



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน
จากดอกปทุมมา(*Curcuma* spp.)

THE STUDY OF ANTHOCYANIN BIOSYNTHETIC GENES IN
PATUMA (*Curcuma* spp.) FLOWERS

โดย

รัฐพร จันทรเดช พิระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน
จากดอกปทุมมา (*Curcuma* spp.)

THE STUDY OF ANTHOCYANIN BIOSYNTHETIC GENES IN
PATUMA (*Curcuma* spp.) FLOWERS

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2551

จำนวน 393,000 บาท

หัวหน้าโครงการ

รัฐพร จันทร์เดช

ผู้ร่วมโครงการ

พีระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

26 กันยายน 2551

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้สนับสนุนงบประมาณในการดำเนินโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2551 การวิจัยครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี จากความอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้



สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญ	ข
สารบัญตาราง	ค
สารบัญภาพ	ง
บทคัดย่อ	จ
คำนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
การตรวจเอกสาร	3
สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย	12
อุปกรณ์การวิจัย	13
วิธีการวิจัย	17
ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	24
สรุปผลการวิจัย	34
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	38

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงรายชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่ใช้ในการแยก <i>dfr</i> gene จากดอกปทุมมา ด้วยเทคนิค RT-PCR	18
2 แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR เพื่อแยกชิ้นส่วนของยีน <i>dfr</i>	19
3 แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR เพื่อแยกชิ้นส่วนของยีน <i>ans</i>	19
4 แสดงจำนวนโคโลนีสีขาวและน้ำเงินจากการคัดเลือกโคลนที่ได้รับ rDNA โดยใช้ ampicillin/X-gal plate	27
5 ระดับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน (5'3' frame 2) ของ Patative <i>dfr</i> gene ที่แยกจากปทุมมาขนาดประมาณ 500 คู่เบส ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับ <i>dfr</i> gene จากพืชปีศาจอื่นๆ	32
6 ระดับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ Patative <i>ans</i> gene ที่แยกจากปทุมมาขนาดประมาณ 850 คู่เบส ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับ <i>ans</i> gene จากพืชปีศาจอื่นๆ	32

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่	3
2 แสดงโครงสร้างพื้นฐาน และโครงสร้างเมื่อเกิดปฏิกิริยาดัดแปลง ของ flavonoids และ anthocyanins	6
3 แผนภาพแสดงปฏิกิริยาเคมีที่เร่งปฏิกิริยาโดย dihydroflavonol 4-reductase. CHS: chalcone synthase, F3H: flavanone 3-hydroxylase, F3'H: flavonoid 3'-hydroxylase, F3'5'H: flavonoid 3'5' hydroxylase, DFR: dihydroflavonol 4-reductase, ANS: anthocyanin synthase, 3GT: flavonoid 3-glucosyltransferase.	9
4 แสดงผลการสกัด total RNA โดยใช้ TRIZOL [®] Reagent	24
5 แสดงการแยก <i>df</i> r gene ด้วยเทคนิค RT-PCR	25
6 แสดงการแยก <i>ans</i> gene ด้วยเทคนิค RT-PCR	26
7 แสดงโคโลนีสีฟ้าซึ่งเป็นโคลนที่ไม่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม และสีขาวซึ่งเป็นโคลนที่คาดว่าจะได้รับดีเอ็นเอสายผสม จากการคัดเลือกด้วย ampicillin/x-gal	27
8 แสดงการตรวจสอบโคลนที่รับ Putative <i>df</i> r gene	28
9 แสดงการตรวจสอบโคลนที่รับ Putative <i>df</i> r gene	29
10 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative <i>ans</i> gene	29
11 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative <i>ans</i> gene	30
12 แสดงแบบแผนการแสดงออกของยีน <i>DFR</i> และ <i>ANS</i> ของพืชเนยในต้น Transgenics	33

การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

จากดอกปทุมมา (*Curcuma spp.*)

THE STUDY OF ANTHOCYANIN BIOSYNTHETIC GENES IN

PATUMA (*Curcuma spp.*) FLOWERS

รัฐพร จันทรเดช¹, พิระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์²

RUTTAPORN CHUMDET¹, PRERAVUT WONGSAWAD²

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

²ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

จากการศึกษาวิธีสังเคราะห์แอนโทไซยานินในดอกปทุมมา (*Curcuma spp.*) โดยการแยกยีน Dihydroflavonol 4-reductase (*dfr*) และ Anthocyanin synthase (*ans*) จากส่วนกลีบเลี้ยงของปทุม ซึ่งยีนทั้งสองมีบทบาทสำคัญในวิถีดังกล่าว พบว่าสามารถแยกยีนทั้ง 2 ได้ ชิ้นส่วนของยีนที่มีขนาด 500 และ 850 คู่เบสตามลำดับ จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนทั้งสองพบว่า ชิ้นส่วนของยีน *dfr* ของปทุมมาคล้ายกับยีน *dfr* ใน *Lilium hybrid* 65% ในขณะที่ยีน *ans* คล้ายกับยีน *ans* ใน *Anthurium andraeanum* 96% และจากการตรวจสอบหน้าที่ของยีนทั้งสองโดยโคลนเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pBI121 ในทิศทาง antisense แล้วส่งถ่ายเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชเนื้อเยื่อและปทุมมาด้วยเทคนิค Agrobacterium transformation พบว่าสามารถลดการแสดงออกของยีนทั้งสองในพืชเนื้อได้

คำนำ

ไม้ตัดดอกเป็นสินค้าส่งออกประเภทหนึ่งของประเทศไทยที่สร้างมูลค่าหลายร้อยล้านบาท ปทุมมา (*Curcuma Spp.*) เป็นหนึ่งในจำนวนไม้ดอกหัวที่ทำรายได้สูง เมื่อเทียบกับไม้ดอกหัวอื่นๆ เช่น ว่านนางค่อม ว่านมหาลาก ว่านมหาโชค ปทุมมากำลังได้รับความนิยมอย่างสูงในตลาดต่างประเทศโดยมีมูลค่าการส่งออกประมาณ 30 ล้านบาท (พ.ศ.2542) ซึ่งเป็นอันดับสองรองจากกล้วยไม้ โดยมีตลาดการส่งออกหลักคือ ญี่ปุ่น, จีน, เกาหลี, ไต้หวัน, เนเธอร์แลนด์, อเมริกา, ออสเตรเลีย และนิวคาลิโดเนีย ปทุมมาเป็นพืชมีหัวซึ่งทำหน้าที่สะสมน้ำและอาหารทำให้เก็บรักษาและขนส่งได้ง่าย อายุในแจกันเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีส่วนสำคัญในการทำให้ดอกปทุมมาได้รับความนิยม นอกจากนี้ปทุมมาถูกนำมาใช้เป็นพืชหลักในการพัฒนาพืชสกุลขมิ้นเนื่องจากมีลักษณะดีหลายประการ เช่น ทรงต้นขนาดใหญ่ ชูช่อดอกเด่นสง่าเหนือทรงพุ่ม แตกกอดี แม้มีข้อเสียที่การมีสีเขียวแต้มทับสีม่วงชมพูที่บริเวณปลายประดับส่วนบน ซึ่งทำให้มีลักษณะคล้ายการเหี่ยว การปรับปรุงพันธุ์เพื่อแก้ไขข้อเสียดังกล่าวจะทำให้ปทุมมาได้รับความนิยมสูงขึ้น

ในวงการไม้ดอกซึ่งเป็นไม้แฟชั่นนั้น ไม่มีไม้ชนิดไหนที่จะอยู่ในความนิยมเป็นเวลานานจึงควรเร่งรัดการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้พันธุ์ใหม่ๆ อย่างต่อเนื่อง แต่การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีธรรมชาติ หรือการให้มนุษย์ช่วยในการผสมพันธุ์นั้นต้องใช้ทุน เวลาและแรงงานจำนวนมาก จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการปรับปรุงสีดอก เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับดอกปทุมมา

เนื่องจากมีรายงานมาก่อนแล้วว่าแอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่ทำให้เกิดสีที่ต่างกัน ดอกไม้ ดังนั้นในการวิจัยนี้ ได้ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในดอกปทุมมา เพื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติ และหาสามารถแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินได้แล้ว อาจจะนำยีนที่ได้ไปปรับปรุงสีดอกโดยการเปลี่ยนแปลงสีของดอกของปทุมมาเองหรือสีของดอกไม้ชนิดอื่นต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อแยกยีน Dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) และ Anthocyanin synthase (*ANS*) จากดอกปทุมมา (*Curcuma Spp.*)
2. เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สามารถแยกได้ และวิเคราะห์ยีนกับฐานข้อมูลใน Gene bank
3. ตรวจสอบหน้าที่ของยีนทั้งสองในระดับการ Transcription

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงแบบแผนการแสดงออก บทบาทและหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในดอกปทุมมาและใช้เป็นแนวทางการปรับปรุงสีดอกปทุมมา
2. พัฒนาคำรู้เกี่ยวกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในดอกปทุมมา
3. เกิดความร่วมมือระหว่างบุคลากรต่างสถาบันในการทำวิจัยที่ยั่งยืน



ตรวจเอกสาร



ภาพที่ 1: ปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่

ที่มา: <http://www.doae.go.th/plant/patumma.htm>

ปทุมมา จัดเป็นพืชในวงศ์ *Zingiberaceae* ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับขิงและข่า อยู่ในสกุล *Curcuma* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบประเทศอินโดจีน พม่า และไทย สำหรับในประเทศไทย จะพบเห็นปทุมมาได้แทบทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะมีความหลากหลายของสายพันธุ์มากที่สุด ซึ่งจากรายงานพบว่ามีประมาณ 70 ชนิด เฉพาะในประเทศไทยพบประมาณ 30 ชนิด จึงนับได้ว่าประเทศไทยเป็นแหล่งพันธุกรรมของไม้ดอกสกุลขมิ้นที่มีความหลากหลายมาก

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของปทุมมา (*Cucurma spp.*)

ปทุมมา (*cucurma spp.*) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีลำต้นสะสมอาหารอยู่ใต้ดินแบบเหง้า ส่วนลำต้นเหนือดินหรือลำต้นเทียมนั้น เกิดจากกาบใบที่ห่อตัวกันแน่น ปทุมมาเป็นไม้หัวมีการเจริญเติบโตทางลำต้นและให้ดอกในช่วงฤดูฝนราวเดือนมิถุนายนถึงเดือนกันยายน จากนั้นจะทิ้งใบจนหมดแล้วพักตัวอยู่ในดินตลอดช่วงฤดูหนาวราวเดือนธันวาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ เมื่อถึงฤดูฝนประมาณเดือนเมษายนก็จะเจริญเติบโตออกดอกอีกครั้ง ดอกปทุมมามีรูปทรงสง่าและมีสีสันทสวยงาม เป็นที่ประทับใจและชื่นชอบของชาวต่างประเทศจนได้สมญาว่า สยามทิวลิป (Siam Tulip) นอกจากนี้ปทุมมายังได้รับการส่งเสริมให้เป็นไม้ตัดดอกและเก็บหัวพันธุ์เพื่อส่งไปขายยังต่างประเทศ ไม้ในสกุลนี้แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1.1 กลุ่มปทุมมา พบได้ทั่วไปในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตามเขตชายแดนไทย-ลาว และตามเขตชายแดนไทย-เขมร ส่วนใหญ่มักพบอยู่ตามทุ่งหญ้าที่โล่งแจ้งบริเวณชายป่าเบญจพรรณหรือบริเวณชั้นล่างของป่าเต็งรัง ลักษณะช่อดอกในกลุ่มปทุมมาจะแทงช่อดอกออกมาจากส่วนกลางของลำต้นเทียม ก้านช่อดอกยาวตรง ดอกจริงมีสีม่วงหรือสีม่วงอ่อน ไม้ในกลุ่มนี้มีหลายชนิดที่สามารถนำมาผลิตเป็นไม้ตัดดอก ไม้กระถาง และไม้ประดับแปลง เช่น ปทุมมา บัวสวรรค์ บัวลายปราจีน บัวลายลาว เทพรัลิก ทับทิมสยาม ช่อมรกต และปทุมรัตน์ เป็นต้น

1.2 กลุ่มกระเจียว กลุ่มนี้มีอยู่หลายชนิดพบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ชนิดที่พบขึ้นในที่โล่งแจ้งมักจะมีลักษณะใบหนา มีขนมาก ส่วนพวกที่พบขึ้นในป่าชื้นมักจะมีลักษณะใบบาง ลักษณะของช่อดอกจะเป็นทรงกระบอก อาจแทงช่อดอกขึ้นมาจากเหง้าโดยตรงหรือออกจากทางด้านข้างของลำต้นเทียม ดอกจริงมีสีขาวหรือเหลือง หลายชนิดในกลุ่มนี้สามารถผลิตเป็นไม้ตัดดอก ไม้กระถางได้เช่นกัน ที่สำคัญได้แก่ บัวชัน กระเจียวส้ม พลอยไพลิน พลอยทักษิณ และพลอยชมพู เป็นต้น

2. flavonoids

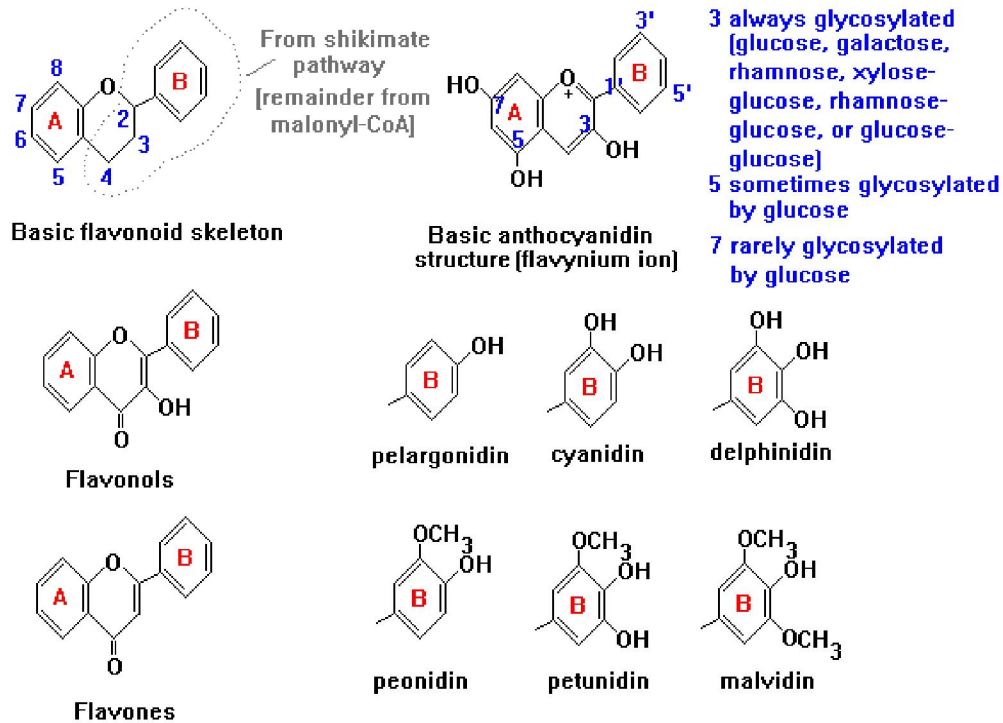
โดยปกติในพืชชั้นสูงจะมีการสังเคราะห์สารทุติยภูมิหลายชนิด เช่น phenolics, alkaloids และ terpenoids ซึ่ง phenolics จัดเป็นสารทุติยภูมิที่พบมากที่สุด และมีส่วนประกอบเป็นวงแหวนอะโรมาติก ตัวอย่างของสารประกอบ phenolics เช่น phenols, phenylpropanoid, flavonoids, tannins และ quinones (Kaufman et al., 1999) flavonoids มีบทบาทสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพืช anthocyanins เป็นรงควัตถุที่จัดอยู่ในกลุ่มของ

flavonoids พบในแควีโอลและในเนื้อเยื่อดอก และใบของพืช anthocyanin พบมากในแควีโอลของกลีบดอก (petal) เป็นรงควัตถุที่ทำให้เกิดสีที่แตกต่างกันในพืชผัก ผลไม้ และดอกไม้ (Martin และ Gerats 1993; Toguri et al., 1993) flavanones เป็นสารในกลุ่มของ flavonoids ที่ทำให้รสชาติของผัก และผลไม้ต่างกัน (Bohm 1986 และ Horowitz 1986) ตัวอย่างของ flavanones เช่น naringin และ poncirin พบในผลองุ่น, ส้มเปรี้ยว และส้มโอ ทำให้ผลไม้เหล่านี้มีรสขม flavonols จัดอยู่ในกลุ่มของ flavonoids เช่นกันซึ่งจะช่วยดึงดูดแมลงต่างๆ เพื่อการถ่ายละอองเรณู และยังช่วยปกป้องอันตรายของใบจากรังสีอุตราไวโอเลต (Brouillard และ Dangles 1993) นอกจากนี้ flavonols มีบทบาทในการสืบพันธุ์ของพิทูเนีย (*Petunia hybrida*) โดยเกี่ยวข้องกับการเจริญของละอองเรณู (Miller et al., 1999) flavonoids ชนิดอื่นๆ เช่น isoflavones เป็นสารประกอบที่ส่งสัญญาณระหว่างรากพืช และแบคทีเรียในดินที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้

นอกจากสารทุติยภูมิจะมีประโยชน์ต่อพืชแล้วยังมีประโยชน์ต่อมนุษย์ในทาง การแพทย์อีก เช่น anthocyanins มีคุณสมบัติเป็น antioxidant (Cody et al., 1986) ซึ่งการบริโภคผัก และผลไม้ที่มี anthocyanins สูงจะช่วยป้องกันโรคหัวใจ และหลอดเลือด นอกจากนี้ anthocyanins ยังช่วยลดการเกิด low-density lipoprotein (LDL) cholesterol (Cody et al., 1986, 1988) flavonoids ชนิดอื่นๆยังช่วยป้องกันการแข็งตัวของเลือด และปกป้องอันตรายของเซลล์จากสารก่อมะเร็ง (Habtemariam 1997, 2000)

3. โครงสร้างพื้นฐานของ flavonoids และ anthocyanins

โครงสร้างพื้นฐานของ flavonoids ประกอบไปด้วยคาร์บอน 15 อะตอม (C6-C3-C6) ซึ่งมีวงแหวนอะโรมาติก 2 วง (วงแหวน A และ B) ขนาบข้างวงแหวนวงกลางซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปเฮเทอโรไซเคิล ยกเว้น chalcones และ dihydrochalcones (McIntosh 1990) การรวมของหมู่ไฮดรอกซิล, น้ำตาล, ออกซิเจน, หมู่เมทิล และอื่นๆที่ตำแหน่งคาร์บอนในระหว่างปฏิกิริยาจัดแปลง ทำให้เกิด flavonoids หลายชนิด เช่น flavones (apigenin และ luteolin), flavonols (keampferol, myricetin และ quercetin), flavanones (hesperetin และ naringenin), isoflavones (genistein และ daidzein) ส่วนโครงสร้างพื้นฐานของ anthocyanins นั้นประกอบด้วยโครงสร้างของ 2-phenylbenzophrylium (flavylium) (Kuhnau, 1976) สารในกลุ่มของ anthocyanins มีประมาณ 200 หรือมากกว่า 200 ชนิด (Parkinson และ Brown, 1981) pelargonidin, cyanidin และ delphinidin คือ anthocyanins ที่เกิดจากปฏิกิริยา hydroxylation, O-methylation, glycosylation และ acylation ซึ่ง anthocyanins เหล่านี้จะมีโครงสร้างคล้ายๆกัน ต่างกันที่วงแหวน B ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2: แสดงโครงสร้างพื้นฐาน และโครงสร้างเมื่อเกิดปฏิกิริยาตัดแปลงของ flavonoids และ anthocyanins

ที่มา: <http://www.hort.purdue.edu/rhodcv/hort640c/secprod/se00012.htm>

4. ปัจจัยซึ่งมีผลเกี่ยวข้องกับการกำหนดสีในพืช

การสะสมของสารกลุ่มเม็ดสีในอัตรส่วนที่แตกต่างกัน ในบริเวณส่วนต่างๆ ของพืช จะมีผลต่อการให้สีที่แตกต่างกันออกไป สารกลุ่มเม็ดสี ได้แก่ Flavonoids ซึ่งรวมถึง anthocyanins, carotenoid และ betalain สารประกอบสองกลุ่มแรกจะพบอยู่ทั่วไป ส่วน betalain จะพบเฉพาะใน *Caryophyllales*, *Amaranthus* และบีท และไม่พบเม็ดสีนี้อยู่ร่วมกับ anthocyanins อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ ก็ส่งผลต่อการมองเห็นสีของดอกไม้เช่นกัน การรวมไอออนของธาตุโลหะและเม็ดสีรวม เช่น Flavonol และ Flavones จะมีผลต่อการเปลี่ยนสีของ anthocyanins โดยจะทำให้เกิดการสะสมเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความเสถียร และส่งผลให้สีดูดกกลืนแสงได้ดีขึ้นจึงเป็นการเพิ่มความเข้มสี นอกจากนี้ค่าพีเอชในแวคิวโอลมีผลในการกำหนดเจดสีของดอกไม้ด้วย ในพืชหลายชนิดพบว่าดอกไม้เมื่ออายุมากขึ้น จะมีค่าพีเอชสูงขึ้น และส่งผลให้เกิดสีโทนฟ้าเพิ่มขึ้น โดยที่ปริมาณเม็ดสีไม่เปลี่ยนแปลง (กนกพร 2545) ยังมีรายงานถึงพื้ญเนียกลายพันธุ์ซึ่งส่งผลให้ดอกไม้สีโทนน้ำเงิน เมื่อค่าพีเอชของกลีบดอกไม้เพิ่มขึ้นแต่ส่วนประกอบของ anthocyanins ไม่เปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน (Houwelingen et al., 1998) จะเห็นได้ว่าปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมค่าพีเอชในแวคิวโอลนั้นมีทั้งปัจจัยทาง

สภาวะแวดล้อมและทางพันธุกรรม รูปร่างของเซลล์ซึ่งสะสม anthocyanins นั้นก็มีผลต่อการมองเห็นสีกลีบดอกของ *Antirrhinum majus* ในต้นปกติพบว่าเซลล์เอพิเดอร์มิสชั้นในมีลักษณะเป็นรูปกรวย ซึ่งจะดูดกลืนแสงได้ดีกว่าเซลล์แบนราบในต้นพืชกลายพันธุ์ (Noda et al., 1994)

5. ชีวสังเคราะห์ flavonoids และ anthocyanins

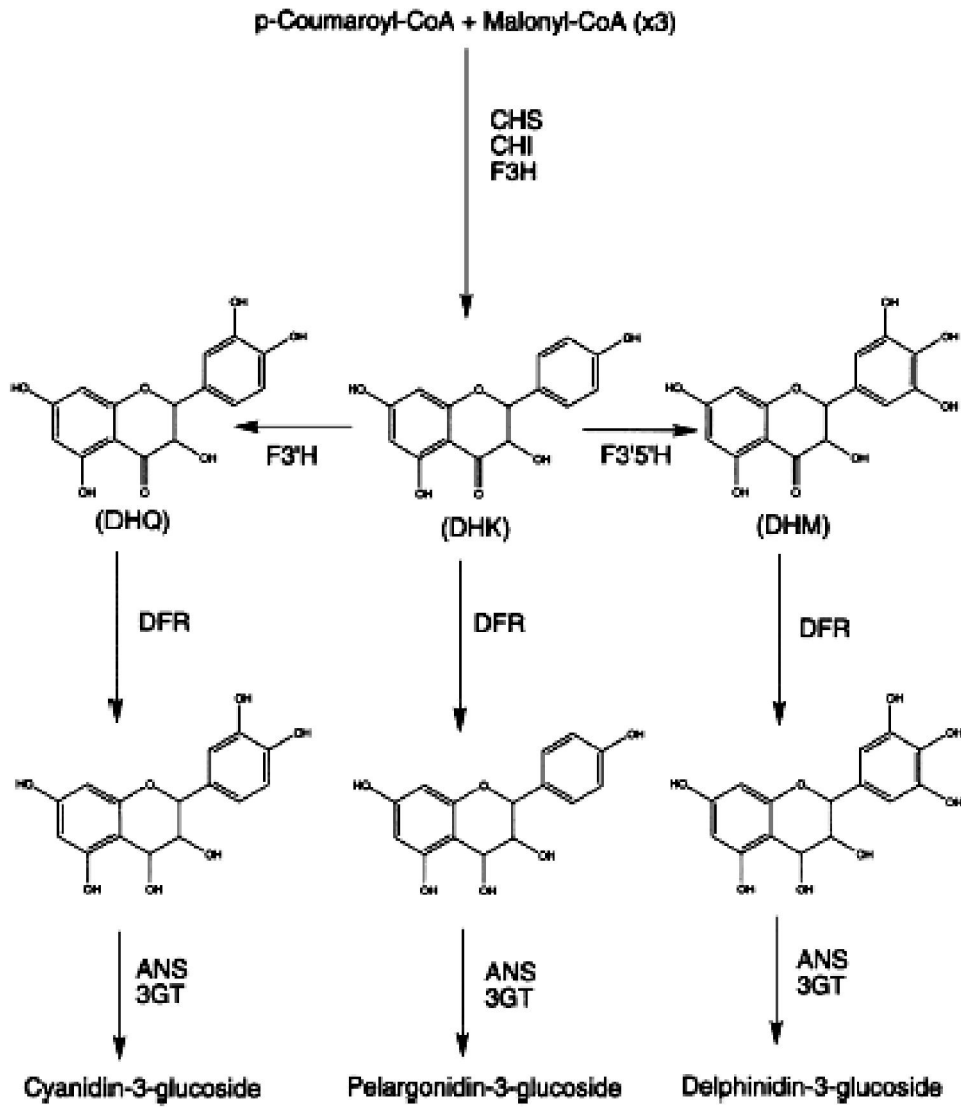
ชีวสังเคราะห์ flavonoids และ anthocyanins สรุปได้ดังภาพที่ 3 คือ ขั้นตอนแรกที่เข้าสู่ชีวสังเคราะห์ flavonoids เกิดจากการกระตุ้นให้รวมตัวกันของ molonyl CoA 3 โมเลกุล และ *p*-coumaroyl CoA 1 โมเลกุล โดยใช้เอนไซม์ chalcone synthase (CHS) ให้ผลผลิตเป็น naringenin chalcone ซึ่งมีสีเหลือง ขั้นที่สองเป็นการทำ isomerization ของ chalcone โดยเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) ให้ผลผลิตเป็น naringenin flavanone ที่ปราศจากสี หลังจากนั้นจะมีการเติมหมู่ไฮดรอกซี (OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 โดยเอนไซม์ flavanone 3-hydroxylase (F3H) ให้สารกลุ่ม dihydroflavonol คือ dihydrokaempferol (DHK) สารประกอบนี้อาจได้รับการเติมหมู่ไฮดรอกซี ที่ตำแหน่งต่างๆ เพิ่มเติม โดยเอนไซม์ flavonoid 3'-hydroxylase (F3' H) และ flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3' 5'H) และให้สารประกอบกลุ่ม dihydroflavonol ชนิดอื่นเพิ่มเติม ได้แก่ dihydroquercetin (DHQ) และ dihydromyricetin (DHM) จำนวนหมู่ไฮดรอกซีบนวง B นี้มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเม็ดสีที่แตกต่างกัน สารกลุ่ม dihydroflavonol ต้องการเอนไซม์อย่างน้อย 3 ขั้นตอน สำหรับเปลี่ยนเป็นสารมีสีกลุ่ม anthocyanins เริ่มจากการกระตุ้นการรีดิวซ์สารประกอบกลุ่ม dihydroflavonol ด้วยเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) และให้สารกลุ่ม leucoanthocyanidin ได้แก่ leucocyanidin, leucodelphinidin และ leucopelargonidin ซึ่งจะถูก oxidation, dehydration และ glycosylation ให้สารกลุ่ม anthocyanin ซึ่งให้เม็ดสีแตกต่างกัน เช่น แดงของ cyanidin น้ำเงินของ delphinidin ส้มของ pelargonidin นอกจากนี้ อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยาต่างๆ เพิ่มเติม เช่น glycosylation, methylation และ acylation และให้เม็ดสี anthocyanin ที่จำเพาะในพืชแต่ละชนิด สารประกอบ anthocyanin เหล่านี้ต้องการเอนไซม์ glutathione S-transferase (GST) และ transporters ซึ่งเรียกว่า glutathione pump สำหรับเคลื่อนย้ายสารจากไซโตพลาสซึมเข้าสู่แวคิวโอล

ถึงแม้ว่ากระบวนการการสังเคราะห์ anthocyanins ในข้าวโพด สแนฟดอกอน และพิทูเนียจะเป็นหลักการของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ anthocyanins โดยทั่วไป แต่ก็ยังมีความแตกต่างของชนิด anthocyanins ที่สังเคราะห์โดยพืชแต่ละสปีชีส์ เช่นในพิทูเนียโดยปกติจะไม่ผลิต pelargonidin ขณะที่สแนฟดอกอน และข้าวโพดไม่สามารถผลิต delphinidin

6. การควบคุมรูปแบบของการเกิดสี

กลีบดอกไม้จะมีรูปแบบการเกิดสีซึ่งเกิดจากการสะสมของ anthocyanins ที่เซลล์จำเพาะ การควบคุมชีวสังเคราะห์ anthocyanins จะควบคุมที่ระดับการถอดรหัสยีนเป็นส่วนใหญ่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ anthocyanins แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มของยีนโครงสร้างซึ่งทำให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาชีวเคมีการสร้างสาร anthocyanins และกลุ่มของยีนควบคุมจะให้โปรตีนซึ่งกำหนดการแสดงออกของยีนโครงสร้างและรูปแบบของการสะสมเม็ดสี โดยการแสดงออกของยีนควบคุม จะมีรูปแบบที่จำเพาะต่อรูปแบบของการเกิดสี (Holton T.A. และ Cornish E.C. 1995) ถึงแม้ว่าในพืชหลายชนิดจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรม แต่ก็พบว่ายีนโครงสร้าง และยีนควบคุมซึ่งทำหน้าที่เดียวกัน ในชีวสังเคราะห์ anthocyanins นั้น จะมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ร่วมกัน และยีนเหล่านี้ยังถูกกระตุ้นการแสดงออกด้วยแสง การศึกษาถึงการควบคุมชีวสังเคราะห์ anthocyanins โดยเฉพาะเทคนิคการกลายพันธุ์นั้นพบว่าการควบคุมชีวสังเคราะห์ นี้ส่วนใหญ่เกิดจากการทำงานร่วมกันของยีนควบคุม ในการกำหนดรูปแบบการแสดงออกของยีนโครงสร้าง

มีการจำแนก ยีนควบคุมชีวสังเคราะห์ anthocyanins ในพืชหลายชนิด ในข้าวโพดพบว่ามียีนควบคุม 2 กลุ่ม คือ *r* และ *cl* ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในเนื้อเยื่อต่างๆ สมาชิกของยีนในกลุ่ม *r* (*r*, *lc*, *sn*, *b*) จะถอดและแปลรหัสให้โปรตีนซึ่งมีกรดอะมิโนที่เป็นกรดที่ปลาย N จำนวนมาก และที่ปลาย C มีส่วนของ basic helix-loop-helix (bHLH) ทำหน้าที่จับกับ DNA (DNA binding domain) ในขณะที่สมาชิกของกลุ่ม *cl* (*cl* และ *pl*) จะถอดและแปลรหัสให้



ภาพที่3:แผนภาพแสดงปฏิกิริยาเคมีที่เร่งปฏิกิริยาโดย dihydroflavonol 4-reductase.

CHS: chalcone synthase, F3H: flavanone 3-hydroxylase, F3'H: flavonoid 3'-hydroxylase, F3'5'H: flavonoid 3'5' hydroxylase, DFR: dihydroflavonol 4-reductase, ANS: anthocyanin synthase, 3GT: flavonoid 3-glucosyltransferase.

ที่มา: Eric T. Johnson *et al.* (2000)

โปรตีนซึ่งมีโดเมน MYB ที่มีส่วนของ helix-turn-helix สำหรับจับกับ DNA ในข้าวโพดจะมีสองกลุ่มนี้หลายยีน แต่มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกันไป (Ludwig และ Wessler 1990), (Cone et al., 1993) กลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนในพืชสังเคราะห์นี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานการทำงานของยีนควบคุมในการควบคุมการแสดงออกที่เหนือโปรโมเตอร์ของ DFR (Grotewold et al., 1994), (Sainz et al., 1997)

มีการรายงานการแยกยีน *dfr* จากข้าวโพด และสนแพดราคอน โดยการติดตาม transposon พบว่าการกลายพันธุ์ที่ยีน *a₁* ในข้าวโพดทำให้ชั้นนอกของเมล็ดข้าวโพดไม่มีสี (O'Reilly et al., 1985) และมีการแสดงว่า *a₁* cDNA จะถอดและแปลรหัสให้เอนไซม์ Dihydroflavonol 4-Reductase (DFR enzyme) (Reddy et al., 1987) ส่วนการกลายพันธุ์ที่ยีน *pal* ของสนแพดราคอน ทำให้หยุดการสร้าง anthocyanins ทำให้ดอกของสนแพดราคอนมีสีขาวหรือมีสีขาวปะปนเป็นบางส่วน ซึ่งยีน *pal* นี้ถอดและแปลรหัสออกมาเป็นเอนไซม์ DFR (Almeida et al., 1989) และลำดับกรดอะมิโนระหว่างยีน *pal* ของสนแพดราคอน และยีน *a₁* ของข้าวโพดนั้นมีความคล้ายคลึงกัน ในปี 1989 Beld และคณะ ใช้โคลน *dfr* ของสนแพดราคอน เพื่อแยกยีนที่มีลำดับเบสเหมือนกันในพิทูเนีย พบว่าพิทูเนียมียีน *dfr* ที่แตกต่างกันสามชนิดคือ *dfrA*, *dfrB* และ *dfrC* แต่มีเพียง *dfrA* เท่านั้นที่สามารถถอดรหัสในเนื้อเยื่อของดอกไม้ และยีน *dfrA* นี้เป็นยีนที่อยู่ตำแหน่ง An6 ของพิทูเนีย (Huits et al., 1994) Forkmann และ Ruhnu พบว่าส่วนใหญ่เอนไซม์ DFR จากพิทูเนียจะใช้ dihydromyricetin (DHM) มากกว่า dihydroquercetin (DHQ) เป็นสารตั้งต้น เพื่อเปลี่ยนไปเป็น leucodelphinidin และไม่มีการเปลี่ยนสารตั้งต้น dihydrokaempferol (DHK) ไปเป็น leucopelargonidin ซึ่งการใช้สารตั้งต้นที่จำเพาะจะทำให้เกิดการสะสม และการขาดอนุพันธ์ delphinidin ในพิทูเนีย (Gerats et al., 1982)

จากรายงานการทำให้เกิด flavonoids ชนิดใหม่ขึ้น โดยนำ *dfr* gene ของข้าวโพด (Meyer et al., 1987) หรือ *full length dfr* gene ของเยอบีรา (Elomaa et al., 1995, Johnson et al., 1999) ส่งถ่ายสู่พิทูเนียทำให้ พิตูเนียสามารถสังเคราะห์ pelargonidin ซึ่งปกติไม่สามารถสังเคราะห์ได้ และทำให้พิทูเนียมีดอกสีส้ม ในดอกของ *Forsythia intermedia* ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อส่งถ่าย *sense dfr* gene จาก *Antirrhinum* และ *sense ans* gene จาก *Matthiola* (Rosati et al., 2000) ทำให้ดอก *Forsythia intermedia* มีสีน้ำตาลเหลือง การเปลี่ยนสีดอก *Dianthus caryophyllus* โดยการส่งถ่าย *sense dfr* gene และ *sense F3'5'H* gene จากพิทูเนีย (Holton 1996) ทำให้ดอกสีขาวของ *Dianthus caryophyllus* เปลี่ยนเป็นดอกสีม่วง

การยับยั้งขั้นตอนในกระบวนการสังเคราะห์ anthocyanins สามารถทำให้เกิดสีดอกต่างไปจากเดิมได้ เช่น การส่งถ่าย *sense dfr* gene หรือ *sense chs* gene (Suzuki et al., 1997) ทำให้ดอก *Torenia hybrida* ซึ่งมีสีน้ำเงินเปลี่ยนเป็นดอกสีขาวและมีลวดลายสีน้ำเงิน

ปะปน นอกจากนี้การส่งถ่าย *antisense dfr* gene หรือ *antisense chs* gene (Aida et al., 2000) ทำให้ *Torenia hybrida* มีดอกสีน้ำเงินอ่อน และมีลวดลายของสีน้ำเงินเข้มปะปน



สถานที่และระยะเวลาในการทำวิจัย

เวลา	เริ่มดำเนินการ	เดือน ตุลาคม 2550
	เสร็จสิ้น	เดือน กันยายน 2551
สถานที่	1.	ห้องปฏิบัติการอนุชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
	2.	ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
	3.	ห้องปฏิบัติการอนุชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



อุปกรณ์การวิจัย

1. ตัวอย่างพืช

ปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ (*Curcuma spp.*) จากศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จ.เชียงราย

2. วัสดุและอุปกรณ์

- 2.1 เครื่องฆ่าเชื้อหรือตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ที่ 37 °C (Mettler, Germany)
- 2.3 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- 2.4 Adjustable automatic pipette และ white, yellow และ blue tip
- 2.5 Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ,
Multi Ultra PCR tube (Sorenson™ Bioscience, Inc., U.S.A.) และ
centrifuge tube
- 2.6 เครื่อง DNA Thermal Cycler (ThermoHybaid PCR Sprint, UK)
- 2.7 ชุดอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ชนิดแวนอน (BIO-RAD, U.S.A.)
- 2.8 ชุดอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ชนิดแวนอนตั้ง (Sequi-Gen® GT, Sequencing cell ;
(BIO-RAD, U.S.A.)
- 2.9 เครื่องจ่ายกระแสไฟ (power supply ; (BIO-RAD, U.S.A.)
- 2.10 เครื่องถ่ายภาพตีเอ็นเอโดยแสง UV (UV transilluminator, BIO-RAD, U.S.A.)
- 2.11 เครื่องวัดค่าการดูดแสง (Spectrophotometer)
- 2.12 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)
- 2.13 เครื่องเขย่า (shaker)
- 2.14 เครื่องอบเครื่องแก้ว (hot air oven)
- 2.15 เครื่องทำความเย็น (freezer) ได้แก่ 4 °C, -20 °C และ -80 °C
- 2.16 เครื่องปรับอุณหภูมิด้วยน้ำ (water bath)
- 2.17 เครื่อง electroporater
- 2.18 คิวเวต (cuvette)
- 2.19 เครื่องผสม (vortex)
- 2.20 เครื่องชั่งแบบละเอียด (analytical balance)
- 2.21 เตาไมโครเวฟ (microwave)
- 2.22 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
- 2.23 ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank)
- 2.24 ชุดโคร่งบดตัวอย่าง (mortar and pestle)

- 2.25 เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ บีกเกอร์ขนาดต่างๆ (beakers) ขวดรูปชมพู่ (flasks) กระบอกตวง (cylinder) ปิเปต (pipettes) แท่งแก้วคนสาร (stirrer) เพลท (plate) spreader ฯลฯ
- 2.26 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ ข้อนตักสาร กระดาษขังสาร กระดาษติดฉลาก กระดาษเทปใส กระดาษทิชชู กระดาษเช็ดกระจก (Kimwipe[®] tissue) ฟลอยด์ อะลูมิเนียม ถังพลาสติกใสชนิดทนร้อน กระดาษพาราฟิล์ม ปากคีบ ถังมือ กล้องโฟม มีดคัตเตอร์ กรรไกร ถาดพลาสติกกันตื้น ฯลฯ
- 2.27 กล้องจุลทรรศน์

3. สารเคมี

- 3.1 Liquid nitrogen
- 3.2 TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen)
- 3.3 RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit (Ferment, U.S.A.)
- 3.4 QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc.)
- 3.5 Inst/Aclone[™] PCR Product Cloning Kit (Fermentus, U.S.A.)
- 3.6 Sodium chloride (NaCl)
- 3.7 Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)
- 3.8 Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)
- 3.9 Chloroform
- 3.10 Isopropanal
- 3.11 Ethyl alcohol (EtOH)
- 3.12 RNaseONE[™] ribonuclease (Promega, U.S.A.)
- 3.13 PCR buffer (Fermentas, U.S.A.)
- 3.14 Magnesium chloride (MgCl₂) (Fermentas, U.S.A.)
- 3.15 Deoxyribonucleotide triphosphate mix (dNTPs) (Fermentas, U.S.A.)
- 3.16 Primers (Primer ; Operon Technology, Alamada, U.S.A.)
- 3.17 Taq DNA polymerase (Fermentas, U.S.A.)
- 3.18 GeneRuler[™] 100bp DNA Ladder (Fermentas, U.S.A.)
- 3.19 Ampicilin
- 3.20 Glycerol oil
- 3.21 Restriction enzyme (*EcoRI*; Fermentas, U.S.A.)
- 3.22 pGEM[®] T Easy Vector (Promega, U.S.A.)
- 3.23 T4 DNA Ligase (Sigma, U.S.A.)

- 3.24 Ligase Buffer (Promega, U.S.A)
- 3.25 Deionize H₂O (dH₂O)
- 3.26 Hydrochloric acid (HCl)
- 3.27 Sodium hydroxide (NaOH)
- 3.28 Sodium dodecyl sulfate (SDS)
- 3.29 Potassium acetate
- 3.30 Bromophenol blue
- 3.31 Xylene cyanol FF
- 3.32 Sucrose
- 3.33 Boric acid
- 3.34 Tris base
- 3.35 Ethidium bromide
- 3.36 Agarose
- 3.37 Agar
- 3.38 Tryptone
- 3.39 Yeast extract
- 3.40 Dideoxyribonucleotide triphosphate (d/ddNTPs) (Promega, U.S.A.)DNA sequencing 5X buffer (Promega, U.S.A.)
- 3.41 Ultrapure water
- 3.42 DNA sequencing Taq DNA polymerase (Promega, U.S.A.)
- 3.43 DNA Sequencing Stop Solution (Promega, U.S.A.)
- 3.44 Acrylamide
- 3.45 N,N'-methylene-bisacrylamide (Bis)
- 3.46 Urea
- 3.47 3-(Trimethoxysilyl),propylmethacrylate (Bind Silane) (sigma, U.S.A.)
- 3.48 Clear view (Dietham Trading Co.,Ltd, Thailand)
- 3.49 Ammonium persulphate (APS)
- 3.50 N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine(TEMED)(BIO-RAD, U.S.A)
- 3.51 Glacial acetic acid
- 3.52 Silver nitrate (AgNO₃)
- 3.53 37% Formaldehyde (HCOH)
- 3.54 Sodium carbonate (Na₂CO₃)
- 3.55 Sodium thiosulfate (Na₂S₂O₃)
- 3.56 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal)

- 3.57 Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)
- 3.58 N,N' -dimethyl-formamide



วิธีการวิจัย

การทดลองแบ่งออกเป็นขั้นตอนต่อไปนี้

1 การเตรียมอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA)

1.1 การเตรียมตัวอย่างพืชทดลอง

นำกลีบดอกของปทุมมามาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว จากนั้นเก็บตัวอย่างใน aluminium foil เก็บที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำไปใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA)

1.2 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA)

- นำตัวอย่างที่บดละเอียด 50-100 mg ใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ที่มี TRIZOL[®] Reagent ปริมาตร 1 ml ผสมตัวอย่างกับ reagent โดยวิธี vortex และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 min
- เติม chloroform ปริมาตร 0.2 ml พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ นาน 15 sec จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-3 min
- นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 15 min ที่ $2-8^{\circ}\text{C}$ แล้วจึงดูดเอาเฉพาะส่วนใสด้านบน (aqueous phase) ใส่หลอดใหม่
- เติม Isopropyl alcohol ปริมาตร 0.5 ml พลิกหลอดกลับไปมาจากนั้น ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 min
- นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 10 min ที่ $2-8^{\circ}\text{C}$ เทส่วนใสด้านบนทิ้งไปเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอน หลังจากนั้นล้างตะกอนโดยเติม 75% ethanol ปริมาตร 1 ml นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 7,500 g นาน 5 min ที่ $2-8^{\circ}\text{C}$
- นำตะกอนอาร์เอ็นเอมาทำให้แห้งโดยวิธี air dry ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอในน้ำที่ปราศจาก RNase (Rnase-free water) ปริมาตร 20 μl
- ตรวจสอบอาร์เอ็นเอทั้งหมดด้วย 1.4% denaturing formaldehyde agarose/EtBr electrophoresis โดยจะสังเกตเห็นแถบ 28S และ 18S ribosomal RNA

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

เตรียมสารละลายปริมาตร 20 μ l ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งประกอบด้วย อาร์เอ็นเอทั้งหมด 0.1-5 μ g , oligo(dT)₁₈ primer 0.5 μ g และ deionized water ให้ครบ 12 μ l ผสมให้เข้ากันเบาๆ บ่มที่ 70°C นาน 5 min จากนั้นแช่หลอดบนน้ำแข็งแล้วเติม 1x reaction buffer, RiboLock™ Ribonuclease inhibitor 20 Unit/reaction และเติม dNTPs 1 mM (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37°C นาน 5 min จากนั้นเติม RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase 200 Unit/reaction บ่มที่ 42°C นาน 1 hr และหยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนที่ 70°C นาน 10 min เก็บ First Strand cDNA ไว้ที่ -70°C

3. การแยก Dihydroflavonol 4-reductase gene (*dfr* gene) และ Anthocyanin synthase (*ans* gene) ด้วยเทคนิค RT-PCR

3.1 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบ Primer โดยใช้บริเวณอนุรักษ์ (Conserved domain) ของ *dfr* และ *ans* gene จาก Dianthus, Fragaria, Cymbidium, Ipomoea, Petunia, Lilium, Prim.cons. แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่ใช้ในการแยก *dfr* gene จากดอกปทุมมา ด้วยเทคนิค RT-PCR

รายชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' → 3'
DFR F2 (Forward primer)*	GG(ATGC) TT(TC) AT(ACT) GG(ATGC) AT(AT) TGG
DFR R5 (Reward primer)*	GG(ATCG) AC(GA) TT(GA) TA(TC) TC(ATCG) GG
ANS F1 (Forward primer)*	TTTGCTCGATCGTTTAGCRGAAGAAGA
ANS R6 (Reward primer)*	TGAGGATGATGACAAAGTTAGCGGAGCA

* สังเคราะห์โดยบริษัท Operon Technology, Alamada, U.S.A

3.2 องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

เตรียมสารละลายปริมาตร 20 μ l ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งประกอบด้วย 1x reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 2 mM $MgCl_2$, dNTPs (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) อย่างละ 200 μ M, ไพรเมอร์ 0.5 μ g, Pfx DNA polymerase 2.5 Unit/reaction และ 1st cDNA (DNA template) 40 ng ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย deionize water จากนั้นจึงดำเนินการเพิ่มขยายปริมาณ 1st cDNA ด้วยเครื่อง PCR

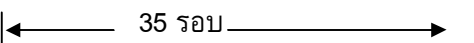
3.3 เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR (PCR condition) ในเทคนิค RT- PCR

แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR

ตารางที่ 2 แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR เพื่อแยกชิ้นส่วนของยีน *dfr*

อุณหภูมิ	94°C	94 °C	50°C	72°C	72 °C
	4°C				
ระยะเวลา	2 min	45 sec	45 sec	1 min	10 min
	α				
จำนวนรอบ					

ตารางที่ 3 แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR เพื่อแยกชิ้นส่วนของยีน *ans*

อุณหภูมิ	94°C	94 °C	53 °C	72°C	72 °C
	4°C				
ระยะเวลา	2 min	45 sec	45 sec	1 min	10 min
	α				
จำนวนรอบ					

3.4 การวิเคราะห์โดย Agarose electrophoresis

- เตรียม agarose ความเข้มข้น 1.4% โดยชั่ง agarose ผสมลงใน 1 x TBE buffer (ภาคผนวก) แล้วนำไปต้มจน agarose ละลายตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิ 50°C
- ทำความสะอาดถาดเจล และหัวเสียบ (comb) ให้สะอาดด้วย 70% ethanol แล้วนำถาดเจลไปประกอบเข้ากับบล็อก
- วางหัวเสียบลงที่ปลายด้านหนึ่งของถาดเจล เพื่อให้เกิดช่องเล็กๆ สำหรับหยอดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ
- เท agarose ลงในถาดเจลที่เตรียมไว้โดยให้แผ่น agarose มีความหนาประมาณ 3-5 mm ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว
- เททับผิวหน้าของเจลด้วย 1 x TBE buffer เพื่อไม่ให้เจลแห้ง และสะดวกต่อการดึงหัวเสียบออก
- นำถาด agarose gel ออกจากบล็อกแล้ววางถาดลงในอ่าง electrophoresis โดยให้ด้านที่หัวเสียบอยู่ทางซ้าย
- เท 1 x TBE buffer ลงในอ่างให้ท่วมแผ่น agarose gel โดยให้ระดับ 1 x TBE buffer อยู่เหนือผิวเจลประมาณ 1-3 mm
- ผสม 1 x loading buffer (ภาคผนวก) กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ และดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ให้เข้ากัน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายแล้วค่อยๆ หยดลงในช่องของ agarose gel
- ปิดฝอ่าง electrophoresis แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากซ้ายไปขวา ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 50 นาที หรือเมื่อแถบสีล่างของ loading buffer เคลื่อนที่ไปอยู่อีกปลายด้านหนึ่งของเจลโดยห่างจากด้านล่างถาดประมาณ 1 cm แล้วจึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- ย้อมดีเอ็นเอโดยนำแผ่น agarose gel ไปแช่ใน EtBr นาน 10 นาที จากนั้นย้ายไปแช่น้ำอีก 5 นาที เพื่อล้าง EtBr ส่วนเกิน
- นำแผ่น agarose gel ไปตรวจดูแบนดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator พร้อมกับบันทึกภาพไว้
- จัดแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการโดยดูขนาดเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน เก็บไว้ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ที่ 4°C จนกว่าจะนำมาแยกเอาดีเอ็นเอออก (elute)

3.5 การ clone ชิ้นส่วนของยีน *DFR* และ *ANS* (Inst/Aclone™ PCR Product Cloning Kit, Fermentus, U.S.A)

3.5.1 องค์ประกอบในปฏิกิริยาการเชื่อม (ligation)

เตรียมสารละลายปริมาตร 30 μ l ประกอบด้วย plasmid vector pGEM-Teasy (ภาคผนวก) 0.165 μ g, purified PCR fragment 0.54 pmol, 1x ligation, PEG 4000 solution, T4 DNA ligase 5 Unit และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย deionized water จากนั้นบ่มที่ 22°C นาน 12 hr

3.5.2 Transformation โดยใช้ The TransformAid™ Bacterial Transformation System

- เตรียม *E.coli* สายพันธุ์ DH5- α โดยเลี้ยงเซลล์ใน TransformAid™ C-Medium ปริมาตร 2 ml จากนั้นเขย่าที่ 37°C นาน 12 hr
- เติมเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยง 12 hr ปริมาตร 1/10 ของ TransformAid™ C-Medium จากนั้นบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 20 min
- บ่ม LB-Ampicillin/X-gal agar plate ที่ 37 °C อย่างน้อย 20 min
- เตรียม TransformAid™ T-Solution โดยการผสม T-solution (A) กับ T-solution (B) ในปริมาตร 1:1 จากนั้นเก็บ TransformAid™ T-Solution ไว้บนน้ำแข็ง
- เก็บเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ 20 min โดยใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml และนำไป centrifuge ที่ความเร็วสูงสุด 4 °C เป็นเวลา 1 min
- ทิ้งส่วนใสและ resuspend ตะกอนเซลล์ด้วย TransformAid™ T-Solution ปริมาตร 300 μ l จากนั้นวางบนน้ำแข็งนาน 5 min
- centrifuge เซลล์อีกครั้งที่ความเร็วสูงสุด 4 °C เป็นเวลา 1 min จากนั้นทิ้งส่วนใส
- resuspend ตะกอนเซลล์ด้วย TransformAid™ T-Solution ปริมาตร 120 μ l จากนั้นวางบนน้ำแข็งนาน 5 min
- เตรียม ligation mixture โดยแบ่งใส่ eppendorf ขนาด 1.5 ml หลอดละ 15 μ l และวางบนน้ำแข็งนาน 2 min
- เติมเซลล์ที่แขวนลอยปริมาตร 60 μ l ในแต่ละหลอดของ ligation mixture จากนั้นวางบนน้ำแข็งนาน 5 min
- Plate เซลล์บน LB-Ampicillin/x-gal agar plate ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นบ่มเซลล์ที่ 37°C นาน 12 hr

3.6 การตรวจสอบแบคทีเรียที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA)

3.6.1 การแยกพลาสมิดโดยวิธี Alkaline (T.Maniatis et., al 1982)

- เลือกโคโลนีสีขาวจาก LB-Ampicillin/x-gal agar plate โดยเลี้ยงใน LB-Ampicillin both ที่ 37 °C เขย่านาน 12 hr
- นำเชื้อ 1.5 ml ใส่ลงใน microtube ปั่นที่ 12,000 rpm นาน 5 min ทิ้งส่วนใสเก็บเฉพาะตะกอนเซลล์
- นำตะกอนเซลล์มาเติม solution I (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 μ l vortex ให้เข้ากัน จากนั้นเติม solution II (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 μ l และกลับหลอดไปมาเบาๆ 4 ครั้ง และเติม solution III (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 μ l เขย่าให้เข้ากันเบาๆ จะเห็นตะกอนสีขาวๆ เกิดขึ้น แช่ต่อในน้ำแข็งอีก 10 min
- นำไปปั่นที่ 12,000 rpm นาน 10 min เพื่อแยกตะกอนทิ้ง เก็บส่วนใสมาเติมด้วย absolute ethanol ที่เย็น ปริมาตร 2 เท่าของน้ำใส
- ผสมให้เข้ากันนำไปแช่ไว้ที่ -20 °C นาน 30 min จากนั้นนำไปปั่นที่ 12,000 rpm ที่ 4 °C นาน 10 min และแยกเอาตะกอนพลาสมิดมาละลายด้วย 0.05 M Tris, 0.1 M NaOAc (pH 8)
- เติม absolute ethanol ที่เย็น 2 เท่าของปริมาตรน้ำใส เขย่าให้เข้ากันนำไปแช่ไว้ที่ -20 °C นาน 30 min และปั่นที่ 12,000 rpm ที่ 4 °C นาน 10 min
- ทิ้งส่วนใส และนำตะกอนพลาสมิดล้างด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 500 μ l จากนั้นนำมาปั่นที่ 12,000 rpm ที่ 4 °C นาน 5 min
- นำตะกอนพลาสมิดมาทำให้แห้งโดยวิธี air dry แล้วละลายด้วย TE ปริมาตร 20 μ l
- ตรวจสอบพลาสมิดโดยการทำ agarose gel electrophoresis

3.6.2 การตรวจสอบพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzyme)

เตรียมสารละลายปริมาตร 20 μ l ซึ่งประกอบด้วย 1x EcoRI buffer, plasmid 2 μ g, เอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI 15 Unit และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย sterile water จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 °C นาน 12 hr ตรวจสอบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยทำ agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับแทปดีเอ็นเอมาตรฐาน (Molecular Marker)

3.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์(Sequencing) ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แยกได้

จากการโคลนชิ้นส่วนของยีนทั้งสองเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์แล้ว ได้ทำการส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ บริษัท First Base ประเทศมาเลเซีย

3.8 การสร้างชุดยีนเพื่อการส่งถ่ายเข้าสู่เนื้อเยื่อปทุมมาโดยวิธี **Agrobacterium transformation**

3.8.1) ย้ายยีนที่โคลนได้จากข้อ 3.6 เข้าสู่พลาสมิด pBI121 ภายใต้การทำงานของ 35S promoter ในทิศทาง antisense สำหรับยีน *DFR* และ *ANS*, *F3'H*

3.8.2) ส่งถ่าย recombinant plasmids จากข้อ 3.8.1 เข้าสู่เนื้อเยื่อของปทุมมาและพิทูเนีย โดยวิธี *Agrobacterium*- mediated transfer (Supuk *et al.*,2006)

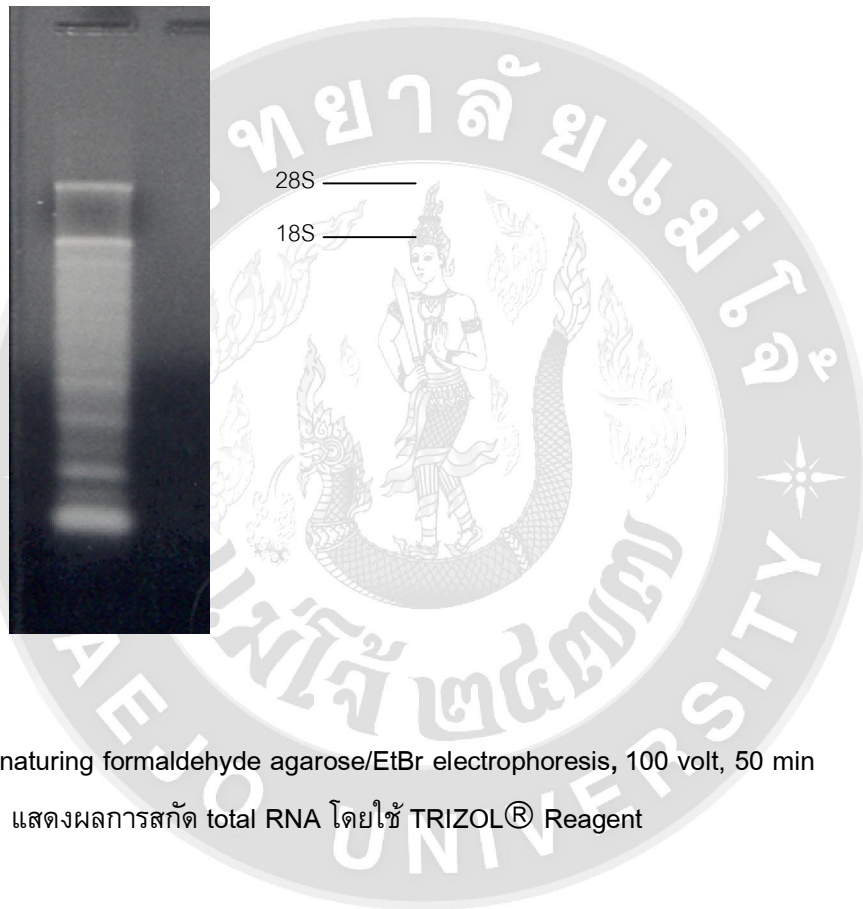
9.3.3) คัดเลือก transgenic plants ในระยะแรกโดยคัดเลือกจาก antibiotic resistance genes แล้วชักนำให้เป็นต้นอ่อนโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของ marker gene และ RT-PCR



ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. ผลการตรวจสอบการสกัด Total RNA โดย 1.4% denaturing formaldehyde agarose/EtBr electrophoresis

จากวิธีการสกัด total RNA โดยใช้ TRIZOL® Reagent สามารถสกัด total RNA จาก bract ของส่วนดอกปทุมมา เมื่อนำมาแยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส พบแถบ 28S และ 18S ribosomal RNA แสดงดัง ภาพที่ 4

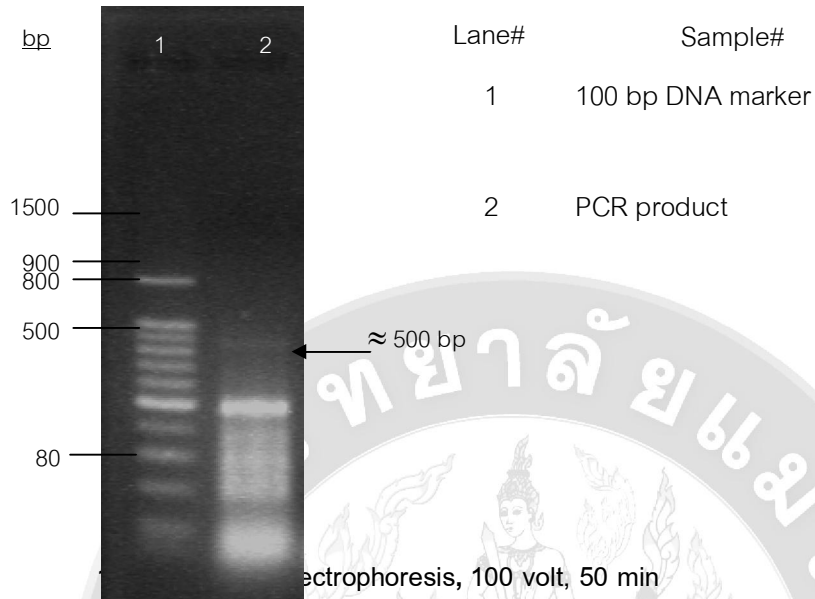


1.4% denaturing formaldehyde agarose/EtBr electrophoresis, 100 volt, 50 min

ภาพที่ 4 แสดงผลการสกัด total RNA โดยใช้ TRIZOL® Reagent

2. ผลการการแยก *dfr* gene ด้วยเทคนิค RT-PCR

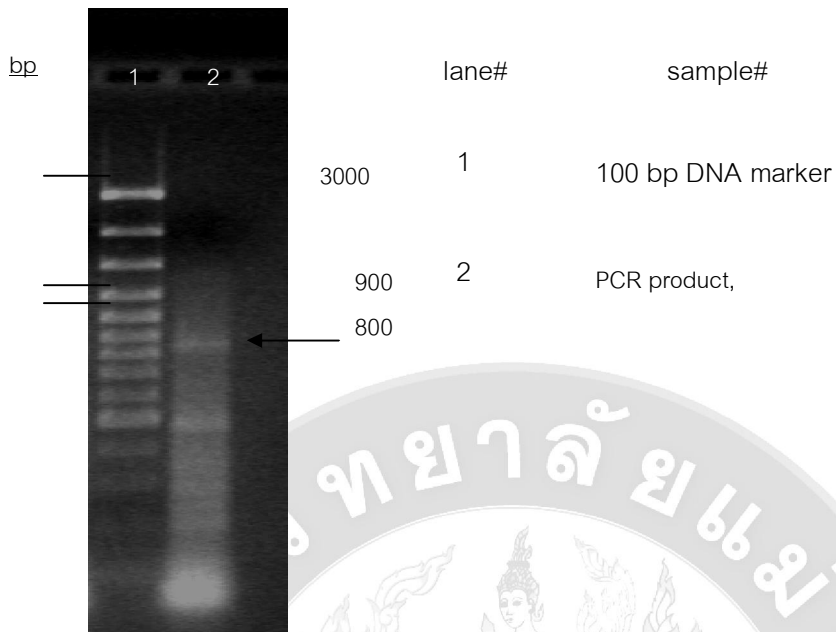
2.1 การแยก *dfr* gene



ภาพที่ 5 แสดงการแยก *dfr* gene ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ DFRF2 และ DFRR5

จาก ภาพที่ 5 แสดงให้เห็นว่าการแยก *dfr* gene ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ DFRF2 และ DFRR5 และ annealing temperature เท่ากับ 50°C ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบโดยมีขนาดประมาณ 500 bp

2.2 การแยก *ans* gene



1.4% agarose electrophoresis, 100 volt, 50 min

ภาพที่ 6 แสดงการแยก *ans* gene ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ANSF1 และ ANSR6

จากภาพที่ 6 แสดงให้เห็นการแยก *ans* gene ด้วยเทคนิค RT-PCR พบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 830 bp ซึ่งมีขนาดตามที่กำหนด Primers ไว้แล้ว

3. ผลการโคลน *dfr* และ *ans* gene และการตรวจสอบโคลนที่ได้รับที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA, rDNA)

3.1 ผลการโคลน *dfr* และ *ans* gene

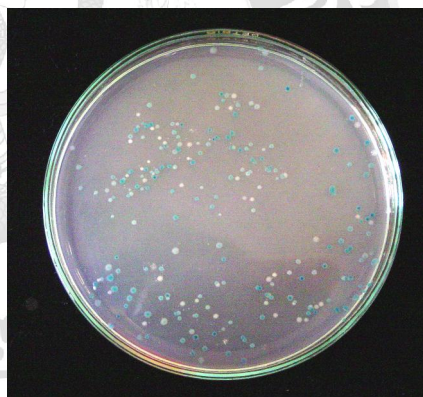
จากการโคลน *dfr* และ *ans* gene โดยใช้ Inst/Aclone™ PCR Product Cloning Kit (Fermentus, U.S.A) แล้วคัดเลือกโคลนที่คาดว่าจะได้รับดีเอ็นเอสายผสมโดยใช้การต้านยาปฏิชีวนะ ampicillin/x-gal พบชนิดโคลนนี้ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนโคลนสีฟ้าและน้ำเงินจากการคัดเลือกโคลนที่ได้รับ rDNA โดยใช้ ampicillin/X-gal plate

ชนิดโคลน	จำนวนโคลนสีฟ้า	จำนวนโคลนสีขาว	อัตราส่วนโคลนสีฟ้า:ขาว
<i>dfr</i> gene 500 bp	110	35	3.14:1
<i>ans</i> gene 800 bp	141	33	4.27:1



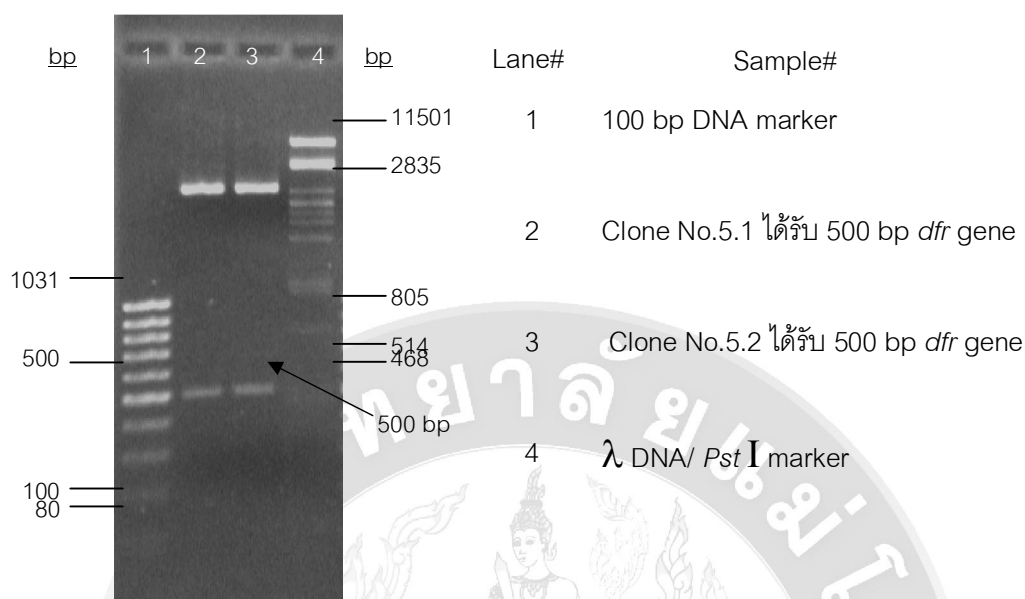
ภาพที่ 7.1



ภาพที่ 7.2

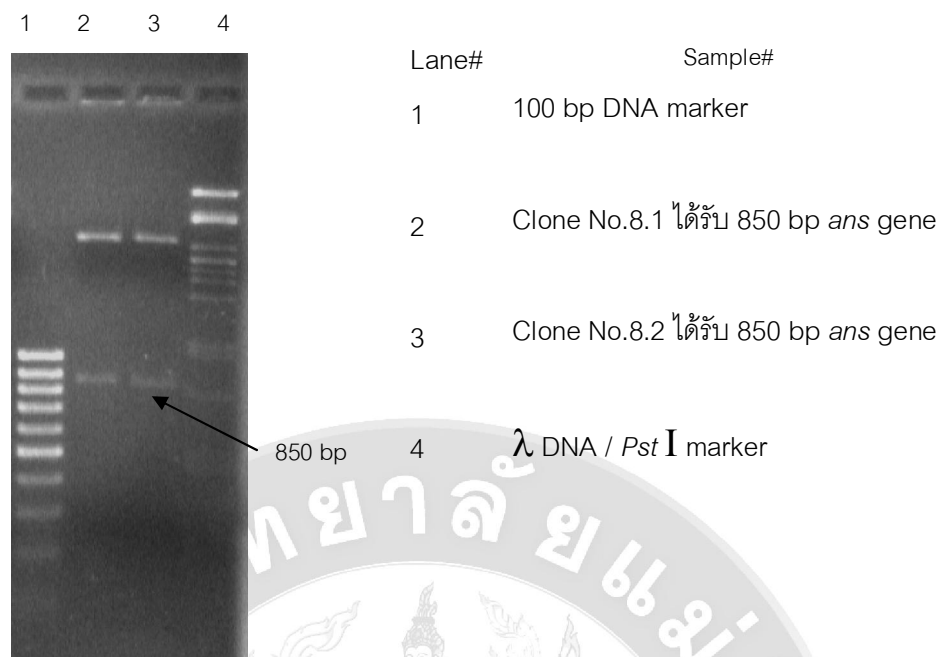
ภาพที่ 7 แสดงโคลนสีฟ้าซึ่งเป็นโคลนที่ไม่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม และสีขาวซึ่งเป็นโคลนที่คาดว่าจะได้รับดีเอ็นเอสายผสม จากการคัดเลือกด้วย ampicillin/x-gal ภาพที่ 7.1 และ 7.2 แสดงการโคลน *dfr* และ *ans* gene ขนาดประมาณ 500 และ 850 คู่เบส ตามลำดับ

3.2 ผลการตรวจสอบโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzyme)



ภาพที่ 8 แสดงการตรวจสอบโคลนที่รับ Putative *dfr* gene ขนาดประมาณ 500 คู่เบส โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoR* I

จากภาพที่ 8 การตรวจสอบโคลนที่รับ Putative *dfr* gene ขนาดประมาณ 500 คู่เบส โดยใช้ *EcoR* I ตัดพลาสมิดที่สกัดได้จากโคลนที่ได้รับ rDNA พบว่า ได้ดีเอ็นเอ 2 fragment และเมื่อเทียบกับ Molecular weight marker แล้ว fragment มีขนาดประมาณ 3000 และ 500 คู่เบส แสดงว่าโคลนได้รับ Putative *dfr* gene ขนาดประมาณ 500 คู่เบส



ภาพที่ 9 แสดงการตรวจสอบโคลนที่รับ Putative *dfp* gene ขนาดประมาณ 850 คู่เบส โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoR* I

จากภาพที่ 9 การตรวจสอบโคลนที่รับ Putative *ans* gene ขนาดประมาณ 850 เบสโดยใช้ *EcoR* I ตัดพลาสมิดซึ่งสกัดได้จากโคลนที่ได้รับ rDNA พบว่า ได้ดีเอ็นเอ 2 fragment และเมื่อเทียบกับ Molecular weight marker แล้ว fragment มีขนาดประมาณ 3000 และ 850 คู่เบส แสดงว่าโคลนได้รับ Putative *ans* gene ขนาดประมาณ 850 คู่เบส

```

TTTTCACTTC CTCTGCTGGA ACCGTGAACG TGCAAGAAAA TCAAATGCCC GAGTACGACG
AAAGCTCATG GAGCGACGTC GACTTCTGCA GACGCGTCAA GATGACTGGA TGGATGTACT
TTGTATCTAA AACCCTAGCG GAGAAAGCTG CATGGGAATT TGCAAAGGAG AAATTGATAT
TCAATTAATA AGCATTATTC CAACTTTGGT GGTGGGTCCT TTCATCACCT CAACTATGCC
TCCTAGTATG CTAACAGCTT TGTCATGAT CACAGGAAAT GAAGCCCACT ATCGATCTTA
AAGCAAATCC AGCTTGTTCA CCTGGATGAT GTATGCAAGG CCCATATTTT CCTCTTCGAG
AATCCTAGAA GCGAGTGGGA GATACATTTG CTCTT

```

ภาพที่ 10: แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative *ans* gene ขนาดประมาณ 500 คู่เบสที่แยกได้ จากปทุมมา

ATGCCGGCAC GGTCTCCATA CACGAGGCC CACGAGACCT CTACGACGAG
 ACCTCCTGGA
 GCGACGTCTGA CTTCTGCAGG GCCAAGAAGA TGACCGGATG GATGTACTTT
 GTGTCTGAAGA
 CGTTGGCCGA GAAGGCCGCG TGGGACTTTG CGGAGAAGAA CAACATCGAC
 TTCATCAGCA
 TTATCCCCAC CCTAGTCAAC GGCCCCTTCG TCATGCCAC CATGCCGCC
 AGCATGCTCT
 CCGCCCTCGC CCTCATCACA ATGAACGAGC CGCACTATTC GATCCTGAAA
 CCGGTGCAGT
 TCGTCCACCT CGATGACCTC TGCAACGCCC ACATCTTCCT GTTCGAGTGC
 CCCGACGCCA
 AGGGAAGGTA CATCTGCTCC TCCCACGACG TCACCATCGC CGGCCTCGCC
 CAGATACTCC
 GGCAGCGCTA CCCTGAGTTC GACGTCCCCA CCGAGTTTGG AGAGATGGAG
 GTCTTCGACA
 TCATAAGCTA CTGGTCCAAG AAGCTCACGG AAATAGGCTT TGAGTTCAAG
 TACAGCTTAG
 AGGATATGTT TGATGGGGCG ATTCAGTCCT GCAGAGAGAA GGGCTTGCTG
 CCGCCCGCCA
 CCAAGGTTCC ATCATATGCC ACTGAACAAT TAATTGCCAC CGGGCAAGAC
 AACGGCCATT
 GAGAACAGTG ATAGCACGGG GACCCAAGAA CGAGATGTGT AACAGACCCT
 GTTTAC

ภาพที่ 11: แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative *ans* gene ขนาดประมาณ 850 คู่เบสที่
 แยกได้จากปทุมมา

จากการออกแบบ primer จากบริเวณอนุรักษ์จะได้เอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส สำหรับยีน *dfr* และ 850 คู่เบสสำหรับยีน *ans* และเมื่อแปลลำดับนิวคลีโอไทด์มาเป็นกรดอะมิโน แล้ววิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย BLAST SEARCH พบว่า ลำดับกรดอะมิโนจาก reading frame ที่ 1, 2 และ 3 ซึ่งอ่านจากปลาย 5' ไปด้าน 3' ของ Putative *dfr* gene ที่แยกจากปทุมมา ขนาดประมาณ 500 คู่เบส คล้ายกับ *dfr* gene จากพืชสปีชีส์อื่นๆ ที่รายงานใน Genbank โดย ลำดับกรดอะมิโนจากทั้งสาม reading frame มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ *Lilium hybrid cv.* สายพันธุ์ Acapulco มากที่สุด แต่ reading frame ที่ 2 นั้นมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับไม้ดอกสปีชีส์อื่นๆ มากกว่าใน reading frame ที่ 1 และ 3 ในขณะที่การทำ BLAST SEARCH ใน Putative *ans* gene ขนาดประมาณ 850 คู่เบส ที่แยกได้จากปทุมมา พบว่า ลำดับกรดอะมิโนจาก reading frame 3 ซึ่งอ่านจากปลาย 5' ไปด้าน 3' มีความคล้ายกับ *ans* gene จากพืชสปีชีส์อื่นๆ ที่รายงานใน Genbank ซึ่งมี amino acid identity สูงถึง 96% เมื่อเทียบกับ *Anthurium andraeanum*.

ระดับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ Putative *dfr* และ *ans* gene ที่แยกได้จากปทุมมาขนาดประมาณ 500 และ 850 คู่เบส เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับพืชสปีชีส์อื่นๆ ดังตารางที่ 5 และ 6



ตารางที่ 5: ระดับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน (5'3' frame 2) ของ Patative *dfr* gene ที่แยกจากปทุมมาขนาดประมาณ 500 คู่เบส ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับ *dfr* gene จากพืชสปีชีส์อื่นๆ

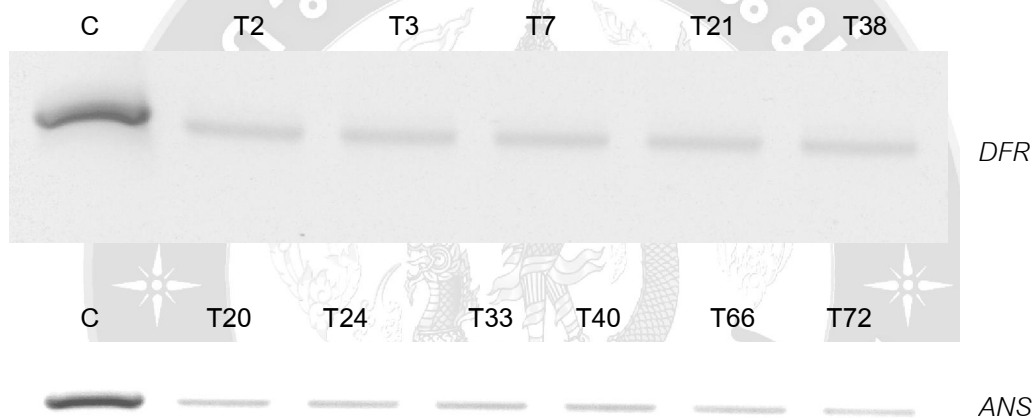
Plant species	Common name	Length of deduce amino acid sequences	Amino acid identity (%)	Nucleic acid identity (%)	GenBank accession number
<i>Lilium hybrid cv.</i> 'Acapulco'.	Oriental Lily	377	65	98	AF169801
<i>Gentiana triflora</i>	Gentian	359	45	82	D85185
<i>Eustoma grandiflorum</i>	Lisianthus	347	51	82	AB078958
<i>Dendrobium hybrid</i> cultivar	Dendrobium	352	59	77	AY741318

ตารางที่ 6: ระดับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ Patative *ans* gene ที่แยกจากปทุมมาขนาดประมาณ 850 คู่เบส ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับ *ans* gene จากพืชสปีชีส์อื่นๆ

Plant species	Common name	Length of deduce amino acid sequences	Amino acid identity (%)	Nucleic acid identity (%)	GenBank accession number
<i>Anthurium andraeanum</i>	Flamingo lily	374	96	98	AY232494
<i>Vitis vinifera</i>	Grape	337	65	70	Y11749
<i>Camellia sinensis</i>	Black tea	347	66	70	ABO18685
<i>Rhododendron simsii</i>	Indoor azalea	344	63	69	AJ413278
<i>Citrus sinnensis</i>	Sweet orange	338	67	79	AY519363

4. การส่งถ่าย recombinant plasmids เข้าสู่ปทุมมาและพิทูเนีย

จากการโคลนชิ้นส่วนของยีน *dfr* และ *ans* ของปทุมมาในทิศทาง antisense เข้าสู่ expression vector pBI121 ภายใต้การควบคุมของ 35S promoter และส่งถ่ายพลาสมิดชุดนี้เข้าสู่เนื้อเยื่อปทุมมาและพิทูเนียโดยเทคนิค Agrobacterium Transformation โดยในส่วนของปทุมมาได้ใช้เนื้อเยื่อในการส่งถ่าย 200 ชิ้น และ พิทูเนีย 100 ชิ้น พบว่ามีการส่งถ่ายชุดยีนดังกล่าวสำเร็จ (ชิ้นส่วนของพืชสามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะ Kanamycin และสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้) ได้ปทุมมาที่เป็นพืช Transgenic 3 ต้น ในขณะที่พิทูเนียได้ 12 ต้น ทำการชักนำให้เกิดต้น และตรวจสอบการแสดงออกของชุดยีนทั้งสองในระดับการ Transcription ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าทั้งชุดยีน antiDFR และ antiANS สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้งสองในพิทูเนียได้ (ภาพที่ 12) แต่ในส่วนของปทุมมานั้น ยังไม่สามารถตรวจสอบได้เนื่องจากการชักนำให้เกิดต้นนั้นใช้เวลานาน



ภาพที่ 12 แสดงแบบแผนการแสดงออกของยีน *DFR* และ *ANS* ของพิทูเนียในต้น Transgenics ที่ได้รับการส่งถ่ายชุดยีน antiDFR และ antiANS ที่โคลนจากปทุมมาด้วยเทคนิค Agrobacterium Transformation

C-ต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน

T2, T3, T7, T21, T38 – ต้น Transgenic ที่ได้รับการส่งถ่ายชุดยีน antiDFR

T20, T24, T33, T40, T66, T72 – ต้น Transgenic ที่ได้รับการส่งถ่ายชุดยีน antiANS

สรุปผลการวิจัย

จากการแยกยีน Dihydroflavonol 4-reductase (*dfr*) และ Anthocyanin synthase (*ans*) จากส่วนกลีบเทียมของปทุมมา (*Curcuma* spp.) พบว่าสามารถแยกยีนทั้ง 2 ได้ fragment ที่มีขนาดประมาณ 500 และ 850 คู่เบสตามลำดับ จากนั้นโคลน fragment ทั้งสองเข้าสู่พลาสมิด pGEM T-Easy และคัดเลือกโคลนที่ได้รับ rDNA ทางฟิโนไทป์โดยใช้ Ampicillin/x-gal plate และตรวจสอบทางจีโนไทป์โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่าสามารถโคลน rDNA ได้ทั้งสอง fragment

เมื่อทำ DNA sequencing และแปลลำดับนิวคลีโอไทด์มาเป็นกรดอะมิโน และทำ Blast search พบว่า fragment ที่มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส (ยีน *dfr*) นั้นมี reading frame ที่ 1,2 และ 3 ขณะที่ fragment ที่มีขนาดประมาณ 850 คู่เบส (ยีน *ans*) มี reading frame ที่ 3 เมื่ออ่านจาก 3' ไป 5' มีความคล้ายคลึงกับยีน *ans* ในพืชสปีชีส์อื่นๆที่มีการรายงานใน Gene bank โดย fragment ที่มีขนาดประมาณ 850 คู่เบสคล้ายกับ *ans* ใน *Anthurium andraeanum* มากที่สุด ดังตารางที่ 7 ขณะที่ fragment ที่มีขนาดประมาณ 500 คู่เบสคล้ายกับ *dfr* ใน *Lilium hybrid* cv. 'Acapulco' ทั้งสาม reading frame

จากการศึกษาหน้าที่ของยีน *dfr* และ *ans* ที่โคลนได้จากปทุมมาด้วยเทคนิค antisense โดยทำการโคลนชิ้นส่วนของยีนทั้งสองเข้าสู่พลาสมิด pBI121 แล้วส่งถ่ายเข้าสู่พืชเนื้อเยื่อและปทุมมาด้วยเทคนิค Agrobacterium Transformation พบว่าสามารถส่งถ่ายชุดยีนทั้งสองได้สำเร็จ และจากการติดตามการแสดงออกของชุดยีนทั้งสองพบว่า สามารถลดการแสดงออกของยีน *dfr* และ *ans* ของพืชเนื้อเยื่อได้ โดยยีนทั้งสองของพืชเนื้อเยื่อมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในดอกพืชเนื้อเยื่อ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่ายีนที่โคลนได้ทั้งสองจากปทุมมานั้นมีบทบาทต่อวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานินในดอกปทุมมา

เอกสารอ้างอิง

- Aida R, Kishimoto S, Tanaka Y, Shibata M. 2000. **Modification of flower colour in torenia (*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation.** *Plant Sci* 153: 33-42.
- Almeida, J., Carpenter, R., Robbins, T.P., Martin, C., and Coen, E.S. 1989. **Genetic interactions underlying flower color patterns in *Antirrhinum majus*.** *Genes Dev.* 3, 1758-1767.
- Beld, M., Martin, C., Hults, H., Stuitje, A.R., and Gerats, A.G.M. 1989. **Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: Partial characterization of dihydroflavonol 4-reductase gene.** *Plant Mol. Biol.* 13, 491-502.
- Bohm BA. 1986. **The Minor Flavonoids.** In JB Harborne, ed. *The Flavonoids-Advances in Research Since 1980*, Chapman and Hall, New York, p 329-397.
- Brouillard R, Dangles O. 1993. **Flavonoids and flower Colour.** In JB Harborne, ed. *The Flavonoid-Advances in Research Since 1986*. Chapman and Hall, New York, p 565-588.
- Cody V, Middleton E Jr, Harborne JB. eds. 1986. **Plants Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical Pharmacological, and Structure-Activity Relationships**, Vol.213, *Progress in Clinical and Biological Research*. Alan R. Liss, New York.
- Cody V, Middleton E Jr, Harborne JB, Beretzy A. eds. 1988. **Plants Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular, and Medical properties**, Vol. 280, *Progress in Clinical and Biological Research*. Alan R. Liss, New York .
- Elomaa, P., Helariutta, Y., Griesbach, R.J., Kotilainen, M., Seppanen, p. and Teeri, T.H. 1995. **Transgene inactivation in *Petunia hybrida* is influenced by the properties of foreign gene.** *Mol. Gen. Genet.* 248, 649-656.
- Eric T. Johnson, Sunhyo Ryu, Hankuil Yi, Byongchul Shin, Hyeonsook Cheong and Giltso Choi. 2000. **Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase.** *The Plant Journal.* 25(3), 325-333.
- Forkman, G., and Ruhnau, B. 1987. **Distinct substrate specificit of dihydroflavonol 4-raductase from flower of *Petunia hybrida*.** *Z. Naturforsch.* 42C, 1146-1148.

- Gerats, A.G.M., de Vlamming, P., Doodeman, M., Al, B, and Schram, A.W. 1982. Genetic control of the conversion of dihydroflavonols into flavonoids and anthocyanins in flower of *Petunia hybrida*. *Planta* 155, 364-368.
- Habtemariam S. 1997. Flavonoids as inhibitors or enhancers of the cytotoxicity of tumor necrosis factor- μ in L-929 tumor cell. *J Nat Prod* 60: 775-78
- Habtemariam S. 2000. Natural inhibitors of tumor necrosis factor- α production, secretion, and function. *Planta Med* 66: 303-13
- Holton T. 1996. Transgenic plants exhibiting altered flower colour and methods for producing the same. *PCT-international patent Application No. WO 96/36716*.
- Horowitz RM. 1986. Taste effects of flavonoids. In V Cody, E Middleton JR, JB Harborne, eds. *Progress in clinical and Biological Research Vol. 213, plant flavonoid in Biology and Medicine*. Alan R. Liss, New York, p 163-176.
- Huits H.S.M., Geraats, A.G.M., Krelke, M.M., Mol, J.N.M., and Koes, R. 1994. Genetic control of dihydroflavonol 4-reductase gene expression in *Petunia hybrida*. *Plant J.* 6, 295-310.
- Kaufman Peter B, Leland J. Csek, Sara Warbes, Jame A. Duke, Harry L. Brielmann. 1999. *Natural Products from Plants*, CRS press LLC p. 22-23.
- Martin C, Gerats T. 1993. Control of Pigment Biosynthesis Genes during Petal Development. *Plants Cell* 5: 1253-1264.
- Meryer, P., Heidmann, I., Forkmann, G., and Saedler, H. 1987. A new petunia flower colour generated by transformation of mutant with a maize gene. *Nature* 330, 677-678.
- Miller, Keith D, Virginie Guyon, Jeremy NS, Evans Wendy, A.Shuttleworth, Loverine P Taylor. 1999. Purification, Cloning, and Heterologous Expression of a Catalytically Efficient Flavonoid 3-O-Galactosyltransferase Expressed in the male Gametophyte of *Petunia hybrida*. *Journal of Biological Chemistry* 274: 34011-34019
- O'Reilly, C., Shepherd, N. S., Perelra, A., Schwaarz-Sommer, Z., Bertram, I., Robertson, d.s., Peterson, P.A., and Saedler, H. 1985. Molecular cloning of the *a1* locus in *Zea mays* using the transposable elements *En* and *Mu1*. *EMBO J.* 4, 877-882.

- Reddy, A.R., Britsch, L., Salaminl, F., Saedler, H., and Rohde, W. 1987. The **A1(Anthocyanin-1)** locus in *zea mays* encode s dihydroquercetin reductase. *Plant Sci.* 52, 7-13.
- Rosati C, Duron M, Cadic A, Simmoneau P. 2000. Transformation of *forsythia x intermedia* cv. 'Spring Glory' with two flavonoid pathway genes leads to anthocyanin synthesis in petals at early flowering stages. *Polyphenols Commun*, 1: 57-58.
- Tanaka, Y., Fukui, Y., Fukuchi-Mizutani, M., Holton, T., Higgins, E., and Kusumi, T. 1995. Molecular cloning and characterization of *Rosa hybrida* dihydroflavonal 4-reductase gene. *Plant Cell Physiol.*, in press.
- Timothy A. Holton and Edwlna C. Cornish 1995. Genetics and Biochemistry of anthocyanin Biosynthesis. *The Plant Cell*, Vol. 7, 1071-1083.
- Toguri T, N. Umemoto, O. Kobayashi, T. Ohtani. 1993. Activation of anthocyanin Synthesis Gene by White Light in eggplant Hypocotyl Tissue, and Identification of an Inducible P-450 cDNA. *Plant Molec. Biol.* 23: 933-946.



ภาคผนวก ก

การเตรียม buffer และสารละลายเข้มข้น

1. 10X Tris borate buffer (10X TBE buffer)

1.1	Tris base	108	g
1.2	boric acid	55	g
1.3	0.5 mM EDTA pH 8.0	40	ml

ละลายสารในข้อ 1.1 และ 1.2 โดยน้ำกลั่นจากนั้นผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกัน แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 ml ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาทีแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. Loading buffer

2.1	0.25% (w/v) bromophenol blue
2.2	0.25% (w/v) xylene cyanol FF
2.3	40% (w/v) sucrose

ผสมสารทั้งสามตัวเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ตามต้องการก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

3. TE buffer (Tris-EDTA buffer)

3.1	10 mM Tris-Hcl
3.2	1 mM EDTA

ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

4. Ethidium bromide 10 mg/ml

ชั่ง Ethidium bromide 1 g นำไปละลายในน้ำกลั่น 100 ml กวนด้วย magnetic stirrer จนกระทั่งสารละลายละลายหมดซึ่งอาจใช้เวลาหลายชั่วโมง จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชาที่ อุณหภูมิ 4°C ในการเตรียมสารนี้ต้องใช้ความระมัดระวังอย่างมาก โดยสวมถุงมือ และอย่าหายใจเอาผงของ Ethidium bromide เข้าไป เนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติเป็น strong mutagen

5. 40% polyacrylamide (19:1)

5.1	acrylamide	38	g
5.2	bis-acrylamide	2	g

ชั่งสารแต่ละชนิด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตรสุทธิ 100 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C มีข้อควรระวังในการเตรียมสารละลาย polyacrylamide คือ สารนี้เป็นอันตรายต่อระบบประสาท (neurotoxin) ทั้งที่ยังเป็นผง และเมื่อเป็นสารละลาย ในการเตรียมทุกครั้งควรใช้ผ้าปิดจมูก และสวมถุงมือ

6. 6% polyacrylamide

6.1	40% polyacrylamide	15	ml
6.2	7 M Urea	42	ml
6.3	5X TBE	20	ml

ผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้ปริมาตร 100 ml แล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C การสวมถุงมือทุกครั้งที่เตรียมสารละลาย

7. 10% ammonium persulfate (APS)

ชั่ง APS 1 g ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

8. 0.5% acetic acid / 95% ethyl alcohol (EtOH)

8.1	acetic acid	0.250	ml
8.2	ปรับปริมาตรด้วย 95% EtOH ให้ได้ปริมาตร 50 ml		เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

9. Fix / Stop solution

9.1	acetic acid	50	ml
9.2	ultra pure water	450	ml

10. Silver straining solution

10.1	silver nitrate ($\text{Ag}(\text{NO}_3)_2$)	0.5	g
10.2	37% formaldehyde	0.75	ml

ปรับปริมาตรด้วย ultra pure water ให้ได้ 500 ml เก็บไว้ในที่มืด และควรเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

11. Developer solution

11.1	sodium carbonate(Na_2CO_3)	15	g
11.2	37% formaldehyde	0.75	ml
11.3	sodium thiosulfate	1-2	เกล็ด

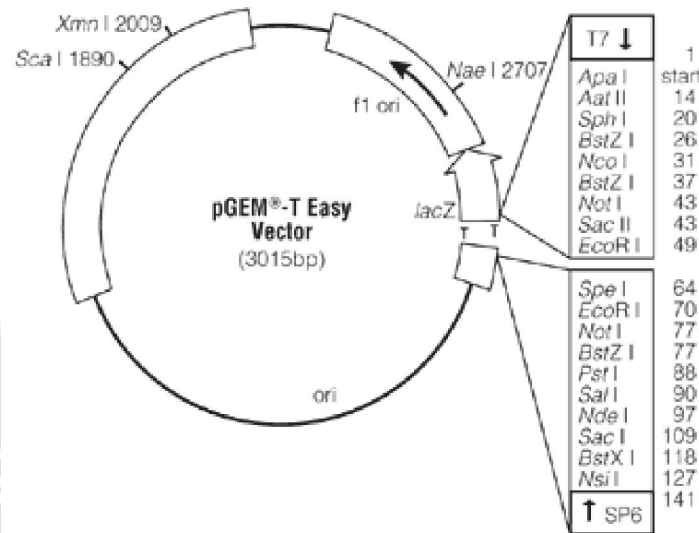
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ 500 ml แช่เย็นให้สารละลายมีอุณหภูมิประมาณ 10°C
และควรเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้



ภาคผนวก ข

Vector ที่ใช้ในการทดลองคือ pGEM[®]-T Easy Vector

Map of pGEM[®]-T Easy Vector



The sequence of pGEM-T Easy Vector

pGEM[®]-T Easy Vector

