



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การประยุกต์ใช้ลำไอออนพลังงานต่ำในการปรับปรุงคุณภาพพันธุ์
ข้าวหอมมะลิ 105 (*Oryza sativa indica* KDML 105) และผักกาดหอมห่อ
(*Lactuna sativa*)

(An Application of Low Energy Ion Beam for quality improvement in rice
(*Oryza sativa indica* KDML 105) and lettuce (*Lactuna sativa*))

โดย รศ. ดร. สมบูรณ์ อันทลามาชัย

ตุลาคม 2551

สัญญาเลขที่ RMU4880036

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประยุกต์ใช้ลำไยอินทรีย์พลังงานต่ำในการปรับปรุงคุณภาพ
พันธุ์ข้าวหอมมะลิ 105 (*Oryza sativa indica* KDML 105) และผักกาดหอม
ห่อ (*Lactuca sativa*)

ผู้วิจัย สังกัด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยโครงการการประยุกต์ใช้ลำไยออนไลน์พลังงานต่ำในการปรับปรุงคุณภาพพันธุ์ข้าวหอมมะลิ 105 (*Oryza sativa indica* KDML 105) และผักกาดหอม (Lactuna sativa) เป็นผลงานในลักษณะสหสาขาวิชา (multidisciplinary) โดยเกิดจากความร่วมมือหลายสาขา ได้แก่ ฟิสิกส์ เทคโนโลยีชีวภาพ, ชีววิทยา และเกษตร ดังนั้นโครงการจึงใคร่ขอบคุณบุคคลและองค์กรต่างๆ ไว้ในที่นี้ดังนี้

ศาสตราจารย์ ดร. เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม และ รองศาสตราจารย์ ดร.ศันสนีย์ จำจด ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้คำแนะนำ สถานที่ และบุคลากรช่วยเหลือในการตอนและผสมพันธุ์ข้าว

ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร. ถิรพัฒน์ วิลัยทอง และ คุณศจี วิลัยทอง ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการปลูกพืชตัวอย่างในการทดลอง

ภาควิชาชีววิทยาที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ

บุคลากรในอาคารวิจัยนิวตรอนพลังงานสูงที่ให้ความร่วมมือและช่วยเหลือในคานธการมาด้วยดีโดยตลอดมา

สุดท้ายนี้ใคร่ขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) (Thailand Research Fund) ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในโครงการจนสามารถทำให้คณะผู้วิจัยเริ่มเห็นศักยภาพของเทคนิคในการที่จะประยุกต์ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์ และงานทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้ในอนาคตอย่างเป็นรูปธรรม

บทคัดย่อ

- รหัสโครงการ** : MU4880036
- ชื่อโครงการ** : การประยุกต์ใช้ลำไอออนพลังงานต่ำในการปรับปรุงคุณภาพพันธุ์ข้าวหอมมะลิ 105 (*Oryza sativa indica* KDML 105) และผักกาดหอมห่อ (*Lactuca sativa*)
- ชื่อนักวิจัย** : รองศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโกชัย
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
เชียงใหม่ 50200
- E-mail Address** : soanu.1@gmail.com
- ระยะเวลา** : 3 ปี (2549-2551)
- วัตถุประสงค์** : เพื่อหาลักษณะเฉพาะ บ่งบอก และวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในข้าวหอมมะลิพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำด้วยลำไอออนพลังงานต่ำ เพื่อประยุกต์เทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำในการชักนำการกลายพันธุ์พืชต่างชนิด ได้แก่ ผักสลัด แดงกวา และพริก รวมทั้งแบคทีเรียด้วย
- วิธีการทดลอง** : ระดมยิงเมล็ดของข้าวหอมมะลิ 105 (*Oryza sativa indica* KDML 105) ด้วยไนโตรเจนไอออนที่ fluences ในช่วง $2-10 \times 10^{16}$ ions/cm² ที่พลังงาน 60 keV สุดท้ายได้ข้าวหอมมะลิพันธุ์กลาย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ TKOS, PKOS และ BKOS ซึ่งมีลักษณะภายนอกที่แตกต่างจากพ่อแม่อย่างเด่นชัด สำหรับ BKOS ถูกเลือกเพื่อมาหาลักษณะเฉพาะ รวมทั้งค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (anthocyanin biosynthesis) ในข้าวสายพันธุ์นี้ รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติการกำจัดสารอนุมูลอิสระ (antioxidant property) ต่อมาได้เลือกใช้เทคนิค HAT RAPD เพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์กลายและพ่อแม่ หลังจากนั้นได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง SCAR และ microsatellite เพื่อช่วยในการบ่งบอกสายพันธุ์ BKOS.
- ลำดับต่อมาได้ประยุกต์ไนโตรเจนไอออนในการระดมยิงเมล็ดของพืชอื่นๆ ได้แก่ ผักสลัด แดงกวา และพริกเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ให้ได้ลักษณะดีโดยเงื่อนไขที่ใช้คือ สำหรับผักสลัดใช้พลังงาน 50 keV ที่ไอออนปริมาณ 6×10^{16} และ 1×10^{17} ions/cm² สำหรับแดงและพริกต่างใช้พลังงานที่ 60 keV แต่ใช้ปริมาณไอออนในการระดมยิงต่างกันคือสำหรับแดง ใช้ปริมาณ $2, 6, 8 \times 10^{17}$ ions/cm² และที่ปริมาณ 6×10^{16} และ 1×10^{17} ions/cm² ใช้สำหรับพริก บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอก การรอด รวมทั้งลักษณะภายนอกต่างๆที่เปลี่ยนแปลงไป

ผลการทดลอง

ท้ายที่สุดประสบความสำเร็จในการประยุกต์เทคนิคลำไออนพลังงานต่ำในการค้นหา ยีนที่ต้องการในแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* อีกด้วย

: ในการทดลองนี้มี 2 ส่วน ส่วนแรกการประยุกต์นำเทคนิคลำไออนพลังงานต่ำในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 และในที่สุดได้ข้าวพันธุ์กลาย จำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ TKOS, PKOS and BKOS โดยที่ทั้ง TKOS และ PKOS มีคุณสมบัติที่ไวแสง นอกจากนั้น TKOS มีลักษณะสูงกว่าข้าวดอกมะลิ 105 ในขณะที่ PKOS มีลักษณะที่เตี้ยกว่า (semi-dwarf) ส่วนสายพันธุ์ BKOS มีลักษณะทั้งไม่ไวแสง ต้นเตี้ย และมีการสะสมของรงควัตถุ anthocyanin ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของต้น เช่น ราก ใบ ต้น เปลือกและเยื่อหุ้มเมล็ด ในรายงานที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากข้าว BKOS สามารถที่จะกำจัดสารอนุมูลอิสระมาตรฐานเช่น DDPH ได้ดี ดังนั้นจึงสนใจที่จะศึกษายีน F3H F3 5 H, DRF และ ASN ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ anthocyanin ผลการศึกษาพบว่า การแสดงออก (transcripts) ของทุกยีนในข้าว BKOS มีมากกว่าของยีนในข้าว KDML 105 ด้วยเหตุนี้ชุดของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ anthocyanin ได้แก่ MYB, MYC, WD 40, F3H F'3H, DFR ANS UFGT และ 5 GT จึงถูกโคลนจากข้าว BKOS โดยพบว่า MYB, MYC และ WD 40 ซึ่งเป็น regulatory genes จะมีความเหมือนกับยีนในข้าวญี่ปุ่นด้วยเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 86, 89 และ 100% ตามลำดับ ในขณะที่ F3H, F'3H, DFR, ANS, UFGT และ 5 GT ซึ่งเป็น structural genes มีความเหมือนกับยีนในกลุ่มเดียวกันกับพืชชนิดอื่นๆ ที่ความเหมือน 92, 81, 75, 89, 92, 86% ตามลำดับ สำหรับกลไกหน้าที่ของยีนเหล่านี้จะอยู่ระหว่างการศึกษาต่อไป

ในการบอกความแตกต่างระหว่างข้าวสายพันธุ์กลายทั้งหมด เทคนิค HAT RAPD marker ถูกเลือกเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ จากการใช้ 19 ไพโรมเมอร์ พบไพโรมเมอร์ OPI 11 ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1.4 กิโลเบส ที่พบเฉพาะในข้าว BKOS และข้าวสายพันธุ์ญี่ปุ่น ต่อมาได้ออกแบบคู่ไพโรมเมอร์ (BF1 และ BR1) โดยอาศัยลำดับเบสภายในแถบดีเอ็นเอขนาด 1.4 กิโลเบส เพื่อบ่งบอกจำเพาะสำหรับสายพันธุ์ BKOS หลังการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ พบแถบดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบส ในข้าว BKOS และข้าวญี่ปุ่น โดยที่ความเข้มที่พบใน BKOS มากกว่าในข้าวญี่ปุ่นประมาณ 5 เท่า แต่หลังจากใช้ไพโรมเมอร์ microsatellite (OSR28F และ OSR28R) จะบอกความแตกต่างระหว่างข้าว BKOS และข้าวญี่ปุ่นได้ ดังนั้นด้วย 2 วิธีจะสามารถบ่งบอกข้าว BKOS ได้ ซึ่งจะใช้เพื่อการรับรองพันธุ์ข้าวนี้

หลังจากได้โคลนยีนทั้ง *rab 5* และ *rab 7* จากข้าวขาวดอกมะลิ 105 และพบว่ายีนที่มีการแสดงออกสูงสุดในเนื้อเยื่อราก ดังได้รายงานไว้ในคราวที่แล้ว ต่อมาจากการทดลองครั้งนี้พบอีกว่ายีนทั้งคู่ยังมีแสดงออกสูงในระยะเสื่อมสลายของใบข้าว ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจะเป็นการทดสอบหน้าที่ของยีนคู่นี้ในใบอ่อนแต่จะอาศัยปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อ ได้แก่ ABA, salt stress รวมทั้งการใช้เชื้อก่อโรค (pathogen) เพื่อการชักนำทดสอบ

ในส่วนที่ 2 ของงาน ได้ประยุกต์ลำไออนพลังงานต่ำเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชผักอื่นๆ ได้แก่ ผักกาดหอมหรือผักสลัด 5 สายพันธุ์, แตงกวา และพริก เจื่อนในการระดมยิงเมล็ดผักสลัดได้แก่ 50 keV ที่ไออนปริมาณ 6×10^{16} และ 1×10^{17} ions/cm² สำหรับแตงและพริกต่างใช้พลังงานที่ 60 keV แต่ใช้ปริมาณไออนในการระดมยิงต่างกันคือสำหรับแตง ใช้ปริมาณ $2, 6, 8 \times 10^{17}$ ions/cm² โดยที่การยิงพริกใช้ปริมาณ 6×10^{16} และ 1×10^{17} ions/cm²

ในการระดมยิงเมล็ดผักสลัดในครั้งนี้เป็นครั้งที่ 4 เนื่องจากที่ผ่านมายังไม่พบลักษณะดีที่ต้องการ ผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกที่ปริมาณไออนที่สูง จะน้อยกว่าที่ปริมาณต่ำ และชุดควบคุม แต่จำนวนต้นที่มีลักษณะผิดปกติพบมากกว่า (2.77%) ในขณะที่พบในชุดที่ใช้ไออนปริมาณต่ำกว่า (0.77%) โดยลักษณะที่พบมีทั้ง การเจริญผิดปกติ (ต้นเล็ก), ใบสีขาว, ทรงพุ่มผิดปกติ อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยความสูงของชุดการทดลองไม่แตกต่างกัน

สำหรับแตง เจื่อนไขที่ใช้ในการระดมยิงไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของทุกกลุ่ม และค่าเฉลี่ยของความสูงก็ไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงต่อลักษณะภายนอกอย่างเด่นชัด ได้แก่การเปลี่ยนแปลง (เปลี่ยนจากเกสรเพศตัวเมียกลายเป็นเพศผู้) รวมทั้งขนาดของผลแตงจะสั้นกลมกว่า แต่วัสดุไม่แตกต่าง จากชุดควบคุม

สำหรับพริก ในเจื่อนไขที่ใช้ครั้งนี้ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอก, ความสูง และทรงพุ่มของต้นพริกในทุกการทดลอง สำหรับต้นพริกที่เกิดการเปลี่ยนแปลงจะพบในกลุ่ม 6×10^{16} ions/cm² เช่น ต้นเตี้ย รวมทั้งพบต้น(ในรุ่น M1)ที่เกิดโรคอันเนื่องมาจากเชื้อราก่อโรค *Colletotrichum* น้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ ดังนั้นจะปลูกในรุ่น M2 และ M3 เพื่อที่จะทดสอบคุณสมบัติในการต้านทานโรคดังกล่าวต่อไป

ท้ายที่สุดได้ประสบความสำเร็จในการใช้เทคนิคลำไออนพลังงานต่ำในการโคลนยีนจาก *Bacillus licheniformis* เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค *Collectotrichum spp* ที่เป็นสาเหตุของโรค anthracnose ในปทุมมาได้ สำหรับยุทธวิธีและการดำเนินการนำเสนอในที่นี้ด้วย

สรุปผล	: ไนโตรเจนไอออนสามารถใช้ในการชักนำการกลายพันธุ์ (ภายใต้พลังงานและปริมาณไอออนที่เหมาะสม) ได้ในข้าว ผักสลัด แตงกวา รวมทั้งในแบคทีเรียได้ โดยพบว่าลักษณะภายนอกจะแตกต่างจากพ่อแม่อย่างเด่น รวมทั้งลักษณะกลายพันธุ์ยังถ่ายทอดสู่รุ่นลูกได้ เช่นข้าว
ข้อเสนอแนะ	: เนื่องจากเทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำสามารถใช้ชักนำการกลายพันธุ์ทั้งในพืชและแบคทีเรีย รวมไปถึงใช้ในการค้นหายีนที่ต้องการได้ ดังนั้นเทคนิคนี้ก็นำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชในอนาคต แต่อย่างไรก็ตามหากจะมีการนำไปใช้จริงควรที่จะต้องมีการวิจัยเพื่อให้ทราบถึงกลไกอันตรกิริยาระหว่างไอออนและวัตถุทางชีวภาพเสียก่อน
คำสำคัญ	: jasmine rice (<i>Oryza sativa indica</i> KDML 105), low -energy ion beam, mutantion anthocyanin genes, HAT RAPD markers, lettuce, <i>Lactuna sativa</i> , cucumber, <i>Cucumis sativus</i> , chili, <i>Capsicum annum</i> ,, <i>Bacillus lichenisformis</i>

ABSTRACT

- Project Code** : RMU4880036
- Project Title** : Application of Low Energy Ion Beam for quality improvement in *Oryza sativa indica* KDML 105) and *Lactuna sativa*
- Investigator** : Assoc. Prof. Dr. Somboon Anuntalabhochai
Biology Department Science Faculty
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
- E-mail Address** : soanu.1@gmail.com
- Project Period** : 3 years (2006.-2008)
- Objectives** : To characterize, identify and analyze gene express in a jasmine rice mutant induced mutation by low energy ion beam
To apply the low energy ion beam to induce mutation in various plant crops including lettuce, cucumber and chili as well as in bacteria spp.
- Methodology** : Seeds of jasmine rice (*Oryza sativa indica* KDML 105) were bombarded with nitrogen ions at fluences of $2-10 \times 10^{16}$ ions/cm² and energy 60 keV . Three mutants named TKOS, PKOS and BKOS, which had different characteristic, were obtained. The BKOS was chosen for further characterization and analysis such as cloning genes involving in anthocyanin biosynthesis pathway and their expression, antioxidant property. Then HAT RAPD was used to determine genetic modification in the mutants, subsequently, SCAR and microsatellite marker were applied to identify the BKOS.
Consequently, nitrogen ions were applied to bombard seeds of other plant crops including lettuce, cucumber and chili in order to induce mutation. The bombarding conditions were respectively. After bombardment the seed were germinated and subsequently cultivated into soil. Percentage of germination and survival were recorded as well as for phenotypic changes.
Finally, low-energy ion-beam technique was also applied successfully to induce mutation in bacterial, *Bacillus licheniformis*, for cloning gene of interest.

Result

: Low energy ion beam was applied to induced mutation to jasmine rice (*Oryza sativa indica* KDML 105). Finally, three mutants named TKOS, PKOS and BKOS were obtained. Both TKOS and PKOS exhibited photoperiod insensitive. However, TKOS was taller than KDML 105 while PKOS was shorter or semi-dwarf. BKOS was also photoperiod insensitive and short in stature and anthocyanin was found to accumulate in various tissue such as root, leaves, stem, seed coat and pericarp. In previous report, BKOS's extract showed high antioxidant activity to reduce DDPH, than the others. Consequently, genes involving in anthocyanin biosynthesis, F3H F3 5 H, DRF and ASN were investigated. The intensity of their transcript in BKOS was higher than the KDML 105. Therefore, a set of genes involving in anthocyanin biosynthesis was cloned and sequenced from BKOS. They were MYB, MYC, WD 40, F3H F'3H, DFR ANS UFGT and 5 GT. The MYC, MYB and WD 40 were regulatory gene and showed high homology to japonica rice at 86, 89 and 100% respectively. While the F3H F'3H, DFR ANS UFGT and 5 GT were structural genes and showed high homology to several plant species at 92, 81, 75, 89, 92, 86% respectively. Their functional mechanisms were under further investigation.

HAT RAPD marker was chosen to distinguish among rice varieties, of 19 primers one of arbitrary primer named OPI 11 provided an additional band at 1.4 kp only in BKOS and japonica varieties. Subsequently, a of primer named BF1 and BR1 was designed based on a internal sequence of the 1.4 kp and used to specific identify for BKOS. An expecting band at 300 bp was amplify only in BKOS and japonica varieties, however, an intensity of this band was 5 fold higher than to japonica's. Using microsatellite marker named OSR28F and OSR28R revealed genetic different between BKOS and japonica rice. With both techniques could be used for BKOS identification purpose in order to protect the rights of BKOS.

Rab 5 and *rab 7* genes were cloned from KDML 105 and documented in previous report. Both genes showed highest expression in root. Moreover, in this experiment revealed that these

genes also expressed high in senescent rice-leaves. Therefore , several inductions involving senescent factors including ABA, salt stress and pathogenic factors are under investigation for their responsibility to leaf senescence in jasmine rice.

In the 2nd section, ion beam was applied for crop improvement in different vegetable crops including 5 varieties of lettuce (*Lactuna sativa*), *Cucumis sativus* and *Capsicum annuum*. For *Lactuna sativa*, the condition for bombardment was at 50 keV and with 6×10^{16} and 1×10^{17} ions/cm². Both *Cucumis sativus* and *Capsicum annuum* were bombarded at 60 keV but the fluences of 2, 6, 8×10^{17} ions/cm² for the before and 6×10^{16} and 1×10^{17} ions/cm² for the later.

This was the 4th attempt of the bombardment to the lettuce since required characters were not found in previous bombardments. In this experiment a percentage of germination at higher fluences was slightly greater to lower fluences and control. However, number of modified phenotypes were 2.77% and 0.77% for the higher and lower fluences respectively. Those phenotypes were abnormal in growth, plant profile and albino leaves.

In *Cucumis sativus*, both percentage of germination and plant height were not different significantly in all experimental groups. The significantly modified phenotypes induced by nitrogen ions were detected. These were sex reversal (from female to male reproductive organ) and fruit size was round and smaller than control's. However, its taste was not different.

Effect of nitrogen ion to *Capsicum annuum*, percentage of germination, plant's height and profile were not different significantly in all experimental groups. All modified phenotypes were found in only the 6×10^{16} ions/cm² groups for instance short in stature. Moreover, in this group (in M1 generation) a percentage of symptom caused by *Colletotrichum* fungus was lower than in the others. In order to test this property (the pathogen resistance) M2 and M3 generations are further investigation.

Finally, low-energy ion beam was also successfully applied to clone a particular gene from *Bacillus licheniformis* for growth

suppression of *Collectotrichum spp* causing anthracnose in curcuma.. Strategy and methodology of the application was demonstrated and discussed.

Conclusion : Nitrogen ions with and appropriate conditions (certain range of energy and fluences) were able to induce mutation in plant varieties such as rice, lettuce, cucumber, and chili, as well in bacterial species. And phenotypes of those mutants exhibited significantly different from wild types. Moreover, these characters was able to heritage into next generation.

Recommendation : Since low energy ion beam can be used for induction mutation in both plant and bacterial species, and also used for gene cloning. In near future, this technique could be applied for crop improvement. However, a fundamental questions for mechanism of interaction between ions and biological material are needed to be elucidated.

Keywords : jasmine rice (*Oryza sativa indica* KDML 105), low -energy ion beam, mutation anthocyanin genes, HAT RAPD markers, lettuce, *Lactuna sativa*, cucumber, *Cucumis sativus*, chili, *Capsicum annuum*,, *Bacillus licheniformis*

สารบัญเรื่อง

	หน้าที่
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญเรื่อง	ฎ
บทที่ 1 เกริ่นนำ	1
1) การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับ anthocyanin biosynthesis ในสายพันธุ์ BKOS	1
1.1) วิธีการทดลอง	4
1.2) ผลการวิจัย	6
บทที่ 2 การตรวจสอบและการบ่งบอกข้าวหอมมะลิพันธุ์กลาย	16
2.1) บทนำ	16
2.2) วัสดุในการทดลอง	16
2.3) วิธีดำเนินการทดลอง	16
2.4) ผลการทดลอง	18
2.5) เอกสารอ้างอิง	23
บทที่ 3 การหาลักษณะจำเพาะ ของ cDNAs จากข้าวหอมมะลิ (<i>Oryza sativa indica</i>) KDML105	24
3.1) การค้นหา cDNA ที่เข้ารหัส polygalacturodase , OsPG 1 จากข้าวหอมมะลิ (<i>Oryza sativa indica</i>) KDML105	24
3.2) วัตถุประสงค์	24
3.3) วิธีทดลอง	24
3.4) ผลการทดลอง	27
3.5) เอกสารอ้างอิง	36
บทที่ 4 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชผักต่างชนิด	37
4.1) ผักสลัด (<i>Lactuca sativa</i>)	37
4.2) แดงกวา (<i>Curcumis sativus</i>)	42
4.3) พริก (<i>Capsicum annuum</i> L)	44
4.3.3) เอกสารอ้างอิง	58
4.3.4) ภาคผนวก	59
บทที่ 5 5.1) ผลสัมฤทธิ์ (Output) จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	60
- รายชื่อผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ	60
5.2) การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์	60
- เชิงนโยบาย	
- เชิงสาธารณะ	
- เชิงวิชาการ	
5.3) ผลงานอื่นๆ:	61
5.3.1) การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการทั้งในและต่างประเทศ	
5.3.2) รางวัล	

5.3.3) สิทธิบัตร

5.3.4) Abstracts

บทที่ 6 Publications

66

บทที่ 1

เกริ่นนำ

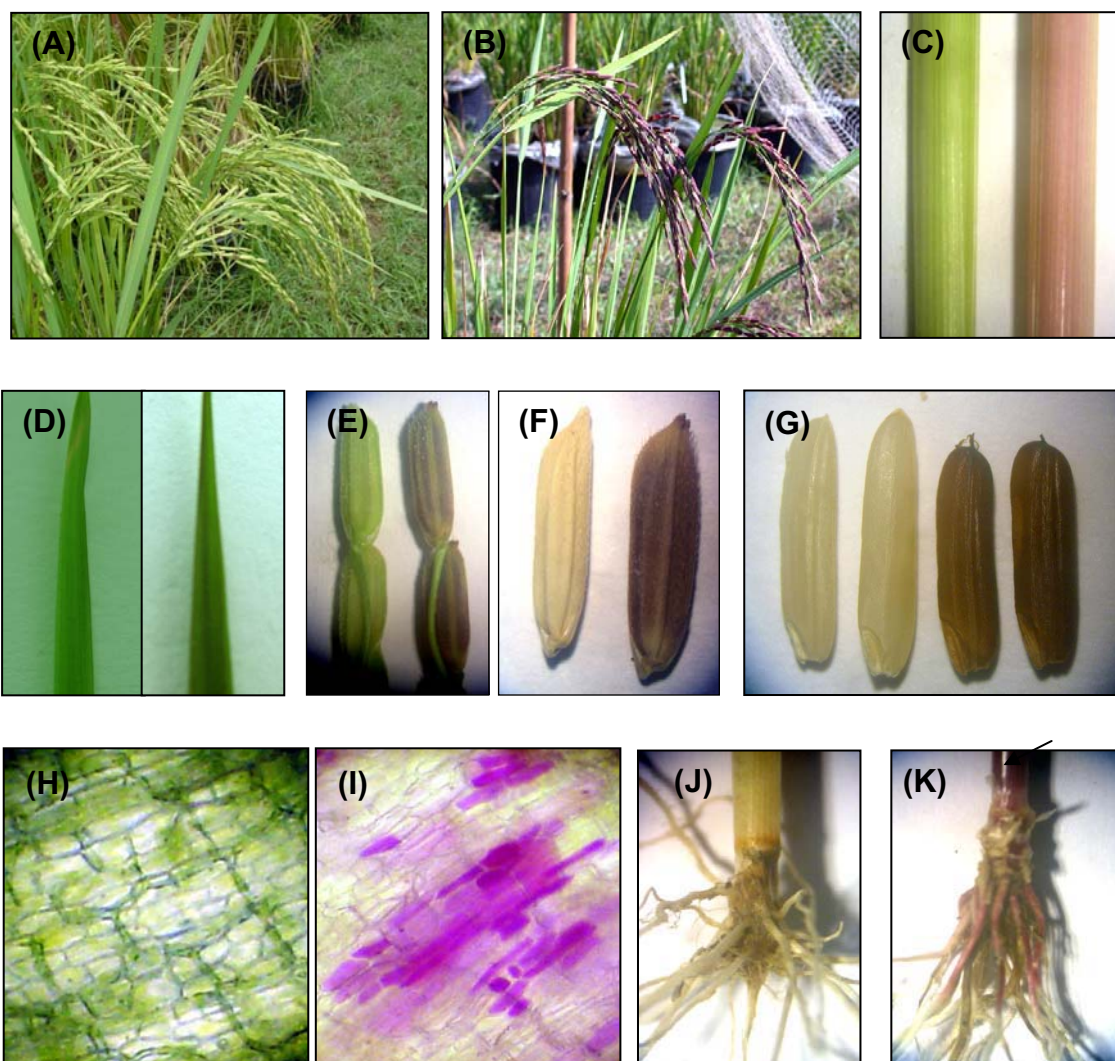
ในโครงการนี้เป็นการประยุกต์เทคนิคลำโอดอนพลังงานต่ำ ในการระดมยิงพันธุ์พืชหลายชนิด ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ จนได้ข้าวพันธุ์กลาย 3 สายพันธุ์ หลังจากนั้น ได้หาวิธีการหาลักษณะจำเพาะ (characterization) ของข้าวพันธุ์กลายโดยเฉพาะข้าวสายพันธุ์ BKOS ซึ่งมีลักษณะต้นเตี้ย ไม่ไวแสง และมีการสะสมของรงควัตถุ anthocyanin ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ เช่น เมล็ด ลำต้น ราก และเส้นกลางใบ เป็นต้น และพบการแสดงออกของยีน (*F3'H*, *F3' 5' H*, *DFR* และ *ANS*) ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์ anthocyanin ในข้าวสายพันธุ์ BKOS ดังได้รายงานในคราวที่แล้ว ในที่นี้จึงเป็นการโคลนยีนและหาลำดับเบสของยีนดังกล่าวรวมทั้ง *F3H*, *UHGF*, *5GT*, *MYC*, *MYB* และ *WD40* เพิ่มเติมขึ้นด้วยเพื่อจะไปหาหน้าที่ของยีนเหล่านั้นต่อไป รวมจะรายงานวิธีการค้นหา molecular marker โดยเฉพาะ Scar marker เพื่อใช้บ่งบอกอย่างเจาะจงแก่สายพันธุ์กลายนี้ ประโยชน์เพื่อการรับรองสายพันธุ์ข้าวโดยเครื่องหมายดีเอ็นเอในอนาคต

นอกจากนั้นได้พบยีนที่เข้ารหัส โปรตีน Rab 5 , Rab7 และ PG (polygalacturonase gene) จากข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยที่ 2 ยีนแรกจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ enocytosis และมีรายงานว่ายีนนี้เกี่ยวข้องกับการรับส่งสารอาหารเช่น ไนโตรเจน หรือ ฟอสเฟตในข้าวญี่ปุ่น ส่วนยีน PG เกี่ยวข้องกับการทำให้ผนังเซลล์ผลไม้อ่อนตัวลงเมื่อถึงระยะสุก ดังนั้นหากยับยั้งการทำงานของยีนนี้ควรที่จะทำให้ผนังเซลล์แข็งแรงเป็นปรกติสามารถป้องกันการบุกรุกของเชื้อก่อโรคในข้าวได้ ดังนั้นจึงสนใจที่จะศึกษาหน้าที่ของยีนเหล่านี้ที่ได้จากข้าวขาวดอกมะลิ

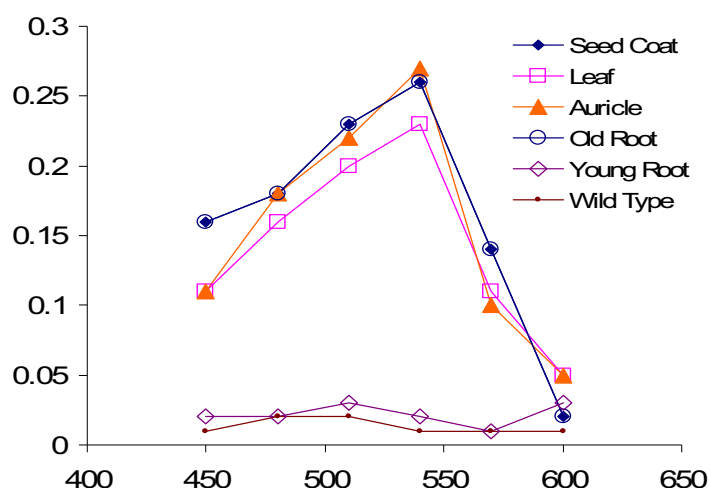
ในโครงการย่อยที่สองจะเป็นการประยุกต์ลำโอดอนในการระดมยิงพันธุ์อื่น เช่น ผักสลัดหรือผักกาดหอมห่อ (*Lactuna sativa*) รวมทั้งได้ทดลองเพิ่มเติมจากที่ได้รับไว้ใน proposal ด้วย ได้แก่ ระดมยิงพันธุ์มะเขือ (ได้รายงานในรายงานครั้งที่แล้ว) ท้ายสุดได้ระดมยิงพันธุ์พริก โดยมีเป้าหมายต้องการค้นหาสายพันธุ์ที่ต้านทานโรค anthracnose ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา ซึ่งได้รายงานในครั้งนี้ นอกจากนั้นงานที่เพิ่มเติมอีกเรื่องคือการค้นหายีนที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค anthracnose จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ (antagonistic bacteria) โดยอาศัยเทคนิคลำโอดอนพลังงานต่ำ ซึ่งจะเป็นวิธีการใหม่ที่ยังไม่พบการรายงานการค้นหาด้วยวิธีนี้มาก่อนด้วย และท้ายสุดพิสูจน์ให้เห็นว่ายีน ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญได้จริงในสภาพ *in vitro* ด้วย

1) การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับ anthocyanin biosynthesis ในสายพันธุ์ BKOS

ดังได้รายไปแล้วว่าข้าวหอมมะลิพันธุ์กลาย สายพันธุ์ BKOS ที่มีลักษณะพิเศษกล่าวคือ ต้นเตี้ย ไม่ไวแสง และมีการสะสมของ anthocyanin ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ (ภาพที่ 1.1)



ภาพที่ 1.1 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกระหว่างข้าวหอมมะลิ 105 (KDML 105) และข้าวพันธุ์กลาย BKOS ที่เกิดจากการชักนำด้วยการระดมยิงโดยลำ N^+ / N_2^+ ไอออนพลังงานต่ำ. รูป (A) และ (B) แสดงลักษณะวิทยาระหว่างต้นปรกติ (WT) และต้นกลายพันธุ์กลาย (BKOS) โดยที่ต้นพันธุ์กลายจะพบว่ามีสีม่วงในส่วนของต้น (C), ใบ (D), เมล็ดอ่อน (E), เปลือกนอก (F) และเมล็ดที่ปราศจากเปลือก (G), .auricle ของต้นปรกติ (H) เทียบกับ auricle ของพันธุ์กลาย BKOS (I) แสดงให้เห็นถึงการสะสมของสาร แอนโทไซยานิน (สีม่วง) ภายในเซลล์, และลักษณะของรากธรรมชาติ (J) ลักษณะของรากสายพันธุ์กลาย (K). เป็นที่สังเกตว่าไม่พบการเกิดสีม่วงที่ส่วนของรากอ่อนเหมือนในส่วนที่เป็นรากแก่ของข้าวพันธุ์กลาย BKOS



ภาพที่ 1.2 เปรียบเทียบปริมาณ แอนโทไซยานินในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวพันธุ์กุลาย BKOS

หลังจากนั้นได้ตรวจพบการสะสมของ anthocyanin ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆดังภาพที่ 1.2 ดังนั้นจึงสนใจที่จะศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ anthocyanin ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของข้าวหอมมะลิ 105 และ BKOS โดยยีนที่จะศึกษา ได้แก่ *F3'H*, *F3'5'H*, *DFR* และ *ANS* (ภาพที่ 1.3)

Wild Type					Gene Name	BKOS				
SC	L	YR	OR	A		SC	L	YR	OR	A
					<i>Ra</i>					
					<i>F3'H</i>					
					<i>F3'5'H</i>					
					<i>DFR</i>					
					<i>ANS</i>					
					<i>Actin</i>					

ภาพที่1.3 Semi-quantitative RT-PCR analysis ที่ใช้เพื่อการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ anthocyanin biosynthesis pathway. การแสดงออกได้ทดสอบในเนื้อเยื่อของ seed coat (SC), leaf (L), young root (YR), old root (OR) and auricle (A) ในทั้ง ต้นควบคุม (KDML 105) และ สายพันธุ์กุลาย (BKOS)

โดยพบว่าการแสดงออกของยีนดังกล่าวแตกต่างกันจริง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ต้องการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุ anthocyanin และหาลำดับเบสของยีนเหล่านี้จากข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS เพื่อการนำไปสู่การศึกษาหาหน้าที่ของยีน เนื่องจากรงควัตถุ anthocyanin มีคุณสมบัติในการต้านทานอนุมูลอิสระ

1.1) วิธีการทดลอง

1.1.1) พืชที่ใช้ในการทดลอง

ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวขาวดอกมะลิพันธุ์กลาย BKOS (*Oryza sativa indica* KDML 105 and BKOS) โดยจะใช้ตัวอย่างจากต้นอ่อน (seedling) อายุ 5 วัน

1.1.2) การเตรียม Total RNA จากต้นอ่อน (seedling)

1.1.2.1 นำตัวอย่างจากข้อ 1.1.1 แล้วบดละเอียด 50-100 mg ใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ที่มี TRIZOL[®] Reagent ปริมาตร 1 ml ผสมตัวอย่างกับ reagent โดยวิธี vortex และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที

1.1.2.2 เติม chloroform ปริมาตร 0.2 ml พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ นาน 15 วินาที จากนั้นทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง นาน 2-3 นาที

1.1.2.3. นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 °C แล้วจึงดูดเอาเฉพาะส่วนใสด้านบน (aqueous phase) ใส่หลอดใหม่

1.1.2.4. เติม Isopropyl alcohol ปริมาตร 0.5 ml พลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

1.1.2.5. นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C เทส่วนใสด้านบนทิ้งไปเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอน หลังจากนั้นล้างตะกอนโดยเติม 75% ethanol ปริมาตร 1 ml นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 7,500 g นาน 5 นาที ที่ 4 °C

1.1.2.6. นำตะกอนอาร์เอ็นเอมาทำให้แห้งโดยวิธี air dry ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอในน้ำที่ปราศจาก RNase (RNase-free water) ปริมาตร 20 µl

1.1.2.7 ตรวจสอบอาร์เอ็นเอทั้งหมดด้วย 1.4% denaturing formaldehyde agarose/EtBr electrophoresis โดยจะสังเกตเห็นแถบ 28S และ 18S ribosomal RNA

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

เตรียมสารละลายปริมาตร 20 µl ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งประกอบด้วย อาร์เอ็นเอทั้งหมด 0.1-5 µg , oligo(dT)₁₈ primer 0.5 µg และ deionized water ให้ครบ 12 µl ผสมให้เข้ากันเบาๆ บ่มที่ 70°C นาน 5 นาที จากนั้นแช่หลอดบนน้ำแข็งแล้วเติม 1x reaction

buffer, RiboLock™ Ribonuclease inhibitor 20 Unit/reaction และ dNTPs 1 mM (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37°C นาน 5 นาที จากนั้นเติม RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase 200 Unit/reaction บ่มที่ 42°C นาน 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาโดยความร้อนที่ 70°C นาน 10 นาที เก็บ First Strand cDNA ไว้ที่ -80°C

1.1.4) การค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินจากข้าวหอมมะลิ กลายพันธุ์สายพันธุ์ BKOS ด้วยเทคนิค RT-PCR

ในการโคลนยีนได้ออกแบบไพรเมอร์ (primer) เพื่อการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ anthocyanin ได้เลือกจากลำดับกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved domain) ของแต่ละยีนดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 แสดงรายชื่อและลำดับของนิวคลีโอไทด์ของ primers ที่ใช้

Group	Gene	Primer sequences (5' → 3')
Regulatory genes	MYB	MYBF 5'TGY ATH RAY AAR TAY GGN GAR GGN AAR TGG 3' MYBR 5'GTR TTC CAR TAR TTY TTN ACR TCR TTN GC 3'
	MYC	MYCF 5'GAATTCTCTAGAATGGCATCTGCTCCTCCAGT 3' MYCR 5'GAATTCTCTAGATTACGGCGCCTTCCCC 3'
	WD40	BKWF 5'AAG CCA GGA TCC ATG GAG AAG AAG GT 3' BKWR 5'GGT ACC GAG CTC CTA CCC CTC AGC CTG CT 3'
Structural genes	Dihydroflavonol-4-reductase (DFR)	DFRF 1 5'-GGYTCWTGGCTNGTCATG-3' DFRR 1 5'-CARAGRTCRTCNARRTG-3'
	Flavanone 3-hydroxylase (F3H)	F3HF 5' GCNTCYAAAGGNTGKCTY3' F3HR 5' CCATGNCCNCAYGCWCT 3'
	Flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H)	RedF 5' GARATNAARGCNYTNCT 3' RedR 5' CGNCCNGCNCRAANGG 3'
	Anthocyanidin synthase (ANS)	ANSF 1 5'-GCAGCYRTGGAMTGGGGTG-3' ANSR 1 5'-GCCRGGMACCATRTTGTGG-3'
	UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UGT)	UF 1 5'-GAYGCNTTYTNTGGTT-3' UR 1 5'-CCANCCRCARTGNGTNAC-3'
	anthocyanin 5-O-glucosyltransferase (5GT)	5GTF 5'GAATTC GAGCTC CC CACAGATGGT TAGAGAGGCT 3' 5GTR 5'GAATTC CCCGGG CGTGTCTCT CCAATGAA 3'

1.1.5) องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

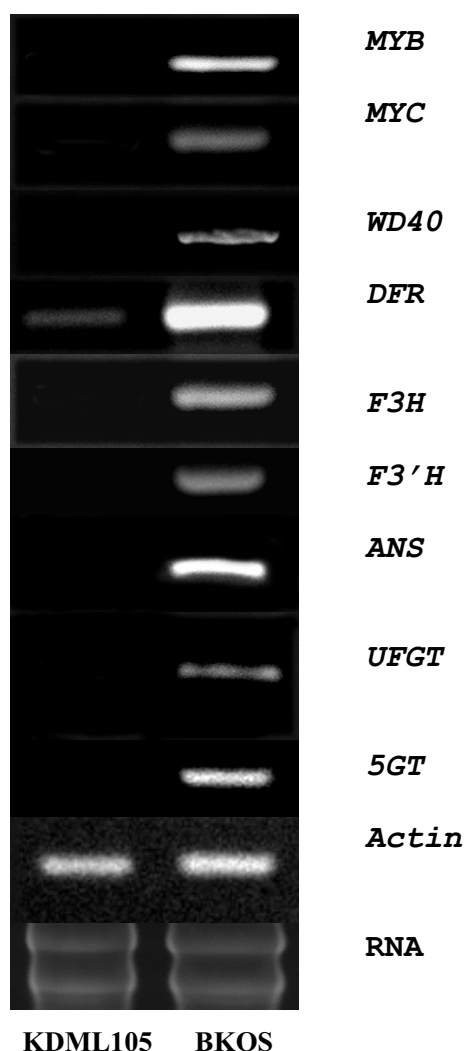
เตรียมสารละลายปริมาตร 20 µl ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งประกอบด้วย 1x reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 2 mM MgCl₂, dNTPs (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) อย่างละ 200 µM, ไพรเมอร์ 0.5 µg, Taq DNA polymerase 2.5 Unit/reaction และ 1 cDNA (DNA template) 40 ng ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย deionize water จากนั้นจึงดำเนินการเพิ่มขยายปริมาณst 1 cDNA ด้วยเครื่อง PCR

หลังการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 1 แล้วจึง subclone เข้า T-easy vector (Promega) แล้วนำไปหาลำดับเบส ที่ Macrogen จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับยีนที่มีรายงานแล้วใน Gen Bank

1.2) ผลการวิจัย

1.2.1) การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวหอมมะลิกลายพันธุ์ BKOS โดยเทคนิค RT-PCR

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวหอมมะลิ 105 และ ข้าวหอมมะลิกลายพันธุ์ BKOS ดังแสดงในภาพที่ 1.4



ภาพที่ 1.4 แสดง Profile ของ genes ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ Anthocyanins จาก ข้าวหอมมะลิ 105 (KDML105) และข้าวหอมมะลิกลายพันธุ์สายพันธุ์ BKOS

พบว่า ยีนใน anthocyanin biosynthesis พบว่ามีการแสดงออกเฉพาะ ในข้าวสายพันธุ์ BKOS โดยไม่พบการแสดงออกในข้าวหอมมะลิ 105 ปรกติ ยกเว้นยีน *DFR* ที่พบว่ามีการแสดงได้บ้างแต่น้อยกว่าในข้าวสายพันธุ์ BKOS

1.2.2) การตรวจสอบชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนของยีนและแปลผลเป็นกรดอะมิโนแลเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าสามารถโคลนชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินทั้ง 9 ยีนได้จากข้าว BKOS ดังนี้

MYB

ลำดับของกรดอะมิโนของยีน MYB ที่แยกได้จากข้าวสายพันธุ์ BKOS

GAGLRLFGVQLHAAAASSPASYLHKSYMDCLRLQVSSPSSLQSSSSPSPLTSSLLLSIDEGCERPAADG
YLSDGPHGAAATMRERKKGVWSEQEHRLFLAGLEKLKGKDWRGISRFSVTTTRPTQVASHAQKFLLR
HNS AAKKTNNKRSSLFDMVQDC DSGGRSLASS DPAT

ภาพที่ 1.5 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของยีน MYB ของข้าวสายพันธุ์ BKOS กับพืชต่างชนิด

```

MYBBKOS|VIRT5329|Blast_submission  -----GAG
tr|Q6L564|Q6L564_ORYSJ  ----MARRCSGDYSTAGQRAGEEG-----GGGGGAG
tr|Q6I5E6|Q6I5E6_ORYSJ  MHAIMARRCSGDYSTAGQRAGEEG-----GGGGGAG
tr|A2Y827|A2Y827_ORYSI  ----MARRCSGDYSTAGQRAGEE-----GGAG
tr|Q9AVV5|Q9AVV5_HORVU  ----MLCEGGGGGSTS-----GSG
tr|Q6L4N3|Q6L4N3_ORYSJ  ----MARKSSCGNNGHNSRTC SGQRVLDHSISSNSGSTTAAATACGG
tr|A2Y196|A2Y196_ORYSI  ----MARKSSCGNNGHNSRTC SGQRVLDHSISSNSGSTTAAATACGG
tr|A5C1Q1|A5C1Q1_VITVI  ----MGRKCSHCNIGHNSRTCIS-----YKGTVVGG
                                     . *

MYBBKOS|VIRT5329|Blast_submission  LRLFGVQLHAAAASSPAS--YLHKSYMDCLRLQVSSPSSLQSSSSSPSP
tr|Q6L564|Q6L564_ORYSJ  LRLFGVQLHAAAASSPAS--YLHKSYMDCLRLQVSSPSSLQSSSSSPSP
tr|Q6I5E6|Q6I5E6_ORYSJ  LRLFGVQLHAAAASSPAS--YLHKSYMDCLRLQVSSPSSLQSSSSSPSP
tr|A2Y827|A2Y827_ORYSI  LRLFGVQLHAAAASSPAS--YLHKSYMDCLRLQVSSPSSLQSSSSSPSP
tr|Q9AVV5|Q9AVV5_HORVU  LRLFGVQVHVAAGRSARAGASMRKSYMDCLQLAAAPSSIVSPSSSS---
tr|Q6L4N3|Q6L4N3_ORYSJ  LRLFGVQLQVGGGSSPLK----KCLSMELCLASPAYYGASASPSVSSSSS
tr|A2Y196|A2Y196_ORYSI  LRLFGVQLQVGGGSSPLK----KCLSMELCLASPAYYGASASPSVSSSSS
tr|A5C1Q1|A5C1Q1_VITVI  LRLFGVQLDLSSSIAMK----KSFSMESLPSLASSPSPSSSLCSSR-
*****:. . . . . * . * . * . . . * . *

MYBBKOS|VIRT5329|Blast_submission  LTSSLLLSIDEGCERPAADGYLSDGPHGAAATMRERKKGVWSEQEHRLF
tr|Q6L564|Q6L564_ORYSJ  LTSSLLLSIDEGCERPAADGYLSDGPHGAAATMRERKKGVWSEQEHRLF
tr|Q6I5E6|Q6I5E6_ORYSJ  LTSSLLLSIDEGCERPAADGYLSDGPHGAAATMRERKKGVWSEQEHRLF
tr|A2Y827|A2Y827_ORYSI  LTSSLLLSIDEGCERPAADGYLSDGPHGAAATMRERKKGVWSEQEHRLF
tr|Q9AVV5|Q9AVV5_HORVU  -SSSVLLSIDEGLER-ASNGYLSDGPHG--RLVQERKKGVWSEEEHRLF
tr|Q6L4N3|Q6L4N3_ORYSJ  SLVSIIEENTER-----VSNGYLSDG--LMGRVQERKKGVWTEEEHQMF
tr|A2Y196|A2Y196_ORYSI  SLVSIIEENTER-----VSNGYLSDG--LMGRVQERKKGVWTEEEHQMF
tr|A5C1Q1|A5C1Q1_VITVI  --VSMDENSDK-----AMNGYLSDG--LIARSQERKKGVWTEEEHRTF
                                     * : . : . . : ***** : ***** : * : * : *

MYBBKOS|VIRT5329|Blast_submission  LAGLEKLKGKDWRGISRFSVTTTRPTQVASHAQKFLLRHNSAAKKTNNKR
tr|Q6L564|Q6L564_ORYSJ  LAGLEKLKGKDWRGISRFSVTTTRPTQVASHAQKFLLRHNSAAKKTNNKR
tr|Q6I5E6|Q6I5E6_ORYSJ  LAGLEKLKGKDWRGISRFSVTTTRPTQVASHAQKFLLRHNSAAKKTNNKR
tr|A2Y827|A2Y827_ORYSI  LAGLEKLKGKDWRGISRFSVTTTRPTQVASHAQKFLLRHNSAAKKTNNKR
tr|Q9AVV5|Q9AVV5_HORVU  LVGLEKLKGKDWRGISRFSVTTTRPTQVASHAQKFLLRQSSMGKK--KR
tr|Q6L4N3|Q6L4N3_ORYSJ  LAGLDKLGKDWRGISRHFVTTTRPTQVASHAQKYFLRQNSMTQK---KR
tr|A2Y196|A2Y196_ORYSI  LAGLDKLGKDWRGISRHFVTTTRPTQVASHAQKYFLRQNSMTQK---KR
tr|A5C1Q1|A5C1Q1_VITVI  LAGLEKLKGKDWRGISRHFVTTTRPTQVASHAQKYFLRQATLSKK---KR
* . * : ***** : ***** : * : * : *

```

```

MYBBKOS|VIRT5329|Blast_submission
tr|Q6L564|Q6L564_ORYSJ
tr|Q6I5E6|Q6I5E6_ORYSJ
tr|A2Y827|A2Y827_ORYSI
tr|Q9AVV5|Q9AVV5_HORVU
tr|Q6L4N3|Q6L4N3_ORYSJ
tr|A2Y196|A2Y196_ORYSI
tr|A5C1Q1|A5C1Q1_VITVI
RSSLFDMVQDCDSGGRSLASSDPAT-----
RSSLFDMVQDCDSGGRSLASSDPATRCNNNISASLSLQVSHHKSGD SAWP
RSSLFDMVQDCDSGGRSLASSDPATRCNNNISASLSLQVSHHKSGD SAWP
RSSLFDMVQDCDSGGRSLASSDPATRCNNNISASLSLQVSHHKSGD SAWP
RSSLFDMVPI CENGIR---VSEPLTNNSENASTSLPRYN SPNMASIDLNS
RSSLFDVVEGIKRAA-----AMPISGSASELQIPGMSIGVGVVKEEVVLP
RSSLFDVVEGIKRAA-----AMPISGSASELQIPGMSIGVGVVKEEVVLP
RSSLFDMVGNMAGXHVYSFCPKPSDHIPTQYLNIASSQYEGXQETSLP
*****:* . . * .

```

ตารางที่ 1.2 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน MYB ของข้าวBKOS กับฐานข้อมูล Gen bank

Plant species	Length of deduced amino acid sequences	Amino acid identity (%)	Gen Bank accession number
<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica	311	86	Q6L564
<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica	270	86	Q6I5E6
<i>Oryza sativa</i> subsp. indica	307	86	A2Y827
<i>Hordeum vulgare</i>	261	60	Q9AVV5
<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica	287	55	Q6L4N3
<i>Oryza sativa</i> subsp. indica	287	55	A2Y196
<i>Vitis vinifera</i>	297	51	A5C1Q1

MYC

ลำดับของกรดอะมิโนของยีน MYC ที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ BKOS

```

NGEVKTRKISNLEDLTADQLVLRSEQLSELYYSLLSGEC DHRARKPVAALSPEDIADTE
WYYVVCMTYAFRPGQGLPGRSYASNRSVWLCNAQSADSKTFLRALLAKSASIQTIVCIPF
MSGVLELGLITS

```

ภาพที่ 1.6 การเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของยีน DFR ของข้าวสายพันธุ์ BKOS กับพืชต่างชนิด

```

MYCBKOS|VIRT4357|Blast_submission
tr|Q948Y2|Q948Y2_ORYSA
tr|Q40643|Q40643_ORYSA
tr|Q948Y3|Q948Y3_ORYSA
tr|Q41780|Q41780_MAIZE
tr|Q9ATL0|Q9ATL0_MAIZE
-----NGEVKTRKISNLEDLTADQLVLRSEQLSELYYSLLSGEC DHR
TWNDGFYNGEVKTRKISNLEDLTADQLVLRSEQLSELYYSLLSGEC DHR
TWKDGIFYNGEIKTRKITSNMNLTADELVLQRSEQLRELYDSL SSGECGHR
TWKDGIFYNGEIKTRKITSNMNLTADELVLQRSEQLRELYDSL SSGECGHR
TWTDGFYNGEVKTRKISHSVELTADQLLMQRSEQLRELYEALRS GECDDR
TWTDGFYNGEVKTRKISHSVELTADQLLMQRSEQLRELYEAL QSGECDDR
***:*****: :****:***** ** :* ****:*
MYCBKOS|VIRT4357|Blast_submission
tr|Q948Y2|Q948Y2_ORYSA
tr|Q40643|Q40643_ORYSA
tr|Q948Y3|Q948Y3_ORYSA
tr|Q41780|Q41780_MAIZE
tr|Q9ATL0|Q9ATL0_MAIZE
ARKPVAALSPEDIADTEWYYVVCMTYAFRPGQGLPGRSYASNRS VWLCNA
ARKPVAALSPEDIADTEWYYVVCMTYAFRPGQGLPGRSYASNRS VWLCNA
ARRPVAALLPEDLGDTEWYYVVCMTYAFGPGQGLPGKSFASNEF VWLTNA
ARRPVAALLPEDLGDTEWYYVVCMTYAFGPRQGLPGKSFASNEF VWLTNA
GARPVGSLSPELDGDTEWYYVICMTYAFLPQGLPGRSSASNEH VWLCNA
AARPVGSLSPELDGDTEWYYVICMTYAFLPQGLPGRSSASNEH VWLCNA
.:**.* ****:*****:***** * ****:* ***. *** **
QSADSKTFLRALLAKSASIQTIVCIPFMSG-VLELGLITS-----
QSADSKTFLRALLAKSASIQTIVCIPFMSG-VLELGTTPVSED PNLVNR
QSADRKLFHRLAIAKSASIKTIVCVPFIMHGVLELGTTPIS EDPALVDR
QSADRKLFHRLAIAKSASIKTIVCVPFIMHGVLELGTTPIS EDPALVDR
HLAGSKDFPRALLAKSASIQTIVCIPLMGG-VLELGTTPD KVPEDPDLVSR
HLAGSKDFPRALLAKSASIQTIVCIPLMGG-VLELGTTPD KVP-----
: * . * * ****:*****:*****:***: *****

```


F3H

ลำดับของกรดอะมิโนของยีน *F3H* ที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ BKOS

RDFFAAALPPEDKLRFDMSGGKGGFIKVSSHLQGEAVWQDWREIVTYFGSYPVKARDYSSRWDPDKP

AAWRGAVVERYSEQLGMALACRLGLVLEAMGLDTEALARACVDMDFQKVNVNFYPRCP

ภาพที่ 1.9 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *F3H* ของข้าวสายพันธุ์ BKOS กับพืชต่างชนิด

```

F3HBKOS|VIRT8169|Blast_submiss -----RDFFAAA
tr|Q43262|Q43262_MAIZE EGIDGPRRRAEIRGRVAAACEDWGIFQVVDHGVDAAALVADMARLARDFFA
tr|Q7XM21|Q7XM21_ORYSJ QGIDEAAR-AEIRARVAGACEEWGIFQVVDHGVDAGLVADMARLARDFFA
tr|Q0J9B6|Q0J9B6_ORYSJ QGIDEAAR-AEIRARVAGACEEWGIFQVVDHGVDAGLVADMARLARDFFA
tr|A3AYB3|A3AYB3_ORYSJ QGIDEAAR-AEIRARVAGACEEWGIFQVVDHGVDAGLVADMARLARDFFA
tr|A2XYL3|A2XYL3_ORYSI QGIDEAAR-AEIRARVAGACEEWGIFQVVDHGVDAGLVADMARLARDFFA
*

F3HBKOS|VIRT8169|Blast_submission LPPEDKLRFDMSGGKGGFIKVSSHLQGEAVWQDWREIVTYFGSYPVKA
tr|Q43262|Q43262_MAIZE LPPEDKLRFDMS-GGKKGFIKVSSHLQG--EAVQDWREIVTYFS-YPVKA
tr|Q7XM21|Q7XM21_ORYSJ LPPEDKLRFDMS-GGKKGFIKVSSHLQG--EAVKDWREIVTYFS-YPVKS
tr|Q0J9B6|Q0J9B6_ORYSJ LPPEDKLRFDMS-GGKKGFIKVSSHLQG--EAVKDWREIVTYFS-YPVKS
tr|A3AYB3|A3AYB3_ORYSJ LPPEDKLRFDMS-GGKKGFIKVSSHLQG--EAVKDWREIVTYFS-YPVKS
tr|A2XYL3|A2XYL3_ORYSI LPPEDKLRFDMS-GGKKGFIKVSSHLQG--EAVKDWREIVTYFS-YPVKS
*****: ***** * .:*****. ****:

F3HBKOS|VIRT8169|Blast_submission RDYSSRWDPDKPAWRGAVVERYSEQLGMALACRLGLVLEAMGLDTEALA
tr|Q43262|Q43262_MAIZE RDYS-RWDPDKPAWR-AVVERYSEQL-MALACRLGLVLEAMGLDTEALA
tr|Q7XM21|Q7XM21_ORYSJ RDYS-RWDPDKPAGWR-AVVEQYSERL-MGLACKLLGLVLEAMGLDTNALA
tr|Q0J9B6|Q0J9B6_ORYSJ RDYS-RWDPDKPAGWR-AVVEQYSERL-MGLACKLLGLVLEAMGLDTNALA
tr|A3AYB3|A3AYB3_ORYSJ RDYS-RWDPDKPAGWR-AVVEQYSERL-MGLACKLLGLVLEAMGLDTNALA
tr|A2XYL3|A2XYL3_ORYSI RDYS-RWDPDKPAGWR-AVVEQYSERL-MGLACKLLGLVLEAMGLDTNALA
**** *****. ** *****:***.* *.***:*****:***

F3HBKOS|VIRT8169|Blast_submission RACVDMDFQKVNVNFYPRCP-----
tr|Q43262|Q43262_MAIZE RACVDMMDQKVNVN-FYPRCPQPDLTGLKRHTDPGTITLLQLDLVGGLQA
tr|Q7XM21|Q7XM21_ORYSJ DACVDMMDQKVNVN-FYPKCPQPDLTGLKRHTDPGTITLLQLDLVGGLQA
tr|Q0J9B6|Q0J9B6_ORYSJ DACVDMMDQKVNVN-FYPKCPQPDLTGLKRHTDPGTITLLQLDLVGGLQA
tr|A3AYB3|A3AYB3_ORYSJ DACVDMMDQKVNVN-FYPKCPQPDLTGLKRHTDPGTITLLQLDLVGGLQA
tr|A2XYL3|A2XYL3_ORYSI DACVDMMDQKVNVN-FYPKCPQPDLTGLKRHTDPGTITLLQLDLVGGLQA
*****: ** ***:***

```

ตารางที่ 1.6 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *F3H* ของข้าวBKOS กับฐานข้อมูล Gen bank

Plant species	Length of deduced amino acid sequences	Amino acid identity (%)	Gen bank accession number
<i>Zea mays</i>	372	92	Q43262
<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica	377	88	Q7XM21
<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica	388	88	Q0J9B6
<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica	325	88	A3AYB3
<i>Oryza sativa</i> subsp. indica	388	88	A2XYL3

F3'H

ลำดับของกรดอะมิโนของยีน F3'H ที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ BKOS

QDQKHTLDMLSTLISLKGTDLDGDGGGSLTDTEIKALLILNMFTFAGTDTTSASQTVDWAI AELIRHPDIM
VKAQE ELDIVVGRWDR PEVNESDIAQLPYLQAVIKENFLRLHPPTPLS LPHIASESCE INGY

ภาพที่ 1.10 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน F3'H ของข้าวสายพันธุ์ BKOS กับพืชต่างชนิด

F3'HBKOS|VIRT1409|Blast_submission
sp|Q9SD85|F3PH_ARATH
tr|B0ZTB2|B0ZTB2_BRACM
tr|A1XBC6|A1XBC6_BRANA
tr|B0ZTB3|B0ZTB3_BRACM
tr|Q9FPN2|Q9FPN2_MATIN

-----QDQKHTLDMLSTLISLKGTDLDGDGGGSLTDTEIKALLI
SILKEHEMNG--QDQKHTDMLSTLISLKGTDLDGDGG--SLTDTEIKALLL
SILEEHEAMKNGQDQKHTDMLSTLISLKGTDGEGG--TLTDTEIKALLL
SILEEHEAMKNGQDQKHTDMLSTLISLKGTDGEGG--TLTDTEIKALLL
SILEEHEAMKNGQDQKHTDMLSTLISLKGTDGEGG--TLTDTEIKALLL
SILKEHEIN--NGDQKHTDMLTTLISLKGTDGEGA--SLTDTEIKALLL
::: ***:*****:*.*. :*****:

F3'HBKOS|VIRT1409|Blast_submission
sp|Q9SD85|F3PH_ARATH
tr|B0ZTB2|B0ZTB2_BRACM
tr|A1XBC6|A1XBC6_BRANA
tr|B0ZTB3|B0ZTB3_BRACM
tr|Q9FPN2|Q9FPN2_MATIN

LNMFTFAGTDTTSASQTVDWAI AELIRHPDIMVKAQEELDIVVGRWDRPEV
N---MFTAGTDTTSASTVDWAI AELIRHPDIMVKAQEELDIVVGRDR--PV
N---MFTAGTDTTSASTVDWAI AELIRHPEIMRKAQEELDSVVGRGR--PI
N---MFTAGTDTTSASTVDWAI AELIRHPEIMRKAQEELDSVVGRGR--PI
N---MFTAGTDTTSASTVDWAI AELIRHPEIMMRKAQEELDSVVGRGR--PI
N---MFTAGTDTTSASTVDWAI AELIRHPHIMKRTQEELDAVVGRR--PI
*:. :.:. *****:.* :***** **:

F3'HBKOS|VIRT1409|Blast_submission
sp|Q9SD85|F3PH_ARATH
tr|B0ZTB2|B0ZTB2_BRACM
tr|A1XBC6|A1XBC6_BRANA
tr|B0ZTB3|B0ZTB3_BRACM
tr|Q9FPN2|Q9FPN2_MATIN

NESDIAQLPYLQAVIKENFLRLHPPTPLSLPHIASESCEINGY-----
NESDIAQLPYLQAVIKENFR-LHPPTPLSLPHIASESCEINGYHIPKGS
NESDLSQLPYLQAVIKENFR-LHPPTPLSLPHIASESCEINGYHIPKGS
NESDLSQLPYLQAVIKENFR-LHPPTPLSLPHIASESCEINGYHIPKGS
NESDLSQLPYLQAVIKENFR-LHPPTPLSLPHIASESCEINGYHIPKGS
NESDLSRLPYLQAVIKENFR-LHPPTPLSLPHIAAESCEINGYHIPKGS

ตารางที่ 1.7 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน F3'H ของข้าวBKOS กับฐานข้อมูล Genbank

Plant species	Length of deduced amino acid sequences	Amino acid identity (%)	Gene bank accession number
<i>Arabidopsis thaliana</i>	513	81	Q9SD85
<i>Brassica rapa subsp. campestris</i>	511	78	B0ZTB2
<i>Brassica napus</i>	511	75	A1XBC6
<i>Brassica rapa subsp. campestris</i>	511	75	B0ZTB3
<i>Matthiola incana</i>	513	71	Q9FPN2

ANS

ลำดับของกรดอะมิโนของยีน ANS ที่แยกได้จากข้าวสายพันธุ์ BKOS

PIAEKEAYANDPAAGRLQGYGSKLAANASGKREWEDYLFHLVHPDHLADHSLWPANPPEYVPVSRDFG
GRVRTLASKLLAILSLGLGLPEETLERRLRGHELAVDDDLLLQLKINYYP RCP RPD LAVGVEAHTDVSA
LSFILHN

ภาพที่ 1.11 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *ANS* ของข้าวสายพันธุ์ BKOS กับพืชต่างชนิด

ANSBKOS VIRT9999 Blast_submission	-----PIAEKEAYANDPAAGRLQGYGSKLAANASGKREWEDYLFHL
tr Q93VC3 Q93VC3_ORYSJ	AAGEAFFALPIAEKEAYANDPAAGRLQGYGSKLAANASGKREWEDYLFHL
tr P93403 P93403_ORYSA	AAGEAFFALPIAEKEAYANDPAAGRLQGYGSKLAANASGKREWEDYLFHL
tr A2WQ39 A2WQ39_ORYSI	AAGEAFFALPIAEKEAYANDPAAGRLQGYGSKLAANASGKREWEDYLFHL
tr Q67VR7 Q67VR7_ORYSJ	AAGEAFFALPIAEKEAYANDPAAGRLQGYGSKLAANASGKREWEDYLFHL
tr A2ZT88 A2ZT88_ORYSJ	AAGEAFFALPIAEKEAYANDPAAGRLQGYGSKLAANASGKREWEDYLFHL
ANSBKOS VIRT9999 Blast_submission	VHPDHLADHSLWPANPPEYVPVSRDFGGRVRTLASKLLAILSLGLGLPEE
tr Q93VC3 Q93VC3_ORYSJ	VHPDHLADHSLWPANPPEYVPVSRDFGGRVRTLASKLLAILSLGLGLPEE
tr P93403 P93403_ORYSA	VHPDHLADHSLWPANPPEYVPVSRDFGGRVRTLASKLLAILSLGLGLPEE
tr A2WQ39 A2WQ39_ORYSI	VHPDHLADHSLWPANPPEYVPVSRDFGGRVRTLASKLLAILSLGLGLPEE
tr Q67VR7 Q67VR7_ORYSJ	VHPDHLADHSLWPANPPEYVPVSRDFGGRVRTLASKLLAILSLGLGLPEE
tr A2ZT88 A2ZT88_ORYSJ	VHPDHLADHSLWPANPPEYVPVSRDFGGRVRTLASKLLAILSLGLGLPEE
ANSBKOS VIRT9999 Blast_submission	TLERRLRGHELAGVDDDLLQLKINYYPRCPRPDLAGVVEAHTDVSALSF
tr Q93VC3 Q93VC3_ORYSJ	TLERRLRGHELAGVDDDLLQLKINYYPRCPRPDLAGVVEAHTDVSALSF
tr P93403 P93403_ORYSA	TLERRLRGHELAGVDDDLLQLKINYYPRCPRPDLAGVVEAHTDVSALSF
tr A2WQ39 A2WQ39_ORYSI	TLERRLRGHELAGVDDDLLQLKINYYPRCPRPDLAGVVEAHTDVSALSF
tr Q67VR7 Q67VR7_ORYSJ	TLERRLRHDDQHGVDDDLLQLKINYYPRCPRPDLAGVVEAHTDVSALSF
tr A2ZT88 A2ZT88_ORYSJ	TLERRLRHDDQHGVDDDLLQLKINYYPRCPRPDLAGVVEAHTDVSALSF
ANSBKOS VIRT9999 Blast_submission	ILHN-----
tr Q93VC3 Q93VC3_ORYSJ	ILHNGVPGQLQVHHAGSWVTARPEPGTIVVHVGDALEILTNGRYTSLVLRG
tr P93403 P93403_ORYSA	ILHNGVPGQLQVHHAGSWVTARPEPGTIVVHVGDALEILTNGRYTSLVLRG
tr A2WQ39 A2WQ39_ORYSI	ILHNGVPGQLQVHHAGSWVTARPEPGTIVVHVGDALEILTNGRYTSLVLRG
tr Q67VR7 Q67VR7_ORYSJ	ILHNGVPGQLQAHHAGTWVTARSEQGTIVVHVGDALEILTNGRYTSLVLRHRS
tr A2ZT88 A2ZT88_ORYSJ	ILHNGVPGQLQAHHAGTWVTARSEQGTIVVHVGDALEILTNGRYTSLVLRHRS

ตารางที่ 1.8 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *5GT* ของข้าวBKOS กับฐานข้อมูล Genebank

Plant species	Length of deduced amino acid sequences	Amino acid identity (%)	Gene bank accession number
<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica	375	89	Q93VC3
<i>Oryza sativa</i>	375	89	P93403
<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica	373	86	Q67VR7
<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica	753	86	A2ZT88
<i>Triticum aestivum</i>	438	66	Q0WY18

UFGT

ลำดับของกรดอะมิโนของยีน *UFGT* ที่แยกได้จากข้าวสายพันธุ์ BKOS

RSTGTAKTEEKTLSGFGPGMTSVRFSDLEPEEILSDNLESPLTLMMIYKMVQKLSKETAIIVNSFEEIDPVI
TNDLKSFKGGQNFLNIGGPSILSSPTLSNGSDSGQECLLTWLEKQRHASYISFGTVITPQPREMAGLAEAL
ETGEF

ภาพที่ 1.12 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *UFGT* ของข้าวสายพันธุ์ BKOS กับพืชต่างชนิด

UFGTBKOS VIRT5551 Blast_submission	-----RSTGTAKTEEKTLS
tr Q9XF16 Q9XF16_FORIN	TCDLAEERGIPWVSFWTAASCSLSAHMYTDQIWSLMRSTGTAKTEEKTLS
tr B2CZW9 B2CZW9_OLEEU	-----WVSFWTASPSSLSAHMCTDQIWSMMRSIGAAEREETLS
tr O04114 O04114_PERFR	ACDMAQKRGLPWVFWTAASCSLSHLYTDQIVKAGTAN-----QEQLNS
tr A7Q6L6 A7Q6L6_VITVI	AGEMAEDRCIPWVPLWTSGLVSLAVHVYTDIDIRKMLVLANGIEGHEVQTL
tr A4F1T0 A4F1T0_LOBER	SSEMAEKRRVPWVPLWTSGASSLSIHFYTDLIRQTVG-LNGIEGRKDEML
..	
UFGTBKOS VIRT5551 Blast_submission	GFGPGMTSVRFSDLEPEEILSDNLESPLTLMMIYKMVQKLSKETAIIVNS
tr Q9XF16 Q9XF16_FORIN	-FVPGMTSVRFSDLP-EEILSDNLESPLT-LMIYKMVQKLSKSTAIIVNS
tr B2CZW9 B2CZW9_OLEEU	-FLPGMSSVRFSDLP-EILPENESPLA-IMIYKMVQKLPKSTAVVINS
tr O04114 O04114_PERFR	-FIPGLEMATLTDLPP-EVFLDNSPSPLA-ITINKMVEKLPKSTAVVINS
tr A7Q6L6 A7Q6L6_VITVI	DFIPGLSSIHAVDLPE-EIVSGSLDSPFS-QMLHKMGLTLPRAAAVVINS
tr A4F1T0 A4F1T0_LOBER	DFIPGFSAVRLGLDLP-GVLSGNLESPPFS-IMLYKMGQCLTKATAIPINS
	* ** : ** : . ** : : ** * : : * : **

UFGTBKOS|VIRT5551|Blast_submission

tr|Q9XF16|Q9XF16_FORIN

tr|B2CZW9|B2CZW9_OLEEU

tr|O04114|O04114_PERFR

tr|A7Q6L6|A7Q6L6_VITVI

tr|A4F1T0|A4F1T0_LOBER

FEEIDPVITNDLKSKFGGQNFLNIGGPSILSSPTLSNGSDSGQECLLTWL

FEEIDPVITNDLKSKFQN--FLNIG-PSILSSPTLSNGSDSGQECLLWLEK

FEEIYTLIKNDLKSKFQN--FLDIQLSILSEDPSIVSGSDQECLEWLEK

FEEIDPIITDDLKTKFKN--FLNVGPSILASPPQATPDDETGCLEWLDQ

FEEEMPTVNNLKSFKK--FVNVGPFTLSSPP-PLAPDSNS-CLLWLDLDR

FQEMDPEINKDLNKHFSN--FLNIGPFNLISPTTPLNTDEFA-CIPWLDK

: : : .:*::* *::: : . . .

UFGTBKOS|VIRT5551|Blast_submission

tr|Q9XF16|Q9XF16_FORIN

tr|B2CZW9|B2CZW9_OLEEU

tr|O04114|O04114_PERFR

tr|A7Q6L6|A7Q6L6_VITVI

tr|A4F1T0|A4F1T0_LOBER

EKQRHASYISFGTVITPQPREMAGLAEAELETGEF-----

QRHASVIYISFGTVITPQPREMAGLAEAELETGEFPFLWSLRDNAMKLLPD

QRHASVVYISFGTVAEAQPEELAAAEVLETGEFPFLWSMRDNAMKLLPE

TSPKSVVYISFGTVITPPENELAAALADALEICRFPFLWSLKDYAVKSLPD

QKAASVAYISFGTIIITPPPHLVALAEAELESTGVPFLWSLRDNAMKLLPK

HLPQSVAYIGFGTVATPPPHLVALAEAELEESGTPFLWSINENSKHLP

ตารางที่ 1.9 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน 5GT ของข้าว BKOSกับฐานข้อมูล Gen bank

Plant species	Length of deduced amino acid sequences	Amino acid identity (%)	Gen bank accession number
<i>Forsythia intermedia</i>	454	92	Q9XF16
<i>Olea europaea</i>	237	66	B2CZW9
<i>Perilla frutescens</i>	447	51	O04114
<i>Vitis vinifera</i>	531	47	A7Q6L6
<i>Lobelia erinus</i>	457	50	A4F1T0

5GT

ลำดับของกรดอะมิโนของยีน 5GT ที่แยกได้จากข้าวสายพันธุ์ BKOS

SKSKKKNGTSTPHSDDHDDASSYPELKFLVYHSGMPWALDIARQHGDGAPFFTNSSSVVAIYEHFL
QGALKIPSTENDRSTTTLSLPSMPPLGFFADLPSFLCDVDSYPAYLELTLSQYSSNIGTLKWLFICTFEKLE
EE

ภาพที่ 1.13 การเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของยีน 5GT ของข้าวสายพันธุ์ BKOS กับพืชต่างชนิด

5GTBKOS|VIRT949|Blast_submission

tr|A9ZM31|A9ZM31_ROSHC

tr|A9ZM17|A9ZM17_ROSHC

tr|A9ZM21|A9ZM21_ROSHC

tr|A7QAW8|A7QAW8_VITVI

tr|A5BTJ5|A5BTJ5_VITVI

tr|A5B769|A5B769_VITVI

-----FAKRLVSKGLKVTVVTTISAMHRFQAAPERLSSFGFDLELISDGSEF

-----PAQGHMNPVMQFAKRLVSKGQRTIVITTFSSSKSVPT

-----TFPAQGHMNPVMQFAKRLVSKGQRTIVITTFSSSKSVPT

MERSDSHILVFPFPTPGHINPMLQFSKRLASMGRLVTLVTTQPN---TKP

MERSDSHILVFPFPTPGHINPMLQFSKRLASMGRLVTLVTTQPN---TKP

-MEYRGHVVVVPPYPSQGHINPLLQFAKRLASKGVKATLATTRYT---VNS

5GTBKOS|VIRT949|Blast_submission

tr|A9ZM31|A9ZM31_ROSHC

tr|A9ZM17|A9ZM17_ROSHC

tr|A9ZM21|A9ZM21_ROSHC

tr|A7QAW8|A7QAW8_VITVI

tr|A5BTJ5|A5BTJ5_VITVI

tr|A5B769|A5B769_VITVI

-----SKSKKKNGTSTPHSDDH

VHRPESIDESTERFTRVTTQTADLITRIKNKSSSKKKNGTSTPHSDDH

LNPTSFGSNLKMFEFISDGSEQVKDSETIEESIERFRISTTKSLTNLMTKI

LNPTSFGSNLKMFEFISDGSEQVKDSETIEESIERFRISTTKSLTNLMTKI

IEEAQSNYPHIEPIISDGFPGEKAQSVEVYLEKFQKVASQSLAQLVEKL

IEEAQSNYPHIEPIISDGFPGEKAQSVEVYLEKFQKVASQSLAQLVEKL

IRAPNIGGGFAQAGKED-----VYLNAFKANGSRTLSQLIHKH

. : : .

5GTBKOS|VIRT949|Blast_submission

tr|A9ZM31|A9ZM31_ROSHC

tr|A9ZM17|A9ZM17_ROSHC

tr|A9ZM21|A9ZM21_ROSHC

tr|A7QAW8|A7QAW8_VITVI

tr|A5BTJ5|A5BTJ5_VITVI

tr|A5B769|A5B769_VITVI

DDDASSYPELKFLVYHSGMPWALDIARQHGDGAPFFTNSSSVVAIYE

DDDASSYPELKFLVYHSG-MPWALDIARQHGDGAPFFTNSSSVVAIYE

RNSSDASQYPLKFVVYHS-GMPWVLDVARRQGIDGAPFFTTSCAVATIFH

RNNSDASQYPLKFVVYHS-GMPRVLDVARRQGIDGAPFFTTSCAVATIFH

AR---SKRPIKFIVYDS-VMPWALDTAQELGLDGAPFYTQSCAVSAIYY

AR---SKRPIKFIVYDS-VMPWALDTAQELGLDGAPFYTQSCAVSAIYY

QH---TTHPINCVLVYDS-FLPWALDVAREHGIHGAFFTNATVCAIFC

: : : :*. * : .** * : . :*. * : * : *

```

5GTBKOS|VIRT949|Blast_submission
tr|A9ZM31|A9ZM31_ROSHC
tr|A9ZM17|A9ZM17_ROSHC
tr|A9ZM21|A9ZM21_ROSHC
tr|A7QAW8|A7QAW8_VITVI
tr|A5BTJ5|A5BTJ5_VITVI
tr|A5B769|A5B769_VITVI

5GTBKOS|VIRT949|Blast_submission
tr|A9ZM31|A9ZM31_ROSHC
tr|A9ZM17|A9ZM17_ROSHC
tr|A9ZM21|A9ZM21_ROSHC
tr|A7QAW8|A7QAW8_VITVI
tr|A5BTJ5|A5BTJ5_VITVI
tr|A5B769|A5B769_VITVI

HFLQGALKIPSTENDRSTTTLSSLPSMPPLGFFADLPSFLCDVDSYPAYLE
HFLQGALKIP-SENDRSTTTLSSLPSMPPLG-FADLPSFLCDVDSYPAYLE
HVHEGTLQLPLEGPR-----AIMPSPMPLE-LNDLPTFLSDVESYPAFLK
HVHEGTLQLPLEGPR-----AIMPSPMPLE-LNDLPTFLSDVESYPAFLK
HVSQGMKKIPIEGKT-----ASFPSMPLG-INDLPSFISDMSYPSLLR
HVSQGMKKIPIEGKT-----ASFPSMPLG-INDLPSFISDMSYPSLLR
RIHHGLLTLPVKLEDT---PLLLPGLPPLN-FPDLPFTFVKFPESYPAYLT
:. . * : : * : * : * * : * * : * : * : *
LTLSSQYSSNIGTLKWLFICTFEKLEEE-----
LTLSSQYSN-IGTLKWLFICTFEKLEEEVVKWMINQEWVPTIGPTVPSMF
LAMNQYSN-LNQVNCIFYSSFDKLEKEVLKWMESQDWPVKMIGPTIPSVF
LAMNQYSN-LNQVNCIFYSSFDKLEKEVLKWMESQDWPVKMIGPTIPSVF
LVLGRFSN-FRKAKCLLINTFDMLEAEVVKWVG-SQWPVKTIGPTIPSMY
LVLGRFSN-FRKAKCLLINTFDMLEAEVVKWVG-SQWPVKTIGPTIPSMY
MKLSQYSN-LDKVDWVIGNSFEELEGEAAKSIS-ELWPGMLVGPMPVPSAY

```

ตารางที่ 1.10 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน 5GT ของข้าว BKOS กับฐานข้อมูล Gen bank

Plant species	Length of deduced amino acid sequences	Amino acid identity (%)	Gen bank accession number
Rosa hybrid cultivar	354	86	A9ZM31
Rosa hybrid cultivar	345	53	A9ZM17
Rosa hybrid cultivar	347	52	A9ZM21
<i>Vitis vinifera</i>	453	52	A7QAW8
<i>Vitis vinifera</i>	1085	52	A5BTJ5
<i>Vitis vinifera</i>	448	48	A5B769

การโคลนยีนทั้งสาย(full length) ของยีนในชุดนี้ อยู่ระหว่างดำเนินการทดลอง เพื่อนำไปศึกษาหน้าที่รวมทั้งอาจจะนำไปใช้ในการเปลี่ยนสีของไม้ดอกต่อไป

บทที่ 2 : การตรวจสอบและการบ่งบอกข้าวหอมมะลิพันธุ์กลาย

2.1) บทนำ

ภายใต้การสนับสนุนของสกว.สา คณะผู้วิจัยได้ระดมยีนข้าวขาวดอกมะลิ 105 ด้วยลำไยไอออนพลังงานต่ำ ในที่สุดได้ข้าวหอมมะลิพันธุ์กลาย 4 สายพันธุ์ได้แก่ TKOS (ต้นสูง ไม่ไวแสง ปริมาณเหล็ก มังกานีส และสังกะสี สูง) PKOS 1, PKOS3, (โดยทั้ง 2 สายพันธุ์มีลักษณะ ต้นเตี้ย ไม่ไวแสง), และ BKOS (ต้นเตี้ย ไม่ไวแสง และเมล็ดมีสีม่วงเข้ม)

ในการทดลองนี้ได้ตรวจสอบความแตกต่างของข้าวหอมมะลิพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์ในระดับพันธุกรรมโดยอาศัยเทคนิค HAT-RAPD (Anuntalabhochai *et al.*, 2000)

2.2) วัสดุในการทดลอง ข้าวหอมมะลิ 105 (KDML 105) และ ข้าวหอมมะลิพันธุ์กลาย 4 สายพันธุ์ได้แก่ TKOS, PKOS 1, PKOS3, BKOS รวมทั้ง ข้าวเจ้าสายพันธุ์ UKOS และข้าวลูกผสม KB (เกิดการผสมระหว่าง KDML 105 x BKOS), BK (เกิดการผสมระหว่าง BKOS x KDML 105), TB (เกิดการผสมระหว่าง TKOS x BKOS), BT (เกิดการผสมระหว่าง BKOS x TKOS), KT (เกิดการผสมระหว่าง KDML 105 x TKOS), ปทุมธานี 1 และ สุพรรณบุรี

2.3) วิธีดำเนินการทดลอง

2.3.1) การเตรียม ดีเอ็นเอ

การเตรียมดีเอ็นเอของข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Doyle and Doyle (1990) มีขั้นตอนดังนี้

บดใบอ่อนของข้าวประมาณ 0.1 กรัมด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด แล้วใส่ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยสารละลาย NaCl 1.4 mM, สารละลาย EDTA 2.0 mM, สารละลาย Tris-HCl 100 mM, Cetyltrimethyl ammoniumbromide 4% (w/v), Polyvinylpolypyrrolidone 1%(w/v) และ สารละลาย β -mercaptonethanol 0.1%(v/v) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย chloroform : Isoamyl alcohol ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000xg เป็นเวลา 15 นาที แยกสารละลายใสด้านบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 2-propanal ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 30 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ ethanol ระเหย แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น

2.3.2) การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค HAT-RAPD (Anuntalabhochai *et al.*, 2000) มีขั้นตอนดังนี้

นำดีเอ็นเอข้าวที่เตรียมได้ประมาณ 50 นาโมกรัม มาใส่ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 2.0 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 150 ng decamer primer (รายชื่อไพรเมอร์ ลำดับเบสของไพรเมอร์ดูในตารางที่ 2.1) และ และ 1 unit Taq DNA polymerase (Fermentas, USA) มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง MJ Mini™ Thermal Cycler (BIO-RAD, Singapore)

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะใช้เงื่อนไขดังนี้ เริ่มขั้นตอน pre-denature ด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วเข้าสู่ขั้นตอน denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 45 วินาที, ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ ขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ทำทั้ง 3 ขั้นตอนจำนวน 30 รอบ แล้วจึงเข้าสู่ขั้นตอน extension ครั้งสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไปแยกวิเคราะห์ขนาดด้วย 1.4% agarose gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE โดยใช้เครื่อง gel electrophoresis หลังจากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย ethidium bromide

ตารางที่ 2.1 แสดงชื่อและ ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

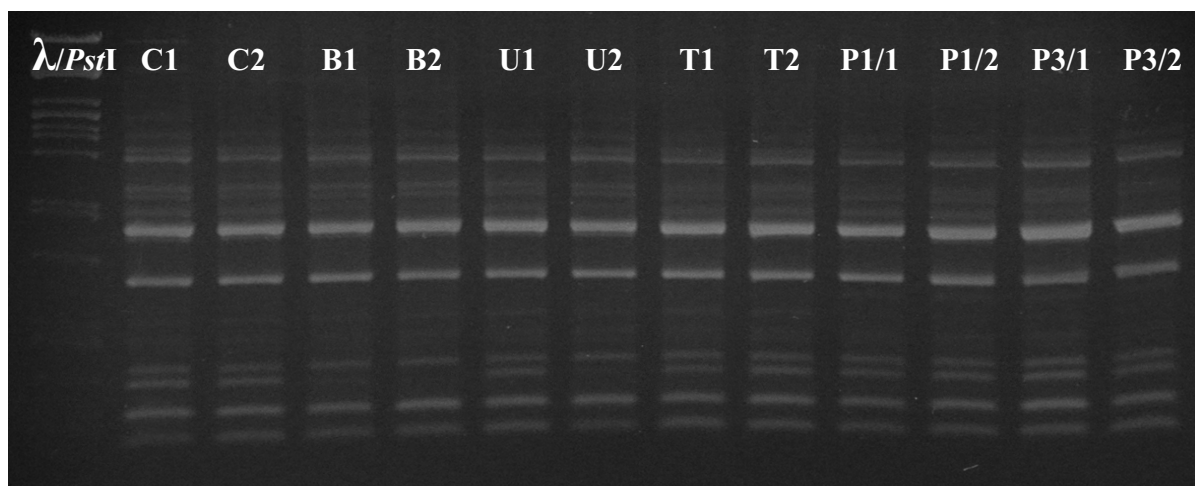
OPD04	TCT GGT GAG G
OPD07	TTG GCA CGG G
OPH02	TCG GAC GTG A
OPH14	ACC AGG TTG G
OPH19	CTG ACC AGC C
OPM10	TCT GGC GCA C
OPQ16	AGT GCA GCC A
OPW04	CAG AAG CGG A
OPZ19	GTG CGA GCA A
OPAR03	GTG AGG CGC A
OPAR08	GTG AAT GCG G
OPAR10	TGG GGC TGT C
OPAR11	GGG AAG ACG G
OPAR13	GGG TCG GCT T
OPAR14	CTC ACA GCA C
OPAI11	ACG GCG ATG A
OPAV17	CTC CGG ATC A
OPAW11	CTG CCA CGA G
OPAW17	TGC TGC TGC C

2.4) ผลการทดลอง

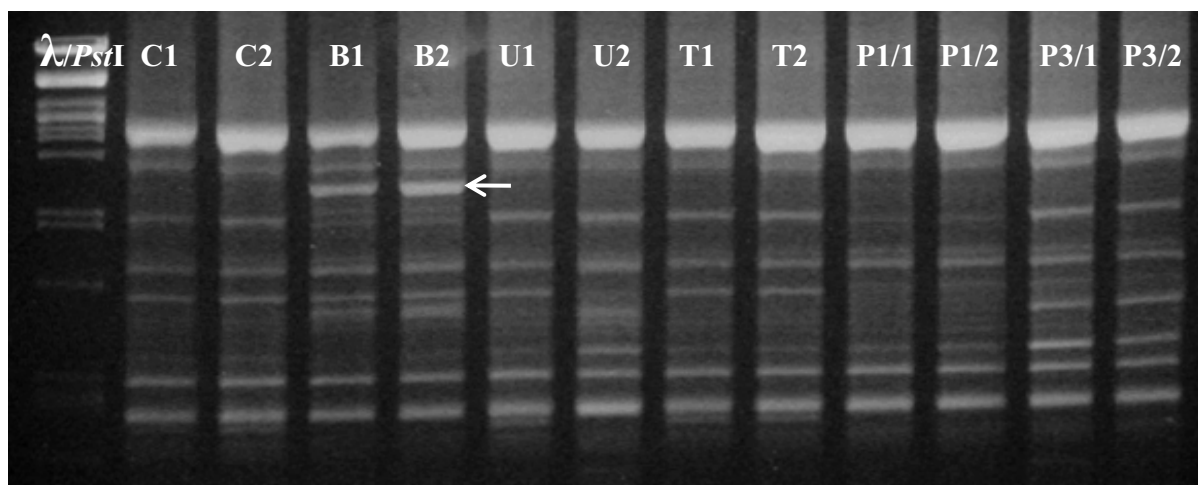
ผลการเปรียบเทียบ DNA fingerprints ระหว่างข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวกลายพันธุ์ที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยเทคนิคลำไออนจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ BKOS, TKOS, PKOS1, PKOS3 และ UKOS ด้วย 19 ไพเมอร์ พบว่ามี 10 ไพเมอร์ที่ไม่สามารถบอกความแตกต่างและ 9 ไพเมอร์ที่บอกความแตกต่างได้ (ตารางที่ 2.2) โดยเฉพาะ ไพเมอร์ OPA11 สามารถให้แถบดีเอ็นเอเฉพาะในสายพันธุ์ BKOS ที่ขนาดประมาณ 1.4 kb (ภาพที่ 2.1) , ไพเมอร์ OPH19 สามารถให้แถบดีเอ็นเอเฉพาะในสายพันธุ์ UKOS ที่ขนาดประมาณ 200 bp (ภาพที่ 2.3), ไพเมอร์ OPZ19 สามารถให้แถบดีเอ็นเอเฉพาะในสายพันธุ์ PKOS1 และ PKOS3 ที่ขนาดประมาณ 550 bp. (ภาพที่ 2.4) ซึ่งลำดับเบสของชิ้นส่วนเหล่านี้จะพัฒนาต่อไปให้ได้เป็น SCAR marker สำหรับแต่ละสายพันธุ์เพื่อการรับรองพันธุ์ในอนาคต

ตารางที่ 2.2 แสดงผลของการเปรียบเทียบ DNA fingerprints ระหว่างข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวกลายพันธุ์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่ได้จากการใช้ primer ต่าง ๆ ในการทำ HAT-RAPD

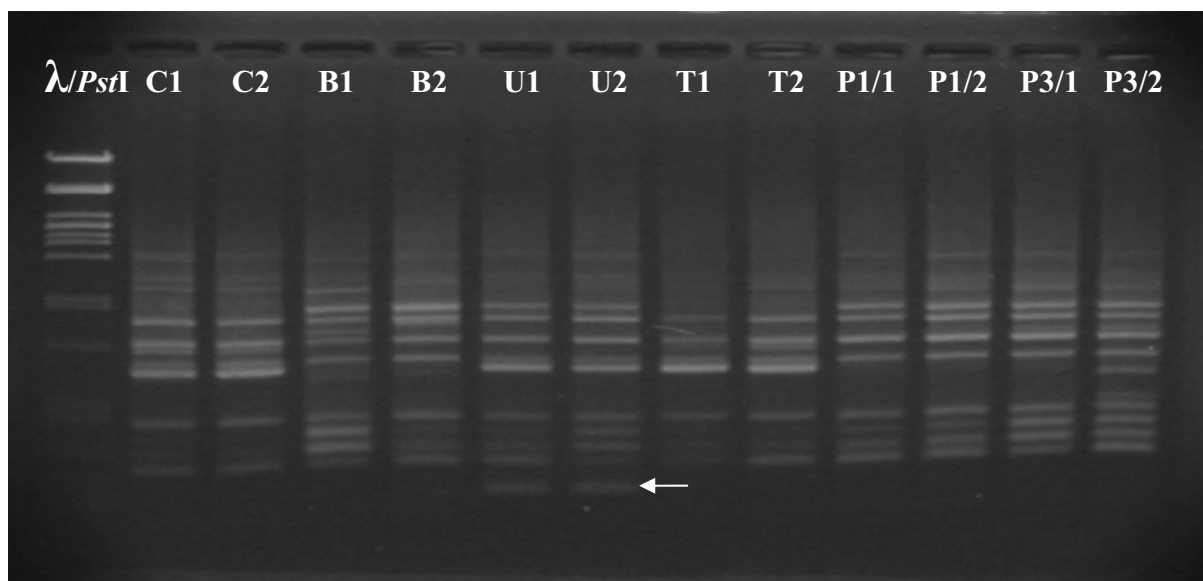
ชื่อไพเมอร์	ลำดับเบส	ไม่พบความแตกต่าง	สายพันธุ์ที่พบความแตกต่าง (ขนาดของแถบดีเอ็นเอ)
OPD04	TCT GGT GAG G	√	PKOS1, PKOS3 (~250 bp)
OPD07	TTG GCA CGG G		
OPH02	TCG GAC GTG A	√	UKOS (~2.8 kb)
OPH14	ACC AGG TTG G		
OPH19	CTG ACC AGC C	√	UKOS (~200 bp)
OPM10	TCT GGC GCA C		
OPQ16	AGT GCA GCC A	√	
OPW04	CAG AAG CGG A		BKOS (~1.2 kb)
OPZ19	GTG CGA GCA A	√	PKOS1, PKOS3 (~550 bp)
OPAR03	GTG AGG CGC A		
OPAR08	GTG AAT GCG G	√	PKOS1, PKOS3 (1.1 kb)
OPAR10	TGG GGC TGT C		BKOS (1.1 kb, 850 bp)
OPAR11	GGG AAG ACG G	√	KDML (1.4kb)
OPAR13	GGG TCG GCT T		
OPAR14	CTC ACA GCA C	√	
OPA11	ACG GCG ATG A		BKOS (~1.4 kb)
OPAV17	CTC CGG ATC A	√	
OPAW11	CTG CCA CGA G	√	
OPAW17	TGC TGC TGC C	√	



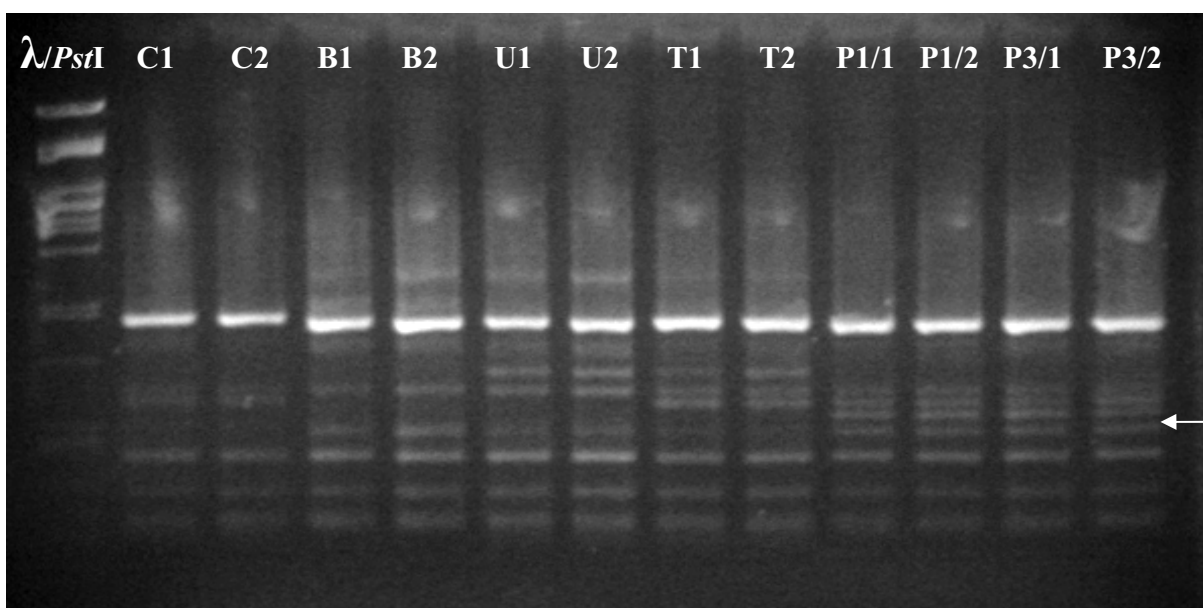
ภาพที่ 2.1 ภาพ DNA fingerprints ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPH14 ซึ่งไม่พบความแตกต่างของข้าวหอมมะลิ 105 (C1, C2) และข้าวกลายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ ข้าว BKOS (B1, B2), UKOS (U1, U2), TKOS (T1, T2), PKOS1 (P1/1, P1/2) และ PKOS3 (P3/1, P3/2) แต่ละตัวอย่างจะใช้ 2 ตัวอย่างทดลองเพื่อยืนยันผลการทดลอง



ภาพที่ 2.2 ภาพ DNA fingerprints ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA11 ลูกศรชี้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.4 kb ที่พบเฉพาะข้าวกลายพันธุ์ BKOS (B1, B2) แต่ไม่พบในข้าวหอมมะลิ 105 (C1, C2) และข้าวกลายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ ข้าว, UKOS (U1, U2), TKOS (T1, T2), PKOS1 (P1/1, P1/2), PKOS3 (P3/1, P3/2) แต่ละตัวอย่างจะใช้ 2 ตัวอย่างทดลองเพื่อยืนยันผลการทดลอง



ภาพที่ 2.3 ภาพ DNA fingerprints ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPH19 ลูกศรชี้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 bp ที่พบเฉพาะข้าวกลายพันธุ์ UKOS (U1, U2) แต่ไม่พบในข้าวหอมมะลิ 105 (C1, C2) และข้าวกลายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ ข้าว, BKOS (B1, B2), TKOS (T1, T2), PKOS1 (P1/1, P1/2), PKOS3 (P3/1, P3/2) แต่ละตัวอย่างจะใช้ 2 ตัวอย่างทดลองเพื่อยืนยันผลการทดลอง

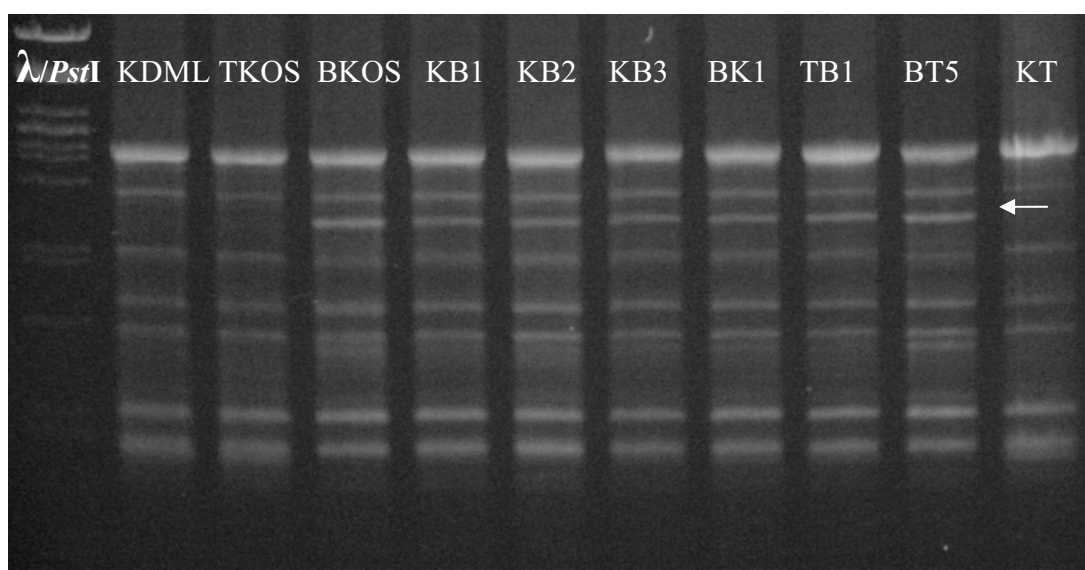


ภาพที่ 2.4 ภาพ DNA fingerprints ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPZ19 ลูกศรชี้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 550 bp ที่พบเฉพาะข้าวกลายพันธุ์ PKOS1 (P1/1, P1/2) และ PKOS3 (P3/1, P3/2) แต่ไม่พบในข้าวหอมมะลิ 105 (C1, C2) และข้าวกลายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ ข้าว, BKOS (B1, B2), UKOS (U1, U2), TKOS (T1, T2) แต่ละตัวอย่างจะใช้ 2 ตัวอย่างทดลองเพื่อยืนยันผลการทดลอง

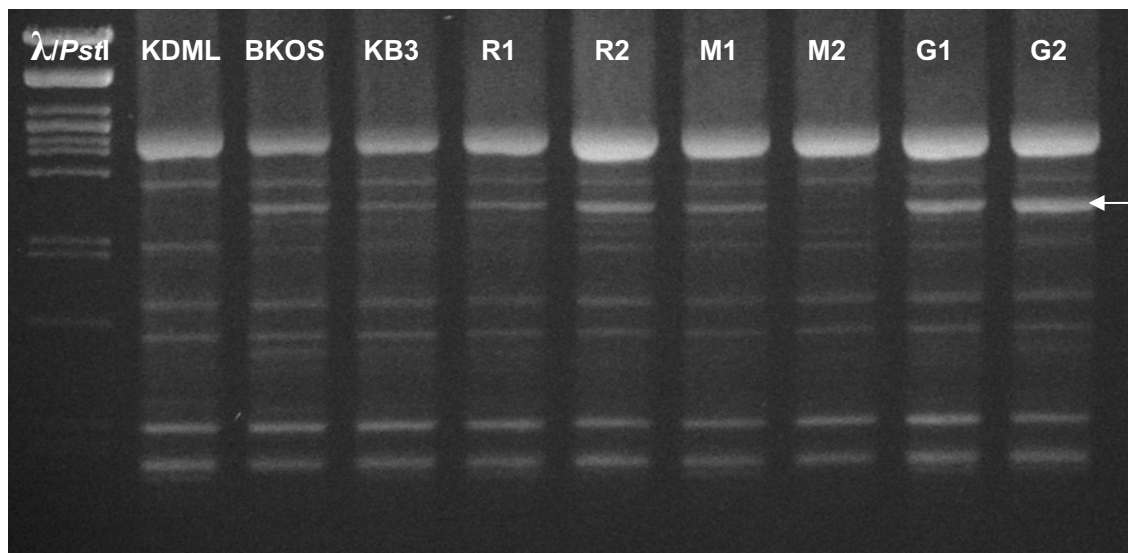
2.4.1) การตรวจสอบข้าวลูกผสมระหว่างข้าวกลายพันธุ์ ด้วยไพเมอร์ OPA11

หลังจากการประยุกต์ลำไยออณพลังงานต่ำในชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในข้าวหอมมะลิ 105 จนได้ข้าวพันธุ์กลาย 4 สายพันธุ์ (TKOS, PKOS1, PKOS 3 และ BKOS) ดังกล่าวแล้ว ต่อได้นำข้าวกลายพันธุ์มาผสมข้ามกันทุกสายพันธุ์ รวมทั้งผสมกลับเข้าสายพันธุ์พ่อแม่ (KDML 105) โดยวิธีการผสมเกสรจนได้ข้าวลูกผสมระหว่างข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวกลายพันธุ์กลายลูกผสมหลายสายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวลูกผสม KB (เกิดการผสมระหว่าง KDML 105 x BKOS), BK (เกิดการผสมระหว่าง BKOS x KDML 105), TB (เกิดการผสมระหว่าง TKOS x BKOS), BT (เกิดการผสมระหว่าง BKOS x TKOS), KT (เกิดการผสมระหว่าง KDML 105 x TKOS),

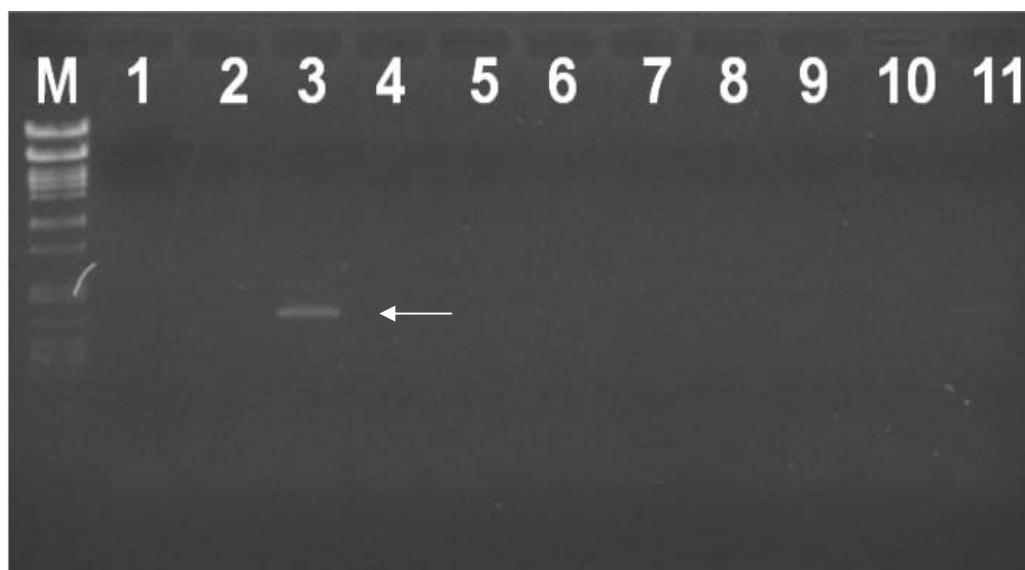
ในการนี้ได้ใช้ไพเมอร์ OPA11 ซึ่งให้แถบ (1.4 kb) เฉพาะใน BKOS ในการตรวจข้าวลูกผสมรุ่น F1 พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวลูกผสมซึ่งมีสายพันธุ์ BKOS เป็นพ่อ หรือแม่กับสายพันธุ์อื่นทุกต้นจะพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1.4 kb เช่นเดียวกันกับที่พบใน BKOS (ภาพที่ 2.2 และ 2.5) แต่จะไม่พบในข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวลูกผสมของข้าวกลายพันธุ์อื่น ๆ



ภาพที่ 2.5 ภาพ DNA fingerprints ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพเมอร์ OPA11 ของข้าวลูกผสมรุ่น F1 ลูกศรชี้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.4 kb ที่พบเฉพาะในลูกผสมที่มี BKOS เป็นพ่อหรือแม่. KB1, KB2, KB3, BK1 = ข้าวลูกผสมระหว่างข้าว BKOS และ KDML 105. TB1, BT5 = ข้าวลูกผสมระหว่างข้าว TKOS และ BKOS, KT ข้าวลูกผสมระหว่าง KDML 105 TKOS ซึ่งไม่มีแถบดีเอ็นเอดังกล่าวปรากฏขึ้น

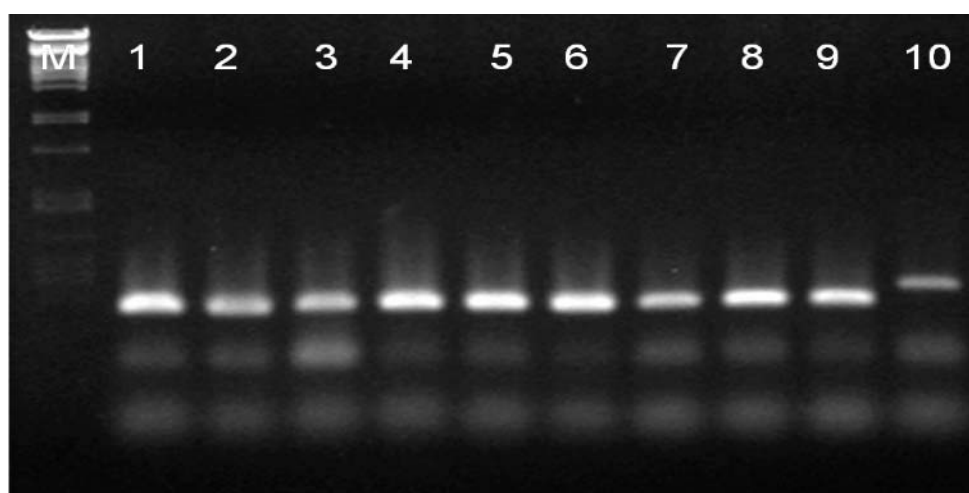


ภาพที่ 2.6 ภาพ DNA fingerprints ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไฟเมอร์ OPA111 ของข้าวลูกผสมรุ่น F2 ลูกศรชี้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.4 kb ที่พบในสายพันธุ์ BKOS, KB3 (ข้าวผสม F1 ระหว่าง BKOS x KDML105), สำหรับ R1, R2, M1, M2, G1, G2 เป็นข้าวลูกผสมรุ่น F2 (จาก KB3) โดยที่แถบดีเอ็นเอ 1.4 kb ไม่พบเฉพาะใน M2



ภาพที่ 2.7 แสดงผลผลิต PCR ที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ BF1 และ BR1 โดยพบใน BKOS (ลูกศรสีขาว) และใน javanica (ลูกศรสีดำ) ซึ่งมีความเข้มจางๆ. KDML (lanes 1-2), the BKOS, UKOS, TKOS, PKOS1, PKOS3 mutants (lanes 3-7) and ข้าวอื่นๆ ได้แก่ ปทุมธานี 1, สุพรรณบุรี 60, ข้าวเก่า และข้าวญี่ปุ่น, (lanes 8-11). M คือดีเอ็นเอมาตรฐานของ lambda DNA/PstI

ภายหลังเพาะ ข้าวลูกผสม KB3 รุ่น F1 ต่อไปโดย self-fertilization จากนั้นจึงตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวลูกผสมรุ่น F2 จำนวน 5 ตัวอย่าง (R1, R2, M1, M2, G1} และ G2) ด้วยไพรเมอร์ OPA11 พบต้นที่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1.4 kb (ภาพที่ 2.6) ยกเว้น M2 แสดงว่าการกระจายตัวทางพันธุกรรมยังไม่เสถียร อย่างไรก็ตามได้ลองนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้ (1.4 kb) ไปหาลำดับเบส จากนั้นได้ออกแบบไพรเมอร์เจาะจงชื่อ BF1 และBR1 ซึ่งสามารถเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ ขนาด 300 คู่เบส เมื่อลองนำไปตรวจสอบกับข้าวหลายสายพันธุ์ ได้แก่ KDML 105, BKOS, UKOS, TKOS, PKOS1, PKOS3 และข้าวอื่นๆ ได้แก่ ปทุมธานี 1, สุพรรณบุรี 60, ข้าวเก่า และข้าวญี่ปุ่น พบแถบดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบสที่มีความเข้มใน BKOS แต่ก็พบในข้าวสายพันธุ์ญี่ปุ่นด้วย (มีความเข้มแถบจางๆ) ภาพที่ 2.7 แต่เมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ microsatellite (OSR28F: 5-agcagctctagcttagctgg -3' and OSR28R: 5-actgcacatcagcagagaca -3') พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของแถบดีเอ็นเอระหว่าง BKOS และข้าวสายพันธุ์อื่น (KDML 105, BKOS, UKOS, TKOS, PKOS1, PKOS3, ปทุมธานี 1, สุพรรณบุรี 60) ไม่แตกต่างกัน แต่จะแตกต่างกับข้าวญี่ปุ่นแตกต่างกัน (ภาพที่ 2.8) ด้วยทั้ง 2 markers ดังนั้นจะสามารถบอกความแตกต่างระหว่าง BKOS ออกจาก ข้าวญี่ปุ่นได้ ประโยชน์ของ marker ที่ได้จะนำไปใช้สำหรับการรับรองหรือยืนยันพันธุ์ของข้าวหอมมะลิสายพันธุ์ BKOS ต่อไป



ภาพที่ 2.8 แสดงการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอด้วย microsatellite primer (OSR28F และ OSR28R) KDML (lane 1); BKOS, UKOS, TKOS, PKOS1, PKOS3 (lanes 2-6); ปทุมธานี 1, สุพรรณบุรี 60 และข้าวญี่ปุ่น (lanes 7-10). ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอของข้าวญี่ปุ่นที่แตกต่างจากข้าวสายพันธุ์อื่น. M ดีเอ็นเอเครื่องหมายของ Lambda DNA/ PstI

2.5) เอกสารอ้างอิง

Anuntalabhochai S., Chaingda J., Chundet R. and Apavatjirut P. (2000). Genetic diversity with in Lychee (*Lichi chirensis* Sonn.) based on RAPD analysis. Present in international symposium on ropical and subtropical fruits, Nov 26th- Dec 1st. Canns Australia: 45.

Doyle J.J. and Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12 (1) :13-15.

บทที่ 3 : การหาลักษณะจำเพาะ ของ cDNAs จากข้าวหอมมะลิ (*Oryza sativa indica*) KDML105

ที่ผ่านมาได้รายงานทราบว่าสามารถโคลนยีน *Rab5* และ *Rab7* ซึ่งยีนที่เข้ารหัสการสังเคราะห์ small GTP binding proteins โดยที่ *Rab5* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ early endocytosis (Anuntalabhochai *et al* 1991,) ในขณะที่ *Rab7* เกี่ยวข้องกับ late endocytosis (Sona *et al.*, 2003.) โดยเฉพาะ *Rab5* มีรายงานว่ายีน *Rab5* ที่ได้จาก *Arabidopsis* นั้นพบการแสดงออกมากในเนื้อเยื่อส่วนราก, ต้น (shoot) แต่ไม่พบการแสดงออกใน ต้น และใบ (Anuntalabhochai *et al* 1991,) นอกจากนี้ยังตรวจพบว่าสามารถชักนำให้แสดงออกในภาวะขาดไนโตรเจน และ ฟอสฟอรัส ในข้าวญี่ปุ่น (Wang *et al.*, 2001) โดยที่หากไนโตรเจนสามารถชักนำให้ยีน *Rab5* แสดงออกได้ดี อีกทั้งไนโตรเจนเป็นสารอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของพืช นั้นก็แสดงว่าโปรตีน *Rab5* อาจจะมีบทบาทต่อการเจริญของรากในภาวะที่ได้รับสารอาหาร (nutrient-regulated root growth) ในอนาคตหากสามารถทราบการทำงานของยีนดังกล่าวได้ อาจจะไปช่วยเร่งการเจริญเติบโตของข้าวได้ด้วยเหตุนี้จึงสนใจจะศึกษาหน้าที่ของยีนจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยในการทดลองนี้จะใช้เทคนิค RT-PCR ในการบ่งบอกหน้าที่ของยีน

นอกจากนั้นในการทดลองนี้สามารถโคลนยีน polygalacturonase จากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งได้รายงานข้างล่างนี้ รวมทั้งหน้าที่ของยีนนี้ด้วย

3.1) การค้นหา cDNA ที่เข้ารหัส polygalacturonase , *OsPG 1* จากข้าวหอมมะลิ (*Oryza sativa indica*) KDML105

เนื่องจากมีรายงานว่า การที่ผลไม้อ่อนนุ่ม เป็นผลเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของพืช (Grierson, 1985) ในกลุ่มของ endopolygalacturonase (PG; EC 3.2.1.15) โดยที่เอนไซม์ชนิดนี้พบว่าการเปลี่ยนแปลงในขณะผลไม้สุก (Crookes and Grierson, 1983) เอนไซม์ PG จะไปย่อย พันธะ ของ galacturonan linkages ซึ่งทำให้โครงสร้างของ pectin เปลี่ยนไป เนื่องจาก Pectin จัดว่าเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนที่ประกอบด้วยหลายสายของ polysaccharides และเป็นสารประกอบที่พบมากทั้งในผนังเซลล์และ middle lamella ของเนื้อเยื่ออ่อนของพืช (Roberts 1990). กรด Polygalacturonic (PGA), ลักษณะเป็นเกลียวที่เกิดจาก กรด 1,4-a-D-galacturonic acid ที่เชื่อมต่อกัน และถือว่าเป็นองค์ประกอบพื้นฐานของ pectic polysaccharides. โดยที่โมเลกุลของ Pectic เชื่อมกันจะอยู่ในรูปของ matrix ในผนังเซลล์ของพืชและเป็นตัวช่วยให้เซลล์พืชยึดติดกันแน่น (cell-to-cell adhesion) ได้ด้วย the middle lamellae.

สำหรับ Polygalacturonase (PGase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถสลายพันธะ 1,4-a-D-galacturonosyl linkages ของกรด PGAs ได้ ดังนั้นดูเหมือนว่า จะเป็นเอนไซม์ ที่สามารถย่อย

สลาย acidic polymers ในผนังเซลล์ได้เป็นอย่างดี โดยทั่วไปเอนไซม์ PGases แบ่งง่าย ๆ ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ขึ้นกับวิธีการสลายพันธะในผนังเซลล์ (Rexova'-Benkova' and Markovic 1976) ได้แก่กลุ่มที่สลายพันธะแบบสุ่มใน (randomly cleaving type) เรียกกลุ่มนี้ว่า endo-PGase (EC 3.2.1.15) และกลุ่มที่สลายพันธะทางด้านนอกเข้า (terminally cleaving type) เรียกกลุ่มนี้ว่า (exo-PGase) (EC 3.2.1.67, EC 3.2.1.82).

เอนไซม์ PGases ทั้งสองกลุ่มโดยมากจะพบอยู่คู่กัน ในผลไม้ ใบ และรากของพืชหลายชนิด (Pressey 1986). ดังนั้นหากยับยั้งการกิจกรรมของเอนไซม์ PG เป็นไปจะทำให้ผนังเซลล์ยังคงรูปอยู่ อันจะเป็นการป้องกันการบุกรุกของโรคพืช

ปัจจุบันประโยชน์ที่เกิดจาก PG ได้แก่การชะลอการสุกของมะเขือเทศ และได้เป็นพันธุ์ที่ชื่อว่า FLAVR SAVR™ เป็นการใส่เทคนิค antisense ในลดปริมาณเอนไซม์ หรือกิจกรรมของเอนไซม์ลง (Sheehy *et al.*, 1988)

3.2) วัตถุประสงค์

ในการทดลองนี้ได้ค้นหา cDNAs ที่เข้ารหัสโปรตีน galacturonase (PG) จากข้าวหอมมะลิ 105

3.3) วิธีทดลอง

เตรียม total RNA จากใบอ่อนอายุ 15 วันของข้าวหอมมะลิ 105 (*Oryza sativa indica* var. KDML 105) ด้วยสารละลาย Trizol Reagent (Gibco BRL). หลังจากนั้น นำไปสร้าง cDNA library โดยอาศัยเวกเตอร์คือ pDNR-LIB (4.2 kb) โดยอาศัย Creator SMART cDNA library construction kit (Invitrogen).

จากนั้นได้คัดเลือกยีนที่ต้องการจาก cDNA library ของข้าวหอมมะลิ โดยที่ probe สำหรับโปรตีน PG ได้จากชิ้นส่วน DNA (ที่เกิดจากการเพิ่มขยายปริมาณด้วยวิธี PCR) จากนั้น cDNA probe ดังกล่าวติดฉลากด้วย DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter kit II (Roche) และนำไปค้นหาใน cDNA library ที่เตรียมจากใบข้าวหอมมะลิ 105 ภายหลังการคัดเลือกได้พบ 1 cDNA clones คือ pOSPG ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ Polygalacturonase (PG) โดยชิ้นส่วน cDNA ที่ได้ถูกย้ายเข้าสู่เวกเตอร์ 2 ชนิด คือ pGEM3Zf+ และ pTZ52R จากนั้นนำ Recombinant ที่ได้ไปหาลำดับเบสโดยใช้ primer M13F และ T7 โดยลำดับเบสที่ได้แต่ละเส้นให้ชื่อใหม่ ดังนี้

1. PG1 = plasmid pGEM3Zf+ ที่มีชิ้นส่วนของยีน PG ใช้ไพรเมอร์ M13F ในการหาลำดับเบส
2. PG2 = plasmid pGEM3Zf+ ที่มี ชิ้นส่วนของยีน PG ใช้ไพรเมอร์ T7 ในการหาลำดับเบส

3. PG3 = plasmid pTZ52R ที่มี ชิ้นส่วนของยีน PG ใช้ไพรเมอร์ M13F ในการหาลำดับเบส

เพื่อต้องการยืนยันความถูกต้องในการหาลำดับของยีนที่เข้ารหัส PG และได้ผลดังนี้

	EcoRI
PG1	TNGTACGACGG---CCANTGNATTGTAATACGCACTCACTATAGGGGCGAATTCGGCCNT
PG3	-----CGG---CCT-----
PG2	-----CNNGCT-----
PG1	TTCGGCCGGGGGAACGAATATAACTG-TTTCTAATGTTACTATCTTAGCTCCTATTTCTA
PG3	-TCGGCCGGGG-CACGAATATAACTGGTTTCTAATGTTACTATCTTAGCTCCTATTTCTA
PG2	-TCGGCCGGGG-CCGAATATAACTG-TTTCTAATGTTACTATCTTAGCTTN-TTTTCTA
PG1	GTGCTCCAAACACAG-ATGGCATAGATCCAGATTCTTGTGAGGATGTGCTTATTGAGAAT
PG3	GTGCTCCAAACACAG-ATGGCATAGATCCAGATTCTTGTGAGGATGTGCTTATTGAGAAT
PG2	GGGGAACAAACACAGNATGGCATAGATCCAGATTCTTGTGAGGATGTGCTTATTGAGAAT
PG1	TGCTACATTTAGTTGGTGATGATGCCATAGCGGTAAGAGTGGGTGGGATCAATATGGG
PG3	TGCTACATTTAGTTGGTGATGATGCCATAGCGGTAAGAGTGGGTGGGATCAATATGGG
PG2	TGCTACATTTAGTTGGTGATGATGCCATAGCGGTAAGAGTGGGTGGGATCAATATGGG
PG1	ATTGCATATGGGCGCCCATCTCGTAACATTGTGATACGCAATGTAATGGCTCGTTCATTG
PG3	ATTGCATATGGGCGCCCATCTCGTAACATTGTGATACGCAATGTAATGGCTCGTTCATTG
PG2	ATTGCATATGGGCGCCCATCTCGTAACATTGTGATACGCAATGTAATGGCTCGTTCATTG
PG1	GTCAGTGCTGGAATTTCAATTGGCAGTGAGATGTCTGGTGGGATTGCAAATGTTACAGTG
PG3	GTCAGTGCTGGAATTTCAATTGGCAGTGAGATGTCTGGTGGGATTGCAAATGTTACAGTG
PG2	GTCAGTGCTGGAATTTCAATTGGCAGTGAGATGTCTGGTGGGATTGCAAATGTTACAGTG
PG1	GAGGATGTCCGCATTTGGGAGTCACGGCGAGGTTTGAGAATAAAGACTGCCATAGGAAGA
PG3	GAGGATGTCCGCATTTGGGAGTCACGGCGAGGTTTGAGAATAAAGACTGCCATAGGAAGA
PG2	GAGGATGTCCGCATTTGGGAGTCACGGCGAGGTTTGAGAATAAAGACTGCCATAGGAAGA
PG1	GGGGGCTACATCCACGATATCTCCTATCGCAACATAACCTTCGACAATGTCCGTGCTGGT
PG3	GGGGGCTACATCCACGATATCTCCTATCGCAACATAACCTTCGACAATGTCCGTGCTGGT
PG2	GGGGGCTACATCCACGATATCTCCTATCGCAACATAACCTTCGACAATGTCCGTGCTGGT
PG1	ATTGTGATAAAGGTTGACTACAATGAGCACGCTGATGATGGGTATGACCGGGATGCCTTT
PG3	ATTGTGATAAAGGTTGACTACAATGAGCACGCTGATGATGGGTATGACCGGGATGCCTTT
PG2	ATTGTGATAAAGGTTGACTACAATGAGCACGCTGATGATGGGTATGACCGGGATGCCTTT
PG1	CCAGACATCACAACATATCATTCAAGGAAATACATGGGCGAGGTGTCCGGGTGCCAGTC
PG3	CCAGACATCACAACATATCATTCAAGGAAATACATGGGCGAGGTGTCCGGGTGCCAGTC
PG2	CCAGACATCACAACATATCATTCAAGGAAATACATGGGCGAGGTGTCCGGGTGCCAGTC
PG1	CGTGCTCATGGCAGCAGTGACATTCCCATCAAGGACATCAGCTTTCAGGGCATGTCTATC
PG3	CGTGCTCATGGCAGCAGTGACATTCCCATCAAGGACATCAGCTTTCAGGGCATGTCTATC
PG2	CGTGCTCATGGCAGCAGTGACATTCCCATCAAGGACATCAGCTTTCAGGGCATGTCTATC
PG1	GGCATCAGCTACAAGAAGAAACATATTTCCAGTGTTCTTCATTGAGGGGCGTGTCATC
PG3	GGCATCAGCTACAAGAAGAAACATATTTCCAGTGTTCTTCATTGAGGGGCGTGTCATC
PG2	GGCATCAGCTACAACAACCCACANATTTCCAGTGTTCTTCATTGAGGGGCGTGTCATC
PG1	GGGTCAAGTGTTCAAAACCATGCGAGAATTTGGATCTCTACAATGAGCAAGGGCAGCTT
PG3	GGGTCAAGTGTTCAAAACCATGCGAGAATTTGGATCTCTACAATGAGCAAGGGCAGCTT
PG2	GGGTCAAGTGTTCAAAACCATGCGAGAATTTGGATCTCTACAATGAGCAAGGGCAGCTT
PG1	GTTAAGCGTGCAGCAATGGTAAACAGCACGGAAGTTGATTATGACATATGATGATATAGG
PG3	GTTAAGCGTGCAGCAATGGTAAACAGCACGGAAGTTGATTATGACATATGATGATATAGG
PG2	GTTAAGCGTGCAGCAATGGTAAACAGCACGGAAGTTGATTATGACATATGATGATATAGG

ภาพที่ 3.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ OSPG ที่หาลำดับเบส 3 ครั้ง ตำแหน่ง EcoRI เป็นตำแหน่งจุดตัดเอนไซม์ในเวกเตอร์ stop เป็นตำแหน่งหยุดของยีน โดยที่ความยาวของยีนยังไม่เป็นยีนทั้งเส้นเพราะไม่พบ start codon ในลำดับเบส

```

PG3      -----LVSNTILAPISSAPNTDGIDPDSQDVLIENTYISVGDDAI
PG2      -----LVSNTILAPISSAPNTDGIDPDSQDVLIENTYISVGDDAI
PG1      YALTIGANSAXSAGGTNITVSNVTILAPISSAPNTDGIDPDSQDVLIENTYISVGDDAI

PG3      AVKSGWDQYGIAYGRPSRNIVIRNVMARSLVSAGISIGSEMSGGIANVTVEDVRIWESRR
PG2      AVKSGWDQYGIAYGRPSRNIVIRNVMARSLVSAGISIGSEMSGGIANVTVEDVRIWESRR
PG1      AVKSGWDQYGIAYGRPSRNIVIRNVMARSLVSAGISIGSEMSGGIANVTVEDVRIWESRR

PG3      GLRIKTAIGRGGYIHDISYRNITFDNVRAGIVIKVDYNEHADDGYDRDAFPDITNISFKE
PG2      GLRIKTAIGRGGYIHDISYRNITFDNVRAGIVIKVDYNEHADDGYDRDAFPDITNISFKE
PG1      GLRIKTAIGRGGYIHDISYRNITFDNVRAGIVIKVDYNEHADDGYDRDAFPDITNISFKE

PG3      IHGRGVRVPVRAHGSSDIPIKDISFQGMISIGSYKKKHIFQCSFIEGRVIGSVFPKPCEN
PG2      IHGRGVRVPVRAHGSSDIPIKDISFQGMISIGSYKKKHIFQCSFIEGRVIGSVFPKPCEN
PG1      IHGRGVRVPVRAHGSSDIPIKDISFQGMISIGSYKKKHIFQCSFIEGRVIGSVFPKPCEN

PG3      LDLYNEQGQLVKRAAMVNSTEVDYDI
PG2      LDLYNEQGQLVKRAAMVNSTEVDYDI
PG1      LDLYNEQGQLVKRAAMVNSTEVDYDI

```

ภาพที่ 3.2 แสดงลำดับกรดอะมิโนของ *OSPG* ที่หาลำดับเบส 3 ครั้ง โดยที่ความยาวของยีนยังไม่เป็นยีนทั้งเส้นเพราะไม่พบ start codon (M) ในสายของกรดอะมิโน

Sequence 1: *OSPG1*

Sequence 2: *Oryza sativa japonica* 93%

Sequence 3: *Arabidopsis thaliana* 63%

Sequence 6: *Eucalyptus globulus* (Tasmanian blue gum) 62%

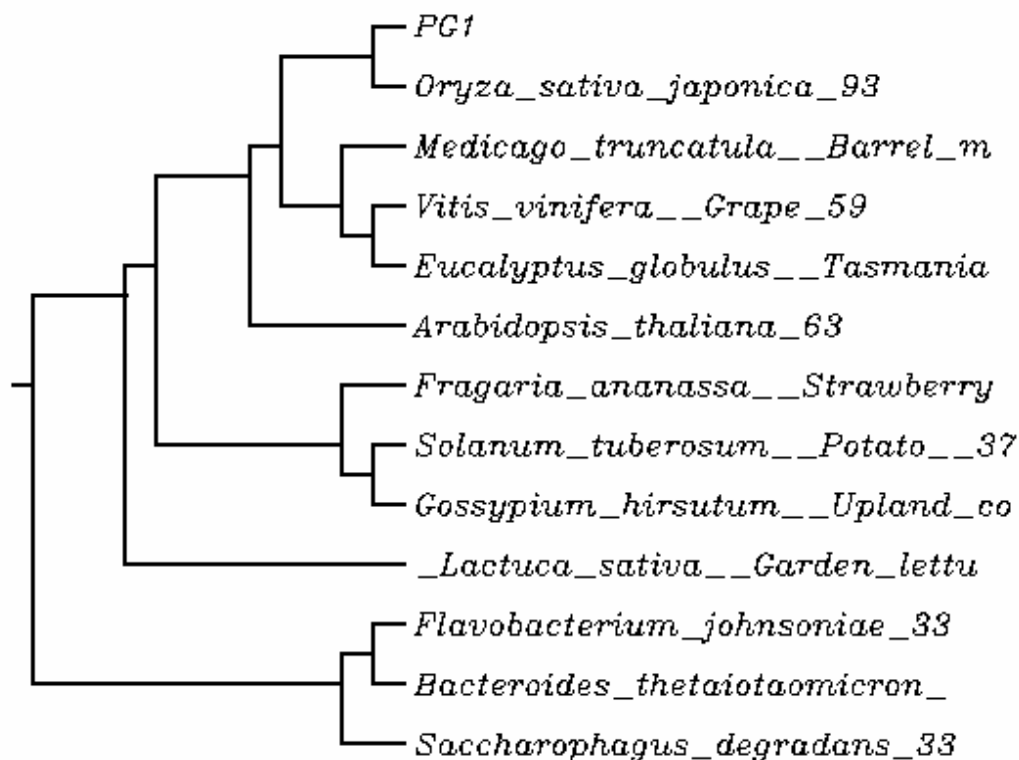
Sequence 4: *Medicago truncatula* (Barrel medic) 60%

Sequence 5: *Vitis vinifera* Grape 59%

ภาพที่ 3.3 เปรียบเทียบความเหมือนของของ *OSPG* กับยีนใน GenBank

3.4) ผลการทดลอง

สำหรับเฉพาะยีน *OsPG* ที่ได้ขณะนี้มีความยาว 771 คู่เบส โดยที่ลำดับเบสทางด้านปลาย 5' ยังขาดหายไปอยู่จำนวนหนึ่ง ซึ่งจะค้นหาลำดับเบสทางปลาย 5' โดยวิธี 5' RACE ต่อไป ส่วนบริเวณปลาย 3' พบจนสุดสิ้นที่ stop codon (ภาพที่ 3.1) และเมื่อแปลเป็นกรดอะมิโนที่มีความยาว 257 กรดอะมิโน (ภาพที่ 3.2) จากการเปรียบเทียบความเหมือนใน GenBank database พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ *OsPG* ไปเหมือนมากที่สุดกับกับ *Oryza sativa japonica*, *Arabidopsis thaliana*, *Eucalyptus globulus*, *Medicago truncatula*, *Vitis vinifera* ด้วยความเหมือน 93%, 63%, 62%, 60 และ 59% ตามลำดับ (ภาพที่ 3.3) และได้แสดงในรูปของ dendrogram (ภาพที่ 3.4)



ภาพที่ 3.4 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ความใกล้เคียงระหว่าง OSPG กับพืชชนิดอื่นใน GenBank

3.4.1) การศึกษาการแสดงออกของยีน *Rab5* , *Rab7* และ *PG* ในเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของข้าวขาวดอกมะลิ 105

ในการศึกษาเรื่องนี้เพื่อต้องการทราบการแสดงออกของยีน *Rab5* , *Rab7* และ *PG* (จากข้าวขาวดอกมะลิ 105) ในเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้วิธี quantitative RT-PCR ดังนี้

3.4.1.1) การสกัด RNA และการสังเคราะห์ 1st cDNA

- นำเนื้อเยื่อข้าวบริเวณต่าง ๆ 5 บริเวณได้แก่ ปลายรากความยาว 0.5 cm., โคนรากบริเวณที่มีสีน้ำตาล, แผ่นใบของใบที่ 5 ที่มีอายุ 30 และ 60 วัน และดอกข้าว มาสกัด RNA โดยใช้ TRIzol reagent (Invitrogen)

- สังเคราะห์ 1st cDNA จาก RNA ที่สกัดได้ โดยใช้ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) ดำเนินวิธีสกัดตามคำแนะนำของบริษัท

3.4.1.2)ศึกษาการแสดงออกของยีน *Rab5* , *Rab7* และ *PG* โดยอาศัยเทคนิค RT-PCR จากเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ

- การเตรียม 1st DNA เพื่อจะใช้เป็นแท่นพิมพ์ในการทดลองการศึกษาการแสดงออกของยีน
 - ใช้ 1st cDNA จากโคโนรามาเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ Actin primer (ซึ่งออกแบบจากลำดับเบสจากบริเวณอนุรักษ์ของยีน actin จากฐานข้อมูล) เพื่อเป็นกลุ่มควบคุมที่จะใช้ในการหาจำนวนรอบที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
- เงื่อนไขในการทำปฏิกิริยา คือ

อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
94	5 นาที	1
94	30 วินาที	} 35 , 40 , 45 , 50
55	30 วินาที	
72	30 วินาที	
72	10 นาที	

ในที่นี้จะเพิ่มจำนวนรอบที่ละ 5 รอบ

นำผลผลิตที่ได้จากการทำ RT-PCR มาตรวจสอบโดยใช้เทคนิค electrophoresis เจลที่ใช้ คือ Agarose gel ความเข้มข้น 1.4%

- ถ่ายรูปแถบดีเอ็นเอที่ได้ในการทำ RT-PCR ในแต่ละเงื่อนไข จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา RT-PCR โดยวิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Scion Image หาพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละแถบดีเอ็นเอและการสร้างแผนภูมิเส้นตรงมาตรฐานขึ้น

- นำเงื่อนไขของจำนวนรอบที่เหมาะสมมาใช้ในการทำ RT-PCR ของ 1st cDNA ที่ได้จากเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ทั้ง 5 บริเวณ จากนั้นตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิค electrophoresis และวิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยโปรแกรม Scion Image

- ปรับความเข้มข้นของ 1st cDNA แม่พิมพ์ของทุกตัวอย่างให้เท่ากันโดยการตรวจสอบจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ของแต่ละตัวอย่าง

3.4.1.3) ศึกษาการแสดงออกของยีน *Rab5* , *Rab7* และ *PG* ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธี RT-PCR

- ออกแบบ primers สำหรับปฏิกิริยา RT-PCR สำหรับยีน *Rab5*, *Rab7* และ *PG* โดยเลือกลำดับเบสทางบริเวณด้านปลาย 3' เพื่อให้ให้ได้แถบดีเอ็นเอสายใหม่ที่ต้องการมีขนาดอยู่ในช่วง 220 – 350 คู่เบส

- นำ 1st cDNA บริเวณโคโนรากที่ปรับความเข้มข้นแล้วในข้อ 3.4.1.2 มาหาเงื่อนไขที่เหมาะสมในปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์เฉพาะ (จากข้อบน) ที่ออกแบบสำหรับยีน *Rab5*, *Rab7* และ *PG* เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในแต่ละตัวอย่าง โดยมีเงื่อนไข ดังนี้

อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
94	5 นาที	1
94	30 วินาที	20, 25, 30, 35, 40
63 สำหรับ Rab5	30 วินาที	
66 สำหรับ Rab7		
65 สำหรับ PG		
72	30 วินาที	
72	10 นาที	1

- ถ่ายรูปแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ในแต่ละเงื่อนไข จากนั้นนำมาวิเคราะห์หารอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา RT-PCR โดยจะวิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม Scion Image และการสร้างแผนภูมิเส้นตรง

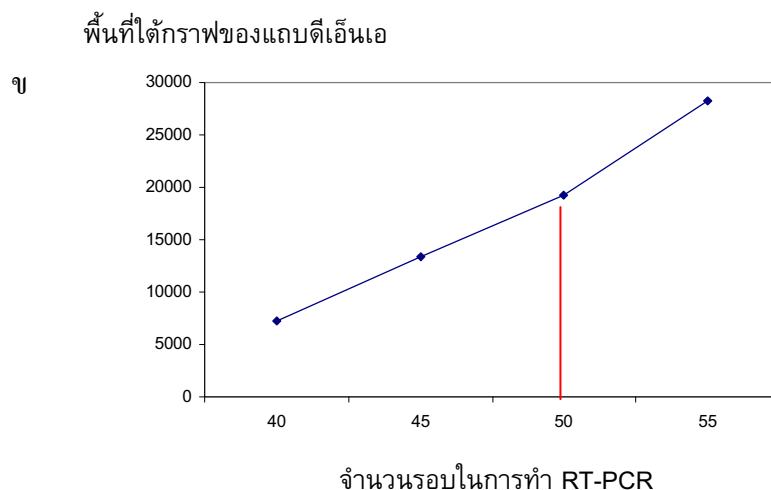
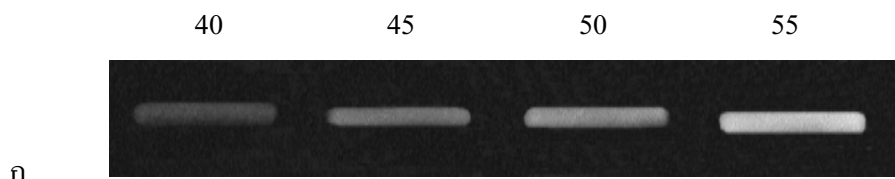
- นำเงื่อนไขของจำนวนรอบที่เหมาะสมในแต่ละยีน มาทดสอบในปฏิกิริยา RT-PCR ของ 1st cDNA ที่ปรับความเข้มข้นแล้วจากข้อ 3.4.1.2 ของตัวอย่างทั้งหมด จากนั้นมาตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิค electrophoresis และวิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยโปรแกรม Scion Image

- เปรียบเทียบการแสดงออกในแต่ละเนื้อเยื่อของแต่ละยีนโดยการสร้างแผนภูมิแท่ง

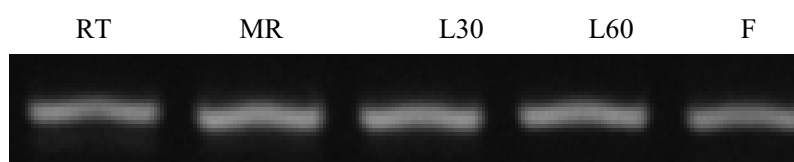
3.4.1.4) การหาเงื่อนไขที่เหมาะสมในการปรับความเข้มข้นของ 1st cDNA แม่พิมพ์

เมื่อนำผลผลิตที่ได้จากการทำ RT-PCR ที่ใช้ actin primer ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ของเนื้อเยื่อที่โคโนราก โดยใช้รอบในการสังเคราะห์ต่างกัน ได้ผลดัง ภาพที่ 3.5

จากภาพที่ 3.5 ความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้ วัดได้จากค่าพื้นที่ใต้กราฟหลังจากวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Scion Image พบว่าจำนวนรอบที่ได้แถบดีเอ็นเอที่มีค่าความเข้มอยู่กึ่งกลางของการเพิ่มขึ้นของความเข้มของแถบดีเอ็นเอ คือ 50 รอบ ดังแสดงในแผนภูมิแท่งในรูป 1x จึงนำเงื่อนไขที่ได้มาใช้ในการทำ RT-PCR เพื่อปรับความเข้มข้นของ 1st cDNA แม่พิมพ์ให้เท่ากัน ดังภาพที่ 3.6



ภาพที่ 3.5 (ก) แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ของเนื้อเยื่อบริเวณโคนรากโดยใช้ actin primer ที่จำนวนรอบต่างกัน ได้แก่ 40, 45, 50 และ 55 รอบ. (ข) แผนภูมิเส้นตรงแสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟของแถบดีเอ็นเอในแต่ละเงื่อนไขของจำนวนรอบในปฏิกิริยา RT-PCR ของ 1st cDNA จากโคนรากโดยใช้ actin primer

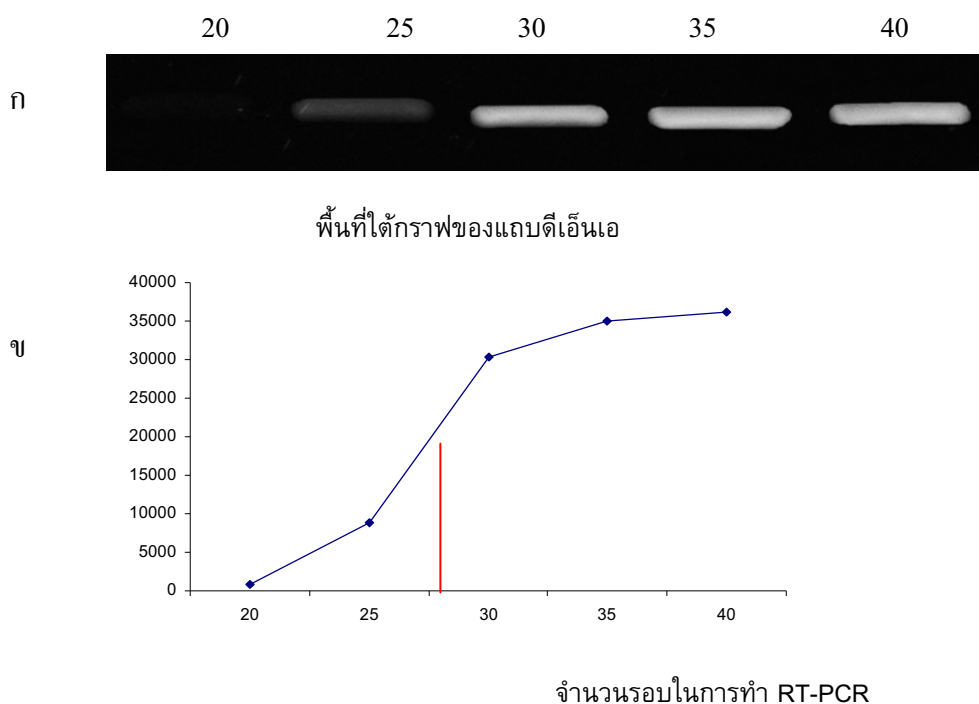


ภาพที่ 3.6 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ actin (เงื่อนไขปฏิกิริยา คือ 94°C 5 นาที 1 รอบ, 94°C 30 วินาที ; 55°C 30 วินาที ; 72°C 30 วินาที 50 รอบ, 72°C 10 นาที 1 รอบ) โดยใช้ 1st cDNA จากเนื้อเยื่อทั้ง 5 บริเวณเป็นแท่นพิมพ์ (RT = ปลายรากความยาว 0.5 cm., MR = โคนรากที่มีสีน้ำตาล, L30 = แผ่นใบข้าวดอกมะลิ 105 ใบที่ 5 ที่มีอายุ 30 วัน, L60 = แผ่นใบข้าวดอกมะลิ 105 ที่ 5 ที่มีอายุ 60 วัน และ F = ดอก)

3.4.1.5) การศึกษาการแสดงออกของยีน Rab5, Rab7 และ PG จากเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยอาศัยเทคนิค RT-PCR

1) ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *Rab5*

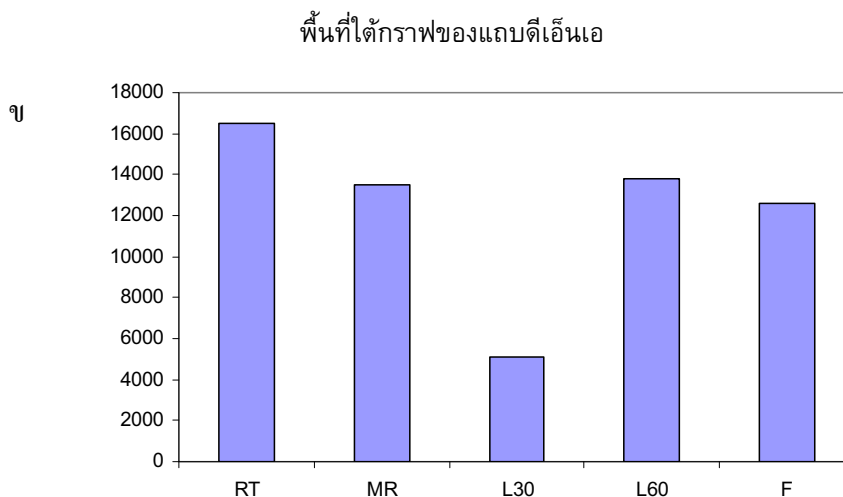
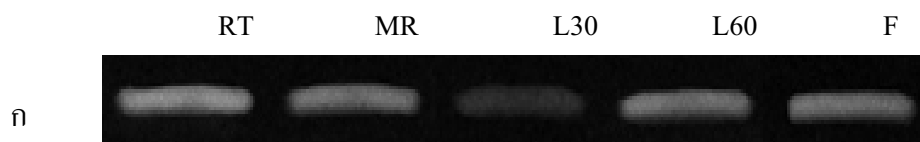
ใช้ 1st cDNA ที่ความเข้มข้นเท่ากันในข้อ 2.1 ของโคเนรากมาหาเงื่อนไขที่เหมาะสมในการทำ RT-PCR ของยีน *Rab5* ดังเงื่อนไขในข้อ 1.2.2 พบว่ารอบที่เหมาะสมในการทำ RT-PCR คือ 27 รอบ ดังภาพที่ 3.7



ภาพที่ 3.7 รูป ก คือแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ของเนื้อเยื่อบริเวณโคเนราก โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับ *Rab5* ที่จำนวนรอบต่างกัน ได้แก่ 20, 25, 30, 35 และ 40 รอบ, (ข) แผนภูมิเส้นตรงแสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟของแถบดีเอ็นเอในแต่ละเงื่อนไขของจำนวนรอบที่ต่างกัน ในการทำ RT-PCR ของ 1st cDNA จากโคเนรากโดยใช้ไพรเมอร์สำหรับ *Rab5*

จากนั้นใช้ไพรเมอร์สำหรับ *Rab5* มาศึกษาการแสดงออกของยีน *Rab5* โดยปฏิกิริยา RT-PCR ซึ่งจะใช้ 1st cDNA ของทั้ง 5 เนื้อเยื่อเป็นแท่นพิมพ์ ตามเงื่อนไขในการทำปฏิกิริยา คือ 94°C 5 นาที 1 รอบ, 94°C 30 วินาที; 63°C 30 วินาที; 72°C 30 วินาที 27 รอบ, 72°C 10 นาที 1 รอบ พบว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ในทุกเนื้อเยื่อในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ดังภาพที่ 3.8

จากภาพที่ 3.8 แสดงให้เห็นว่ายีน *Rab5* มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อส่วนราก ทั้งปลายรากและโคเนรากตามที่เคยมีรายงานมาก่อนรวมทั้งในดอก แต่หากเปรียบเทียบการแสดงออกที่ ใบอายุต่างๆ พบว่ายีน *Rab5* ไม่แสดงออกในใบอายุ 30 วัน แต่มาพบการแสดงออกมาที่อายุ 60 วัน เป็นไปได้ที่ยีนนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับระยะเสื่อมสภาพ (senescence) ของใบ

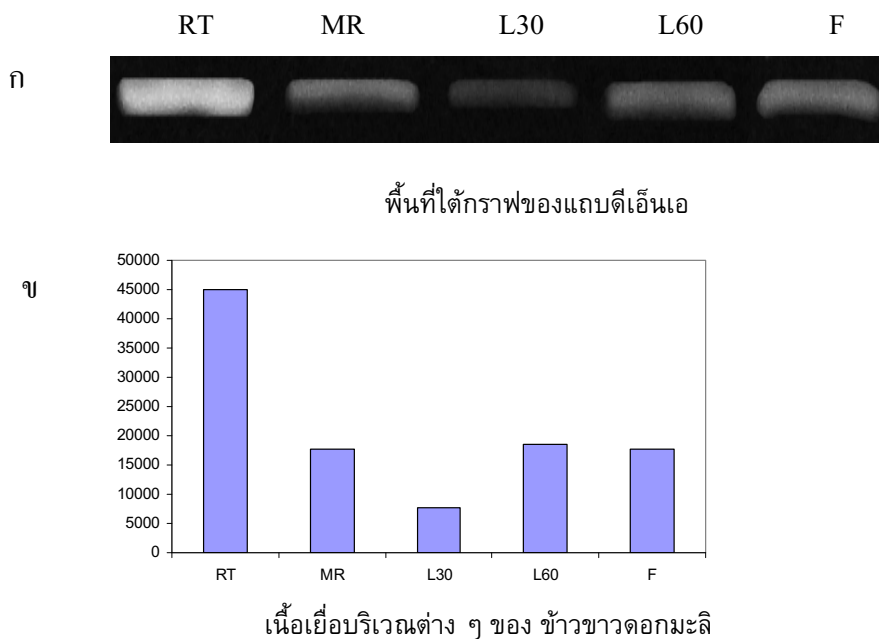


ภาพที่ 3.8 (ก) แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับ *Rab5* สังเคราะห์จาก 1st cDNA จากเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ทั้ง 5 บริเวณของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และ (ข) แผนภูมิแท่งเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อเยื่อทั้ง 5 บริเวณ (RT = ปลายรากความยาว 0.5 cm., MR = โคนรากที่มีสีน้ำตาล, L30 = แผ่นใบข้าวดอกมะลิ 105 ใบที่ 5 ที่มีอายุ 30 วัน, L60 = แผ่นใบข้าวดอกมะลิ 105 ที่ 5 ที่มีอายุ 60 วัน และ F = ดอก)

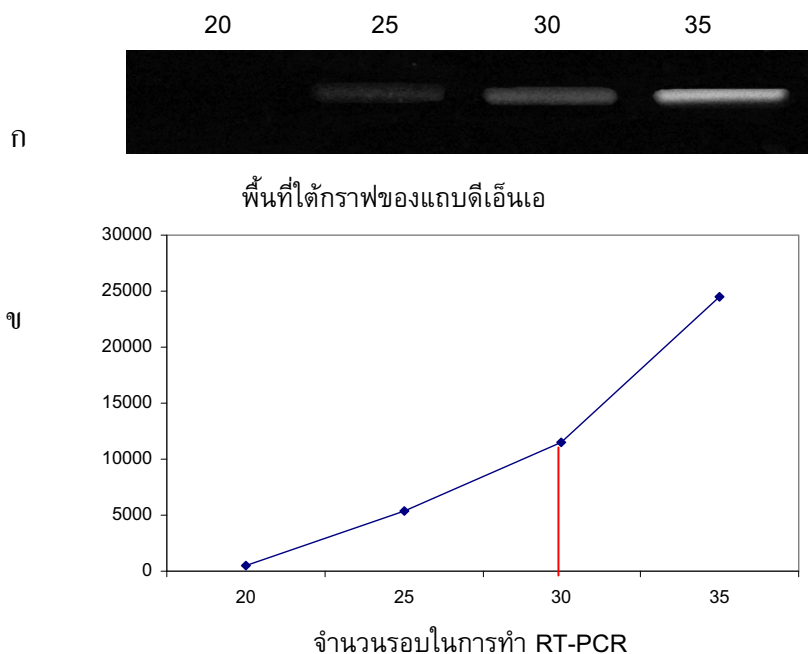
3.4.3.2) ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *Rab7*

ในการหาเงื่อนไขที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของยีน *Rab7* โดยอาศัย 1st cDNA จากโคนรากเป็นแท่นพิมพ์โดยปฏิกิริยา RT-PCR ได้ปฏิบัติตั้งเงื่อนไขในข้อ 1.2.2 พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มและแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของความเข้มของแถบดีเอ็นเอใกล้เคียงกับการทำ RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับ *Rab5* ดังนั้นรอบที่เหมาะสมในปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *Rab7* คือ 27 รอบเท่ากัน ต่อจากนั้นนำ 1st cDNA จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ เป็นแม่พิมพ์ในการทำ RT-PCR ตามเงื่อนไขในการทำปฏิกิริยา คือ 94°C 5 นาที 1 รอบ, 94°C 30 วินาที ; 66°C 30 วินาที ; 72°C 30 วินาที 27 รอบ, 72°C 10 นาที 1 รอบ พบว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ในทุกเนื้อเยื่อ ดังภาพที่ 3.9

จากภาพที่ 3.9 แสดงให้เห็นว่ายีน *Rab7* มีการแสดงออกเหมือนกับยีน *Rab5* ทุกเนื้อเยื่อ เพราะพบการแสดงในราก (ปลายและโคนราก) และที่ดอก ไม่พบแสดงออกในใบอายุ 30 วัน แต่มาพบการแสดงออกมาที่อายุ 60 วัน เนื่องจากทั้ง 2 ยีนทำงานร่วมกันในกระบวนการ endocytosis โดยที่ *Rab5* เกี่ยวข้องกับระยะ early endocytosis ส่วน *Rab7* เกี่ยวข้องกับระยะ late endocytosis ในกระบวนการ secretion traffics protein transport



ภาพที่ 3.9 (ก) แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับ *Rab7* สังเคราะห์จาก 1st cDNA จากเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ทั้ง 5 บริเวณของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และรูป ข แผนภูมิแท่งเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อเยื่อทั้ง 5 บริเวณ (RT = ปลายรากความยาว 0.5 cm., MR = โคนรากที่มีสีน้ำตาล, L30 = แผ่นใบข้าวดอกมะลิ 105 ใบที่ 5 ที่มีอายุ 30 วัน, L60 = แผ่นใบข้าวดอกมะลิ 105 ที่ 5 ที่มีอายุ 60 วัน และ F = ดอก)

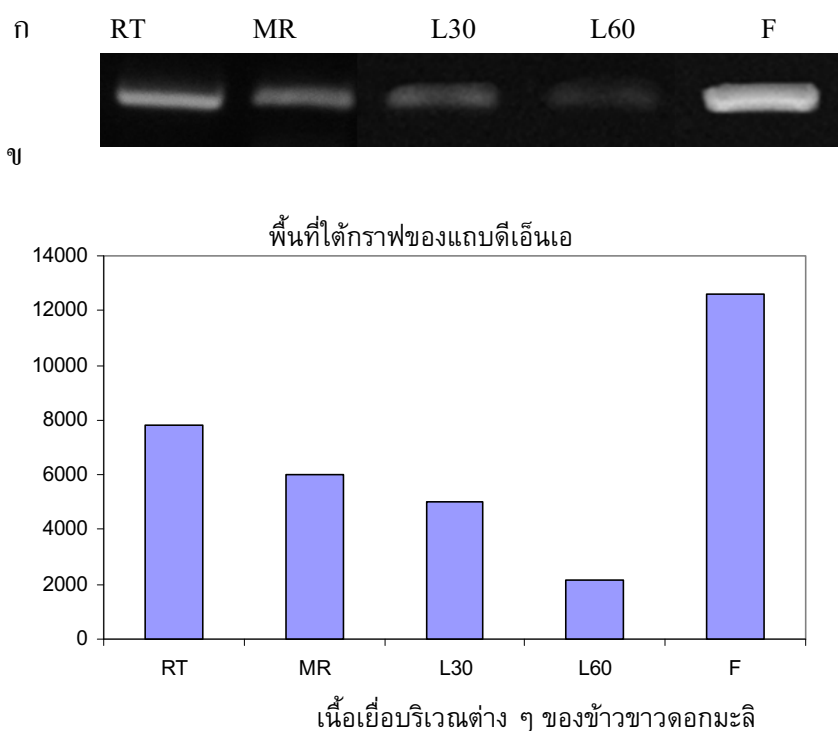


ภาพที่ 3.10 (ก) คือแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ของเนื้อเยื่อบริเวณโคนรากโดยใช้ไพรเมอร์สำหรับ *PG* ที่จำนวนรอบต่างกัน ได้แก่ 20, 25, 30 และ 35 รอบ, (ข) แผนภูมิเส้นตรงแสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟของแถบดีเอ็นเอในแต่ละเงื่อนไขของจำนวนรอบที่ต่างกันของปฏิกิริยา RT-PCR

3.4.3.3) ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *PG*

นำ 1st cDNA จากโค่นรากมาหาเงื่อนไขที่เหมาะสมในการทำ RT-PCR ของยีน *PG* ตั้งเงื่อนไขในข้อ 1.2.2 พบว่ารอบที่เหมาะสมปฏิกิริยา RT-PCR คือ 33 รอบ ดังภาพที่ 3.10

สำหรับ ปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ 1st cDNA จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ เป็นแม่พิมพ์ โดยใช้ ไพเมอร์สำหรับ *PG* ได้ดำเนินในเงื่อนไข คือ 94°C 5 นาที 1 รอบ, 94°C 30 วินาที; 65°C 30 วินาที ; 72°C 30 วินาที 33 รอบ, 72°C 10 นาที 1 รอบ พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ในทุกเนื้อเยื่อ ภาพที่ 3.11



ภาพที่ 3.11 (ก) แถบดีเอ็นเอที่ได้ปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพเมอร์สำหรับ *PG* โดยใช้ 1st cDNA จากเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ทั้ง 5 บริเวณของข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นแม่พิมพ์ (ข) แผนภูมิแท่งเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อเยื่อทั้ง 5 บริเวณ RT = ปลายรากความยาว 0.5 cm., MR = โค่นรากที่มีสีน้ำตาล, L30 = แผ่นใบข้าวดอกมะลิ 105 ใบที่ 5 ที่มีอายุ 30 วัน, L60 = แผ่นใบข้าวดอกมะลิ 105 ที่ 5 ที่มีอายุ 60 วัน และ F = ดอก

สำหรับยีน *PG* พบว่ามีการแสดงออกมาที่สูงสุดในส่วนของดอก รองลงมาได้แก่ที่ ปลายราก โค่นราก และใบอายุ 30 วัน และ พบน้อยที่สุดแสดงออกที่ใบอายุ 60 วัน ดังนั้นเชื่อว่ายีน *PG* ไม่น่าที่จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ senescence ในใบ แต่จะเกี่ยวข้องกับ พัฒนาการของดอก

3.5 เอกสารอ้างอิง

- Anuntalabhochai, S., Terry, T., Van Montagu, M., and Inze, D. (1991). Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a small GTP-binding protein, Rha1. *Plant, J.* 1:167-174.
- Crookes, P.R., Grierson, D., (1983). Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. *Plant Physiol.* 72, 1088-1093.
- Grierson, D., (1985). Gene expression in ripening tomato fruit. *Crit. Rev. Plant Sci.* 3, 113-132.
- Pressey R (1986) Polygalacturonases in higher plants. American Chemical Society Symposium Series 310, Washington DC, pp 157–174
- Roberts K (1990) Structures at the plant cell surface. *Curr Opin Cell Biol* 2:920–928.
- Rexova -Benkova L, Markovic O (1976). Pectic enzymes. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 33:323–385
- Sheehy, R.E., Kramer, M., and Hiatt, W.R (1988) Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8805-8809
- Sona, O., Yang, H-S, Lee, H-J., Lee, M-Y, Shin, K-H., Jeon, S-L, Lee, M-S, Choi, S-Y., Chun, J-Y, Kim, H., An, C-H., Hong, S-K., Kim, N-S., Koh, S-K., Cho, M-J., Kim, S., Verma, D.P.S., Cheon, C.I (2003) Expression of *srab7* and *SCaM* genes required for endocytosis of *Rhizobium* in root nodules *Plant Science* 165 1239–1244
- Wang X, Xia M, Chen Q, Wu Z and Wu P (2002) Identification of a new small GTP-binding protein gene *OsRab5a*, genomic organization, and expression pattern analysis during nitrate supply and early nutrient starvation in rice (*Oryza sativa* L.) root *Plant Science*.163: 273-280.

บทที่ 4: การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชผักต่างชนิด

4.1) ผักสลัด (*Lactuca sativa*)

ในการศึกษาเรื่องการชักนำการกลายพันธุ์ในพืชผัก ด้วยลำไอออนพลังงานต่ำ เพื่อในการปรับปรุงคุณภาพ โดยแรกเริ่มได้ศึกษาการทดลองการกลายพันธุ์ในผักกาด 5 ชนิด ได้แก่ ผักกาดหอมบัตเตอร์เฮด ผักกาดหอมใบแดง ผักกาดหอมโอลิฟเขียว ผักกาดหอมใบแดงอินทรีย์ ผักกาดหอมห่ออินทรีย์ ซึ่งผลการทดลองที่ผ่านมาจำนวน 3 ครั้ง ยังไม่สามารถพบลักษณะที่ดีของผักกาด เพราะได้ลักษณะต้นเตี้ย และต้นเล็กเป็นส่วนใหญ่ (ดังได้รายงานไปในคราวที่แล้ว) ในการทดลองครั้งจึงได้เลือกทดสอบเฉพาะ พันธุ์เรดสลัดโบว์ (MJ-6) อีกครั้งหนึ่ง

4.1.1) การทดลองที่ 1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในผักสลัดพันธุ์เรดสลัดโบว์ (MJ-6) อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์สลัด พันธุ์เรดสลัดโบว์ (MJ-6)
2. อุปกรณ์การเพาะเมล็ด เช่น ถาดเพาะ วัสดุเพาะกล้า ปากคีบปลายแหลม
3. อุปกรณ์ทางการเกษตรที่ใช้ในการดูแลรักษา เช่น บัวรดน้ำ สารเคมีป้องกันกำจัดแมลง

4.1.2) วิธีการทดลอง

1. ทำการเพาะเมล็ดพันธุ์สลัด พันธุ์เรดสลัดโบว์ (MJ-6) ที่ประกอบด้วย 4 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1 (ควบคุม) ชุดการทดลองที่ 2 (สุญญากาศ) ชุดการทดลองที่ 3 (6×10^{16} ions/cm²) และชุดการทดลองที่ 4 (1×10^{17} ions/cm²) ด้วยพลังงานที่ 60 keV หลังจากนั้นจะหยอดเมล็ดพันธุ์สลัด ลงในถาดเพาะหลุมละ 1 เมล็ดและรดน้ำเช้า – เย็น (เพาะกล้า 3 มกราคม 2551)

2. การบันทึกข้อมูล

2.1 เปอร์เซ็นต์การงอก ทำการนับจำนวนต้นกล้าที่อายุ 18 วันหลังเพาะ แล้วนำตัวเลขที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอก

2.2 เปอร์เซ็นต์ต้นกล้าที่มีการเจริญเติบโตและลักษณะผิดปกติโดยทำการตรวจนับที่อายุ 32 วันหลังเพาะ และนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติ

3. ดูแลต้นกล้าสลัดต่อไปจนถึงอายุ 39 วันหลังเพาะ เพื่อดูความสามารถในการรอดชีวิตของต้นกล้าที่แสดงลักษณะการเจริญเติบโตผิดปกติ

4.1.3) ผลการทดลอง

ผลของลำไอออนพลังงานต่ำต่อเปอร์เซ็นต์การงอก เปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติ และการรอดชีวิตของเมล็ดพันธุ์ผักสลัด พันธุ์เรดสลัดโบว์ (MJ-6) ได้ผลการทดลองดังนี้

ผลของลำไอออนพลังงานต่ำต่อเปอร์เซ็นต์การงอก พบว่า ที่ปริมาณไอออนโมเลกุลที่สูง เปอร์เซ็นต์การงอกมีแนวโน้มลดลง โดยในชุดการทดลองที่ 4 มีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำที่สุด เท่ากับ 77.39 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในชุดการทดลองที่ 1, 2 และ 3 มีเปอร์เซ็นต์การงอกใกล้เคียงกันเท่ากับ 96.00, 94.31 และ 95.21 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตาราง 1)

ด้านเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติ พบว่าชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ไม่พบลักษณะต้นกล้าผิดปกติ ส่วนในชุดการทดลองที่ 3 และ 4 ที่ผ่านการระดมยิงด้วย ลำไอออนพลังงานต่ำ ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น มีแนวโน้มทำให้ต้นกล้าฝักสลับแสดงความผิดปกติเพิ่มขึ้น โดยพบว่า ชุดการทดลองที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติเท่ากับ 0.77 เปอร์เซ็นต์ และชุดการทดลองที่ 4 มีเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติสูงที่สุดเท่ากับ 2.89 เปอร์เซ็นต์ โดยต้นกล้าที่แสดงลักษณะ ผิดปกตินั้นจะมีลักษณะที่ปรากฏให้เห็น คือ ต้นที่มีขนาดเล็กเจริญเติบโตช้า มีเฉพาะใบเลี้ยงไม่มี ส่วนของใบจริง และรวมถึงการมีรูปร่างของใบจริงที่บิดเบี้ยวไปจากเดิม (ตาราง 4.1, ภาพที่ 4.1)

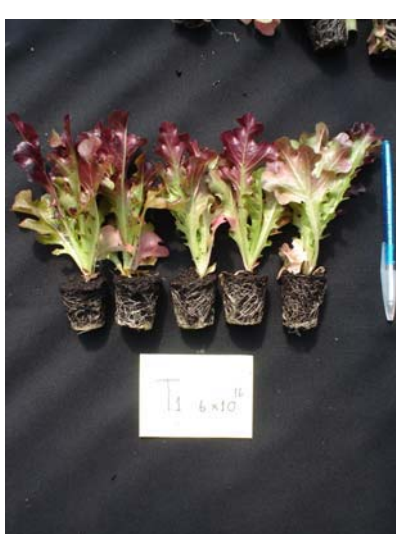
เมื่อปล่อยให้ต้นกล้าที่มีลักษณะการเจริญเติบโตที่ผิดปกติเจริญต่อไปจนถึงอายุ 39 วัน เพื่อศึกษาถึงความสามารถในการรอดชีวิตของต้นกล้า ที่ผ่านการระดมยิงด้วยไอออนพลังงานต่ำ ทั้ง 2 ระดับ พบว่าต้นกล้าที่เจริญเติบโตผิดปกติทุกต้นตายทั้งหมดเมื่อถึงอายุ 39 วัน

ตาราง 4.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การงอกและเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติของเมล็ดพันธุ์เรดสลับโบว์ (MJ-6)

ชุดการทดลอง	อายุ 18 วันหลังเพาะ			อายุ 32 วันหลังเพาะ		
	จำนวน เพาะ	จำนวน งอก	%การงอก	จำนวนต้น ปกติ	จำนวนต้น ผิดปกติ	% ต้น ผิดปกติ
ชุดการทดลองที่ 1 (ควบคุม)	100	96	96.00	96	0	0
ชุดการทดลองที่ 2 (สุญญากาศ)	88	83	91.31	83	0	0
ชุดการทดลองที่ 3 (6×10^{16} ions/cm ²)	962	916	95.21	909	7	0.77
ชุดการทดลองที่ 4 (1×10^{17} ions/cm ²)	920	712	77.39	692	20	2.89



(บน)



(กลาง)

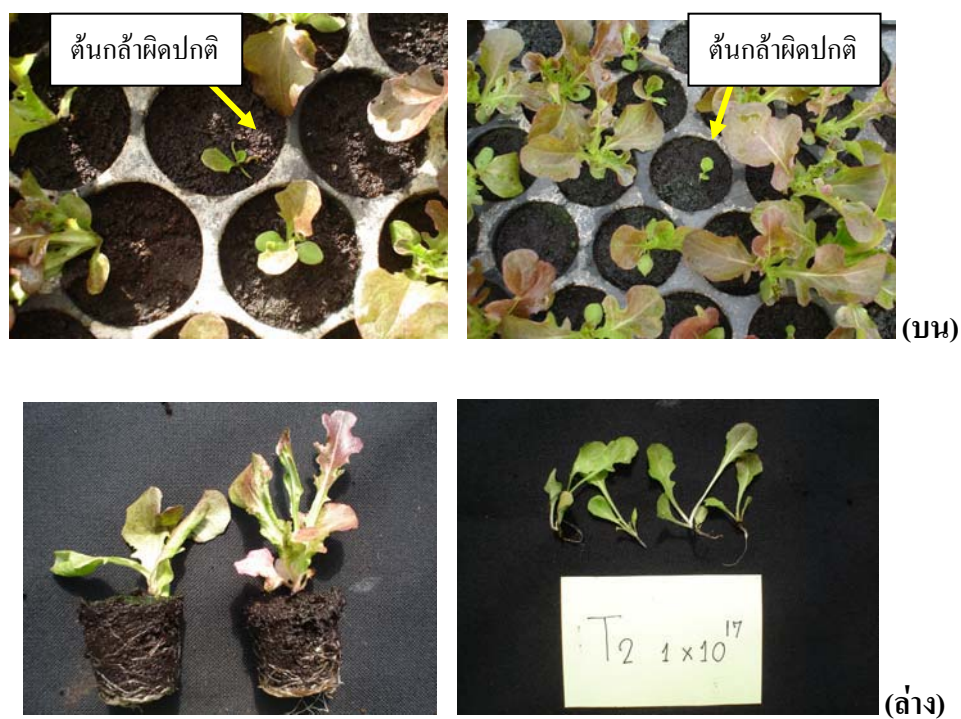


(ล่าง)

ภาพที่ 4.1 ต้นกล้าที่มีการเจริญเติบโตปกติเปรียบเทียบระหว่าง ชุดการทดลองที่1(ซ้าย) กับ ชุดการทดลองที่2 (ขวา) (บน), ระหว่างชุดการทดลองที่1(ซ้าย) กับ ชุดการทดลองที่3 (ขวา) (กลาง) และระหว่างชุดการทดลองที่1(ซ้าย) กับ ชุดการทดลองที่4 (ขวา) (ล่าง)



ภาพที่ 4.2 ต้นกล้าสลัดที่แสดงลักษณะผิดปกติ ใบบิดเบี้ยว และต้นมีขนาดเล็ก ในชุดการทดลองที่ 3 (6×10^{16} ions/cm²)



ภาพที่ 4.3 ต้นกล้าสลัดที่แสดงลักษณะผิดปกติ ใบบิดเบี้ยว และต้นมีขนาดเล็ก ในชุดการทดลองที่ 3 (1×10^{17} ions/cm²)

ส่วนการเจริญเติบโตของต้นกล้าสลัดสายพันธุ์เรดสลัดโบว์ (MJ-6) ที่อายุ 32 วัน (สุม วัสดุ 10 ต้น) พบว่าต้นกล้าสลัดมีการเจริญเติบโตในด้านความสูงที่ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยมีความสูงของต้นเฉลี่ยอยู่ในช่วง 13.35 – 14.23 เซนติเมตร (ตาราง 4.2)

ตารางที่ 4.2 แสดงความสูงของต้นกล้าที่อายุ 32 วันหลังเพาะ (สุม 10 ต้น) (เซนติเมตร)

ต้นที่	ชุดการทดลอง			
	ชุดการทดลองที่ 1 (ควบคุม)	ชุดการทดลองที่ 2 (สัญญาณ)	ชุดการทดลองที่ 3 (6×10^{10})	ชุดการทดลองที่ 4 (1×10^{17})
1	13.1	11.5	14.1	13.1
2	13.5	14.5	12.3	12.1
3	11.8	14.7	14.2	13.9
4	14.8	12.6	15.1	11.2
5	14.6	13.4	13.4	13.3
6	15.7	15.3	14.7	15.1
7	14.8	11.4	15.5	12.7
8	11.9	13.5	15.2	14.5
9	13.2	12.5	14.6	13.4
10	13.3	14.1	13.2	14.1
รวม	136.7	133.5	142.3	133.4
เฉลี่ย	13.67	13.35	14.23	13.34

4.1.4) สรุปผลการทดลอง

จากการทดลอง พบว่า เมล็ดพันธุ์สลัด พันธุ์เรดสลัดโบว์ (MJ-6) ในชุดการทดลองที่ 1, 2, 3 และ 4 มีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 96.00, 94.31, 95.21 และ 77.39 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นกล้าผิดปกติ พบว่า ในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ไม่มีต้นกล้าที่แสดงลักษณะผิดปกติ ในชุดการทดลองที่ 3 และ 4 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นกล้าผิดปกติเท่ากับ 0.77 และ 2.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยต้นกล้าที่แสดงลักษณะผิดปกติจะมีรูปร่างใบที่บิดเบี้ยวผิดปกติ และการเจริญเติบโตช้า แคระแกร็นและเมื่อถึงอายุ 39 วัน ต้นกล้าที่แสดงลักษณะผิดปกติทุกต้นได้ตายไปทั้งหมด

ในส่วนของความสูงของต้นกล้าที่อายุ 32 วันหลังเพาะเมล็ด พบว่าในชุดการทดลองที่ 1, 2, 3 และ 4 มีความสูงของต้นกล้าเท่ากับ 13.67, 13.35, 14.23 และ 13.34 เซนติเมตรตามลำดับ

สรุปผลการทดลอง ยังไม่พบลักษณะที่ดีของผักสลัดพันธุ์เรดสลัดโบว์ (MJ-6)

4.2) แดงกวา (*Curcumis sativus*)

ต่อมาจึงได้ไปทดสอบเพิ่มในพืชผักชนิดอื่นซึ่งได้แก่ แดงกวา (*Curcumis sativus*) ซึ่งผลของไอออนต่อการเปลี่ยนแปลงในแดงได้รายงานในรายงานในครั้งนี้แล้ว

ในที่นี้เพื่อสรุปได้ว่า ถ้าไอออนมีผลต่อความสูงของแดง ดังตาราง 4.3 นอกจากนั้นยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงต่อลักษณะภายนอกอีกหลายอย่างด้วย ดังการสรุปข้างล่าง

ตารางที่ 4.3 ความสูง (เฉลี่ย) ของต้นเมื่อดอกแรกบาน (อายุ 20 วัน) และเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ (อายุ 70 วัน) ในชุดการทดลองต่างๆ

กลุ่มทดลอง	เมื่อดอกแรกบาน (20 วัน)	เมื่อถอนวัดต้น (70 วัน)	เปอร์เซ็นต์ การงอก
ชุดการทดลองที่ 1 (control)	72.53	306.6	92
ชุดการทดลองที่ 2 (2×10^{17} ions/cm ²)	62.4	262.28	91.09
ชุดการทดลองที่ 3 (6×10^{17} ions/cm ²)	59.24	333.41	88
ชุดการทดลองที่ 4 (8×10^{17} ions/cm ²)	61.14	278.89	92

โดยพบว่า สามารถชักนำให้ดอกตัวเมียของแดง เปลี่ยนเป็นดอกตัวผู้ (ภาพที่ 4.4) โดยพบว่าเกิดประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ในทางกลับกันสามารถเปลี่ยนแปลงขนาดดอกเพศเมียให้มีขนาดใหญ่กว่าปกติ (ภาพที่ 4.5) และขนาดของรังไข่มีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 4.6) รวมทั้งชักนำให้ขนาดของผลแดงกวาเปลี่ยนไปโดยมีลักษณะกลมป้อมกว่าต้นปกติ (ภาพที่ 4.7) แต่รสชาติไม่แตกต่างจากพันธุ์ปกติ



ภาพที่ 4.4 แสดงการเปลี่ยนเพศจากดอกตัวเมียเป็นดอกตัวผู้ (ไม่มีกระเปาะของรังไข่) (ลูกศร)



ภาพที่ 4.5 แสดงลักษณะของดอกเพศเมียที่มีขนาดใหญ่กว่า (ขวา) ดอกเพศเมียปกติ (ซ้าย)



ภาพที่ 4.6 เปรียบเทียบดอกเพศเมีย ที่มีขนาดรังไข่ (ลูกสร) ที่ใหญ่กว่าดอกปกติ



ภาพที่ 4.7 เปรียบเทียบลักษณะเนื้อของผลแดงของต้นที่ 8 (ซ้าย) และต้นปกติ (ขวา)

4.3) พริก (*Capsicum annuum* L)

พริกเป็นผักอีกชนิดหนึ่งที่ถูกเลือกมาใช้ปรับปรุงพันธุ์โดยเทคนิคลำไอออนพลังงานต่ำ โดยมีจุดมุ่งหมายที่จะหาพันธุ์ที่ต้านทานโรคต่างบนใบ หรือ anthracnose

4.3.1) การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพริก (*Capsicum annuum* L.) ด้วยลำไอออนพลังงานต่ำ

เนื่องจากพริกเป็นพืชผักที่มีความสำคัญ และเกี่ยวข้องในชีวิตประจำวันของคนไทย ทำให้มีหน่วยงานราชการและภาคเอกชน ที่มีความสนใจในการพัฒนาสายพันธุ์พริกกันเป็นอย่างมาก เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ดีที่ตรงกับความต้องการของตลาดและปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในพื้นที่ปลูกในปัจจุบันนี้มากยิ่งขึ้น จุดประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อหาเงื่อนไขของปริมาณไอออนพลังงานต่ำที่ใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพริก เช่น ขนาดและสีของผล รวมทั้งความสามารถในการต้านทานโรค

4.3.2) อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

4.3.2.1) อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์พริกหนุ่มขาวสายพันธุ์แท้
2. อุปกรณ์การเพาะเมล็ด เช่น ถาดเพาะ วัสดุเพาะกล้า และปากคีบปลายแหลม
3. อุปกรณ์ทางการเกษตรต่าง ๆ เช่น พลาสติกคลุมแปลง ปุ๋ยเคมี และสารเคมีป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืช

4.3.2.2) วิธีการทดลอง

1. ได้นำเมล็ดพริกสายพันธุ์แท้ มาเรียงใน Petri disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. (ภาพที่ 4.8) เพื่อนำไประดมยิงด้วยลำไอออน ที่ศูนย์เครื่องเร่งอนุภาคนิวตรอน ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตามเงื่อนไขดังนี้

ตัวอย่างพืชทดลอง พริก (*Capsicum annuum* L.) สายพันธุ์แท้ จากภาควิชาพืชผัก มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พลังงาน 60 keV

ปริมาณไอออน 6×10^{16} ions/cm² และ 1×10^{17} ions/cm²

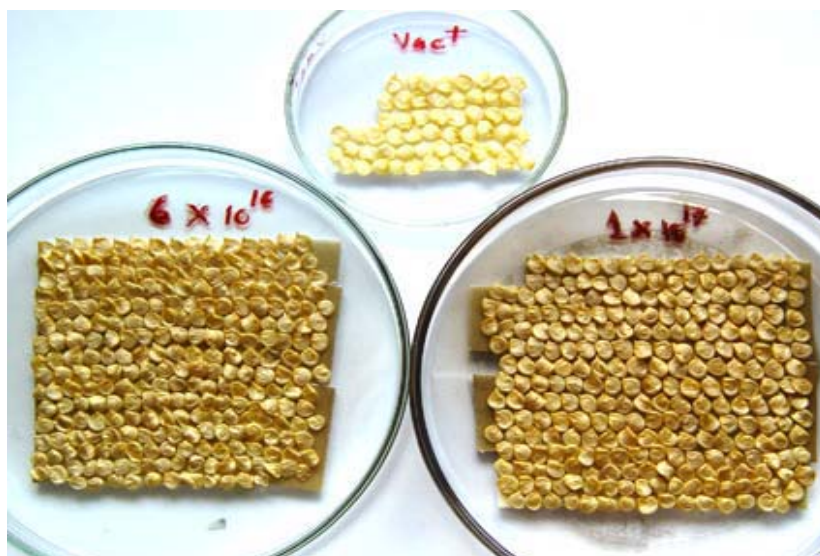
(กลุ่มควบคุม (Vac⁺) ไม่ได้ระดมยิงด้วยไอออนแต่อยู่ในสุญญากาศ)

ชนิดของไอออน ไนโตรเจน ($N^+ + N_2^+$)

2. หลังระดมยิงเมล็ดพริก (ภาพที่ 4.9) ได้นำไปเพาะเมล็ดพันธุ์พริกที่ประกอบด้วย 4 ชุดการทดลอง คือชุดการทดลองที่ 1 (ควบคุม) ชุดการทดลองที่ 2 (สุญญากาศ) ชุดการทดลองที่ 3 (6×10^{16} ions/cm²) และชุดการทดลองที่ 4 (1×10^{17} ions/cm²) โดยหยอดเมล็ดพริก ลงในถาดเพาะหลุมละ 1 เมล็ดและรดน้ำเช้า – เย็น (เพาะกล้า 26 พฤศจิกายน 2550 ย้ายปลูก 19 มกราคม 2551)



ภาพที่ 4.8 การเรียงเมล็ดพริกก่อนระดมยิงด้วยไนโตรเจนไอออนพลังงานต่ำ



ภาพที่ 4.9 เปรียบเทียบเมล็ดพริกหลังการระดมยิงตามเงื่อนไข 6×10^{16} ions/cm² และ 1×10^{17} ions/cm² และกลุ่มควบคุม (vac+)

3. เตรียมแปลงปลูกขนาด 1×40 เมตร จำนวน 8 แปลง ใส่ปุ๋ยคอก อัตรา 2,000 กิโลกรัมต่อไร่ ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่
 4. เตรียมหลุมปลูกโดยใช้ระยะปลูก 50×70 เซนติเมตร (ต้น $\times$ แถว)
 5. ย้ายกล้าปลูกที่อายุกล้า 54 วันหลังเพาะ
- * หมายเหตุ ปัญหาที่เกิดขึ้นในช่วงนี้คือช่วงที่เป็นฤดูหนาวอากาศหนาวเย็นต้นกล้าพริกมีการเจริญเติบโตช้า ทำให้ย้ายกล้าปลูกได้ช้า

6. การบันทึกข้อมูล ทำการบันทึกข้อมูลที่ประกอบด้วยเปอร์เซ็นต์การงอก เปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติ ความสูงของต้นกล้า (วันย้ายปลูก) ความสูงที่อายุ 90 และ 120 วัน ความกว้างทรงพุ่มที่อายุ 90 และ 120 วัน ลักษณะรูปทรง – สีผลที่เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 1 (ควบคุม) และระดับการเกิดโรคไวรัสโดยมีเกณฑ์การให้คะแนนการเกิดโรค คือ

ระดับความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้น

0 = ต้นสมบูรณ์ ไม่เกิดโรคหรือเกิดโรคน้อย

1 = เกิดโรคใบด่าง ใบบิดเบี้ยวเฉพาะส่วนยอด ยอดเน่า (ไม่ลูกกลม) และสามารถให้ผลผลิตได้ตามปกติ

2 = เกิดโรคใบด่าง ใบบิดเบี้ยวครึ่งต้น ยอดเน่า (ไม่ลูกกลม) แต่สามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้

3 = เกิดโรคใบด่าง ใบบิดเบี้ยวทั้งต้น ยอดเน่า (ไม่ลูกกลม) แต่สามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้

4 = เกิดโรคทุกระดับหรือยอดเน่าลูกกลม และไม่สามารถให้ผลผลิตหรือให้ผลผลิตได้เล็กน้อย

5 = ต้นแคระแกรน หรือตาย ไม่สามารถให้ผลผลิตได้

ข้อกำหนดในการสังเกต

- ความรุนแรงระดับ 1 – 3 ยังคงให้ผลผลิตได้ แต่อายุมากขึ้นแตกต่างกันตามอาการ

- ความรุนแรงระดับ 4 ต้นให้ผลผลิตน้อยหรือไม่ให้ผลผลิตเลย แต่ต้นแสดงแนวโน้มเจริญเติบโตได้อีกครั้งหนึ่ง

- ความรุนแรงระดับ 5 ต้น ไม่แสดงแนวโน้มว่าสามารถเจริญเติบโตได้ และไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ หรือได้น้อยมาก

4.3.2.3) ผลการทดลอง

ผลของลำไอออนพลังงานต่ำต่อเปอร์เซ็นต์การงอก เปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติและการเจริญเติบโตของเมล็ดพันธุ์พริกหนุ่มขาว ตามเงื่อนไขที่แสดงไว้ในวิธีการทดลองได้ผลการทดลองดังนี้

เปอร์เซ็นต์การงอกและเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติ พบว่า ชุดการทดลองที่ 3 ที่ระดมยิงด้วยไนโตรเจนไอออนที่ 6×10^{16} ions/cm² มีเปอร์เซ็นต์การงอกน้อยที่สุด เท่ากับ 74.20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดการทดลองที่ 1, 2 และ 4 มีเปอร์เซ็นต์การงอก เท่ากับ 76.00, 76.00 และ 82.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและเมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติ ก็ยังพบว่าชุดการทดลองที่ 3 เป็นเพียงชุดการทดลองเดียวที่มีการเกิดต้นกล้าผิดปกติคิดเป็น 3.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในชุดการทดลองอื่น ๆ ไม่มีการเกิดต้นกล้าผิดปกติ โดยต้นกล้าที่แสดงลักษณะผิดปกติ มี

ลักษณะของการเจริญเติบโตช้า แคระแกร็น และเมื่อดูแลรักษาต่อไปอีก 10 วัน พบว่าต้นกล้าตายทั้งหมด(ตาราง 4.3)

ตาราง 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์การงอก และเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติ

ชุดการทดลอง	จำนวนเมล็ด ที่เพาะ	จำนวนเมล็ดที่งอก (15 วันหลังเพาะ)	จำนวนต้นกล้า ผิดปกติ (อายุ 54 วัน)	เปอร์เซ็นต์ การงอก	เปอร์เซ็นต์ ต้นกล้า ผิดปกติ
ชุดการทดลองที่ 1 (ควบคุม)	50	38 (76%)	0	76	0
ชุดการทดลองที่ 2 (สุญญากาศ)	50	38 (76%)	0	76	0
ชุดการทดลองที่ 3 (6×10^{16} ions/cm ²)	260	193 (74.23%)	6	74.20	31
ชุดการทดลองที่ 4 (1×10^{17} ions/cm ²)	252	208 (82.25%)	0	82.53	0



ภาพที่ 4.10 แสดงต้นกล้าจากชุดการทดลองที่ 3 (6×10^{16}) ที่มีขนาดเล็กแคระแกร็น (A) และเปรียบเทียบต้นกล้าแคระแกร็นกับต้นกล้าปกติ (B)

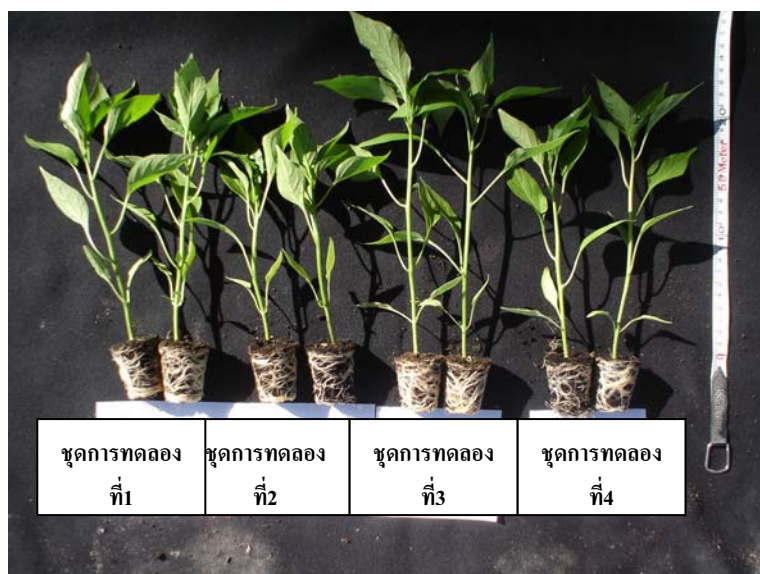
ด้านความสูงต้นและความกว้างทรงพุ่มของพริกหนุ่มขาว พบว่าในระยะต้นกล้า (วันย้ายปลูกอายุ 54 วันหลังเพาะ) ความสูงของต้นกล้าในชุดการทดลองที่ 2 (สุญญากาศ) มีความสูงต่ำที่สุดคือ 19.63 เซนติเมตร ส่วนในชุดการทดลองที่ 1, 3 และ 4 ต้นกล้ามีความสูง 21.88, 24.66 และ 23.30 ตามลำดับ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการได้รับแสงของต้นกล้าไม่เท่ากัน โดยต้นกล้าในชุดการทดลองที่ 2 จะวางอยู่ด้านนอกทำให้ได้รับแสงมากกว่า ทำให้ต้นกล้าไม่ยืดหาแสง จึงมีความสูงต้นน้อยกว่า

ความสูงที่อายุ 90 วัน พบว่า พริกจากชุดการทดลองที่ 2 มีความสูงต้นน้อยที่สุดเท่ากับ 46.60 เซนติเมตร เนื่องจากต้นกล้าที่ย้ายปลูกมีความสูงต่ำสุด ในชุดการทดลองที่ 1, 3 และ 4 ต้นพริกมีความสูงเท่ากับ 49.00, 48.10 และ 51.80 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนความสูงที่อายุ 120 วัน พบว่าต้นพริกทุกชุดการทดลองมีความสูงที่ไม่แตกต่างกันมากนักโดยมีความสูงเฉลี่ยอยู่ในช่วง 70.10 – 71.60 เซนติเมตร

ความกว้างทรงพุ่มของต้นพริกที่อายุ 90 วัน พบว่าพริกในชุดการทดลองที่ 4 จะมีความกว้างทรงพุ่ม มากที่สุดแต่ก็มากกว่าชุดการทดลองที่ 1 (ควบคุม) เพียง 0.50 เซนติเมตร ส่วนในชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ต้นพริกมีความกว้างทรงพุ่มเท่ากับ 29.35 และ 30.90 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนความกว้างทรงพุ่มที่อายุ 120 วัน พบว่าในทุกชุดการทดลอง ต้นพริกมีความกว้างทรงพุ่มเฉลี่ยไม่แตกต่างกันมากนักอยู่ในช่วง 48.10 – 49.60 เซนติเมตร (ตาราง 4.4)

ตาราง 4.4 แสดงข้อมูลการเจริญเติบโต

ชุดการทดลอง	ความสูงต้นกล้าเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ความสูงอายุ 90 วันเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ความสูงอายุ 120 วันเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ความกว้างทรงพุ่ม อายุ 90 วันเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ความกว้างทรงพุ่มอายุ 150 วันเฉลี่ย (เซนติเมตร)
ชุดการทดลองที่ 1 (ควบคุม)	21.88	49.00	71.60	32.00	48.10
ชุดการทดลองที่ 2 (สุญญากาศ)	19.63	46.60	70.10	29.35	48.85
ชุดการทดลองที่ 3 (6×10^{16})	24.66	48.10	71.00	30.90	48.90
ชุดการทดลองที่ 4 (1×10^{17})	23.30	51.80	70.10	32.50	49.60



(บน)



(กลาง)



(ล่าง)

ภาพที่ 4.11 ต้นกล้าพริกวันที่ทำการย้ายปลูก (บน) และสภาพแปลงปลูกพริก (กลางและล่าง)

ระดับความรุนแรงในการเกิดโรคไวรัสที่อายุ 150 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่ 1 มีการเกิดโรคในระดับที่ 2 จำนวน 10 ต้นคิดเป็น 26.31% ระดับที่ 3 จำนวน 21 ต้นคิดเป็น 55.26% ระดับที่ 4 จำนวน 4 ต้นคิดเป็น 10.52% ระดับที่ 5 จำนวน 1 ต้นคิดเป็น 2.63% และในชุดการทดลองที่ 1 นี้ไม่พบการเกิดโรคในระดับ 1 ส่วนชุดการทดลองที่ 2 มีการเกิดโรคในระดับที่ 2 จำนวน 8 ต้นคิดเป็น 21.05% ระดับที่ 3 จำนวน 19 ต้นคิดเป็น 50% ระดับที่ 4 จำนวน 8 ต้นคิดเป็น 21.05% ระดับที่ 5 จำนวน 1 ต้นคิดเป็น 2.63% และในชุดการทดลองที่ 2 นี้ไม่พบการเกิดโรคในระดับ 1 ในขณะที่พริกในชุดการทดลองที่ 3 มีการเกิดโรคในระดับที่ 1 จำนวน 8 ต้นคิดเป็น 4.27% ระดับที่ 2 จำนวน 52 ต้นคิดเป็น 27.80% ระดับที่ 3 จำนวน 101 ต้นคิดเป็น 54.01% ระดับที่ 4 จำนวน 12 ต้นคิดเป็น 6.41% และระดับที่ 5 จำนวน 8 ต้นคิดเป็น 4.27% และในชุดการทดลองที่ 4 มีการเกิดโรคในระดับที่ 2 จำนวน 58 ต้นคิดเป็น 27.88% ระดับที่ 3 จำนวน 114 ต้นคิดเป็น 48.80% ระดับที่ 4 จำนวน 24 ต้นคิดเป็น 11.53% ระดับที่ 5 จำนวน 6 ต้นคิดเป็น 2.88% และในชุดการทดลองที่ 4 นี้ไม่พบการเกิดโรคในระดับ 1

นอกจากนี้ยังมีการบันทึกข้อมูลต้นพริกที่ตายเนื่องจากเชื้อสาเหตุอื่น เช่น จากเชื้อราหรือแบคทีเรีย โดยพบว่าชุดการทดลองที่ 1, 2, 3 และ 4 มีจำนวนต้นพริกที่ตายเท่ากับ 2, 2, 6 และ 6 ต้นตามลำดับ ซึ่งไม่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส (ตาราง 4.5)

ตาราง 4.5 แสดงจำนวนต้นและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคในระดับต่าง ๆ

ชุดการทดลอง	ระดับการเกิดโรค											
	ตาย		1		2		3		4		5	
	จน.	%	จน.	%	จน.	%	จน.	%	จน.	%	จน.	%
ชุดการทดลอง ที่ 1 (ควบคุม)	2	5.26	0	0	10	26.31	21	55.26	4	10.52	1	2.63
ชุดการทดลอง ที่ 2 (สุญญากาศ)	2	5.26	0	0	8	21.05	19	50.00	8	21.05	1	2.63
ชุดการทดลอง ที่ 3 (6×10^{16})	6	3.20	8	4.27	52	27.80	101	54.01	12	6.41	8	4.27
ชุดการทดลอง ที่ 4 (1×10^{17})	6	2.88	0	0	58	27.88	114	48.80	24	11.53	6	2.88



(ระดับ2)



(ระดับ3)



(ระดับ4)



(ระดับ5)

ภาพที่ 4.12 ความรุนแรงในการเกิดโรคใบด่างจากเชื้อไวรัส ในระดับต่างๆ ในพริกจากชุดการทดลองที่1



(ระดับ2)



(ระดับ3)



(ระดับ4)



(ระดับ5)

ภาพที่ 4.13 ความรุนแรงในการเกิดโรคใบด่างจากเชื้อไวรัส ในระดับต่างๆ ในพริกจากชุดการทดลองที่2



(ระดับ1)



(ระดับ2)



(ระดับ3)



(ระดับ4)



(ระดับ5)

ภาพที่ 4.14 ความรุนแรงในการเกิดโรคใบด่างจากเชื้อไวรัส ในระดับต่างๆ ในพริกจากชุดการทดลองที่3



(ระดับ2)



(ระดับ3)



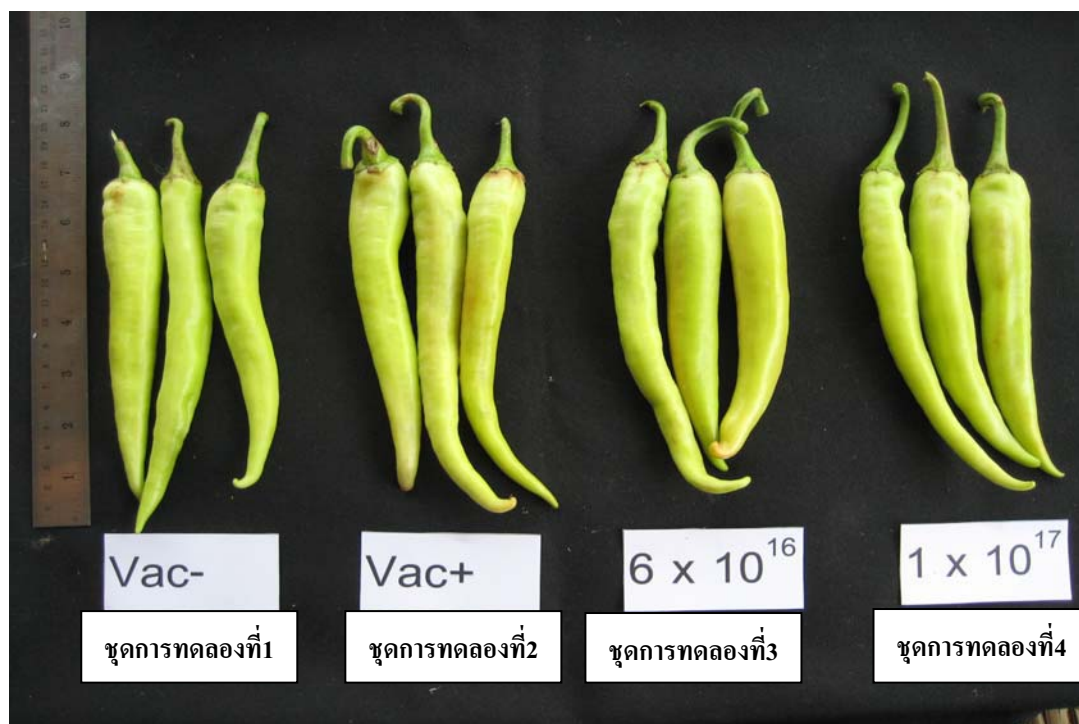
(ระดับ4)



(ระดับ5)

ภาพที่ 4.15 ความรุนแรงในการเกิดโรคใบด่างจากเชื้อไวรัส ในระดับต่างๆ ในพริกจากชุดการทดลองที่4

ส่วนผลการทดลองด้านสีผลและรูปร่างผล พบว่าผลพริกจากชุดการทดลองที่ 2, 3 และ 4 มีลักษณะรูปร่างผลตลอดจนสีผล เหมือนกันกับผลพริกจากชุดการทดลองที่ 1 (ควบคุม) โดยผลพริกจะมีสีผลเป็นสีเขียวอ่อนและมีรูปร่างผลแบบ elongate (ภาพที่ 4.16)



ภาพที่ 4.16 เปรียบเทียบลักษณะผลพริกกระหว่างชุดการทดลองต่างๆ

4.3.2.4) สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า ชุดการทดลองที่ 1, 2, 3 และ 4 มีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 76, 76, 74.20 และ 82.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติพบว่ามีเพียงชุดการทดลองที่ 3 เท่านั้น ที่พบลักษณะของต้นกล้าผิดปกติเท่ากับ 3.1 เปอร์เซ็นต์

ในส่วนของความสูงต้นกล้าเมื่อย้ายปลูก พบว่า ชุดทดลองที่ 3 มีความสูงที่สุด คือ 24.66 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ ชุดการทดลองที่ 4 และ 1 เท่ากับ 23.30 และ 21.88 เซนติเมตร ในขณะที่ในชุดการทดลองที่ 2 มีความสูงน้อยที่สุดคือ 19.63 เซนติเมตร ส่วนความสูงที่อายุ 90 วัน พบว่าชุดการทดลองที่ 4 มีความสูงมากที่สุด เท่ากับ 51.80 เซนติเมตร รองลงมาคือ ชุดการทดลอง 3, 1 และ 2 เท่ากับ 48.10, 49.00 และ 46.60 เซนติเมตร ตามลำดับ และความสูงที่อายุ 120 วัน พบว่า ในชุดการทดลองที่ 1 มีความสูงมากที่สุดเท่ากับ 71.60 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ชุดการทดลองที่ 3 เท่ากับ 71.00 เซนติเมตร ส่วนชุดการทดลองที่ 2 และ 4 มีความสูงต้นน้อยที่สุดเท่ากันคือ 70.10 เซนติเมตร

ความกว้างทรงพุ่มที่อายุ 90 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่ 1, 2, 3 และ 4 มีความกว้างทรงพุ่มเท่ากับ 32.00, 29.35, 30.90 และ 32.50 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนความกว้างทรงพุ่มที่อายุ 120 วัน พบว่าชุดการทดลองที่ 4 มีความกว้างทรงพุ่มมากที่สุดเท่ากับ 49.60