บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การโคลนยีน *OSB2*

การตรวจสอบยีน *OSB2* จากจีโนมของข้าวทั้ง 12 พันธุ์ด้วยเทคนิค PCR พบว่า ทั้งข้าวขาวและข้าวสีมียีน *OSB2* เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *OSB2* โดยเทคนิค RT-PCR พบว่า มีการแสดงออกของยีนในใบอ่อนของข้าวสีดำจำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU ลืมผัว KU หอมนิล ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา และจากเมล็ดอ่อนของข้าวสีดำ 4 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์ ลืมผัว KU หอมนิล ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา สำหรับข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU พบแถบดีเอ็นเอเฉพาะในใบอ่อนของข้าวเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีน *OSB2* ที่มีขนาดต่างกันคือ ขนาดประมาณ 1,300 และ 1,100 bp

จากการทดลองสามารถโคลนยีน *OSB2* ได้จากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำ และก่ำพะเยา ทั้งขนาด 1,300 และ 1,100 bp เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่โคลนได้ขนาด 1,300 bp เปรียบเทียบกับยีน *OSB2* ขนาด 1,300 bp จากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ลืมผัว MJU ลืมผัว KU และหอมนิล และจากเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ ลืมผัว KU และหอมนิล จากรายงานปัญหาของวิศิษฏ์ (2555) และเปรียบเทียบกับยีน *OSB2* จากข้าว nearly isogenic *Pi*^{w} Taichung 65 ซึ่งเป็นข้าวสีในฐานข้อมูล (accession no. AB021080) พบว่าเป็นบริเวณ open reading frame (ORF) ขนาด 1,356 bp และมีลำดับเบสเหมือนกับฐานข้อมูล 99 เปอร์เซ็นต์ โดยมีลำดับเบสต่างกันเพียงบางตำแหน่งเท่านั้น ส่วนการเปรียบเทียบยีนขนาด 1,100 bp กับลำดับเบสของจีโนมิกดีเอ็นเอของยีน *OSB2* จากข้าว japonica ในฐานข้อมูล GenBank (accession no. AL606682) พบว่า เกิดการขาดหายของลำดับเบสจำนวน 255 bp ซึ่งเป็นส่วนของบริเวณเอกซอนที่ 2 จึงมีขนาดของ ORF คือ 1,101 bp ดังนั้น ยีน *OSB2* ที่โคลนได้จากข้าวสีอาจมี 2 รูปแบบ คือ มี ORFs ขนาด 1,356 bp และขนาด 1,101 bp หรือยีนอาจมีรูปแบบเดียวในจีโนมแต่เกิดการเลือกตัดอินทรอน (alternative splicing) ทำให้สร้าง mRNA ได้ 2 ขนาด

สำหรับลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSB2* ที่ได้จากการแปลรหัสของยีนขนาด 1,356 และ 1,101 bp มีขนาด 451 และ 366 หน่วย ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้จากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าว 5 พันธุ์ที่วิเคราะห์ กับยีน *OSB2* จากข้าวสีใน GenBank (accession no. BAB64302) พบว่ามีความคล้ายกันถึง 99 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน และพบบริเวณที่เป็น

Basic helix-loop-helix (bHLH) domain ที่ลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง 377-428 ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์สำหรับโปรตีน transcription factor

จากนั้นสร้างชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::T*nos* ที่ประกอบด้วยยีน *OSB2* จากใบอ่อนของข้าวพันธุ์กำหนองเต่าคำขนาด 1,300 bp ภายใต้การควบคุมของ dual 35s Promoter และ *nos* Terminator เพื่อใช้สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว พบว่า จากการเชื่อมต่อยีน *OSB2* เข้ากับพลาสมิด p2CA คัดเลือกได้ดีเอ็นเอสายผสมที่มีขนาดของชิ้น insert ทั้งหมด 2,236 bp ประกอบด้วยยีน *OSB2* ขนาด 1,356 bp dual 35s Promoter ขนาด 630 bp และ *nos* Terminator ขนาด 250 bp เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่า เป็นยีน *OSB2* ที่ประกอบด้วย dual 35s Promoter และ *nos* Terminator ในทิศของยีนที่ถูกต้อง และส่วน ORF ของยีนเมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนแล้วมีความถูกต้อง (in-frame) ดังนั้นจึงโคลนชุดยีนเข้าสู่ binary vector ต่อไป

เมื่อได้ชุดยีน *OSB2* ที่ประกอบด้วย dual 35s Promoter และ *nos* Terminator ทำการโคลนเข้าสู่พลาสมิด pCAMBIA1305.1 ซึ่งเป็น binary vector ที่มียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล และยีน *npt*II เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก แล้วส่งถ่ายเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว เพื่อนำไปใช้ประโยชน์สำหรับเป็นยีนรายงานผลหรือเป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการคัดเลือกในระบบการถ่ายยีนในข้าว อีกทั้งศึกษากลไกการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวหรือพืชอื่น ๆ รวมทั้งศึกษาหน้าที่ของยีน *OSB2* ในการควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

การถ่ายยีน *OSB2* เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare และ T65

จากการถ่ายยีน *OSB2* เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare และ T65 เมื่อทดสอบการแสดงออกของยีน *gus* จากแคลลัสด้วยวิธี GUS assay พบว่า แคลลัสที่นำมาทดสอบพบจุดสีฟ้าสูงสุดคิดเป็น 90.48 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare และ T65 รอดบนอาหารคัดเลือกสูงสุดคิดเป็น 96 และ 98.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นย้ายแคลลัสที่รอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น แคลลัสที่ต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเจริญและเกิดจุดเขียว โดยจำนวนกลุ่มแคลลัสข้าวพันธุ์ Nipponbare และ T65 เกิดจุดเขียวสูงสุดคิดเป็น 6.25 และ 7.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการถ่ายยีนทั้งหมดได้ต้นข้าวพันธุ์ Nipponbare จากการถ่ายยีนจำนวน 16 ต้น และ T65 จำนวน 13 ต้น เมื่อนำต้นข้าวที่ได้มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบว่าต้นข้าวพันธุ์ Nipponbare เกิดสีฟ้าทั้งหมด 4 ต้น จาก

6 ต้น คิดเป็น 66.67 เปอร์เซ็นต์ และ T65 เกิดสีฟ้าทั้ง 7 ต้นที่นำมาตรวจสอบ คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนพันธุ์ Nipponbare จำนวน 2 และ T65 จำนวน 5 ต้น มาตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *OSB2* ด้วยเทคนิค PCR พบว่า ต้นข้าวที่เกิดสีฟ้าทุกต้นให้ผล PCR บวก ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,300 bp แสดงว่าต้นข้าวที่นำมาวิเคราะห์ได้รับยีน *OSB2* จากการถ่ายยีน *OSB2* เข้าสู่แคลลัสข้าวทั้ง 2 พันธุ์ ลักษณะการเจริญเติบโตและการเกิดจุดเขียวของแคลลัสข้าวพันธุ์ T65 มีการเจริญและเกิดจุดเขียวมากกว่า Nipponbare แต่ข้าว Nipponbare จะเกิดต้นได้จำนวนมากกว่าข้าวพันธุ์ T65

จากการถ่ายยีน *OSB2* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินจากข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำเข้าสู่ข้าวขาวพันธุ์ Nipponbare และ T65 พบว่า ต้นที่ได้จากการถ่ายยีนมีลักษณะต้นสีเขียวและไม่มีการสะสมแอนโทไซยานิน ซึ่งจากการที่ต้นข้าวไม่มีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินอาจเนื่องจากในข้าวขาวมียีน *DFR* ซึ่งเป็นยีนโครงสร้างที่สร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินไม่ทำหน้าที่ รวมทั้งยีน *OSB2* อาจมีการทำงานร่วมกับยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินชนิดอื่น ดังนั้น การถ่ายยีน *OSB2* จากข้าวสีเพียงยีนเดียวจึงไม่สามารถทำให้เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินได้ ในงานวิจัยต่อไปควรศึกษาการแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในต้นข้าวที่ได้รับยีน *OSB2* ต่อไป เพื่อศึกษาการทำงานของยีน *OSB2* ในการควบคุมหรือส่งผลต่อการแสดงออกของยีนโครงสร้างต่างๆ รวมทั้งอาจมีการศึกษาการถ่ายยีน *OSB2* ร่วมกับยีน *OSC1* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินอีกชนิดหนึ่งจากข้าว หรือยีน *C1* จากข้าวโพด เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนโครงสร้างและลักษณะการเกิดสีของต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีน