน.....	21
12 วิธีการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินในเปลือกข้าว	22
13 วิธีการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินในแอนโดสเปิร์มข้าว	25
14 แผนที่พลาสมิด pCAMBIA 1305.1.....	27
15 ยีน <i>OsB2</i> โคลนได้จากข้าวพันธุ์เก่าที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเข้มหรือสีดำภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ nos terminator และถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1305.1.....	28
16 ยีน <i>OsC1</i> โคลนได้จากข้าวพันธุ์เก่าที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเข้มหรือสีดำภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ nos terminator และถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1305.1.....	28
17 ลักษณะแคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath	44
18 เชื้อที่นำมา streak บนอาหาร LB ที่มีสารปฏิชีวนะไรแฟมพิซิน และกานามัยซิน.....	45

19 การตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay ในแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน <i>OsC1</i>	47
20 การตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay ในแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน <i>OsB2</i>	47
21 การตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay ในแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน <i>OsC1</i> ร่วมกับยีน <i>OsB2</i>	48
22 การตรวจสอบใบของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยวิธี Gus assay.....	53
23 การคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน <i>OsC1</i> บนอาหารคัดเลือกและการชักนำให้เกิดขึ้น	53
24 การคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน <i>OsB2</i> บนอาหารคัดเลือกและการชักนำให้เกิดขึ้น	54
25 การคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีนร่วมของยีน <i>OsC1</i> และยีน <i>OsB2</i> บนอาหารคัดเลือกและการชักนำให้เกิดขึ้น	55
26 จีโนมิกดีเอ็นเอของต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน <i>OsC1</i> , <i>OsB2</i> และยีน <i>OsC1</i> ร่วมกับยีน <i>OsB2</i>	56
27 การวิเคราะห์ต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน <i>OsC1</i> ครั้งที่ 1, 2 และ 3	57
28 การวิเคราะห์ต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน <i>OsB2</i> ครั้งที่ 1, 2 และ 3.....	57
29 การวิเคราะห์ต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน <i>OsC1</i> ร่วมกับยีน <i>OsB2</i> ครั้งที่ 1, 2, 3 และ 4	58
30 พีโนไทป์ของข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_0 พีโนไทป์ของข้าวพันธุ์ Kasalath	61
31 จีโนมิกดีเอ็นเอของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 ที่ได้รับยีน <i>OsC1</i> , <i>OsB2</i> และยีน <i>OsC1</i> ร่วมกับยีน <i>OsB2</i>	62
32 การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีน gus โดยวิธี GUS assay ในต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรม	64
33 การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีน <i>OsC1</i> ของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ตัดแปลงพันธุกรรม.....	66
34 การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีน <i>OsB2</i> ของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น ..	67
35 การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีน <i>OsC1</i> ร่วมกับยีน <i>OsB2</i> ของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ตัดแปลงพันธุกรรม	67
36 พีโนไทป์ของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน และได้รับยีน <i>OsC1</i> , <i>OsB2</i> และได้รับยีน <i>OsC1</i> ร่วมกับยีน <i>OsB2</i> รุ่น T_1	69
37 พีโนไทป์ของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์ Kasalath อายุ 15 วัน.....	70
38 พีโนไทป์ของข้าวพันธุ์ให้ พันธุ์รับและข้าวพันธุ์รับที่ได้รับยีน <i>OsC1</i>	71

39 ต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ลูกผสมรุ่น F ₁	72
40 การตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay ในข้าวลูกผสมรุ่น F ₁	73
41 การวิเคราะห์ยีน <i>OsC1</i> และ <i>OsB2</i> ของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ลูกผสมรุ่น F ₁	73
42 การสกัดอาร์เอ็นเอจากต้นอ่อนข้าวอายุ 15 วัน ในข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนและข้าวตัดแปลงพันธุกรรม.....	74
43 การแสดงออกของยีน <i>OsC1</i> และ <i>OsB2</i> ในเนื้อเยื่อใบอ่อนของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ต้นตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T ₁ และลูกผสม F ₁ เมื่อเทียบกับยีน <i>OsActin</i>	78
44 การแสดงออกของยีนโครงสร้างในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเนื้อเยื่อใบอ่อนของข้าวพันธุ์ Kasalath ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T ₁ โดยเทคนิค RT-PCR.....	79
45 การแสดงออกของยีนโครงสร้างในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเนื้อเยื่อใบอ่อนของข้าวพันธุ์ Kasalath ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T ₁ โดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR	80
46 เมล็ดข้าวที่ใช้ในการวัดปริมาณแอนโทไซยานินและทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ	81
47 ปริมาณแอนโทไซยานินในข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ข้าวพันธุ์ Kasalath ตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน <i>OsC1</i> , <i>OsB2</i> , <i>OsC1</i> ร่วมกับ <i>OsB2</i> และลูกผสมรุ่น F ₁	83
48 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับยีน <i>OsC1</i> , <i>OsB2</i> , <i>OsC1</i> ร่วมกับ <i>OsB2</i> และลูกผสมรุ่น F ₁	84

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

แอนโทไซยานินเป็นสารประกอบอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ และเป็นรงควัตถุหรือสารสี มีอยู่ด้วยกัน 6 ชนิด ได้แก่ เพลาโกนินิดิน (pelargonidin) ไชยานินิดิน (cyanidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) พีโอนินิดิน (peonidin) เพทูนิดิน (petunidin) และมาลิวิดิน (malvidin) สารแอนโทไซยานินเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ช่วยในการต้านอนุมูลอิสระ ช่วยในการป้องกันและลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน และโรคมะเร็ง (Geekiyana et al., 2012) นอกจากนี้ ยังสามารถลดคอเลสเตอรอลในเลือด และต้านไวรัส ซึ่งประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินนั้นสูงกว่าวิตามินซี และอี (Bagchi et al., 1998; Cossins et al., 1998; Shi et al., 2003)

ข้าวเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และเป็นอาหารหลักของประชากรในประเทศไทยและหลายประเทศ อีกทั้งยังเป็นธัญพืชที่สำคัญในด้านโภชนาการ ข้าวบางพันธุ์มีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ คือ แอนโทไซยานิน ซึ่งสามารถพบสารดังกล่าวได้บริเวณเนื้อเยื่อใบ และบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ด ข้าวที่มีเมล็ดสีแดงและสีดำ มักมีแอนโทไซยานินสะสมอยู่จำนวนมาก การสังเคราะห์แอนโทไซยานินมียีนที่เกี่ยวข้องหลัก ๆ 2 ชนิด คือ ยีนโครงสร้าง (structural genes) ซึ่งมีรหัสสร้างเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Geekiyana et al., 2012) และยีนควบคุม (regulatory genes) ซึ่งมีรหัสสร้างโปรตีนทรานสคริปชันแฟคเตอร์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Myc และ Myb ซึ่งยีนควบคุมกลุ่ม Myc ทรานสคริปชันแฟคเตอร์ จัดอยู่ในกลุ่ม basic helix-loop-helix (bHLH) ในข้าว ได้แก่ ยีน *OsB1* (Sakulsingharoj et al., 2016) และยีน *OsB2* (Inta et al., 2013; Sakulsingharoj et al., 2014) ก่อนหน้านี้นี้มีการศึกษา ยีน *OsB2* พบว่าจากการค้นหา ยีนโดยใช้เทคนิค RT-PCR พบการแสดงออกของยีนเฉพาะในข้าวสีแต่ไม่พบในข้าวขาว อาจเนื่องจากในข้าวขาวมีการแสดงออกของยีน *OsB2* น้อย (Inta et al., 2013) ยีน *OsB2* มีหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว (Kim et al., 2018) สามารถกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวโดยไปกระตุ้นยีนโครงสร้างให้มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น (Hu et al., 1996; Sakamoto et al., 2001) ยีนควบคุมกลุ่ม Myb ในพืชส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม R2R3 transcription factor ในข้าว ได้แก่ ยีน *OsC1* เป็นยีนควบคุมที่เป็นรหัสของโปรตีนทรานสคริปชันแฟคเตอร์ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ยีน *OsC1* อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่

6 บริเวณเอกซอนที่ 3 (Saitoh et al., 2004) ก่อนหน้านี้นี้มีการศึกษา ยีน *OsC1* ที่ควบคุมการสร้างสีในข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่ายีน *OsC1* มีขนาด 1,290 bp ประกอบด้วย 3 เอกซอน และ 2 อินทรอน ในข้าวขาวมีการเกิดการขาดหายไป 10 bp ใน R3 (Choudhury et al., 2014) การศึกษาสีม่วงของกาบใบข้าวพบการขาดหายไป 10 และ 3 bp ใน R2R3 Myb domain ของยีน *OsC1* ในกาบใบที่มีสีเขียว (Choudhury et al., 2014) ยีน *OsC1* ควบคุมการสร้างสีในข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ยกเว้นเยื่อหุ้มเมล็ด (Choudhury et al., 2014; Kim et al., 2018; Zheng et al., 2019) ซึ่งการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวต้องใช้ยีนเด่นสามชนิด (dominant genes) โดยยีนสองชนิดเป็นรหัสของ transcription factor *B1* หรือ *B2* (basic helix-loop-helix) และ *C1* (R2R3-Myb) และยีนอีกชนิดมีรหัสสำหรับเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน คือ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) (Furukawa et al., 2007; Nagao and Takahashi, 1963; Oshima et al., 2019; Saika et al., 2011; Saitoh et al., 2004; Sakamoto et al., 2001; Zheng et al., 2019; Zhu et al., 2017a)

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการถ่ายยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเข้าสู่ข้าว ศึกษาการทำงานร่วมกันของยีนควบคุมสองชนิดในข้าว ตรวจสอบการใช้ยีนควบคุมเป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกแคลัสในขั้นตอนการถ่ายยีน และสามารถประยุกต์ใช้เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้ และใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกข้าวในระยะต้นกล้า

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อถ่ายยีน *OsC1* และ *OsB2* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเข้าสู่ข้าว
2. เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีน *OsC1* และ *OsB2* และการทำงานร่วมกันของทั้งสองยีนที่มีต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว
3. เพื่อตรวจสอบการใช้ยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเป็นยีนคัดเลือกหรือยีนเครื่องหมายในขั้นตอนการถ่ายยีนเข้าสู่แคลัสข้าว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถถ่ายยีน *OsC1* และ *OsB2* เข้าสู่ข้าวได้
2. ทราบหน้าที่ และการทำงานร่วมกันของยีน *OsC1* และ *OsB2* ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน
3. ได้ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการแสดงออกของยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและมีสีม่วง
4. สามารถประยุกต์ใช้เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้ และใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกข้าวในระยะต้นกล้า
5. ได้ข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีปริมาณแอนโทไซยานินสูง และมีประสิทธิภาพในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

สถานการณ์ข้าวไทย

การสรุปสถานการณ์การผลิตข้าวปีการผลิต 2559/60 คาดการณ์ว่าผลผลิตข้าวนาปีจะมีประมาณ 25.41 ล้านตันข้าวเปลือก เพิ่มขึ้นจากปีการผลิต 2558/59 ซึ่งมีประมาณ 24.31 ล้านตันข้าวเปลือก คิดเป็นร้อยละ 4.52 เนื่องจากปลายปี 2559 ต้นปี 2560 คาดว่าจะมีปริมาณน้ำฝนเพิ่มขึ้นจากปรากฏการณ์ลานีญา ในเดือนพฤศจิกายน 2559 ข้าวนาปีออกสู่ตลาดมากที่สุด ร้อยละ 54.96 หรือประมาณ 13.97 ล้านตันข้าวเปลือก และเดือนธันวาคม 2559 ผลผลิตข้าวนาปี ปีการผลิต 2559/60 ออกสู่ตลาด ร้อยละ 21.02 หรือประมาณ 5.34 ล้านตันข้าวเปลือกช่วงเดือนพฤศจิกายน 2559 ไทยส่งออกข้าวประมาณ 8.71 ล้านตัน มูลค่า 3,906 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ (137,005 ล้านบาท) เพิ่มขึ้นจากช่วงเดียวกันของปี 2558 คิดเป็นร้อยละ 1.52 และมูลค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 0.15 ตามลำดับ และช่วงเดือนพฤศจิกายน 2559 ตลาดส่งออกข้าวที่สำคัญของไทยส่วนใหญ่เป็นตลาดภูมิภาค แอฟริกาโดยมีสัดส่วนการส่งออก ถึงร้อยละ 51.21 ของปริมาณการส่งออกข้าวไทยทั้งหมด รองลงมา ได้แก่ ตลาดภูมิภาคเอเชีย อเมริกา และยุโรป ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 32.49 ร้อยละ 6.43 และร้อยละ 3.90 ตามลำดับ (กรมการค้าต่างประเทศ, 2560) ปัจจุบันปี 2562 กระทรวงพาณิชย์กำหนดเป้าหมายการส่งออกข้าวไทย ปริมาณ 9.5 ล้านตัน โดยในเดือนมกราคม มีการส่งออกข้าวรวม 951,700 ตัน โดยลดลงจากเดิมร้อยละ -1.56 คิดเป็นมูลค่า 471.26 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ โดยมีคู่แข่งที่สำคัญคือ เวียดนาม สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย จีน อินเดีย ปากีสถาน เมียนมา เป็นต้น ปัญหาและปัจจัยที่ส่งผลการส่งออกข้าวไทยคือ มาตรการกีดกันทางการค้า มาตรการของประเทศคู่ค้าในการอุดหนุนภาคเกษตรเพื่อเพิ่มผลผลิตในประเทศและลดการพึ่งพาการนำเข้า ภาวะการแข่งขันที่ทวีความรุนแรง โดยประเทศคู่แข่งเร่งพัฒนาสายพันธุ์ข้าวและราคาต่ำ การที่เงินบาทมีการแข็งค่าขึ้นอย่างต่อเนื่องทำให้กระทบต่อภาวะการแข่งขันด้านราคา ปัญหาภัยพิบัติและภัยแล้งในหลายประเทศทำให้ความต้องการข้าวในตลาดโลกเพิ่มสูงขึ้น (กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศกระทรวงพาณิชย์, 2562)

สถานการณ์ข้าวโลก

การบริโภคข้าวโลกปี 2559/60 คาดว่าจะมีปริมาณ 478.38 ล้านตันข้าวสาร เพิ่มขึ้นจาก 470.37 ล้านตันข้าวสาร ในปี 2558/59 หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.70 การค้าข้าวโลกปี 2559/60 คาดว่าจะมีปริมาณ 40.85 ล้านตันข้าวสาร เพิ่มขึ้นจาก 40.07 ล้านตันข้าวสาร ในปี 2558/59 หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.95 (กรมการค้าต่างประเทศ, 2560) สถานการณ์การผลิตข้าว ปีการผลิต 2561/62 คาดว่าโลก มีการผลิตข้าวทั้งหมด 490.7 ล้านตัน ข้าวสารลดลงจากปี 2560/61 ที่มีปริมาณการผลิต 494.31 ล้านตันข้าวสาร หรือลดลงร้อยละ 0.7 ประเทศที่มีปริมาณผลผลิตสูงสุด ได้แก่ จีน อินเดีย และอินโดนีเซีย ตามลำดับ สำหรับไทย มีเนื้อที่เพาะปลูก 69.62 ล้านไร่ ปริมาณผลผลิต 21.2 ล้านตันข้าวสาร ทั้งนี้ปริมาณเนื้อที่และผลผลิต มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากปีก่อนหน้า และในปีการผลิตหน้า คาดว่าจะมีปริมาณผลผลิตข้าวลดลง เนื่องจากคาดว่าจีนและอินเดียซึ่งเป็นประเทศที่มีปริมาณผลผลิตข้าวสูงจะมีปริมาณผลผลิตลดลง (สำนักงานนโยบายและยุทธศาสตร์การค้ากระทรวงพาณิชย์, 2562)

ข้าว

ข้าวเป็นพืชตระกูลหญ้า (Gramineae) ซึ่งจัดอยู่ในสกุล (Genus) *Oryza* สกุลนี้ประกอบด้วยชนิด (Species) ต่าง ๆ ถึง 25 ชนิด แต่ชนิดที่เพาะปลูกเป็นอาหารมีเพียง 2 ชนิด คือชนิด *sativa* ซึ่งปลูกทั่วไปในเขตต่าง ๆ ของโลก และ ชนิด *glaberrima* ซึ่งปลูกอยู่บ้างในแอฟริกาตะวันตก *O. glaberrima* แตกต่างจาก *O. sativa* ตรงที่ไม่มีการแตกกระแงแรก (secondary branch) ของฐานช่อดอก (panicle) และมีความแตกต่างเล็กน้อยในส่วนของขนบนกลีบดอกใหญ่ (lemma) และความยาวของเยื่อกันน้ำฝน (ligule) ชนิด *sativa* มีการปรับตัวเข้ากับสภาพท้องถิ่นที่ต่าง ๆ สามารถจำแนกได้เป็น 3 subspecies คือ *Indica*, *Japonica* และ *Javanica* ลักษณะความแตกต่างของ ข้าวทั้ง 3 subspecies ดังกล่าว จะมีแหล่งปลูกต่างกันกล่าวคือ ข้าว *Indica* นั้น รวมถึงพันธุ์จากศรีลังกา จีนทางใต้ และตอนกลาง ขวา ปากีสถาน ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน และประเทศในเขตร้อนอื่น ๆ ในขณะที่ *Japonica* เป็นพันธุ์ที่มีอยู่ทางภาคเหนือ และภาคตะวันออกของจีน ในญี่ปุ่น และเกาหลี subspecies *javanica* ซึ่งมีการกำหนดเพิ่มเติมภายหลัง หมายถึง ข้าวพวก bulu และ gundil ของอินโดนีเซีย (bulu มีหนวดข้าวยาว ส่วนข้าว gundil ไม่มีหนวดข้าว) ต่อมาเมื่อมีการรวบรวมพันธุ์ข้าวจำนวนมาก พบว่า ลักษณะต่าง ๆ ที่กล่าวแล้วนั้น เป็นลักษณะที่มีความแปรปรวนอย่างต่อเนื่อง และการที่เกิดการเป็นหมัน (sterility) เมื่อผสมระหว่างพันธุ์ก็ไม่สามารถใช้เป็นข้อสรุปได้ว่าเป็นข้าวคนละ subspecies กัน เพราะการเป็นหมัน เป็นเรื่องซับซ้อน และอาจเนื่องจากสาเหตุ

อื่น ๆ ด้วยไม่ใช่เป็นเพราะต่าง subspecies กันเพียงอย่างเดียว ดังนั้น การจำแนกข้าวเป็น 3 subspecies ตามสภาพท้องถิ่นที่ค่อย ๆ ลดความสำคัญลง เพราะมีพันธุ์บางพันธุ์ที่จัดว่าอยู่ในกลุ่ม *Japonica* ขึ้นอยู่แถบเนปาล รัฐ Orissa ในอินเดีย และทางภาคเหนือของไทย (ศูนย์การเรียนรู้การเกษตรตำบลสาคุ, 2554)

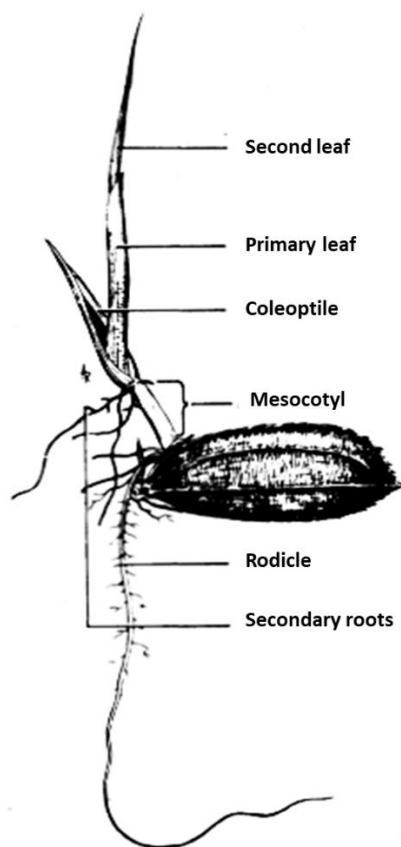


ภาพที่ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว

ที่มา: ศูนย์การเรียนรู้การเกษตรตำบลสาคุ, (2554: ระบบออนไลน์)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว

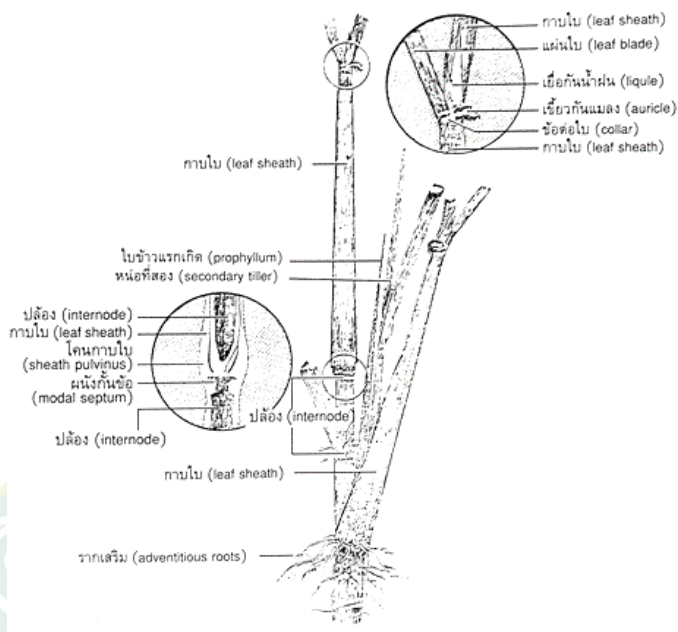
ราก ระบบรากเป็นแบบรากฝอย (ภาพที่ 1 และภาพที่ 2) ประกอบด้วยรากที่พัฒนามาจากส่วนรากแรกเกิด (radicle) เรียกว่ารากปฐมภูมิ (primary root/first seedling root) และรากที่แตกแขนงออกมาเรียกว่า รากถาวร (secondary root/ lateral root) รากที่เกิดจาก scutellar node เรียกว่ารากแรกเกิด (seminal root) ส่วนรากที่เกิดจากข้อใต้ดินตั้งแต่ coleoptilar node ขึ้นไป เรียกว่ารากเสริม (adventitious root)



ภาพที่ 2 รากต้นข้าว

ที่มา: Bardenas, (1965)

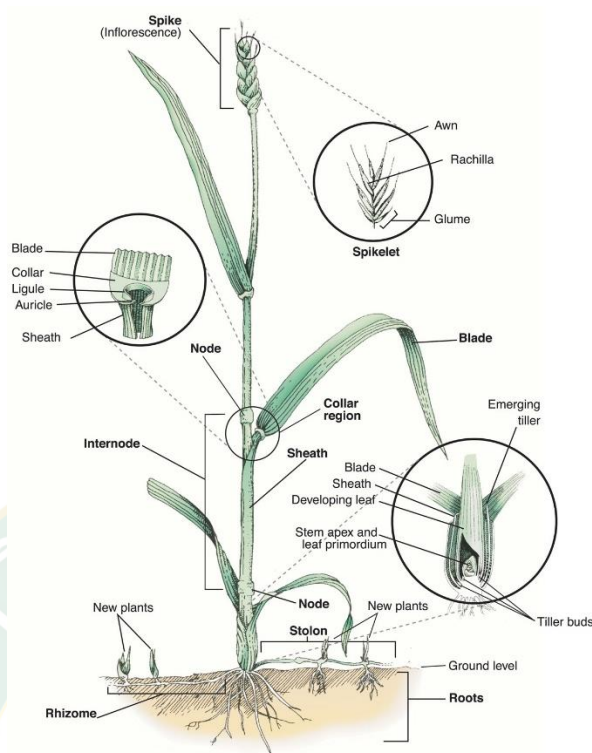
ลำต้น (haulm หรือ culm) ประกอบด้วย ปล้อง (internode) และข้อ (node) ในส่วนของข้อประกอบด้วย วงเจริญ (growth ring) ปุ่มที่กำลังเกิดราก (root primordia) ตา (bud) และรอยกาบ



ภาพที่ 3 ลำต้นข้าว

ที่มา: บุญหงษ์, (2557)

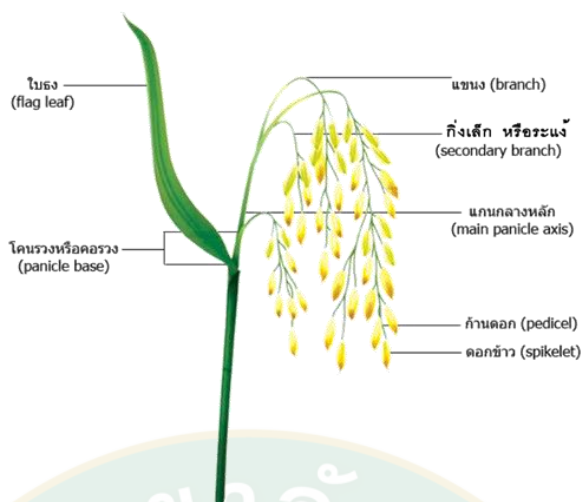
ใบ (leaf scar) (ภาพที่ 3) เป็นต้น ในส่วนของต้นข้าวมีการแตกหน่อ (tillering) ซึ่งลำต้นหลัก เรียกว่า main culm หน่อที่เจริญจาก primary tiller เรียกว่า secondary tiller หน่อที่เจริญจาก main culm เรียกว่า primary tiller และหน่อที่เจริญจาก secondary tiller เรียกว่า tertiary tiller ตามลำดับ



ภาพที่ 4 ลักษณะใบของข้าว

ที่มา: Southwestern, (2019)

ช่อดอก เป็นแบบ panicle ปล้องสุดท้ายของลำต้น (uppermost internode) เป็นก้านช่อดอก (peduncle) แกนกลางช่อดอกเรียกว่า rachis หรือ panicle axis กิ่งที่แตกจาก rachis เรียกว่า primary branch และกิ่งที่แตกจาก primary branch เรียกว่า secondary branch (ภาพที่ 5)

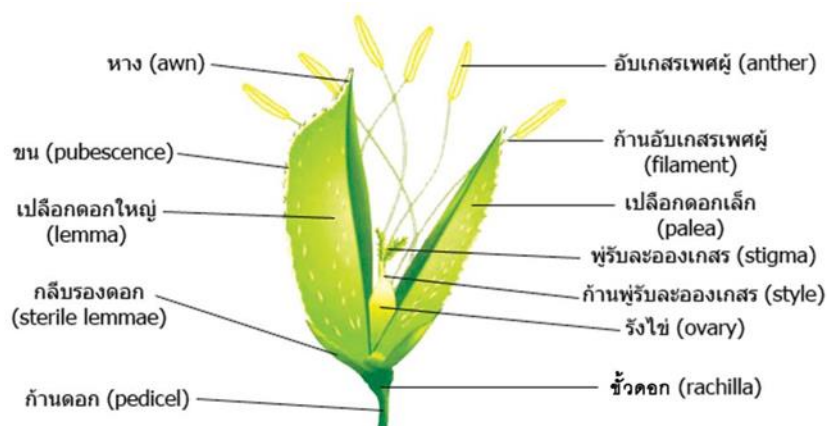


ภาพที่ 5 ลักษณะดอกของข้าว

ที่มา: กองวิจัยและพัฒนาข้าวกรมการข้าว, (2559: ระบบออนไลน์)

ดอกข้าว เกิดเป็นกลุ่มเรียกว่า spikelet ประกอบด้วย กลีบดอกที่หุ้ม spikelet 2 กลีบ ได้แก่ กลีบด้านนอก (outer glume) และกลีบด้านใน (inner glume) แต่มองเห็นไม่ชัด (rudimentary glume) ดอกประกอบด้วยดอกย่อย (floret) 3 ดอก มีดอกย่อยเพียงดอกเดียวที่มีการเจริญ เรียกว่า flowering glume ส่วนดอกย่อยที่ไม่เจริญเหลือเฉพาะส่วน lemma เรียกว่า sterile lemma หรือ non-flowering glume หรือ empty glume

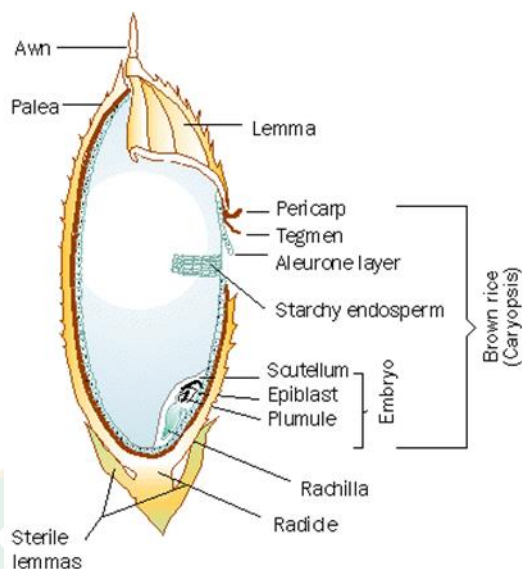
ดอกย่อย ที่มีการเจริญประกอบด้วยกลีบดอกย่อยด้านนอก (lemma) ที่มีเส้นตามความยาว 5 เส้น และกลีบดอกย่อยด้านใน (palea) ที่มีเส้นตามความยาว 3 เส้น ดอกย่อยประกอบด้วย เกสรตัวผู้ (stamen) ที่มีก้านชูละอองเกสรตัวผู้ (filament) และอับละอองเกสรตัวผู้ (anther) ส่วนเกสรตัวเมีย (pistil) ประกอบด้วยรังไข่ (ovary) ก้านชูเกสรตัวเมีย (style) สั้น ปลายเกสรตัวเมีย (stigma) แยกเป็น 2 แฉก มีลักษณะคล้ายขนนกเรียกว่า plumose stigma และเยื่อรองรับรังไข่ (lodicule) อยู่ที่ส่วนฐานของรังไข่ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ลักษณะดอกย่อย

ที่มา: กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, (2559; ระบบออนไลน์)

ผลหรือเมล็ด เป็นแบบ caryopsis ประกอบด้วยเยื่อหุ้มผล (pericarp) ติดอยู่กับส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat หรือ testa) มีเปลือกหุ้มซึ่งเป็นส่วนของ lemma และ palea เรียกว่า hull ผลของข้าวที่เก็บเกี่ยวมาเรียกว่า ข้าวเปลือก (hulled grain) เมื่อแกะส่วนของเปลือกหุ้มออก เห็นเยื่อหุ้มผล และเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีน้ำตาล เรียกว่า ข้าวกล้อง (brown rice grain) เมื่อขัดส่วนของเยื่อหุ้มสีน้ำตาลออกจะเป็น ข้าวสาร (kernel) ส่วนหัวของข้าวสารมีสีขาวขุ่น เรียกว่า จมูกข้าวหรือคัพพะ (embryo) ที่เหลือเป็นเอนโดสเปิร์ม (endosperm) คัพพะประกอบด้วยแรดิเคิล (radicle) พลูมูล (plumule) ใบเลี้ยงที่ไม่มีการพัฒนา (epiblast) และเนื้อเยื่อที่กั้นระหว่างคัพพะกับเอนโดสเปิร์ม (scutellum) บริเวณรอบนอกของเอนโดสเปิร์มมีชั้น aleurone layer และบริเวณส่วนที่เป็นสีขาวขุ่นที่ด้านท้องของเมล็ดด้านเดียวกันกับคัพพะ เรียกว่า ท้องปลาขาวหรือท้องไข่ (abdominal white) (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 เมล็ดข้าว

ที่มา: Bardenas, (1965)

การเจริญเติบโตและพัฒนาทางลำต้นของข้าว

การเจริญเติบโต และพัฒนาทางลำต้นจะเริ่มตั้งแต่การงอกของเมล็ดจากเอ็มบริโอ (embryo) จนถึงระยะการให้กำเนิดช่อดอกหรือรวงอ่อน (initiation of panicle primordium)

ระยะต้นกล้า (seeding stage) คือ ระยะตั้งแต่ต้นข้าวเริ่มงอกจนถึงต้นข้าวอายุประมาณ 30 วัน ในระยะนี้เมื่อต้นข้าวเริ่มงอกจะมีรากแรกเกิดแทงออกมาเป็นรากชุดแรก และต่อมาจะมีรากชุดที่สองที่เรียกว่ารากแขนงแตกกอออกมาจากข้อใต้ระดับดินของต้นข้าว จากนั้นรากชุดที่หนึ่งก็จะสลายไป ในระยะจะพัฒนาไปขึ้นมาจนถึงใบที่ 5 ระยะแรกจะมีการใช้สารอาหารจากส่วนแบ่งของเมล็ด เมื่ออาหารจากเมล็ดหมดลงต้นกล้าจึงจะดูดธาตุอาหารจากดินมาใช้ในการเจริญเติบโต

ระยะแตกกอ (tillering stage) คือ ระยะที่ต้นกล้าเริ่มมีการแตกหน่อใหม่หน่อแรกออกมาจากตาข้างลำต้นที่อยู่ในซอกใบของใบที่สองของต้นหลักที่นำไปปักดำ จนถึงระยะการแตกกอสูงสุด โดยปกติหน่อแรกของต้นข้าวจะแตกกอภายหลังการปักดำประมาณ 10 วัน หรือเมื่อต้นข้าวที่นำไปปักดำเริ่มมีใบที่ 5 และจะแตกกอสูงสุดเมื่อเริ่มมีช่อดอกหรือรวงอ่อนเกิดขึ้น (บุญหงษ์, 2557)

การเจริญเติบโตและพัฒนาทางการสืบพันธุ์ของข้าว

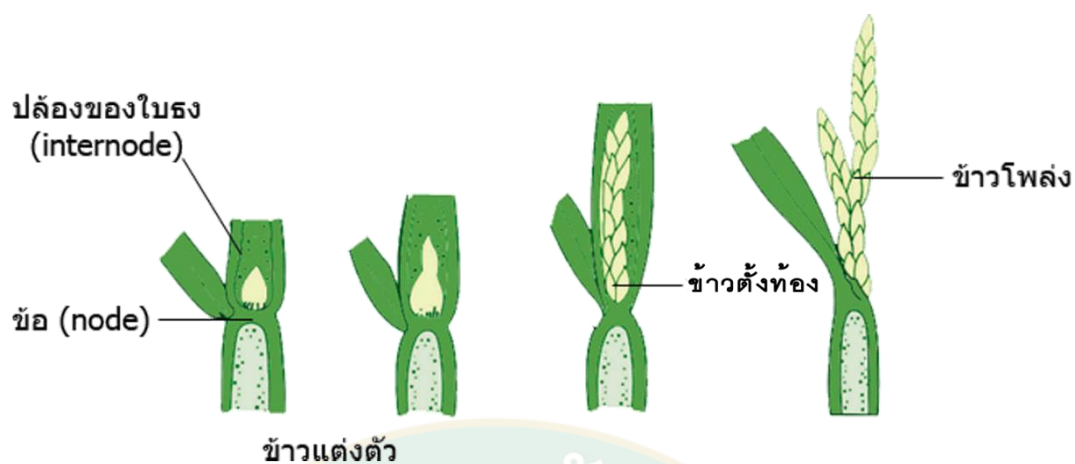
การเจริญเติบโต และพัฒนาการที่เกี่ยวกับการสืบพันธุ์ของต้นข้าวตั้งแต่ระยะให้กำเนิดช่อดอกหรือรวงอ่อน จนถึงระยะที่ต้นข้าวนั้นออกดอก ซึ่งจะใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 30 วัน

ระยะกำเนิดช่อดอกหรือระยะสร้างรวงอ่อน (panicle initiation stage) เป็นระยะเวลาที่ต้นข้าวมีลักษณะลำต้นกลมอย่างชัดเจน และปลายสุดของลำต้นจะมีปมของปุยขนขนาดเล็กเกิดขึ้น การให้กำเนิดช่อดอกหรือรวงอ่อนนี้ โดยปกติจะอยู่ในช่วงระยะประมาณ 30 วัน ก่อนที่ต้นข้าวจะออกรวง

ระยะตั้งท้อง (booting stage) เป็นระยะเวลาที่ต้นข้าวมีการพัฒนาจากการกำเนิดช่อดอกไปเป็นรวงอ่อนภายใต้กาบใบธงที่หุ้มไว้ ซึ่งต้นข้าวระยะนี้จะมีการยึดปล้องอย่างเห็นได้ชัด พร้อมกับการร่อนไปขึ้นของกาบใบธง ระยะตั้งท้องนี้จะใช้เวลา 5-6 วันก่อนออกรวง

ระยะออกรวง (heading stage) คือ ระยะที่ช่อดอกหรือรวงข้าวโผล่พ้นออกมาจากกาบใบธงซึ่งจะเกิดขึ้นในระยะเวลาประมาณ 30 วันก่อนการเก็บเกี่ยว ระยะนี้ต้นข้าวจะมีการยึดปล้องรองสุดท้ายจากปลายสุดของลำต้นอย่างสมบูรณ์ก่อน หลังจากนั้นปล้องสุดท้ายก็จะมี การยึดตัวอย่างรวดเร็วเพื่อต้นให้รวงข้าวโผล่พ้นออกมาจากกาบใบธง (ภาพที่ 8)

ระยะดอกบาน (flowering or anthesis stage) คือ ระยะเวลาการปิด และเปิดของดอกข้าว ซึ่งโดยปกติแล้วจะใช้เวลาประมาณ 1-2.5 ชั่วโมง ในระยะนี้ก่อนที่กลีบดอกใหญ่ และกลีบดอกเล็กจะเปิดอ้าออก อับเรณูจากภายในดอกจะแตก และละอองเรณูจะหลุดจากอับเรณูไปตกบนยอดเกสรตัวเมีย และงอกเข้าไปผสมกับไข่ ทำให้เกิดการผสมตัวเองภายในดอกเดียวกันเป็นส่วนใหญ่ และเมื่อกลีบดอกทั้งสองอ้าออก ก้านเกสรตัวผู้จะยึดตัวออกให้อับเรณูโผล่พ้นออกมาจากกลีบดอก ทำให้ละอองเรณูบางส่วนฟุ้งกระจายไปตกลงบนยอดเกสรตัวเมียของดอกอื่นทำให้เกิดการผสมข้ามได้บ้าง ซึ่งไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์ในธรรมชาติ รวงข้าวแต่ละรวงจะออกดอกครบสมบูรณ์ทุกดอกภายใน 7-10 วัน (บุญหงษ์, 2557)

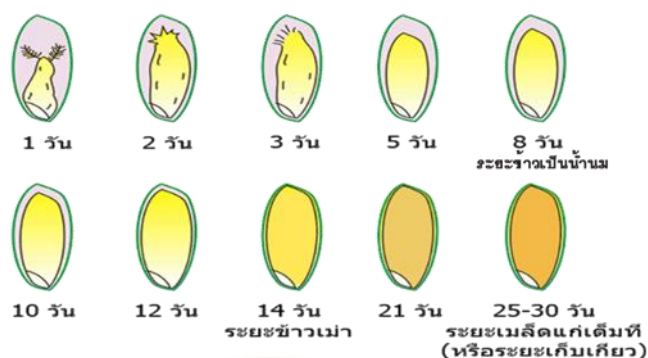


ภาพที่ 8 การเจริญเติบโตและพัฒนาทางการสืบพันธุ์ของข้าว

ที่มา: กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, (2559: ระบบออนไลน์)

การเจริญเติบโตและพัฒนาของเมล็ด

ก่อนที่เมล็ดจะมีการสุกแก่ นั้นจะมีขั้นตอนการพัฒนาเป็น 3 ระยะ ได้แก่ ระยะน้ำนม ซึ่งจะเกิดหลังการออกดอกประมาณ 8-13 วัน เมล็ดในระยะแรกจะมีแป้งเหลว และต่อมาจะมีความชื้นเพิ่มมากขึ้น เมื่อผ่านระยะน้ำนมแล้วต่อไปจะเป็นระยะที่เป็นเนื้อเมล็ดช่วงเวลาประมาณ 14-25 วันหลังการออกดอก ในช่วงนี้น้ำในแป้งของเมล็ดจะค่อย ๆ ระเหยไปทำให้เมล็ดประกอบด้วยเนื้อแป้งเป็นส่วนใหญ่แต่ยังไม่แข็งตัวเต็มที่ จากนั้นระยะต่อมาจะพัฒนามาเป็นระยะสุกแก่ ซึ่งเป็นช่วงเวลา 25-35 วันหลังข้าวออกดอกเนื้อเมล็ดจะแข็งพร้อมเก็บเกี่ยว ในการพัฒนาของเมล็ดจนเป็นเมล็ดสุกแก่เต็มที นั้นจะใช้เวลารวดเร็วขึ้นในพื้นที่ปลูกข้าวเขตร้อนซึ่งหากเป็นพื้นที่เขตกึ่งหนาวจะใช้เวลายาวนานกว่า (บุญหงษ์, 2557) (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 เมล็ดข้าวที่อายุต่างกัน

ที่มา: กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, (2559: ระบบออนไลน์)

คุณค่าทางอาหารของข้าว

คุณค่าทางอาหารของข้าวนอกจากจะให้แป้ง (starch) หรือคาร์โบไฮเดรตในปริมาณร้อยละ 70 ซึ่งถือว่าเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญแล้ว เมล็ดข้าวยังประกอบด้วยสารอาหารหม้ออื่น ๆ ได้แก่

โปรตีน จะมีอยู่หนาแน่นที่บริเวณผิวนอกของเมล็ดข้าวกล้อง และบริเวณเอมบริโอ มากกว่าที่ส่วนอื่น ๆ ของเมล็ด อย่างไรก็ตามปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวจะมีมากหรือน้อยย่อมขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว และสภาพแวดล้อมที่ปลูกข้าว เช่น สภาพของดิน ลมฟ้าอากาศ และการให้ปุ๋ย

ไขมัน พบเฉพาะที่ชั้นในสุดของเยื่อหุ้มเมล็ด และที่ส่วนของเอมบริโอ ดังนั้นในการขัดสีข้าวกล้องให้เป็นข้าวสารขาวจึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียไขมันไปอยู่ในรูปของรำข้าว เป็นปริมาณมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

แร่ธาตุ ส่วนใหญ่จะพบอยู่ที่บริเวณผิวนอกของเมล็ด ปริมาณมากน้อยของแร่ธาตุในเมล็ดข้าวจะขึ้นอยู่กับปริมาณของแร่ธาตุในดินที่มีอยู่ และปริมาณแร่ธาตุที่ได้จากปุ๋ย และยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของข้าวสารอีกด้วย

วิตามิน ส่วนใหญ่จะพบที่บริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดชั้นในสุด และที่เอมบริโอจึงเป็นสาเหตุให้ข้าวสารขาวมีวิตามินเหลืออยู่เพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวกล้องที่มีวิตามินอยู่ในปริมาณที่สูงกว่า วิตามินที่มีอยู่ค่อนข้างมาก ได้แก่ กรดนิโคตินิก หรือไนอะซิน วิตามินที่มีอยู่ในปริมาณน้อย ได้แก่ ไทอะมิน หรือวิตามินบี 1 และไรโบฟลาวิน หรือวิตามินบี 2 ส่วนวิตามินที่มีอยู่ในปริมาณน้อยมาก ได้แก่ วิตามินเอ ซึ่งมีเฉพาะในข้าวเหนียวดำ วิตามินซี วิตามินดี และวิตามินบี 12 (บุญหงษ์, 2557)

ข้าวสี

โดยทั่วไปข้าวที่ปลูกจะมีเมล็ดสีขาวในขณะที่ข้าวพันธุ์ปามีเมล็ดหลากหลายสีหลายสายพันธุ์ บางพันธุ์มีใบสีม่วงหรือสีเขียว ในขณะที่บางพันธุ์มีเมล็ดสีม่วง สีแดงและสีน้ำตาล ปัจจุบันกลุ่มข้าวที่มีสี เช่น สีดำ สีแดง และสีน้ำตาลได้รับความนิยมจากกลุ่มผู้บริโภคที่รักสุขภาพ ซึ่งข้าวสีมีสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น สารแอนโทไซยานิน ธาตุเหล็ก วิตามินบี กรดอะมิโน และแร่ธาตุต่าง ๆ (ภาวิช, 2560)

การเกิดสีในส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าวมาจากการสะสมรงควัตถุ โดยเมล็ดข้าวที่มีสีม่วงดำเกิดจากการสะสมรงควัตถุแอนโทไซยานิน ส่วนข้าวสีแดงเกิดจากการสะสมรงควัตถุโปรแอนโทไซยานิน รงควัตถุเหล่านี้เป็น secondary metabolites ที่อยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ (Furukawa et al., 2007; Min et al., 2011) การสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินมียีนที่เกี่ยวข้องหลัก 2 ชนิด คือ ยีนควบคุม (regulatory gene) และยีนโครงสร้าง (structural gene) โดยการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวต้องใช้ยีนเด่นสามชนิดของ dominant genes ซึ่งสองชนิดแรกเป็น transcription factor [*B1* หรือ *B2* (basic helix-loop-helix) และ *C1* (R2R3-Myb)] และอีกชนิดเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน คือ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) (Arai et al., 2002; Furukawa et al., 2007; Nagao and Takahashi, 1963; Saitoh et al., 2004) ข้าวสีม่วงหรือดำเป็นข้าวสีที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงเนื่องจากสารสกัดจากรำข้าวของข้าวสีดำสามารถช่วยลดความเครียดและปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในสัตว์ทดลองได้ (Ling et al., 2001; Min et al., 2011; Nam et al., 2006; Shin et al., 2006; Sompong et al., 2011)

จากการศึกษาพบว่า ข้าวที่มีสีม่วงไปจนถึงม่วงเข้มอาจจะช่วยลดการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังต่าง ๆ ได้ ซึ่งปัจจุบันพบว่าโรคที่ไม่ติดต่อเรื้อรังเพิ่มมากขึ้น และมีหลายการศึกษาชี้ให้เห็นว่า การเกิดโรคดังกล่าวมาจากการได้รับสารอนุมูลอิสระในสิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น และพบว่ามีธัญพืชต่าง ๆ เป็นแหล่งที่ดีของสารต่อต้านอนุมูลอิสระที่มีในธรรมชาติมากที่สุด เช่น วิตามินอี เบต้าแคโรทีน ลูทีน และสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งสามารถป้องกันและต่อต้านอนุมูลอิสระได้มาก (Arai et al., 2002; Landrault et al., 2001; Tamimi et al., 2005)

สารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระภายในร่างกายมนุษย์ เกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลาจากการได้รับการกระตุ้นจากร่างกายทั้งภายใน และภายนอกในร่างกาย เช่น การได้รับมลภาวะที่เป็นพิษ แสงแดด การขาดการออกกำลังกาย

กาย ภาวะความเครียดทั้งจากการทำงาน จากสิ่งแวดล้อมเป็นตัวกระตุ้น หรือการได้รับสารพิษตกค้าง จากยาฆ่าแมลง ความร้อนจากรังสีที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือจากปัจจัยภายในร่างกายสร้างขึ้น เช่น กระบวนการเผาผลาญสารอาหารที่เกิดขึ้นภายในร่างกายทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น อย่างไรก็ตาม ร่างกายจะมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระอยู่ตลอดเวลา คือ เมื่อร่างกายสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ ชนิดต่าง ๆ ขึ้นมา ร่างกายจะมีการกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านั้นออกไป แต่ความสามารถในการสร้าง สารต้านอนุมูลอิสระนั้น จะลดลงเมื่อมนุษย์มีอายุเพิ่มมากขึ้น (Bray, 2000; Elsayed, 2001; Lachance et al., 2001) ซึ่งร่างกายของมนุษย์นั้นจำเป็นต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มเติม จากแหล่งต่าง ๆ เช่น อาหาร ซึ่งข้าวสีนั้นสามารถช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด และมี คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ดี เนื่องจากมีสารโพลีฟีนอล แอนโทไซยานิน และแอนโทไซยานิดิน ค่อนข้างสูง โดยสารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านการอักเสบ (รัชนี and ริญญ, 2553) ในพืชสารต้านอนุมูลอิสระหรือแอนโทไซยานินทำให้เกิดสีในดอกไม้ เมล็ด และผลไม้ เพื่อ ช่วยในการดึงดูดแมลงสำหรับการผสมเกสร และช่วยป้องกันพืชจากรังสี UV-B (Geekiyana et al., 2012; Geekiyana et al., 2007)

มีการศึกษาก่อนหน้านี้ว่า สารสกัดจากข้าวสีดำที่ให้กระต่าย และหนูกินทำให้ระดับของ lipid peroxide, triglyceride, LDL-C, VLDL-C และ Total cholesterol ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Hu et al., 2003) และยังมีการศึกษา พบว่าสารสกัดจากรำข้าวสีดำสามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งเต้านม และมะเร็งที่ลำไส้ใหญ่ได้ (Hudson et al., 2000) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า เบต้าแคโรทีน ในข้าวสีดำยังสามารถยับยั้งการทำลายดีเอ็นเอ จากสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ได้อีกด้วย (Hu et al., 2003) และยังมีสารอาหารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) ซึ่งเป็นสารที่เป็นรงควัตถุในพืช เช่น ข้าว ผัก และผลไม้สร้างขึ้น เพื่อป้องกันแมลง และเชื้อโรคต่าง ๆ ให้กับตัวเอง มีการศึกษา พบว่าสาร เหล่านี้ช่วยในการป้องกันอนุมูลอิสระต่าง ๆ เพื่อไม่ให้ทำลายเซลล์ของมนุษย์ได้ (Joshi et al., 1999; Kaur and Kapoor, 2001; Serafini, 2006) สารประกอบแคโรทีนอยด์ เช่น ลูทีน (lutein) และซีแซนทีน (zeaxanthin) ช่วยในการป้องกันภาวะเสื่อมของตา และยังช่วยลดความเสี่ยงของการ เกิดโรคมะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ และมะเร็งเต้านม เป็นต้น (ริญญ and รัชนี, 2551) และยังมีสารโพลีฟีนอล ซึ่งเป็นกลุ่มของสารประกอบที่พบในพืช โพลีฟีนอลสามารถแบ่งกลุ่มย่อยออกเป็นแทนนิน (tannin) และฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoids) ซึ่งได้แก่ ลิกนิน (lignins) และฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถต้านฤทธิ์ของอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด อาการเสื่อมของร่างกาย และโรคไม่ติดต่อเรื้อรังซึ่งพบว่าสารโพลีฟีนอลสามารถลดการอักเสบในโรค ต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจ และโรคหลอดเลือด นอกจากนี้ยังสามารถลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งได้ มีการศึกษาในข้าวที่มีสีเข้มจะมีปริมาณสารโพลีฟีนอลสูง เนื่องจากพืชมักจะสร้างรงควัตถุ โดยเฉพาะ

สารโพลีฟีนอล และสารแอนโทไซยานินเพื่อป้องกันเซลล์จากการโดนทำลายโดยแสงอาทิตย์ (ริญ and รัชณี, 2551)

ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) ประเภทพอลิฟีนอล (polyphenol) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) รวมอยู่ในโมเลกุล ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป สามารถละลายในน้ำได้ ส่วนใหญ่มักพบอยู่ร่วมกับน้ำตาล ในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) สารประกอบ flavonoids ได้แก่ flavonol, flavonone, flavone, isoflavone, flavonol catechin และ anthocyanins ฟลาโวนอยด์ถูกสังเคราะห์โดย polypropanoid pathway และเริ่มต้นจากโมเลกุล phenylalanine โครงสร้างพื้นฐานคือ C6-C3-C6 ประกอบด้วยสองวงแหวนอะโรมาติก C6 ring และ heterocyclic ring ที่มีออกซิเจน 1 อะตอม ซึ่งถูกจัดกลุ่มเป็น 6 กลุ่ม คือ

-Flavonols ได้แก่ myricetin, kaempferol, quercetin, isorhamnetin และ pachypodol

-Flavones ได้แก่ luteonin, apigenin และ tangeritin

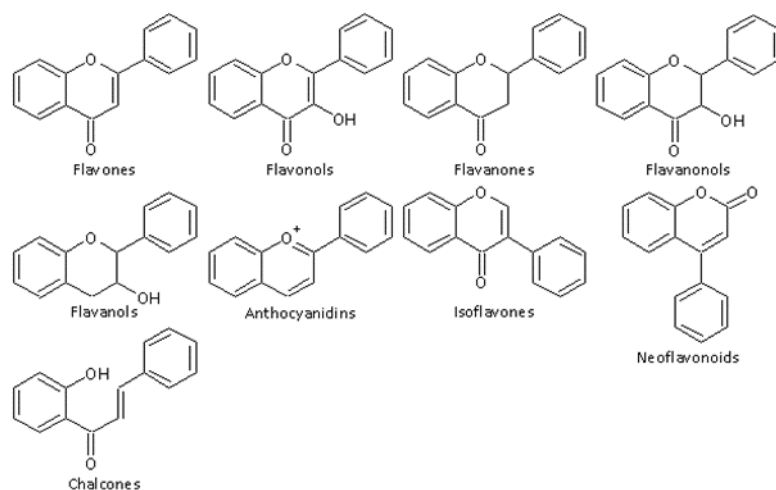
-Flavanones ได้แก่ hesperetin, naringenin และ eriodictyol

-Flavan-3-ols ได้แก่ catechins และ epicatechins

-Isoflavones ได้แก่ genistein, daidzein และ glycitein

-Anthocyanidins ได้แก่ cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin และ petunidin (Lepiniec et al., 2006) (ภาพที่ 10)

สารในกลุ่มของฟลาโวนอยด์จะเกิดการสังเคราะห์ในระยะเวลาการพัฒนาระดับต่าง ๆ ในพืช และพบการสังเคราะห์ในเมล็ด ได้แก่ กลุ่มฟลาโวนอล (flavonols) แอนโทไซยานิน (anthocyanins) และโปรแอนโทไซยานิน (proanthocyanidins) (Zhou et al., 2008) ทำหน้าที่ปกป้องพืชจากโรคและความเครียดต่าง ๆ ป้องกันรังสี UV (Agati et al., 2011; Kim et al., 2012; Kootstra, 1994) ต้านทานแมลง (Abdel-Aal et al., 2001) การสังเคราะห์สีในเนื้อเยื่อต่าง ๆ (Gu et al., 2011; Himi et al., 2011) และยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมการสังเคราะห์ออกซินอีกด้วย (Murphy et al., 2000)



ภาพที่ 10 ฟลาโวนอยด์

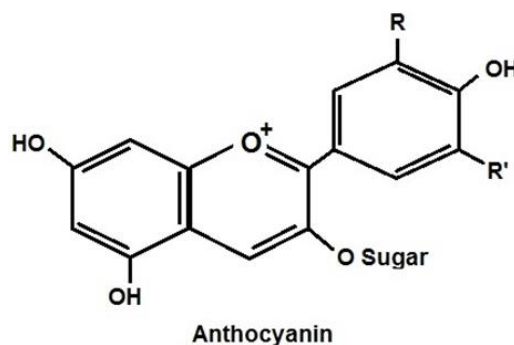
ที่มา: Tazzini, (2014)

รงควัตถุในเมล็ดข้าว

แอนโทไซยานิน (ภาพที่ 11) เป็นสารประกอบอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ และเป็นรงควัตถุหรือสารสี มีอยู่ด้วยกัน 6 ชนิด ได้แก่ เพลาโกนินิดิน (pelargonidin) ไชยานิดิน (cyanidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) พีโอนินิดิน (peonidin) เพทูนิดิน (petunidin) และมาลิวิดิน (malvidin) สารแอนโทไซยานินเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity) ช่วยในการต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันและลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน และโรคมะเร็ง (Geekiyana et al., 2012) ส่วนใหญ่การสะสมแอนโทไซยานินพบได้ในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานทางสรีรวิทยาต่าง ๆ ได้แก่ การตอบสนองของฮอร์โมน รังสีอัลตราไวโอเล็ต และการป้องกันต่อความเครียดทางชีวภาพ และกายภาพ (Ithal and Reddy, 2004; Reddy et al., 1995) ซึ่งมีความสำคัญทางชีวภาพมากมาย เช่น สารต้านอนุมูลอิสระช่วยป้องกัน และลดความเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดหัวใจ และมะเร็ง (Geekiyana et al., 2012) นอกจากนี้ ยังมีคุณสมบัติในการลดคอเลสเตอรอลในเลือด และต้านการอักเสบ พบว่าประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินสูงกว่าวิตามินซี และอี (Bagchi et al., 1998; Cossins et al., 1998; Shi et al., 2003) ข้าวบางพันธุ์มีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ คือ แอนโทไซยานินซึ่งสามารถพบสารดังกล่าวได้บริเวณเนื้อเยื่อใบ และบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวที่มีเมล็ดสีแดง และสีดำ โดยทั่วไปแล้ว cyanidin-3-glucoside และ peonidin-3-glucoside เป็นแอนโทไซยานินที่มีมากที่สุดในข้าวสีม่วง (Abdel-Aal et al., 2006; Hu et al., 2003; Hu et al., 2017; Jang and Xu, 2009; Kim et al., 2007; Kim

et al., 2011; Zaupa et al., 2015; Zhu et al., 2010) โดยทั่วไปการวิเคราะห์แอนโทไซยานินและกรดฟีนอลิกทำโดยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) (Hao et al., 2015; Shao et al., 2014) โดยมีการศึกษาพบว่าในเมล็ดข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงมีการสะสมปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่าในข้าวที่มีสีแดงและขาว ตามลำดับ (Na Rachasima et al., 2017; Peanparkdee et al., 2019; Yamuangmorn et al., 2019) และจากการศึกษาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า ข้าวที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ ข้าวแดง ข้าวดำ และข้าวขาว ตามลำดับ (Jiamyangyuen et al., 2017; Muntana and Prasong, 2010; Peanparkdee et al., 2019) ซึ่งการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวเกี่ยวข้องกับยีนสองยีนหลัก ๆ ที่เป็นยีนที่ควบคุม และยีนโครงสร้างคือ ยีน hydroxylase (*F3H*), flavonoid 3'-hydroxylase (*F3'H*), dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) และ anthocyanidin synthase (*ANS*) (Shin et al., 2006)

ยีนโครงสร้าง (structural genes) ซึ่งมีรหัสสร้างแอนไซมใน anthocyanin biosynthesis pathway (Geekiyanae et al., 2012) และยีนควบคุม (regulatory genes) ซึ่งมีรหัสสร้างโปรตีนทรานสคริปชันแฟคเตอร์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่ม Myc และ Myb ซึ่งยีนควบคุมกลุ่ม Myc transcription factor จัดอยู่ในกลุ่ม basic helix-loop-helix (bHLH) ในข้าวได้แก่ ยีน *OsB1* และยีน *OsB2* (Sakamoto et al., 2001) และยีนควบคุมกลุ่ม Myb ในพืชส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม R2R3 transcription factor ในข้าวได้แก่ ยีน *OsC1* ซึ่งในข้าวยีน *OsC1* เป็นยีนควบคุมที่เป็นรหัสของโปรตีนทรานสคริปชันแฟคเตอร์ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ยีน *OsC1* ในข้าวคล้ายกับยีน *C1* ในข้าวโพดซึ่งเป็นกลุ่มของ R2R3-Myb factors ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Martin and Paz-Ares, 1997; Reddy et al., 1995) ควบคุมยีนโครงสร้างในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินทำให้เมล็ดข้าวเกิดสีแดง และสีดำ ซึ่งก่อนหน้านี้มีการศึกษาเกี่ยวกับการเกิดสีข้าว ยีน *OsC1* อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 6 บริเวณเอกซอนที่ 3 (Saitoh et al., 2004) การศึกษายีน *OsC1* ที่ควบคุมการสร้างสีในข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า ยีน *OsC1* มีขนาด 1,290 bp ประกอบด้วย 3 เอกซอน และ 2 อินทรอน และมีการเกิดการขาดไป 10 bp ใน R3 ในข้าวขาว (Choudhury et al., 2014) และการศึกษาสีม่วงของกาบใบในข้าว และพบการขาดหายไป 10 และ 3 bp ใน R2R3 Myb domain ของยีน *OsC1* ในข้าวที่มีกาบใบสีเขียว (Chin et al., 2016)



ภาพที่ 11 โครงสร้างแอนโทไซยานิน

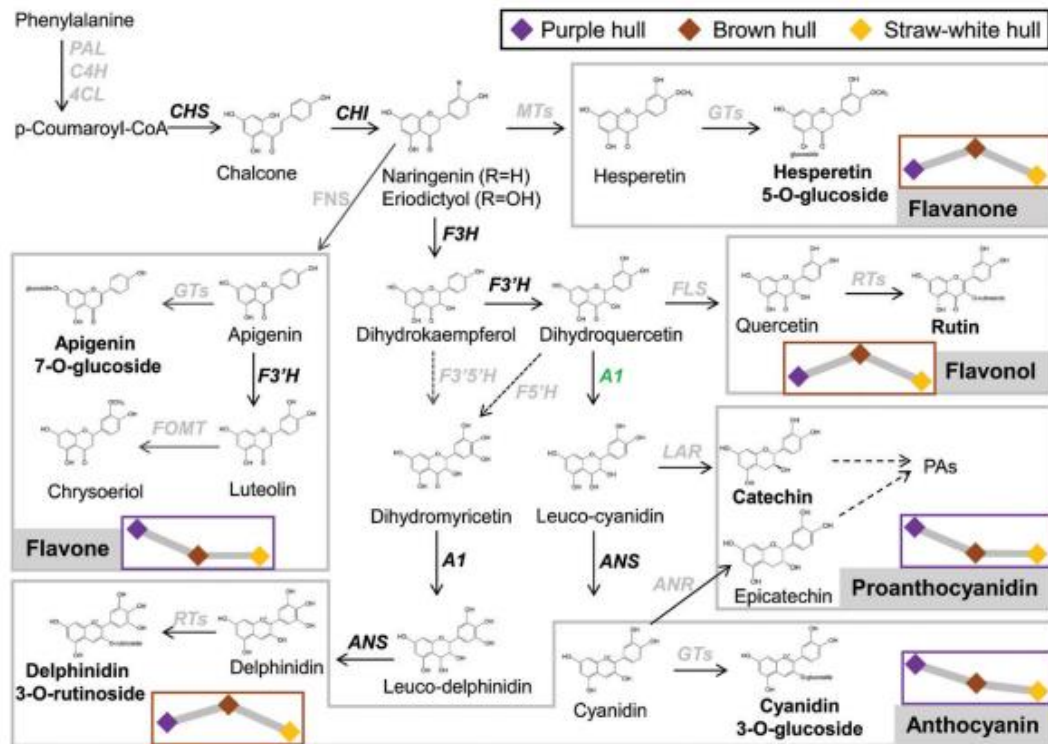
ที่มา: Horticulture industry network, (2017)

ยีนโครงสร้าง

ในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเกี่ยวข้องกับยีนเพื่อเปลี่ยนกรดอะมิโนฟีนอลอะลานีนไปเป็นแอนโทไซยานิน ยีนโครงสร้างที่สำคัญ ได้แก่ ยีนสร้างเอนไซม์ chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI), flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H), dihydroflavonol 4-reductase (DFR), anthocyanidin synthase (ANS), flavonoid 3-glucosyl-transferase (3GT), และ phenyl alanine ammonia lyase (PAL) (Schijlen et al., 2004) (ภาพที่ 12 และ 13)

สารตั้งต้นของการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน คือ malonyl-CoA และ *p*-coumaroyl-CoA ซึ่งมาจาก carbohydrate metabolism และ phenylpanoid pathway ในการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ เอนไซม์ตัวแรกในปฏิกิริยาที่ทำงาน 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 C-3 ของ flavanone ได้เป็น dihydroflavonoid ซึ่ง flavanone naringenin จะถูกเปลี่ยนเป็น dihydrokaempferol (DHK) จากเอนไซม์ flavonoid 3-hydroxylase (F3'H) เร่งปฏิกิริยาการเติม หมู่ OH (hydroxylation) ที่ตำแหน่ง 3' และ 5' ของ B-ring ทำให้เปลี่ยน dihydrokaempferol (DHK) ไปเป็น dihydroquercetin (DHQ) ที่จะถูกเปลี่ยนไปเป็น cyanidin อีกสามารถเปลี่ยนรูป DHK ไปเป็น dihydromyricetin (DHM) สำหรับการสร้าง delphinidin จากนั้นเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) เร่งปฏิกิริยา reduction โดยเปลี่ยน dihydroflavonoid ได้เป็น leucoanthocyanidins (flavan-3,4-diol) โดยใช้ NADPH เป็น cofactor ซึ่ง leucoanthocyanidins เป็นสารตั้งต้นโดยตรงสำหรับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน โดยเอนไซม์ anthocyanidin synthase (ANS) เปลี่ยน leucoanthocyanidins ไปเป็น

anthocyanidins และเอนไซม์ flavonoid 3-glucosyl transferase (3GT/FGT/GT) จะเร่งปฏิกิริยาการขนส่งกลูโคสจาก UDP-glucose ไปยัง hydroxyl group ในตำแหน่งที่ 3 ของ C-ring ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายที่ทำให้ anthocyanidins มีความเสถียร ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน



ภาพที่ 12 วิธีการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินในเปลือกข้าว

ที่มา: Sun et al., (2018)

ยีนควบคุม

ยีนควบคุมเป็นรหัสของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินที่สำคัญมี 2 กลุ่มคือ MYB transcription factor ประกอบไปด้วยบริเวณซ้ำสองบริเวณ คือ R2 และ R3 ซึ่งบริเวณ R2 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 53 ตัว และ R3 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 51 ตัว ซึ่งมี DNA binding domain เป็นแบบ helix-turn-helix (HTH) (Zhou et al., 2008) และ MYC transcription factor มี DNA binding domain เป็นแบบ basic helix-loop-helix (bHLH) (Geekiyana et al., 2012)

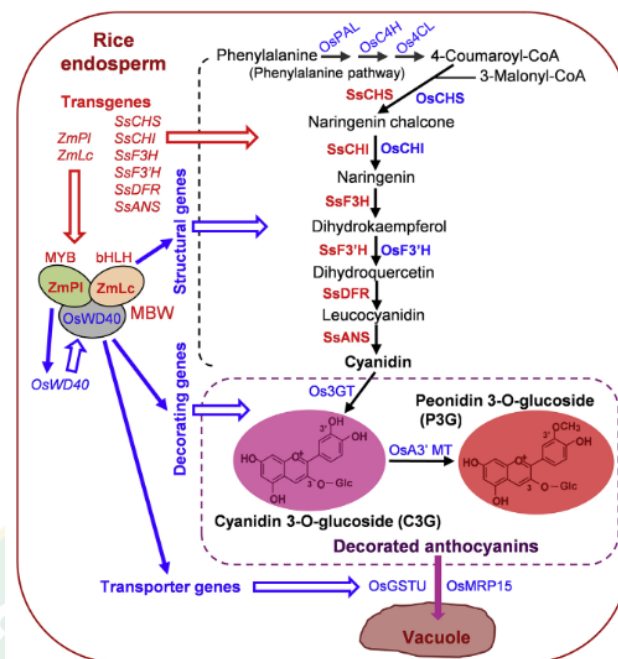
ในข้าวโพดมียีนควบคุม 2 กลุ่มคือ *R/B* และ *C1/Pl* gene families กลุ่มของ *R/B* gene families เป็นรหัสของ basic helix-loop-helix (bHLH) myc-type protein ส่วน *C1/Pl* gene families เป็นรหัสของ myb-related regulatory protein การกระตุ้นของ pathway ของแอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับการทำงานของยีนในกลุ่ม *R/B* และ *C1/Pl* อย่างน้อย หนึ่งในที่ทำหน้าที่จากแต่ละ gene family ต่อการสังเคราะห์รงควัตถุในเนื้อเยื่อ (Sakamoto et al., 2001)

การศึกษาการถ่ายยีน *C1* และ *R-S* จากข้าวโพด ซึ่งเป็นยีนควบคุมในการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ เข้าสู่ข้าวพบว่า มีการแสดงออกของยีน *C1* และ *R-S* ในเมล็ดข้าว โดยเมล็ดของต้น homozygous transgenic line รุ่น T_2 และ T_3 มีสีน้ำตาลเข้ม และเมล็ดเล็กกว่าเมล็ดรุ่น T_1 และเมล็ดจากต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน เนื่องจากต้นข้าวที่ตัดแปลงพันธุกรรมมีการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์หลายชนิด (Shin et al., 2006) ยีนควบคุมกลุ่ม Myb ในพืชส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม R2R3 transcription factor ในข้าว ได้แก่ ยีน *OsC1* เป็นยีนควบคุมที่เป็นรหัสของโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ซึ่งยีน *OsC1* อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 6 บริเวณเอกซอนที่ 3 (Saitoh et al., 2004) มีการศึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม และวิวัฒนาการการเกิดสีม่วงบริเวณกาบใบข้าวพบว่า ยีน *OsC1* เกี่ยวข้องในการทำให้เกิดสีม่วงในกาบใบข้าว โดยพบว่าการเกิดสีม่วงของกาบใบในข้าว พบการขาดหายไป 10 และ 3 bp ใน R2R3 Myb domain ของยีน *OsC1* ในกาบใบที่มีสีเขียว และยังเกี่ยวข้องกับการเกิดสีบริเวณเยื่อหุ้มปลายกลีบดอกใหญ่ (Chin et al., 2016; Fan et al., 2008) และมีการศึกษาพบว่า ยีน *OsC1* มีลักษณะคล้ายกับยีน *C1* ในข้าวโพด (Saitoh et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า การทำงานของยีน *Wx* และยีน *OsC1* นั้นเกี่ยวข้องกับฟีโนไทป์ แต่ลักษณะที่เกิดขึ้นอาจไม่สอดคล้องกับฟีโนไทป์ในข้าวบางพันธุ์ เช่น ข้าวพันธุ์พื้นเมืองในประเทศเนปาล (Choudhury et al., 2014) และมีการศึกษายีน *OsC1* พบว่ามีหน้าที่ควบคุมการสร้างสีในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า ยีน *OsC1* มีขนาด 1,290 bp ประกอบด้วย 3 เอกซอน และ 2 อินทรอน ในข้าว ขาวมีการเกิดการขาดไป 10 bp ใน R3 (Choudhury et al., 2014; Na Rachasima et al., 2017)

ยีนควบคุมกลุ่ม MYC transcription factor ที่มี DNA binding domain เป็นแบบ basic helix-loop-helix (bHLH) เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ได้แก่ยีน *Ra1/OsB1*, *Rb*, *Ra2* และ *OsB2/Kala 4* (Hu et al., 1996; Hu et al., 2000; Reddy, 1998; Sakamoto et al., 2001) โดยในยีน *OsB1* ซึ่งเป็นกลุ่ม myc basic helix-loop-helix (bHLH) มีการศึกษาพบว่า ในข้าวขาวมีการ insertion 2-bp ใน เอกซอน ที่ 7 ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบเฟรมชิฟท์ และยีน *OsB1* ในข้าวสีดำ มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Sakulsingharoj et al., 2016) ยีน *OsB2* หรือ *Kala 4* เป็นรหัสของ Myc transcription factor ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว และมีบริเวณ DNA-binding

domain เป็นชนิด basic helix-loop-helix (bHLH) domain ซึ่งในยีน *OsB2* มีบริเวณ C terminus ซึ่งเป็นบริเวณ DNA binding domain ที่มีความสำคัญต่อการทำงานของโปรตีน transcription factor มี 8 เอกซอน และ 7 อินทรอน (Oikawa et al., 2015) มีการศึกษาเกี่ยวกับการค้นหายีน *OsB2* โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่ายีน *OsB2* พบเฉพาะในข้าวสี แต่ไม่พบในข้าวขาว เนื่องจากในข้าวขาวนั้นมีการแสดงออกของยีน *OsB2* น้อย (Inta et al., 2013) นอกจากนี้ ยังมี การศึกษาเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน และพบว่า ยีน *OSB2* สามารถกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว โดยกระตุ้นยีนโครงสร้างให้มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น (Hu et al., 1996; Sakamoto et al., 2001) และมีหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวทำให้มีสีม่วงหรือดำ (Kim et al., 2018; Maeda et al., 2014; Oikawa et al., 2015; Rahman et al., 2016) การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ยีนในตำแหน่ง Purple 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) และยังมีรายงานว่ายีน *OsB2* เมื่อมีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่ายีน *OsB2* ไม่มีการแสดงออกในข้าวขาว ในข้าว *japonica* (Shin et al., 2006)

มีรายงานว่า การเกิดสีม่วงในข้าวนั้นต้องการยีนเด่น 3 ชนิด โดยยีน 2 ชนิดแรก เป็นรหัสของทรานสคริปชันแฟกเตอร์กลุ่ม B1 หรือ B2 (basic helix-loop-helix) และกลุ่ม C1 (R2R3-Myb) และอีกชนิดหนึ่งเป็นยีนที่มีรหัสสร้างเอนไซม์สังเคราะห์แอนโทไซยานิน คือ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) (Furukawa et al., 2007; Nagao and Takahashi, 1963; Oshima et al., 2019; Saika et al., 2011; Saitoh et al., 2004; Sakamoto et al., 2001; Zheng et al., 2019; Zhu et al., 2017a) (ภาพที่ 12) Sun et al. (2018) รายงานว่า ยีน *C1* (*OsC1*), *S1* (*OsB2*) and *A1* (*OsDFR*) เกี่ยวข้องกับการสะสมแอนโทไซยานินในเปลือกข้าว (rice hull) (ภาพที่ 12 และ 13)



ภาพที่ 13 วิธีการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินในเอนโดสเปิร์มข้าว

ที่มา: (Zhu et al., 2017a)

การถ่ายยีน

การถ่ายยีนในพืช (plant transformation) เป็นวิธีการผสมพันธุ์พืชโดยที่ธรรมชาติไม่สามารถทำได้ เช่น การสร้างพืชที่สามารถสร้างสารปราบแมลงได้ พืชที่ทนต่อยาปราบวัชพืช และพืชที่ผลิตวัคซีน เป็นต้น เนื่องจากการผลิตโปรตีนทำได้ง่ายในพืช และมีคุณภาพดี นอกจากนี้ยังประหยัดเวลา ซึ่งพาหะที่ใช้โคลนสำหรับพืชมี 3 ระบบ คือ (ศิริลักษณ์, 2552)

1. พาหะที่มีพื้นฐานจากพลาสมิดตามธรรมชาติของอะโกรแบคทีเรีย
2. การถ่ายยีนโดยตรงโดยใช้พลาสมิดดีเอ็นเอต่าง ๆ กัน
3. พาหะที่มีพื้นฐานจากไวรัส

ก่อนหน้านี้มีการศึกษาการถ่ายยีนโดยการถ่ายยีนทั้ง 2 ยีนเข้าไปในแคลลัส (co-transformation) ของข้าว ยีนทั้งสองยีนที่ถ่ายเข้าไปในข้าวคือยีน *mALS* และ ยีน *NIR* และตรวจสอบการแสดงออกของ *GFP* และ *GUS* พบว่า สามารถถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าวได้ (Wakasa et al., 2012) และมีการศึกษาก่อนหน้านี้มีการถ่ายยีนทั้ง 2 ยีนเข้าไปในแคลลัส (co-transformation) โดยใช้ยีน *Lc* (Leaf color), *Pl* (Purple leaf) และยีน *Lc* ร่วมกับ ยีน *Pl* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และตรวจสอบด้วยวิธี Southern และ Northern blot พบว่า พืชที่ได้รับ

ยีน *Lc* และ *Pl* มีสีม่วงทั้งหมด แต่หากพืชได้รับยีน *Pl* เพียงยีนเดียวจะทำให้ลำต้นมีสีม่วง หรือหากได้รับยีน *Lc* เพียงยีนเดียวจะทำให้พืชไม่ปรากฏสีม่วง (Han et al., 2009) การศึกษาการพัฒนาข้าวให้มีความสามารถในการแสดงออกของแอนโทไซยานิน และทำให้มีความต้านทานโรคไหม้สูงขึ้นโดยการถ่ายยีน *C2* เข้าไปในพืช พบว่า ยีน *C2* เกี่ยวข้องกับยีนโครงสร้างในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และได้ต้นที่มีสีม่วง ใบมีสีม่วงหรือสีแดง (Gandikota et al., 2001) มีการศึกษาการถ่ายยีน *OsB2* ในข้าว 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ Nipponbare และพันธุ์ Taichung 65 และตรวจสอบการแสดงออกด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่า ข้าวตัดแปลงพันธุ์กรรมมีการแสดงออกของยีน *OsB2* เพิ่มมากขึ้นและยังสอดคล้องกับการเพิ่มการแสดงออกของยีนโครงสร้างในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินอีกด้วย (Sakulsingharoj et al., 2014) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาเกี่ยวข้องกับการถ่ายยีน 8 ยีนในข้าว โดย 2 ยีนเป็นยีนควบคุมซึ่งได้มาจากข้าวโพดคือยีน *ZmLc* และยีน *ZmPl* ซึ่งยีน *ZmPl* คล้ายกับยีน *ZmC1* และอีก 6 ยีนเป็นยีนโครงสร้างซึ่งได้มาจากต้นถั่วเขียว (Coleus) พบว่า จากการศึกษาได้ข้าวที่มีสีม่วงทั้งเมล็ด และมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูงในเอ็นโดสเปิร์มของข้าวที่ได้รับยีน (Zhu et al., 2017b) และการถ่ายยีน *OsB2* ร่วมกับยีน *ZmC1* ที่ได้จากข้าวโพดและยีน *OsDFR* ในข้าวพันธุ์ Kasalath ที่เป็นข้าวแดงเพื่อศึกษาการสะสมแอนโทไซยานินบริเวณเนื้อเยื่อกาบใบ โดยใช้โปรโมเตอร์ที่จำเพาะต่อเนื้อเยื่อกาบใบคือ *LSSPO1*, *LSSPO2* และ *LSSPO3* พบว่าข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับยีนรวมทั้ง 3 ยีน และใช้โปรโมเตอร์จำเพาะต่อเนื้อเยื่อกาบใบ คือ *LSSPO3* แคลสส์มีการสะสมของแอนโทไซยานินและเมื่อพัฒนาไปเป็นต้นพบว่ามีกาบใบสีแดงแตกต่างกับต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนแสดงว่าการเกิดสะสมแอนโทไซยานินที่เนื้อเยื่อกาบใบจำเป็นต้องใช้ยีน 3 ยีน คือ ยีนควบคุม คือ MYB และ bHLH และยีนโครงสร้าง (Oshima et al., 2019)

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

พันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษา

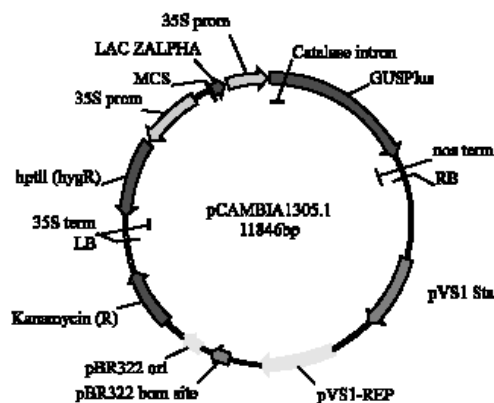
ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงพันธุ์ Kasalath ที่ใช้ศึกษาได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. วราภรณ์ แสงทอง สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

อะโกรแบคทีเรีย

อะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Thomas W. Okita จาก Institute of Biological, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา

พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

พลาสมิด pCAMBIA1305.1 (ภาพที่ 14) ซึ่งประกอบด้วยชุดของยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยให้ยีนทำงานภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ nos Terminator ซึ่งเป็น T-DNA vector เพื่อใช้สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath โดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

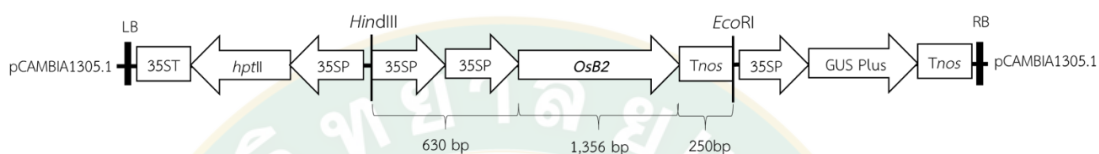


ภาพที่ 14 แผนที่พลาสมิด pCAMBIA 1305.1

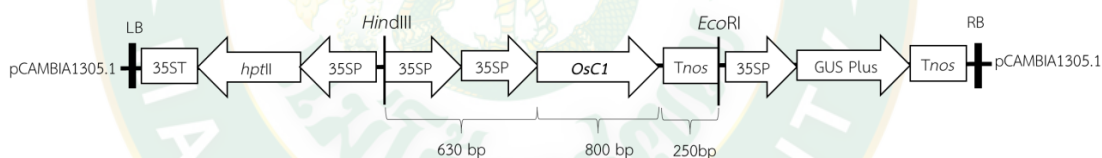
ที่มา: Raveendar and Ignacimuthu, (2010)

ยีนที่ใช้ศึกษา

ยีน *OsB2* (ภาพที่ 15) และ *OsC1* (ภาพที่ 16) โคลนได้จากข้าวพันธุ์เก่าที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเข้มหรือสีดำภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos* terminator และถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 (Sakulsingharoj et al., 2014; ช่อทิพา and ทอง, 2561)



ภาพที่ 15 ยีน *OsB2* โคลนได้จากข้าวพันธุ์เก่าที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเข้มหรือสีดำภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos* terminator และถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 (Sakulsingharoj et al., 2014)



ภาพที่ 16 ยีน *OsC1* โคลนได้จากข้าวพันธุ์เก่าที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเข้มหรือสีดำภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos* terminator และถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 (ช่อทิพา และคณะ, 2561)

วัสดุอุปกรณ์

1. ที่ตั้งหลอดทดลอง
2. กระจกบอทวง
3. กล้องสเตอริโอ
4. กระจกตาชพิชชู่
5. ขวดแก้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 12 ออนซ์
6. ขวดรูปชมพู่ (Flask)
7. จานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Petri dish)
8. ซ้อนตักสาร
9. ตะเกียงแอลกอฮอล์
10. ตะแกรง
11. ถ้วยใส่สาร
12. ทิป (Tip)
13. นาฬิกาจับเวลา
14. ปีกเกอร์ (Beaker)
15. ปากคีบ (Forcep)
16. ปิเปตแก้ว
17. พลาสติกแรป (Plastic wrap)
18. หลอดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
19. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
20. หลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
21. หลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

เครื่องมือ

1. กล้องสเตอริโอ SD 3045 (Olympus, Japan)
2. เครื่องกวนสารและให้ความร้อน (Jenway 1000, UK)
3. เครื่อง Vortex Cycler ยี่ห้อ Bio-RAD รุ่น T 100 (BioRad, USA)
4. เครื่อง spectrophotometer (Perkin Elmer, USA)
5. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น PG802-S (Mettler toledo, Switzerland)

6. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AG285 (Mettler toledo, Switzerland)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง แบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น Harrier 18/80 Refrifuge (Sanyo, UK)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Biofuge Pico (Sorvall, Germany)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง แบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Universal 32R (Hettich, Germany)
10. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง Sartorius Professional Meter PP-50 (Sartorius, Germany)
11. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส My Rn Intelligent Electrophoresis Unit (Tokyo, Japan)
12. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส Mupid-exu Submarine Electrophoresis system (Advance, Japan)
13. เครื่อง Microplate reader (SPECTROstar® Nano, Germany)
14. เครื่อง NanoDrop 8000 Spectroptometer (Thermo Fisher Scientific, USA)
15. เครื่อง Gel Doc™ XR+ with Image Lab™ Software (BIO-RAD, USA)
16. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ Orbital Shakering Incubation (Shall Lab, USA)
17. ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส (Haier, Thailand)
18. ตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส
19. ตู้ปลอดเชื้อ ClassII/B3 biology safety (Forma scientific, USA)
20. ตู้อบแห้ง ED115 (E2) (BINDER, Norway)
21. ไมโครเวฟ รุ่น Intell wave (LG, China)
22. ไมโครปิเปต (Micropettes)
23. หม้อนึ่งความดันไอ
24. หม้อนึ่งความดันไอ (Zealway, China)
25. อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (Julabo, Germany)

สารเคมี

1. Absolute ethanol (MERCK, Germany)
2. Acetic acid (Merck, Germany)
3. Agarose (Merck, Germany)
4. A-Naphthaleneacetic acid (NAA) (phytotechnology, USA)
5. Boric acid (Fisher scientific, UK)
6. Cassamino acids powder (Bio Basic Inc, Canada)

7. Chloroform (LAB-SCAN, Thailand)
8. Diaminoethanetetra-acid disodium salt (EDTA) (Fisher scientific, UK)
9. Diethy pyrocarbonate (DEPC) (Euro clone, Italy)
10. Dimethyl sulfoxid (DMSO) (Merck, Germany)
11. D-Glucose anhydrous (Fisher scientific, UK)\
12. D-Sorbitol (Bio Basic Inc., Canada)
13. Gelzan-CM (Phytotechnology, USA)
14. Glycine (Fisher scientific, UK)
15. Glycerol (Merck, Germany)
16. Hydrochloric acid (HCL) (Merck, Germany)
17. Isoproponol (Merck, Germany)
18. Kinetin (6-furturylaminopurine) (Phytotechnology, USA)
19. L-Glutamine (Fluka, Switzerland)
20. L-Proline (Phytotechnology, USA)
21. Methanol (Merck, Germany)
22. Myo-Inositol (Bio Basic Inc, Canada)
23. Nicotinic acid (Fluka, Switzerland)
24. Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) (Phytotechnology, USA)
25. Potassium chloride (Merck, Germany)
26. Sucrose (BDH Laboratory, England) (Bio Basic Inc, Canada)
27. SYBR saft DNA gel stain (Invitrogen, USA)
28. TRIzol reagent (Invitrogen, USA)
29. Vitamin B1 Hydrochloride (Thiamine. HCL) (Fluka, UK)
30. X-gal (Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-b-D-galactopyranoside) (Bio Basic Inc., Canada)
31. X-Gluc (100 mM X-Gluc in Dimethylformamide) (Bio Basic Inc, Canada)
32. Yeast extract (Bio Basic Inc, Canada)
33. 2-mercaptoethanol (BIO BASIC INC, Thailand)
34. 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (Phytotechnology, USA)
35. 2, 2-Diphenyl-1-picryldrazyl (DPPH) (Sigma, Germany)
36. 3M Sodium acetate pH 5.2
37. 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-glucronide (X-gluc) (Phytotechnology, USA)

38. (\pm)-6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) (Sigma, Germany)

สารปฏิชีวนะที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารปฏิชีวนะไทเมนทิน (Timentin) (PhytoTechnollogy Laboratories, USA)
2. สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (Hygromycin) (Caisson, USA)
3. สารปฏิชีวนะไรแฟมพิซิน (Rifampicin) (Bio scientific Inc, USA)
4. สารปฏิชีวนะกานามัยซิน (Kanamycin) (Siam Bheasach, Thailand)

ดีเอ็นเอมาตรฐาน

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

ชุดสำเร็จรูป

1. ชุด ReverseAid First strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA)
2. DNaseI (Thermo Fisher Scientific, USA)
3. ชุด Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, USA)
4. ชุด My Taq Red Mix (Bioline, USA)

โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย

1. โปรแกรม R3.6.0 (<http://www.r-project.org>)
2. Gel Doc™ XR+ with Image Lab™ Software (BIO–RAD, USA)

วิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็นขั้นตอน ดังนี้

1. การถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าว

- 1.1 การชักนำแคลลัสของข้าวแดงพันธุ์ Kasalath
- 1.2 การเตรียมอะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA

1305.1

1.3 การถ่ายยีน *OsC1*, *OsB2* และถ่ายยีนร่วม เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath และทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวโดยวิธี GUS assay

- 1.4 การคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน และชักนำให้เกิดต้น
- 1.5 การวิเคราะห์ต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์
- 1.6 การศึกษาพีโนไทป์ของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรม

2. การทดสอบการกระจายตัวของยีนในต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากต้นอ่อนข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁

2.2 การทดสอบการกระจายตัวของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁ โดยวิธี GUS assay และเทคนิคพีซีอาร์

- 2.3 การศึกษาพีโนไทป์ของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁

3. การสร้างข้าวลูกผสมที่มียีน *OsC1* และยีน *OsB2*

- 3.1 การคัดเลือกต้นแม่และต้นพ่อ
- 3.2 การผสมข้าว
- 3.3 การตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay และเทคนิคพีซีอาร์ในข้าวลูกผสมรุ่น F₁

4. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR และ semi-quantitative RT-PCR

4.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากต้นอ่อนข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน

4.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR และ semi-quantitative RT-PCR

5. การวัดปริมาณแอนโทไซยานิน

- 5.1 การสกัดแอนโทไซยานิน
- 5.2 การวัดปริมาณแอนโทไซยานิน

6. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

- 6.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

1. การถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าว

1.1 การชักนำแคลลัสของข้าวแดงพันธุ์ Kasalath

- นำเมล็ดข้าวแดงพันธุ์ Kasalath มากะเทาะเปลือกออก แล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย 75% เอทานอล เป็นเวลา 5 นาที และ 10% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ ปริมาตร 25-30 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที เขย่า 150 รอบต่อนาที จำนวน 2 รอบ

- ล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่น 4-5 ครั้ง ปริมาตร 25-30 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อกำจัดเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวออกจนหมด นำเมล็ดที่ทำความสะอาดแล้วซับน้ำให้แห้ง

- นำเมล็ดข้าวที่ฟอกฆ่าเชื้อและกำจัดเยื่อหุ้มเมล็ดแล้วมาชักนำให้เกิดแคลลัสเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ดัดแปลง (Toki, 1997) และวางเมล็ดโดยให้ส่วนเอ็มบริโออยู่บนผิวของอาหาร จำนวน 10 เมล็ดต่อเพลท

- เลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 สัปดาห์ และคัดเลือกแคลลัสที่มีลักษณะกลม แน่น ย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร N6D เป็นเวลา 3 วัน

1.2 การเตรียมอะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1305.1

- นำอะโกรแบคทีเรียมา streak บนอาหาร LB ที่มีสารปฏิชีวนะไรแฟมพิซิน และกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

- นำโคลนเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติมกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และอะซิโตไซริงกอน ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ จากนั้นนำมาเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

- วัดความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้อ ด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

- ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนอะโกรแบคทีเรีย โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- เเทส่วนใสทิ้งและละลายตะกอนกลับด้วยอาหารสูตร 2N6 ปริมาตร 20 ml เจือจางเชื้อให้ได้ 0.15 ด้วยอาหาร 2N6

1.3 การถ่ายยีน *OsC1*, *OsB2* และถ่ายยีนร่วม เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath

- นำแคลลัสที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน มาถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1305.1

- การถ่ายยีนร่วม นำไปแคลลัสที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน มาถ่ายยีนโดยนำเชื้อที่เจือจางได้ 0.15 ด้วยอาหารสูตร 2N6 ของทั้งสองยีนมาผสมกันในหลอด 50 ml ก่อนจึงนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับแคลลัส

1.4 การคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน และชักนำให้เกิดต้น

- หลังจากการถ่ายยีนและเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน บนอาหารสูตร Co-culture นำแคลลัสมาล้างด้วยน้ำกลั่น 4-5 ครั้ง จนน้ำใส

- จากนั้นล้างน้ำสุดท้ายด้วยอาหารเหลวสูตร N6D ที่เติมสารปฏิชีวนะไทเมนทิน

- เขย่าเบา ๆ และเทลงตะแกรง

- นำตะแกรงวางบนกระดาษทิชชู ชุบให้แห้งก่อนนำวางลงบนอาหารคัดเลือกสูตร SMI ที่มี 15 mg/L และไทเมนทิน 150 mg/L เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ ± 28 องศาเซลเซียส

- เมื่อครบ 2 สัปดาห์ ย้ายแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือก สูตร SMI ไปวางบนอาหารคัดเลือก สูตร SMII ที่มี 30 mg/L และไทเมนทิน 150 mg/L เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ ± 28 องศาเซลเซียส

- เมื่อครบสองสัปดาห์ย้ายแคลลัสที่รอดบนอาหารชักนำให้เกิดยอดสูตร RM จนกว่าจะเกิดยอด

- เมื่อเกิดยอดนำยอดที่ได้ย้ายไปบนอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงต้นข้าวเพื่อชักนำให้เกิดราก สูตร MS เมื่อได้ต้นนำไปปลูกลงบนกระถางในโรงเรือนกระจก

1.5 การวิเคราะห์ต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์

- ปฏิกริยา PCR ที่ใช้ในการตรวจสอบวิเคราะห์ต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ผ่านการถ่ายยีนโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsB2* และ *OsC1*

ยีน	ชื่อไพรเมอร์และลำดับเบส (5'-3')	Annealing temp (°C)	ขนาด (bp)
<i>OsC1</i>	<i>OsC1</i> cdsF: ATGGGGAGGAGAGCTTGCTGC	68	819
	<i>OsC1</i> cdsR: TCACGCACACAAGTTCCAGGC		
<i>OsB2</i>	<i>OsB2</i> cdsF: ATGGCATCTGCTCCTCCAGTTCAGG	68	1,356
	<i>OsB2</i> cdsR: TTACGGCGCCTTCCCCTGTCC		

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา)
2x My Taq TM Red Mix	10
10 μ M Forward primer	1
10 μ M Reverse primer	1
DNA (100 ng)	1
dH ₂ O	7
Total	20

สภาวะในการทำ PCR

Initial Denaturation	95 องศาเซลเซียส	3 นาที	} 35 รอบ
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Annealing	68 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	

จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วย 1% Agarose gel electrophoresis ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายรูปลงฟิล์มภายใต้แสงยูวี สังเกตแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800bp

1.6 การศึกษาฟีโนไทป์ของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรม

- บันทึกลักษณะของต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนและต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรม เช่น สีกาบใบ เขียวกันแมลง ข้อ หางข้าว และสีเยื่อหุ้มเมล็ด เป็นต้น

2. การทดสอบการกระจายตัวของยีนในต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁

2.1 สกัดดีเอ็นเอจากต้นอ่อนข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน

- บดใบให้ละเอียด จากนั้นเติมสารละลาย mCTAB + 1% 2-mercaptoethanol ปริมาตร 500 μ l

- ใส่ Chloroform 500 ไมโครลิตร นำไปปั่น 65 องศาเซลเซียส 20 นาที (ผสมทุก 10 นาที)

- ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่ออนาที นาน 5 นาที และย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่

- ใส่ RNaseA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ต่อสารละลาย ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

- เติม Chloroform ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นย้ายส่วนใสชั้นบนใสหลอดใหม่

- เติม 3M-Sodium acetate, pH 5.2 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วเติม Cold-absolute ethanol 2 เท่า ของสารละลาย บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 20 นาทีหรือข้ามคืน

- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทน้ำทิ้ง และใส่ 75% Ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร (2 ครั้ง)

- จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทน้ำทิ้ง ตากให้แห้งและละลายกลับด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.0

2.2 วิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน

- ปฏิกริยา PCR ที่ใช้ในการตรวจสอบวิเคราะห์ต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ผ่านการถ่ายยีนโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsB2* และ *OsC1* โดยทำตามข้อ 1.5

2.3 การศึกษาฟีโนไทป์ของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁

บันทึกลักษณะของต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนและต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรม เช่น สี กาบใบ เขียวกันแมลง ข้อ หางข้าว และสีเขียวหุ้มเมล็ด เป็นต้น

3. การสร้างข้าวลูกผสมที่มียีน *OsC1* และยีน *OsB2*

3.1 การคัดเลือกต้นพันธุ์รับและพันธุ์ให้

- ปลูกต้นข้าวรุ่น T₁ ของต้นที่มียีน *OsC1* และยีน *OsB2* และเลือกต้นที่มียีน *OsC1* และยีน *OsB2* มาเป็นต้นแม่และต้นพ่อ

- ใช้ต้น T₁ ที่มียีน *OsC1* เป็นต้นแม่ และให้ต้น T₁ ที่มียีน *OsB2* เป็นต้นพ่อ

3.2 การผสมข้าว

- เมื่อต้นพันธุ์รับออกดอกผ่านไปประมาณ 2-3 วัน จึงเริ่มผสม

- กำจัดเกสรตัวผู้ของต้นพ่อโดยแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นคีบเอาเกสรตัวผู้ของต้นพ่อออกจนหมด

- เมื่อดอกของต้นแม่เริ่มบาน คีบเกสรตัวผู้จากต้นพ่อเคาะใส่เกสรตัวเมียของต้นแม่

- เมื่อผสมเรียบร้อยแล้วนำถุงกระดาษไขคลุมข้อที่ทำการผสมของต้นพันธุ์รับ

3.3 การตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay และเทคนิคพีซีอาร์ในข้าวลูกผสมรุ่น F₁

- ตัดชิ้นส่วนใบมาตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay เพื่อดูการแสดงออกของยีน *gus* ในต้นลูกผสมรุ่น F_1
- ปฏิบัติ PCR ที่ใช้ในการตรวจสอบวิเคราะห์ต้นข้าวลูกผสมรุ่น F_1 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsB2* และ *OsC1* โดยทำตามข้อ 1.5

4. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR (reverse transcriptase-PCR) และ semi-quantitative RT-PCR

4.1 สกัดอาร์เอ็นเอจากต้นอ่อนข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน

4.1.1 ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอ

- นำใบข้าวมาบดให้ละเอียดในโกร่ง โดยใช้ไนโตรเจนเหลว
- ใส่ TRIzol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร
- บ่มตัวอย่าง 5 นาที อุณหภูมิห้อง (15-30 องศาเซลเซียส)
- เติมน้ำ Chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าหลอด 15 วินาที และบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง (15-30 องศาเซลเซียส) 2-3 นาที
- ปั่นเหวี่ยง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส และย้ายชั้นน้ำใสหลอดใหม่ 600 ไมโครลิตร และเติมน้ำ Isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
- บ่มตัวอย่างเป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (15-30 องศาเซลเซียส) และปั่นเหวี่ยง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- ดูดส่วนใสทิ้งแล้วล้างด้วย 75% Ethanol เย็น ผสมแล้วปั่นเหวี่ยง 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 2 รอบ
- ดูดส่วนใสทิ้งแล้วตากตะกอนให้แห้ง เมื่อแห้งเติม DEPC (free RNase) 20-30 ไมโครลิตร ผสมแล้วบ่มเป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิห้อง
- จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วย 1% Agarose gel electrophoresis ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

4.1.2 การกำจัดดีเอ็นเอด้วย เอนไซม์ DNaseI

- เมื่อได้อาร์เอ็นเอจากการสกัดด้านบน จากนั้นกำจัดดีเอ็นเอด้วย เอนไซม์ DNaseI โดยเติมส่วนประกอบของปฏิกิริยา ดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาณต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
RNA	8
10x Reaction buffer DNaseI	1
DNaseI	1
total	10

- บ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเติม 25 mM EDTA 1 ไมโครลิตร และบ่ม 65 องศาเซลเซียส 10 นาที

- จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วย 1% Agarose gel electrophoresis ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

4.2 วิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR และ semi-quantitative RT-PCR

4.2.1 สังเคราะห์ cDNA

- สังเคราะห์ cDNA ด้วยชุด RevertAid First strand cDNA synthesis (Thermo Scientific, USA) โดยเติมส่วนประกอบของปฏิกิริยา ดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาณต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
Template (RNA: 0.1 µg -5 µg)	10 µl
Primer: Oligo (dT) ₁₈ primer	1 µl
dH ₂ O	1 µl
Total	12 µl

- ผสมเบา ๆ spin down บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และวางบนน้ำแข็ง และเติมส่วนประกอบต่อไปนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
5x Reaction Buffer	4 μ l
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μ L)	1 μ l
10 mM dNTP Mix	2 μ l
RevertAid M-MuLV RT (200U/ μ L)	1 μ l
Total volume	20 μ l

- ผสมเบา ๆ และ spin down และดูมาปริมาตร 8 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดตัวอย่าง แต่ละหลอด ผสมและ spin down

- บ่มตัวอย่าง นาน 60 นาที ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และตามด้วยอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4.2.2 วิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR และ semi quantitative RT-PCR

- วิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน

ยีน	ชื่อไพรเมอร์และลำดับเบส (5'-3')	Annealing temp (°C)	ขนาด (bp)
<i>OsC1</i>	OsC1ex1F: ATGGGGAGGAGAGCTTGCTG	68	263
	OsC1ex1R: CTGTTGCCGAGGAGGGTGTG		
<i>OsB2</i>	OsB2cdsF: ATGGCATCTGCTCCTCCAGTTCAGG	68	1,356
	OsB2cdsR: TTACGGCGCCTTCCCCTGTCC		
<i>OsCHS</i>	OCHS1F: CGGACTGGA ACTCCATCTTC	58	366
	OCHS1R: AAAGATGACGTGTGGCGTA		
<i>OsCHI</i>	OCHIF: TCCATCCTCTTCACCCACTC	58	338
	OCHIR: TGTCAAACACGAGGGCAGTA		
<i>OsF3'H</i>	OsF3'HF: ATCAAGGAGACGTTTCGGC	60	313
	OsF3'HR: TGGCAGTCAGTGTGAC		
<i>OsDFR</i>	OsDFR-RTF: GCCCACTACTCGATCCTGAA	60	250
	OsDFR-RTR: CAGCGTGTACCTGAACCTGA		
<i>OsANS</i>	OANS1F: GAAGAGGGAGTGGGAGGACT	57	528
	OANS1R: CAGAAGACGACCCAGGAGAG		
<i>OsActin</i>	OsActinR: TGATGCGCCCAGGGCTGTCT	68	276
	OsActinR: CGATTGGCCTTGGGGTTGAG		

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยา)
2x My Taq TM Red Mix	10
10 μ M Forward	1
10 μ M Reverse	1
cDNA (2 ng)	1
dH ₂ O	7
Total	20

สภาวะในการทำ PCR

Initial Denaturation	95 องศาเซลเซียส	3 นาที	} 35 รอบ
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Annealing	57-68 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	

จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วย 1.8 % Agarose gel electrophoresis ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายรูปลงฟิล์มภายใต้แสงยูวี สังเกตแถบดีเอ็นเอขนาดที่คาดหวัง

5. การวัดปริมาณแอนโทไซยานิน

5.1 สกัดแอนโทไซยานิน

- นำเมล็ดแก่ของข้าวมาบดให้ละเอียดเป็นผง และใช้ผงบดละเอียด 100 มิลลิกรัม
- ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ HCl ในเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ (V/V) ตัดแปลงจาก (Chin et al., 2016)

- ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
- ดูดส่วนในใสในไมโครเพลทเพื่อเตรียมนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง

5.2 วัดปริมาณแอนโทไซยานิน

- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร และ 675 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Microplate reader

- คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินดังนี้ Monomeric anthocyanin = $(A \times MW \times DF \times 1000) / \epsilon \times 1$ (Na Rachasima et al., 2017) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

6. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

6.1 ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

- นำเมล็ดแก่ของข้าวบดให้ละเอียดเป็นผง ไซ้ผง 100 มิลลิกรัม
- ผสมกับ 80 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร
- บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

ทำตามวิธีดัดแปลงจาก (Shao et al., 2014)

- ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ 2, 2-Diphenyl-1-picryldrazyl (DPPH) เป็นอนุมูลอิสระและใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐานหรือสารควบคุม ดัดแปลงจาก (Zhu et al., 2017a)

- เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลต่อลิตร ในเมทานอล
- เทียบกับกราฟมาตรฐานของ Trolox ที่ความเข้มข้น 0, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 และ 125 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่ม 30 นาที
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 516 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader

- ค่าดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณหาการยับยั้งอนุมูลอิสระ ดังสมการนี้ %DPPH inhibition = $[(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$

A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีตัวอย่างของสารสกัดโดยใช้ เมทานอล 20 ไมโครลิตร แทนตัวอย่างของสารสกัด

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเจือจางที่เตรียมไว้สำหรับผสมกับสารละลาย DPPH โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 516 นาโนเมตร

Blank คือ สารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ร่วมกับเมทานอล ปริมาตร 180 ไมโครลิตร

Negative คือ เมทานอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

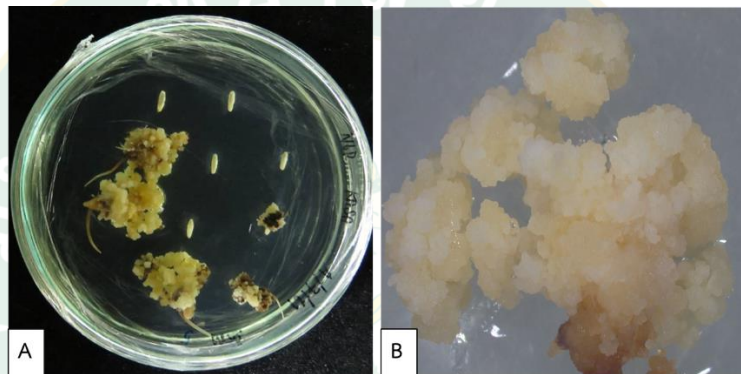
บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. การถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าว

1.1 การชักนำแคลลัสของข้าวแดงพันธุ์ Kasalath

การชักนำแคลลัสจากเมล็ดข้าวบนอาหาร N6D ดัดแปลง เป็นเวลา 4-5 สัปดาห์ พบว่า มีแคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath กระจายตัวบริเวณโดยรอบเอมบริโอเป็นกลุ่มเกาะกันแน่น มีสีเหลืองอ่อน เหมาะสำหรับนำไปใช้ในการถ่ายยีน (ภาพที่ 17)

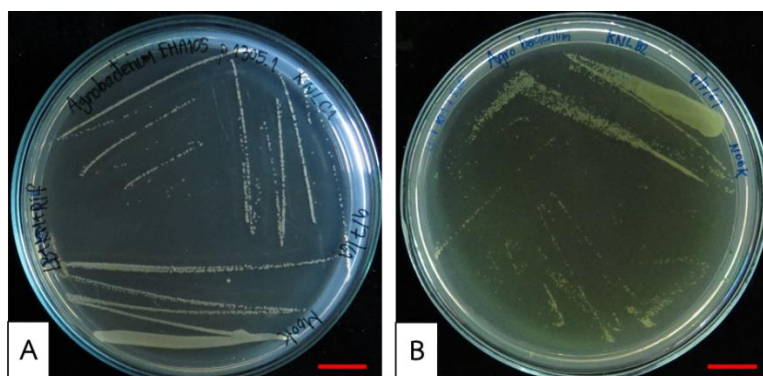


ภาพที่ 17 ลักษณะแคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath

หมายเหตุ A คือ แคลลัสของข้าวแดงพันธุ์ Kasalath อายุ 4-5 สัปดาห์
B คือ ลักษณะกลุ่มแคลลัส อายุ 4-5 สัปดาห์

1.2 การเตรียมอะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1305.1

การเตรียมอะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 ซึ่งมีชุดยีนที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์เก่าที่มีสีม่วงเข้มหรือสีดำที่มียีน *OsC1* ภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos* terminator (dual 35SP::*OsC1*::*Tnos*) และยีน *OsB2* ภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos* terminator (dual35SP::*OsB2*::*Tnos*) ที่ streak บนอาหาร LB ที่มีสารปฏิชีวนะไรแฟมพิซิน และกานามัยซิน พบว่าได้โคลนนี้เดี่ยวเหมาะสำหรับนำไปใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath ต่อไป (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 เชื้ออะโกรแบคทีเรียที่นำมา streak บนอาหาร LB ที่มีสารปฏิชีวนะไรแฟมพิซิน และกานามัยซิน

หมายเหตุ A คือ อะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 ซึ่งมีชุดยีนที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์เก่าที่มีสีม่วงเข้มหรือสีดำที่มียีน *OsC1* ภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos terminator* (dual35SP::*OsC1*::*Tnos*)

B คือ อะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 ที่มียีน *OsB2* ภายใต้การควบคุมของ dual 35S Promoter และ *nos terminator* (dual35SP::*OsB2*::*Tnos*)

1.3 การถ่ายยีน *OsC1*, *OsB2* และถ่ายยีนร่วม เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath และทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวโดยวิธี GUS assay

การถ่ายยีน *OsC1* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath จำนวน 3 ครั้ง เมื่อตรวจสอบแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยวิธี GUS assay พบว่ามีจุดสีฟ้าปรากฏบนแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน (ภาพที่ 19) มีการแสดงออกของยีน *gus* เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของการถ่ายยีน *OsC1* จากการถ่ายยีนทั้ง 3 ครั้ง พบร้อยละ 40, 0 และ 80 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

การถ่ายยีน *OsB2* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath จำนวน 3 ครั้ง เมื่อตรวจสอบแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยวิธี GUS assay พบว่ามีจุดสีฟ้าปรากฏบนแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน (ภาพที่ 20) มีการแสดงออกของยีน *gus* เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของการถ่ายยีน *OsB2* จากการถ่ายยีนทั้ง 3 ครั้ง พบร้อยละ 30, 0 และ 20 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

การถ่ายยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath จำนวน 4 ครั้ง เมื่อตรวจสอบแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยวิธี GUS assay พบว่ามีจุดสีฟ้าปรากฏบนแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน (ภาพที่ 21) มีการแสดงออกของยีน *gus* เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของการถ่ายยีน *OsB2* จากการถ่ายยีนทั้ง 4 ครั้ง พบร้อยละ 20, 20, 40 และ 0 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพการถ่ายยีน *OsC1* ที่ตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay

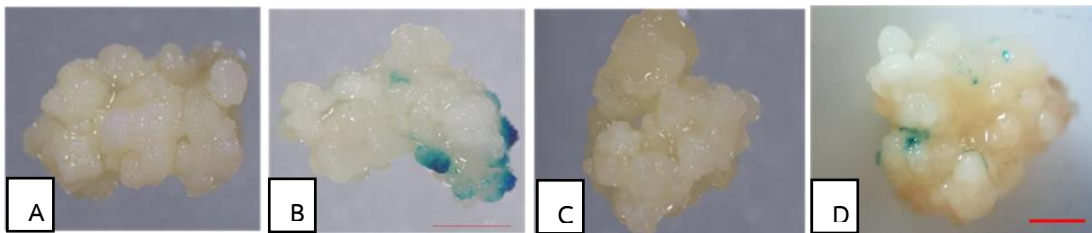
ครั้งที่ถ่ายยีน	จำนวนกลุ่มแคลลัสทั้งหมด	แคลลัสที่มีจุดสีฟ้า	ประสิทธิภาพการถ่ายยีน (ร้อยละ)
1	10	4	40
2	5	0	0
3	5	4	80

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการถ่ายยีน *OsB2* ที่ตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay

ครั้งที่ถ่ายยีน	จำนวนกลุ่มแคลลัสทั้งหมด	แคลลัสที่มีจุดสีฟ้า	ประสิทธิภาพการถ่ายยีน (ร้อยละ)
1	10	3	30
2	5	0	0
3	5	1	20

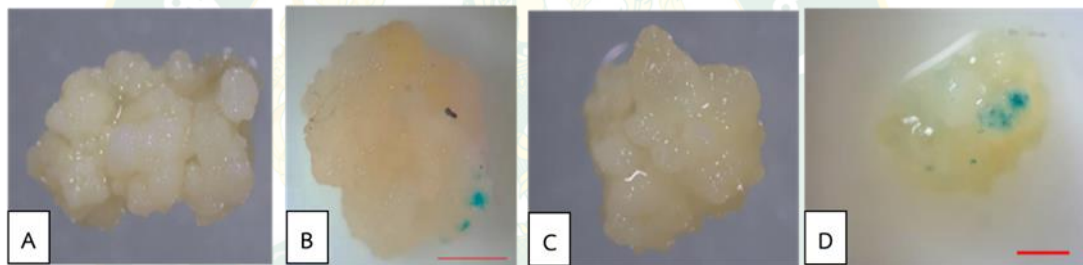
ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพการถ่ายยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* ที่ตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay

ครั้งที่ถ่ายยีน	จำนวนกลุ่มแคลลัสทั้งหมด	แคลลัสที่มีจุดสีฟ้า	ประสิทธิภาพการถ่ายยีน (ร้อยละ)
1	10	2	20
2	5	1	20
3	5	2	40
4	5	0	0



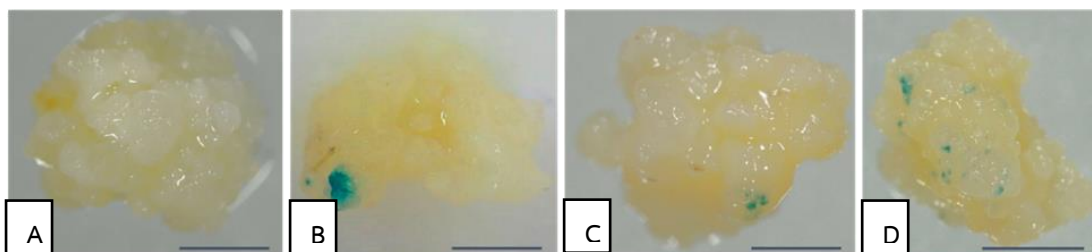
ภาพที่ 19 การตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay ในแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน *OsC1*

- หมายเหตุ
- A คือ แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน
 - B คือ แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน *OsC1* ครั้งที่ 1
 - C คือ แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน *OsC1* ครั้งที่ 2
 - D คือ แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน *OsC1* ครั้งที่ 3



ภาพที่ 20 การตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay ในแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน *OsB2*

- หมายเหตุ
- A คือ แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน
 - B คือ แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน *OsB2* ครั้งที่ 1
 - C คือ แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน *OsB2* ครั้งที่ 2
 - D คือ แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน *OsB2* ครั้งที่ 3



ภาพที่ 21 การตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay ในแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2*

- หมายเหตุ
- A คือ แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน
 - B คือ แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* ครั้งที่ 1
 - C คือ แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* ครั้งที่ 2
 - D คือ แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* ครั้งที่ 3

1.4 การคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน และชักนำให้เกิดต้น

การคัดเลือกแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน *OsC1* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath บนอาหาร N6D ดัดแปลง ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไทเมนติน 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าการถ่ายยีนทั้ง 3 ครั้ง มีแคลลัสที่สามารถรอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 โดยคิดเป็น 100, 100 และ 40 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) และเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นสูตร MS ดัดแปลง ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และไทเมนติน 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายแคลลัสลงอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงจนกว่าจะได้ต้น (ภาพที่ 23) พบว่ากลุ่มแคลลัสบางกลุ่มมีการเกิดจุดสีม่วง ซึ่งจำนวนกลุ่มแคลลัสที่ถ่ายยีนทั้ง 3 ครั้ง สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ 100, 40 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพัฒนาเป็นต้นได้ทั้งหมด 8 ต้น (ตารางที่ 4 และภาพที่ 23G) และนำต้นที่ได้ตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay (ภาพที่ 22) และเทคนิคพีซีอาร์ แคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน *OsC1* ได้จำนวนน้อยอาจเกิดจากขั้นตอนการล้างแคลลัสเพื่อกำจัดอะโกรแบคทีเรียไม่หมดทำให้มีการปนเปื้อนของอะโกรแบคทีเรียบนกลุ่มแคลลัสที่อยู่บนอาหารคัดเลือก และเกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียอื่นในขั้นตอนการย้ายกลุ่มแคลลัสไปบนอาหารใหม่ นอกจากนี้แคลลัสที่นำมาใช้ถ่ายยีน *OsC1* มีขนาดเล็กและเป็นเอ็มบริโอจินิกแคลลัสน้อย ทำให้พัฒนาไปเป็นต้นได้จำนวนน้อย

การคัดเลือกแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน *OsB2* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath บนอาหาร N6D ดัดแปลง ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไทเมนทิน 150 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าการถ่ายยีนทั้ง 3 ครั้ง มีแคลลัสที่สามารถรอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 โดยคิดเป็น 60, 100 และ 50 ตามลำดับ (ตารางที่ 5) และเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นสูตร MS ดัดแปลง ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และไทเมนทิน 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายแคลลัสลงอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงจนกว่าจะได้ต้น (ภาพที่ 24) พบว่าจำนวนกลุ่มแคลลัสที่ถ่ายยีนทั้ง 3 ครั้ง สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ 100, 55 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพัฒนาเป็นต้นได้ทั้งหมด 70 ต้น (ตารางที่ 5 และภาพที่ 24G) และนำต้นที่ได้ตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay (ภาพที่ 22) และเทคนิคพีซีอาร์

การคัดเลือกแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath บนอาหาร N6D ดัดแปลง ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไทเมนทิน 150 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าการถ่ายยีนทั้ง 4 ครั้ง มีแคลลัสที่สามารถรอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 โดยคิดเป็น 63.33, 100, 100 และ 10 ตามลำดับ (ตารางที่ 6) และเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นสูตร MS ดัดแปลง ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และไทเมนทิน 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายแคลลัสลงอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงจนกว่าจะได้ต้น (ภาพที่ 25) พบว่ากลุ่มแคลลัสบางกลุ่มมีการเกิดจุดสีเขียวและม่วง ซึ่งจำนวนกลุ่มแคลลัสที่ถ่ายยีนทั้ง 4 ครั้ง สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ 100, 100, 20 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพัฒนาเป็นต้นได้ทั้งหมด 61 ต้น (ตารางที่ 6 และภาพที่ 25) และนำต้นที่ได้ตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay (ภาพที่ 22) และเทคนิคพีซีอาร์

การที่แคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน *OsC1* และยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* บางกลุ่มมีการเกิดจุดสีม่วง อาจเกิดจากการได้รับยีนที่ถ่ายเข้าไป ไปเพิ่มการสังเคราะห์แอนโทไซยานินทำให้มีการสะสมของรงควัตถุสีม่วงขึ้น สอดคล้องกับรายงานการถ่ายยีน *ZmC1* ร่วมกับยีน *OsB2* (p35SP::B2/C1) เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Kasalath พบว่าแคลลัสมีการเกิดจุดสีม่วงเนื่องจากเกิดการสะสมแอนโทไซยานิน (Oshima et al., 2019; Saika et al., 2011) การที่แคลลัสเกิดจุดสีม่วงหรือมีการสะสมแอนโทไซยานิน อาจนำไปประยุกต์ใช้ยีน *OsC1* เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือกในขั้นตอนการถ่ายยีนได้

ตารางที่ 4 จำนวนแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน *OsC1* ที่รอดบนอาหารคัดเลือกและพัฒนาไปเป็นต้น

ครั้งที่ ถ่ายยีน	จำนวนกลุ่ม แคลลัส ทั้งหมด	จำนวนกลุ่ม แคลลัสที่รอดบน อาหารคัดเลือกครั้งที่ ที่ 2 ^(a)	จำนวนกลุ่ม แคลลัสที่เกิด จุดเขียวและ ม่วง ^(b)	จำนวนกลุ่ม แคลลัสที่เกิด ยอด ^(c)	ต้นที่ได้รับยีน/ จำนวนต้น ทั้งหมด ^(d)
1	20	20/20 (100)	20/20 (100)	20/20 (100)	2/2 (100)
2	20	20/20 (100)	8/20 (40)	8/20 (40)	4/4 (100)
3	20	8/20 (40)	8/8 (100)	8/8 (100)	2/2 (100)

หมายเหตุ

ตัวเลขในวงเล็บ คือ การแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์

(a) = (จำนวนแคลลัสที่รอด/จำนวนแคลลัสเริ่มต้น) × 100

(b) = (จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียวและม่วง/จำนวนแคลลัสที่รอดบนอาหาร
คัดเลือก ครั้งที่ 2) × 100

(c) = (จำนวนแคลลัสที่เกิดยอด/จำนวนแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2) ×
100

(d) = (จำนวนต้นที่ได้รับยีน *OsC1* /จำนวนต้นทั้งหมด) × 100

ตารางที่ 5 จำนวนแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน *OsB2* ที่รอดบนอาหารคัดเลือกและพัฒนาไปเป็นต้น

ครั้งที่ ถ่ายยีน	จำนวนกลุ่ม แคลลัส ทั้งหมด	จำนวนกลุ่ม แคลลัสที่รอดบน อาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 ^(a)	จำนวนกลุ่ม แคลลัสที่เกิด จุดเขียว ^(b)	จำนวนกลุ่ม แคลลัสที่เกิด ยอด ^(c)	ต้นที่ได้รับยีน/ จำนวนต้น ทั้งหมด ^(d)
1	20	12/20 (60)	12/12 (100)	12/12 (100)	51/58 (87.93)
2	20	20/20 (100)	11/20 (55)	11/20 (55)	6/10 (60)
3	10	5/10 (50)	5/5 (100)	5/5 (100)	2/2 (100)

หมายเหตุ

ตัวเลขในวงเล็บ คือ การแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์

(a) = (จำนวนแคลลัสที่รอด/จำนวนแคลลัสเริ่มต้น) × 100

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

(c) = (จำนวนแคลลัสที่เกิดยอด/จำนวนแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2) × 100

(d) = (จำนวนต้นที่ได้รับยีน *OsB2* /จำนวนต้นทั้งหมด) × 100

ตารางที่ 6 จำนวนแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนร่วมระหว่างยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* รอดบนอาหาร คัดเลือกและพัฒนาไปเป็นต้น

ครั้งที่ ถ่ายยีน	จำนวน กลุ่ม แคลลัส ทั้งหมด	จำนวนกลุ่มแคลลัส ที่รอดบนอาหาร คัดเลือกครั้งที่ 2 ^(a)	จำนวนกลุ่ม แคลลัสที่เกิด จุดเขียวและ ม่วง ^(b)	จำนวนกลุ่ม แคลลัสที่เกิด ยอด ^(c)	ต้นที่ได้รับยีน รวม/จำนวน ต้นทั้งหมด ^(d)
1	30	19/30 (63.33)	19/19 (100)	19/19 (100)	3/36 (8.33)
2	10	10/10 (100)	10/10 (100)	10/10 (100)	0/4 (0)
3	10	10/10 (100)	2/10 (20)	2/10 (20)	2/11 (18.18)
4	20	2/20 (10)	2/2 (100)	2/2 (100)	5/10 (50)

หมายเหตุ

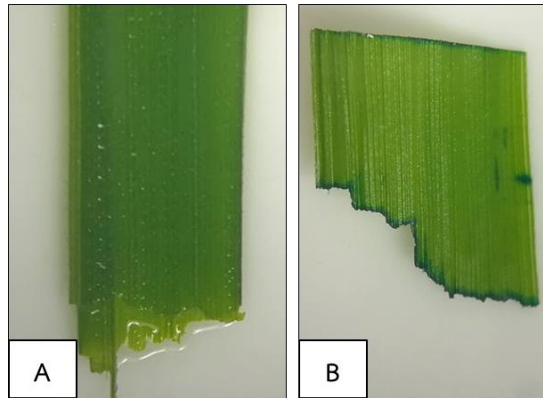
ตัวเลขในวงเล็บ คือ การแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์

(a) = (จำนวนแคลลัสที่รอด/จำนวนแคลลัสเริ่มต้น) × 100

(b) = (จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียวและม่วง/จำนวนแคลลัสที่รอดบนอาหาร
คัดเลือก ครั้งที่ 2) × 100

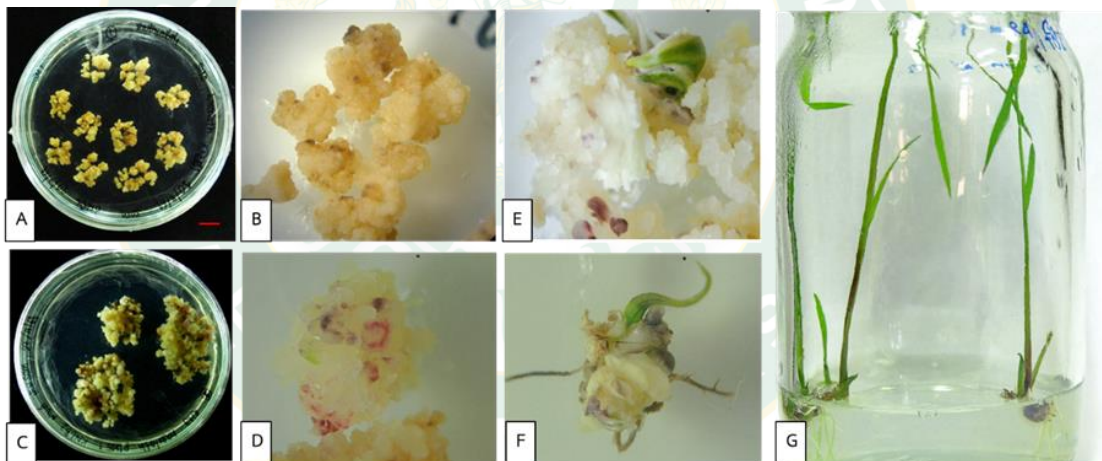
(c) = (จำนวนแคลลัสที่เกิดยอด/จำนวนแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2) ×
100

(d) = (จำนวนต้นที่ได้รับยีนรวม/จำนวนต้นทั้งหมด) × 100



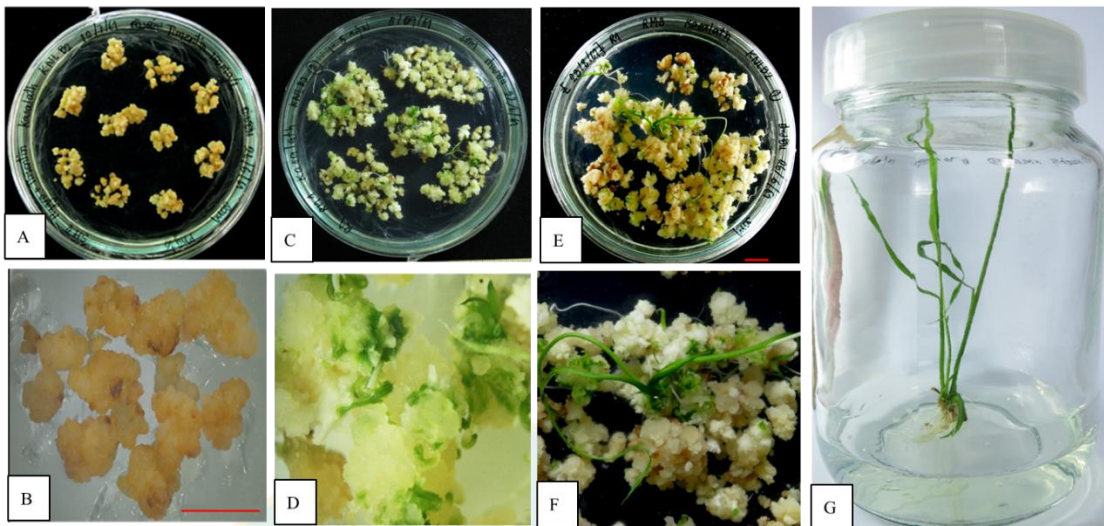
ภาพที่ 22 การตรวจสอบใบของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยวิธี Gus assay

หมายเหตุ A คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน
B คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน



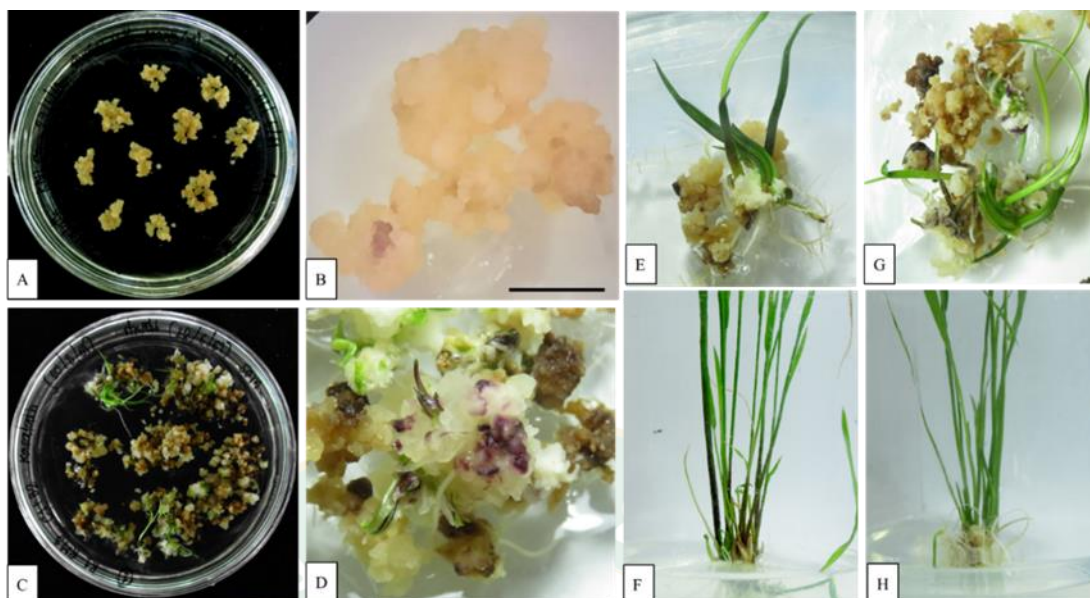
ภาพที่ 23 การคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน *O_sC1* บนอาหารคัดเลือกและการชักนำให้เกิดต้น

หมายเหตุ A-B คือ แคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกอายุ 4 สัปดาห์
C-D คือ แคลลัสที่อยู่บนอาหารชักนำให้เกิดยอดอายุ 8 สัปดาห์ และมีจุดสีม่วง
E-F คือ แคลลัสที่พัฒนาไปเป็นยอดและเป็นต้นที่มีสีม่วง
G คือ แคลลัสที่พัฒนาไปเป็นต้นที่มีสีโคนต้นสีม่วง



ภาพที่ 24 การคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน *OsB2* บนอาหารคัดเลือกและการชักนำให้เกิดต้น

- หมายเหตุ
- A-B คือ แคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกอายุ 4 สัปดาห์
 - C-D คือ แคลลัสที่เจริญบนอาหารชักนำให้เกิดยอดอายุ 8 สัปดาห์
 - E-F คือ แคลลัสที่พัฒนาไปเป็นยอด
 - G คือ ต้นข้าวที่มีการพัฒนาของรากและต้นทานสารปฏิชีวนะไฮโกลมัซิน



ภาพที่ 25 การคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนร่วมของยีน *OsC1* และยีน *OsB2* บนอาหาร
คัดเลือกและการชักนำให้เกิดต้น

หมายเหตุ A-B คือ แคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกอายุ 4 สัปดาห์
C-D คือ แคลลัสที่อยู่บนอาหารชักนำให้เกิดยอดอายุ 8 สัปดาห์
E-F คือ แคลลัสที่พัฒนาไปเป็นยอดและเป็นต้นที่มีสีม่วง
G-H คือ แคลลัสที่พัฒนาไปเป็นยอดและเป็นต้นที่มีสีเขียว

1.5 การวิเคราะห์ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์

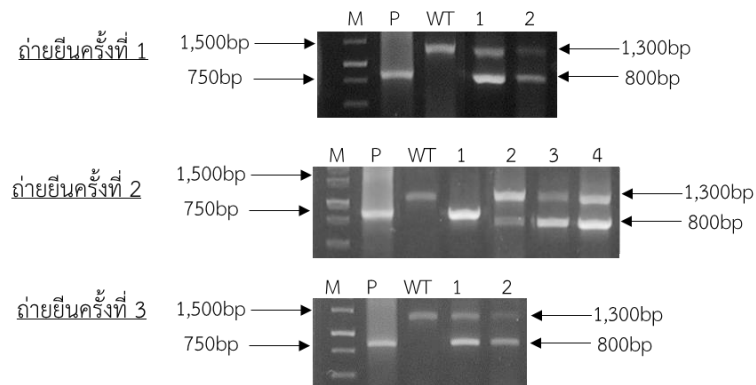
การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใบของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนและใบของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับยีน *OsC1*, *OsB2* และยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* ด้วยวิธี mCTAB (ภาพที่ 26) พบว่าได้ดีเอ็นเอขนาดใหญ่เหมาะสำหรับนำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *OsC1* จากการถ่ายยีนทั้ง 3 ครั้ง จำนวน 8 ต้น วิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่จำเพาะต่อยีน *OsC1* พบว่ามีต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *OsC1* จำนวน 8 ต้น คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 27)

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *OsB2* จากการถ่ายยีนทั้ง 3 ครั้ง จำนวน 70 ต้น วิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่จำเพาะต่อยีน *OsB2* พบว่ามีต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *OsB2* จำนวน 59 ต้น คิดเป็น 84.28 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 28)

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* จากการถ่ายยีนทั้ง 4 ครั้ง จำนวน 61 ต้น วิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่จำเพาะต่อยีน *OsC1* และ *OsB2* พบว่ามีต้นข้าวที่ได้รับยีน *OsC1* เพียงยีนเดียวจำนวน 37 ต้น ได้รับยีน *OsB2* เพียงยีนเดียวจำนวน 9 ต้น ได้รับยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* จำนวน 10 ต้น และไม่ได้รับยีนจำนวน 5 ต้น คิดเป็น 57.37, 14.75, 16.39 และ 11.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 7 และภาพที่ 29) การที่ข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ผ่านการถ่ายยีนร่วมระหว่างยีน *OsC1* และยีน *OsB2* มีต้นที่ได้รับยีน *OsC1* จำนวนมากที่สุด อาจเนื่องจากขนาดของยีน *OsC1* มีขนาดเล็กกว่ายีน *OsB2*



ภาพที่ 26 จีโนมิกดีเอ็นเอของต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน *OsC1*, *OsB2* และยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* M: 1 kb DNA ladder



ภาพที่ 27 การวิเคราะห์ต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน *OsC1* ครั้งที่ 1, 2 และ 3 จำนวน 2, 4 และ 2 ต้น ตามลำดับ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *OsC1* เพื่อตรวจสอบต้นที่ได้รับยีน *OsC1* ที่ถ่ายเข้าไป

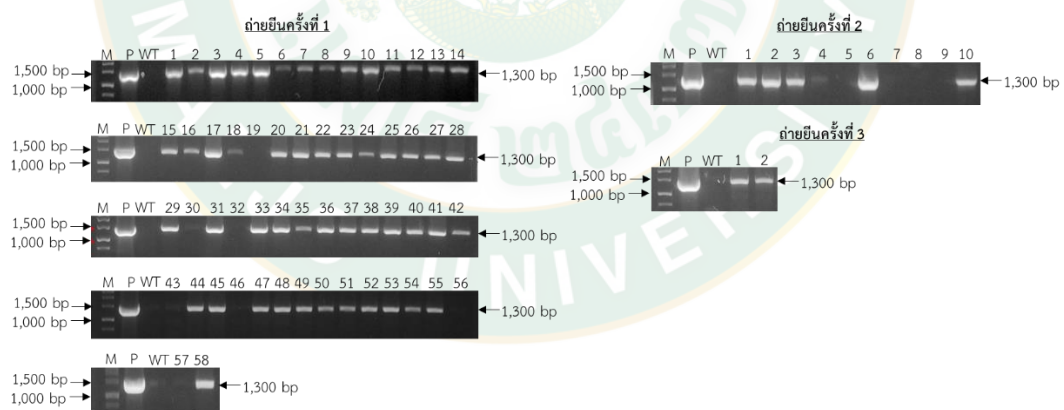
หมายเหตุ

M คือ 1 kb DNA ladder,

WT คือ ข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน

P คือ plasmid p2CA ที่มียีน *OsC1*

หมายเลข 1-4 คือ ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีน *OsC1*



ภาพที่ 28 การวิเคราะห์ต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน *OsB2* ครั้งที่ 1, 2 และ 3 จำนวน 58, 10 และ 2 ต้น ตามลำดับ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *OsB2* เพื่อตรวจสอบต้นที่ได้รับยีน *OsB2* ที่ถ่ายเข้าไป

หมายเหตุ

M คือ 1 kb DNA ladder

WT คือ ข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน

P คือ plasmid p2CA ที่มียีน *OsB2*

หมายเลข 1-58 คือ ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีน *OsB2*



ภาพที่ 29 การวิเคราะห์ต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* ครั้งที่ 1, 2, 3 และ 4 จำนวน 36, 4, 11 และ 10 ต้น ตามลำดับ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *OsC1* และ *OsB2* เพื่อตรวจสอบต้นที่ได้รับยีนร่วมกัน คือ ยีน *OsC1* และ *OsB2* ที่ถ่ายเข้าไป

หมายเหตุ

M คือ 1 kb DNA ladder

WT คือ ข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน

P คือ plasmid p2CA ที่มียีน *OsC1* และ *OsB2*

หมายเลข 1-36 คือ ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2*

ตารางที่ 7 การตรวจสอบต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* รุ่น T_0 โดยเทคนิคพีซีอาร์

ครั้งที่ ถ่ายยีน	จำนวน ต้น ทั้งหมด	จำนวนต้น ที่มียีน <i>OsC1</i>	จำนวนต้น ที่มียีน <i>OsB2</i>	จำนวนต้นที่มี ยีน <i>OsC1</i> ร่วมกับ <i>OsB2</i>	จำนวนต้นที่ ไม่ได้รับยีน	เปอร์เซ็นต์ต้นที่ ได้รับยีนรวม
1	36	19	9	3	5	3/36 (8.33)
2	4	4	0	0	0	0/4 (0)
3	11	7	0	2	2	2/11 (18.18)
4	10	5	0	5	0	5/10 (50)
รวม	61	35/61 (57.37)	9/61 (14.75)	10/61 (16.39)	7/61 (11.49)	10/61 (16.39)

1.6 การศึกษาฟีโนไทป์ของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรม

การศึกษาฟีโนไทป์ของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนและต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน ฟีโนไทป์ของต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน *OsC1* พบว่า ต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน *OsC1* มีฟีโนไทป์ดังนี้ ต้นข้าวมีลักษณะกาบใบ (leaf sheath) ข้อ (node) เชี่ยวกันแมลง (auricle) ปลายกลีบดอกใหญ่ (apiculus) และหางข้าว (awn) เป็นสีแดง นอกจากนี้ยังพบว่า เกสรตัวเมีย (stigma) เป็นสีม่วง เมื่อติดเมล็ดอ่อนจะมีสีเขียว เมล็ดแก่มีสีแดงเหมือนกับต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (ภาพที่ 30) การที่กาบใบ (leaf sheath) ข้อ (node) เชี่ยวกันแมลง (auricle) ปลายกลีบดอกใหญ่ (apiculus) และหางข้าว (awn) ของข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *OsC1* มีสีม่วง เนื่องจากเดิม ยีน *OsC1* ไม่ทำงานในข้าวพันธุ์ Kasalath (Oshima et al., 2019; Sun et al., 2018) ฟีโนไทป์ที่เกิดขึ้นอาจเนื่องจากยีน *OsC1* เป็นยีนควบคุมที่เป็นรหัสของโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Saitoh et al., 2004) และยีน *OsC1* ยังควบคุมการสร้างสีในข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ (Choudhury et al., 2014) โดยยีน *OsC1* ไปควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ยกเว้นเยื่อหุ้มเมล็ด (Kim et al., 2018; Zheng et al., 2019) เช่น ยีน *OsC1* ทำให้มีสีหรือการสะสมแอนโทไซยานินในเนื้อเยื่อปลายกลีบดอกใหญ่ (apiculus) และกาบใบ (leaf sheath) (Saitoh et al., 2004) นอกจากนี้ Kim et al (2018) รายงานว่าเมื่อถ่ายยีน *OsC1* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่มียีน *OsDFR* และยีนกลุ่ม Myb จึงทำให้กาบใบ (leaf sheath) ข้อ (node) เชี่ยวกันแมลง (auricle) ปลายกลีบดอกใหญ่ (apiculus) และหางข้าว (awn) เกิดสีม่วง ซึ่งการเกิดสีบริเวณกาบใบเมื่อต้นข้าวได้รับยีน *OsC1* ยังสอดคล้องกับ

(Chin et al., 2016) ที่ศึกษาการกลายพันธุ์ของข้าวสีม่วง พบการขาดหายไป 10 และ 3 bp ใน R2R3 Myb domain ของยีน *OsC1* ในข้าวที่มีกาบใบสีเขียว แต่ไม่พบในข้าวที่มีกาบใบสีม่วง

การศึกษาลักษณะของต้นข้าวที่ได้รับยีน *OsB2* ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางฟีโนไทป์ ด้านกายภาพจากการตรวจสอบลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ กาบใบ (leaf sheath) ข้อ (node) เขี้ยวกันแมลง (auricle) ปลายกลีบดอกใหญ่ (apiculus) หางข้าว (awn) และเกสรตัวเมีย (stigma) ส่วนลักษณะที่แตกต่าง คือ เมล็ดอ่อนและเมล็ดแก่จะมีการสะสมรงควัตถุสีม่วง แต่ในข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนนั้นมีเมล็ดสีเขียวในระยะเมล็ดอ่อน และมีสีแดงในระยะเมล็ดแก่ (ภาพที่ 30) การที่ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *OsB2* มีสีม่วงอาจเกิดจากยีน *OsB2* สามารถกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว โดยไปกระตุ้นยีนโครงสร้างให้มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น (Hu et al., 1996; Sakamoto et al., 2001) นอกจากนี้ Kim et al. (2018) รายงานว่ายีน *OsB2* มีหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว เนื่องจากข้าวแดงพันธุ์ Kasalath มียีน *DFR* ที่ทำหน้าที่อยู่แล้ว (Furukawa et al., 2007) แต่ยีน *OsC1* ไม่ทำงาน (Oshima et al., 2019; Sun et al., 2018) เมื่อถ่ายยีน *OsB2* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath แล้วทำให้เมล็ดเกิดสีม่วงอาจเกิดจากการทำงานร่วมกันของยีน *OsB2* ที่ถ่ายเข้าไปกับยีนอื่น (endogenous gene) ที่สร้างทรานสคริปชันแฟกเตอร์ชนิด Myb ในจีโนมของข้าวพันธุ์ Kasalath

การศึกษาลักษณะของต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* พบว่าต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนร่วมมีฟีโนไทป์ดังนี้ ต้นข้าวมีลักษณะกาบใบ (leaf sheath) ข้อ (node) เขี้ยวกันแมลง (auricle) ปลายกลีบดอกใหญ่ (apiculus) และหางข้าว (awn) เป็นสีแดง นอกจากนี้ยังพบว่า เกสรตัวเมีย (stigma) เป็นสีม่วง เมื่อติดเมล็ดอ่อนจะมีสีเขียวและด้านข้างเป็นแถบสีม่วง เมื่อเมล็ดแก่จะมีสีแดงและแถบด้านข้างสีม่วง (ภาพที่ 30) การที่ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* มีสีม่วงที่เมล็ดและเนื้อเยื่อต่าง ๆ อาจเกิดจากยีน *OsB2* สามารถกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว โดยไปกระตุ้นยีนโครงสร้างให้มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น (Hu et al., 1996; Sakamoto et al., 2001) และยีน *OsC1* เป็นยีนควบคุมที่เป็นรหัสของโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และควบคุมการสร้างสีในข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ (Choudhury et al., 2014; Saitoh et al., 2004) เมื่อถ่ายยีน *OsB2* ร่วมกับยีน *OsC1* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath แล้วทำให้เมล็ดและเนื้อเยื่อต่าง ๆ เกิดสีม่วง อาจเกิดจากการทำงานร่วมกันของยีน *OsC1* และ *OsB2* ที่ถ่ายเข้าไปกับยีนอื่น (endogenous gene) ที่สร้างทรานสคริปชันแฟกเตอร์ชนิด Myb ในจีโนมของข้าวพันธุ์ Kasalath



ภาพที่ 30 ฟีนোটป์ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₀

หมายเหตุ

A คือระยะการเจริญเติบโต

B คือระยะสืบพันธุ์

WT คือ ต้นข้าวที่ไม่ได้ผ่านการถ่ายยีน

OsB2 คือ ต้นข้าวที่ได้รับยีน OsB2

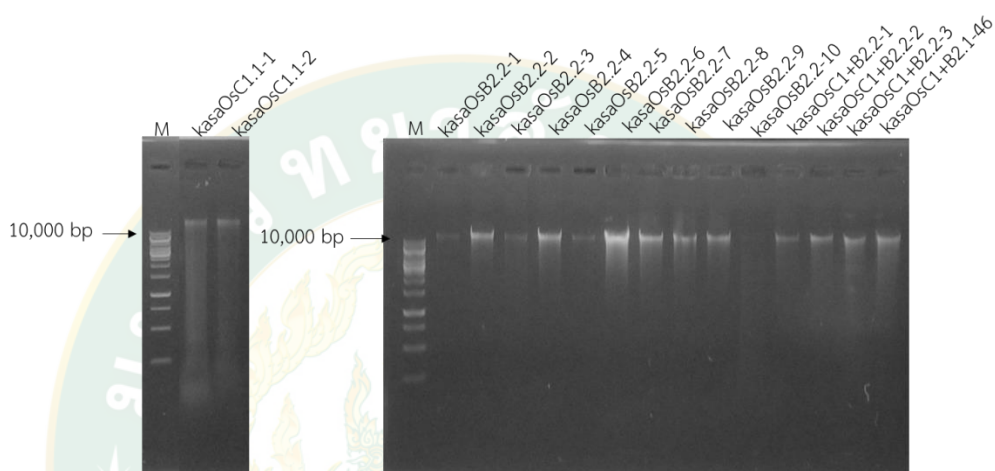
OsC1 คือ ต้นข้าวที่ได้รับยีน OsC1

OsC1+OsB2 คือ ต้นข้าวที่ได้รับยีน OsC1 ร่วมกับยีน OsB2

2. การทดสอบการกระจายตัวของยีนในต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากต้นอ่อนข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁

การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใบของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนและใบของข้าวพันธุ์ Kasalath ได้รับยีน *OsC1*, *OsB2* และยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* รุ่น T₁ ด้วยวิธี mCTAB พบว่าได้ดีเอ็นเอขนาดใหญ่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 31 จีโนมิกดีเอ็นเอของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁ ที่ได้รับยีน *OsC1*, *OsB2* และยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2*

หมายเหตุ M คือ 1 kb DNA ladder

2.2 การทดสอบการกระจายตัวของยีนในต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁ โดยวิธี GUS assay และเทคนิคพีซีอาร์

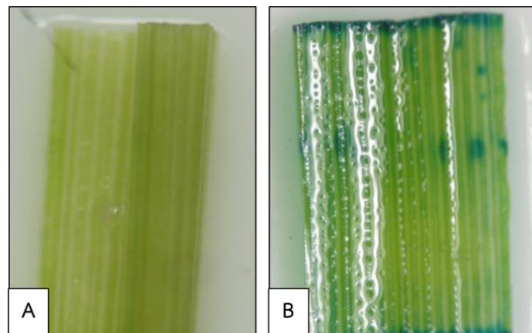
การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนในต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁ ของข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁ ต้น KasaOsC1.2-4 โดยวิธี GUS assay พบว่าจากจำนวน 30 ต้น พบต้นที่มีการแสดงออกของยีน *gus* คือมีสีฟ้าบริเวณบาดแผลของเนื้อเยื่อใบจำนวน 27 ต้น และต้นที่ไม่เกิดสีฟ้าจำนวน 3 ต้น จากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *OsC1* พบว่าจากต้น KasaOsC1.2-4 ทั้งหมดจำนวน 30 ต้น มีต้นข้าวที่ได้รับยีน *OsC1* จำนวน 27 ต้น โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาดที่คาดหวังคือ ประมาณ 800 bp (ภาพที่ 33 และตารางที่ 9) เมื่อวิเคราะห์ไคสแควร์ได้ค่า p-value เท่ากับ 0.057 คือ ต้น KasaOsC1.2-4 มีผลการทดลองเป็นไปตามสมมุติฐานที่ว่ามีการกระจายตัวของยีน *gus* (ภาพที่ 32) ไปสู่รุ่นลูก T₁ เป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ มี

อัตราส่วน 3 : 1 (ตารางที่ 8) ซึ่งผลวิเคราะห์การถ่ายทอดยีน *OsC1* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์นั้นสอดคล้องกับผลการตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay

การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนในต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 ด้วยวิธี GUS assay ของต้น KasaOsB2.1-8 พบว่าจากจำนวน 30 และ 27 ต้น มีต้นที่มีการมีการแสดงออกของยีน *gus* คือมีสีฟ้าบริเวณบาดแผลของเนื้อเยื่อใบจำนวน 27 ต้นและต้นที่ไม่เกิดสีฟ้าจำนวน 3 จากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *OsB2* พบว่าจากต้น KasaOsB2.1-8 ทั้งหมดจำนวน 30 ต้น มีต้นข้าวที่ได้รับยีน *OsB2* จำนวน 27 ต้น โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาดที่คาดหวังคือ ประมาณ 1,300 bp (ภาพที่ 34 และตารางที่ 9) โดยวิเคราะห์โคสแควร์ได้ค่า p-value เท่ากับ 0.057 แสดงว่าต้น KasaOsB2.1-8 มีผลการทดลองเป็นไปตามสมมุติฐานที่ว่ามีการกระจายตัวของยีน *gus* ไปสู่รุ่นลูก T_1 เป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ มีอัตราส่วน 3 : 1 (ตารางที่ 8) ซึ่งผลวิเคราะห์การถ่ายทอดยีน *OsB2* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์นั้นสอดคล้องกับผลการตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay

อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบการกระจายตัวของยีนโดยมีสมมุติฐานการแทรกตัวของยีน 2 ตำแหน่ง ซึ่งจะมีอัตราส่วนเป็น 15 : 1 สำหรับการทดสอบด้วยวิธี GUS assay (ฟ้า : ไม่ฟ้า) และเทคนิคพีซีอาร์ (มียีน : ไม่มียีน) พบว่าต้น KasaOsC1.2-4 และ KasaOsB2.1-8 ได้ค่า p-value เท่ากับ 0.396 (ตารางที่ 8) แสดงว่าต้น KasaOsC1.2-4 และ KasaOsB2.1-8 ไม่แตกต่างจากทฤษฎีของการแทรกตัวของยีน 2 ตำแหน่ง ดังนั้นในการทดลองนี้ ต้น KasaOsC1.2-4 และ KasaOsB2.1-8 ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการแทรกตัวของยีน 1 หรือ 2 ตำแหน่ง โดยอาจจะต้องการทดสอบจำนวนตัวอย่างมากกว่านี้จึงจะสรุปได้

การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนในต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 ด้วยวิธี GUS assay ของต้น kasaOsC1+OsB2.1-28 พบว่าจากจำนวน 40 ต้น มีต้นที่มีการมีการแสดงออกของยีน *gus* คือ มีสีฟ้าบริเวณบาดแผลของเนื้อเยื่อใบจำนวน 37 ต้น และต้นที่ไม่เกิดสีฟ้าจำนวน 3 จากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *OsB2* และ *OsC1* พบว่าจากต้น kasaOsC1+OsB2.1-28 ทั้งหมดจำนวน 40 ต้น ของต้น ต้น kasaOsC1+OsB2.1-28 พบขนาดที่คาดหวังคือ ประมาณ 800 bp แสดงว่ามีต้นข้าวที่ได้รับยีน *OsC1* จำนวน 8 ต้น และพบขนาดที่คาดหวังคือ ประมาณ 1,300 bp แสดงว่ามีต้นข้าวที่ได้รับยีน *OsB2* จำนวน 4 ต้น ที่มีทั้งสองยีนร่วมกันจำนวน 25 ต้น และต้นไม่มียีนจำนวน 3 ต้น จากทั้งหมดจำนวน 40 (ตารางที่ 10) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay เมื่อวิเคราะห์โคสแควร์ได้ค่า p-value เท่ากับ 0.5632 พบว่ายอมรับสมมุติฐาน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการกระจายตัวของยีนไปสู่รุ่นลูก T_1 เป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ มีอัตราส่วน 9 : 3 : 3 : 1 (ภาพที่ 35 และตารางที่ 10) แสดงว่ามีการแทรกตัวของยีน 2 ตำแหน่ง



ภาพที่ 32 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS assay ในต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T₁

หมายเหตุ

A คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน

B คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่มีการแสดงออกของยีน *gus*

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบการกระจายตัวของยีน *gus* โดยวิธี GUS assay ในข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁

ต้น	จำนวนต้นทั้งหมด	ต้น T ₁ ที่เกิดสีฟ้า	ต้น T ₁ ที่ไม่เกิดสีฟ้า	สมมุติฐาน* ฟ้า:ไม่ฟ้า	χ^2	P-value
KasaOsC1.2-4	30	27	3	3:1	3.600	0.057 ^{ns}
				15:1	0.720	0.396 ^{ns}
KasaOsB2.1-8	30	27	3	3:1	3.600	0.057 ^{ns}
				15:1	0.720	0.396 ^{ns}
KasaOsC1+B21-28	40	37	3	15:1	0.107	0.744 ^{ns}

หมายเหตุ ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

* สมมุติฐาน คือ อัตราส่วนลูกรุ่น T₁ ฟ้า:ไม่ฟ้า = 3:1 และอัตราส่วนลูกรุ่น T₁ ฟ้า:ไม่ฟ้า = 15:1

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบการกระจายตัวของยีน *OsC1* และ *OsB2* โดยวิธีพีซีอาร์ในข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁

ต้น	จำนวนต้นทั้งหมด	ต้นที่ได้รับยีน	ต้นที่ไม่ได้ รับยีน	สมมุติฐาน* มียีน:ไม่มียีน	χ^2	P-value
KasaOsC1.2-4	30	27	3	3:1	3.600	0.057 ^{ns}
				15:1	0.720	0.396 ^{ns}
KasaOsB2.1-8	30	27	3	3:1	3.600	0.057 ^{ns}
				15:1	0.720	0.396 ^{ns}

หมายเหตุ ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

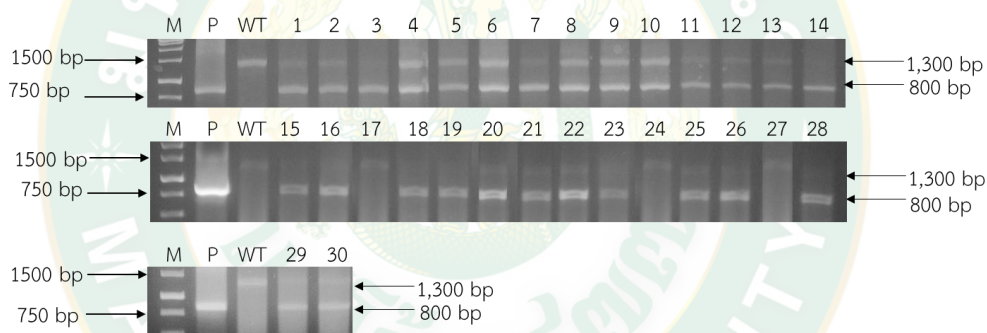
* สมมุติฐาน คือ อัตราส่วนลูกรุ่น T₁ ที่มียีน:ไม่มียีน = 3:1 และอัตราส่วนลูกรุ่น T₁ ที่มียีน:ไม่มียีน = 15:1

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบการกระจายตัวของยีน *OsC1* และ *OsB2* โดยวิธีพีซีอาร์ในข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 ที่ได้รับยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2*

ต้น T_0	จำนวนต้น T_1 ทั้งหมด	จำนวนต้น มียีนรวม	จำนวนต้นที่มี มียีน <i>OsC1</i>	จำนวนต้นที่มี มียีน <i>OsB2</i>	ไม่มียีน	χ^2	p-value
KasaOsC1 +OsB2.1-28	40	25	8	4	3	2.044	0.5632 ^{ns}

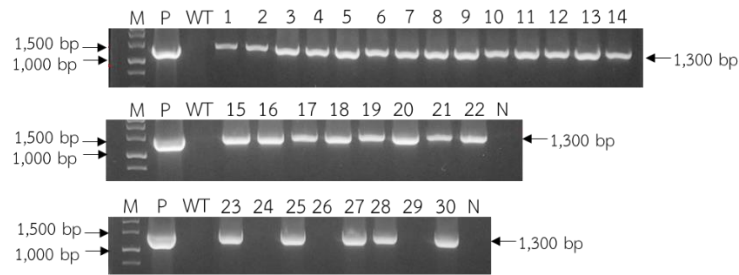
หมายเหตุ ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

สมมุติฐาน คือ อัตราส่วนลูกรุ่น T_1 คือ ลูกที่ได้รับทั้งยีน *OsC1* และ *OsB2* (B_C_) : ลูกที่ได้รับยีน *OsC1* เพียงยีนเดียวเท่านั้น (bbC_) : ลูกที่ได้รับยีน *OsB2* เพียงยีนเดียวเท่านั้น (B_cc) : ลูกที่ไม่ได้รับยีน (bbcc) = 9:3:3:1



ภาพที่ 33 การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีน *OsC1* ของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 (ต้นที่ 1-30) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *OsC1*

หมายเหตุ M คือ 1 kb DNA ladder
WT คือ ข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน
P คือ plasmid p2CA ที่มียีน *OsC1*



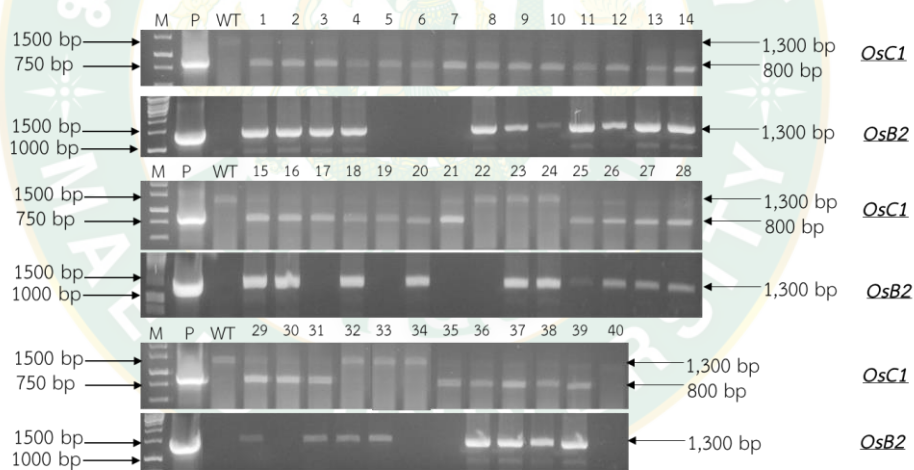
ภาพที่ 34 การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีน *OsB2* ของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T_1 (ต้นที่ 1-30) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน

หมายเหตุ

M คือ 1 kb DNA ladder

WT คือ ข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน

P คือ plasmid p2CA ที่มียีน *OsB2*



ภาพที่ 35 การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* ของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 (ต้นที่ 1-30) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *OsC1* และ *OsB2*

หมายเหตุ

M คือ 1 kb DNA ladder

WT คือ ข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน

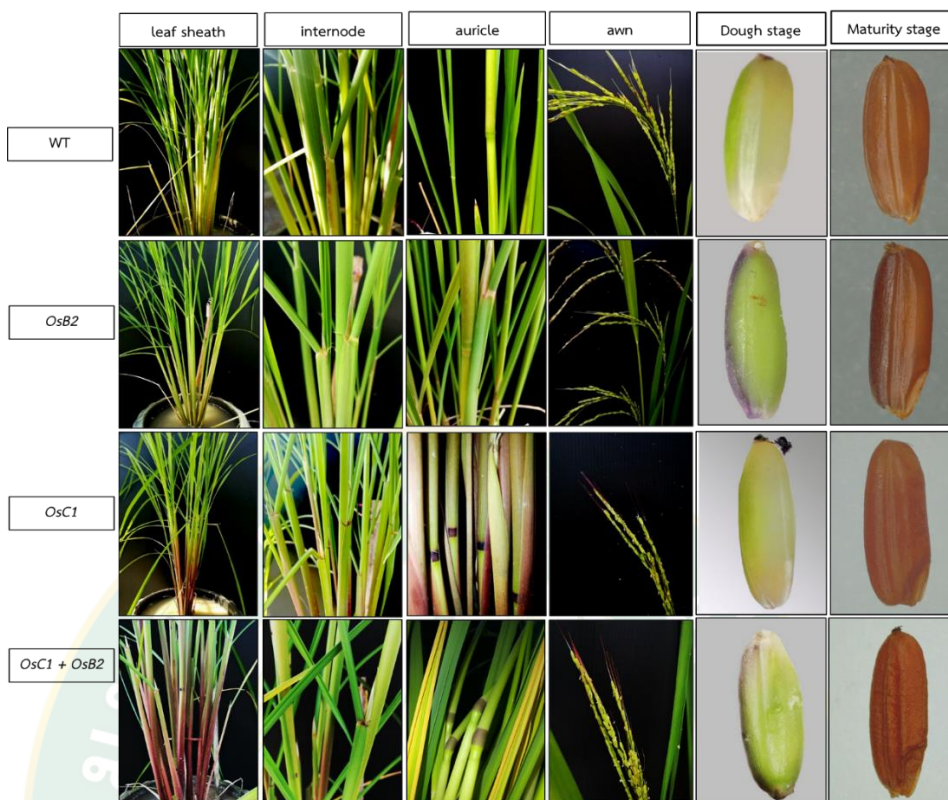
P คือ plasmid p2CA ที่มียีน *OsC1* และ *OsB2*

2.3 การศึกษาฟีโนไทป์ของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1

การศึกษาฟีโนไทป์ของต้นข้าวที่ได้รับยีน *OsC1* รุ่น T_1 พบว่า ต้นข้าวที่ได้รับยีน *OsC1* มีฟีโนไทป์ดังนี้ ต้นข้าวมีลักษณะกาบใบ (leaf sheath) ข้อ (node) เขี้ยวกันแมลง (auricle) ปลายกลีบดอกใหญ่ (apiculus) และหางข้าว (awn) เป็นสีแดง นอกจากนี้ยังพบว่า เกสรตัวเมีย (stigma) เป็นสีม่วง เมื่อติดเมล็ดอ่อนจะมีสีเขียวเมล็ดแก่มีสีแดงเหมือนกับต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ซึ่งลักษณะที่พบคล้ายกับต้นและเมล็ดจากต้นที่ได้รับยีน *OsC1* รุ่น T_0 (ภาพที่ 36) เนื่องจากมีการถ่ายทอดยีน *OsC1* ไปสู่รุ่นลูก

การศึกษาฟีโนไทป์ของต้นข้าวที่ได้รับยีน *OsB2* ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางฟีโนไทป์ด้านกายภาพจากการตรวจสอบลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ กาบใบ (leaf sheath) ข้อ (node) เขี้ยวกันแมลง (auricle) ปลายกลีบดอกใหญ่ (apiculus) หางข้าว (awn) และเกสรตัวเมีย (stigma) ส่วนลักษณะที่แตกต่าง คือ เมล็ดอ่อนและเมล็ดแก่จะมีการสะสมรงควัตถุสีม่วง แต่ในข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนนั้นมีสีเขียวในระยะเมล็ดอ่อนและมีสีแดงในระยะเมล็ดแก่ การที่เมล็ดของข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *OsB2* มีสีม่วง ซึ่งลักษณะที่พบคล้ายกับต้นที่ผ่านการถ่ายยีน *OsB2* รุ่น T_0 (ภาพที่ 36) เนื่องจากมีการถ่ายทอดยีน *OsB2* ไปสู่รุ่นลูก

การศึกษาฟีโนไทป์ของต้นข้าวที่ได้รับยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* พบว่า ต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนร่วมมีฟีโนไทป์ดังนี้ ต้นข้าวมีลักษณะกาบใบ (leaf sheath) ข้อ (node) เขี้ยวกันแมลง (auricle) ปลายกลีบดอกใหญ่ (apiculus) และหางข้าว (awn) เป็นสีแดง นอกจากนี้ยังพบว่า เกสรตัวเมีย (stigma) เป็นสีม่วง เช่นเดียวกับต้นที่ได้รับยีน *OsC1* เมื่อติดเมล็ดอ่อนจะมีสีเขียวและด้านข้างเป็นแถบสีม่วง เมื่อเมล็ดแก่จะมีสีแดงและแถบด้านข้างสีม่วงเช่นเดียวกับต้นที่ได้รับยีน *OsB2* ซึ่งลักษณะที่พบคล้ายกับต้นผ่านการถ่ายยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* รุ่น T_0 (ภาพที่ 36) เนื่องจากมีการถ่ายทอดยีน *OsC1* และ *OsB2* ไปสู่รุ่นลูก



ภาพที่ 36 พิโนไทป์ของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน และได้รับยีน *OsC1*, *OsB2* และได้รับยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* รุ่น T₁

หมายเหตุ WT คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน

3. การสร้างข้าวลูกผสมที่มียีน *OsC1* และยีน *OsB2*

3.1 การคัดเลือกต้นพันธุ์รับและพันธุ์ให้

การคัดเลือกต้นพันธุ์รับและพันธุ์ให้โดยคัดเลือกจากต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับยีน *OsC1* และ *OsB2* ซึ่งได้ต้นที่มียีน *OsC1* คือ ต้น KasaC1.1-2 โดยข้าวตัดแปลงพันธุ์กรรมที่ได้รับยีน *OsC1* จะมีบริเวณของโคนต้นเป็นสีแดงและใบเป็นสีเขียว และต้นที่มียีน *OsB2* คือ ต้น KasaB2.1-8 จะมีลักษณะต้นสีเขียวทั้งต้นเหมือนกับลักษณะของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (ภาพที่ 37 และ 38)



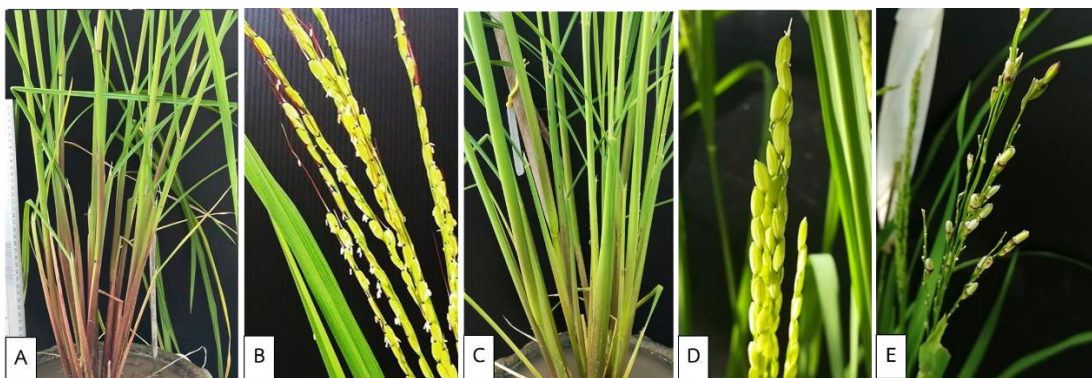
ภาพที่ 37 พิโนไทป์ของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมพันธุ์ Kasalath อายุ 15 วัน

หมายเหตุ A คือ ต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน
B-C คือ ต้นข้าวที่ได้รับยีน *OsB2*
D-E คือ ต้นข้าวที่ได้รับยีน *OsC1*

3.2 การผสมข้าว

การผสมข้าวดัดแปลงพันธุกรรมของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่มียีน *OsC1* และต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่มียีน *OsB2* พบว่า คู่ผสมที่ ต้นที่มียีน *OsC1* เป็นต้นแม่และต้นที่มียีน *OsB2* เป็นต้นพ่อได้ลูกผสมรุ่น F_1 จำนวน 59 เมล็ด ซึ่งได้จาก 3 คู่ คือ KasaC1.1-2.T₁-4 ผสมกับ KasaB2.1-8.T₁-15 ได้จำนวน 37 เมล็ด KasaC1.1-2.T₁-9 ผสมกับ KasaB2.1-8.T₁-11 ได้จำนวน 7 เมล็ด และ KasaC1.1-2.T₁-4 ผสมกับ KasaB2.1-8.T₁-9 ได้จำนวน 15 เมล็ด (ตารางที่ 11)

การผสมข้าวของต้นคู่ผสมที่มียีน *OsB2* เป็นต้นแม่และต้นที่มียีน *OsC1* เป็นต้นพ่อได้ลูกผสมรุ่น F_1 จำนวน 6 เมล็ด ซึ่งได้จาก 2 คู่ คือ KasaB2.1-8.T₁-15 ผสมกับ KasaC1.1-2.T₁-4 ได้จำนวน 5 เมล็ด และ KasaB2.1-8.T₁-17 ผสมกับ KasaC1.1-2.T₁-13 ได้จำนวน 1 เมล็ด (ตารางที่ 11)



ภาพที่ 38 พิโนไทป์ของข้าวพันธุ์ให้ และพันธุ์รับ

หมายเหตุ A-B คือ พิโนไทป์ต้นข้าวพันธุ์รับที่ได้รับยีน *OsC1*
 C-D คือ พิโนไทป์ต้นข้าวพันธุ์ให้ที่ได้รับยีน *OsB2*
 E คือ เมล็ดข้าวลูกผสมรุ่น F_1 บนต้นแม่ที่ได้รับยีน *OsC1*

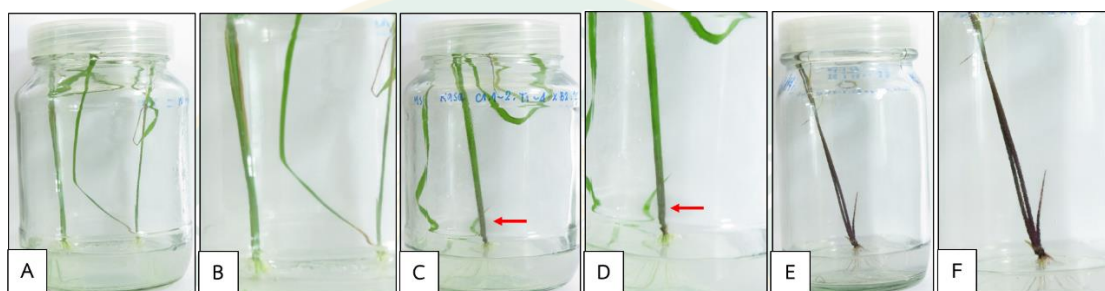
ตารางที่ 11 คู่ผสมระหว่างต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่มียีน *OsC1* และ *OsB2*

คู่ผสมที่	ต้นแม่	ต้นพ่อ	จำนวนเมล็ดลูกรุ่น F_1
1	KasaC1.1-2.T ₁ -4	KasaB2.1-8.T ₁ -15	37
2	KasaC1.1-2.T ₁ -9	KasaB2.1-8.T ₁ -11	7
3	KasaC1.1-2.T ₁ -4	KasaB2.1-8.T ₁ -9	15
4	KasaB2.1-8.T ₁ -15	KasaC1.1-2.T ₁ -4	5
5	KasaB2.1-8.T ₁ -17	KasaC1.1-2.T ₁ -13	1

3.3 การตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay และเทคนิคพีซีอาร์ในข้าวลูกผสมรุ่น F_1

เมื่อนำเมล็ดของต้น F_1 จากคู่ผสมที่ 1 KasaC1.1-2.T₁-4 ผสมกับ KasaB2.1-8.T₁-15 จำนวน 22 เมล็ด มาเพาะเลี้ยงบนอาหารพบว่าพิโนไทป์ที่ได้มี 2 แบบ คือ ต้นที่มีกาบใบสีแดง จำนวน 7 ต้น และต้นที่มีสีม่วงทั้งต้น จำนวน 15 ต้น จากนั้นนำเนื้อเยื่อใบจาก 22 ต้น มาตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay พบว่ามีการเกิดสีฟ้าบริเวณบาดแผลในเนื้อเยื่อใบของต้น F_1 แต่ไม่พบการเกิดสีฟ้าในตัวอย่างต้น Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (ภาพที่ 40) จากนั้นทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใบของต้นข้าวลูกผสม F_1 จำนวนทั้งหมด 22 ต้น และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *OsC1* และ *OsB2* พบว่า มีต้นที่มียีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* จำนวน 15

ต้น (ภาพที่ 41) คือ ต้นที่มีฟีโนไทป์สีม่วงทั้งต้น และต้นที่มียีน *OsC1* เพียงยีนเดียวจำนวน 7 ต้น คือ ต้นที่มีฟีโนไทป์กาบใบสีแดง ต้นที่มีกาบใบสีแดงอาจเกิดจากการผสมตัวเองของต้นแม่คือ ต้น KasaC1.1-2.T₁-4 (ภาพที่ 39) นอกจากนี้ยังพบว่าต้นข้าวลูกผสมที่มีต้นสีม่วงมีการเจริญเติบโตช้ากว่า ต้นที่มีกาบใบสีแดงและตายไปในที่สุด อาจเกิดจากการที่ต้นมีการสะสมแอนโทไซยานินเพิ่มมากขึ้นจึง ทำให้มีผลต่อการสังเคราะห์แสงของพืช (Oshima et al., 2019) และการที่ต้นลูกผสม F₁ เป็นสีม่วง ทั้งต้นอาจเกิดจากยีน *OsC1* และ *OsB2* ไปกระตุ้นยีนโครงสร้างในต้นข้าวทำให้มีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเพิ่มมากขึ้น (Hu et al., 1996; Sakamoto et al., 2001)



ภาพที่ 39 ต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ลูกผสมรุ่น F₁

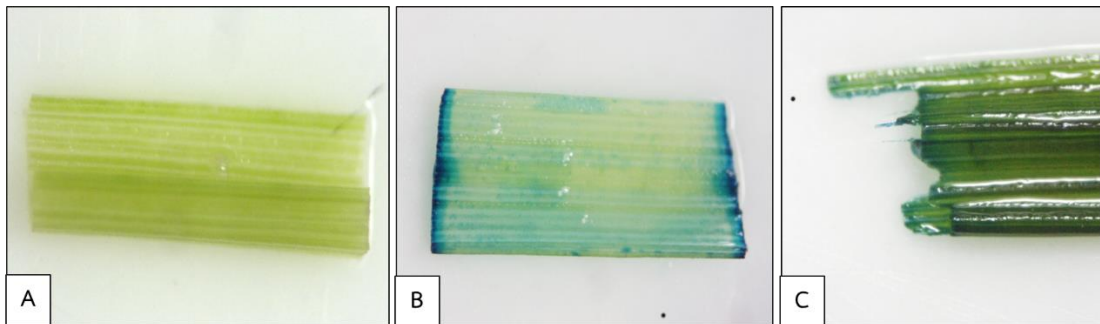
หมายเหตุ

A-B คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน

C-D คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่มีกาบใบสีแดง

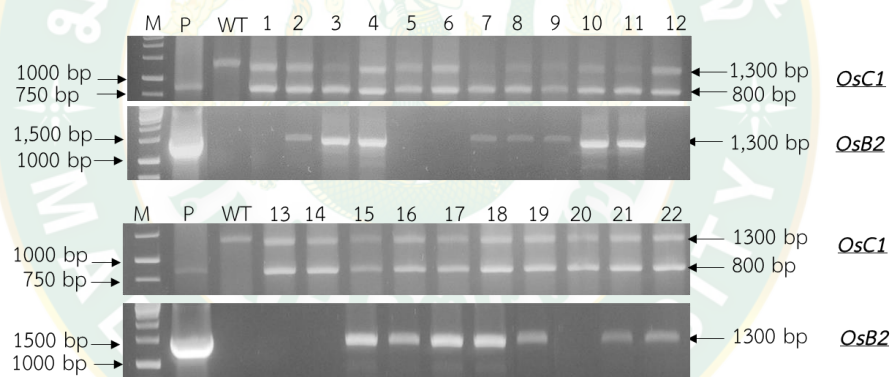
E-F คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่มีต้นสีม่วงทั้งต้น

ลูกศรสีแดง คือ บริเวณกาบใบสีแดง



ภาพที่ 40 การตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay ในข้าวลูกผสมรุ่น F₁

หมายเหตุ A คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน
 B คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่มีกาบใบสีแดงและมีการแสดงออกของยีน *gus*
 C คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่มีต้นสีม่วง และมีการแสดงออกของยีน *gus*



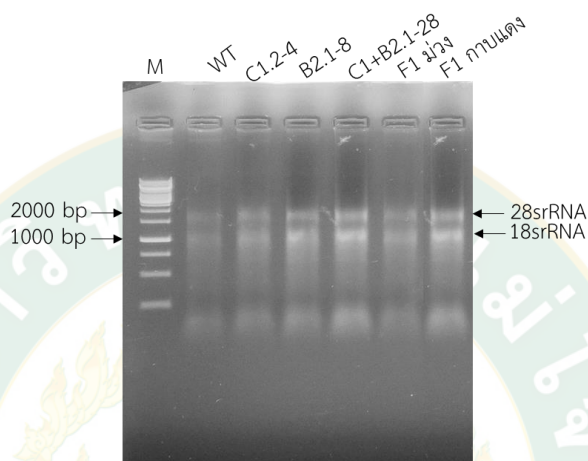
ภาพที่ 41 การวิเคราะห์ยีน *OsC1* และ *OsB2* ของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ลูกผสมรุ่น F₁
 โดยเทคนิคพีซีอาร์

หมายเหตุ M คือ 1 kb DNA ladder
 WT คือ ข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน
 P คือ plasmid p2CA ที่มียีน *OsC1* และ *OsB2*
 ลูกศรสีแดง คือ แถบดีเอ็นเอ

4. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR และ semi-quantitative RT-PCR

4.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากต้นอ่อนข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน

การสกัดอาร์เอ็นเอจากต้นอ่อนอายุ 15 วัน ของข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนและข้าวลูกผสมรุ่น F_1 ด้วยวิธี mCTAB พบแถบอาร์อาร์เอ็นเอ (rRNA) ขนาด 28S และ 18S (ภาพที่ 42) แสดงว่าสามารถสกัดได้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดี เมื่อนำไปวิเคราะห์คุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยวิธีนาโนทรอป พบว่าอาร์เอ็นเอมีคุณภาพดีเหมาะสำหรับนำไปใช้ต่อไป (ตารางที่ 12)



ภาพที่ 42 การสกัดอาร์เอ็นเอจากต้นอ่อนข้าวอายุ 15 วัน ในข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ข้าวตัดแปลงพันธุกรรม และข้าวลูกผสมรุ่น F_1

หมายเหตุ

WT คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน

C1.2-4 คือ ข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *OsC1*

B2.1-8 คือ ข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *OsB2*

C1+B2.1-28 คือ ข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *OsC1* และ *OsB2*

F1 ม่วง คือ ข้าวลูกผสมรุ่น F_1 ที่มีต้นสีม่วง

F1 กาบแดง คือ ข้าวลูกผสมรุ่น F_1 ที่มีกาบใบสีแดง

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์คุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยวิธีนาโนทรอป

พันธุ์ข้าว	ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ (ng/ul)	A260/A280	A260/A230
Kasa (WT)	394.2	2.03	0.73
KasaC1.2-4	258.4	1.96	0.44
KasaB2.1-8	343.9	1.99	0.59
KasaC1+B2.1-28	484.6	2.05	0.74
Kasa.F ₁ ม่วง	331.6	2.09	1.52
Kasa.F ₁ กาบแดง	2154	1.96	1.92

4.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR และ semi-quantitative RT-PCR

การนำ cDNA ของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ต้นข้าวตัดแปลงพันธุ์กรรมรุ่น T₁ ที่ได้รับยีน *OsC1*, *OsB2* และยีนร่วมระหว่างยีน *OsC1* และ *OsB2* คือต้น KasaC1.2-4, KasaB2.1-8 และ KasaC1+B2.1-28 ตามลำดับ และลูกผสมรุ่น F₁ ที่มีต้นสีม่วง และต้นที่มีสีแดง มาวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsC1* พบแถบดีเอ็นเอขนาดที่คาดหวังประมาณ 260 bp ในทุกตัวอย่าง (ภาพที่ 43A) เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsC1* พบว่าในต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนไม่พบการแสดงออกของยีน *OsC1* ส่วนต้นข้าวตัดแปลงพันธุ์กรรมที่ได้รับยีน *OsC1* มีระดับการแสดงออกของยีน *OsC1* สูง โดยต้น KasaC1+B2.1-28 มีการแสดงออกสูงกว่าต้น KasaC1.2-4 นอกจากนี้ต้นลูกผสมรุ่น F₁ ที่มีสีแดงจะมีระดับการแสดงออกของยีน *OsC1* สูงกว่าในต้นที่มีสีม่วง (ภาพที่ 43C และ D) การที่ต้นที่ได้รับยีน *OsC1* ต้นที่ได้ยีนร่วมของยีน *OsC1* และ *OsB2* ต้น F₁ ที่มีสีม่วงและต้น F₁ ที่มีสีแดง มีการแสดงออกสูงกว่าในต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน สอดคล้องกับรายงานที่พบว่ายีน *OsC1* ข้าวที่มีกาบใบสีม่วงจะมีการแสดงออกของยีน *OsC1* สูงกว่าต้นที่มีกาบใบสีเขียว เนื่องจากยีน *OsC1* มีบทบาทสำคัญในการสะสมของแอนโทไซยานิน (Chin et al., 2016) เมื่อถ่ายยีน *OsC1* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath ทำให้ต้นที่ได้รับยีน *OsC1* มีการไปกระตุ้นยีนโครงสร้างทำให้มีการสะสมแอนโทไซยานินจึงมีการการแสดงออกของยีน *OsC1* มากกว่าต้นที่ไม่ได้รับยีน

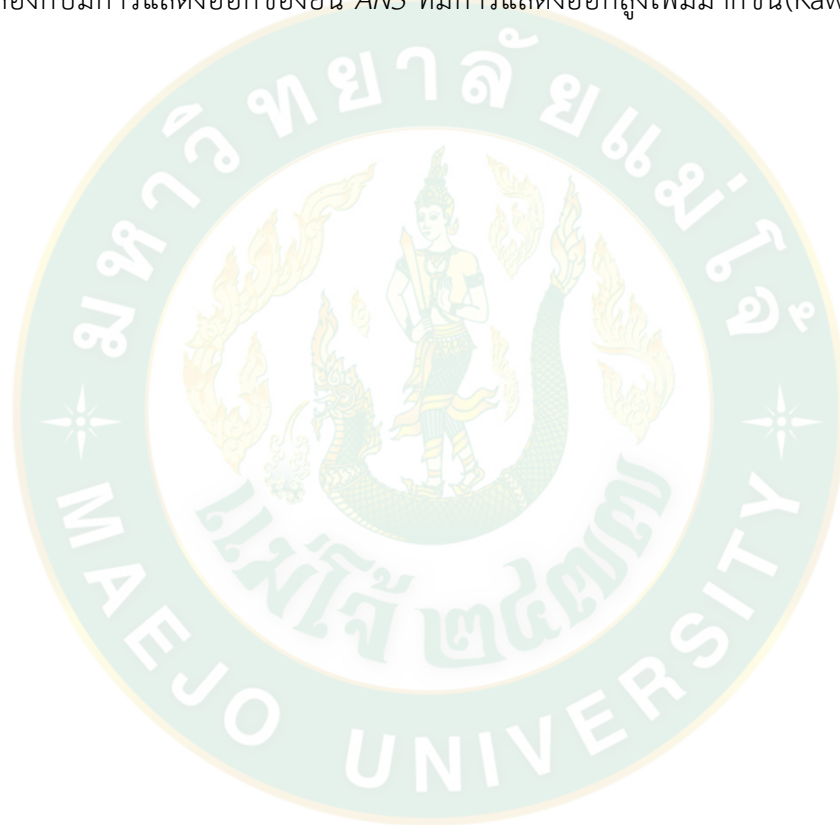
การนำ cDNA ของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ต้นข้าวตัดแปลงพันธุ์กรรมรุ่น T₁ ที่ได้รับยีน *OsC1*, *OsB2* และยีนร่วมระหว่างยีน *OsC1* และ *OsB2* คือต้น KasaC1.2-4, KasaB2.1-8 และ KasaC1+B2.1-28 ตามลำดับ และลูกผสมรุ่น F₁ ที่มีต้นสีม่วง และ

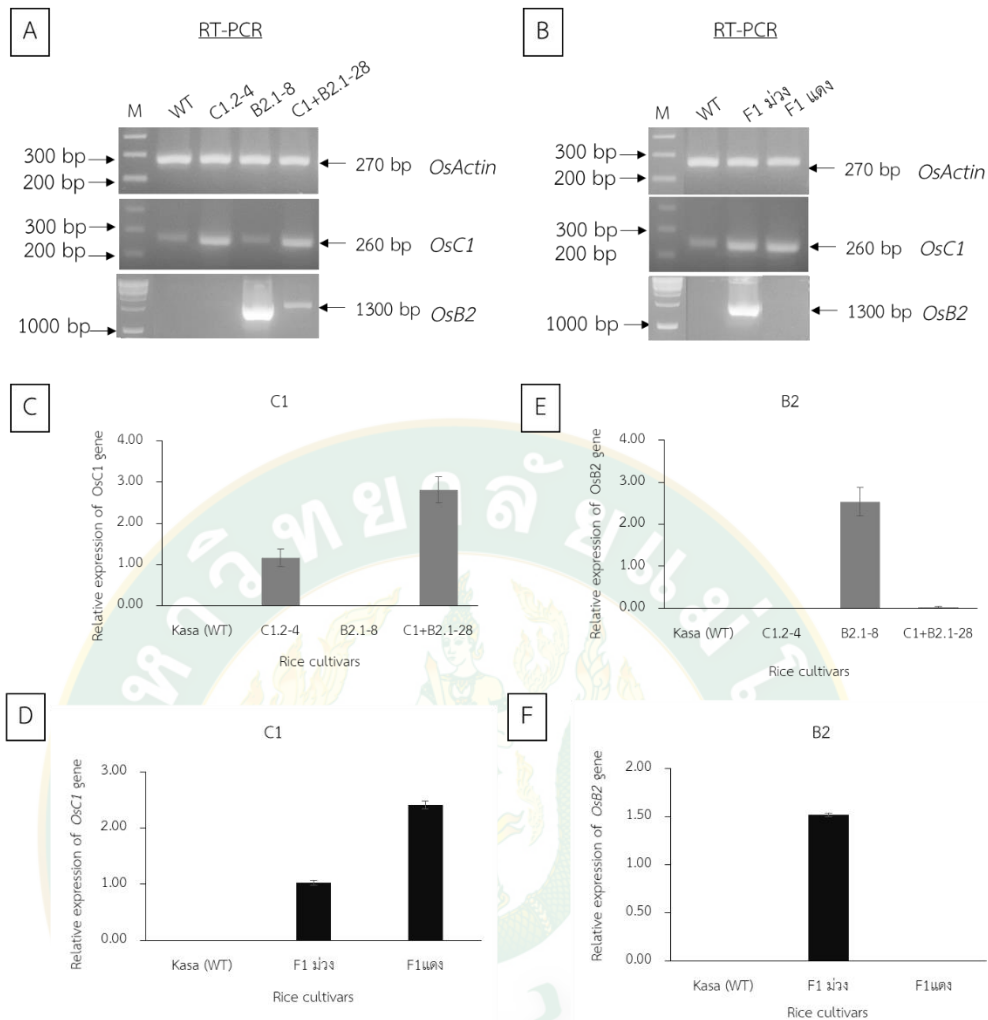
ต้นที่มีสีแดง ที่ได้มาวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsB2* พบแถบดีเอ็นเอขนาดที่คาดหวังประมาณ 1,300 bp ในต้น KasaB2.1-8, KasaC1+B2.1-28 และลูกผสมรุ่น F_1 ที่มีต้นสีม่วง (ภาพที่ 43B) เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsB2* พบว่าในต้น KasaC1.2-4, F_1 ที่มีสีแดง และต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ไม่พบการแสดงออกของยีน *OsB2* ส่วนต้น KasaB2.1-8, KasaC1+B2.1-28 และลูกผสมรุ่น F_1 ที่มีสีม่วง มีการแสดงออกของยีน *OsB2* (ภาพที่ 43E และ F) การแสดงออกของต้นที่ได้รับยีน *OsB2* สอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานว่าพบการแสดงออกของยีน *OsB2* ที่ถ่ายเข้าสู่ข้าวขาวพันธุ์ Nipponbare และ Taichung 65 มีการแสดงออกสูงกว่าต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ เนื่องจากข้าวขาวพันธุ์ Nipponbare และ Taichung 65 ที่นำมาใช้ถ่ายยีนไม่มียีน *DFR* ที่ทำงานได้จึงไม่มีการสร้างสีในข้าวขาวที่นำมาใช้ในการถ่ายยีน (Sakulsingharoj et al., 2014) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับ Shih et al (2008) ที่รายงานว่ายีน *OsB2* ไม่ทำงานในข้าวที่มีใบสีเขียว ซึ่งข้าวพันธุ์ Kasalath ที่นำมาใช้ถ่ายยีนในการศึกษาครั้งนี้เป็นข้าวที่มีใบสีเขียว นอกจากนี้มีรายงานว่าในข้าวแดงยีน *OsB1* ที่เป็นกลุ่ม Myc จัดอยู่ในกลุ่ม basic helix-loop-helix (bHLH) เช่นเดียวกับยีน *OsB2* ก็ไม่ทำงานเช่นกัน โดยพบว่ามีเพิ่มขึ้น 2 คู่เบส ทำให้มีการกลายพันธุ์แบบ frameshift ในข้าวแดง (Lim and Ha, 2013)

การนำ cDNA ของต้น Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ต้นข้าวตัดแปลงพันธุ์กรรมรุ่น T_1 ที่ได้รับยีน *OsC1*, *OsB2* และยีนร่วมระหว่างยีน *OsC1* และ *OsB2* คือต้น KasaC1.2-4, KasaB2.1-8 และ KasaC1+B2.1-28 ตามลำดับ วิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนโครงสร้างคือยีน *CHS*, *CHI*, *F3'H*, *DFR* และ *ANS* พบว่าต้นข้าวตัดแปลงพันธุ์กรรมและต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนมีการแสดงออกของยีน *CHS*, *CHI*, *F3'H* และ *DFR* แต่ยีน *ANS* พบการแสดงในข้าวตัดแปลงพันธุ์กรรมแต่ไม่พบในต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (ภาพที่ 44A) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่ายีน *CHS* และ *CHI* มีการแสดงออกของทุกตัวอย่าง แต่ยีน *F3'H*, *DFR* และ *ANS* มีการแสดงออกในต้น KasaC1.2-4 และ KasaC1+B2.1-28 ในระดับสูงกว่าในต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนและต้น KasaB2.1-8 (ภาพที่ 45A) อาจเกิดจากยีน *OsC1* ไปกระตุ้นยีนโครงสร้างทำวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าการแสดงออกของยีนโครงสร้าง คือ *F3H*, *DFR*, *ANS*, *CHS*, *CHI* และ *F3'H* ในข้าวพันธุ์ T65-Plw ที่มีสีแดงมีการแสดงออกสูง (Shih et al., 2008)

การนำ cDNA ของต้นข้าวลูกผสมรุ่น F_1 ที่มีสีม่วงและต้นที่มีสีแดง มาวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนโครงสร้างคือยีน *CHS*, *CHI*, *F3'H*, *DFR* และ *ANS* พบว่าต้นข้าวลูกผสมรุ่น F_1 ที่มีสีม่วงและต้นที่มีสีแดง มีการแสดงออกของยีน

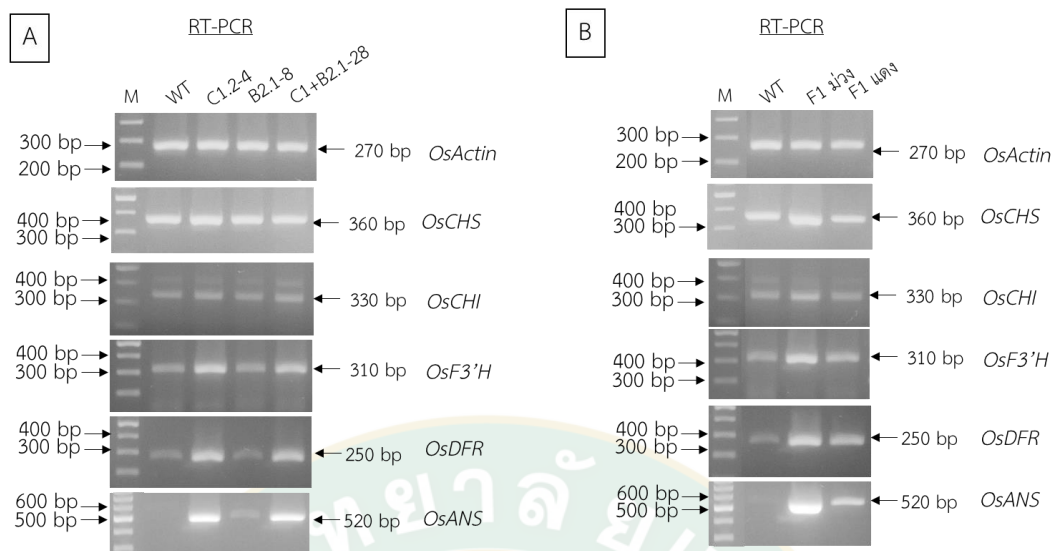
CHS, *CHI*, *F3'H* และ *DFR* แต่ยีน *ANS* พบการแสดงออกในต้นข้าวลูกผสมรุ่น F_1 ที่มีสีม่วงและต้นที่มีสีแดง แต่ไม่พบในต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (ภาพที่ 44B) เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่าต้นข้าวลูกผสม F_1 ที่มีสีม่วงมีการแสดงออกของยีน *CHS*, *CHI*, *F3'H*, *DFR* และ *ANS* สูงกว่าในต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนและต้นลูกผสม F_1 ที่มีสีแดง อาจเกิดจากการที่ยีน *OsC1* และ *OsB2* ที่ถ่ายเข้าไปในข้าวพันธุ์ Kasalath ไปกระตุ้นยีนโครงสร้างให้มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นกว่าในต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (Oshima et al., 2019) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับที่รายงานว่าต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่มีต้นสีแดงเกิดจากการที่สะสมแอนโทไซยานินเพิ่มมากขึ้น และสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *ANS* ที่มีการแสดงออกสูงเพิ่มมากขึ้น (Kawahigashi et al., 2007)





ภาพที่ 43 การแสดงออกของยีน *OsC1* และ *OsB2* ในเนื้อเยื่อใบอ่อนของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ต้นตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁ และลูกผสม F₁ เมื่อเทียบกับยีน *OsActin*

- หมายเหตุ
- A คือ การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ของต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนรุ่น T₁ เทียบกับต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน
 - B คือ การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ของลูกผสมรุ่น F₁ เทียบกับต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน
 - C-D คือ ระดับการแสดงออกของยีนควบคุม *OsC1* เมื่อเปรียบเทียบกับยีน *OsActin* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ของลูกรุ่น T₁ และลูกผสมรุ่น F₁
 - E-F คือ ระดับการแสดงออกของยีนควบคุม *OsB2* เมื่อเปรียบเทียบกับยีน *OsActin* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ของลูกรุ่น T₁ และลูกผสมรุ่น F₁



ภาพที่ 44 การแสดงออกของยีนโครงสร้างในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเนื้อเยื่อใบอ่อนของข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁ และลูกผสมรุ่น F₁ โดยเทคนิค RT-PCR

หมายเหตุ A คือ การแสดงออกของยีนโครงสร้างของต้นที่ผ่านการถ่ายยีนรุ่น T₁ เทียบกับต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน

B คือ การแสดงออกของยีนโครงสร้างของลูกผสมรุ่น F₁ เทียบกับต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน

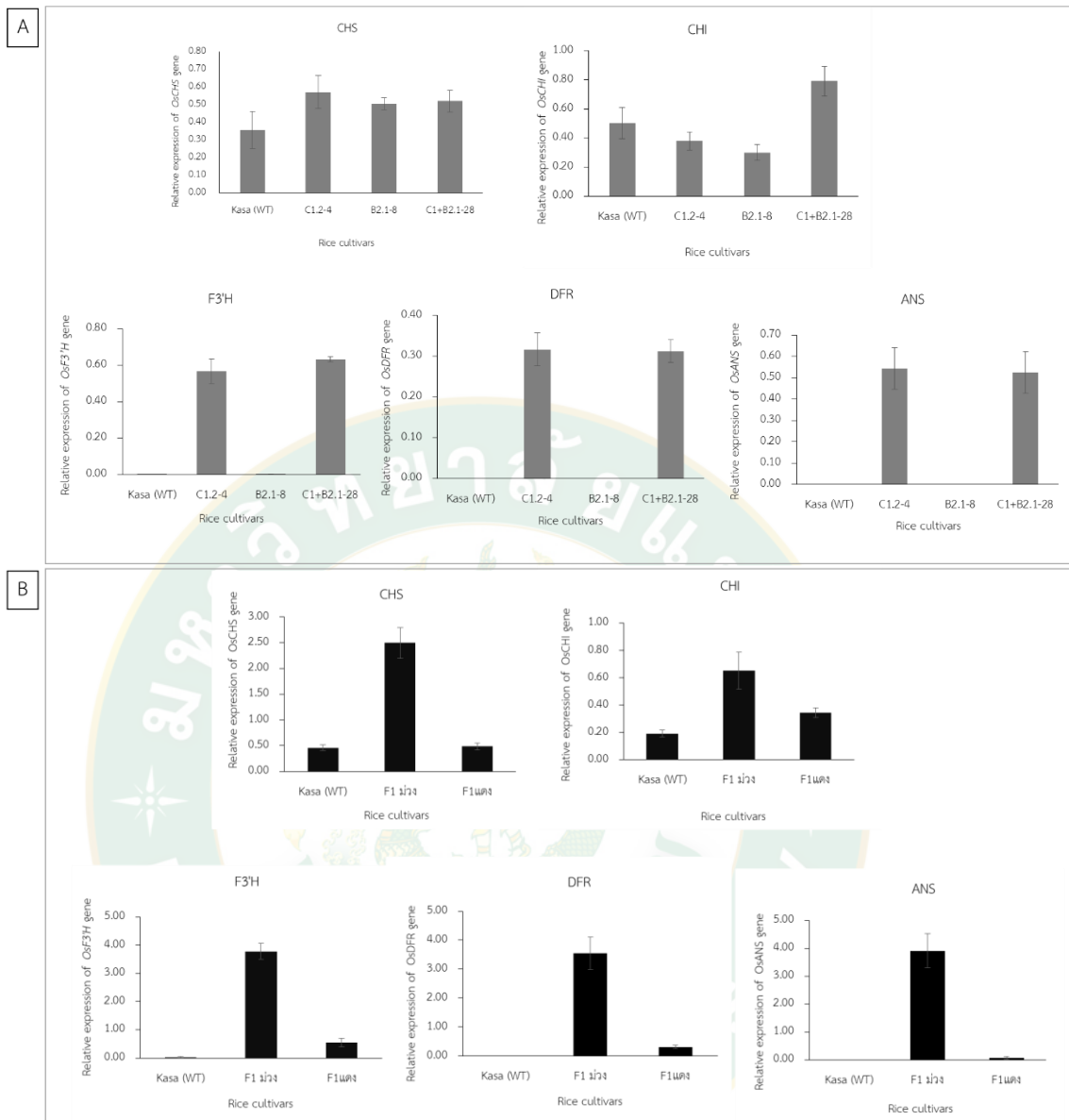
OsCHS คือ chalcone synthase

OsCHI คือ chalcone isomerase

OsF3'H คือ flavonoid 3'-hydroxylase

OsDFR คือ dihydroflavonol 4-reductase

OsANS คือ anthocyanidin synthase



ภาพที่ 45 การแสดงออกของยีนโครงสร้างในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเนื้อเยื่อใบอ่อนของข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 และลูกผสมรุ่น F_1 โดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

หมายเหตุ A คือ การแสดงออกของยีนโครงสร้างของต้นที่ผ่านการถ่ายยีนรุ่น T_1 เทียบกับต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน

B คือ การแสดงออกของยีนโครงสร้างของลูกผสมรุ่น F_1 เทียบกับต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน

CHS คือ chalcone synthase

CHI คือ chalcone isomerase

F3'H คือ flavonoid 3'-hydroxylase

DFR คือ dihydroflavonol 4-reductase

ANS คือ anthocyanidin synthase

5. การวัดปริมาณแอนโทไซยานิน

5.1 การสกัดแอนโทไซยานิน

การสกัดแอนโทไซยานินของเมล็ดแก่ของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน และเมล็ดข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 ที่ได้รับยีน *OsC1* (KasaC1.2-4), *OsB2* (KasaB2.1-8) และ *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* (KasaC1+B2.1-28) พบว่าสีที่สกัดได้ของข้าว พันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน *OsB2* มีสีแดงเข้มมากที่สุด ตามด้วยข้าวที่ได้รับยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* และข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนมีสีใกล้เคียงกับข้าวที่ได้รับยีน *OsC1* (ภาพที่ 46A) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของสีเมล็ด (ภาพที่ 46)



ภาพที่ 46 เมล็ดข้าวที่ใช้ในการวัดปริมาณแอนโทไซยานินและทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH

- หมายเหตุ
- A คือ เมล็ดข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน
 - B คือ เมล็ดข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับยีน *OsC1*
 - C คือ เมล็ดข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับยีน *OsB2*
 - D คือ เมล็ดข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2*

5.2 การวัดปริมาณแอนโทไซยานิน

การวัดปริมาณแอนโทไซยานินของเมล็ดแก่ของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน และข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *OsC1*, *OsB2* และ *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* พบว่า ตัวอย่างข้าวที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุดคือ ข้าวที่ได้รับยีน *OsB2* รองลงมาคือ ข้าวที่ได้รับยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* และข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนมีปริมาณแอนโทไซยานินใกล้เคียงกับต้นที่ได้รับยีน *OsC1* (ภาพที่ 47 และตารางที่ 13) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของสีเมล็ด (ภาพที่ 46) เนื่องจากข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับยีน *OsB2* และข้าวที่ได้รับยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* มีการสะสมของแอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ด ซึ่งต้นที่ได้รับยีน *OsB2* มีการสะสมแอนโทไซยานินที่เมล็ดแก่มากกว่าต้นที่ได้รับยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2*

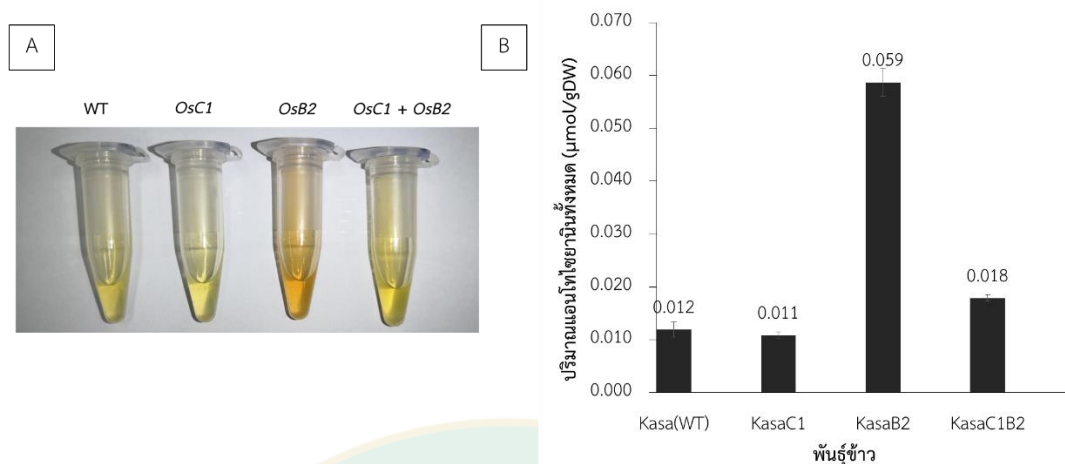
การที่เมล็ดข้าวที่ได้รับยีน *OsB2* และยีนร่วม มีปริมาณแอนโทไซยานินมากกว่าในข้าวที่ได้รับยีน *OsC1* และข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน อาจเกิดจากการที่ยีน *OsB2* ไปกระตุ้นยีนโครงสร้างในเมล็ดข้าวให้มีการแสดงออกมากขึ้นทำให้สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวให้แสดงออกเพิ่มมากขึ้น (Hu et al., 1996; Sakamoto et al., 2001) และยีน *OsB2* เป็นยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว (Kim et al., 2018) ทำให้เมล็ดของต้นที่ได้รับยีน *OsB2* มีการสะสมแอนโทไซยานิน เมื่อวัดปริมาณแอนโทไซยานินจึงมีมากกว่าข้าวที่ได้รับยีน *OsC1* และข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน

ตารางที่ 13 ปริมาณแอนโทไซยานินของเมล็ดข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับยีน *OsC1*, *OsB2* และ *OsC1* ร่วมกับ *OsB2*

พันธุ์ข้าว	ปริมาณแอนโทไซยานิน ($\mu\text{mol/gDW}$)
Kasa (WT)	0.012 ± 0.001^c
KasaC1.2-4	0.011 ± 0.000^c
KasaB2.1-8	0.059 ± 0.002^a
KasaC1+B2.1-28	0.018 ± 0.000^b

หมายเหตุ \pm คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

^{a-c} คือ อักษรแตกต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p > 0.05$)



ภาพที่ 47 ปริมาณแอนโทไซยานินในข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *OsC1*, *OsB2*, *OsC1* ร่วมกับ *OsB2*

หมายเหตุ A คือ สารสกัดจากเมล็ดแก่ของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน และข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน
B คือ ปริมาณแอนโทไซยานินในข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน และข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน

6. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

6.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของเมล็ดแก่ในข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน และข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *OsC1*, ยีน *OsB2* และยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* พบว่าตัวอย่างข้าวที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุดคือ ข้าวที่ได้รับยีน *OsB2* รองลงมาคือ ข้าวที่ได้รับยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2*, ต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน และต้นที่ได้รับยีน *OsC1* ตามลำดับ (ภาพที่ 48 และตารางที่ 14) นอกจากนี้ยังพบว่าต้นข้าวที่ได้รับยีนร่วมระหว่างยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับลักษณะของสีเมล็ด (ภาพที่ 46) เนื่องจากข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับยีน *OsB2* และข้าวที่ได้รับยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* มีการสะสมของแอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ด ซึ่งต้นที่ได้รับยีน *OsB2* มีการสะสมแอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดมากกว่าต้นที่ได้รับยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* และผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระยังสอดคล้องกับปริมาณแอนโทไซยานินอีกด้วยพบว่าข้าวที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุดคือ ข้าวที่ได้รับยีน *OsB2* เพียงยีนเดียว

ตารางที่ 14 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน และข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *OsC1*, *OsB2* และ *OsC1* ร่วมกับ *OsB2*

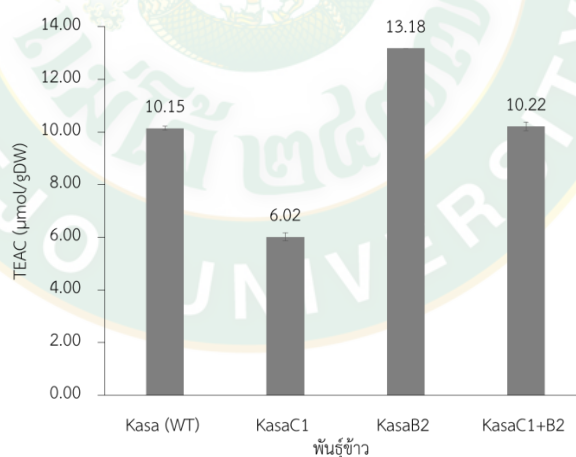
พันธุ์ข้าว	TEAC ($\mu\text{mol/gDW}$)
Kasa(WT)	10.15 ± 0.07^d
KasaC1.2-4	6.02 ± 0.16^c
KasaB2.1-8	13.18 ± 0.00^a
KasaC1+B2.1-28	10.22 ± 0.17^b

หมายเหตุ

\pm คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

^{a-c} คือ อักษรแตกต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p > 0.05$)

TEAC คือ Trolox equivalent antioxidant capacity ในหน่วย μmol Trolox equivalents ต่อกรัม ของตัวอย่างเมล็ดข้าวที่บดละเอียด



ภาพที่ 48 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับยีน *OsC1*, *OsB2*, *OsC1* ร่วมกับ *OsB2*

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

การถ่ายยีน *OsC1* การถ่ายยีน *OsB2* และการถ่ายยีนร่วมระหว่างยีน *OsC1* และ *OsB2* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath พบว่ามีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด คือ 80, 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีนสามารถรอดบนอาหารคัดเลือกสูงสุด คือ 100, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพัฒนาไปเป็นยอดสูงสุด 100, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยจากยอดที่เกิดขึ้นสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ทั้งหมดจำนวน 8, 70 และ 61 ต้น ตามลำดับ ซึ่งจากจำนวนต้นทั้งหมดเมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่ามีต้นที่ได้รับยีนจำนวน 8, 59 และ 10 ต้น ตามลำดับ คิดเป็น 100, 84.28 และ 16.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การศึกษาลักษณะของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_0 ที่มียีน *OsC1* ยีน *OsB2* และยีนร่วมระหว่างยีน *OsC1* และ *OsB2* พบว่าต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_0 ที่มียีน *OsC1* มีลักษณะกาบใบข้อ เขียวกันแมลง ปลายกลีบดอกใหญ่ และหางข้าวเป็นสีแดง นอกจากนี้ยังพบว่าเกสรตัวเมียเป็นสีม่วง เมื่อติดเมล็ดอ่อนจะมีสีเขียวเมล็ดแก่มีสีแดงเหมือนกับต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_0 ที่มียีน *OsB2* ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางฟีโนไทป์ด้านกายภาพจากการตรวจสอบลักษณะต่าง ๆ เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ได้แก่ กาบใบข้อ เขียวกันแมลง ปลายกลีบดอกใหญ่ หางข้าว และเกสรตัวเมีย ส่วนลักษณะที่แตกต่าง คือ เมล็ดอ่อนและเมล็ดแก่จะมีการสะสมรงควัตถุสีม่วง แต่ในข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนนั้นมีเมล็ดสีเขียวในระยะเมล็ดอ่อน และมีสีแดงในระยะเมล็ดแก่ ต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_0 ที่มียีนร่วมระหว่างยีน *OsC1* และ *OsB2* ต้นข้าวมีลักษณะกาบใบข้อ เขียวกันแมลง ปลายกลีบดอกใหญ่ และหางข้าวเป็นสีแดง นอกจากนี้ยังพบว่า เกสรตัวเมียเป็นสีม่วง คล้ายกับต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *OsC1* เมื่อติดเมล็ดอ่อนจะมีสีเขียวและด้านข้างเป็นแถบสีม่วง เมื่อเมล็ดแก่จะมีสีแดงและแถบด้านข้างสีม่วง คล้ายกับต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *OsB2*

การทดสอบการกระจายตัวของยีนในข้าวพันธุ์ Kasalath ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 ที่มียีน *OsC1* และข้าวที่มียีน *OsB2* พบว่ามีการกระจายตัวของยีนไปสู่รุ่นลูกซึ่งสามารถเป็นได้ทั้งสองทฤษฎี คือ มีอัตราส่วนเป็น 3 : 1 และ 15 : 1 ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการแทรกตัวของยีน 1 หรือ 2 ตำแหน่ง ส่วนข้าวพันธุ์ Kasalath ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 ที่ยีนร่วมระหว่างยีน *OsC1* และ *OsB2*

เป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ มีอัตราส่วน 9 : 3 : 3 : 1 แสดงว่ามียีนแทรกอยู่ในจีโนมข้าวตัดแปลงพันธุกรรม 2 ตำแหน่ง และยังพบว่าลักษณะของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 ที่มียีน *OsC1* ข้าวที่มียีน *OsB2* และข้าวที่มียีน *OsC1* ร่วมกับ *OsB2* เหมือนกับต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_0

การสร้างข้าวลูกผสมพันธุ์ Kasalath ที่มียีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* โดยการผสมต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมใช้ต้นพันธุ์รับที่มียีน *OsC1* กับต้นพันธุ์ให้ที่มียีน *OsB2* เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *OsC1* และ *OsB2* พบว่าจากข้าวลูกผสมรุ่น F_1 ทั้งหมด 22 ต้น มีต้นที่มียีนร่วมระหว่าง *OsC1* ร่วมกับ *OsB2* จำนวน 15 ต้น ซึ่งทั้งหมดมีฟีโนไทป์สีม่วงทั้งต้น และต้นที่มีเพียงยีน *OsC1* เพียงยีนเดียวจำนวน 7 ต้น มีฟีโนไทป์กาบใบสีแดง และใบสีเขียว อาจเกิดจากการผสมตัวเองของต้นแม่ที่มียีน *OsC1* จึงทำให้มีฟีโนไทป์เหมือนกับต้นแม่ ต้นข้าวลูกผสม F_1 ที่มีต้นสีม่วงมีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นที่มีกาบใบสีแดงและตายไป ซึ่งอาจเกิดจากการที่ต้นมีการสะสมแอนโทไซยานินเพิ่มมากขึ้นจึงทำให้ผลต่อการสังเคราะห์แสงของพืชทำให้โตช้าและตาย

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนควบคุม คือยีน *OsC1* ด้วยเทคนิค RT-PCR พบแถบดีเอ็นเอขนาดที่คาดหวังในทุกตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsC1* พบว่าในต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนไม่พบการแสดงออกของยีน *OsC1* ส่วนต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *OsC1* มีระดับการแสดงออกของยีน *OsC1* สูง โดยต้น KasaC1+B2.1-28 มีการแสดงออกสูงกว่าต้น KasaC1.2-4 นอกจากนี้ต้นลูกผสมรุ่น F_1 ที่มีสีม่วงจะมีระดับการแสดงออกของยีน *OsC1* สูงกว่าในต้นที่มีสีแดง

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *OsB2* ด้วยเทคนิค RT-PCR พบแถบดีเอ็นเอขนาดที่คาดหวัง ในต้น KasaB2.1-8, KasaC1+B2.1-28 และลูกผสมรุ่น F_1 ที่มีต้นสีม่วง เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsB2* พบว่าในต้น KasaC1.2-4, F_1 ที่มีสีแดง และต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ไม่พบการแสดงออกของยีน *OsB2* ส่วนต้น KasaB2.1-8, KasaC1+B2.1-28 และลูกผสมรุ่น F_1 ที่มีสีม่วง มีการแสดงออกของยีน *OsB2*

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโครงสร้าง คือยีน *CHS*, *CHI*, *F3'H*, *DFR* และ *ANS* ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมและต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนมีการแสดงออกของยีน *CHS*, *CHI*, *F3'H* และ *DFR* แต่ยีน *ANS* พบการแสดงในข้าวตัดแปลงพันธุกรรมแต่ไม่พบในต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่ายีน *CHS* และ *CHI* มีการแสดงออกของทุกตัวอย่าง แต่ยีน *F3'H*, *DFR* และ *ANS* มีการแสดงออกในต้น KasaC1.2-4

และ KasaC1+B2.1-28 ในระดับสูงกว่าในต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนและต้น KasaB2.1-8 นอกจากนี้ยังพบว่าต้นข้าวลูกผสมรุ่น F_1 ที่มีสีม่วงและต้นที่มีสีแดง มีการแสดงออกของยีน *CHS*, *CHI*, *F3'H* และ *DFR* แต่ยีน *ANS* พบการแสดงออกในต้นข้าวลูกผสมรุ่น F_1 ที่มีสีม่วงและต้นที่มีสีแดง แต่ไม่พบในต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่าต้นข้าวลูกผสม F_1 ที่มีสีม่วงมีการแสดงออกของยีน *CHS*, *CHI*, *F3'H*, *DFR* และ *ANS* สูงกว่าในต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนและต้นลูกผสม F_1 ที่มีสีแดง

การวัดปริมาณแอนโทไซยานินและการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่าข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน *OsB2* มีปริมาณแอนโทไซยานินและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน *OsC1* ร่วมกับยีน *OsB2* ซึ่งสอดคล้องกับพีโนโทเบมิลิตที่มีการสะสมแอนโทไซยานินบริเวณเมล็ด มากกว่าข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนและข้าวที่ได้รับยีน *OsC1* เพียงยีนเดียว ซึ่งบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดไม่มีการสะสมแอนโทไซยานิน

จากงานวิจัยนี้สามารถใช้ยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเป็นยีนคัดเลือกหรือยีนเครื่องหมายในขั้นตอนการถ่ายยีนเข้าสู่แคลัสข้าว และนำไปพัฒนาในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ข้าวพันธุ์ดีที่มีแอนโทไซยานินสูงในอนาคต

บรรณานุกรม

- กรมการค้าต่างประเทศ. 2560. สถานการณ์ข้าวไทย เดือน พ.ย.59. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.thairiceexporters.or.th/default_th.htm (10 มิถุนายน 2560).
- กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศกระทรวงพาณิชย์. 2562. การส่งออกข้าว. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา https://ditp.go.th/ditp_web61/article_sub_view.php?filename=contents_attach/539561/539561.pdf&title=539561&cate=456&d=0.
- กองวิจัยและพัฒนาข้าวกรมการข้าว. 2559. องค์ความรู้เรื่องข้าว. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา ricethailand.go.th/rkb3/title-index.php-file=content.php&id=112.htm.
- ช่อทิพา สกกุลสิงหาโรจน์, รอยพิมพ์ สุขเกษม, ลลิตา ณ ราชสีมา, แสงทอง พงษ์เจริญกิต, วราภรณ์ แสงทอง และศรีเมฆ ชาวโพงพาง. 2561. การโคลนยีนและศึกษาคุณสมบัติของยีน *OsC1* ที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำพันธุ์เก่า. รายงานการประชุมวิชาการ.
- บุญหงษ์ จงคิด 2557. ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- ภาวิช วิจารณ์. 2560. ทานข้าวไทยเป็นยา รักษาชีวิต. **วารสารอู่ข้าว**
- รัชนี้ คงคาอุยฉาย และ ริญ เจริญศิริ. 2553. คุณค่าทางโภชนาการของข้าวพันธุ์พื้นเมืองในเขตปฏิรูปที่ดิน อำเภอกุดชุม จังหวัดยโสธร. สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- ริญ, เจริญศิริ และ รัชนี้ คงคาอุยฉาย. 2551. โภชนาการกับผลไม้. . สำนักพิมพ์สารคดี กรุงเทพมหานคร.
- ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรมม. 2552. พันธุ์วิศวกรรมและการประยุกต์ใช้. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สายวิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.
- ศูนย์การเรียนรู้การเกษตรตำบลสาคุ. 2554. ข้าว. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.sakhu.go.th/multimedia/learning/listpage.shtml?cid=3> (10 มิถุนายน 2560).
- สำนักงานนโยบายและยุทธศาสตร์การค้ากระทรวงพาณิชย์. 2562. ทิศทางสถานการณ์ข้าว ปี 2562. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <https://www.thailandplus.tv/archives/34826>.
- Abdel-Aal, E.-S., Hucl, P., Sosulski, F., Graf, R., Gillott, C. & Pietrzak, L. 2001. Screening

- spring wheat for midge resistance in relation to ferulic acid content. **Journal of agricultural and food chemistry**, 49(8), 3559-3566.
- Abdel-Aal, E.-S. M., Young, J. C. & Rabalski, I. 2006. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. **Journal of agricultural and food chemistry**, 54(13), 4696-4704.
- Agati, G., Biricolli, S., Guidi, L., Ferrini, F., Fini, A. & Tattini, M. 2011. The biosynthesis of flavonoids is enhanced similarly by UV radiation and root zone salinity in *L. vulgare* leaves. **Journal of plant physiology**, 168(3), 204-212.
- Arai, S., Morinaga, Y., Yoshikawa, T., Ichiishi, E., Kiso, Y., Yamazaki, M., Morotomi, M., Shimizu, M., Kuwata, T. & Kaminogawa, S. 2002. Recent trends in functional food science and the industry in Japan. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 66(10), 2017-2029.
- Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R., Bagchi, M., Bagchi, D., Balmoori, J. & Stohs, S. 1998. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. **General Pharmacology: The Vascular System**, 30(5), 771-776.
- Bardenas, E. A. 1965. **Morphology and Varietal Characteristics of the Rice Plant**, The. Int. Rice Res. Inst.
- Bray, T. M. 2000. Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress. **Nutrition**, 16(7), 578-581.
- Chin, H.-s., Wu, Y.-p., Hour, A.-l., Hong, C.-y. & Lin, Y.-r. 2016. Genetic and Evolutionary Analysis of Purple Leaf Sheath in Rice. **Rice**, 9(1), 8.
- Choudhury, B. I., Khan, M. L. & Dayanandan, S. 2014. Patterns of nucleotide diversity and phenotypes of two domestication related genes (*OsC1* and *Wx*) in indigenous rice varieties in Northeast India. **BMC genetics**, 15(1), 71.
- Cossins, E., Lee, R. & Packer, L. 1998. ESR studies of vitamin C regeneration, order of reactivity of natural source phytochemical preparations. **IUBMB Life**, 45(3), 583-597.
- Elsayed, N. M. 2001. Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental–nutritional interaction. **Nutrition**, 17(10), 828-834.

- Fan, F.-J., Fan, Y.-Y., Du, J.-h. & Zhuang, J.-Y. 2008. Fine mapping of C (chromogen for anthocyanin) gene in rice. **Rice Science**, 15(1), 1-6.
- Furukawa, T., Maekawa, M., Oki, T., Suda, I., Iida, S., Shimada, H., Takamura, I. & Kadowaki, K. i. 2007. The *Rc* and *Rd* genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp. **The Plant Journal**, 49(1), 91-102.
- Gandikota, M., de Kochko, A., Chen, L., Ithal, N., Fauquet, C. & Reddy, A. R. 2001. Development of transgenic rice plants expressing maize anthocyanin genes and increased blast resistance. **Molecular Breeding**, 7(1), 73-83.
- Geekiyanaige, H., Jicha, G. A., Nelson, P. T. & Chan, C. 2012. Blood serum miRNA: non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease. **Experimental neurology**, 235(2), 491-496.
- Geekiyanaige, S., Takase, T., Ogura, Y. & Kiyosue, T. 2007. Anthocyanin production by over-expression of grape transcription factor gene *VlmybA2* in transgenic tobacco and Arabidopsis. **Plant Biotechnology Reports**, 1(1), 11-18.
- Gu, X.-Y., Foley, M. E., Horvath, D. P., Anderson, J. V., Feng, J., Zhang, L., Mowry, C. R., Ye, H., Suttle, J. C. & Kadowaki, K.-i. 2011. Association between seed dormancy and pericarp color is controlled by a pleiotropic gene that regulates abscisic acid and flavonoid synthesis in weedy red rice. **Genetics**, 189(4), 1515-1524.
- Han, Y.-J., Kim, Y.-M., Lee, J.-Y., Kim, S. J., Cho, K.-C., Chandrasekhar, T., Song, P.-S., Woo, Y.-M. & Kim, J.-I. 2009. Production of purple-colored creeping bentgrass using maize transcription factor genes *Pl* and *Lc* through Agrobacterium-mediated transformation. **Plant cell reports**, 28(3), 397-406.
- Hao, J., Zhu, H., Zhang, Z., Yang, S. & Li, H. 2015. Identification of anthocyanins in black rice (*Oryza sativa* L.) by UPLC/Q-TOF-MS and their in vitro and in vivo antioxidant activities. **Journal of cereal science**, 64(92-99).
- Himi, E., Maekawa, M., Miura, H. & Noda, K. 2011. Development of PCR markers for Tamyb10 related to R-1, red grain color gene in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, 122(8), 1561-1576.
- Hu, C., Zawistowski, J., Ling, W. & Kitts, D. D. 2003. Black rice (*Oryza sativa* L. indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in

- chemical and biological model systems. **Journal of agricultural and food chemistry**, 51(18), 5271-5277.
- Hu, J., Anderson, B. & Wessler, S. R. 1996. Isolation and characterization of rice *R* genes: evidence for distinct evolutionary paths in rice and maize. **Genetics**, 142(3), 1021-1031.
- Hu, J., Reddy, V. S. & Wessler, S. R. 2000. The rice *R* gene family: two distinct subfamilies containing several miniature inverted-repeat transposable elements. **Plant molecular biology**, 42(5), 667-678.
- Hu, Z., Tang, X., Liu, J., Zhu, Z. & Shao, Y. 2017. Effect of parboiling on phytochemical content, antioxidant activity and physicochemical properties of germinated red rice. **Food chemistry**, 214(285-292).
- Hudson, E. A., Dinh, P. A., Kokubun, T., Simmonds, M. S. & Gescher, A. 2000. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, 9(11), 1163-1170.
- Inta, P., Phongburaphat, W., Pongjaroenkit, S., Chowpongpan, S., Sangtong, V. & Sakulsingharoj, C. 2013. Cloning and characterization of *OSB2* gene controlling anthocyanin biosynthesis in rice. **Thai J Genet**, 6(25-29).
- Ithal, N. & Reddy, A. R. 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(6), 1505-1513.
- Jang, S. & Xu, Z. 2009. Lipophilic and hydrophilic antioxidants and their antioxidant activities in purple rice bran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57(3), 858-862.
- Jiamyangyuen, S., Nuengchamnong, N. & Ngamdee, P. 2017. Bioactivity and chemical components of Thai rice in five stages of grain development. **Journal of cereal science**, 74(136-144).
- Joshiyura, K. J., Ascherio, A., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Rimm, E. B., Speizer, F. E., Hennekens, C. H., Spiegelman, D. & Willett, W. C. 1999. Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. **Jama**, 282(13), 1233-1239.

- Kaur, C. & Kapoor, H. C. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium's health. **International journal of food science & technology**, 36(7), 703-725.
- Kawahigashi, H., Hirose, S., Iwai, T., Ohashi, Y., Sakamoto, W., Maekawa, M. & Ohkawa, Y. 2007. Chemically induced expression of rice OSB2 under the control of the OsPR1. 1 promoter confers increased anthocyanin accumulation in transgenic rice. **Journal of agricultural and food chemistry**, 55(4), 1241-1247.
- Kim, B.-G., Lee, E.-R. & Ahn, J.-H. 2012. Analysis of flavonoid contents and expression of flavonoid biosynthetic genes in *Populus euramericana* Guinier in response to abiotic stress. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, 55(1), 141-145.
- Kim, B. G., Kim, J. H., Min, S. Y., Shin, K.-H., Kim, J. H., Kim, H. Y. & Ryu, S. N. 2007. Anthocyanin content in rice is related to expression levels of anthocyanin biosynthetic genes. **Journal of Plant Biology**, 50(2), 156-160.
- Kim, C.-K., Cho, M.-A., Choi, Y.-H., Kim, J.-A., Kim, Y.-H., Kim, Y.-K. & Park, S.-H. 2011. Identification and characterization of seed-specific transcription factors regulating anthocyanin biosynthesis in black rice. **Journal of applied genetics**, 52(2), 161-169.
- Kim, D.-H., Park, S., Lee, J.-Y., Ha, S.-H., Lee, J.-G. & Lim, S.-H. 2018. A rice B-Box protein, OsBBX14, finely regulates anthocyanin biosynthesis in rice. **International journal of molecular sciences**, 19(8), 2190.
- Kootstra, A. 1994. Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids. **Plant Molecular Biology**, 26(2), 771-774.
- Lachance, P. A., Nakat, Z. & Jeong, W.-S. 2001. Antioxidants: an integrative approach. **Nutrition**, 17(10), 835-838.
- Landrault, N., Poucheret, P., Ravel, P., Gasc, F., Cros, G. & Teissedre, P.-L. 2001. Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, 49(7), 3341-3348.
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J.-M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N. & Caboche, M. 2006. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 57(405-430).

- Lim, S.-H. & Ha, S.-H. 2013. Marker development for the identification of rice seed color. **Plant biotechnology reports**, 7(3), 391-398.
- Ling, W. H., Cheng, Q. X., Ma, J. & Wang, T. 2001. Red and black rice decrease atherosclerotic plaque formation and increase antioxidant status in rabbits. **The Journal of nutrition**, 131(5), 1421-1426.
- Maeda, H., Yamaguchi, T., Omoteno, M., Takarada, T., Fujita, K., Murata, K., Iyama, Y., Kojima, Y., Morikawa, M. & Ozaki, H. 2014. Genetic dissection of black grain rice by the development of a near isogenic line. **Breeding science**, 64(2), 134-141.
- Martin, C. & Paz-Ares, J. 1997. MYB transcription factors in plants. **Trends in Genetics**, 13(2), 67-73.
- Min, B., McClung, A. M. & Chen, M. H. 2011. Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color. **Journal of Food Science**, 76(1), C117-C126.
- Muntana, N. & Prasong, S. 2010. Study on total phenolic contents and their antioxidant activities of Thai white, red and black rice bran extracts. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 13(4), 170.
- Murphy, A., Peer, W. A. & Taiz, L. 2000. Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. **Planta**, 211(3), 315-324.
- Na Rachasima, L., Sukkasem, R., Pongjaroenkit, S., Sangtong, V., Chowpongpan, S. & Sakulsingharoj, C. 2017. Expression analysis and nucleotide variation of *OsC1* gene associated with anthocyanin pigmentation in rice. **Genomics and Genetics**, 10(3), 46-53.
- Nagao, S. & Takahashi, M.-e. 1963. Trial Construction of Twelve Linkage Groups in Japanese Rice:(Genetical Studies on Rice Plant, X X VII). **Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University**, 53(1), 72-130.
- Nam, S. H., Choi, S. P., Kang, M. Y., Koh, H. J., Kozukue, N. & Friedman, M. 2006. Antioxidative activities of bran extracts from twenty one pigmented rice cultivars. **Food Chemistry**, 94(4), 613-620.
- Oikawa, T., Maeda, H., Oguchi, T., Yamaguchi, T., Tanabe, N., Ebana, K., Yano, M., Ebitani, T. & Izawa, T. 2015. The birth of a black rice gene and its local spread by introgression. **The Plant Cell**, 27(9), 2401-2414.
- Oshima, M., Taniguchi, Y., Akasaka, M., Abe, K., Ichikawa, H., Tabei, Y. & Tanaka, J. 2019.

- Development of a visible marker trait based on leaf sheath-specific anthocyanin pigmentation applicable to various genotypes in rice. **Breeding Science**, 18151.
- Peanparkdee, M., Patrawart, J. & Iwamoto, S. 2019. Effect of extraction conditions on phenolic content, anthocyanin content and antioxidant activity of bran extracts from Thai rice cultivars. **Journal of cereal science**, 86(86-91).
- Rahman, M. M., Lee, K. E. & Kang, S. G. 2016. Allelic gene interaction and anthocyanin biosynthesis of purple pericarp trait for yield improvement in black rice. **Journal of Sciences**, 26(6), 727-736.
- Raveendar, S. & Ignacimuthu, S. 2010. Improved Agrobacterium Mediated Transformation in Cowpea *Vigna unguiculata* L. Walp. **Asian Journal of Plant Sciences**, 9(5), 256.
- Reddy, V. 1998. Cloning and characterization of the rice homologue of the maize *C1* anthocyanin regulatory gene. **Plant Mol. Biol.**, 36(497-498).
- Reddy, V., Dash, S. & Reddy, A. 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. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, 91(2), 301-312.
- Saika, H., Sakamoto, W., Maekawa, M. & Toki, S. 2011. Highly efficient visual selection of transgenic rice plants using green fluorescent protein or anthocyanin synthetic genes. **Plant biotechnology**, 28(1), 107-110.
- Saitoh, K., Onishi, K., Mikami, I., Thidar, K. & Sano, Y. 2004. Allelic diversification at the *C* (*OsC1*) locus of wild and cultivated rice. **Genetics**, 168(2), 997-1007.
- Sakamoto, W., Ohmori, T., Kageyama, K., Miyazaki, C., Saito, A., Murata, M., Noda, K. & 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 and cell physiology**, 42(9), 982-991.
- Sakulsingharoj, C., Inta, P., Sukkasem, R., Pongjaroenkit, S., Chowpongpan, S. & Sangtong, V. 2014. Overexpression of *OSB2* gene in transgenic rice up-regulated expression of structural genes in anthocyanin biosynthesis pathway. **Thai J. Genet**, 7(3), 173-182.

- Sakulsingharoj, C., Inta, P., Sukkasem, R., Pongjaroenkit, S., Chowpongpan, S. & Sangtong, V. 2016. Cloning and characterization of OSB1 gene controlling anthocyanin biosynthesis from Thai black rice. **Genomics and Genetics**, 9(1), 7-18.
- Schijlen, E. G., De Vos, C. R., van Tunen, A. J. & Bovy, A. G. 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. **Phytochemistry**, 65(19), 2631-2648.
- Serafini, M. 2006. The role of antioxidants in disease prevention. **Medicine**, 34(12), 533-535.
- Shao, Y., Xu, F., Sun, X., Bao, J. & Beta, T. 2014. Phenolic acids, anthocyanins, and antioxidant capacity in rice (*Oryza sativa* L.) grains at four stages of development after flowering. **Food chemistry**, 143(90-96).
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J. E. & Kakuda, Y. 2003. Polyphenolics in grape seeds- biochemistry and functionality. **Journal of medicinal food**, 6(4), 291-299.
- Shih, C. H., Chu, H., Tang, L. K., Sakamoto, W., Maekawa, M., Chu, I. K., Wang, M. & Lo, C. 2008. Functional characterization of key structural genes in rice flavonoid biosynthesis. **Planta**, 228(6), 1043-1054.
- Shin, Y. M., Park, H. J., Yim, S. D., Baek, N. I., Lee, C. H., An, G. & Woo, Y. M. 2006. Transgenic rice lines expressing maize *C1* and *R-S* regulatory genes produce various flavonoids in the endosperm. **Plant biotechnology journal**, 4(3), 303-315.
- Sompong, R., Siebenhandl-Ehn, S., Linsberger-Martin, G. & Berghofer, E. 2011. Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. **Food chemistry**, 124(1), 132-140.
- Southwestern, T. a. 2019. How Does Grass Grow. (Publication. Available <http://tscra.org/how-does-grass-grow/>
- Sun, X., Zhang, Z., Chen, C., Wu, W., Ren, N., Jiang, C., Yu, J., Zhao, Y., Zheng, X. & Yang, Q. 2018. The *C-S-A* gene system regulates hull pigmentation and reveals evolution of anthocyanin biosynthesis pathway in rice. **Journal of experimental botany**, 69(7), 1485-1498.
- Tamimi, R. M., Hankinson, S. E., Campos, H., Spiegelman, D., Zhang, S., Colditz, G. A., Willett, W. C. & Hunter, D. J. 2005. Plasma carotenoids, retinol, and

- tocopherols and risk of breast cancer. **American Journal of Epidemiology**, 161(2), 153-160.
- Toki, S. 1997. Rapid and efficient Agrobacterium-mediated transformation in rice. **Plant Molecular Biology Reporter**, 15(1), 16-21.
- Wakasa, Y., Ozawa, K. & Takaiwa, F. 2012. Agrobacterium-mediated co-transformation of rice using two selectable marker genes derived from rice genome components. **Plant cell reports**, 31(11), 2075-2084.
- Yamuangmorn, S., Dell, B., Du, X., Ren, Y. & Prom-u-thai, C. 2019. Simultaneous Quantification of Anthocyanins and Phenolic Acids in Pigmented Rice (*Oryza sativa*) using UPLC-PDA/ESI-Q-TOF. **International Journal of Agriculture and Biology**, 21(3), 590-596.
- Zaupa, M., Calani, L., Del Rio, D., Brighenti, F. & Pellegrini, N. 2015. Characterization of total antioxidant capacity and (poly) phenolic compounds of differently pigmented rice varieties and their changes during domestic cooking. **Food chemistry**, 187(338-347).
- Zheng, J., Wu, H., Zhu, H., Huang, C., Liu, C., Chang, Y., Kong, Z., Zhou, Z., Wang, G. & Lin, Y. 2019. Determining factors, regulation system, and domestication of anthocyanin biosynthesis in rice leaves. **New Phytologist**.
- Zhou, L.-L., Zeng, H.-N., Shi, M.-Z. & Xie, D.-Y. 2008. Development of tobacco callus cultures over expressing Arabidopsis *PAP1/MYB75* transcription factor and characterization of anthocyanin biosynthesis. **Planta**, 229(1), 37.
- Zhu, F., Cai, Y.-Z., Bao, J. & Corke, H. 2010. Effect of γ -irradiation on phenolic compounds in rice grain. **Food Chemistry**, 120(1), 74-77.
- Zhu, Q., Yu, S., Zeng, D., Liu, H., Wang, H., Yang, Z., Xie, X., Shen, R., Tan, J. & Li, H. 2017a. Development of “purple endosperm rice” by engineering anthocyanin biosynthesis in the endosperm with a high-efficiency transgene stacking system. **Molecular plant**, 10(7), 918-929.
- Zhu, Q., Yu, S., Zeng, D., Liu, H., Wang, H., Yang, Z., Xie, X., Shen, R., Tan, J. & Li, H. 2017. Development of “Purple Endosperm Rice” by Engineering Anthocyanin Biosynthesis in the Endosperm with a High-Efficiency Transgene Stacking System.

Molecular Plant.





ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้ออะโกราแบคทีเรีย

ภาคผนวกที่ 1 สูตรอาหาร LB Medium (Luria-Bertani Medium)

องค์ประกอบ	ปริมาณ 1 L
Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
Agar for Bacteria	15 g
ปรับ pH = 7 ด้วย 5N NaOH	
Autoclave	

- ชั่งสารต่าง ๆ ตามตารางเมื่อครบละลายสารในบีกเกอร์
- เติมน้ำลงในบีกเกอร์ครึ่งของปริมาณที่ต้องการ
- ปรับปริมาตรสุดท้ายตามปริมาณที่ต้องการ
- ปรับ pH = 7 ด้วย 5N NaOH
- หากใส่วุ้นแบคทีเรีย ชั่ง 15 กรัม ใส่ลงในขวดก่อนเติมสารตามลงไป
- นำไป Autoclave
- รอให้อาหารอุ่นจึงเติมสารปฏิชีวนะ
- อาหาร LB แข็ง (ใช้สำหรับใช้เลี้ยงเชื้อเพื่อต้องการโคโลนีเดี่ยว) เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 mg/L และ ไรแฟมพิซิน 50 mg/L
- อาหาร LB เหลว (ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อก่อนการถ่ายยีนเติมสารปฏิชีวนะเมื่อต้องการใช้) เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 mg/L และอะซิโตไซริงกอน 100 μ M

สูตรอาหารสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว

ภาคผนวกที่ 2 อาหารสูตร N6D Medium สำหรับการชักนำเมล็ดข้าวให้เกิดแคลลัส และเพาะเลี้ยงแคลลัสก่อนการถ่ายยีน

องค์ประกอบ	ปริมาณ 1 L
N6 stock	
Stock 1	20 ml
Stock 2	5 ml
Stock 3	5 ml
Stock 4	5 ml
N6 vitamin	1 ml
2,4-D	10 ml
KNO ₃	2.830 g
Sucrose	30 g
Myo-inositol	100 mg
Casamino acid	300 mg
L proline	2.978 g
ปรับ pH = 5.8 1N KHO	
เติมวุ้น Gellan Gum (Gelrite) 2 g / 500 ml (0.4%)	
Autoclave	

- ชั่งสารต่าง ๆ ตามตารางเมื่อครบเติมน้ำลงในบีกเกอร์ครึ่งของปริมาตรที่ต้องการ
- เติม N6 stock, 2,4-D และ N6 vitamin ละลายสารในบีกเกอร์จนหมด
- ปรับปริมาตรสุดท้ายตามปริมาตรที่ต้องการ
- ปรับ pH = 5.8 ด้วย 1N KHO
- เติมวุ้น Gellan Gum (Gelrite) 2 g / 500 ml (0.4%)
- Autoclave และเทอาหารลงในเพลท

ภาคผนวกที่ 3 อาหารสูตร 2N6-AS สำหรับปลูกเชื้อ (Infection) และเพาะเลี้ยงร่วม (Co-culture)

องค์ประกอบ	ปริมาณ 1 L
N6 stock	
Stock 1	20 ml
Stock 2	5 ml
Stock 3	5 ml
Stock 4	5 ml
N6 vitamin	1 ml
2,4-D	10 ml
Sucrose	30 g
Glucose	10 g
KNO ₃	2.830 g
Myo-inositol	100 mg
Casamino acid	300 mg
ปรับ pH = 5.2 1N KHO	
เติมวุ้น Gellan Gum (Gelrite) 2 g / 500 ml (0.4%)	
Autoclave	

- ชั่งสารต่าง ๆ ตามตารางเมื่อครบเติมน้ำลงในบีกเกอร์ครึ่งของปริมาณที่ต้องการ
- เติม N6 stock, 2,4-D และ N6 vitamin ละลายสารในบีกเกอร์จนหมด
- ปรับปริมาตรสุดท้ายตามปริมาณที่ต้องการ
- ปรับ pH = 5.2 ด้วย 1N KHO
- เติมวุ้น Gellan Gum (Gelrite) 2 g / 500 ml (0.4%) แต่ไม่เติมอาหารสำหรับปลูกเชื้อ
- นำไป Autoclave
- สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงร่วม (Co-culture) เติมอะซิโตไซริงกอน 100 μ M และเทอาหารลงในเพลท

ภาคผนวกที่ 4 อาหารสูตร 2N6 สำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ

องค์ประกอบ	ปริมาณ 1 L
N6 stock	
Stock 1	20 ml
Stock 2	5 ml
Stock 3	5 ml
Stock 4	5 ml
N6 vitamin	1 ml
2,4-D	10 ml
Sucrose	30 g
KNO ₃	2.830 g
Myo-inositol	100 mg
Casamino acid	300 mg
ปรับ pH = 5.2 1N KHO	
Autoclave	

- ชั่งสารต่าง ๆ ตามตารางเมื่อครบเติมน้ำลงในบีกเกอร์ครึ่งของปริมาตรที่ต้องการ
- เติม N6 stock, 2,4-D และ N6 vitamin ละลายสารในบีกเกอร์ทั้งหมด
- ปรับปริมาตรสุดท้ายตามปริมาตรที่ต้องการ
- ปรับ pH = 5.2 ด้วย 1N KHO
- Autoclave และเทอาหารลงในเพลท

ภาคผนวกที่ 5 อาหารสูตร SMI (N6D Medium) ใช้สำหรับคัดเลือกเซลล์ส์ที่ผ่านการถ่ายยีน

องค์ประกอบ	ปริมาณ 1 L
N6 stock	
Stock 1	20 ml
Stock 2	5 ml
Stock 3	5 ml
Stock 4	5 ml
N6 vitamin	1 ml
2,4-D	10 ml
KNO ₃	2.830 g
Sucrose	30 g
Myo-inositol	100 mg
Casamino acid	300 mg
L proline	2.978 g
ปรับ pH = 5.8 1N KHO	
เติมวุ้น Gellan Gum (Gelrite) 2 g / 500 ml (0.4%)	
Autoclave	

- ชั่งสารต่าง ๆ ตามตารางเมื่อครบเติมน้ำลงในบีกเกอร์ครึ่งของปริมาตรที่ต้องการ
- เติม N6 stock, 2,4-D และ N6 vitamin ละลายสารในบีกเกอร์จนหมด
- ปรับปริมาตรสุดท้ายตามปริมาตรที่ต้องการ
- ปรับ pH = 5.8 ด้วย 1N KHO
- เติมวุ้น Gellan Gum (Gelrite) 2 g / 500 ml (0.4%)
- Autoclave และเทอาหารลงในเพลท
- เติมสารปฏิชีวนะ ไฮโอมัยซิน 15 mg/L และไทเมทิน 150 mg/L

ภาคผนวกที่ 6 อาหารสูตร SMII (N6D Medium) ใช้สำหรับคัดเลือกเซลล์ส์ที่ผ่านการถ่ายยีน

องค์ประกอบ	ปริมาณ 1 L
N6 stock	
Stock 1	20 ml
Stock 2	5 ml
Stock 3	5 ml
Stock 4	5 ml
N6 vitamin	1 ml
2,4-D	10 ml
KNO ₃	2.830 g
Sucrose	30 g
Myo-inositol	100 mg
Casamino acid	300 mg
L proline	2.978 g
ปรับ pH = 5.8 1N KHO	
เติมวุ้น Gellan Gum (Gelrite) 2 g / 500 ml (0.4%)	
Autoclave	

- ชั่งสารต่าง ๆ ตามตารางเมื่อครบเติมน้ำลงในบีกเกอร์ครึ่งของปริมาตรที่ต้องการ
- เติม N6 stock, 2,4-D และ N6 vitamin ละลายสารในบีกเกอร์จนหมด
- ปรับปริมาตรสุดท้ายตามปริมาตรที่ต้องการ
- ปรับ pH = 5.8 ด้วย 1N KHO
- เติมวุ้น Gellan Gum (Gelrite) 2 g / 500 ml (0.4%)
- Autoclave และเทอาหารลงในเพลท
- เติมสารปฏิชีวนะ ไฮโอมัยซิน 30 mg/L และไทเมทิน 150 mg/L

ภาคผนวกที่ 7 อาหารสูตร Regeneration Medium (RM) สำหรับชักนำให้เกิดยอด

องค์ประกอบ	ปริมาณ 1 L
MS stock	
Stock 1	20 ml
Stock 2	5 ml
Stock 3	5 ml
Stock 4	5 ml
B5 vitamin	5 ml
Sucrose	30 ml
Sorbitol	30 g
Casamino acid	2 g
NAA (1 mg/L)	10 ml
Kinetin (2.5 mg/L)	1000 μ l
ปรับ pH = 5.8 ด้วย 1N KHO เติมวุ้น Gellan Gum (Gelrite) 2 g / 500 ml (0.4%) Autoclave	

- ชั่งสารต่าง ๆ ตามตารางเมื่อครบเติมน้ำลงในบีกเกอร์ครึ่งของปริมาตรที่ต้องการ
- เติม MS stock และ B5 vitamin ละลายสารในบีกเกอร์จนหมด
- ปรับปริมาตรสุดท้ายตามปริมาตรที่ต้องการ
- ปรับ pH = 5.8 ด้วย 1N KHO
- เติมวุ้น Gellan Gum (Gelrite) 2 g / 500 ml (0.4%)
- Autoclave และเทอาหารลงในเพลท
- เติมสารปฏิชีวนะ ไฮโอมัยซิน 30 mg/L และไทเมทิน 150 mg/L

ภาคผนวกที่ 8 อาหารสูตร MS Medium สำหรับเพาะเลี้ยงต้นข้าวเพื่อชักนำให้เกิดราก

องค์ประกอบ	ปริมาณ 1 L
MS stock	
Stock 1	20 ml
Stock 2	5 ml
Stock 3	5 ml
Stock 4	5 ml
B5 vitamin	5 ml
Sucrose	30 ml
ปรับ pH = 5.8 ด้วย 1N KHO	
เติมวุ้น Gellan Gum (Gelrite) 2 g / 500 ml (0.4%)	
Autoclave	

- ชั่งสารต่าง ๆ ตามตารางเมื่อครบเติมน้ำลงในบีกเกอร์ครึ่งของปริมาตรที่ต้องการ
- เติม MS stock และ B5 vitamin ละลายสารในบีกเกอร์จนหมด
- ปรับปริมาตรสุดท้ายตามปริมาตรที่ต้องการ
- ปรับ pH = 5.8 ด้วย 1N KHO
- เติมวุ้น Gellan Gum (Gelrite) 2 g / 500 ml (0.4%)
- Autoclave และเทอาหารลงในเพลท
- เติมสารปฏิชีวนะ ไฮโอมัยซิน 30 mg/L และไทเมทิน 150 mg/L



ภาคผนวก ข

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวลลิตา ณ ราชสีมา
เกิดเมื่อ	20 เมษายน 2537
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2559 ปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัย แม่โจ้ - แพร่ เฉลิมพระเกียรติ จังหวัดแพร่ พ.ศ. 2555 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนหอวังปทุมธานี จังหวัด ปทุมธานี
ประวัติการทำงาน	2562 Thai Journal of Science and Technology บทความวิจัย: การ ถ่ายยีนและวิเคราะห์การแสดงออกของยีน OsB2 ที่ควบคุมการสังเคราะห์ แอนโทไซยานินในข้าว 2562 National Genetics นำเสนอโปสเตอร์: การโคลนยีนและศึกษา คุณสมบัติของยีน OsC1 ที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวที่มี เยื่อหุ้มเมล็ดสีดำพันธุ์เก่า 2017 Genomics and Genetics Research Article: Expression analysis and nucleotide variation of OsC1 gene associated with anthocyanin pigmentation in rice