

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการตอบสนองของข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ต่อโรคไหม้



เลขหมู่.....67290
เลขทะเบียน..... 22 พ.ย. 2548
วัน,เดือน,ปี.....

b. 11 bh 2918
i.....

โครงการพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A studies of Indica Rice Varieties in Response to Blast Diseases



A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง ศึกษาการตอบสนองของข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ต่อโรคไหม้
นักศึกษา นายธนธร วิทิตศานต์
 นายภูษงค์ ยศบุตร
 นางสาวอ้อยใจ ลิ้มปัญญาเลิศ
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพหลิน

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร
 ลาดกระบัง อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ.มาลินี ดันติยาภรณ์	
กรรมการ	อาจารย์ณิ่งกานต์ กลั่นบุศย์	
กรรมการ	ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพหลิน	

.....
 (รศ.ดร.นवलพรรณ ณ ระนอง)
 หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	ศึกษาการตอบสนองของข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ต่อโรคไหม้	
นักศึกษา	นายธนธร	วิทิตศานต์
	นายภูษงค์	ยศบุตร
	นางสาวอ้อยใจ	ลิมปัญญาเลิศ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.กนกพร	สมพร ไพลิน

บทคัดย่อ

ศึกษาการตอบสนองต่อเชื้อราโรคไหม้ในข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 60 (ไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้) และข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 (ต้านทานต่อโรคไหม้) โดยเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ในต้นข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ติดเชื้อราโรคไหม้กับต้นข้าวปกติ พบว่าสารกลุ่มแซลโคน (ไอโซควิริทิจินิน) กลุ่มฟลาวาโนน (นารินจิน) กลุ่มไอโซฟลาโวน (จีนิสทีน) กลุ่มฟลาโวน (ลูทีโอลินและไพเรซิน) และกลุ่มฟลาโวนอล (เคอซีติน เคเอ็มเฟอรอล และไอโซแรมนิติน) จากสารสกัดในข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 60 ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ ให้ค่าการดูดกลืนแสงไม่แตกต่างกับข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้ ในขณะที่สารสกัดจากข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ มีค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มดังกล่าวมากกว่าข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้ จึงคาดว่าสารกลุ่มดังกล่าวน่าจะส่งผลกระทบต่อระดับการติดเชื้อที่แตกต่างกันในข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ จึงทำการศึกษากการแสดงออกของยีน *chs* ที่ให้เอนไซม์สำคัญกับวิถีชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ ในพืชทดลองเพื่อการตอบสนองต่อเชื้อราโรคไหม้ โดยนำชิ้นส่วน cDNA ของยีน *chs* จากพืช *Perilla frutescens* มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์สำหรับเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ตามด้วยการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pBI121 ถ่ายโอนเข้าสู่ *Agrobacterium* สายพันธุ์ LBA4404 เพื่อใช้สำหรับการถ่ายโอนยีน *chs* เข้าสู่ต้นยาสูบ โดยนำเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายโอนยีนเลี้ยงบนอาหารที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะคานามัยซิน และคาร์เบนนิซิลิน คัดเลือกต้นที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน *chs* ไปทดสอบผลการเจริญเติบโตของเชื้อราโรคไหม้ เปรียบเทียบกับต้นยาสูบต้นปกติและต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *dfp* พบว่าในอาหารที่ผสมใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *chs* มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณเมลานินที่เพิ่มขึ้นกว่าวิธีการทดลองอื่นซึ่งคาดว่ายีนดังกล่าวน่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของเชื้อราโรคไหม้ ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *chs* ในข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ตอบสนองต่อเชื้อราโรคไหม้ โดยการสกัดอาร์เอ็นเอจากต้นข้าวที่ตอบสนองต่อเชื้อราโรคไหม้ นำไปสังเคราะห์ cDNA เพื่อใช้เป็นแม่แบบในการทำอาร์ทีพีซีอาร์ ซึ่งผลที่ได้ยังไม่สามารถสรุปการแสดงออกของยีน *chs* ในข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	A studies of Indica Rice Varieties in Response to Blast Diseases	
Name	Mr. Tanathorn	Vitisand
	Mr. Puchong	Yotbort
	Miss Oijai	Limpanyalert
Department	Applied Biology	
Program	Biotechnology	
Special Project Advisor	Asist. Prof. Dr. Kanokporn	Sompornpailin

Abstract

The response of flavonoid levels to blast disease in Thai rice was studied using Patum 60 and Suphan Buri 60 which were blast sensitive and blast-resistant varieties, respectively. After exposing to *Pyricularia grisea*, chalcone (isoliquiritigenin) flavanone (naringenin) isoflavone (genistein) flavone (luteolin, tricetin) flavonol (quercetin, kaempferol, isorhamnetin) levels were increased in Suphan Buri 60 variety more than Patum 60 variety. These compounds might be involved in different ability to resist blast disease in both of rice varieties. The one of key enzyme in flavonoid biosynthesis encoded from *chs* gene was used in a study of the Plant expression against blast diseases. The *chs* cDNA from *Perilla frutescens* was ligated into DNA amplifying vector and subsequently ligated into *Agrobacterium* expression vector (pBI121) before transformation to *Agrobacterium* LBA4404. This *Agrobacterium* strain was used in gene transformation into tobacco. Transformants were selected using medium with kanamycin and carbenicillin. Control tobacco plants and those expected to be *chs* transformant or *dfp* transformant were blended with PDA medium and used to culture *Pyricularia grisea*. It was found that *Pyricularia grisea* in medium with *chs* transgenic tobacco produced more melanin than that in medium supplied with other plants. Thus we expected that this gene involved in blast stress response of plant. The expression of *chs* gene in both rice varieties was performed using RT-PCR technique. Total RNA was extracted from rice plants that exposed and unexposed to blast

diseases and then subjected to synthesize cDNA which was used as templates for RT-PCR. However, the expression patterns couldn't be concluded yet.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์ ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพลิน อาจารย์คณิงกานต์ กลั่นบุตร และอาจารย์ทุกท่านที่ให้คำปรึกษา วิธีการดำเนินงาน ตลอดจนคำแนะนำที่ดี รวมถึงเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน นอกจากนี้ยังขอขอบคุณ ดร.พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ นักวิชาการประจำศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี และคณะนักวิชาการประจำศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานีที่ได้มอบความรู้ รวมทั้งเทคนิคต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ สำหรับตัวอย่างชิ้นในการทำโครงการครั้งนี้ ได้รับการเอื้อเฟื้อจาก prof. Dr. Kazuki Saito มหาวิทยาลัยชิบะ ประเทศญี่ปุ่น และคุณลุงป๊อกที่ได้มอบตัวอย่างข้าวในการทดลอง สุดท้ายนี้ขอขอบคุณบิดา มารดา รวมทั้งสถาบันอันทรงเกียรติแห่งนี้ที่ได้มอบการอบรมสั่งสอนจนทำให้การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

นายธนธร วิทิตสานต์
 นายภูษงค์ ยศบุตร
 นางสาวอ้อยใจ ลิ้มปัญญาเลิศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญรูป	ช
สารบัญตาราง	ณ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีดำเนินงาน	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	
2.1 ข้าว	4
2.2 โรคไหม้	8
2.3 กลไกการป้องกันของพืช	11
2.4 เฟลไวโนอยด์	15
2.5 เมลานิน	25
2.6 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง	26
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 การตรวจสอบปริมาณสารในกลุ่มฟิวโนอยด์	29
3.2 การโคลนยีนและการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ	30
3.3 ศึกษาการยับยั้งเชื้อราโรคไหม้ของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน และไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน	33
3.4 การศึกษาการแสดงออกของยีน <i>chs</i>	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	
4.1 ผลการตรวจสอบปริมาณสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์	35
4.2 ผลการโคลนยีนและการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ	45
4.3 ผลการยับยั้งเชื้อราโรคไหม้ของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน และไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน	53
4.5 ผลการแสดงออกของยีน <i>chs</i>	55
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	56
เอกสารอ้างอิง	58
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	61
ภาคผนวก ข วิธีการและเทคนิค	63
ภาคผนวก ค ตารางวิเคราะห์ค่าทางสถิติ	69
ภาคผนวก ง ลำดับนิวคลีโอไทด์	74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคไหม้	8
2	แสดงรูปร่าง Appressoria ของเชื้อราโรคไหม้	9
3	แสดงวงจรการเกิดโรคไหม้ ที่เกิดจากเชื้อรา <i>Pyricularia grisea</i> Sacc.	10
4	แสดงลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อโรคไหม้ในแต่ละระยะ	11
5	โครงสร้างหลักของสารเพลโวโนอยด์	15
6	โครงสร้างของสารชนิดต่างๆ ในกลุ่มเพลโวโนอยด์	20
7	วิถีชีวสังเคราะห์ของสารในกลุ่มเพลโวโนอยด์	22
8	ชีวสังเคราะห์ของสารเมลานิน	25
9	ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาลูกลูโซโพลีเมอร์เรส	26
10	เชื้อ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> และเนื้อเยื่อปุ่มปมที่เกิดจากการบุงกรุก	27
11	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มแซลโคน	35
12	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มออโรน	36
13	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มเฟลวาโนน	36
14	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มไอโซเฟลโวน	37
15	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มเพลโวน	38
16	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มเพลโวโนล	40
17	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มเบนโซควิโนน	41
18	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มเนฟทาควิโนน	42
19	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน	43
20	ผลการเปรียบเทียบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน <i>chs</i> ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ กับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน	45
21	โคลนนิ่งของ <i>E. coli</i> ที่ได้รับการถ่ายโอนชิ้นส่วนของยีน <i>chs</i> เข้าสู่เวกเตอร์ pGEM บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิซิลิน IPTG และ X-gal	46
22	ผลการเปรียบเทียบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน <i>chs</i> ที่เชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM กับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่	หน้า
23 ผลการเปรียบเทียบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน <i>chs</i> ที่เชื่อมอยู่กับเวกเตอร์ pGEM เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bam</i> HI กับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน	48
24 ผลการเปรียบเทียบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน <i>chs</i> ที่เชื่อมอยู่กับ <i>Agrobacterium</i> expression vector กับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน	49
25 ผลการเปรียบเทียบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน <i>chs</i> ที่เชื่อมกับเวกเตอร์ pHTT202 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ <i>Hind</i> III กับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน	50
26 ผลการเปรียบเทียบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน <i>chs</i> ที่เชื่อมกับเวกเตอร์ pBI121 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ <i>Hind</i> III กับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน	51
27 ดินยาสูบที่ได้จากการศึกษาการถ่ายโอนยีน โดยใช้อะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pHTT202 และ pBI121	52
28 ลักษณะของเส้นใยและเมลานินของเชื้อราโรคราไหม้ในอาหารผสมใบยาสูบที่ได้รับ และไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน <i>chs</i>	53
29 ลักษณะของเส้นใยและเมลานินของเชื้อราโรคราไหม้ในอาหารผสมใบยาสูบที่ได้รับ และไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน <i>dfi</i>	54
30 ผลการทำอาร์ทีพีซีอาร์ของตัวอย่างข้าวแต่ละสายพันธุ์	55

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงลักษณะความแตกต่างของข้าว subspecies indica, japonica, javanica	5
2	สรุปสูตรเคมีของสารแต่ละตัวในกลุ่มเฟลโวนอยด์	16
3	แสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใยของเชื้อราโรคไหม้ ที่ได้รับการถ่ายโอน และ ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน <i>chs</i>	53
4	แสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใยของเชื้อราโรคไหม้ ที่ได้รับการถ่ายโอน และ ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน <i>dfr</i>	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ข้าวเป็นอาหารหลักของคนทั่วโลกกว่า 3,000 ล้านคน รวมทั้งคนไทย 63 ล้านคน ปัจจุบันองค์การอาหารและเกษตร (FAO) ประมาณการว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่เกษตรกรรมที่มีอยู่บนโลก เป็นพื้นที่สำหรับปลูกข้าว สำหรับประเทศไทยข้าวเป็นธัญพืชที่มีบทบาทสำคัญ ทั้งทางด้านกรบริโภคและทางการค้าและการส่งออก การสำรวจพื้นที่ปลูกข้าวในปี พ.ศ. 2545 ถึง พ.ศ. 2546 พบว่าประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวประมาณ 78,250,960 ไร่ สามารถผลิตข้าวได้ 26.63 ล้านตัน มีการส่งออกข้าวประมาณ 7,345,971 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 76,699.16 ล้านบาท และมีอัตราการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง

โรคไหม้ข้าวเกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* Sacc. มีชื่ออยู่ในระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศว่า *Magnaporthe grisea* ราชชนิดนี้อยู่ใน Class Ascomycete มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ สามารถเข้าทำลายข้าวได้ทุกระยะ ข้าวที่ถูกทำลายโดยเชื้อนี้ จะมีลักษณะบาดแผลคล้ายรูปดวงดา สีน้ำตาล มีสีเทาตรงกลางบาดแผล ถ้าอาการดังกล่าวเกิดบริเวณใบจะทำให้ใบเป็นจุด อาจเกิดอาการหักเสียวหาย และถ้าเกิดบริเวณข้อรวงข้าว จะทำให้รวงข้าวหักเป็นผลให้ข้าวไม่ได้รับสารอาหารเมล็ดฝ่อ ผลผลิตข้าวลดลง โดยข้าวจะติดเชื้อ *M. grisea* ได้ง่ายขึ้น โดยเฉพาะที่อุณหภูมิต่ำ (Koga และคณะ, 1996) และในสภาวะที่มีธาตุไนโตรเจนสูงเกิน (Talbot และคณะ, 1995) จากผลของการติดเชืดังกล่าวได้สร้างความเสียหายอย่างมากต่อเกษตรกร โดยเฉพาะในเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งรวมถึงประเทศไทยด้วย

พืชมีกลไกการป้องกันตัวจากเชื้อโรค พบว่าสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่พบในพืชชั้นสูงทั่วไป มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Izabela Konczak และ Wci Zhang, 2004) โดยพืชที่ติดเชื้อจุลินทรีย์จะมีการกระตุ้นให้ผลิตสารฟลาโวนอยด์ออกมาในปริมาณที่มากกว่าปกติ โดยเฉพาะบริเวณแผลที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ (Gandikota และคณะ, 2001) และมีรายงานว่าข้าวฟ่างสายพันธุ์ที่มี flavan 4-ol สูงจะสามารถต้านทานเชื้อราได้มากขึ้น (Jambunathan และคณะ, 1999) นอกจากนี้สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ยังมีหน้าที่ทางชีวภาพอีกหลากหลาย เช่น เป็นสารให้สีแก่พืช ช่วยล่อแมลงในการผสมเกสร ป้องกันพืชจากแมลง รวมถึงสภาวะเครียด โดยจะมีผลให้พืชมีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อมอันเกิดจากสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิต (Chalker-Scott และคณะ, 1999) สำหรับวิธีการสังเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ของพืช ต้องอาศัยเอนไซม์หลายชนิด หนึ่งในเอนไซม์ที่มีความสำคัญก็คือ เอนไซม์ chalcone synthase (CHS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ช่วงต้นของวิธีการสังเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ (De-Yu Xi และคณะ, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากสายพันธุ์ข้าวที่แตกต่างกันจะมีผลต่อการผลิตสารเมแทบอลิต์ที่แตกต่างกัน ซึ่งมีผลต่อความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อโรคใหม่ได้แตกต่างกัน ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาสารเมแทบอลิต์กลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคใหม่ ระหว่างข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 60 ซึ่งมีลักษณะประจำพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อโรคใหม่ และข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ซึ่งมีลักษณะประจำพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใหม่ รวมถึงศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับโมเลกุล ทั้งนี้ยังได้ศึกษาการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือยีน *chs* ที่ถอดและแปลรหัสให้เอนไซม์ chalcone synthase เพื่อเป็นองค์ความรู้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อศึกษากลไกการตอบสนองของข้าวต่อโรคใหม่ในสายพันธุ์ที่ต้านทาน และสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทาน
- 1.2.2 เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนที่ให้สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ตอบสนองต่อการเกิดโรคใหม่ในข้าวแต่ละสายพันธุ์
- 1.2.3 ศึกษาการแสดงออกของยีนที่ให้เอนไซม์ CHS ในพืชทดสอบที่ส่งผลกระทบต่อเจริญของเชื้อโรคใหม่

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ระหว่างข้าวสายพันธุ์ที่ต้านทานและไม่ต้านทานต่อโรคใหม่
- 1.3.2 ศึกษาแบบการแสดงผลของยีนที่ให้สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ของต้นข้าวที่ตอบสนองต่อการเกิดโรคใหม่
- 1.3.3 ศึกษาการแสดงออกของยีน *chs* ในพืชทดสอบที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อโรคใหม่

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

- 1.4.1 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่ตอบสนองต่อเชื้อราโรคใหม่ในข้าวสายพันธุ์ที่ต้านทาน และไม่ต้านทานต่อโรคใหม่
 - 1.4.1.1 ทำการสกัดสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์จากข้าวสายพันธุ์ที่ต้านทาน และไม่ต้านทานต่อโรคใหม่ที่ได้รับการเข้าทำลาย และไม่เข้าทำลายของเชื้อโรคใหม่
 - 1.4.1.2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.2 ศึกษาการแสดงออกของยีนในชีวสังเคราะห์เพลโวนอยด์ที่ตอบสนองต่อโรคไหม้

1.4.2.1 การถ่ายโอนยีน *chs* เข้าสู่โครแบคทีเรีย

การโคลนโดยพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อยีน *chs* นำชิ้นดีเอ็นเอที่คาดว่าจะมียีนที่ต้องการ เชื่อม (ligation) เข้ากับเวกเตอร์และถ่ายโอน (transformation) เข้าสู่ *Eschichia coli*. เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดและชิ้นดีเอ็นเอ คัดเลือกโคลนของ *E.coli* ที่คาดว่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่

เชื่อมต่อยีนดีเอ็นเอกับ *Agrobacterium* expression vector และถ่ายโอน *Agrobacterium* expression vector เข้าสู่ *E.coli* เพื่อคัดเลือกและเพิ่มปริมาณพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ แล้วจึงคัดเลือกพลาสมิดที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่อย่างถูกต้อง (sense) ถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่โครแบคทีเรีย และใช้โครแบคทีเรียนี้ถ่ายโอนยีน *chs* เข้าสู่ต้นยาสูบ

1.4.2.2 ผลการยับยั้งเชื้อราต่อโรคไหม้ของยาสูบที่ได้และไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน

นำใบยาสูบที่ได้รับ และไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน *chs* มาบดรวมกับอาหารเลี้ยงเชื้อราโรคไหม้ วางปลายเส้นใยของเชื้อราโรคไหม้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ติดตามผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย (hypha) และเมลานินของเชื้อราต่อโรคไหม้

1.4.2.3 ศึกษาการแสดงออกของยีน *chs* ที่ตอบสนองต่อโรคไหม้ของข้าว

โดยการสกัดอาร์เอ็นเอจากข้าว สายพันธุ์ที่ต้านทาน และไม่ต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ นำมาสร้างสายซิติเอ็นเอ (cDNA) เพื่อใช้เป็นแม่แบบในการทำอาร์ทีพีซีอาร์ (RT-PCR) เปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอ

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบการตอบสนองที่แตกต่างกันของต้นข้าวแต่ละสายพันธุ์ต่อโรคไหม้

1.5.2 เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้ ในระดับโมเลกุล

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ข้าว (http://www.thairice.org/html/aboutrice/about_rice1.htm)

การจำแนกทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic classification)

Class : Angiospermac

Subclass : Monocotyledoneae

Order : Graminales

Family : Gramineae

Sub-family : Pooideae

Tribe : *Oryzeae*

Genus : *Oryza*

Species : *sativa*

Scientific name : *Oryza sativa* L.

Common name : Rice

พันธุ์ข้าวที่มนุษย์เพาะปลูกในปัจจุบันได้พัฒนามาจากข้าวป่าในตระกูล *Oryza gramineae* สันนิษฐานว่า พืชสกุล *Oryza* มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนชื้นของทวีป Gondwanaland ก่อนผืนดินจะเคลื่อนตัวและเคลื่อนออกจากกันเป็นทวีปต่าง ๆ เมื่อ 230 ถึง 600 ล้านปีมาแล้วจากนั้นกระจายจากเขตร้อนชื้นของแอฟริกา เอเชียใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงเหนือ ออสเตรเลีย อเมริกากลางและใต้ ข้าวสามารถเจริญเติบโตได้ตั้งแต่ความสูงระดับน้ำทะเลถึง 2,500 เมตรหรือมากกว่า ทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ทั้งในที่ราบลุ่มจนถึงที่สูง ครอบคลุมพื้นที่ตั้งแต่เส้นรุ้งที่ 53 องศาเหนือ ถึง 35 องศาใต้ มนุษย์ได้คัดเลือกข้าวป่าชนิดต่างๆ ตามความต้องการของตน เพื่อให้สอดคล้องกับระบบนิเวศน์ มีการผสมพันธุ์ข้ามระหว่างข้าวที่ปลูกกับวัชพืชที่เกี่ยวข้อง ได้ข้าวพื้นเมืองมากมายหลายสายพันธุ์ ซึ่งสามารถให้ผลผลิตสูง ปลูกได้ตลอดปี ก่อให้เกิดพันธุ์ข้าวปลูกที่เรียกว่า ข้าวลูกผสมซึ่งมีปริมาณ 120,000 พันธุ์ทั่วโลก ข้าวที่ปลูกในปัจจุบันแบ่งออกเป็นข้าวแอฟริกา และข้าวเอเชีย ดังนี้

ข้าวแอฟริกา (*Oryza glaberrima*) พบแพร่กระจายอยู่เฉพาะบริเวณเขตร้อนของแอฟริกา เท่านั้น สันนิษฐานว่าข้าวแอฟริกาอาจเกิดขึ้นครั้งแรกเมื่อประมาณ 1,500 ปีก่อนคริสตกาล

ข้าวเอเชีย (*Oryza sativa*) เป็นข้าวลูกผสม เกิดจาก *Oryza sativa* กับข้าวป่า มีถิ่นกำเนิดบริเวณประเทศอินเดีย บังกลาเทศ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปลูกกันอย่างแพร่หลายตั้งแต่อินเดีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตอนเหนือของบังคลาเทศ บริเวณดินแดนสามเหลี่ยมระหว่างพม่า ไทย ลาว เวียดนาม และทางตอนใต้ของประเทศจีน สำหรับข้าวเอเชีย สามารถจำแนกได้ออกเป็น 3 ชนิด (subspecies) ดังนี้

สายพันธุ์ญี่ปุ่น หรือ Japonica ปลูกบริเวณแม่น้ำเหลืองของจีน แพร่ไปยังเกาหลี และญี่ปุ่น เมื่อประมาณ 300 ปีก่อนคริสต์ศตวรรษ เป็นข้าวเมล็ดป้อม

สายพันธุ์อินเดีย หรือ Indica เป็นข้าวเมล็ดยาวปลูกในเขตร้อนแพร่สู่ตอนใต้ของอินเดีย ศรีลังกา แหลมมาลายู หมู่เกาะต่าง ๆ และลุ่มแม่น้ำแยงซีของจีนประมาณคริสต์ศักราช 200

สายพันธุ์ข้าวชวา หรือ Javanica ปลูกในอินโดนีเซีย ประมาณ 1,084 ปีก่อนคริสต์ศักราช จากนั้นแพร่ไปยังฟิลิปปินส์ ญี่ปุ่น ยุโรป แอฟริกา อเมริกาใต้ อเมริกากลาง เข้าสู่สหรัฐอเมริกาครั้งแรกประมาณคริสต์ศตวรรษที่ 1 โดยนำเมล็ดพันธุ์ไปจากหมู่เกาะมาดากัสกาโดยทั้งสายพันธุ์ข้าวทั้ง 3 ชนิดจะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะความแตกต่างของข้าว subspecies indica, japonica, javanica

ที่มา : <http://classroom.psu.ac.th/users/spravit/510-211/lab/ricelab.doc>

ลักษณะ	indica	japonica	javanica
1. ใบ	ใบกว้าง สีเขียวอ่อน	ใบแคบ สีเขียวเข้ม	ใบกว้าง, แข็ง สีเขียวอ่อน
2. เมล็ด	เรียวยาว	สั้นและป้อม	กว้างและหนา
3. การแตกกอ	แตกกอมาก	แตกกอปานกลาง	แตกกอน้อย
4. ทรงต้น	สูง	เตี้ย	สูง
5. หนวดข้าว	มักไม่มีหนวด	ไม่มีหนวดข้าว จนถึงมีหนวดยาว	ไม่มีหนวดข้าว จนถึงมีหนวดยาว
6. ขนบนเปลือกเมล็ด	ขนสั้นมีเพียงบางเบา	ขนยาวและดก	ขนยาว
7. การร่วงของเมล็ด	ร่วงง่าย	ร่วงยาก	ร่วงยาก
8. ความแข็งของเนื้อเยื่อ	อ่อน	แข็ง	แข็ง
9. การตอบสนองต่อช่วงแสง	แตกต่างกันในระดับ การตอบสนองต่อช่วงแสง	แตกต่างกันในระดับ ของการตอบสนอง ต่อช่วงแสง	ตอบสนองต่อ ช่วงแสงเพียง เล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.2 ข้าวปทุมธานี 60 (<http://www.doa.go.th/rri/tech/PT60.htm>)

ชื่อพันธุ์ ปทุมธานี 60

ชนิด ข้าวเจ้า

ประวัติพันธุ์

ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 70 กับสายพันธุ์ไชนีส 345 เมื่อปี พ.ศ. 2501 ที่สถานีทดลองข้าวสันป่าตอง และปลูกคัดเลือกพันธุ์ผสมชั่วที่ 1 แล้วนำไปปลูกคัดเลือกในชั่วต่อๆ มาในสถานีทดลองข้าวภาคกลางจนได้สายพันธุ์ข้าว SPT58-37-400 ในปี พ.ศ. 2518 ถึง พ.ศ. 2529 ทำการทดลองเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานีภาคกลาง 8 แห่ง และในปี พ.ศ. 2526 ถึง พ.ศ. 2529 ทำการทดลองเปรียบเทียบผลผลิตในนารายณ์

การรับรองพันธุ์

คณะกรรมการวิจัยและพัฒนากรมวิชาการเกษตร มีมติให้เป็นพันธุ์รับรอง เมื่อวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2530 และให้ชื่อว่า ปทุมธานี 60

ลักษณะประจำพันธุ์

เป็นข้าวเจ้าหอม สูงประมาณ 159 เซนติเมตร เป็นพันธุ์ข้าวที่ไวต่อช่วงแสง ปลูกได้เฉพาะนาปี มีอายุเก็บเกี่ยว ประมาณ 25 พฤศจิกายน ลำต้นและใบมีสีเขียว มีขนบนใบ รวงแน่น ละเอียด คอรวงยาว เมล็ดข้าวเปลือกมีสีคล้ายสีฟางข้าว มีขนระยะพักตัวของเมล็ด ประมาณ 5 สัปดาห์ เมล็ดข้าวกล้องเรียวยาวมีความกว้าง 2.1 มิลลิเมตรยาว 7.6 มิลลิเมตร และหนา 0.7 มิลลิเมตร ปริมาณอะมิโลส 17.8 มีปริมาณท้องไข่น้อย คุณภาพข้าวสุกนุ่ม ร่วน มีกลิ่นหอมเล็กน้อย

ผลผลิต เฉลี่ยประมาณ 517 กิโลกรัมต่อไร่

ลักษณะเด่น

- มีกลิ่นหอมคล้ายขาวดอกมะลิ 105 แต่ไม่แฉะ
- คุณภาพเมล็ดดี ยาวเรียวยาว เลื่อมมัน ใสแกร่ง
- เป็นท้องไข่น้อย คุณภาพการสีดี
- ด้านทานโรคกาบใบเน่า และโรคใบหงิก

ลักษณะด้อย

- ไม่ต้านทานโรคไหม้ โรคใบสีส้ม และโรคขอบใบแห้ง
- ไม่ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

2.2 โรครไหม้ (พุนตักคี, 2547)

2.2.1 เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรครไหม้

โรครไหม้ข้าวเกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* Sacc. มีชื่ออยู่ในระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศว่า *Magnaporthe grisea* ราชนิดนี้อยู่ใน Class Ascomycete มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศโดยที่เชื้อนี้จะเข้าสู่ (infect) ข้าวในช่วงของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ



รูปที่ 1 ลักษณะของเชื้อที่ทำให้เกิดโรครไหม้ (*Magnaporthe grisea*)

ที่มา : www.doa.go.th/rri/tech/images/m3_6/RB/1.jpg

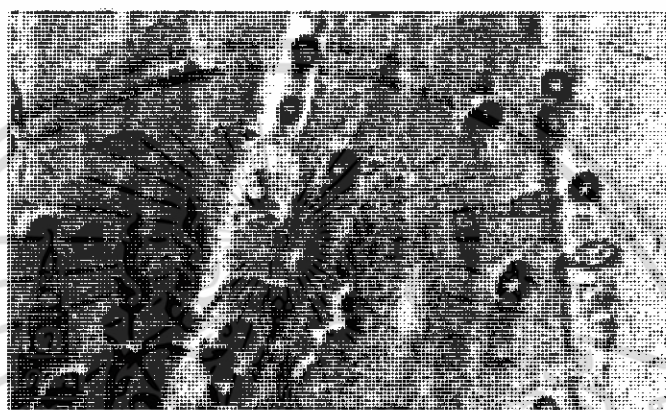
2.2.2 ระบบการสืบพันธุ์ของเชื้อโรครไหม้

2.2.2.1 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

มีลักษณะการสืบพันธุ์เช่นเดียวกับเชื้อที่อยู่ใน class Ascomycetes โดยจะมีเพศอยู่ 2 แบบ (mating type) มีตำแหน่งของยีนที่ควบคุมการผสมพันธุ์คือ MAT1-1 เชื้อ จะเกิดการผสมพันธุ์เมื่อมีเพศที่แตกต่างกัน ได้แก่ MAT1-1 และ MAT 1-2 เมื่อมาพบกันจะมีการเชื่อมต่อ โดยการรวมส่วนของนิวเคลียส และจะมีการสร้างสปอร์ที่เรียกว่า แอสโคสปอร์ (ascospore) จำนวน 8 สปอร์บรรจุภายในถุงหุ้มสปอร์ (ascus) เรียกว่า เพอริเทเซีย (perithecia) ในกรณีที่เชื้อผสมพันธุ์กันไม่ได้ไม่สมบูรณ์ เชื้ออาจจะสร้างเนื้อเยื่อเพอริเทเซีย แต่ไม่มีการสร้างสปอร์ ทำให้ไม่สามารถสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศได้ สำหรับยีนที่ควบคุมการสร้างเนื้อเยื่อเพอริเทเซีย พบว่าควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง และมีการกระจายตัวอย่างอิสระในยีนควบคุมเพศ

2.2.2.2 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

เชื้อ *Pyricularia grisea* มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างเส้นใยที่เรียกว่าไฮยาลิน (hyaline) และมีผนังกันคอนนินดิโอฟอร์ (conidiophore) ที่มีลักษณะเรียวยาว อาจเป็นเส้นเดี่ยวหรือมีกิ่งก้านเล็กน้อย มีส่วนของโคนิเดียม (conidia) ที่มีรูปร่างเป็นทรงลูกแพร์ (pear shape) ใส ไม่มีสี เช่นเดียวกับเส้นใย มีส่วนที่ใช้ในการเจาะเข้าเซลล์ของต้นพืช ที่ชื่อว่า แอปเพรสซอเรียม (appressorium)



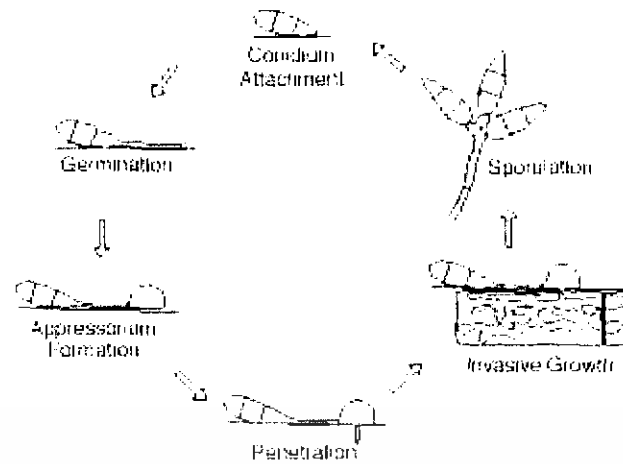
รูปที่ 2 แสดงรูปร่าง appressoria ของเชื้อ *Magnaporthe grisea* A: appressorium; C: conidium; G: germ tube

ที่มา : www.btny.purdue.edu/faculty/Xu/Fig2.jpg

2.2.3 ลักษณะอาการของโรคไหม้

การเข้าทำลายของเชื้อราโรคไหม้ สามารถเข้าทำลายข้าวได้ทุกระยะตั้งแต่ระยะต้นกล้าไปจนถึงระยะที่ข้าวออกรวง โดยเชื้อจะมีการสร้างสปอร์ (conidia) ที่สามารถฟุ้งทั่วไปในอากาศ เมื่อพบกับสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์ คือ มีความชื้นที่สูง อุณหภูมิประมาณ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส เมื่อสปอร์ตกอยู่บนใบข้าว โดยเฉพาะใบข้าวเปียก ชื้นนานกว่า 10 ชั่วโมง สปอร์จะเริ่มงอกโดยใช้เวลาเพียง 30 ถึง 90 นาที โดยอาศัยน้ำที่อยู่บนผิวใบงอกเส้นใยและสร้างแอปเพรสซอเรียม เพื่อทำหน้าที่ยึดเกาะโดยใช้อวัยวะปลายแหลมที่เรียกว่าพรีเนเทรชันเพก (penetration peg) แทะแทรกตัวเข้าไปในใบ และเจริญโดยใช้อาหารในใบข้าว สำหรับการเข้าทำลายของเชื้อโรคไหม้มักเกิดขึ้นในช่วงเวลากลางคืน ซึ่งมีอุณหภูมิเย็นและมีความชื้นสูง ขบวนการตั้งแต่การงอกของสปอร์เป็นเส้นใยจนเข้าทำลายในใบข้าวใช้เวลาทั้งสิ้น 24 ถึง 36 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงวงจรการเกิดโรคไหม้ ที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* Sacc.

ที่มา : www.btny.purdue.edu/faculty/Xu/Fig2.jpg

2.2.3.1 ระยะต้นกล้า

พบอาการของโรคเป็นจุดสีน้ำตาลขนาดเล็ก 1 ถึง 2 มิลลิเมตร ซึ่งจะพบในช่วงวันที่ 1 ถึงวันที่ 2 ของการเข้าทำลาย จากนั้นแผลจะเริ่มขยายใหญ่ขึ้นและเปลี่ยนเป็นจุดสีเทา ลักษณะช้ำน้ำขนาดของแผลประมาณ 2 ถึง 3 มิลลิเมตร ในวันที่ 3 ถึงวันที่ 5 และในวันที่ 7 ถึงวันที่ 10 แผลจะใหญ่ขึ้น มีลักษณะคล้ายดวงตาสีเทา มีสีน้ำตาลที่ขอบแผล ขนาดแผลกว้างประมาณ 3 ถึง 5 มิลลิเมตร และยาว 5 ถึง 15 มิลลิเมตร และในกรณีที่มีการระบาดอย่างรุนแรง จะพบบาดแผลจำนวนมากทั่วทั้งใบทำให้ใบแห้งตาย

2.2.3.2 ระยะแตกกอ

พบเชื้อโรคไหม้เข้าทำลายบริเวณใบ กาบใบ ข้อต่อใบ และข้อต่อลำต้น ลักษณะอาการส่วนใหญ่ จะพบจุดสีน้ำตาลรูปดวงตา ตรงกลางบาดแผลมีสีเทา และขอบแผลมีสีน้ำตาลขนาดใหญ่ เชื้อที่เข้าทำลายที่ข้อต่อใบและข้อต่อลำต้นจะพบบาดแผลมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ใบข้าวจะหลุด หรือพับหักได้ง่าย

2.5.3.3 ระยะออกรวง

เชื้อสามารถเข้าทำลายข้าวได้ที่ส่วนของรวงข้าวจนถึงคอรวงข้าว โรคไหม้ที่เกิดในระยะนี้เรียกว่า โรคไหม้คอรวง (panicle blast) โดยสปอร์ของเชื้อจะงอกเส้นใยเข้าทำลายรวงข้าวทำให้เมล็ดข้าวลีบ เปลือกข้าวมีสีเทาดำของสปอร์ กรณีที่เกิดการเข้าทำลายที่คอรวงข้าว พบบริเวณที่เชื้อเข้าทำลายมีสีเทาดำ รวงข้าวมีลักษณะเมล็ดข้าวที่ลีบ เนื่องจากไม่ได้รับสารอาหาร ถ้าเกิดการระบาดอย่างรุนแรงจะพบรวงข้างลีบทั้งรวงและมักพบรวงข้าวหักง่าย



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 4 แสดงลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อโรครุ่ยในแต่ละระยะ

(ก) ลักษณะอาการของโรครุ่ยที่เกิดที่ข้อต่อ

(ข) ลักษณะอาการของโรครุ่ยที่เกิดที่คอรวงข้าว

(ค) ลักษณะอาการของโรครุ่ยที่เกิดที่ใบ

ที่มา : www.doa.go.th/rri.html

2.3 กลไกป้องกันโรคของพืช

โดยทั่วไปพืชจะมีกลไกการป้องกันการเกิดโรค ทำให้ได้รับความเสียหายจากโรคน้อยลง การป้องกันโรคของพืชอาจเกิดจากลักษณะโครงสร้างของพืชเอง ทำให้เกิดการกีดขวางและยับยั้งการเข้าสู่เซลล์พืช หรือเจริญลุกลามของเชื้อในต้นพืช ซึ่งเป็นการป้องกันที่เกิดขึ้นทางกายภาพ หรือปฏิกิริยาทางชีวเคมีในเซลล์พืช โดยการสร้างสารที่เป็นพิษต่อเชื้อโรค เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

2.3.1 การป้องกันของพืชทางโครงสร้าง (structural defense)

พืชจะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างขัดขวางการเข้าทำลายของเชื้อ หลังจากเชื้อเข้าสู่พืชแล้วไม่ให้เจริญลุกลามต่อไป เช่น การเกิดเซลล์ที่อัดกันเป็นชั้นหนา เป็นต้น ลักษณะการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและเชื้อโรค โดยโครงสร้างที่พืชสร้างขึ้น เพื่อเป็นการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อ

2.3.1.1 การป้องกันที่เกิดจากโครงสร้างของเนื้อเยื่อ

เนื้อเยื่อพืชที่ติดเชื้อจะสร้างเซลล์หลายๆ ชั้นเรียงซ้อนกันเนื่องจากการ กระตุ้น จากสารที่เชื้อหลั่งออกมา โดยชั้นเซลล์ที่สร้างขึ้นจะช่วยยับยั้งไม่ให้เชื้อและสารพิษ ที่เชื้อหลั่งออกมาเกิดการขยายวงกว้าง และยังระงับการไหลเวียนของน้ำและอาหารพืชจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อเยื่อปกติไป ยังเนื้อเยื่อที่เป็นโรคทำให้เชื้อ และเนื้อเยื่อพืชที่ตายแล้วอยู่ในขอบเขตของแผลที่เป็นจุดหรือแผลนูนแยกส่วนออกมาจากเนื้อเยื่อปกติ

2.3.1.2 การป้องกันเกิดจากโครงสร้างของเซลล์

โครงสร้างป้องกันที่เซลล์ขึ้นอยู่กับ การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของผนังเซลล์ในระหว่างที่เซลล์ถูกเชื้อเข้าทำลาย กลไกที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันโรคนี้นี้มีขอบเขตจำกัดเท่าที่พบกับโรคที่เกิดจากเชื้อรา 2 แบบ คือ เกิดจากการไปงอกของเซลล์เอพิเดอร์มิส และเซลล์ที่อยู่ใต้เอพิเดอร์มิส ในระหว่างที่เชื้อแทงผ่านพืชโดยตรง ซึ่งอาจยับยั้งการแทงผ่านของเชื้อได้ และการเกิดเป็นปลอกหุ้มเส้นใยของเชื้อที่เริ่มแทงผ่านเซลล์ ปลอกที่ห่อหุ้มดังกล่าวเกิดจากการขยายตัวของผนังเซลล์

2.3.1.3 การป้องกันเกิดจากปฏิกิริยาของไซโตพลาสซึมของเซลล์

ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) จะคลุมกลุ่มเส้นใย โดยนิวเคลียสของพืชจะเคลื่อนตามไปด้วย แล้วโปรโทพลาสซึม (protoplasm) ของเซลล์จะเริ่มหายไป ในขณะที่เส้นใยของเชื้อเจริญเพิ่มขึ้นบางครั้งเซลล์ที่เชื้อเข้าทำลายไซโตพลาสซึม และนิวเคลียสจะขยายใหญ่ขึ้นไซโตพลาสซึมจะกลายเป็นเม็ด เส้นใยของเชื้อสลายตัวเห็นเป็นส่วนๆ แล้วการเข้าทำลายก็หยุดลงในที่สุด

2.3.1.4 เกิดไฮเปอร์เซนซิวิตี (hypersensitivity)

เป็นปฏิกิริยาแสดงถึงความต้านทานโรคของพืช โดยเซลล์พืชจะตายอย่างรวดเร็วหลังจากเชื้อเข้าสู่เซลล์ พบมากกับโรคที่เกิดจากเชื้อราปรสิตถาวรและไส้เดือนฝอย ทำให้เชื้อโรคในเนื้อเยื่อของแผลที่ตายแล้วนั้นไม่ได้รับสารอาหารจากเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่

2.3.2 การป้องกันที่เกิดจากการกระตุ้นของเชื้อโรค

2.3.2.1 พืชสร้างสารยับยั้งการเจริญ

บทบาทของสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) เซลล์และเนื้อเยื่อของพืชมีปฏิกิริยาทางเคมีตอบโต้แผลที่เกิดขึ้นแก่พืช โดยปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดขึ้นเพื่อขัดขวางเชื้อหรือสิ่งแปลกปลอมเข้าไปในพืชไม่ให้ขยายวงกว้าง และสมานแผลที่เกิดขึ้นสารส่วนมากเป็นสารประกอบของฟีนอลในรูปต่างๆ สารเหล่านี้อาจมีความเข้มข้นสูงพอในการยับยั้งเชื้อรา และแบคทีเรียสารหลายชนิดร่วมกันมีพิษต่อเชื้อสูงกว่าแต่ละชนิดแยกกันสารประกอบของฟีนอลที่พบดังกล่าวมีอยู่ 2 ประเภท

2.3.2.1.1 สารประกอบฟีนอลสามัญ (common phenolics) เป็นสารประกอบที่พบได้ในพืช โดยในพืชที่เป็นโรคจะมีอัตราการเกิดการสะสมในเนื้อเยื่อสูงกว่า พืชพันธุ์ที่ต้านทานโรคมีการสะสมได้รวดเร็วกว่าพันธุ์ที่เป็นโรคง่ายได้แก่ กรดคลอโรนิก กรดคาเฟอิก และสารสโคโปเลทิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.1.2 ไฟโตอะเลซิน (phytoalexin) เป็นสารประกอบที่พบในพืชที่ได้รับการกระตุ้นการเข้าทำลายของเชื้อโรค หรือพืชที่มีบาดแผล ไฟโตอะเลซินเป็นสารปฏิชีวนะที่พืชสร้างขึ้น และมีพิษต่อเชื้อราพบเฉพาะ ในพืชที่ถูกเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เข้าทำลาย หรือมีบาดแผลทางกล สารดังกล่าว ได้แก่ ipomeamarone, orchinol, pisatin, phascolin และ rhitin

2.3.2.2 พืชสร้างสารอาหารที่ทนต่อเอนไซม์ของเชื้อโรค

พืชสามารถต้านทานต่อโรคบางชนิดโดยมีการสร้างสารอาหารเป็นสารประกอบที่เอนไซม์ของเชื้อใช้เข้าทำลายพืชย่อยไม่ได้ โดยสารเหล่านี้เกิดสะสมอยู่ใกล้บริเวณที่ติดเชื้อเพื่อยับยั้งเชื้อ โดยการย่อยเนื้อเยื่อพืชบริเวณนั้น ส่งผลให้เชื้ออยู่เฉพาะในแผลพืช และไม่สามารถลุกลามต่อไปไม่ได้ สารดังกล่าว ได้แก่ เกลือ ของเพคติน เป็นต้น

2.3.2.3 พืชสร้างโพลีฟีนอล (polyphenol) ยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เชื้อสร้าง

สารประกอบฟีนอล หรือในรูปออกซิไดส์ สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เชื้อผลิตขึ้นแทนการยับยั้งการเจริญของเชื้อ เช่น ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่ย่อยเพคติน เป็นต้น พืชที่มีโพลีฟีนอล สูงจะมีความต้านทานโรคที่ดีกว่าในพันธุ์พืชที่มีปริมาณโพลีฟีนอลต่ำ

2.3.2.4 พืชมีปฏิกิริยาทำให้สารพิษของเชื้อสลายตัว

พืชพันธุ์ต้านทานโรคมีความต้านทานต่อสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้น กลไกที่เกี่ยวข้องของความต้านทานนี้ยังไม่ทราบชัดเจน สารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นในพืชพันธุ์ต้านทาน เช่น กรดฟูซาริก สารไพริคูลาริน (piricularin) เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสารประกอบที่ไม่มีพิษโดยปฏิกิริยารวมตัวกับสารอื่นๆ และจำนวนสารประกอบที่เกิดขึ้นนี้จะมีสัดส่วนกับการต้านทานโรคของพันธุ์พืชอีกด้วย

2.3.3 การป้องกันของพืชทางเคมี (biochemical defense)

เนื่องจากการที่มีสารต่างๆ เกิดขึ้นในเซลล์ก่อนแล้ว หรือพืชสร้างขึ้นจากการกระตุ้นของเชื้อที่เข้าทำลายพืช ดังจะเห็นได้ว่า เชื้อบางชนิดไม่สามารถเข้าทำลายพืชบางพันธุ์ได้ทั้งๆ ที่พืชนั้นไม่มีลักษณะโครงสร้างที่สามารถขัดขวางการเข้าทำลายของเชื้อ ซึ่งเป็นเหตุผลสนับสนุนว่ากลไกทางเคมีมีส่วนเกี่ยวข้อง ทำให้พืชมีความต้านทานโรค การเข้าทำลายของเชื้อโรคมักกว่าลักษณะโครงสร้างของพืชที่มีอยู่ตามปกติธรรมชาติ กลไกที่เกิดทางเคมีมีดังนี้

2.3.3.1 การป้องกันที่มีอยู่ก่อนเชื้อเข้าสู่พืช (preexisting biochemical defense)

- 2.3.3.1.1 พืชปล่อยสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ (inhibitors) ออกมาทางผิวพืช ราก และใบ สารดังกล่าวอาจมีคุณสมบัติออกฤทธิ์กับเชื้อใดเชื้อหนึ่ง
- 2.3.3.1.2 พืชมีสารยับยั้งการเจริญอยู่ในเซลล์ เช่น กรดคลอโรจีนิกสารประกอบฟีนอลต่างๆ ที่มีพิษต่อเชื้อสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้
- 2.3.3.1.3 พืชขาดธาตุอาหารที่จำเป็นต่อเชื้อ พืชบางพันธุ์ไม่สร้างสารที่จำเป็นให้เชื้อปรสิตแบบถาวรมีชีวิตอยู่ได้ หรือเป็นสารจำเป็นต่อการเจริญของโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุแบบอื่นๆ เช่น เชื้อรา *Rhizoctonia* ต้องการสารบางชนิด เพื่อให้เส้นใยของเชื้อเจริญ เป็นคุ่มคล้ายหมอนตรงจุดสัมผัสของเชื้อกับพืช หากไม่มีคุ่มดังกล่าวเกิดขึ้น เชื้อจะไม่สามารถแทงผ่านเข้าสู่พืชและทำให้พืชเป็นโรคได้ เป็นต้น
- 2.3.3.1.4 พืชมีอัตราการหายใจเปลี่ยนไป (altered respiration) พืชพันธุ์ต้านทานโรค หลังติดเชื้อแล้วมีอัตราการหายใจเพิ่มขึ้นเนื่องจากการหายใจเพิ่มขึ้นนั้น เพื่อกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ของพืชที่จำเป็นในปฏิกิริยาการป้องกันต่างๆ ของพืชต่อโรค
- 2.3.3.1.5 พืชมีการเปลี่ยนแปลงวิถีการสังเคราะห์ต่างๆ การที่พืชเป็นแผล หรือเป็นโรคพืชจะมีการหายใจเพิ่มขึ้น และเกิดกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด และมีการสังเคราะห์สะสมสารประกอบที่มีพิษต่อเชื้อจุลินทรีย์ จนมีปริมาณความเข้มข้นที่มากพอ ที่จะสามารถยับยั้งการทำลายของเชื้อได้

2.4 เฟลโวนอยด์

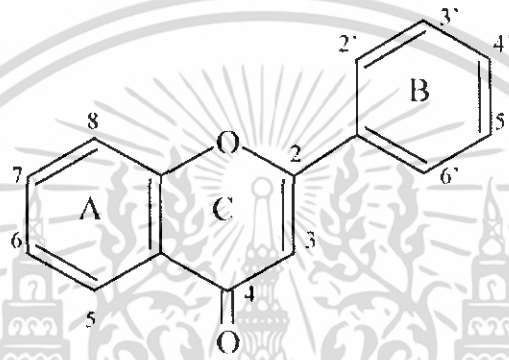
เฟลโวนอยด์เป็นสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้น เป็นสารประกอบประเภทโพลีฟีนอล (polyphenolic) ที่สามารถพบได้ตามส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ดอก ราก ใบ และบริเวณลำต้น โดยพบจะในรูปแบบอิสระ (aglycone) และจับกับน้ำตาลเป็นไกลโคไซด์ (glycosides) สารเฟลโวนอยด์มีหน้าที่หลากหลายในพืช เช่น เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเม็ดสีในพืช ป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรค ล้อมแมลงเพื่อช่วยในการผสมเกสร เป็นตัวส่งสัญญาณ (signal) ให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างพืชและเชื้อโรครวมทั้งช่วยป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ต

ปัจจุบันมีการค้นพบสารกลุ่มเฟลโวนอยด์มากกว่า 7,000 ชนิด (Harborne และ Williams, 2000) โดยได้ศึกษาในด้านพันธุศาสตร์ เคมี ชีวเคมี และความสัมพันธ์ต่างๆ ของสารเฟลโวนอยด์ต่อพืช เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการผลิต การสะสมที่เกิดขึ้นในพืช ตลอดจนแนวทางการนำมาใช้ประโยชน์ในพืช มนุษย์มีการนำสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์มาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน แต่ที่ได้รับความสนใจ คือ การนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านสุขภาพ โดยเฟลโวนอยด์มีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไวรัสต่อต้านการจับตัวกันเป็นก้อนของเลือด ลดอาการอักเสบ มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็ง และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ(Antioxidant)

เฟลโวนอยด์ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม มีโครงสร้างที่มีคาร์บอน 6 อะตอมคือส่วนของวง A (A-ring) และส่วนที่มีคาร์บอน 6 อะตอมจับกับลูกโซ่คาร์บอน 3 อะตอม คือส่วนของวง B (B-ring) เฟลโวนอยด์ที่พบในธรรมชาติถูกจัดออกเป็น 12 กลุ่ม โดยทั้งหมดมีชีวสังเคราะห์เหมือนกันคือ โครงสร้างของวง B มาจากสารฟีนีลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid) และส่วนของวง A มาจาก อะซิเตท (acetate) 3 โมเลกุล



รูปที่ 5 โครงสร้างหลักของสารเฟลโวนอยด์

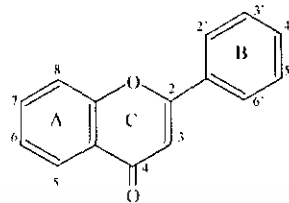
ที่มา : T.P. Tim Cushnie and Andrew J. Lamb. 2005. International Journal of Antimicrobial Agents 26 หน้า 343-356

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 สรุปสูตรเคมีของสารแต่ละตัวในกลุ่มฟลโวนอยด์

ที่มา : T.P. Tim Cushnie and Andrew J. Lamb. 2005. International Journal of Antimicrobial

Agents 26 หน้า 343–356



Compound	Substituents at carbon position:											
	2	3	4	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'
Flavones and their glycosides												
Acacetin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	OCH ₃	-	-
Apigenin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-
Baicalin	-	-	-	OH	OH	OR ₁	-	-	-	-	-	-
Baicalein	-	-	-	OH	OH	OH	-	-	-	-	-	-
Chrysin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	-	-	-
Gardenin A (demethylated)	-	-	-	OH	OH	OH	OH	-	OH	OH	OH	-
Genkwanin	-	-	-	OH	-	OCH ₃	-	-	-	OH	-	-
Luteolin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Luteolin 7-glucoside	-	-	-	OH	-	OR ₂	-	-	OH	OH	-	-
7,8-Dihydroxyflavone	-	-	-	-	-	OH	OH	-	-	-	-	-
5,5'-Dihydroxy-8,2',4'-trimethoxyflavone	-	-	-	OH	-	-	OCH ₃	OCH ₃	-	OCH ₃	OH	-
5-Hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone	-	-	-	OH	-	-	OCH ₃	-	-	OCH ₃	-	-
5,7,4'-Trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavone	-	-	-	OH	-	OH	-	-	CH ₃	OH	CH ₃	-
6,7,4'-Trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavone	-	-	-	-	OH	OH	-	-	CH ₃	OH	CH ₃	-
Isoflavones												
6,8-Diprenylgenistein	-	-	-	OH	R ₃	OH	R ₃	-	-	OH	-	-
Sophoraisoflavane A	-	-	-	OH	-	OH	-	*	*	OH	-	-
Flavonols and their glycosides												
Galangin	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	-	-	-	-
Kaempferol	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-
3-O-methylquercetin	-	OCH ₃	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Morin	-	OH	-	-	-	OH	-	OH	-	OH	OH	-
Myricetin	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	OH	-
Quercetagenin	-	OH	-	OH	OH	OH	-	-	OH	OH	-	-
Quercetagenin-7-arabinosyl-galactoside	-	OH	-	OH	OH	OR ₄	-	-	OH	OH	-	-
Quercetin	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Quercetin-3-O-(2'-galloyl)-α-L-arabinopyranoside	-	OR ₅	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Quercetrin	-	OR ₆	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Robinetin	-	OH	-	-	-	OH	-	-	OH	OH	OH	-
Rutin	-	OR ₇	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	OH	-
3,2'-Dihydroxyflavone	-	OH	-	-	-	-	-	OH	-	-	-	-
3,6,7,3',4'-Pentahydroxyflavone	-	OH	-	-	OH	OH	-	-	OH	OH	-	-
Flavan-3-ols												
Catechin	-	OH	OH	-	-	OH	-	-	OH	-	OH	-
Epicatechin gallate	-	R ₈	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Epigallocatechin	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	OH	-
Epigallocatechin gallate	-	R ₈	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	OH	-
3-(8-octanoyl)-(+)-catechin	-	R ₉	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
3-(8-octanoyl)-(-)-epicatechin	-	R ₉	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Flavanon-3-ols												
Dihydrofisetin	-	OH	-	-	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Dihydroquercetin	-	OH	-	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Flavanones and their glycosides												
Lonchocarpol A	-	-	-	OH	R ₃	OH	R ₃	-	-	OH	-	-
Naringenin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-
Naringin	-	-	-	OH	-	OR ₇	-	-	-	OH	-	-
Pinocembrin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	-	-	-
Ponciretin	-	-	-	OH	-	OH	-	-	-	OCH ₃	-	-
Sophor flavanone G	-	-	-	OH	-	OH	R ₁₀	OH	-	OH	-	-
3-Methylene flavanone	-	CH ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,7,4'-Trihydroxy-8-methyl-6-(3-methyl-2-butanyl)-(-)-flavanone	-	-	-	OH	R ₃	OH	CH ₃	-	-	OH	-	-
Chalcones												
Licochalcone A	-	R ₁₁	OH	-	OCH ₃	-	-	-	-	OH	-	-
Licochalcone C	-	-	OH	R ₃	OCH ₃	-	-	-	-	OH	-	-
2,4,2'-Trihydroxychalcone	OH	-	OH	-	-	-	-	OH	-	-	-	-
2,4,2'-Trihydroxy-5'-methylchalcone	OH	-	OH	CH ₃	-	-	-	OH	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Compound	Substituents at carbon position:											
	2	3	4	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'
Flavan-3,4-diols and anthocyanidins												
Leucocyanidin	-	OH	OH	OH	-	OH	-	-	OH	OH	-	-
Pelargonidin chloride	-	Cl	-	OH	-	OH	-	-	-	OH	-	-
Flavans												
6,4'-Dichloroflavan	-	-	-	-	Cl	-	-	-	-	Cl	-	-
7-Hydroxy-3',4'-(methylenedioxy)flavan	-	-	-	-	-	OH	-	-	#	#	-	-

2.4.1 สารในกลุ่มฟลาวอนอยด์

2.4.1.1 แชลโคน (Chalcone) และ ออโรน (Aurone)

แชลโคนเป็นสารในกลุ่มฟลาวอนอยด์ ที่ต่างจากสารชนิดอื่นๆ ในกลุ่มเดียวกัน คือ มีวงอะโรมาติก (aromatic ring) เพียง 2 วง เชื่อมกันด้วย คาร์บอน 3 อะตอม ซึ่งเรียงตัวแบบ α,β -unsaturated carbonyl system เมื่อแชลโคนเกิดการรีดักชัน ที่ตำแหน่ง α,β -double bond จะให้สารชนิดใหม่ที่เรียกว่า ไดไฮโดรแชลโคน (dihydrochalcone) แชลโคนให้สารที่มีสีเหลืองเข้ม สามารถพบได้หลายส่วนของพืช โดยเฉพาะที่สีเหลืองของดอกไม้

ออโรน มีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างจากฟลาวอนอยด์ชนิดอื่น คือ เป็น 2-benzylidene-coumaranone การเกิดอนุพันธ์จะเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ที่ตำแหน่ง 4,6 หรือ 7 ในวง A แล้วเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิล (-CH₃) หรือปฏิกิริยาไกลโคไซด์ (glycosides) ที่วง B

ฟลาวอนอยด์ทั้งสองชนิดนี้ มีคุณสมบัติเหมือนกันคือ เมื่ออยู่ในสารละลายต่างจะเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีแดง

2.4.1.2 ไอโซฟลาวอนอยด์ (Isoflavonoid)

ไอโซฟลาวอนอยด์ ต่างจากฟลาวอนอยด์ชนิดอื่นๆ ตรงส่วนของคาร์บอนที่เชื่อมระหว่างวง A และวง B จะมีแขนง (branch) ที่ต่างกัน กระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารชนิดนี้แยกจากกลุ่มฟลาวอนอยด์ ที่สารตั้งต้นของแชลโคน (chalcone precursor) คือเมื่อแชลโคน เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสารฟลาวานอน (flavanone) แล้วเกิดการเปลี่ยนตำแหน่ง (ring migration) ผ่าน oxidation product ที่วง B และได้สารตัวแรกในกลุ่มที่เรียกว่า ไอโซฟลาวอน (isoflavone)

ไอโซฟลาวอนอยด์ เป็นกลุ่มสารที่พืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่นเดียวกับสารในกลุ่มฟลาวอนอยด์ สามารถพบได้ในพืชตระกูลถั่ว มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา สารที่สำคัญ ได้แก่ ไอโซฟลาวอน และคูเมสแทน (coumestans)

2.4.1.3 เฟลวาโนน (Flavanone) และ ไดไฮโดรเฟลวาโนล (Dihydroflavonol)

เฟลวาโนน มีโครงสร้างเป็น 2-phenylbenzopyran-4-one ส่วนโครงสร้างของไดไฮโดรเฟลวาโนล เป็น 2-phenyl-3-hydroxybenzopyran-4-one เรียกว่า 3-hydroxyflavanone หรือ เฟลวาโนน ซึ่งอาจเกิดปฏิกิริยาคีไฮโดรจีเนชัน (dhydrogenation) ได้เฟลโวน (flavone) หรือเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ที่ตำแหน่งที่ 3 ได้เป็นไดไฮโดรเฟลวาโนล (dihydroflavonol) ซึ่งเปลี่ยนไปเป็นสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์ชนิดต่างๆ

สารทั้ง 2 ตัว มีความสำคัญเพราะเป็นตัวกลางในการสังเคราะห์ของเฟลโวนอยด์สามารถพบได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ทั้ง เฟลวาโนน และไดไฮโดรเฟลวาโนล มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราจึงใช้ในการเก็บรักษาไม้

2.4.1.4 เฟลโวนอล (Flavonol)

โครงสร้างของสารเฟลโวนอล เป็นโครงสร้างหลักที่จะมีการเปลี่ยนไปเป็นเฟลโวนอลชนิดอื่นๆ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ได้แก่ ปฏิกิริยาออกซิเจนเนชัน (oxygenation) ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) และปฏิกิริยาคีไฮดรอกซีเลชัน (dhydroxylation)

2.4.1.5 เฟลโวน (Flavone)

เฟลโวนในพืชพบทั้งรูปของอะไกลโคน และไกลโคไซด์ มักพบบริเวณเปลือกไม้แก่นไม้ ผล และรากไม้ เฟลโวนที่พบมากที่สุดคืออะพิจินิน (apigenin) และลูทีโอลิน (luteolin) มักเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ที่ตำแหน่ง 3' 4' และ 5'

2.4.1.6 แคทีชิน (Catechin)

พบครั้งแรกจากเชื้อ *Acacia catechu* มีการพิสูจน์ได้ว่าเป็น (-) epicatechin ต่อมาจึงพบ (+) catechin จากใบ *Uncaria gambier* และยังพบสารที่มีโครงสร้างแบบเดียวกันนี้อีกมาก จึงเรียกรวมกันว่า แคทีชิน คือ สารที่มีโครงสร้างเป็น polyhydroxyflavan-3-ol

แคทีชินเป็นสารตั้งต้นของ condensed tannin และมีคุณสมบัติพิเศษ คือ เมื่อถูกกับความร้อน กรด จะเปลี่ยนจากสารที่ไม่มีสีเป็นสารสีแดง (tannin-red) ซึ่งไม่ละลายน้ำ

2.4.1.7 ลิวโคแอนโทไซยานิน (Leucoanthocyanin)

เป็นกลุ่มของเฟลโวนอยด์ที่ไม่มีสี ไปจนถึงมีสีแดงและม่วง เมื่อถูกอยู่ในสภาพที่เป็นกรดจะได้สาร แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin) จึงเรียกสารนี้ว่า ลิวโคแอนโทไซยานิน ต่อมาพบว่าสารนี้มีอยู่อย่างแพร่หลาย พบมากในพืชที่มีเปลือกไม้ ในสภาพที่เป็นกรดมักจะได้อาไซยานิดิน และในบางกรณีให้สารเดลฟิณีดิน (delphinidin)

ลิวโคแอนโทไซยานินที่พบในธรรมชาติมีโครงสร้างเป็น flavan-3,4- diols โดยในสภาพที่เป็นกรด และมีความร้อนอยู่ด้วย พบว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของลิวโคแอนโทไซยา

นิน จะเปลี่ยนเป็นสารแอนโทไซยานินเริ่มจากการเกิดปฏิกิริยา ดีไฮเดรชัน ได้เป็น fl-3-cnc ตามด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยอากาศเกิดเป็น แอนโทไซยานิน

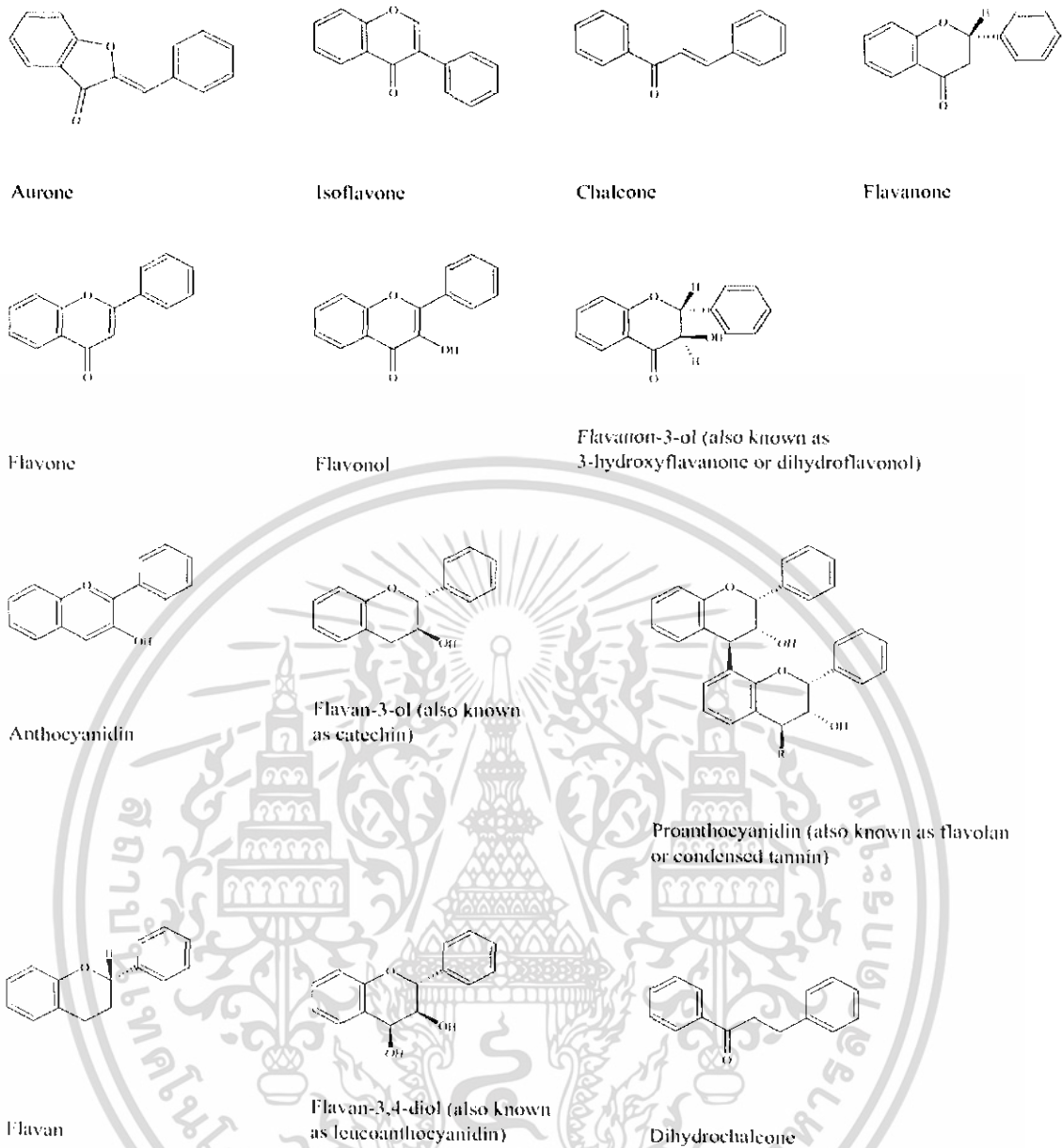
2.4.1.8 แอนโทไซยานิน (Anthocyanin)

โครงสร้างของสารแอนโทไซยานิน ประกอบด้วยโมเลกุลที่มีน้ำตาล และโมเลกุลที่ไม่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบเรียกว่าแอนโทไซยานินซึ่งประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 2 วงเชื่อมกับวงแหวนที่มี 5 คาร์บอนกับออกซิเจน 1 อะตอม ชนิดแอนโทไซยานินจะแตกต่างกันไปตาม ดังนี้ ประการแรกคือจำนวน และชนิดของกลุ่มสารที่ติดกับวงแหวนของแอนโทไซยานินทั้งที่เป็นหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) หรือหมู่เมทอกซี (-OCH₃) ประการที่สองน้ำตาล ซึ่งจัดเรียงตัวเป็นพันธะไกลโคไซด์ (glycoside linkage)

แอนโทไซยานินที่อยู่ในรูปของเม็ดสี ที่ละลายน้ำได้ จะให้สีแดง สีม่วงและ สีฟ้า พบในใบ ดอก ผล ไม้ของต้นไม้พืช รวมทั้งในเหล่าองุ่น มีความคงตัว จึงมีความสำคัญในด้านธุรกิจ นอกจากนี้ยังมีการใช้สารกลุ่มนี้ในทางเภสัชเวช และเป็นอาหารเสริมสุขภาพ เช่น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ลดปริมาณคอเลสเตอรอล และต่อต้านการเกิดมะเร็ง

2.4.1.9 ไบฟลาโวนอยด์ (Biflavonoids)

ไบฟลาโวนอยด์ เป็นไดเมอร์ (dimer) ของอะฟิจีนิน โดยมีชีวสังเคราะห์เริ่มจากแซลโคน สามารถแบ่งได้ 7 กลุ่ม ตามแบบการจับกันของโมโนเมอร์ (monomer) โดยสามารถพบได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่



รูปที่ 6 โครงสร้างของสารชนิดต่างๆ ในกลุ่มฟลาโวนอยด์

ที่มา : T.P.Tim Cushnic and Andrew J. Lamb. 2005. International Journal of Antimicrobial

Agents 26 หน้า 343-356

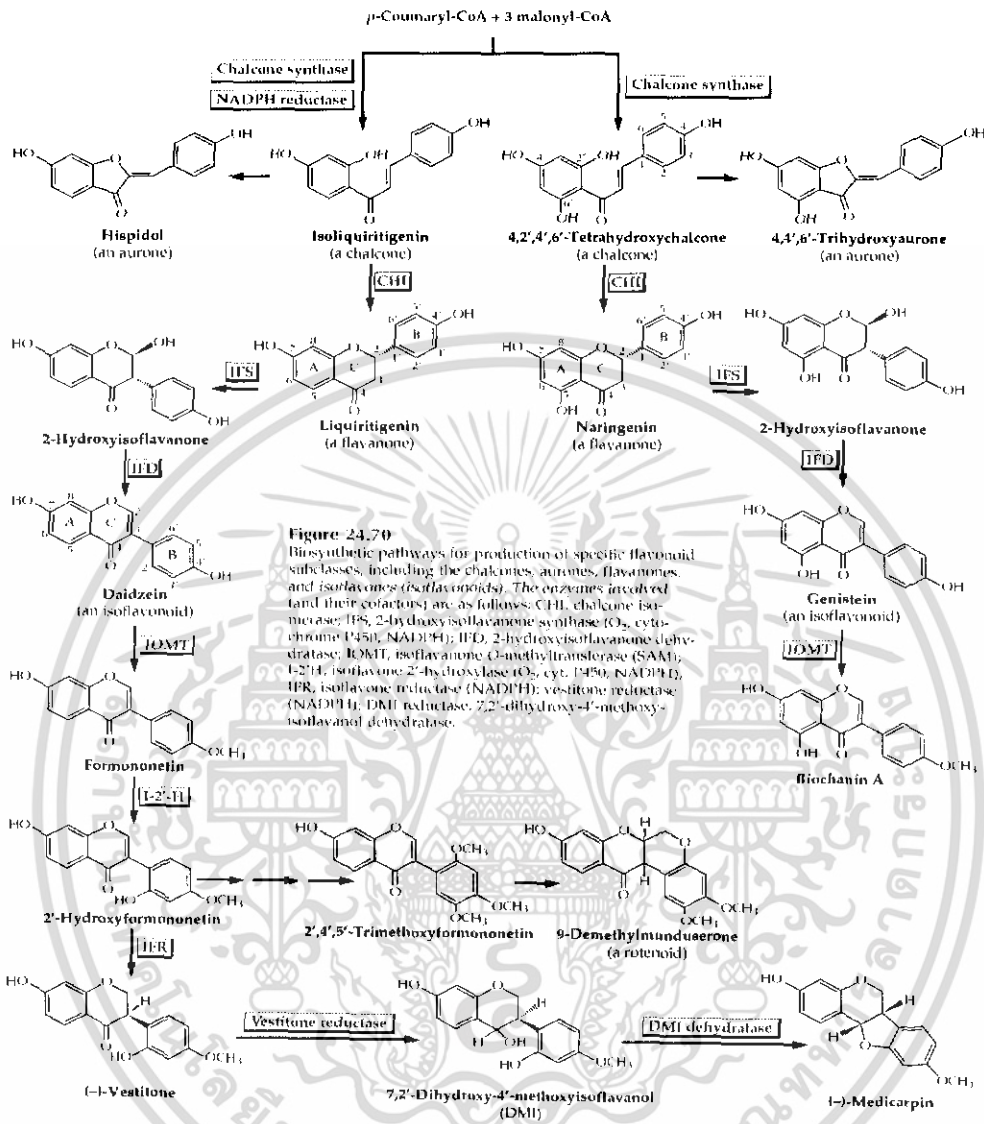
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 วิถีชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ (The flavonoid biosynthesis pathway)

สำหรับวิถีการสังเคราะห์สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เริ่มจากการกระตุ้นการรวมตัวของสารมาโลนิลโคเอ (malonyl CoA) 3 โมเลกุล และสารพาราโคมาริลโคเอ (*p*-coumaroyl CoA) 1 โมเลกุล ด้วยเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) ให้ผลผลิตเป็นเอ็นไซม์ 4,2', 4',6'-Tetrahydrochalcone เอนไซม์ CHS ประกอบด้วย 2 ส่วนของ polyketide synthase ซึ่งแต่ละส่วน (sub unit) มีน้ำหนักประมาณ 42 KDa ส่วนอีกปฏิกิริยาที่เกิดควบคู่กันของเอนไซม์ CHS โดยมีโคแฟกเตอร์เป็น NADPH จะได้เป็นสารในกลุ่มแซลโคนคือ ไอโซลิกวิริทีเจนนิน (Isoliquiritigenin) แซลโคนทั้ง 2 ชนิดสามารถเปลี่ยนไปเป็นออโรนในขั้นตอนต่อมาเป็นการเกิดไอโซเมอร์ (isomerization) ของสารแซลโคน โดยเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) ได้เป็นสารกลุ่มฟลาโวนคือเนรินเจนนิน (naringenin) และลิกวิริทีเจนนิน (liquiritigenin) ต่อมาฟลาโวน จะเปลี่ยนเป็น 2-Hydroxyisoflavanone โดยเอนไซม์ isoflavone synthase (IFS) จากนั้น จะเกิดปฏิกิริยาดีไฮเดรชันโดยเอนไซม์ 2-hydroxyisoflavanone dehydratase (IFD) ได้สารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ คือเจนิสทิน (genistein) และไดซัน (daidzein) โดยสารกลุ่มนี้นำไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตโรเทนอยด์ (rotenoid) ซึ่งสามารถนำไปผลิตเป็นยาฆ่าแมลง นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่น เช่น ยาฆ่าหนู ใช้เป็นตัวยับยั้ง (inhibitor)

จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาดีไฮเดรชันของเนรินเจนนิน ที่คาร์บอนตำแหน่ง 2 หรือ 3 ได้สารกลุ่มฟลาโวน คืออะพิจินิน (apigenin) โดยเอนไซม์ flavone synthase (FNS) ซึ่งเอนไซม์นี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของพืช เช่น เซลล์พาร์สลีย์ (parsley) สารในกลุ่มฟลาโวนจะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ α -ketoglutaratedependent dioxygenase (FNS I) นอกจากนี้ ยังเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งที่ 3 ของโมเลกุลเนรินเจนนิน โดยเอนไซม์ flavanone 3-hydroxylase (FHT) เกิดเป็นสารในกลุ่มไดไฮโดรฟลาโวนอล คือไดไฮโดรเคเอ็มพีรอล (dihydrokaempferol) ซึ่งเป็นตัวกลางที่สำคัญในวิถีชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ โดยจะเกิดปฏิกิริยาได้หลายทิศทาง ปฏิกิริยาแรกเป็นการเติมหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง 3' โดยเอนไซม์ flavonoid 3'-hydroxylase ได้สารไดไฮโดรเคอร์เซติน (dihydroquercetin) แล้วจึงเปลี่ยนเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอลคือ เคอร์เซติน (Quercetin) โดยเอนไซม์ flavonol synthase (FLS) นอกจากนี้ยังสามารถเปลี่ยนไปเป็นสารฟลาแวน-3,4-ไดออล (flavan-3,4-diols) โดยเอนไซม์ dihydroflavonol reductase (DFR) ปฏิกิริยาที่สอง เกิดปฏิกิริยารีดักชันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 โดยเอนไซม์ DFR เกิดเป็นสารในกลุ่มลิวโคแอนโทไซยานินคือ ลิวโคเพลาโกนิดีน (leucolargonidin) จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาดีไฮโดรราเทส เกิดเป็นสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน คือเพลาโกนิดีน (pelargonidin) โดยเอนไซม์ anthocyanidin synthase

(ANS) จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่น้ำตาลกลูโคสเกิดเป็นสาร pelargonidin 3-glucoside โดยเอนไซม์ UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (FGT)

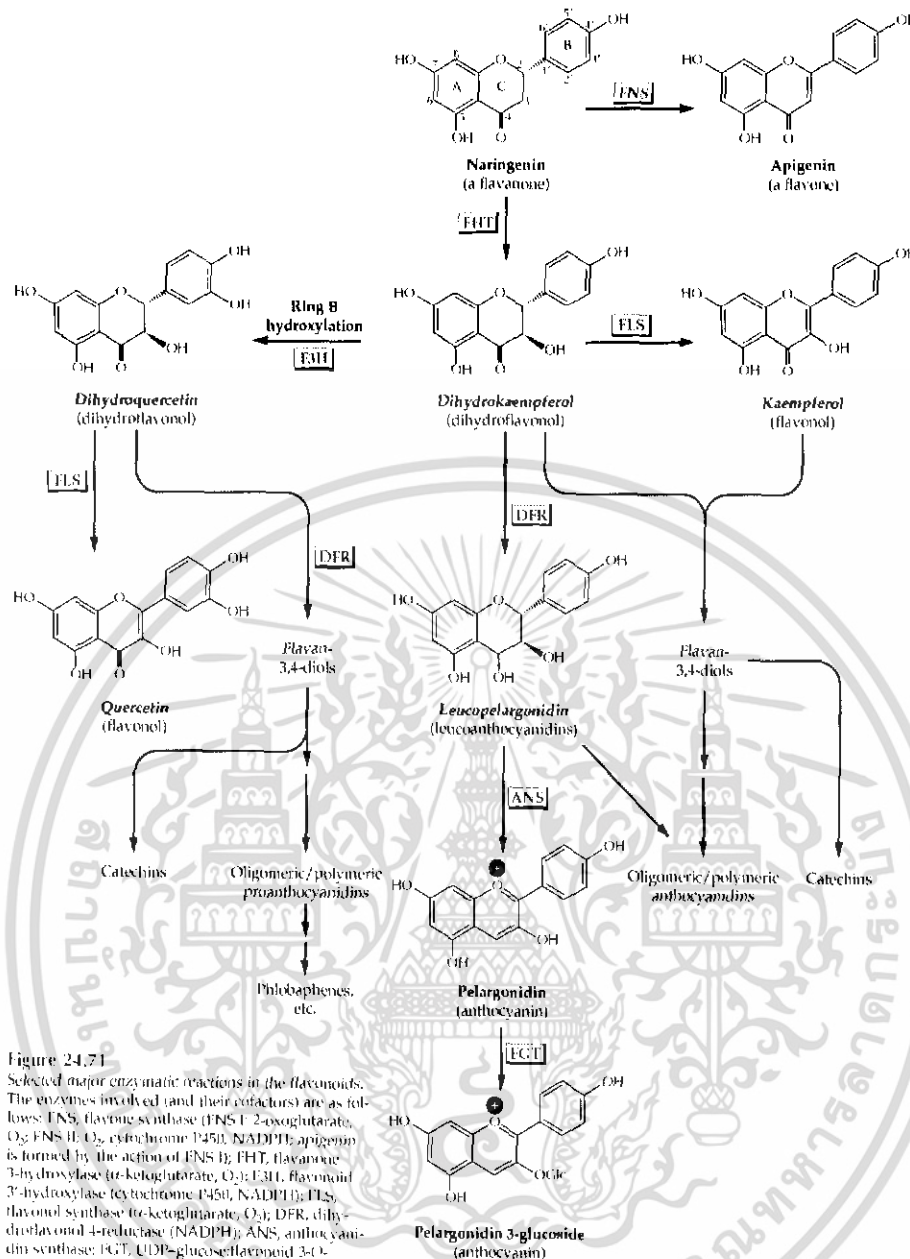


รูปที่ 7 สารในกลุ่มฟเลโวนอยด์โดยใช้น้ำมันงนี้

CHI : chalcone isomerase; IFS : 2-hydroxyisoflavanone synthase; IFD : 2-hydroxyisoflavanone dehydratase; IOMT : isoflavanone O-methyltransferase; IFR : isoflavone reductase; DMI : reductase, 7,2'-dihydroxy-4'-methoxyisoflavanol dehydratase

ที่มา : T.P.Tim Cushnie and Andrew J. Lamb. 2005. International Journal of Antimicrobial Agents 26 หน้า 343-356

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 (ต่อ) วิธีชีวสังเคราะห์ของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยใช้เอนไซม์ดังนี้

FNS : flavone synthase; FHT : flavanone 3-hydroxylase; F3H : flavonoid 3'-hydroxylase; FLS : flavonol synthase; DFR : dihydroflavonol 4-reductase; ANS : anthocyanidin synthase; FGT : UDP-glucose :flavonoid 3-O-glucosyltransferase

ที่มา : T.P.Tim Cushnic and Andrew J. Lamb. 2005. International Journal of Antimicrobial Agents 26 หน้า 343-356

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 หน้าที่และประโยชน์ของสารฟลาโวนอยด์ในพืช

2.4.3.1 ช่วยในการผสมเกสร

การผสมเกสรเป็นพัฒนาเพื่อดำรงพันธุ์ให้คงอยู่ต่อไป โดยการพัฒนาในส่วนของใบ ดอก มีสีอันสวยงามเพื่อช่วยดึงดูดแมลง ซึ่งส่วนของสีที่เกิดขึ้น เป็นผลมาจากสารสีที่มีในสารฟลาโวนอยด์

2.4.3.2 ช่วยป้องกันอันตรายจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต

รังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นรังสีที่มีพลังงานที่สูง เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต โดยจะเข้าขัดขวางการจำลองตัวของดีเอ็นเอ มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนขึ้น หรืออาจถึงขั้นกลายพันธุ์ในธรรมชาติ สารแอนโทไซยานิน ซึ่งอยู่ภายในเซลล์บริเวณรอบนอกของส่วนต่างๆ ของพืชจะคอยดูดซับหรือกรองรังสีอัลตราไวโอเล็ตไว้ ทำให้ดีเอ็นเอที่อยู่ภายในเซลล์ไม่ได้รับอันตราย

2.4.3.3 ใช้ในการจัดหมวดหมู่และจำแนกพันธุ์พืช

เนื่องจากสารฟลาโวนอยด์ในธรรมชาติมีมากมาย นักอนุกรมวิธาน จึงได้นำไปใช้ประโยชน์จากความหลากหลายนี้มาช่วยจำแนกพันธุ์พืช โดยพืชในกลุ่มเดียวกันจะมีสารฟลาโวนอยด์ชนิดเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน

2.4.3.4. ช่วยดูดซับอนุมูลอิสระ

ทำหน้าที่เป็นตัวต้านอนุมูลอิสระในกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในสิ่งมีชีวิต

2.4.3.5 ต่อต้านจุลินทรีย์

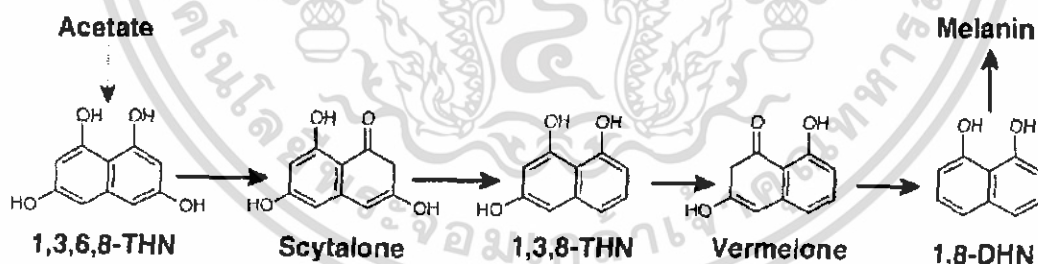
ได้มีการศึกษาทดลองสารกลุ่มฟลาโวนอยด์หลายชนิด พบว่ามีฤทธิ์ต่อต้านและยับยั้งจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น ต่อต้านแบคทีเรีย (Tereshchuk และคณะ, 1980) ต่อต้านเชื้อรา (Harborne และ Williams, 1992) และไวรัส (Li และคณะ, 2000) โดยพบการสะสมของสาร 3-deoxyanthocyanidins ในข้าวฟ่างแสดงลักษณะเป็นพิษต่อเชื้อโรคพืช (Lo, และคณะ, 1998) ข้าวฟ่างสายพันธุ์ที่มี flavan 4-ol สูงสามารถต้านทานเชื้อราได้เพิ่มมากขึ้น (Jambunathan และคณะ, 1990) รูปแบบการสะสมของสารกลุ่มแอนรินเจนิน ในพืชมีผลทำให้โรคไหม้เข้าทำลายได้แตกต่างกัน โดยจะมีผลต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ ซึ่งอาจเป็นเพราะสารมีคุณสมบัติเป็นไลโปฟิลิก (lipophilic) ยังพบว่า สารสกัดแอนโทไซยานินจากข้าวสามารถยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas* ได้ (Padmavati และคณะ, 1997)

2.5 เมลานิน (melanin)

เมลานินจัดเป็นสารทุติยภูมิ ให้สีน้ำตาลถึงสีดำ พบได้ใน พืช สัตว์ เชื้อรา รวมทั้งแบคทีเรีย ซึ่งเกิดจากสารประกอบฟีนอลิก หรืออินโดลิก (indolic) (Bell และ Wheeler, 1986) โดยในเชื้อราบางชนิดเมลานินสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)

อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์เมลานินส่วนใหญ่เกิดจาก 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN) เช่น ในเชื้อราสายพันธุ์ *Alternaria* sp. *Cochliobolus* sp. และ *Magnaporthe* sp. (Henson และคณะ, 1999 ; Kubo และ Furusawa, 1991) โดยมีบทบาทสำคัญในการทำให้เชื้อราอยู่รอดในสภาพที่ไม่เหมาะสม เช่น ต่อด้านอนุมูลอิสระที่พืชสร้างขึ้น เพื่อป้องกันตัวเองจากเชื้อโรค (Romero Martinez และคณะ, 2000) รังสีอัลตราไวโอเล็ต (Kawamura และคณะ, 1997) และต่อด้านเอนไซม์ wall-degrading (Butler และคณะ, 2001)

ในเชื้อรา *Magnaporthe* sp จะสามารถพบกระบวนการสร้างเมลานินได้ในบริเวณ apressorium ซึ่งเมลานินมีความสำคัญในกระบวนการบุกรุก (penetration) เข้าสู่ต้นพืช (Howard และ Ferrari, 1989 ; Kubo และ Furusawa, 1991) โดยเมลานินที่พบในผนังเซลล์ของ apressorium จะมีหน้าที่คล้ายเนื้อเยื่อเลือกผ่าน (semipermeable membrane) โดยยอมให้โมเลกุลที่ไม่มีขั้ว เช่น glycerol ผ่าน แต่ไม่ยอมให้น้ำผ่านเข้าไปได้โดยกระบวนการออสโมซิส (osmosis)



รูปที่ 8 ชีวสังเคราะห์ของสารเมลานิน

ที่มา : Carzaniga, R. 2002. The American Phytopathological Society. หน้า 216-224.

2.6 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง

2.6.1 ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction: PCR; สุรินทร์, 2545)

ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส หรือพีซีอาร์ เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยอาศัยหลักการของการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลอง แต่จะทำปฏิกริยาอย่างต่อเนื่องโดยอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส (DNA polymerase) ในการทำปฏิกริยาร่วมกับการใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะ 2 เส้น ซึ่งมีทิศทางในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเข้าหากันเป็นจุดเริ่มต้นในการสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่ขึ้นมา จุดเด่นของเทคนิคพีซีอาร์ คือ สามารถกำหนดปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจง และเพิ่มปริมาณเป็นล้านๆ เท่าจากดีเอ็นเอเริ่มต้น โดยมีขั้นตอนการทำงานดังรูปที่ 9 โดยการทำงานของเครื่องพีซีอาร์ เริ่มจากการทำให้เสียสภาพ (denaturation) เป็นการทำให้ดีเอ็นเอแยกออกจากกัน จากสายคู่กลายเป็นสายเดี่ยว แล้วจึงทำการเชื่อม (annealing) เป็นการทำให้ไพรเมอร์เข้าไปเกาะบริเวณที่เป็นคู่ผสมกันบนเส้นดีเอ็นเอต้นแบบ และสุดท้ายทำการต่อสาย (extension) เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส (DNA polymerase) จะเริ่มทำงานด้วยการเชื่อมต่อเบสทั้ง 4 ชนิดโดยจะจัด ลำดับการเรียงตัวของเบสตามเบสที่เป็นคู่สมกัน (complementary bases)



Copyright © 2001 by Harcourt, Inc. All rights reserved.

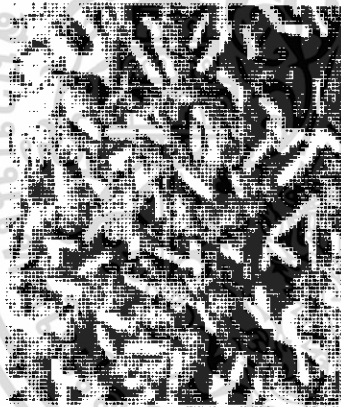
รูปที่ 9 ขั้นตอนการเกิดปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

ที่มา : <http://campus.queens.edu/faculty/jannr/molecular/>

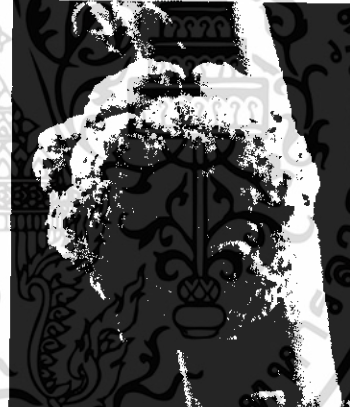
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2 การถ่ายฝากยีน โดยอะโกรแบคทีเรีย (สุรินทร์, 2543)

Agrobacterium เป็นแบคทีเรียแกรมลบซึ่งอยู่ในดิน สามารถบุกรุกเข้าสู่ต้นพืชได้ บริเวณที่มีบาดแผล ทำให้เกิดเป็นปุ่มปม (tumour) หรือก้อนเนื้อตรงจุดนั้น เรียกว่า crown gall disease เนื้อเยื่อดังกล่าวนี้จะสร้างสารพวกโอปีน (opine) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโนที่พบได้ไม่บ่อยนัก สารโอปีนที่เซลล์สร้างขึ้นนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เข้าบุกรุกพืช และสารโอปีนที่เซลล์พืชสร้างขึ้นนี้จะเป็อาหารของแบคทีเรีย *Agrobacterium* นั้นอีก ต่อหนึ่งหลังจากเซลล์พืชเปลี่ยนสภาพ (transformed) ไปเป็นเนื้อเยื่อปุ่มปมและผลิตสารโอปีนแล้วจะไม่ต้องการเชื้อ *Agrobacterium* อีก กลไกที่ทำให้เกิดสภาพเช่นนี้ พบว่ามีสาเหตุมาจากพลาสมิดขนาดใหญ่ประมาณ 140 ถึง 235 กิโลเบส ที่พบใน *Agrobacterium* จึงเรียกพลาสมิดนี้ว่าพลาสมิด Ti (Tumour inducing plasmid) เชื้อ *Agrobacterium* ที่พบพลาสมิดชนิดนี้ คือ *Agrobacterium tumefaciens* เชื้อ *Agrobacterium* อีกชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดรากมากมาย บริเวณที่มีการบุกรุกของแบคทีเรีย คือ *Agrobacterium rhizogenes* ซึ่งมี พลาสมิด Ri (Root inducing plasmid)



(ก)



(ข)

รูปที่ 10 (ก) เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* (ข) เนื้อเยื่อปุ่มปมที่เกิดจากการบุกรุกของ *Agrobacterium tumefaciens*

ที่มา : <http://arabidopsis.info/students/agrobacterium/mechanism.html>

เนื้อเยื่อปุ่มปมที่เกิดจากการบุกรุกของ *Agrobacterium tumefaciens* จะมีดีเอ็นเอบางส่วนของพลาสมิด Ti และแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืชเรียกดีเอ็นเอส่วนนี้ว่า T (transferred) DNA พลาสมิด Ti ที่พบมากมี 2 ชนิด คือ ชนิดออกโทปีน และ โนปลาซิน มีส่วนของ ยีน virulence (vir) gene ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

T-DNA ซึ่งภายในมียีนที่กำหนดการสร้างสารโอปีน ส่วนอื่น ๆ คือ จุดเริ่มต้นการจำลอง โมเลกุล (*ori*) ส่วนที่ควบคุมการส่งถ่ายพลาสมิดโดยวิธีคอนจูเกชัน (*conj*) (*tra*) ยีนที่กำหนดให้เซลล์แบคทีเรียสามารถใช้สารบางชนิดเป็นแหล่งพลังงานได้ ได้แก่ อาจินิน แคตาโบลิซึม (*arginine catabolism; arc*) โนพาลีนแคตาโบลิซึม (*nopaline catabolism; noc*) ออกโตพีนแคตาโบลิซึม (*octopine catabolism; occ*) และอะโกพีนแคตาโบลิซึม (*agropine catabolism; agr*) เมื่อแบคทีเรียส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชแล้ว เซลล์ของพืชบริเวณที่ถูกบุกรุกจึงสามารถสร้างสารโอปีนขึ้นได้ตามชนิดของพลาสมิด Ti นั้น ส่วน *Agrobacterium* ก็สามารถเจริญเติบโตโดยใช้สารโอปีนที่พืชสร้างขึ้นเป็นแหล่งพลังงานได้ เนื่องจากมียีนที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารโอปีนดังกล่าว เมื่อกำจัดแบคทีเรียออกไปพืชจะยังคงสังเคราะห์สารโอปีนได้เนื่อง จาก T-DNA ถูกส่งเข้าไปอยู่ในเซลล์พืชอย่างถาวรใน ส่วนของ T-DNA นอกจากนี้ยังมียีนที่กำหนดการสังเคราะห์สารโอปีนแล้ว ยังมียีนที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนพืชพวกออกซินและไซโตไคนิน เป็นเหตุให้เซลล์พืชที่ได้รับ T-DNA มีการเจริญเติบโตรวดเร็วและไม่จำกัด เกิดเป็นเนื้อเยื่อปมที่ไม้สามารถพัฒนาไปเป็นยอด หรือรากได้

สำหรับกลไกการส่งถ่ายยีน คล้ายกับการส่งถ่ายพลาสมิดในการจับคู่ *conj* ของแบคทีเรีย กระบวนการส่งถ่ายกระตุ้นโดยสารประกอบฟีโนลิกจากพืช คือ อะซิโตไซริงโตน (*acetosyringone; AS*) ซึ่งพืชปล่อยออกมาเนื่องจากเกิดบาดแผล และการส่งถ่ายจะควบคุมโดยยีน *chv* ซึ่งอยู่โครโมโซมของแบคทีเรีย และ *vir* gene ที่อยู่บนพลาสมิด Ti โดย T-DNA จะถูกตัดโดยเอนไซม์ซึ่งเป็นผลผลิตของยีน *vir* D ที่ขอบเขตทั้งสองข้าง แล้วจึงส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชในแบบดีเอ็นเอสายเดี่ยว ทิศทางการส่งถ่ายเริ่มจากขอบเขตทางขวา (RB) ไปเรื่อยๆ ส่วน RB นี้เป็นส่วนที่จำเป็นมากสำหรับการส่ง T-DNA ส่วนขอบเขตทางซ้าย (LB) ทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดปลายของชิ้นดีเอ็นเอที่จะส่งเท่านั้น แม้ว่าไม่มีส่วน LB การส่ง T-strand ก็เกิดขึ้นได้ แต่จะมีขนาดไม่แน่นอนเพราะการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ทางปลายจะเป็นแบบสุ่ม

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 การตรวจสอบปริมาณสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์

3.1.1 การเก็บตัวอย่างต้นข้าว ของสายพันธุ์ที่ต้านทาน และไม่ต้านทาน ต่อโรคไหม้

สำหรับสายพันธุ์ข้าวที่ทำการเก็บตัวอย่าง เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานโรคไหม้ ได้แก่ สายพันธุ์ปทุมธานี 60 และสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคไหม้ ได้แก่ สายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ซึ่ง ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ ได้เก็บตัวอย่างมาจากแปลงที่นาในเขตลาดกระบัง สำหรับการเก็บตัวอย่าง จะเก็บตัวอย่างจากใบข้าวที่มีลักษณะปรกติ และที่มีบาดแผลที่เกิดจากการทำลายของเชื้อรา โรคไหม้ของข้าวแต่ละสายพันธุ์ เก็บตัวอย่างในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งไว้ภายใน เพื่อรักษา สภาพของใบพืช แล้วจึงนำเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการทดลอง

3.1.1 การสกัดสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์

เพื่อการตรวจสอบและเปรียบเทียบปริมาณสารในกระบวนการชีวสังเคราะห์ ของสาร ในกลุ่มเฟลโวนอยด์ ของข้าวสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทาน และสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคไหม้ โดยการบดใบข้าวด้วยสารละลายไนโตรเจนเหลว แล้วจึงสกัดด้วยสารละลายผสมของกรด ไฮโดรคลอริกกับเมทานอล และน้ำ (ภาคผนวก ข)

3.1.2 การตรวจสอบปริมาณสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์

การตรวจสอบปริมาณสารแต่ละตัวในกลุ่มเฟลโวนอยด์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ช่วงความยาวคลื่นต่างๆ ของสารแต่ละชนิดในกลุ่มเฟลโวนอยด์ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโต มิเตอร์ แล้วจึงเปรียบเทียบปริมาณสาร โดยประมาณ ของข้าวสายพันธุ์ที่ต้านและไม่ต้านทาน โรคไหม้ ใช้ระดับความเข้มข้นสารสกัด 10.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ภาคผนวก ง)

3.2 การโคลนยีนและการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ

3.2.1 การโคลนยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

การทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนที่ต้องการ ได้แก่ ยีน *chs* ซึ่งถอดรหัสและแปลรหัสให้เอนไซม์ chalcone synthase โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับใช้เพิ่มปริมาณยีนดังกล่าว ซึ่งมีปฏิกิริยาของการทำพีซีอาร์ดังนี้

ยีน <i>chs</i> จากต้น <i>Perilla frutescens</i>	1.00	ไมโครลิตร
10X ExTaq buffer	5.00	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์	5.00	ไมโครลิตร
dNTP	1.00	ไมโครลิตร
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์	1.00	ไมโครลิตร
รีเวิร์สไพรเมอร์	1.00	ไมโครลิตร
แทคทีเอ็นเอพอลิเมอเรส (Taq DNA polymerase)	0.40	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออนที่ฆ่าเชื้อแล้ว	35.60	ไมโครลิตร

สำหรับสถานะในการทำปฏิกิริยาของพีซีอาร์ คือ การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพตามธรรมชาติ (denaturing) โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นให้ไพรเมอร์เข้าจับกับสายดีเอ็นเอเป้าหมาย (annealing) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และการเข้าเติมสายดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ โดยการทำงานของเอนไซม์แทคทีเอ็นเอพอลิเมอเรส (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสดังนี้

ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ 5'-CGGGAT CCA TGG TGA CCG TYG AGG ACA-3'

รีเวิร์สไพรเมอร์ 5'-CGGGAT CCT CAA TTA TTA ATC GGG ACG-3'

โดย Y หมายถึง C และ T

นำส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณไปตรวจสอบขนาดโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรส และทำให้บริสุทธิ์ (ภาคผนวก ข)

3.2.2 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ (ligation)

การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยการทำพีซีอาร์ ที่ทำการตรวจสอบขนาดแล้ว เข้ากับเวกเตอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณในแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งเวกเตอร์ที่ใช้คือ pGEM ที่มีปฏิกิริยาของการเชื่อมต่อ ดังนี้

ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์	5.00	ไมโครลิตร
เวกเตอร์ pGEM	1.00	ไมโครลิตร
10 ligation buffer	1.00	ไมโครลิตร
เอ็นไซม์ดีเอ็นเอไลเกส ชนิด T4 (3 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1.00	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออนที่ฆ่าเชื้อแล้ว	2.00	ไมโครลิตร
บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง		

จากนั้นทำการถ่ายโอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เชื่อมต่ออยู่กับเวกเตอร์ pGEM เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ โดยวิธีการ heat-shock (ภาคผนวก ข) เพื่อเพิ่มปริมาณของยีน *chs* ในเซลล์เจ้าบ้าน (host) ได้แก่เซลล์ของแบคทีเรีย *E.coli* ที่ทำการเตรียมพร้อม หรือคอมพีเทนต์เซลล์ (ภาคผนวก ข) และคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับส่วนของพลาสมิด ซึ่งมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแทรก โดยการคัด เลือกลงในอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก ก) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน IPTG และ X-gal สเปรดสารแขวนลอยเซลล์ที่ทำการถ่ายโอนพลาสมิด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการสกัดพลาสมิดที่คัดเลือก (ภาคผนวก ข) ตรวจสอบ พลาสมิดที่สกัดได้คดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส เพื่อนำศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2.3 การคัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแทรกอยู่

โดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ชนิด *Bam*HI แล้วจึงนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตัดได้ไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส เพื่อเปรียบเทียบขนาด กับดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยมีสภาวะการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้

10X buffer E	1.00	ไมโครลิตร
เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ชนิด <i>Bam</i> HI (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.15	ไมโครลิตร
พลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือก	2.00	ไมโครลิตร
BSA	0.10	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออนที่ฆ่าเชื้อแล้ว	6.75	ไมโครลิตร

3.2.4 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอ กับ *Agrobacterium* expression vector

นำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตรวจสอบแล้ว เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pBI121 และ pHTT202 โดยมีปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดังนี้

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว	3.00	ไมโครลิตร
เวกเตอร์ pBI121 หรือ pHTT202	2.00	ไมโครลิตร
10X ligation buffer	1.00	ไมโครลิตร
เอ็นไซม์ดีเอ็นเอไลเกส ชนิด T4	1.00	ไมโครลิตร

(3 ยูนิตต่อไมโครลิตร)

น้ำปราศจากไอออนที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3.00 ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

จากนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาณ โดยการถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อเข้าสู่ *E. coli* ทำการคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร LB (ภาคผนวก ก) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน แล้วจึงสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกได้ (ภาคผนวก ข)

3.2.5 การตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในพลาสมิด

การตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิด โดยการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ นำมาคำนวณขนาดดีเอ็นเอที่ได้เทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยมีสภาวะการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้

10X buffer E	1.00	ไมโครลิตร
เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ชนิด <i>HindIII</i>	0.10	ไมโครลิตร

(15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)

พลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือก	3.00	ไมโครลิตร
BSA	0.10	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออนที่ฆ่าเชื้อแล้ว	5.80	ไมโครลิตร

นำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่แยกออกจากพลาสมิดได้ไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน เพื่อทำการตรวจสอบทิศทางการต่อของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับโปรโมเตอร์ (sense, antisense) จากนั้นแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส แล้วทำให้บริสุทธิ์ (ภาคผนวก ข)

3.2.6 การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

ถ่ายโอนพลาสมิด pBI121 และ pHTT202 ที่มีส่วนของยีน *chs* แทรกอยู่ในบริเวณของ T-DNA เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 สำหรับพลาสมิด pBI121 และสายพันธุ์ C58C1PGV3850 สำหรับพลาสมิด pHTT202 นำอะโกรแบคทีเรียที่ได้ถ่ายโอนเข้าสู่ต้นยาสูบ (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ศึกษาการยับยั้งเชื้อราโรคไหม้ของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *chs*

เพื่อศึกษาผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Pyricularia grisea* Sacc. ที่ก่อให้เกิดโรคไหม้ในสายพันธุ์ข้าว โดยได้ศึกษาจากผลการยับยั้งของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *chs* หรือยีน *dhf* เปรียบเทียบกับต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน ซึ่งการทดลองโดยการนำไปยาสูบที่ทั้งที่ได้รับการถ่ายโอนยีน และไม่ได้รับการถ่ายโอนยีนมาบด แล้วผสมรวมกับอาหาร PDA (ภาคผนวก ก) ที่ระดับความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร จากนั้นตัดปลายเส้นใยของเชื้อรา นำมาเลี้ยงในอาหารดังกล่าว ติดตามผลการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยและเมลานินนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบค่าทางสถิติ โดยใช้การทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับค่าเฉลี่ยของประชากร 2 กลุ่ม (t-test)

3.4 การศึกษาการแสดงออกของยีน *chs*

การศึกษาการแสดงออกของยีน *chs* ที่ตอบสนองต่อการเกิดโรคไหม้ ของสายพันธุ์ข้าวที่ต้านและไม่ต้านทานต่อโรคไหม้โดยการสกัดอาร์เอ็นเอจากใบข้าว (ภาคผนวก ข) เพื่อนำมาสร้างเป็นสายซีดีเอ็นเอ (cDNA) ในการใช้เป็นแม่แบบเพื่อทำ RT-PCR โดยใช้อาร์เอ็นเอ ปริมาณ 5 ไมโครกรัม oligo (dT)₂₀ primer ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร annealing buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ได้ 8 ไมโครลิตร ด้วยน้ำ DEPC นำแต่ละหลอดที่ผสมสารครบทุกชนิด ทำตามขั้นตอนดังนี้

- 3.4.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำลงแช่บนน้ำแข็งทันที
- 3.4.2 เติมสารละลาย 2X First-strand reaction mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลง ตามด้วยสารละลาย Super script III / RNase OUT enzyme mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลอด ผสมให้สารเข้ากัน
- 3.4.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดการทำปฏิกิริยา เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

จากนั้นนำสาย cDNA ที่ได้ทำพีซีอาร์ เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *chs* ที่ตอบสนองต่อเชื้อราโรคไหม้ในข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 60 และสุพรรณบุรี 60 โดยมีสภาวะการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้

สาย cDNA	3.00	ไม่โครลิตร
10X ExTaq buffer	5.00	ไม่โครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์	5.00	ไม่โครลิตร
dNTP	1.00	ไม่โครลิตร
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์	1.00	ไม่โครลิตร
รีเวิร์สไพรเมอร์	1.00	ไม่โครลิตร
แทคตีเอ็นเอพอลิเมอเรส	0.30	ไม่โครลิตร
น้ำปราศจากไอออนที่ฆ่าเชื้อแล้ว	33.70	ไม่โครลิตร

สำหรับสภาวะในการทำปฏิกิริยาของพีซีอาร์ คือ การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพตามธรรมชาติ โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นให้ไพรเมอร์ เข้าจับกับสายดีเอ็นเอเป้าหมาย ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และการเข้าเติมสายดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ โดยการทำงานของเอ็นไซม์แทคตีเอ็นเอพอลิเมอเรส ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที โดยใช้ไพรเมอร์ ที่มีลำดับเบสดังนี้

ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์
 5' -A(A/G)CGCATGTG(C/T)GA(C/T)AA(A/G)TC(A/G/T)A(C/T)(A/G)AT- 3'

รีเวิร์สไพรเมอร์
 5' - CA(A/C/G/T)GC(A/G)CT(A/C/T)GACAT(A/G)GT(G/T)CC(A/G)TA(C/T)TC- 3'

นำส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ไปตรวจสอบขนาดโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

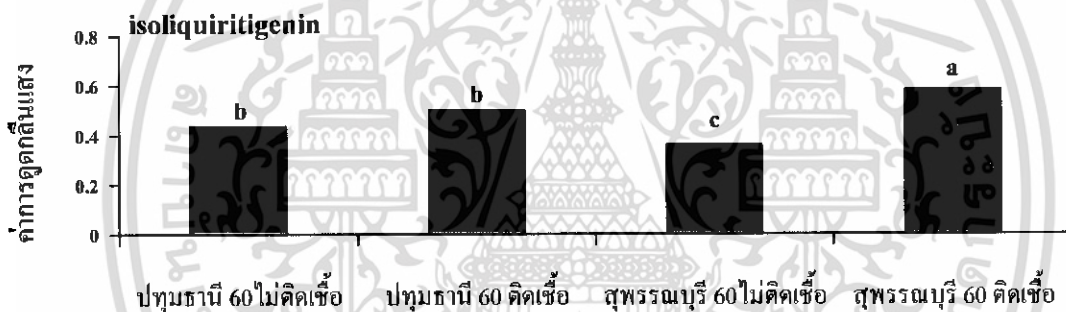
บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 ผลการตรวจสอบปริมาณสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์

4.1.1 ผลการตรวจสอบปริมาณสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์

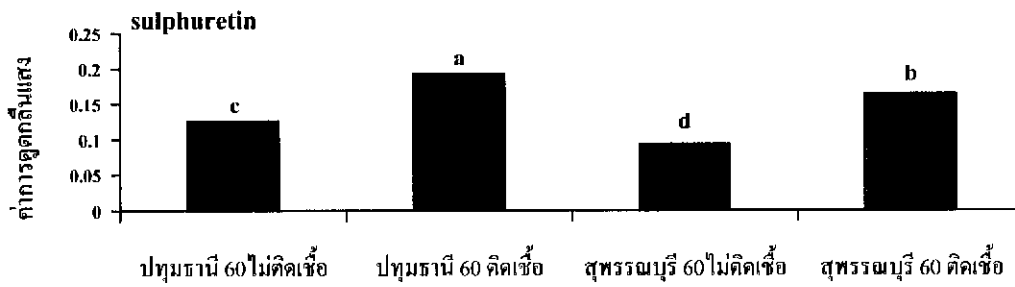
นำสารสกัดจากใบข้าวสาลีพันธุ์ปทุมธานี 60 (ไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้) และสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 (ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้) ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ วัดค่าการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบกับต้นปกติ ผลปรากฏว่าสารสกัดในใบข้าวสาลีพันธุ์ปทุมธานี 60 ที่ติดและไม่ติดเชื้อราโรคไหม้ ให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารไอโซลิกวิลิทิจินิน (isoliquiritigenin) ไม่แตกต่างกัน ส่วนในข้าวสาลีพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้อย่างมีนัยสำคัญ ดังรูปที่ 11



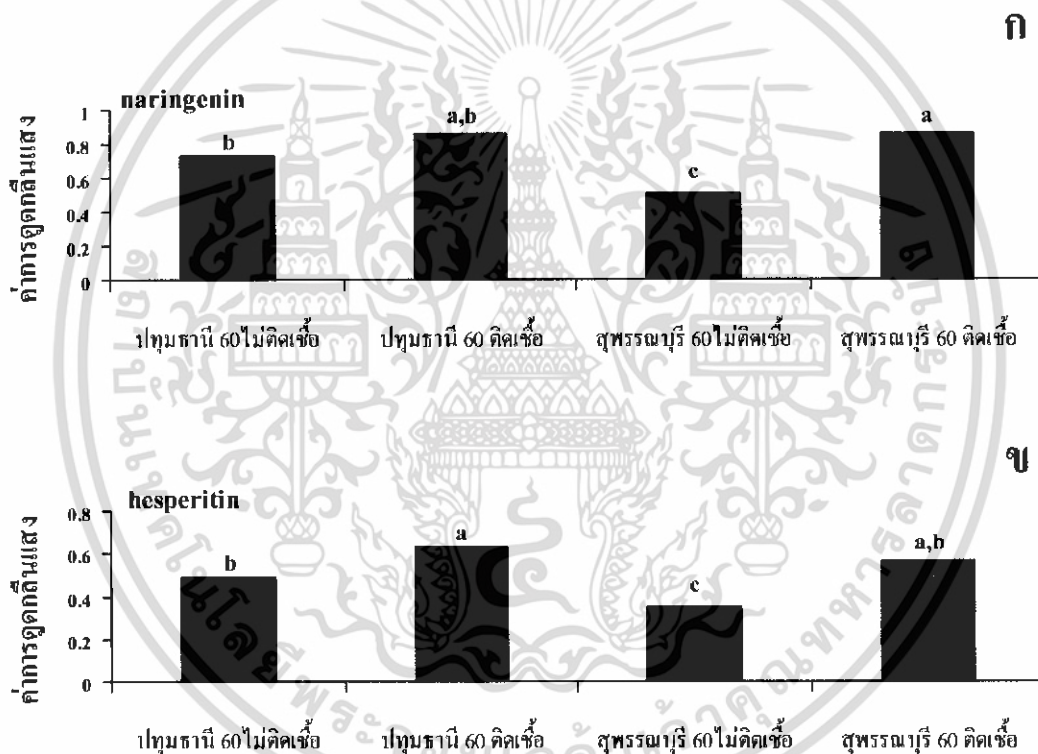
รูปที่ 11 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มแซลโคน (ไอโซลิกวิลิทิจินิน) ที่ความยาวคลื่น 372 นาโนเมตร โดยใช้สารสกัดจากใบข้าวที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

สำหรับสารซัลฟูเรติน (sulphuretin) พบว่าสารสกัดในข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 12) ส่วนสารในกลุ่มฟลาโวนอน พบว่าสารนารินเจนนิน พบว่าสารสกัดจากข้าวสาลีพันธุ์ปทุมธานี 60 ให้ค่าการดูดกลืนแสงไม่แตกต่างกัน ระหว่างข้าวที่ติดและไม่ติดเชื้อราโรคไหม้ ในขณะที่สารสกัดจากข้าวสาลีพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 13 ก) ส่วนสารเฮสเปอร์ริติน (hesperitin) พบว่าสารสกัดในข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 13 ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



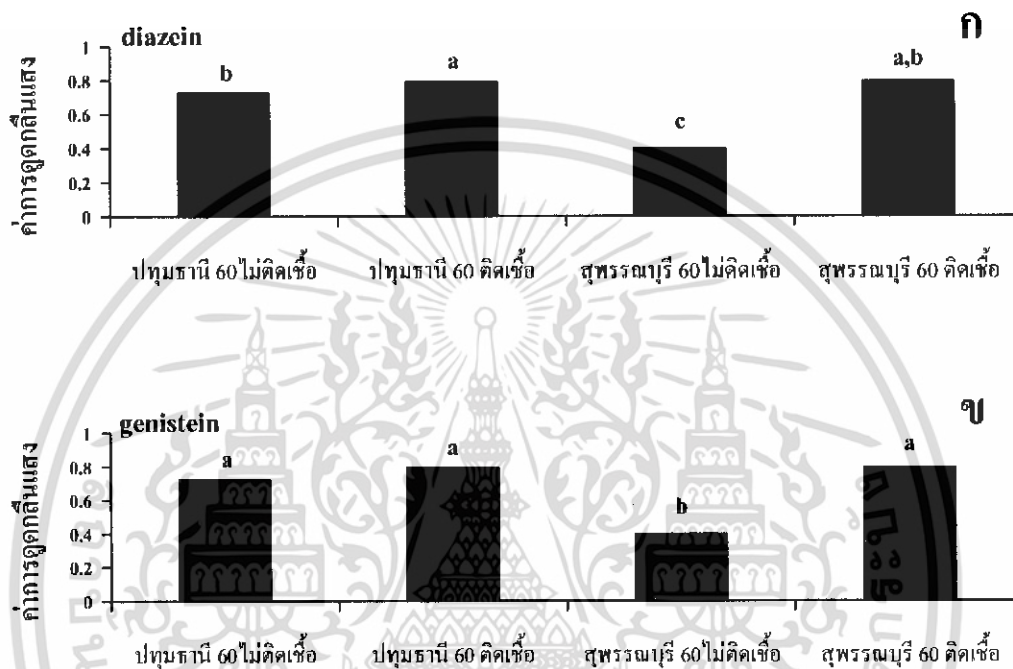
รูปที่ 12 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มออโรน (ซัลฟูเรติน) ที่ความยาวคลื่น 399 นาโนเมตร โดยใช้สารสกัดจากใบข้าวที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 13 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มฟลาโวน ได้แก่ นารินจีนิน ที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร (ก) และเฮสเพอริติน ที่ความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร (ข) โดยใช้สารสกัดจากใบข้าวที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

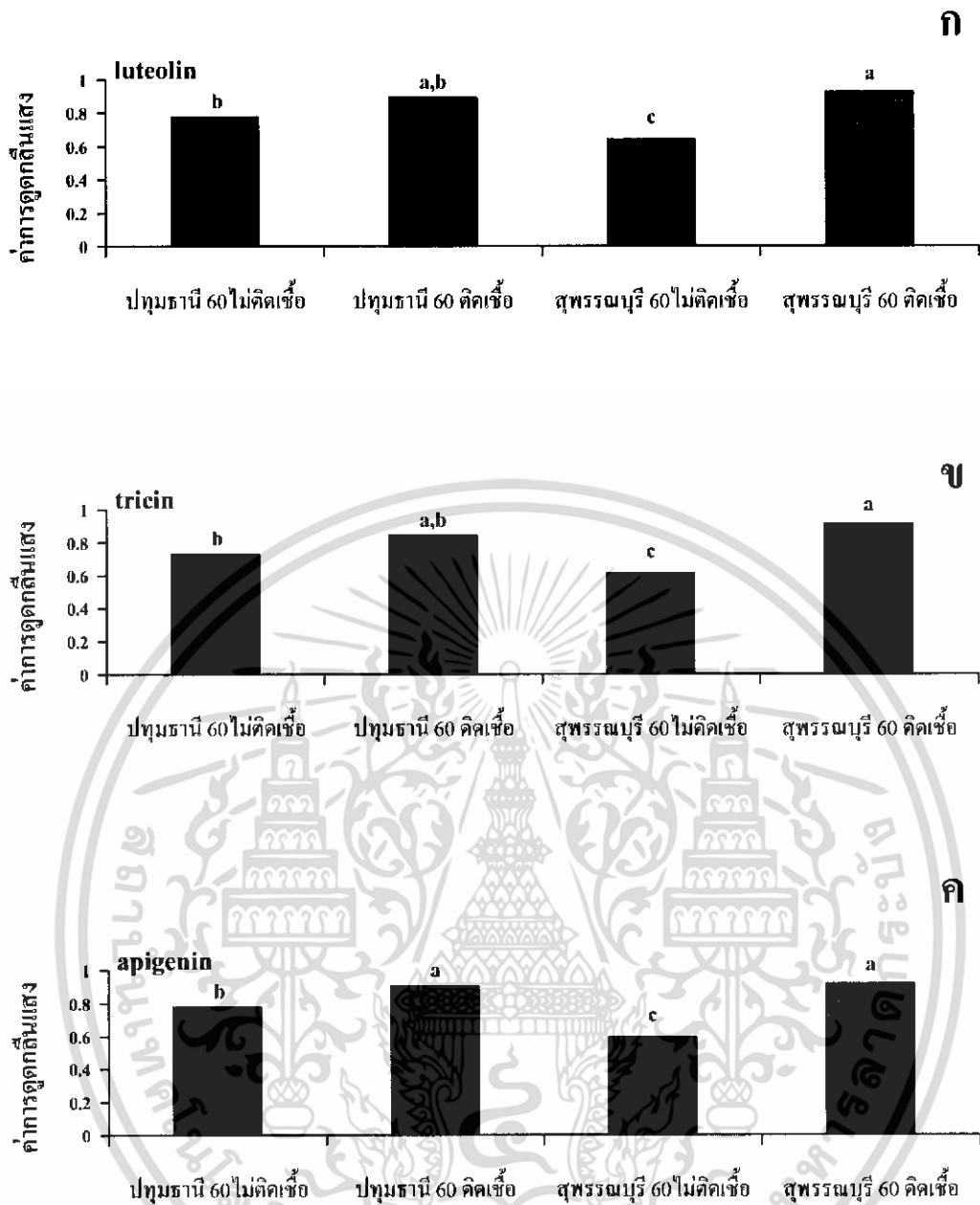
สำหรับสารในกลุ่มไอโซฟเลโวน พบว่าสารไดอะซีน (diazcin) จากสารสกัดในข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้ อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 14 ก) ส่วนสารเจนนิสทิน (genistein) พบว่าสารสกัดจากข้าวสายพันธุ์ ปทุมธานี 60 ให้ค่าการดูดกลืนแสงไม่แตกต่างกัน ระหว่างข้าวที่ติดและไม่ติดเชื้อราโรคไหม้ ในขณะที่สารสกัดจากข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ให้ค่าการดูดกลืนแสง มากกว่าข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 14 ข)



รูปที่ 14 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มไอโซฟเลโวน ได้แก่ ไดอะซีน ที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร (ก) และเจนนิสทิน ที่ความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร (ข) โดยใช้สารสกัดจากใบข้าวที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

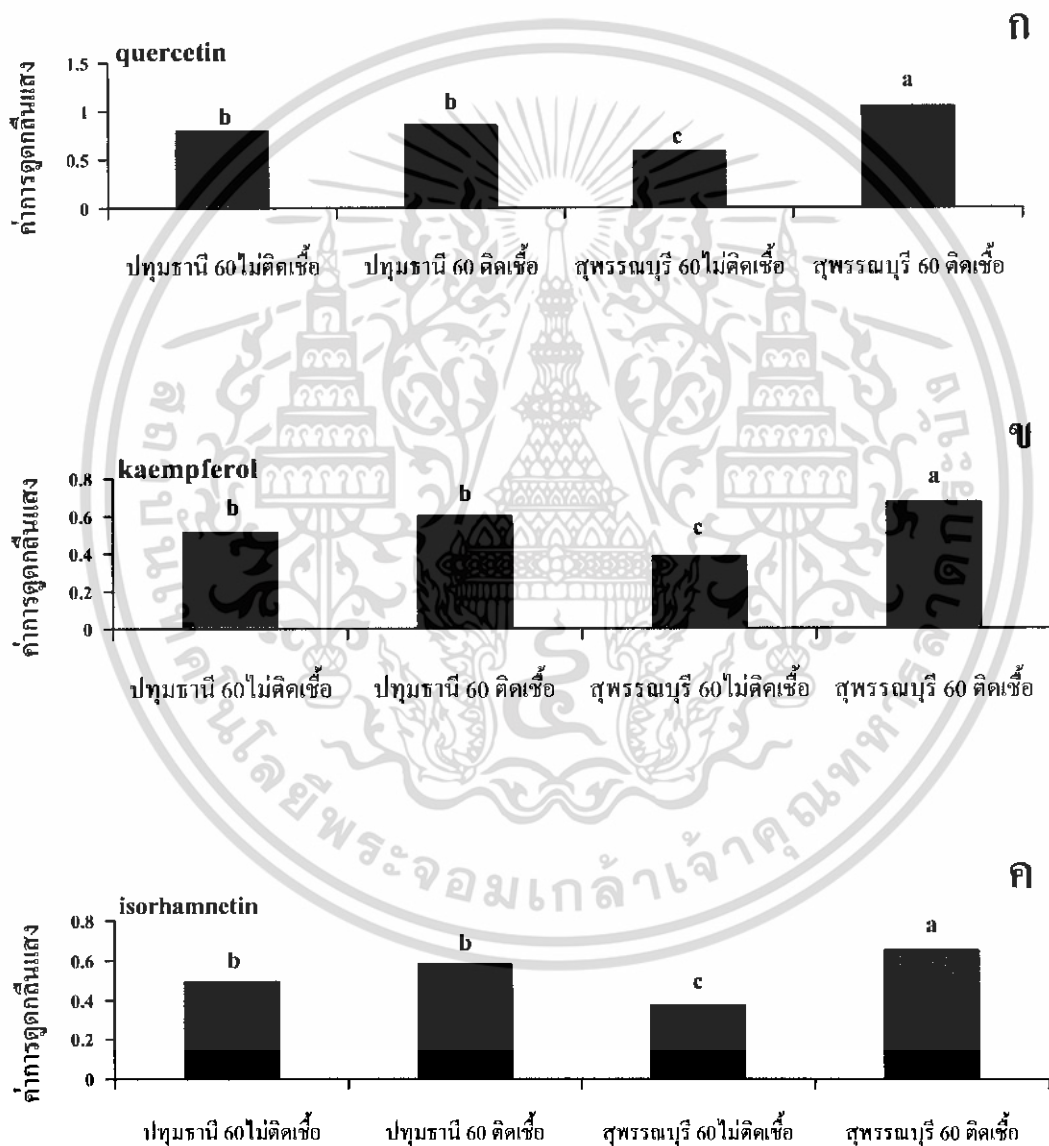
ขณะที่สารในกลุ่มฟเลโวน พบว่าสาร ลูทีโอลิน (luteolin) และ ไทรซิน (tricin) จากสารสกัดในข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 60 ให้ค่าการดูดกลืนแสงไม่แตกต่างกัน ระหว่างข้าวที่ติดและไม่ติดเชื้อราโรคไหม้ ในขณะที่สารสกัดจากข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 15 ก และ ข) ส่วนสารอะพิจินิน (apigenin) พบว่าสารสกัดในข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ จะให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าสายพันธุ์ที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 15 ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

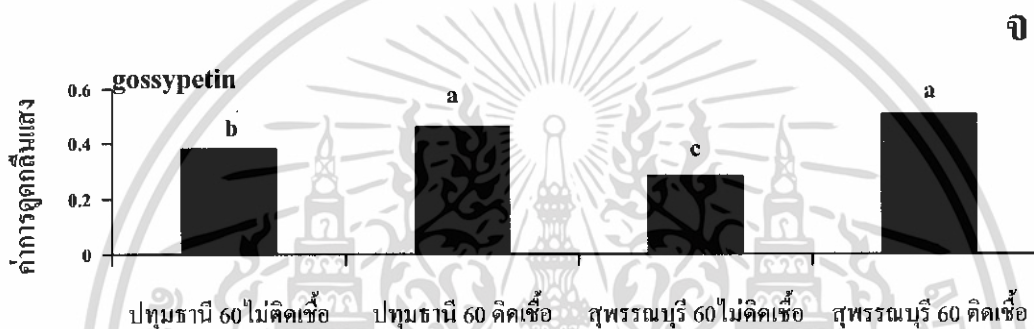
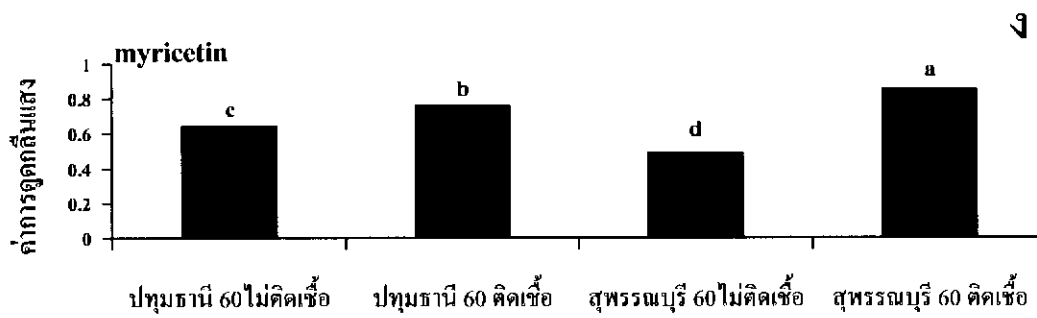


รูปที่ 15 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มฟลาโวน ได้แก่ ลูทีโอลินที่มีความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร (ก) ไทรซิน ที่ความยาวคลื่น 355 นาโนเมตร (ข) และอะพิจินินที่มีความยาวคลื่น 336 นาโนเมตร (ค) โดยใช้สารสกัดจากใบข้าวที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

สำหรับสารในกลุ่มฟลาโวนอล นั้นพบว่าในข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 60 ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารเคอควิซีน เกเอ็มเฟอร์อล และไอโซรามาเนติน (isorhamnetin) ไม่แตกต่างกับข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้ (รูปที่ 16 ก ข และ ค) ในขณะที่สารสกัดจากข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 16 ง) ส่วนสาร เมอร์ซิเดติน และกอสซิปิติน (gossypetin) จากสารสกัดในข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 16 จ และ ฉ)

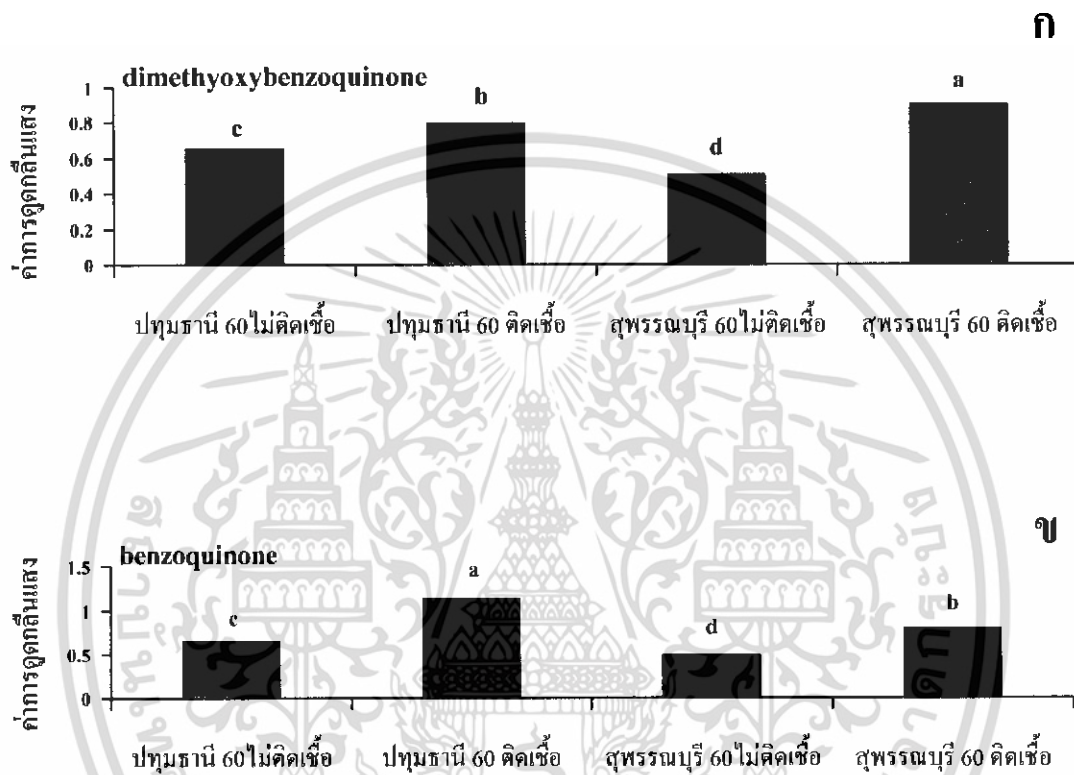


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



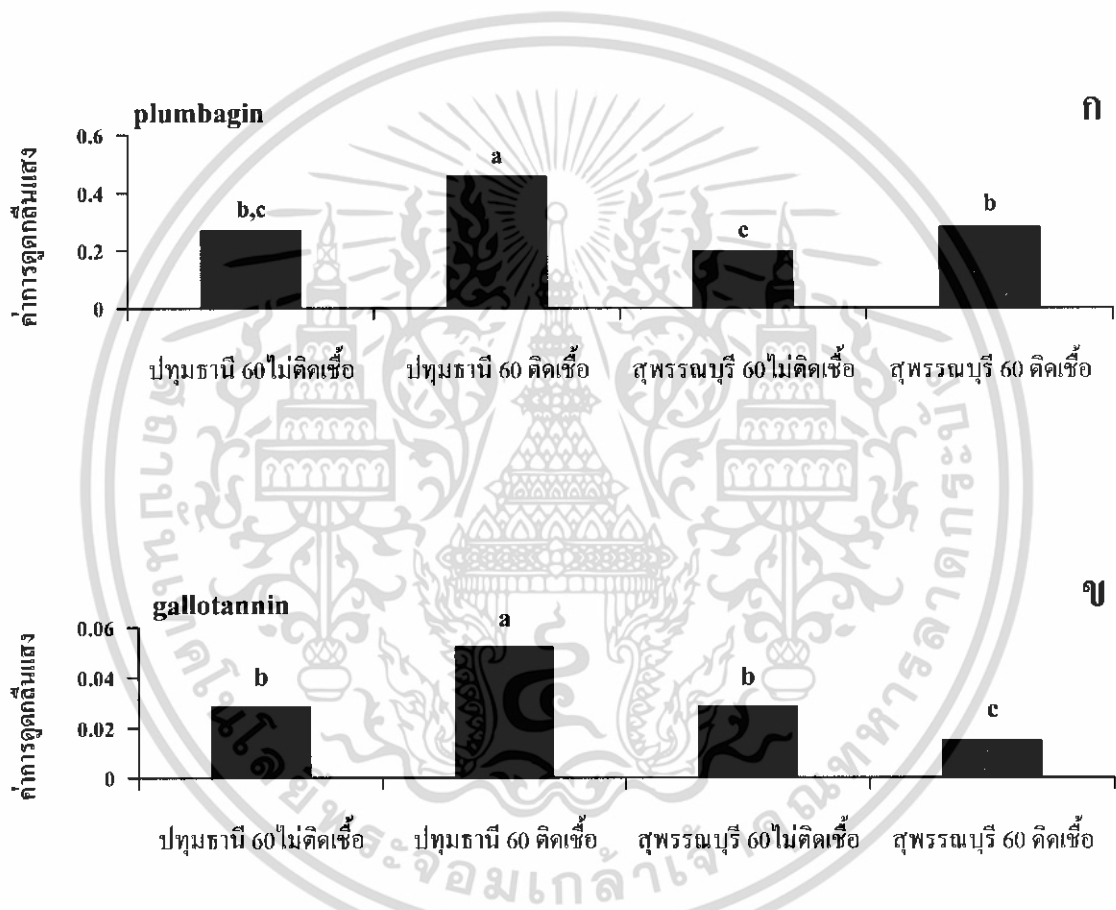
รูปที่ 16 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ เควอซีตินที่ความยาวคลื่น 374 นาโนเมตร (ก) โดยใช้สารสกัดจากใบข้าวที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เคเอ็มเฟอร์อล ที่ความยาวคลื่น 368 นาโนเมตร (ข) และไอโซเรมณิดิน ที่ความยาวคลื่น 369 นาโนเมตร (ค) โดยใช้สารสกัดจากใบข้าวที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมอร์เซติน ที่ความยาวคลื่น 378 นาโนเมตร (ง) และ กอสซิปีติน ที่ความยาวคลื่น 386 นาโนเมตร (จ) โดยใช้สารสกัดจากใบข้าวความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน คือ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.5

ส่วนสารในกลุ่มเบนโซควิโนน (benzoquinone) ได้แก่ สารไดเมททิลออกซิเบนโซควิโนน(dimethoxybenzoquinone) และเบนโซควิโนน (benzoquinone) นั้นพบว่าสารสกัดจากข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 17 ก และ ข)



รูปที่ 17 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มเบนโซควิโนน ได้แก่ ไดเมททิลออกซิเบนโซควิโนน ความยาวคลื่น 377 นาโนเมตร (ก) โดยใช้สารสกัดจากใบข้าวที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน เบนโซควิโนน ที่ความยาวคลื่น 406 นาโนเมตร (ข) โดยใช้สารสกัดจากใบข้าวที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

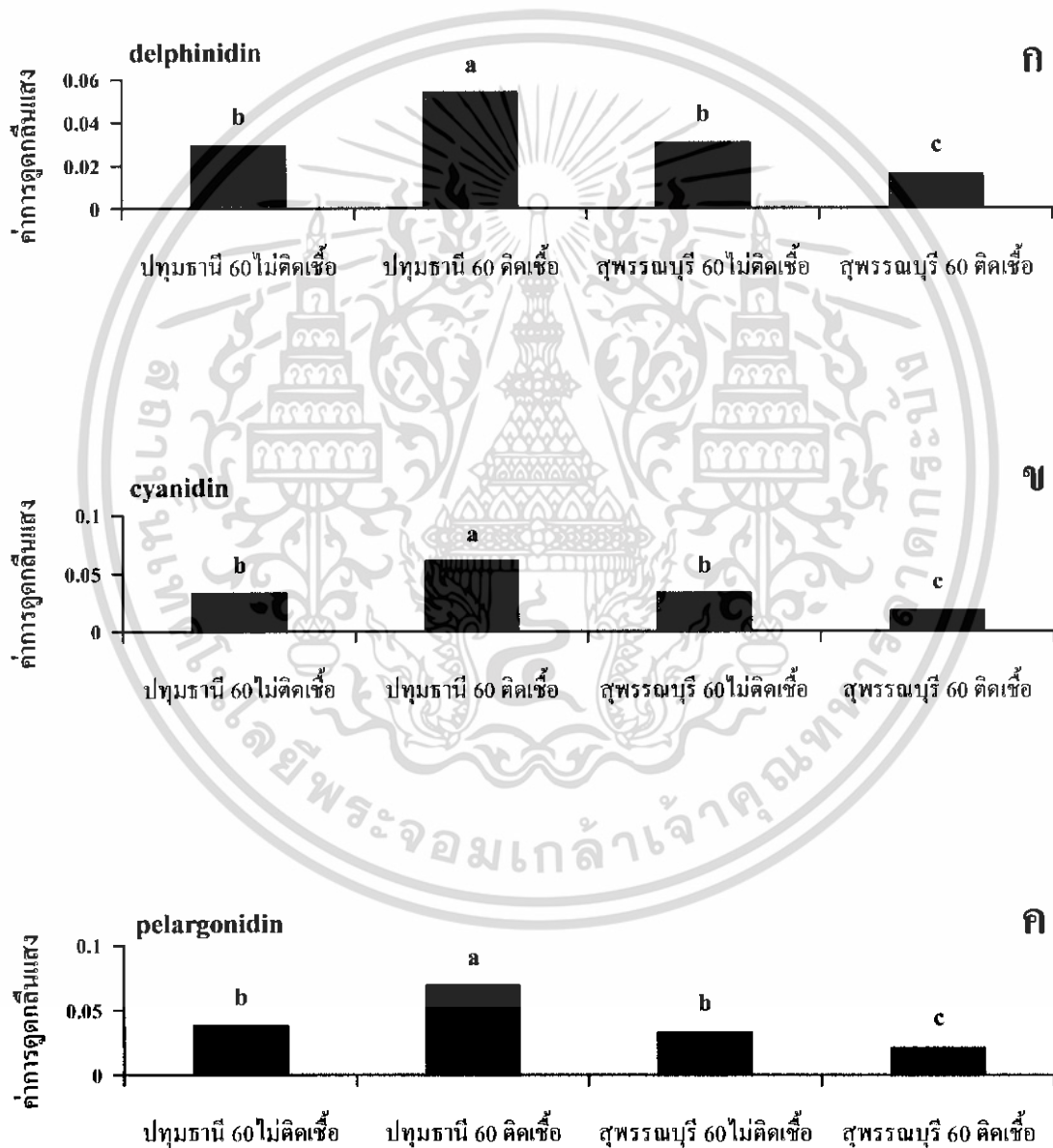
ส่วนสารในกลุ่มแนฟทาควิโนน (naphthaquinone) นั้นพบว่าสารสกัดจากข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ ให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารพลัมเบกิน (plumbagin) มากกว่าข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 18 ก) ในขณะที่สารในกลุ่มแทนนิน ได้แก่ กัลโลแทนนิน (gallotannin) มีค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำมาก โดยสารสกัดจากข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 60 ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนสารสกัดจากข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่น้อยกว่าข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 18 ข)



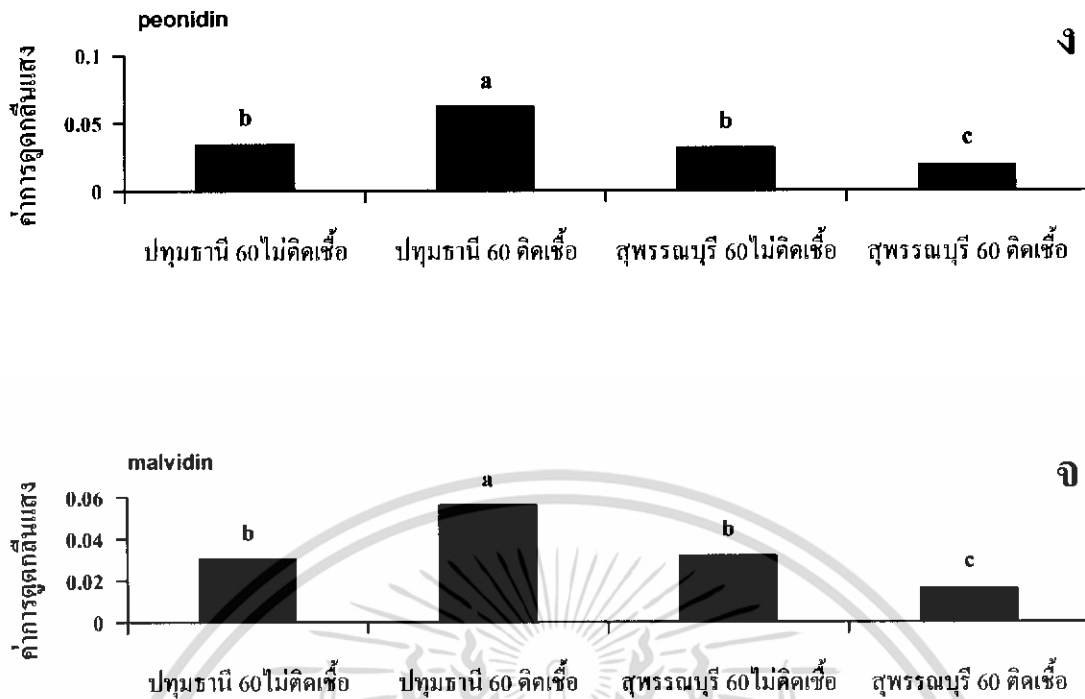
รูปที่ 18 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มแนฟทาควิโนน ได้แก่ พลัมเบกิน ที่ความยาวคลื่น 418 นาโนเมตร (ก) และสารในกลุ่มแทนนิน ได้แก่ กัลโลแทนนิน ที่ความยาว คลื่น 550 นาโนเมตร (ข) โดยใช้สารสกัดจากใบข้าวที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารในกลุ่มแอนโทไซยานิน ได้แก่ เดลฟินิดิน (delphinidin) ไซยานิดิน (cyanidin) เพลาโกนิดิน (pelargonidin) พิโอนิดิน (peonidin) และมาลวิดิน (malvidin) พบว่าสารสกัดจากข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำมาก โดยสารสกัดจากข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 60 ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนสารสกัดจากข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่ติดเชื้อราโรคไหม้กลับให้ค่าการดูดกลืนแสงที่น้อยกว่าข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 19 ก ข ค ง และ ฉ)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

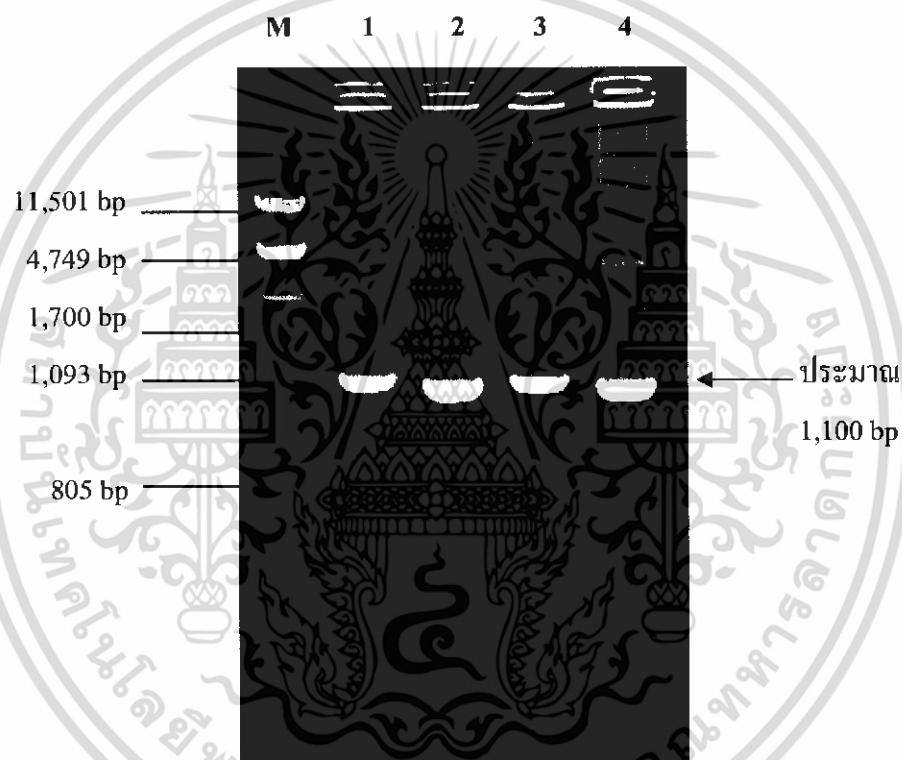


รูปที่ 19 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน ได้แก่ เดลฟินิดินที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร (ก) ไซยานิดินที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร (ข) เฟลาโณนิน ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ฟิโอนิน ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร (ค) และ มอลวิดิน ที่ความยาวคลื่น 542 นาโนเมตร (ง) โดยใช้สารสกัดจากใบข้าวที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติจากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

4.2 ผลการโคลนยีนและการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ

4.2.1 ผลการโคลนยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

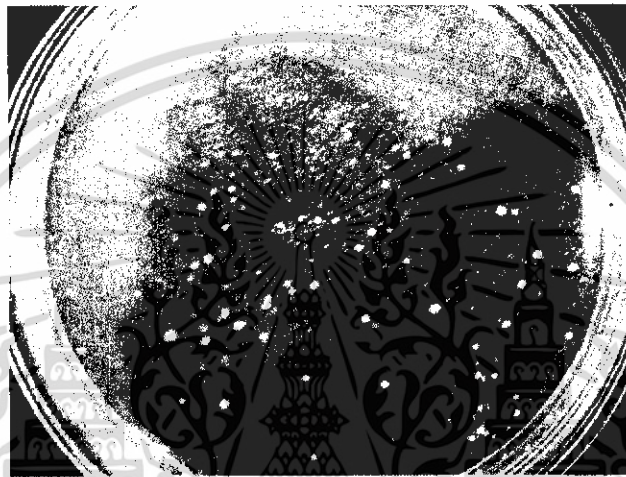
การทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนที่ควบคุม ได้แก่ *chs* ซึ่งตรวจผลการทำพีซีอาร์โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1.00 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นำไปเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส ดังรูปที่ 14 จึงคาดว่าชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวน่าจะเป็นส่วนของยีน *chs* ที่มีขนาด 1,173 กิโลเบส ซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้จาก GenBank



รูปที่ 20 แสดงผลของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *chs* ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (หมายเลข 1 2 3 และ 4 คือชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *chs* และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

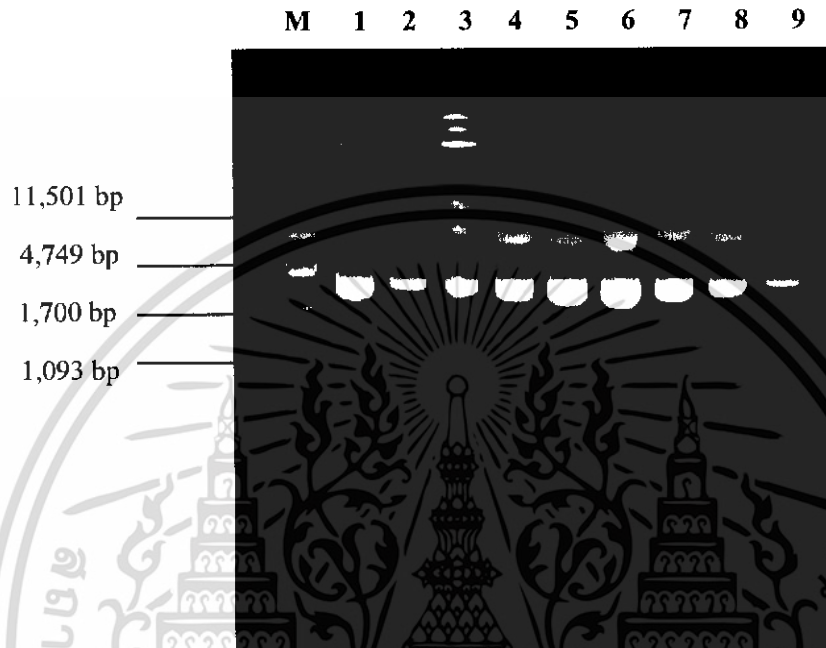
4.2.2 ผลการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ pGEM ที่เข้าสู่ *E. coli* และการคัดเลือกโคโลนี

ผลการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์กับเวกเตอร์ pGEM ที่เข้าสู่ *E. coli* และทำการคัดเลือกโคโลนี ที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดย การเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนยีนบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน IPTG และ X-gal ซึ่งโคโลนีที่มีสีขาวแสดงว่า เซลล์ *E. coli* ได้รับการถ่ายโอนชิ้นส่วนของยีน *chs* เข้าสู่เวกเตอร์ pGEM ในตำแหน่งที่ถูกต้องเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด pGEM จะสามารถเจริญได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ได้ผลดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 โคโลนีของ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนชิ้นส่วนของยีน *chs* เข้าสู่เวกเตอร์ pGEM บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน IPTG และ X-gal

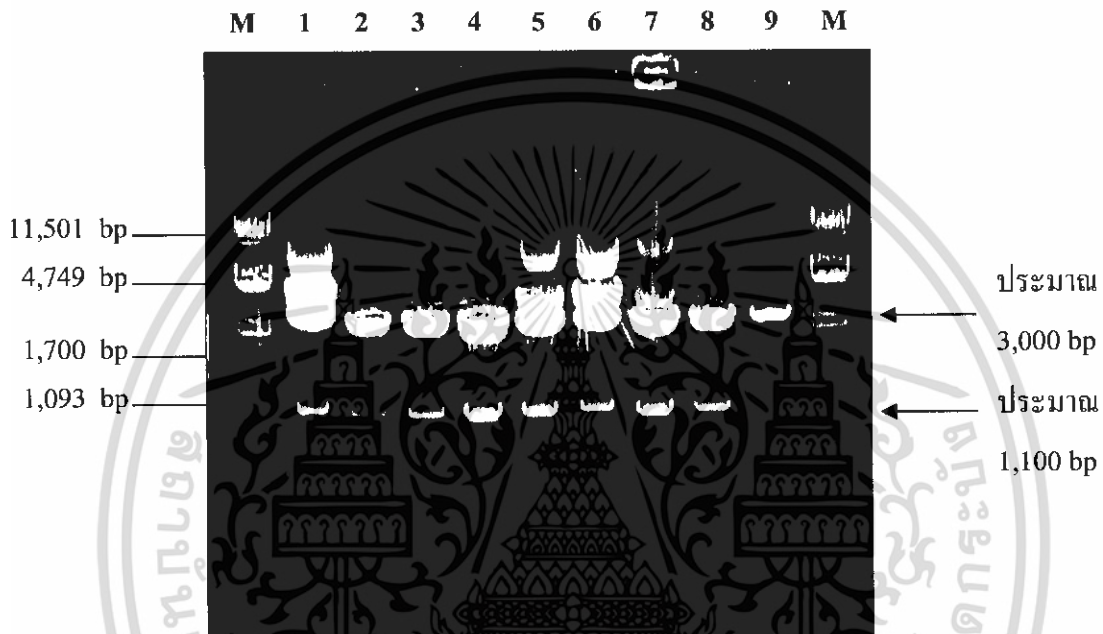
คัดเลือกโคลนของ *E. coli* ที่คาดว่าจะมีพลาสมิดที่มีจีนดีเอ็นเอแทรกอยู่ และทำการสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกได้ ตรวจสอบผลการสกัดพลาสมิด โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1.00 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลดังรูปที่ 22



รูปที่ 22 แสดงผลของขนาดพลาสมิดที่สกัดได้จากโคลนสีขาว เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (หมายเลข 1 ถึง 9 คือ พลาสมิดที่สกัดได้และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

4.2.3 การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pGEM

การคัดเลือกพลาสมิด pGcm ที่มีชิ้นดีเอ็นเอของยีน *chs* แทรกอยู่ โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ตรวจสอบโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1.00 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งจะให้เห็นส่วนของดีเอ็นเอ 2 ชิ้นส่วนที่มีขนาดประมาณ 1,100 และ 3,000 คู่เบส โดยเทียบกับกับขนาดดีเอ็นเอ มาตรฐาน ได้ผลดังรูปที่ 23



รูปที่ 23 แสดงผลการตัดพลาสมิดที่คัดเลือกได้ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI (หมายเลข 1 ถึง 9 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *chs* ที่ต่ออยู่กับเวกเตอร์ pGEM และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

4.2.4 ผลการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอ กับ *Agrobacterium* expression vector

ทำการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล นำดีเอ็นเอที่ได้เชื่อมต่อกับ *Agrobacterium* expression vector ได้แก่ เวกเตอร์ pBI121 และเวกเตอร์ pHTT202 ถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอจากการเชื่อมต่อ เข้าสู่เซลล์ *E. coli* และทำการคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดทั้ง 2 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนยีนบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน สำหรับเวกเตอร์ pBI121 และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินสำหรับเวกเตอร์ pHTT202 เนื่องจากในพลาสมิดมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะชนิดนี้ โคโลนีที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดจะสามารถเจริญได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะดังกล่าวได้

คัดเลือกโคโลนีของ *E.coli* ที่คาดว่าจะมีส่วนของพลาสมิด pBI121 และ pHTT202 ที่มีชิ้นส่วนของยีน *chs* แทรกอยู่ มาทำการสกัดพลาสมิด และตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1.00 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นำไปเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งผลที่ได้พบว่าขนาดของยีน *chs* เชื่อมต่อกับ pBI121 มีขนาดประมาณ 14,000 คู่เบส และขนาดของยีน *chs* เชื่อมต่อกับ pHTT202 มีขนาดประมาณ 11,000 คู่เบส สำหรับได้ผลดังรูปที่ 24



รูปที่ 24 แสดงผลของขนาดพลาสมิดที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นส่วนของยีน *chs* กับ *Agrobacterium* expression vector เทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (หมายเลข 1 และ 2 คือ ส่วนดีเอ็นเอของยีน *chs* ที่ต่ออยู่กับเวกเตอร์ pHTT202 หมายเลข 3 4 5 และ 6 คือส่วนดีเอ็นเอของยีน *chs* ที่ต่ออยู่กับเวกเตอร์ pBI12 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

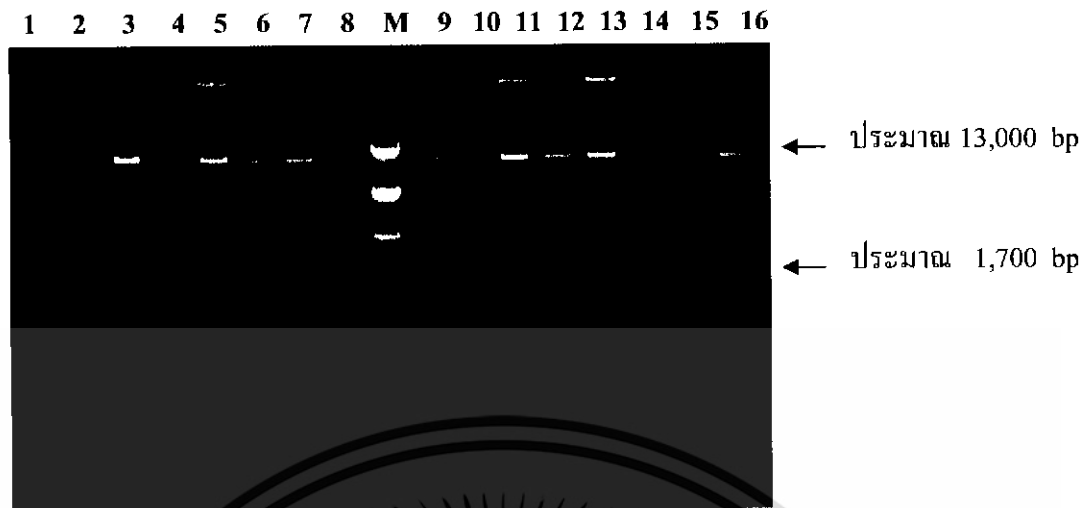
4.2.5 ผลการตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในพลาสมิด

คัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีน *CHS* แทรกอยู่ และทำการตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิด โดยการใส่เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* นำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตัดได้มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1.00 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน แล้วนำมาคำนวณ เพื่อตรวจสอบทิศทางการเข้าเชื่อมต่อ (sense, antisense) สำหรับผลการ

ตัดพลาสมิด pHTT202 จะได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ 2 ชิ้นส่วนที่มีขนาด 8,600 และ 2,500 คู่เบส ซึ่งจะได้ทิศทางการเข้าที่ถูกทิศทาง (sense) ส่วนพลาสมิด pBI121จะได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ 2 ชิ้นส่วนที่มีขนาดประมาณ 13,000 และ 1,700 คู่เบส ในทิศทางการเข้าที่ถูกต้อง ได้แก่ โคลนที่ 3, 6, 9, 11, 15 ผลแสดงดังรูปที่ 25 และรูปที่ 26



รูปที่ 25 แสดงผลของขนาดพลาสมิด pHTT202 ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *chs* เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ *HindIII* เทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (M)



รูปที่ 26 แสดงผลของขนาดพลาสมิด pBI121 ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *chs* เมื่อตัดด้วย เอนไซม์ *Hind*III เทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (M)

4.2.6 ผลการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

ผลการนำอะโกรแบคทีเรียที่ได้ถ่ายโอนยีน *chs* เข้าสู่ต้นยาสูบ ทำการทดลองในแต่ละพลาสมิดทั้งหมด 50 ชิ้น นำไปเลี้ยงให้เกิดแคลลัสและยอด พบว่าส่วนของใบยาสูบ ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนของอะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pHTT202 ไม่สามารถที่จะเจริญเป็นแคลลัสได้ ทั้งหมด 50 ชิ้น ซึ่งคาดว่าเป็นต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน *chs*

ส่วนใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนของอะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pBI121 พบว่ามี พบว่ามีใบยาสูบที่สามารถเจริญเป็นแคลลัส และเกิดยอดทั้งหมด 43 ชิ้นใบ ที่เหลือ 7 ชิ้นใบ มีการเจริญเป็นแคลลัส แต่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นยอด จากนั้นทำการตัดยอดที่ได้เลี้ยงให้เกิดเป็นต้นสมบูรณ์ทั้งหมด 37 ต้น พบว่ามียอดของต้นยาสูบทั้งหมด 24 ต้นที่สามารถเจริญไปเป็นต้นที่สมบูรณ์



(ก)



(ข)

รูปที่ 27 ต้นยาสูบที่ได้จากการศึกษาการถ่ายโอนยีน โดยใช้อะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pBI121 (ก) คือแคลลัส เจริญเป็นยอด ที่คาดว่าได้รับการถ่ายโอนยีน และ (ข) คือ ต้นยาสูบที่ขึ้นเป็นต้นที่สมบูรณ์ ที่คาดว่าได้รับการถ่ายโอนยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการยับยั้งเชื้อราโรคไหม้ระหว่างต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

การทดสอบผลการยับยั้งต่อการเจริญของเชื้อราโรคไหม้ โดยเปรียบเทียบระหว่างอาหารสูตร PDA ผสมใบยาสูบที่ได้และไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน *chs* และยีน *dfc* ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยและเมลานิน (melanins) (ภาคผนวก ง) พบว่าในอาหารสูตร PDA ที่มีส่วนผสมของใบยาสูบที่คาดว่าได้รับการถ่ายโอนยีน *chs* พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย ในขณะที่เส้นผ่านศูนย์กลางของเมลานินมีขนาดมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร PDA ที่ผสมใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน *chs* อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 28)



รูปที่ 28 ลักษณะของเส้นใยและเมลานินของเชื้อราโรคไหม้ ที่อายุ 6 วัน

(ก) ลักษณะของเส้นใยและเมลานินในอาหารที่ผสมใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน *chs*

(ข) ลักษณะของเส้นใยและเมลานินในอาหารที่ผสมใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *chs*

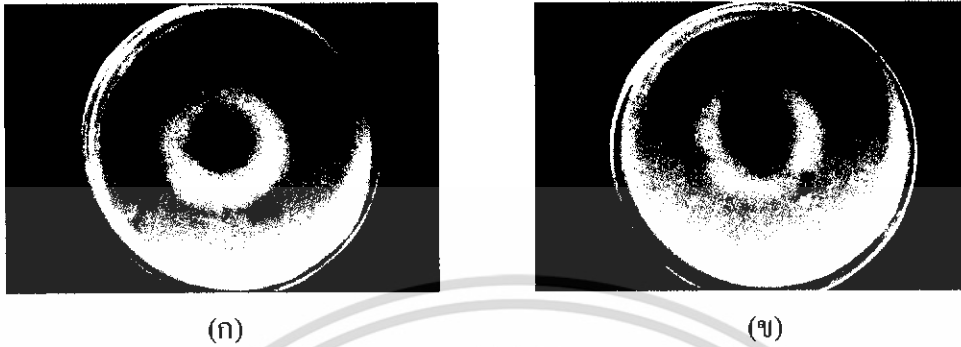
ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใยของเชื้อราโรคไหม้ ที่ได้รับการถ่ายโอน และ ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน *chs*

ยีน <i>chs</i>	อาหารที่ผสมใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน <i>chs</i>	อาหารที่ผสมใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน <i>chs</i>
ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใย (เซนติเมตร)	3.6517 ^a	3.6367 ^a
ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเมลานิน (เซนติเมตร)	2.0805 ^a	2.8000 ^b

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $\alpha = .05$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนอาหารผสมใบยาสูบที่คาดว่าได้รับถ่ายโอนยีน *dfr* ไม่พบการเปลี่ยนแปลงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นและเมลานินเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร PDA ที่ผสมใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน (รูปที่ 29)



รูปที่ 29 ลักษณะของเส้นใยและเมลานินของเชื้อราโรคโหม้ ที่อายุ 9 วัน

(ก) ในอาหารที่ผสมใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน *dfr*

(ข) ในอาหารที่ผสมใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *dfr*

ตารางที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใยของเชื้อราโรคโหม้ ที่ได้รับการถ่ายโอน และ ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน *dfr*

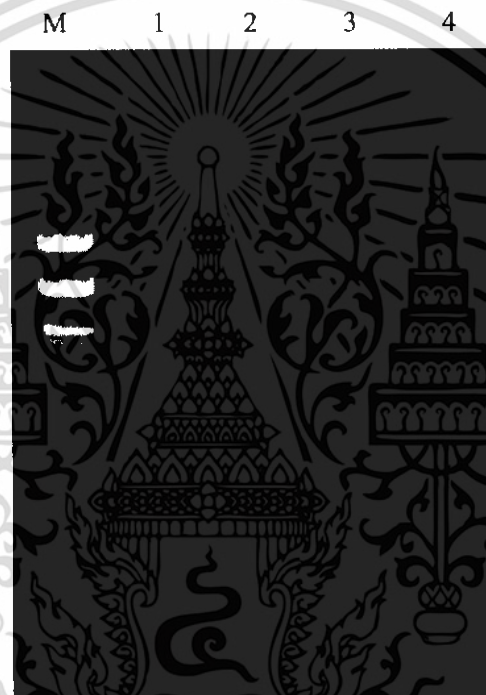
ยีน <i>dfr</i>	อาหารที่ผสมใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน <i>dfr</i>	อาหารที่ผสมใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน <i>dfr</i>
ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใย (เซนติเมตร)	6.225 ^a	6.1967 ^a
ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเมลานิน (เซนติเมตร)	4.4783 ^a	4.4817 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $\alpha = .05$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ศึกษาการแสดงออกของยีน *chs* ที่ตอบสนองต่อโรคไหม้ ของข้าวสายพันธุ์ที่ต้านทานและไม่ต้านทาน

ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *chs* ที่ตอบสนองต่อเชื้อราโรคไหม้ในข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 60 และสุพรรณบุรี 60 ด้วยเทคนิค RT-PCR ตรวจสอบโดยทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1.00 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และความเข้มของแถบระหว่างข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 60 และสุพรรณบุรี 60 ที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อเชื้อราโรคไหม้ ได้ผลดังรูป



รูปที่ 30 ผลการทำอาร์ทีพีซีอาร์ของตัวอย่างข้าวแต่ละสายพันธุ์

- 1 คือ ผลการทำอาร์ทีพีซีอาร์ข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 60 ที่ไม่ตอบสนองต่อเชื้อโรคไหม้
- 2 คือ ผลการทำอาร์ทีพีซีอาร์ข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 60 ที่ตอบสนองต่อเชื้อโรคไหม้
- 3 คือ ผลการทำอาร์ทีพีซีอาร์ข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่ไม่ตอบสนองต่อเชื้อโรคไหม้
- 4 คือ ผลการทำอาร์ทีพีซีอาร์ข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่ตอบสนองต่อเชื้อราโรคไหม้
- M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 การตรวจสอบปริมาณสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์

จากการนำสารสกัดจากใบข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 60 (ไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้) และสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 (ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้) มาวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ พบว่าสารกลุ่มแซลโคน ได้แก่ ไอโซควิริฟิเจนนิน กลุ่มเฟลวาโนน ได้แก่ นารินจินิน กลุ่มไอโซเฟลโวน ได้แก่ จินิสทิน กลุ่มเฟลโวน ได้แก่ ลูทิโอลิน ไทรซิน และกลุ่มเฟลโวนอล ได้แก่ เทวอซิดิน เทเอ็มเฟอร์อล และไอโซแรมนิติน จากสารสกัดในข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 60 ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ ให้ค่าการดูดกลืนแสงไม่แตกต่างกับข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้ ในขณะที่สารสกัดจากข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่ติดเชื้อราโรคไหม้ มีค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มดังกล่าวมากกว่าข้าวที่ไม่ติดเชื้อราโรคไหม้ จึงคาดว่าสารกลุ่มดังกล่าวน่าจะส่งผลกระทบต่อระดับการติดเชื้อที่แตกต่างกันในข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์

5.2 ศึกษาการถ่ายโอนยีน *chs* เข้าสู่ต้นยาสูบ

5.2.1 การโคลนยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์

จากการทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *chs* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ช่วงต้นในวิถีชีวสังเคราะห์สารกลุ่มเฟลโวนอยด์ โดยที่ได้จากการทำพีซีอาร์ ครอบคลุมบริเวณ *ori* ของยีน *chs* โดยทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้เข้ากับเวกเตอร์ pGEM เพื่อทำการเพิ่มจำนวนใน *E. coli* พบว่ามีโคลนที่คาดว่าเป็นยีน *chs* อยู่ 9 โคลน จากนั้นได้ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเวกเตอร์ pGEM โดยใช้เอนไซม์ *Bam*HI และเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เข้ากับเวกเตอร์ pBI121 ทำการตรวจสอบขนาด และทิศทางการเข้าร่วมของยีน *chs* กับเวกเตอร์ พบว่าได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอสองส่วนขนาดประมาณ 1,700 และ 13,000 คู่เบส นั่นคือ ดีเอ็นเอมีทิศทางการเข้าอย่างถูกต้อง (*scense*) ภายในเวกเตอร์ แล้วทำการถ่ายโอนพลาสมิดที่มียีน *chs* อยู่เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404

5.2.2 ถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ LBA4404 ที่ภายในมียีน *chs* และยีนต้านยาปฏิชีวนะคานามัยซิน ทำการทดลองโดยใช้ใบจากต้นยาสูบ โดยใช้ทั้งหมด 50 ชิ้นใบ พบว่ามี 24 ชิ้นใบให้ต้นพืชเจริญได้อย่างสมบูรณ์บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน และคาร์เบนนิซิลิน ซึ่งเป็นการคัดเลือกเบื้องต้น คาดว่าต้นพืชที่เจริญได้อย่างสมบูรณ์จากใบดังกล่าวได้รับ T-DNA เข้าไปอยู่ในจีโนม และมีการแสดงออกที่สามารถต้านยาปฏิชีวนะคานามัยซินได้

5.3 เปรียบเทียบผลการยับยั้งต่อเชื้อราโรคไหม้ระหว่างต้นยาสูบที่ได้รับและไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน

การศึกษาผลการยับยั้งเชื้อราโรคไหม้ระหว่างอาหารสูตร PDA ที่มีส่วนผสมของใบยาสูบที่ได้รับ และไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน *chs* หรือ *dfi* พบว่าอาหารสูตร PDA ที่มีส่วนผสมของใบยาสูบที่คาดว่าได้รับการถ่ายโอนยีน *chs* ไม่มีการเปลี่ยนแปลงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเส้นใย ในขณะที่เส้นผ่านศูนย์กลางของเมลานินมีขนาดที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร PDA ที่มีส่วนผสมของยาสูบต้นปกติ จากผลการทดลองในการตรวจสอบปริมาณสารกลุ่มฟีนอลในเชื้อรา พบว่ามีสารหลายชนิดในเชื้อราสังเคราะห์ที่น่าจะมีส่วนช่วยยับยั้งการติดเชื้อโรคไหม้ จึงคาดว่ายีน *chs* ซึ่งเป็นยีนในช่วงต้นของวิถีชีวสังเคราะห์ฟีนอลจะส่งผลต่อกระบวนการผลิตเมลานินของเชื้อราโรคไหม้ ซึ่งเมลานินเป็นสารพิษที่มีเชื้อราสร้างขึ้นเมื่อเข้าสู่สภาวะคงที่ (stationary phase) หรืออยู่ในสภาวะเครียด มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสปอร์ของเชื้อรา และต่อต้านสารพิษที่พืชสร้างขึ้นในกระบวนการป้องกันตัวของเชื้อรา (Raffaella C. และคณะ, 2002)

5.4 ศึกษาการแสดงออกของยีน *chs* ที่ตอบสนองต่อโรคไหม้ ของข้าวสายพันธุ์ที่ต้านทานและไม่ต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้

จากการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *chs* ที่ตอบสนองต่อเชื้อราโรคไหม้ในข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 60 และสุพรรณบุรี 60 โดยการสกัดอาร์เอ็นเอจากใบข้าวที่มีการตอบสนองต่อเชื้อราโรคไหม้ แล้วนำไปสังเคราะห์สายซิดีเอ็นเอ เพื่อใช้เป็นแม่แบบในการทำเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์ ผลที่ได้ไม่สามารถสรุปการแสดงออกของยีน *chs* ที่ตอบสนองต่อเชื้อราโรคไหม้ได้ เนื่องจากไพรเมอร์มีการออกแบบไม่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *chs* ในข้าว

เอกสารอ้างอิง

- กนกพร สมพรไพลิน. 2545. **บทปฏิบัติการวิชาพันธุวิศวกรรม**. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- กนกพร สมพรไพลิน. 2546. **บทปฏิบัติการเทคโนโลยีทางพืช เรื่อง การถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์ของต้นยาสูบโดยใช้กระโกรแบคทีเรีย**. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2547 **เอกสารเรื่องโรคไหม้ในข้าว**. ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ
- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A. and Lamb, C. 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network. The establishment of plant immunity. 92: 773-84
- Bell, A. A. and Wheeler, M. H. 1986. Biosynthesis and function of fungal melanins. Annu. Rev. Phytopathol. 24:411-451.
- Butler, M. J. and Day, A. W. 1998. Fungal melanins: a review. Can. J. Microbiol. 44:1115-1136.
- Butler, M. J., Day, A. W., Henson, J. M., and Money, N. P. 2001. Pathogenic properties of fungal melanins. Mycologia 93:1-8.
- Chalker, S., Rakwal, R., Tamogami, S., Agrawal, G.K. and Iwahashi, H. 2002. Octadecanoid signaling component "burst" in rice (*Oryza sativa L*) seedling leaves upon wounding by cut and treatment with fungal elicitor chitosan. Biochem Biophys Res Commun. 295: 1041-1045
- Christine A. Williamsa, Je.rey B. Harbornea., Jenny R. Greenhama, Rene J. Grayc, Geo.rey C. Kiteb, John Eaglesc. 2003. Variations in lipophilic and vacuolar flavonoids among European *Pulicaria* species. Phytochemistry 64. 275-283
- Cushnic, T. and Andrew, J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents. 26. 343-356
- De-Yu Xie, Shashi B. Sharma, and Richard A. Dixon. 2003. Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. Plant Biology Division, Samuel Roberts Noble Foundation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Dillon K., Vivian M. Jonathan Overton, Renée J. Grayner and Jeffrey B. Harborne. 1997. Differences in phytoalexin response among rice cultivars of different resistance to blast. *Phytochemistry*, Volume 44. Pages 599-603
- Gandikota, G., Rodney, C., Toni, M. and Norman, G. 2001. Natural Products (Secondary Metabolites). American Society of Plant Physiologists.
- Gandikota, M., De Kochko, A., Chen, L., Ithal, N., Eauquet, C. and Reddy, A.R. 2001. Development of transgenic rice plants expressing maize anthocyanin gene and increased blast resistance. *Molecular Breeding*. 7: 73-83
- Harborne, JB. and Williams, CA. 1992. Advances in flavonoid research since. *Phytochemistry* 2000. 55:481–504.
- Henson, J. M., Butler, M. J. and Day, A. W. 1999. The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37:447-471.
- Howard, R. J., and Ferrari, M. A. 1989. Role of melanin in appressorium function. *Exp. Mycol.* 13:403-418.
- Izabela, K. and Wci, Z. 2004. Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators. *Phytochemistry*. 61. 107–114.
- Jambunathan, S., Banos, B.S., Hernandez-Lopez, M. and Bosquez-Molina, E. 1999. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. *Mexican Journal of phytopathology*. 82: 322-328
- Kawamura, C., Moriwaki, J., Kimura, N., Fujita, Y., Fuji, S., Hirano, T., Koizumi, S. and Tsuge, T. 1997. The melanin biosynthesis genes of *Alternaria alternata* can restore pathogenicity of the melanin deficient mutant of *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:445-453.
- Koga, J., Howard, R.J. and Valent, B. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*, *Annu. Rev. Microbiol.* 50 (1996). 491–512.
- Kubo, Y., and Furusawa, I. 1991. Melanin biosynthesis. Prerequisite for successful invasion of the plant host by appressoria of *Colletotrichum* and *Pyricularia*. Pages 205-218 in: *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. G. T. Cole and H. C. Hoch, eds. Plenum Publishing Co., New York.

- Li BQ, Fu T., Dongyan, Y., Mikovits, JA., Ruscelli, FW. and Wang, JM. 2000. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochem Biophys Res Commun.* 276:534–548.
- Lo S., Janyce A. Sugui, Connie Bonham, Karl V. Wood and Ralph L. Nicholson. 1998. MALDI-TOF analysis of mixtures of 3-deoxyanthocyanidins and anthocyanins. *Phytochemistry*, Volume 48. Pages 1063-1066
- Padmavati, P., Gutkind, G., Rondina, RV., de Torres, R. and Coussio, JD. 1997. Genus *Baccharis*. II. Antimicrobial activity of *B. crispa* and *B. notoserghila*. *Planta Med.* 49:128.
- Raffaella, C., Daniela, F., Paul, B. and Richard, J. 2002. Localization of Melanin in conidia of *Alternaria alternata* using phage display antibodies. *The American Phytopathological Society*. Vol. 15, No. 3 ; 216–224.
- Romero-Martinez, R., Wheeler, M., Guerrero-Plata, A., Rico, G. and Torres-Guerrero, H. 2000. Biosynthesis and function of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect. Immun.* 68:3696-3703.
- Talbot, G., Ashby, M.F., Gibson, L.J., Wegst, U. and Olive, R. 1995. The mechanical properties of natural materials. I. Material property charts. *Proc. R. Soc. Lond. A* 450: 123–140
- Tereschuk, ML., Ricra, MV., Castro, GR. and Abdala, LR. 1997. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *J Ethnopharmacol.* 56:227–32.
- T.P. Tim Cushnie and Andrew J. Lamb. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Volume 26.
- http://www.thairice.org/html/aboutrice/about_rice1.htm
- <http://classroom.psu.ac.th/users/spravit/510-211/lab/ricelab.doc>
- http://www.ipst.ac.th/ThaiVersion/publications/in_sci/rice_civilize.html
- <http://update.se-cd.com/206/rice.htm>
- www.sut.ac.th/etexts/Agri/Insectfinal2/Insects%20web/chapter2_01.htm
- <http://www.sut.ac.th/etexts/Agri/Insectfinal2/Insects%20web.html>
- <http://www.sut.ac.th/e-texts/Agri/Insectfinal2/Insects%20web/chapter2.htm>
- <http://www.doa.go.th/rri/tech/SP60.htm>
- <http://update.se-cd.com/206/rice.html>
- www.agsci.ubc.ca/courses/fnh/410/colour/3_22.htm

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani)

Bacto tryptone	10	กรัมต่อลิตร
Bacto yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
NaCl	10	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.2

(หากเป็นอาหารแข็งให้เติม Agar 15 กรัม/ลิตร)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB

Bacto tryptone	2	กรัมต่อลิตร
Bacto yeast extract	0.5	กรัมต่อลิตร
NaCl	0.0585	กรัมต่อลิตร
KCl	0.0186	กรัมต่อลิตร
MgCl ₂	10	มิลลิโมลาร์
MgSO ₄	10	มิลลิโมลาร์

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOC

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB	1	ลิตร
กลูโคส เข้มข้น 2 โมลาร์	10	มิลลิลิตร

4. อาหารชักนำให้เกิดแคลลัสของยาสูบ (กนกพร, 2546)

อาหารสูตร MS เต็ม	Adenine	40	มิลลิกรัมต่อลิตร
	MES	0.5	กรัมต่อลิตร
	ซูโครส	20	กรัมต่อลิตร
	BAP	1	มิลลิกรัมต่อลิตร
	IAA	0.1	มิลลิกรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. อาหารชักนำให้เกิดยอดของยาสูบ (กนกพร, /2546)
อาหารชักนำให้เกิดแคลลัสแต่ปราศจาก IAA

6. อาหารชักนำให้เกิดรากของยาสูบ (กนกพร, 2546)
อาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสแต่ปราศจาก BA

7. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB	24	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร
ปรับพีเอชเป็น 5.6		

8. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร RPA (Rice Polish Agar) (พูนศักดิ์, 2547)

รำข้าว	20	กรัมต่อลิตร
Agar	17	กรัมต่อลิตร
ซูโครส	5	กรัมต่อลิตร
ปรับพีเอชเป็น 5.6		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการและเทคนิค

1. การสกัดและวิธีการวัดปริมาณสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์

- 1.1 นำใบข้าวสาคั่วแห้ง 0.50 กรัม บดด้วยในโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผง ใส่ลงในหลอดทดลอง
- 1.2 เติมสารละลายผสมของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นกับเมทานอล ในอัตราส่วน 1 ต่อ 99 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร
- 1.3 นำไปแช่ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 1.4 เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
- 1.5 นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นของสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์

2. การแยกดีเอ็นเอจากเจล (Amersham Biosciences Corp.)

- 2.1 ตัดชิ้นส่วนของชิ้นเจล ที่มีส่วนของดีเอ็นเออยู่ จากการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ใส่ลงในหลอดเอพเพนดรอฟ
- 2.2 เติม capture buffer ลงในหลอดจากข้อ 1 ในอัตราส่วน capture buffer 10 ไมโครลิตร ต่อ เจลหนัก 10 มิลลิกรัม
- 2.3 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ถึง 15 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมด
- 2.4 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบต่ำ ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ของเหลวในหลอดตกลงมารวมกัน
- 2.5 ย้ายของเหลวในหลอดเอพเพนดรอฟใส่ลงใน GFX column แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที
- 2.6 นำ GFX column ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 2.7 เติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน GFX column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 2.8 ย้าย GFX column ลงในหลอดเอพเพนดรอฟหลอดใหม่ เติมน้ำปราศจากไอออนที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน GFX column เพื่อละลายดีเอ็นเอที่ติดอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ เป็นเวลา 1 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2.9 นำ GFX column ที่อยู่ในหลอดเอฟเฟนดรอฟหลอดใหม่ ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 2.10 นำ GFX column ออก จะได้สารละลายดีเอ็นเอที่อยู่ในหลอดเอฟเฟนดรอฟ

3. การเตรียมคอมพิเทนท์เซลล์ (กนกพร, 2545)

- 3.1 ถ่ายเชื้อสายพันธุ์ *E. coli* ที่ได้จากการแยกโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 3 มิลลิตร ที่มีแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที
- 3.2 ถ่ายเชื้อจากข้อ 1 ลงในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 40 มิลลิตร ที่มีแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ โดยใช้เชื้อปริมาณเท่ากับ 1 ถึง 2 เปอร์เซ็นต์ของอาหารบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.4 ถึง 0.5
- 3.3 นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 3.4 เทส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง แล้วทำให้เป็นสารละลายแขวนลอยอีกครั้งโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ TFB ปริมาตร 5 มิลลิตร
- 3.5 วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 3.6 เทส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง แล้ววางบนน้ำแข็ง ทำให้เป็นสารละลายแขวนลอยอีกครั้งโดยใช้ สารละลายบัฟเฟอร์ TFB ปริมาตร 3 มิลลิตร
- 3.7 เติม DMSO 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 3.8 แบ่งเซลล์แขวนลอยลงในหลอดเอฟเฟนดรอฟ หลอดละ 20 ไมโครลิตร
- 3.9 เก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

4. การถ่ายโอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต่อกับเวกเตอร์เข้าสู่คอมพิเทนท์เซลล์

- 4.1 นำคอมพิเทนท์เซลล์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส มาทำให้ละลายอย่างช้าๆ โดยวางไว้บนน้ำแข็ง
- 4.2 ดูดคอมพิเทนท์เซลล์ที่ละลายแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดเอฟเฟนดรอฟ ที่วางอยู่บนน้ำแข็งตลอดเวลา เติม ligation solution ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ไปเปิดตู้เย็นลง
- 4.3 นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 4.4 เติมหาอาหาร SOC (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5. การสกัดพลาสมิด

- 5.1 คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน แล้วสเปรดด้วย IPTG และ X-gal ถ่ายโคโลนีดังกล่าวลงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ปริมาตร 3 มิลลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 5.2 นำสารแขวนลอยของเซลล์ใส่หลอดเอฟเฟนดรอฟ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการเก็บเกี่ยวเซลล์
- 5.3 เทส่วนของอาหารทิ้ง แล้วทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งในสารละลาย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วางหลอดบนน้ำแข็ง
- 5.4 เติมหلول solution II ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที
- 5.5 เติมหلول solution III ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที
- 5.6 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 5.7 ย้ายส่วนของเหลวด้านบนใส่ลงในหลอดเอฟเฟนดรอฟหลอดใหม่ เติมหีทานอล ความเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อทำการตกตะกอนดีเอ็นเอ
- 5.8 นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที
- 5.9 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทเอทานอลด้านบนทิ้ง
- 5.10 ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย เอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิตร
- 5.11 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทเอทานอลด้านบนทิ้ง
- 5.12 ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยใช้เซซิเคเตอร์ ภายใต้แรงดันสูญญากาศ
- 5.13 ละลายดีเอ็นเอด้วย สารละลาย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่มี RNase ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร
- 5.14 เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6. การเตรียมเชื้ออะโกราแบคทีเรียสำหรับการถ่ายโอนเข้าสู่ต้นพืช (กนกพร, 2546)

- 6.1 เลี้ยงเชื้ออะโกราแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ในอาหารสูตร LB ซึ่งมีขาด้านปฏิชีวนะริฟามัยซิล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
- 6.2 นำสารละลายเชื้อดังกล่าววางบนน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 6.3 เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์มาละลายในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บนน้ำแข็ง
- 6.4 นำเซลล์แขวนลอยในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์มา 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ และผสมพลาสมิด pBI 121 ที่มียีน *CHS* ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยใช้ไปเปิดดูคขึ้นลงเบาๆ บนน้ำแข็ง
- 6.5 นำสารละลายนี้ใส่ในไนโตรเจนเหลว จนกระทั่งเป็นน้ำแข็ง ย้ายหลอดดังกล่าวบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที
- 6.6 เติมหอาหารสูตร LB 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
- 6.7 นำสารละลายที่ได้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 6.8 นำตะกอนเซลล์แขวนลอยปริมาตร 200 ไมโครลิตร สเปรดบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 2 วัน

7. การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้อะโกราแบคทีเรีย

- 7.1 เลี้ยงเชื้ออะโกราแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ในอาหารเหลวสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นานข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส
- 7.2 นำเซลล์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 100 ที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซินปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้ได้ค่าประมาณ 0.8 (ประมาณ 6-10 ชั่วโมง)
- 7.3 นำสารละลายเชื้อ ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
- 7.4 นำตะกอนเซลล์แขวนลอยมาเติมสารละลายซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ และสารละลาย tween 80 0.5 เปอร์เซ็นต์
- 7.5 ตัดใบยาสูบที่ปราศจากเชื้อขนาดประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร แช่ลงในเซลล์แขวนลอยประมาณ 30 ถึง 60 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 7.6 นำใบยาสูบที่ตัดได้วางบนเพลท ที่มีกระดาษทิชชูปราศจากเชื้อเพื่อขจัดเซลล์อะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออก
- 7.7 นำใบยาสูบวางบนอาหารแข็ง MS สูตรชักนำให้เกิดแคลลัส (ภาคผนวก ก) บ่มได้แสงไฟ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน
- 7.8 ย้ายใบยาสูบลงในอาหารแข็ง MS สูตรชักนำให้เกิดแคลลัส ที่มียาปฏิชีวนะคาร์เบนนิซิลลิน และยาปฏิชีวนะคานามัยซิน (ภาคผนวก ก) เพื่อฆ่าอะโกรแบคทีเรีย และคัดเลือกใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน
- 7.9 เลี้ยงเนื้อเยื่อจนเกิดเป็นแคลลัส แล้วจึงย้ายลงในอาหารแข็ง MS สูตรชักนำให้เกิดยอดที่มียาปฏิชีวนะคาร์เบนนิซิลลิน และยาปฏิชีวนะคานาไมซิน (ภาคผนวก ก) เลี้ยงจนแคลลัสเกิดเป็นยอด
- 7.10 คัดเลือกยอดที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีนย้ายลงอาหารแข็ง MS สูตรปกติที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน (ภาคผนวก ก) จากนั้นคัดเลือกยอดที่เกิดราก ซึ่งคาดว่าจะเป็ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

8. วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอจากต้นพืช

- 8.1 นำตัวอย่างของพืชที่ทราบน้ำหนักแน่นอน มาบดด้วยในโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนได้เป็นผง ใสในหลอดเอฟเพนครอฟ
- 8.2 เดิมสารละลายผสมของ RNA extract กับฟีนอล อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ที่ทำให้อุ่นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส โดยเติมลงในอัตราส่วน 2 มิลลิลิตร ต่อ ตัวอย่างพืช 1 กรัม ผสมให้เข้ากัน โดยการ vortex เป็นเวลา 5 นาที
- 8.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 8.4 ดูดส่วนใสใสในหลอดใหม่ แล้วจึงเติมสารละลายผสมของคลอโรฟอร์ม กับไอโซเอมีล (isoamyl) อัตราส่วน ในปริมาณเท่ากับสารละลายส่วนใสของตัวอย่างที่คุณได้ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 8.5 ดูดส่วนใสใสในหลอดใหม่ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงต่อที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 8.6 ดูดส่วนใสใสในหลอดใหม่ เติมสารละลายลิเทียมคลอไรด์ ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 โมลาร์ โดยเติมลงในอัตราส่วน 200 ไมโครลิตร ต่อ สารละลายส่วนใสที่คุณได้ 1 มิลลิลิตร
- 8.7 แช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ถึง 16 ชั่วโมง
- 8.8 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะได้ตะกอนอยู่ด้านล่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 8.9 เทส่วนไส้ทิ้ง ล้างตะกอนด้วย สารละลายเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
- 8.10 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 8.11 เทส่วนไส้ทิ้ง ละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร
- 8.12 เติมสารละลายผสมของของคลอโรฟอร์ม กับไอโซเอมีล (isoamyl) อัตราส่วนใน ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 8.13 ดูดสารละลายส่วนใสลงในหลอดใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 8.14 ดูดดูดสารละลายส่วนใสลงในหลอดใหม่ แบ่งสารละลายที่ได้ปริมาตร 3 ไมโครลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนที่ฆ่าเชื้อแล้ว 297 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ
- 8.15 สารละลายอาร์เอ็นเอที่เหลือ นำมาเติมสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 99
- 8.16 นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานกว่า 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะได้ ตะกอนอยู่ด้านล่าง
- 8.17 เทส่วนไส้ทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 8.18 เทส่วนไส้ทิ้ง นำตะกอนอาร์เอ็นเอไปทำให้แห้งโดยใช้เซซิเคเตอร์ ภายใต้แรงดัน สูญญากาศ
- 8.19 ละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลาย DEPC ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผสมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ถ่ายสู่หลอดใหม่ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงข้อมูลทางสถิติ

1. ผลการวิเคราะห์การเปรียบเทียบปริมาณสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่ตอบสนองต่อเชื้อรา
โรครไหมในข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 60 และสุพรรณบุรี 60 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

กลุ่มสาร	ชื่อสาร	OD	PT60 C	PT60 I	SP60 C	SP60 I
chalcone	Isoliquiritigenin	372	0.436 (b)	0.498 (b)	0.360 (c)	0.583 (a)
Aurone	Sulphuretin	399	0.126 (c)	0.192 (a)	0.092 (d)	0.164 (b)
Flavanone	Naringenin	330	0.730 (b)	0.863 (a,b)	0.504 (c)	0.861 (a)
	Hesperitin	300	0.488 (b)	0.627 (a)	0.345 (c)	0.564 (a,b)
Isoflavone	Daizein	302	0.491 (b)	0.617 (a)	0.367 (c)	0.561 (a,b)
	Genistein	325	0.724 (a)	0.790 (a)	0.397 (b)	0.792 (a)
Flavone	Luteotin	350	0.777 (b)	0.890 (a,b)	0.639 (c)	0.923 (a)
	Apigenin	336	0.775 (b)	0.904 (a)	0.591 (c)	0.914 (a)
	Tricin	355	0.736 (b)	0.847 (a,b)	0.614 (c)	0.917 (a)
Flavonol	Myricetin	378	0.641 (c)	0.759 (b)	0.486 (d)	0.854 (a)
	Quercetin	374	0.799 (b)	0.852 (b)	0.581 (c)	1.042 (a)
	Kaempferol	368	0.514 (b)	0.596 (b)	0.382 (c)	0.671 (a)
	Isorhamnetin	369	0.492 (b)	0.578 (b)	0.372 (c)	0.652 (a)
	Gossypetin	386	0.381 (b)	0.459 (a)	0.280 (c)	0.505 (a)
Benzoquinone	Dimethoxbenzoquinone	377	0.651 (c)	0.794 (b)	0.504 (d)	0.902 (a)
	Benzoquinone	406	0.645 (b,c)	1.136 (a)	0.488 (c)	0.789 (b)
Napthaquinone	Plumbagin	418	0.266 (b,c)	0.454 (a)	0.193 (c)	0.278 (b)
tannin	Gallotannin	550	0.028 (b)	0.052 (a)	0.028 (b)	0.014 (c)
Anthocyanin	Delphinidin	546	0.029 (b)	0.054 (a)	0.030 (b)	0.015 (c)
	Cyanidin	535	0.032 (b)	0.060 (a)	0.033 (b)	0.018 (c)
	Pelargonidin	520	0.037 (b)	0.069 (a)	0.033 (b)	0.021 (c)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มสาร	ชื่อสาร	OD	PT60 C	PT60 I	SP60 C	SP60 I
Anthocyanin	Peonidin	532	0.033 (b)	0.061 (a)	0.031 (b,c)	0.018 (c)
	Malvidin	542	0.030 (b)	0.055 (a)	0.031 (b)	0.016 (c)

หมายเหตุ PT60C คือ สายพันธุ์ปทุมธานี 60 ที่ไม่ติดเชื้อโรคไหม้
 PT60I คือ สายพันธุ์ปทุมธานี 60 ที่ติดเชื้อโรคไหม้
 SP60C คือ สายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่ไม่ติดเชื้อโรคไหม้
 SP60I คือ สายพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ที่ติดเชื้อโรคไหม้
 ตัวอักษรในแต่ละแถวแสดงความแตกต่างทางค่าสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $\alpha = .05$

2. ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่างของผลการยับยั้งเชื้อราโรคไหม้ระหว่างยาสูบที่ได้รับและไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน *dfr*

2.1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย

Group Statistics

	hypha	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
dimeter	control	6	6.2250	.07817	.03191
	DFR	6	6.1967	.15175	.06195

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
dimeter	Equal variance assumed	3.310	.099	.407	10	.693	.02833	.06969	-.12694	.18360
	Equal variance not assumed			.407	7.479	.696	.02833	.06969	-.13433	.19100

ผลการทดสอบ t-test ทำการทดสอบสมมติฐานแบบทางเดียว เพื่อพิจารณาความแปรปรวนของประชากรทั้ง 2 กลุ่ม ได้ค่า sig. เท่ากับ .099 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญ $\alpha = .05$ ดังนั้นจึงยอมรับ $H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2$ นั่นคือสรุปว่าความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางไฮฟา เท่ากัน

ค่า p-value เท่ากับ $\text{sig.}(2\text{-tailed})/2 = .693/2 = 0.3465$ ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนด $\alpha = .05$ จึงยอมรับ $H_0 : \mu_1 \geq \mu_2$ นั่นคือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไฮฟราโดยเฉลี่ยในอาหารที่มีส่วนผสมของใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน *dfr* ไม่น้อยกว่าใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *dfr*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเมลานิน

Group Statistics

	melanin	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
dimeter1	control	6	4.4783	.04750	.01939
	DFR	6	4.4817	.06706	.02738

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
dimeter1	Equal variances assumed	.880	.370	-.099	10	.923	-.00333	.03355	-.07809	.07142
	Equal variances not assumed			-.099	9.009	.923	-.00333	.03355	-.07922	.07255

ผลการทดสอบ t-test ทำการทดสอบสมมติฐานแบบทางเดียว เพื่อพิจารณาความแปรปรวนของประชากรทั้ง 2 กลุ่ม ได้ค่า sig. เท่ากับ .370 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญ $\alpha = .05$ ดังนั้นจึงยอมรับ $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$ นั่นคือสรุปว่าความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางของเมลานินเท่ากัน

ค่า p-value เท่ากับ $\text{sig.}(2\text{-tailed})/2 = .923/2 = 0.461$ ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนด $\alpha = .05$ จึงยอมรับ $H_0: \mu_1 \geq \mu_2$ นั่นคือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเมลานินโดยเฉลี่ยในอาหารที่มีส่วนผสมของใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนอินโดล *dfr* ไม่น้อยกว่าใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนอินโดล *dfr*

3. ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่างของผลการยับยั้งเชื้อราโรคราไหม้ระหว่างยาสูบที่ได้รับและไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน *chs*

3.1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย

Group Statistics

	hypha	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
dimeter	control	6	3.6517	.02787	.01138
	CHS	6	3.6367	.03830	.01563

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
dimeter	Equal variance assumed	.461	.512	.776	10	.456	.01500	.01934	-.02808	.05808
	Equal variance not assumed			.776	9.136	.458	.01500	.01934	-.02864	.05864

ผลการทดสอบ t-test ทำการทดสอบสมมติฐานแบบทางเดียว เพื่อพิจารณาความแปรปรวนของประชากรทั้ง 2 กลุ่ม ได้ค่า sig. เท่ากับ .512 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญ $\alpha = .05$ ดังนั้นจึงยอมรับ $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$ นั่นคือสรุปว่าความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางไฮฟรา เท่ากัน

ค่า p-value เท่ากับ $\text{sig.}(2\text{-tailed})/2 = .456/2 = 0.228$ ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนด $\alpha = .05$ จึงยอมรับ $H_0: \mu_1 \geq \mu_2$ นั่นคือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไฮฟราโดยเฉลี่ยในอาหารที่มีส่วนผสมของใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน *chs* ไม่น้อยกว่าใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *chs*

3.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเมลานิน

Group Statistics

	melanin	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
dimeter1	control	6	2.0805	.01901	.00776
	CHS	6	2.8000	.03033	.01238

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
dimeter1	Equal variances assumed	.786	.396	-49.232	10	.000	-.71950	.01461	-.75206	-.68694
	Equal variances not assumed			-49.232	8.404	.000	-.71950	.01461	-.75292	-.68608

ผลการทดสอบ t-test ทำการทดสอบสมมติฐานแบบทางเดียว เพื่อพิจารณาความแปรปรวนของประชากรทั้ง 2 กลุ่ม ได้ค่า sig. เท่ากับ .396 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญ $\alpha = .05$ ดังนั้นจึงยอมรับ $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$ นั่นคือสรุปว่าความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางเมลานินเท่ากัน

ค่า p-value เท่ากับ $\text{sig.}(2\text{-tailed})/2 = .000/2 = 0$ ซึ่งน้อยกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนด $\alpha = .05$ จึงปฏิเสธสมมติฐาน $H_0: \mu_1 \geq \mu_2$ ยอมรับ สมมติฐาน $H_1: \mu_1 < \mu_2$ นั่นคือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเมลานินโดยเฉลี่ยในอาหารที่มีส่วนผสมของไบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน *chs* น้อยกว่าไบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *chs*

ภาคผนวก ง

ลำดับนิวคลีโอไทด์

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *chs* จากพืช *Perilla frutescens*

1 gaaactgtca cactttccac tactttccac laattaacta ccactgcccgc aaacaacatt
 21 ttcccggcga cgaaaatggg gaccgttgag gacatccgcc gtgctcaacg tgccgagggc
 121 cctgccaccg tgttgccgat cggcactgcc acaccggaga attgctcga ccagagcacc
 181 tatcccatt actacttccg catcacaac agtgagcata ggaccgacct aaaagaaaa
 241 ttcaagegca tgtgcgagaa atccatgac aggaaacgct acatgcatct gacggagggag
 301 ttctcaagg aaaatccgaa catgacggcg tacatggcgc cgtcgtcga cgcgcggcaa
 361 gacatcgtgg tggtaggggt gccgaagctg ggcaaagagg cagcgcagaa ggcgatcaag
 421 gaatgggggc agcccaaac caagatcacc cacctcgtt tctgcaccac cagcggcgtc
 481 gacatgcccg gcgcgacta ccagtcacc aagctcctc gctcccgcce ctccgtcaag
 541 cgtttcatga tgtaccagca gggctgctac gccggcggca ctgctcctc catggccaag
 601 gacctgtcgt agaacaacgc cggcgttagg gttttggtc tctgctcga gatcaccgcc
 661 gttacctcc gcggcccag cgagtctac ctgacagcc tctcgggca ggcgctgttc
 721 gggcagggcg ctgccccgt catcgtcggc tccgacccc tggtaggggt ggaagcggccg
 781 ctctccagc tctcctgc agcgcagac atcctgccc acagcagcg cgcgatcgac
 841 gggcatttgc gtgaggtcgg gctgacatc caectctga aagatgtccc gggccttacc
 901 tcgaagaaca tcgagaaaag ctgaaaggag gctttcgggc cgttggggat ttccgattgg
 961 aactcgggtg tctggattgc gcatccgggc gggcccgcga tactggatca ggtggagggc
 1021 aagctcggat tgaagcccga gaaactgcga tcaacgcgac acgtgcttgg tgagtacggc
 1081 aacatgctga gcgcgtgctg gctctttat ttggatgaga tgaggaagtc ctccccaag
 1141 gaaggggatga gctccaccgg cgagggggctc gattgggggg tgcgtttgg gttcggggcc
 1201 ggcctcacgg ttagacgggt ggtgctcac agcgtcccga ttaataatg agattgatcc
 1261 agtttgaac ctgctgctgt tgaaggatg gaagatct ctatgttct cggtgattct
 1321 actagtatc taitttcaa ttattttt attttatt gatctattat gttacaaata
 1381 ataataata aaaaagatg acggttatc gatccataca tcaagttgt gtagcaatg
 1441 laattatgt ttgatggac agcctgcglg ttccgttaa ggatglatgt atttgttcg
 1501 acaaaaagca attacgtta caaaaacaa taaaattag tgattagtga ttagtgatg
 1561 aatattataa ttatatac

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้