

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีน Myc transcription factor

ในข้าวหอมมะลิกลายพันธุ์

Cloning and characterization of gene encoding Myc transcription factor in

Thai Jasmine rice mutant

ผู้วิจัย

รัฐพร จันทร์เดช

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุน

สนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย และขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

ผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้าที่
สารบัญตาราง	ก
สารบัญภาพ	ข
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทนำ	4
วัสดุและอุปกรณ์	14
วิธีการทดลอง	18
ผลการทดลอง	29
วิจารณ์ผลการทดลอง	52
เอกสารอ้างอิง	54

(ก)

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงรายชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการแยก MYC transcription factor gene จากข้าวพันธุ์กลาย BKOS ด้วยเทคนิค RT-PCR	20
2 แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR เพื่อแยกดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 400 คู่เบส	21
3 แสดงระดับความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน ของ Putative transcription factor gene MYC (bHLH) ที่แยกจากข้าวกลายพันธุ์ BKOS ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ transcription factor gene MYC (bHLH) จากพืชปีชีส์อื่น ๆ	31
4 แสดงระดับความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน ของ Putative transcription factor gene MYC (bHLH) ที่แยกจากข้าวกลายพันธุ์ BKOS ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ transcription factor gene MYC (bHLH) จากพืชปีชีส์อื่น ๆ	32
5 แสดงระดับความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน ของ Putative transcription factor WD-40 gene ที่แยกจากข้าวกลายพันธุ์ BKOS ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับ transcription factor WD-40 gene จากพืชปีชีส์อื่น ๆ	41
6 แคลลัสของข้าว BKOS ดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อ Kanamycin และมีกิจกรรมของยีน <i>gus</i> ภายหลังการส่งถ่ายด้วยเชื้อ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> สายพันธุ์ AGL1 และ LBA4404	44
7 ผลการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-MYC และ pSTART-MYC-WD40 เข้าสู่ยาสูบโดยเทคนิค <i>Agrobacterium</i> transformation	45
8 ผลการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-MYC และ pSTART-MYC-WD40 เข้าสู่พื้งูเนียบโดยเทคนิค <i>Agrobacterium</i> transformation	47

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงโครงสร้างพื้นฐานของ Flavonoids และ Anthocyanins	1
2 แสดงวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Anthocyanin biosynthesis pathway)	10
3 แสดงการแยก transcription factor gene MYC (bHLH) จากข้าวพันธุกลาย สายพันธุ์ BKOS ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ Degenerate primers	29
4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative transcription factor gene MYC ขนาด 351 คู่เบส ที่แยกได้จากข้าวพันธุกลายสายพันธุ์ BKOS	30
5 แสดงลำดับกรดอะมิโนขนาด 117 อะมิโนที่แปลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative transcription factor gene MYC จากข้าวพันธุกลายสายพันธุ์ BKOS	30
6 แสดงการทำ Multiple sequence alignment ระหว่าง Putative transcription factor gene MYC (bHLH) ของข้าวพันธุกลาย (BKOS) กับพืชอื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank	33
7 Dendrogram แสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ MYC gene จากข้าวพันธุกลาย BKOS กับลำดับกรดอะมิโนของยีน MYC พืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูล GenBank	35
8 แสดงแบบแผนการแสดงของยีน MYC Transcription factor ในระดับการ Transcription	36
9 cDNA fringerprint ระหว่างข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปกติ (1) และข้าวขาวดอกมะลิ พันธุ์กลาย BKOS (2) จากการใช้ primer OPW14	37
10 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 840 นิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative transcription factor WD-40 ที่แยกได้จากข้าวพันธุกลายสายพันธุ์ BKOS	38
11 แสดงลำดับกรดอะมิโนขนาด 280 อะมิโนที่แปลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative transcription factor WD-40 จากข้าวพันธุกลายสายพันธุ์ BKOS	38
12 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Full length cDNA Putative transcription factor	39

WD-40 gene ขนาด 1,035 นิวคลีโอไทด์ ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS

(ค)

13 แสดงลำดับกรดอะมิโนขนาด 345 อะมิโนที่แปลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Full length cDNA Putative transcription factor WD-40 gene ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS	40
14 แสดงการทำ Multiple sequence alignment ระหว่าง Putative transcription factor WD-40 gene ของข้าวพันธุ์กลาย (BKOS) กับพืชอื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank	42
15 Dendrogram แสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ WD-40 gene จากข้าวพันธุ์กลาย BKOS กับลำดับกรดอะมิโนของยีนต่างๆจากฐานข้อมูล GenBank	42
16 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน MYC และ <i>WD40</i> ในเนื้อเยื่อของยาสูบ ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค RT-PCR	46
17 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน MYC และ <i>WD40</i> ในเนื้อเยื่อของพื้ญเณย์ที่ได้รับ การส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค RT-PCR	47
18 การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนในวิธีสังเคราะห์แอนโทไซยานินในยาสูบ ที่ได้รับการส่งถ่ายยีน <i>MYC</i> และ <i>MYC-WD40</i>	49
19 HPLC-Chromatogram ของสารในกลุ่มแอนโทไซยานินจากยาสูบ ที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน (A) และ ยาสูบที่ได้รับการส่งถ่ายยีน <i>MYC</i> และ <i>WD40</i> (B)	50

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ MRG5180017

ชื่อโครงการ การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีน *Myc* transcription factor ในข้าวหอมมะลิกลายพันธุ์

ชื่อนักวิจัย ดร.รัฐพร จันทร์เดช

ระยะเวลาโครงการ 3 ปี 6 เดือน ตั้งแต่ 15 พฤษภาคม พ.ศ.2551 ถึง 30 กันยายน พ.ศ.2554

การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการโคลน Transcription factor *MYC* gene จากข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS ซึ่งมีขนาด 1,353 คู่เบส และแปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 451 อะมิโน เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้กับฐานข้อมูล พบว่ามีความคล้ายกับยีน R-type basic helix-loop-helix (*Plw-OSB2*) ของข้าวมากที่สุดถึง 92% และมีความคล้ายคลึงกับกลุ่มของ Transcription factor *MYC* gene ในพืชชนิดอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน ในการศึกษาหน้าที่ของยีน *Myc* ได้ทำการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบและส่งถ่ายร่วมกับยีน *WD40* ที่โคลนได้จากข้าวสายพันธุ์เดียวกันนี้ พบว่าเมื่อยีน *MYC* ทำงานร่วมกับยีน *WD40* จะสามารถชักนำให้ยีน *Chalcone synthase (CHS)*, *anthocyanin synthase (ANS)* และ *UDP-glucose-flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UGT)* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในต้นยาสูบที่ได้รับการส่งถ่ายยีนมีการแสดงออกได้เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบการสะสมของสารสำคัญในกลุ่มแอนโทไซยานินหลากหลายมากขึ้นด้วย

คำหลัก: *MYC*, Transcription factor, Anthocyanins, แอนโทไซยานิน ข้าวพันธุ์กลาย BKOS

Abstract

Project code: MRG5180017

Project Title:

Investigator: Dr. Ruttaporn Chundet, Maejo University

E-mail address: auanmolec@gmail.com

Project Period: 3 years and 6 month from 15 May 2008 – 30 September 2011

This research has been cloned the transcription factor *MYC* gene from mutants rice BKOS. *Myc* gene has 1,353 base pairs open reading frame and encodes a protein of 451 amino acids.

The deduce *MYC* amino acids sequence showed the highest homology with R-type basic helix-loop-helix (*Plw-OSB2*) of rice at 92% identity and was grouped to *MYC* protein that involved in the anthocyanin biosynthesis of the other plants. For functional analysis, *MYC* gene has been transferred into tobacco by single and with *WD40* which cloned from the same mutant rice. It was found that the co-transformation of *MYC* and *WD40* can be induced the expression of the three structural genes: *Chalcone synthase (CHS)*, *anthocyanin synthase (ANS)* and *UDP-glucose-flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UGT)*, which code for enzymes involved in the anthocyanin biosynthetic pathway. In addition we found the accumulation of varieties of anthocyanin in transgenic tobacco.

Keywords: *MYC*, Transcription factor, Anthocyanins, mutant rice BKOS

คำนำ

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ของสารประกอบในกลุ่มแอนโทไซยานินในพืชชนิดต่างๆอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นที่ยอมรับว่าแอนโทไซยานินมีคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระ ตลอดจนมีคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็งบางชนิดได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในธัญพืช เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี ได้มีการศึกษาถึงกลไกการควบคุมและการชักนำให้เกิดการสะสมของแอนโทไซยานิน ซึ่งกลไกการควบคุมนั้นมีความซับซ้อนและมีความจำเพาะในพืชแต่ละชนิด จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษากระบวนการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวหอมมะลิพันธุ์กลายของไทยซึ่งถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคลำไออนพลังงานต่ำทำให้เกิดข้าวพันธุ์ใหม่ที่มีเมล็ดเป็นสีม่วงดำซึ่งสีดังกล่าวเกิดจากการสะสมของรงควัตถุแอนโทไซยานิน โดยงานวิจัยนี้ได้ศึกษายีนในกลุ่มของ Transcription factor ที่มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆในวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เพื่อที่จะใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชต่างๆ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อโคลนยีน Myc transcription factor จากข้าวหอมมะลิกลายพันธุ์
2. เพื่อศึกษาแบบแผนการแสดงออกของ Myc transcription factor gene ที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวหอมมะลิกลายพันธุ์
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของ Myc transcription factor จากข้าวหอมมะลิกลายพันธุ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เข้าใจบทบาทหน้าที่ของ Myc transcription factor gene ที่โคลนได้จากข้าวหอมมะลิกลายพันธุ์
2. ทราบถึงกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนระดับ Transcription ในวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวหอมมะลิกลายพันธุ์
3. มีความเป็นไปได้ที่จะนำยีน Myc transcription factor ที่โคลนได้จากข้าวหอมมะลิกลายพันธุ์มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดต่างๆในอนาคต

1. บทนำ

การควบคุมรูปแบบของการเกิดสีในพืช

พืชจะมีรูปแบบการเกิดสีซึ่งเกิดจากการสะสมของ anthocyanins ที่เซลล์จำเพาะ การควบคุมชีวสังเคราะห์ anthocyanins จะควบคุมที่ระดับการถอดรหัสยีนเป็นส่วนใหญ่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ anthocyanins แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มของยีน โครงสร้างซึ่งทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ของสารในกลุ่มของ anthocyanins และกลุ่มของยีนควบคุม (Transcription factor) โดยจะให้โปรตีนซึ่งกำหนดการแสดงออกของยีน โครงสร้างและรูปแบบของการสะสมเม็ดสี โดยการแสดงออกของยีนควบคุม จะมีรูปแบบที่จำเพาะต่อรูปแบบของการเกิดสี (Holton and Cornish, 1995) ถึงแม้ว่าในพืชหลายชนิดจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรม แต่ก็พบว่ายีน โครงสร้าง และยีนควบคุมซึ่งทำหน้าที่เดียวกันในชีวสังเคราะห์ anthocyanins นั้น จะมีบริเวณอนุรักษ์ของยีน (conserved region) ร่วมกัน และยีนเหล่านี้ยังถูกกระตุ้นการแสดงออกด้วยแสง การศึกษาถึงการควบคุมชีวสังเคราะห์ anthocyanins โดยเฉพาะเทคนิคการกลายพันธุ์นั้นพบว่า การควบคุมชีวสังเคราะห์ นี้ส่วนใหญ่เกิดจากการทำงานร่วมกันของยีนควบคุม ในการกำหนดรูปแบบการแสดงออกของยีน โครงสร้าง

มีการจำแนก ยีนควบคุมชีวสังเคราะห์ anthocyanins ในพืชหลายชนิด เช่น ในข้าวโพดพบว่ามียีนควบคุม 2 กลุ่ม คือ *r* และ *cl* ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในเนื้อเยื่อต่างๆ สมาชิกของยีนในกลุ่ม *r* (*r*, *lc*, *sn*, *b*) จะแปลรหัสให้โปรตีนซึ่งมีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นกรดที่ปลาย N จำนวนมาก และที่ปลาย C จะมีส่วนของ basic helix-loop-helix (bHLH) ทำหน้าที่จับกับ DNA (DNA binding domain) ในขณะที่สมาชิกของกลุ่ม *cl* (*cl* และ *p1*) จะถอดและแปลรหัสให้โปรตีนซึ่งมีโดเมน MYB ที่มีส่วนของ helix-turn-helix สำหรับจับกับ DNA โดยในข้าวโพดพบว่ามียีนหลายยีนที่เป็นสมาชิกของทั้ง *r* และ *cl* แต่มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกันไป (Ludwig and Wessler 1990; Cone *et al.*, 1993) ใน

ปัจจุบันได้มีความพยายามที่จะอธิบายกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนในชีวสังเคราะห์ anthocyanin ในระดับการ Transcription ซึ่งพบว่าพืชแต่ละชนิดจะมีรูปแบบการควบคุมแตกต่างกัน เช่น มีรายงานการทำงานของยีนควบคุมในการควบคุมการแสดงออกของยีนบริเวณเหนือโปรโมเตอร์ของยีน *DFR* (Grotewold *et al.*, 1994; Sainz *et al.*, 1997)

MYC transcription factor

สีส้มในพืชที่เรามองเห็นนั้นเป็นผลมาจากกลุ่มของรงควัตถุในพืช (Plant pigments) ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลักใหญ่ ๆ ที่ทำให้เกิดสีส้มในพืช ได้แก่ betalains, carotenoids และ anthocyanins โดยรงควัตถุ anthocyanin ซึ่งสร้างขึ้นจาก flavonoid pathway เป็นรงควัตถุที่ทำให้เกิดสีส้ม, แดง, ม่วง และน้ำเงินในพืชชนิดต่าง ๆ

วิธีการสังเคราะห์รงควัตถุ anthocyanin ถูกใช้เป็นเป้าหมายหลักในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพและเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรม เพื่อที่จะสร้างสารประกอบที่จะทำให้เกิดความแปลกใหม่หรือเปลี่ยนแปลงไปจากพันธุ์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ การควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เป็นระบบการควบคุมการแสดงออกของยีนในพืชที่มีการศึกษากันมากที่สุดระบบหนึ่ง (Grotewold, 2006) ปัจจัยหลักที่สำคัญอย่างหนึ่งในการควบคุมการแสดงออกในระดับการถอดรหัสของยีน ก็คือ transcription factors ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการเกิดกระบวนการถอดรหัส (transcription) โดยผ่านทาง การเข้าจับกับลำดับเบสในส่วนที่เป็นโปรโมเตอร์ของยีนโดยตรงหรือเข้าจับกับ RNA polymerase หรือโปรตีนอื่น ๆ ในกระบวนการเริ่มต้นการถอดรหัส (transcription initiation)

โปรตีน transcription factors ที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ควบคุมการแสดงออกของยีนในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ได้แก่ bHLH (basic-helix-loop-helix) ซึ่งพบทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ (Nicola *et al.*, 2003) bHLH เป็นโปรตีนในกลุ่มของ transcription factor MYC- like protein มี

โครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิที่ประกอบด้วย motif ที่มีลักษณะเป็น basic helix loop helix มีหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสของยีนที่เข้ารหัสให้เอนไซม์ในขั้นตอน Late stage ของวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินซึ่งเริ่มจากขั้นตอนที่เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ dihydroflavonol reductase (DFR) (Quattrocchio *et al.*, 1999)

จากการศึกษาในข้าวโพด พบว่าโปรตีน bHLH และ MYB transcription factors สามารถกระตุ้นการถอดรหัสของยีนหลายตัวที่เข้ารหัสให้เอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Roth *et al.*, 1991; Bodeau and Walbot, 1992; Lesnick and Chandler, 1998) เช่นเดียวกับในพืชใบเลี้ยงคู่ที่มีการค้นพบโปรตีน bHLH ที่ควบคุมวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ตัวอย่างเช่น โปรตีน DELILA ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมสีที่ปรากฏในกลีบดอกของดอกลินมังกร (Snapdragon) (Goodrich *et al.*, 1992) โปรตีน JAF13 และ AN1 ที่ควบคุมสีของดอกพิทูเนีย (Petunia) (Quattrocchio *et al.*, 1993, 1998, 2000) และโปรตีน TT8 ที่ควบคุมการสร้างแอนโทไซยานินในต้นอ่อนของ *Arabidopsis* (Shirley *et al.*, 1995) และการสร้าง proanthocyanidin ในฝัก (siliques) (Nesi *et al.*, 2000)

ในปี ค.ศ. 1992 Lloyd และคณะ ได้ทำการส่งถ่ายยีน *Lc* ซึ่งเป็น bHLH ในข้าวโพดเข้าสู่ *Arabidopsis* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณรงควัตถุแอนโทไซยานินและเพิ่มจำนวน trichomes ที่สร้างขึ้นในต้นอ่อนของ *Arabidopsis* ได้ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษายีน *R* ซึ่งเป็น bHLH ที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวโพดเช่นเดียวกันกับยีน *Lc* พบว่าสามารถแสดงออกได้ในพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น *Arabidopsis*, พิตูเนีย, ยาสูบ และมะเขือเทศได้ โดยทำให้เกิดการสะสมของรงควัตถุแอนโทไซยานินในพืชดังกล่าว (Lloyd *et al.*, 1992; Goldsbrough *et al.*, 1996; Bradley *et al.*, 1998) เช่นเดียวกันกับการแสดงออกของยีน *delila* ที่สามารถทำให้ปริมาณรงควัตถุแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นในต้นมะเขือเทศทั้งในส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อของลำต้น ใบ และดอก เมื่อทำการส่งถ่ายยีนดังกล่าวเข้าไปในพืชทั้งสองชนิด

จากการทดลองที่ได้กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าโปรตีนในกลุ่มของ bHLH หรือ MYC like proteins สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน การส่งถ่ายยีนที่เข้ารหัสให้โปรตีนในกลุ่มดังกล่าวเข้าสู่พืช สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการสร้างหรือการสะสมรงควัตถุแอนโทไซยานินในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ไม่ว่าจะเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหรือพืชใบเลี้ยงคู่

ในเวลาต่อมามีรายงานการวิจัยต่างๆแสดงให้เห็นว่าการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชถูกควบคุมโดย Transcription factors 3 กลุ่มได้แก่ R2R3 Myb, basic helix-loop-helix (bHLH) และ WD40 โดย Transcription factors ทั้งสามนี้จะมารวมตัวกันเป็นโครงสร้างพิเศษและจะกระตุ้นการทำงานของยีนต่างๆในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Baudry *et al.*, 2004; Carey *et al.*, 2004; Morita *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2004)

ในกลุ่มพืชชั้นสูง MYB transcription factor ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ Super gene family โดยแบ่งออกเป็น 3 subfamilies ได้แก่ Myb1R, R2R3Myb และ Myb3R Myb domain ประกอบด้วยกรดอะมิโน 52 กรดอะมิโน ซึ่งจะไปจับกับดีเอ็นเอบริเวณที่จำเพาะเจาะจง ใน Arabidopsis นั้นพบว่ามีสมาชิกของ MYB transcription factor มากกว่า 100 ยีน ซึ่งในพืชและยีสต์จะพบ R2R3Myb เป็นส่วนใหญ่ และเป็นที่ทราบกันดีว่ากลุ่มของ R2R3Myb นั้นมีบทบาทควบคุมการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน (Martin and Paz-Ares 1997; Zhang *et al.*, 2000; Nesi *et al.*, 2001)

Transcription factor ในกลุ่ม basic helix-loop-helix (bHLH) เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุดที่สุดในพืชและสัตว์ (Riechmann *et al.*, 2000) โดย Transcription factor กลุ่มนี้จะมีบริเวณของ basic helix-loop-helix ซึ่งมีการระบุในสัตว์ว่าเป็นกลุ่มของ MycD และ Myc (Murre *et al.*, 1989)

WD40 โปรตีน ประกอบไปด้วย β -propeller protein group โดยจะพบ กรดอะมิโน 40 อะมิโน ในบริเวณที่เรียกว่า glycine histidine (GH) dipeptide และ tryptophan-aspartate (WD) dipeptide จากการศึกษาพบว่าโปรตีน WD40 พบในเซลล์ยูคาริโอตเช่น สัตว์ พืช และฟังไจ

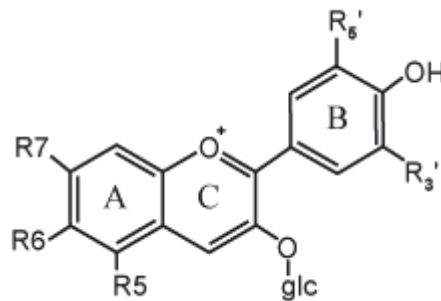
โดยจากการศึกษาต่างๆพบว่า Myb/bHLH/WD40-repeat model มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆในวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชหลายชนิดเช่น snapdragon (*Antirrhinum majus*) พืชเนย และ *Arabidopsis thaliana* (Mortia *et al.*, 2006; Quattrocchio *et al.*, 1999; Schwinn *et al.*, 2006; Spelt *et al.*, 2000; de Vetten *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2003)

โครงสร้างพื้นฐานของ flavonoids และ anthocyanins

โครงสร้างพื้นฐานของ flavonoids ประกอบไปด้วยคาร์บอนจำนวน 15 อะตอม (C6-C3-C6) ซึ่งมีวงแหวนอะโรมาติกสองวง (วงแหวน A และ B) ขนาบข้างวงแหวนวงกลางซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปเฮเทอโรไซเคิล ยกเว้น chalcones และ dihydrochalcones (McIntosh *et al.*, 1990) การรวมของหมู่ไฮดรอกซิล, น้ำตาล, ออกซิเจน, หมู่เมทิล และอื่นๆ ที่ตำแหน่งคาร์บอนในระหว่างปฏิกิริยาคัดแปลง ทำให้เกิด flavonoids หลายชนิด เช่น flavones (apigenin และ lutein), flavonols (quercetin, myricetin และ kaempferol), flavonones (hesperetin และ naringenin), isoflavones (genistein และ daidzein) ส่วนโครงสร้างพื้นฐานของ anthocyanin นั้นประกอบไปด้วยโครงสร้างของ 2-phenylbenzopyrylium (flavylium) (Kuhnau *et al.*, 1976) สารในกลุ่มของ anthocyanins มีประมาณ 200 หรือมากกว่า 200 ชนิด (Parkinson *et al.*, 1981) pelargonidin, cyanidin, delphinidin คือ anthocyanin ที่เกิดจากปฏิกิริยา hydroxylation, O-methylation, glycosylation และ acylation ซึ่ง anthocyanins เหล่านี้จะมีโครงสร้างที่คล้ายกัน แตกต่างที่วงแหวน B

Anthocyanins เป็นกลุ่มของรงควัตถุที่มีสีแดงไปจนถึงสีม่วงหรือสีน้ำเงิน (Mol *et al.*, 1998) เป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ในพืชพบว่ามีโครงสร้างสารในกลุ่มของ anthocyanins มากกว่า 200 ชนิด (Liew *et al.*, 1998) รงควัตถุ anthocyanins จะมี flavan nucleus เป็นโครงสร้างหลัก แต่จะแตกต่างกันไปบ้างขึ้นอยู่กับ side chain ของ ring โดยเฉพาะตรงตำแหน่งของ B-ring ซึ่งเป็น ring ที่มี functional group ต่างๆ มาเกาะทำให้เกิดชนิดของ anthocyanins ที่แตกต่างกันไป (ภาพที่ 1) สามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่มใหญ่ๆ

คือ pelargonidin (ส้ม-แดง) cyanidin (แดง) peonidin (แดง - แดงเข้ม) delphinidin (ม่วงอ่อน - น้ำเงิน) petunidin (ม่วง - น้ำเงิน) และ malvidin (ม่วง) (Aida et al.,2000) ซึ่งแต่ละกลุ่มมีโครงสร้างที่ B-ring ต่างกัน

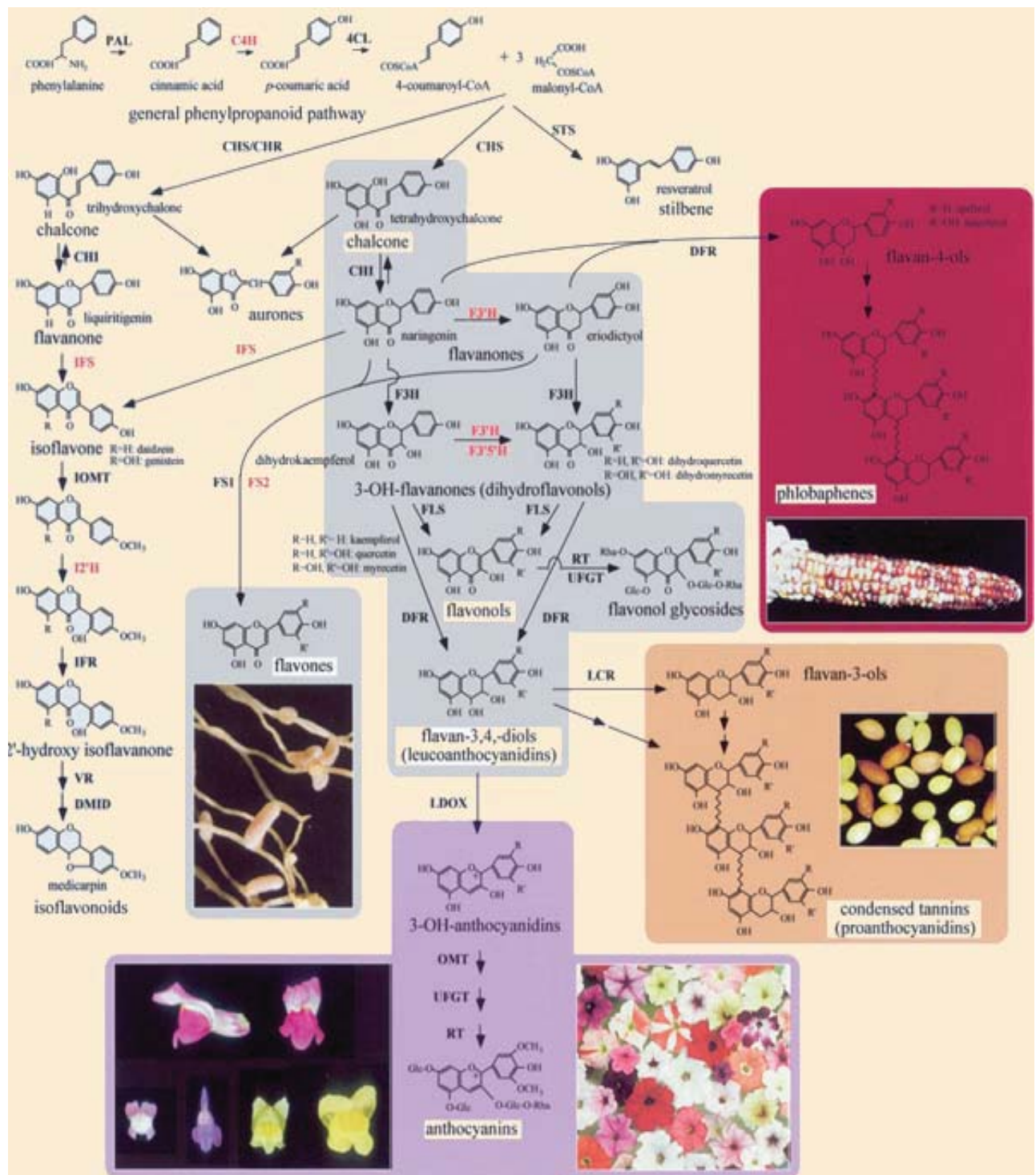


ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างพื้นฐานของ Flavonoids และ Anthocyanins

ชีวสังเคราะห์ Anthocyanins

ชีวสังเคราะห์ anthocyanins (ภาพที่ 2) สามารถสรุปเป็นขั้นตอนได้โดยในขั้นตอนแรกจะเกิดการกระตุ้นให้มีการรวมตัวกันของ molonyl CoA 3 โมเลกุล และ *p*-coumaroyl CoA 1 โมเลกุล ด้วยเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) ให้ผลผลิตเป็น naringenin chalcone ซึ่งมีสีเหลืองอ่อน ขั้นที่สองเป็นการเกิด isomerization ของ chalcone โดยการทำงานของเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) ให้ผลผลิตเป็น naringenin flavanone ซึ่งเป็นตัวกลางที่ไม่มีสี จากนั้นจะมีการเติมหมู่ไฮดรอกซี (OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 โดยเอนไซม์ flavanone 3 – hydroxylase (F3H) ให้สารกลุ่ม dihydroflavonol คือ dihydrokaempferol (DHK) สารประกอบนี้อาจได้รับการเติมหมู่ไฮดรอกซี ที่ตำแหน่งต่างๆ เพิ่มเติม โดยการทำงานของเอนไซม์ flavonoid 3'- hydroxylase (F3' H) และ flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3' 5'H) และให้สารประกอบกลุ่ม dihydroflavonol ชนิดอื่นๆ ได้แก่ dihydroquercetin (DHQ) และ dihydromyricetin (DHM) จำนวนหมู่ไฮดรอกซีบนวง แหวน B-ring นี้มีบทบาทสำคัญต่อการกำหนดเฉดสีที่แตกต่างกัน สารในกลุ่ม dihydroflavonol ต้องการเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิดสำหรับเปลี่ยนเป็นสารมีสีกลุ่ม anthocyanins เริ่มจากการกระตุ้นการรีดิวซ์สารประกอบกลุ่ม dihydroflavonol ด้วยเอนไซม์

dihydroflavonol 4- reductase (DFR) และให้สารกลุ่ม leucoanthocyanidin ได้แก่ leucocyanidin, leucodelphinidin และ leucopelargonidin ซึ่งจะถูกรีดอกซิเดชัน, dehydration และ glycosylation ให้สารกลุ่ม anthocyanin ซึ่งให้เฉดสีแตกต่างกัน เช่น สีแดงของ cyanidin สีน้ำเงินของ delphinidin สีส้มของ pelargonidin นอกจากนี้ อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยาต่างๆ เพิ่มเติม เช่น glycosylation, methylation และ acylation และทำให้เกิดสีที่จำเพาะในพืชแต่ละชนิด สารประกอบ anthocyanin เหล่านี้ต้องการเอนไซม์ glutathione S-transferase (GST) และ transporters ซึ่งเรียกว่า glutathione pump สำหรับเคลื่อนย้ายสารจากไซโตพลาสซึมเข้าสู่แวคิวโอล



ภาพที่ 2 แสดงวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Anthocyanin biosynthesis pathway)

ที่มา http://www.stanford.edu/group/dahlia_genetics/2008_reports/lab_5/lab_5_pics/flavonoid_biosynthesis.png

จากวิธีสังเคราะห์ที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าในวิถีของการสังเคราะห์ anthocyanins มีเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้อง โดยเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ chalcone synthase (CHS) , chalcone-flavanone isomerase (CHI) , flavanone 3-hydroxylase (F3H) ; flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) ; flavonoid 3' , 5'-hydroxylase (F3' 5'H) ; dihydroflavonol-4-reductase (DFR) และ anthocyanin synthase (ANS) เอนไซม์ตามลำดับ ซึ่งในปัจจุบันยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์เหล่านี้ถูกค้นพบและทำการศึกษาแล้วในพืชหลายชนิด (Holton *et al.*, 1995) รวมทั้งมีรายงานถึงการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากยีนดังกล่าวในการเปลี่ยนแปลงสีดอกไม้โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมด้วย ในการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ anthocyanins นั้นมีรายงานการใช้วิธีการต่าง ๆ ที่ประสบผลสำเร็จ เช่น การใช้ homologous gene สามารถค้นหาโดยวิธี hybridization วิธีการเช่นนี้สามารถค้นหายีนที่ค่อนข้างมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved) เช่น CHS Ueyama *et al.* (2002) สามารถแยกยีน flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) , flavonoid 3' , 5' - hydroxylase (F3' 5'H) และ flavone synthase II (FNSII) จากดอกสร้อยมยุรา โดยที่การสะสม anthocyanins หรือ flavonol เกิดจากหน้าที่ของเอนไซม์แต่ละตัวที่ทำงานควบคุมซึ่งกันและกัน

เอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ Anthocyanins

1. เอนไซม์ Chalcone synthase (CHS) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนการสร้าง Three acetate unit ซึ่งได้มาจาก malonyl -CoA 3 โมเลกุล รวมกับ p-coumaroyl 1 โมเลกุล ผลผลิตที่ได้คือ 2',4,4',6'-tetrahydroxychalcone (Holton *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1998)

ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ CHS ถูกนำมาใช้ศึกษาทางพันธุวิศวกรรม และได้มีการทำ co-suppression ของยีนดังกล่าวเพื่อปรับปรุงสีของดอกไม้ให้เป็นสีขาว เนื่องจากจะทำให้ไม่มีการสังเคราะห์ flavonoids อย่างไรก็ตามการขัดขวางการสังเคราะห์ flavonoids สามารถทำให้เกิด pleiotropic เช่น ตัวผู้เป็นหมัน

2. เอนไซม์ Chalcones isomerase (CHI) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา isomerization naringenin chalcones ทำให้เปลี่ยนเป็น flavonone naringenin (Holton *et al.*, 1995) ในพืชบางชนิดได้มีการศึกษาโดยทำให้เกิด mutation ของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ CHI เช่น เบญจมาศ คาร์เนชั่น ทำให้กลีบดอกมีสีเหลือง ใน Arabidopsis ทำให้เปลือกเมล็ดมีการเปลี่ยนสี (Forkmann and Heller, 1999) และยังพบว่าผิวมะเขือเทศมีการสร้าง naringenin chalcone ที่มีสีเหลือง (Muir *et al.*, 2001)

เอนไซม์ CHI มี 2 ชนิด คือ isomerizes 6'-hydroxyl เป็น 6'-deoxy chalcone และ เปลี่ยน 6'-hydroxy chalcone ไปเป็น flavonone

3. เอนไซม์ Flavonoid hydroxylase (F3H/F3'H/F3'5'H) เป็นเอนไซม์ กลุ่ม 2-oxoglutarate dependent dioxygenase มีการเติมหมู่ hydroxyl ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของ flavonone ทำให้เปลี่ยนเป็น dihydroflavonone ซึ่งได้มีการทดลองในพืชหลายชนิด ได้แก่ petunia snapdragon tomato และ maize (Britsch *et al.*, 1993) โดยมีการทำให้เกิด mutation ของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ F3H มีผลทำให้เอนไซม์ F3H ไม่ทำงาน ซึ่งพบว่าเป็นสาเหตุให้ทั้ง petunia และ Antirrhinum ไม่มีการสร้างแอนโทไซยานิน ทำให้กลีบดอกสีขาว (Martin *et al.*, 1991 ; Britsch *et al.*, 1992)

4. เอนไซม์ Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) กระตุ้นการเกิดรีดิวซ์ dihydroflavonol ทำให้ได้สารกลุ่ม leucoanthocyanidin (flavan-3,4-diol) โดยใช้ NADH เป็นโคแฟกเตอร์ (Kristensen and Rohde, 1991) สาร leucoanthocyanidin นี้ จะเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ anthocyanin และนอกจากนี้ยังเป็นสารตั้งต้นในการผลิต catechins และ PA ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

5. เอนไซม์ anthocyanidin synthase (ANS) เร่งปฏิกิริยาสารกลุ่ม leucoanthocyanidin ไปเป็นสาร anthocyanidin ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ 2-oxoglutarate dependent dioxygenase และมีลักษณะคล้ายกับเอนไซม์ F3H และ FLH (Martin *et al.*, 1991 ; Tanaka *et al.*, 1998) ได้มีการศึกษายีน ANS พบว่า ในพืชหลายชนิด ได้แก่ Arabidopsis, Antirrhinum, petunia, *Vitis vinifera* และ maize พบว่าเมื่อเอนไซม์

ANS ถูกทำให้เกิด mutation ก็จะมีผลต่อการแสดงออกของยีน ANS ในพืชเหล่านี้ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์ anthocyanin ต่อไป

6. เอนไซม์ Flavonoid 3-O-glucosyltransferase (3GT) ในธรรมชาติ Flavonoid และ anthocyanin จะไม่มีหมู่ hydroxyl ที่ heterocyclic ring ตำแหน่งที่ 3 (Forlman and Heller , 1999) ดังนั้นเอนไซม์ UDP-glucose flavonoid 3-O –glucosyltransferase จะทำการย้ายกลูโคสจาก UDP-glucose ไปยังหมู่ hydroxyl เพื่อทำให้มีความสามารถละลายน้ำได้ในแวคิวโอล

ดังนั้นเอนไซม์ 3GT จึงถือเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ anthocyanin จากการทำให้เกิด mutation ของยีน 3GT พบว่าการทำงานของเอนไซม์ DFR และเอนไซม์ ANS ลดลง และการทำงานของเอนไซม์ 3GT ก็ลดลงเช่นกันแสดงว่า ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ anthocyanin ในขั้นตอนสุดท้ายมีกลไกการควบคุมร่วมกัน (Hrazdina and Wagner, 1985; Hrazdina and Jensen; 1992)

การเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ hydroxyl ที่ B-ring ทำให้ได้สารสี anthocyanin 3 ชนิดที่แตกต่างกันทางด้านลักษณะของสี ได้แก่

- Pelargonidin 3-glucoside ทำให้เกิดเป็นสีส้ม , ชมพู หรือ แดง
- Cyaniding 3-glucoside ทำให้เกิดสีแดง หรือ แดงเข้ม
- Delphinidin 3-glucoside ทำให้เกิดสีน้ำเงิน หรือ ม่วง (Zucker *et al.*, 2002)

การควบคุมรูปแบบของการเกิดสี

พืชจะมีรูปแบบการเกิดสีซึ่งเกิดจากการสะสมของ anthocyanins ที่เซลล์จำเพาะ การควบคุมชีวสังเคราะห์ anthocyanins จะควบคุมที่ระดับการถอดรหัสยีนเป็นส่วนใหญ่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ anthocyanins แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มของยีนโครงสร้างซึ่งทำให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาชีวเคมี การสร้างสาร anthocyanins และกลุ่มของยีนควบคุม จะให้โปรตีนซึ่งกำหนดการแสดงออกของยีนโครงสร้างและรูปแบบของการสะสมเม็ดสี โดยการแสดงออกของยีนควบคุม จะมีรูปแบบที่จำเพาะต่อรูปแบบของการเกิดสี (Holton T.A. และ Cornish E.C. 1995) ถึงแม้ว่าในพืชหลายชนิดจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรม แต่ก็พบว่ายีนโครงสร้าง และยีนควบคุมซึ่งทำหน้าที่เดียวกัน ในชีวสังเคราะห์

anthocyanins นั้น จะมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ร่วมกัน และยีนเหล่านี้ยังถูกระงับการแสดงออกด้วยแสง การศึกษาถึงการควบคุมชีวสังเคราะห์ anthocyanins โดยเฉพาะเทคนิคการกลายพันธุ์นั้น พบว่าการควบคุมชีวสังเคราะห์ นี้ส่วนใหญ่เกิดจากการทำงานร่วมกันของยีนควบคุม ในการกำหนดรูปแบบการแสดงออกของยีนโครงสร้าง

มีการจำแนก ยีนควบคุมชีวสังเคราะห์ anthocyanins ในพืชหลายชนิด เช่นในข้าวโพดพบว่ามียีนควบคุม 2 กลุ่ม คือ *r* และ *cl* ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในเนื้อเยื่อต่างๆ สมาชิกของยีนในกลุ่ม *r* (*r*, *lc*, *sn*, *b*) จะถอดและแปลรหัสให้โปรตีนซึ่งมีกรดอะมิโนที่เป็นกรดที่ปลาย N จำนวนมาก และที่ปลาย C มีส่วนของ basic helix-loop-helix (bHLH) ทำหน้าที่จับกับ DNA (DNA binding domain) ในขณะที่สมาชิกของกลุ่ม *cl* (*cl* และ *pl*) จะถอดและแปลรหัสให้โปรตีนซึ่งมีโดเมน MYB ที่มีส่วนของ helix-turn-helix สำหรับจับกับ DNA ในข้าวโพดจะมีสองกลุ่มนี้หลายยีน แต่มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกันไป (Ludwig and Wessler 1990), (Cone *et al.*, 1993) กลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนในชีวสังเคราะห์นี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานการทำงานของยีนควบคุมในการควบคุมการแสดงออกที่เหนือโปรโมเตอร์ของ DFR (Grotewold *et al.*, 1994), (Sainz *et al.*, 1997)

2. วัสดุและอุปกรณ์

2.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการวิจัย

- ข้าวหอมมะลิ 105 สายพันธุ์ปกติ
- ข้าวหอมมะลิ 105 พันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS
- ยาสูบ (Tobacco)
- พืชเนย

2.2 สารเคมี

1. Liquid nitrogen
2. TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen)
3. RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit (Ferment, U.S.A.)
4. QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc.)
5. Inst/Aclone[™] PCR Product Cloning Kit (Fermentus, U.S.A)
6. Sodium chloride (NaCl)
7. Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)
8. Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)
9. Chloroform
10. Isopropanal
11. Ethyl alcohol (EtOH)
12. RNaseONE[™] ribonuclease (Promega, U.S.A.)

13. PCR buffer (Fermentas, U.S.A.)
14. Magnesium chloride (MgCl_2) (Invitrogen ,BRAZIL)
15. Deoxyribonucleotide triphosphate mix (dNTPs) (Fermentas, U.S.A.)
16. Primers (Primer ; Operon Technology, Alamada, U.S.A.)
17. Platinum[®] *Taq* DNA polymerase (Invitrogen ,BRAZIL)
18. GeneRuler[™] 100bp DNA Ladder (Fermentas, U.S.A.)
19. Ampicilin
20. Glycerol oil
21. pJET[™] Vector (Fermentas, U.S.A)
22. T4 DNA Ligase (Sigma, U.S.A.)
23. Ligase Buffer (Promega, U.S.A)
24. Deionize H_2O (dH_2O)
25. Hydrochloric acid (HCl)
26. Sodium hydroxide (NaOH)
27. Sodium dodecyl sulfata (SDS)
28. Potassium acetate
29. Bromophenol blue
30. Xylene cyanol FF
31. Sucrose
32. Boric acid
33. Tris base
34. Ethidium bromide
35. Agarose
36. Agar
37. Tryptone
38. Yeast extract

39. Dideoxyribonucleotide triphosphate (d/ddNTPs) (Promega, U.S.A.)
40. Ultrapure water
41. DNA sequencing Taq DNA polymerase (Promega, U.S.A.)
42. DNA Sequencing Stop Solution (Promega, U.S.A.)
43. Acrylamide
44. N,N'-methylene-bisacrylamide (Bis)
45. Urea
46. 3-(Trimethoxysilyl),propylmethacrylate (Bind Silane) (sigma, U.S.A.)
47. Clear view (Dietham Trading Co.,Ltd, Thailand)
48. Ammonium persulphate (APS)
49. N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine(TEMED)(BIO-RAD, U.S.A)
50. Glacial acetic acid
51. Silver nitrate (AgNO_3)
52. 37% Formaldehyde (HCOH)
53. Sodium carbonate (Na_2CO_3)
54. Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)
55. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal)
56. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)
N,N' –dimethyl-formamide

2.3 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. เครื่องฆ่าเชื้อหรือตะเกียงแอลกอฮอล์
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ที่ 37 องศาเซลเซียส (Mettler, Germany)
3. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
4. Adjustable automatic pipette และ white,yellow และ blue tip

5. Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ,Multi Ultra PCR tube
(SorensonTM Bioscience, Inc., U.S.A.) และ centrifuge tube
6. เครื่อง DNA Thermal Cycler (ThermoHybaid PCR Sprint, UK)
7. ชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซิสชนิดแนวนอน (BIO-RAD, U.S.A.)
8. ชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซิสชนิดแนวตั้ง (Sequi-Gen[®] GT, Sequencing cell ; (BIO-RAD, U.S.A.)
9. เครื่องจ่ายกระแสไฟ (power supply ; (BIO-RAD, U.S.A.)
10. เครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอโดยแสง UV (UV transilluminator, BIO-RAD, U.S.A.)
11. เครื่องวัดค่าการดูดแสง (Spectrophotometer)
12. เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)
13. เครื่องเขย่า (shaker)
14. เครื่องอบเครื่องแก้ว (hot air oven)
15. เครื่องทำความเย็น (freezer) ได้แก่ 4 °C, -20 °C และ -80 °C
16. เครื่องปรับอุณหภูมิด้วยน้ำ (water bath)
17. เครื่อง electroporater
18. คิวเวต (cuvette)
19. เครื่องผสม (vortex)
20. เครื่องชั่งแบบละเอียด (analytical balance)
21. เตาไมโครเวฟ (microwave)
22. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

23. ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank)
24. ชุดโม่บดตัวอย่าง (mortar and pestle)
25. เครื่องแก้วต่าง ๆ ได้แก่ บีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ (beakers) ขวดรูปชมพู่ (flasks) กระบอกตวง (cylinder) ปิเปต (pipettes) แท่งแก้วคนสาร (stirrer) เพลท (plate) spreader ฯลฯ
26. วัสดุอื่น ๆ ได้แก่ ซ้อนดักสาร กระดาษขังสาร กระดาษติดฉลาก กระดาษเทปใส กระดาษทิชชู กระดาษเช็ดกระจก (Kimwipe[®] tissue) ฟลอยด์อะลูมิเนียม ถังพลาสติกไนลอนร้อน กระดาษพาราฟิล์ม ปากกิบ ถังมือ กล่องโฟม มีดคัตเตอร์ กรรไกร ถาดพลาสติกกันดื่น ฯลฯ
27. กล้องจุลทรรศน์

3. วิธีการทดลอง

การโคลนยีน MYC transcription factors จากข้าวหอมมะลิพันธุ์กล้วย BKOS

1.การเตรียม Total RNA จากใบข้าวหอมมะลิโดยวิธีของ Van Derstaeten et al., 1977

- นำตัวอย่างใบข้าวที่บดละเอียด 50-100 มิลลิกรัม ใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี RNA extraction buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และนำไปผสม (vortex) ให้เข้ากัน
- เติม phenol chloroform (1:1 , v/v) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับขึ้นมาให้เข้ากันประมาณ 10 ครั้ง จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
- นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และดูดเอาเฉพาะส่วนใสด้านบน (supernatant) ใส่หลอดใหม่
- เติม phenol chloroform (1:1 , v/v) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับขึ้นมาให้เข้ากันประมาณ 10 ครั้ง จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
- นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และดูดเอาเฉพาะส่วนใสด้านบน (supernatant) ใส่หลอดใหม่
- เติม chloroform ปริมาตร 400 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับขึ้นมาให้เข้ากันประมาณ 10 ครั้ง จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
- นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และดูดเอาเฉพาะส่วนใสด้านบน (supernatant) ใส่หลอดใหม่
- เติม Ethanol ปริมาตร 1188 ไมโครลิตร (ภาคผนวก) แล้วเติม 0.3 M NaOAc (ภาคผนวก) ปริมาตร 62.5 ไมโครลิตร (ภาคผนวก) พลิกหลอดกลับขึ้นมาให้เข้ากันประมาณ 10 ครั้งและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

- นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเทสารละลายทิ้ง ให้เหลือเพียงตะกอนอาร์เอ็นเอก้อนหลอดเท่านั้น
- เติมน้ำกลั่น (ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นเวลา 40 นาที) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร (ภาคผนวก) พลิกหลอดกลับไปมาให้เข้ากันประมาณ 10 ครั้ง จากนั้นเติม 8 M LiCl และนำไปแช่ไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเทสารละลายทิ้ง ให้เหลือเพียงตะกอน RNA ก้อนหลอดเท่านั้น
- เติม 70 เปอร์เซ็นต์ EtOH ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
- นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และเทส่วนใสด้านบน (supernatant) ทิ้ง ให้เหลือเพียงตะกอน RNA ก้อนหลอดเท่านั้น
- นำตะกอนอาร์เอ็นเอมาทำให้แห้งโดยวิธี air dry ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอในน้ำที่ปราศจาก RNase (Rnase-free water) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
- ตรวจสอบอาร์เอ็นเอทั้งหมดด้วยวิธี Agarose Gel electrophoresis

2. การสังเคราะห์ First Strand cDNA (RevertAid™ First Strand cDNA Kit, Fermentas, U.S.A)

เตรียมสารละลายปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยอาร์เอ็นเอทั้งหมด 0.1-5 ไมโครกรัม , oligo (dT)₁₈ primer 0.5 ไมโครกรัม และ deionized water ให้ครบ 12 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแช่บนน้ำแข็งแล้วเติม 1x reaction buffer, RiboLock™ Ribonuclease Inhibiter (20 Unit/reaction) , 10 mM dNTPs Mix , RevertAid™ M-MuLVReverse Transcriptase (200 Unit/reaction) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเก็บ First Strand cDNA ที่ -20 องศาเซลเซียส

ทำการตรวจสอบคุณภาพของ First Strand cDNA ที่เตรียมได้ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Actin จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบด้วย Agarose Gel electrophoresis

3. การโคลน Transcription Factor genes MYC ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกไทโชนินจากข้าวหอมมะลิพันธุ์กลาย BKOS

3.1 การออกแบบไพรเมอร์

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนยีน MYC ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกไทโชนิน โดยออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ (Conserve Domain) ของยีน MYC ของพืชชนิดต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ ข้าว (R-type basic helix-loop-helix protein [Plw-OSB2]), ข้าวโพด (Regulatory protein [B-Peru], SN protein, Anthocyanin regulatory R-S protein [R-S], Anthocyanin regulatory LC protein [lc1]) โดยออกแบบในลักษณะ Degenerated primers ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยา PCR แล้ว คาดว่าจะได้ชิ้นส่วนของยีน MYC ที่มีขนาดประมาณ 351 คู่เบส โดยลำดับเบสของ Primers แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการแยก MYC transcription factor gene จากข้าวพันธุ์กลาย BKOS ด้วยเทคนิค RT-PCR

รายชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'→3'
degenerate primer (forward primer)	5' – GGNGCCGYCTTNCTGCRGCTG– 3'
degenerate primer (reward primer)	5' – RTYTACTWCTTCTNCAGACGA– 3'

3.2 การทำปฏิกิริยา RT-PCR

องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

เตรียมสารละลายปริมาตร 20 µl ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งมีส่วนประกอบ ดังนี้

- | | |
|--|------------------|
| - 10x buffer | 2.0 µl of 10X |
| - MgCl ₂ | 1.2 µl of 25 mM |
| - First strand cDNA (DNA Template) | 50 ng |
| - primer (Primer ; Operon Technology, Alamada, U.S.A.) | |
| - MYC forward | 0.5µl of 20 pMol |
| - MYC reward | 0.5µl of 20 pMol |
| - 10 mM dNTP | 2.5 µl of 10 mM |
| - <i>PfxTaq</i> DNA polymerase (Invitrogen) | 2 unit |
| - dH ₂ O | ได้ปริมาตร 20 µl |

เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR (PCR condition) ในเทคนิค RT-PCR

ตารางที่ 2 แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR เพื่อแยกดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส

อุณหภูมิ	94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C	4 °C
ระยะเวลา	2 min	30 sec	30 sec	1 min	5 min	forever
จำนวนรอบ	————— 35 รอบ —————					

3.3 การวิเคราะห์โดย Agarose electrophoresis

- เตรียม agarose ความเข้มข้น 1.4 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง agarose ผสมลงใน 1 x TBE buffer (ภาคนวนก) แล้วนำไปต้มจน agarose ละลายตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
- ทำความสะอาดถาดเจล และหัวเสียบ (comb) ให้สะอาดด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol แล้วนำถาดเจลไปประกอบเข้ากับบล็อก
- วางหัวเสียบลงที่ปลายด้านหนึ่งของถาดเจล เพื่อให้เกิดช่องเล็กๆ สำหรับหยอดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ
- เท agarose ลงในถาดเจลที่เตรียมไว้โดยให้แผ่น agarose มีความหนาประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว
- เททับผิวหน้าของเจลด้วย 1 x TBE buffer เพื่อไม่ให้เจลแห้ง และสะดวกต่อการดึงหัวเสียบออก
- นำถาด agarose gel ออกจากบล็อกแล้ววางถาดลงในอ่าง electrophoresis โดยให้ด้านที่หัวเสียบอยู่ทางซ้าย
- เท 1 x TBE buffer ลงในอ่างให้ท่วมแผ่น agarose gel โดยให้ระดับ 1 x TBE buffer อยู่เหนือผิวเจลประมาณ 1-3 มิลลิเมตร
- ผสม 1 x loading buffer (ภาคนวนก) กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ และดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ให้เข้ากัน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย แล้วค่อยๆ หยอดลงในช่องของ agarose gel
- ปิดฝาอ่าง electrophoresis แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปยังขั้วบวก ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 50 นาที หรือเมื่อแถบสีล่างของ loading buffer เคลื่อนที่ไปอยู่อีกปลายด้านหนึ่งของเจลโดยห่างจากด้านล่างถาดประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วจึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- ย้อมดีเอ็นเอโดยนำแผ่น agarose gel ไปแช่ใน EtBr นาน 10 นาที จากนั้นย้ายไปแช่น้ำอีก 5 นาที เพื่อล้าง EtBr ส่วนเกิน
- นำแผ่น agarose gel ไปตรวจดูแบนดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator พร้อมกับบันทึกภาพไว้
- ตัดแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการโดยดูขนาดเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน เก็บไว้ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาแยกเอาดีเอ็นเอออก (elute)

3.4 การ clone ชิ้นส่วน MYC transcription factor gene (Inst/Aclone™ PCR Product Cloning Kit, Fermentus, U.S.A)

3.4.1 องค์ประกอบในปฏิกิริยาการเชื่อม (ligation)

เตรียมสารละลายปริมาตร 30 ไมโครลิตร ประกอบด้วย plasmid vector pTZ57/T™ (ภาคผนวก) 0.165 ไมโครกรัม, purified PCR fragment 0.54 พิโคโมล, 1x ligation, PEG 4000 solution, T4 DNA ligase 5 Unit และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย deionized water จากนั้นบ่มที่ 22 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง

3.4.2 Transformation โดยใช้ The TransformAid™ Bacterial Transformation System

- เตรียม *E.coli* สายพันธุ์ DH5-α โดยเลี้ยงเซลล์ใน TransformAid™ C-Medium ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง
- เติมน้ำเกลือเบคทีเรียที่เลี้ยง 12 ชั่วโมง ปริมาตร 1/10 ของ TransformAid™ C-Medium จากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- บ่ม LB-Ampicillin/X-gal agar plate ที่ 37 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 20 นาที
- เตรียม TransformAid™ T-Solution โดยการผสม T-solution (A) กับ T-solution (B) ในปริมาตร 1:1 จากนั้นเก็บ TransformAid™ T-Solution ไว้บนน้ำแข็ง
- เก็บเซลล์เบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ 20 นาที โดยใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไป centrifuge ที่ความเร็วสูงสุด 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
- ทิ้งส่วนใสและ resuspend ตะกอนเซลล์ด้วย TransformAid™ T-Solution ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นวางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที
- centrifuge เซลล์อีกครั้งที่ความเร็วสูงสุด 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใส
- resuspend ตะกอนเซลล์ด้วย TransformAid™ T-Solution ปริมาตร 120 ไมโครลิตร จากนั้นวางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที
- เตรียม ligation mixture โดยแบ่งใส่ eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หยอดละ 15 ไมโครลิตร และวางบนน้ำแข็งนาน 2 นาที
- เติมน้ำเกลือที่แขวนลอยปริมาตร 60 ไมโครลิตร ในแต่ละหลอดของ ligation mixture จากนั้นวางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที

- Spread Plate เซลล์บน LB-Ampicillin/x-gal agar plate ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นบ่มเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง

3.5 การตรวจสอบแบคทีเรียที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA)

3.5.1 การแยกพลาสมิดโดยวิธี Alkaline (Maniatis et., al 1982)

- เลือกโคโลนีสีขาวจาก LB-Ampicillin/x-gal agar plate โดยเลี้ยงใน LB- Ampicillin both ที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่านาน 12 ชั่วโมง
- นำเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในไมโครทิว ปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่มีส่วนใส่เก็บเฉพาะตะกอนเซลล์
- นำตะกอนเซลล์มาเติม solution I (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร vortex ให้เข้ากัน จากนั้นเติม solution II (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และกลับหลอดไปมาเบา ๆ 4 ครั้ง และเติม solution III (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ จะเห็นตะกอนสีขาว ๆ เกิดขึ้น แช่ต่อในน้ำแข็งอีก 10 นาที
- นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกตะกอนทิ้ง เก็บส่วนใสมาเติมด้วย absolute ethanol ที่เย็น ปริมาตร 2 เท่าของน้ำใส
- ผสมให้เข้ากันนำไปแช่ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และแยกเอาตะกอน พลาสมิดมาละลายด้วย 0.05 โมล Tris, 0.1 โมล NaOAc (pH 8)
- เติม absolute ethanol ที่เย็น 2 เท่าของปริมาตรน้ำใส เขย่าให้เข้ากันนำไปไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
- ที่ส่วนใส และนำตะกอนพลาสมิดล้างด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
- นำตะกอนพลาสมิดมาทำให้แห้งโดยวิธี air dry แล้วละลายด้วย TE ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
- ตรวจสอบพลาสมิดโดยการทำ agarose gel electrophoresis
- ตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดด้วยเทคนิค PCR

3.6. หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) ของชิ้นส่วนMYC transcription factor gene ที่แยกได้

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แยกได้เบื้องต้น โดยทำการส่งไปหา
ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd (604911-x) No. 23 Jalan
U1/19, HICOM Glenmarie Industrial Park 40150 Shah Alam, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

4.การโคลนชิ้นส่วน WD-40 transcription factor gene โดยเทคนิค cDNA Fingerprint

4.1 เตรียม Total RNA จากใบอ่อนของข้าวหอมมะลิ 105 และ ข้าวหอมมะลิพันธุ์กลายสายพันธุ์
BKOS และเปลี่ยนเป็น 1st cDNA ตามวิธีการในข้อ 1 และ 2

4.2 ทำปฏิกิริยาPCR โดยใช้ primers แบบสุ่มขนาด 10 คู่เบสจากบริษัท Operon โดยใช้ DNA
template จากข้อ 4.1 โดยทำการเปรียบเทียบลายพิมพ์ DNA ระหว่างข้าวพันธุ์ปกติและข้าวพันธุ์กลาย

4.3 คัดเลือกแถบ DNA ที่แตกต่างกันระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ และทำการโคลนเพื่อวิเคราะห์
ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อ

5. การโคลน Full length ของ MYC และ WD40 transcription factor gene โดยเทคนิค 5'RACE และ 3'RACE (Takara)

5.1 เตรียม Total RNA และ 1st cDNA จากใบข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS ตามวิธีการในข้อ 1
และ 2

5.2 ออกแบบ Primers ที่ใช้ในการทำโคลนชิ้นส่วนของยีน MYC และ WD40 ทั้งด้านปลาย 5' และ
3' ตามวิธีการจากบริษัท Takara (ภาคผนวก) โดยใช้ลำดับเบสที่ได้จากชิ้นส่วนของยีน MYC ที่โคลนได้

5.3 ทำ 1st Amplification และ 2nd Amplification ด้วยปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการจากบริษัท Takara

5.4 ตรวจสอบผลด้วย Agarose gel electrophoresis

5.5 ทำการแยกชิ้นส่วนของยีน MYC ออกจาก Agarose gel และโคลนชิ้นส่วนดังกล่าวเข้าพลาสมิด
pTZ57R/T (Fermentas) เพื่อทำการหาลำดับเบสต่อไป

5.6 วิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank เพื่อยืนยันความถูกต้อง

6. การสร้างพลาสมิดเพื่อตรวจสอบหน้าที่ของยีน MYC และ WD-40 Transcription factor

เพื่อศึกษาหน้าที่ของ MYC gene ที่โคลนได้ ผู้วิจัยได้ทำการโคลนชิ้นส่วนของ MYC gene เข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pSTART ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Binary vector โดยยีนหรือชิ้นส่วนของยีนที่โคลนเข้าสู่พลาสมิดนี้จะถูกควบคุมการแสดงออกในระดับการ Transcription ด้วย 35S promoter ที่ถูกดัดแปลงให้สามารถกระตุ้นการ Transcription ได้ดีกว่าปกติ โดยในการทดลองนี้ได้ทำการโคลนชิ้นส่วนของ MYC gene ในทิศทาง Antisense (pSTART-antiMYC), Sense (pSTART-MYC) และ โคลนร่วมกับ WD40 (pSTART-MYC-WD40)

7.การส่งถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว พืชเนย และยาสูบ ด้วยเทคนิค Agrobacterium Transformation

ข้าว

1. ทำการชักนำข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS ให้เกิดเป็นแคลลัสโดยทำการเพาะเลี้ยงข้าวในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารแข็งสูตร LS ดัดแปลง ที่มี 2,4-D 2 mg/l เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส โดยเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวันและอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน
2. นำเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pSTART-antiMYC โดยทำการเลี้ยงในอาหารเหลว LB-medium ที่มี 50 mg/l Rifampicin + 100 mg/l Kanamycin เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. ละลายเซลล์ของ *Agrobacterium* ในอาหารสูตร MS ปริมาตร 20 ml แล้วนำไปเขย่าที่ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3- 5 ชั่วโมง นำสารละลายเซลล์มาวัดค่า OD โดยให้ได้ค่าประมาณ 0.1 – 0.2
4. นำแคลลัสของข้าวมาทำให้เกิดบาดแผล จากนั้นนำมาแช่ในสารละลายเซลล์ โดยเขย่าที่ 100 rpm ที่อุณหภูมิห้อง
5. นำชิ้นส่วนแคลลัสมาจับด้วยกระดาษกรองฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 2-3 นาที นำชิ้นส่วนแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหาร LS + AS (Coculture medium) เป็นเวลา 2 วันในที่มืด
6. นำชิ้นส่วนที่เลี้ยงไว้มาล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 50 ml + 500 mg/l Cefotaxime 3-5 ครั้ง นาน 30 นาที เพื่อกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ส่วนเกิน

- นำชิ้นส่วนพืชมาซบด้วยกระดาษทิชชูมาเชื้อ จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร LS + 500 mg/l Cefotexime + 50 mg/l Kanamycin (Selective medium) ที่มีฮอร์โมน BAP (0.5 mg/l) + IAA (0.2 mg/l) เพื่อชักนำให้เกิดต้น

พิทูเนีย

- นำเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มีพลาสมิดที่ต้องการส่งถ่าย โดยทำการเลี้ยงในอาหารเหลว LB-medium ที่มี 50 mg/l Rifampicin + 100 mg/l Kanamycin เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- นำเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* 1 ml มาเลี้ยงในอาหาร LB medium 20 ml ที่มี 50 mg/l Rifampicin + 100 mg/l Kanamycin + AS เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- ละลายเซลล์ของ *Agrobacterium* ในอาหารสูตร MS ปริมาตร 20 ml แล้วนำไปเขย่าที่ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3- 5 ชั่วโมง นำสารละลายเซลล์มาวัดค่า OD โดยให้ได้ค่าประมาณ 0.1 – 0.2
- นำชิ้นส่วนใบของต้นพิทูเนีย มาทำให้เกิดบาดแผลโดยการใช้มีดตัดเนื้อเยื่อให้เป็นสี่เหลี่ยม หลังจากนั้นนำมาแช่ในสารละลายเซลล์ โดยเขย่าที่ 100 rpm ที่อุณหภูมิห้อง
- นำชิ้นส่วนพืชมาซบด้วยกระดาษกรองมาเชื้อแล้วเป็นเวลา 2-3 นาที นำชิ้นส่วนพืชมาเลี้ยงบนอาหาร MS + AS (Coculture medium) เป็นเวลา 2 วันในที่มืด
- นำชิ้นส่วนที่เลี้ยงไว้มาล้างด้วยน้ำกลั่นมาเชื้อ 50 ml + 500 mg/l Cefotexime 3-5 ครั้ง นาน 30 นาที เพื่อกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ส่วนเกิน
- นำชิ้นส่วนพืชมาซบด้วยกระดาษทิชชูมาเชื้อ จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS + 500 mg/l Cefotexime + 50 mg/l Kanamycin (Selective medium) ที่มีฮอร์โมน BAP + NAA เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและชักนำให้เกิดยอด เป็นเวลา 3 สัปดาห์และ Sub-culture ทุกๆสัปดาห์
- หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดราก (MS + 500 mg/l Cefotexime + 50 mg/l Kanamycin) ที่มีฮอร์โมน NAA (root medium)

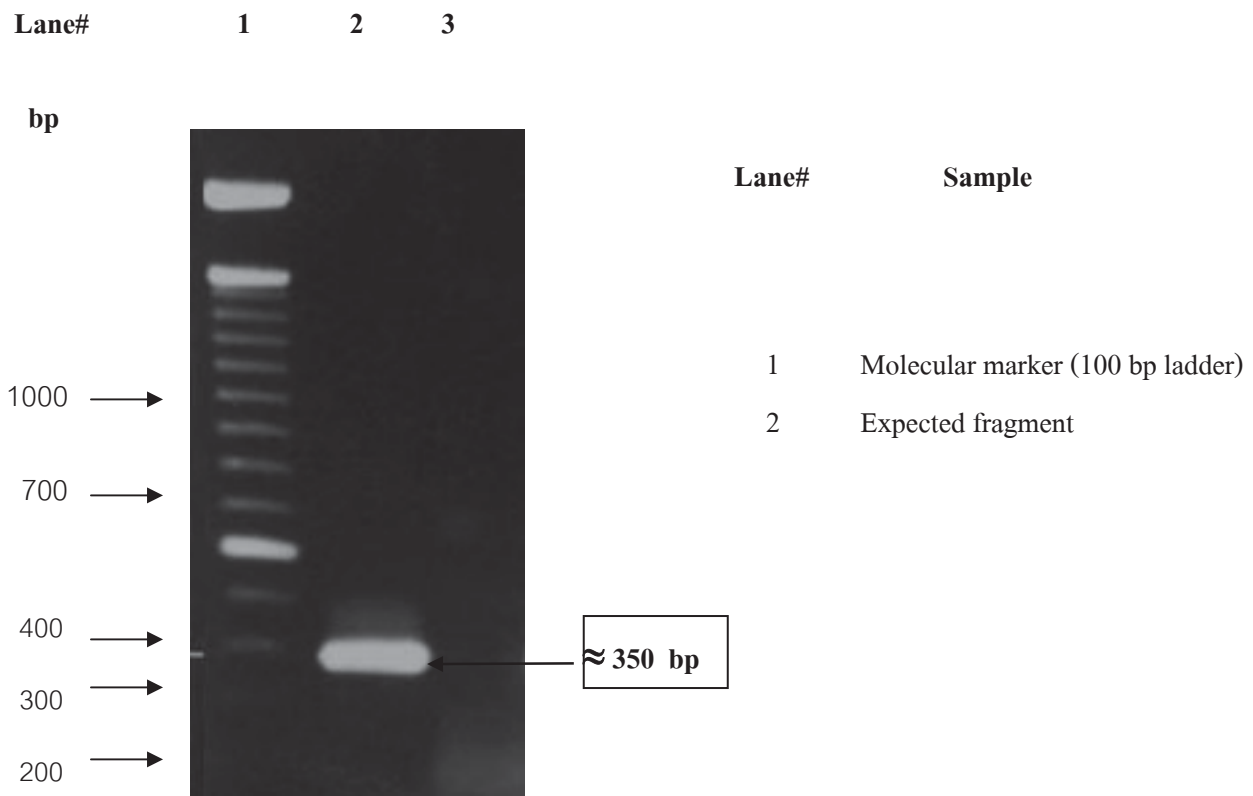
ยาสูบ

1. เตรียมเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มีพลาสมิดที่ต้องการส่งถ่าย โดยทำการเลี้ยงในอาหารเหลว LB-medium เลี้ยงเชื้อจนสารละลายของเชื้อสามารถวัดค่า OD ประมาณ 0.5 – 1.0
2. นำชิ้นส่วนใบของยาสูบที่ทำให้เกิดบาดแผลแล้วแช่ในสารละลายเซลล์โดยเขย่าที่ 100 rpm ที่อุณหภูมิห้อง
3. นำชิ้นส่วนพืชมาจับด้วยกระดาษทิชชูมาเชื้อ แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหาร MS+AS (Coculture medium) เป็นเวลา 3 วันในที่มืด
4. นำชิ้นส่วนที่เลี้ยงไว้มาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 ml 4 ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 50 ml + 500 mg/l Cefotaxime 5 นาที เพื่อกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ส่วนเกินออก
5. นำชิ้นส่วนพืชมาจับด้วยกระดาษทิชชูมาเชื้อ แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS + 50 mg/l Kanamycin + 500 mg/l Cefotaxime (Selective Medium) ที่มีฮอร์โมน BAP + NAA เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและชักนำให้เกิดยอดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดย Subculture ทุกๆสัปดาห์
6. หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารที่ชักนำให้เกิดราก (50 mg/l Kanamycin + 500 mg/l Cefotaxime) ที่มีฮอร์โมน NAA (root medium)

4. ผลการทดลอง

1. ผลการโคลน Transcription factor gene MYC (bHLH) ด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการโคลนชิ้นส่วนของ MYC transcription factor gene จากข้าวพันธุกรรมกลายสายพันธุ์ BKOS ด้วยปฏิกิริยา PCR ที่กำหนดไว้พบว่าสามารถแยกชิ้นส่วนของ DNA ขนาดประมาณ 350 คู่เบส



ภาพที่ 3 แสดงการแยก transcription factor gene MYC (bHLH) จากข้าวพันธุ์กล้วยสายพันธุ์ BKOS ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ Degenerate primers

จาก ภาพที่ 3 แสดงให้เห็นว่าการแยก transcription factor gene MYC (bHLH) ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ degenerate primers ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบโดยมีขนาดประมาณ 350 คู่เบส จากนั้นได้ทำการโคลนชิ้นส่วน DNA ดังกล่าวเข้าสู่พลาสมิด pTZ57R/T เพื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดังกล่าว ซึ่งผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงดังภาพที่ 4

```

AGGAGCATCAGTTGGAGTTACACCATCTTTTGGTCCACTTCAACCAGTCTCCCGGGAGTTCT
GACTTGGAACGATGGATTCTACAACGGCGAGGTAAGACGAGGAAGATATCCAACCTTAGAG
GACCTCACCGCTGACCAGCTCGTCCTGCGGAGAAGCGAGCAACTGAGCGAGCTCTACTACT
CTCTCCTGTCCGGCGAGTGCGACCACCGGGCAAGGAAGCCCGTCGCCGCACTGTGCGCCGG

```

AAGATATCGCGGACACAGAATGGTACTACGTTGTCTGCATGACCTACGCCTTTTCGACCCGG
CCAAGGGTTACCCGGCAGAAGCTATGCAAGCAATCGATCTGTTTGGTTGTGCAATGCTCAGT
CTGCAGATAGCAAAACCTTTCTACGTGCGCTC

ภาพที่ 4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative transcription factor gene MYC ขนาด 351 คู่เบส ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS

RSISWSYTIWFSTSTSLPGVLTWNDGFYNGEVKTRKISNLEDLTADQLVLRSEQLSELYYSLLS
GECDHRARKPVAALSPEDIADTEWYYVVCMTYAFRPGQGLPGRSYASNRSVWLCNAQSADSK
TFLRAL

ภาพที่ 5 แสดงลำดับกรดอะมิโนขนาด 117 อะมิโนที่แปลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative transcription factor gene MYC จากข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS

ผลจากการทำ DNA Sequencing สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ 351 นิวคลีโอไทด์ และเมื่อแปลลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นกรดอะมิโนได้ 117 อะมิโน (ภาพที่ 5) ทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม BLAST SEARCH พบว่า ลำดับกรดอะมิโนจาก reading frame ที่ 1 ซึ่งอ่านจากปลาย 5' ไปด้าน 3' ของ Putative transcription factor gene MYC (bHLH) ที่แยกจากข้าว BKOS มีความคล้ายกับ transcription factor gene MYC (bHLH) จากข้าว (R-type basic helix-loop-helix protein [Plw-OSB2]) มากที่สุด (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงระดับความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน ของ Putative transcription factor gene MYC (bHLH) ที่แยกจากข้าวกลายพันธุ์ BKOS ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับ transcription factor gene MYC (bHLH) จากพืชสปีชีส์อื่น ๆ

Plant species	Common name	Gene	Amino acid identity (%)	GenBank accession number
<i>Oryza sativa</i>	Rice	R-type basic helix-loop-helix protein	90	Q948Y2
<i>Hordeum vulgare</i>	Barley	Putative bHLH domain protein [bHLH1]	69	E5FCX9
<i>Oryza sativa</i>	Barley	Putative bHLH domain protein [bHLH1]	69	E5FCX9
<i>Sorghum bicolor</i>	Rice	Ra	69	Q40643
<i>Zea mays</i>	Sorghum	B1-2	65	Q6JAH4
	Maize	Regulatory protein [B-Peru]	64	Q41780

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนของ Transcription factor gene MYC ที่โคลนได้ ทำการออกแบบ Primers ตามวิธีการของบริษัท Takara (ภาพผนวก) เพื่อทำการโคลน Full length cDNA ด้วยเทคนิค 5' และ 3' RACE โดยจากการทำปฏิกิริยา PCR สามารถโคลนยีนที่มีขนาด 1,353 คู่เบส และแปลลงเป็นกรดอะมิโนได้ 451 อะมิโน ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Blast n และ ทำ Multiple sequence alignment พบว่ามีความคล้ายกับยีน R-type basic helix-loop-helix (Plw-OSB2) ของข้าวมากที่สุดถึง 92% (ตารางที่ 4) และมีความคล้ายคลึงกับกลุ่มของ Transcription factor gene MYC ในพืชชนิดอื่นๆที่มีรายงานแล้วว่าเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน นอกจากนี้ได้นำลำดับกรดอะมิโนของ Transcription factor gene MYC ของข้าว BKOS มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับ Transcription factor gene MYC ของพืชชนิดต่างๆโดยการสร้าง Dendrogram (ภาพที่ 7) ซึ่งจาก Dendrogram จะเห็นได้ว่า Transcription

factor gene MYC ของข้าวสายพันธุ์ BKOS ได้ถูกจัดรวมกลุ่มกับ MYC gene ที่โคลนได้จากข้าวชนิดอื่นๆ แสดงให้เห็นว่ายีน MYC ที่โคลนได้จากข้าว BKOS มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับข้าว

ตารางที่ 4 แสดงระดับความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน ของ Putative transcription factor gene MYC (bHLH) ที่แยกจากข้าวกลายพันธุ์ BKOS ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับ transcription factor gene MYC (bHLH) จากพืชสปีชีส์อื่น ๆ

Plant species	Gene name	Amino acid Identity (%)	GenBank accession number
<i>Oryza sativa</i>	R-type basic helix-loop-helix protein [Plw-OSB2]	92	Q948Y2
<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica	Putative anthocyanin regulatory Lc protein [Ra]	63	B2KQN4
<i>Zea mays</i>	Regulatory protein [B-Peru]	62	Q41780
<i>Zea mays</i>	SN protein	59	Q41854
<i>Zea mays</i>	Anthocyanin regulatory R-S protein [R-S]	60	P13027
<i>Zea mays</i>	Anthocyanin regulatory LC protein [lc1]	59	Q0GZN8
<i>Sorghum vulgare</i>	B1-1	62	Q6JAH5
<i>Cornus alternifolia</i>	Myc-like anthocyanin regulatory protein	49	Q675M4
<i>Ipomoea quamoclit</i>	Putative anthocyanin regulator [bHLH1]	49	A9YF17
<i>Perilla frutescens</i>	MYC-RP [myc-rp]	49	Q9ZQS4

```

MYC-BKOS
tr|Q948Y2|Q948Y2_ORYSA
tr|Q40643|Q40643_ORYSA
tr|Q6JAH4|Q6JAH4_SORBI
tr|Q41854|Q41854_MAIZE
sp|P13027|ARRS_MAIZE
sp|P13526|ARLC_MAIZE
tr|Q675N0|Q675N0_CORSU
-----MASAPPVQEEALQPGTNHFRSRLAAAVRSISWSYTIWFSTSTSLP
-----MASAPPVQEEALQPGTNHFRSRLAAAVRSISWSYTIWFSTSTSLP
-----MEETPLPSGKNFRSRLAAAAARSINWYIAIFWSISSTRP
---MALSASQVQEELQQAERQLMRNQLAAAAARSINWYIALFWSISSTRP
MALSASRVQQAEELLQRPAPERQLMRSQAAAAARSINWSYALFWSISDTQP
MAVSASRVQQAEELLQRPAPERQLMRSQAAAAARSINWSYALFWSISDTQP
MALSASRVQQAEELLQRPAPERQLMRSQAAAAARSINWSYALFWSISDTQP
-----MASSGEQNVGLLENLKNQLAIAVRSIQWSYIAIFWSISSRQP
: : : : * * . * * . * : : : * * *

```

GVLTWNDGFYNGEVKTRKISNLEDLTADQLVLRRSEQLSELYSLLSGEC
 GVLTWNDGFYNGEVKTRKISNLEDLTADQLVLRRSEQLSELYSLLSGEC
 GVLTWKDGFYNGEIKTRKITSNMLTADQLVLRSEQLRELYDSLLSGEC
 GVLTWTDGFYNGEVKTRKISNSVELTADQLVMQRSEQLRELYEALLSGEC
 GVLTWTDGFYNGEVKTRKISNSVELTSDQLVMQRSDQLRELYEALLSGEG
 GVLTWTDGFYNGEVKTRKISNSVELTSDQLVMQRSDQLRELYEALLSGEG
 GVLTWTDGFYNGEVKTRKISNSVELTSDQLVMQRSDQLRELYEALLSGEG
 GVLEWGDGYNGDIKTRKTVQAVEFNADQLGLQRSEQLKELYESLVGES
 *** *

DH--RARKPVAALSPEDIADTEWYVVCMTYAFRPGQGLPGRSYASNRSV
DH--RARKPVAALSPEDIADTEWYVVCMTYAFRPGQGLPGRSYASNRSV
G--HRARRPVAALLPEDLGDETWYVVCMTYAFGPQGGLPGKSFASNEFV
DR--RAARPVGSLSPEDLGDETWYVVCMTYAFQPQGGLPGRSFGGNEHV
DRAAPARPAGSLSPEDLGDETWYVVSMTYAFRPGQGLPGRSFASDEHV
DRAAPARPAGSLSPEDLGDETWYVVSMTYAFRPGQGLPGRSFASDEHV
DRAAPARPAGSLSPEDLGDETWYVVSMTYAFRPGQGLPGRSFASDEHV
NP--QARKSSAALSPEDLTDEWYVLVMSFVNIGQLPGRTFANGQPI

. . . * * * * . * * * * . * * * * . * * * * . * * * *

WLCNAQSADSKTFLRALLAKSASIQTIVCIPMSG-VLELGTDPVSEDP
WLCNAQSADSKTFLRALLAKSASIQTIVCIPMSG-VLELGTDPVSEDP
WLTNAQSADRKLFHRLAIAKSASIKTIVCVPFIMHGVLELGTDPISED
WLRNAHLADSKAFPRAVLAK-----SIICIPLMG-VLELGTDTVPEDP
WLCNAHLAGSKAFPRALLAKSASIQSILCIPVMGG-VLELGTDTVPEAP
WLCNAHLAGSKAFPRALLAKSASIQSILCIPVMGG-VLELGTDTVPEAP
WLCNAHLAGSKAFPRALLAKSASIQSILCIPVMGG-VLELGTDTVPEAP
WLCNAHYADSKIFSRWLAKSASIQTVVCFFPLGG-VVELGVTELVLED
* * * * *

[illegible]

TEDADTVFDGLIEEDQMVLQGEDELGDVVVAECETNGANPETITMETDE
TEDADTVFDGLIEEDQMVLQGEDELGDVVVAECETNGANPETITMETDE
EDLDHGNAAVEATTTTVPGEHAVAGGEVAECEPNADNDLEQITMDDIGE
-ANEAGEAADIVVFEDQLGHSAMKTTTAAGNEPVSLFNASLDHITDEIDD
EELDHNNGMDDIEAMTAAGGHGQEEELRLRAEALSDASLEHITKEIEE
EELDHN - GMDIEAMTAAGGHGQEEELRLRAEALSDASLEHITKEIEE
EELDHNNGMDDIEAMTAAGGHGQEEELRLRAEALSDASLEHITKEIEE
AALECGEIDMCAPNNNSSGFLPNQRTEKSVMEGLSGGASQVQSWQFMD

FYSLCEELDLDLGSYQLVPTSARET-----
FYSLCEELDLDLGSYQLVPTSARET-----
LYSLCEELDVRPLDDSSSWAVADPWSSFQLVLTSSPAPDQAPAAEATD
FYSLLEEMVVRPLPLEDSLIMVDGS-----NNFEVPSS---PEPPS
FYSLCDEMDLQALPLPLEDGWTVDA-----SNFEVPCSSPQPAPPP
FYSLCDEMDLQALPLPLEDGWTVDA-----SNFEVPCSSPQPAPPP
FYSLCDEMDLQALPLPLEDGWTVDA-----SNFEVPCSSPQPAPPP
EISNCVQNSTNSSEISRTSENPEKDCCLTDLPECNLTSLDLPNYDF
* .

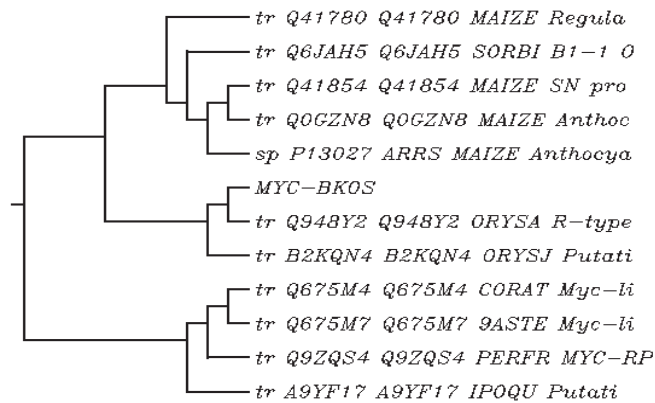
```

---VAAAAAANDVDGVAY-----SHASCFVSWKRAN-----PAEKVVA
---VAAAAAANDVDGVAY-----SHASCFVSWKRAN-----PAEKVVA
VDDVVVAALDGSSIDGSCR-----PSPSSFVAWKRTAD-----SDEVQA
PGATTNNNGADTSSSPADG-----SRATSFMAWTRSSQ----SCSDEAV
VDRATANVAADASRAPVYG-----SRATSFMAWTRSSQSSCSDDAAPA
VDRATANVAADASRAPVYG-----SRATSFMAWTRSSQSSCSDDAAPA
VDRATANVAADASRAPVYG-----SRATSFMAWTRSSQSSCSDDAAPA
HYHSVVSPLLKNSHLILGPYFHKCNKESSFMGWKKTPSG---SQQRRRG

```

MYC-BKOS	VPMTAGIESQKLLKKAVGGGTAWMSNIDDRGSAITTTTPGSNIKSHVMSE
tr Q948Y2 Q948Y2_ORYSA	VPMTAGIESQKLLKKAVGGGTAWMSNIDDRGSAITTTTPGSNIKSHVMSE
tr Q40643 Q40643_ORYSA	VPLISGEPPQKLLKKAVAGAGAWMN--NGDSSAAAMTTQESSIKNHVMSE
tr Q6JAH4 Q6JAH4_SORBI	AAVPVIEEPQKLLKKVVAGGEAWAN--CG-GGGTAGTAQESGIKNHVMSE
tr Q41854 Q41854_MAIZE	AVVPAIEEPQRLKKVVAGGGAWES--CGGATGAAQEMSGTGTKKHVMSE
sp P13027 ARRS_MAIZE	VVP-AIEEPQRLKKVVAGGGAWES--CGGATGAAQEMS--ATKNHVMSE
sp P13526 ARLC_MAIZE	AVVPAIEEPQRLKKVVAGGGAWES--CGGATGAAQEMSGTGTKNHVMSE
tr Q675N0 Q675N0_CORSU	TPQKLLKKVLFVARMHGGCLVESRQDNSKKDGLWGSEDDIGTTDLFLE
	. : : . * : : *
MYC-BKOS	RRRREKLNEMFLILKSLLPSVRKVD-----KASILAETITYLKVLEKRVK
tr Q948Y2 Q948Y2_ORYSA	RRRREKLNEMFLILKSLLPSVRKVD-----KASILAETITYLKVLEKRVK
tr Q40643 Q40643_ORYSA	RRRREKLNEMFLILKSLLPSVRKVD-----KASILAETITYLKVLEKRVK
tr Q6JAH4 Q6JAH4_SORBI	RKRREKINEMFLILKSLLPSVRKVD-----KASILAETITYLKVLEKRVK
tr Q41854 Q41854_MAIZE	RKRREKLNEMFLILKSLLPSVRKVD-----KASILAETITYLKVLEKRVK
sp P13027 ARRS_MAIZE	RKRREKLNEMFLILKSLLPSVRKVD-----KASILAETITYLKVLEKRVK
sp P13526 ARLC_MAIZE	RKRREKLNEMFLILKSLLPSVRKVD-----KASILAETITYLKVLEKRVK
tr Q675N0 Q675N0_CORSU	RRRDKTKERYSVLGLSLIPSTSKDD-----KISILDGTIEDLKEPERRLE
	::* : * : : * * : * : : * * * * * : : : *
MYC-BKOS	ELESS-----SREPSRWRPTEIGQGKAP-----
tr Q948Y2 Q948Y2_ORYSA	ELESS-----SREPSRWRPTEIGQGKAP-----
tr Q40643 Q40643_ORYSA	ELESSSQSPSCP-----LETRSRRKCREITGKKVSAGAKRKAPAPEVAS
tr Q6JAH4 Q6JAH4_SORBI	ELESSRELTTPSETTTT--TTRPRGISNESARKKLCAGSKRESPALEVDG
tr Q41854 Q41854_MAIZE	ELESSREPASRPSETTTTTLITRPSRGNNESVRKEVCAGSKRKSPELGRD-
sp P13027 ARRS_MAIZE	ELESSREPASRPSETTTTTLITRPSRGNNESVRKEVCAGSKRKSPELGRD-
sp P13526 ARLC_MAIZE	ELESSREPASRPSETTTTTLITRPSRGNNESVRKEVCAGSKRKSPELGRD-
tr Q675N0 Q675N0_CORSU	GSECLAARTSRKPQGTAEARTSANYENDRIGIGKKPLINKRKACDIVEAEL
	* : .
MYC-BKOS	-----
tr Q948Y2 Q948Y2_ORYSA	-----
tr Q40643 Q40643_ORYSA	---DDDDTDGERRHCVSNVNTIMDNKEVLLLELQCQWKELLMTRVFDAIK
tr Q6JAH4 Q6JAH4_SORBI	DVVNKEHPWLPKDGTSNVTVTVAN-TDVLLEVQCRWEELLMTRVFDAIK
tr Q41854 Q41854_MAIZE	--DVERPPVLTMDAGTSNVTVTVSD-KDVLLEVQCRWEELLMTRVFDAIK
sp P13027 ARRS_MAIZE	--DVERPPVLTMDAGTSNVTVTVSD-KDVLLEVQCRWEELLMTRVFDAIK
sp P13526 ARLC_MAIZE	--DVERPPVLTMDAGTSNVTVTVSD-KDVLLEVQCRWEELLMTRVFDAIK
tr Q675N0 Q675N0_CORSU	----EINLVQLKDSSTDDVSIRIID-KDVFIEIRCPWRERLLEIMDAIS
MYC-BKOS	-----
tr Q948Y2 Q948Y2_ORYSA	-----
tr Q40643 Q40643_ORYSA	GVSLDVLVSQASTSDGLLGLKIQAKFASSAAVEPGMITEALRKAIAS-
tr Q6JAH4 Q6JAH4_SORBI	SLHLDVLSVQASTPDGFMGLKIRAQFAGSGAVVPWMISEALHKAIGKR
tr Q41854 Q41854_MAIZE	SLHLDVLSVQASAPDGMGLKIRAQFAGSGAVVPWMISEALHKAIGKR
sp P13027 ARRS_MAIZE	SLHLDVLSVQASAPDGMGLKIRAQFAGSGAVVPWMISEALHKAIGKR
sp P13526 ARLC_MAIZE	SLHLDVLSVQASAPDGMGLKIRAQFAGSGAVVPWMISEALHKAIGKR
tr Q675N0 Q675N0_CORSU	NFHLDHSVQSSNIDGILSLSIKSKFKGSTVASTGMIIQALQRIICK

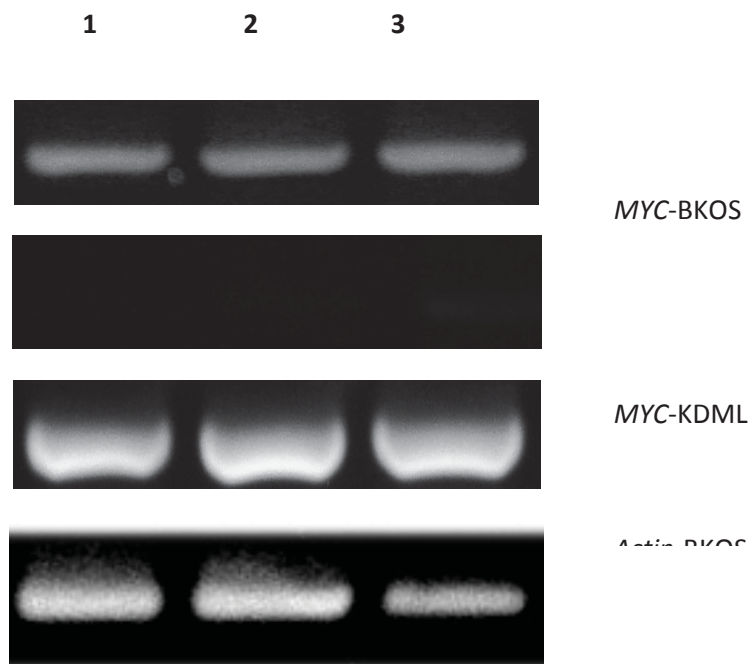
ภาพที่ 6 แสดงการทำ Multiple sequence alignment ระหว่าง Putative transcription factor gene MYC (bHLH) ของข้าวพันธุ์กลาย (BKOS) กับพืชอื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank



ภาพที่ 7 Dendrogram แสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ MYC gene จากข้าวพันธุ์กล้วย BKOS กับลำดับกรดอะมิโนของยีน MYC พืชชนิดต่างๆจากฐานข้อมูล GenBank

2.การศึกษาแบบแผนการแสดงออกของ MYC transcription factor gene ในข้าวพันธุ์กล้วย BKOS

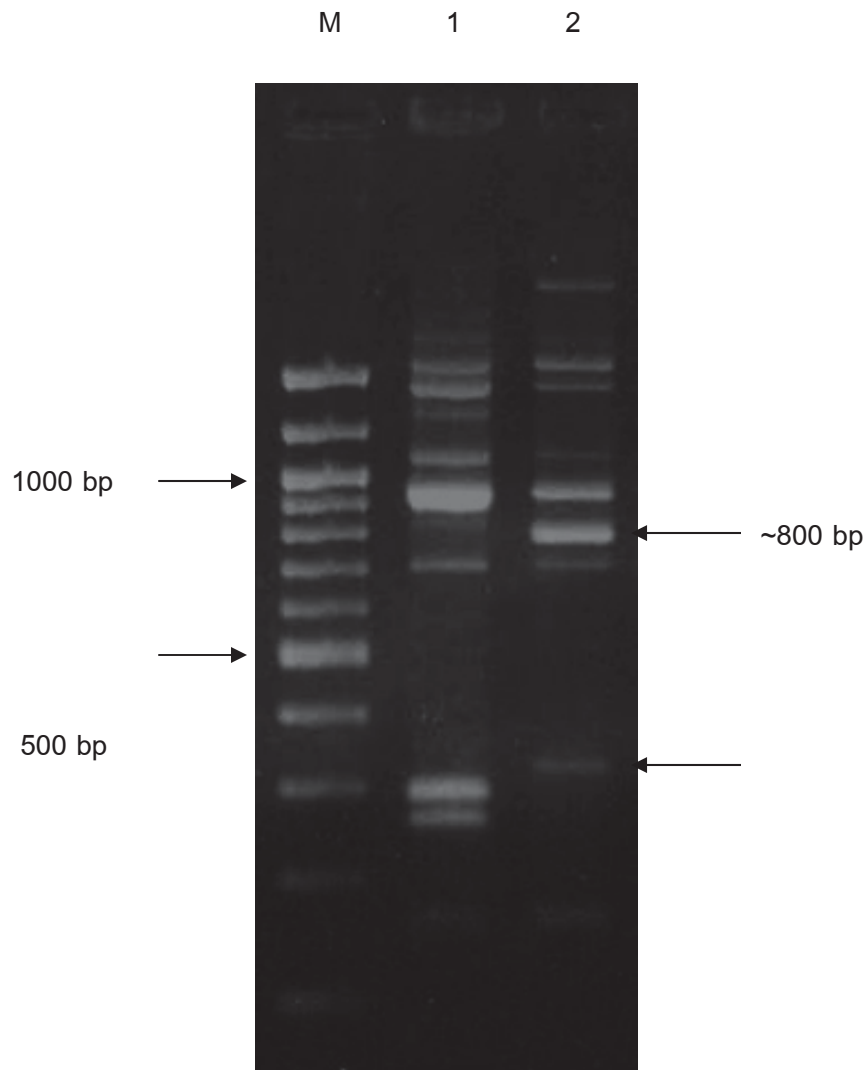
ทำการตรวจสอบแบบแผนการแสดงออกของยีน MYC ในเนื้อเยื่อส่วนใบ ลำต้น และรากของข้าวขาวดอกมะลิกลายพันธุ์ เปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์ปกติ โดยได้ทำการสกัด Total RNA จากส่วนต่างๆและเปลี่ยนเป็น cDNA จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของ MYC gene ด้วยเทคนิค RT-PCR (ภาพที่ 4) โดยใช้ Primers ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนดังกล่าว ซึ่งพบว่าการแสดงออกของยีน MYC ในระดับการ Transcription ในเนื้อเยื่อทุกส่วนของข้าวขาวดอกมะลิกลายพันธุ์ที่ได้นำมาทำการศึกษาในขณะที่ไม่พบการแสดงออกของ mRNA ของยีนดังกล่าวในส่วนต่างๆของข้าวขาวดอกมะลิปกติ ซึ่งผลการวิจัยในส่วนนี้สามารถสรุปได้ว่ามีความเป็นไปได้ที่ยีน MYC ที่โคลนได้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดการสร้าง Anthocyanins ในข้าวกลายพันธุ์



ภาพที่ 8 แสดงแบบแผนการแสดงของยีน MYC Transcription factor ในระดับการ Transcription ทำ การตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR จาก mRNA ที่เตรียมจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของข้าวขาวดอกมะลิปกติ (KDML) และ ข้าวขาวดอกมะลิกลายพันธุ์ (BKOS) ได้แก่ช่องที่1 ส่วนใบ: ช่องที่ 2 ลำต้น : ช่องที่ 3 ราก

2. ผลการโคลน Transcription factor WD40 gene จากข้าวขาวดอกมะลิพันธุ์กลายพันธุ์ BKOS

จากการทำ cDNA fingerprint เพื่อเปรียบเทียบแบบแผนการแสดงออกของยีนต่างๆระหว่างข้าวพันธุ์กลายและข้าวสายพันธุ์ปกติโดยใช้ primers แบบคู่ พบว่าจากการใช้ primer OPW14 จะให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 9) โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 310 และ 800 นิวคลีโอไทด์ปรากฏเฉพาะในข้าวพันธุ์กลายเท่านั้น จึงได้ทำการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งสองเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



ภาพที่ 9 cDNA fringerprint ระหว่างข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปกติ (1) และข้าวขาวดอกมะลิพันธุ์กลาย
BKOS (2) จากการใช้ primer OPW14

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งสองชิ้นซึ่งมีขนาดประมาณ 800 และ 310 นิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนขนาด 310 นิวคลีโอไทด์มีความคล้ายกับ MYC transcription factor gene ที่ผู้วิจัยโคลนได้ในการทดลองแรกถึง 100 % ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนที่สองขนาด 840 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่) และเมื่อทำการแปลไปเป็นกรดอะมิโนได้ 280 อะมิโน (ภาพที่) ซึ่งเมื่อทำการเปรียบกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blast n พบว่าชิ้นส่วนนี้มีความมีความคล้ายกับ putative WD-40 repeat protein 100 %

GGGAATCCAATGCTTCGTAATGGTGAGACTGGAGATTGGATTGGGACTTTCCAAGGTCATAA
AGGGGCTGTCTGGAGCTGCTGCCTAGACACAAATGCTCTGCGTGCTGCATCTGGTTCTGCT
GACTTTTCAGCCAAAGTTTGGGATGCACTAACAGGTGATGAGCTACATTCATTTGAACACAA
GCACATTGTCCGTGCATGCGCGTTTTCTGAGGATACCCACCTGTTGCTCACTGGAGGCGTA
GAAAAGATTTTGCCTGTCTATGATATGAATCGTCCAGATGCAGCACCAAGAGAACTTGACAA
AGCACCTGGTAACGTGCGAACTGTTGCTTGGCTTCATAGTGATCAAACAATACTAAGCTCGT
GCTCTGATATGGGAGGAGTAAGATTGTGGGATGTGAGGACTGGAAAAATTGTCCAAACTCTT
GAAACCAAGGCGCCTGTGACTAGCGCAGAAGTAAGTCAAGACAGCAGGTTCACTACTACAG
CTGATGGCTCGAGTGTTAAATTTTGGGATGCTAATCACTTTGGGCTTGTTAAAAGCTATGATA
TGCCTTGCACTGTGGAGTCAGCTTCCCTGGAACCAAAATCTGGGAGCAAATTTATTGTTGGG
GGAGAAGATATGTGGGTTTCATGTATTTGATTTCTTCACTGGTGAAGAAATAACCTGTAACAAG
GGGCATCATGGTCCTGTCCACTGTGTCCGCTTTGCACCTGGCGGTGAATCTTATGCATCAG
GATCAGAAGATGGCACCATCCGGATCTGGCAGCTGAGCCCACCTAACGCTGATGACAATGA
GGCGGTCAATTCAAATGGCAAACCAACAGTTGGGGTA

ภาพที่ 10 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 840 นิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative transcription factor WD-40 ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS

GNPMLRNGETGDWIGTFQGHKGAVWSCCLDTNALRAASGSA
DFSAKVWDALTGDELHSFEHKHIVRACAFSEDTHLLLTGGVEK
ILRVYDMNRPDAAPRELDKAPGNVRTVAWLHSDQTILSSCS
DMGGVRLWDVRTGKIVQTLETKAPVTSAEVSQDSRFITTADGSSV
KFW DANHFGLVKSYDMPCTVESASLEPKSGSKFIVGGEDMWV
HVFDFFTGEEITCNKGHHGPVHCVRFAPGGESYASGSEDGTIR
IWQLSPPNADDNEAVNSNGKPTVGV

ภาพที่ 11 แสดงลำดับกรดอะมิโนขนาด 280 อะมิโนที่แปลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative transcription factor WD-40 จากข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนของ Transcription factor WD-40 gene ที่โคลนได้ นำมาใช้
ในการออกแบบ Primers ตามวิธีการของบริษัท Takara (ภาพผนวก) เพื่อทำการโคลน Full length cDNA

ด้วยเทคนิค 5' และ 3' RACE โดยจากการทำปฏิกิริยา PCR สามารถโคลนยีนที่มีขนาด 1,035 คู่เบส (ภาพที่) และทำการแปลเป็นกรดอะมิโนได้ทั้งสิ้น 345 อะมิโน (ภาพที่)

ATGGAGAAGAAGAAGGTGGCGGTGCCGCTGGTGTGCCACGGCCACTCGCGCCCGGTTCGTC
GACCTGTTCTACAGCCCCGTCACGCCCCGACGGGTACTTCCTCATCAGCGCCAGTAAGGATG
GGAATCCAATGCTTCGTAATGGTGAGACTGGAGATTGGATTGGGACTTTCCAAGGTCATAAA
GGGGCTGTCTGGAGCTGCTGCCTAGACACAAATGCTCTGCGTGCTGCATCTGGTTCTGCTG
ACTTTTCAGCCAAAGTTTGGGATGCACTAACAGGTGATGAGCTACATTCATTTGAACACAAG
CACATTGTCCGTGCATGCGCGTTTTCTGAGGATACCCACCTGTTGCTCACTGGAGGCGTAG
AAAAGATTTTTCGTGTCTATGATATGAATCGTCCAGATGCAGCACCAAGAGAACTTGACAAA
GCACCTGGTAACGTGCGAACTGTTGCTTGGCTTCATAGTGATCAAACAATACTAAGCTCGTG
CTCTGATATGGGAGGAGTAAGATTGTGGGATGTGAGGACTGGAAAAATTGTCCAAACTCTTG
AAACCAAGGCGCCTGTGACTAGCGCAGAAGTAAGTCAAGACAGCAGGTTTCATCACTACAGC
TGATGGCTCGAGTGTTAAATTTTGGGATGCTAATCACTTTGGGCTTGTTAAAAGCTATGATAT
GCCTTGCACTGTGGAGTCAGCTTCCCTGGAACCAAAATCTGGGAGCAAATTTATTGTTGGGG
GAGAAGATATGTGGGTTCATGTATTTGATTTCTTCACTGGTGAAGAAATAACCTGTAACAAGG
GGCATCATGGTCCTGTCCACTGTGTCCGCTTTGCACCTGGCGGTGAATCTTATGCATCAGGA
TCAGAAGATGGCACCATCCGGATCTGGCAGCTGAGCCACCTAACGCTGATGACAATGAGG
CGGTCAATTCAAATGGCAAACCAACAGTTGGGGTAAATGAGGTTGCACGCAAGATCGAAGG
CTTCCACATTCCAAGGAGGAGGAGCAGCAGCAGCAGCAGGCTGAGGGGTAG

ภาพที่ 12 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Full length cDNA Putative transcription factor WD-40 gene ขนาด 1,035 นิวคลีโอไทด์ ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS

MEKKKVAVPLVCHGHSRPVVDLFYSPVTPDGYFLISASKDGNP
MLRNGETGDWIGTFQGHKGAVWSCCLDTNALRAASGSADFS
KVWDALTGDELHSFEHKHIVRACAFSEDTHLLLTGGVEKILRV
YDMNRPDAAPRELDKAPGNVRTVAWLHSDQTILSSCSMDGGV
RLWDVRTGKIVQTLETKAPVTSAEVSQDSRFITTADGSSVKFW
DANHFGLVKSYDMPCTVESASLEPKSGSKFIVGGEDMWVHV
DFFTGEEITCNKGHHGPVHCVRFAPGGESYASGSEDGTIRIWQ

L S P P N A D D N E A V N S N G K P T V G V N E V A R K I E G F H I P K E E E Q Q Q
Q Q A E G

ภาพที่ 13 แสดงลำดับกรดอะมิโนขนาด 345 อะมิโนที่แปลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Full length cDNA Putative transcription factor WD-40 gene ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS

ได้ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Blast n และ ทำ Multiple sequence alignment (ภาพที่) พบว่ามีความคล้ายกับยีน putative WD-40 repeat protein ของข้าวมากที่สุดถึง 97% (ตารางที่ 5) นอกจากนี้ได้นำลำดับกรดอะมิโนของ Transcription factor WD-40 gene ของข้าว BKOS มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับ Transcription factor WD-40 gene ของพืชชนิดต่างๆโดยการสร้าง Dendrogram (ภาพที่) ซึ่งจาก Dendrogram จะเห็นได้ว่า Transcription factor WD-40 gene ของข้าวสายพันธุ์ BKOS ได้ถูกจัดรวมกลุ่มกับ WD-40 gene ที่โคลนได้จากข้าวชนิดอื่นๆ แสดงให้เห็นว่ายีน WD-40 ที่โคลนได้จากข้าว BKOS มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับข้าวมากที่สุด

ตารางที่ 5: แสดงระดับความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน ของ Putative transcription factor WD-40 gene ที่แยกจากข้าวกลายพันธุ์ BKOS ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับ transcription factor WD-40 gene จากพืชสปีชีส์อื่น ๆ

Plant species	Gene name	Amino acid Identity (%)	GenBank accession number
<i>Oryza sativa</i>	Putative WD-40 repeat protein	97	Q69X61
<i>Zea mays</i>	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	92	B6T3R6
<i>Zea mays</i>	Predicted protein	89	F2DAB2
<i>Populus balsamifera</i> subsp. trichocarpa	Predicted protein	83	B9GWN6

<i>Ricinus communis</i>	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	83	B9STP9
-------------------------	---	----	--------

BK0S-WD40	MEKKKVAVPLVCHGHSRPVVDLFYSPVTPDGYFLISASKDGNPMLRNGET
tr Q69X61 Q69X61_ORYSJ	MEKKKVAVPLVCHGHSRPVVDLFYSPVTPDGYFLISASKDGNPMLRNGET
tr B4G1G6 B4G1G6_MAIZE	MEKKKVAIPLVCHGHSRPVVDLFYSPVTPDGYFLISASKDNPMLRNGET
tr B6T3R6 B6T3R6_MAIZE	MEKKKVAIPLVCHGHSRPVVDLFYSPVTPDGYFLISASKDNPMLRNGET
tr B9STP9 B9STP9_RICCO	MDKKRVAVPLVCHGHSRPVVDLFYSPVTPDGFFLISASKDSSPMLRNGET
tr B9RUZ3 B9RUZ3_RICCO	MDKKKVAVPLVCHGHSRPVVDLFYSPVTPDGFFLISASKDSSPMLRNGET
	*.:**.:**.:*****.*****.*****.*****

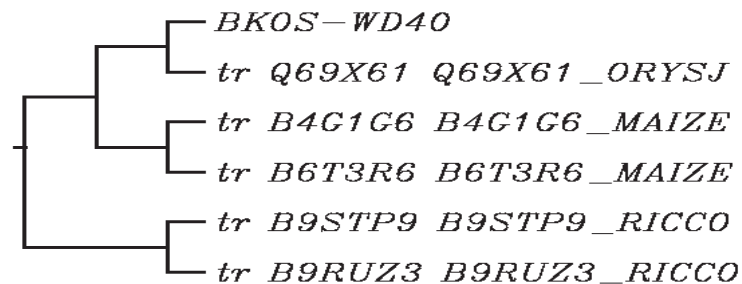
BK0S-WD40	GDWIGTFQGHKGAVWSCCLDTNALRAASGSADFSAKVWDALTGDELHSFE
tr Q69X61 Q69X61_ORYSJ	GDWIGTFQGHKGAVWSCCLDTNALRAASGSADFSAKVWDALTGDELHSFE
tr B4G1G6 B4G1G6_MAIZE	GDWIGTFQGHKGAVWSCCLDRNALRAASASADFSAKVWDALTGDELHSFE
tr B6T3R6 B6T3R6_MAIZE	GDWIGTFQGHKGAVWSCCLDRNALRAASASADFSAKVWDALTGDELHSFE
tr B9STP9 B9STP9_RICCO	GDWIGTFEGHKGAVWSCCLDTNALRAASGSADFTAKVWDALTGDLVHSFE
tr B9RUZ3 B9RUZ3_RICCO	GDWIGTFEGHKGAVWSCSLDTKALRAASASADFTAKLWDALTGDELHSFE
	*****.:*****.***.:*****.*****.:**.:***** *****

BK0S-WD40	HKHIVRACAFSEDTHLLLTGGVEKILRVYDMNRPDAAPRELDKAPGNVRT
tr Q69X61 Q69X61_ORYSJ	HKHIVRACAFSEDTHLLLTGGVEKILRVYDMNRPDAAPRELDKAPGNVRT
tr B4G1G6 B4G1G6_MAIZE	HKHIVRACAFSEDTHLLLTGGMEKILRVYDMNRPDAAPRELDKSPGSVRT
tr B6T3R6 B6T3R6_MAIZE	HKHIVRACAFSEDTHLLLTGGMEKILRVYDMNRPDAAPRELDKSPGSVRT
tr B9STP9 B9STP9_RICCO	HKHIVRASAFSEDTHLLLTGGIEKVLRIFDLNRPDAPPREVDKSPGSVRT
tr B9RUZ3 B9RUZ3_RICCO	HRHIVRACAFSEDTHLLLTGGMEKILRLFDLNRPDAPPREVNSSPGSIRT
	*.:*****.*****.*****.:**.:**.:**.:*****.*****.:**.:**

BK0S-WD40	VAWLHSDQTISSCSDMGGVRLWDVVRTGKIVQTLETKAPVTSAEVSQDSR
tr Q69X61 Q69X61_ORYSJ	VAWLHSDQTISSCSDMGGVRLWDVVRTGKIVQTLETKAPVTSAEVSQDSR
tr B4G1G6 B4G1G6_MAIZE	AAWLHSDQTISSCTDMGGVRLWDVVRTGKIVQTLETKASVTSAEVSQDGR
tr B6T3R6 B6T3R6_MAIZE	AAWLHSDQTISSCTDMGGVRLWDVVRTGKNVQTLETKASVTSAEVSQDGR
tr B9STP9 B9STP9_RICCO	VAWLHSDQTISSCTDMGGVRLWDVRSKGIVQTLETKSSVTSAEVSQDGR

tr B9RUZ3 B9RUZ3_RICCO	VAWLHSDQTISSCTDMGGVRLWDIRSGKIVQTLETKSPVTSAEVSDQGR . *****:*****:*. ** *****: *****.*
BKOS-WD40	FITTADGSSVKFWDANHFGLVKSYPMPCTVESASLEPKSGSKFIVGGEDM
tr Q69X61 Q69X61_ORYSJ	FITTADGSSVKFWDANHFGLVKSYPMPCTVESASLEPKSGSKFIVGGEDM
tr B4G1G6 B4G1G6_MAIZE	FITTADGSSVKFWDANHFGLVKSYPMPCNVESASLEPKSGSKFVAGGEDL
tr B6T3R6 B6T3R6_MAIZE	FITTADGSSVKFWDANHFGLVKSYPMPCNVESASLEPKSGSKFVAGGEDL
tr B9STP9 B9STP9_RICCO	YITTCDGSTVKFWDANHFGLVKSYPMPCTVESASLEPKYGNKFIAGGEDM
tr B9RUZ3 B9RUZ3_RICCO	YITTADGSTVKFWDANHFGLVKSYPMPCNVESASLEPKLGKNFVAGGEDM :***.***:*****:***.***** *.**:.****:
BKOS-WD40	WVHVDFDFTGEEITCNKGHHGPVHCVRFAPGGESYASGSEDGTIRIWQLS
tr Q69X61 Q69X61_ORYSJ	WVHVDFDFTGEEITCNKGHHGPVHCVRFAPGGESYASGSEDGTIRIWQLS
tr B4G1G6 B4G1G6_MAIZE	WVHVDFDFTGEEIACNKGHHGPVHCVRFAPCGESYASGSEDGTIRIWQLS
tr B6T3R6 B6T3R6_MAIZE	WVHVDFDFTGEEIACNKGHHGPVHCVRFAPCGESYASGSEDGTIRIWQLS
tr B9STP9 B9STP9_RICCO	WIHVDFDFTGDEIACNKGHHGPVHCVRFSPGGESYASGSEDGTIRIWQTG
tr B9RUZ3 B9RUZ3_RICCO	WIHVDFDFTGEQIGCNKGHHGPVHCLRFSPGGESYASGSEDGTIRIWQTG *:*****.***:*. *****:***.* *****
BKOS-WD40	PPNADDNEAVNSN - - GKPTVGVNEVARKIEGFHIPKEEEQQQQAEG - -
tr Q69X61 Q69X61_ORYSJ	PPNADDNEAVNSN - - GKPTVGVNEVARKIEGFHIPKEEEQQQQAEG - -
tr B4G1G6 B4G1G6_MAIZE	PANADDNEVANAN - - GKTTAGVNEVTTKIEGFHIPKEGQTEG - - - - -
tr B6T3R6 B6T3R6_MAIZE	PANADDNEVANAN - - GKTTAGVNEVTTKIEGFHIPKEGQTEG - - - - -
tr B9STP9 B9STP9_RICCO	PLIQDDTEGLAANGSVGKVKVTAEEVTHKIEGFHIADGGKAKDKKEAAKE
tr B9RUZ3 B9RUZ3_RICCO	PQNHDE - - - - - NGPTGKAMASADDVTQIKGKGKTAGTDP - - - - - * * : * * . . : : * : * : *

ภาพที่ 14 แสดงการทำ Multiple sequence alignment ระหว่าง Putative transcription factor WD-40 gene ของข้าวพันธุกรรม (BKOS) กับพืชอื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank



ภาพที่ 15 Dendrogram แสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ WD-40 gene จากข้าวพันธุ์กลาย BKOS กับลำดับกรดอะมิโนของยีนต่างๆจากฐานข้อมูล GenBank

3. การตรวจสอบหน้าที่ของยีน MYC และ WD-40 Transcription factor genes

เพื่อศึกษาหน้าที่ที่แท้จริงของ Transcription factor MYC gene ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS ผู้วิจัยได้ทำการโคลน MYC gene เข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ที่สามารถกระตุ้นให้ยีนที่ได้รับการส่งถ่ายสามารถแสดงออกได้ในพืช โดยในการทดลองนี้ได้เลือกใช้พลาสมิด pSTART ซึ่งมี 35S promoter ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนในพืช ในทิศทาง sense (pSTART-MYC) และ anti-sense (pSTART-antiMYC) นอกจากนี้ยังได้ทำการโคลน MYC gene เข้าสู่พลาสมิด pSTART ร่วมกับ WD-40 gene (pSTART-MYC-WD40) ซึ่งยีนทั้งสองถูกควบคุมการแสดงออกด้วย 35S promoter เช่นเดียวกัน

หลังจากโคลนยีนทั้งหมดได้แล้ว ทำการส่งถ่ายพลาสมิดทั้งสามเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 และ LBA4404 ตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อเตรียมการส่งถ่ายเข้าสู่พืชต่อไป

3.1 การส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-MYC, pSTART-antiMYC, pSTART-MYC-WD40 เข้าสู่เนื้อเยื่อข้าว ยาสูบ และพืชมุเนีย ด้วยเทคนิค Agrobacterium Transformation

ทำการส่งถ่ายพลาสมิดทั้งสามเข้าสู่เนื้อเยื่อข้าว ยาสูบและพืชมุเนีย โดยในเบื้องต้นได้หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการส่งถ่ายพลาสมิดทั้งหมดเข้าสู่พืชแต่ละชนิด โดยผลการทดลองมีดังนี้

ข้าวหอมมะลิพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS

ในการตรวจสอบหน้าที่ของยีน *MYC* ได้ทำการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ของข้าว BKOS ด้วยเทคนิค Agrobacterium transformation โดยใช้ พลาสมิด pSTART-antiMYC ที่มียีน antisense *MYC* เข้าสู่เนื้อเยื่อเซลล์ของข้าว BKOS ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้เชื้อ Agrobacterium สองสายพันธุ์ได้แก่ AGL1 และ LBA4404 ในการส่งถ่ายพลาสมิด โดยผลการทดลองแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เซลล์ของข้าว BKOS ดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อ Kanamycin และมีกิจกรรมของยีน *gus* ภายหลังการส่งถ่ายด้วยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 และ LBA4404

<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	การทดลองครั้งที่	จำนวนแคลลัส		เปอร์เซ็นต์การส่งถ่ายยีน (%)
		เริ่มต้น	ต้านทานต่อ Kanamycin และมีการแสดงออกของยีน <i>gus</i>	
AGL1	1	250	0	0
	2	250	0	0
	3	250	1	0.004
LBA4404	1	250	1	0.004
	2	250	3	0.012
	3	250	3	0.012

จากผลการทดลองพบว่าประสิทธิภาพในการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ข้าว BKOS ด้วยเชื้อ *Agrobacterium* ทั้งสองสายพันธุ์คือ AGL1 และ LBA4404 มีประสิทธิภาพต่ำมาก (0.004 และ 0.012 % ตามลำดับ) โดยหลังจากทดสอบการแสดงออกของยีน *gus* แล้ว ผู้วิจัยได้ย้ายแคลลัสดังกล่าวไปเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นและราก ซึ่งจากการเลี้ยงไว้เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าแคลลัสดังกล่าวไม่มีการพัฒนาเป็นต้น และเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายลงทั้งหมดในสัปดาห์ที่สองของเดือนที่ 5 จึงไม่สามารถที่จะตรวจสอบการยับยั้งการแสดงออกของยีน *MYC* ในระดับการ Transcription ได้

ยาสูบ

จากการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-MYC และ pSTART-MYC-WD40 เข้าสู่ยาสูบโดยเทคนิค *Agrobacterium* transformation โดยใช้ *Agrobacterium* สองสายพันธุ์ได้แก่ AGL1 และ LBA4404 เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีน *MYC* และการทำงานร่วมกับยีน *WD40* โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำซึ่งผลของการส่งถ่ายยีนแสดงในตารางที่ 7

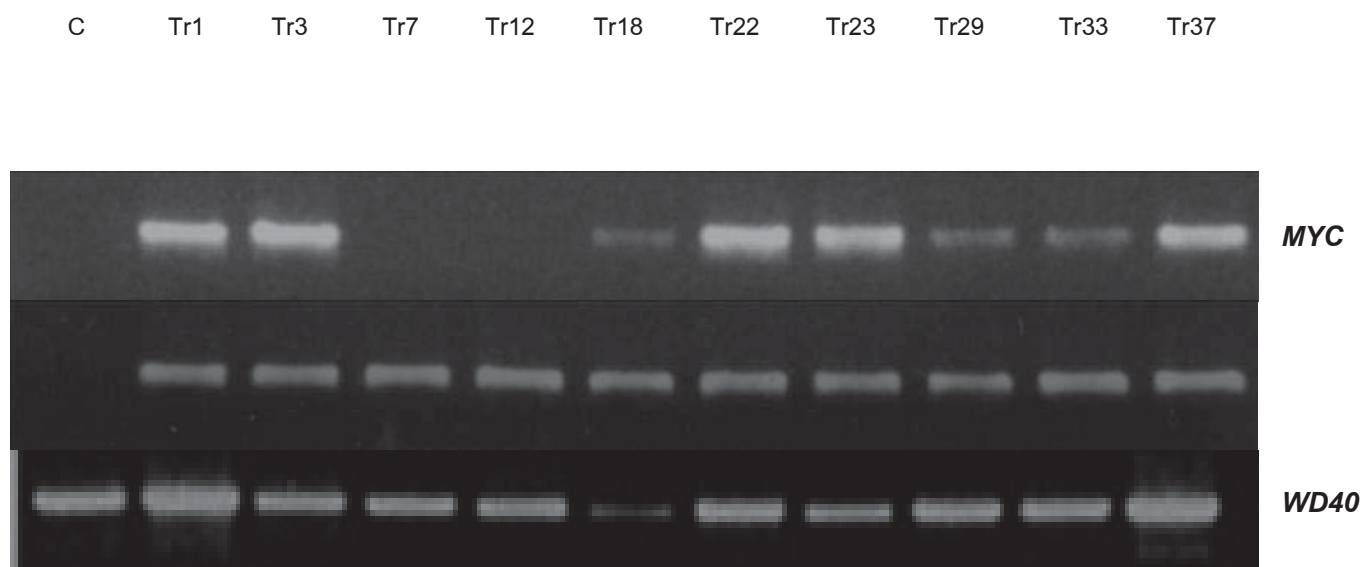
ตารางที่ 7 ผลการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-MYC และ pSTART-MYC-WD40 เข้าสู่ยาสูบโดยเทคนิค *Agrobacterium* transformation โดยใช้ *Agrobacterium* สองสายพันธุ์ได้แก่ AGL1 และ LBA4404

<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Plasmid	การทดลองครั้งที่	จำนวนแคลลัส		เปอร์เซ็นต์การส่งถ่ายยีน (%)
			เริ่มต้น	ต้านทานต่อ Kanamycin	
AGL1	pSTART-MYC	1	105	22	20.9
		2	105	18	17.1
		3	105	15	14.3
	pSTART-MYC-WD40	1	105	18	17.1
		2	105	10	9.5
		3	105	12	11.4
LBA4404	pSTART-MYC	1	115	65	56.5

	2	115	68	59.1
	3	115	72	62.6
pSTART-MYC- WD40	1	115	43	37.4
	2	115	47	40.9
	3	115	46	40 .0

จากผลการส่งถ่ายพลาสมิดทั้งสองเข้าสู่ยาสูบ พบว่าการส่งถ่ายพลาสมิดด้วยเชื้อ *Agrobacterium* สายพันธุ์ LBA4404 จะมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้เชื้อ AGL1 โดยในการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-MYC ด้วยเชื้อ LBA4404 มีเปอร์เซ็นต์การส่งถ่ายอยู่ในช่วง 50 – 60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การส่งถ่ายด้วยเชื้อ AGL1 อยู่ในช่วง 14 – 20 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันกับผลการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-MYC-WD40 ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิด pSTART-MYC ประมาณ 1.5 kb ซึ่งการส่งถ่ายด้วยเชื้อ *Agrobacterium* สายพันธุ์ LBA4404 มีประสิทธิภาพดีกว่าการส่งถ่ายด้วย AGL1

เนื้อเยื่อของยาสูบที่สามารถเจริญได้ในอาหารคัดเลือกจะถูกนำมาทดสอบการแสดงออกของยีน *gus* ซึ่งพบว่าเนื้อเยื่อของยาสูบทุกชิ้นที่นำมาพบจุดสีน้ำเงินเกิดขึ้นทั้งหมดเมื่อทำการทดสอบ (ภาพที่) จากนั้นได้ทำการทดสอบการแสดงออกของยีนในระดับการ Transcription ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยได้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน MYC และ WD-40 ในเนื้อเยื่อที่คัดเลือกแบบสุ่ม โดยจากภาพที่ พบว่าสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน WD40 ได้ในทุกตัวอย่างที่เลือกมา ในขณะที่การตรวจสอบการแสดงออกของยีน MYC พบมีการแสดงออกในทุกตัวอย่างยกเว้นในตัวอย่าง Tr7 และ Tr12



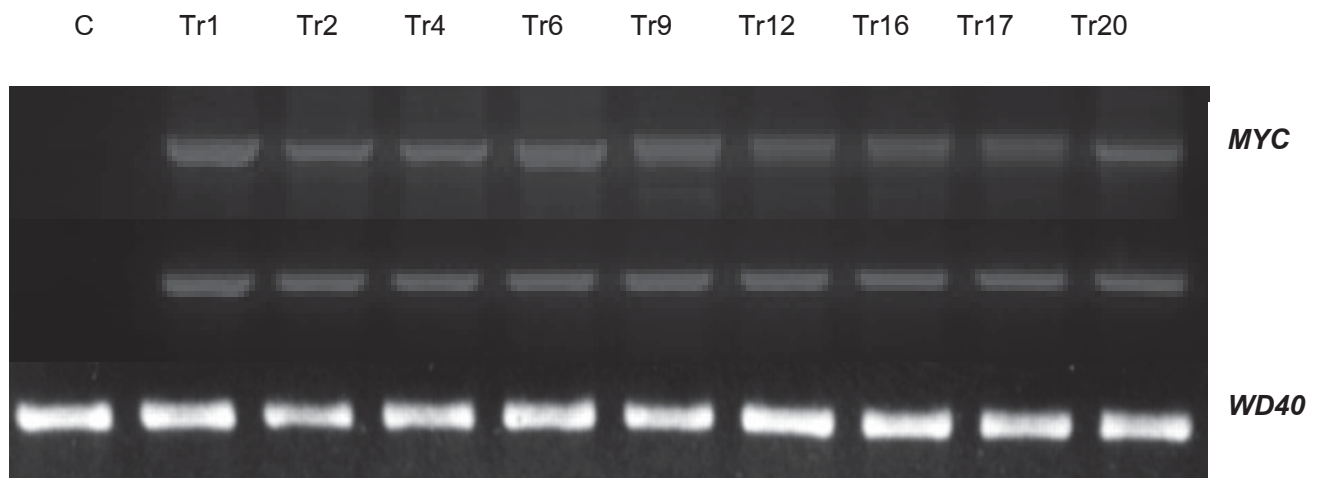
ภาพที่ 16 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน MYC และ WD40 ในเนื้อเยื่อของยาสูบที่ได้รับการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค RT-PCR โดย C คือ พืชควบคุม (ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน) Tr1 – Tr37 คือพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

พืชมุเนีย

เช่นเดียวกับในการทดลองในยาสูบ ได้ทำการศึกษาหน้าที่ของยีน MYC และศึกษาการทำงานร่วมกับยีน WD40 โดยทำการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-MYC และ pSTART-MYC-WD40 เข้าพืชมุเนีย โดยใช้ Agrobacterium สองสายพันธุ์ได้แก่ AGL1 และ LBA4404 โดยในพืชมุเนียนอกจากจะติดตามการแสดงออกของยีน *gus* แล้ว ได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน MYC และ WD40 ในระดับการ Transcription ด้วยเทคนิค RT-PCR ซึ่งหลังจากนั้นจะได้ทำการย้ายต้นพืชมุเนียที่คัดเลือกแล้วออกปลูกในสภาพแวดล้อมปกติเพื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่อไป สำหรับผลการทดลองในการส่งถ่ายพลาสมิดทั้งสอง แสดงได้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-MYC และ pSTART-MYC-WD40 เข้าสู่พืชมุเนียโดยเทคนิค Agrobacterium transformation โดยใช้ Agrobacterium สองสายพันธุ์ได้แก่ AGL1 และ LBA4404

<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Plasmid	การทดลอง ครั้งที่	จำนวนแคลลัส		เปอร์เซ็นต์การ ส่งถ่ายยีน (%)	
			เริ่มต้น	ต้านทานต่อ Kanamycin		
AGL1	pSTART-MYC	1	50	10	20	
		2	50	12	24	
		3	50	11	22	
	pSTART-MYC- WD40	1	50	8	16	
		2	50	8	16	
		3	50	7	14	
	LBA4404	pSTART-MYC	1	50	22	44
			2	50	20	40
			3	50	20	40
pSTART-MYC- WD40		1	50	18	36	
		2	50	21	42	
		3	50	20	40	



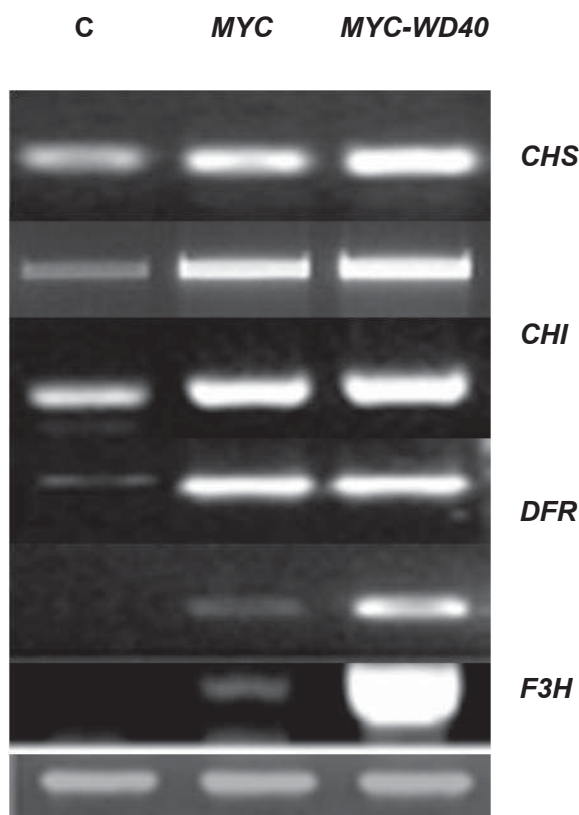
ภาพที่ 17 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน MYC และ WD40 ในเนื้อเยื่อของพืชเนยที่ได้รับการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค RT-PCR โดย C คือ พืชควบคุม (ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน) Tr1 – Tr20 คือพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

จากเนื้อเยื่อของพืชเนยที่สามารถเจริญได้ในอาหารคัดเลือกจะถูกนำมาทดสอบการแสดงออกของยีน *gus* ซึ่งพบว่าเนื้อเยื่อของพืชเนยทุกชิ้นที่สุ่มมานั้นเมื่อทำการทดสอบ พบจุดสีน้ำเงินเกิดขึ้นทั้งหมด (ภาพที่) จากนั้นได้ทำการทดสอบการแสดงออกของยีนในระดับการ Transcription ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยได้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน MYC และ WD-40 ในเนื้อเยื่อที่คัดเลือกแบบสุ่ม โดยจากภาพที่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน MYC และ WD40 ได้ในทุกตัวอย่างที่เลือกมาทดสอบ

3.2 การศึกษาหน้าที่ของยีน MYC และ การทำงานร่วมกันระหว่างยีน MYC-WD40 ในพืชดัดแปลงพันธุกรรม

ในการศึกษาหน้าที่การทำงานของยีน MYC ที่โคลนได้จากข้าวขาวดอกมะลิพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS ได้ทำการติดตามการแสดงออกของยีนที่อยู่ในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เปรียบเทียบกับการทำงานร่วมกันระหว่างยีน MYC และ WD40 ในต้นยาสูบที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรม โดยได้ติดตามระดับการแสดงออกของยีน *CHS* *CHI* *DFR* *F3H* *ANS* และ *UFGT* เปรียบเทียบกับต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนดังภาพที่ โดยจากภาพจะเห็นได้ว่าในยาสูบที่ได้รับการส่งถ่ายยีน MYC และ MYC-WD40 พบระดับการแสดงออกของยีน *CHS* *CHI* *DFR* *F3H* สูงกว่าในยาสูบที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน ในขณะที่พบ

ระดับการแสดงออกของยีน *ANS* และ *UFGT* สูงที่สุดในพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *MYC-WD40* ซึ่งมากกว่าการส่งถ่ายเฉพาะยีน *MYC* เพียงยีนเดียว

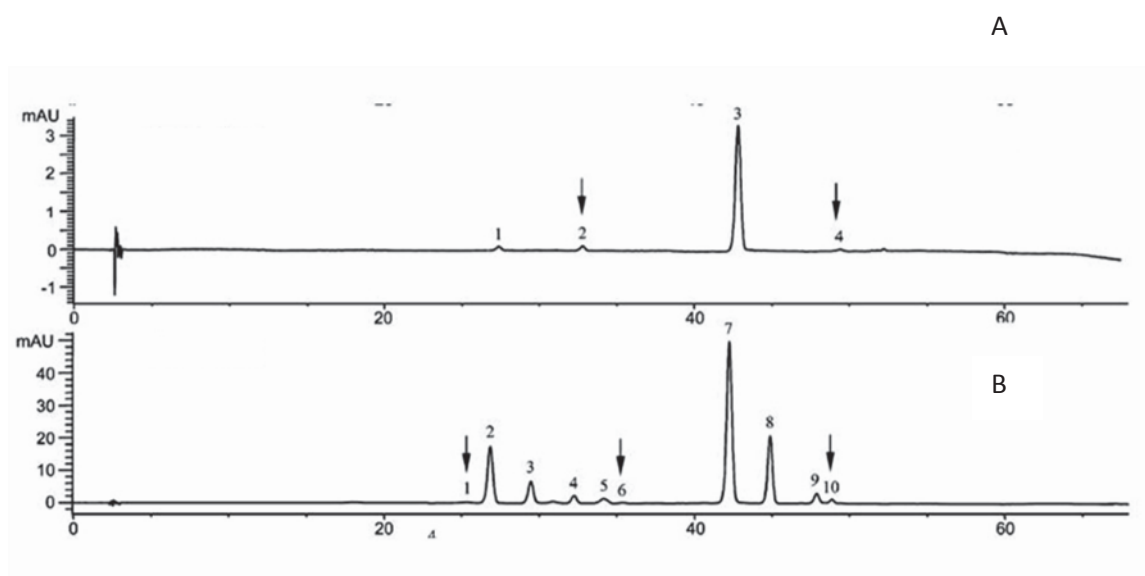


ภาพที่ 18 การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนในวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานินในยาสูบที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *MYC* และ *MYC-WD40* เปรียบเทียบกับยาสูบที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน (C)

4. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารในกลุ่มแอนโทไซยานินในพืชดัดแปลงพันธุกรรม

ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน จากใบของยาสูบที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *MYC-WD40* เปรียบเทียบกับยาสูบที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) ตามวิธีการของ Kuwayama *et al.*, 2005 โดยเริ่มจากการเตรียมตัวอย่างด้วยการบดใบของยาสูบด้วย Liquid Nitrogen แล้วเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20°C ทำการสกัดตัวอย่างที่บดด้วย เมทานอลและน้ำใน อัตราส่วนโดยปริมาตรเท่ากับ 70:30 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าด้วยเครื่องเขย่า โดยใช้ความเร็ว 140 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในที่ ไม่มีแสง เก็บสารตัวอย่างที่สกัดได้ทุกๆ 1 ชั่วโมง จนครบ 7 ชั่วโมง และที่ 24 ชั่วโมง กรองสารสกัดที่ได้ผ่าน Millipore filter

ขนาด 45 ไมครอนและนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-25, Sephadex LH-20 และ Amberlite CG-50 จากนั้นนำไปฉีดวิเคราะห์ชนิดของสารในกลุ่ม แอนโทไซยานิน ได้แก่ 1- delphinidin 3-galactoside; 2 – delphinidin 3-glucoside; 3 – cyanidin 3-galactoside; 4 – delphinidin 3-arabinoside; 5 – cyanidin 3-glucoside; 6 – petunidin 3-galactoside; 7 – cyanidin 3-arabinoside; 8 – petunidin 3-glucoside; 9 – peonidin 3-galactoside; 10 – petunidin 3-arabinoside ด้วย HPLC โดยกำหนด Flow rate 1.0 Lpm ที่ 510 นาโนเมตร



ภาพที่ 19 HPLC-Chromatogram ของสารในกลุ่มแอนโทไซยานินจากยาสูบที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน (A) และ ยาสูบที่ได้รับการส่งถ่ายยีน MYC และ WD40 (B)

จากการตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัดในกลุ่มแอนโทไซยานินด้วยเทคนิค HPLC จากยาสูบที่ได้รับการส่งถ่ายยีน MYC-WD40 (ภาพที่ A) เปรียบเทียบกับยาสูบที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน (ภาพที่ B) พบว่ายีน MYC-WD40 สามารถทำให้เกิดการสังเคราะห์สารประกอบต่างๆที่อยู่ในวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานินที่แตกต่างไปจากพืชควบคุม โดยจากภาพที่ 19 พบว่ามี peak ที่ปรากฏเฉพาะในพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน 6 ตำแหน่งได้แก่ peak ที่ 1- delphinidin 3-galactoside; 3- cyanidin 3-galactoside; 5 – cyanidin 3-glucoside; 6 – petunidin 3-galactoside; 8 – petunidin 3-glucoside และ 9 – peonidin 3-galactoside ในขณะที่พบสารที่เหมือนกันในพืชทั้งสองได้แก่ peak ที่ 2 – delphinidin 3-glucoside; 4 – delphinidin 3-arabinoside; 7 – cyanidin 3-arabinoside และ 10 – petunidin 3-arabinoside

ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้นี้ซึ่งพิจารณาจาก Chromatogram แสดงให้เห็นว่าการทำงานร่วมกันของ ยีน *MYC* และ *WD40* สามารถกระตุ้นให้ยาสืบสามารถสร้างสารสำคัญในกลุ่มแอนโทไซยานินได้ หลากหลายมากกว่าการทำงานของยีน *MYC* เพียงตัวเดียว (ไม่ได้แสดงผลการวิจัย) ซึ่งผลการตรวจสอบจาก HPLC พบว่าไม่มีความแตกต่างของจำนวนชนิดของสารเมื่อเปรียบเทียบกับพืชควบคุม

5. วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการโคลนและศึกษาหน้าที่ของยีน *Myc* transcription factor ที่แยกได้จากข้าวขาวดอกมะลิ พันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS ที่ชักนำโดยเทคนิคลำไออนพลังงานต่ำ โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะเข้าใจกลไกการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานินผ่านการทำงานของยีน *Myc* และ Transcription factor บางกลุ่มเช่น WD40 และ Myb โดยจากงานวิจัยต่างๆ แสดงให้เห็นว่ายีน *Myc* มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการทำงานของยีนโครงสร้างบางชนิดในวิถีสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานินในพืช (Stommel *et al.*, 2009; Yamazaki *et al.*, 2003) แต่เนื่องจากกลุ่มของ *Myc* transcription factor gene เป็น Family genes ที่มีสมาชิกอยู่มากมายและทำหน้าที่หลากหลายในสิ่งมีชีวิตดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องพิสูจน์หน้าที่ของยีน *Myc* ที่โคลนได้ ซึ่งในพืชทั่วไปนั้น *Myc* protein จะรวมตัวกับ Myb และ WD40 เกิดเป็น protein complex ขึ้น โดยโครงสร้างดังกล่าวจะไปกระตุ้นให้เกิดการทำงานของยีนต่างๆ ในวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชหลายชนิดโดยเฉพาะ (Ramsary and Glover. 2005) กลุ่มของ late biosynthetic genes (LBGs) โดยโครงสร้างดังกล่าวจะจดจำและจับกับส่วน responsive elements บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนต่างๆ

ในงานวิจัยนี้สามารถโคลนยีน *Myc* จากข้าวสายพันธุ์ BKOS โดยมีขนาด 1,353 คู่เบส และแปลลงเป็นกรดอะมิโนได้ 451 อะมิโน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้กับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความคล้ายกับยีน R-type basic helix-loop-helix (*Plw-OSB2*) ของข้าวมากที่สุดถึง 92% โดยจากรายงานของ Sakamoto และคณะในปี 2001 พบว่า *Plw-OSB2* จะทำงานร่วมกับยีน *PI* ซึ่งเป็นกลุ่มของ Transcription factor gene จึงจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างรงควัตถุแอนโทไซยานินในข้าวได้ เช่นเดียวกันกับในข้าวโพด ซึ่งโปรตีน MYC จะจับกับโปรตีน MYB เกิดเป็นโปรตีนโครงสร้างพิเศษก่อนที่โครงสร้างดังกล่าวจะไปกระตุ้นให้ยีนโครงสร้างในวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานินทำงานจึงทำให้ข้าวโพดสามารถสร้างรงควัตถุแอนโทไซยานินได้ (Dooner *et al.*, 1991) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้สนใจที่จะศึกษากลไกในการควบคุมการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานินในข้าวพันธุ์กลาย โดยเบื้องต้นได้ ทำการศึกษาหน้าที่ของยีน *Myc* ด้วยการส่งถ่ายเข้าสู่ต้นยาสูบและพืชมุข ซึ่งตรวจพบการแสดงออกของยีน *Myc* ในระดับการ transcription และกระตุ้นให้เกิดการทำงานของยีน *Chalcone synthase (CHS)*,

anthocyanin synthase (ANS) และ *UDP-glucose-flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UGT)* เพิ่มขึ้นมากกว่าพืชในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 18) แต่เมื่อติดตามลักษณะ Phenotypes แล้วไม่พบการเปลี่ยนแปลงซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยในพืชหลายๆชนิดเช่น การศึกษาของ Cultrone และคณะในปี 2010 โดยทำการศึกษาน้ำที่ของยีน *MYC* ในส้ม พบว่า ยีน *MYC* สามารถชักนำให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีน *CHS*, *ANS* และ *UGT*

โดยเมื่อทำการส่งถ่ายยีน *Myc* ร่วมกับ *WD40* ที่โคลนได้จากข้าวพันธุกลายสายพันธุ์ BKOS สามารถชักนำให้ต้นยาสูบผลิตสารต่างๆในกลุ่มของแอนโทไซยานินได้หลากหลายเพิ่มขึ้นมากกว่าต้นยาสูบปกติ (ภาพที่ 19) แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสีของต้นยาสูบในส่วนต่างๆ ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากปัจจัยอื่นๆที่มีอิทธิพลต่อการเกิดสีของแอนโทไซยานินในยาสูบ เช่น จากการศึกษาของ Quattrocchio และคณะในปี 2006 ได้รายงานว่ ค่าความเป็นกรดต่างในแวคคิวโอลมีอิทธิพลต่อการเกิดสีของแอนโทไซยานินในพืทุเนียบโดยค่าความเป็นกรดต่างจะถูกควบคุมโดย *Myb* transcription factor gene โดยยีน *Myb* นี้จะทำให้เกิดสภาวะเป็นกรดภายในแวคคิวโอล ซึ่งในบริเวณแวคคิวโอลของยาสูบอาจจะมีค่าความเป็นกรดต่างไม่เหมาะสมจึงทำให้ไม่ปรากฏสีของแอนโทไซยานินที่เกิดจากการชักนำของยีน *Myc* และ *WD40* ที่ส่งถ่ายเข้าไป

แต่เป็นที่น่าสนใจว่าจากการศึกษาน้ำที่การทำงานของยีน *Myc* ร่วมกับยีน *WD40* ที่โคลนได้จากข้าวพันธุกลายสายพันธุ์ BKOS นั้นสามารถกระตุ้นให้พืชทดลองสามารถสร้างสารสำคัญต่างๆในกลุ่มของแอนโทไซยานินที่คุณสมบัติเป็น antioxidant ขึ้นได้ เช่น cyanidin 3-glucoside และ petunidin 3-glucoside ที่มีรายงานอย่างแพร่หลายถึงคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดบางชนิดได้แก่ มะเร็งเต้านม (Xu *et al.*, 2010) มะเร็งลำไส้ (Cooke *et al.*, 2006) cyanidin 3-galactoside ยับยั้งมะเร็งปอด (Chen *et al.*, 2006) เป็นต้น ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะประยุกต์ใช้ยีนทั้งสองที่โคลนได้จากข้าวพันธุกลายสายพันธุ์ BKOS มาปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้สร้างสารที่มีคุณสมบัติในการต้านทานต่อมะเร็งได้ต่อไปในอนาคต

6. เอกสารอ้างอิง

กนกพร สมพรไพลิน. 2545. ผลของชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินต่อการควบคุมสีในพืช

(Anthocyanin Biosynthesis Effects on Plant Color Controlling). วารสารพระจอม

เกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. ปีที่ 10. ฉบับที่ 1.

โครงสร้างพื้นฐานของ flavonoid. {ระบบออนไลน์}. แหล่งข้อมูล : www.hort.purdue.edu. (15/11/50)

อัญชัน. {ระบบออนไลน์}. แหล่งข้อมูล : www.tourthai.com/cgi-bin/gallery. (15/11/50)

Flavonoid. {ระบบออนไลน์}. แหล่งข้อมูล : www.florigene.com.au/regulation. (15/11/50)

Bohm B. A. 1986. The Minor Flavonoids. In JB Harborne, ed. The Flavonoids-Advances in Research Since 1980, Chapman and Hall, New York, p 329-397.

Buck M.J. and Atchley, W.R. 2003. Phylogenetic analysis of plant basic helix-loop-helix proteins. J. Mol. Evol. 56: 742-750

Chen P.N., Chu S.C., Chiou H.L., Kuo W.H., Chiang C.L. and Hsieh Y.S. 2006. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. Cancer Lett. Apr 28;235(2):248-59.

Cody V., Middleton E. Jr and Harborne J.B. eds. 1986. Plants Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical Pharmacological, and Structure-Activity Relationships, Vol.213, Progress in Clinical and Biological Research. Alan R. Liss, New York.

Cody V., Middleton E. Jr., Harborne J.B. and Beretz A. eds. 1988. Plants Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular, and Medical properties, Vol. 280, Progress in Clinical and Biological Research. Alan R. Liss, New York.

Cooke D., Schwarz M., Boocock D., Winterhalter P., Steward W.P., Gescher A.J. and Marczylo T.H. 2006. Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the ApcMin mouse model of intestinal carcinogenesis--relationship with tissue anthocyanin levels. *Int J Cancer*. 1;119(9):2213-20

Cultrone A., Cotroneo S. P. and Recupero G.R. 2010. Cloning and molecular characterization of R2-R3-MYB and bHLH-MYC transcription factors from *Citrus sinensis*. *Tree Genetics&Genomes*. 6:101-112.

Dooner H.K., Robbins T.P. and Jorgensen R.A. 1991. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* 25:173-199.

Duek P. D. and C. Fankhauser. 2005. bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signaling. *TRENDS in Plant Science* Vol.10 No.2: 51-54

Heim M.A. 2003. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular Biology Evolution*. 20: 735-747

Kaufman Peter B, Leland J. Csek, Sara Warbes, Jame A. Duke and Harry L. Brielmann.

1999. Natural Products from Plants. CRS press LLC p. 22-23.

Ludwig, S. 1989. *Lc*, a member of the maize *R* gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcription activators and contains the *myc* homology region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 7092-7096

Martin C, Gerats T. 1993. Control of Pigment Biosynthesis Genes during Petal Development. *Plants Cell* 5: 1253-1264.

Payne C.T. 2000. GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with *GL1* and *TTG1*. *Genetics* 156: 1349–1362

Quattrocchio F. 1998. Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. *Plant Journal*. 13: 475–488

Quattrocchio F., Verweij W., Kroon A., Spelt C., Mol J. and Koes R. 2006. PH4 of Petunia Is an R2R3 MYB Protein That Activates Vacuolar Acidification through Interactions with Basic-Helix-Loop-Helix Transcription Factors of the Anthocyanin Pathway. *Plant Cell*.18: 1274-1291.

Ramsay, N.A. 2003. Two basic-helix-loop-helix genes (*MYC-146* and *GL3*) from *Arabidopsis* can activate anthocyanin biosynthesis in a white-flowered *Matthiola incana* mutant. *Plant Molecular Biology*. 52: 679–688

Ramsay N. A. and B. J. Glover. 2005. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *TRENDS in Plant Science* Vol.10 No.2: 63-70.

Stommel J. R., . Lightbourn G. J., . Winkel B. S. and Griesbach R. J. 2009. Transcription Factor Families Regulate the Anthocyanin Biosynthetic Pathway in *Capsicum annuum*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134:244-251.

Toguri T., N. Umemoto, O. Kobayashi and T. Ohtani. 1993. Activation of anthocyanin Synthesis Gene by White Light in eggplant Hypocotyl Tissue, and Identification of an Inducible P-450 cDNA. *Plant Molecular Biol.* 23: 933-946.

Xu M., Bower A K., Wang S., Frank A. J., Chen G., Ding M., Wang S., Shi X. and Luo J. 2010. Cyanidin-3-Glucoside inhibits ethanol-induced invasion of breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Mol. Cancer.* 9:285

Yamazaki M., Y. Makita, K. Springob and K. Saito. 2003. Regulatory mechanisms for anthocyanin biosynthesis in chemotypes of *Perilla frutescens* var. *crispa*. *Biochemical Engineering Journal.* 14: 191–197

Induction of anthocyanin accumulation in Thai jasmine rice mutant by low-energy ion beam

Ruttaporn Chundet^{1*}, Somboon Anuntalabhochai²

¹ Division of Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand

² Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

* Corresponding author, e-mail: ruttaporn@mju.ac.th, auanmolec@gmail.com

Received: / Accepted: / Published:

Using a low-energy N^+ / N_2^+ ion beam, a mutant variety of Thai jasmine rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML105) was created which had distinctive black seeds, was short-in-stature and was photoperiod insensitive. To characterize the biochemical origin of the black seeds color phenotype, flavonoid and anthocyanin accumulation levels were measured as was the expression of genes involved in the anthocyanin biosynthesis pathway. Anthocyanin synthase, an enzyme not expressed in the original variety, was found to be expressed in all mutant tissues in addition to the two enzymes *F3'H* and *F3'5'H* which initiate alternative color pathways. The expression of *MYC* or *Ra*, a known anthocyanin upregulator, in the mutant is proposed to be caused by the inactivation of a repressor gene present in the original variety which was inactivated in the mutant by the ion beam bombardment. The increased production of anthocyanin, a known antioxidant, and the additional growing season due to high-light insensitivity mark this mutant as a possible new improved crop variety for Thai rice cultivation.

Keywords: low energy ion-beam, *Oryza sativa* L. cv. KDML105, , *F3'H*, *F3'5'H*, *DFR*, *MYC*.

INTRODUCTION

To characterize a potentially economically important mutant variety of Thai jasmine rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML105) created using low-energy ion beam bombardment, we examined the morphological and physiological features, flavonoid and anthocyanin accumulation levels, and explored the expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis. The progenitor of this mutant variety of Thai jasmine rice called Khao Hom Mali 105 (KDML105) is widely valued due to its long grain, appealing flavor and good texture, which marks it as one of the key varieties for export from Thailand [1]. Although this variety is the reportedly highest quality rice available [2], it has several characteristics which could be improved such as photo sensitivity which limits growth to short daylight seasons, long stalks which can be damaged by high winds, relatively low yield as compared to other rice varieties and a lack of resistance to pathogens [3].

In an effort to create additional varieties of jasmine rice with novel characteristics, seeds were bombarded with low-energy N^+ / N_2^+ ions in vacuum as a mechanism to induce mutation. Such ion beams have been characterized as having a wide mutation spectrum with lower damage to living tissue and a higher mutation rate in comparison to other mutation methods used in plants [4,5].

The mutant described herein had a modified anthocyanin biochemical pathway leading to an increased accumulation of anthocyanin in various tissues of the mutant jasmine rice. Anthocyanins are water-soluble pigments produced in many vascular plants which accumulate in vacuoles[6], and are involved in a broad range of functions[7,8]. The first enzymes in the anthocyanin pathway are chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI), and flavanone-3-hydroxylase (F3H), which produce chalcones, flavanones and dihydroflavonols, respectively. From these anthocyanins 3-O-glycosides are synthesized from dihydroflavonols by the consecutive reactions catalyzed by dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*), anthocyanin synthase (*ANS*) and UDP-glucose flavonol 3-O-glucosyltransferase [9]. The expression of anthocyanins biosynthesis genes is regulated at the transcription level and consequently, the pigmentation pattern must be specified by expression of

the regulatory genes [10], so both differential expression of structural genes and the modification of regulatory genes could be responsible for modified anthocyanin expression patterns.

1. Materials and methods

1.1 Ion beam bombardment

To prepare the Thai jasmine rice seeds for bombardment, about 4,800 seed coats were carefully peeled to avoid damage to the embryo tissues. All of the peeled seeds were then placed into the sample holder.. The rice seeds were positioned so that their embryonic end was exposed to the ion beam line. The nitrogen ion beam composed of both atomic (N) and molecular (N₂) ions was used to bombard the seeds at an accelerating voltage of 60 kV where the energy of the nitrogen ions was 60 keV with fluences of 4×10^{16} ions cm⁻² using the protocol described by Anuntalabhochai et.al., 2004.

1.2 Scanning electron microscopy

To image the surface of the bombarded rice, a scanning electron microscope (SEM) was used where the bombarded and control rice seeds were fixed in glutaraldehyde, dehydrated through an alcohol-acetone series, dried in a critical-point drying apparatus, mounted on stubs and coated with gold in a sputter coater [11]. The specimens were observed and photographed with a JEOL 5800 LV SEM operating at a 15-kV accelerating voltage.

1.3 Plant materials

The seeds of Thai jasmine rice (*Oryza sativa* indica KDML105) used in this study were kindly provided by the Agronomy Department, Agriculture Faculty, Chiang Mai University, Thailand. After being bombarded, the seeds were kept moist overnight until the following day, when the seeds were planted in potting soil, and allowed to grow for three to four weeks until attaining the rice seedling growth stage. From these rice seedlings, which were around 15cm in height, samples were selected

and transplanted to plastic pots for two months. The cultivations were carried out during the July to December season. A mutant from the bombarded seed sample which had distinctive black seeds and was short-in-stature was selected for analysis.

1.4 Preparation of rice extract and anthocyanin analysis

Leaves, roots, auricles and seeds from the M5 mutant and control were harvested and stored at -80°C . Each sample was ground to a fine powder in liquid N_2 and any anthocyanin present was extracted using 1% HCl in methanol or 70% (w/v) acetone containing 0.1% (w/v) ascorbate, respectively, for 12 h at 4°C in the dark. The total anthocyanin solutions were then extracted using Folch partitioning [12] and the anthocyanin absorbance peak was measured at 530 to 540 nm.

1.5 Analysis of gene expression (RT-PCR)

Total RNA was isolated from seedlings and multiple body parts of mature M5 mutants and controls using the manufacturer's recommended Trizol reagent protocol (Invitrogen). For each RNA sample, absorption at 260 nm was measured and RNA concentration calculated as $A_{260} \times 40 \text{ } (\mu\text{g mL}^{-1}) \times$ dilution factors. The quality of each RNA sample was checked using agarose gel electrophoresis. From this RNA pool, cDNA was synthesized using the First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). To test for the presence of six mRNA transcripts involved in the anthocyanin biochemical pathway (*Ra*, *F3'H*, *F3'5'H*, *DFR*, *ANS* and *Actin*), primer sequences (Table 1.) were designed to amplify internal segments of these genes.

Table 1. Primer sequences used in RT-PCR

<i>MYC, Ra</i>	Forward	5'-ATGGCTCAGAATCATGAGAGGGTG-3'
	Reverse	5'-TCAGCACTTACCAGCAATTTTC-3'
<i>F3'H</i>	Forward	5'-GGTGATCGGCGCCTCGAGAATC-3'
	Reverse	5'-GGCATGTGTGGACATGGACCC-5'
<i>F3'5'H</i>	Forward	5'-CTACAAGATGCGTTTCGTGTATGC-3'
	Reverse	5'-CAAAACAAACACACTTCATTCATC-3'
<i>DFR</i>	Forward	5'-CGATTGTCTTGGAGACGAAG-3'
	Reverse	5'-GACCCACGAATCAGAAGAAGG-3'
<i>ANS</i>	Forward	5'-CCAGCCTCCCTTCATCCAATCC-3'
	Reverse	5'-ATTCGAGCTCGGTACCCGGGG-3'
<i>Actin</i>	Forward	5'-CTTTGATTTCTCATAAGGTGCC-3'
	Reverse	5'-CTAAATCCCTTAACGAGGATCC-3'

2. Results

2.1 Effect of ion beam bombardment on the rice embryo cell surface

Due to a high linear energy transfer, ion beam technology has been used to increase the mutation frequency in a wide spectrum of plant species [13]. The mutation mechanism is through ablation of the cell surface by the positively charged nitrogen ions which perforate the seed allowing cascade ions to penetrate the cell without causing extensive damage to the interior of the cell [14,15]. The mutant jasmine rice seeds generated by bombardment with the low-energy N^+ / N_2^+ ion beam show a characteristic sputtering of the embryo cell envelope (Fig. 1). From this image, it is clear that the

surface topography has been significantly altered and the treated cell surfaces are now much rougher with several surface intrusions visible in the SEM.

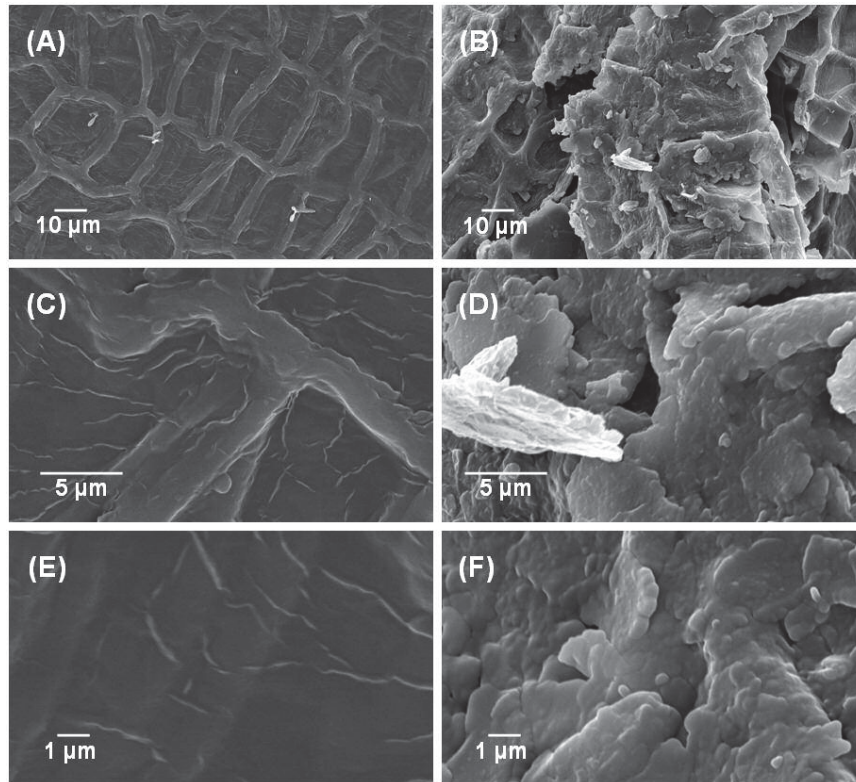


Fig. 1. The morphological effect of ion-beam bombardment on seed embryo cells of jasmine rice.

The six figures contain Scanning Electron Microscope (SEM) images of untreated embryo cell surfaces of KDML105 at x1,000 (A), x5,000 (C) and x10,000 (E) times magnification, and embryo cell surfaces bombarded with N⁺ / N₂⁺ ions at x1,000 (B), x5,000 (D) and x10,000 (F) times magnification. The treatment conditions were an applied voltage of 60 keV with a dose of 2×10^{16} ions cm⁻².

2.2 Mutant jasmine rice morphological characteristics

The mutant jasmine rice presented here exhibited several striking morphological changes from that of the wild-type variety. These changes include a decreased height of approximately 80 to 90 cm

from that of the wild-type which grows to 1.2-1.5 meters, an insensitivity to high light intensity which enables it to grow in the middle of the Thai summer (March to June), and a deep purple color in multiple tissues of the plant. (Fig. 2A) and (Fig. 2B) present the appearance of the normal wild-type (WT) rice plant and the deep purple mutant variety respectively. As can be seen in these images, the mutant variety can be easily distinguished from the wild-type by both the color of the rice sheaf and the plant stalks. The purple accumulation occurs in the stalk (Fig. 2C), leaf (Fig. 2D), and in the immature rice seeds where there is a slight build up anthocyanin as compared to the WT (Fig. 2E). This becomes significantly more pronounced in the mature seeds both in the husk (Fig. 2F) and after being husked (Fig. 2G) as compared to the progenitor variety. In addition, the buildup of purple color in the cells is clearly visible in the mutant auricle (Fig. 2I) versus the wild-type (Fig. 2H). Interestingly, the only tissue of the mutant variety which does not show a purple signature is in the young roots, but in older established roots the purple color is clearly present (Fig. 2K).

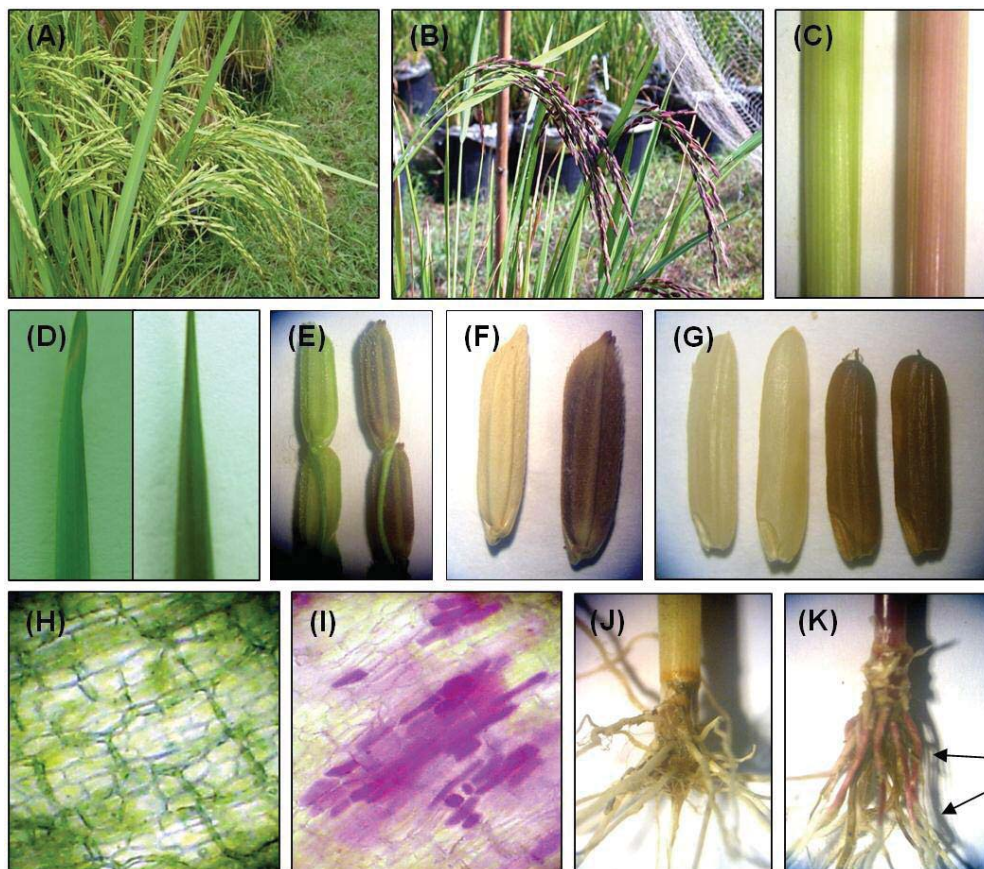


Fig. 2. Morphological mutants in KDML105 jasmine rice induced with a low-energy N^+ / N_2^+ ion-beam. Figs (A) and (B) illustrate the wild-type (WT) plant versus the mutant (BKOS) phenotype. The mutant has a purple color in the plant stem (C), Leaf (D), immature-seeds (E), husked (F) and de-husked mature seeds (G), in the normal auricle (H) versus mutant auricle (I) which shows the accumulation of purple inside the cells, and the normal root (J) versus the mutant roots structures (K). Note the lack of purple accumulation in the young roots versus older roots of the mutant BKOS phenotype.

2.3 Accumulation of anthocyanin

The presence of anthocyanin was tested in the leaves, young and old roots, auricles and seeds from the M5 mutant and control. In each case, the measured absorbance peaks for the different tissues (Fig. 3) showed that the purple color accumulation was accompanied by the presence of a chemical with the correct absorbance peak at 530 to 540 nm.

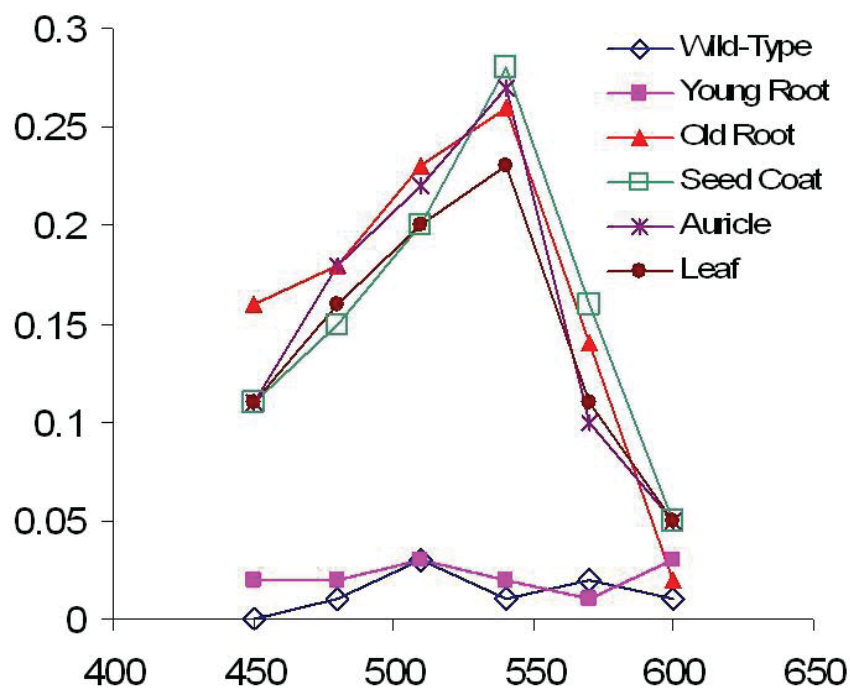


Fig. 3. Anthocyanin levels in various body tissues.

2.4 Biochemical regulation of anthocyanin production

To determine which proteins in the anthocyanin biochemical pathway were differentially expressed in the mutant versus the wild type, the expression levels of four core enzymes of this pathway (*F3'H*, *F3'5'H*, *DFR*, and *ANS*), a known regulator of anthocyanin production MYC (*Ra*) and an internal standard control (*Actin*) were measured. As shown in (Fig. 5), both *DFR* and *ANS* are critical steps in the anthocyanin pathway, and *DFR* was found to be expressed in some tissues of the wild type and all tissues of the mutant (Fig. 4), while *ANS* was not expressed in the wild type at all and was highly expressed in all mutant tissues. Although the proteins *F3'H* and *F3'5'H* are not required for activation of the anthocyanin pathway, both were active in the mutant type and not in the wild type. The expression of protein *Ra* which is a known activator of the anthocyanin pathway [16] was found to be differentially expressed in the wild type versus the mutant.

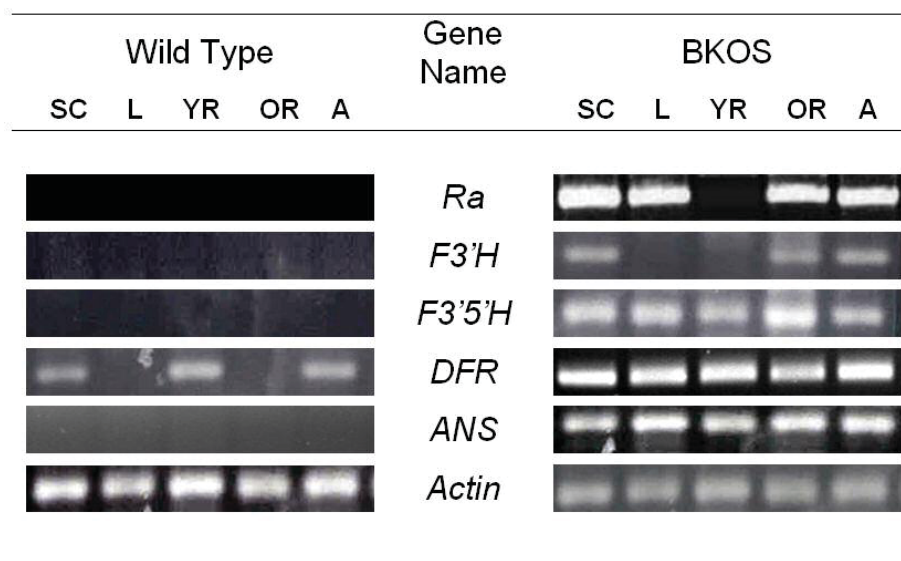


Fig. 4. Semi-quantitative RT-PCR analysis used to detect the expression of genes in the anthocyanin biosynthesis pathway. Expression was tested in tissues of the seed coat (SC), leaf (L), young root (YR), old root (OR) and auricle (A) for both the wild-type and mutant BKOS jasmine rice.

Discussion

The use of low-energy ion beams to induce mutation in serial crops has proven to be an effective method of mutation due to a high linear energy transfer and relative biological effectiveness as compared to mutation using gamma rays. During ion beam implantation, in addition to energy absorption (as is deposited with gamma-ray and X-ray radiation), there is also mass deposition and charge exchange [17,18]. This mass and charge deposition enables a low dose of irradiation to damage the double chain of DNA causing large-scale deletions [19] in addition to point mutations [20]. To capitalize on this ability to mutate plants while retaining viability, nitrogen ions were used to bombard Thai Jasmine rice seeds and a mutant with a bright purple phenotype due to increased levels of anthocyanin was created.

The buildup of anthocyanin in the mutant Thai jasmine rice KDML105 due to the activation of the anthocyanin biochemical pathway is most likely due to the activation of the *Ra* gene which is active in the mutant jasmine rice and is known to activate anthocyanin production in Maize [21]. Since ion beam bombardment predominantly leads to loss of function mutations, the most likely explanation for the activation of *MYC* or *Ra* in the mutant is due to the knockout of a repressor gene for *Ra* as shown at the top of (Fig. 5). The expression of *ANS* in the mutant variety is the second critical requirement for anthocyanin production since it is not expressed in the original variety and without *ANS* the leucoanthocyanidins cannot be converted to the colored cyanin products. Also since the protein product dihydrokaempferol is not present in the wild type (data not shown), this points to a breakdown of the initiation of the biochemical pathway which is why the *Ra* activator was chosen to be tested.

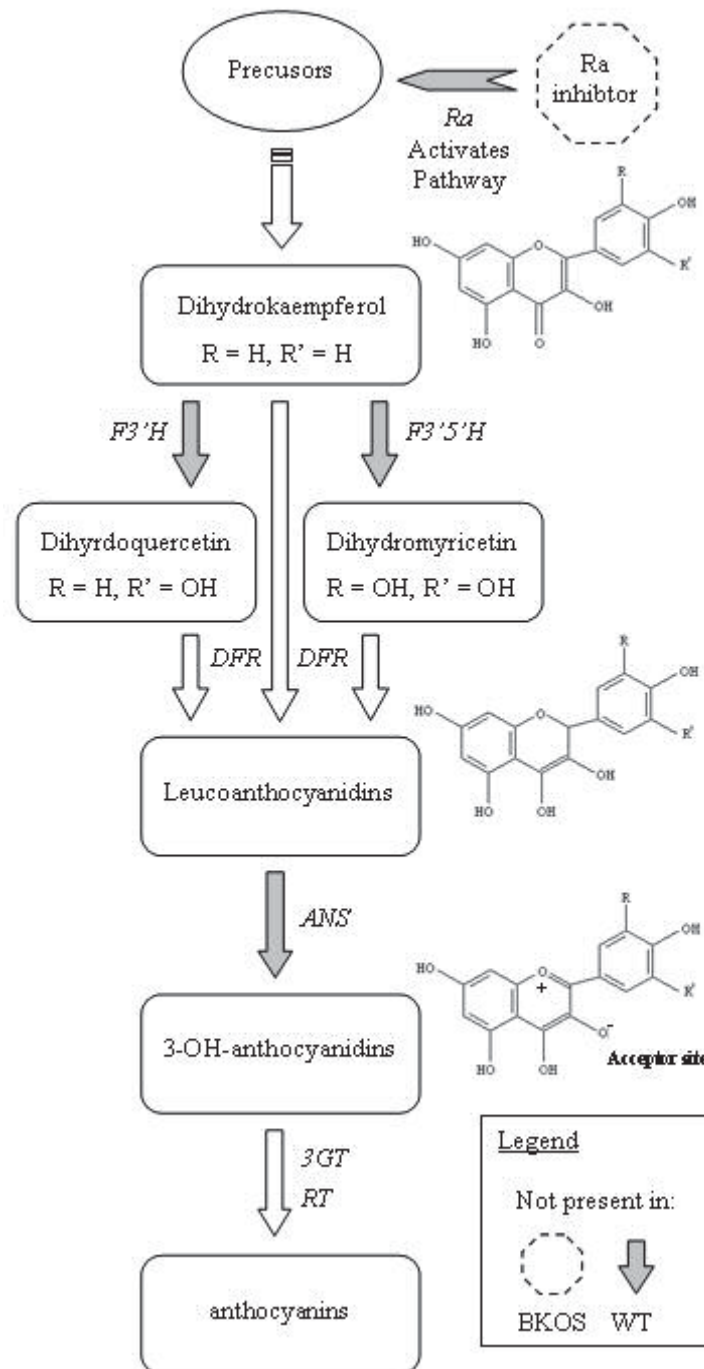


Fig. 5. Anthocyanin biosynthesis pathway. Dihydrokaempferol is the base product for the orange color pathway. Two additional pathways proceed using the same biochemical steps after dihydrokaempferol is modified using *F3'H* (red color) or *F3'5'H* (blue color) by adding extra OH groups at residues R and/or R'. Proteins shaded gray are not expressed in the WT and the predicted *Ra* repressor protein is not expressed in BKOS.

Horticultural approaches to improve the nutritional quality of crops provide an inexpensive complement to medical programs and nutritional supplementation to prevent human disease. In particular anthocyanins are known to be effective antioxidants capable of free radical scavenging [22,23]. Besides antioxidant activity, anthocyanins are considered important substances in cancer prevention as they have been shown to inhibit the growth of cancer cells in multiple tissues [24,25]. To capitalize on these beneficial properties, the increased production of anthocyanins has become a highly sought trait in such plants as the tomato [26] and Shiraz grape berries [27]. Although the anthocyanin biosynthetic pathway has been completely elucidated, attempts to modify anthocyanin biosynthesis have met with varying degrees of success [28] showing that multiple regulatory proteins may act synergistically [29,30]. The increased anthocyanin production in a staple crop such as rice could provide an effective means to provide the benefit of anthocyanins to a wide range of economically disadvantaged people otherwise unable to afford the costs of nutritional supplementation. The mutant Thai jasmine rice described here has the potential to be just such a staple crop which could provide another direction for the growing interest in the development of agronomically important food crops with optimized levels and composition of anthocyanins.

This research was conducted using funding from the following sources: The Thailand Research Fund (TRF) and the National Research Council of Thailand (NRCT).

- 1 Wongpornchai S, Dumri K, Jongkaewwattana S, et al. Effects of drying methods and storage time on the aroma and milling quality of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Khao Dawk Mali 105. *Food Chem*, 2004, 87: 407-414.
- 2 Leelayuthsoontorn P, Thipayarat A, Textural and morphological changes of Jasmine rice under various elevated cooking conditions. *Food Chem*, 2006, 96: 606-613.
- 3 Ronald P C, Molecular basis of disease resistance in rice. *Plant Mol Biol*, 1997, 35: 179-186.
- 4 Morishita T, Yamaguchi H, Degi K, et al. Dose response and mutation induction by ion beam irradiation in buckwheat. *Nucl Instrum Methods*, 2003, 206: 565-569.
- 5 Anuntalabhochai S, Chandej R, Phanchaisri B, et al. Mutation Induction In Thai Purple Rice By Low-Energy Ion Beam. *Proceedings of the Ninth Asia Pacific Physics Conference (9th APPC)*, 2004, Vietnam, pp.1-6.
- 6 Marty F, Plant Vacuoles. *Plant Cell*, 1999, 11: 587-599
- 7 Dixon R A, Steele C L, Flavonoids and isoflavonoids-a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci*, 1999, 4: 394-400.
- 8 Winkle-Shirley B, Flavonoid biosynthesis: A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol*, 2001, 126: 485-493.
- 9 Dixon R A, Palva N L, Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 1995,7: 1085-1097.
- 10 Lin-Wang K, Bolitho K, Grafton K, et al. An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 1-17
- 11 Maiti R K, Hernandez-Pineiro J L, Valdez-Marroquin M, Seed ultrastructure and germination of some species of Cactaceae. *Phyton*, 1994, 55: 97-105.

- 12 Folch J, Less M, Sloane-Stanley G H B,: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem, 1951, **226**: 497–509.
- 13 Yu Z, Deng J, He J, et al. Mutation breeding by ion implantation. Nucl Instr Meth Phys Res, 1991, B 59/60: 705-708.
- 14 Vilaithong T, Yu L D, Alisi C, et al. A study of low-energy ion beam effects on outer plant cell structure for exogenous macromolecule transferring. Surf Coat Tech, 2000, 128/129: 133-138.
- 15 Yu L D, Phanchaisri B, Apavatjirut P, et al. Some investigations of ion bombardment effects on plant cell wall surfaces. Surf Coat Tech, 2002, 158/159: 146–150.
- 16 Schwechheimer C, Zourelidou M, Bevan M W, Plant Transcription Factor Studies. Annu Rev Plant Phys, 1998, 49: 127–50.
- 17 Yu Z L, Shao C L, Dose effect of the tyrosine sample implanted by a low energy N⁺ ion beam. Radiat Phys Chem, 1994, 43: 349–351.
- 18 Shao C L, Yu Z L, Mass deposition in tyrosine irradiated by a N⁺ ion. Radiat Phys Chem, 1997, 50: 595–599.
- 19 Zengliang Y, Jianguo D, Jianjun H. et al. Mutation breeding by ion implantation. Nucl Instr Meth Phys Res, 1991, B 59/60: 705-708.
- 20 Yang J B, Wu L J, Li L, et al. Sequence analysis of *lacZ*—mutations induced by ion beam irradiation in double-stranded M13mp18DNA. Sci China ser C, 1997, 40:107-112.
- 21 Bovy A, de Vos R, Kemper M, et al. High-Flavonol Tomatoes Resulting from the Heterologous Expression of the Maize Transcription Factor Genes *LC* and *C1*, Plant Cell, 2002, 14, 2509–2526.
- 22 Rice-Evans C, Flavonoid Antioxidants. Curr Med Chem, 2001, 8: 797-807.

- 23 Einbond L S, Reynertson K A, Luo X-D, et al. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chem*, 2004, 84: 23–28.
- 24 Geeta L, Minnie M, Cuiwei Z, et al. Anthocyanin-Rich Extracts Inhibit Multiple Biomarkers of Colon Cancer in Rats. *Nutr Cancer*, 2006, 54: 84-93.
- 25 Manach C, Scalbert A, Morand C, et al. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79(5): 727-747.
- 26 Butelli E, Titta L, Giorgio M, et al. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nat Biotechnol*, 2008, 26:1301-1308.
- 27 Boss P K, Davies C, Robinson S P, et al. Analysis of the Expression of Anthocyanin Pathway Genes in Developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz Grape Berries and the Implications for Pathway Regulation. *Plant Physiol*, 1996, 111: 1059-1066.
- 28 Peer W A, Brown D E, Tague B W, et al. Flavonoid Accumulation Patterns of Transparent Testa Mutants of Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2001, 126: 536–548.
- 29 Verhoeven M E, Bovy A, Collins G, et al. Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway. *J Exp Bot*, 2002, 53(377): 2099-2106.
- 30 Turnbull J J, Nakajima J-i, Welford R W D, et al. Mechanistic Studies on Three 2-Oxoglutarate-dependent Oxygenases of Flavonoid Biosynthesis. *J Biol Chem*, 2004, 279(2): 1206-1216.