

การเพิ่มการแสดงออกและการถ่ายทอดยีน *OsDFR* ที่เกี่ยวข้อง ในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดิน ในข้าวตัดแปลงพันธุกรรม

Overexpression and Transmission of *OsDFR* Gene Involved in Anthocyanin and Proanthocyanidin Biosynthesis Pathway in Transgenic Rice

กนกภรณ์ คำโมนะ, แสงทอง พงษ์เจริญกิต,
วารภรณ์ แสงทอง และชอทิพา สกุลสิงหาโรจน์*
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

ศรีเมฆ ชาวโพพาง

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Kanogporn Khammona, Saengtong Pongjaroenkit,

Varaporn Sangtong and Chotipa Sakulsingharoj*

Program in Genetics, Faculty of Science, Maejo University,

Nonghan, Sansai, Chiang Mai 50290

Srimek Chowpongpan

National Science and Technology Development Agency, Thailand Science Park,

Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

ยีน *OsDFR* ซึ่งมีรหัสสร้างเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) เป็นยีนโครงสร้างที่สำคัญในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิดิน งานวิจัยนี้ได้โคลนยีนและศึกษาหน้าที่ของยีน *OsDFR* ที่มีต่อการสังเคราะห์สีของเยื่อหุ้มเมล็ดในข้าวไทย โดยการโคลนยีน *OsDFR* จากข้าวดำพันธุ์เก่า และสร้างชุดยีนให้อยู่ภายใต้การควบคุมของ dual 35S promoter และ nos terminator แล้วถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวแดงพันธุ์ Kasalath พบว่าแคลลัสมีการเจริญเติบโตเกิดจุดเขียวและพัฒนาเป็นต้น เมื่อนำต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนมาตรวจสอบยีน *OsDFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าให้ผลเป็นบวก 77.78 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบการกระจายตัวของยีน *gusA* และยีน *OsDFR* ในข้าวตัดแปลงพันธุกรรม พบว่ามีการถ่ายทอดของยีนไปสู่รุ่นลูก

T₁ เป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ อัตราส่วน 3:1 แสดงว่ามีการแทรกของยีนเข้าไปหนึ่งตำแหน่งในจีโนมข้าว นอกจากนี้การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อใบของข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁ โดยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกของยีน *OsDFR* สูงสุด 38 เท่า อย่างไรก็ตาม ข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนมีฟีโนไทป์เหมือนกับต้น wild-type แสดงว่าการเพิ่มการแสดงออกของยีน *OsDFR* ยีนเดียวไม่สามารถทำให้เพิ่มการสังเคราะห์สีในข้าวแดงได้ ซึ่งสนับสนุนกลไกการสร้างสีในข้าวที่จำเป็นต้องมียีนควบคุมที่สร้างทรานสคริปชันแฟกเตอร์ทำงานร่วมกับยีน *OsDFR*

คำสำคัญ : ข้าว; การถ่ายยีน; ยีน *OsDFR*; แอนโทไซยานิน; โปรแอนโทไซยานิน

Abstract

OsDFR gene encoding dihydroflavonol 4-reductase (DFR) is an important structural gene involved in anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in rice. In this study, we cloned *OsDFR* gene and examined gene function in color biosynthesis in Thai rice caryopsis. The *OsDFR* gene from Thai black rice cv. Khum was constructed under the control of dual 35S promoter and *nos* terminator and transformed into red rice cv. Kasalath. After cocultivation, it was found that hygromycin-resistant calli were grown, developed green spots, and regenerated to plantlets. PCR analysis showed 77.78 % of rice plants carrying *OsDFR* transgene. Segregation analysis of *gusA* and *OsDFR* genes showed the ratio of 3:1 in T₁ generation, indicating a single gene insertion site in genome of transgenic rice. Furthermore, semi-quantitative RT-PCR analysis revealed that the T₁ transgenic rice plant overexpressed *OsDFR* gene in leaf tissues was up to 38 fold. However, the phenotypes of transgenic rice plants were similar to those of wild-type. The results suggested that overexpression of *OsDFR* gene could not enhance anthocyanin and proanthocyanidin pigmentation, supporting that other genes including regulatory genes that encode transcription factors are required to complement effect with *OsDFR*.

Keywords: rice; transformation; *OsDFR* gene; anthocyanin; proanthocyanidin

1. คำนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจและสินค้าเกษตรส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย และเป็นพืชอาหารหลักที่สำคัญของคนในชาติและทวีปเอเชีย ในปัจจุบันนี้ได้มีผู้บริโภคที่ใส่ใจสุขภาพและนักวิจัยจำนวนมากหันมาสนใจข้าวพื้นเมืองพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำและแดง ซึ่งมีสารแอนโทไซยานิน และโปรแอนโทไซยานิน สารเหล่านี้เป็นประโยชน์อย่างมากต่อสุขภาพ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และ

ช่วยปกป้องหลอดเลือด (vasoprotective) โดยการขยายหลอดเลือด และกระตุ้นการไหลเวียนของเลือด ลดคอเลสเตอรอลในเลือดโดยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (lipid peroxidation) (Francis *et al.*, 2002) ลดความเสี่ยงของโรคมะเร็งและต้านไวรัส (Zhao *et al.*, 2009) ซึ่งการสังเคราะห์สีในข้าวเกิดจากการทำงานของยีน 2 กลุ่ม ได้แก่ ยีนควบคุม (regulatory /

transcription factor gene) และยีนโครงสร้าง (structural gene)

ยีนโครงสร้างที่สำคัญ คือ ยีน *OsDFR* หรือ *Rd* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 ของข้าว ที่ตำแหน่ง 83 cM (Kinoshita, 1995) ประกอบด้วย 3 เอกซอน และ 2 อินทรอน (Nakai *et al.*, 1998) มีรหัสสร้างเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่เร่งปฏิกิริยาอยู่ระหว่างทางแยกของวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิน จากการศึกษากายของ Furukawa *et al.* (2007) พบว่าในข้าวสีแดงที่มีการสะสมของสารโปรแอนโทไซยานินเกิดจากการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในตำแหน่ง *Rd* ที่ทำหน้าที่ในการส่งเสริมการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานินร่วมกับการแสดงออกของยีน *Rc* ซึ่งทำหน้าที่เป็น ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน basic helix-loop-helix (bHLH) จากการศึกษากายโดยการโคลนยีน *DFR* จากข้าวพันธุ์ Murasakiine ที่มีจีโนมไทป์ *rcRd* แล้วถ่ายยีนไปสู่ข้าวสายพันธุ์ *tRc* ที่มีจีโนมไทป์เป็น *RcRd* พบว่าได้ข้าวที่มีจีโนมไทป์แบบ *RcRd* และมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง ถ้าเกิดการกลายพันธุ์ที่ยีน *Rd* จะได้จีโนมไทป์แบบ *RcRd* มีผลทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีน้ำตาล และหากเกิดการกลายพันธุ์ที่ยีน *Rc* จะได้จีโนมไทป์อยู่ 2 แบบ คือ *rcRd* และ *rcrd* มีผลทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีขาว และพบว่า *DFR* เป็นเอนไซม์สำคัญ (key enzyme) ในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิน (Furukawa *et al.* 2007) นอกจากนี้ Wang *et al.* (2013) ได้ศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน *DFR* โดยวิธี RNAi ในมันเทศสีม่วง พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดสีม่วงในมันเทศได้ โดยทำให้เกิดสีนวลลง แสดงว่ายีน *DFR* เป็นยีนที่สำคัญในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีน *OsDFR* จากข้าวไทยที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ และถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวแดงพันธุ์ Kasalath เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีน *OsDFR* ในการส่งเสริมการสังเคราะห์สีในข้าว ทำให้เข้าใจการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิน และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การสร้าง construct ของชุดยีน *OsDFR*

สกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อนอายุ 14 วัน ของข้าวดำพันธุ์เก่า (จากหมู่บ้านหนองเต่าคำ จังหวัดเชียงใหม่) กำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนโดยเติมเอนไซม์ DNase I (New England Biolabs, USA) และนำมาสังเคราะห์ cDNA โดยปฏิกิริยา reverse transcription (RT) โดยใช้ oligo (dT) ทำตามขั้นตอนของชุดสำเร็จรูป Superscript III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific, USA)

นำ cDNA ที่ได้มาเป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณยีน *OsDFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, USA) และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* (AB003496.1) คือ *OsDFR* cds-38F: 5'- GAA TCC AAC ACA AGC AGA TC -3' และ *OsDFR* cds+25R: 5'- GTT CTC TGG ACT CAC TAG TC -3' โคลนยีนไปสู่พลาสมิด pBluescript II SK (+) คัดเลือกโคลนและสังเคราะห์ลำดับเบส จากนั้นสร้างชุดยีน โดยการโคลนยีนไปสู่พลาสมิด p2CA ซึ่งจะได้ชุดยีน *OsDFR* ที่ประกอบด้วย dual 35SP::*OsDFR*::*Tnos* นำไปเชื่อมกับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ทำให้ได้พลาสมิด T-DNA ซึ่งให้ชื่อว่า pCAMBIAKNLDFR-1 (รูป

ที่ 1A) และนำไปถ่ายเข้าสู่โกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 เพื่อใช้สำหรับถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว

2.2 การถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของข้าว

นำเมล็ดแก่ของข้าวพันธุ์ Kasalath ซึ่งเป็นข้าว *indica* ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง มาลอกเปลือกออก แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วย 75 % เอทานอล และ 10 % โซเดียมไฮโปคลอไรต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 4-5 ครั้ง ซับเมล็ดให้แห้ง และนำเมล็ดข้าวมาชักนำให้เกิดแคลลัส โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6D Toki (1997) ในที่มีอุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-6 สัปดาห์ ย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิม เป็นเวลา 4 วัน และนำไปถ่ายยีน โดยใช้โกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIAKNLDFR-1 ตามวิธีดัดแปลงจาก Endo และคณะ (2002) และ Sakulsingharoj และคณะ (2015)

หลังจากนั้นสุมแคลลัสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงร่วม มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gusA* ด้วยเทคนิค GUS assay (Jefferson *et al.*, 1987) และนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินร่วมกับไทเมนติน เป็นเวลา 1 เดือน แล้วย้ายแคลลัสที่รอดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินร่วมกับไทเมนติน และย้ายแคลลัสลงอาหารใหม่ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงจนกว่าจะได้ต้น ย้ายต้นข้าวที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เพื่อชักนำให้เกิดราก และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gusA* ด้วยเทคนิค GUS assay ก่อนย้ายปลูกในโรงเรือนกระจก

2.3 การวิเคราะห์ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมโดยเทคนิคพีซีอาร์

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *gusA* ด้วยวิธี CTAB ดัดแปลง (Hwang and Kim, 2000) และวิเคราะห์

ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* คือ *OsDFR*cds-38F และ *Tnos_R*: 5'-GCG TAT TAA ATG TAT AAT TGC GGG AC -3' เพื่อตรวจสอบยีน *OsDFR* ที่ถ่ายเข้าไปเพิ่ม (transgene) เนื่องจากในข้าวมียีน *OsDFR* ที่เป็น endogenous gene อยู่แล้ว กำหนดสภาวะการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิแต่ละขั้นตอนดังนี้ เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยการทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ กำหนดอุณหภูมิและเวลา คือ denaturation 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที annealing 67 °C เป็นเวลา 30 วินาที extension 72 °C เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย final extension 72 °C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำผลผลิตของพีซีอาร์มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

2.4 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์

สกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อนอายุ 1 เดือน จากต้นข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *gusA* และมีผลพีซีอาร์เป็นบวกตามวิธี TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) จากนั้นกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนโดยเติมเอนไซม์ DNase I (New England Biolabs, USA) นำอาร์เอ็นเอที่ผ่านการกำจัดดีเอ็นเอมาสังเคราะห์ cDNA โดยปฏิกิริยา reverse transcription (RT) โดยใช้ oligo (dT) ทำตามขั้นตอนของชุดสำเร็จรูป High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA) นำ cDNA ที่เตรียมได้ มาเป็นแม่พิมพ์ในการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *OsDFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ MyTaq HS Red Mix, 2x (Bioline, USA) และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* มีลำดับเบสของไพรเมอร์ดังนี้ *OSDFR-RT_F*: 5'-GCC CAC TAC TCG ATC CTG AA -3' และ *OSDFR-RT_R*: 5'-CAG CGT GTA CCT GAA CCT GA -3' กำหนดสภาวะการเปลี่ยนแปลง

ของอุณหภูมิแต่ละขั้นตอนดังนี้ เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยการทำปฏิกิริยา จำนวน 29 รอบ ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ กำหนดอุณหภูมิและเวลา คือ denaturation 95 °C เป็นเวลา 1 นาที annealing 57 °C เป็นเวลา 1 นาที extension 72 °C เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย final extension 72 °C เป็นเวลา 5 นาที และใช้ยีน *OsActin* เป็นยีนควบคุม โดยมีลำดับเบสของไพรเมอร์ดังนี้ *OsActinF*: 5'- TGA TGC GCC CAG GGC TGT CT -3' และ *OsActinR*: 5'- CTC AAC CCC AAG GCC AAT CG -3' จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน (*OsDFR*/*OsActin* ratio) โดยใช้เครื่อง Gel Doc™ XR+ with Image Lab™ Software (BIO-RAD, USA) โดยทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

2.5 การวิเคราะห์การถ่ายทอดยีน

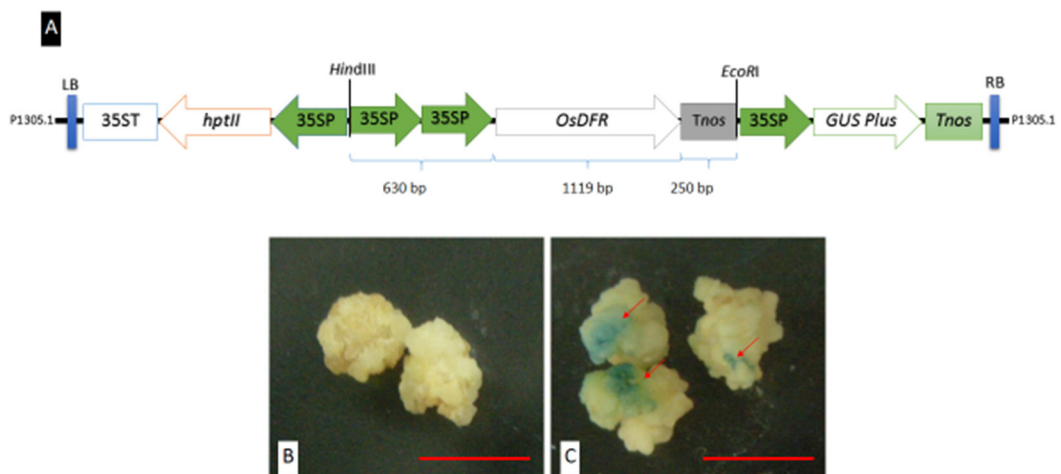
นำเมล็ดข้าวรุ่น T₁ จากต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₀ จำนวน 25 เมล็ดต่อต้น มาเพาะเป็นเวลา 2 สัปดาห์ นำชิ้นส่วนใบของต้นกล้ามา

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gusA* ด้วยเทคนิค GUS assay (Jefferson *et al.*, 1987) แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์การถ่ายทอดพันธุกรรมของยีนตามกฎของเมนเดลด้วยวิธีไคสแควร์ ที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 และ Degree of freedom (df) เท่ากับ 1 นอกจากนี้ นำใบอ่อนของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₁ มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบการถ่ายทอดยีน *OsDFR* ไปสู่รุ่นลูก

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวและการทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีน

เมื่อเชื่อมต่อชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::*Tnos* เข้าสู่พลาสมิด pCAMBIA1305.1 ทำให้ได้พลาสมิด T-DNA คือ pCAMBIAKNLDFR-1 ดังแสดงในรูปที่ 1A ภายในบริเวณ LB และ RB ประกอบไปด้วยชุดยีน dual 35SP::*OsDFR*::*Tnos* มียีน *gusA* เป็นยีนรายงานผล และยีน *hptII* (ต้าน-



รูปที่ 1 โครงสร้างพลาสมิด T-DNA สำหรับการถ่ายยีน *OsDFR* เข้าสู่ข้าว และการทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยเทคนิค GUS assay (bar = 0.5 cm) [หมายเหตุ : (A) ประกอบด้วย LB คือ Left border, RB คือ Right border, 35SP คือ 35S Promoter, 35ST คือ 35S Terminator, *OsDFR* คือ ยีนที่สร้าง

เอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase (DFR), *Tnos* คือ *nos Terminator*, *GUS Plus* คือ ยีนรายงานผล *gusA*, และ *hptII* คือ ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (B) คือ แคลลัสชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (C) คือ แคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน]

ทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน) เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก ซึ่งบริเวณเหล่านี้จะถูกส่งผ่านไปสู่จีโนมของข้าว

การเพาะเลี้ยงร่วมระหว่างแคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath กับอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIAKNLDFR-1 เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นล้างแคลลัสและตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนด้วยวิธี GUS assay พบว่ามีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 1B-C) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Prodhan และ Komamine (2007) ที่พบว่าในข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับการถ่ายยีนมีการแสดงออกของยีน *gusA* สูง 97-100 เปอร์เซ็นต์

3.2 การคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีนและการชักนำให้เกิดเกิดต้น

การเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIAKNLDFR-1 บนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 1 ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 15 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสมีลักษณะเป็นสีเหลืองและรอดตายทั้งหมด จากนั้นย้ายแคลลัสที่รอดไปบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสมีเปอร์เซ็นต์รอดบน

อาหารคัดเลือกจากการถ่ายยีนครั้งที่ 1 และ 2 คิดเป็น 100 และ 98.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) แคลลัสบางส่วนไม่มีการเจริญเติบโต กลายเป็นสีน้ำตาล และตาย (รูปที่ 2A-B)

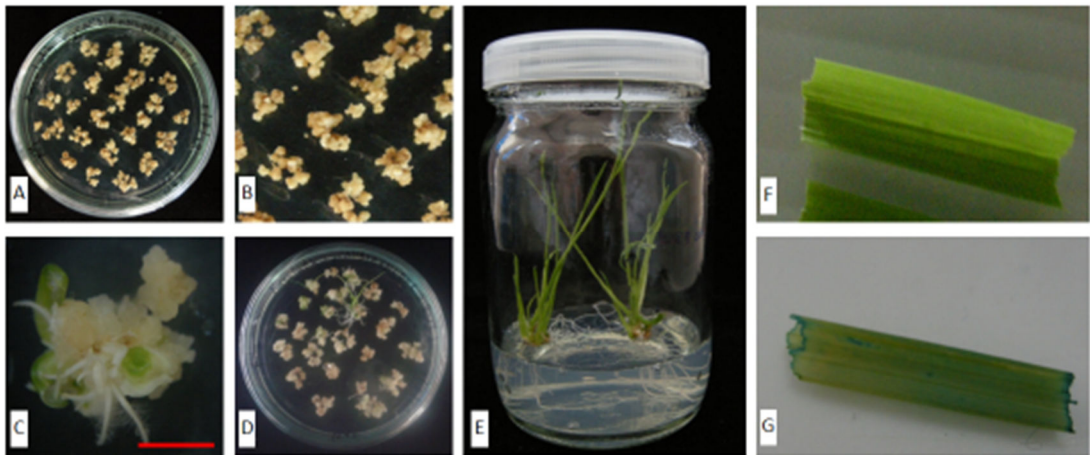
หลังจากวางแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีนบนอาหารชักนำให้เกิดต้นเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่เกิดจุดเขียวจากการถ่ายยีนครั้งที่ 1 และ 2 คิดเป็น 70.83 และ 57.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพัฒนาเป็นยอดและราก (รูปที่ 2C-D) การเกิดต้นจากการถ่ายยีนครั้งที่ 1 และ 2 คิดเป็น 45.83 และ 42.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Saika และ Toki (2010) ซึ่งทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ใช้เป็นข้าว *indica* ต้นแบบในการถ่ายยีน พบว่ามีประสิทธิภาพการเกิดต้น 66.9 เปอร์เซ็นต์ ย้ายต้นข้าวไปบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดรากและเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ (รูปที่ 2E) และปลูกในกระถางต่อไป

จากการถ่ายยีนครั้งที่ 1 และ 2 ได้ต้นข้าวทั้งหมดจำนวน 11 และ 22 ต้น ตามลำดับ มีต้นที่มีการเจริญเติบโตทั้งหมด 9 และ 18 ต้น ตามลำดับ

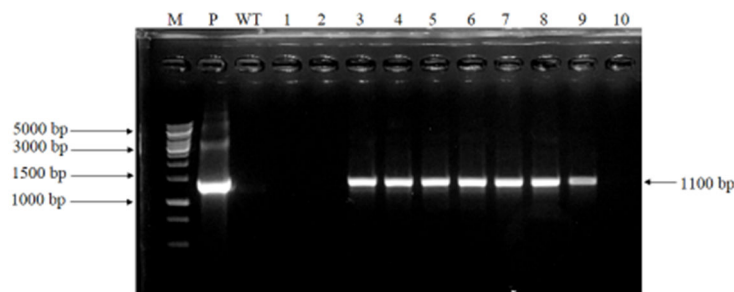
ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การรอดของแคลลัส การเกิดจุดเขียว และการเกิดต้น หลังการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pCAMBIAKNLDFR-1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตรและไทเมนทิน 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

ครั้งที่ถ่ายยีน	จำนวนกลุ่มแคลลัสทั้งหมด	จำนวนแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 ^(a)	จำนวนกลุ่มแคลลัสที่เกิดจุดเขียว ^(b)	จำนวนต้นทั้งหมด ^(c)
1	24	24/24 (100)	17/24 (70.83)	11/24 (45.83)
2	53	52/53 (98.11)	30/52 (57.69)	22/52 (42.31)

หมายเหตุ : ตัวเลขในวงเล็บ หมายถึง แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์, (a) = (จำนวนแคลลัสที่รอด/จำนวนแคลลัสเริ่มต้น) $\times$ 100, (b) = (จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียว + จำนวนแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2) $\times$ 100, (c) = (จำนวนต้น + จำนวนแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2) $\times$ 100



รูปที่ 2 ลักษณะและการพัฒนาของแคลลัสข้าวพันธุ์ Kasalath หลังการถ่ายยีน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรคัดเลือกและชักนำให้เกิดต้น และการตรวจสอบใบข้าวโดยวิธี GUS assay [หมายเหตุ : (A-B) คือ แคลลัสที่วางบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์, (C-D) แคลลัสที่วางบนอาหารชักนำให้เกิดต้น เป็นเวลา 4-5 สัปดาห์, (E) ลักษณะต้นสมบูรณ์ของข้าวที่ได้จากการถ่ายยีน *OsDFR* เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 1 สัปดาห์, (F-G) คือ ใบข้าวที่ตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay จากต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และต้นที่ได้รับการถ่ายยีน ตามลำดับ]



รูปที่ 3 การตรวจสอบการแทรกของยีน *OsDFR* ในข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ [หมายเหตุ : ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder, ช่อง P คือ พลาสมิด pCAMBIAKNDLDFR-1, ช่อง WT คือ ดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, ช่องที่ 1-9 คือ ดีเอ็นเอจากข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน ต้นที่ 1-9 ตามลำดับ, ช่องที่ 10 คือ น้ำกลั่น]

นำใบข้าวมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gusA* พบว่า ข้าวที่นำมาตรวจสอบจำนวน 9 ต้น เกิดเป็นสีฟ้าทั้งหมด คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 2F-G) แสดงว่าเป็นต้นข้าวที่ได้รับยีน แล้วนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ต่อไป

3.3 การวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำจีโนมิกดีเอ็นเอของต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนและมีการแสดงออกของยีน *gusA* จำนวน 9 ต้น มาตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *OsDFR* ในจีโนมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* และบริเวณ *nos terminator* พบว่ามีต้นข้าวจำนวน 7 ต้น ที่เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,100 bp แสดงว่ามีการแทรกของชุดยีน *OsDFR* ในจีโนมข้าว คิดเป็น 77.78 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 3) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *gusA* อย่างไรก็ดีตาม เมื่อตรวจสอบลักษณะต้นข้าวพบว่า มีสีเขียว ไม่พบสีม่วงหรือแดงของแอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานิน

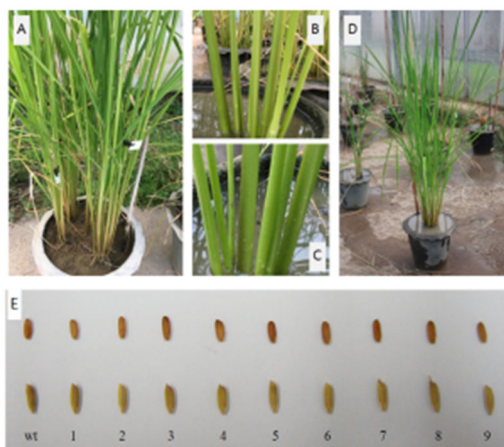
3.4 การตรวจสอบฟีโนไทป์ของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรม

จากผลการทดสอบต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมโดยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่ามีต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมทั้งหมด 7 ต้น ที่มียีน *OsDFR* แทรกอยู่ในจีโนม จึงนำมาปลูกและตรวจสอบลักษณะฟีโนไทป์ของลำต้นและใบ พบว่ามีลักษณะสีเขียว ไม่พบสีม่วงหรือแดง และไม่มีแตกต่างจากต้น wild-type นอกจากนี้ลักษณะสีเขียวเข้มเมล็ดของข้าวตัดแปลงพันธุกรรมไม่แตกต่างจากเมล็ดของต้น wild-type และต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนที่มีผลพีซีอาร์เป็นลบ ซึ่งไม่ได้รับยีน *OsDFR* (รูปที่ 4)

3.5 การทดสอบการกระจายตัวของยีนในรุ่น T_1

การวิเคราะห์การถ่ายทอดยีนในต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมไปสู่รุ่นลูกและตรวจสอบความ

เสถียรของยีนในต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรม (stable integration) โดยนำต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_0 จำนวน 5 ต้น ที่ได้รับยีน *OsDFR* มาทดสอบการกระจายตัวของยีน *gusA* ไปสู่รุ่นลูก T_1 (ตารางที่ 2) พบว่าผลจากการวิเคราะห์ค่า χ^2 มีค่าน้อยกว่าค่า χ^2 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ df เท่ากับ 1 ซึ่งมีค่า 3.841 แสดงว่ามีการถ่ายทอดของยีนไปสู่รุ่นลูก T_1 เป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ อัตราส่วน 3:1 ดังนั้นต้น T_0 ทุกต้นที่นำมาตรวจสอบมียีนแทรกอยู่หนึ่งตำแหน่ง (single insertion site) นอกจากนี้ได้นำจีโนมิกดีเอ็นเอของต้น T_1 มาตรวจสอบการถ่ายทอดของยีน *OsDFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (ไม่แสดงผล) พบว่าให้ผลสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *gusA* โดยมีอัตราส่วนการถ่ายทอดยีนเป็น 3:1



รูปที่ 4 การตรวจสอบฟีโนไทป์ของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีนในรุ่น T_0 [หมายเหตุ : (A-B) คือ ข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน, (C-D) คือ ข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (wild-type) และ (E) ประกอบด้วย wt คือ wild-type, 1-2 คือ ข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน แต่ไม่มียีน *OsDFR* แทรกอยู่ในจีโนม ต้นที่ 1-2, และ 3-9 คือ ต้นข้าวตัดแปลง

พันธุ์กรรมที่มียีน *OsDFR* ต้นที่ 3-9 ตามลำดับ]

3.6 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *OsDFR* ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบการกระจายตัวของยีน *gusA* ในต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_0 ที่มียีน *OsDFR*

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

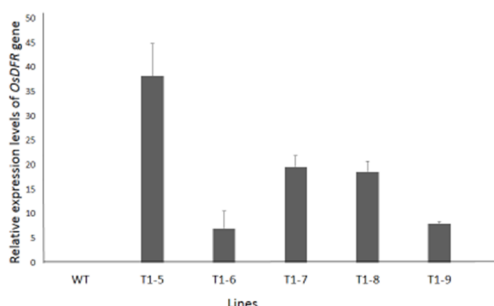
ทั้ง 5 ต้น ที่ผ่านการทดสอบการกระจายตัวของยีน และมีการแสดงออกของยีน *gusA* (ตารางที่ 2) มา สกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อน และสังเคราะห์ cDNA จากนั้นนำมาทดสอบการแสดงออกของยีน *OsDFR* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* และใช้ยีน *OsActin* เป็นยีนควบคุม พบว่า ไม่พบการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในต้น wild-type แต่มีการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 ทุกต้น เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 พบว่า ต้นที่ T1-5 มีการแสดงออกของยีน *OsDFR* สูงสุด คิดเป็น 38 เท่า (รูปที่ 5) จากการศึกษาของ Furukawa และคณะ (2007) พบว่าในข้าวสีแดงที่มีการสะสมของสารโปรแอนโทไซยานินเกิดจากการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในตำแหน่ง *Rd* ที่ทำหน้าที่ในการส่งเสริมการแสดงออกของข้าวสีแดง ร่วมกับการทำงานของยีน *Rc* ซึ่งทำหน้าที่สร้างทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่อยู่ในกลุ่มของโปรตีน

ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_0 และ T_1 ไม่พบลักษณะฟีโนไทป์ที่แตกต่างจากต้น wild-type จึงได้วิเคราะห์การแสดงออกของยีน *OsDFR* โดยนำต้น T_1 ที่ได้จากต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_0

basic helix-loop-helix (bHLH) (Furukawa *et al.*, 2007; Chandler *et al.*, 1989)

ข้าวพันธุ์ Kasalath ซึ่งมีเยื่อหุ้มเมล็ตสีแดง มียีน *OsDFR* หรือยีน *Rd* และยีน *Rc* เป็นอัลลีลเด่น ซึ่งยีนทั้งสองทำงานร่วมกันแล้วทำให้เกิดเยื่อหุ้มเมล็ตสีแดง (Furukawa *et al.*, 2007) จากการศึกษาของ Lim และ Ha (2013) พบว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ตสีดำและแดงมียีน *OsDFR* ที่ทำหน้าที่ได้ และพบการแสดงออกของยีนในเมล็ตข้าว Sweeney และคณะ (2006) ศึกษาการแสดงออกของยีน *Rc* โดยเทคนิค RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกเฉพาะในเมล็ตเท่านั้น ไม่พบในเนื้อเยื่อใบ ในงานวิจัยนี้ได้ถ่ายยีน *OsDFR* จากข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ตสีดำเข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ตสีแดง เพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ และศึกษาผลที่เกิดกับฟีโนไทป์ของการสร้างสารสีแดงและสีม่วงในข้าวดัดแปลงพันธุกรรม ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีน *OsDFR* สูงขึ้นในต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม แต่ลักษณะเนื้อเยื่อลำต้น ใบ และเมล็ตของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมไม่

แตกต่างจากข้าว wild-type อาจเนื่องจาก ยีน *Rc* ไม่แสดงออกในเนื้อเยื่อใบ ดังนั้นการเพิ่มการแสดงออกของยีน *OsDFR* เพียงยีนเดียว จึงไม่ทำให้เกิดการสังเคราะห์สารสีขึ้นในเนื้อเยื่อดังกล่าวได้ ส่วนในเมล็ดข้าวดัดแปลงพันธุกรรมไม่พบลักษณะการสะสมสารสีม่วงหรือแดงที่เพิ่มขึ้นจากข้าว wild-type อาจต้องมีการวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานินดิน เพื่อเปรียบเทียบระหว่างเมล็ดข้าวดัดแปลงพันธุกรรมกับข้าว wild-type



รูปที่ 5 การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในใบข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR [หมายเหตุ : WT คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, ต้น T1-5 ถึง T1-9 คือ ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับการถ่ายยีนรุ่น T_1 ที่ได้มาจากรุ่น T_0 ต้นที่ 5-9 ตามลำดับ จากการทดลองได้ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ และค่า error bar คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ]

4. สรุป

การถ่ายยีน *OsDFR* เข้าสู่เซลล์ข้าวพันธุ์ Kasalath และตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนด้วยวิธี GUS assay พบว่ามีประสิทธิภาพการถ่าย

ยีนสูงสุดคิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ การรอดของแคลลัสบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 สูงสุดคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ การชักนำให้เกิดต้น พบว่ามีการเกิดจุดสีเขียวบนแคลลัสสูงสุดคิดเป็น 70.83 เปอร์เซ็นต์ ได้จำนวนต้นสูงสุดคิดเป็น 45.83 เปอร์เซ็นต์ และต้นข้าวที่นำมาตรวจสอบพบว่ามียีน *OsDFR* แทรกอยู่ในจีโนมคิดเป็น 77.78 เปอร์เซ็นต์ การกระจายตัวของยีน *gusA* และ *OsDFR* ไปสู่รุ่นลูก T_1 เป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ อัตราส่วน 3 : 1 แสดงว่าต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมมียีนที่ถ่ายทอดเข้าไประหว่างหนึ่งตำแหน่งในจีโนม นอกจากนี้ได้วิเคราะห์การแสดงออกของยีน *OsDFR* พบว่ามีการแสดงออกของยีนในต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_1 สูงสุด 38 เท่า อย่างไรก็ตาม ไม่พบการสังเคราะห์สีม่วงหรือแดงในเนื้อเยื่อต่าง ๆ เพิ่มขึ้น ในงานวิจัยต่อไปควรศึกษาการแสดงออกของยีนสร้างทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่ควบคุมการสังเคราะห์สีในข้าว ร่วมกับการแสดงออกของยีน *OsDFR* เพื่อให้เข้าใจกลไกการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและโปรแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้น

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผ่านมหาวิทยาลัยแม่โจ้ และทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2559 ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. สุภารัตน์ ลิ้นจี่อุดม ที่ให้คำแนะนำและช่วยตรวจแก้ไขต้นฉบับ

6. รายการอ้างอิง

Chandler, V., Radicella, J., Robbins, T., Chen, J. and Turks, D., 1989, Two regulatory genes

- of the maize anthocyanin pathway are homologous: isolation of B utilizing R genomic sequences, *Plant Cell* 1: 1175-1183.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. and Becker, K., 2002, The biological action of saponins in animal systems: A review, *Brit. J. Nutr.* 88: 587-605.
- Furukawa, T., Maekawa, M., Oki, T., Suda, I., Iida, S., Shimada, H., Takamure, I. and Kadowaki, K.I., 2007, The *Rc* and *Rd* genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp, *Plant J.* 49:91-102.
- Hwang, S.K., 2000, A simple and reliable method for preparation of cross-contamination-free plant genomic DNA for PCR-based detection of transgenes, *BMB Rep.* 33: 537-540.
- Jefferson, R.A., 1987, Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system, *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405.
- Kinoshita, T., 1995, Report of committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups, *Rice Genet. Newsl.* 12: 9-153.
- Lim, S.H. and Ha, S.H., 2013, Marker development for the identification of rice seed color, *Plant Biotechnol. Rep.* 7: 391-398.
- Nakai, K., Inagaki, Y., Nagata, H., Miyazaki, C. and Iida, S., 1998, Molecular characterization of the gene for dihydroflavonol 4-reductase of Japonica rice varieties, *Plant Biotechnol.* 15: 221-225.
- Prodhan, S.H. and Komamine, A., 2007, Expression of reporter genes in transformed indica rice through agrobacterium mediated method, *Bangladesh J. Plant Breed. Genet.* 20: 01-08.
- Saika, H. and Toki, S., 2010, Mature seed-derived callus of the model indica rice variety Kasalath is highly competent in *Agrobacterium*-mediated transformation, *Plant Cell Rep.* 29: 1351-1364.
- Sakulsingharoj, C., Phaulumpak, K., Inta, P., Pongjaroenkit, S. and Sangtong, V., 2015, Transformation of rice (*Oryza sativa*) cultivar Taichung 65 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, pp. 189-196, *Biology Education and Research in a Changing Planet*.
- Sweeney, M., Thomson, M., Pfeil, B. and McCouch, S., 2006, Caught red-handed: *Rc* encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice, *Plant Cell* 18: 283-294.
- Toki, S., 1997, Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice, *Plant Mol. Biol. Rep.* 15: 16-21.
- Wang, H., Fan, W., Li, H., Yang, J., Huang, J. and Zhang, P., 2013, Functional characterization of dihydroflavonol-4-reductase in anthocyanin biosynthesis of purple sweet potato underlies the direct evidence of anthocyanins function against abiotic stresses, *PLoS One* 8(11): e78484.
- Zhao, C., Guo, H., Dong, Z. and Zhao, Q., 2009, Pharmacological and nutritional activities of potato anthocyanins, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 3: 463-468.