

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

โปรแกรมที่ใช้ในการทดลอง และผลการวิเคราะห์ลำดับเบส

ตารางผนวก 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ยีน	GenBank Accession No.	ไพรเมอร์	Product size (bp)
<i>OSB2</i> cds	AB021080	OSB2cdsF = 5'- ATG GCA TCT GCT CCT CCA GTT CAG G -3' OSB2cdsR = 5'- TTA CGG CGC CTT CCC CTG TCC -3'	1356
<i>OSB2</i>	AB021080	OB2F = 5'- TGG CAA TAA CGA CGA CTC C-3' OB2R = 5'- CGT ACG GTG TTG ACG AGG TA-3'	333 (cDNA เป็นแม่พิมพ์) 410 (จีโนมิกดีเอ็นเอเป็น แม่พิมพ์)
<i>OSB2</i>	AB021080	OSB2R98S* = 5'- CTC CAA CTG ATG CTC CTC ACA GC -3' OSB2R420S* = 5'- ATT GCT TGC ATA GCT TCT GCC G -3' OSB2F1079S* = 5'- TTG ATG ATC GTG GTA GCG TGG C - 3'	-

หมายเหตุ \* คือ ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการหาลำดับเบส

### ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OSB2* ที่อยู่ในพลาสมิด p2CA

จากการคัดเลือกโคลนจำนวน 3 โคลนนี้ สกัดพลาสมิดแล้วส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่าทั้ง 2 โคลนที่คัดเลือกมีชิ้นยีน *OSB2* แทรกอยู่ระหว่าง dual 35s Promoter และ *nos* Terminator โดยชิ้นยีน *OSB2* อยู่ในทิศที่ถูกต้องคือ start codon อยู่ต่อจาก dual 35s Promoter (ภาพผนวก 1) และ stop codon ต่อกับ *nos* Terminator (ภาพผนวก 2) และเนื่องจากยีนรวมกับ dual 35s Promoter และ *nos* Terminator มีขนาดใหญ่ แล้วอ่านลำดับเบสจากไพรเมอร์ M13F (-20) Forward

และ M13R-pUC (-26) reverse เท่านั้น ทำให้ไม่สามารถอ่านลำดับเบสตรงกลางและสร้าง contig ได้ แต่เมื่อนำลำดับเบสไป blast กับฐานข้อมูล GenBank พบว่าประกอบด้วยยีน *OSB2* ต่อกับ dual 35s Promoter และ *nos* Terminator (ภาพผนวก 1 และ 2) ซึ่งถือว่าเป็นโคลนที่ถูกต้องสำหรับการโคลนเข้าสู่พลาสมิด pCABIA1305.1 สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว

```
>p2CA-KNLB2-1300-48_M13F(-20)
GGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCATGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCC
TACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCC AAAAGATGGACCCCCACCCAC
GAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATGGTCCGATTGAGACTTTTCAAC
AAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCATGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGC
TCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCC AAAAGATGGACCCCCACC
CACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGG
ATGACGCACAATCCACTATCCTTCGCAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGACACGCTGACAAGCT
GACTCTAGAGGATCAATTCGATTTCGCATCTGCTCCTCCAGTTCAGGAAGAAGCCCTACAGCCAGGGACGAAACACTTCAGGAGC
CGGCTTGCTGCTGCTGTGAGGAGCATCAGTTGGAGTTACACCATCTTTGGTCCACTTCAACCAGTCTCCGGGAGTCTGACTTG
GAACGATGGATTCTACAACGGCGAGGTAAGACGAGGAAGATATCCAACCTTAGAGGACCTCACCGCTGACCAGCTCGTCTGCGGA
GAAGCGAGCAACTGAGCGAGCTCTACTACTCTCTCTGTCGGCGAGTGCACCACCGGGCAAGGAAGCCCGTC
```

**ภาพผนวก 1** ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OSB2* จากใบข้าวพันธุ์ก่ำหนองเต่าคำใน พลาสมิด p2CA โคลนที่ 48 โดยใช้ไพรเมอร์ M13F\_(-20) Forward ในการหา ลำดับเบส

หมายเหตุ ลำดับเบสที่เน้นสีเทาเข้มคือ start codon ของยีน *OSB2* ต่อกับ dual 35s Promoter ลำดับเบสที่เน้นสีเทาอ่อนคือ ยีน *OSB2* ลำดับเบสที่ไม่แรเงาคือ dual 35s Promoter

```
>p2CA-KNLB2-1300-48_M13R-pUC(-26)
CGCGCGATAATTTATCCTAGTTTGGCGGTATTAATGTATAATTGCGGGACTCTAATCATAAAA
ACCCATCTCATAAATAACGTCATGCATTACATGTTAATTATTACATGCTTAACGTAATTCACAGAAATTTATGATAATCATCGC
AAGACCGGCAACAGGATTC AATCTTAAGAACTTTATTGCCAAATGTTGAACGATCGGGGAAATTCGAATTCAGTAGTATTTC
CGGCGCCTTCCCCTGTCCAATTTTCGGTTGGGCGCCAACGCGATGGCTCCCTGCTGCTGGACTCCAGCTCTTTCACTCTTTCTCTA
ACACTTTGAGGTAGGTTATCGTTTCTGCAAGTATGGATGCCTTGTCAACCTTGGCGACGGAGGGGAGTAGTGACTTCAGAATGAGC
AACATCTCGTTGAGCTTCTCTCGGCGCTTCTCTGACATGACATGGCTCTTGATGTTACTTCTGGAGTCTCGTTATTGCCAC
GCTACCACGATCATCAATATTACTCATCCATGCGGTGCCGCCGCTACAGCTTTCTTCAGCAACTTCTGTGACTCTATGCCCTGCAG
TCATCGGCACGGCCACCACCTTCTCCGCCGGTTCGCTCTTTCCATGACACGAAACACGAGGCGTGAGAGTATGCAACGCCGTCG
ACATCGTTAGCCGCGCCGCCGCCGAGCCACCGTCTCCCGTGGCGACGTCGGGACTAGCTGATAAGAACCAGGTCAGGTCAGC
CTCCTCGCAGAGGCTGTAGA AACTCGTCCGTTCCATGGTATCGTTTCGGGGTTGGCGCGCTTGGTCTGCGACTCAGCGACGACGA
CGTCCGCTAGCTCGTCTTCTCCCTGGAGTATGACCATCT
```

**ภาพผนวก 2** ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OSB2* จากใบพันธุ์ข้าวก่ำหนองเต่าคำใน พลาสมิด p2CA โคลนที่ 48 โดยใช้ไพรเมอร์ M13F\_(-26) Reverse ในการหา ลำดับเบส

หมายเหตุ ลำดับเบสที่เน้นสีเทาเข้มคือ stop codon ของยีน *OSB2* ต่อกับ *nos* Terminator ลำดับเบสที่เน้นสีเทาอ่อนคือ ยีน *OSB2* ลำดับเบสที่ไม่แรเงาคือ *nos* Terminator

## ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OSB2* ในพลาสมิด pCAMBIA1305.1

เมื่อคัดลอกโคลนที่ถูกต้องจากพลาสมิด p2CA แล้วทำการโคลนชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::*Tnos* เข้าสู่ binary vector คือ pCAMBIA1305.1 แล้วส่งถ่ายเข้าสู่ *E. coli* competent cell จากนั้นคัดลอกโคลนที่ถูกต้องไปวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้ไพรเมอร์ OSB2R98S OSB2R420S และ OSB2F1079S ซึ่งครอบคลุมส่วนของ dual 35S Promoter ยีน *OSB2* และ *nos* Terminator จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่า ประกอบด้วยชุดยีน dual 35sP::*OSB2*::*Tnos* ที่ถูกต้องในพลาสมิด pCAMBIA1305.1 (ภาพผนวก 3) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OSB2* ในพลาสมิด pCAMBIA1305.1 กับยีน *OSB2* จากข้าวพันธุ์กำหนดงเต่าคำที่โคลนได้จาก pGEM-T Easy และยีนจากฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีน *OSB2* ที่โคลนในพลาสมิด pCAMBIA1305.1 มีลำดับเบสที่ถูกต้อง ซึ่งเหมือนกับลำดับเบสใน pGEM-T Easy (ภาพผนวก 4) ดังนั้น ลำดับเบสของยีนที่โคลนอยู่ใน pCAMBIA1305.1 มีความถูกต้องและสามารถส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่โกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL1 และ EHA105 สำหรับในการถ่ายยีนต่อไปได้

```
>Contig-p13051_KNLB2_1300_3_48_35S-cds-nos
CCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAA
AGGCCATCGTTGAAGATGCCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGCTT
CCAACCACGCTTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCTTCGCAAGA
CCCTTCCCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCTGACAAGCTGACTCTAGAGGATCAATTCGATTATCGCATC
TGCTCCTCCAGTTCAGGAAGAAGCCCTACAGCCAGGGACGAACCACTTCAGGAGCCGGCTTGTGCTGTGTGAGGAGCATCAGTT
GGAGTTACACCATCTTTTGGTCCACTTCAACCACTCTCCCGGGAGTTCTGACTTGGAACGATGGATTCTACAACGGCGAGGTAAG
ACGAGGAAGATATCCAACCTTAGAGGACCTCACCGCTGACCAGCTCGTCTGCCGAGAAGCGAGCAACTGAGCGAGCTTACTACTC
TCTCCTGTCCGGCAGTGCACCCCGGGCAAGGAAGCCCGTCCCGCAGCTGTCGCCGGAAGATATCGCGGACACAGAATGGTACT
ACGTTGTCTGCATGACCTAGCCTTTTCGACCCGGCCAAAGGTTACCCGGCAGAAGCTATGCAAGCAATCGATCTGTTGGTTGTGC
AATGCTCAGTCTGCAGATAGCAAAACCTTTCTACGTGCGCTCTTAGCGAAGAGCGCGTCTATTTCAGACAATGTCTGCATCCCTT
CATGAGTGGGTGCTTGGAGTGGGAACCACTGATCCGGTTTCGGAGGACCCAAACTTGGTAAACCGAATCGTTGCATATTTGAAGG
AGCTTCAGTCTCCGATATGCTTAGAGGTACCGAGTTCTACTCCTTCTCCAGACGAAACAGAAGATGCCGACACCGTGTTCGATGGC
CTCATGGAAGAGGACCGATGGTCACTACTCCAGGAGAGAAGACGACTAGGCGAGCTCGTCTGCTGCTGAGTGCAGAGCAACGGCGC
CAACCCCGAAACGATCACCATGGAGACCGACGAGTTCTACAGCCTCTGCGAGGAGCTGGACCTGGACCTCGGTTCTTATCAGCTAG
TCCCGACGTCGGCACGGGACGGTGGCTGCGGGCGGGCGGGCGGCTAACGATGTCAGCGGCTTGCATACTCTCACGCCTCGTGT
TTCGTTGTCATGAAAAGAGCGAACCAGGGCGGAGAGGTTGGTGGCCGTGCCGATGACTGCAGGCATAGAGTACACAGAAGTTGCTGAA
GAAAGCTGTAGCGCGCGCACCGCATGGATGGATGATTAATTTGATGATCGTGGTAGCGTGGCAATAACAGCAGACTCCAGGAAGTAACA
TCAAGAGCCATGTCTAGTGCAGAGAGAAGGCGCGGAGAGAAGCTCAACGAGATGTTCTCATTCTGAAGTCACTACTCCCTCCGTC
CGCAAGGTTGACAAGGCATCCATACTTGCAGAAACGATAACCTACCTCAAAGTGTAGAGAAAAGAGTGAAAGAGCTGGAGTCCAG
CAGCAGGGAGCCATCGCGTTGGCGCCCAACCGAAATTGGACAGGGGAAGGGCGCGTAATCACTAGTGAATTCGTAATCATGTCA
TAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGAAGCCTGGGGTGC
CTAATGAGTGAAGTCACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCCGGAAACCTGCTGTCGACGTCGATTAAT
GAATCGGCCAACGCGGGGAGAGCGGTTTGCCTATTGGCTAGAGCAGCTTGCCAACATGGTGGAGACGACACTCTCGTCTACT
CCAAGAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCGGGAAACCTCCTCGGA
TTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTCATCAAAAAGGACA
```

ภาพผนวก 3 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OSB2* จากใบข้าวพันธุ์กำหนดงเต่าคำในพลาสมิด pCAMBIA1305.1

หมายเหตุ ลำดับเบสที่เน้นสีเทาเข้มคือ start codon และ stop codon ของยีน *OSB2* ลำดับเบสที่เน้นสีเทาอ่อนคือ ยีน *OSB2* ลำดับเบสที่ไม่แรเงาส่วนหน้ายีน *OSB2* คือ dual 35s Promoter และด้านหลังยีน คือ *nos* Terminator

```

Contig-p13 : ATGSCATCGCTCCCTCAGTTCAGGAAGAGCCCTACAGCCAGGGACGAACCACTTCAGGAGCCGGCTTGGTGTCTGTGAGGAGCATCAGTTGGAGTACACCATCTTTTGG : 114
pFN1B2-130 : ATGSCATCGCTCCCTCAGTTCAGGAAGAGCCCTACAGCCAGGGACGAACCACTTCAGGAGCCGGCTTGGTGTCTGTGAGGAGCATCAGTTGGAGTACACCATCTTTTGG : 114
CSB2 : ATGSCATCGCTCCCTCAGTTCAGGAAGAGCCCTACAGCCAGGGACGAACCACTTCAGGAGCCGGCTTGGTGTCTGTGAGGAGCATCAGTTGGAGTACACCATCTTTTGG : 114

120 * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 *
Contig-p13 : TCCACTTCAACCAGTCTCCCGGAGTTCGACTTGGACAGATGGATTCTACAACGGCCAGGTAAGACGAGGAAGATATCCAACTTAGAGGACCTACCCTGACACGCTCTGTC : 228
pFN1B2-130 : TCCACTTCAACCAGTCTCCCGGAGTTCGACTTGGACAGATGGATTCTACAACGGCCAGGTAAGACGAGGAAGATATCCAACTTAGAGGACCTACCCTGACACGCTCTGTC : 228
CSB2 : TCCACTTCAACCAGTCTCCCGGAGTTCGACTTGGACAGATGGATTCTACAACGGCCAGGTAAGACGAGGAAGATATCCAACTTAGAGGACCTACCCTGACACGCTCTGTC : 228

240 * 260 * 280 * 300 * 320 * 340 *
Contig-p13 : CTGCGGAGAGCGAGCAACTGAGCGAGCTCTACTACTCTCTCTGTCGGGAGTGGGACACCGGGCAAGGAAGCCCGTCCGGCACTGTCCCGGAAGATATCCGGGACACA : 342
pFN1B2-130 : CTGCGGAGAGCGAGCAACTGAGCGAGCTCTACTACTCTCTCTGTCGGGAGTGGGACACCGGGCAAGGAAGCCCGTCCGGCACTGTCCCGGAAGATATCCGGGACACA : 342
CSB2 : CTGCGGAGAGCGAGCAACTGAGCGAGCTCTACTACTCTCTCTGTCGGGAGTGGGACACCGGGCAAGGAAGCCCGTCCGGCACTGTCCCGGAAGATATCCGGGACACA : 342

360 * 380 * 400 * 420 * 440 *
Contig-p13 : GAATGGTACTACCTGTCTGCTGACATACGCCCTTTGACCCCGCCCAAGGGTTACCCGGCAGAAGCTATGCAAGCAATCGMCTGTTGGTGTGCAATGCTCAGTCTGGAGAT : 456
pFN1B2-130 : GAATGGTACTACCTGTCTGCTGACATACGCCCTTTGACCCCGCCCAAGGGTTACCCGGCAGAAGCTATGCAAGCAATCGMCTGTTGGTGTGCAATGCTCAGTCTGGAGAT : 456
CSB2 : GAATGGTACTACCTGTCTGCTGACATACGCCCTTTGACCCCGCCCAAGGGTTACCCGGCAGAAGCTATGCAAGCAATCGMCTGTTGGTGTGCAATGCTCAGTCTGGAGAT : 456

460 * 480 * 500 * 520 * 540 * 560 *
Contig-p13 : AGCAAAACCTTTTACCTGCGCTCTTAGCGAAGAGCGCGCTTATTTCAGACAATTTGCTGATCCCTTCATGAGTGGCGTGTCTGAGCTGGGAACCACTGATCCGGTTTCGGAG : 570
pFN1B2-130 : AGCAAAACCTTTTACCTGCGCTCTTAGCGAAGAGCGCGCTTATTTCAGACAATTTGCTGATCCCTTCATGAGTGGCGTGTCTGAGCTGGGAACCACTGATCCGGTTTCGGAG : 570
CSB2 : AGCAAAACCTTTTACCTGCGCTCTTAGCGAAGAGCGCGCTTATTTCAGACAATTTGCTGATCCCTTCATGAGTGGCGTGTCTGAGCTGGGAACCACTGATCCGGTTTCGGAG : 570

580 * 600 * 620 * 640 * 660 * 680 *
Contig-p13 : GACCCAAACTTGGTAAACCGAATCGTTGCATATTTGAAGGAGCTTCAGTTCGGATATGCTTAGAGGTACCGAGTCTACTCCITTCACGACGAAACAGAAGATGCCGACACC : 684
pFN1B2-130 : GACCCAAACTTGGTAAACCGAATCGTTGCATATTTGAAGGAGCTTCAGTTCGGATATGCTTAGAGGTACCGAGTCTACTCCITTCACGACGAAACAGAAGATGCCGACACC : 684
CSB2 : GACCCAAACTTGGTAAACCGAATCGTTGCATATTTGAAGGAGCTTCAGTTCGGATATGCTTAGAGGTACCGAGTCTACTCCITTCACGACGAAACAGAAGATGCCGACACC : 684

700 * 720 * 740 * 760 * 780 * 800 *
Contig-p13 : GTGTTGATGCGCTCATTGAAGGAGCCAGATGGTCTATCTCCAGGGAGAGACGAGCTAGGCCACCTCCCTCCCTGAGTGGCGAGCAACCGGCCAACCCCGAAACGATC : 798
pFN1B2-130 : GTGTTGATGCGCTCATTGAAGGAGCCAGATGGTCTATCTCCAGGGAGAGACGAGCTAGGCCACCTCCCTCCCTGAGTGGCGAGCAACCGGCCAACCCCGAAACGATC : 798
CSB2 : GTGTTGATGCGCTCATTGAAGGAGCCAGATGGTCTATCTCCAGGGAGAGACGAGCTAGGCCACCTCCCTCCCTGAGTGGCGAGCAACCGGCCAACCCCGAAACGATC : 798

820 * 840 * 860 * 880 * 900 *
Contig-p13 : ACCATGGAGACCGAGAGTTCACAGCCTCTGCGAGGAGCTGGACCTGGACTCGGTTCTTATCAGCTAGTCCCGACGTCCGACGGGAGACGGTGGTGGCGGGCGGGCGGG : 912
pFN1B2-130 : ACCATGGAGACCGAGAGTTCACAGCCTCTGCGAGGAGCTGGACCTGGACTCGGTTCTTATCAGCTAGTCCCGACGTCCGACGGGAGACGGTGGTGGCGGGCGGGCGGG : 912
CSB2 : ACCATGGAGACCGAGAGTTCACAGCCTCTGCGAGGAGCTGGACCTGGACTCGGTTCTTATCAGCTAGTCCCGACGTCCGACGGGAGACGGTGGTGGCGGGCGGGCGGG : 912

920 * 940 * 960 * 980 * 1000 * 1020 *
Contig-p13 : GCTAACGATGTCACGCGCTTGCATCTCTCACGCTCGTGTTCGTCATGGAAAGAGCGAACCCCGCGGAGAGGTGGTGGCTCCCGATGACTCGAGGATAGAGTCA : 1026
pFN1B2-130 : GCTAACGATGTCACGCGCTTGCATCTCTCACGCTCGTGTTCGTCATGGAAAGAGCGAACCCCGCGGAGAGGTGGTGGCTCCCGATGACTCGAGGATAGAGTCA : 1026
CSB2 : GCTAACGATGTCACGCGCTTGCATCTCTCACGCTCGTGTTCGTCATGGAAAGAGCGAACCCCGCGGAGAGGTGGTGGCTCCCGATGACTCGAGGATAGAGTCA : 1026

1040 * 1060 * 1080 * 1100 * 1120 * 1140 *
Contig-p13 : CAGAAGTTCCTGAAAGAAAGCTTAGGCGCGCCACCCGATGAGTAAATATTTGATGCTGGTGGTGGCAATAACCGAGCTCCAGGAAATCAACATCAGAGCCATGTC : 1140
pFN1B2-130 : CAGAAGTTCCTGAAAGAAAGCTTAGGCGCGCCACCCGATGAGTAAATATTTGATGCTGGTGGTGGCAATAACCGAGCTCCAGGAAATCAACATCAGAGCCATGTC : 1140
CSB2 : CAGAAGTTCCTGAAAGAAAGCTTAGGCGCGCCACCCGATGAGTAAATATTTGATGCTGGTGGTGGCAATAACCGAGCTCCAGGAAATCAACATCAGAGCCATGTC : 1140

1160 * 1180 * 1200 * 1220 * 1240 *
Contig-p13 : ATGTCAGAGAGAGGCGCGGAGAGAGCTCAACGAGATGTTCCCTATTCTGAAGTCACTACTCCCTCCGTCGGCAAGGTTGACAAGGCATCCATCTTGCAGAAACGATTAACC : 1254
pFN1B2-130 : ATGTCAGAGAGAGGCGCGGAGAGAGCTCAACGAGATGTTCCCTATTCTGAAGTCACTACTCCCTCCGTCGGCAAGGTTGACAAGGCATCCATCTTGCAGAAACGATTAACC : 1254
CSB2 : ATGTCAGAGAGAGGCGCGGAGAGAGCTCAACGAGATGTTCCCTATTCTGAAGTCACTACTCCCTCCGTCGGCAAGGTTGACAAGGCATCCATCTTGCAGAAACGATTAACC : 1254

1260 * 1280 * 1300 * 1320 * 1340 *
Contig-p13 : TACCTCAAAGTGTAGAGAAAAGAGTGAAGAGCTGGAGTCCAGCAGCAGGAGCCATCCGCTTGGCGCCCAACCGAAATTTGGACAGGGGAAGGCGCCATA : 1356
pFN1B2-130 : TACCTCAAAGTGTAGAGAAAAGAGTGAAGAGCTGGAGTCCAGCAGCAGGAGCCATCCGCTTGGCGCCCAACCGAAATTTGGACAGGGGAAGGCGCCATA : 1356
CSB2 : TACCTCAAAGTGTAGAGAAAAGAGTGAAGAGCTGGAGTCCAGCAGCAGGAGCCATCCGCTTGGCGCCCAACCGAAATTTGGACAGGGGAAGGCGCCATA : 1356

```

**ภาพผนวก 4** ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *OSB2* จากไขขาวพันธุ์กำหนดของเต่าดำที่โคลนในพลาสมิด pCAMBIA1305.1 กับยีน *OSB2* ที่โคลนได้จากไขขาวพันธุ์กำหนดของเต่าดำในพลาสมิด pGEM-T Easy และยีน *OSB2* จากฐานข้อมูล GenBank (accession no. AB021080)

**หมายเหตุ** ลำดับเบสที่เน้นสีเทาอ่อนคือ ลำดับเบสที่เหมือนกัน และสีเทาเข้มคือ ลำดับเบสที่ไม่เหมือนกัน ลำดับเบสในกรอบสีแดง คือ start codon และ stop codon โดย Contig-p13 คือ ลำดับเบสของยีน *OSB2* จากไขขาวพันธุ์กำหนดของเต่าดำที่โคลนในพลาสมิด pCAMBIA1305.1 ส่วน pKNLB2-1300 คือ ลำดับเบสของยีน *OSB2* จากไขขาวพันธุ์กำหนดของเต่าดำที่โคลนในพลาสมิด pGEM-T Easy และ *OSB2* คือ ยีนจากฐานข้อมูล GenBank

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSB2* ที่โคลนในพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 เปรียบเทียบกับยีน *OSB2* ที่โคลนได้ก่อนหน้านี้ในพลาสมิด pGEM-T Easy และยีน *OSB2* จากฐานข้อมูล พบว่า ยีนที่โคลนได้ใน pCAMBIA1305.1 มีความเหมือนกับยีน *OSB2* ในพลาสมิด pGEM-T Easy ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน พบว่า มีความเหมือนกันและไม่มี ส่วนใดของกรดอะมิโนหายไป (ภาพผนวก 5) แสดงว่ายีน *OSB2* ในพลาสมิด pCAMBIA1305.1 มี ลำดับเบสและกรดอะมิโนถูกต้อง จึงสามารถนำไปถ่ายเข้าสู่เซลล์สัตว์ต่อไป

```

Contig-p13 : MASAPPVQEALQPGTNRFRSRLAAAVRSISWSYTIWSTSTSLPGVLTWNDGFYNGEVKTRKISNLEDLTADQLVLRSEQLSELYSYLLSGECDHRARKPVAALSPEDIADTEWY : 117
pKN1B2-130 : MASAPPVQEALQPGTNRFRSRLAAAVRSISWSYTIWSTSTSLPGVLTWNDGFYNGEVKTRKISNLEDLTADQLVLRSEQLSELYSYLLSGECDHRARKPVAALSPEDIADTEWY : 117
OSB2-plw : MASAPPVQEALQPGTNRFRSRLAAAVRSISWSYTIWSTSTSLPGVLTWNDGFYNGEVKTRKISNLEDLTADQLVLRSEQLSELYSYLLSGECDHRARKPVAALSPEDIADTEWY : 117

Contig-p13 : YVVCMTYAFRFGQLPGRSYASNRSVWLCNAQSADSSTFLRALAKSASIGTIVCIFFMNSVLELGTTFVSEDDNIVNRIVAYIKELQFPICLEVRSSTPSPDETEDADTVFDGLI : 234
pKN1B2-130 : YVVCMTYAFRFGQLPGRSYASNRSVWLCNAQSADSSTFLRALAKSASIGTIVCIFFMNSVLELGTTFVSEDDNIVNRIVAYIKELQFPICLEVRSSTPSPDETEDADTVFDGLI : 234
OSB2-plw : YVVCMTYAFRFGQLPGRSYASNRSVWLCNAQSADSSTFLRALAKSASIGTIVCIFFMNSVLELGTTFVSEDDNIVNRIVAYIKELQFPICLEVRSSTPSPDETEDADTVFDGLI : 234

Contig-p13 : EEDCMVLLQGEDELGDVVVAECETNGANPETITMETEEFYSLCEELDLGLSYQLVPTSARETVAAAAAANDVDGVAYSHASCFSVSWKRANPAEKVVAVPMTAGIESCKLLKRAVG : 351
pKN1B2-130 : EEDCMVLLQGEDELGDVVVAECETNGANPETITMETEEFYSLCEELDLGLSYQLVPTSARETVAAAAAANDVDGVAYSHASCFSVSWKRANPAEKVVAVPMTAGIESCKLLKRAVG : 351
OSB2-plw : EEDCMVLLQGEDELGDVVVAECETNGANPETITMETEEFYSLCEELDLGLSYQLVPTSARETVAAAAAANDVDGVAYSHASCFSVSWKRANPAEKVVAVPMTAGIESCKLLKRAVG : 351

Contig-p13 : GGTAMMSNIDDRGSAITTPGSMIKSHVMSERRRRKLNEMFLILKSLLPVSRVVKASILAETITYLKVKLEKRVKELESSSRPFRWRPTEIGQGGKAP : 451
pKN1B2-130 : GGTAMMSNIDDRGSAITTPGSMIKSHVMSERRRRKLNEMFLILKSLLPVSRVVKASILAETITYLKVKLEKRVKELESSSRPFRWRPTEIGQGGKAP : 451
OSB2-plw : GGTAMMSNIDDRGSAITTPGSMIKSHVMSERRRRKLNEMFLILKSLLPVSRVVKASILAETITYLKVKLEKRVKELESSSRPFRWRPTEIGQGGKAP : 451
    
```

**ภาพผนวก 5** ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSB2* จากไบชีวพันธุ์ที่กำหนดค่าที่โคลนในพลาสมิด pCAMBIA1305.1 กับยีน *OSB2* ที่โคลนได้จากไบชีวพันธุ์ที่กำหนดค่าในพลาสมิด pGEM-T Easy และยีน *OSB2* จากฐานข้อมูล GenBank (accession no. BAB64302)

**หมายเหตุ** ลำดับกรดอะมิโนที่เน้นสีเทาอ่อนคือ ลำดับเบสที่เหมือนกัน ลำดับกรดอะมิโนที่เน้นสีเทาเข้มคือ ลำดับเบสที่ไม่เหมือนกัน โดย Contig-p13 คือ ลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSB2* จากไบชีวพันธุ์ที่กำหนดค่าที่โคลนในพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 ส่วน pKNLB2-1300 คือ ลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSB2* จากไบชีวพันธุ์ที่กำหนดค่าที่โคลนในพลาสมิด pGEM-T Easy และ *OSB2* คือ ลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล GenBank

ภาคผนวก ข

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

## สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ *E. coli* และอะโกรแบคทีเรียม

ตารางผนวก 2 อาหารสูตร LB Medium (Luria – Bertani Medium)

องค์ประกอบ	250 ml	500 ml	1000 ml
Tryptone	2.5 g	5 g	10 g
Yeast extract	1.25 g	2.5 g	5 g
NaCl	2.5 g	5 g	10 g
วุ้นแบคทีเรีย	3.75 g	7.5 g	15 g
pH 7			

- หมายเหตุ
- อาหาร LB (แข็ง) ที่ใช้เลี้ยง *E. coli* หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อ รอให้อาหารอุ่นลงจึงเติมสารปฏิชีวนะ Ampicilin (Stock 100 mg/ml); (Final 100 mg/L) หรือ Kanamycin (Stock 50 mg/ml); (Final 50 mg/L)
  - อาหาร LB (แข็ง) ที่ใช้เลี้ยงอะโกรแบคทีเรียม หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อ รอให้อาหารอุ่นลงจึงเติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin (Stock 50 mg/ml); (Final 50 mg/L) และ Rifamycin (Stock 50 mg/ml); (Final 50 mg/L)
  - LB (เหลว) ที่ใช้เลี้ยงอะโกรแบคทีเรียมก่อนการถ่ายยีนจะไม่เติมวุ้น และเติมสารปฏิชีวนะก่อนนำไปใช้

สูตรอาหารสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว

ตารางผนวก 3 อาหารสูตร N6D สำหรับการชักนำเมล็ดข้าวให้เกิดแคลลัส และเพาะเลี้ยงแคลลัส  
ก่อนการถ่ายยีน

องค์ประกอบ	500 ml	1 L
<b>N6 stock</b>		
Stock1	10 ml	20 ml
Stock2	2.5 ml	5 ml
Stock3	2.5 ml	5 ml
Stock4	2.5 ml	5 ml
N6 vitamin (x1000)	0.5 ml	1 ml
2,4-D (0.2 mg/ml)	5 ml	10 ml
KNO <sub>3</sub>	1.415 g	2.830 g
Sucrose	15 g	30 g
Myo-inositol	50 mg	100 mg
Casamino acid	150 mg	300 mg
L proline	1.439 g	2.878 g
pH 5.8		

ตารางผนวก 4 อาหารสูตร 2N6-AS สำหรับปลูกเชื้อและการเพาะเลี้ยงร่วม

องค์ประกอบ	500 ml	1 L
<b>N6 stock</b>		
Stock1	10 ml	20 ml
Stock2	2.5 ml	5 ml
Stock3	2.5 ml	5 ml
Stock4	2.5 ml	5 ml
N6 vitamin (x1000)	0.5 ml	1 ml
2,4-D (0.2 mg/ml)	5 ml	10 ml
Sucrose	15 g	30 g
Glucose	5 g	10 g
KNO <sub>3</sub>	1.415 g	2.830 g
Myo-inositol	50 mg	100 mg
Casamino acid	150 mg	300 mg
pH 5.8		
Acetosyringone (AS) (stock 500 μM); (Final 100 μM)	100 μl	200 μl

- หมายเหตุ
- อาหารเพาะเลี้ยงร่วมหลังจากนึ่งฆ่าเชื้อรอให้อาหารอุ่นลงแล้วเติม Acetosyringone (AS) (Stock 500 μM); (Final 100 μM) จากนั้นเทลงขวด
  - อาหารปลูกเชื้อจะไม่เติมวุ้น และเติม AS ก่อนนำไปใช้

ตารางผนวก 5 อาหารสูตร 2N6 สำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ

องค์ประกอบ	500 ml	1 L
<b>N6 stock</b>		
Stock1	10 ml	20 ml
Stock2	2.5 ml	5 ml
Stock3	2.5 ml	5 ml
Stock4	2.5 ml	5 ml
N6 vitamin (x1000)	0.5 ml	1 ml
2,4-D (0.2 mg/ml)	5 ml	10 ml
Sucrose	15 g	30 g
KNO <sub>3</sub>	1.415 g	2.830 g
Myo-inositol	50 mg	100 mg
Casamino acid	150 mg	300 mg
pH 5.8		

หมายเหตุ สำหรับอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อจะไม่เติมวุ้น และเติมสารปฏิชีวนะ Timentin (Stock 150 mg/ml); (Final 150 mg/L) ก่อนนำไปใช้

ตารางผนวก 6 อาหาร SM 1 และ SM 2 (สูตรอาหาร N6D) สำหรับคัดเลือกเซลล์ที่ผ่านการถ่ายยีน

องค์ประกอบ	500 ml	1 L
<b>N6 stock</b>		
Stock1	10 ml	20 ml
Stock2	2.5 ml	5 ml
Stock3	2.5 ml	5 ml
Stock4	2.5 ml	5 ml
N6 vitamin (x1000)	0.5 ml	1 ml
2,4-D (0.2 mg/ml)	5 ml	10 ml
KNO <sub>3</sub>	1.415 g	2.830 g
Sucrose	15 g	30 g
Myo-inositol	50 mg	100 mg
Casamino acid	150 mg	300 mg
L proline	1.439 g	2.878 g
pH 5.8		

- หมายเหตุ
- อาหาร SM1 หลังนิ่งฆ่าเชื้อเติมสารปฏิชีวนะ Hygromycin (Stock 50 mg/ml); (Final 15 mg/L) และ Timentin (Stock 150 mg/ml); (Final 150 mg/L)
  - อาหาร SM2 หลังนิ่งฆ่าเชื้อเติมสารปฏิชีวนะ Hygromycin (Stock 50 mg/ml); (Final 30 mg/L) และ Timentin (Stock 150 mg/ml); (Final 150 mg/L)

ตารางผนวก 7 อาหารสูตร Regeneration Medium (RM) สำหรับชักนำแคลลัสให้เกิดยอด

องค์ประกอบ	500 ml	1 L
<b>MS stock</b>		
Stock1	10 ml	20 ml
Stock2	2.5 ml	5 ml
Stock3	2.5 ml	5 ml
Stock4	2.5 ml	5 ml
B5 vitamin (x1000)	2.5 ml	5 ml
Sucrose	15 g	30 g
Sorbitol	15 g	30 g
Casamino acid	1 g	2 g
NAA (Stock 100 mg/L); (Final 1 mg/L)	5 ml	10 ml
Kinetin (Stock 2.5 mg/ml); (Final 2.5 mg/L)	500 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
pH 5.8		

หมายเหตุ อาหาร RM หลังนี้ฆ่าเชื้อเตมิสารปฏิชีวนะ Hygromycin (Stock 50 mg/ml); (Final 30 mg/L) และ Timentin (Stock 150 mg/ml); ( Final 150 mg/L)

ตารางผนวก 8 อาหารสูตร MS สำหรับเพาะเลี้ยงต้นข้าวในขวดเพื่อชักนำให้เกิดราก

องค์ประกอบ	500 ml	1 L
<b>MS stock</b>		
Stock1	10 ml	20 ml
Stock2	2.5 ml	5 ml
Stock3	2.5 ml	5 ml
Stock4	2.5 ml	5 ml
B5 vitamin (x1000)	2.5 ml	5 ml
Sucrose	15 g	30 g
pH 5.8		

หมายเหตุ อาหาร MS หลังนำมาเชื้อไม่เติมสารปฏิชีวนะ

ภาคผนวก ก  
ประวัติผู้วิจัย

## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - สกุล	นางสาวพูนศรี อินตะ
เกิดเมื่อ	9 กุมภาพันธ์ 2532
ประวัติการศึกษา	พ.ศ.2549 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสันทรายวิทยาคม พ.ศ.2553 ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ทุนวิจัยและทุนการศึกษา	ทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีการศึกษา 2555 และทุนการศึกษา ประเภททุนศิษย์เรียนดี บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปี 2555
ผลงานวิจัยเผยแพร่	<p>การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 18 ประจำปี 2556 (ภาคโปสเตอร์) เรื่อง การโคลนและศึกษา คุณสมบัติของยีน <i>OSB2</i> ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ในข้าว วันที่ 17 กรกฎาคม 2556 ณ โรงแรมแอมบาสเดอร์ สุขุมวิท กรุงเทพมหานคร</p> <p>การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมทางวิชาการ International Symposium on Rice Functional Genomics ครั้งที่ 10 ประจำปี 2555 (ภาค โปสเตอร์) เรื่อง Transformation and Expression of a Gene Controlling Anthocyanin Biosynthesis from <i>Arabidopsis</i> in Rice. วันที่ 26-29 พฤศจิกายน 2555 ณ โรงแรมโลตัส ปางสวนแก้ว จ. เชียงใหม่</p> <p>การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมทางวิชาการ ประจำปี 2554 มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (ภาคบรรยาย) เรื่อง การถ่ายยีนสร้างแอนโทไซยานิน เข้าสู่ยาสูบเพื่อใช้เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก วันที่ 1 ธันวาคม 2554 ณ ศูนย์การศึกษาและฝึกอบรมนานาชาติ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการ การเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่</p>

## ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์

พูนศรี อินตะ วิศิษฎ์ พงศ์บุรพัฒน์ แสงทอง พงษ์เจริญกิต ศรีเมฆ ชาวโพงพาง วราภรณ์ แสงทอง และช่อทิพา สกกุลสิงหาโรจน์. 2556. การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีน *OSB2* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว. **Thai Journal of Genetics** 6 (1): 25-29.

รอยพิมพ์ สุขเกษม พัชราภา หมั่นภิรมย์ พูนศรี อินตะ แสงทอง พงษ์เจริญกิต ศรีเมฆ ชาวโพงพาง และช่อทิพา สกกุลสิงหาโรจน์. 2556. ผลของการขาดในโครเจนที่มีต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในต้นยาสูบที่มียีน *pap1* รายงานการประชุมวิชาการ ประจำปี 2556. 3-4 ธันวาคม 2556 ณ ศูนย์การศึกษาและฝึกอบรมนานาชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

วารุณี เข็มหาญ พูนศรี อินตะ วราภรณ์ แสงทอง แสงทอง พงษ์เจริญกิต นลินี รุ่งเรืองศรี และช่อทิพา สกกุลสิงหาโรจน์. 2554. การถ่ายยีนและการแสดงออกของยีนสร้างแอนไซม์เอคิพี-กลูโคสไพโรฟอสฟอริเลสในเมล็ดข้าว. รายงานการประชุมทางวิชาการประจำปี 2554. 1-2 ธันวาคม 2554. ศูนย์การศึกษาและฝึกอบรมนานาชาติ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้