บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ข้าวเป็นอาหารหลักและเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลก ประเทศไทยมีการผลิตข้าวเพื่อการบริโภคภายในประเทศและสามารถผลิตเป็นการส่งออกมากเป็นอันดับที่ 6 ของโลกรองจากประเทศจีน อินเดีย อินโดนีเซีย บังคลาเทศ และเวียดนาม ถึงแม้ว่าอัตราการผลิตข้าวในประเทศไทยจะอยู่ในอันดับต้นๆ ของโลกก็ตาม แต่ก็ยังไม่เพียงพอที่จะตอบสนองต่อความต้องการของประชากรโลกที่เพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากสภาวะแวดล้อมในการเพาะปลูกที่ไม่เหมาะสมและการเกิดภัยธรรมชาติซึ่งหลีกเลี่ยงไม่ได้ เช่น โรคพืช แมลงศัตรูพืช ดินเค็ม น้ำท่วม และความแห้งแล้ง เป็นต้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการศึกษาถึงปัยจัยที่มีผลกับการเจริญเติบโตของข้าว และการตอบสนองของข้าวภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เพื่อเป็นองค์ความรู้ในการนำไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มผลผลิตของข้าวให้เพียงพอต่อการบริโภค และรองรับการขยายตัวของประชากรโลกต่อไป

ในการวิจัยทางด้านพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ข้าวเป็นแบบจำลองที่ดีที่สุดที่ใช้ในการศึกษา เนื่องจากข้าวมีรหัสพันธุกรรม (จีโนม) ขนาดเล็ก (ประมาณ 430 เมกกะเบส (Mb)) เมื่อเปรียบเทียบกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวชนิดอื่นๆ เช่น ข้าวสาลี หรือ ข้าวบาเลย์ ซึ่งมีขนาดของสารพันธุกรรมที่ใหญ่กว่ามาก ที่ผ่านมามีการวิเคราะห์กลุ่มยีน และศึกษาถึงลำดับสารพันธุกรรมของยีนต่างๆ ในข้าว โดยความร่วมมือของ 8 ประเทศ คือ ประเทศญี่ปุ่น (Rice Genome Research Program [RGP] ศึกษาโครโมโซมที่ 1, 2, 6, 7 และ 8) ประเทศเกาหลี (Korea Rice Genome Research Program [KRGRP] ศึกษาโครโมโซมที่ 1) ประเทศอังกฤษ (John Innes Center, ศึกษาโครโมโซมที่ 2) ประเทศสหรัฐอเมริกา (Clemson Univ. [CUGI], Cold Spring Harbor Laboratory [CSHL], Washington University School of Medicine-Genome Sequencing Center [GSC], The Institute for Genomic Research [TIGR], Plant Genome Initiative at Rutgers [PGIR],

Genome Center of Wisconsin, ศึกษาโครโมโซมที่ 3, 10 และ 11) ประเทศจีน (National Center for Gene Research Chinese Academy of Sciences [NCGR], ศึกษาโครโมโซมที่ 4) ประเทศไต้หวัน (Academia Sinica Plant Genome Center [ASPGC], ศึกษาโครโมโซมที่ 5) ประเทศไทย (National Center for Genetic Engineering and Biotechnology [BIOTEC], ศึกษาโครโมโซมที่ 9) และประเทศฝรั่งเศส (Genoscope, ศึกษาโครโมโซมที่ 12) ข้อมูลของลำดับสารพันธุกรรมของยีนทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาในข้าว ณ ปัจจุบันเกือบจะเสร็จสมบูรณ์แล้ว และบรรจุไว้ในฐานข้อมูลของข้าว หลังจากทราบถึงลำดับสารพันธุกรรมของยีนต่างๆ ในข้าวแล้วขั้นตอนต่อไป คือ ต้องศึกษาถึงหน้าที่ของยีนเหล่านั้นในข้าวว่ายีนนั้นๆ ทำหน้าที่อะไรและอย่างไร และมีความเกี่ยวข้องกับการทำงานระหว่างยีนอื่นๆ หรือไม่ ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาถึงหน้าที่ของยีนต่างๆ ในข้าวไปบ้างแล้วก็ตาม แต่ยังมียีนอีกจำนวนมากที่ยังไม่ได้มีการศึกษา ดังนั้นถ้าหากมีการวิจัยร่วมมือกันในการบ่งชี้ถึงบทบาทหน้าที่ของยีนทั้งหมดในข้าวแล้ว จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไปในอนาคต

ในอดีตที่ผ่านมาจนถึงปัจจุบันได้มีการศึกษาโปรตีนกลุ่มหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของข้าว และช่วยให้ข้าวต้านทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ โปรตีนกลุ่มนี้คือเบต้ากลูโคซิเดส (β-glucosidase) ซึ่งช่วยในการทำงานของผนังเซลล์และกระตุ้นให้เกิดการทำงานของระบบฮอร์โมนในพืช ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของข้าว นอกจากนี้ยังช่วยผลักดันให้เกิดกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ ซึ่งส่งผลให้ข้าวสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ในสภาวะเครียด และปัญหาการเข้าทำลายของโรคพืชและแมลงศัตรูพืช จากการศึกษาในข้าวพบว่าเบต้ากลูโคซิเดสเป็นกลุ่มของโปรตีนขนาดใหญ่ซึ่งมีจำนวนทั้งสิ้น 40 ยีน โดย 2 ยีนคาดว่าจะเป็นยีนของ endophyte อีก 2 ยีนเป็นยีน pseudogene และอีก 2 ยีนเป็นยีน fragment และที่เหลืออีก **34 ยีนน่าจะเป็นยีนกลุ่มกลูโคซิเดสของข้าวที่มีหน้าที่จริง ดังนั้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจว่าทำไมข้าวต้องมีจำนวนยีนที่มากมายเช่นนี้** อาจเป็นไปได้ว่าข้าวได้มีการปรับเปลี่ยนพันธุกรรมของตัวเอง เพื่อให้สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่

ไม่เหมาะสม โดยการเพิ่มยีนบางยีนด้วยการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมเพียงเล็กน้อย หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมบางส่วนเพื่อทำให้ข้าวสามารถเจริญ เติบโตได้และมีชีวิตรอดต่อไป แต่บทบาทหน้าที่ที่แท้จริงของแต่ละยีนทั้ง 34 ยีนยังไม่ได้มีผลการวิจัยที่แน่ชัด ดังนั้นถ้าหากมีการศึกษาและทราบหน้าที่ของยีน/โปรตีนเบต้ากลูโคซิเดสแล้ว จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์ข้าวให้มีผลผลิตและคุณภาพที่ดีขึ้นในอนาคตอีกด้วย

ปัจจุบันการศึกษาหน้าที่ของยีนต่างๆ มีบทบาทและความสำคัญมากขึ้น และเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและมีประสิทธิภาพสูงในขณะนี้คือ อาร์เอ็นเอไอ (RNAi) หรือเทคนิคที่ใช้ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ต้องการศึกษาในระดับอาร์เอ็นเอไปจนถึงโปรตีน ในธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดจะมีกระบวนการอาร์เอ็นเอไอเพื่อต่อต้าน และทำลายไวรัสที่เป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ (double stand RNA) ทำให้ไวรัสไม่สามารถขยายจำนวนจนก่อให้เกิดความเสียหายต่อสิ่งมีชีวิตได้ เทคนิคอาร์เอ็นเอไอเป็นวิธีที่รวดเร็วและง่ายต่อการศึกษาหน้าที่ของยีน และสามารถศึกษาได้ในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาบทบาทหน้าที่ของโปรตีนเบต้ากลูโคซิเดส โดยการทำให้ยีนเบต้ากลูโคซิเดสไม่มีการแสดงออกในต้นข้าวอีกต่อไป จากจำนวนเบต้ากลูโคซิเดสทั้งหมด 34 ยีนได้เริ่มต้นศึกษาเพียง 5 ยีนโดยคัดเลือกมาจากฐานข้อมูลข้าว เริ่มต้นจากยีนที่มีรายงานว่ามีการแสดงออกสูงที่สุดในข้าว คือ ยีน *Os3bglu7* (AK100165) และเมื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของทั้ง 34 ยีนผ่านทางแผนผังรูปต้นไม้ (phylogenetic tree) จึงได้คัดเลือกยีนอีก 4 ยีนที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันกับยีน *Os3bglu7* มาใช้ในการศึกษาร่วมกัน ข้าวที่นำมาทดลองจะได้รับการส่งถ่ายเวคเตอร์ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการแสดงออกของเบต้ากลูโคซิเดสโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* ผ่านทางเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน จะนำมาตรวจสอบผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในระดับชีว-โมเลกุล หลังจากนั้นจึงเปรียบเทียบกับต้นข้าวปกติเพื่อทดสอบว่าเมื่อข้าวไม่มียีนเบต้ากลูโคซิเดสแล้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างไรในทางสัญฐานวิทยาระดับเซลล์ และส่งผลอย่างไรต่อการเจริญเติบโตของ

ข้าวเมื่อเปรียบเทียบกับต้นข้าวปกติ จากผลการศึกษาที่ได้นี้จะนำมารวบรวมและวิเคราะห์เพื่อหาบทบาทหน้าที่ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสทั้ง 5 ยีนในข้าว และจะขยายผลในการศึกษาหน้าที่ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสที่เหลืออีก 29 ยีนต่อไปในอนาคต เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้สามารถเจริญเติบโตได้ดี ให้ผลผลิตสูง มีคุณภาพ และยังทนทานต่อสภาวะแวดล้อมได้ดีขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ในเบื้องต้นโครงการนี้จะทำการศึกษา และค้นหายีนไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 (Glycosyl Hydrolase family I; GHI) ในข้าว โดยนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดของจีโนมข้าวที่ได้ทำการศึกษาไว้แล้ว อย่างไรก็ตามในปี 2006 รจนา โอภาสศิริ และคณะ ได้ทำการศึกษาและนำเสนอการศึกษายีน GH1 ทั้งหมดในข้าว ดังนั้นการทดลองหลักในงานวิจัยนี้จึงเน้นไปที่การศึกษาถึงหน้าที่ของยีนที่สำคัญ และที่มีการแสดงออกสูงของยีนในกลุ่มนี้แทน รายงานการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. ค้นหาข้อมูลของยีนไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 จากอะเรย์ 45 K ของฐานข้อมูลจีโนมข้าวจากมหาวิทยาลัย UC Davis และจากฐานข้อมูล NCBI เปรียบเทียบกัน และทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในกลุ่มนี้

2. ศึกษาหน้าที่ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในข้าวโดยใช้เทคนิคอาร์เอ็นเอไอ เนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็ว และสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนได้อย่างมีประสิทธิภาพในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด รวมทั้งสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนในข้าวได้ โดยจะเริ่มต้นศึกษา 5 ยีนเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อระบุให้ได้ว่าแต่ละยีนมีบทบาทหน้าที่อย่างไร และมีความ สำคัญอย่างไรต่อการเจริญเติบโตของข้าวภายใต้สภาวะแวดล้อมปกติและสภาวะเครียด

3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเวคเตอร์ pHELLSGATE8 ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอาร์เอ็นเอไอในข้าวได้ เวคเตอร์นี้ได้รับการพัฒนาให้ใช้ในระบบ Gateway cloning system ทำให้

รวดเร็วในการสร้างเวคเตอร์ที่มีชิ้นยีนที่ต้องการยับยั้งแทรกอยู่สองตำแหน่งในทิศทางตรงกันข้าม เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดอาร์เอ็นเอสายคู่ และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอาร์เอ็นเอไอในระดับเซลล์ต่อไป

4. พัฒนาเทคนิคในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* ถึงแม้ว่าการถ่ายยีนวิธีนี้เคยมีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย แต่ความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าวทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนประสบความสำเร็จแตกต่างกันไป สายพันธุ์ข้าวที่ง่ายต่อการถ่ายยีน เช่น นิปปอนบาเร (Nipponbare) ไม่สามารถที่จะเจริญเติบโตได้ดีในประเทศไทย ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวสายพันธุ์อื่นที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในประเทศไทย รวมไปถึงหาสภาวะที่เหมาะสมในทุกขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วย

5. ศึกษาระดับการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสทั้ง 5 ยีนในสภาวะแวดล้อมปกติที่ระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการวิเคราะห์ว่ายีนเหล่านี้มีการแสดงออกมากน้อยอย่างไรในแต่ละระยะการเจริญเติบโต และนำผลที่ได้ไปเป็นมาตรฐานสำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนเพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้ง 5 ยีน

ขอบเขตการวิจัย

โครงการนี้มีเป้าหมายเพื่อศึกษาฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรมของข้าว เพื่อหายีนในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 ทั้งหมด และศึกษาหน้าที่ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในข้าว 5 ยีนโดยใช้เทคนิคอาร์เอ็น-เอไอโดย

1. ศึกษาและค้นหายีนในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 จากข้าวนิปปอนบาเร่ และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่ได้มีผู้ทำการศึกษาไว้แล้ว

2. ยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้ง 5 ยีนโดยใช้เพียงแค่ 1 เวคเตอร์ และประเมินประสิทธิภาพของการยับยั้งการแสดงออกของทั้ง 5 ยีนในต้นข้าว

3. ยับยั้งการแสดงออกของยีนแต่ละยีนโดยออกแบบเวคเตอร์ 5 อันสำหรับการยับยั้งแต่ละยีน และประเมินประสิทธิภาพของการยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้ง 5 ยีน

4. ใช้เทคนิคอาร์เอ็นเอไอในการศึกษาเวคเตอร์ สำหรับชักนำให้เกิดกระบวนการอาร์เอ็นเอไอในข้าว ซึ่งถูกสร้างขึ้นโดยใช้ระบบ Gateway Cloning Technology

5. ตรวจสอบต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) และตรวจสอบระดับการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ (messenger RNA; mRNA) ของแต่ละยีนด้วยเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)

6. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน (T_0) จะนำไปเปรียบเทียบกับต้นข้าวปกติ

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ทราบถึงจำนวนยีนไกลโครซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 และการแสดงออกของแต่ละยีน

2. ทราบถึงบทบาทหน้าที่ที่ชัดเจนของยีนเบต้ากลูโคซิเดสทั้ง 5 ยีนในข้าว

3. สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้เทคนิคอาร์เอ็นเอไอ และสามารถใช้เทคนิคนี้ในการศึกษายีนกลุ่มอื่นในข้าวได้

4. สามารถใช้เวคเตอร์ pHELLSGATE8 ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในข้าว และเป็นการยืนยันว่าเวคเตอร์นี้สามารถทำงานได้จริง และมีประสิทธิภาพสูงในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอาร์เอ็นเอไอในข้าว

5. สามารถพัฒนาเทคนิคในการถ่ายยีนเข้าสู่พันธุ์ข้าว ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในประเทศไทยโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* และได้เปอร์เซ็นต์ของต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนสูงเทียบเท่ากับข้าวสายพันธุ์อื่นที่ง่ายต่อการถ่ายยีนแต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในประเทศไทย

6. สามารถนำเทคนิค และความรู้ที่ได้จากผลการวิจัยไปใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวในประเทศไทย เช่น ข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 ซึ่งมีชื่อเสียงไปทั่วโลก และข้าวสายพันธุ์อื่นๆ เพื่อให้ได้ผลผลิตสูง มีคุณภาพ และสามารถทนทานต่อสภาวะเครียดหรือการระบาดของโรคและแมลงได้

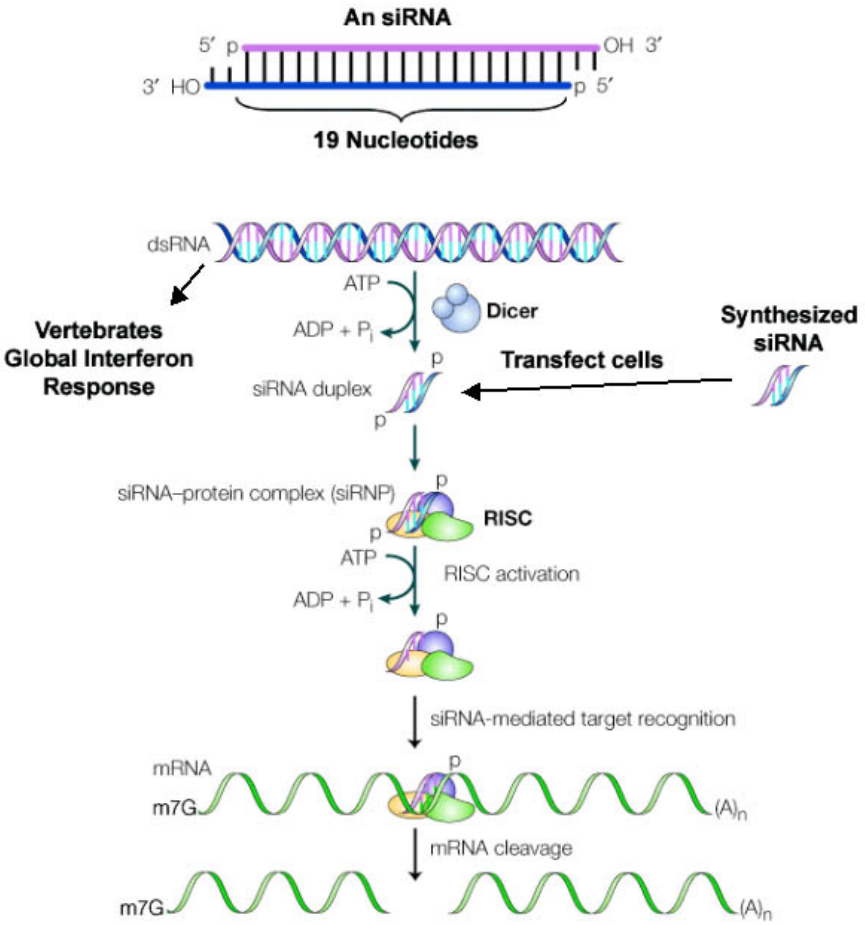
การทบทวนวรรณกรรม (Reviewed literature)

เบต้ากลูโคซิเดสเป็นเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะกลูโคซิดิก ตรงตำแหน่งพันธะที่เป็นเบต้าระหว่างโมเลกุลของสารหนึ่งกับโมเลกุลของน้ำตาลที่เชื่อมติดกันอยู่ (Vasella และคณะ, 2002) เบต้ากลูโคซิเดสพบได้ในสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอทและยูคาริโอท (Faure และคณะ, 2001) ในพืชจะพบเบต้ากลูโคซิเดสในเนื้อเยื่อเจริญเช่น ยอด ใบอ่อน ปลายราก ต้นอ่อน รังไข่ และไหมของฝักข้าวโพด เป็นต้น (Nikus และ Lisbeth, 1999) พืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะพบเบต้ากลูโคซิเดสสะสมอยู่ในคลอโรพลาสแต่ในพืชใบเลี้ยงคู่มักจะพบในส่วนของผนังเซลล์และโปรตีนบอดี้ (Esen, 2004) ในพืชเบต้ากลูโคซิเดสมีหน้าที่หลายอย่าง เช่น ช่วยในการเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ กระตุ้นให้พืชมีการต้านทานต่อแมลงศัตรูพืช (Stotz และคณะ, 2000) และโรคพืช (Chong และคณะ, 2002) เกิดการสร้างลิกนินเพื่อปกปิดบาดแผล (Trevino และคณะ, 2004) รวมทั้งกระตุ้นการสร้างฮอร์โมนและปลดปล่อยสารระเหยต่างๆ โดยเบต้ากลูโคซิเดสจะตัดพันธะที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลและโมเลกุลของสารอื่นออกจากกัน ทำให้สารนั้นทำงานได้เมื่อไม่มีโมเลกุลของน้ำตาลเกาะอยู่ (Stotz และคณะ, 2000) ในปี 1998 Esen และ Bandaranayake พบว่าเบต้ากลูโคซิเดสในข้าวโพดจะตัดโมเลกุลของน้ำตาลออกไปและปลดปล่อยแอบไซซิกแอซิด (ABA) ออกมาในใบ ซึ่งนำไปสู่การกระตุ้นให้เกิดการปิดของปากใบอย่างรวดเร็วในสภาวะที่พืชขาดน้ำ และชักนำให้พืชเกิดการปรับตัวในสภาพที่แห้งแล้งเป็นเวลานาน ในปี 2001 Mok และ Mok รายงานว่าเบต้ากลูโคซิเดสใน Arabidopsis มีบทบาทสำคัญในการทำงานของไซโตไคนินซึ่งอยู่ในรูปของซีเอทิโอกลูโคไซด์ โดยการปลดปล่อยซีเอทินออกมา และการศึกษาพิ่มเติมในปี 2004 โดย

Keri และคณะ ให้การสนับสนุนว่าการปลดปล่อยซีเอทินออกมาจะช่วยให้รากของข้าวโพดสามารถต้านทานต่ออากาศที่หนาวเย็นได้ ปริมาณของเบต้ากลูโคซิเดสจะเพิ่มสูงภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากปลูกข้าวโพดในสภาวะที่มีอากาศเย็น ซึ่งเป็นช่วงที่ข้าวโพดมีการปรับตัวต่อสภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลงไป และปี 2004 Opassiri และคณะ พบว่าเบต้ากลูโคซิเดสในข้าวมีปริมาณเพิ่มขึ้นและสูงสุดที่อายุ 5 วันหลังงอก ดังนั้นจากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าเป็นไปได้ที่เบต้ากลูโคซิเดส อาจจะมีหน้าที่ในการปรับเปลี่ยนโอลิโกแซคคาไรด์ในผนังเซลล์ในระยะเริ่มแรกของการงอกของต้นข้าว

ในปัจจุบันข้อมูลของลำดับสารพันธุกรรมของยีนทั้งหมดในข้าวถูกเก็บไว้ในฐานข้อมูล แต่ยังขาดข้อมูลหน้าที่ของยีนเหล่านั้น จึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการศึกษา เพื่อสามารถระบุได้ว่ายีนเหล่านั้นทำหน้าที่อะไรและอย่างไรในข้าว เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไปในอนาคต ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะมีการศึกษาและทราบหน้าที่ของยีนบางส่วนแล้วก็ตาม แต่หน้าที่ของยีนอื่นๆ อีกมากมายในข้าวยังไม่มีการศึกษา ดังนั้นเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนจึงมีการพัฒนาและปรับปรุงเพื่อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ในปัจจุบันการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ต้องการโดยระบุถึงลำดับสารพันธุกรรมของยีนเป้าหมาย เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมมากเพราะมีความแม่นยำและมีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากเฉพาะยีนที่มีลำดับสารพันธุกรรมที่เราต้องการจะยับยั้งเท่านั้นที่ถูกทำลายไปจึงไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในพืชอีกต่อไป เทคนิคที่ได้รับการยอมรับกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน คือ เทคนิคอาร์เอ็นเอไอ (RNAi) ซึ่งเป็นกลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอโดยทำลายสายอาร์เอ็นเอเป้าหมายทำให้ผลิตโปรตีนไม่ได้ โดยปกติแล้วกระบวนการอาร์เอ็นเอไอพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วๆ ไป เช่น พืชและสัตว์ เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของไวรัสที่เป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ รวมถึงอาร์เอ็นเอสายคู่ที่แปลกปลอมอื่นๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยทำลายเส้นสายคู่ของอาร์เอ็นเอแปลกปลอมให้สลายไป (Lichner, 2003)

กระบวนการอาร์เอ็นเอไอเริ่มต้นจากสายคู่อาร์เอ็นเอเกิดขึ้นในเซลล์ (Waterhouse และคณะ, 1998) และจะถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ไดเซอร์ (Dicer) เป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ขนาดสั้นๆ ประมาณ 21 นิวคลีโอไทด์ หรือเรียกว่า เอสไออาร์เอ็นเอ (siRNA) หลังจากนั้นเอสไออาร์เอ็นเอจะเข้าไปเกาะรวมอยู่กับโปรตีนที่เรียกว่าริสค์คอมเพล็ก (RISC) ซึ่งทำหน้าที่แยกสายคู่ของเอสไออาร์เอ็นเอออกเป็นสายเดี่ยว และโครงสร้างนี้เองจะไปเกาะกับอาร์เอ็นเอที่อยู่ในเซลล์ ที่มีลำดับสารพันธุกรรมเหมือนกันกับเอสไออาร์เอ็นเอที่อยู่บนริสค์คอมเพล็ก หลังจากจับกันแล้วสายอาร์เอ็นเอจะถูกตัดขาดออกจากกันและถูกย่อยสลายไป ดังนั้นสายอาร์เอ็นเอนี้จะไม่สามารถอ่านรหัสเปลี่ยนไปเป็นโปรตีนได้ จึงไม่สามารถทำหน้าที่ในเซลล์ได้อีกต่อไป (Hannon, 2002) กระบวนการอาร์เอ็นเอไอแสดงได้ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงกระบวนการอาร์เอ็นเอไอ ดัดแปลงมาจาก Dykxhoorn (2003)

ในพืชจะเรียกกระบวนการอาร์เอ็นเอไอว่า post-transcriptional gene silencing (PTGS) หรือ co-suppression ซึ่งถูกค้นพบครั้งแรกในเพตทูเนียโดย Napoli และคณะ (1990) นักวิจัยกลุ่มนี้ได้พยายามทำให้เพตทูเนียมีสีเข้มขึ้นโดยการเพิ่มการแสดงออกของยีน chalcone synthase (CHS) ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่ช่วยในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน แต่ผลการทดลองพบว่าดอกของเพตทูเนียมีสีขาว หรือมีสีขาวสลับกับสีม่วงแทนที่จะมีสีม่วงเข้ม ในปี 1994 Macino และคณะ ค้นพบกระบวนการ co-suppression ในเชื้อรา การทดลองครั้งนี้ต้องการเพิ่มเม็ดสีสีส้มในเชื้อรา โดยเพิ่มการแสดงออกของยีนแคโรทีนอย แต่ผลการทดลองพบว่าเชื้อราไม่ได้มีสีส้มเพิ่มขึ้นแต่กลับมีสีขาวแทน ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกันกับการทดลองใน

ดอกเพตทูเนีย หลังจากนั้นในปี 1998 Fire และ Sun ให้ไส้เดือนกินแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีเวคเตอร์ในการผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่ของยีน *unc*-22 เข้าไป ผลการทดลองพบว่ายีน *unc*-22 ถูกยับยั้งไม่ให้มีการแสดงออก และปรากฏการณ์นี้ยังถูกถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกๆอีกด้วย และในปี 1999 Richard และคณะ ศึกษาการยับยั้งยีน *bicoid* ที่เกี่ยวข้องกับการสลายของเอ็มอาร์เอนเอในแมลงหวี่ ซึ่งในการทดลองได้ฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ของยีน *bicoid* นี้เข้าไปในไข่ของแมลงหวี่ และพบว่าโปรตีน bicoid มีปริมาณลดลง ซึ่งการค้นพบในระยะเวลาต่อมาจึงทราบว่าการทดลองที่เกิดขึ้นทั้งหมดนั้นเนื่องมาจากกระบวนการอาร์เอ็นเอไอนั่นเอง

ในปัจจุบัน เทคนิคอาร์เอ็นเอไอเป็นที่นิยมแพร่หลายเพื่อใช้ศึกษาหน้าที่ของยีนในข้าว เช่น การศึกษายีน *OsMADS*2 ในปี 2003 โดย Prasad และ Vijayraghavan การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ายีนนี้มีความสำคัญในการพัฒนาและเกี่ยวพันกับ *OsMADS*4 ที่เกี่ยวข้องกับความจำเพาะของเกสรตัวผู้ ขณะที่ Xiao และคณะ (2003) ศึกษาหน้าที่ของยีน *OsMADS*16 ซึ่งเป็นยีนที่มีความสัมพันธ์กับยีน B-function MADS-box ที่อยู่ในเมล็ดข้าว ซึ่งนักวิจัยกลุ่มนี้ได้หาลำดับสารพันธุกรรมของยีนนี้ และศึกษาหน้าที่โดยใช้เทคนิคอาร์เอ็นเอไอ พืชที่ได้รับการถ่ายยีนจะพบว่าเป็นหมันและมีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาของเกสรตัวผู้ รวมทั้งเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ lodicules นอกจากนี้ยังพบอีกว่าระดับของการแสดงออกของยีน *OsMADS*16 ลดลง การทดลองจึงสรุปได้ว่ายีนนี้คือ AP3/DEF ซึ่งเฉพาะเจาะจงกับการพัฒนาของ lodicules และเกสรตัวผู้ในดอกของข้าว ในปี 2004 Wang และคณะ ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเวคเตอร์อาร์เอ็นเอไอ pTCK303 ซึ่งมียีนเป้าหมายที่ต้องการยับยั้งคือ *OsGAS*1 เวคเตอร์นี้ได้ถ่ายเข้าไปสู่แคลลัสของข้าว และทำการตรวจสอบต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนนี้โดยวิธี Southern blot และตรวจระดับการแสดงออกของยีนนี้ในระดับอาร์เอ็นเอโดยวิธี Northern blot ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของอาร์เอ็นเอของยีนนี้ลดลง 85 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเวคเตอร์นี้จึงใช้ได้ค่อนข้างมีประสิทธิภาพในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เพื่อใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนต่างๆ ในข้าวได้ Islam และคณะ (2005) ได้พัฒนาระบบของการสร้างอาร์เอ็นเอไอเวคเตอร์โดยใช้เทคนิค GATEWAY™ cloning ซึ่งทำให้การสร้างเวคเตอร์

อาร์เอ็นเอไอง่ายและรวดเร็วขึ้น ในการทดลองได้ศึกษายีน *OsGAMYB* และพบว่ายีนนี้มีความจำเป็นในการสร้างเอ็นโดสเปิร์มเพื่อให้เอ็มบริโอเจริญเติบโตได้ในระยะแรกของการพัฒนาเมล็ดข้าว ในปี 2005 Miki และคณะ ศึกษาหน้าที่ของกลุ่มยีน *OsRac* ทั้งหมด 7 ยีน การสร้างเวคเตอร์สำหรับอาร์เอ็นเอไอนั้นใช้ลำดับสารพันธุกรรมในส่วนที่มีความเฉพาะเจาะจงกับแต่ละยีน คือ ส่วนของ 3'UTR ซึ่งแต่ละเวคเตอร์จะยับยั้งการแสดงออกของยีนแต่ละตัว และนอกจากนี้ยังได้สร้างเวคเตอร์โดยใช้ส่วนของลำดับสาร-พันธุกรรมที่เหมือนกันของยีน 2 ตัว และใช้ส่วนของลำดับสารพันธุกรรมที่มีความเหมือนกันของยีนทั้ง 7 ตัว เพื่อดูถึงผลการยับยั้งยีนในกลุ่มนี้ด้วย ผลการทดลองพบว่ายีนทั้ง 7 ตัวถูกยับยั้งการแสดงออกโดยใช้เวคเตอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับแต่ละยีน ส่วนการยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้ง 7 ตัวโดยใช้เวคเตอร์ที่เหลืออีก 2 อัน พบว่าผลของการยับยั้งไม่มีความแน่นอนและยังพบการแสดงออกของยีนทั้ง 7 ตัวในปริมาณที่ต่างกันอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบว่ามีความแตกต่างระหว่างต้นพืชที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้เมื่อเทียบกับต้นข้าวปกติอย่างเด่นชัด แต่จากการทดลองก็พบว่าอาร์เอ็นเอไอยังเป็นวิธีที่มีประโยชน์และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนต่างๆ และใช้ศึกษาหน้าที่ของกลุ่มยีนในข้าวและพืชชนิดอื่นๆ ได้ Lin และคณะ (2005) ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะการขาดน้ำในข้าว คือ ยีน *OsARD* ซึ่งจะผลิตโปรตีน acid-reductone-dioxygenase และยีนนี้ถูกศึกษาโดยใช้เทคนิค Northern blot และอาร์ที-พีซีอาร์พบว่ายีนนี้จะมีการแสดงออกเมื่อถูกกระตุ้นโดยสภาวะที่แห้งแล้งและน้ำท่วม ยีนนี้จะแสดงออกในรากของข้าวในสภาวะที่น้ำท่วม แต่จะถูกยับยั้งโดยสภาวะที่แห้งแล้ง ดินเค็ม และอุณหภูมิต่ำ แต่จะถูกกระตุ้นเมื่อมีเอทิลีน และจิบเบอราลิน ผลการทดลองพบว่าข้าวที่ผ่านการถ่ายเวคเตอร์อาร์เอ็นเอไอสำหรับการยับยั้งยีน *OsARD* ทำให้ปริมาณของ S-adenosylmethionine (SAM) synthase และ 1-aminocyclopropane-1-caboxylic acid (ACC) synthase เพิ่มขึ้น นอกจากนี้การแสดงออกของยีน *ETR*2 และ *EIN*3 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตเอทิลีนมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ *ERF*3 ถูกยับยั้งไป ดังนั้นผลการทดลองจึงสรุปได้ว่ายีน *OsARD* อาจจะมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทไทโอนีนและเอทิลีน

ซึ่งตอบสนองต่อสภาวะน้ำท่วมและแห้งแล้ง Luo และคณะ (2005) ศึกษาข้าวกลายพันธุ์ คือ Teqing 2 ซึ่งจะร่นระยะเวลาการออกดอก และยีนที่ควบคุมคือ *rhd*1 การทดลองนี้จะศึกษายีน *rhd*1 และกลไกในระดับโมเลกุล จากการศึกษาพบว่ายีน *rhd*1 เป็นยีนที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ซึ่งไม่ได้มีผลมาจากการแทรกของที-ดีเอ็นเอ (T-DNA) ผลการศึกษาลำดับสารพันธุกรรมของยีนนี้พบว่ามีความเหมือนกันกับยีน *OsGRF*1 ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ และอาจจะมีแค่ตำแหน่งเดียวในกลุ่มยีนของข้าว เมื่อยีน *OsGRF*1 ถูกยับยั้งการแสดงออกโดยเทคนิคอาร์เอ็นเอไอ พบว่าข้าวมีการพัฒนาและเจริญเติบโตช้า ใบมีขนาดเล็กและออกดอกช้าอีกด้วย ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะปรากฏให้เห็นแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับระดับการแสดงออกของยีน *OsGRF*1 ดังนั้นผลการทดลองสรุปได้ว่ายีน *OsGRF*1 เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตในระยะต้นอ่อนและระยะออกดอกของข้าว

ในปี 2006 Opassiri และคณะ ได้ทำการศึกษาแผนผังจีโนมของข้าว และพบว่ามีไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 ทั้งสิ้น 40 ยีน และจากการศึกษาลงลึกพบว่ามี 2 ยีนที่เป็นยีนจาก endophyte หรือจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับต้นข้าว และอีก 2 ยีนเป็นยีนปลอมหรือ pseudogene คือยีนที่ไม่มีการแสดงออก และอีก 2 ยีนเป็นยีนที่มีส่วนประกอบไม่ครบยีนหรือที่เรียกว่า fragment นั่นเองซึ่งแสดงดังรูปที่ 2

ศึกษาการแสดงออกของแต่ละยีนโดยการค้นหาข้อมูลจาก Express sequence Tag (EST) library ในฐานข้อมูลพบว่าแต่ละยีนมีการแสดงออกที่แตกต่างกันดังตารางที่ 1

จากการวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าการใช้เทคนิคอาร์เอ็นเอไอสามารถศึกษาถึงบทบาท และหน้าที่ของยีนที่สนใจได้ ในการทดลองนี้จึงจะใช้เทคนิคอาร์เอ็นเอไอในการศึกษาการทำงานของกลุ่มยีนเบต้า-กลูโคซิเดส 5 ยีน

รูปที่ 2 แผนผังรูปต้นไม้เปรียบเทียบโปรตีนไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 ในข้าว และพืชอื่น (ปรับปรุงจาก Opassiri 2006)

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติ และตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีนเบต้ากลูโคซิเดส GHI ที่ได้ทำนายไว้ (ปรับปรุงจาก Opassiri 2006)

Gene name	Gene ID	Pre-protein			Mature protein				
		MW[a]	AA[b]	Cleavage site[c]	MW[a]	AA[b]	pI[a]	N-gly site[d]	Possible destination[e]
*Os*1*bglu*1	AP003217 (BAD73293)	58.0	516	21-22	55.9	495	7.78	5	Out, per, ERm, ERI
*Os*1*bglu*2	AP003570	62.4	561	44-45	57.6	517	5.21	3	M inn, plas, chl, m int
*Os*1*bglu*3	AP003570	57.5	514	22-23	55.3	492	7.29	3	Out, per, ERm, ERI
*Os*1*bglu*4	AP003349 (BAD82183)	55.3	483	-	55.3	483	5.16	0	Per, cyt, m mat, ERm
*Os*1*bglu*5	AP003272 (BAD87322)	57.4	513	26-27	54.9	487	5.31	3	Out, per, ERm, ERI
*Os*3*bglu*6	AC146619	58.5	521	31-32	55.4	490	6.36	3	Out, per, ERm, ERI
*Os*3*bglu*7	AC091670	56.9	504	26-27	54.3	478	8.96	3	Out, per, ERm, ERI
*Os*3*bglu*8	AAAA02010831	63.1	568	33-34	59.7	535	6.21	3	Plas, per, ERm, ERI
*Os*4*bglu*9	AAAA02014146	58.3	514	28-29	55.6	486	7.73	4	Out, vac, per, ERm
*Os*4*bglu*10	AL731582 (CAE05481)	58.1	510	23-24	55.8	487	8.07	4	Out, vac, per, nuc
*Os*4*bglu*11	AL731582 (CAE05482)	59.8	530	25-26	57.4	505	7.29	4	Out, vac, per, nuc
*Os*4*bglu*12	AAAA02014151	57.5	510	24-25	55.3	486	8.85	6	Out, vac, per, ERm
*Os*4*bglu*13	AL731582 (CAE05485)	57.1	506	25-26	54.8	481	6.66	6	Out, vac, per, ERm
*Os*4*bglu*14	AL606622 (CAE03397)	58.8	516	23-24	56.4	493	7.69	6	Out, per, ERm, ERI
*Os*4*bglu*15	AL606622 (CAE003399)	-	-	-	-	-	-	-	-
*Os*4*bglu*16	AL606622 (CAE54544)	58.6	516	27-28	56.0	489	6.13	4	Out, per, ERm, ERI

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Gene name	Gene ID	Pre-protein			Mature protein				
		MW[a]	AA[b]	Cleavage site[c]	MW[a]	AA[b]	pI[a]	N-gly site[d]	Possible destination[e]
*Os*4*bglu*17	AL606622	-	-	-	-	-	-	-	-
*Os*4*bglu*18	AL606659 (CAE54546)	57.6	505	26-27	55.0	479	5.30	1	Out, per, ERm, ERI
*Os*5*bglu*19	AC121366 (AAS79738)	59.8	530	31-32	56.2	499	5.05	6	Out, per, ERm, ERI
*Os*5*bglu*20	AAAA02016859	58.6	520	30-31	55.1	490	5.23	5	Out, per, ERm, ERI
*Os*5*bglu*21	AAAA02016862	59.2	526	34-35	55.3	492	5.67	4	Out, vac, per, ERm
*Os*5*bglu*22	AC137618 (AAV31358)	59.5	533	24-25	57.1	509	4.96	5	Out, vac, per, ERm
*Os*5*bglu*23	AAAA02016873	58.5	523	27-28	55.8	496	5.19	3	Out, vac, per, ERm
*Os*6*bglu*24	AP003543 (BAD61620)	57.8	504	18-19	55.8	486	7.78	5	Out, per, ERm, ERI
*Os*6*bglu*25	AP003766	57.2	501	19-20	55.2	482	5.51	2	Out, per, ERm, ERI
*Os*7*bglu*26	AP005182	58.5	510	27-28	55.6	483	6.49	6	M inn, per, plas, m int
*Os*8*bglu*27	AAAA02025912	56.8	499	19-20	54.8	480	8.36	5	Out, per, ERm, ERI
*Os*8*bglu*28	AP006049 (BAC57391)	56.6	500	24-25	53.9	476	8.4	6	M out, vac, out, per
*Os*9*bglu*29	AC108758	57.7	508	28-29	54.8	480	8.76	4	Out, per, ERm, ERI
*Os*9*bglu*30	AC108758	57.4	500	25-26	54.6	475	6.99	6	Out, vac, per, ERm
*Os*9*bglu*31	AC137594	58.4	523	22-23	56.3	501	5.32	2	Out, per, ERm, ERI
*Os*9*bglu*32	AAAA02027836	57.1	510	30-31	54.1	480	5.51	2	Out, per, vac, ERm
*Os*9*bglu*33	AC137594	56.8	503	30-31	53.8	473	5.62	2	Out, vac, per, ERm
*Os*10*bglu*34	AAAA02028915	58.0	510	26-27	55.3	484	6.34	5	Out, per, ERm, ERI

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Gene name	Gene ID	Pre-protein			Mature protein				
		MW[a]	AA[b]	Cleavage site[c]	MW[a]	AA[b]	pI[a]	N-gly site[d]	Possible destination[e]
*Os*11*bglu*35	AC108758	-	-	-	-	-	-	-	-
*Os*11*bglu*36	AC135190	73.2	647	26-27	70.8	621	6.10	1	M inn, per, ERm, m int, chl
*Os*11*bglu*37	AC137594	-	-	-	-	-	-	-	-
*Os*12*bglu*38	AL731785	57.0	492	21-22	54.8	471	7.44	5	Out, per, ERm, ERI
*Osbglu*39	AAAA02042985	53.0	458	-	-	-	5.91	-	Per, cyt, m mat, chl
*Osbglu*40	AC137594	-	-	-	-	-	-	-	-

[a]determined by ProtParam, [b]AA means number of amino acids, [c]predicted by SignalP, [d]predicted by NetNGlyc at the Expasy proteomics server [69], [e]cellular locations predicted by PSORT. Chl: chloroplast; cyt: cytoplasm; ERm: endoplasmic reticulum membrane; ERI: endoplasmic reticulum lumen; m inn, m int, m mat, m out: mitrocondria inner membrane, intermembrane space, matrix, outer membrane, respectively; per: peroxisome; plas: plasma membrane; vac: vacuole. (ปรับปรุงจาก Opassiri 2006)

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การแสดงออกของยีนกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลสในอะเรย์ข้าวขนาด 45 K

1.1 การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าว

เพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นแบ่งต้นกล้าที่ได้ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกย้ายเพื่อเพาะปลูกต่อในโรงเรือน (greenhouse) และให้แสง กลุ่มที่ 2 ย้ายเพื่อปลูกในห้องเพาะเลี้ยง (growth chamber) โดยปราศจากแสงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความชื้น 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อครบ 2 สัปดาห์ สุ่มเก็บตัวอย่างใบข้าวจากต้นกล้าทั้งสองกลุ่มมาสกัดอาร์เอ็นเอ

1.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA)

นำใบข้าวมาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว และสกัดอาร์เอ็นเอด้วย TRIZOL (Invitrogen, USA) โดยอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จะนำมาเติม DNaseI และบ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการแยกให้บริสุทธิ์โดย RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA) โดยนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาทำการแยกเอ็ม-อาร์เอ็นเอ (mRNA) ต่อด้วย Oligotex mRNA Kit (Qiagen, USA) ซึ่งขั้นตอนต่างๆ ในการใช้ผลิตภัณฑ์นั้นดำเนินการตามวิธีการของบริษัทนั้นๆ

1.3 การติดฉลาก (Labeling system)

การติดฉลากให้กับอาร์เอ็นเอโดยชุดน้ำยาเคมีของ CyScribe Post-labeling Kit (GE Healthcare, Bioscience, USA) และ SuperScript Indirect cDNA labeling System (Invitrogen, USA) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- CyScribe Post-labeling Kit ทำการติดฉลากสารฟลูออเรสเซนต์ด้วย Cy3 หรือ Cy5 (ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง) ประกอบด้วยขั้นตอนหลักคือ การรวมสาร amino allyl-dUTP (AA-dUTP) ในระหว่างขั้นตอนการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (cDNA) โดยการทำปฏิกิริยา reverse transcription ด้วยเอ็มอาร์เอ็นเอปริมาณ 500 นาโนกรัม (ng) ร่วมกับไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ random hexamers และ anchored oligo (dT) แล้วนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทำให้เย็นโดยเร็วที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการปรับปริมาตรของปฏิกิริยาข้างต้นให้ได้ 20 ไมโครลิตร (ul) โดยการเติมบัฟเฟอร์ (Cyscript buffer), ดีทีที (DTT), นิวคลีโอไทด์ (dNTPs), AA-dUTP และเอ็นไซม์ Cyscript reverse transcriptase นำสารละลายผสมที่ได้มาทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอเส้นแรกเรียบร้อยแล้ว ทำการไฮโดรไลซ์อาร์เอ็นเอต้นแบบด้วย 2.5N NaOH ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการปรับสภาวะของสารละลายในแต่ละตัวอย่างด้วย 2M HEPES ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และแยกสารต่างๆ ออกจากสายดีเอ็นเอที่ผ่านการติดฉลากด้วยคอลัมน์ตัวกรอง (filter column, Zymo research kit) เติมสารละลาย 50mM sodium bicarbonate (pH 9.0) ปริมาตร 32 ไมโครลิตร เพื่อละลาย allyl-modified cDNA ออกจากคอลัมน์ และผสมกับผงสี Cy3 หรือ Cy5 ในขั้นตอนต่อไป

- SuperScript Indirect cDNA labeling System ทำการติดฉลากสารฟลูออเรสเซนต์ด้วยหลักการเดียวกับวิธี CyScript Post-Labeling Kit แต่เพิ่มปริมาตรเอ็นไซม์ reverse transcriptase เป็น 2 เท่าในแต่ละปฏิกิริยา และเพิ่มอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาจากอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส

การ Coupling amino allyl-modified cDNA ด้วย cyanine dye (CyDye) เตรียมได้จากการละลาย amino allyl-modified cDNA ในผง Cy3 หรือ Cy5 แล้วนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1

ชั่วโมง จากนั้นเติม 4M hydroxylam ปริมาตร 15 ไมโครลิตร และนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที โดยปฏิกิริยาทั้งหมดนั้นทำในที่มืด จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วย Zymo research kit

1.4 กระบวนการไฮบริไดซ์ (Hybridization)

เตรียมตัวอย่างที่ติดฉลากด้วย Cy3 หรือ Cy5 (ตารางที่ 2) มาไฮบริไดซ์โดยการผสม Cy3 และ Cy5 cDNAs เข้าด้วยกัน แล้วละลายในสารละลาย hybridization solution โดยผสมเบาๆ เพื่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำตัวอย่างที่ผสมแล้วมาทำปฏิกิริยากันที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และทำให้เย็นโดยเร็วในน้ำแข็ง เมื่อเตรียมตัวอย่างพร้อมแล้วผสมตัวอย่างในแผ่นสไลด์ (ที่มีสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์) แล้วปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ นำไปวางในเครื่อง automatic TECAN station เพื่อไฮบริไดซ์และล้างสไลด์ในขั้นตอนต่อไป โดยอุณหภูมิในการไฮบริไดซ์คืออุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากล้างสไลด์เรียบร้อยแล้ว ย้ายสไลด์ไปเก็บในที่แห้งที่มีแก๊สไนโตรเจน

1.5 การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูล

สแกนสไลด์ด้วยสแกนเนอร์ GenePix Pro 4000B (Axon Instrument) โดยตั้งค่าการสแกนที่ความยาวคลื่น 532 และ 635 นาโนเมตร (nm) ที่ความละเอียด 10 ไมโครเมตร (resolution) และวิเคราะห์ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์แต่ละจุดด้วยโปรแกรม GenePix Pro software โปรแกรมจะคำนวณแยกจุดแต่ละจุดและแบ่งเขตพื้นที่เพื่อหาค่าเฉลี่ยความเข้มแสงในแต่ละจุด แล้วสร้างไฟล์ที่มีความเข้มแสงและความหมายของแต่ละจุดเพื่อการวิเคราะห์ผลในขั้นตอนต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูลทำโดยปรับข้อมูลในชุดเดียวกันให้อยู่ในระดับใกล้เคียงกัน (normalization) เพื่อลดความแตกต่างของการติดฉลาก และประสิทธิภาพของสีฟลูออเรสเซนต์ รวมถึงปริมาณของ

เอ็มอาร์เอนเอเริ่มต้น ค่าอัตราส่วนเฉลี่ยระหว่างความเข้มของสารสี Cy3 และ Cy5 จะถูกคำนวณเพื่อลดความแปรปรวนของข้อมูล และทำการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อแยกกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการแสดงออกแบบมากขึ้น (up-regulation) หรือลดลง (down-regulation)

ตารางที่ 2 แสดงการไฮบริไดซ์ตัวอย่างข้าวที่ทำการเพาะปลูกในที่มีแสง และปลูกในที่ไม่มีแสงที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

Slide #	**45K array**	
	Cy3	**Cy5**
1	Light	Dark
2	Dark	Light
3	Light	Dark
4	Dark	Light

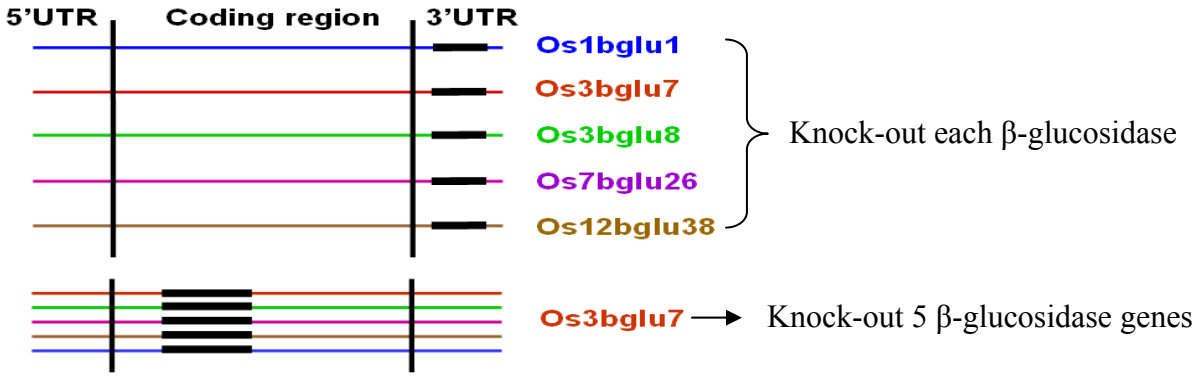
2. การศึกษาบทบาทและหน้าที่ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากฐานข้อมูล

2.1 ยีนเบต้ากลูโคซิเดสที่ทำการศึกษา

ยีนเบต้ากลูโคซิเดสที่ต้องการศึกษาทั้งหมด 5 ยีน ได้มาจากข้อมูลของ Opassiri และคณะ (2006) ที่ได้ตีพิมพ์ข้อมูลลงใน NCBI คือ หมายเลข AK068499 (*Os*7*bglu*26), AK069177 (*Os*1*bglu*1), AK071058 (*OS*12*bglu*38), AK100165 (*Os*3*bglu*7) และ AK120790 (*Os*3*bglu*8)

2.2 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับแต่ละยีน

สำหรับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะในแต่ละยีนออกแบบมาจากส่วนของ 3'UTR และอีกหนึ่งคู่สำหรับยับยั้ง (knock-out) ทั้ง 5 ยีนโดยใช้ลำดับสารพันธุกรรมของ *Os3bglu7* เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ไพรเมอร์คู่นี้ (รูปที่ 3) โดยไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ ด้าน forward จะออกแบบให้มีลำดับสารพันธุกรรมจำเพาะ 4 ตัวคือ CACC และต่อด้วยสารพันธุกรรม CTCGAG ที่ตัดจำเพาะด้วยเอ็นไซม์ *Xho*I ส่วนไพรเมอร์ด้าน reverse จะมีลำดับสารพันธุกรรม GAATTC ที่ตัดจำเพาะด้วยเอ็นไซม์ *Eco*RI ไพรเมอร์ในการทดลองทั้งหมดแสดงในตารางที่ 3



รูปที่ 3 บริเวณที่ใช้สำหรับออกแบบไพรเมอร์ยับยั้งแต่ละยีน และทั้ง 5 ยีนเบต้ากลูโคซิเดส

2.3 การสร้างเวคเตอร์อาร์เอ็นเอไอ (RNAi vector)

เวคเตอร์ที่ใช้ในการทดลองคือ pHELLSGATE8 (AF489904 จาก genbank) (รูปที่ 4) จากการศึกษาครั้งนี้จะสร้างเวคเตอร์ทั้งหมด 7 ตัว โดยเวคเตอร์ 5 ตัวสำหรับยับยั้งการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสแต่ละยีน และแต่ละเวคเตอร์จะถูกถ่ายเข้าสู่พืชแต่ละต้นอย่างอิสระ และเวคเตอร์อีก 2 ตัวคือ เวคเตอร์สำหรับยับยั้งการแสดงออกของทั้ง 5 ยีน โดยนำลำดับสารพันธุกรรมทั้ง 5 ยีนมาทำการเปรียบเทียบในโปรแกรม alignment เพื่อหาส่วนที่เหมือนกันมากที่สุดระหว่าง 5 ยีนและใช้ลำดับนิวคลี-

โอไทด์ของยีน *Os3bglu7* ซึ่งมีการแสดงออกมากที่สุดในข้าวซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์พื้นฐานสำหรับการทดลองและเวคเตอร์สุดท้าย คือ เวคเตอร์เปล่าของ pHELLSGATE8 ที่ตัดเอาส่วนของยีน ccdB ออกไปเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมสำหรับการทดลองนี้

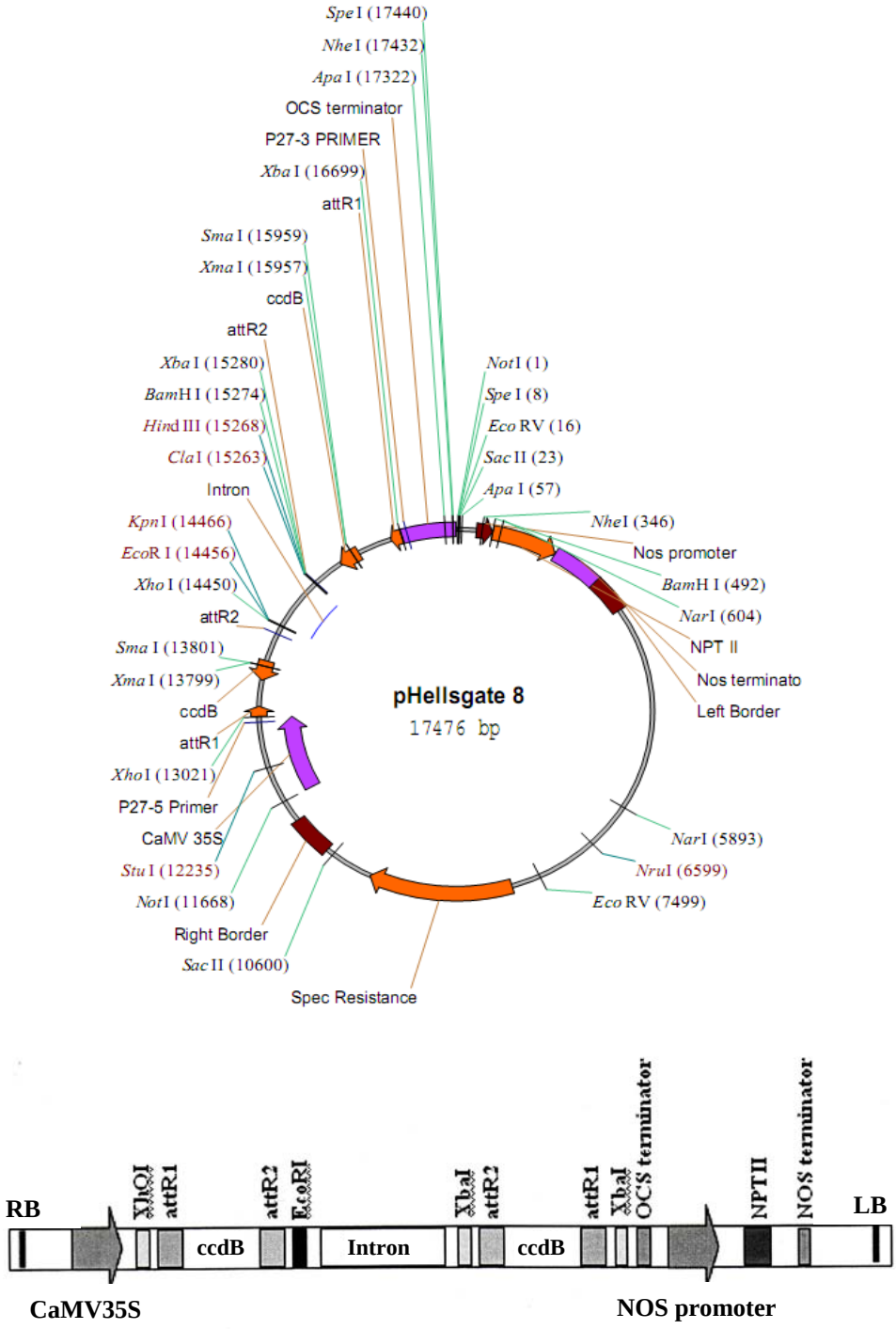
ตารางที่ 3 ลำดับสารพันธุกรรมของไพรเมอร์

Specific primers		**Sequences**	**Knock-out region**
AK120790 (*Os3bglu8*)	Forward	**CACC**CTCGAGAAGTAGTGGATGCCAGCAG	3'UTR
	Reverse	GGGAATTCAGGCCAAAGTCCAGGAGATC	
AK071058 (*Os12bglu38*)	Forward	**CACC**CTCGAGCACGTTGGTTCAGGAAG	3'UTR
	Reverse	GGGAATTCCTGCCTCTCTTATCACC	
AK068499 (*Os7bglu26*)	Forward	**CACC**CTCGAGTGCAGACAAAAGGATCAAGC	3'UTR
	Reverse	GGGAATTCTAGTCCCTTCTGTCAGCTC	
AK100165 (*Os3bglu7*)	Forward	**CACC**CTCGAGGTCGACTTCAACACGCTC	3'UTR
	Reverse	GGGAATTCCACCAAGCCAAACTCACT	
AK069177 (*Os1bglu1*)	Forward	**CACC**CTCGAGGGGGTAGATTGGGCAAGG	3'UTR
	Reverse	GGGAATTCCATGGTGTGCAACACCAAC	
5 Groups Bglu	Forward	**CACC**CTCGAGGTTCCCCAAGCGGTTCGTG	Coding region
	Reverse	GGGAATTCGCATTCAACCAGCCTCCG	

****หมายเหตุ**** CACC สำหรับใช้โคลนเข้าเวคเตอร์ pENTR/D TOPO ตำแหน่งที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Xho*I ขีดเส้นใต้ 1 เส้น ส่วนตำแหน่งที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Eco*RI ขีดเส้นใต้ 2 เส้น

เวคเตอร์อาร์เอ็นเอไอนี้ประกอบไปด้วยส่วนของ intron และมีส่วนที่จำเพาะของ cloning site อยู่ 2 ข้าง เวคเตอร์นี้มีส่วนที่เรียกว่า att site (attachment site) ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญของเอ็นไซม์ LR clonase

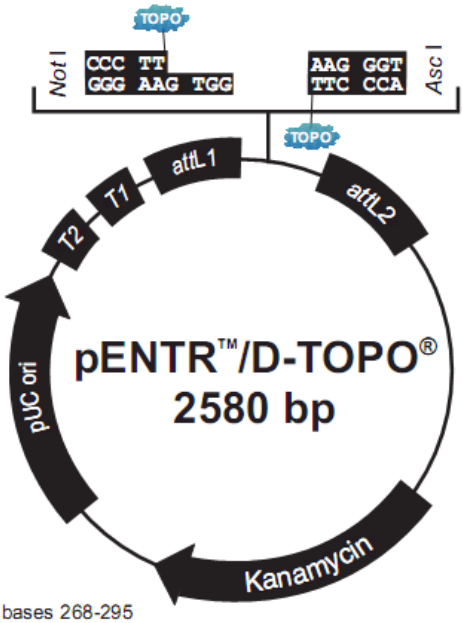
ในการย้ายชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการจากเวคเตอร์หนึ่งไปยังอีกเวคเตอร์หนึ่ง หรือเวคเตอร์ปลายทาง การสร้างเวคเตอร์ pHELLSGATE8 แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้



รูปที่ 4 แผนที่เวคเตอร์ pHELLSGATE8

2.3.1 การแทรกยีนเบต้ากลูโคซิเดสชิ้นแรกจาก pENTR™/D-TOPO เข้าสู่ pHELLSGATE8

ไพรเมอร์ที่ใช้ด้าน forward (5’ end) จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะ 4 ตัว คือ CACC สำหรับการย้ายยีนที่ได้มาจากการทำพีซีอาร์เข้าสู่เวคเตอร์ pENTR™/D-TOPO (Invitrogen, USA) (รูปที่ 5) เพื่อผลิต entry clone เวคเตอร์นี้สามารถใช้ในระบบ Gateway cloning system (Invitrogen, USA)



Comments for pENTR™/D-TOPO®
2580 nucleotides

*rrn*B T2 transcription termination sequence: bases 268-295
*rrn*B T1 transcription termination sequence: bases 427-470
M13 forward (-20) priming site: bases 537-552
*attL*1: bases 569-668 (c)
TOPO® recognition site 1: bases 680-684
Overhang: bases 685-688
TOPO® recognition site 2: bases 689-693
*attL*2: bases 705-804
T7 Promoter/priming site: bases 821-840 (c)
M13 reverse priming site: bases 845-861
Kanamycin resistance gene: bases 974-1783
pUC origin: bases 1904-2577

(c) = complementary sequence

รูปที่ 5 เวคเตอร์ pENTR™/D-TOPO

การแทรกยีนเบต้ากลูโคซิเดสชิ้นแรกจาก pENTR™/D-TOPO เข้าสู่ pHELLSGATE8 โดยตัดเวคเตอร์ pENTR™/D-TOPO ที่มีชิ้นยีนเบต้ากลูโคซิเดสอยู่ และ pHELLSGATE8 โดยเอ็นไซม์ *Eco*RI จากนั้นตัดด้วยเอ็นไซม์ *Xho*I แล้วนำเวคเตอร์ทั้ง 2 ตัว ไปแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วย

electrophoresis บนเจลอะกาโรส โดยเวคเตอร์ pENTR™/D-TOPO ที่มีชิ้นยีนอยู่จะพบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบบนเจลคือ ชิ้นดีเอ็นเอของพลาสมิด และชิ้นดีเอ็นเอของยีนเบต้ากลูโคซิเดส จากนั้นตัดเฉพาะเจลส่วนที่มีชิ้นยีนออกมา แล้วแยกดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ gel purification kit (QIAGEN, USA) ส่วนเวคเตอร์ pHELLSGATE8 จะตัดเอาเฉพาะส่วนของพลาสมิดขนาดใหญ่ที่อยู่ด้านบนของเจลออกมา และแยกดีเอ็นเอออกจากเจลด้วย gel purification kit เช่นกัน หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่แยกได้แล้วจากทั้ง 2 ตัวอย่าง นำมาทำการเชื่อมต่อกันด้วยเอ็นไซม์ T4 DNA ligase แล้วถ่ายเวคเตอร์นี้เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DB3.1 ซึ่งต้านทานต่อยีน ccdB ที่ยังเหลืออยู่บนเวคเตอร์ pHELLSGATE8 จากนั้นคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับเวคเตอร์โดยการเลี้ยงบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ spectinomycin

2.3.2 การเตรียมพลาสมิดสำหรับการถ่ายโอนเข้าสู่ข้าว

หลังจากคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับเวคเตอร์ pHELLSGATE8 ซึ่งมีชิ้นยีนของเบต้ากลูโคซิเดสแทรกอยู่หนึ่งชิ้นเรียบร้อยแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือสกัดพลาสมิดออกมาจากเซลล์แบคทีเรีย และนำพลาสมิดนี้ไปผสมกับ pENTR™/D-TOPO ที่มีชิ้นยีนอยู่ และเอ็นไซม์ LR clonase ซึ่งเอ็นไซม์นี้จะย้ายยีนเบต้ากลูโคซิเดสจาก pENTR™/D-TOPO ไปสู่ pHELLSGATE8 โดยจดจำส่วนของ att site ที่อยู่ 2 ข้างระหว่างชิ้นยีนเบต้ากลูโคซิเดสในเวคเตอร์ pENTR™/D-TOPO และระหว่างยีน ccdB บนพลาสมิด pHELLSGATE8 หลังจากนั้นคัดเลือกพลาสมิด pHELLSGATE8 ที่มีชิ้นยีนเบต้ากลูโคซิเดสอยู่ 2 ชิ้น โดยใช้แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5α เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไม่ต้านทานต่อโปรตีนเป็นพิษที่ผลิตจากยีน ccdB ดังนั้นเฉพาะเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดแล้วเท่านั้นที่สามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะได้ หลังจากนั้นทำการสกัดพลาสมิด pHELLSGATE8 ที่มีชิ้นยีนเบต้ากลูโคซิเดส 2 ยีน แล้วย้ายเข้าสู่แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ข้าวต่อไป

2.4 การผลิตข้าวดัดแปลงพันธุ์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

นำเมล็ดข้าว (Koshihikary, japonica และ ข้าวขาวดอกมะลิ KDML 105 indica) มาแกะเปลือกออก แล้วนำไปฆ่าเชื้อเบื้องต้นด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดข้าวไปฟอกฆ่าเชื้อด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) โซเดียมไฮโปคลอ-ไรท์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 6 ครั้ง นำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ววางลงบนอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัส คือ N6D และ MS ที่เติมวุ้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ และนำไปบ่มในตู้ควบคุมแสงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยให้แสง 18 ชั่วโมง และอยู่ในที่มืด 6 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 4-5 สัปดาห์ จากนั้นคัดเลือกเฉพาะแคลลัสก้อนเล็กๆ ที่แตกออกมาจากก้อนใหญ่ เพื่อนำไปเลี้ยงบนอาหาร N6D และ MS เป็นเวลา 3 วัน เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการถ่ายยีนด้วยแบคทีเรีย *Agrobacterium* สำหรับแบคทีเรีย *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิด pHELLSGATE8 ซึ่งมีชิ้นยีนจะถูกนำไปเลี้ยงบนอาหาร AB ที่เติมวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และมียาปฏิชีวนะ spectinomycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำแบคทีเรีย *Agrobacterium* มาละลายในอาหารเหลว 2N6AS ที่มี acetosyringone 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วใส่แคลลัสลงไป นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นใช้ตะแกรงกรองแคลลัส แล้วใช้กระดาษทิชชู่ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วซับเอาแบคทีเรีย *Agrobacterium* ส่วนเกินออก เลือกแคลลัสที่สมบูรณ์ไปเลี้ยงบนอาหาร 2N6AS ที่มีวุ้นผสมอยู่ 0.4 เปอร์เซ็นต์ และ acetosyringone เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืด จากนั้นนำแคลลัสที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผสมยาปฏิชีวนะ carbenicilin 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 4 ครั้ง เพื่อฆ่าแบคทีเรีย *Agrobacterium* แล้วย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหาร N6D ที่มียาปฏิชีวนะ 2 ตัว คือ carbenicilin 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ paromomycin 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นย้ายต้นอ่อนที่ได้ไปเลี้ยงในอาหาร MS เพื่อชักนำให้เกิดรากเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส แล้วย้ายต้นข้าวลงปลูกในดิน

2.5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์

ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ อาร์ที-พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่มีความไวต่อการตรวจสอบปริมาณของเอ็มอาร์เอ็นเอ โดยสกัดอาร์เอ็นเอจากแคลลัสด้วย RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, USA) จากนั้นสังเคราะห์สายซีดีเอ็นเอสายแรก (first-strand cDNA) โดยเติมโอลิโก dT, dNTP, อาร์เอ็นเอแม่แบบที่สกัดได้ และน้ำที่ใช้ทำพีซีอาร์ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปวางบนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติม 5x first strand buffer, DTT RNase inhibitor และ superscript reverse transcriptase III (Invitrogen, USA) แล้วนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หยุดการสังเคราะห์สายซีดีเอ็นเอสายแรกที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวางบนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำซีดีเอ็นเอสายแรกที่สังเคราะห์ได้ใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอต่อไป โดยการใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงสำหรับแต่ละยีนคือส่วนของ 3'UTR ของแต่ละยีน นำผลการทดลองที่ได้ไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ ในต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน เบต้ากลูโคซิเดสในต้นข้าวแต่ละต้น และเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อดูว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรเมื่อไม่มีการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในข้าวอีกต่อไป

2.6 การตรวจสอบเอสไออาร์เอ็นเอโดยใช้เทคนิค northern blot analysis

เอสไออาร์เอ็นเอมีบทบาทสำคัญ และเป็นตัวบ่งชี้ว่ามีกระบวนการอาร์เอ็นเอไอเกิดขึ้นภายในเซลล์ เนื่องจากสายคู่อาร์เอ็นเอของยีนเบต้ากลูโคซิเดสที่ผลิตโดยเวคเตอร์ pHELLSGATE8 ซึ่งมีความยาวของสายนิวคลีโอไทด์ประมาณ 200-300 นิวคลีโอไทด์ ถูกตัดให้เป็นอาร์เอ็นเอสายคู่สายสั้นๆ ที่มีความยาวประมาณ 21-25 นิวคลีโอไทด์ การตรวจสอบเอสไออาร์เอ็นเอจะใช้ตัวติดตามที่เป็น non-

radioactive ตามวิธีของ Goto และคณะ (2003) การสกัดเอสไออาร์เอ็นเอออกจากแคลลัสเริ่มจากการบดแคลลัสในไนโตรเจนเหลว แล้วเติม RNA extraction buffer และ TE-saturated phenol จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม และตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยเอธานอล ละลายตะกอนด้วยสารละลาย QRL1 ใน RNA/DNA kit (QIAGEN, USA) จากนั้นแยกอาร์เอ็นเอโมเลกุลเล็กๆ โดยใช้ denaturing PAGE ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 200 โวลต์ เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง แล้วนำไปวางบน Hybond-N^+ membrane เพื่อให้อาร์เอ็นเอเคลื่อนที่ไปบนเมมเบรน และใช้ตัวติดตามที่เฉพาะเจาะจงกับยีนเบต้ากลูโคซิเดสแต่ละยีน แล้วตรวจสอบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอสายสั้นโดยใช้ x-ray film

2.7 การตรวจสอบต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดด้วยเทคนิคพีซีอาร์

สกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวด้วย DNeasy Plant Kit (QIAGEN, USA) และใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน neomycin phosphotransferase (NPTII) ที่อยู่บนเวคเตอร์ pHELLSGATE8 เพื่อตรวจสอบว่าต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนนั้นมีการแทรกชุดยีนที่อยู่ระหว่าง left border และ right border บนเวคเตอร์ pHELLSGATE8 หรือไม่

บทที่ 3

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การแสดงออกของยีนกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลสในอะเรย์ข้าวขนาด 45 K

1.1 การแสดงออกของยีนกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1

วิเคราะห์การแสดงออกของยีนไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 โดยใช้ไฟล์ข้อมูลอะเรย์ (array annotated file) พบว่ากลุ่มโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 มีทั้งหมด 26 กลุ่ม (ตารางที่ 4) ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเพาะปลูกข้าวในที่ที่ไม่มีแสงโอลิโกนิวคลีโอไทด์ส่วนใหญ่มีการแสดงออกที่ระดับต่ำกว่าปกติ ซึ่งผลการวิเคราะห์โดยค่า false discovery rate (FDR) ที่ระดับ 0.05 เพื่อคัดเลือกกลุ่มของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทำการเปรียบเทียบชุดตัวอย่างต่างๆในการทดลองพบว่าโอลิโกนิวคลีโอไทด์ 13 กลุ่ม ที่มีความจำเพาะต่อยีนกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 โดยมีการแสดงออกของยีนที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบการปลูกข้าวในที่มีและไม่มีแสง ซึ่งระดับการแสดงออกของยีน 13 กลุ่ม มีค่าลดลงในชุดทดลองที่ทำการปลูกแบบมีแสงในระดับ $\log_2$ (-0.28 ถึง -1.19) 4 กลุ่ม และมีค่าเพิ่มขึ้นในระดับ $\log_2$ (0.23 ถึง 2.37) 9 กลุ่ม

การจัดจำแนกโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อยีนกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 โดยอาศัยข้อมูลอ้างอิงจาก Opassiri และคณะ ในปี 2006 พบว่ามีโอลิโกนิวคลีโอไทด์ 11 กลุ่ม ที่ตรงกัน (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 แสดงโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อไกลโคซิลไฮโดรเลสในชุดอะเรย์ข้าวขนาด 45K

Locus ID	Annotation	FRD (p-value)	Log_2 (Ratio)
LOC_Os01g70520.1; LOC_Os01g70520.2	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	6.79 E-08	2.16
LOC_Os11g45710.1; LOC_Os01g45710.3	Glycosyl hydrolase family 1 protein, putative, expressed	1.97 E-07	1.62
LOC_Os11g45710.2	Glycosyl hydrolase family 1 protein, putative, expressed	1.97 E-07	2.28
LOC_Os07g46280.1; LOC_Os07g46280.2; LOC_Os07g46280.3	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	3.73 E-07	-2.37
LOC_Os09g31430.1; LOC_Os09g31430.2	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	6.95 E-06	-1.31
LOC_Os09g33680.1; LOC_Os09g33680.2	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	2.53 E-05	1.10
LOC_Os04g43360.1	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	1.22 E-04	0.58
LOC_Os01g67220.1; LOC_Os01g67220.2; LOC_Os01g67220.3	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	1.40 E-04	1.02
LOC_Os05g30250.1	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	3.69 E-04	1.98
LOC_Os03g11420.1	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	6.84 E-04	-1.19
LOC_Os04g43410.1	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	1.23 E-03	-1.01
LOC_Os01g32364.1	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	1.82 E-02	0.23
LOC_Os03g49610.1	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	3.31 E-02	-0.28

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Locus ID	Annotation	FRD (p-value)	Log_2 (Ratio)
LOC_Os06g21570.1	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	5.41 E-02	0.33
LOC_Os05g30350.1; LOC_Os05g30350.2	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	5.94 E-02	1.29
LOC_Os03g49600.1; LOC_Os03g49600.2; LOC_Os03g49600.4	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	8.30 E-02	0.40
LOC_Os09g33710.1	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	1.40 E-01	0.28
LOC_Os04g43390.1	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	1.69 E-01	-0.61
LOC_Os01g59819.1	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	4.28 E-01	0.08
LOC_Os01g59819.1	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	5.07 E-01	0.09
LOC_Os09g31410.1	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	6.59 E-01	-0.14
LOC_Os04g43410.1	Glycosyl hydrolase family 1 protein	9.40 E-01	0.01
LOC_Os10g17650.1	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	9.99 E-01	0.05
LOC_Os05g30300.1	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	9.99 E-01	0.05
LOC_Os05g30390.1	Glycosyl hydrolase family 1 protein	9.99 E-01	0.04
LOC_Os12g23170.1	Glycosyl hydrolase family 1 protein, expressed	9.99 E-01	-0.04

ตารางที่ 5 แสดงโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อไกลโคซิลไฮโดรเลส ในชุดอะเรย์ข้าวขนาด 45K โดยจัดจำแนกตาม Opassiri และคณะ (2006)

Locus ID	**Annotation** (Opassiri *et al*., 2006)	**FDR (p-value)**	**Log_2 (Ratio)**
LOC_Os03g49610.1	*Os*3*bglu*8	3.31 E-02	-0.28
LOC_Os01g32364.1	*Os*1*bglu*1	1.82 E-02	0.23
LOC_Os04g43410.1	*Os*4*bglu*18	1.23 E-03	-1.01
LOC_Os03g11420.1	*Os*3*bglu*6	6.84 E-04	-1.19
LOC_Os05g30250.1	*Os*5*bglu*19	3.69 E-04	1.98
LOC_Os01g67220.1; LOC_Os01g67220.2; LOC_Os01g67220.3	NA	1.41 E-04	1.02
LOC_Os04g43360.1	*Os*4*bglu*14	1.22 E-04	0.58
LOC_Os09g33680.1; LOC_Os09g33680.2	*Os*9*bglu*31	2.53 E-05	1.10
LOC_Os09g31430.1; LOC_Os09g31430.2	*Os*9*bglu*30	6.95 E-06	1.31
LOC_Os07g46280.1; LOC_Os07g46280.2; LOC_Os07g46280.3	*Os*7*bglu*26	3.73 E-07	-2.37
LOC_Os11g45710.2	NA	1.97 E-07	2.28
LOC_Os11g45710.1; LOC_Os11g45710.3	*Os*11*bglu*36	1.93 E-07	1.62
LOC_Os01g70520.1; LOC_Os01g70520.2	*Os*1*bglu*5	6.79 E-08	2.16

NA; not available

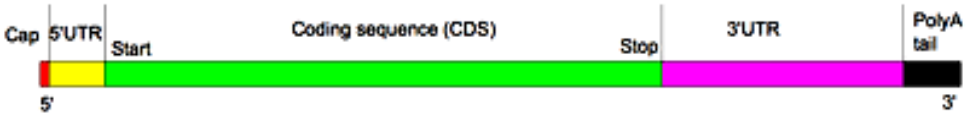
1.2 การวิเคราะห์ไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 ในชุดอะเรย์ข้าวขนาด 45K

จากผลการวิเคราะห์พบว่าในสภาวะที่มีแสงเมื่อเปรียบเทียบกับไม่มีแสงยีน *Os9bglu30* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (log_2 1.31) และยีน *Os7bglu26* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (log_2 2.37) โดยมีรายงานของยีนทั้ง 2 กลุ่มนี้ในฐานข้อมูล Expressed Sequence Tag database (EST database) ที่มีการศึกษาการแสดงออกของยีนในข้าวที่ปลูกเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่ามีการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้นในรากและใบข้าวที่ทำการทดสอบด้วยสภาวะ abiotic และ biotic stress (Opassiri และคณะ, 2006) ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 โดยอะเรย์ข้าวขนาด 45K พบว่ามีกลุ่มยีนที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และมีระดับการแสดงออกที่สูงขึ้นและลดต่ำลงเมื่อทำการเปรียบเทียบข้าวที่ทำการปลูกในที่มีแสงและไม่มีแสง ซึ่งการเลือกกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่มีความแตกต่างกัน 2 เท่า พบว่ามีเพียง 5 กลุ่มโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (*Os5bglu19*, *Os9bglu31*, *Os9bglu30*, *Os11bglu36* และ *Os1bglu5*) ที่มีการแสดงออกแบบลดลงตั้งแต่ 2 เท่าขึ้นไป และมีเพียง 3 กลุ่มโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (*Os4bglu18*, *Os3bglu6* และ *Os7bglu26*) ที่มีการแสดงออกแบบเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 2 เท่าขึ้นไป

2. การศึกษาบทบาทและหน้าที่ของยีนเบต้ากลูโคซิเดโดยเทคนิคอาร์เอ็นเอไอ

2.1 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับแต่ละยีน

ตำแหน่ง 3'UTR เป็นตำแหน่งจำเพาะของเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ดังรูปที่ 6 เป็นส่วนที่ไม่ได้ถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีน (untranslated region) โดยทั่วไป 3'UTR จะมีลำดับสารพันธุกรรมที่แตกต่างกันไปตามชนิดของสิ่งมีชีวิต หรือกลุ่มของยีน (gene families) ซึ่งในข้าวก็มีลำดับสารพันธุกรรมของ 3'UTR ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสที่มีความจำเพาะในแต่ละยีนเช่นกัน ดังนั้นจึงสามารถใช้ส่วนที่จำเพาะนี้ในการยับยั้งยีนที่จำเพาะได้นั่นเอง

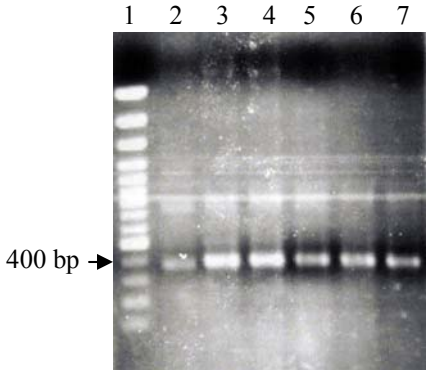


รูปที่ 6 โครงสร้างของเอ็มอาร์เอ็นเอที่แสดงถึงส่วน UTRs ที่ไม่ถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีนด้วย

2.2 การสร้างเวคเตอร์อาร์เอ็นเอไอ

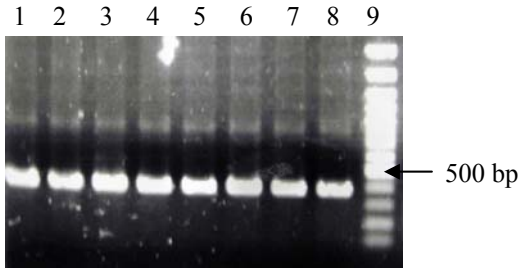
2.2.1 การแทรกยีนเบต้ากลูโคซิเดสชิ้นแรกจาก pENTR™/D-TOPO เข้าสู่ pHELLSGATE8

จีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA) ที่สกัดจากใบข้าว และซีดีเอ็นเอใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวนชิ้นยีนเบต้ากลูโคซิเดส ซึ่งขั้นตอนแรกในการยับยั้งยีนเบต้ากลูโคซิเดสทั้ง 5 ยีน ถูกสร้างขึ้นโดยการทำเวคเตอร์อาร์เอ็นเอไอด้วยการเพิ่มจำนวนส่วนที่เป็น conserved region จากซีดีเอ็นเอของ *Os3bglu7* ซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR products) จะนำมาวิเคราะห์บนเจลอะกาโรสซึ่งขนาดที่คาดการณ์ไว้คือ 399 คู่เบส (base pair; bp) แสดงดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บนเจลอะกาโรสซึ่งใช้ปฏิกิริยา (PCR reacions) ของ *Os3bglu7* โดยใช้ไพรเมอร์ของกลุ่มยีนเบต้ากลูโคซิเดส (คู่ที่ 6 ในตารางที่ 3) โดยเลนที่ 1 คือ 100bp marker และเลนที่ 2-7 คือ อุณหภูมิที่ไพรเมอร์เข้าจับดีเอ็นเอแม่แบบ (อุณหภูมิแอนเนลลิ่ง; annealing temperature) เป็น 70.0, 70.8, 71.7, 72.9, 74.2 และ 75.6 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

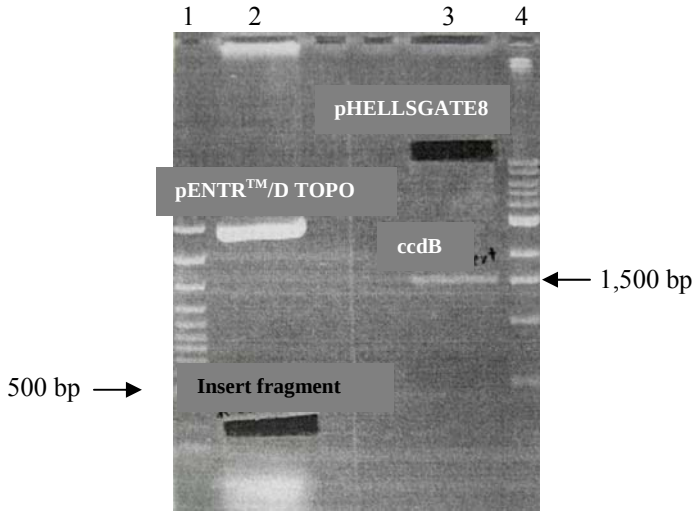
จากผลพีซีอาร์ที่ได้ข้างต้นพบว่า ปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้สูงสุดคือเลนที่ 3 และ 4 ที่อุณหภูมิแอนเนลลิ่งเท่ากับ 70.8 และ 71.7 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยสังกตได้จากความหนา และความคมชัดของแถบดีเอ็นเอบนเจล จากนั้นเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิแอนเนลลิ่งที่ 71 องศาเซลเซียส ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จะถูกนำมาโหลดบนเจลอะกาโรส ทำการตัดเอาเฉพาะขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการแล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทดสอบ (QIAquick gel extraction kit) จากนั้นนำมาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pENTR™/D TOPO และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียเพื่อเพิ่มจำนวนของพลาสมิดนี้ ซึ่งหลังจากถ่ายโอนพลาสมิดนี้เข้าสู่แบคทีเรีย แบคทีเรียที่เจริญได้จะถูกนำมาทำโคโลนีพีซีอาร์ (colony PCR method) เพื่อทดสอบว่าแบคทีเรียนั้นมีชิ้นยีนที่ต้องการอยู่หรือไม่ และนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาวิเคราะห์บนเจลอะกาโรส ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 8 พบว่ามีชิ้นยีนนั้นอยู่ในแบคทีเรียจริง ซึ่งมีขนาดดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรสประมาณ 400 คู่เบส



รูปที่ 8 ผลการทำโคโลนีพีซีอาร์เพื่อวิเคราะห์หาชิ้นยีนที่ถูกถ่ายโอนในแบคทีเรีย ซึ่งเลนที่ 1-8 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแบคทีเรียที่คาดว่าได้รับพลาสมิดดังกล่าว และเลนที่ 9 คือ 100bp marker

จากผลข้างต้นทำให้สามารถสรุปได้ว่าทั้ง 8 ตัวอย่าง มีพลาสมิดที่มีส่วนของ *Os3bglu7* ที่ถูกถ่ายโอนเข้าไปจริง ซึ่ง 1 ใน 8 ตัวอย่างนี้ ถูกนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Os3bglu7* จริง พลาสมิดถูกเก็บเกี่ยวและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทดสอบ (QIAprep miniprep plasmid extraction kit) จากนั้นถ่ายโอนยีนเป้าหมายจาก pENTR™/D TOPO cloning vector

ไปยังเวคเตอร์ pHELLSGATE8 ด้วยการตัด pENTR™/D TOPO cloning vector และ pHELLSGATE8 ด้วยเอ็นไซม์ *Eco*RI จากนั้นตกตะกอนและกำจัดเอ็นไซม์ที่เหลือและบัฟเฟอร์ ขั้นตอนต่อมาตัด pENTR™/D TOPO cloning vector และ pHELLSGATE8 อีกครั้งด้วยเอ็นไซม์ *Xho*I แล้วตรวจเช็คขนาดของแถบดีเอ็นที่ได้บนเจลอะกาโรส ซึ่งพบว่าชิ้นส่วน ccdB มีขนาด 1435 คู่เบส ประกอบไปด้วยยีน *ccdB*, attR1, attR2 และตำแหน่งตัดจำเพาะของเอ็นไซม์ *Xma*I และ *Sma*I ถูกตัดออกจากเวคเตอร์ pHELLSGATE8 ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวถูกแทนที่ด้วยยีนเป้าหมายที่ถูกตัดออกจากเวคเตอร์ pENTR™/D TOPO โดยแสดงแถบดีเอ็นเอดังรูปที่ 9

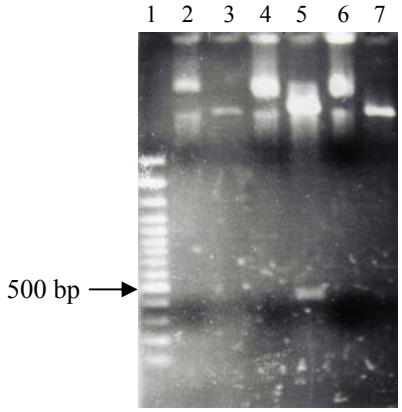


รูปที่ 9 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรสหลังจากถูกตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะ โดยเลนที่ 1 และ 4 คือ 100bp และ 1kb marker ตามลำดับ และเลนที่ 2 และ 3 คือ เวคเตอร์ pENTR™/D TOPO ที่มีชิ้นยีนเป้าหมายอยู่ และเวคเตอร์ pHELLSGATE8 ซึ่งถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *Eco*RI และ *Xho*I แล้ว

2.2.2 การเตรียมพลาสมิดสำหรับการถ่ายโอนเข้าสู่ข้าว

นำแถบดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย และ pHELLSGATE8 ซึ่งถูกตัดและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทดสอบ มาเชื่อมต่อกันเพื่อสร้างพลาสมิดอันใหม่ แล้วถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด

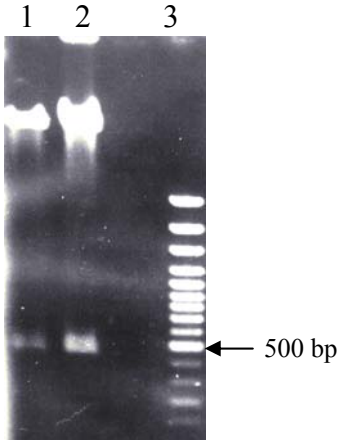
ต่อไป แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารทดสอบจำนวน 3 โคโลนี ถูกนำไปสกัดพลาสมิด แล้วทดสอบความถูกต้องของพลาสมิดที่ได้ด้วยการตัดด้วยเอ็นไซม์ที่จำเพาะคือ เอ็นไซม์ *Eco*RI และ *Xho*I โดยผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพลาสมิดบนเจลอะกาโรสหลังถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ที่จำเพาะ โดยเลนที่ 1 คือ 100bp marker เลนหมายเลขคู่ และ เลนหมายเลขคี่ คือ พลาสมิดที่ไม่ได้ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะ และพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะ ตามลำดับ

ผลจากรูปที่ 10 พบว่ามีเพียง 1 ตัวอย่าง จาก 3 ตัวอย่างเท่านั้นที่หลังจากตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะแล้วได้ชิ้นยีนเป้าหมายขนาดประมาณ 400 คู่เบส แสดงในเลนที่ 5 ดังนั้นพลาสมิด ของตัวอย่างเลนที่ 5 นี้ จะถูกใช้สำหรับการทดลองขั้นต่อไปเพื่อเคลื่อนย้ายยีนเป้าหมายยีนเดิม (ชิ้นที่ 2) จากเวคเตอร์ pENTR™/D TOPO ที่มีชิ้นยีนเป้าหมายอยู่ โดยใช้ LR clonase enzyme reaction ปฏิกิริยา แอลอาร์ (LR reaction) ประกอบด้วย 2 พลาสมิด คือ pENTR™/D TOPO ที่มีชิ้นยีนเป้าหมายอยู่ และพลาสมิดจากตัวอย่างของเลนที่ 5 (รูปที่ 10) ทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้เกิดการทำปฏิกิริยา แล้วจึงถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย ซึ่งมีเพียงแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดจากปฏิกิริยาแอลอาร์เท่านั้นที่จะสามารถเจริญได้บนอาหารทดสอบ โดยผลที่ได้พบเพียง 2 โคโลนีเท่านั้นที่เจริญได้บนอาหารทดสอบ จากนั้นนำ 2 โคโลนีที่

ได้ไปเพาะเลี้ยงเพื่อสกัดพลาสมิดต่อไป การวิเคราะห์ชิ้นยีนเป้าหมายชิ้นที่ 2 นี้ พลาสมิดจะถูกตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะ *Xba*I ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 แสดงแถบดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรสที่วิเคราะห์หาชิ้นยีนเป้าหมายชิ้นที่ 2 ด้วยการตัดพลาสมิดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะ *Xba*I ซึ่งเลนที่ 1 และ 2 คือ ตัวอย่างพลาสมิดที่มียีนเป้าหมายทั้ง 2 ชิ้น และถูกตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะ และเลนที่ 3 คือ 100bp marker

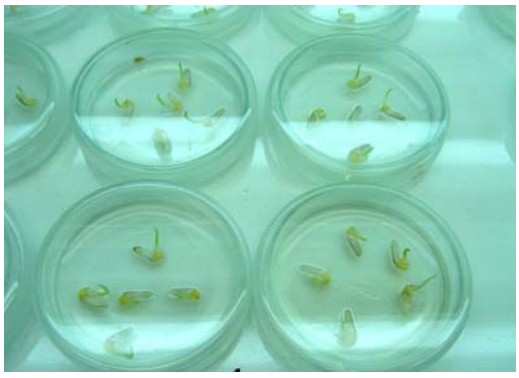
ผลที่ได้จากรูปที่ 11 พบว่าทั้ง 2 ตัวอย่างมีชิ้นยีนเป้าหมายชิ้นที่ 2 ซึ่งเมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะแล้วจะมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 450 คู่เบส ซึ่งยาวกว่าชิ้นยีนเป้าหมายชิ้นแรก (ประมาณ 400 คู่เบส) เล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากเอ็นไซม์จำเพาะ *Xba*I ตัดพลาสมิดแล้วทำให้ได้ชิ้นส่วนของ attR1 และ attR2 (ขนาด 25 และ 24 คู่เบส ตามลำดับ) ติดมากับชิ้นยีนเป้าหมายด้วยนั่นเอง จากนั้นพลาสมิดที่มียีนเป้าหมายทั้ง 2 ชิ้น ถูกนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อยืนยันความถูกต้องของตำแหน่งยีนเป้าหมายที่แทรกอยู่ในเวคเตอร์ ซึ่งผลที่ได้พบว่าถูกต้อง คือ intron อยู่ระหว่างชิ้นยีนเป้าหมายทั้ง 2 ชิ้น เพื่อทำให้เกิดโครงสร้างที่เป็นบ่วง (loop structure) แสดงดังรูปที่ 12 จากนั้นพลาสมิดนี้จะถูกถ่ายโอนไปยังแบคทีเรีย *Agrobacterium* เพื่อที่จะถ่ายโอนยีนไปยังข้าว และทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนในข้าวต่อไป และสำหรับการยับยั้งยีนเบต้ากลูโคซิเดสแต่ละยีนที่ใช้ไพรเมอร์จำเพาะ (ไพร์เมอร์คู่ที่ 1-5 ในตารางที่ 3) ก็ทำตามขั้นตอนต่างๆ เช่นเดียวกับไพรเมอร์กลุ่มยีนเบต้ากลูโคซิเดสทั้ง 5 และเมื่อได้

Agrobacterium ที่มีพลาสมิดสำหรับยับยั้งการแสดงออกของยีนครบทุกตัวอย่าง ทำการถ่ายโอนพลาสมิดนั้นเข้าสู่ข้าวต่อไป

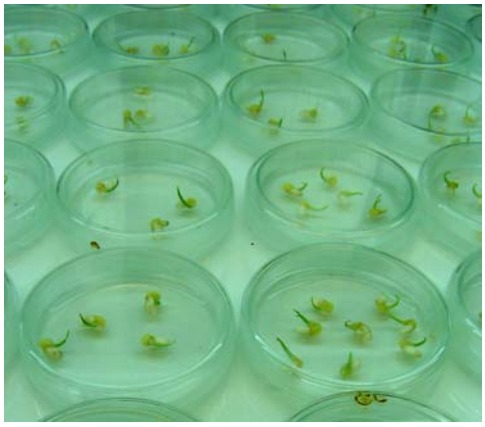
รูปที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายทั้ง 2 ชิ้น ที่แทรกอยู่ในเวคเตอร์ pHELLSGATE8

2.3 การผลิตข้าวดัดแปลงพันธุ์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

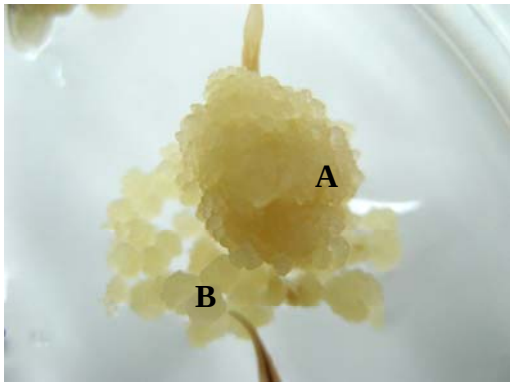
ในการทดลองนี้ใช้ข้าว 2 สายพันธุ์ คือ โคชิฮิคาริ (Koshihikary, japonica) และ ข้าวขาวดอกมะลิ KDML 105 (indica) สำหรับตัวที่จะทำให้เกิดกระบวนการถ่ายโอนยีนเข้าไปยังตัวอย่างข้าวคือ แบคทีเรีย *Agrobacterium* EHA105 ซึ่งหลังจากที่เพาะเมล็ดข้าวทั้ง 2 ชนิด บนอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสปฐมภูมิ (primary calli) แสดงดังรูปที่ 13 และ 14 และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 4-6 สัปดาห์จะได้แคลลัสทุติยภูมิ (secondary calli) ดังแสดงในรูปที่ 15



รูปที่ 13 แคลลัสปฐมภูมิของข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 บนอาหารชักนำ N6D เป็นเวลา 2 สัปดาห์



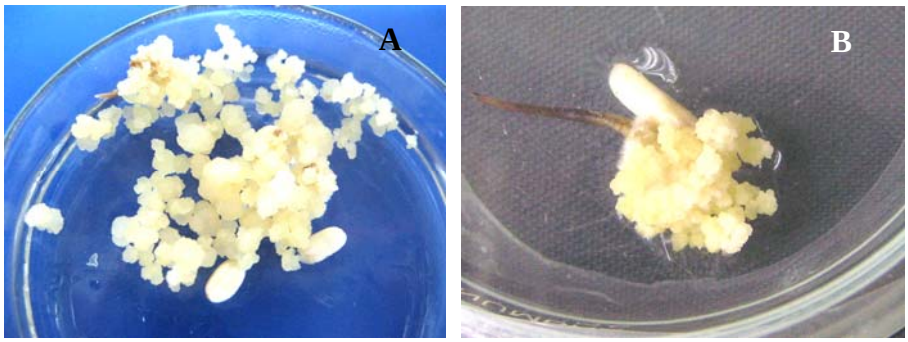
รูปที่ 14 แคลลัสปฐมภูมิของข้าวโคชิฮิคาริ บนอาหารชักนำ N6D เป็นเวลา 2 สัปดาห์



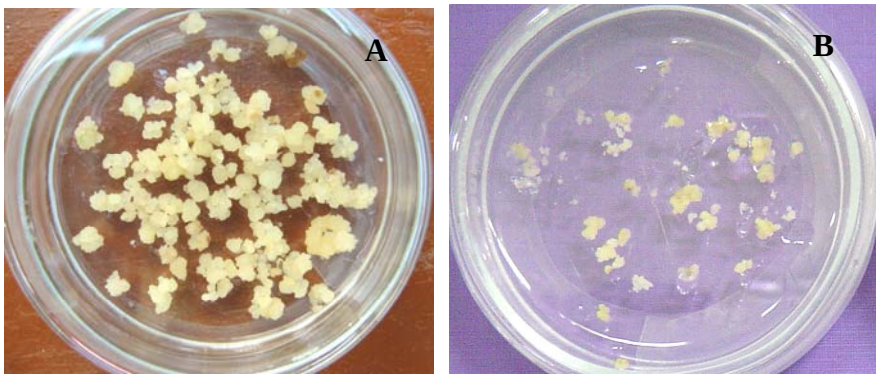
รูปที่ 15 แสดงการเจริญของแคลลัสจากแคลลัสปฐมภูมิ (A) จนกลายเป็นแคลลัสทุติยภูมิ (B) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4-6 สัปดาห์

จากรูปที่ 16 พบว่าแคลลัสทุติยภูมิของข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 มีความแตกต่างเมื่อเทียบจากข้าวโคชิฮิคาริทั้งอัตราการเจริญ รูปร่าง และขนาด โดยแคลลัสข้าวโคชิฮิคาริจะเจริญได้เร็วกว่าได้รูปร่างกลม เรียบ และมีขนาดใหญ่กว่าแคลลัสข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 นอกจากนี้ยังพบว่าเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัสทุติยภูมิสำหรับข้าวโคชิฮิคาริ ที่จะใช้ในการถ่ายโอนยีนเป้าหมายโดยแบคทีเรีย *Agrobacterium* นั้นใช้เวลาเพียงแค่ 4-6 สัปดาห์เท่านั้น แต่แคลลัสข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 ต้องการระยะเวลานานกว่าคือ 6-7 สัปดาห์ และพบว่าแคลลัสทุติยภูมิของข้าวโคชิฮิคาริบนอาหารเพาะเลี้ยง

เบื้องต้น (pre-culture) N6D มีสุขภาพ และคุณภาพที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 (รูปที่ 17) ซึ่งความแตกต่างทั้งปริมาณ สี ขนาด และลักษณะรูปร่างของแคลลัสนี้ น่าจะเกิดจากความหลากหลายของจีโนมข้าวนั่นเอง และนอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส รวมทั้งสภาวะแวดล้อมก็ส่งผลต่อการเจริญของแคลลัสด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตามปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่ส่งผลต่อการเจริญของแคลลัสก็คือ จีโนมของข้าวแต่ละสายพันธุ์



รูปที่ 16 การชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวโคชิฮิคาริ (A) และข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 (B) ด้วยอาหารเพาะเลี้ยง N6D



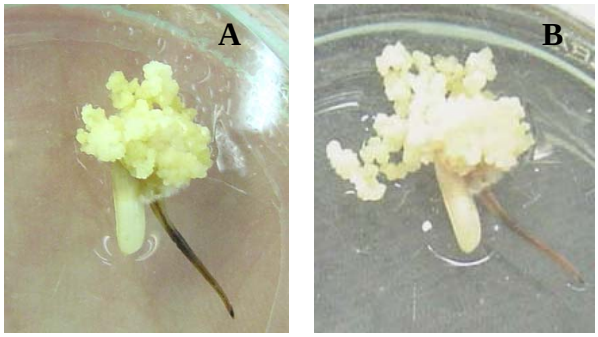
รูปที่ 17 แคลลัสทุติยภูมิของข้าวโคชิฮิคาริ (A) และข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 (B) ที่เพาะเลี้ยงเบื้องต้นบนอาหาร N6D เป็นระยะเวลา 3 วัน

นอกจากนี้แสงเป็นปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และกระบวนการผลิตเมทาบอลิซึมทุติยภูมิ (secondary metabolism) ของพืช แต่อย่างไรก็ตามระดับการตอบสนองต่อแสงยังขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ (cell type) และชนิดและสายพันธุ์ของพืช (plant species and cultivar) ด้วยเช่นกัน ดังนั้นในการทดลองนี้ปัจจัยด้านแสงในการชักนำให้เกิดแคลลัสทุติยภูมิจึงถูกนำมาพิจารณาด้วยเช่นกัน จากผลการทดลองพบว่าแสงไม่ได้เป็นปัจจัยที่สำคัญในการชักนำให้เกิดแคลลัสทุติยภูมิของข้าวทั้ง 2 ชนิดในการทดลองครั้งนี้ แต่กลับเป็นอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมากกว่าที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสทุติยภูมิของข้าวทั้ง 2 ชนิด รายงานของ Qian และคณะ ในปี 2004 ที่ได้ศึกษาการเกิดสีน้ำตาล (browning) ในแคลลัสข้าว (indica rice variety Pei'ai64s) พบว่าถึงแม้แสงจะเพิ่มการชักนำให้เกิดแคลลัส แต่เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในที่มืดแล้ว พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าแสงไม่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสทุติยภูมิซึ่งตรงกับผลการทดลองนี้ และยิ่งไปกว่านั้น Qian และคณะ ยังได้ชี้แจงอีกว่า ถึงแม้แสงจะทำให้แคลลัสเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วก็จริง แต่ก็ทำให้เพิ่มอัตราการเกิดสีน้ำตาลในแคลลัสเช่นกัน ซึ่งส่งผลให้แคลลัสอ่อนแอและตายในที่สุด

นอกจากนี้ ปัจจัยด้านอุณหภูมิก็ถูกนำมาพิจารณาถึงการชักนำให้เกิดแคลลัสทุติยภูมิของข้าวทั้ง 2 ชนิดด้วยเช่นกัน แต่ก็พบว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่าหรือสูงกว่า 25-30 องศาเซลเซียส จะส่งผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสทุติยภูมิอย่างแน่นอน โดยแคลลัสที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิที่สูงกว่า 30 องศาเซลเซียส จะเกิดสีน้ำตาล มีลักษณะอ่อนนุ่ม โปร่งแสง และเปราะ ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิสูงส่งผลให้น้ำระเหยจากอาหารเพาะเลี้ยง ทำให้หยดน้ำจำนวนมากไปเกาะที่ฝาจานเพาะเลี้ยงและหยดลงมายังแคลลัสซึ่งส่งผลให้แคลลัสตายเกือบทั้งหมด หรือไม่ก็จะส่งผลต่อประสิทธิภาพที่ลดต่ำลงของการถ่ายโอนยีนเป้าหมายนั่นเอง และสำหรับลักษณะแคลลัสที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส จะมีลักษณะแคลลัส

ที่แห้งแกรน และสีค่อนข้างเหลือง แต่สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแคลลัสทุติยภูมิมากที่สุด คือ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืด และนอกจากนี้สภาวะดังกล่าวยังทำให้ได้แคลลัสทุติยภูมิที่มีคุณภาพดีและเหมาะในการถ่ายโอนยีนเป้าหมายด้วย

อาหารเพาะเลี้ยงเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญเช่นกัน ดังนั้นจึงถูกนำมาพิจารณาสำหรับการทดลองในครั้งนี้ด้วยโดยแสดงดังตารางที่ 6 เนื่องจากการชักนำให้เกิดแคลลัสแรกเริ่มของข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิด (MS และ N6D) ไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีเพียงการชักนำให้เกิดแคลลัสทุติยภูมิเท่านั้น ที่ถูกทดสอบการชักนำให้เกิดแคลลัสด้วยอาหารเพาะเลี้ยงดังกล่าว ซึ่งจากการทดลองจะเห็นว่าแคลลัสที่ถูกเพาะเลี้ยงบนอาหาร N6D จะได้จำนวนที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดังแสดงในรูปที่ 18 ซึ่งได้ผลตรงกับงานวิจัยของ Niroula และคณะ ในปี 2005 ที่ได้รายงานไว้ว่าองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงส่งผลต่อการเจริญเติบโตเซลล์พืชเพาะเลี้ยง และอาหารเพาะเลี้ยง N6D เป็นอาหารที่มีประสิทธิภาพสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัส การเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของเซลล์และการงอกของเมล็ดข้าวที่มีจีโนมที่แตกต่างกัน



รูปที่ 18 การชักนำให้เกิดแคลลัสทุติยภูมิของข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 ด้วยอาหารเพาะเลี้ยง MS (A) และ N6D (B)

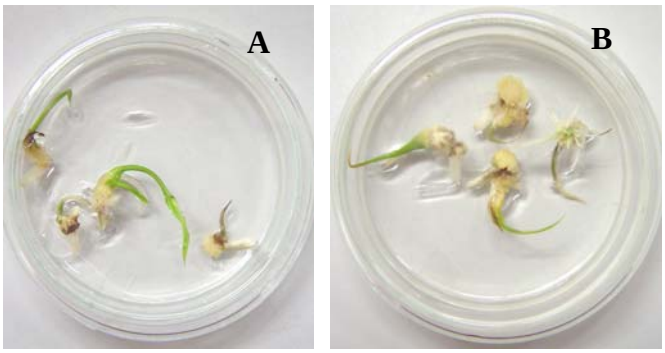
ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 ด้วยอาหารเพาะเลี้ยง MS และ N6D และการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวโคชิฮิคาริด้วยอาหารเพาะเลี้ยง N6D

Rice variety	**KDML105**		**Koshihikari**
	MS	**N6D**	**N6D**
Replication	**% callus induction***	**% callus induction***	**% callus induction***
1	92.40	94.80	94.00
2	96.80	90.40	97.20
3	91.60	96.00	93.60
4		95.00	91.33
5		91.33	95.33
6		94.00	92.33
7		94.50	99.00
8		96.12	98.25
9		97.25	97.62
10		96.00	95.75
11			88.20
12			89.00
13			87.60
14			88.00
Average	**93.60 ± 2.80 %**	**94.54 ± 2.16 %**	**93.37 ± 4.03 %**

* callus induction frequency (%) = $\frac{\text{No. of seeds produced calli}}{\text{No. of seeds cultured}}$ X 100

การชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีคุณภาพสูงและมีปริมาณมาก ซึ่งได้มาจากเมล็ดข้าวที่เก็บเกี่ยวภายใน 6 เดือน โดยเก็บเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 และเมล็ดข้าวโคชิฮิคาริ ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเมล็ดข้าวที่เก็บไว้นานเกิน 6 เดือน จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดแคลลัสทุติยภูมิลดลง ดังนั้นเมล็ดข้าวที่ใช้ในการทดลองนี้ควรจะถูกเปลี่ยนทุกๆ 6 เดือน เพื่อคงไว้ซึ่งคุณภาพและประสิทธิภาพของการชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีแคลลัสทุติยภูมิที่เพาะในอาหาร N6D ของข้าวขาวดอก

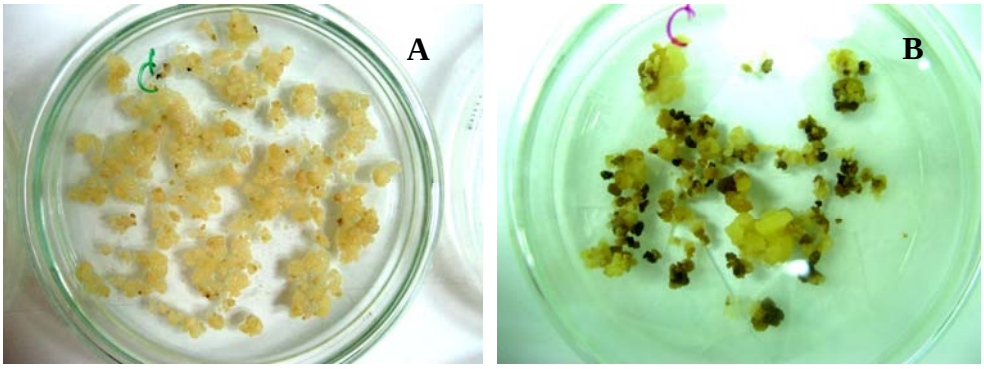
มะลิ KDML105 (รูปที่ 19) และข้าวโคชิฮิคาริจำนวนเล็กน้อยเท่านั้นที่ได้จากเมล็ดข้าวที่เก็บไว้นานเกินกว่า 6 เดือน การยุติการเจริญของแคลลัสปฐมภูมิเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสทุติยภูมิ นำไปสู่การเกิดแคลลัสที่เป็นสีน้ำตาลและมีประสิทธิภาพต่ำ ดังนั้นแคลลัสทุติยภูมิควรจะเจริญเติบโตจากแคลลัสแรกเริ่มจนกระทั่งแคลลัสทุติยภูมิสามารถเจริญเติบโตแผ่กระจายไปบนอาหารเพาะเลี้ยงเองได้ ซึ่งปริมาณวุ้นที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงส่งผลต่อการดูดซึมน้ำของเนื้อเยื่อ โดยปริมาณวุ้นที่มากเกินไปส่งผลถึงประสิทธิภาพของอาหาร ส่งผลให้แคลลัสที่ได้แข็งกระด้าง แห้ง และเปราะ ซึ่งจะส่งผลอย่างมากต่อกระบวนการโอนถ่ายยีนเป้าหมาย



รูปที่ 19 การชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีประสิทธิภาพต่ำของเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 ที่มีอายุการเก็บที่มากกว่า 6 เดือน ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS (A) และ N6D (B) เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเป้าหมายเข้าสู่พืชด้วยแบคทีเรีย *Agrobacterium* ไม่ได้ขึ้นอยู่เพียงแค่ความสำเร็จในการจดจำตำแหน่งที่ถูกต้อง และการสร้างโคโลนีของแบคทีเรีย *Agrobacterium* ได้เท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับการตอบสนองของเซลล์พืชต่อกระบวนการจู่โจมของแบคทีเรีย *Arobacterium* ด้วย ซึ่งการศึกษากระบวนการถ่ายโอนยีนเป้าหมายของแบคทีเรีย *Agrobacterium* ในข้าว โดยมากมักใช้เซลล์ระยะแรกเริ่ม (embryonic cell) เช่นเซลล์เริ่มต้นที่ยังไม่เจริญเติบโตเต็มที่ (immature embryos) และแคลลัสที่มาจากสคูเทลลัม (scutellum) ซึ่งสำหรับงานวิจัยนี้กระบวนการถ่ายโอนยีนเป้าหมายเข้าสู่ข้าว

โคชิฮิคาริ และข้าวขาวหอมมะลิ KDML105 ถูกทำขึ้นโดยเพาะเลี้ยงแคลลัสทุติยภูมิเบื้องต้น (pre-culture) บนอาหารเพาะเลี้ยง N6D เป็นระยะเวลา 3 วัน แล้วจึงนำมาเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *Agrobacterium* เป็นระยะเวลาอีก 3 วัน เพราะหากนานมากกว่า 3 วัน จะทำให้ลดประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเป้าหมายได้ และจะทำให้แคลลัสมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ตายได้ โดยเฉพาะแคลลัสข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 เพราะด้วยโครงสร้างของแคลลัสที่มีขนาดเล็ก และผิวหน้าหยาบ ซึ่งทำให้ยากแก่การล้างแบคทีเรีย *Agrobacterium* ออกไป และแบคทีเรีย *Agrobacterium* นี้ก็จะไปชักนำให้เกิดกระบวนการนิวโครซีส (necrosis) และฆ่าแคลลัสทั้งหมดหลังจาก 3 วันของการเพาะเลี้ยงร่วม (co-culture) นั่นเอง ดังแสดงในรูปที่ 20

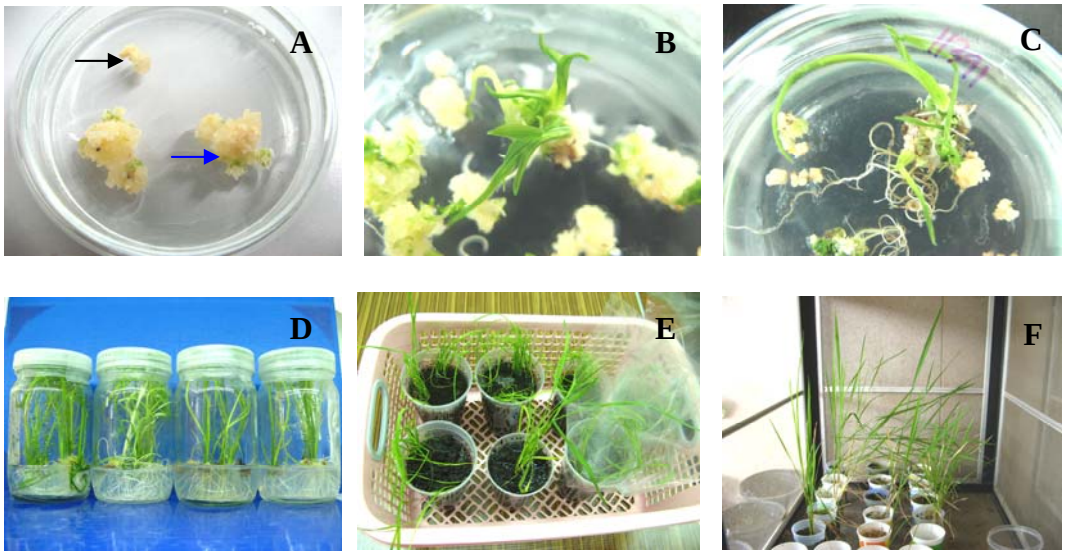


รูปที่ 20 แคลลัสของข้าวโคชิฮิคาริบนอาหารคัดเลือกหลังจากที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *Agrobacterium* เป็นระยะเวลา 3 วัน (A) และ 4 วัน (B)

จากผลการทดลองที่ได้ดังตารางที่ 7 จะเห็นว่ามีเพียงแคลลัสที่ถูกถ่ายโอนด้วยพลาสมิดของชุดทดสอบควบคุม และชุดทดสอบ *Os12bglu38* เท่านั้นที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นข้าวได้ ขณะที่แคลลัสที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิดจากชุดทดสอบอื่นๆ ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นข้าวได้ ซึ่งในภายหลังพบว่าแคลลัสนั้นเป็นแคลลัสที่ถ่ายโอนพลาสมิดเข้าไปไม่ได้นั่นเอง ถึงแม้ว่าจะมีแคลลัสที่ไม่มีพลาสมิดที่ถูกถ่ายโอนของแต่ละชุดทดสอบสามารถเจริญได้ในอาหารที่มียาปฏิชีวนะก็ตาม แต่เนื่องจากปริมาณความ

เข้มข้นที่ต่ำของยาปฏิชีวนะพาโรโมไมซิน (50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในอาหารคัดเลือก จึงทำให้แคลลัสสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและเจริญได้นั่นเอง และจะเห็นว่าอาหารคัดเลือกที่ใช้ไม่ใช่ปัจจัยสำคัญในการยับยั้งการงอกของต้นข้าวเนื่องจากมีทั้งแคลลัสของชุดทดสอบควบคุม และชุดทดสอบ *Os*12*bglu*38 ที่แคลลัสสามารถเจริญไปเป็นต้นข้าวได้ และยิ่งกว่านั้นลักษณะของต้นข้าวจากทั้ง 2 ชุดทดสอบยังเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างเลย ถึงแม้ต้นข้าวที่ได้จากชุดทดสอบควบคุมจะเป็นต้นข้าวที่ไม่มีพลาสมิดที่ถูกถ่ายโอน (nontransformed rice; empty pHELLSGATE8 transformed) ก็ตาม ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากยีน *Os*12*bglu*38 ไม่มีการแสดงออกในแคลลัส ถึงแม้จะแสดงออกในใบ ดอกและรวงข้าวก็ตาม ซึ่งจากการทดลองนี้น่าจะ**สรุปได้ว่าผลกระทบของการยับยั้งยีนเบต้ากลูโคซิเดสทั้ง 4 ยีน ที่แสดงออกในแคลลัสน่าจะไปลดการงอกเป็นต้นข้าวของแคลลัสนั่นเอง**

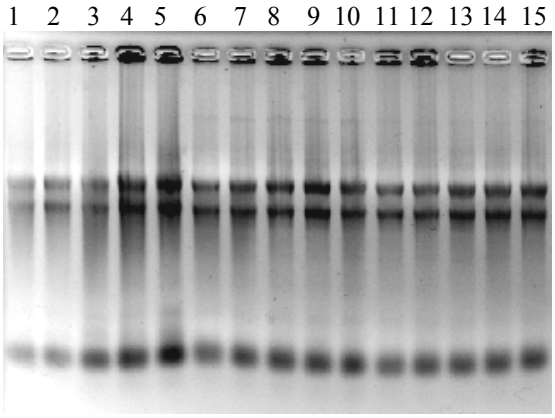
แคลลัสที่มีศักยภาพสูงในการที่จะงอกเป็นต้นข้าวนั้น จะสร้างจุดสีเขียวขึ้นบนผิวหน้าของแคลลัส และพบว่าจะสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วเพียงแค่ 2 สัปดาห์แรกของการปลูกเท่านั้น (รูปที่ 21A) จำนวนแคลลัสที่พอเหมาะในการเพาะเลี้ยงบนอาหารอยู่ที่ 10-15 แคลลัสต่อจานเพาะเลี้ยงนั่นเอง ซึ่งเป็นการดีสำหรับแคลลัสในการใช้พื้นที่ในการเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ จากจุดสีเขียวทั้งหมดที่พบบนแคลลัสนั้น บางจุดจะพัฒนาไปเป็นราก หลังจากใช้ระยะเวลา 3-6 สัปดาห์ ดังรูปที่ 21B แต่บางจุดก็จะไม่พัฒนาไปเป็นรากภายใต้สภาวะแวดล้อมเดิม การพัฒนาไปเป็นราก และใบไม่ได้มีความสัมพันธ์กับขนาดของแคลลัสเลย เนื่องจากแคลลัสขนาดเล็กๆ ก็สามารถพัฒนาไปเป็นราก และใบได้เช่นเดียวกันกับแคลลัสก้อนใหญ่นั่นเอง



รูปที่ 21 แสดงการพัฒนาจากแคลลัสจนเป็นต้นข้าว แคลลัสที่มีจุดสีเขียวหลังจากเพาะเลี้ยง 2-3 สัปดาห์ (A) แคลลัสพัฒนาไปเป็นใบบนอาหารเพาะเลี้ยง (B) การงอกเป็นรากและใบ (C) ต้นข้าวที่เจริญเติบโตบนอาหาร MS ที่ไม่มีฮอร์โมน (D) ต้นข้าวถูกหุ้มด้วยถุงพลาสติกก่อนจะถูกย้ายออกมาภายนอกชายคา (E) และต้นข้าวที่ปปลูกไว้ในกรงตาข่าย (F)

2.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์

หลังจากสกัดอาร์เอนเอทั้งหมด (total RNA) จากตัวอย่างแคลลัสของแต่ละชุดการทดสอบที่ใช้ในการยับยั้งแต่ละยีน ยกเว้นตัวอย่างแคลลัสจากชุดทดสอบที่ใช้ในการยับยั้งยีน *Os12bglu38* เนื่องจากปกติยีนนี้จะไม่มีการแสดงออกในแคลลัสนั่นเอง นำอาร์เอนเอทั้งหมดของทุกตัวอย่างที่สกัดได้มาโหลดบนเจลอะกาโรสซึ่งแสดงดังรูปที่ 22

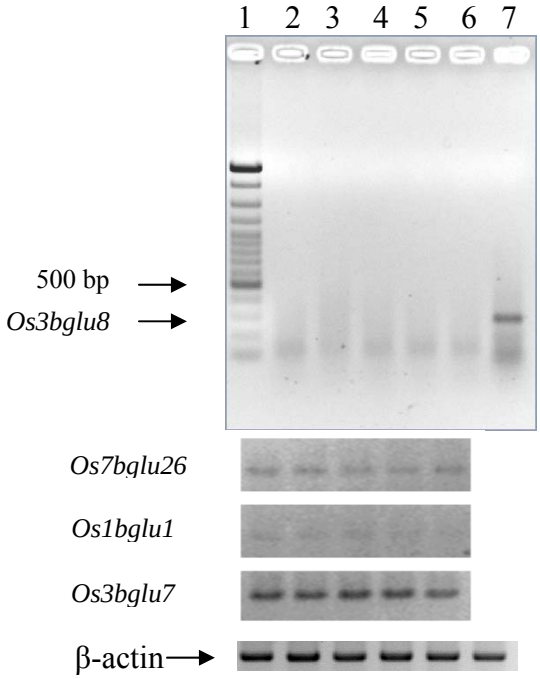


รูปที่ 22 อาร์เอนเอที่สกัดได้ในแต่ละตัวอย่างแคลลัส ที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะพาโรโมไมซินจากชุดทดสอบทั้ง 5 ชุดทดสอบ เลนที่ 1-3 คือ ตัวอย่างจากชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os*3*bglu*7 เลนที่ 4-6 คือ ตัวอย่างจากชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os*1*bglu*1 เลนที่ 7-9 คือ ตัวอย่างจากชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os*7*bglu*26 เลนที่ 10-12 คือ ตัวอย่างจากชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os*3*bglu*8 และเลนที่ 13-15 คือ ตัวอย่างจากชุดทดสอบควบคุม (empty pHELLSGATE8)

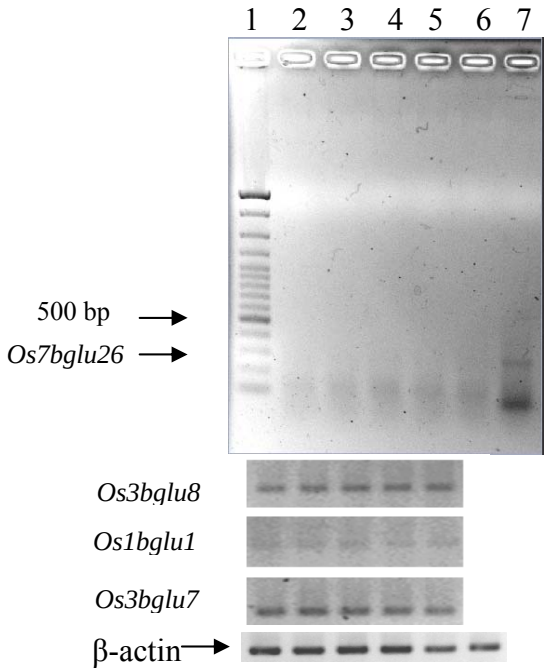
อาร์เอ็นเอนเหล่านี้จะถูกนำไปเป็นดีเอนเอแม่แบบสำหรับปฏิกิริยาอาร์ที-พีซีอาร์ 2 ขั้นตอน (2 step RT-PCR reaction) โดยผลที่ได้ (รูปที่ 23) แสดงให้เห็นว่าในทุกตัวอย่างของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os*3*bglu*8 ตรวจสอบแล้วไม่พบเอ็มอาร์เอ็นเอ แต่ตัวอย่างของชุดทดสอบควบคุมตรวจพบเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน *Os*3*bglu*8 ส่วนยีนอีก 3 ยีนที่เหลือตรวจพบเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนนั้นๆ และยังตรวจพบการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของทั้งยีน *Os*7*bglu*26 *Os*3*bglu*7 และ *Os*1*bglu*1 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าไม่เกิดผลกระทบใดๆ หากทำการยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ในแคลลัสที่ต้านทานยาปฏิชีวนะของตัวอย่างชุดทดสอบ *Os*3*bglu*8

สำหรับแคลลัสที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะพาโรโมไมซินของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os*7*bglu*26 และ *Os*1*bglu*1 ให้ผลการทดลองที่เหมือนกับในชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os*3*bglu*8 ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนได้อย่างสมบูรณ์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบควบคุม (รูปที่ 24 และ 25 ตามลำดับ)

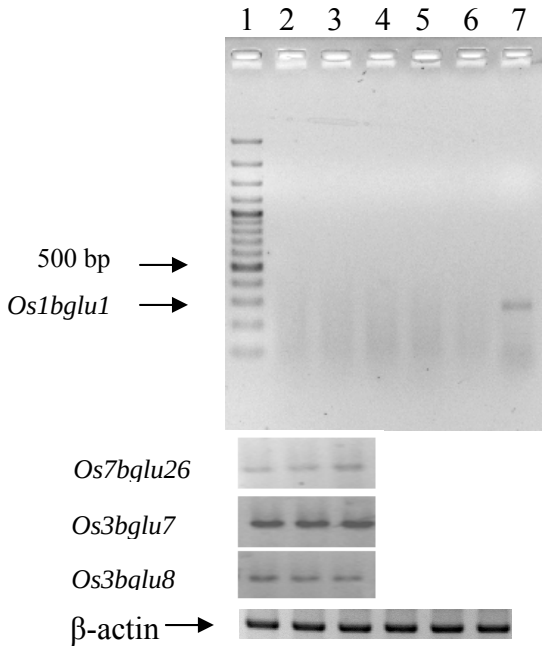
แต่สำหรับผลการทดลองในชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os3bglu7* ให้ผลที่แตกต่างออกไปซึ่งน่าสนใจ คือ ตรวจพบเอ็มอาร์เอ็นเอของ *Os3bglu7* ในแคลลัสทุกตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างแคลลัสของชุดทดสอบ (รูปที่ 26) ถึงแม้จะพบว่าในบางตัวอย่างเกือบจะยับยั้งการแสดงออกของยีนได้เกือบสมบูรณ์ (รูปที่ 26 เลนที่ 2) หรือยับยั้งการแสดงออกได้เพียงครึ่งหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างของชุดควบคุมก็ตาม แต่นั่นก็ถือว่าไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *Os3bglu7* ได้อย่างชุดทดสอบอื่นๆ



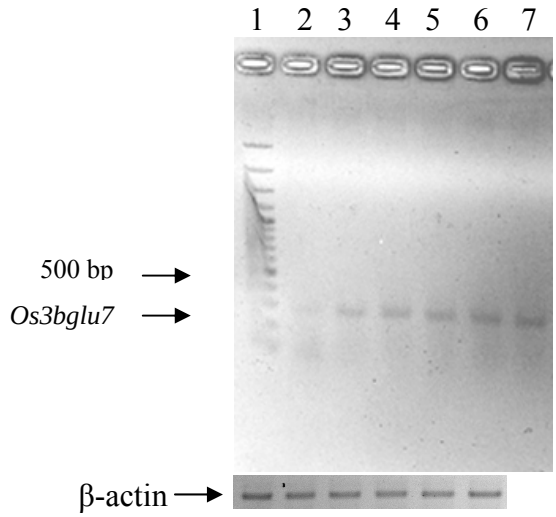
รูปที่ 23 ผลิตภัณฑ์อาร์ที-พีซีอาร์จากเอ็มอาร์เอ็นเอ ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในแคลลัสของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os3bglu8* ไพรเมอร์เฉพาะ 3'UTR ของแต่ละยีนถูกใช้เพื่อสังเคราะห์ชิ้นยีน *Os3bglu8* *Os7bglu26* *Os1bglu1* และ *Os3bglu7* โดยใช้เบต้าแอคติน (β-actin) เป็นตัวควบคุม เลนที่ 1 คือ 100bp marker เลนที่ 2-6 คือ ตัวอย่างแคลลัสของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os3bglu8* และเลนที่ 7 คือ ตัวอย่างแคลลัสของชุดทดสอบควบคุม



รูปที่ 24 ผลิตภัณฑ์อาร์ที-พีซีอาร์จากเอ็มอาร์เอ็นเอ ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในแคลลัสของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os7bglu26* ไพรเมอร์เฉพาะ 3'UTR ของแต่ละยีนถูกใช้เพื่อสังเคราะห์ชิ้นยีน *Os7bglu26* *Os3bglu8* *Os1bglu1* และ *Os3bglu7* โดยใช้เบต้าแอคติน (β-actin) เป็นตัวควบคุม เลนที่ 1 คือ 100bp marker เลนที่ 2-6 คือ ตัวอย่างแคลลัสของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os7bglu26* และเลนที่ 7 คือ ตัวอย่างแคลลัสของชุดทดสอบควบคุม



รูปที่ 25 ผลิตภัณฑ์อาร์ที-พีซีอาร์จากเอ็มอาร์เอ็นเอ ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในแคลลัสของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os*1*bglu*1 ไพรเมอร์เฉพาะ 3'UTR ของแต่ละยีนถูกใช้เพื่อสังเคราะห์ชิ้นยีน *Os*1*bglu*1 *Os*7*bglu*26 *Os*3*bglu*7 และ *Os*3*bglu*8 โดยใช้เบต้าแอคติน (β-actin) เป็นตัวควบคุม เลนที่ 1 คือ 100bp marker เลนที่ 2-6 คือ ตัวอย่างแคลลัสของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os*1*bglu*1 และเลนที่ 7 คือ ตัวอย่างแคลลัสของชุดทดสอบควบคุม



รูปที่ 26 ผลิตภัณฑ์อาร์ที-พีซีอาร์จากเอ็มอาร์เอ็นเอ ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในแคลลัสของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os3bglu7* ไพรเมอร์เฉพาะ 3'UTR ถูกใช้เพื่อสังเคราะห์ชิ้นยีน *Os3bglu7* โดยใช้เบต้าแอคติน (β-actin) เป็นตัวควบคุม เลนที่ 1 คือ 100bp marker เลนที่ 2-6 คือ ตัวอย่างแคลลัสของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os3bglu7* และเลนที่ 7 คือ ตัวอย่างแคลลัสของชุดทดสอบควบคุม

จากงานวิจัยของ Opassiri และคณะในปี 2006 ได้กล่าวไว้ว่ายีน *Os3bglu7* เป็นยีนที่มีการแสดงออกสูงที่สุดในข้าว ดังนั้นจึงอาจจะเป็นไปได้ที่อาร์เอ็นเอสายคู่ของ *Os3bglu7* จาก pHELLSGATE8 ไม่เพียงพอในการยับยั้งการแสดงออกทั้งหมดที่มีปริมาณมาก หรืออาจจะเป็นการยับยั้งการแสดงออกของยีนเองที่ไปกระตุ้นบางโมเลกุล เพื่อให้มีการแสดงออกของยีนนี้มากยิ่งขึ้นสำหรับการคงไว้ซึ่งกิจกรรมทางชีวภาพของแคลลัสในการมีชีวิตอยู่ หรืออาจเป็นไปได้ที่อาร์เอ็นเอสายคู่ของ *Os3bglu7* ไปยับยั้งอาร์เอ็นเอไอ เนื่องจากมีลำดับอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะที่เป็นผู้แข่งขันกับโครงสร้างของอาร์เอ็นเอไอ หรืออาจจะต้องใช้ระยะเวลาในการยับยั้งยีนเป็นเวลานานยิ่งขึ้นเพื่อให้สามารถยับยั้งปริมาณยีนที่แสดงออกมามากได้ทั้งหมด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกกับยีนอื่นๆ แล้วพบว่ายีนนี้มี

การแสดงออกที่มากกว่ายีนอื่นมาก จึงเป็นไปได้ที่น่าจะเพิ่มระยะเวลาเพื่อให้สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนนี้ให้ได้ทั้งหมด ซึ่งถ้าหากเกิดการยับยั้งยีน *Os3bglu7* ได้อย่างสมบูรณ์และแคลลัสสามารถงอกเป็นต้นข้าวได้ ดังนั้นการยับยั้งนี้จึงน่าจะส่งผลในบางวิถีชีวภาพ (biological pathway) ที่เกี่ยวข้องกับการงอกเป็นต้นข้าว แต่เนื่องจากในชุดทดสอบนี้ไม่มีการพัฒนาจากแคลลัสไปเป็นต้นข้าว จึงไม่สามารถเปรียบเทียบผลกระทบที่เกิดกับลักษณะที่ปรากฏของต้นข้าวได้นั่นเอง

2.5 การตรวจสอบเอสไออาร์เอ็นเอโดยใช้เทคนิค northern blot analysis

การตรวจสอบเอสไออาร์เอ็นเอสามารถทำได้โดยใช้เทคนิค northern blot analysis ซึ่งระดับการสะสมของเอสไออาร์เอ็นเอในแคลลัสของแต่ละชุดทดสอบแสดงดังรูปที่ 27 ซึ่งการเก็บสะสมเอสไอ-อาร์เอ็นเอในปริมาณที่สูงพบในแคลลัสของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os3bglu8* ตามมาด้วยแคลลัสของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os7bglu26* *Os1bglu1* *Os3bglu7* ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นว่าปริมาณเอสไออาร์เอ็นเอที่ต่ำในชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os3bglu7* นั้น ไม่เพียงพอในการยับยั้งการแสดงออกที่มากของยีนนี้ในแคลลัส ซึ่งการมีปริมาณเอสไออาร์เอ็นเอมากจะเพิ่มโอกาสในการเข้าจับกับ RISC complex สำหรับค้นหาและเข้าทำลายเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย อย่างไรก็ตามการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน *Os3bglu8* *Os7bglu26* และ *Os1bglu1* มีระดับการแสดงออกต่ำในสภาวะปกติ ดังนั้นเอสไออาร์เอ็นเอที่สร้างได้จึงเพียงพอในการยับยั้งยีน และนั่นทำให้ตรวจไม่พบเอ็มอาร์เอ็นเอในตัวอย่างแคลลัสจากทั้ง 3 ชุดทดสอบนั่นเอง

ความหลากหลายของระดับเอสไออาร์เอ็นเอนั้น น่าจะขึ้นอยู่กับหลายๆ เหตุผล ข้อแรก คือ ตำแหน่งของที-ดีเอ็นเอที่เข้าไปแบบสุ่มในจีโนมซึ่งจะส่งผลต่อการแสดงออกของยีน ข้อที่ 2 คือ จำนวนซ้ำ (copy number) ของทรานสยีน (transgene) อาจจะเป็นปัจจัยที่มีส่วนในระดับของการแสดงออกของยีน อย่างไรก็ตามกิจกรรมของทรานสยีนอาจจะไม่เกี่ยวข้องโดยตรงต่อจำนวนซ้ำเนื่องจากกิจกรรมของ

ทรานสยีนเป็นการกดการแสดงออกร่วม (co-suppression) ข้อที่ 3 อาจเกิดกระบวนการเติมเมธิล (methylation) ของทรานสยีนโดยเฉพาะที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ หรือตำแหน่งใกล้เคียงถ้าทรานสยีนนั้นถูกพิจารณาว่าเป็นสิ่งแปลกปลอม ซึ่งเป็นเรื่องปกติของเซลล์เจ้าบ้านที่จะมีกลไกในการป้องกันตัวเองโดยการเติมเมธิลและทำให้ทรานสยีนนั้นไม่ถูกกระตุ้นได้ และเนื่องจากอาร์เอ็นเอไอกระตุ้นลำดับสารพันธุกรรมที่จำเพาะในการทำลายเอ็มอาร์เอ็นเอ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่ลำดับสารพันธุกรรมของเอสไอ-อาร์เอ็นเอของ *Os*3*bglu*7 มีปัญหาในการเข้าจับกับ RISC complex ซึ่งทำให้เกิด naked siRNA duplex ในเซลล์และถูกทำลายในที่สุด

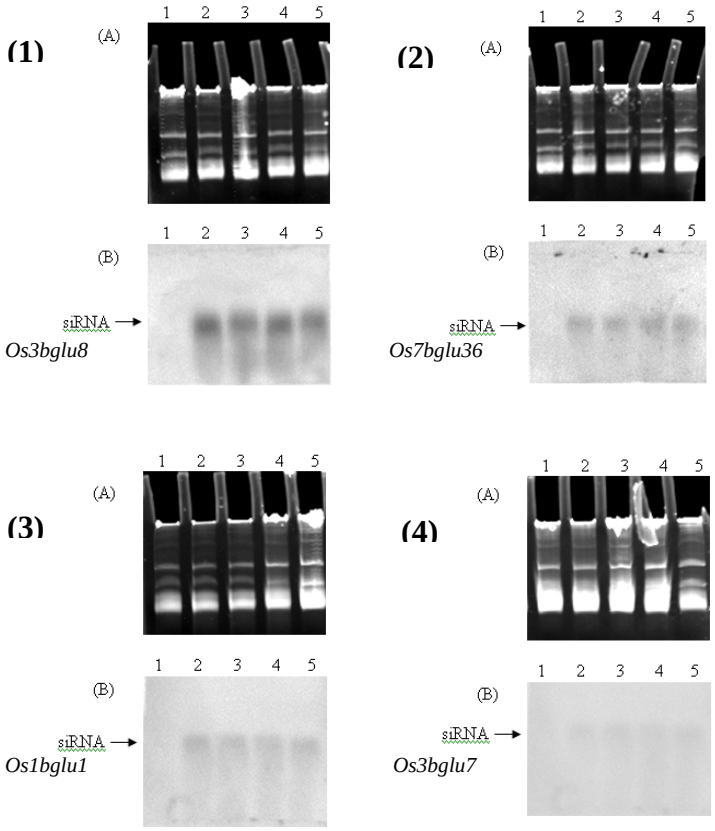
ผลกระทบของการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ และการสะสมเอสไออาร์เอ็นเอในแคลลัสของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os*3*bglu*7 อาจจะเกี่ยวข้องกับโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของยีน *Os*3*bglu*7 เองที่มีผลต่อการจับของโปรตีนไดเซอร์ (dicer binding protein) และโปรตีนที่จับกับเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA-binding protein) อาจจะเป็นตัวกำหนดการเข้ากันได้ของอาร์เอ็นเอสายคู่กับเอสไออาร์เอ็นเอก็ได้

2.6 การตรวจสอบต้นข้าวที่ได้รับการโอนพลาสมิดด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การตรวจสอบต้นข้าวที่ถูกถ่ายโอนยีนเป้าหมายของชุดทดสอบ *Os*12*bglu*38 และต้นข้าวจากชุดทดสอบควบคุมที่ถูกถ่ายโอนเพียงเวคเตอร์ pHELLSGATE8 อย่างเดียวเท่านั้นด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับยีน *nptII* ซึ่งแสดงผลการทดลองดังรูปที่ 28 และ 29 ตามลำดับ พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีขนาด 730 คู่เบส ในทุกตัวอย่างต้นข้าวทั้งที่มาจากชุดทดสอบควบคุม และชุดสดสอบ *Os*12*bglu*38

ในการทดลองนี้ยังได้นำแคลลัสที่ไม่มียีนที่ถูกถ่ายโอน (non transformed calli) มาทำการทดลองเปรียบเทียบด้วย และน่าประหลาดใจที่พบแถบดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรสเช่นกัน แต่มีขนาดที่ใหญ่กว่า

อย่างไรก็ตามก็ไม่พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย (730 คู่เบส) แสดงดังรูปที่ 29 ดังนั้นจึงทำให้แน่ใจได้ว่าต้นข้าวที่ได้ทั้งหมดนั้นเป็นต้นข้าวที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิดอย่างแน่นอน



รูปที่ 27 Northern blot analysis ของเอสไอาร์เอ็นเอโดยใช้ตัวติดตามเป็น 3'UTR ของยีน *Os*3*bglu*8 (1) *Os*7*bglu*26 (2) *Os*1*bglu*1 (3) และ *Os*12*bglu*38 (4) โดยตัวอย่างอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) ถูกโหลดในเจลโพลีอะคริลาไมด์ 15 เปอร์เซนต์ (A) และการตรวจสอบเอสไอาร์เอ็นเอบนเมมเบรน (B) เลนที่ 1 คือ ตัวอย่างแคลลัสจากชุดทดสอบควบคุม เลนที่ 2-5 คือ ตัวอย่างแคลลัสจากชุดทดสอบที่ยับยั้งยีนแต่ละยีน

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพการงอกของแคลลัสที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะพาราโมไมซิน

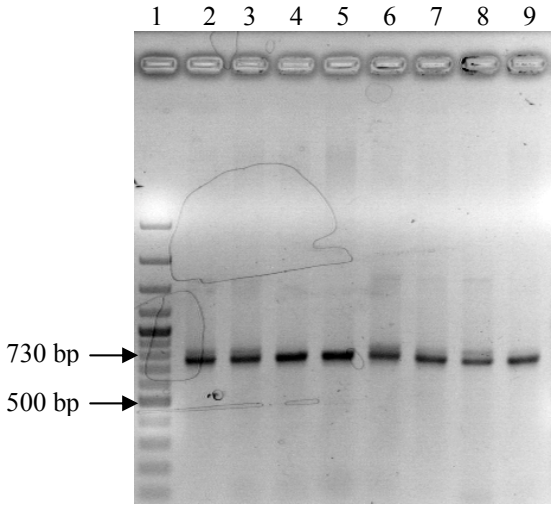
Construct	**Replication**	**No. of callus**	**No. of resistant callus**	**Transformation efficiency (%)***
Control	1	150	8	5.33
	2	150	7	4.67
	3	150	12	8.00
	4	150	9	6.00
	5	150	4	2.67
	6	150	11	7.33
	7	150	7	4.67
Average		**150**	**8.29**	**6 ± 2[a]**
*Os*3*bglu*7	1	150	0	0
	2	150	0	0
	3	165	0	0
	4	180	0	0
	5	180	0	0
	6	195	0	0
	7	225	0	0
	8	225	0	0
	9	225	0	0
	10	225	0	0
Average		**192**	**0**	**0**
*Os*3*bglu*8	1	165	0	0
	2	165	0	0
	3	165	0	0
	4	180	0	0
	5	180	0	0
	6	180	0	0
	7	195	0	0
	8	195	0	0
	9	195	0	0
Average		**180**	**0**	**0**

ตารางที่ 7 (ต่อ)

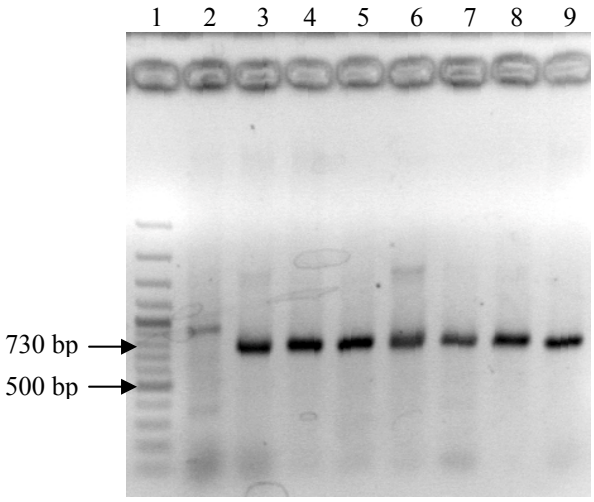
Construct	Replication	No. of callus	No. of resistant callus	Transformation efficiency (%)*
*Os*12*bglu*38	1	150	5	3.33
	2	150	3	2.00
	3	165	6	3.64
	4	195	8	4.10
	5	195	2	1.03
	6	225	10	4.44
Average		**180**	**5.67**	**3 ± 1**[b]
*Os*7*bglu*26	1	165	0	0
	2	180	0	0
	3	180	0	0
	4	180	0	0
	5	180	0	0
	6	195	0	0
	7	225	0	0
	8	225	0	0
	9	225	0	0
	10	225	0	0
Average		**198**	**0**	**0**
*Os*1*bglu*1	1	150	0	0
	2	150	0	0
	3	150	0	0
	4	150	0	0
	5	180	0	0
	6	180	0	0
	7	195	0	0
	8	225	0	0
	9	225	0	0
Average		**178**	**0**	**0**

***** Regeneration efficiency = $\frac{\text{No. of resistant callus}}{\text{No. of plantlet}}$ X 100

Within a column, values with the different superscripts (a, b) are significantly different ($P \leq 0.05$)



รูปที่ 28 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *nptII* จากตัวอย่างต้นข้าวของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os*12*bglu*38 บนเจลอะกาโรส เลนที่ 1 คือ 100bp marker เลนที่ 2-9 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของตัวอย่างต้นข้าวแต่ละตัวอย่างที่แตกต่างกันของชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os*12*bglu*38



รูปที่ 29 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *nptII* จากตัวอย่างต้นข้าวของชุดทดสอบควบคุมบนเจลอะกาโรส เลนที่ 1 คือ 100bp marker เลนที่ 2 คือ แคลลัสที่ไม่มีพลาสมิดที่ถูกถ่ายโอน (nontransgenic calli) เลนที่ 3-9 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของตัวอย่างต้นข้าวแต่ละตัวอย่างที่แตกต่างกันของชุดทดสอบควบคุม

บทที่ 4

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

เบต้ากลูโคซิเดสเป็นโปรตีนกลุ่มหนึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของข้าว และมีการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของข้าว ซึ่งจากงานวิจัยของ Opassiri และคณะ ในปี 2006 พบว่ามีทั้งสิ้น 40 ยีน และมีเพียง 34 ยีนเท่านั้นที่มีหน้าที่อย่างแท้จริง โดยเมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างที่ทำการศึกษากับข้อมูลที่มีอยู่แล้วพบว่า ใน 45 K array ข้าว พบ 26 กลุ่มโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 และพบว่ามี 11 กลุ่มที่ตรงกับข้อมูลของ Opassiri และคณะ ซึ่งจากผลการศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลสกลุ่มที่ 1 โดยอะเรย์ข้าวขนาด 45K กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกลดลงตั้งแต่ 2 เท่าขึ้นไปมีเพียง 5 กลุ่มโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (*Os*5*bglu*19, *Os*9*bglu*31, *Os*9*bglu*30, *Os*11*bglu*36 และ *Os*1*bglu*5) และมีเพียง 3 กลุ่มโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (*Os*4*bglu*18, *Os*3*bglu*6 และ *Os*7*bglu*26) ที่มีการแสดงออกแบบเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 2 เท่าขึ้นไป เมื่อปลูกข้าวในสภาวะเครียด

การมีอยู่ของยีนเบต้ากลูโคซิเดสหลายยีนในข้าวนั้น ก็อาจจะเนื่องจากมีการทำหน้าที่อื่นๆ ในข้าวด้วย ซึ่งยังไม่ทราบถึงหน้าที่เหล่านั้น ซึ่งพบว่ายีน *Os*3*bglu*7 มีการแสดงออกที่สูงที่สุดในข้าวเมื่อเปรียบเทียบกับยีนอื่นๆ ซึ่งผลจากแผนผังรูปต้นไม้ (phylogenetic tree) แสดงให้เห็นว่ายีน *Os*3*bglu*7 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันกับยีนอื่นอีก 4 ยีนในกลุ่มยีนเบต้ากลูโคซิเดส ซึ่งก็คือยีน *Os*1*bglu*1 *Os*3*bglu*8 *Os*7*bglu*26 และ *Os*12*bglu*38 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษายีนเบต้ากลูโคซิเดส 5 ยีน คือ *Os*1*bglu*1 *Os*3*bglu*7 *Os*3*bglu*8 *Os*7*bglu*26 และ *Os*12*bglu*38 เกี่ยวกับหน้าที่ของยีนโดยการใช้เทคนิคอาร์เอ็นเอไอ การสร้างชุดทดสอบ 5 ชุดทดสอบ โดยใช้ส่วนที่เป็น 3'UTR ของแต่ละยีนในการยับยั้งการ

แสดงออกของยีนแต่ละยีน และใช้ส่วนที่พบในทุกยีนเบต้ากลูโคซิเดส (conserved region) จากยีน *Os3bglu7* เป็นแบบในการใช้เพื่อยับยั้งยีนทั้ง 5 โดยใช้เวคเตอร์ pHELLSGATE8 ที่ถูกสร้างขึ้นด้วย Gateaway cloning technology ด้วยเอ็นไซม์แอลอาร์โคลเนส และถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ต้นข้าวด้วยแบคทีเรีย *Agrobacteruim* สายพันธุ์ EHA105

สายพันธุ์ข้าวที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ ข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 และข้าวโคชิฮิคาริ ที่ชักนำให้สร้างแคลลัสในอาหารเพาะเลี้ยง N6D โดยพบว่าในการเพาะเลี้ยงนั้น แสงไม่ได้เป็นปัจจัยที่สำคัญในการชักนำให้เกิดแคลลัส แต่กลับเป็นอาหารเพาะเลี้ยงมากกว่าที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสทุติยภูมิ ปริมาณแคลลัสทุติยภูมิสูงสุดของข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถเพาะเลี้ยงได้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสบนอาหารเพาะเลี้ยง N6D แต่เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของแคลลัสจากข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าแคลลัสของข้าวโคชิฮิคาริจะมีผิวหน้าที่เรียบกว่า ขนาดแคลลัสใหญ่กว่า และเจริญเติบโตได้เร็วกว่าแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ KDML105 ซึ่งลักษณะแคลลัสดังกล่าวของข้าวโคชิฮิคาริจะช่วยลดการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย *Agrobacteruim* อีกด้วย

สำหรับการยับยั้งการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสแต่ละยีนไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบควบคุม โดยชุดทดสอบควบคุมมีประสิทธิภาพในการถ่ายโอนพลาสมิดสูงที่สุด (19 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบอื่นๆ โดยการตรวจสอบแทรกของที-ดีเอ็นเอเข้าไปในจีโนมข้าวสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์ *nptII* ซึ่งจากการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่าแคลลัสที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะพาโรโมไมซินที่ได้ เป็นแคลลัสที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดจริง สำหรับเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์ ใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการยับยั้งการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน โดยจากผลการทดลองพบว่าสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *Os1bglu1* *Os3bglu8* และ *Os7bglu26* ได้อย่างสมบูรณ์ แต่สำหรับยีน *Os3bglu7* แสดงระดับเอ็มอาร์เอ็นเอที่แตกต่างกันที่ถูกยับยั้งการแสดงออก อย่างไรก็ตามก็ถือว่าไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *Os3bglu7* ได้อย่างสมบูรณ์ ทั้งนี้การทดสอบ

การแสดงออกของยีน *Os*12*bglu*38 ไม่ได้ถูกทดสอบเนื่องจากว่ายีนนี้ไม่มีการแสดงออกในแคลลัสนั่นเอง นอกจากนี้การตรวจสอบเอสไออาร์เอ็นเอเป็นการตรวจสอบถึงกลไกของอาร์เอ็นเอไอที่เกิดขึ้นในเซลล์ โดยจากงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าเอสไออาร์เอ็นเอถูกตรวจพบในแคลลัสที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด ซึ่งพบว่าปริมาณเอสไออาร์เอ็นเอสูงสุดที่ตรวจพบคือ ตัวอย่างจากชุดทดสอบที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *Os*3*bglu*8 ตามมาด้วยตัวอย่างจากชุดทดสอบที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *Os*1*bglu*1 และ *Os*7*bglu*26 ตามลำดับ และปริมาณของเอสไออาร์เอ็นเอที่ตรวจพบต่ำที่สุดคือ ตัวอย่างจากชุดทดสอบที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *Os*3*bglu*7 จึงเป็นเหตุผลที่ทำให้ยีน *Os*3*bglu*7 ไม่ถูกยับยั้งการแสดงออกได้อย่างสมบูรณ์ และประกอบกับยีนนี้มีการแสดงออกของยีนที่สูงมากในข้าวนั่นเอง สำหรับการพัฒนาไปเป็นต้นข้าวของแคลลัส มีเพียงแคลลัสจากตัวอย่างชุดทดสอบควบคุม และชุดทดสอบที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *Os*12*bglu*38 เท่านั้นที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นข้าวได้ และพบว่าประสิทธิภาพในการงอกเป็นต้นข้าว คือ 5 เปอร์เซ็นต์ และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งตรวจสอบพบยีน *nptII* จากตัวอย่างต้นข้าวทุกตัวอย่างของชุดทดสอบทั้ง 2 ชุด โดยยีนนี้จะเป็นตัวบ่งชี้ว่าต้นข้าวที่ตรวจสอบนั้นได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าไปในจีโนมข้าวจริง จึงทำให้มั่นใจได้ว่าต้นข้าวที่นำมาทดสอบนี้เป็นต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดแล้วนั่นเอง แต่อย่างไรก็ตามต้นข้าวจากชุดทดสอบที่ยับยั้งยีน *Os*12*bglu*38 ไม่ได้แสดงถึงความแตกต่างของลักษณะต้นข้าวที่ปรากฏเมื่อเปรียบเทียบกับต้นข้าวจากชุดทดสอบควบคุมเลย กล่าวคือลักษณะของต้นข้าวจากทั้ง 2 ชุดทดสอบมีความเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันเลย แต่แคลลัสที่ถูกถ่ายยีนยับยั้งการแสดงออกของยีนอื่นอีก 4 ยีนไม่สามารถงอกเป็นต้นได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากยีนทั้ง 4 มีความสำคัญต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อน/ข้าว

กลไกต่างๆของยีนเบต้ากลูโคซิเดสในข้าวยังคงไม่ทราบแน่ชัด แต่สำหรับงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าหลังจากที่ยีนเบต้ากลูโคซิเดสถูกยับยั้งการแสดงออกจะส่งผลกระทบต่อแคลลัสข้าว และการปนเปื้อน

ของแบคทีเรีย *Agrobacterium* และการที่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นข้าวได้นั้น แสดงให้เห็นว่ายีนเบตากลูโคสิเดส ทั้ง 4 ยีน มีความสำคัญต่อการเจริญจากแคลลัสเป็นต้น