บทความวิจัย (Research Article)

# การถ่ายยีนและวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *OsB2* ที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว

# Transformation and Expression Analysis of *OsB2* Regulatory Gene in Anthocyanin Biosynthesis Pathway in Rice

ลลิตา ณ ราชสีมา, กนกภรณ์ คำโมนะ, แสงทอง พงษ์เจริญกิต,
วราภรณ์ แสงทอง, นฤมล เข็มกลัดเงิน และช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์*
*สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้*
*ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290*
ศรีเมฆ ชาวโพงพาง
*สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย*
*ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120*
Lalita Na Rachasima, Kanogporn Khammona, Saengtong Pongjaroenkit,
Varaporn Sangtong, Naruemon Khemkladngoen and Chotipa Sakulsingharoj*
*Program in Genetics, Faculty of Science, Maejo University,*
*Nonghan, Sansai, Chiang Mai 50290*
Srimek Chowpongpang
*National Science and Technology Development Agency, Thailand Science Park,*
*Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120*

**Received: April 22, 2019; Accepted: May 8, 2019**

## บทคัดย่อ

ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำมีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ คือ แอนโทไซยานิน ยีน *OsB2* ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและมีรหัสสร้างโปรตีนทรานสคริพชันแฟคเตอร์ สามารถกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว งานวิจัยนี้ได้ถ่ายยีน *OsB2* ซึ่งโคลนจากข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำเข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนที่มีต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว จากการถ่ายยีน *OsB2* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath พบว่าได้ต้นข้าวจำนวน 59 ต้น เมื่อนำต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนมาตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์พบว่าต้นข้าวที่มียีน *OsB2* แทรกอยู่ในจีโนมคิดเป็น 84.28 เปอร์เซ็นต์ ฟีโนไทป์ของต้นข้าวที่ได้รับยีน *OsB2* มีลักษณะเหมือนกับต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ยกเว้นเมล็ดอ่อนและเมล็ดแก่มีการสะสมของรงควัตถุสีม่วงบนเยื่อหุ้มเมล็ด การวิเคราะห์ต้นข้าวดัดแปลง

**Corresponding author: chotipa.cs@gmail.com*
DOI: 10.14456/tjst.2019.57

พันธุกรรมรุ่น $T_1$ พบการกระจายตัวของยีน *gus* ไปสู่รุ่นลูกในอัตราส่วน 3 : 1 แสดงว่ามียีนเข้าแทรกในจีโนมข้าว 1 ตำแหน่ง ฟีโนไทป์ของต้นข้าวและเมล็ดรุ่น $T_1$ มีลักษณะเหมือนกับรุ่น $T_0$ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแสดงออกของยีน *OsB2* ในต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมและเมล็ดรุ่น $T_1$ ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าในต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน

**คำสำคัญ :** ข้าว; ยีน *OsB2*; การถ่ายยีน; แอนโทไซยานิน

## Abstract

Anthocyanins are important antioxidants found in black pericarp rice. The *OsB2* gene encodes a transcription factor which can activate anthocyanin biosynthesis in rice. In this study, transformation of Kasalath variety (red pericarp rice) using *OsB2* cloned from a black pericarp rice *via Agrobacterium* was investigated for functional study on anthocyanin biosynthesis in rice. Fifty-nine transformants were regenerated and PCR analysis showed that 84.28 % carried the *OsB2* transgene. The phenotypic traits of transgenic rice were similar to those of wild-type but developing and mature seeds showed purple pigmentation on their pericarp. Segregation analysis of *gus* genes showed the 3 : 1 ratio in $T_1$ generation, indicating a single gene insertion in the rice genome. Phenotypic traits of $T_1$ progeny were similar to those of the $T_0$ transgenic rice plants. Semi-quantitative RT-PCR analysis revealed that overexpression of *OsB2* gene in seedlings was found in $T_1$ plants. In addition, seeds of $T_1$ transgenic rice contained higher antioxidant activity than that of the untransformed plants.

**Keywords:** *Oryza sativa*; *OsB2*; transformation; anthocyanin

## 1. คำนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและเป็นอาหารหลักของประชากรในประเทศไทย อีกทั้งยังเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญในด้านโภชนาการ ซึ่งสามารถพบสารแอนโทไซยานินได้บริเวณเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของข้าว เช่น ใบ เยื่อหุ้มเมล็ด โดยข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำมักเกิดจากการสะสมของสารแอนโทไซยานินอยู่ปริมาณมาก (Reddy *et al*., 1994)

แอนโทไซยานินเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์และเป็นรงควัตถุหรือสารสี มี 6 ชนิด ได้แก่ เพลาโกนิดิน (pelargonidin) ไซยานิดิน (cyanidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) พีโอดินิน (peonidin) เพทูนิดิน (petuidin) และมาลวิดิน (malvidin) (Lepiniec *et al*., 2006) สารแอนโทไซยานินเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ที่ช่วยต้านอนุมูลอิสระและในการช่วยป้องกันและลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตันและโรคมะเร็ง (Geekiyanage *et al*., 2012) นอกจากนี้ยังสามารถลดคอเลสตอรอลในเลือดและต้านไวรัส ซึ่งประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินสูงกว่าวิตามินซีและวิตามินอี (Bagchi *et al*., 1998; Cossin *et al*., 1998; Shi *et al*., 2003) โดยในการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินมียีนที่เกี่ยวข้องหลัก 2 ชนิด คือ ยีนโครงสร้าง (structural gene) ซึ่งมีรหัสสร้างเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และยีนควบคุม (regulatory gene) ซึ่งมีรหัสสร้างโปรตีนทรานสคริพชันแฟคเตอร์ แบ่งเป็น 2

กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Myb ในพืชส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม R2R3 transcription factor ซึ่งในข้าว ได้แก่ ยีน *OsC1* ซึ่งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 6 (Saitoh *et al*., 2004) โดยในข้าวขาวพบการขาดหายไปของ 10 bp ใน R3 (Choudhury *et al*., 2014; Na Rachasima *et al*., 2017) และกลุ่ม Myc จัดอยู่ในกลุ่ม basic helix-loop-helix (bHLH) ซึ่งในข้าว ได้แก่ ยีน *OsB1* (Sakamoto *et al*., 2001; Sakulsingharoj *et al*., 2016) และยีน *OsB2* (Sakamoto *et al*., 2001; Inta *et al*., 2013) คล้ายกับยีน *R/B* ในข้าวโพด ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Hu *et al*., 1996; Sakamoto *et al*., 2001)

ยีน *OsB2* มี 8 เอกซอน และ 7 อินทรอน (Oikawa *et al*., 2015) ก่อนหน้านี้มีการค้นหายีน *OsB2* โดยเทคนิค RT-PCR พบการแสดงออกของยีนเฉพาะในข้าวสี (Shin *et al*., 2006; Inta *et al*., 2013) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ายีน *OsB2* สามารถกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวโดยกระตุ้นยีนโครงสร้างให้มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น (Hu *et al*., 1996; Sakamoto *et al*., 2001) และยังมีรายงานว่ายีน *OsB2* หรือ *Kala 4* มีหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวทำให้มีสีม่วงหรือดำ (Maeda *et al*., 2014; Oikawa *et al*., 2015; Rahman *et al*., 2016; Kim *et al*., 2018) การสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวต้องใช้ยีนเด่น 3 ชนิด (dominant gene) โดยยีน 2 ชนิดแรก เป็นรหัสของ transcription factor B1 หรือ B2 (basic helix-loop-helix) และ C1 (R2R3-Myb) และอีกชนิดหนึ่งเป็นยีนที่มีรหัสสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน คือ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) (Nagao and Takahashi, 1963; Sakamoto *et al*., 2001; Saitoh *et al*., 2004; Furukawa *et al*., 2007; Saika *et al*., 2011; Zhu *et al*., 2017)

การศึกษายีน *OsB2* ก่อนหน้านี้มีรายงานว่ายีน *OsB2* แสดงออกในข้าวดำ แต่ไม่พบในข้าวขาว (Shih *et al*. 2008; Inta *et al*. 2013; Sakulsingharoj *et al*., 2014) และมีรายงานการโคลนยีน *OsB2* จากข้าวดำและถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวขาว แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ของข้าวขาวที่ได้รับยีน *OsB2* เนื่องจากยีน *OsDFR* ในข้าวขาวไม่ทำงาน (Sakulsingharoj *et al*., 2014) งานวิจัยนี้จึงศึกษาการถ่ายยีน *OsB2* จากข้าวดำเข้าสู่ข้าวแดงพันธุ์ Kasalath ที่มียีน *OsDFR* ที่ทำงานได้ (Furukawa *et al*., 2007) โดยคาดว่ายีน *OsB2* ที่ถ่ายเข้าไปอาจไปกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวแดง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการถ่ายยีนและการทำหน้าที่ของยีน *OsB2* สำหรับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว และตรวจสอบการใช้ยีน *OsB2* เป็นเครื่องหมายสำหรับการคัดเลือกแคลลัสในขั้นตอนการถ่ายยีน

## 2. อุปกรณ์และวิธีการ

### 2.1 การถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าว

นำเมล็ดแก่ของข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงพันธุ์ Kasalath ซึ่งเป็นข้าว indica มาชักนำให้เกิดแคลลัส และนำแคลลัสไปถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 ซึ่งมีชุดยีนที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์ก่ำที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเข้มหรือสีดำ ซึ่งมียีน *OsB2* ภายใต้การควบคุมของ dual *35S* Promoter และ *nos* terminator (รูปที่ 1 ภาพบน) (Sakulsingharoj *et al*., 2014) โดยถ่ายยีนตามวิธีดัดแปลงจาก Toki (1997) Endo และคณะ (2002) และ Sakusingharoj และคณะ (2015) นำแคลลัสที่ผ่านการเพาะเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมเป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay โดยเติม X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid)

ในแคลลัส และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (Jefferson, 1987) นำแคลลัสหลังผ่านการถ่ายยีนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร N6D ดัดแปลง (Toki, 1997) ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไทเมนทิน 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ย้ายแคลลัสที่รอดไปบนอาหารคัดเลือกใหม่ที่มีไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไทเมนทิน 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงอีกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายแคลลัสที่รอดลงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นสูตร MS ดัดแปลง ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และไทเมนทิน 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายแคลลัสลงอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงจนกว่าจะได้ยอด และนำต้นข้าวที่ต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงที่ไม่เติมฮอร์โมนเพื่อให้เกิดต้นและราก จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS assay ย้ายต้นข้าวไปเพาะเลี้ยงในโรงเรือนกระจก สังเกตฟีโนไทป์ของต้นข้าวที่ได้รับยีนที่บริเวณเนื้อเยื่อต่าง ๆ

**2.2 การวิเคราะห์ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์**

นำใบข้าวจากต้นที่ต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและมีการแสดงออกของยีน *gus* มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ดัดแปลง (Hwang and Kim, 2000) และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsB2* คือ OSB2cdsF (5′- ATG GCA TCT GCT CCT CCA GTT CAG G -3′) และ OSB2cdsR (5′-TTA CGG CGC CTT CCC CTG TCC -3′) โดยใช้ชุด My Taq Red Mix (Bioline, USA) ปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วยจีโนมิกดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.5 ไมโครโมลาร์ ใช้อุณหภูมิในขั้นตอนต่าง ๆ คือ อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 35 รอบดังนี้ denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing ที่ 68 องศาเซลเซียส 1 นาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ตามด้วย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที หลังจากนั้นนำผลผลิตของพีซีอาร์มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส

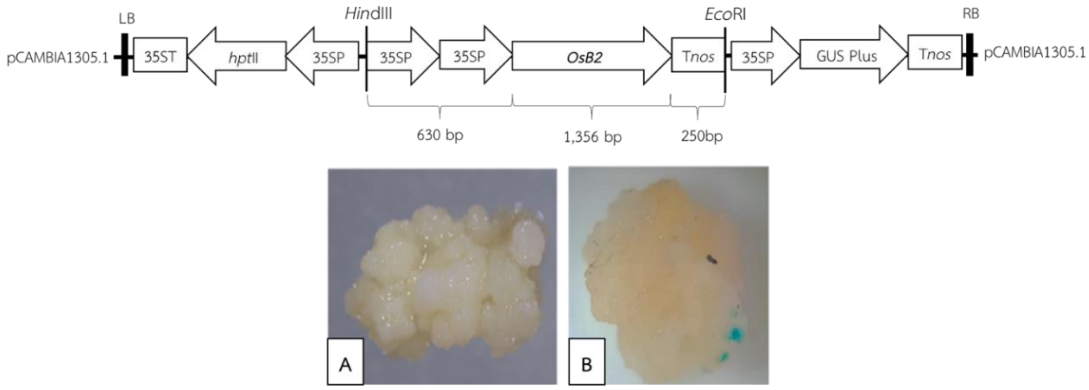
**2.3 การทดสอบการกระจายตัวของยีนในต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น $T_1$**

นำเมล็ดข้าวจากต้น $T_0$ ที่ได้รับยีน *OsB2* มาเพาะให้ได้ต้นข้าวรุ่น $T_1$ แล้วนำใบมาตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay เพื่อศึกษาการกระจายตัวของยีน *gus* และศึกษาการถ่ายทอดยีนและการกระจายตัวของยีน *OsB2* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *OsB2* คือ OSB2cdsF และ OSB2cdsR วิเคราะห์ไคสแควร์โดยใช้โปรแกรม R3.6.0 (http://www.r-project.org)

**2.4 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR และ semi-quantitative RT-PCR**

สกัดอาร์เอ็นเอจากต้นอ่อนอายุ 15-25 วัน ของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น $T_1$ ที่มียีน *OsB2* ด้วยวิธี TRIzol reagent (Invitrogen, USA) กำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนโดยเติมเอนไซม์ DNaseI (New England Biolab, USA) และนำอาร์เอ็นเอที่ได้วิเคราะห์ด้วยเครื่อง NanoDrop 8000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) นำอาร์เอ็นเอมาสังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription (RT) โดยใช้ oligo (dT) ตามขั้นตอนของชุด ReverseAid First strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) นำ cDNA มาเป็นแม่พิมพ์ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR และเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ My Taq Red Mix (Bioline, USA) และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsB2* คือ OSB2cdsF และ OSB2cdsR ใช้อุณหภูมิ

ในขั้นตอนต่าง ๆ คือ อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 35 รอบ สำหรับเทคนิค RT-PCR และ 28 รอบ สำหรับ semi-quantitative RT-PCR ดังนี้ denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing ที่ 58 องศาเซลเซียส 1 นาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ตามด้วย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที และใช้ยีน *OsActin* เป็นยีนควบคุม โดยมีไพรเมอร์ คือ OsActin_F (5′- TGA TGC GCC CAG GGC TGT CT - 3′) และ OsActin_R (5′- CGA TTG GCC TTG GGG TTG AG -3′) ใช้ชุด My Taq Red Mix (Bioline, USA) อุณหภูมิในขั้นตอนต่าง ๆ คือ อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 35 รอบ สำหรับเทคนิค RT-PCR และ 28 รอบ สำหรับ semi-quantitative RT-PCR ดังนี้ denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing ที่ 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที ตามด้วย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิสและวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน (*OsB2*/*OsActin* ratio) โดยใช้เครื่อง Gel Doc™ XR+ with Image Lab™ Software (BIO–RAD, USA) โดยทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ




**รูปที่ 1** โครงสร้างพลาสมิด T-DNA สำหรับการถ่ายยีน *OsB2* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath (ภาพบน) และการตรวจสอบแคลลัสข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยวิธี GUS assay ภายหลังเพาะเลี้ยงร่วมของแคลลัสกับอะโกรแบคทีเรียม เป็นเวลา 3 วัน (ภาพล่าง) A: แคลลัสที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน B: แคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน

**2.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH**

นำเมล็ดแก่ของต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนและต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม มาบดให้ละเอียดเป็นผง 100 มิลลิกรัม ผสมกับ 80 เปอร์เซ็นต์เมทานอล ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำตามวิธีดัดแปลงจาก Shao และคณะ (2014) แล้วทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เป็นอนุมูลอิสระและใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐานหรือสารควบคุม ทำตามวิธีดัดแปลงจาก Zhu และคณะ (2017) เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลต่อลิตร ในเมทานอล

เทียบกับกราฟมาตราฐานของ Trolox ที่ความเข้มข้น 0, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 และ 125 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่ม 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 516 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader (SPECTROstar® Nano, Germany) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ ดังสมการนี้ % DPPH inhibition = $[(A_{control} - A_{sample}) \div A_{control}] \times 100$ เมื่อ $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีตัวอย่างของสารสกัด โดยใช้เมทานอล 20 ไมโครลิตร; $A_{sample}$ คือ ค่าการดูดแสงของสารสกัดเจือจางที่ใช้สำหรับผสมกับสารละลาย DPPH; blank คือ สารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ร่วมกับเมทานอล ปริมาตร 180 ไมโครลิตร; negative คือ เมทานอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยรายงานผลในรูปของ TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) ในหน่วย μmol Trolox equivalents ต่อกรัม ของตัวอย่างเมล็ดข้าวที่บดละเอียด แต่ละตัวอย่างทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม R3.6.0 (http://www.r-project.org)

## 3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

### 3.1 ประสิทธิภาพการถ่ายยีน *OsB2* เข้าสู่ข้าว

เมื่อถ่ายยีน *OsB2* ของข้าวพันธุ์ก่ำเข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath หลังจากการเพาะเลี้ยงร่วมของแคลลัสกับอะโกรแบคทีเรียมเป็นเวลา 3 วัน สุ่มแคลลัสมาตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนด้วยวิธี GUS assay พบว่ามีจุดสีฟ้าปรากฏบนแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน (รูปที่ 1 ภาพล่าง) แสดงว่ามีการแสดงออกของยีน *gus* ประสิทธิภาพของการถ่ายยีน *OsB2* จากการถ่ายยีน 3 ครั้ง สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 30 เมื่อพิจารณาจากการรอดบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวะนะไฮโกรมัยซิน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดของกลุ่มแคลลัสจากการถ่ายยีนทั้ง 3 ครั้ง คือ 60, 100 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

**ตารางที่ 1** จำนวนแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน *OsB2* ที่รอดบนอาหารคัดเลือกและพัฒนาไปเป็นยอดและต้น

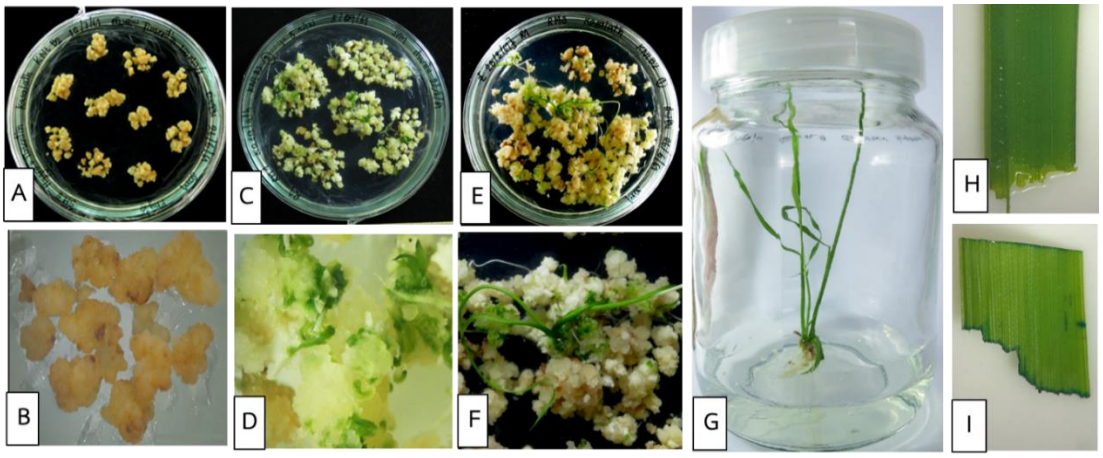
| ครั้งที่ถ่ายยีน | จำนวนกลุ่มแคลลัสทั้งหมด | จำนวนกลุ่มแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2[(a)] | จำนวนกลุ่มแคลลัสที่เกิดจุดเขียว[(b)] | จำนวนกลุ่มแคลลัสที่เกิดยอด[(c)] | จำนวนกลุ่มแคลลัสที่ได้รับยีน[(d)] |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 20 | 12/20 (60) | 12/12 (100) | 12/12 (100) | 51/58 (87.93) |
| 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) |

ตัวเลขในวงเล็บ หมายถึง แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ (a) = (จำนวนแคลลัสที่รอด/จำนวนแคลลัสเริ่มต้น) x 100, (b) = (จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียว/จำนวนแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2) x 100, (C) = (จำนวนแคลลัสที่เกิดยอด/จำนวนแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2) x 100, (d) = (จำนวนต้นที่ได้รับยีน *OsB2* ÷ จำนวนต้นทั้งหมด) x 100

### 3.2 การคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีนและการชักนำให้เกิดต้น

หลังจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน *OsB2* บนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินร่วมกับไทเมนทิน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสจากการถ่ายยีนทั้ง 3 ครั้ง มีจำนวน 20, 20 และ 10 กลุ่ม ตามลำดับ (รูปที่ 2A และ 2B) สามารถรอดบนอาหารคัดเลือกได้คิดเป็น 60, 100 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดยมีแคลลัสบางส่วนที่กลายเป็นสีน้ำตาลหลังจากเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินร่วมกับไทเมนทิน และย้ายแคลลัสลงอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงจนกว่าจะได้ยอด (รูป

ที่ 2C ถึง 2F) พบว่าจำนวนกลุ่มแคลลัสจากการถ่ายยีนครั้งที่ 1, 2 และ 3 สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ 100, 55 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เมื่อนำยอดที่ต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่ไม่เติมฮอร์โมนเพื่อให้เกิดต้นและราก พบว่าการถ่ายยีนครั้งที่ 1, 2 และ 3 ได้ต้นข้าวที่มียีน *OsB2* ของข้าวพันธุ์ก่ำ จำนวน 58, 10 และ 2 ต้น ตามลำดับ (รูปที่ 2G และตารางที่ 1)



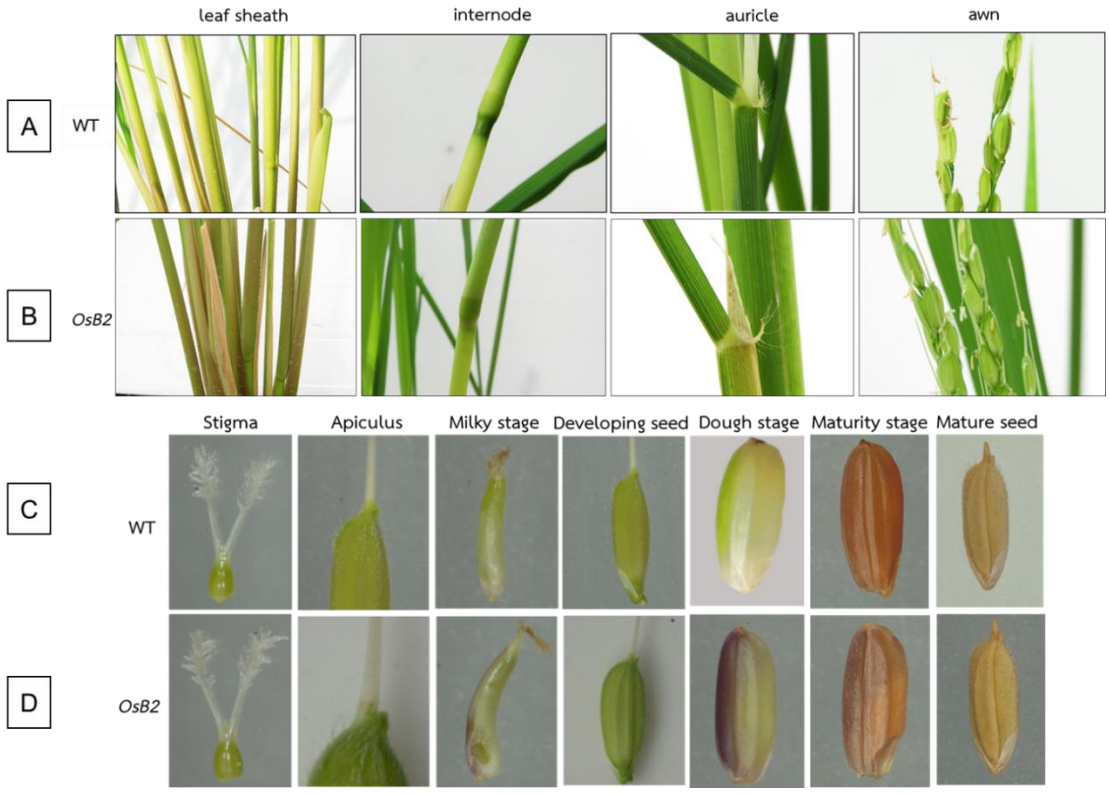

**รูปที่ 2** การคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีนบนอาหารคัดเลือกและการชักนำให้เกิดต้น โดย A-B: แคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกอายุ 4 สัปดาห์, C-D: แคลลัสที่เจริญบนอาหารชักนำให้เกิดยอดอายุ 8 สัปดาห์, E-F: แคลลัสที่พัฒนาไปเป็นยอด, G: ต้นข้าวที่มีการพัฒนาของรากและต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน, H: เนื้อเยื่อใบของข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนที่ตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay และ I: เนื้อเยื่อใบข้าวดัดแปลงพันธุกรรม ที่ตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay

**3.3 ลักษณะฟีโนไทป์ของต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน *OsB2***

นำต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับยีน *OsB2* มาตรวจสอบฟีโนไทป์ ไม่พบการปลี่ยนแปลงทางฟีโนไทป์ด้านกายภาพจากการตรวจสอบลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ กาบใบ (leaf sheath) ข้อ (internode) เขี้ยวกันแมลง (auricle) ปลายกลีบดอกใหญ่ (apiculus) หางข้าว (awn) และเกสรตัวเมีย (stigma) ส่วนลักษณะที่แตกต่าง คือ เมล็ดอ่อนและเมล็ดแก่จะมีการสะสมรงควัตถุสีม่วง แต่ในข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนนั้นมีเมล็ดสีเขียวในระยะเมล็ดอ่อนและมีสีแดงในระยะเมล็ดแก่

การที่เมล็ดของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *OsB2* มีสีม่วง (รูปที่ 3) อาจเกิดจากยีน *OsB2* สามารถกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว โดยไปกระตุ้นยีนโครงสร้างให้มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น (Hu *et al*, 1996; Sakamoto *et al*., 2001) มีรายงานว่าการเกิดสีม่วงในข้าวนั้นต้องการยีนเด่น (dominant gene) 3 ชนิด โดยยีน 2 ชนิดแรก เป็นรหัสของทรานสคริพชันแฟคเตอร์กลุ่ม B1 หรือ B2 (basic helix-loop-helix) และกลุ่ม C1 (R2R3-Myb) และอีกชนิดหนึ่งเป็นยีนที่มีรหัสสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน คือ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) (Nagao and Takahashi, 1963; Sakamoto *et al*., 2001; Saitoh *et al*., 2004; Furukawa *et al*., 2007; Saika *et al*.,

2011; Zhu *et al*., 2017; Oshima *et al*., 2019) นอกจากนี้ Kim และคณะ (2018) รายงานว่ายีน *OsB2* มีหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว เนื่องจากข้าวแดงพันธุ์ Kasalath มียีน *DFR* ที่ทำงานอยู่แล้ว (Furukawa *et al*., 2007) แต่ยีน *OsC1* ไม่ทำงาน (Sun *et al*., 2018; Oshima *et al*., 2019) เมื่อถ่ายยีน *OsB2* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath แล้วทำให้เมล็ดเกิดสีม่วงอาจเกิดจากการทำงานร่วมกันของยีน *OsB2* ที่ถ่ายเข้าไปกับยีนอื่น (endogenous gene) ที่สร้างทรานสคริพชันแฟคเตอร์ชนิด Myb ในจีโนมของข้าวพันธุ์ Kasalath




**รูปที่ 3** ฟีโนไทป์ของต้นข้าว Kasalath ที่ได้รับยีน *OsB2* รุ่น $T_0$ โดย A และ C: ต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (WT), B และ D: ต้นข้าวที่ได้รับยีน *OsB2*

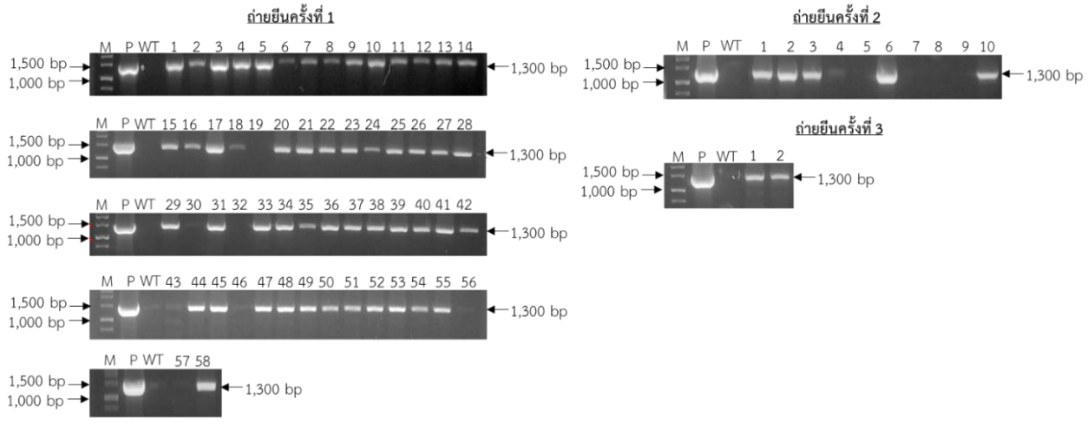
**3.4 การวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยด้วยวิธี GUS assay และเทคนิคพีซีอาร์**

เมื่อนำใบข้าวจากต้นที่ต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินมาตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าต้นที่ได้รับยีน *OsB2* มีขนาดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวัง คือ 1,300 bp โดยมีจำนวนต้นที่ได้รับยีน *OsB2* สูงสุดคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1 และรูปที่ 4) นอกจากนี้พบว่าต้นที่ได้รับยีน *OsB2* จากการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์สอดคล้องกับเมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี GUS assay ซึ่งมีการแสดงออกของยีน *gus* โดยพบการเกิดสีฟ้าบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนใบ (รูปที่ 2H และ 2I)

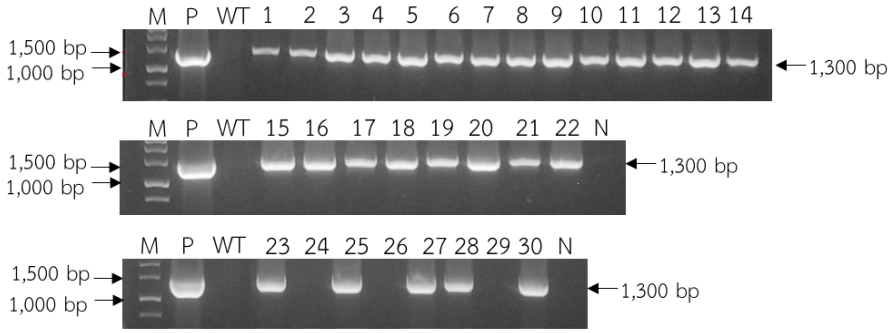
**3.5 การถ่ายทอดยีนและการกระจายตัวของยีน *OsB2* และลักษณะฟีโนไทป์ของรุ่น $T_1$**

นำต้นข้าวรุ่น $T_1$ มาตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay เพื่อศึกษาการกระจายตัวของยีน *gus*

โดยนำเมล็ดรุ่น $T_1$ ที่มียีน *OsB2* ต้น OsB2.1-8 และ OsB2.1-11 จำนวน 30 และ 27 ต้น ตามลำดับ พบต้นที่มีการแสดงออกของยีน *gus* จำนวน 27 และ 21 ต้น ตามลำดับ จากการทดสอบการกระจายตัวของยีนในต้น OsB2.1-8 และ OsB2.1-11 โดยวิเคราะห์ไคสแควร์ได้ค่า p-value เท่ากับ 0.057 และ 0.738 ตามลำดับ แสดงว่าต้น OsB2.1-8 และ OsB2.1-11 มีผลการทดลองเป็นไปตามสมมุติฐานที่ว่ามีการกระจายตัวของยีน *gus* ไปสู่รุ่นลูก $T_1$ เป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ มีอัตราส่วน 3 : 1 (ตารางที่ 2) และนำต้น OsB2.1-8 มาวิเคราะห์ยีน *OsB2* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (รูปที่ 5) พบว่าจากต้นทั้งหมดจำนวน 30 ต้น มีต้นที่ได้รับยีน *OsB2* จำนวน 27 ต้น และต้นที่ไม่ได้รับยีนจำนวน 3 ต้น ซึ่งผลวิเคราะห์การถ่ายทอดยีน *OsB2* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์นั้นสอดคล้องกับผลการตรวจสอบด้วยวิธี GUS assay




**รูปที่ 4** การวิเคราะห์ต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ผ่านการถ่ายยีน *OsB2* ครั้งที่ 1, 2 และ 3 จำนวน 58, 10 และ 2 ต้น ตามลำดับ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *OsB2* เพื่อตรวจสอบต้นที่ได้รับยีน *OsB2* ที่ถ่ายเข้าไป โดย M: 1 kb DNA ladder, WT: ข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน, P: plasmid p2CA ที่มียีน *OsB2*



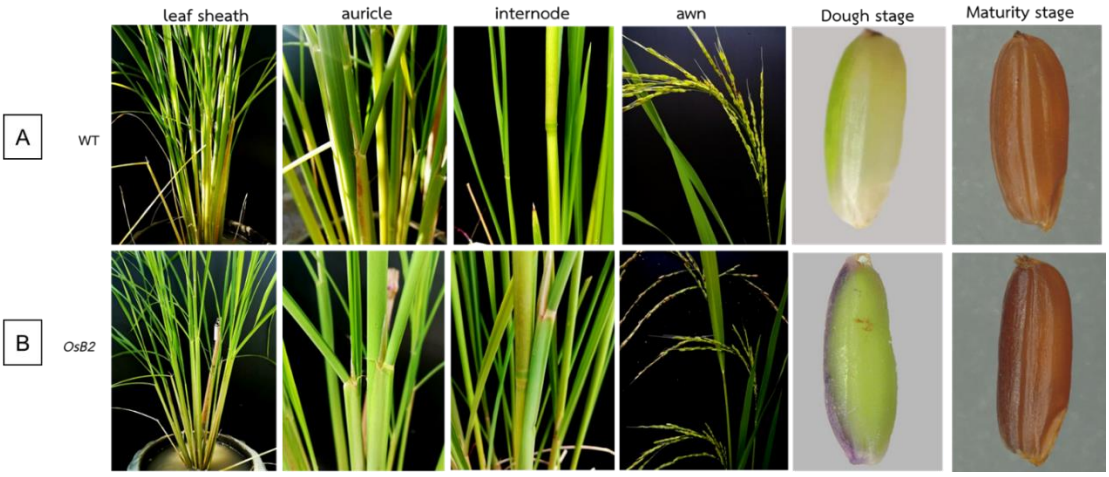

**รูปที่ 5** การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีน *OsB2* ของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น $T_1$ (ต้นที่ 1-30) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *OsB2* โดย M: 1 kb DNA ladder, WT: ข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน, P: plasmid p2CA ที่มียีน *OsB2*

**ตารางที่ 2** ผลการทดสอบการกระจายตัวของยีน *gus* ในต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น $T_1$

| ต้น $T_0$ | จำนวนต้น $T_1$ ทั้งหมด | จำนวนต้น T1 ที่เกิดสีฟ้า | จำนวนต้น T1 ที่ไม่เกิดสีฟ้า | p-value |
|---|---|---|---|---|
| OsB2.1-8 | 30 | 27 | 3 | $0.057^{ns}$ |
| OsB2.1-11 | 27 | 21 | 6 | $0.738^{ns}$ |

$^{ns}$ = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบการกระจายตัวของยีน โดยมีสมมุติฐานการแทรกของยีน 2 ตำแหน่ง ซึ่งจะมีการกระจายตัวเป็น 15 : 1 สำหรับการทดสอบ GUS assay ที่ให้ผลเกิดสีฟ้า : ไม่เกิดสีฟ้า พบว่าต้น OsB2.1-8 และ OsB2.1-11 ได้ค่า p-value เท่ากับ 0.396 และ 0.0007 ตามลำดับ แสดงว่าต้น OsB2.1-11 ไม่เป็นไปตามทฤษฎีของการแทรกตัวของยีน 2 ตำแหน่ง แต่ต้น OsB2.1-8 ไม่แตกต่างจากค่าทฤษฎีของการแทรกตัวของยีน 2 ตำแหน่ง ดังนั้นต้น OsB2.1-8 ในการทดลองนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่ามีการแทรกของยีน 1 หรือ 2 ตำแหน่ง ต้องมีการทดสอบจำนวนตัวอย่างที่มากกว่านี้จึงจะสรุปได้ เมื่อศึกษาฟีโนไทป์ของข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น $T_1$ พบว่ามีลักษณะเหมือนกับต้นที่ผ่านการถ่ายยีนในรุ่น $T_0$ (รูปที่ 6)




**รูปที่ 6** ฟีโนไทป์ของต้นข้าวพันธุ์ Kasalath ที่ได้รับยีน *OsB2* รุ่น $T_1$ โดย A: ฟีโนไทป์ของต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (WT), B: ฟีโนไทป์ของต้นข้าวได้รับยีน *OsB2*

**3.6 การแสดงออกของยีน *OsB2* ในต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม**

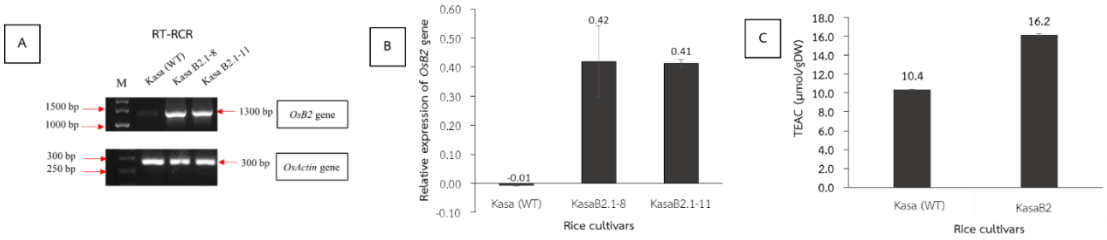
การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *OsB2* จากเนื้อเยื่อใบอ่อนของต้นข้าวรุ่น $T_1$ ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น $T_1$ มีการแสดงออกของยีน *OsB2* แต่การแสดงออกของยีนในต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนต่ำมาก (รูปที่ 7A) จากผลการวิจัยสอดคล้องกับ Kawahigashi และคณะ (2007) ที่วิเคราะห์การแสดงออกของยีน *OsB2* โดยเทคนิค RT-PCR ในต้นข้าวพันธุ์ Taichung 65 (T65) ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน และต้นข้าวพันธุ์ T65 ดัดแปลงพันธุกรรม โดยพบว่าต้น

ข้าวพันธุ์ T65 ดัดแปลงพันธุกรรมมีการแสดงออกของยีน *OsB2* ในเนื้อเยื่อรากและยอด แต่ไม่พบการแสดงออกในต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *OsB2* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ของต้นข้าวรุ่น $T_1$ พบว่าในต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนไม่พบการแสดงออกของยีน *OsB2* ที่ถ่ายเข้าสู่ข้าว ส่วนต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมมีระดับการแสดงออกของยีน *OsB2* ที่ถ่ายเข้าสู่ข้าวใกล้เคียงกันทั้ง 2 ต้น คือ ต้น KasaB2.1-8 และ KasaB2.1-11 (รูปที่ 7B) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shih และคณะ (2008) และ Sakulsingharoj และคณะ (2014) โดยรายงานว่าเมื่อถ่ายยีน *OsB2* เข้าสู่ข้าวขาวพันธุ์ Nipponbare และ Taichung 65 พบว่าต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมทั้ง 2 พันธุ์ มีการแสดงออกของยีน *OsB2* และยีนโครงสร้างสูงกว่าต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (WT) แต่ไม่พบความแตกต่างของฟีโนไทป์ อาจเนื่องจากข้าวขาวพันธุ์ Nipponbare และ Taichung 65 ที่นำมาใช้ในการถ่ายยีนไม่มียีน *DFR* ที่ทำงานได้ จึงไม่มีการสร้างสีในข้าวขาวที่นำมาใช้ในการถ่ายยีน นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับ Shih และคณะ (2008) ที่รายงานว่ายีน *OsB2* ไม่ทำงานในข้าวที่มีใบสีเขียว ซึ่งในข้าวพันธุ์ Kasalath เป็นข้าวที่มีใบสีเขียว นอกจากนี้มีรายงานว่าในข้าวแดงยีน *OsB1* ที่เป็นกลุ่ม Myc จัดอยู่ในกลุ่ม basic helix-loop-helix (bHLH) เช่นเดียวกับยีน *OsB2* ก็ไม่ทำงานเช่นกัน โดยพบว่ามีการเพิ่มขึ้น 2 คู่เบส ทำให้มีการกลายพันธุ์แบบ frameshift ในข้าวแดง (Lim and Ha, 2013)

**3.7 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม**

เมื่อนำสารสกัดจากเมล็ดแก่ของข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนและข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น $T_1$ มาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าข้าวดัดแปลงพันธุกรรมมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (รูปที่ 7C) โดยพบว่า ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 16.2±0.09 μmole Trolox/gDW ส่วนข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 10.4±0.06 μmole Trolox/gDW การวิเคราะห์ทางสถิติของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระระหว่างข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนและข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น $T_1$ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) อาจเกิดจากในเมล็ดข้าวดัดแปลงพันธุกรรมมีการสะสมของแอนโทไซยานินจึงทำให้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น




**รูปที่ 7** การแสดงออกของยีน *OsB2* ในเนื้อเยื่อใบอ่อนของข้าวพันธุ์ Kasalath ดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น $T_1$ โดย A: การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR, B: ระดับการแสดงออกของยีน *OsB2* ในข้าวดัดแปลงพันธุกรรมและต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนเมื่อเทียบกับยีน *OsActin* ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR, C: ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

## 4. สรุป

การถ่ายยีน *OsB2* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kasalath โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม และทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนด้วยวิธี GUS assay พบว่าจากการถ่ายยีน 3 ครั้ง มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงที่สุดคิดเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การรอดบนอาหารคัดเลือกสูงสุดคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การเกิดจุดเขียวสูงสุดคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และพัฒนาไปเป็นต้นได้ทั้งหมด 70 ต้น เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าต้นที่ได้รับยีน *OsB2* ทั้งหมด 59 ต้น คิดเป็น 84.28 เปอร์เซ็นต์ ฟีโนไทป์ของต้นข้าวที่ได้รับยีน *OsB2* มีลักษณะคล้ายกับต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน แต่พบลักษณะที่แตกต่าง คือ ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมเมล็ดอ่อนและเมล็ดแก่มีการสะสมของรงควัตถุสีม่วง แต่ในข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีนนั้นมีเมล็ดสีเขียวในระยะเมล็ดอ่อน และมีสีแดงในระยะเมล็ดแก่ การที่เมล็ดมีสีม่วงอาจเกิดจากยีน *OsB2* มีรหัสสร้างทรานสคริพชันแฟคเตอร์กระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว การวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับยีน *OsB2* ด้วยวิธี GUS assay พบว่ามีการกระจายตัวของยีนไปสู่รุ่นลูกเป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ มีอัตราส่วน 3 : 1 แสดงว่ามียีนแทรกอยู่ในจีโนมข้าวดัดแปลงพันธุกรรมหนึ่งตำแหน่ง และฟีโนไทป์ของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น $T_1$ มีลักษณะเหมือนกับต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น $T_0$ เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ไม่พบการแสดงออกของยีน *OsB2* ที่ถ่ายเข้าสู่ข้าวในต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน แต่พบในต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม เมล็ดแก่ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าต้นข้าวที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน ผลงานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้และนำไปพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ข้าวพันธุ์ดีที่มีแอนโทไซยานินสูงในอนาคต

## 5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผ่านมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปี 2561 ทุนศิษย์ก้นกุฏิ ประจำปี 2559 จากมหาวิทยาลัยแม่โจ้ และทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2561 ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการวิจัยครั้งนี้

## 6. รายการอ้างอิง

Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R., Bagchi, M., Bagchi, D., Balmoori, J. and Stohs, S., 1998, Protective effects of grape seed pro anthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice, Gen. Pharmacol. Vasc. Syst. 30: 771-776.

Cossins, E., Lee, R. and Packer, L., 1998, ESR studies of vitamin C regeneration, order of reactivity of natural source phytochemical preparations, IUBMB Life 45: 583-597.

Choudhury, B.I., Khan, M.L. and 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 Genet. 15: 71.

Endo, S., Sugita, K., Sakai, M., Tanaka, H. and Ebinuma, H., 2002, Single-step trans formation for generating marker-free transgenic rice using the ipt-type MAT vector system, Plant J. 30: 115-122.

Furukawa, T., Maekawa, M., Oki, T., Suda, I., Iida, S., Shimada, H. and Kadowaki, K. I.,

2007, The *Rc* and *Rd* genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp, Plant J. 49: 91-102.

Geekiyanage, H., Jicha, G.A., Nelson, P.T. and Chan, C., 2012, Blood serum miRNA: non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease, Exp. Neurol. 235: 491-496.

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

Hwang, S. and Kim, Y., 2000, A simple and reliable method for preparation of cross-contamination-free plant genomic DNA for PCR-based detection of transgenes, J. Biochem. Mol. Biol. 33: 537-540.

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

Jefferson, R., 1987, Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system, Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387-405.

Kawahigashi, H., Hirose, S., Iwai, T., Ohashi, Y., Sakamoto, W., Maekawa, M. and Ohkawa, Y., 2007, Chemically induced expression of rice *OSB2* under the control of the OsPR1, 1 promoter confers increased anthocyanin accumulation in transgenic rice, J. Agric. Food Chem. 55: 1241-1247.

Kim, D.H., Park, S., Lee, J.Y., Ha, S.H., Lee, J.G. and Lim, S.H., 2018, A rice B-Box protein, OsBBX14, finely regulates anthocyanin biosynthesis in rice, Int. J. Mol. Sci. 19: 2190.

Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J.M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N. and Caboche, M., 2006, Genetics and biochemistry of seed flavonoids, Ann. Rev. Plant Biol. 57: 405-430.

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

Maeda, H., Yamaguchi, T., Omoteno, M., Takarada, T., Fujita, K., Murata, K. and Mukaino, N., 2014, Genetic dissection of black grain rice by the development of a near isogenic line, Breeding Sci. 64: 134-141.

Nagao, S. and Takahashi, M.E., 1963, Trial construction of twelve linkage groups in Japanese rice: Genetical studies on rice plant, J. Fac. Agric. Hokkaido Univ. 53: 72-130.

Na Rachasima, L., Sukkasem, R., Pongjaroen kit, S., Sangtong, V., Chowpongpang, S., and Sakulsingharoj, C., 2017, Expression analysis and nucleotide variation of *OsC1* gene associated with anthocyanin pigmentation in rice, Genomics Genet. 10: 46-53.

Oikawa, T., Maeda, H., Oguchi, T., Yamaguchi, T., Tanabe, N., Ebana, K. and Izawa, T., 2015, The birth of a black rice gene and its local spread by introgression, Plant Cell 27: 2401-2414.

Oshima, M., Taniguchi, Y., Akasaka, M., Abe, K., Ichikawa, H., Tabei, Y. and Tanaka, J., 2019, Development of a visible marker trait based on leaf sheath-specific anthocyanin pigmentation applicable to various genotypes in rice, Breeding Sci., Article ID: 18151, 11 p.

Rahman, M.M., Lee, K.E. and Kang, S.G., 2016, Allelic gene interaction and anthocyanin biosynthesis of purple pericarp trait for yield improvement in black rice, J. Life Sci. 26: 727-736.

Reddy, V.S., Goud, K.V., Sharma, R. and Reddy, A.R., 1994, Ultraviolet-B-responsive anthocyanin production in a rice cultivar is associated with a specific phase of phenylalanine ammonia lyase biosynthesis, Plant Physiol. 105: 1059-1066.

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

Saitoh, K., Onishi, K., Mikami, I., Thidar, K. and Sano, Y., 2004, Allelic diversification at the C (*OsC1*) locus of wild and cultivated rice, Genetics 168: 997-1007.

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

Sakulsingharoj, C., Inta, P., Sukkasem, R., Pongjaroenkit, S., Chowpongpang, S. and 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., Phanlumpak, K., Inta, P., Pongjaroenkit, S. and Sangtong, V., 2015, Transformation of rice (*Oryza sativa*) cultivar Taichung 65 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, pp. 189-196, In Biology Education and Research in a Changing Planet, Springer, Singapore.

Sakulsingharoj, C., Inta, P., Sukkasem, R., Pongjaroenkit, S., Chowpongpang, S. and Sangtong, V., 2016, Cloning and characterization of *OSB1* gene controlling anthocyanin biosynthesis from Thai black rice, Genomics Genet. 9: 7-18.

Shao, Y., Xu, F., Sun, X., Bao, J. and Beta, T., 2014, Phenolic acids, anthocyanins, and antioxidant capacity in rice (*Oryza sativa* L.) grains at four stages of development after flowering, Food Chem. 143: 90-96.

Shi, J., Yu, J., Pohorly, J.E. and Kakuda, Y., 2003, Polyphenolics in grape seeds biochemistry and functionality, J. Med. Food 6: 291-299.

Shin, Y.M., Park, H.J., Yim, S.D., Baek, N.I., Lee, C.H., An, G. and Woo, Y.M., 2006, Transgenic rice lines expressing maize *C1*

and *R-S* regulatory genes produce various flavonoids in the endosperm, Plant Biotechnol. J. 4: 303-315.

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

Sun, X., Zhang, Z., Chen, C., Wu, W., Ren, N., Jiang, C. and Zhang, H., 2018, The *C-S-A* gene system regulates hull pigmentation and reveals evolution of anthocyanin biosynthesis pathway in rice, J. Exp. Bot. 69: 1485-1498.

Toki, S., 1997, Rapid and efficient *Agrobacte rium*-mediated transformation in rice, Plant Mol. Biol. Rep. 15: 16-21.

Zhu, Q., Yu, S., Zeng, D., Liu, H., Wang, H., Yang, Z. and Zhao, X., 2017, Development of “Purple Endosperm Rice” by engineering anthocyanin biosynthesis in the endosperm with a high-efficiency transgene stacking system, Mol. Plant 10: 918-929.