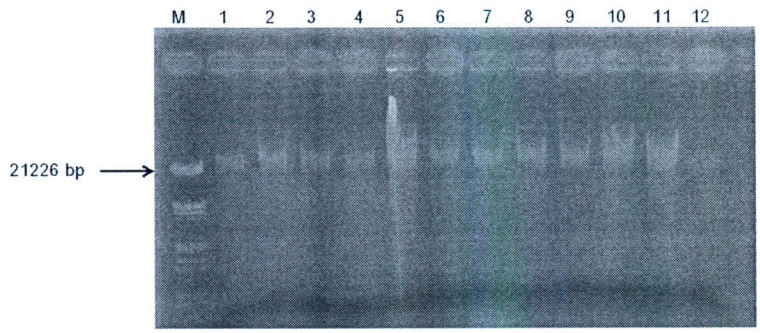
บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. การตรวจสอบยีน *OSB2* โดยเทคนิค PCR

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าว

จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าว 12 พันธุ์ พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีขนาดใหญ่ แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี และสามารถนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบยีน *OSB2* ในจีโนมข้าวเหล่านี้ต่อไป (ภาพ 10)

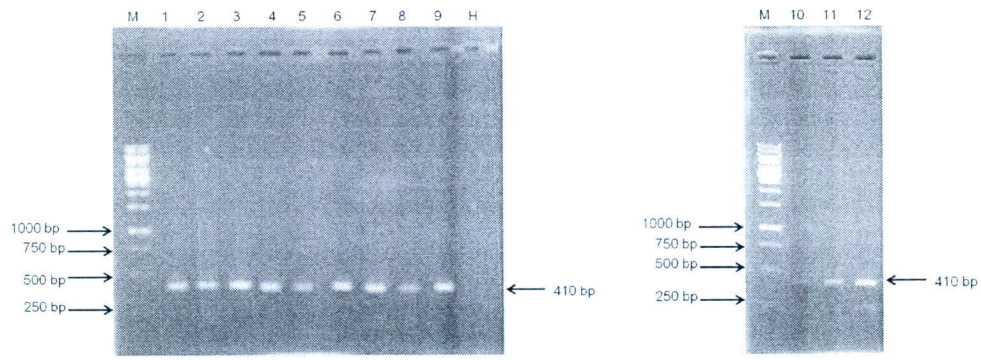


ภาพ 10 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าว

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Eco*RI + *Hin*dIII ช่องที่ 1-12 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake Sasanishiki Nipponbare กข6 ขาวดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง ลืมผัว MJU ลืมผัว KU สังข์หยดพัทลุง หอมนิล ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา ตามลำดับ

1.2 การตรวจสอบยีน *OSB2* ด้วยเทคนิค PCR

เมื่อสกัดดีเอ็นเอแล้วทำการตรวจสอบยีน *OSB2* จากจีโนมข้าวทั้ง 12 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OSB2F และ OSB2R (ภาคผนวก 1) ที่จำเพาะต่อส่วนหนึ่งของยีน *OSB2* พบว่า ข้าวทุกพันธุ์ที่นำมาศึกษาพบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 410 bp (ภาพ 11) จึงแสดงให้เห็นว่า ข้าวทุกพันธุ์ที่ศึกษาทั้งข้าวขาวและข้าวสีมียีน *OSB2* อยู่ในจีโนม จึงนำไปสู่การทดลองต่อไปคือการตรวจสอบการแสดงออกและค้นหายีนในส่วนที่เป็น coding region ในขั้นต่อไป



ภาพ 11 ผลการตรวจสอบยีน *OSB2* ในจีโนมข้าวด้วยเทคนิค PCR

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1-12 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake Sasanishiki Nipponbare กข 6 ขาวดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง ลืมผัว MJU ลืมผัว KU หอมนิล ก่ำหนองเต่าคำ ข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา สังข์หยดพัทลุง ตามลำดับ

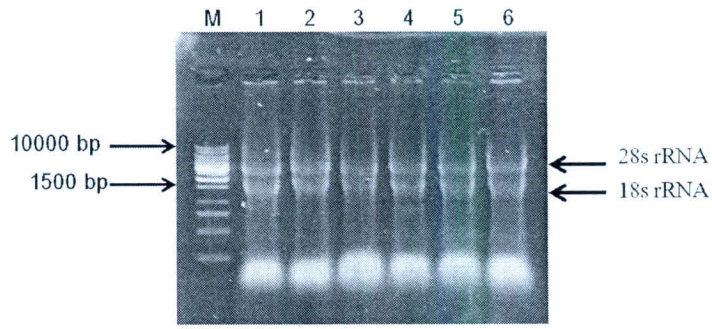
จากการตรวจสอบยีน *OSB2* จากจีโนมข้าว พบว่า ในข้าวทุกพันธุ์ที่ตรวจสอบทั้งข้าวขาวและข้าวสีมียีน *OSB2* อยู่ในจีโนม เนื่องจากเกิดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 410 bp ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sakamoto et al. (2001) ที่มีการศึกษายีน *OSB2* จากข้าว T65 ปกติซึ่งมีใบสีเขียวและเมล็ดขาว และจากข้าว T65-*pl*[w] ที่มีต้นสีม่วง พบว่าทั้งข้าว T65 ปกติซึ่งเป็นข้าวขาว และ T65 ต้นสีม่วงล้วนมียีน *OSB2* เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน พบว่ายีน *OSB2* มีการแสดงออกเฉพาะในข้าว T65-*pl*[w] ต้นสีม่วงเท่านั้นแต่ไม่พบการแสดงออกของยีนในข้าวพันธุ์ T65 ปกติ

2. การค้นหายีน *OSB2* ด้วยเทคนิค RT-PCR

2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าว

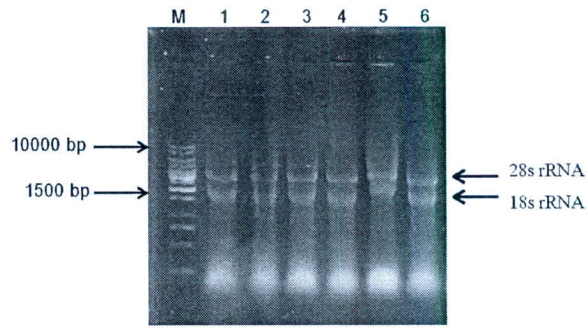
สกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อนหลังเพาะเมล็ดอายุ 4 สัปดาห์ และเมล็ดอ่อนในระยะน้ำนม หลังออกดอกประมาณ 15 วัน ของข้าวทั้ง 12 พันธุ์ ได้แก่ Sasanishiki Kitaake Niponbarea กข6 ขาวดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง สังข์หยดพัทลุง ลืมผัว MJU ลืมผัว KU หอมนิล ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา พบแถบอาร์อาร์เอ็นเอ (rRNA) ที่สกัดจากใบอ่อนขนาด 18S และ 28S ที่ชัดเจนแสดงว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนมีคุณภาพดี (ภาพ 12 และ 13) ส่วนอาร์เอ็นเอที่สกัดจากเมล็ดอ่อนพบแถบอาร์อาร์เอ็นเอขนาด 18S และ 28S เช่นกันแต่ไม่ชัดเจนเท่าอาร์เอ็นเอที่สกัด

จากใบอ่อน (ภาพ14) เนื่องจากเมล็ดอ่อนมีส่วนประกอบของแป้งเป็นหลักและต้องสกัดในระยะที่เหมาะสมคือระยะน้ำนมเท่านั้นจึงอาจทำให้ได้อาร์เอ็นเอปริมาณน้อย ดังนั้นอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนสามารถนำไปเป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์ cDNA เพื่อใช้ในการโคลนยีนต่อไปได้



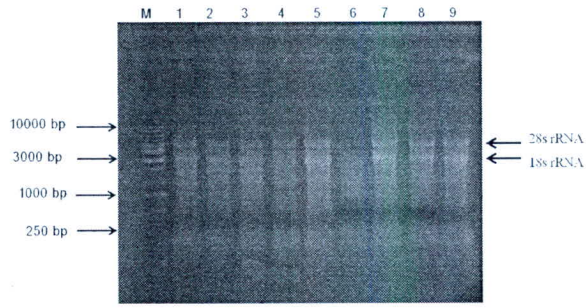
ภาพ 12 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อนของข้าว

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1-6 คือ ข้าวพันธุ์สังข์หยด พัทลุง ลืมผัว MJU ลืมผัว KU หอมนิล ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา ตามลำดับ



ภาพ 13 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อนของข้าว

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1-6 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake Sasanishiki Nipponbare กข6 ขาวดอกมะลิ 105 และหอมมะลิแดง ตามลำดับ

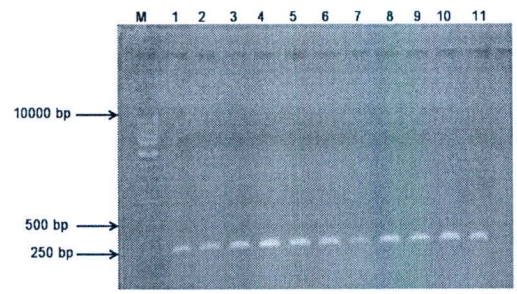


ภาพ 14 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเมล็ดอ่อนของข้าว

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1-9 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake Sasanishiki Nipponbare หอมมะลิแดง ลืมผัว MJU ลืมผัว KU หอมนิล กำหนองเต่าคำ และกำพะเยา ตามลำดับ

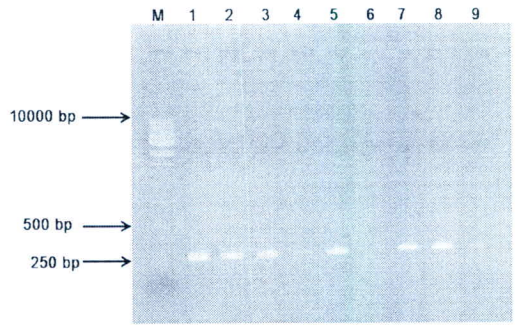
2.2 การค้นหายีน *OSB2* โดยเทคนิค RT-PCR

เมื่อสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนจากข้าวพันธุ์ต่างๆ 12 พันธุ์ จากนั้นทำการสังเคราะห์ First Strand cDNA โดยปฏิกิริยา reverse transcription (RT) และตรวจสอบ cDNA ที่ใช้เป็นแม่พิมพ์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *actin* พบว่า cDNA จากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าวทุกพันธุ์เกิดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังมีขนาดประมาณ 276 bp จึงนำ cDNA เหล่านี้ไปเป็นแม่พิมพ์ในการทำ PCR ต่อไป (ภาพ 15 และ 16)



ภาพ 15 ผลการตรวจสอบยีน *actin* โดยใช้ cDNA จากใบอ่อนของข้าวเป็นแม่พิมพ์ด้วยเทคนิค PCR

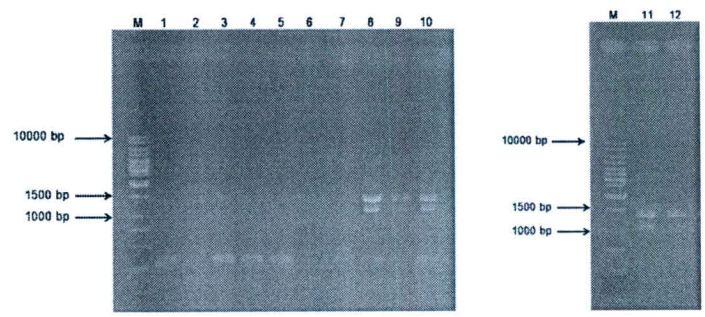
หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1-11 คือ ข้าวพันธุ์ Sasanishiki Nipponbare กข6 ขาวดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง ลืมผัว MJU ลืมผัว KU สังข์หยดพัทลุง หอมนิล กำหนองเต่าคำ และกำพะเยา ตามลำดับ



ภาพ 16 ผลการตรวจสอบยีน *actin* โดยใช้ cDNA จากเมล็ดอ่อนของข้าวเป็นแม่พิมพ์ด้วยเทคนิค PCR

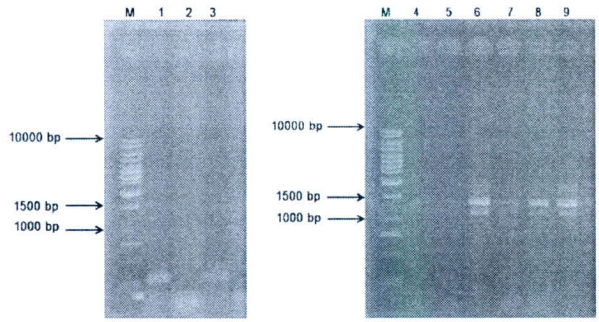
หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1-9 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake Sasanishiki Nipponbare กข6 ขาวดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง ลืมผัว MJU ลืมผัว KU และหอมนิล ตามลำดับ

จากนั้นทำการค้นหายีน *OSB2* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ cDNA ที่สังเคราะห์จากอาร์เอ็นเอเป็นแม่พิมพ์ และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ coding region ของยีน *OSB2* พบว่า cDNA จากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU ลืมผัว KU หอมนิล กำหนองเต่าคำ และกำพะเยา เกิดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังมีขนาดประมาณ 1,300 bp และ 1,100 bp ซึ่งข้าวพันธุ์อื่นไม่พบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวัง (ภาพ 17) ส่วน cDNA จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ลืมผัว KU หอมนิล กำหนองเต่าคำ และกำพะเยา พบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 1,300 bp และ 1,100 bp ส่วนข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU พบการแสดงออกของยีน *OSB2* ในใบเท่านั้น แต่ไม่พบการแสดงออกในเมล็ดอ่อน (ภาพ 18)



ภาพ 17 ผลการค้นหายีน *OSB2* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ cDNA จากใบอ่อนของข้าวเป็นแม่พิมพ์

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1-12 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake Sasanishiki Nipponbare กข6 ขาวดอกมะลิ 105 หอมมะลิแดง สังข์หยดพัทลุง หอมนิล ก่ำหนองเต่าคำ ก่ำพะเยา ลืมผัว MJU และลืมผัว KU ตามลำดับ



ภาพ 18 ผลการค้นหายีน *OSB2* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ cDNA จากเมล็ดอ่อนของข้าวเป็นแม่พิมพ์

หมายเหตุ ช่อง M คือ 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1-9 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake Sasanishiki Nipponbare หอมมะลิแดง ลืมผัว MJU ลืมผัว KU หอมนิล ก่ำหนองเต่า และก่ำพะเยา ตามลำดับ

ดังนั้นจากการค้นหายีน *OSB2* พบว่า ยีนมีการแสดงออกในใบอ่อนและเมล็ดอ่อนข้าวสีดำเท่านั้น สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ที่ไม่พบการแสดงออกของยีน *OSB2* ในข้าวใบเขียวที่มีเมล็ดสีขาว รวมทั้งไม่พบการแสดงออกของยีนโครงสร้าง *OsF3H, OsDFR และ OsANS1* ซึ่งยีน *OSB2* จะแสดงออกในข้าวพันธุ์ T65-*Pl*^{w} ที่มีใบสีม่วงเท่านั้น (Shih et al., 2008) นอกจากนี้ข้าวเมล็ดสีดำที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ทุกพันธุ์พบการแสดงออกของยีนสองรูปแบบทั้งใบอ่อนและเมล็ดอ่อน (ยกเว้นลืมผัว MJU พบการแสดงออกในใบอ่อนเท่านั้น) คือ เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 1300 bp ตามที่คาดหวังสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ (Sakamoto et al., 2001) แต่ในงานวิจัยนี้ได้ค้นพบยีนขนาด 1,100 bp อีกด้วย ซึ่งต้องมีการศึกษาลำดับเบสของยีนที่ได้ทั้ง 2 ขนาดต่อไป

การค้นหายีน *OSB2* ด้วยเทคนิค RT-PCR จากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าว 12 พันธุ์ พบว่า มีข้าวเพียง 5 พันธุ์ ได้แก่ ลืมผัว MJU ลืมผัว KU หอมนิล ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา เกิดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวัง (ตาราง 3) แสดงว่าข้าวเหล่านี้มีการแสดงออกของยีน *OSB2* ในใบอ่อนและเมล็ดอ่อน ยกเว้นข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU ที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในเมล็ดอ่อน แสดงว่ายีนอาจไม่มีการแสดงออกในเมล็ดอ่อน นอกจากนี้พบว่าข้าวเมล็ดขาว ได้แก่ ข้าวพันธุ์ Kitaake Sasanishiki

Nipponbare กข6 และขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวเมล็ดแดง ได้แก่ ข้าวพันธุ์หอมมะลิแดง และสังข์หยดพัทลุง ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวัง แต่ข้าวเหล่านี้มียีน *OSB2* เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR แสดงว่ายีน *OSB2* อาจไม่แสดงออกในข้าวขาว

ตาราง 3 สรุปผลการค้นหา complete cds ของยีน *OSB2* โดยใช้ cDNA ที่เตรียมจากใบอ่อน และเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ต่างๆ ด้วยเทคนิค PCR

พันธุ์ข้าว	ใบอ่อน		เมล็ดอ่อน	
	สีใบ	แถบดีเอ็นเอ (bp)	สี pericarp	แถบดีเอ็นเอ (bp)
Kitaake	เขียว	Nd	ขาว	Nd
Sasanishiki	เขียว	Nd	ขาว	Nd
Nipponbare	เขียว	Nd	ขาว	Nd
กข 6	เขียว	Nd	ขาว	Nd
ขาวดอกมะลิ 105	เขียว	Nd	ขาว	Nd
หอมมะลิแดง	เขียว	Nd	แดง	Nd
สังข์หยดพัทลุง	เขียว	Nd	แดง	Nd
ลืมผัว MJU	เขียว	1,100/1,300	ดำ	Nd
ลืมผัว KU	เขียว	1,100/1,300	ดำเข้ม	1,100/1,300
หอมนิล	เขียว	1,100/1,300	ดำเข้ม	1,100/1,300
ก่ำหนองเต่าคำ	ม่วง	1,100/1,300	ดำเข้ม	1,100/1,300
ก่ำพะเยา	ม่วง	1,100/1,300	ดำเข้ม	1,100/1,300

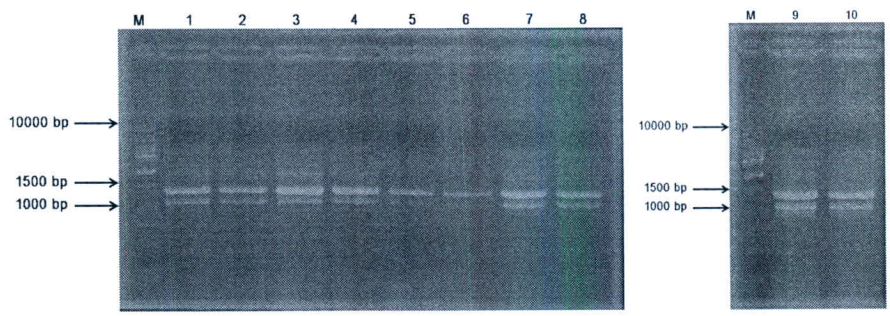
หมายเหตุ Nd = Not detected คือทำการทดลอง แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอ

pericarp = เยื่อหุ้มเมล็ดชั้นนอก

3. การโคลนยีน *OSB2* เข้าสู่เวกเตอร์ pGEM-T Easy

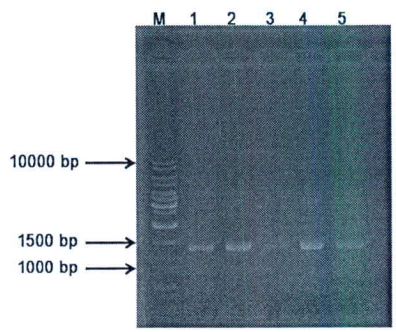
3.1 การแยกบริสุทธิ์ยีน *OSB2* จากเจล

เมื่อค้นหายีนด้วยเทคนิค RT-PCR ทำการเพิ่มปริมาณยีน *OSB2* จากใบอ่อนของข้าวจำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ ลืมผัว MJU ลืมผัว KU หอมนิล กำหนองเตาคำ และกำพะเยา และจากเมล็ดอ่อนของข้าวจำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ ลืมผัว KU หอมนิล กำหนองเตาคำ และกำพะเยา (ข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังในเมล็ดอ่อน) ทั้งขนาด 1,300 และ 1,100 bp เพื่อโคลนเข้าสู่ pGEM-T Easy สำหรับวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป (ภาพ 19–22)



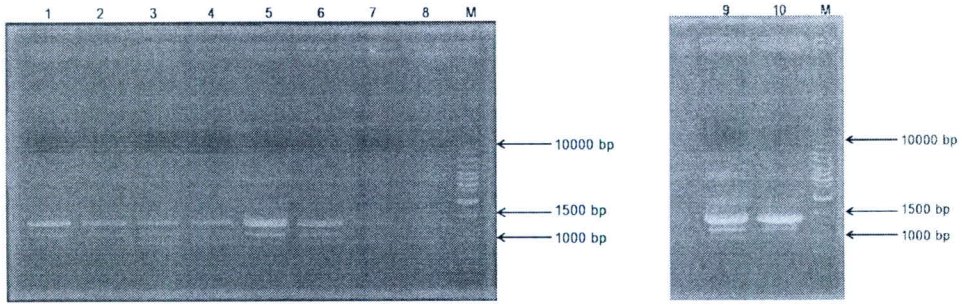
ภาพ 19 ผลการเพิ่มปริมาณยีน *OSB2* โดยใช้ cDNA จากใบอ่อนของข้าวด้วยเทคนิค PCR

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1-2 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU ช่องที่ 3-4 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ช่องที่ 5-6 คือ ข้าวพันธุ์หอมนิล ช่องที่ 7-8 คือ ข้าวพันธุ์กำหนองเต่าคำ ช่องที่ 9-10 คือ ข้าวพันธุ์กำพะเยา



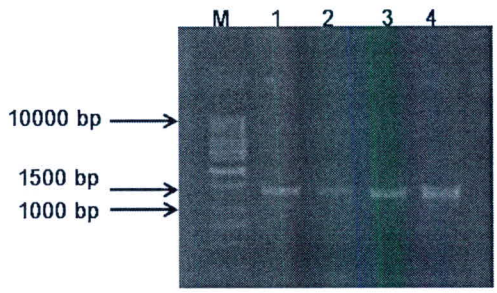
ภาพ 20 ผลการแยกบริสุทธิ์ยีน *OSB2* จากเจล โดยใช้ cDNA จากใบอ่อนเป็นแม่พิมพ์

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1-5 คือ ข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU กำหนองเต่าคำ ลืมผัว KU หอมนิล และกำพะเยา ตามลำดับ



ภาพ 21 ผลการเพิ่มปริมาณยีน *OSB2* โดยใช้ cDNA จากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าวด้วยเทคนิค PCR

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1-2 คือ จากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ช่องที่ 3-4 คือ จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์หอมนิล ช่องที่ 5-6 คือ จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ช่องที่ 7-8 คือ จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ ช่องที่ 9-10 คือ จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา



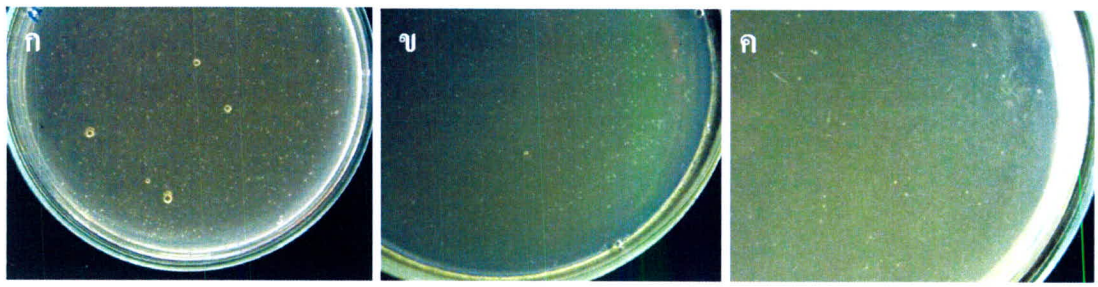
ภาพ 22 ผลการแยกบริสุทธิ์ยีน *OSB2* จากเจล

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1-4 คือ ยีน *OSB2* จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์หอมนิล ลืมผัว KU ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา ตามลำดับ

3.2 การเชื่อมชิ้นยีน *OSB2* เข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy และส่งถ่ายเข้าสู่ *E. coli* competent cell

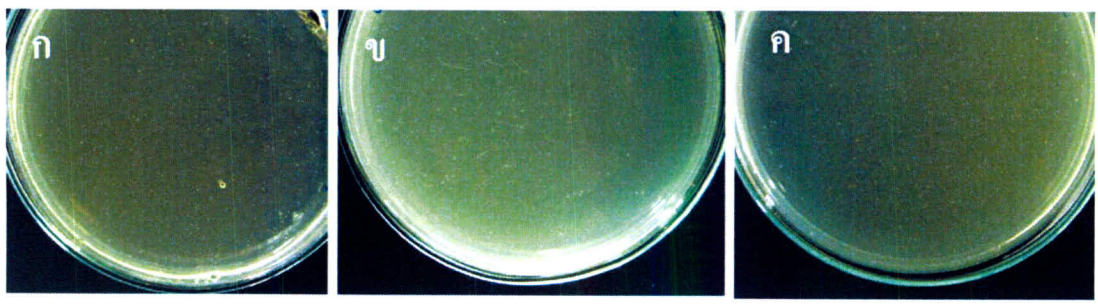
ในงานวิจัยนี้ได้นำยีน *OSB2* จากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยาที่ทำการแยกบริสุทธิ์จากเจลขนาด 1,300 และ 1,100 bp มาเชื่อมต่อกับ pGEM-T Easy จากนั้นส่งถ่ายเข้าสู่ competent cell แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีแอมพิซิลินเพื่อคัดเลือกโคลน

ที่ได้รับพลาสมิด พบว่า ได้โคโลนีสีขาวจำนวนมาก และโคโลนีสีฟ้า (ภาพ 23 และ 24) จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวเหล่านี้แล้วนำพลาสมิดไปวิเคราะห์ลำดับเบส



ภาพ 23 ผลการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *E. coli* DH5α ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร X-gal 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

หมายเหตุ (ก) ยีนจากใบอ่อนของข้าวพันธุ์กำหนองเต่าคำขนาด 1,300 bp (ข) ยีนจากใบอ่อนของข้าวพันธุ์กำหนองเต่าคำขนาด 1,100 bp (ค) ยีนจากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์กำหนองเต่าคำขนาด 1,300 bp

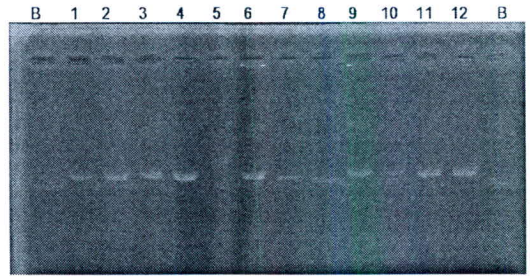


ภาพ 24 ผลการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *E. coli* DH5α ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร X-gal 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

หมายเหตุ (ก) ยีนจากใบอ่อนของข้าวพันธุ์กำพะเยาขนาด 1,300 bp (ข) ยีนจากใบอ่อนของข้าวพันธุ์กำพะเยาขนาด 1,100 bp (ค) ยีนจากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์กำพะเยาขนาด 1,300 bp

3.3 การคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยขนาด (Rapid size screening)

จากการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมที่มียีน *OSB2* จากใบและเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา ขนาด 1,300 กับ 1,100 bp อย่างละ 4 โคโลนี พบว่า ดีเอ็นเอสายผสมทุกโคลนที่คัดเลือกมีขนาดใหญ่กว่าดีเอ็นเอจากโคโลนีสีฟ้า (ภาพ 25) คาดว่าโคโลนีสีขาวเหล่านี้ได้รับยีน *OSB2* จึงนำมาสกัดพลาสมิดและคัดเลือกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป

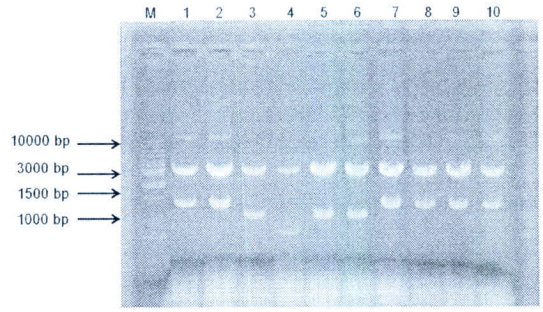


ภาพ 25 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด

หมายเหตุ ช่อง B คือ โคโลนีสีฟ้า ช่องที่ 1-4 คือ โคโลนีที่คัดเลือกจากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าขนาด 1,300 bp ช่องที่ 5-8 คือ โคโลนีที่คัดเลือกจากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำพะเยาขนาด 1,100 bp ช่องที่ 9-12 คือ โคโลนีที่คัดเลือกจากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำขนาด 1,300 bp

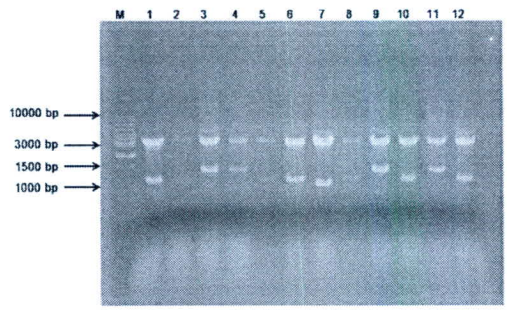
3.4 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบว่า พลาสมิดที่คัดเลือกจากโคลนที่มียีน *OSB2* จากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกับที่คาดหวังประมาณ 1,300 กับ 1,100 bp และขนาดประมาณ 3,000 bp ซึ่งเป็นเวกเตอร์ pGEM-T Easy ดังนั้นโคโลนีที่คัดเลือกทั้งหมดน่าจะมียีน *OSB2* (ภาพ 26 และ 27)



ภาพ 26 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

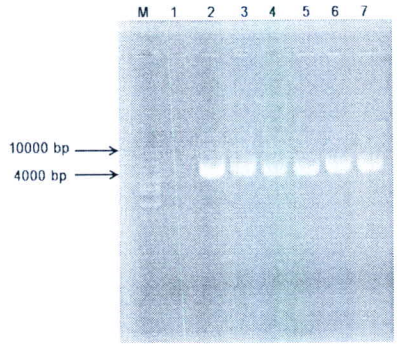
หมายเหตุ ช่องที่ 1-2 คือ จากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำขนาด 1,300 bp โคโลนีที่ 1-2 ช่องที่ 3-6 คือ จากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำขนาด 1,100 bp โคโลนีที่ 1-4 และช่องที่ 7-10 คือ จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำขนาด 1,300 bp โคโลนีที่ 1-4



ภาพ 27 ผลการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

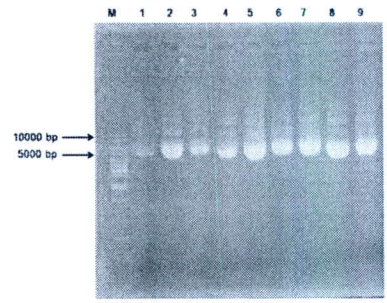
หมายเหตุ ช่องที่ 1-4 คือ จากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำพะเยาขนาด 1,300 bp โคโลนีที่ 1-4 ช่องที่ 5-8 คือ จากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำพะเยาขนาด 1,100 bp โคโลนีที่ 1-4 และช่องที่ 9-12 คือ จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำพะเยาขนาด 1,300 bp โคโลนีที่ 1-4

เมื่อคัดเลือกโคลนที่ถูกต้องจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำการสกัดพลาสมิด pGEM-T Easy ที่มียีน *OSB2* จากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา ทั้งขนาด 1,100 และ 1,300 bp เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป (ภาพ 28 และ 29)



ภาพ 28 ผลการสกัดพลาสมิด pGEM-T Easy ที่มียีน *OSB2* จากข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ

หมายเหตุ ช่องที่ 1-3 คือ จากใบอ่อนขนาด 1,300 bp โคโลนีที่ 1-3 ช่องที่ 4-5 คือ จากใบอ่อนขนาด 1,100 bp โคโลนีที่ 1-2 และช่องที่ 6-7 คือ จากเมล็ดอ่อนขนาด 1,300 bp โคโลนีที่ 1-2



ภาพ 29 ผลการสกัดพลาสมิด pGEM-T Easy ที่มียีน *OSB2* จากข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา

หมายเหตุ ช่องที่ 1-3 คือ จากใบอ่อนขนาด 1,300 bp โคโลนี 1-3 ช่องที่ 4-6 คือ จากใบอ่อนขนาด 1,100 bp โคโลนีที่ 1-3 และช่องที่ 7-9 คือ จากเมล็ดอ่อนขนาด 1,300 bp โคโลนีที่ 1-2

จากงานวิจัยนี้สามารถโคลนยีน *OSB2* ได้จากข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา สำหรับโคลนที่คัดเลือกจากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำที่มีขนาด 1,300 bp สามารถคัดเลือกได้จำนวน 3 โคลน และขนาด 1,100 bp จำนวน 2 โคลน ส่วนโคลนที่คัดเลือกจากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำพะเยาที่มียีนขนาด 1,300 bp ได้จำนวน 3 โคลน และขนาด 1,100 bp จำนวน 2 โคลน

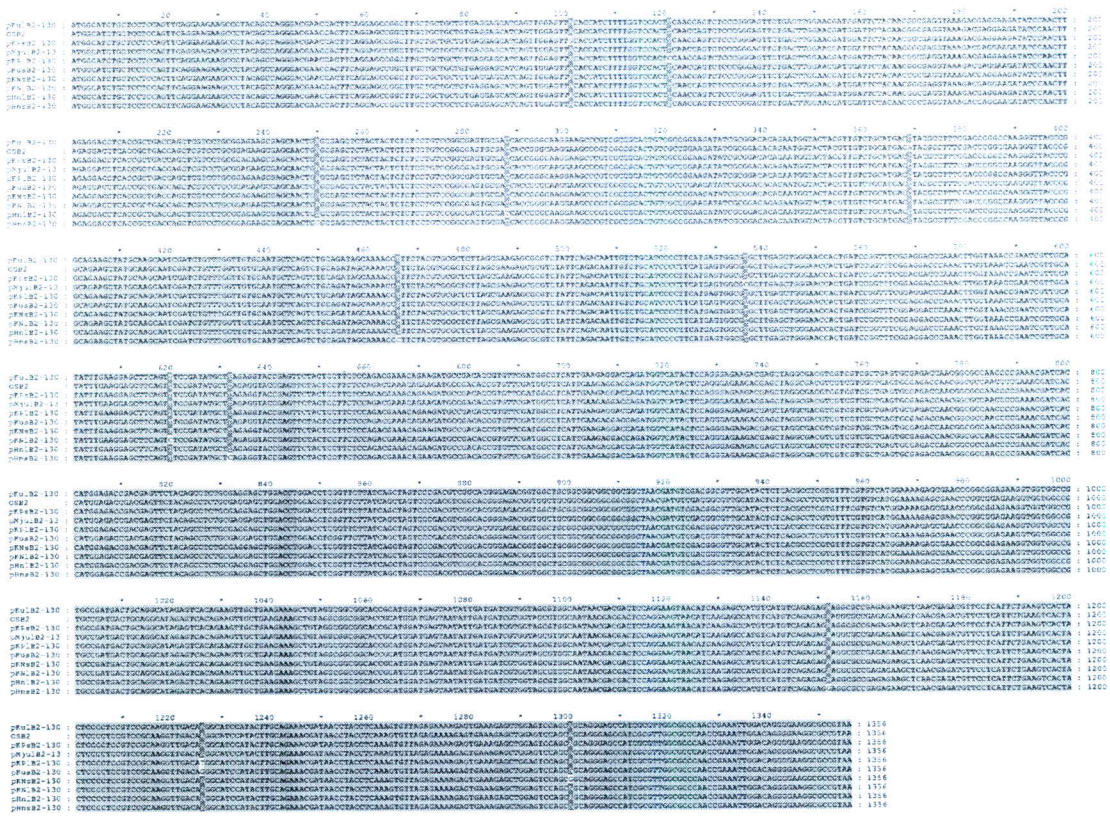
นอกจากนี้สามารถโคลนยีน *OSB2* ได้จากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา โดยสามารถคัดเลือกโคลนจากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำที่มียีน *OSB2*

ขนาด 1,300 bp ได้จำนวน 3 โคลน และขนาด 1,100 bp จำนวน 2 โคลน และคัดเลือกโคลนจากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำพะเยาที่มียีนขนาด 1,300 bp ได้จำนวน 3 โคลน และขนาด 1,100 bp จำนวน 2 โคลน

4. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OSB2* จากโคโลนีสายผสมที่ถูกคัดเลือก

จากการวิจัยนี้สามารถโคลนยีน *OSB2* จากใบและเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำและก่ำพะเยา ขนาด 1,300 และ 1,100 bp แล้วส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบส จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ coding region ของยีน *OSB2* ที่โคลนได้เปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน *OSB2* จากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU ลืมผัว KU และหอมนิล และจากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ลืมผัว KU และหอมนิล ทั้งขนาด 1,300 และ 1,100 bp จากรายงานปัญหาพิเศษของวิศิษฏ์ (2556) และเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OSB2* จากข้าวสีในฐานข้อมูล GenBank (accession no. AB021080) พบว่า ยีน *OSB2* ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์ต่างๆ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ open reading frame (ORF) ขนาด 1,356 bp ซึ่งมีความเหมือนกับยีนในฐานข้อมูลถึง 99 เปอร์เซ็นต์ โดยในแต่ละพันธุ์แตกต่างจากยีนในฐานข้อมูลจำนวน 12 นิวคลีโอไทด์ จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OSB2* จากข้าวเมล็ดสีดำทั้ง 5 พันธุ์ มีลำดับเบสขนาด 1,356 bp เหมือนกับยีนจากข้าว T65-*pl*^{w} (Sakamoto et al., 2001) (ภาพ 30) ส่วนยีน *OSB2* ขนาด 1,100 bp ประกอบด้วย ORF ขนาด 1,101 bp ซึ่งพบว่า มีบริเวณลำดับเบสบางส่วนขาดหายไปในชิ้นยีนขนาด 1,101 bp ที่ตำแหน่งเบสที่ 138-392 (ภาพ 31)

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OSB2* ที่โคลนจากข้าวพันธุ์ต่างๆ ขนาด 1,356 bp และ1,101 bp กับจีโนมิกดีเอ็นเอของยีน *OSB2* ของข้าว japonica ในฐานข้อมูล พบว่ายีนขนาด 1,101 bp มีลำดับเบสของเอกซอนที่ 2 หายไปจำนวน 255 bp แสดงว่า ยีน *OSB2* ในข้าวที่ศึกษาในงานวิจัยนี้อาจมี 2 รูปแบบ ที่มี ORFs ขนาด 1,356 bp และ 1,101 bp หรือ อาจมียีนเดียวแต่มีการดัดแปลง mRNA โดยเกิดการเลือกตัดอินทรอนแตกต่างกัน (alternative splicing) ทำให้เกิด mRNA 2 รูปแบบที่มีขนาดต่างกัน (ภาพ 31)



ภาพ 30 การเปรียบเทียบลำดับเบสของบริเวณ coding sequence ของยีน *OSB2* ขนาด 1,300 bp ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์ต่างๆ กับยีน *OSB2* ใน GenBank (accession no. AB021080) ซึ่งบริเวณที่แรเงาสีเทาแสดงให้เห็นลำดับเบสที่เหมือนกันของข้าวแต่ล่ะพันธุ์

หมายเหตุ *OSB2* คือ ยีน *OSB2* ในฐานข้อมูล GenBank

pLMlB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากใบอ่อนข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU ขนาด 1,300 bp

pLKlB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากใบอ่อนข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ขนาด 1,300 bp

pLKsB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากเมล็ดอ่อนข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ขนาด 1,300 bp

pHNlB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากใบอ่อนข้าวพันธุ์หอมนิล ขนาด 1,300 bp

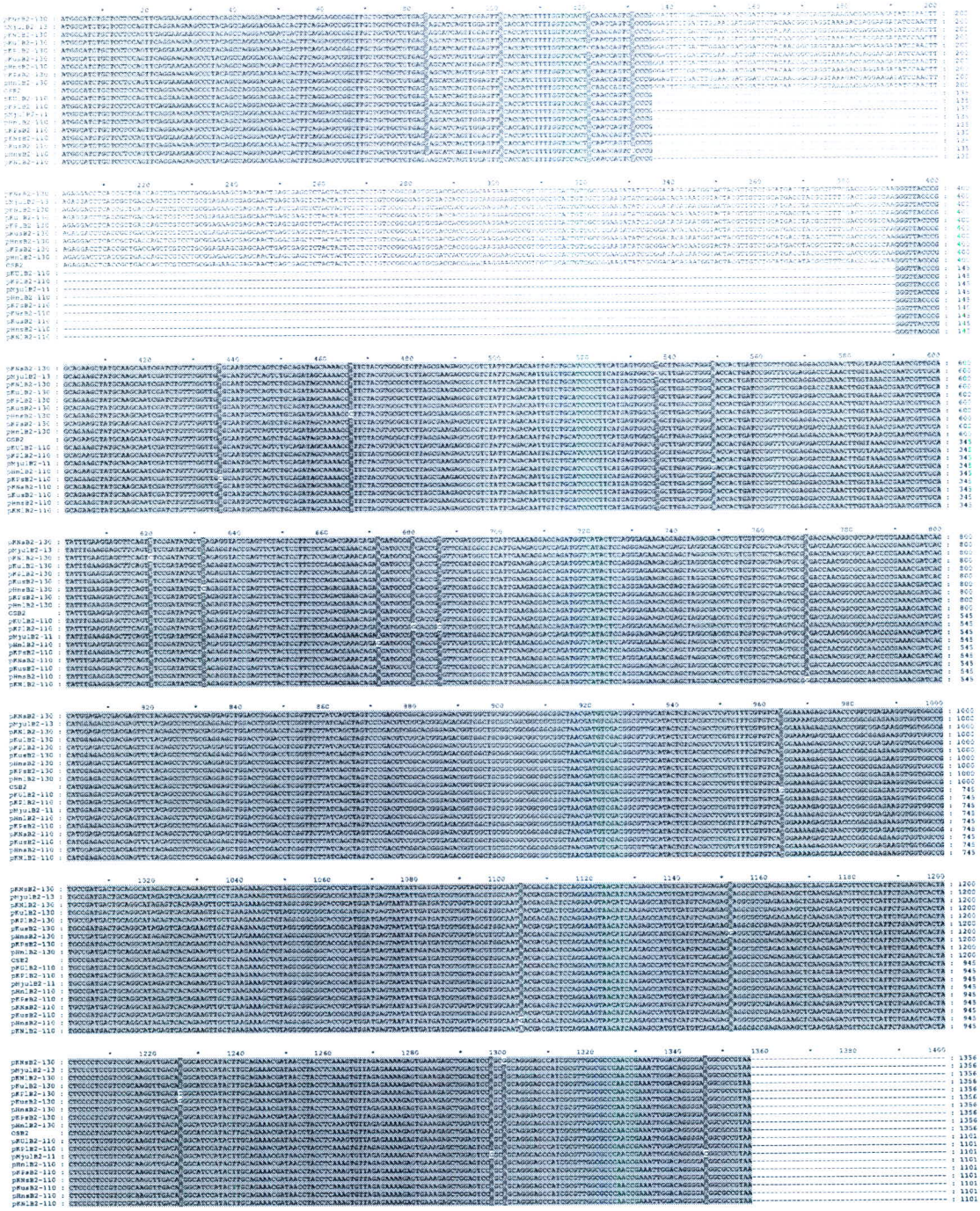
pHNsB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากเมล็ดอ่อนข้าวพันธุ์หอมนิล ขนาด 1,300 bp

pKNlB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากใบอ่อนข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำขนาด 1,300 bp

pKNsB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากเมล็ดอ่อนข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำขนาด 1,300 bp

pKPlB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากใบอ่อนข้าวพันธุ์ก่ำพะเยาขนาด 1,300 bp

pKPsB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากเมล็ดอ่อนข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา ขนาด 1,300 bp



ภาพ 31 การเปรียบเทียบลำดับเบสของบริเวณ coding sequence ของยีน *OSB2* ขนาด 1,300 bp และ 1,100 bp ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์ต่างๆ กับยีน *OSB2* ใน GenBank (accession no. AB021080)

หมายเหตุ บริเวณที่แรเงาสีเทาอ่อนแสดงให้เห็นลำดับเบสที่เหมือนกันของข้าวแต่ละสายพันธุ์ ส่วนบริเวณที่ไม่แรเงา คือ ลำดับเบสที่ตำแหน่ง 138-392 ที่ขาดหายไปทั้งหมด 255 bp ของยีนขนาด 1,100 bp

OSB2 คือ ยีน *OSB2* ในฐานข้อมูล GenBank

pLMlB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากใบอ่อนข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU ขนาด 1,300 bp

pLKlB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากใบอ่อนข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ขนาด 1,300 bp

pLKsB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากเมล็ดอ่อนข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ขนาด 1,300 bp

pHNlB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากใบอ่อนข้าวพันธุ์หอมนิลขนาด 1,300 bp

pHNsB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากเมล็ดอ่อนข้าวพันธุ์หอมนิลขนาด 1,300 bp

pKNlB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากใบอ่อนข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำขนาด 1300 bp

pKNsB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากเมล็ดอ่อนข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำขนาด 1,300 bp

pKPlB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากใบอ่อนข้าวพันธุ์ก่ำพะเยาขนาด 1,300 bp

pKPsB2-1300 คือ ยีน *OSB2* จากเมล็ดอ่อนข้าวพันธุ์ก่ำพะเยา ขนาด 1,300 bp

pLMlB2-1100 คือ ยีน *OSB2* จากใบอ่อนข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU ขนาด 1,100 bp

pLKlB2-1100 คือ ยีน *OSB2* จากใบอ่อนข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ขนาด 1,100 bp

pLKsB2-1100 คือ ยีน *OSB2* จากเมล็ดอ่อนข้าวพันธุ์ลืมผัว KU ขนาด 1,100 bp

pHNlB2-1100 คือ ยีน *OSB2* จากใบอ่อนข้าวพันธุ์หอมนิลขนาด 1,100 bp

pHNsB2-1100 คือ ยีน *OSB2* จากเมล็ดอ่อนข้าวพันธุ์หอมนิลขนาด 1,100 bp

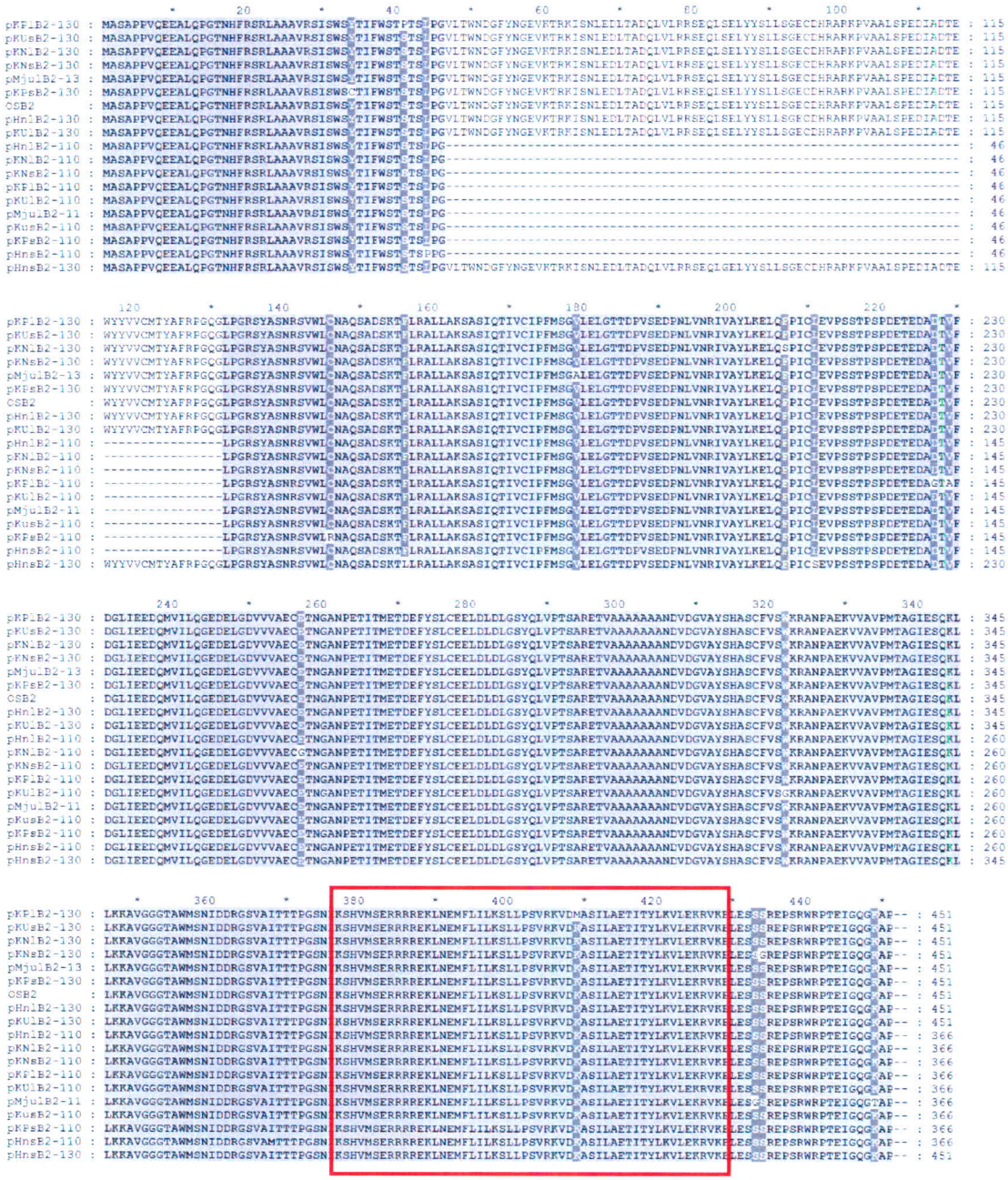
pKNlB2-1100 คือ ยีน *OSB2* จากใบอ่อนข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำขนาด 1,100 bp

pKNsB2-1100 คือ ยีน *OSB2* จากเมล็ดอ่อนข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำขนาด 1,100 bp

pKPlB2-1100 คือ ยีน *OSB2* จากใบอ่อนข้าวพันธุ์ก่ำพะเยาขนาด 1,100 bp

pKPsB2-1100 คือ ยีน *OSB2* จากเมล็ดอ่อนข้าวพันธุ์ก่ำพะเยาขนาด 1100 bp

จากนั้นวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OSB2* ที่โคลนได้เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีนขนาด 1,356 bp และ 1,101 bp มีลำดับกรดอะมิโนยาว 451 และ 366 หน่วย ตามลำดับ (ภาพ 32) ซึ่งลำดับกรดอะมิโนที่วิเคราะห์จากข้าวทั้ง 5 พันธุ์ คล้ายกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSB2* ในฐานข้อมูล (accession no.BAB64302) ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ มีเพียงจำนวน 7 กรดอะมิโนที่แตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ และพบส่วนที่เป็น basic helix-loop-helix (bHLH) domain ซึ่งเป็นบริเวณที่จับกับดีเอ็นเอ และเป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์สำหรับโปรตีน transcription factor



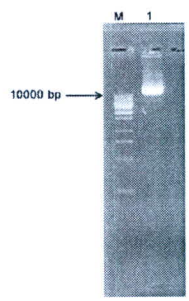
ภาพ 32 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSB2* ที่ได้จากการแปลรหัสของบริเวณ coding sequence จำนวน 452 กรดอะมิโนของยีนขนาด 1,356 bp ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ กับกรดอะมิโนของยีน *OSB2* ใน GenBank (accession no. BAB64302)

หมายเหตุ บริเวณที่แรเงาสีเทาอ่อนแสดงให้เห็นลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันของข้าวแต่ละพันธุ์ และบริเวณ bHLH domain ที่ตำแหน่ง 377-428 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในข้าวทุกพันธุ์ ลำดับกรดอะมิโนในกรอบสีแดง คือ ตำแหน่ง bHLH domain

5. การสร้างชุดยีนที่ประกอบด้วยยีน *OSB2* ภายใต้การควบคุมของ dual 35s Promoter และ *nos* Terminator

5.1 การเตรียมพลาสมิด p2CA และ ชิ้นยีน *OSB2*

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OSB2* จากข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยาที่สามารถโคลนได้ซึ่งมีความเหมือนกับยีนในฐานข้อมูล ทำการสร้างชุดยีนที่ประกอบด้วยยีน *OSB2* จากใบข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำที่มีขนาด 1,300 bp ให้อยู่ภายใต้การควบคุมของ dual 35s Promoter และ *nos* Terminator โดยสกัดพลาสมิด pGEM-T Easy ที่มีชิ้นยีน *OSB2* เพื่อเตรียมสำหรับปฏิกิริยาการตัดชิ้นยีน *OSB2* (insert) จาก pGEM-T Easy และนำไปเชื่อมเข้าสู่พลาสมิด p2CA ซึ่งมี dual 35s Promoter และ *nos* Terminator ต่อไป (ภาพ 33)

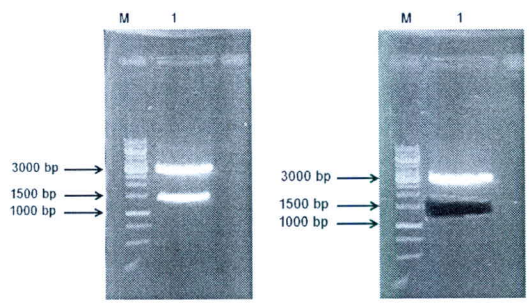


ภาพ 33 การสกัดพลาสมิด pGEM-T Easy ที่มีชิ้นยีน *OSB2* จากใบอ่อนข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1 คือ การสกัดพลาสมิด pGEM-T Easy ที่มีชิ้นยีน *OSB2*

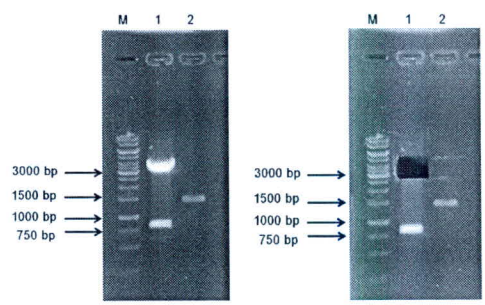
เตรียมชิ้นยีน *OSB2* ที่โคลนได้จากใบข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ ขนาด 1,300 bp จากเวกเตอร์ pGEM-T Easy เพื่อสร้างชุดยีนที่ประกอบด้วย dual 35s Promoter และ *nos* Terminator โดยตัดชิ้นยีนออกจากเวกเตอร์ pGEM-T Easy ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ได้ชิ้นยีน *OSB2* ขนาดตามที่คาดหวังประมาณ 1,300 bp (ภาพ 34 และ 35) แล้วทำให้ปลายชิ้นยีน *OSB2* (insert) เป็น blunt end เนื่องจากการโคลนยีน *OSB2* เข้าสู่พลาสมิด p2CA ที่ตัดชิ้นยีนเดิมออกระหว่าง *Bam*HI/ *Sac*I sites ไม่สามารถทำได้โดยตรงเนื่องจากลำดับเบสของยีน *OSB2* จากใบอ่อนของข้าวก่ำหนองเต่าคำมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I จึงไม่สามารถเตรียมชิ้นยีน *OSB2* โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I ได้ จึงทำการต่อปลายชิ้นยีนและพลาสมิด p2CA ให้เป็นปลายทู่ก่อนการโคลนชิ้นยีนเข้าสู่พลาสมิด p2CA ต่อไป

สำหรับการเตรียมพลาสมิด p2CA ซึ่งเป็นพลาสมิด pUC19 ที่มีชุดยีนที่ประกอบด้วยยีน *npt*II ขนาด 790 bp โคลนอยู่ที่ *Bam*HI/*Sac*I sites ภายใต้การควบคุมของ dual 35s Promoter ขนาดประมาณ 630 bp และ *nos* Terminator มีขนาดประมาณ 250 bp ทำการเตรียมพลาสมิดเพื่อสร้างชุดยีน *OSB2* ให้อยู่ภายใต้การควบคุมของ dual 35s Promoter และ *nos* Terminator โดยการตัดชิ้นยีนเดิมออกจากพลาสมิด p2CA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I แล้วแทนที่ด้วยยีน *OSB2* ซึ่งจากปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะพบชิ้นยีน *npt*II ขนาด 790 bp และ พลาสมิดขนาด 4,000 bp ซึ่งก็คือ pUC19 ที่มี dual 35s Promoter และ *nos* Terminator แล้วจึงทำการแยกบริสุทธิ์เฉพาะพลาสมิดขนาดประมาณ 4,000 bp เพื่อใช้ในปฏิกิริยาการเชื่อมเข้ากับยีน *OSB2* ต่อไป



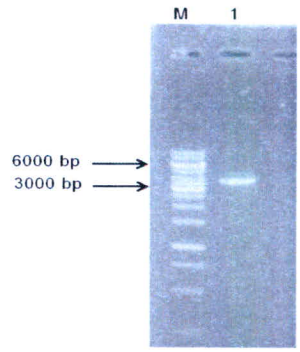
ภาพ 34 ผลการตัดพลาสมิด pGEM-T Easy ที่มีชิ้นยีน *OSB2* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1 คือ ผลการตัดพลาสมิด pGEM -T Easy ที่มีชิ้นยีน *OSB2* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI



ภาพ 35 การตัดพลาสมิด p2CA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1 คือ การตัดพลาสมิด p2CA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I ช่องที่ 2 ผลการแยกบริสุทธิ์ชิ้นยีน *OSB2* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI



ภาพ 36 การแยกบริสุทธิ์พลาสมิด p2CA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1 คือ พลาสมิด p2CA ที่แยกบริสุทธิ์จากเจลหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I

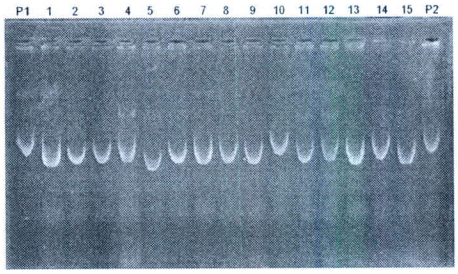
5.2 การเชื่อมชิ้นยีน *OSB2* เข้ากับพลาสมิด p2CA แล้วถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* competent cell

เชื่อมยีน *OSB2* เข้ากับพลาสมิด p2CA แล้วส่งถ่ายเข้าสู่ competent cell เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน พบว่าได้โคโลนีสีขาวจำนวนมาก (ภาพ 37) จากนั้นจึงทำการคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยขนาดและด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII ต่อไป

ภาพ 37 การเชื่อมชิ้นยีน *OSB2* เข้ากับพลาสมิด p2CA แล้วถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* competent cell เพาะเลี้ยงบนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

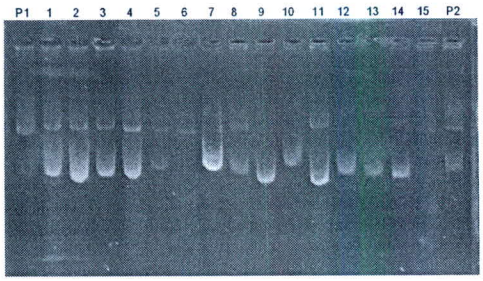
5.3 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมจากการเชื่อมชิ้นยีน *OSB2* เข้ากับพลาสมิด p2CA ด้วยขนาด (Rapid size screening)

จากการถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *E. coli* competent cell คัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมโดยนำโคโลนีจำนวน 57 โคโลนี จากการเชื่อมต่อยีน *OSB2* เข้ากับพลาสมิด p2CA มาเลี้ยงในอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นคัดเลือกด้วยขนาดและเปรียบเทียบพลาสมิด p2CA ที่ตัดชิ้นยีนออกแล้ว self ligation พบว่าโคโลนีที่คัดเลือกส่วนใหญ่มีขนาดใกล้เคียงกับพลาสมิด p2CA ยกเว้นพลาสมิดจากโคโลนีที่ 20, 22, 25, 35, 36 และ 48 ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า ดังนั้น จึงเลือกโคโลนีเหล่านี้และนำไปคัดเลือกต่อโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII (ภาพ 38-41)



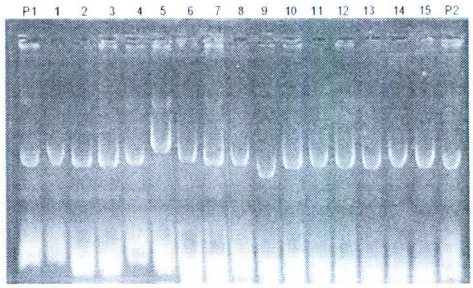
ภาพ 38 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยขนาด

หมายเหตุ ช่อง P1 และ P2 คือ พลาสมิด p2CA ที่ตัดชิ้นยีนออกแล้ว self ligation ช่อง 1-15 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกโคโลนีที่ 1-15 ตามลำดับ



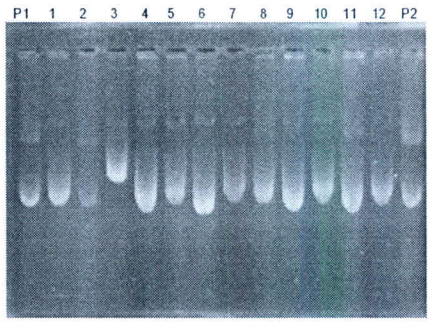
ภาพ 39 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยขนาด

หมายเหตุ ช่อง P1 และ P2 คือ พลาสมิด p2CA ที่ตัดชิ้นยีนเดิมออกแล้ว self ligation ช่อง 1-15 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกโคโลนีที่ 16-30 ตามลำดับ



ภาพ 40 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยขนาด

หมายเหตุ ช่อง P1 และ P2 คือ พลาสมิด p2CA ที่ตัดชิ้นยีนเดิมออกแล้ว self ligation ช่อง 1-15 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกโคโลนีที่ 31-45 ตามลำดับ

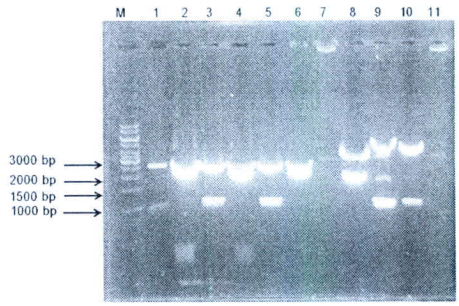


ภาพ 41 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยขนาด

หมายเหตุ ช่อง P1 และ P2 คือ พลาสมิด p2CA ที่ตัดชิ้นยีนเดิมออกแล้ว self ligation
ช่อง 1-12 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกโคโลนีที่ 46-57 ตามลำดับ

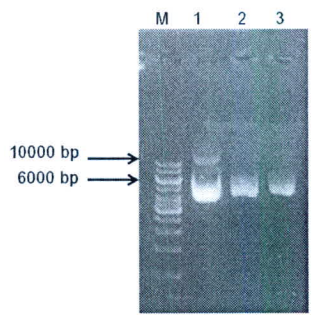
5.4 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมจากการเชื่อมชิ้นยีน *OSB2* เข้ากับพลาสมิด p2CA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตัดพลาสมิดสายผสมจากโคโลนีที่คัดเลือกทั้งหมด 6 โคโลนี ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII พบว่า โคโลนีที่ 22, 35 และ 48 มีขนาดของชิ้น insert ตามคาดหวังคือ 2,300 bp (ภาพ 42) จึงทำการตัดด้วย *Sac*I และ *Hin*dIII เพื่อยืนยันทิศที่ถูกต้อง (ทิศ sense) ซึ่งจากการตัดคาดว่าโคโลนีที่ 35 และ 48 (ภาพ 42 ช่องเจลที่ 9 และ 10) อาจเป็นโคโลนีที่มีพลาสมิดที่มีชิ้นยีน *OSB2* ในทิศที่ถูกต้อง เนื่องจากได้แถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือขนาดประมาณ 4,034 bp และ 888 bp จึงทำการสกัดพลาสมิดเพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส (ภาพ 43)



ภาพ 42 ผลการคัดเลือกพลาสมิดจากการเชื่อมต่อยีน *OSB2* เข้ากับพลาสมิด p2CA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่อง 1-6 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกโคโลนีที่ 20, 22, 25, 35, 36 และ 48 ที่ตัดด้วย *Eco*RI และ *Hin*dIII ช่องที่ 7 คือ พลาสมิด p2CA ที่ตัดชิ้นยีนเดิมออกแล้ว self-ligation จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII ช่องที่ 8-10 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกโคโลนีที่ 22, 36 และ 48 ที่ตัดด้วย *Sac*I และ *Hin*dIII ช่องที่ 11 คือ พลาสมิด p2CA ที่ตัดชิ้นยีนเดิมออกแล้ว self-ligation จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I และ *Hin*dIII



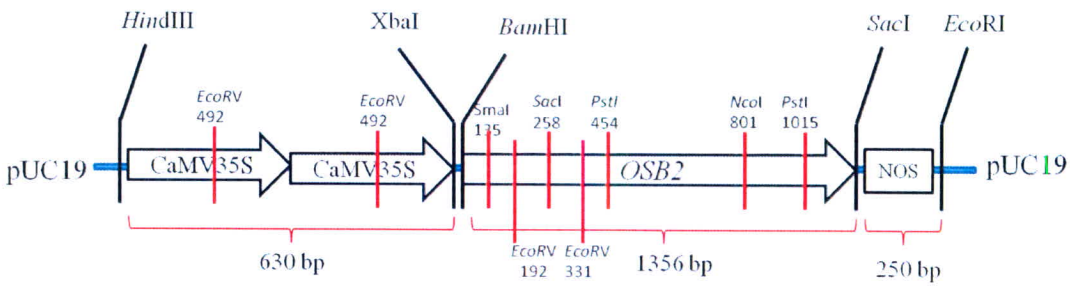
ภาพ 43 ผลการสกัดพลาสมิด p2CA ที่มีชิ้นยีน *OSB2*

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่อง 1-3 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกจากโคโลนีที่ 22, 36 และ 48 ตามลำดับ

5.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OSB2* จากโคโลนีสายผสมที่ถูกคัดเลือก

คัดเลือกพลาสมิดจาก 3 โคโลนี แล้วส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่า โคลนที่ 35 และ 48 มีชิ้นยีน *OSB2* ต่อกับ dual 35S Promoter และ *nos* Terminator โดยชิ้นยีน *OSB2* อยู่ในทิศทางที่ถูกต้องโดย start condon อยู่ทางด้านโปรโมเตอร์ เมื่อนำลำดับเบสไป blast กับฐานข้อมูล

GenBank พบว่าประกอบด้วยยีน *OSB2* ภายใต้การควบคุมของ dual 35s Promoter และ *nos* Terminator ซึ่งถือว่าเป็นโคลนที่ถูกต้องทำให้ได้ชุดยีนที่ประกอบด้วย dual 35SP::*OSB2*::Tnos (ภาพ 44) และจะได้ทำการโคลนชุดยีนนี้เข้าสู่พลาสมิด pCAMBIA1305.1 เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวต่อไป

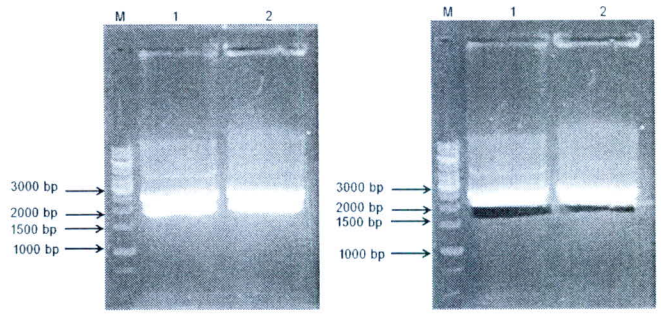


ภาพ 44 โครงสร้างพลาสมิด p2CA ที่มียีน *OSB2* ภายใต้การควบคุมของ dual 35s Promoter และ *nos* Terminator (p2CA_KNlB2S)

6. การสร้างพลาสมิดที่มีชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว

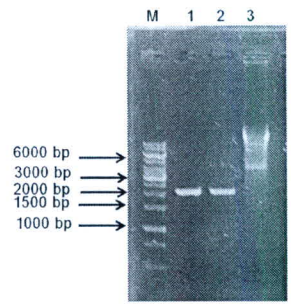
6.1 การเตรียมพลาสมิด pCAMBIA1305.1 และชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos*

จากการเชื่อมต่อยีน *OSB2* เข้าสู่พลาสมิด p2CA คัดเลือกโคลนที่ถูกต้องคือ โคโลนีที่ 35 และ 48 สำหรับโคลนเข้าสู่พลาสมิด pCAMBIA1305.1 และถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* competent cell โดยทำการเตรียม insert ซึ่งก็คือชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* จากพลาสมิด p2CA_KNlB2S โดยการตัดด้วยเอนไซมตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือพลาสมิด p2CA ขนาด 2,700 bp และชิ้น insert ที่ประกอบด้วยยีน *OSB2* และ dual 35s Promoter กับ *nos* Terminator ขนาดทั้งหมด 2,300 bp (ภาพ 45 และ 46) จึงทำการแยกบริสุทธิ์ชิ้น insert เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ต่อไป



ภาพ 45 ผลการตัดพลาสมิด p2CA_KNlB2S ที่มีชิ้นยีน *OSB2* ด้วย *Eco*RI และ *Hin*dIII

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1-2 คือ พลาสมิด p2CA_KNlB2S ที่มีชิ้นยีน *OSB2* โคโลนีที่ 35 และ 48 ตามลำดับ

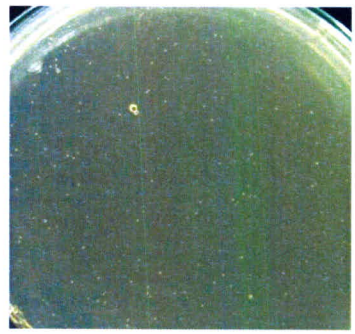


ภาพ 46 ผลการแยกบริสุทธิ์ชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* จากพลาสมิด p2CA_KNlB2 ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1-2 คือ ชิ้นยีน *OSB2* จากพลาสมิด p2CA_KNlB2 โคโลนีที่ 35 และ 48 ตามลำดับ ช่อง 3 คือ พลาสมิด pCAMBIA1305.1 ที่ตัดด้วย *Eco*RI และ *Hin*dIII

6.2 การเชื่อมชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* เข้าสู่ pCAMBIA1305.1

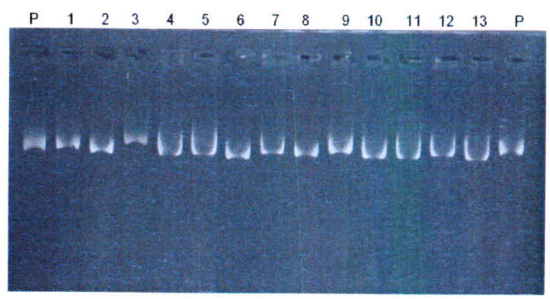
เมื่อเชื่อมต่อชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* กับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ทำการส่งถ่ายเข้าสู่ *E.coli* competent cell และ spread บนอาหาร LB ที่มีกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดบนอาหารที่มีกานามัยซิน พบว่า ได้โคโลนีสีขาว 13 โคโลนี (ภาพ 47) จากนั้นนำโคโนลีนีที่ขึ้นบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินมาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อทำการคัดเลือกต่อไป



ภาพ 47 ผลการส่งถ่ายดีเอ็นเอสายผสมจากการเชื่อมต่อชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* เข้ากับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 เข้าสู่ *E. coli* competent cell เพาะเลี้ยงบนอาหาร LB ที่มีกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

6.3 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมจากการเชื่อมชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* เข้ากับพลาสมิด pCAMBIA1305.1

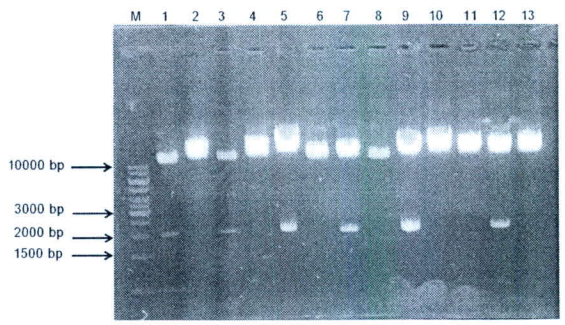
จากการถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *E. coli* competent cell คัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมโดยนำโคโลนีจำนวน 13 โคโลนี จากการส่งถ่ายชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* เข้ากับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 มาเลี้ยงในอาหาร LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน จากนั้นคัดเลือกด้วยขนาดโดยเปรียบเทียบพลาสมิด pCAMBIA1305.1 พบว่า โคโลนีที่คัดเลือกส่วนใหญ่มีขนาดใกล้เคียงกับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 จึงทำการสกัดพลาสมิดทั้งหมดที่คัดเลือกเพื่อนำไปคัดเลือกโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII ต่อไป (ภาพ 48)



ภาพ 48 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมด้วยขนาด

หมายเหตุ ช่อง P คือ พลาสมิด pCAMBIA1305.1 และช่อง 1-13 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกจากโคโลนีที่ 1-13 ตามลำดับ

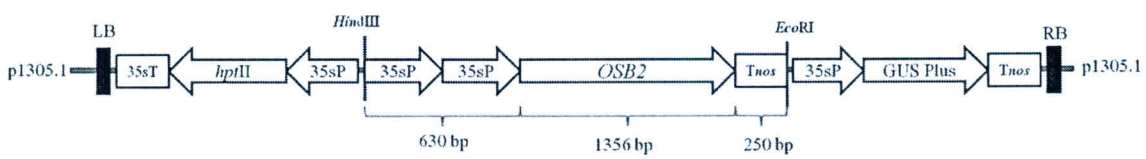
เมื่อคัดเลือกพลาสมิดสายผสมด้วยขนาด จำนวน 13 โคลน พบว่า พลาสมิดจากทุกโคโลนีมีขนาดใกล้เคียงกับ pCAMBIA1305.1 จึงทำการสกัดพลาสมิดและนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII พบว่า โคโลนีที่ 1, 3, 5, 7, 9 และ 12 มีขนาดของชิ้น insert ตามที่คาดหวังประมาณ 2,300 bp (ภาพ 49) จึงเลือกโคโลนีที่ 5 ซึ่งมีขนาด insert ใกล้เคียงกับที่ต้องการเพื่อใช้สำหรับส่งถ่ายเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL1 และ EHA105 ต่อไป



ภาพ 49 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมที่มีชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* เชื่อมกับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่อง 1-13 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกจากโคโลนีที่ 1-13 ตามลำดับ

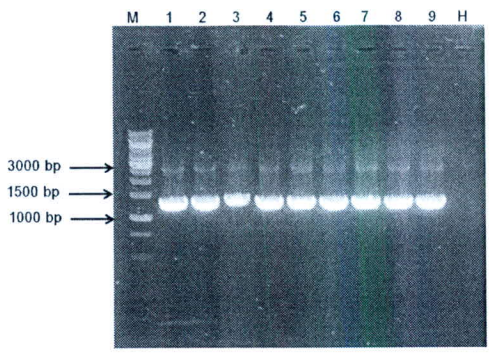
เมื่อเชื่อมต่อชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* เข้าสู่พลาสมิด pCAMBIA1305.1 จะได้ construct ใหม่โดยให้ชื่อว่าพลาสมิด pPI01_B2S (ภาพ 50) ซึ่งภายในบริเวณ LB และ RB ประกอบด้วยชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* และยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล และยีน *npt*II ซึ่งเป็นยีนต้านสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก แล้วทำการคัดเลือกโคลนที่มียีน *OSB2* แล้วส่งถ่ายเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมเพื่อนำไปถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวต่อไป



ภาพ 50 โครงสร้างพลาสมิด pPI01_B2S ซึ่งเป็น binary vector สำหรับการถ่ายยีน *OSB2* เข้าสู่ข้าว

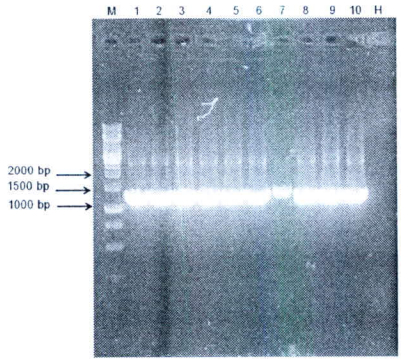
6.4 การส่งถ่ายพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ที่มีชิ้นยีน *OSB2* เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL1 และ EHA105 และคัดเลือกด้วยเทคนิค PCR

จากการคัดเลือกโคโลนีของ *E. coli* DH5α ที่มีพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ซึ่งมีชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* (พลาสมิด pPI01_B2S) ทำการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีที่ 5 และส่งถ่ายเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL1 และ EHA105 ด้วยวิธี heat shock และเลี้ยงบนอาหารที่มีไรแฟมพิซินและกานามัยซิน จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะเช่นเดิมแล้วทำกาสกัดพลาสมิดจากอะโกรแบคทีเรียมด้วยวิธี Alkaline lysis และนำพลาสมิดไปเป็นแม่พิมพ์ในการทำ PCR เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิด pPI01_B2S พบว่า ทุกโคลนที่คัดเลือกเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดที่คาดหวังของยีน *OSB2* ประมาณ 1,300 bp ดังนั้นอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL1 และ EHA105 ที่คัดเลือกทั้งหมดได้รับพลาสมิด pPI01_B2S ที่มียีน *OSB2* (ภาพ 51 และ 52)



ภาพ 51 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมที่มีชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* เชื่อมกับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 จากอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL1 ด้วยเทคนิค PCR

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่อง 1-9 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกจากโคโลนีที่ 1-9 ช่อง H คือ น้ำกลั่น



ภาพ 52 ผลการคัดเลือกโคโลนีสายผสมที่มีชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::Tnos เชื่อมกับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 จากอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 ด้วยเทคนิค PCR

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่อง 1-10 คือ พลาสมิดที่คัดเลือกโคโลนีที่ 1-10 ช่อง H คือ น้ำ

7. การถ่ายยีน *OSB2* เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare และ T65 แล้ววิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับจากการถ่ายยีน

7.1 การชักนำเมล็ดข้าวให้เกิดแคลลัส

หลังจากชักนำเมล็ดข้าวพันธุ์ Nipponbare และ T65 ให้เกิดแคลลัสบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส N6D เป็นเวลา 4-5 สัปดาห์ แคลลัสมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ซึ่งพัฒนามาจากเนื้อเยื่อส่วน scutellum ของเมล็ดข้าว โดยแคลลัสมีลักษณะเป็นกลุ่มแน่น สีเหลือง ซึ่งเป็นลักษณะแคลลัสที่ดี เหมาะสำหรับนำมาถ่ายยีน โดยแคลลัสของข้าวทั้ง 2 พันธุ์ มีลักษณะการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน คือมีการเจริญเป็นแคลลัส ลักษณะแคลลัส และอัตราการเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกัน (ภาพ 53 และ 54) จากนั้นนำแคลลัสของข้าวทั้งสองพันธุ์นี้ไปถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ซึ่งมียีน *OSB2* (พลาสมิด pPI01_B2S) โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมต่อไป

ภาพ 53 ลักษณะแคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร N6D ดัดแปลง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ภาพ 54 ลักษณะแคลลัสข้าวพันธุ์ T65 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส N6D ดัดแปลง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

7.2 การเตรียมอะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pPI01_B2S

การเตรียมอะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pPI01_B2S ซึ่งมียีน *OSB2* เป็นยีนเป้าหมาย ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (*npt*II) เป็นยีนเครื่องหมายสำหรับคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน และยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล เพื่อนำมาใช้ถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare และ T65 โดยนำอะโกรแบคทีเรียมที่เก็บในกลีเซลรอลมา streak บนอาหารสูตร LB ที่มีไรแฟมพิซินและกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเลี้ยงในที่มืด เป็นเวลา 3 วัน พบว่าเกิดโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะกลม นูน และสีครีม (ภาพ 55) จึงนำโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่เติมกานามัยซิน และอะซิโตไซริงกอน สำหรับถ่ายยีนต่อไป

ภาพ 55 ลักษณะโคโลนีของอะโกรแบคทีเรียมที่เจริญบนอาหาร LB ที่มีไรแฟมพิซินและกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน

7.3. การทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวโดยวิธี GUS assay

จากการถ่ายยีน *OSB2* เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare ด้วยอะโกรแบคทีเรียม ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนด้วยวิธี GUS assay โดยตรวจสอบแคลลัสภายหลังเพาะเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมเป็นเวลา 3 วัน พบว่า แคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare จากการถ่ายยีนจำนวน 2 ครั้ง มีการแสดงออกของยีน *gus* สูงสุดถึง 90.48 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 4 และภาพ 56)

การถ่ายยีน *OSB2* เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ T65 ด้วยอะโกรแบคทีเรียมที่มีพลาสมิด pPI01_B2S และตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนด้วยวิธี GUS assay โดยตรวจสอบแคลลัสภายหลังเพาะเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมเป็นเวลา 3 วัน พบว่า แคลลัสมีการแสดงออกของยีน *gus* สูงสุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 5 และภาพ 57)

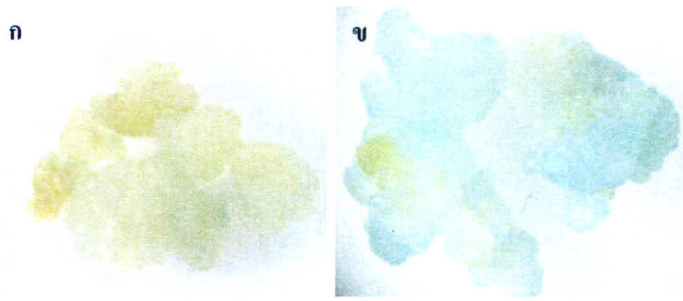
จากประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare และ T65 เมื่อทดสอบด้วยวิธี GUS assay ในข้าวพันธุ์ T65 ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เกิดจุดสีฟ้าสูงสุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าวทั้ง 2 พันธุ์ ให้ประสิทธิภาพดีใกล้เคียงกัน

ตาราง 4 ประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare เมื่อทดสอบด้วยวิธี GUS assay

ครั้งที่ถ่ายยีน	จำนวนแคลลัสทั้งหมดที่ทดสอบ	จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดสีฟ้า	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เกิดจุดสีฟ้า
1	21	19	90.48
2	42	33	78.57

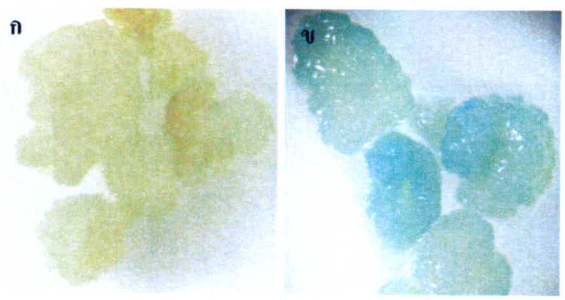
ตาราง 5 ประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ T65 เมื่อทดสอบด้วยวิธี GUS assay

ครั้งที่ถ่ายยีน	จำนวนแคลลัสทั้งหมดที่ทดสอบ	จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดสีฟ้า	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เกิดจุดสีฟ้า
1	30	30	100
2	26	24	90.48
3	53	45	84.91



ภาพ 56 การตรวจสอบแคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare ด้วยวิธี GUS assay ภายหลังเพาะเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมเป็นเวลา 3 วัน

หมายเหตุ (ก) แคลลัสชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (ข) แคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน



ภาพ 57 การตรวจสอบแคลลัสข้าวพันธุ์ T65 ด้วยวิธี GUS assay ภายหลังเพาะเลี้ยงร่วมกับอะโกร-แบคทีเรียมเป็นเวลา 3 วัน

หมายเหตุ (ก) แคลลัสชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (ข) แคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีน

7.4 เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือก และเปอร์เซ็นต์การเกิดต้น

หลังเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare บนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสรอดบนอาหารคัดเลือกสูงสุดคิดเป็น 96 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 6 ภาพ 58 และ 59) จากนั้นย้ายแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น แคลลัสที่ต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินจะเกิดจุดเขียวและพัฒนาเป็นต้นภายใน 4-8 สัปดาห์ (ภาพ 62-64) ซึ่งเปอร์เซ็นต์จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดสีเขียวสูงสุดคิดเป็น 6.25 เปอร์เซ็นต์ และได้ต้นจากการถ่ายยีนทั้งหมด 16 ต้น (ตาราง 6 และภาพ 65) เมื่อนำต้นข้าวที่ได้มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ทั้งหมดจำนวน 6 ต้น พบว่า ต้นข้าวเกิดสีฟ้าจำนวน 4 ต้น (ภาพ 71)

หลังเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์ T65 บนอาหารสูตรคัดเลือก เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกสูงสุดคิดเป็น 98.75 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 7 ภาพ 60 และ 61) เมื่อย้ายแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือก เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น แคลลัสที่ต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเกิดการแบ่งตัว และเกิดจุดเขียวสูงสุดคิดเป็น 7.59 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 2-8 สัปดาห์ (ภาพ 66 - 69) และพัฒนาเป็นต้นจำนวน 13 ต้น ในเวลาประมาณ 3-8 สัปดาห์ (ตาราง 7 ภาพ 70) เมื่อนำต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีน ซึ่งเป็นต้นข้าวที่ต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินมาทดสอบด้วยวิธี GUS assay พบว่า เกิดสีฟ้าบริเวณรอยตัดของใบข้าวทั้ง 7 ต้น คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 72) แสดงว่าข้าวทั้ง 7 ต้น ได้รับยีน *gus* ซึ่งเป็นยีนรายงานผล ซึ่งคาดว่าจะได้รับยีน *OSB2* ด้วย ซึ่งจากการถ่ายยีนแคลลัสข้าวพันธุ์ T65 มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และเกิดจุดเขียวเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นเพียง 2 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับพันธุ์ Nipponbare ที่เกิดจุดเขียวเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลาถึง 4 สัปดาห์ แต่แคลลัสข้าวพันธุ์ Nippobare สามารถพัฒนาเป็นต้นได้มากกว่าถึง 15.63 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าข้าวพันธุ์ T65 ที่ได้เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น 10.13 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 6 ผลของการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pPI01_B2S

ครั้งที่ถ่ายยีน	จำนวนกลุ่มแคลลัสทั้งหมด	จำนวนกลุ่มแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 [a]	จำนวนกลุ่มแคลลัสที่เกิดจุดเขียว [b]	จำนวนต้นทั้งหมด [c]
1	100	96/100 (96)	6/96 (6.25)	15/96 (15.63)
2	80	73/80 (91.25)	1/73 (1.37)	1/73 (1.37)

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บ หมายถึง แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์

(a) = (จำนวนแคลลัสที่รอด/จำนวนแคลลัสเริ่มต้น) × 100

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

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

ตาราง 7 ผลของการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ T65 โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pPI01_B2S

ครั้งที่ถ่ายยีน	จำนวนกลุ่มแคลลัสทั้งหมด	จำนวนกลุ่มแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 [a]	จำนวนกลุ่มแคลลัสที่เกิดจุดเขียว [b]	จำนวนต้นทั้งหมด [c]
1	120	110/120 (91.67)	2/110 (1.82)	3/110 (2.73)
2	80	79/80 (98.75)	6/79 (7.59)	8/79 (10.13)
3	280	257/280 (91.79)	5/257 (1.95)	2/257 (0.77)-

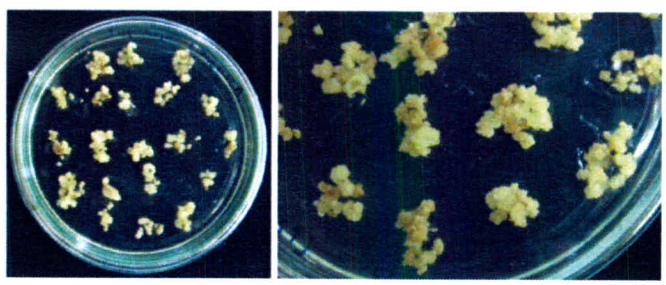
หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บ หมายถึง แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์

(a) = (จำนวนแคลลัสที่รอด/จำนวนแคลลัสเริ่มต้น) × 100

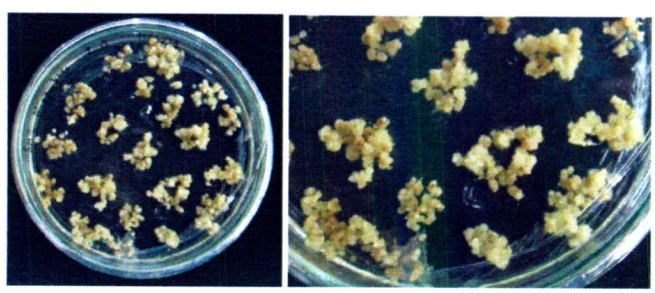
(b) = (จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียว/จำนวนแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2)×100

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

จากการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Npponbare และเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 1 ที่มีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แคลลัสมีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนและมีลักษณะสีเหลืองไม่เป็นสีน้ำตาล เมื่อย้ายไปยังอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 ที่มีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แคลลัสมีลักษณะสีน้ำตาลและเริ่มตายบนอาหารคัดเลือก อีกทั้งแคลลัสมีการเจริญหรือแบ่งตัวน้อยเมื่อเทียบกับพันธุ์ T65 มีเพียงแคลลัสบางกลุ่มเท่านั้นที่ทนต่อไฮโกมัยซินแล้วมีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวน (ภาพ 58 และ 59)



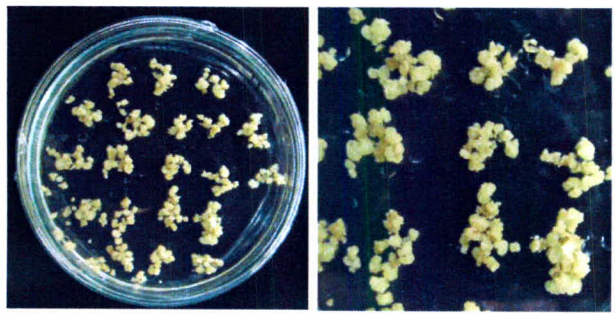
ภาพ 58 ลักษณะแคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare หลังการถ่ายยีนเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารคัดเลือก (N6D) ครั้งที่ 1 ที่มีไทแมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์



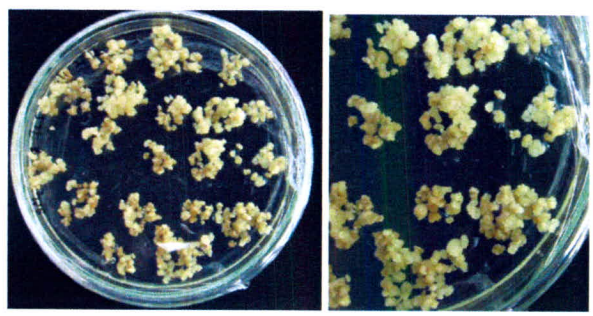
ภาพ 59 ลักษณะแคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare หลังการถ่ายยีนเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารคัดเลือก (N6D) ครั้งที่ 2 ที่มีไทแมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์

หลังเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์ T65 ที่ผ่านการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือก ครั้งที่ 1 ที่มีโกรมัยซินความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แคลลัสมีการเจริญเติบโตและแบ่งตัวเพิ่มจำนวน อีกทั้งมีลักษณะสีเหลือง ไม่เป็นสีน้ำตาลหรือตายบนอาหารคัดเลือก เมื่อย้ายแคลลัสไปยังอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 ที่มีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า แคลลัสมีการ

แบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากกว่าแคลลัสของข้าวพันธุ์ Nipponbare และแคลลัสภายในกลุ่มบางก้อนมีสีน้ำตาลเข้มและตายบนอาหารคัดเลือก (ภาพ 60 และ 61)

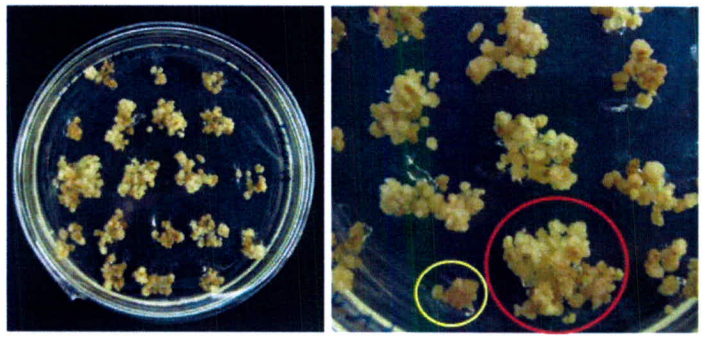


ภาพ 60 ลักษณะแคลลัสข้าวพันธุ์ T65 หลังการถ่ายยีนเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารคัดเลือก (N6D) ครั้งที่ 1 ที่มีไทแมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์

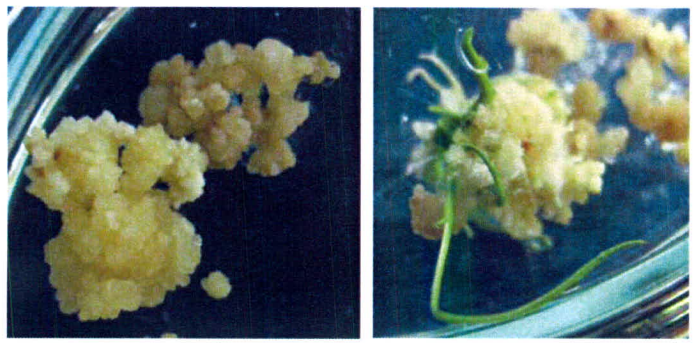


ภาพ 61 ลักษณะแคลลัสข้าวพันธุ์ T65 หลังการถ่ายยีนเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารคัดเลือก (N6D) ครั้งที่ 2 ที่มีไทแมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์

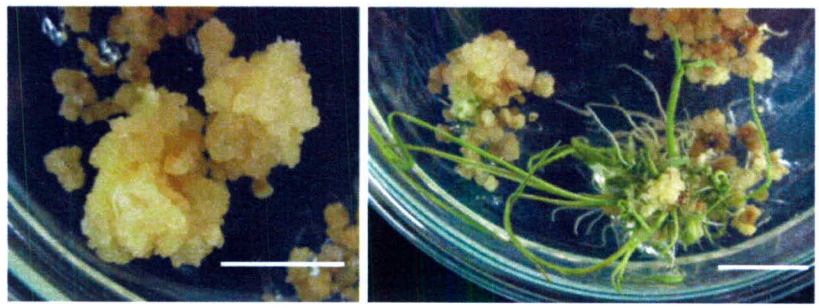
เมื่อย้ายแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือกไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น พบว่า แคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare เกิดจุดเขียวเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ภาพ 63) เมื่อเทียบกับแคลลัสข้าวพันธุ์ T65 เริ่มเกิดจุดเขียวเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ภาพ 66 และ 67) อีกทั้งแคลลัสข้าวพันธุ์ T65 มีการเจริญเป็นแคคลัสสีเหลืองขนาดใหญ่และมีจุดเขียวเกิดขึ้นมากกว่าพันธุ์ Nipponbare ซึ่งจุดเขียวเหล่านี้จะพัฒนาเป็นต้นต่อไป



ภาพ 62 ลักษณะแคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare ที่รอดและตาย เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น (MS) ที่มี NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทแมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์

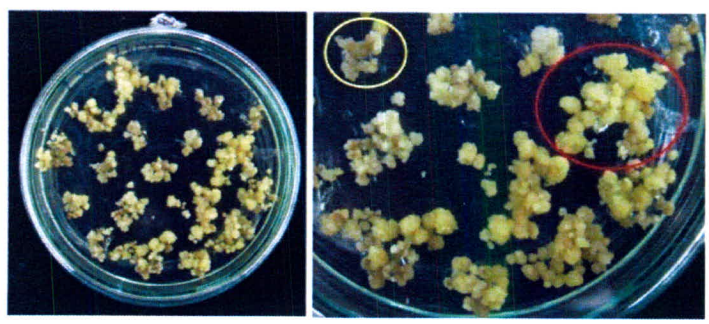


ภาพ 63 ลักษณะแคลลัสและต้นข้าวพันธุ์ Nipponbare เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น (MS) ที่มี NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทแมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์



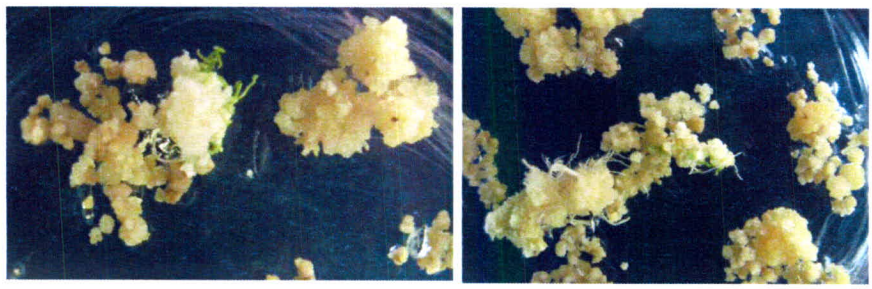
ภาพ 64 ลักษณะแคลลัสและต้นข้าวพันธุ์ Nipponbare เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น (MS) ที่มี NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทแมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ภาพ 65 ลักษณะต้นสมบูรณ์ของข้าวพันธุ์ Nipponbare ที่ได้จากการถ่ายยีน เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 สัปดาห์

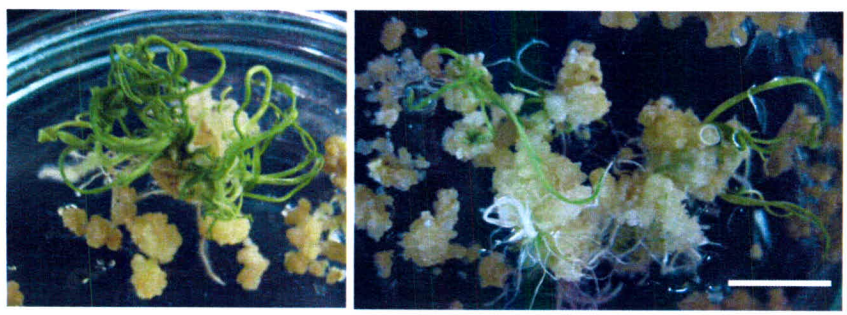


ภาพ 66 ลักษณะแคลลัสข้าวพันธุ์ T65 ที่รอดและตาย เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น (MS) ที่มี NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

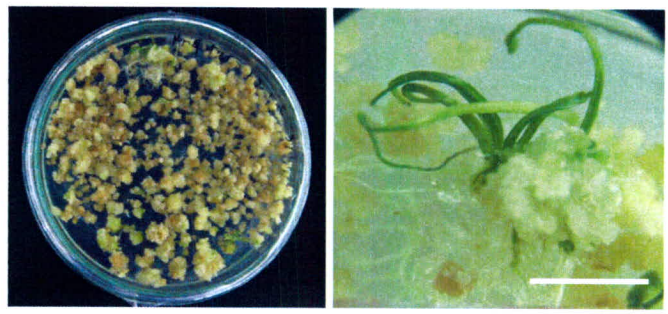
ไทแมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์



ภาพ 67 ลักษณะแคลลัสและต้นข้าวพันธุ์ T65 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น (MS) ที่มี NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทแมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์



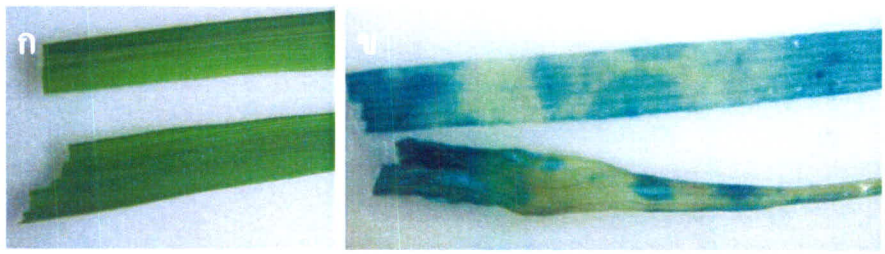
ภาพ 68 ลักษณะแคลลัสและต้นข้าวพันธุ์ T65 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น (MS) ที่มี NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทแมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์



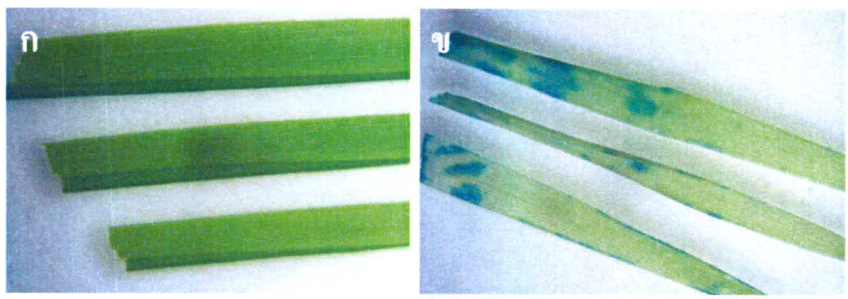
ภาพ 69 ลักษณะแคลลัสและต้นข้าวพันธุ์ T65 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น (MS) ที่มี NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทแมนทินความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ภาพ 70 ลักษณะต้นสมบูรณ์ของข้าวพันธุ์ T65 ที่ได้จากการถ่ายยีน เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 สัปดาห์

เมื่อได้ต้นจากการถ่ายยีน นำใบต้นข้าวมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบว่า ข้าวพันธุ์ Nipponbare ที่นำมาตรวจสอบจำนวน 6 ต้น เกิดสีฟ้าจำนวน 4 ต้น คิดเป็น 66.67 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 71) ส่วนต้นข้าวพันธุ์ T65 ที่นำมาตรวจสอบทั้งหมด 7 ต้น เกิดสีฟ้าทั้งหมด คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 72) ซึ่งต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนเหล่านี้จะต้องนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ต่อไป



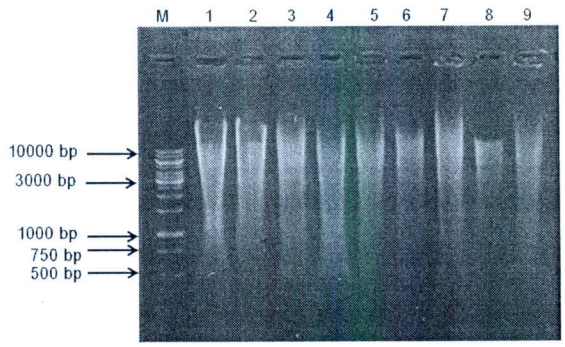
ภาพ 71 การตรวจสอบใบข้าวพันธุ์ Nipponbare ที่ได้จากการถ่ายยีน ด้วยวิธี GUS assay
หมายเหตุ (ก) ใบจากต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (ข) ต้นที่ได้รับจากการถ่ายยีน



ภาพ 72 การตรวจสอบใบข้าวพันธุ์ T65 ที่ได้จากการถ่ายยีน ด้วยวิธี GUS assay
หมายเหตุ (ก) ใบจากต้นที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (ข) ต้นที่ได้รับจากการถ่ายยีน

7.5 การวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR

การตรวจสอบต้นข้าวพันธุ์ Nipponbare และ T65 ที่ได้จากการถ่ายยีนจำนวน 2 และ 5 ต้น ตามลำดับ โดยนำต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนมาสกัดดีเอ็นเอ พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีขนาดใหญ่ (ภาพ 73) แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี และสามารถนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค PCR ต่อไป



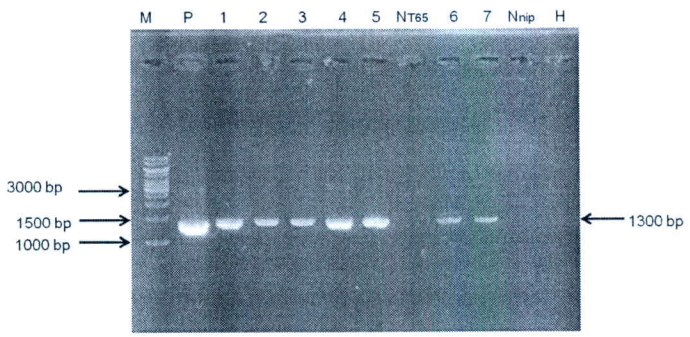
ภาพ 73 การตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นข้าวพันธุ์ Nipponbare และ T65 ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วย 1 % agarose gel electrophoresis

หมายเหตุ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่องที่ 1-6 คือ ดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ T65 ที่ไม่ได้ผ่านการถ่ายยีน และที่ได้จากการถ่ายยีน จำนวน 5 ต้น ช่องที่ 7-9 คือ ดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ Nipponbare ที่ไม่ได้ผ่านการถ่ายยีน และที่ได้จากการถ่ายยีน จำนวน 2 ต้น

เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอของต้นข้าวพันธุ์ Nipponbare และ T65 ที่ได้จากการถ่ายยีน จำนวน 2 และ 5 ต้น ตามลำดับ มาตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *OSB2* ในจีโนม ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OSB2* พบว่ามีต้นข้าวพันธุ์ Nipponbare และ T65 ทุกต้นที่ตรวจสอบเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,300 bp คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 74) ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจการแสดงออกของยีน *gus* ที่พบว่าทุกต้นที่นำใบมาตรวจสอบเกิดสีฟ้า ดังนั้นต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนทั้งหมดได้รับยีน *OSB2* แต่ลักษณะต้นข้าวที่ได้มีลักษณะสีเขียวไม่มีลักษณะสีม่วงแดงของแอนโทไซยานิน

ตาราง 8 ผลการวิเคราะห์ต้นข้าวพันธุ์ Nipponbare และ T65 ที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR

พันธุ์ข้าว	ครั้งที่ถ่ายยีน	จำนวนต้นที่ทำ PCR ทั้งหมด	จำนวนต้นที่ได้ผล PCR บวก	ต้นที่ได้ผล PCR บวก	เปอร์เซ็นต์ต้นที่ได้ PCR บวก
Nipponbare	1	-	-	-	-
	2	2	2	2.1-1 และ 2.2-1	100
	3	-		-	-
T65	1	-	-	-	-
	2	5	5	2..1-1, 2.2-1, 2.2-2, 2.2-3 และ 2.2-4	100
	3	-	-	-	-



ภาพ 74 การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *OSB2* ในจีโนมข้าวพันธุ์ Nipponbare และ T65 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OSB2*

หมายเหตุ ช่อง M คือ คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder ช่อง P คือ พลาสมิด pPI01_B2S ซึ่งมียีน *OSB2* (Positive control) ช่อง NT65 คือ ต้นข้าวพันธุ์ T65 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (Negative control) ช่อง NNip คือ ต้นข้าวพันธุ์ Nipponbare ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (Negative control) ช่องที่ 1–5 คือ ต้นข้าวพันธุ์ T65 ที่ได้จากการถ่ายยีน ต้นที่ 1-5 ตามลำดับ ช่องที่ 6–7 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Nipponbare ที่ได้จากการถ่ายยีน ต้นที่ 1-2 ตามลำดับ และช่อง H คือ น้ำกลั่น

จากการถ่ายยีน *OSB2* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินจากใบข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำขนาด 1300 bp เข้าสู่ข้าวขาวพันธุ์ Nipponbare และ T65 ซึ่งไม่มีการแสดงออกของยีน *OSB2* พบว่า ลักษณะแคลลัสและต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนมีลักษณะปกติเหมือน wild-type คือ แคลลัสมีลักษณะสีเหลือง เมื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นแคลลัสพัฒนาเกิดจุดสีเขียว และไม่พบจุดสีแดง เมื่อได้ต้นจากการถ่ายยีน ต้นที่ได้มีลักษณะต้นและใบสีเขียวซึ่งไม่มีการสร้างรงควัตถุสีแดงในส่วนต่างๆ เช่นกัน ถึงแม้มีการถ่ายยีน *OSB2* จากข้าวสีเข้าสู่ข้าวขาวที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *OSB2* แต่ข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนไม่สามารถสังเคราะห์แอนโทไซยานินได้ อาจเนื่องจากต้องมีการทำงานร่วมกันของยีน *OSB2* ร่วมกับยีน *C1* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการสงเคราะห์แอนโทไซยานินอีกชนิดหนึ่ง โดยมีรายงานก่อนหน้านี้ในการส่งถ่ายยีน *OSB2* ร่วมกับยีน *C1* จากข้าวโพด หรือยีน *OSB1* ร่วมกับยีน *C1* เข้าสู่เมล็ดข้าว ผลที่ได้คือเกิดจุดสีม่วงแดงบนเมล็ดข้าว ซึ่งหากส่งถ่ายยีน *OSB1* หรือ *OSB2* เพียงอย่างใดอย่างหนึ่งเข้าสู่ข้าว ข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนก็ยังไม่สามารถสร้างแอนโทไซยานินได้ (Sakamoto et al., 200) รวมทั้งการถ่ายยีน *OSB2* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ nearly isogonic line พันธุ์ T65 $C^{B}A$ ซึ่งมียีนตำแหน่งอื่นที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินที่สามารถทำงานได้จากข้าวสี พบว่า ต้นอ่อนของข้าวเหล่านั้นเกิดลักษณะสีม่วงแดง (Hirose et al., 2008) นอกจากนี้ยีน *OSC1* ในข้าวพันธุ์ T65 ที่เป็น wild-type และข้าวขาวมีอัลลีล C^{+} ซึ่งเกิด deletion ในตำแหน่ง R3 ทำให้เกิด frame shift ซึ่งส่งผลให้ยีนสูญเสียหน้าที่ (Saitoh et al., 2004) ทำให้ข้าวที่ได้จากการถ่ายยีน *OSB2* ทั้งสองพันธุ์ไม่สามารถสังเคราะห์แอนโทไซยานินได้เนื่องจากมีเพียงยีน *OSB2* เพียงยีนเดียวที่ทำหน้าที่เท่านั้น

นอกจากนี้การที่ข้าวสามารถสร้างแอนโทไซยานินได้ต้องมียีนโครงสร้างที่สำคัญ คือ ยีน *DFR* ซึ่งมีรายงานว่า ยีน *DFR* จากข้าวขาวเกิดการแทนที่เบสซึ่งส่งผลให้เกิด stop codon ในเอกซอนที่ 2 แล้วทำให้ยีนสูญเสียหน้าที่ (Furukawa et al., 2007) ซึ่งถึงแม้จะถ่ายยีน *OSB2* ซึ่งเป็น MYC transcription factor ที่ส่งเสริมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยเฉพาะยีน *OsF3H, OsDFR และ OsANS* แม้ว่ายีน *DFR* มีการแสดงออกมากแต่กรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสสั้นกว่าปกติและไม่สามารถทำงานได้ ข้าวจึงไม่สามารถสร้างแอนโทไซยานินได้เช่นกัน ดังนั้นจึงควรศึกษาการถ่ายยีนและการควบคุมการแสดงออกของยีน *OSB2* ในข้าวที่มียีน *DFR* ที่สามารถทำหน้าที่ได้อย่างเช่น ข้าวพันธุ์ Kasalath (Saika et al., 2011) หรือพันธุ์ข้าวที่มียีน *OSC1* ที่ทำหน้าที่ได้