



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

..... วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

ปริญญา

..... พันธุ์วิศวกรรม

..... โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การแสดงออกของยีนพินินซินเทสของมะกรูดในอะราบิโดปซิสและกล้วยไม้พันธุ์
เอื้องเงินหลวง

Expression of *Pinene Synthase* Gene of Kaffir lime (*Citrus hystrix* D.C.) in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. and *Dendrobium formosum* Roxb. ex Lindl.

นามผู้วิจัย นายภาวรรณ วงศ์คำไพโร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์อัคราพร ศรีบุญเลิศ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์สิทธิรักษ์ รอยตระกูล, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พราพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

..... (รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สืบสิงห์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การแสดงออกของยีนพินินซินเทสของมะกรูดในอะราบิโดปซิสและกล้วยไม้พันธุ์
เอื้องเงินหลวง

Expression of *Pinene Synthase* Gene of Kaffir lime (*Citrus hystrix* D.C.) in *Arabidopsis thaliana*
(L.) Heynh. and *Dendrobium formosum* Roxb. ex Lindl.

โดย

นายภาวรรณ วงศ์คำไพ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

พ.ศ. 2555

ภาววรรณ วังคำไพร 2555: การแสดงออกของยีนพีนินซินเทสของมะกรูดในอะราบิโดปซิสและกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์, Ph.D. 87 หน้า

เบต้า-พีนินจัดเป็นสารโมโนเทอร์ปีนองค์ประกอบสำคัญของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากผิวของมะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) การศึกษาในครั้งนี้นำยีนพีนินซินเทส ที่แยกได้จากมะกรูดมาตัดต่อเข้าเวกเตอร์ที่แสดงออกในพืช (pCAMBIA1305.1) เพื่อการถ่ายเข้าสู่อะราบิโดปซิสและกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวง หลังจากการทดสอบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของไฮโกรมยซินในอะราบิโดปซิสแปลงพันธุ์ยีนพีนินซินเทสที่ถูกสร้างขึ้นโดยการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 และถูกคัดเลือกบนอาหาร 1/2MS ที่มีไฮโกรไมซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 10 วัน แล้วจัดเก็บเมล็ดจากอะราบิโดปซิสแปลงพันธุ์แต่ละต้นที่ผ่านการคัดเลือกโดยลักษณะความต้านทานต่อไฮโกรมยซินในรุ่นที่ 1 – 6 (T0–T5) หลังจากผ่านการคัดเลือก เปรอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเมล็ดอะราบิโดปซิสในรุ่น T0, T1, T2, T3, T4 และ T5 เพิ่มขึ้นด้วยอัตรา 0.27, 45.17, 70.65, 78.88, 80.00 และ 83.33 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ายีนพีนินซินเทสของมะกรูดประสบความสำเร็จในการแทรกตัวเข้าสู่โครโมโซมของอะราบิโดปซิสแปลงพันธุ์ทุกต้นเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ แต่เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี GC-MS พบว่าไม่สามารถตรวจพบสารหอมระเหยที่ปล่อยออกมาจากดอกอะราบิโดปซิสแปลงพันธุ์หลังจากปล่อยให้เกิดการสะสมนาน 3 ชั่วโมง

ยีนพีนินซินเทสของมะกรูดถูกถ่ายเข้าโปรโตคอร์มกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงด้วยอะโกรแบคทีเรีย หลังจากการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่มีไฮโกรไมซินและซีโฟแทกซิม นาน 12 สัปดาห์ พบอัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มที่ได้รับยีนพีนินซินเทส คิดเป็นร้อยละ 1.34 และตรวจพบการแทรกตัวของยีนเข้าสู่โครโมโซมของต้นอ่อนกล้วยไม้เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์

Bhawat Wongkhamprai 2012: Expression of *Pinene Synthase* Gene of Kaffir lime (*Citrus hystrix* D.C.) in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. and *Dendrobium formosum* Roxb. ex Lindl. Master of Science (Genetics Engineering), Major Field: Genetics Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Pattana Srifah Huehne, Ph.D. 87 pages.

β -pinene, a monoterpene, was found as a major component of an essential oil extracted from fruit peel of Kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.) known as Makrut. Therefore, in this study, the pinene synthase (*pns*) gene previously cloned from Kaffir lime was constructed into a plant expression vector (pCAMBIA1305.1) and transformed into *Arabidopsis thaliana* and Protocorm-like body (Plbs) of *Dendrobium formosum* Roxb. for gene construction validation. After tested for appropriate hygromycin concentration, the *pns* transgenic Arabidopsis mediated by *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 were selected on 1/2MS containing 20 mg/L hygromycin for 10 days. The Arabidopsis seeds were collected from 1st– 6th generation (T0–T5) of each transgenic lines by hygromycin resistant character. After selection, the percentage of seed survival of T0, T1, T2, T3, T4 and T5 transgenic Arabidopsis gradually increased at rate of 0.27, 45.17, 70.65, 78.88, 80.00 and 83.33 respectively. In addition, the *pns* transgene was successfully integrated into the genome of Arabidopsis transgenic lines when detected by PCR. However, scent from transgenic Arabidopsis flowers was unable to be detected by GC–MS.

Pns gene of Kaffir lime was also transferred to *Den. formosum* Roxb. by *Agrobacterium*–mediated transformation. After selection on MS containing hygromycin and cefotaxime for 12 weeks, the survival percentage of *pns* transgenic protocorm-like body (Plbs) was 1.34 and the *pns* transgene was successfully integrated into *Dendrobium* genome and the Kaffir lime *pns* transgene was successfully integrated into the genome of some transgenic lines when detected by PCR.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก สำหรับการช่วยเหลือวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ และขอขอบพระคุณ ดร. อัจราพร ศรีบุญเลิศ และ ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ขอขอบพระคุณอาจารย์เจ้าหน้าที่ภาควิชาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และขอขอบพระคุณ นางสาวกฤษฎา พินิจ และนายนิรุตต์ ฉิมน้อย นักวิจัยของสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนสำเร็จ

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง ในภาควิชาพันธุวิศวกรรมและภาควิชาพันธุศาสตร์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้มาโดยตลอดโดยเฉพาะสมาชิกในห้องปฏิบัติการ 4505 ทุกคน

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2553 (สัญญาเลขที่ ภค./๒๕๕๓-กท๔) สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และทุนวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่มอบทุนให้สำหรับการวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงสำหรับคุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้ความรัก กำลังใจ และให้การสนับสนุนด้านการศึกษาตลอดมา ขอขอบคุณทุกคนในครอบครัวที่ทำให้กำลังใจเสมอมา

ภาววรรณ วงศ์คำไพโร

เมษายน 2555

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	21
ผลและวิจารณ์	35
สรุปและข้อเสนอแนะ	66
สรุป	66
ข้อเสนอแนะ	67
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	68
ภาคผนวก	78
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	87

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งโดยน้ำมันหอมระเหยจากใบและผิวมะกรูด	12
2	เปรียบเทียบชนิดของสารหอมระเหยที่พบในใบมะกรูด และผิวมะกรูด	17
3	รายงานการทดลองการเปลี่ยนแปลงสารหอมระเหยในพืชหลายชนิด โดยการ ถ่ายยีนในกลุ่ม monoterpenoids	19
4	ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>pns</i> กับพืชชนิดอื่น	38
5	อัตราการรอด (%) ของอะราบิดอปซิสบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง 1/2MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซินในระดับความเข้มข้น 0 20 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร	48
6	อัตราการรอด (%) ของอะราบิดอปซิสที่ได้รับการถ่ายยีน <i>pns</i> รุ่น T5 บนอาหาร สังเคราะห์สูตรดัดแปลง 1/2MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซิน 20 มิลลิกรัม ต่อลิตร	50
7	ค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ relative RT-PCR ของอะราบิดอปซิสที่ ได้รับการถ่ายยีน <i>pns</i> โดยคำนวณค่าตามวิธีการของ Livak and Schmittgen (2001)	54
8	ค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ relative RT-PCR ของอะราบิดอปซิสที่ ได้รับการถ่ายยีน <i>pns</i>	54
9	ค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ relative RT-PCR ของกล้วยไม้เอื้องเงิน หลวงที่ได้รับการถ่ายยีน <i>pns</i> โดยคำนวณค่าตามวิธีการของ Livak and Schmittgen (2001)	62
10	ค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ relative RT-PCR ของกล้วยไม้เอื้องเงิน หลวงที่ได้รับการถ่ายยีน <i>pns</i>	62

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
1 สารเคมีในอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) และอาหารสูตรดัดแปลง VW (Vacin and Went, 1949)	77
2 อาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและคัดเลือกเนื้อเยื่อกล้วยไม้	78

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม Terpene Synthases (TPS)	9
2 ตัวอย่างองค์ประกอบทางเคมีของ Terpene ที่พบในน้ำมันหอมระเหย	10
3 การสังเคราะห์สารประกอบพินีน 2 ไอโซเมอร์	15
4 การสังเคราะห์สารหอมระเหยกลุ่มโมโนเทอร์ปีนในพลาสติก	19
5 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน <i>pns</i> ของพลาสมิด pPSWK1138 pPSWK977 และผลผลิต พีซีอาร์ของยีน <i>pns</i> สมบูรณ์	35
6 แผนภาพการเชื่อมดีเอ็นเอด้วยวิธี overlap extension pcr และสังเคราะห์ยีน <i>pns</i> สมบูรณ์ด้วยวิธีพีซีอาร์	36
7 ผลการตรวจสอบยีน <i>pns</i> ด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์ จำนวน 8 โคลน และแผนภาพโครงสร้างพลาสมิด pPink4	37
8 โครงสร้างพลาสมิดสายผสม pPink4 ในเวกเตอร์ pGEM®-T Easy	38
9 การตรวจสอบลำดับการแปลรหัสของกรดอะมิโนของยีน <i>pns</i> ในพลาสมิดสายผสม pPink4 ด้วยโปรแกรม BLAST2SEQUENCES	39
10 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน <i>pns</i> ด้วยไพรเมอร์สำหรับตัดต่อเข้าเวกเตอร์พีซ pCAMBIA1305.1	40
11 แผนภาพการตัดต่อยีน <i>pns</i> สมบูรณ์เข้าสู่ pCAMBIA 1305.1, การตรวจสอบยีน <i>pns</i> ด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์ และการทำ Restriction Mapping ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Eco</i> RI	41
12 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pPink19 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PSWK977	42
13 แผนภาพการเข้าจับของไพรเมอร์ในพลาสมิด pPink26 และผลผลิตโคลนนิ่งพีซีอาร์ของ pPink23 – 26	44
14 การเพาะเลี้ยงอะราบิดอปซิสเพื่อการถ่ายยีน <i>pns</i>	45
15 ผลของไฮโกรไมซินระดับความเข้มข้นต่างๆ บนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง 1/2MS ที่มีผลต่ออะราบิดอปซิสสายพันธุ์ Columbia	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของอะราบิดอปซิสที่ได้รับการถ่ายยีน <i>pns</i> และ <i>gus</i> กับสายพันธุ์ Columbia	49
17	ผลผลิตพืชอาหารของการตรวจสอบอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์ของยีน <i>pns</i> รุ่น T0–T5	51
18	อาร์เอ็นเอสกัดจากดอกอะราบิดอปซิส รุ่น T5	52
19	ระดับการแสดงออกของยีน <i>pns</i> ในอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์ ตรวจสอบด้วยวิธี relative RT–PCR (A) และ ปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>pns</i> เปรียบเทียบกับ 5.8S rRNA (control) ที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี relative RT–PCR จากอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์ 5 โคลน เทียบกับ จำนวน 25 รอบ	53
20	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหาร MS จากฝักกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวง อายุ 6 เดือน และลักษณะโปรโตคอร์มบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS ที่เติม 0.8% ผงถ่าน อายุ 4 สัปดาห์	56
21	การคัดเลือกโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน <i>pns</i> และ <i>gus</i> ในพลาสมิดสายผสม pPink26 บนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซินระดับความเข้มข้นต่างกัน	60
22	อัตราการรอดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน <i>pns</i> ในพลาสมิด pPink26 และยีน <i>gus</i> บนอาหารสูตรสังเคราะห์ดัดแปลง MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซินและซีโฟแทกซิมในระดับความเข้มข้นต่างๆ	61
23	กล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน <i>pns</i> ในพลาสมิดสายผสม pPink26 บนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS ที่เติมผงถ่าน 0.8 % หลังการคัดเลือก เป็นเวลา 6 สัปดาห์	61
24	ผลผลิตพืชอาหารของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน <i>pns</i>	62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
25	อาร์เอ็นเอสกัดจากใบของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวง	63
26	ระดับการแสดงออกของยีน <i>pns</i> ในกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงแปลงพันธุ์ ตรวจสอบด้วยวิธี relative RT-PCR (A) และ ปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>pns</i> เปรียบเทียบกับ 5.8S rRNA (control) ที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี relative RT-PCR จากกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงแปลงพันธุ์ 3 โคลน เทียบกับ จำนวน 30 รอบ	64
ภาพผนวกที่		
1	ข้อมูลที่ได้จากการทำ relative RT-PCR ของอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์รุ่น T5	73
2	แผนที่ยีนและตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะของ pGEM®-T vector	75
3	แผนที่ยีนและตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะของ pCAMBIA1305.1	75
4	วิธีการสังเคราะห์สารกลุ่มโมโนเทอร์ปีนใน peppermint และ cornmint	76

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bp	=	base pair
cDNA	=	complementary DNA
C _T	=	threshold cycle
DEPC	=	diethylpyrocabonate
dH ₂ O	=	deionized H ₂ O water
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTP	=	deoxynucleotide triphosphate
EDTA	=	ethylene diamine tetraacetic acid
EtOH	=	ethanol
ER	=	endoplasmic recticulum
GC	=	gas chromatography
GPP	=	geranyl diphosphate
gus	=	beta-glucuronidase
HCl	=	hydrochloric
hptII	=	hygromycin phosphotransferase II
IPP	=	isopentenyl diphosphate
IPTG	=	isopropylthio- β -D-galactoside
kb	=	kilobasepair (1,000 base pair)
LA	=	Luria-Bertani agar
LB	=	Luria-Bertani broth
lms	=	limonene synthase
M	=	molar
MEP	=	methylerythritol phosphate
mg	=	milligram
MgCl ₂	=	magnesium chloride
mL	=	milliliter
MS	=	mass spectrometer

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

mM	=	milli molar
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
NaCl	=	sodium chloride
Na ₂ EDTA	=	sodium ethylene diamine tetraacetic acid
NaOH	=	sodium hydroxide
NaOAc	=	sodium acetate
ng	=	nanogram
nt	=	nucleotide
OD	=	optical density
PCR	=	polymerase chain reaction
pns	=	β -pinene synthase
RT-PCR	=	Real-Time Polymerase Chain Reaction
RI	=	retention index
RNA	=	ribonucleic acid
rRNA	=	ribosomal ribonucleic acid
RT-PCR	=	reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	=	sodium dodecyl sulphate
SPME	=	solid phase microextraction
TAE	=	Tris-Acetate-EDTA
TE	=	Tris-EDTA buffer
T _m	=	melting temperature
TR	=	retention time
TSS	=	transformation and storage solution
v/v	=	volume by volume
w/v	=	weight by volume
μg	=	microgram
μl	=	microliter
μM	=	micromolar

การแสดงออกของยีนพินีนซินเทสของมะกรูดในอะราบิโดปซิสและกล้วยไม้ พันธุ์เอื้องเงินหลวง

**Expression of *Pinene Synthase* Gene of Kaffir lime (*Citrus hystrix* D.C.) in
Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. and *Dendrobium formosum* Roxb. ex Lindl.**

คำนำ

ในปัจจุบันสารสกัดจากธรรมชาติหลายชนิดที่นำมาทำน้ำมันหอมระเหย (Essential oil) นับได้ว่ามีประโยชน์มากต่ออุตสาหกรรมน้ำหอมและเครื่องสำอาง ในแต่ละปีประเทศไทยนำเข้าเครื่องหอมจากต่างประเทศคิดเป็นมูลค่าไม่ต่ำกว่า 3,500 ล้านบาทต่อปี ข้อมูลจากกรมศุลกากรในปี 2540 (จรัส และ พิสม, 2546) โดยทั่วไปน้ำมันหอมระเหยที่ซื้อขายในตลาดผลิตจากพืชและดอกไม้ที่มีกลิ่นหอมต่างๆ เช่น ดอกแก้ว ดอกโมก ดอกกล้วยไม้ มะกรูด และตะไคร้หอม เป็นต้น ด้วยความต้องการของตลาดมีแนวโน้มจะเพิ่มสูงขึ้นอุตสาหกรรมสารสกัดจากธรรมชาติจึงมีการเติบโตอย่างรวดเร็วและแพร่หลาย การค้นหาแหล่งของพืชที่มีกลิ่นหอมใหม่ๆ โดยเฉพาะพืชสมุนไพรไทยหลายชนิดถือได้ว่าจะช่วยเสริมการพัฒนาตลาดเครื่องหอมเพื่อใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรม มะกรูดเป็นพืชหนึ่งที่มีความสนใจในการใช้เป็นแหล่งผลิตน้ำมันหอมระเหย องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของน้ำมันหอมระเหยในมะกรูด คือ pinene, sabinene, limonene, citronellal และ terpinen-4-ol (สถาบันวิทยาศาสตร์ และ เทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2548) สารเบต้า-พินีน เป็นสารองค์ประกอบหลักที่มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหยสกัดจากผิวมะกรูดถึงร้อยละ 30.6 (นิจศิริ, 2532) และร้อยละ 21.4 ในกลิ่นหอมที่ระเหยออกมาจากผิวมะกรูด (กิตติยา, 2553) น้ำมันใบมะกรูดมีฤทธิ์ไล่ยุง ดันเชื้ออะมีบา และ น้ำมันผิวมะกรูดมีฤทธิ์ฆ่าแมลง (สถาบันวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2548) นอกจากนี้ สารเคมีพวก pinene, limonene, sabinene และ citronellal ถูกนำมาใช้ในการแต่งกลิ่นรสอาหาร ใช้เป็นส่วนประกอบทางยา และเครื่องสำอาง และช่วยให้คลายกังวลทำให้สดชื่น (สิริลักษณ์, 2545) การนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ศึกษาขึ้นและวิเคราะห์ขึ้นที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกลิ่นในมะกรูดเป็นแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ต้องการด้วยระยะเวลาสั้น ดังจะเห็นได้จากการทดลองของ Joost (2002) ได้ถ่ายยีน *pinene synthase* (*pns*) ของ เลมอน เข้าสู่ยาสูบด้วยอะโกรแบคทีเรีย พบว่าดอกยาสูบแปลงพันธุ์ปลดปล่อยสาร pinene เพิ่มมากขึ้น กิตติยา (2553) โคลนยีนที่ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ PNS ที่อยู่

ในวิธีการสร้างสารเทอร์พีนอยด์พวก monoterpene จากมะกรูดในประเทศไทย งานวิจัยในครั้งนี้ได้สร้าง พลาสมิดสายผสมของยีนพีนินซินเทส (*pns*) ที่แยกได้จากมะกรูดตัดต่อเข้าเวกเตอร์พีช และถ่ายยีนเข้าสู่อะราบิดอปซิสฟิชโมเดล เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการถ่ายยีนและโครงสร้างยีน *pns* ที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนเข้ากล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวง ซึ่งโครงสร้างของยีนที่ได้สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พีชสำคัญทางเศรษฐกิจด้านน้ำมันหอมระเหยต่อไป



วัตถุประสงค์

1. การตัดต่อยีน *pns* สมบูรณ์ ที่แยกจากมะกรูดเข้าสู่เวกเตอร์ที่แสดงออกในพืช
2. ถ่ายยีนโครงสร้างเข้าสู่อะราบิดอปซิสและกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงโดยอะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium*-mediated transformation)
3. ตรวจสอบและวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน *pns*

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของมะกรูด

มะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) อยู่ในวงศ์ Rutaceae ชื่อสามัญ Kaffir lime เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก กิ่งและลำต้นที่ยังเล็กมีหนามแหลม ใบเขียวหนาขอบคี่ตรงกลาง ผลอ่อนมีสีเขียวอ่อนเมื่อแก่ ผิวของผลขรุขระทั้งลูก มีขี้จุกสูง ใบ ดอกและผลมีต่อมน้ำมัน ซึ่งคนไทยนิยมนำผิวของผลมาใช้ในการประกอบอาหาร อีกทั้งสามารถเก็บไว้ในรูปแห้ง ทำให้ปัจจุบันสามารถส่งออกมะกรูดแห้งเพื่อจำหน่ายต่างประเทศ มะกรูดยังถูกนำส่วนของใบและผล ขายให้แก่โรงงานผลิตน้ำมันหอมระเหยเพื่อสกัดน้ำมันหอมระเหยเป็นการค้า (ชูขวัญ, 2549; ทวีศักดิ์, 2550) นอกจากนี้ยังใช้เป็นยาสมุนไพร เช่น ผิวของผลเป็นยาบำรุงหัวใจ แก้อาหารวิงเวียนศีรษะ น้ำในผลแก้อาการท้องอืด แก้อาการปวดศีรษะช่วยเจริญอาหาร และใช้ทำยาสระผม (กรมเศรษฐกิจพาณิชย์, 2532) ผิวผลและใบมะกรูดมีฤทธิ์ในการป้องกันยุง และไล่แมลงศัตรูพืช (เด่นคนัย และอรรถพล, 2546) อีกทั้งฤทธิ์และประโยชน์ของน้ำมันหอมระเหยในมะกรูดดังกล่าวในหัวข้อถัดไป

กล้วยไม้และอุตสาหกรรมของกล้วยไม้ในประเทศไทย

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งเป็นที่ยอมรับจากต่างประเทศว่าประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญ (ศักดิ์สิทธิ์, 2531; สมชาย และคณะ, 2534) และจัดเป็นสินค้าไม้ดอกไม้ประดับซึ่งเป็นที่นิยมสูงในตลาดโลกรวมถึงเป็นสินค้า product champion ที่สำคัญของไทย ทั้งนี้ธุรกิจการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ของไทยสามารถสร้างรายได้นำเงินเข้าสู่ประเทศได้เป็นจำนวนมาก และการส่งออกกล้วยไม้ของไทยยังคงมีแนวโน้มเติบโตได้ต่อเนื่อง อีกทั้งกล้วยไม้ยังเป็นสินค้าที่มีความสวยงามโดดเด่น มีเสถียรภาพ มีมูลค่าสูง และจัดเป็นสินค้าประเภทเศรษฐกิจสร้างสรรค์ (creative economy) (คณะกรรมการกล้วยไม้แห่งชาติ, 2553) สำหรับความต้องการกล้วยไม้ตัดดอกยังคงมีมากขึ้นโดยเฉพาะการใช้สำหรับประดับ อาคารสถานที่และใช้ตกแต่งอาหารในธุรกิจบริการ โรงแรม ภัตตาคาร และร้านอาหารต่างๆ ทั้งนี้ไทยเองมีจุดแข็งในฐานะเป็นประเทศผู้ส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกเมืองร้อน ที่มีสัดส่วนสูงเป็นอันดับ 1 ของโลกมาโดยตลอด (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2551) อย่างไรก็ตามการแข่งขันด้านการค้ากล้วยไม้ระหว่างประเทศที่สูง ดังนั้นการผลิตกล้วยไม้ให้มีลักษณะที่แปลกใหม่จึงมีโอกาสดีในเชิงการค้า การพัฒนาพันธุ์ให้

มีดอกที่มีกลิ่นหอม จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการปฏิบัติ ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ไทยให้มีความหลากหลายทางสายพันธุ์ทั้งในด้านสีดอกและกลิ่นหอม เพื่อการค้าในเชิงไม้ตัดดอก และอุตสาหกรรมการผลิตน้ำหอม

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีราคาสูงตามมีสีสัน กลิ่น ขนาด รูปร่างและความหลากหลายของพันธุ์กล้วยไม้ จากความต้องการของตลาดโลกที่มีเพิ่มมากขึ้น ทำให้มีอัตราส่งออกกล้วยไม้อย่างต่อเนื่อง ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีการส่งออกและได้รายได้จากการส่งออกกล้วยไม้ โดยประเทศไทยสามารถส่งออกได้ในอันดับหนึ่งของโลก (กรมวิชาการเกษตร, 2548; คณะกรรมการกล้วยไม้แห่งชาติ, 2553) และส่งออกต้นกล้วยไม้เป็นอันดับ 2 ของโลก รองจากประเทศไต้หวัน (คณะกรรมการกล้วยไม้แห่งชาติ, 2553) พบว่ามูลค่าส่งออกของต้นกล้วยไม้ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2555 มีมูลค่าการส่งออกต้นกล้วยไม้ 432 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) และปัจจุบันมีการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความหลากหลายมากขึ้น โดยนำความรู้ทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาใช้ เพื่อให้สอดคล้องกับความต้องการของตลาดและเป็นการขยายการแข่งขันในตลาดระหว่างประเทศ (มาลินี, 2542)

กล้วยไม้ (orchid) อยู่ในวงศ์ Orchidaceae กล้วยไม้ที่พบอยู่ในโลกนี้มีประมาณ 15,000 – 30,000 ชนิด และมีมากกว่า 800 สกุล ซึ่งนับว่าเป็นวงศ์ที่ใหญ่ที่สุดวงศ์หนึ่งของพืชมีดอก (กรรชิต, 2547) กล้วยไม้ป่าของประเทศไทยมี 183 สกุล จำนวน 1224 ชนิด กล้วยไม้สกุลหวาย ถือเป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่สุด ซึ่งพบในประเทศไทยจำนวน 171 ชนิด (พัชรียา, 2553) ดอกของกล้วยไม้แต่ละพันธุ์มีรูปร่าง สี และกลิ่น แตกต่างกันไป ซึ่งจากการทำการศึกษาในกล้วยไม้ 2200 ชนิด มีเพียง 15–20% เท่านั้นที่พบว่าดอกกล้วยไม้สกุลหวายที่ขายเป็นการค้าบางชนิดไม่มีกลิ่นหอม เช่น *Dendrobium Anna*, *Dendrobium Sonia* และ *Dendrobium Sabin* สำหรับกล้วยไม้สกุลหวายที่มีดอกหอมถูกแบ่งเป็นกลุ่มได้ดังนี้คือ กล้วยไม้ที่มีกลิ่นหอมแรง เช่น เอื้องแซะหลวง (*Dendrobium scabrilingue* Lindl.), เอื้องเงินหลวง (*Dendrobium formosum* Roxb), เอื้องกรัง (*Dendrobium parishii*) เอื้องสายหลวง (*Dendrobium anosmum*) เอื้องเงิน (*Dendrobium draconis*) และกล้วยไม้สกุลช้าง (Kaiser, 1993; จิตราพรรณ, 2538; จิตราพรรณ, 2542; ธรรมภา 2552)

กล้วยไม้เอื้องเงินหลวง

ผู้ค้นพบกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง คือ William Roxburgh ต่อมาในปี ค.ศ. 1837 Gibson ได้นำออกมาเผยแพร่ (Charles, 1950) กล้วยไม้เอื้องเงินหลวงเป็นกล้วยไม้ป่าที่พบทางตะวันออกเฉียงใต้ของเทือกเขาหิมาลัยจนถึงพม่า เวียดนาม และไทย อีกทั้งยังพบในบริเวณพื้นที่ราบ (Holtum, 1964)

ศิริลักษณ์ (2544) กล่าวว่า ประเทศไทยพบเอื้องเงินหลวงเฉพาะจังหวัดระนอง (Haruyuki และ Rapee, 1975) อีกทั้งกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงจัดเป็นกล้วยไม้อากาศ (epiphytic orchid) มีลำต้นเป็น pseudobulbous ผิวของลำต้นเมื่อโตเต็มที่จะพบรอยย่น ลำต้นสูง 25–55 เซนติเมตร เป็นรูปไข่ (ovate) ฐานใบเบี้ยว (oblique) มีความยาว 7.5 – 12.5 เซนติเมตร และกว้าง 3.5–4 เซนติเมตร ดอกมีสีขาวเป็นช่อแบบ raceme จำนวน 2–5 ดอก ตรงบริเวณปลายลำที่ยังมีใบติดอยู่ กลีบเลี้ยงหรือกลีบดอก (sepal) เป็นรูปไข่กลับ (obovate) ถึงรูปหอก (lanceolate) ปลายกลีบแคบ ด้านหลังกลีบเป็นสันคล้ายท้องเรือ กลีบดอกหรือกลีบใน (petal) มีขนาดกว้างกว่ากลีบเลี้ยง 2–2.5 เท่า กลีบดอกเป็นรูปไข่กลับ (obovate) ถึงรูปวงกลม (orbicular) ขอบของกลีบดอกเป็นคลื่นเล็กน้อย บริเวณปลายกลีบมีลักษณะแหลมคล้ายติ่งเล็กน้อย กลีบดอกมีขนาด 4–6 เซนติเมตร ส่วนกลีบปาก (lip) มีสีขาวแต้มสีเหลือง ยาว 7–10 เซนติเมตร เป็นรูปไข่กลับ (obovate) ถึงรูปวงกลม (orbicular) ที่ฐานกลีบปากเชื่อมติดกับเส้าเกสร (column) ส่วนปลายกลีบปากเว้าเป็นพู (lobes) 2 พู และปลายพูหักเล็กน้อย (Backer และ Van Den Brink, 1968) ดอกมีกลิ่นหอมนาน 2 สัปดาห์ โดยปกติจะออกดอกช่วงเดือนตุลาคม–ธันวาคม (Haruyuki และ Rapee, 1975) จากการประชุม CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) ครั้งที่ 10 เมื่อวันที่ 9–22 มิถุนายน พ.ศ. 2540 ณ ประเทศ Zimbabwe ได้มีมติให้พันธุ์กล้วยไม้ของไทย ได้แก่ กล้วยไม้ป่าทุกชนิดรวมทั้งกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงเป็นพืชอนุรักษ์ในบัญชีแนบท้ายอนุสัญญาฯ บัญชีที่ 2 (อาพล, 2537)

อะราบิโดปซิส

อะราบิโดปซิส (thale cress, *Arabidopsis*) เป็นไม้ดอกขนาดเล็กสกุลหนึ่งในวงศ์บราสซิกาซีอี (Brassicaceae) จำนวนโครโมโซม 5 แท่ง ($2n = 10$) เป็นพืชที่มีเมล็ดรสฝาดอยู่ในตระกูลเดียวกันกับมัสตาร์ด และเกี่ยวข้องกับกะหล่ำ อะราบิโดปซิสสายพันธุ์โคลัมเบีย (*Columbia*) แลนด์

สเบิร์ก (Landsberg) อีเรกตา (Erecta) และ วาซิลอฟสกีจ (Wassilewskija) เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้ในการศึกษาด้านชีวโมเลกุล (<http://www.arabidopsis.org>) โดยเฉพาะสายพันธุ์โคลัมเบียและสายพันธุ์แลนส์เบิร์กถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบของการศึกษาด้านชีววิทยาของพืชและพันธุศาสตร์โมเลกุล (Meyerowitz and Somerville, 1994) และปัจจุบันมีการถอดลำดับพันธุกรรมทั้งหมดของอะราบิโดปซิสได้สำเร็จ (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) ซึ่งขนาดจีโนมประมาณ $100-120 \times 10^6$ คู่เบส ด้วยเหตุที่อะราบิโดปซิสเป็นพืชช่วงอายุสั้น ระยะเวลาการงอกของเมล็ด การออกดอก การติดฝัก จนได้เมล็ดรวมเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (David *et al.*, 1998)

ประเภทสารหอมระเหย และการใช้ประโยชน์

สารหอมระเหย หรือน้ำมันหอมระเหย เป็นสารประกอบที่ได้จากธรรมชาติ เป็นน้ำมันที่พืชผลิตขึ้นตามธรรมชาติเก็บไว้ตามส่วนต่างๆ เช่น กลีบดอก ใบ ผิวของผล เกสร รากหรือเปลือกของลำต้น มีลักษณะเป็นลักษณะเป็นน้ำมันที่มีอนุภาคเล็กมาก มีกลิ่นเฉพาะตัว ระเหยได้ในอุณหภูมิธรรมดา น้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนผสมของสารหอมที่ระเหยได้ (fragrant volatile compounds) ผลิตจากพืชโดยกระบวนการทางกายภาพ มักเป็นของเหลวซึ่งมีสีเหลืองอ่อนจนถึงเข้ม ไม่ละลายน้ำ ละลายในน้ำส้มสายชูเล็กน้อย ละลายดีในแอลกอฮอล์ น้ำมันพืช ไขมัน (fats) และไขแข็ง (waxes) ในธรรมชาติจะพบอยู่เป็นอนุเล็กๆ ระหว่างเซลล์ของพืช ซึ่งทำหน้าที่เป็นฮอร์โมน ตัวควบคุม (regulators) และตัวเร่ง (catalysis) ในพืช ช่วยให้พืชปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดี เช่น ในพืชทะเลทรายจะใช้น้ำมันหอมระเหยในการป้องกันแสงแดด และปรับอากาศรอบต้นให้สดชื่น พืชบางชนิดอาศัยน้ำมันหอมระเหยในการป้องกันโรค เช่น แบคทีเรีย และ รา และศัตรูพืช เช่น แมลง พืชบางชนิดมีน้ำมันหอมระเหยไว้ดึงดูดแมลงหรือผึ้งมาผสมเกสร พืชบางชนิดมีน้ำมันหอมระเหยอยู่ที่รากเพื่อกำจัดวัชพืช เป็นต้น (พิมพร, 2547) น้ำมันหอมระเหยในธรรมชาติมักจะพบในส่วนที่มีโครงสร้างที่เป็นต่อม (glandular hair) ซึ่งอาจพบได้ในส่วนต่างๆ ของพืช ลักษณะดังกล่าวสามารถนำมาแบ่งพืชออกเป็น 7 กลุ่ม คือ พืชที่ให้ดอกมีกลิ่นหอม พืชที่ให้ใบมีกลิ่นหอม พืชที่ให้เปลือกมีกลิ่นหอม พืชที่ให้ผลหรือเมล็ดมีกลิ่นหอม พืชที่ให้รากหรือส่วนที่คล้ายรากมีกลิ่นหอม พืชที่ให้ยางมีกลิ่นหอม และ พืชที่ให้ต้นมีกลิ่นหอม (จรัส และ พิสมม, 2546; พิมพร, 2547; อรรถ, 2547) กลิ่นเฉพาะตัวของพืชแต่ละชนิดขึ้นกับองค์ประกอบทางเคมีของสารหอมระเหยในพืชนั้นๆ น้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดมีสารประกอบเคมีหลายตัวรวมกัน เช่น น้ำมันดอกกุหลาบ มีสารประกอบเคมีอยู่ 18 ชนิด และในข้าวหอมมีสารประกอบเคมีมากกว่า 90 ชนิด ที่อยู่ในรูปต่างๆ (จรัส และ พิสมม,

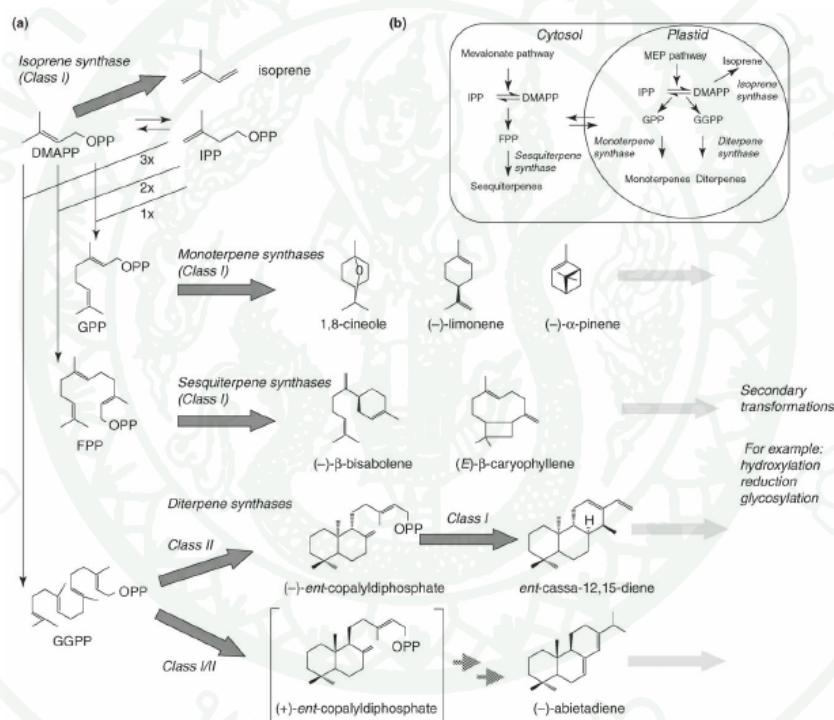
2546) น้ำมันหอมระเหยจะสะสมอยู่ในผนังเซลล์เป็นผลพลอยได้จากการเจริญของพืช ทำหน้าที่ปกป้องตัวเอง รักษาบาดแผล หรือกั้นการระเหยของน้ำ รวมทั้งใช้ไล่แมลงที่เป็นศัตรู อีกทั้งยังช่วยไล่แมลงเพื่อช่วยในการผสมพันธุ์ (สุจินดา, 2545)

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยมีอยู่มากมายหลายร้อยชนิด แต่สามารถแยกเป็นกลุ่มของสารได้เป็น 7 กลุ่ม ซึ่งในแต่ละกลุ่มจะออกฤทธิ์บำบัดที่แตกต่างกัน (อุไรวรรณ และคณะ, 2549) ดังนี้

1. กลุ่ม alcohol สารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติฆ่าเชื้อโรค ดันเชื้อไวรัส ยกระดับจิตใจ สารในกลุ่มนี้ได้แก่ linalool, citronellol, geraniol, borneol, menthol, nerol และ teppineol
2. กลุ่ม aldehydes สารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการระงับประสาท ยกระดับจิตใจ ลดการอักเสบ ลดความอ้วน ขยายหลอดเลือด และมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโรค สารในกลุ่มนี้ได้แก่ citronellal, citral, neral, geranial
3. กลุ่ม esters มีคุณสมบัติระงับประสาท สงบอารมณ์ ลดอาการเกร็งของกล้ามเนื้อ ลดการอักเสบและต้านทานเชื้อรา สารในกลุ่มนี้ได้แก่ linalyl acetate, geranyl acetate, bomyl acetate, eugenyl acetate, lavendulyl acetate
4. กลุ่ม ketones สาร ketones มีคุณสมบัติช่วยขยายหลอดลม ละลายเสมหะเสริมสร้างเนื้อเยื่อและลดการอักเสบ สารในกลุ่มนี้ได้แก่ jasmone, fenchone, camphor, carvone, menthose
5. กลุ่ม oxides ในสารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการขับเสมหะ ละลายเสมหะ สารที่สำคัญได้แก่ cineol นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และการกระตุ้นระบบประสาท สารในกลุ่มนี้ได้แก่ linalol oxide, bisabolon oxide
6. กลุ่ม phenols มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย กระตุ้นระบบประสาท และภูมิคุ้มกันของร่างกาย สารในกลุ่มนี้ได้แก่ eugenol, thymol
7. กลุ่ม terpene สารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการต้านทานเชื้อและลดการอักเสบ ประกอบด้วย camphene, sabinene, caryophyllene, cedrene, dipentene, phellandrene, terpinene, cardinene, mycrene สาร sesquiterpenes เช่น chamazulene, farnesol มีฤทธิ์ในการลดการอักเสบและต้านแบคทีเรีย สาร limonene มีคุณสมบัติต้านไวรัส ซึ่งพบในน้ำมันส้ม และ pinene มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ เป็นต้น โดยปกติน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดจะมีสารประกอบทางเคมีตั้งแต่ 50-500 ชนิด

องค์ประกอบทางเคมีแต่ละชนิด ก็มีคุณสมบัติแตกต่างกันไป ดังที่กล่าวแล้ว แต่เมื่อมาผสมผสานกันอยู่ ทำให้เกิดคุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์ ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชแต่ละชนิด ที่มีจุดเด่นความเหมือนและความแตกต่างกันในการบำบัดต่างกันออกไป

พิมพร (2547) และ อรชร (2547) ได้จัดกลุ่มของน้ำมันหอมระเหยออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตามองค์ประกอบของโครงสร้างโมเลกุลของวงอะโรแมติกที่มีโมเลกุลหลัก ได้แก่ กลุ่มของ phenylpropenes และกลุ่มของ hydrocarbons โดยน้ำมันหอมระเหยจะอยู่ในรูปของสารเคมีที่ต่างชนิดกันในเซลล์ ซึ่งจะอยู่ภายในพลาสติดและในไซโตพลาสซึม แสดงดังภาพที่ 1

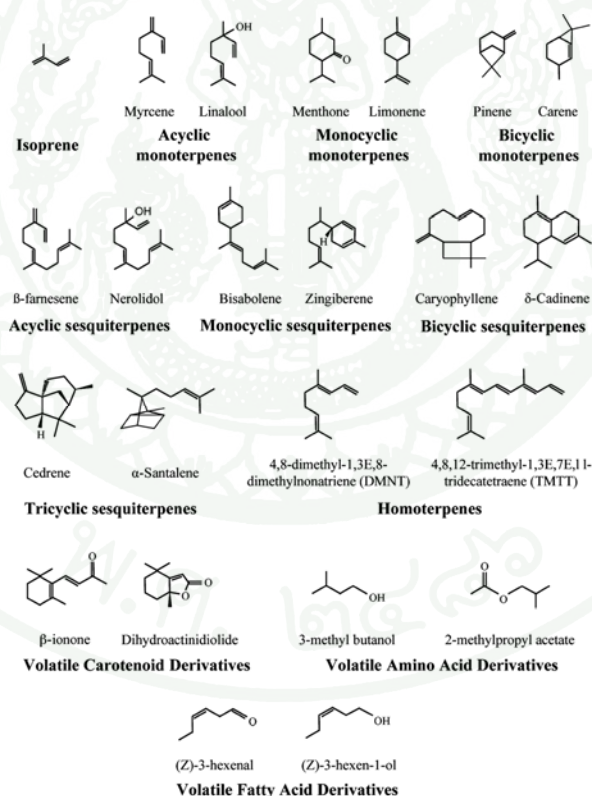


ภาพที่ 1 การทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม Terpene Synthases (TPS)

ที่มา: Dorothea (2006)

สารหอมระเหยกลุ่มเทอร์พีน

เทอร์พีน (Terpene) มีหลายชื่อด้วยกัน เราอาจรู้จักในชื่อของ terpenoid isoprene หรือ isoprenoid เป็นสารที่สำคัญมากในพืช terpenoid มีหลายโครงสร้างและหลายรูปแบบ (Dudareva *et al.*, 2006) (ภาพที่ 2) สารที่อยู่ในกลุ่มนี้มีมากกว่า 30,000 ชนิด ซึ่งในสารแต่ละตัวจะประกอบมาจากหน่วยของ isoprene ที่มีโครงสร้างจากคาร์บอน 5 อะตอม เช่น hemiterpenes C₅ (1 isoprene unit), monoterpenes C₁₀ (2 isoprene units), sesquiterpenes C₁₅ (3 isoprene units), diterpenes C₂₀ (4 isoprene units), triterpenes C₃₀ (6 isoprene units), tetraterpenes C₄₀ (8 isoprene units) และ polyterpene (C₅)_n ซึ่ง n สามารถแทนได้ตั้งแต่ 9 – 30,000 ตัว สามารถพบ terpene ได้จากสารอื่นๆ อีก เช่น anthraquinones, terpenoid indole alkaloid, flavonoids และ isoflavonoids (Liu *et al.*, 2005; Dubey *et al.*, 2003)



ภาพที่ 2 ตัวอย่างองค์ประกอบทางเคมีของ Terpene ที่พบในน้ำมันหอมระเหย

ที่มา: Dudareva *et al.* (2006)

สารกลุ่ม monoterpene ได้แก่ camphene, limonene, myrcene, α -pinene, β -pinene, α -terpinene, β -terpinene และ sabinene มีสมบัติกระตุ้นและบำรุง ฆ่าเชื้อโรค พบใน bay, bergamot, black pepper, cistus, fir, lime, lemon และ rosemary เป็นต้น สารในกลุ่ม monoterpene เป็นสารที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้แก่ การแต่งกลิ่น สี ในอาหาร และเครื่องสำอางต่างๆ นอกจากนี้ยังสามารถต่อต้านจุลชีพ และเชื้อรา (Lücker *et al.*, 2001) และ limonene มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งในกระเพาะอาหารและมะเร็งตับ (Lu *et al.*, 2004 และ Elegbede and Abiodun, 2002) ประภัสสร และคณะ (2011) ได้ศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร 8 ชนิดในหลอดทดลอง คือ กะเพรา การพลู ตะไคร้หอม ตะไคร้บ้าน แผลกหอม มะนาว โรสแมรี่ และอบเชย น้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี free radical scavenging (DPPH) และ lipid peroxidation inhibition (TBARs) พบมากที่สุดจาก 2 วิธี คือน้ำมันจากใบกะเพรา และรองลงมาคือ กานพลู

น้ำมันหอมระเหยถูกนำมาใช้ในการแต่งกลิ่นรสอาหาร ส่วนประกอบทางยา และเครื่องสำอาง และช่วยให้คลายกังวล ทำให้สดชื่น (สิริลักษณ์, 2545) อีกทั้งมะกรูดยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา (นิรนาม, 2537) เนื่องจากมีสารพวก geraniol, neroliol, linalool และ terpenol อยู่ด้วย (ชลลดา, 2546) ซึ่งสอดคล้องกับบทความของ นวลจันทร์ และสุภาพร (2551) กล่าวถึงน้ำมันหอมระเหยสามารถใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus cereus* แต่กลไกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ยังไม่ทราบแน่ชัด และน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าใบมะกรูด (บัญญัติ, 2527) อีกทั้งน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและใบมะกรูดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (ตารางที่ 1) การทดสอบของ Monasoi *et al.* (2006) ฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง KB และ P388 ของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพืชสมุนไพรไทย โดยนำเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดมาเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมันหอมระเหยผสมอยู่ จากนั้นดูผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT ใน 96 well tissue culture plate และปริมาณผลการตายหรือการรอดของเซลล์มะเร็งนั้น พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยหลายชนิดมีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง KB และ P388 โดยเฉพาะน้ำมันหอมจากโหระพามีฤทธิ์ที่ดีที่สุดในเซลล์มะเร็ง P388 แต่มีฤทธิ์แรงน้อยกว่า ยา 5-FU 12.7 เท่า และน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่ง (*Psidium guajava* L.) มีฤทธิ์ที่ดีที่สุดในเซลล์มะเร็ง KB โดยมีฤทธิ์แรงมากกว่ายา vincristine 4.37 เท่า จากการศึกษาของ Belletti *et al.* (2004) ได้สกัดและวิเคราะห์สารสกัดจากพืชตระกูล citrus พบว่าสารออกฤทธิ์ที่มีความเข้มข้น

สูงสุด เรียงตามลำดับ ได้แก่ β -pinene , *P*-cymene และ Citral isomers ซึ่ง β -pinene ที่พบมี ปริมาณประมาณ 20% ในสารสกัดจากน้ำมันขาว พบว่าสารนี้มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. coli* 0157-H7 นอกจากนี้ bicyclic terpenes, α และ β -pinene ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งยีสต์ และเชื้อราหลายชนิด จากการศึกษาของ สาวิตรี และคณะ (2005) โดยการสำรวจและทดสอบหาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระ ของสมุนไพรทั้งหมด 15 ชนิด โดยวิธี agar diffusion test พบว่า มะกรูดและมะนาว มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิก โดยมีความกว้างของวงทดสอบประมาณ 0.83 ± 0.06 และ 0.87 ± 0.12 เซนติเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ น้ำสมุนไพรทั้งสองชนิดยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* โดยมีความกว้างของวงทดสอบอยู่ที่ 1.30 ± 0.1 และ 1.47 ± 0.06 ตามลำดับ Dorothea and Eran (2006) กล่าวว่า การปลดปล่อยสารโมโนเทอร์พีน และเซสควิเทอร์พีน ในอะราบิคอปซิส สายพันธุ์โคลัมเบีย พบสารกลุ่มโมโนเทอร์พีน 3 ชนิด คือ β -mycrene, linalool และ limonene และพบสารกลามเซสควิเทอร์พีน อีก 20 ชนิด โดยพบว่า (-)- E - β -caryophyllene มีการปลดปล่อยมากที่สุด

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งโดยน้ำมันหอมระเหยจากใบและผิวมะกรูด

Essential oil of <i>Citrus hystrix</i>	Bacteria	Fungi
Leaf Oil	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Alternaria</i> sp.
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Cunninghamella</i> sp.
		<i>Fusarium</i> sp.
		<i>Rhizopus</i> sp.
Peel Oil	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Alternaria</i> sp.
	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Cunninghamella</i> sp.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Curvularia</i> sp.

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก บัญญัติ (2527)

การสังเคราะห์สารหอมระเหยในวิถีเทอร์ปีนอยด์

สารในกลุ่ม terpene นับว่ามีความสำคัญต่อกลิ่นหอม Soheil and Croteau (2002) จึงทำการศึกษากระบวนการสร้างอนุพันธ์ของสาร terpene กว่า 20,000 ชนิด โดยปฏิกิริยาเริ่มจากสารตั้งต้นที่มีคาร์บอน 5 อะตอม คือ isopentenyl diphosphate (IPP) และไอโซเมอร์ของ IPP ได้แก่ dimethylallyl diphosphate (DMAPP) ผลจากการสังเคราะห์จะได้สารทั้งหมด 3 ชนิด คือ geranyl diphosphate (GPP, C10) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของ IPP กับ DMAPP อย่างละ 1 โมเลกุล สาร GPP สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างได้เป็นสารในกลุ่ม monoterpenes (C10), farnesyl diphosphate (FPP, C15) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของ IPP 2 โมเลกุล และ DMAPP 1 โมเลกุล สาร FPP สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างได้เป็นสารในกลุ่ม sesquiterpenes (C15) และถ้า FPP เกิดการรวมตัวกัน 2 โมเลกุล จะได้โครงสร้างของสารในกลุ่ม triterpenes (C30) และ geranylgeranyl diphosphate (GGPP, C20) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของ IPP 3 โมเลกุล และ DMAPP 1 โมเลกุล สาร GGPP สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างได้เป็นสารในกลุ่ม diterpenes (C20) และถ้า GGPP เกิดการรวมตัวกัน 2 โมเลกุล จะได้โครงสร้างของสารในกลุ่ม tetraterpenes (C40)

จากการศึกษาของ Dorthea (2006) ในกระบวนการสังเคราะห์สาร terpenes ในพืชจากสาร DMAPP, GPP, FPP หรือ GGPP (ภาพผนวกที่ 5) โดยเอนไซม์ terpene synthase นั้นพบว่าสาร GPP, FPP และ GGPP ถูกสังเคราะห์จาก DMAPP รวมกับ IPP ชนิดต่างๆ กัน โดยเอนไซม์ prenyltransferase จะได้สารสุดท้าย คือ monoterpene, sesquiterpene และ diterpene โดยเอนไซม์ terpene synthase มี 2 กลุ่มใหญ่คือ ในกลุ่มที่ 1 ได้แก่ isoprene synthase, monoterpene synthases และ sesquiterpene synthases ทำหน้าที่ให้โปรตอน (H^+) และเติมคาร์บอนลงไปในสารตั้งต้น prenyl diphosphate สำหรับเอนไซม์ terpene synthase ในกลุ่มที่ 2 คือ diterpene synthases เช่น เอนไซม์ ent - copalyl diphosphate (CPP) synthase ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำโปรตอนจากสารตั้งต้นทำให้เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างจาก GGPP ไปเป็น CPP นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์บางชนิดที่ทำหน้าที่ได้ 2 แบบ (กลุ่มที่ 1/กลุ่มที่ 2) ได้แก่ abietadiene synthase สามารถเปลี่ยน GGPP ไปเป็นสารพวก (+) - CPP ได้ จากนั้น (+) - CPP จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสาร abietadiene ได้ นอกจากนี้เอนไซม์ diterpene synthase ยังทำหน้าที่สังเคราะห์ CPP หรือ GGPP ได้ โดยทั่วไป เอนไซม์ terpene synthase ทุกชนิด สามารถเปลี่ยนสารผลผลิตสุดท้าย ให้มีโครงสร้างทุติยภูมิได้

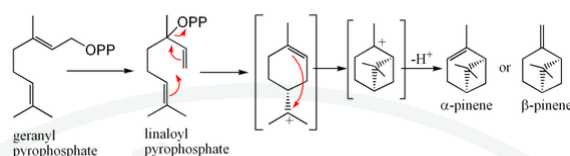
การสังเคราะห์ terpene ในเซลล์พืชเกิดได้ใน 2 ส่วนของเซลล์ คือ ในไซโทพลาสซึม และในพลาสติด (ภาพผนวกที่ 5) ซึ่งทั้ง 2 กระบวนการ เกิดการสังเคราะห์สารโดยอิสระต่อกัน คือ กระบวนการ Mevalonate pathway เกิดขึ้นในไซโทพลาสซึม โดยสาร IPP ถูกสร้างเป็น DMAPP และ FPP ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิด เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ sesquiterpenes โดยเอนไซม์ sesquiterpene synthases และกระบวนการ methylerythritol phosphate (MEP) เกิดขึ้นในพลาสติด IPP ถูกเปลี่ยนเป็น DMAPP ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ isoprene โดยเอนไซม์ isoprene synthase และสาร IPP ถูกสร้างเป็น DMAPP เป็นสารตั้งต้นในการสร้าง GPP ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ monoterpene โดยเอนไซม์ monoterpene synthases และ DMAPP ถูกเปลี่ยนเป็น GGPP ซึ่งจะถูกระงเคราะห์เป็น diterpene โดยเอนไซม์ diterpene synthases นอกจากนี้ GPP จากพลาสติดอาจถูกระงเคราะห์เป็น FPP โดยเอนไซม์ monoterpene synthases และ ส่งผ่านออกไปยังไซโทพลาสซึมได้ FPP ในไซโทพลาสซึมอาจถูกระงเคราะห์โดย monoterpene synthases ให้เป็น GPP ถูกส่งกลับมาใช้ในพลาสติดได้เช่นกัน

จากการศึกษาของ Muñoz-Bertomeu et al. (2008) และ Xiang et al. (2006) สาร monoterpene ที่เกิดจากกระบวนการสร้างสารในพลาสติด จะมีการเปลี่ยนสารให้อยู่ในรูปของสารตัวกลางก่อนจึงค่อยเปลี่ยนรูปไปเป็นสารหอมระเหยที่แตกต่างกัน แสดงดังภาพผนวกที่ 5 สารตัวกลางนี้เรียกว่า α -terpinyl cation ซึ่งสารตัวกลางนี้ถูกเปลี่ยนมาจากสาร GPP เป็นสาร LDP (linalyl diphosphate) โดยเอนไซม์ MTSs (monoterpene synthases) ก่อนที่จะถูกสร้างเป็นสารหอมระเหยด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะต่อสารนั้นๆ เช่น เอนไซม์ limonene synthase สร้างสารหอมระเหย limonene, linalool synthase สร้างสารหอมระเหย linalool, pinene synthase สร้างสารหอมระเหย α -pinene และ myrcene synthase สร้างสารหอมระเหย myrcene เป็นต้น

สารหอมระเหยพินิน

พินิน มีสูตรทางเคมีคือ $C_{10}H_{16}$ เป็นโมโนเทอร์พีน แบบ bicyclic ในธรรมชาติจะพบสารพินินเป็นสารที่มี 2 ไอโซเมอร์ คือ แอลฟา-พินิน (α -pinene) และ เบต้า-พินิน (β -pinene) ซึ่งการสังเคราะห์สารประกอบทั้งสองชนิด เกิดจากสารตั้งต้นชนิดเดียวกัน คือ geranyl pyrophosphate (GPP) และเกิดปฏิกิริยา cyclisation ของ linaloyl pyrophosphate ทำให้เกิดการสูญเสียโปรตอน และ

มีการปรับสมดุลของอะตอมคาร์บอนที่มีประจุบวก มี 6 electron และ 3 พันธะ ได้เป็นแอลฟา-พินีน (α -pinene) และ เบต้า-พินีน (β -pinene) ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การสังเคราะห์สารประกอบพินีน 2 ไอโซเมอร์

ที่มา : นิรนาม (2005)

เบต้า-พินีน

เบต้า-พินีน เป็นของเหลวใสไม่มีสี ละลายได้ในแอลกอฮอล์ แต่ไม่ละลายในน้ำ มีอยู่ในพืชหลายชนิด เช่น โรสแมรี่ พาสลีย์ ผักชีลาว กะเพรา ยาร์โรว์ กุหลาบ (Glenn Tinseth, 1993) และยังเป็นสารประกอบกลิ่นที่สำคัญที่สกัดได้จากส้มแมนดาริน และยังพบในพืชอีกหลายชนิด โดยเฉพาะพืชตระกูลส้ม (Citrus) ซึ่งในบทความของ Masayoshi (2010) ศึกษาาระดับสารหอมระเหยของ lime oil ที่สกัดได้จากผิวของ *Citrus aurantifolia* Swingle, BT lime โดยพบสารกลุ่มโมโนเทอร์พีน ที่สามารถจำแนกได้ประมาณ 77.41% ดังนี้ คือ limonene 41.40%, β -pinene 18.54%, gamma-terpinene 7.13%, sabinene 4.52%, α -pinene 2.87% และ myrcene 1.21% ซึ่งการสะสมของสาร β -pinene สอดคล้องกับการทดลองของ Dugo *et al.* (2002) และระดับสารหอมระเหยของ lime oil ที่สกัดได้จาก *Citrus limonia* Osbeck, DT lime พบสารหอมระเหยที่สามารถจำแนกได้ประมาณ 98.51% ที่น่าสนใจคือสารกลุ่มโมโนเทอร์พีน ถูกพบมากถึง 87.38% ซึ่งสูงกว่า Persa lime (77.77%) และ BT lime (77.41%) โดยพบว่าสัดส่วนของสาร 2 ชนิดระหว่าง β -pinene และ gamma-terpinene ของ DT lime และ BT lime คือ DT oil มีสัดส่วนระหว่าง β -pinene และ gamma-terpinene คือ 1 : 2.6 ซึ่งในทางกลับกัน BT oil มีสัดส่วนของ β -pinene และ gamma-terpinene คือ 2.7 : 1 (Giovanni *et al.*, 2002) เป็นที่น่าสนใจในพืชหลายชนิดที่ยังไม่มีการค้นคว้า และศึกษาระดับของสารหอมระเหย ซึ่งความรู้ที่ได้ อาจจะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อความเข้าใจในกลไกของการสร้างสารหอมระเหยในพืชต่างๆ

น้ำมันหอมระเหยจากมะกรูดกลุ่ม top note ถูกนำมาใช้ในการบำบัดและเข้ากันได้ดีกับกลิ่นตระกูลส้ม ลาเวนเดอร์ คาโมไมล์ ไชเปรส เจอเรเนียม ปาล์มาโรซ่า เป็ทชูลี และกระดังงา ช่วยให้คลายเครียด หายหงุดหงิด (อรชร, 2547) องค์ประกอบน้ำมันหอมระเหยในมะกรูดโดยการทดลองของ สุภาพ และคณะ (2524) ได้ศึกษาการแยกน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดจากผลสดด้วยวิธีการบีบเย็น (cold press) และวิเคราะห์หาสารประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรสโคปี (Gas Chromatography – Mass Spectrometry, GC-MS) พบว่าสามารถแยกสารประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด และหาโครงสร้างและปริมาณของสารประกอบนั้นๆ คือ α -pinene, β -pinene, β -phellandrene, limonene, linalool, citronellal, terpinen-4-ol และ α -terpineol กิตติยา (2553) ได้ทำการศึกษาระดับสารหอมระเหยและวิเคราะห์สารหอมระเหยองค์ประกอบของกลิ่นในใบมะกรูด และผิวมะกรูดโดยวิธี GC-MS พบว่ามีองค์ประกอบของสารเคมีรวมทั้งสิ้น 20 ชนิด พบสารหอมระเหยจากใบมะกรูด 16 ชนิด และจากผิวมะกรูด 14 ชนิด ดังตารางที่ 2

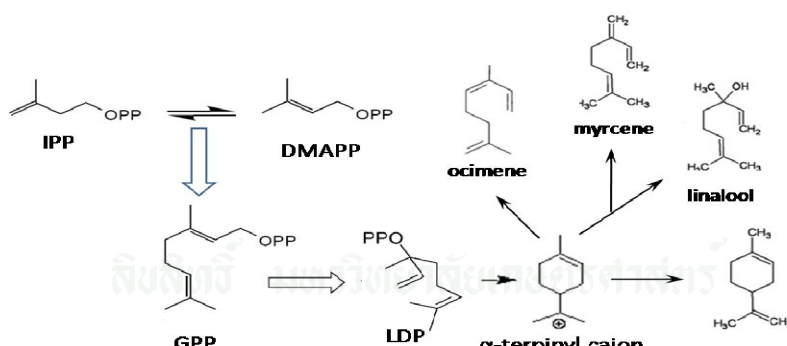
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบชนิดของสารหอมระเหยที่พบในใบมะกรูด และผิวมะกรูด

Compound type	ใบมะกรูด	ผิวมะกรูด	Compound group
	% product	% product	
Pinene<alpha->	–	1.6	monoterpene
Sabinene	1.0	13.2	monoterpene
Pinene<beta->	–	21.4	monoterpene
Myrcene	–	1.7	monoterpene
Limonene	–	3.0	monoterpene
Linalool	6.4	2.5	monoterpene
Pulegone	21.5	10.5	monoterpene
Citronellal	1.6	–	monoterpene
Citronellyl acetate	5.6	–	monoterpene
Geranyl acetate	1.7	–	monoterpene
Hexenyl acetate<3E->	2.3	–	unclassified
Copaene<alpha->	9.7	11.0	sesquiterpene
Cubebene<beta->	5.2	8.1	sesquiterpene
Cubebene<alpha->	1.2	–	sesquiterpene
Caryophyllene<(E)->	16.9	10.3	sesquiterpene
Humulene<alpha->	2.8	2.2	sesquiterpene
Germacrene D	2.7	5.4	sesquiterpene
Bicyclogermacrene	10.2	1.7	sesquiterpene
Cadinene<delta->	6.9	7.2	sesquiterpene
Farnesene	4.1	–	sesquiterpene

ที่มา : กิตติยา (2553)

การศึกษายืนยันกำหนดการสร้างสารหอมระเหยกลุ่ม monoterpene

เอนไซม์พินินซินเทส (*pns*) (EC 4.2.3.14) เป็นเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีในการเปลี่ยนสารตั้งต้น geranyl diphosphate (GPP) เป็นสารประกอบ 2 ชนิด คือ แอลฟา-พินิน (α -pinene) และ เบต้า-พินิน (β -pinene) (ภาพที่ 4) โดยในพืชตระกูลสน (Gymnospermae) เช่น สนในกลุ่ม *Abies grandis* จะเปลี่ยนสารตั้งต้น GPP เป็นสารประกอบ แอลฟา-พินิน (α -pinene) ในอัตราส่วน 40% และ เบต้า-พินิน (β -pinene) ในอัตราส่วน 60% (Anake, 2008) Krasnyanski *et al.* (1999) ทำการถ่ายยีน limonene synthase (*lms*) ของ สะระแหน่ (*Mentha piperita* L.) เข้าสู่ แบคทีเรีย *Black Mitcham peppermint* พบว่า ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับสารหอมระเหย ต่อมา LÜcker *et al.* (2001) ทำการถ่ายยีน S-linalool synthase เข้าสู่พืชทูเนีย (*Petunia hybrida*) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสาร linalool glucoside เพิ่มขึ้น Jesus *et al.* (2008) ได้ทำการแยกยีน *Limonene synthase* จาก สเปียร์มินต์ (spearmint) และถ่ายยีนเข้าไปในสไปค์ ลาเวนเดอร์ (spike lavender) พบว่าจากวิเคราะห์ตัวอย่างใบพืชที่รับยีนมีการสะสมน้ำมันที่สูงกว่าใบที่ไม่ได้รับยีน และมีการสะสมสาร limonene เพิ่มขึ้นกว่า 450 เปอร์เซ็นต์ Rachel *et al.* (2008) ได้ทำการแยกยีน α -Zingiberene synthase จาก lemon basil และทำ Overexpression ในผลมะเขือเทศ พบว่ามีการสะสมสาร monoterpene ได้แก่ limonene, β -phellandrene, sabinene, β -pinene, β -myrcene, α -phellandrene, α -terpinene และ β -oncimene เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ control อย่างไรก็ดีตาม Asaph *et al.* (2005) ได้รายงานการถ่ายยีนเข้าสู่พืชหลายชนิด และผลการเปลี่ยนแปลงของระดับสารหอมระเหยที่เปลี่ยนแปลงไป (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 4 การสังเคราะห์สารหอมระเหยกลุ่มโมโนเทอร์ปีนในพลาสติก

ที่มา : อรรัมภา (2554)

ตารางที่ 3 รายงานการทดลองการเปลี่ยนแปลงสารหอมระเหยในพืชหลายชนิด โดยการถ่ายยีนในกลุ่ม monoterpenoids

Engineered species	Target	Subcellular location	Regulation	Alter terpene profile	Reference
Mint	Limonene synthase	Plastid	Constitutive	No Change	Krasnyanski <i>et al.</i> (1999)
Mint	Limonene synthase	Plastid	Constitutive	Several products ($\pm$)	Diemer <i>et al.</i> (2001)
Mint	Limonene synthase	Plastid	Constitutive	No Change	Mahmoud <i>et al.</i> (2004)
Petunia	Linalool synthase	Plastid	Constitutive	Linalool glycoside (+)	LÜcker <i>et al.</i> (2001)
Tomato	Linalool synthase	Plastid	Fruit Specific	Linalool (+), hydroxylated linalool (+)	Lewinsohn <i>et al.</i> (2001)
Carnation	Linalool synthase	Plastid	Constitutive	Linalool (+), linalool oxides (+)	Lavy <i>et al.</i> (2002)
<i>Arabidopsis</i>	Linalool/nerolidol synthase	Plastid	Constitutive	Linalool (+), hydroxylated and glycosylated linalool (+)	Aharoni <i>et al.</i> (2003)
Potato	Linalool/nerolidol synthase	Plastid	Constitutive	Linalool (+), hydroxylated and glycosylated linalool (+)	Aharoni <i>et al.</i> (2003)
Tobacco	g-Terpinene synthase, b-pinene synthase and limonene synthase	Plastid	Constitutive	gamma-Terpinene (+), limonene (+) , b-pinene (+) and side products (+)	LÜcker <i>et al.</i> (2004)
Tobacco	Limonene synthase	Cytosol	Constitutive	Limonene (+)	Ohara <i>et al.</i> (2003)
Tobacco	Limonene synthase	Plastid	Constitutive	Limonene (+)	Ohara <i>et al.</i> (2003)
Tobacco	Limonene synthase	Endoplasmic reticulum	Constitutive	No Change	Ohara <i>et al.</i> (2003)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Asaph *et al.* (2005)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมพืชทดลองและการทดสอบระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

1.1 การเตรียมพืชทดลอง

อะราบิโดปซิส (*Arabidopsis thaliana*) ที่ใช้ในงานทดลองเป็นพันธุ์ Columbia ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์ และ ดร.ศุภชัย วุฒิพงศ์ชัยกิจ ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

1.1.1 การเตรียมอะราบิโดปซิส

ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดอะราบิโดปซิส (*Arabidopsis thaliana*) สายพันธุ์ Columbia ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอ-รอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และล้างด้วยน้ำ deionize (dH_2O) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดวางบนอาหาร 1/2MS (Murashige and Skoog, 1962) เพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 45 วัน จึงทำการถ่ายยีน

1.1.2 การฟอกเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

กล้วยไม้ที่ใช้ในการทดลองคือ กล้วยไม้เอื้องเงินหลวง ดอกขาว ปากเหลือง (*Dendrobium formosum* Roxb. ex Lindl.) แหล่งที่มา จากสถาบันวิจัยเพื่อการพัฒนาชายฝั่งอันดามัน ต.กำพวน อ.สุขสำราญ จ.ระนอง ฟอกฆ่าเชื้อฟักกล้วยไม้ด้วย 95% EtOH เผาไฟ ทำซ้ำ 1 ครั้ง แล้วนำเมล็ดกล้วยไม้เอื้องมาเพาะบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตรดัดแปลง VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 6 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ จนมีขนาดประมาณ 0.5 – 1 มิลลิเมตร เหมาะสมแก่การถ่ายยีน

1.2 การทดสอบระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดอะราบิโดปซิส ตามวิธีการ 2.1 นำเมล็ดวางบนอาหาร 1/2MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซินความเข้มข้น 0, 20, 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกปริมาณการอยู่รอดของอะราบิโดปซิส

2. การสร้างโครงสร้างของยีน

ดีเอ็นเอที่ใช้ในการถ่ายยีน คือดีเอ็นเอส่วนของยีน *pns* ที่แยกได้จากใบมะกรูด โดยตัดต่อยีนเข้ากับเวกเตอร์พีช pCAMBIA 1305.1 มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.1 การตัดต่อยีน *pns* เข้าสู่เวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy (Promega co.,สหรัฐอเมริกา)

2.1.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เพิ่มปริมาณชิ้นโคลน PSWK 1138 และ PSWK 977 (ได้รับการอนุเคราะห์จาก กิตติยา แสงสว่าง) ใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *pns* เพื่อนำไปเชื่อมกันเป็นสายดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ specific primer สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอชิ้นโคลน 1138 ใช้ไพรเมอร์ T7 (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3') กับ 5'Pin(As)1200 (5' AGT AGC GTC CCA TCT CTA A 3') สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นโคลน 977 ใช้ไพรเมอร์ Lim(S)1070 (5' GAT GAY ATT TAC GAT GTC TAY GG 3') กับ SP6 (5'TAT TTA GGT GAC ACT ATA G 3') โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร, 10x buffer 2.5 ไมโครลิตร, 25mM dNTP 2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร, เอนไซม์ *Pfu* polymerase (Fermentas, แคนาดา) 0.25 ไมโครลิตร และเติมน้ำให้มีปริมาตรรวมเป็น 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำส่วนผสมที่ได้ไปเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Mastercycler[®] gradient (Eppendorf, สหรัฐอเมริกา) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ, 95 องศาเซลเซียส 2 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบปริมาณและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส (1 Kb DNA ladder)

2.1.2 การทำให้พีซีอาร์บริสุทธิ์ด้วย PCR Purification Kit (QIAGEN, สหรัฐอเมริกา)

นำผลผลิตที่มีปริมาตรจากข้อ 3.1 ใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Buffer PBI 5 เท่าของปริมาตรผลผลิตพีซีอาร์ ตรวจสอบสีของสารละลายว่าเป็นสีเหลืองหรือไม่ หากเป็นสีส้มหรือม่วง ให้เติม 3M sodium acetate 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตรวจสอบอีกที ทำแบบนี้จนสารละลายกลับเป็นสีเหลือง คูณสารละลายลงตู้ QIAquick spin column ปั่นตกเป็นเวลา 30–60 วินาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง ล้างด้วย Buffer PE 750 ไมโครลิตร แล้วปั่นตก 30–60 วินาที เทสารละลายส่วนล่างทิ้ง และปั่นตก 30–60 วินาที นำ QIAquick column ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใหม่ เติม Buffer EB 30 ไมโครลิตร แล้วปั่นตกอีก 30–60 วินาที เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส

2.1.3 การเชื่อมโคลนของยีน *pms* ด้วยวิธี rapid denaturation

นำผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์จากข้อ 2.1.2 ทำการเชื่อมกันด้วยวิธี rapid denaturation โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที และนำพีซีอาร์ที่ได้ไปเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ โดยการทำให้พีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ T7 (5'-ACG TTG TAA AAC GAC GG-3') และ SP6 (5'-GAT AAG AAT TTC ACA CA-3')

2.1.4 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอเวกเตอร์ (ligation)

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ และเวกเตอร์ที่กลับมาเชื่อมต่อกัน (religated vector) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *SpeI* สำหรับดีเอ็นเอทำได้โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (20 ยูนิตต่อไมโครลิตร) (Fermentas, แคนาดา) สำหรับดีเอ็นเอใช้ 0.2 ไมโครกรัม ใน 1x FastDigest® Buffer สำหรับพลาสมิดเวกเตอร์ใช้ 1 ไมโครกรัม เติมน้ำให้ครบ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอสมบูร์นเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy (Promega co., สหรัฐอเมริกา) ที่มีโปรโมเตอร์ T7 และยีนคัดลอกแอมพิซิลิน สำหรับการเชื่อมต่อยีน *pms* เข้ากับเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy ทำได้โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase (1 ยูนิตต่อ 1 ไมโครลิตร) (Fermentas, แคนาดา) ด้วยอัตราส่วนปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ 3 ไมโครกรัม ต่อดีเอ็นเอเวกเตอร์ 1 ไมโครกรัม ใน 1x Reaction Buffer เติมน้ำให้ครบ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง

2.1.5 การเตรียมเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน (competent cell) สำหรับเพิ่มปริมาณ

เตรียมแบคทีเรียเจ้าบ้านโดยดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานของ Sambrook *et al.* (1989) ดังนี้เลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ที่ได้จากโคโลนีเดียวในหลอดทดลอง ซึ่งบรรจุอาหารเหลว LB 3 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำเชื้อ 1 มิลลิลิตร ไปเลี้ยงต่อในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว LB 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้มีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.4–0.6 นำแบคทีเรียที่ได้มาเทใส่หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตรที่แช่เย็น แล้วแช่น้ำแข็งนาน 20 นาที ตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย TSS ที่เย็นจัด 10 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็ง 5 นาที ตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียอีกครั้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย TSS 1 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็ง 5 นาที ผสมด้วยเครื่องผสมสารให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ทำให้สารละลายเซลล์เย็นอยู่ตลอดเวลาด้วยการแช่น้ำแข็ง แบ่ง competent cell 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร สำหรับนำไปใช้ต่อไป

2.1.6 การนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านโดยวิธี heat shock Transformation และการคัดเลือก

เติมพลาสมิดสายผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ต้องการกับเวกเตอร์จำนวน 5 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ที่มี competent cell 100 ไมโครลิตร ที่แช่เย็นอยู่ตลอดเวลา ผสมให้เข้ากันและแช่น้ำแข็งนาน 20 นาที นำไปจุ่มในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที แล้วนำมาแช่น้ำแข็งทันที 5 นาที นำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB

จำนวน 1 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารออกให้เหลือประมาณ 200 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ แล้วนำมาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LA ที่ผสมแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.1.7 การตรวจสอบโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสม

การตรวจสอบโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสมโดยวิธีพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ SP6 และ T7 นำโคโลนีสีขาวที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสมเพิ่มปริมาณบนอาหารแข็ง LA ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ขูดเซลล์แบคทีเรียด้วยปลายไม้ในน้ำ 7 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X PCR บัฟเฟอร์ 1 ไมโครลิตร, 10mM dNTP 1 ไมโครลิตร, i-Taq DNA Polymerase 0.1 ไมโครลิตร,ไพรเมอร์ SP6 (5'-GAT AAG AAT TTC ACA CA-3') และไพรเมอร์ T7 (5'-ACG TTG TAA AAC GAC GG-3') อย่างละ 0.2 ไมโครลิตร และ DMSO 0.5 ไมโครลิตร ทำพีซีอาร์ โดยใช้โปรแกรม 95 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อด้วย 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 20 รอบ และที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที นำผลพีซีอาร์มาตรวจสอบโดยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโตรฟอรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส (1 Kb DNA ladder)

2.1.8 สกัดพลาสมิดจากแบคทีเรียด้วยชุดน้ำยา AxyPrep Plasmid Miniprep kit (Axygen Bioscience, USA)

เลี้ยงเชื้อโคโลนีเดี่ยวในอาหาร LB ซึ่งมียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่านานข้ามคืน จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ละลายเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ S1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติมน้ำบัฟเฟอร์ S2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำบัฟเฟอร์ S3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำน้ำใสบรรจุลงใน column จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ล้างตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ W2 แล้วหมุนเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อให้แผ่นกรองของ column แห้ง จากนั้นเติมน้ำบัฟเฟอร์ TE (Tris-HCl

ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์, pH 7.4 EDTA ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, pH 8.0) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นำไปหมุนเหวี่ยงเก็บสารละลายที่ -20 องศาเซลเซียส

2.1.9 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำแบคทีเรียที่มีพลาสมิดสายผสมที่คาดว่าจะได้รับชิ้นดีเอ็นเอมาแยกสกัดให้ได้ พลาสมิดบริสุทธิ์โดยวิธีอัลคาไลน์ไลซิสด้วย AxyPrep Plasmid Miniprep kit (Axygen Bioscience, สหรัฐอเมริกา) เลี้ยงเชื้อจากโคลนที่ถูกดองในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าข้ามคืน นำมาหมุนเหวี่ยง เพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ละลายเซลล์ 250 ไมโครลิตร ของ บัฟเฟอร์ S1 แล้วเติม 250 ไมโครลิตร ของ S2 ผสมให้เข้ากัน เติม 350 ไมโครลิตร ของ บัฟเฟอร์ S3 ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยง 11,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำน้ำใสบรรจุลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยง 1 นาที ล้างตะกอนด้วย บัฟเฟอร์ W2 หมุนเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อให้คอลัมน์แห้ง จากนั้นจึงเติม TE ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นำไปหมุนเหวี่ยงเก็บน้ำใสส่วนที่มีพลาสมิด ละลายอยู่ นำมาตรวจสอบความเข้มข้นโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส นำไปศึกษาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen (Macrogen, เกาหลีใต้)

2.2 การตัดต่อและเชื่อมยีน *pns* เข้าสู่เวกเตอร์พืช pCAMBIA 1305.1

2.2.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำโคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกดองจากข้อ 2.1.9 มาเพิ่มปริมาณด้วย เทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 5'Pin_SpeI (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3') กับ 3'Pin_EcoRV (5' AGT AGC GTC CCA TCT CTA A 3') โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร, 10x buffer 2.5 ไมโครลิตร, 25mM dNTP 2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร, เอนไซม์ *Pfu* polymerase (Fermentas, แคนาดา) 0.25 ไมโครลิตร และเติมน้ำให้มีปริมาตรรวมเป็น 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำส่วนผสมที่ได้ไปเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Mastercycler[®] gradient (Eppendorf, สหรัฐอเมริกา) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที

จำนวน 1 รอบ, 95 องศาเซลเซียส 2 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบปริมาณและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส (1 Kb DNA ladder)

2.2.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอเวกเตอร์ (ligation)

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 2.2.1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI* และ *EcoRV* และเวกเตอร์ pCAMBIA1305.1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI* และ *PmlI* สำหรับดีเอ็นเอทำได้โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (20 ยูนิตต่อไมโครลิตร) (Fermentas, แคนาดา) สำหรับดีเอ็นเอใช้ 0.2 ไมโครกรัม ใน 1x FastDigest® Buffer สำหรับพลาสมิดเวกเตอร์ใช้ 1 ไมโครกรัม เติมน้ำให้ครบ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอสมบูร์นเข้าสู่เวกเตอร์ pCAMBIA1305.1 ที่มีโปรโมเตอร์ 35S เทอร์มินเตอร์ NOS ยีนคัดลอกในแบคทีเรียกานาไมซิน และยีนคัดลอกในพืชไฮโกรไมซิน เชื่อมต่อยีน *pns* เข้ากับเวกเตอร์ pCAMBIA1305.1 ทำได้โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase (1 ยูนิตต่อ 1 ไมโครลิตร) (Fermentas, แคนาดา) ด้วยอัตราส่วนปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ 3 ไมโครกรัม ต่อดีเอ็นเอเวกเตอร์ 1 ไมโครกรัม ใน 1x Reaction Buffer เติมน้ำให้ครบ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง

2.2.3 การเตรียมเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน (competent cell) สำหรับเพิ่มปริมาณ

เลี้ยงแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่ได้จากโคโลนีเดี่ยวในหลอดทดลอง ตามวิธีของ Zhang *et al.* (2006) ซึ่งบรรจุอาหารเหลว LB 5 มิลลิลิตร ที่ผสมไรแฟมพิซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำเชื้อ 1 มิลลิลิตร ไปเลี้ยงต่อในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว LB 50 มิลลิลิตร ที่ผสมไรแฟมพิซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้มีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.7–0.9 นำแบคทีเรียที่ได้มาเทใส่หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตรที่แช่เย็น แล้วแช่

บนน้ำแข็งนาน 30 นาที ตักตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารทิ้ง คว่ำบนกระดาษที่ผารการนั่งฆ่าเชื้อนาน 1 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 10% Glycerol ที่เย็นจัด 10 มิลลิลิตร แล้ว vortex ตักตะกอนเซลล์แบคทีเรียอีกครั้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% Glycerol 1 มิลลิลิตร แช่บนน้ำแข็ง 5 นาที ผสมด้วยเครื่องผสมสารให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ทำให้สารละลายเซลล์เย็นอยู่ตลอดเวลาด้วยการแช่น้ำแข็ง แบ่ง competent cell 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร สำหรับนำไปใช้ต่อไป

2.2.4 การนำพลาสมิดเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียโดยวิธี electroporation

เตรียม competent cell ของอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA 105 ตามวิธีของ Zhang *et al.* (2006) ผสมอะโกรแบคทีเรียกับพลาสมิดที่เตรียมได้ให้เข้ากันแล้วดูดใส่ในคิวเวตต์ที่แช่เย็น ให้กระแสไฟฟ้าด้วยเครื่อง electroporator (Eppendorf, เยอรมัน) โดยใช้ electrical pulse ของ capacitance 25 ไมโครฟารัด 2.5 กิโลโวลต์ และ resistance 200 โอห์ม ระยะเวลาที่ใช้อยู่ในช่วง 4–5 มิลลิวินาที หลังการให้กระแสไฟฟ้านำหลอดแช่น้ำแข็งทันที เดิม LB 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2–3 ชั่วโมง นำเซลล์เกลี่ยบนจานอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินและไรแฟมพิซินที่มีความเข้มข้นอย่างละ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำโคโลนีที่เจริญเติบโตได้ไปตรวจสอบผลด้วยวิธีพีซีอาร์ และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI และศึกษาองค์ประกอบของยีนเพื่อตรวจสอบพลาสมิดสายผสมที่ได้

2.2.5 การถ่ายยีนเข้าอะราบิดอปซิสด้วยวิธี floral dip

เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิดของยีน *pms* ในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินและไรแฟมพิซินที่มีความเข้มข้นอย่างละ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืด จนมีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 2 ละลายตะกอนเซลล์ในสารละลายซูโครสความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสม Tween-20 เข้มข้น 0.03 เปอร์เซ็นต์ นำดอกอะราบิดอปซิสมาแช่ในสารละลายนาน 10 วินาที แล้วเก็บไว้ในที่มืด 16–24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 2,000 ลักซ์ เป็น

เวลา 16 ชั่วโมง จนกระทั่งติดเมล็ด เก็บเมล็ดอะราบิโดปซิสแปลงพันธุ์ที่ได้ มาฟอกฆ่าเชื้อดังที่กล่าวมาข้างต้น และเพาะบนอาหาร 1/2MS ที่ผสมสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน แล้วนำต้นที่เจริญบนอาหาร เพาะเมล็ดในกระบะพีทมอสเพื่อตรวจสอบผลการถ่ายยีน

3. การคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน

3.1 การคัดเลือกเมล็ดอะราบิโดปซิสที่ได้รับการถ่ายยีน

นำเมล็ดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 1 กรัม ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดอะราบิโดปซิส (*Arabidopsis thaliana*) สายพันธุ์ Columbia ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอ-รอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และล้างด้วยน้ำ deionize (dH_2O) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดวางบนอาหาร 1/2MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตรเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 15 วัน และนำต้นอะราบิโดปซิสแปลงพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ลงปลูกบนพีทมอส

3.2 .การคัดเลือกกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน

นำกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงเพาะบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MSH ที่เติมไฮโกรไมซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และซีโฟแทกซิม 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บไว้ที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของเมล็ดที่ได้รับการถ่ายยีน หากพบการตายไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ให้ย้ายลงอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MSH ที่เติมไฮโกรไมซินในความเข้มข้นที่มากขึ้น

4. การตรวจสอบวิเคราะห์ผลการถ่ายยีนและการแสดงออกของยีน

4.1 การสกัดแยกจีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA, gDNA)

ใช้วิธีการสกัดแบบ miniprep ซึ่งดัดแปลงมาจาก Dellaporta *et al.* (1983) วิธีการสกัด ทำโดยนำใบอ่อนของกล้วยไม้หนักประมาณ 300 มิลลิกรัม บดกับไนโตรเจนเหลวในโกรงจนละเอียด จากนั้นตัดใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จนได้ระดับที่ขีด 0.5 มิลลิลิตร เติม extraction buffer (100mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM Na₂EDTA pH 8.0, 500mM NaCl, 2% SDS, 10mM β -mercaptoethanol) 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน วางลงบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงใน microcentrifuge ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวส่วนบนใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ใหม่ และเติมเอนไซม์ RNase A (10 mg/mL) 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที เติม ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล เอทานอล (25:24:1) 700 ไมโครลิตร พลิกขึ้นลงเบาๆ 2 – 3 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวใสชั้นบนใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม คลอโรฟอร์ม 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวใสชั้นบนใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 3M NaOAc (pH 5.2) 0.1 เท่าของปริมาตรทั้งหมด และ isopropanol 0.7 เท่าของปริมาตรทั้งหมด เขย่าเบาๆ ให้สารละลายผสมกัน แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้ตะกอนติดที่ก้นหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ให้เทสารละลายทิ้งไป แล้วจึงเติมเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ทิ้ง แล้วนำไปปั่นสั้น 10 วินาที ดูดเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือทิ้ง ระวังอย่าให้ตะกอนหลุดออกไป เปิดฝาทิ้งไว้ ให้เอทานอล ระเหยจนตะกอนดีเอ็นเอเกือบแห้ง แล้วจึงเติม TE buffer ลงไป 20 ไมโครลิตร เก็บตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

4.2 การสกัดแยกอาร์เอ็นเอด้วย Trizol reagent (Gibco BRL, สหรัฐอเมริกา)

บดตัวอย่างพืชในไนโตรเจนเหลว ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติม Trizol reagent (Gibco BRL, สหรัฐอเมริกา) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที เติมคลอโรฟอร์ม 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วย

ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 1 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทำให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น (DEPC treated-water)

4.3 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรก (First strand cDNA synthesis)

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรก (first strand synthesis) โดยใช้ Ready-To-Go You-Prime first strand beads (GE Healthcare Biosciences, สหรัฐอเมริกา) จากอาร์เอ็นเอที่แยกจากอะราบิดอปซิส ในข้อ 4.2 นำไปอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำแข็ง 2 นาที ดูดอาร์เอ็นเอ 29 ไมโครลิตร ผสมร่วมกับ ไพรมเมอร์ 5.8S rRNA(R) Pin_RT(R) และ HPTII(R) จำนวน 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ใส่ลงในหลอดสำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรก บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

4.4 การตรวจสอบยีนที่ถ่ายเข้าอะราบิดอปซิสและกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

4.4.1 การตรวจสอบยีนที่ถ่ายเข้ากล้วยไม้

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 4.1 จำนวน 0.1 ไมโครกรัม มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรมเมอร์ของยีนที่สนใจชนิดต่าง ๆ ในข้อ 2.3 ใช้ไพรมเมอร์ความเข้มข้นชนิดละ 0.1 ไมโครโมล สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 2 ยูนิตต่อปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ใช้สารละลาย $MgCl_2$ และบัฟเฟอร์ตามที่บริษัท แนะนำ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง DNA thermal cycle 9600 ด้วยระดับอุณหภูมิดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 4 นาที, 62 องศาเซลเซียส 60 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที จำนวน 1 รอบ 94 องศาเซลเซียส 60 วินาที, 62 องศาเซลเซียส 60 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที จำนวน 25 รอบ และ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 62 องศาเซลเซียส 60 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 4 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลที่ได้โดยวิธีอิเล็กโทรฟอเรซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส (1 Kb DNA ladder)

4.4.2 การตรวจสอบยีนที่ถ่ายเข้าอะราบิดอปซิสด้วยวิธีพีซีอาร์

สกัดดีเอ็นเอจากใบอะราบิโดปซิสหนัก 100 มิลลิกรัม ด้วยวิธีแบบ miniprep ซึ่งดัดแปลงมาจาก Dellaporta *et al.* (1983) นำดีเอ็นเอมาตรวจสอบยีน *pns* ที่ถ่ายเข้าพืช ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ใช้คู่ไพรเมอร์ระหว่างโปรโมเตอร์กับยีน คือ 187 CaMV35S และ 367 PNS 5'Pin เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ระดับอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 60 วินาที 55 องศาเซลเซียส 60 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที จำนวน 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลที่ได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส (1 Kb DNA ladder)

5. การตรวจสอบองค์ประกอบของสารหอมระเหยด้วยวิธี Gas Chromatography – Mass Spectroscopy (GC–MS)

5.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำช่อดอกอะราบิโดปซิสจำนวน 70 ช่อดอก ขนาดยาว 10 เซนติเมตรจากปลายยอด มาวิเคราะห์ชนิด และปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของสารหอมระเหย โดยวิธี SPME (Solid Phase Micro Extraction) ดูดซับสารหอมระเหยด้วยโพรบแท่งคาร์บอนประเภทไฟเบอร์ที่เคลือบด้วย PDMS (polydimethylsiloxane) ขนาด 100 ไมครอน ในระบบปิด ของช่วงเวลาที่พืชส่งกลิ่นหอมระเหยสูงสุดของวัน (ช่วงเช้าโดยประมาณ 13.00–16.00 น.) กำหนดให้โพรบดูดซับกลิ่นนาน 3 ชั่วโมง

5.2 การวิเคราะห์สารหอมระเหยด้วยวิธี GC–MS

นำโพรบที่ผ่านการดูดซับสารมาวิเคราะห์องค์ประกอบของสาร GC–MS รุ่น ITS40™ (Finnigan MAT, สหรัฐอเมริกา) ทำให้เกิดอิเล็กตรอนพลังงานสูง (70 eV) โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวพา ภายในมี capillary column คือ DB–5 (ขนาดความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 250 ไมครอน เคลือบสารหนา 0.25 ไมครอน) ใช้ injector temperature เท่ากับ 220 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ detector temperature เท่ากับ 240 องศาเซลเซียส อัตราการฉีดสารเข้า (split ratio) 1:7 ของใบมะกรูด และ 1:40 ของผลอ่อนมะกรูด อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นอุณหภูมิจะค่อยๆ เพิ่มขึ้น ในอัตรา 4 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 240 องศาเซลเซียส

5.3 การวิเคราะห์ผล

นำข้อมูลจากการวัดสารหอมระเหยที่ได้มาวิเคราะห์ชนิดของสารด้วยโปรแกรม Wsearch32 (<http://www.wsearch.com.au>) จากกราฟผลการวิเคราะห์ GC-MS ที่ได้นำมาคำนวณค่า Retention index (RI) จากค่า Retention time (TR) ของสารหอมระเหยที่ได้จากกราฟ โดยเปรียบเทียบกับค่า TR_Z และ TR_{Z+1} จากกราฟมาตรฐานของไฮโดรคาร์บอนที่มีค่าใกล้เคียงกับสารหอมระเหยที่ได้ ค่า RI มีสูตรในการคำนวณ ดังนี้

$$RI = \left\{ \frac{TR - TR_Z}{TR_{Z+1} - TR_Z} \right\} \times 100 + 100 (Z)$$

TR = ค่า Retention time ของสารหอมระเหยที่ต้องการทราบชนิด

TR_Z = ค่า Retention time ของไฮโดรคาร์บอนมาตรฐานค่าน้อย

TR_{Z+1} = ค่า Retention time ของไฮโดรคาร์บอนมาตรฐานค่ามาก

Z = จำนวนไฮโดรคาร์บอนมาตรฐาน

นำค่า RI ที่ได้จากการคำนวณมาใช้หาชนิดของสารหอมระเหย โดยการเปรียบเทียบรูปแบบองค์ประกอบของสารที่พบแต่ละ peak กับฐานข้อมูลของ Adams (2001) ที่แสดงข้อมูลการวิเคราะห์ชนิดของสารหอมระเหยด้วยวิธี GC-MS จากนั้นนำค่าความสูงของพีคที่ได้จากการวิเคราะห์มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์สารแต่ละชนิดที่เกิดขึ้น

5.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี relative real-time polymerase chain reaction (relative RT-PCR)

การศึกษาการแสดงออกของยีนระดับอาร์เอ็นเอด้วยวิธี relative RT-PCR ด้วยชุดตรวจสอบ KAPA SYBR[®] FAST qPCR Kit (KAPABiosystems, สหรัฐอเมริกา) โดยเตรียมส่วนประกอบของการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ส่วนประกอบของพีซีอาร์คือ ดีเอ็นเอตั้งต้นที่ได้จากข้อ 4.3 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, Taq Polymerase 0.5 ไมโครลิตร, 2X SYBR Green mix 12.5 ไมโครลิตร, 10 μ M Forward primer 0.5 ไมโครลิตร, 10 μ M Reverse Primer 0.5 ไมโครลิตร โดยมีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง Mastercycler[®] ep realplex

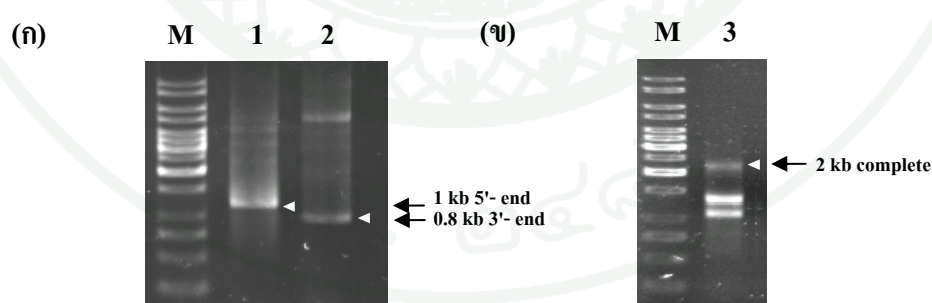
(Eppendorf, สหรัฐอเมริกา) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตรวจสอบผลโดยดูการวัดปริมาณฟลูออเรสเซนซ์ทั้งหมดเปรียบเทียบกับตัวอย่าง cDNA โดยใช้สารเรืองแสงชนิด SYBR Green (KAPA biosystems, สหรัฐอเมริกา)



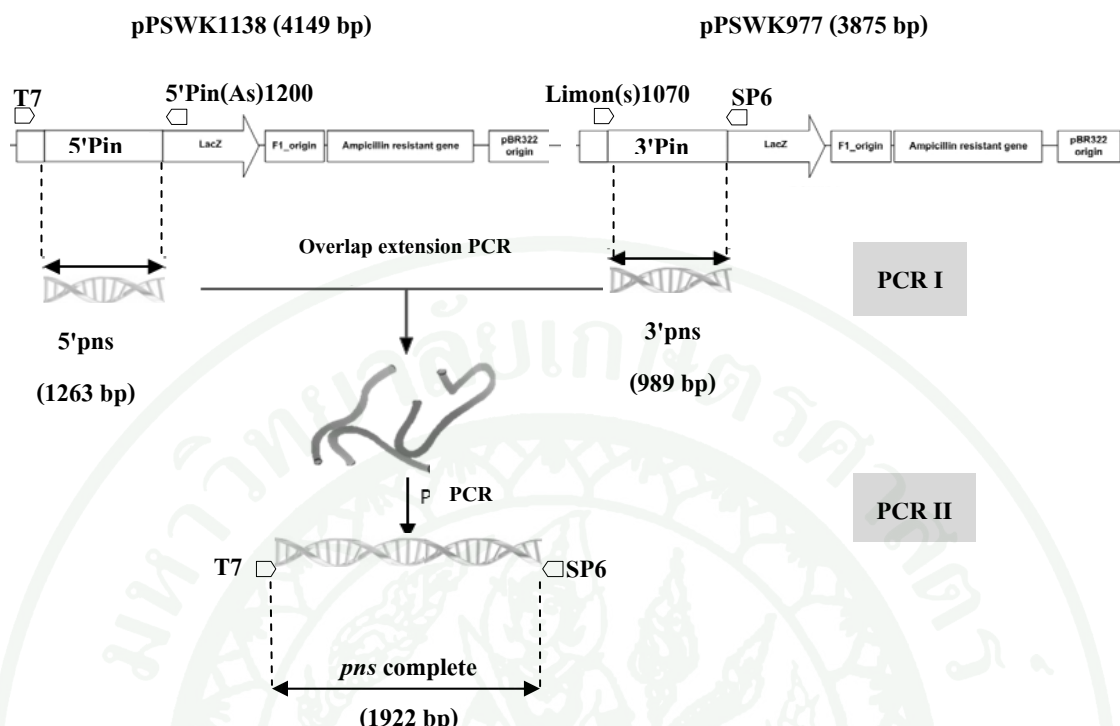
ผลและวิจารณ์

1. การตัดต่อยีน *pns* สมบูรณ์เข้าสู่เวกเตอร์ pGEM®-T Easy

การตัดต่อยีน *pns* ที่ควบคุมการสร้างสารกลั่นของมะกรูดให้ได้ครบสมบูรณ์ ได้รับความอนุเคราะห์โคลนยีน *pns* ด้านปลาย 3' (pPSWK 1138) และ 5' (pPSWK 977) จากนางสาวกิตติยา แสงสว่าง ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (กิตติยา, 2553) เข้ากับพลาสมิดโคลนยีน pGEM®-T Easy (Promega co., สหรัฐอเมริกา) โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์จากพลาสมิด pPSWK 1138 ด้วยไพรเมอร์ T7 (5'-ACG TTG TAA AAC GAC GG-3') และ 5'Pin(As)1200 (5'-AGT AGG GTC CCA TCT CTC AA-3') และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากพลาสมิด pPSWK 977 ด้วยไพรเมอร์ Limon(S)1070 (5'-GAT GAY ATT TAC GAT GTC TAY GG-3') และ SP6 (5'-GAT AAG AAT TTC ACA CA-3') ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1 กิโลเบส และ 0.8 กิโลเบส ตามลำดับ ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวัง (ภาพที่ 5) ทำการเชื่อมดีเอ็นเอทั้งสองด้วยวิธีเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (ภาพที่ 6) โดยที่ผลผลิตพีซีอาร์จากพลาสมิด pPSWK1138 และพลาสมิด pPSWK977 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นเบสคู่สมกันจำนวน 78 คู่เบส (5'-GAT GAT GTT TAT GAT GTC TAC GGG ACT TTG GAT GAA CTT GAG ATA TTC ACT GAT GCA GTT GAG AGA TGG GAC GCT ACT-3') และ ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ T7 และ SP6 เพื่อสังเคราะห์ยีน *pns* สมบูรณ์ ด้วยโปรแกรมเดียวกับข้างต้น พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2 กิโลเบส (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 (ก) ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *pns* (1) ยีน *pns* ปลาย 5' ที่สังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ T7 และ 5'Pin(As)1200 จาก pPSWK1138 และ (2) ยีน *pns* ปลาย 3' ที่ได้จาก pPSWK977 ด้วยไพรเมอร์ Limon(s)1070 และ SP6 และ (ข) ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *pns* สมบูรณ์ ด้วยไพรเมอร์ SP6 และ T7 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส (1 Kb DNA ladder)

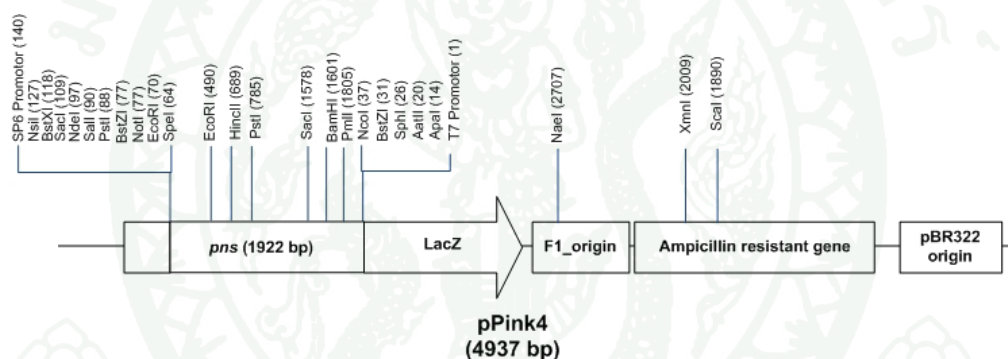


ภาพที่ 6 แผนภาพการสร้างยีน *pns* สมบูรณ์ด้วยวิธี Overlap Extension PCR โดยการสังเคราะห์พีซีอาร์ครั้งที่ 1 ได้ยีน *pns* ด้าน 5' (1263 คู่เบส) จากพลาสมิด pPSWK1138 ด้วยไพรเมอร์ T7 และ 5'Pin(As)1200 และได้ยีน *pns* ด้าน 3' (989 คู่เบส) จากพลาสมิด pPSWK977 ด้วยไพรเมอร์ Limon(s)1070 และ SP6 และการสังเคราะห์พีซีอาร์ครั้งที่ 2 ได้ยีน *pns* สมบูรณ์ (1922 คู่เบส) ด้วยไพรเมอร์ T7 และ SP6

จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Spe*I เชื่อมต่อดีเอ็นเอกับพลาสมิด pGEM[®]-T Easy (religated pGEM[®]-T Easy Vector) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน แล้วนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ด้วยวิธี heat shock transformation หลังการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสม พบเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือก LA ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งหมด 8 โคโลนี นำโคโลนีมาตรวจสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอที่โคลนได้ ด้วยวิธีพีซีอาร์ใช้ไพรเมอร์ T7 และ SP6 เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าโคลนที่ 4 (pPink4) มีขนาดแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 1.9 กิโลเบส (ภาพที่ 7) ซึ่งตรงกับที่คาดหวัง จึงแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์และตรวจสอบการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *pns* กับพืชชนิดอื่น

Accession #	Plant species	Gene	nt size	% nucleotide Identities
				<i>Citrus hystrix</i>
	<i>Citrus hystrix</i>	<i>Beta-pinene synthase</i>	887	100
HQ636424	<i>Citrus hystrix</i>	<i>pinene synthase</i>	888	99
AF514288	<i>Citrus limon</i>	<i>Beta-pinene synthase</i>	888	96
AB266585	<i>Citrus jambhiri</i>	<i>Beta-pinene synthase</i>	889	96
AB110641	<i>Citrus unshiu</i>	<i>Beta-pinene synthase</i>	889	96
AB110640	<i>Citrus unshiu</i>	<i>Gamma-terpinene synthase</i>	889	96



ภาพที่ 8 โครงสร้างพลาสมิดสายผสม pPink4 ในเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy

3. การตัดต่อยีน *pns* เข้าสู่เวกเตอร์พืช pCAMBIA 1305.1

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดสายผสม pPink4 ที่ได้จากข้อ 2. ซึ่งมีขนาดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 1922 คู่เบส มาตรวจสอบลำดับการแปลรหัส ด้วยโปรแกรม BLAST2SEQUENCES จากฐานข้อมูล NCBI พบว่ายีนที่ได้มีลำดับการแปลรหัสและการจัดเรียงลำดับของกรดอะมิโนได้ถูกต้อง ดังภาพที่ 9

```

> AF514288_1(-)-beta-pinene synthase [Citrus limon]
Score = 691 bits (1782), Expect = 0.0
Identities = 351/374 (93%), Positives = 363/374 (97%), Gaps = 0/374 (0%)
Frame = +3

Query 12  LLSSIPAACNFTRL LSLPLSSKVN VFPPITRVQYHVAASTTPIKPVDQTIIRRSADYGPT 191
Sbjct 5    LLSSIPAACNFTRL LSLPLSSKVN VFPPITRVQYHVAASTTPIKPVDQTIIRRSADYGPT 64

Query 192 IWSFDYIQSLDSKYKGESYARQLEKLKEQVSAMLQQDDKVVLDLPLHQLLELIDNLHRLGV 371
Sbjct 65 IWSFDYIQSLDSKYKGESYARQLEKLKEQVSAMLQQD+KVVLDL LHQLLELIDNLHRLGV 124

Query 372 SYHFEDVKTLDRIHNKNTNKS LYATALKFRILRQYGYNTPEETFSRFMDEKGSFKSS 551
Sbjct 125 SYHFEDVKTLDRIHNKNTNKS LYATALKFRILRQYGYNTPEETFSRFMDEKGSFKSS 184

Query 552 SHGDDCKGMLalyleaayllveeeSSIFRDAIRFTTAYLKEWVIKHDNNKHDEHLCTLVK 731
Sbjct 185 SH DDCKGMLALYEAAYLLVEEESSIFRDA FTTAYLKEWVI+HDNNKHDEHLCTLV 244

Query 732 HALELPLHWRMRLEARWFIDVYQSGPDMNPILLEFAKLDYNIVQAIHQEDLKYVSRWWK 911
Sbjct 245 HALELPLHWRMRLEARWFIDVY++GP MNPILLE AK+D+NIVQA+HQE+LKY SRWWK 304

Query 912 KTGLGENLN FVRDRIVENFMWTVGEKFEPQFGYFRMSTMVIALITAVDDVYDVYGTLE 1091
Sbjct 305 KTGLGENLN FVRDRIVENFMWTVGEKFEPQFGYFRMSTMV ALITAVDDVYDVYGTLE 364

Query 1092 LEIFTDAIERWDAT 1133
Sbjct 365 LEIFTDAERWDAT 378

```

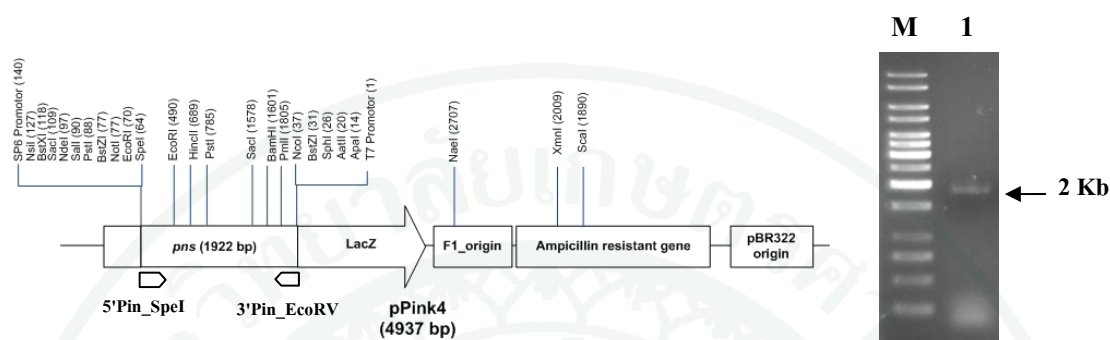
ภาพที่ 9 การตรวจสอบลำดับการแปลรหัสของกรดอะมิโนของยีน *pns* ในพลาสมิดสายผสม pPink4 ด้วยโปรแกรม BLAST2SEQUENCES

4. การสังเคราะห์และการตัดต่อยีน *pns*

ออกแบบไพรเมอร์เพื่อการตัดต่อยีน *pns* ในพลาสมิดสายผสม pPink4 เข้าสู่พลาสมิดเพื่อการแสดงออกในพืช โดยออกแบบไพรเมอร์ด้าน 5' ด้วยการเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์อะดีโนซีนและตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI* (5'-ACTATG-3') ทำให้ได้ไพรเมอร์ ชื่อ 5'Pin_*SpeI* (5'-GTA GAT CTG ACT AGT ATG GCT CTT AAT CTG-3') และไพรเมอร์ด้าน 3' ด้วยการเพิ่มตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV* (5'-GATATC-3') ทำให้ได้ไพรเมอร์ ชื่อ 3'Pin_*EcoRV* (5'-TCA GAT ATC TTA AGC AAT GGG ATT-3') เพื่อใช้ในการสังเคราะห์และตัดต่อชิ้นดีเอ็นเอของยีน *pns* เข้าสู่เวกเตอร์พืช pCAMBIA 1305.1

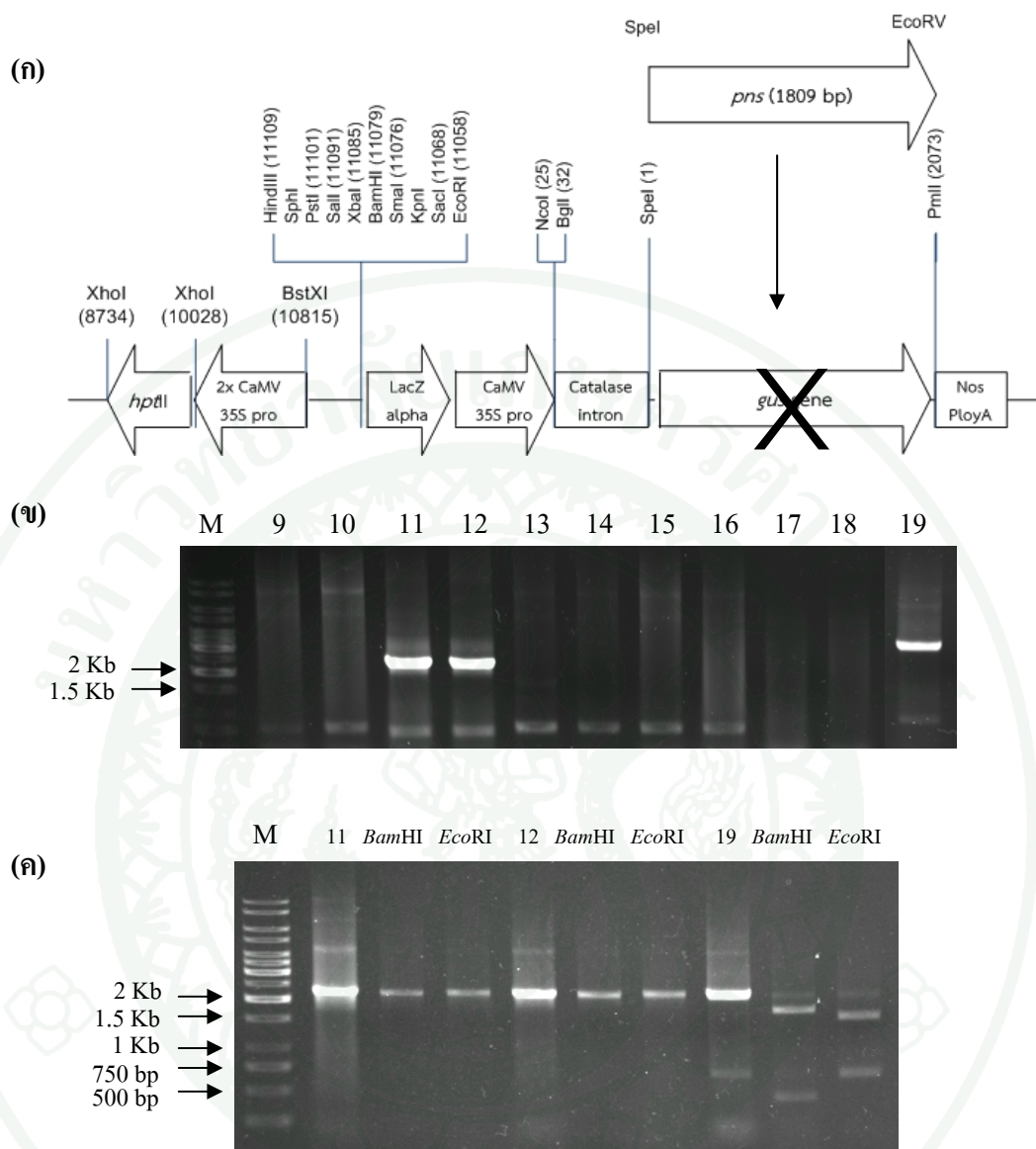
เพิ่มปริมาณยีน *pns* ของพลาสมิดสายผสม pPink4 ด้วยไพรเมอร์ 5'Pin_*SpeI* และ 3'Pin_*EcoRV* โดยวิธีพีซีอาร์ ด้วยโปรแกรมที่ 1 ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมที่ 2 ที่ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที

จำนวน 30 รอบ และโปรแกรมที่ 3 ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 0.8% พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2 กิโลเบส ซึ่งผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวัง (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *pns* โดยที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส (1 Kb DNA ladder) และ 1 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ของ pPink4 ด้วยไพรเมอร์ 5'Pin_SpeI และ 3'Pin_EcoRV

การตัดดีเอ็นเอของยีน *pns* ขนาด 2 กิโลเบส ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI* (5'-ACTATG-3') และ *EcoRV* (5'-GATATC-3') แล้วเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pCambia 1305.1 ขนาด 11.8 กิโลเบส ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *SpeI* (5'-ACTATG-3') และ *PmlI* (5'-CACGTG-3') (ตัดยีน *gus* ออก) (ภาพที่ 10) นำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue หลังการคัดเลือก พบโคโลนีทั้งหมด 20 โคโลนี คัดเลือกมา 11 โคโลนี เพื่อตรวจสอบความถูกต้องด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ 35S_pro (5'-GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG-3') และ NOS_ter (5'-GAG GAT TCA ATC TTA AGA AAC TT-3') นำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2 กิโลเบส ซึ่งผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวัง คือพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2 กิโลเบส ในโคโลนีที่ 11 12 และ 19 (ภาพที่ 11) นำโคโลนีที่ 11 12 และ 19 มาตรวจสอบความถูกต้องของขนาดและทิศทางยีน *pns* ด้วย การทำ Restriction Mapping โดยคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ได้แก่ *BamHI* (5'-GGATCC-3') และ *EcoRI* (5'-GAATTC-3') ตัดพลาสมิดสายผสมโคโลนี 11 12 และ 19 พบว่าโคโลนีที่ 19 เท่านั้นที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดตามที่คาดหวังคือ 0.4/1.6 กิโลเบส และ 0.5/1.5 กิโลเบส ตามลำดับ (ภาพที่ 10) และทำการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท MacroGen (MacroGen, เกาหลี) ด้วยไพรเมอร์ NOS_ter



ภาพที่ 11 แผนภาพการตัดต่อยีน *pns* สมบูรณ์เข้าสู่ pCambia 1305.1 (ก) การตรวจสอบยีน *pns* ด้วยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ 35S_pro และ NOS_ter (ข) และ การทำ Restriction Mapping ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI โดยที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส (1 Kb DNA ladder) (ค)

หลังจากนั้นนำนิวคลีโอไทด์ที่ได้ มาตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์อีกครั้ง ด้วยการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *pns* ของ pPWSK997 ด้วยโปรแกรม ClustalW (www.ebi.ac.uk) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากโคลนที่ 19 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอ

ไทรด์ของ pPWSK997 เป็นอย่างมาก อีกทั้งยังพบบริเวณของไพรเมอร์ 3'Pin_EcoRV และ 5'Pin(As)1200 (ภาพที่ 12) จึงตั้งชื่อโคลนที่ 19 คือ pPink19

```

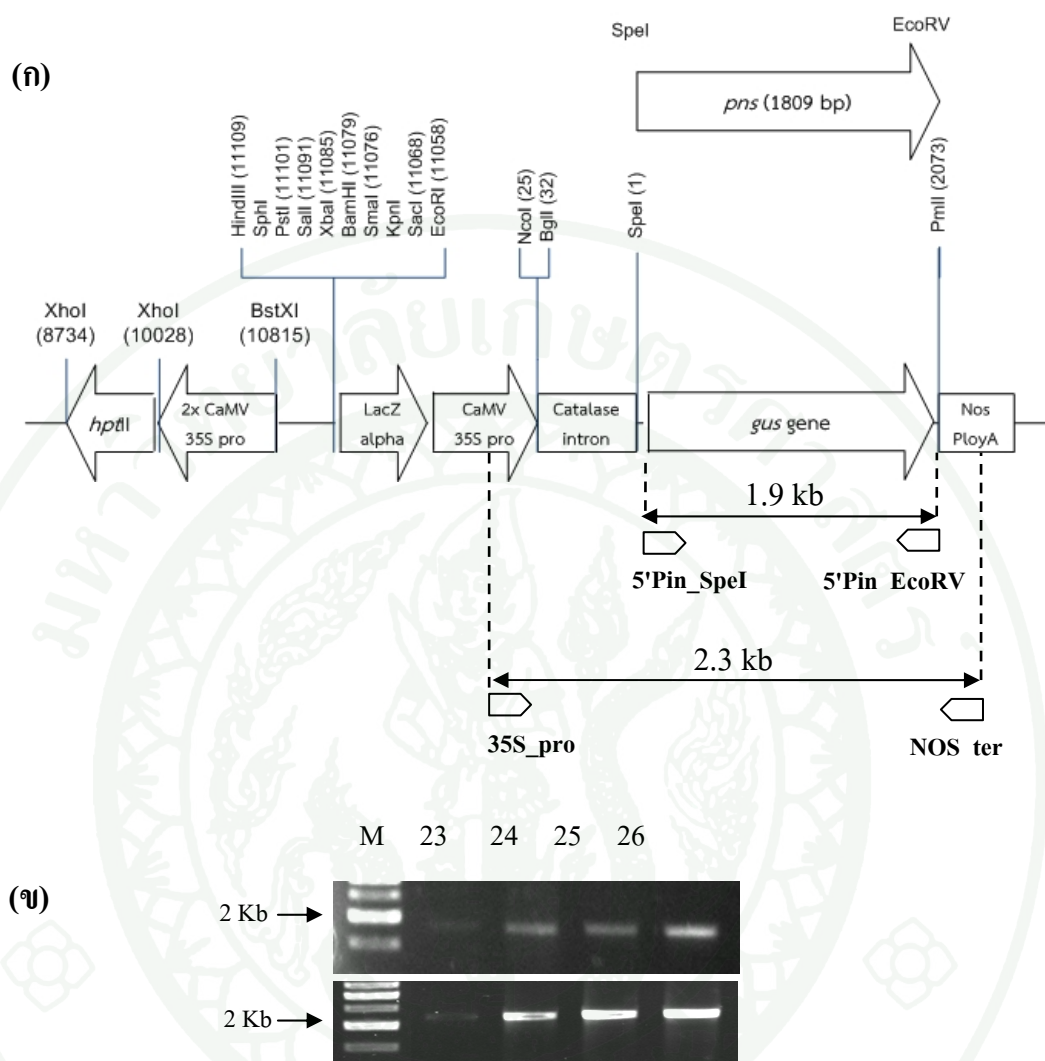
pinene_pPink19      TTGCCTTAATAACAGCAGTCGATGATGTTTATGATGTCTACGGGACTTTGGATGAACCTTG 180
pinene_pPSWK977     -----GATGATATTTACGATGTCTATGGGACTTTGGATGAACCTTG 40
                        *****
                        5'Pin(As)1200
pinene_pPink19      AGATATTTCACTGATGCAATTGAGAGATGGGACGCTACTGCAGTAGAGCAACTTCCACACT 240
pinene_pPSWK977     AGATATTTCACTGATGCAATTGAGAGATGGGACGCTACTGCAGTAGAGCAACTTCCACACT 100
                        *****
pinene_pPink19      ATATGAAGTTGTGCTTTTCATGCTCTCCGTAATTCCATAAAATGAAATGACTTTTGATGCTC 300
pinene_pPSWK977     ATATGAAGTTGTGCTTTTCATGCTCTCCGTAATTCCATAAAATGAAATGACTTTTGATGCTC 160
                        *****
pinene_pPink19      TTAGGGATCAAGGAGTTGACATTGTCAATTTCTTATCTTACGAAAGCGTGGGCAGATATAT 360
pinene_pPSWK977     TTAGGGATCAAGGAGTTGACATTGTCAATTTCTTATCTTACGAAAGCGTGGGCAGATATAT 220
                        *****
pinene_pPink19      GTAAAGCATATTTAGTAGAGGCAAAGTGGTACAACAGCGGCTACATACCGCCTCTCCAAG 420
pinene_pPSWK977     GTAAAGCATATTTAGTAGAGGCAAAGTGGTACAACAGCGGCTACATACCGCCTCTCCAAG 280
                        *****
pinene_pPink19      AATACATGGAAAATGCTTGGATTTCATAGGAGCAACTGTAATTCTAGTCCATGCAAACA 480
pinene_pPSWK977     AATACATGGAAAATGCTTGGATTTCATAGGAGCAACTGTAATTCTAGTCCATGCAAACA 340
                        *****
pinene_pPink19      CTTTACAGCAAATCCAATAACAAAGGAGGGCTTGGAAATTCGTGAAAGATTATCCCAATA 540
pinene_pPSWK977     CTTTACAGCAAATCCAATAACAAAGGAGGGCTTGGAAATTCGTGAAAGATTATCCCAATA 400
                        *****
pinene_pPink19      TAATTCGTTGGTCATCGGTGATTCTACGATTTGCAGACGATTTGGGAACATCATCGGATG 600
pinene_pPSWK977     TAATTCGTTGGTCATCGGTGATTCTACGATTTGCAGACGATTTGGGAACATCATCGGATG 460
                        *****
pinene_pPink19      AGCTGAAGAGGGGAGATGTTCAATAATCAATTCAATGTTACATGCATGAAGCTGGAGTTT 660
pinene_pPSWK977     AGCTGAAGAGGGGAGATGTTCAATAATCAATTCAATGTTACATGCATGAAGCTGGAGTTT 520
                        *****
pinene_pPink19      CAGAGGGAGAGGCTCGTGAACATATAAATGATTTGATTGCTCAGACATGGATGAAGATGA 720
pinene_pPSWK977     CAGAGGGAGAGGCTCGTGAACATATAAATGATTTGATTGCTCAGACATGGATGAAGATGA 580
                        *****
pinene_pPink19      ACCGTGATCGATTTGGAAACCCACATTTTCGTTTCCGACGTTTTTGTGGGATTGCAATGA 780
pinene_pPSWK977     ACCGTGATCGATTTGGAAACCCACATTTTCGTTTCCGACGTTTTTGTGGGATTGCAATGA 640
                        *****
pinene_pPink19      ATTTGGCGAGGATGTCTCAATGCATGTACCAATTTGGAGATGGTCACGGATGCGGTGCTC 840
pinene_pPSWK977     ATTTGGCGAGGATGTCTCAATGCATGTACCAATTTGGAGATGGTCACGGATGCGGTGCTC 700
                        *****
                        3'Pin_EcoRV
pinene_pPink19      AAGAAATTACTAAAGATCGTGTGTTTGGCCCTTATTTTAAATCCCATTGCTTAAG----A 895
pinene_pPSWK977     AAGAAATTACTAAAGATCGTGTGTTTGGCCCTTATTTTAAATCCCATTGCTTAATTAATTA 760
                        *****

```

ภาพที่ 12 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pPink19 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pPSWK977

5. การถ่ายพลาสมิด pPink19 เข้าสู่โกรแบคทีเรีย

ถ่ายพลาสมิดสายผสม pPink19 ที่ประกอบด้วยยีน *pns* ต่อเข้ากับส่วนของโปรโมเตอร์ที่สามารถแสดงออกได้ในพืช คือโปรโมเตอร์ 35S และหยุดการสังเคราะห์ด้วยเทอร์มิเนเตอร์ *nos* เข้าสู่โกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) สายพันธุ์ EHA105 ด้วยวิธี electroporation คัดเลือกแบคทีเรียที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมบนอาหารคัดเลือกสูตร LA ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยโนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และไรแฟมพิซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบเชื้อแบคทีเรียโกรแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกทั้งหมด 4 โคโลนี ตรวจสอบโคโลนีที่ได้ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยคู่ไพรเมอร์ 2 คู่ คู่ที่หนึ่ง คือ 5'Pin_SpeI (5'-GTA GAT CTG ACT AGT ATG GCT CTT AAT CTG-3') และ 3'Pin_EcoRV (5'-TCA GAT ATC TTA AGC AAT GGG ATT-3') และคู่ที่สอง คือ 35S_pro (5'-GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG-3') และ NOS_ter (5'-GAG GAT TCA ATC TTA AGA AAC TT-3') ตามลำดับ ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณและตรวจสอบความถูกต้องของยีน *pns* ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.9 กิโลเบส (ภาพที่ 13) ได้ตั้งชื่อพลาสมิดที่ได้ว่า pPink23, 24, 25 และ 26 ตามลำดับ นำเอาโกรแบคทีเรียที่มียีน *pns* และยีนคัดเลือกไฮโกรไมซินที่ตรวจสอบความถูกต้องคือพลาสมิดสายผสม pPink26 (pCaMV35S:PNS:Nos) (ภาพที่ 12) ในลักษณะ Binary vector ไปใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่ราบิโดปซิส และกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงต่อไป



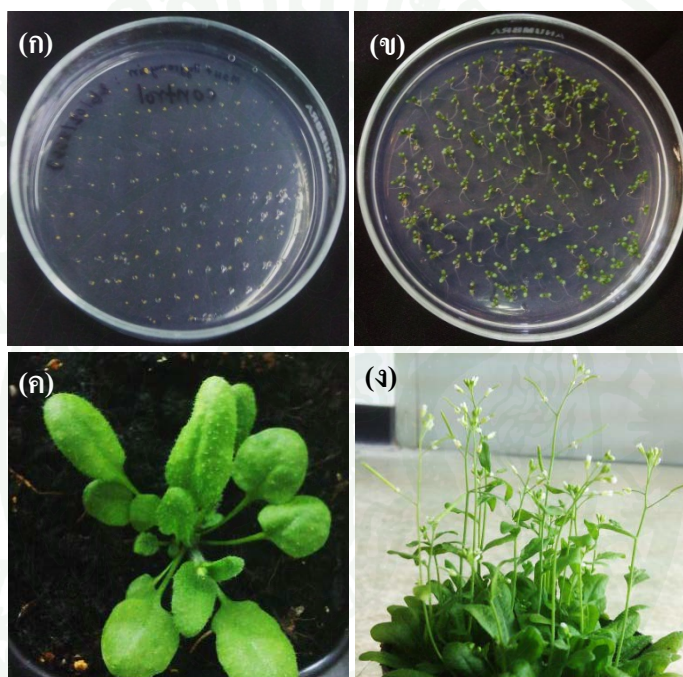
ภาพที่ 13 แผนภาพการเข้าจับของไพรเมอร์ในพลาสมิด pPink26 (ก) และผลผลิตโคลนนิ่งพีซีอาร์ของ pPink23 – 26 ด้วยไพรเมอร์ 35S_pro และ NOS_ter และคู่ด้วยไพรเมอร์ 5'Pin_SpeI และ 3'Pin_EcoRV (ข)

6. การถ่ายยีนโครงสร้าง pPink26 เข้าสู่อะราบิดอปซิส

6.1 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออะราบิดอปซิสสายพันธุ์ Columbia

เพาะเมล็ดอะราบิดอปซิสบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง 1/2 MS (Murashige and Skoog, 1962) พบว่าหลังเพาะเมล็ดอะราบิดอปซิสเป็นเวลา 3 วัน พบการเกิดรากยาวเฉลี่ย 0.5

เซนติเมตร และเริ่มแตกใบเลี้ยง ลำต้นสูงเฉลี่ย 0.5 เซนติเมตร ใบลักษณะค่อนข้างกลม ขนาดเฉลี่ย 0.2 เซนติเมตร หลังเพาะเมล็ดเป็นเวลา 7 วัน พบว่าขนาดความยาวของรากและลำต้น เพิ่มขึ้นอีกทั้งขนาดของใบยังเพิ่มขึ้นด้วย และเมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน ย้ายต้นอะราบิโดปซิสลงปลูกบนวัสดุปลูกพีทมอส เมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน พบว่าเกิดการแตกกิ่งก้านของใบ ลักษณะใบมีลักษณะกลมรี สีเขียวเข้ม เริ่มมีช่อดอก และเมื่อเวลาผ่านไป 45–50 วัน พบลำต้นสูงประมาณ 20 เซนติเมตร และมีดอกกระชาก้างบานและบาน และมีเริ่มติดฝักบริเวณช่วงล่างของลำต้น (ภาพที่ 14)



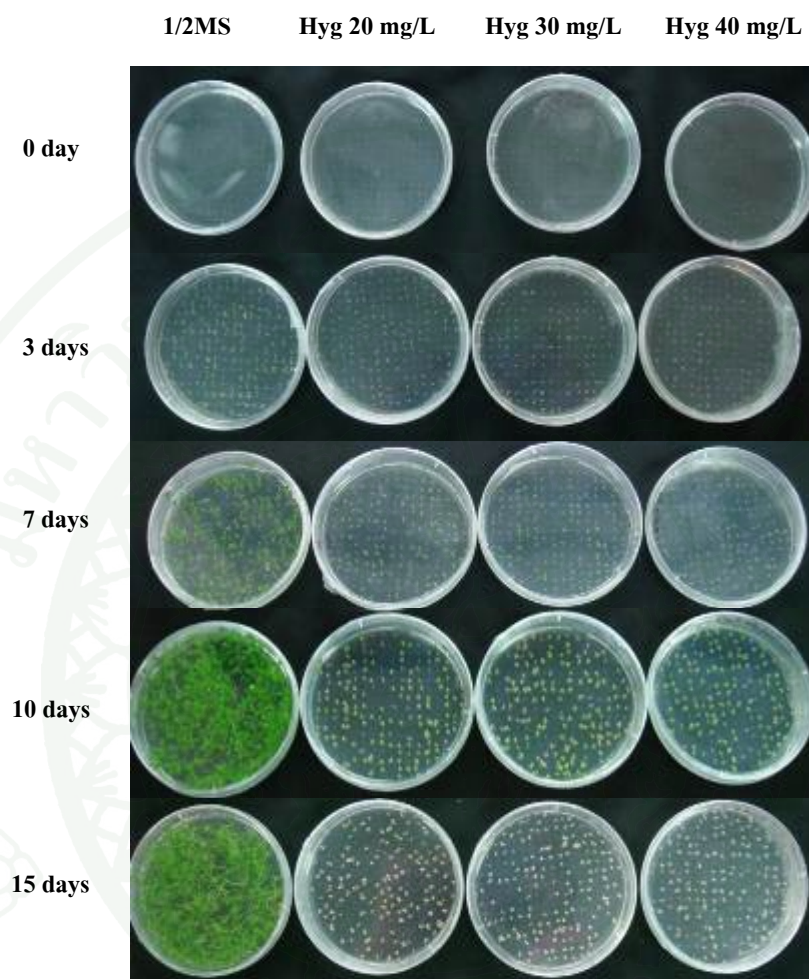
ภาพที่ 14 การเพาะเลี้ยงอะราบิโดปซิสเพื่อการถ่ายยีน ระยะการเจริญเติบโตมีดังนี้ คือ อะราบิโดปซิสบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง 1/2 MS เป็นเวลา 3 วัน (ก) และ 7 วัน (ข) ปลูกอะราบิโดปซิสในพีทมอส เป็นเวลา 30 วัน (ค) และ 45 วัน (ง)

7. ระดับความเข้มข้นสารปฏิชีวนะไฮโกลมัยซินที่มีผลต่ออะราบิโดปซิส

สารปฏิชีวนะไฮโกลมัยซินทุกความเข้มข้น คือ 20, 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อการเจริญเติบโตของอะราบิโดปซิสสายพันธุ์ Columbia โดยพบว่าอะราบิโดปซิสชะลอการงอกและลดอัตราการเจริญเติบโตนับตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเมล็ดบนอาหาร 1/2MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกลมัยซิน และเมื่อปลูกเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ต้นอะราบิโดปซิสบนอาหารที่มีสาร

ปฏิชีวนะไฮโกรไมซินทุกความเข้มข้นตายไปทั้งหมด อย่างไรก็ตามอัตราการอยู่รอดของอะราบิโดปซิสที่เพาะบนอาหาร 1/2MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซิน 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความใกล้เคียงกัน ดังภาพที่ 16 และ ตารางที่ 5 เมื่อเพาะเมล็ดอะราบิโดปซิสบน อาหาร 1/2MS ที่ปลอดสารปฏิชีวนะ เป็นเวลา 10 วัน พบว่าอะราบิโดปซิสเริ่มมีใบเลี้ยง 2 ใบ เมื่อย้ายปลูกลงบนพีทมอส หลังจากนั้น 6 สัปดาห์ อะราบิโดปซิสเริ่มมีดอกพร้อมสำหรับการถ่ายยีน

รายงานของ Hongying *et al.* (2007) ได้กล่าวถึงผลไฮโกรไมซินในระดับความเข้มข้น 0 10 20 30 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไฮโกรไมซินมีผลต่อการเจริญของรากของอะราบิโดปซิส โดยที่ไฮโกรไมซินจะไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่มีผลต่อการเจริญของรากในคลอโรพลาสต์ และไมโทคอนเดรีย และ Hongying *et al.* (2011) ยังกล่าวถึงผลของไฮโกรไมซินมีผลต่อการเจริญของใบเลี้ยงของอะราบิโดปซิสสายพันธุ์ปกติโดยทำให้ใบเลี้ยงเล็กลง และยังมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงอีกด้วย



ภาพที่ 15 ผลของไฮโกรไมซินระดับความเข้มข้นต่างๆ บนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง 1/2MS ที่มีต่ออะราบิโดปซิสสายพันธุ์ Columbia-0

ตารางที่ 5 อัตราการรอด (%) ของอะราบิดอปซิสบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง 1/2MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซินในระดับความเข้มข้น 0 20 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

Hyg mg/L	% Survival				
	0 day	3 days	7 days	10 days	15 days
0	100	100	100	100	100
20	100	66.5	50.25	34.25	0
30	100	63.25	45.25	26.25	0
40	100	52.25	27.25	0	0

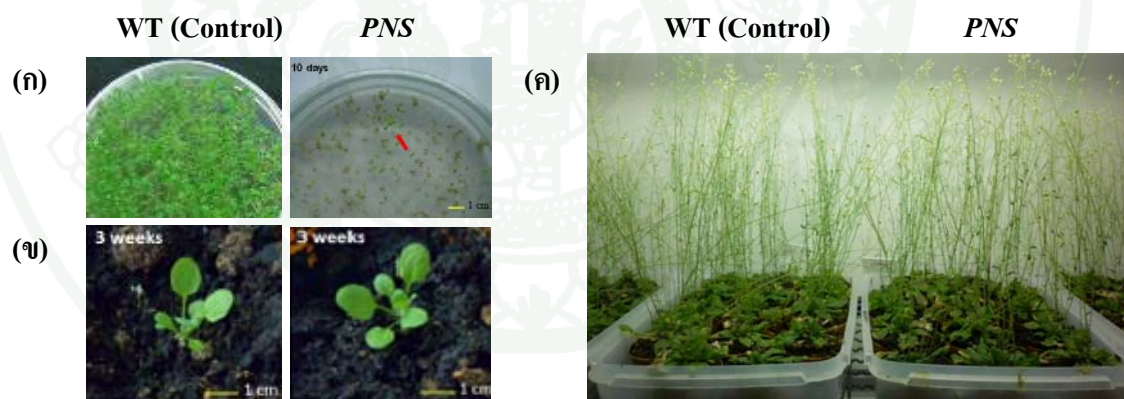
การสร้างพลาสมิดสายผสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าพืช pPINK26 ประกอบด้วยยีน β -pinene synthase ที่แยกจากผิวมะกรูด (กิตติยา, 2553) ทำโดยนำยีนพินินซินเทสของมะกรูดมาตัดต่อเข้ากับเวกเตอร์พืช pCAMBIA1305.1 โดยกำหนดให้ยีนพินินซินเทสแทนที่ยีนกัส ดังนั้นยีนพินินซินเทสนี้จะถูกควบคุมการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอด้วยโปรโมเตอร์ CaMV35S และหยุดการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอด้วย NOS terminator และเวกเตอร์พืชชนิดนี้ยังประกอบด้วยยีนคัดเลือกที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซิน อย่างไรก็ตาม ลักษณะทางพันธุกรรมของพืชมีอิทธิพลต่อระบบการคัดเลือก ดังนั้น การทดสอบปริมาณความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซินต่อการตายของอะราบิดอปซิสจึงนับว่ามีความสำคัญ จากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า ความเข้มข้นของไฮโกรไมซินระดับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถฆ่าอะราบิดอปซิสได้ภายใน 10 วัน โดย Duan *et al.* (2007) ได้รายงานว่าไฮโกรไมซินมีผลต่อการเจริญของราก และ ใบเลี้ยงของอะราบิดอปซิสโดยที่ไฮโกรไมซินจะไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่มีผลต่อการเจริญของรากในคลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรีย (Duan *et al.*, 2011)

8. ประสิทธิภาพของการถ่ายยีน

ถ่ายยีน *pns* ของพลาสมิดสายผสม pPink26 (pCaMV35S:PNS:Nos) ในเชื้ออะโรแบคทีเรีย เข้าสู่ดอกอะราบิดอปซิส อายุ 6 สัปดาห์ ที่มีความเข้มข้น OD₆₀₀ เท่ากับ 2 เป็นเวลา 10 วินาที ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Xiuren (2006) ทำการคัดเลือกอะราบิดอปซิสถ่ายพลาสมิดสายผสม pPink26 บนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง 1/2MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เวลาคัดเลือกนาน 15 วัน พบว่าอะราบิดอปซิสที่ได้รับพลาสมิดสายผสม

pPink26 มีการเจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็นต้นได้ หลังจากการนำต้นอะราบิโดปซิสที่ผ่านการคัดเลือก ย้ายลงปลูกบนพีทมอสเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าอัตราการเจริญเติบโต ลักษณะลำต้น และใบ ของอะราบิโดปซิสที่ได้รับการถ่ายพลาสมิดสายผสม pPink26 (pCaMV35S:PNS:Nos) และอะราบิโดปซิสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีลักษณะโดยทั่วไปไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 16)

หลังจากอะราบิโดปซิสแปลงพันธุ์เริ่มให้ผลและติดเมล็ด ได้จัดเก็บเมล็ดจากต้นอะราบิโดปซิสที่ได้รับการถ่ายยีน (T0) ใน 5 สัปดาห์หลังการถ่ายยีน และเมื่อนำเมล็ดจากอะราบิโดปซิส (T0) มาเพาะบนอาหารสังเคราะห์ 1/2MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนับจำนวนต้นที่อยู่รอด และย้ายไปปลูกเดี่ยวในกระบะพีทมอส จากนั้นทำการผสมตัวเองจนได้เมล็ดของอะราบิโดปซิสที่ได้รับการถ่ายยีน (T1) ทำการคัดเลือกต้นที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซิน ผสมและคัดเลือกจนได้เมล็ดจากอะราบิโดปซิสแปลงพันธุ์รุ่นที่ 2 (T2) ทำการผสมตัวเองอีกครั้งจนได้รุ่นที่ 5 (T5) จากการตรวจสอบอัตราการรอดของอะราบิโดปซิสแปลงพันธุ์ในรุ่นต่างๆ พบว่าอัตราการรอดในรุ่น T0 T1 T2 T3 T4 และ T5 เพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 0.27, 45.17, 70.65, 78.88 80.00 และ 83.33 ตามลำดับ (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 16 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของอะราบิโดปซิสที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* กับสายพันธุ์ Columbia ระหว่างการคัดเลือกบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) และ เมื่อย้ายปลูกในพีทมอสเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ข) และ 45 วัน (ค)

ตารางที่ 6 อัตราการรอด (%) ของอะราบิดอปซิสที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* รุ่น T5 บนอาหาร
สังเคราะห์สูตรดัดแปลง 1/2MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

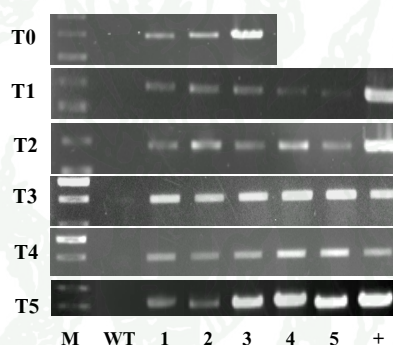
	Test/Total Clones	#Tested seeds	% Survival
T0	2/2	750	0.27
T1	5/400	890	44.94
T2	10/1200	1700	70.59
T3	25/2500	3200	78.88
T4	25/2000	2500	80.00
T5	15/2500	3000	83.33

ถึงแม้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนในครั้งนี้จะต่ำเพียง 0.27% ในอัตราการมีชีวิตรอดของเมล็ดในรุ่น T0 (ตารางที่ 8) แต่เมื่อทำการผสมตัวเองอัตราการมีชีวิตรอดของเมล็ดในรุ่น T1–T5 เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงระดับ 83.33% ในรุ่น T5 แสดงว่าการแทรกของยีนในโครโมโซมเกิดขึ้นแบบถาวรโดยยืนยันผลจากการตรวจสอบยีนพีนินซินเทสและโครงสร้างของยีนที่ต่อเข้ากับโปรโมเตอร์ CaMV35S ด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าวด้วยวิธีพีซีอาร์เปรียบเทียบกับอะราบิดอปซิสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน พบอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรไมซินทุกต้นที่สุ่มมาทดลอง มียีนพีนินซินเทสของมะกรูด นอกจากโครงสร้างของยีนแล้ว เทคนิคในการถ่ายยีนก็มีส่วนเสริมในประสิทธิภาพของการถ่ายยีน วิธีการถ่ายยีนที่ใช้ในการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Xiuren *et al.* (2006) ในด้านปริมาณเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ใช้ นอกจากนี้ส่วนประกอบของสารละลายน้ำตาลซูโครส และ Tween20 ที่ใช้ในขณะถ่ายยีนมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับรายงานของ Steven *et al.* (1998) ที่ใช้ Silwet-77 ซึ่งทำให้อัตราการมีชีวิตรอดของเมล็ดคิดเป็นร้อยละ 0.3 ระยะเวลาในการถ่ายยีนเข้าสู่ดอกอะราบิดอปซิสในงานวิจัยนี้คือ 10 วินาที สอดคล้องกับรายงานของ Elke *et al.* (2006) และ Xiuren *et al.* (2006) ซึ่งต่างจากรายงานของ Steven *et al.* (1998) ที่ใช้เวลาจุ่มดอกลงในเชื้ออะโกรแบคทีเรียเพียง 3–5 วินาที ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

9. การตรวจสอบยีน *pns* ของมะกรูดที่ถ่ายเข้าอะราบิดอปซิส

9.1 การตรวจสอบยีน *pns* ของมะกรูดที่ถ่ายเข้าอะราบิดอปซิสด้วยวิธีพีซีอาร์

สกัดดีเอ็นเอจากการสุ่มตัวอย่างใบอะราบิดอปซิสที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* รุ่น T0 T1 T2 T3 T4 และ T5 เพื่อตรวจสอบยีน *pns* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 35S_pro และ 5'Pin(As)1200 เปรียบเทียบกับพลาสมิดสายผสม pPink26 (positive control, +) พบแถบดีเอ็นเอของยีน *pns* ที่สังเคราะห์ได้ขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส เท่ากับขนาดของยีน *pns* ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ของพลาสมิดสายผสม pPink26 (ภาพที่ 17) แสดงให้เห็นว่าอะราบิดอปซิสที่ได้รับการถ่ายพลาสมิดสายผสม pPink26 ที่ผ่านการคัดเลือกและตรวจสอบ ต่างได้รับยีน *pns* ของมะกรูดที่อยู่ในพลาสมิดสายผสม pPink26 ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยอะโกรแบคทีเรีย

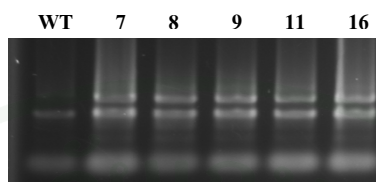


ภาพที่ 17 ผลผลิตพีซีอาร์ของการตรวจสอบอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์ของยีน *pns* รุ่น T0–T5 โดยที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส (1 Kb DNA ladder) WT คืออะราบิดอปซิสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน *pns* 1–5 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ของตัวอย่างที่ได้จากการสุ่มอะราบิดอปซิสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน *pns* และ + คือ ผลผลิตพีซีอาร์ของ พลาสมิดสายผสม pPink26 ด้วยไพรเมอร์ 35S_pro และ 5'Pin(As)1200

9.2 การแยกอาร์เอ็นเอจากอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์ และการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pns* ของอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์ด้วยวิธี relative RT–PCR

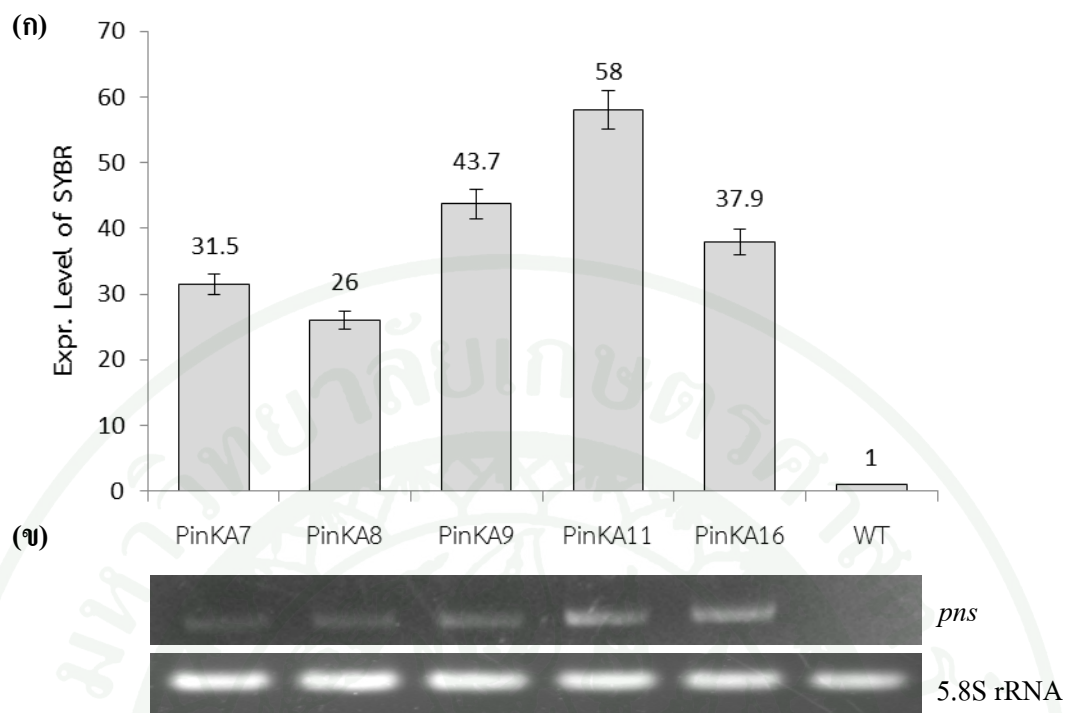
สกัดอาร์เอ็นเอดอกอะราบิดอปซิสที่ไม่ได้และได้รับการถ่ายยีน *pns* น้ำหนัก 1 กรัม ด้วยวิธี Trizol reagent (Gibco BRL, สหรัฐอเมริกา) พบว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี (ภาพที่

18) และนำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปใช้ในการสร้างดีเอ็นเอสายแรกด้วย Ready-To-Go You-Prime first strand beads (GE Healthcare Biosciences, สหรัฐอเมริกา) เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR



ภาพที่ 18 อาร์เอ็นเอสกัดจากดอกอะราบิโดปซิส รุ่น T5 โดยที่ WT คือ อาร์เอ็นเอที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน *pns* และ 7 8 9 11 และ 16 คือ อาร์เอ็นเอของดอกอะราบิโดปซิสที่ได้รับการถ่ายยีน *pns*

ผลการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี relative RT-PCR ดังตารางที่ 7 แสดงค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ relative RT-PCR ของอะราบิโดปซิสที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* โดยคำนวณค่าตามวิธีการของ Livak and Schmittgen (2001) และตารางที่ 8 แสดงค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ relative RT-PCR ของอะราบิโดปซิสที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* ที่ถูกคำนวณด้วยโปรแกรม realplex (Eppendorf, สหรัฐอเมริกา) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PNS_RT(S)773 (5'-GGA GGC AAG GTG GTT CAT-3') และ PNS_RT(R)977 (5'-CGT CTA AAA TAC CCA AAC TGA GG-3') เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pns* โดยใช้ระดับการแสดงออกของยีนในต้นอะราบิโดปซิสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็น calibrator และใช้ยีน 5.8S rRNA ซึ่งเป็น internal control ในต้นอะราบิโดปซิสที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* มาปรับระดับการแสดงออกของยีนให้อยู่ในมาตรฐานเดียวกัน เมื่อนำค่า relative expression ratio มาแสดงเป็นกราฟแท่ง ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel (Microsoft, สหรัฐอเมริกา) พบว่าต้นอะราบิโดปซิสที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* มีการแสดงออกของยีน *pns* ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (กำหนดให้ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีค่า expression ratio เท่ากับ 1) ซึ่งระดับการแสดงออกของยีน *pns* ในระดับอาร์เอ็นเอของโคลนที่ 11 มีการแสดงออกมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาร์เอ็นเอของอะราบิโดปซิสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เท่ากับ 58.0 เท่า รองลงมาคือ โคลนที่ 9 16 7 และ 8 มีระดับการแสดงออกของยีน *pns* ในระดับอาร์เอ็นเอ เท่ากับ 43.7 37.9 31.5 และ 26.0 เท่า ตามลำดับ ดังภาพที่ 19 ตารางที่ 7-8 และดังภาพผนวกที่ 1



ภาพที่ 19 ระดับการแสดงออกของยีน *pns* ในอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์ ตรวจสอบด้วยวิธี relative RT-PCR (ก) และ ปริมาณดีเอ็นเอของยีน *pns* เปรียบเทียบกับ 5.8S rRNA (control) ที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี relative RT-PCR จากอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์ 5 โค隆 เทียบกับจำนวน 25 รอบ (ข)

ตารางที่ 7 ค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ relative RT-PCR ของอะราบิดอปซิสที่ได้รับ
การถ่ายยีน *pns* โดยคำนวณค่าตามวิธีการของ Livak and Schmittgen (2001)

Transgenic lines	gene mean CT	5.8rRNA mean CT	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	expression ratio
T5-P7 (<i>pns</i>)	19.58	3.50	16.08	-4.98	31.56
T5-P8 (<i>pns</i>)	19.05	2.69	16.36	-4.70	25.99
T5-P9 (<i>pns</i>)	18.48	2.87	15.61	-5.45	43.71
T5-P11 (<i>pns</i>)	18.34	3.14	15.20	-5.86	58.08
T5-P16 (<i>pns</i>)	18.86	3.05	15.81	-5.25	38.05
WT	23.78	2.72	21.06	0	1

โดยกำหนดให้

$$\Delta CT = \text{gene mean CT} - 5.8 \text{ rRNA mean CT}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT - \Delta CT_{WT}$$

$$\text{expression ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

ตารางที่ 8 ค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ relative RT-PCR ของอะราบิดอปซิสที่ได้รับ
การถ่ายยีน *pns*

Name	Ct mean SYBR	Expr. Level SYBR
WT	23.78	
T5-P7 (<i>pns</i>)	19.58	31.5
T5-P8 (<i>pns</i>)	19.05	26.0
T5-P9 (<i>pns</i>)	18.48	43.7
T5-P11 (<i>pns</i>)	18.34	58.0
T5-P16 (<i>pns</i>)	18.86	37.9
WT (5.8S rRNA)	2.72	
T5-P7 (5.8S rRNA)	3.50	
T5-P8 (5.8S rRNA)	2.69	
T5-P9 (5.8S rRNA)	2.87	
T5-P11 (5.8S rRNA)	3.14	
T5-P16 (5.8S rRNA)	3.05	

9.3 ผลการตรวจสอบองค์ประกอบของสารหอมระเหยจากมะกรูดด้วยวิธี GC-MS

ตัดช่อดอกของอะราบิโดปซิสที่ได้รับการถ่ายยีน *pms* คัดเลือกด้วยคุณสมบัติความต้านสารไฮโกรมัยซิน และผสมตัวเอง ชั่วอายุที่ 5 จำนวน 70 ช่อดอก ที่ประกอบด้วยดอกตูม แรก แยมและบาน นำมาวิเคราะห์ชนิด และปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของสารหอมระเหยจากดอก โดยวิธี SPME ตรวจจับสารด้วย fiber PDMS ขนาด 100 ไมครอน ในระบบปิด เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง GC-MS การวิเคราะห์สารหอมระเหยจากอะราบิโดปซิสที่ได้รับการถ่ายยีน *pms* เปรียบเทียบกับอะราบิโดปซิสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

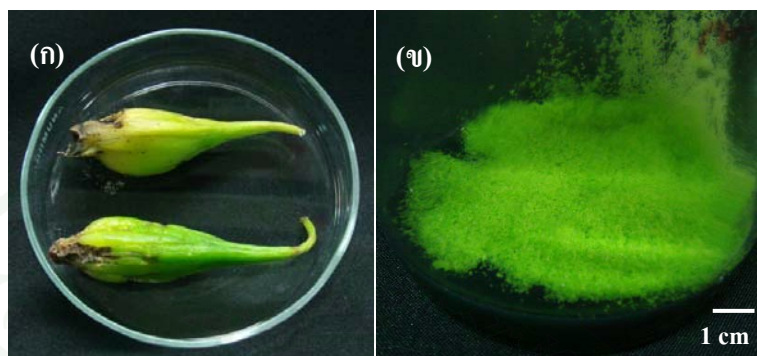
ผลการวิเคราะห์สารหอมระเหยที่ปล่อยออกจากดอกอะราบิโดปซิสที่ได้รับการถ่ายยีนเปรียบเทียบกับอะราบิโดปซิสที่ไม่ได้ถ่ายยีน ผลปรากฏว่าไม่สามารถตรวจพบสารชนิดใดๆ โดยการดูดซับกลิ่นด้วยแท่งคาร์บอน (SPME) ด้วยวิธี GC-MS โดยทั่วไปสารหอมระเหยส่วนใหญ่จะเป็นสารในกลุ่มแอลกอฮอล์ เอสเทอร์ และ ไฮโดรคาร์บอน ตามลำดับ (Jette, 2006) และผลการวิเคราะห์ที่ได้แตกต่างจากการวิเคราะห์สารสกัดสารจากดอกอะราบิโดปซิสและวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS ในการทดลองของ Dorothea and Eran (2006) ซึ่งตรวจสอบการปลดปล่อยสารหอมระเหยของช่อดอกอะราบิโดปซิสจำนวน 70 ช่อดอก ด้วยวิธี GC-MS โดยกำหนดให้มีการสะสมเป็นเวลานาน 8 ชั่วโมง พบว่าอะราบิโดปซิสมีการปล่อยสารหอมระเหยในกลุ่มโมโนเทอร์ปีนและเซสควิเทอร์ปีน คิดเป็นร้อยละ 60 ของสารหอมระเหยทั้งหมดที่ปล่อยออกมา ซึ่งพบสารกลุ่มโมโนเทอร์ปีน 3 ชนิด คือ β -myrcene, linalool และ limonene และพบสารกลุ่มเซสควิเทอร์ปีน อีก 20 ชนิด โดยพบว่า (-)- E - β -caryophyllene มีถูกปล่อยมากที่สุด

10. การตรวจสอบยีน *pms* ของมะกรูดที่ถ่ายเข้ากล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวง

10.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวง

จากการเพาะเมล็ดกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวง อายุฝัก 6 เดือน ฝักมีสีเหลืองอมเขียว รูปกลมรี ลักษณะผลแห้ง เมล็ดมีขนาดเล็กมากคล้ายฝุ่นผง และเพาะเมล็ดกล้วยไม้บนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS (Murashige and Skoog, 1962) ผสมผงถ่าน 0.8 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอัตราการงอกคิดเป็นร้อยละ 99 เมล็ดบวมพองและขยายขนาดเป็นโปรโตคอร์มสีเขียวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร (ภาพที่ 20) และโปรโตคอร์มสีเขียวเข้มขึ้นแต่มี

อัตราการเจริญค่อนข้างช้า และมีอัตราการแตกตาข้างในปริมาณต่ำ คล้ายคลึงกับการทดลองของพิสิฐ (2546) ที่ทำการทดลองเพาะเมล็ดเอื้องและบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS แต่แตกต่างจากการทดลองของ ศิริลักษณ์ (2540)



ภาพที่ 20 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหาร MS จากฟักกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวง อายุ 6 เดือน (ก) ลักษณะโปรโตคอร์มบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS ที่เติม 0.8% ผงถ่าน อายุ 4 สัปดาห์ (ข)

ปัจจัยในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงให้ประสบความสำเร็จ คือ อายุฟัก ถ้าฟักอ่อนเกินไป อัตราการงอกจะต่ำ หากฟักแก่เกินไปจะทำให้ประสบปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อซึ่งพบเสมอในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้จากฟักแก่เต็มที่จนกระทั่งฟักแตก จะทำให้ปนเปื้อนเชื้อได้ง่ายและยากต่อการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ด (ระพี, 2517) จากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ นอกจากอายุฟัก เห็นได้จากการทดลองของ ศิริลักษณ์ (2545) ได้ศึกษาการงอกและระยะพัฒนาการของต้นอ่อนกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงโดยใช้ฟักที่มีอายุหลังการผสมเกสรประมาณ 7 เดือนพบว่าสูตรอาหารแข็งสูตรดัดแปลง Vacin and Went (VW) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำต้มมันฝรั่ง 50 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร และกล้วยหอมบด 100 กรัมต่อลิตร ทำให้เมล็ดสามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้และมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดคิดเป็น 95.2 เปอร์เซ็นต์

10.2 การคัดเลือกโปรโตคอร์มกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* ในพลาสมิดสายผสม pPink26

นำโปรโตคอร์มกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* ในพลาสมิดสายผสม pPink26 ที่ประกอบด้วยยีน *hptII* เป็นยีนคัดเลือกในพืช การถ่ายยีนใช้อะโกรแบคทีเรีย

ความเข้มข้นเชื้อ ที่มีค่า OD₆₀₀ ของเชื้ออะโกราแบคทีเรียเท่ากับ 0.9 ความเข้มข้นของอะซิโตไซริง โกรน 150 ไมโครโมลาร์ และทำการ co-cultivation ในที่มีด เป็นเวลา 3 วัน

หลังจากการคัดเลือกโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* ในพลาสมิดสายผสม pPink26 บนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซิน และเซฟโฟแทก ซิม พบว่าหลังจากคัดเลือบบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลงที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซินและ เซฟโฟแทกซิมในระดับต่างๆ พบว่า

หลังการคัดเลือกโปรโตคอร์มกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวง อายุ 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าโปรโตคอร์มที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน *pns* บางส่วนยังคงมีสีเขียว และบางส่วนชีดตาย เหลือร้อยละ 71.76 โปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* ส่วนใหญ่ยังคงมีสีเขียว และบางส่วนชีดตายเหลือร้อยละ 83.2 และโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายยีน *gus* ส่วนใหญ่ยังคงมีสีเขียว และ บางส่วนชีดตายเหลือร้อยละ 71.33 ดังภาพที่ 22 และ 23

หลังการคัดเลือกโปรโตคอร์มกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวง อายุ 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าโปรโตคอร์มที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน *pns* ชีดตายเพิ่มมากขึ้น เหลือร้อยละ 66.67 โปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* และ *gus* บางส่วนยังคงมีสีเขียว พัฒนาไปเป็นยอดแหลมขนาดเล็ก และบางส่วนชีดตายเหลือร้อยละ 47.4 และ 51 ตามลำดับ ดังภาพที่ 21 และ 22

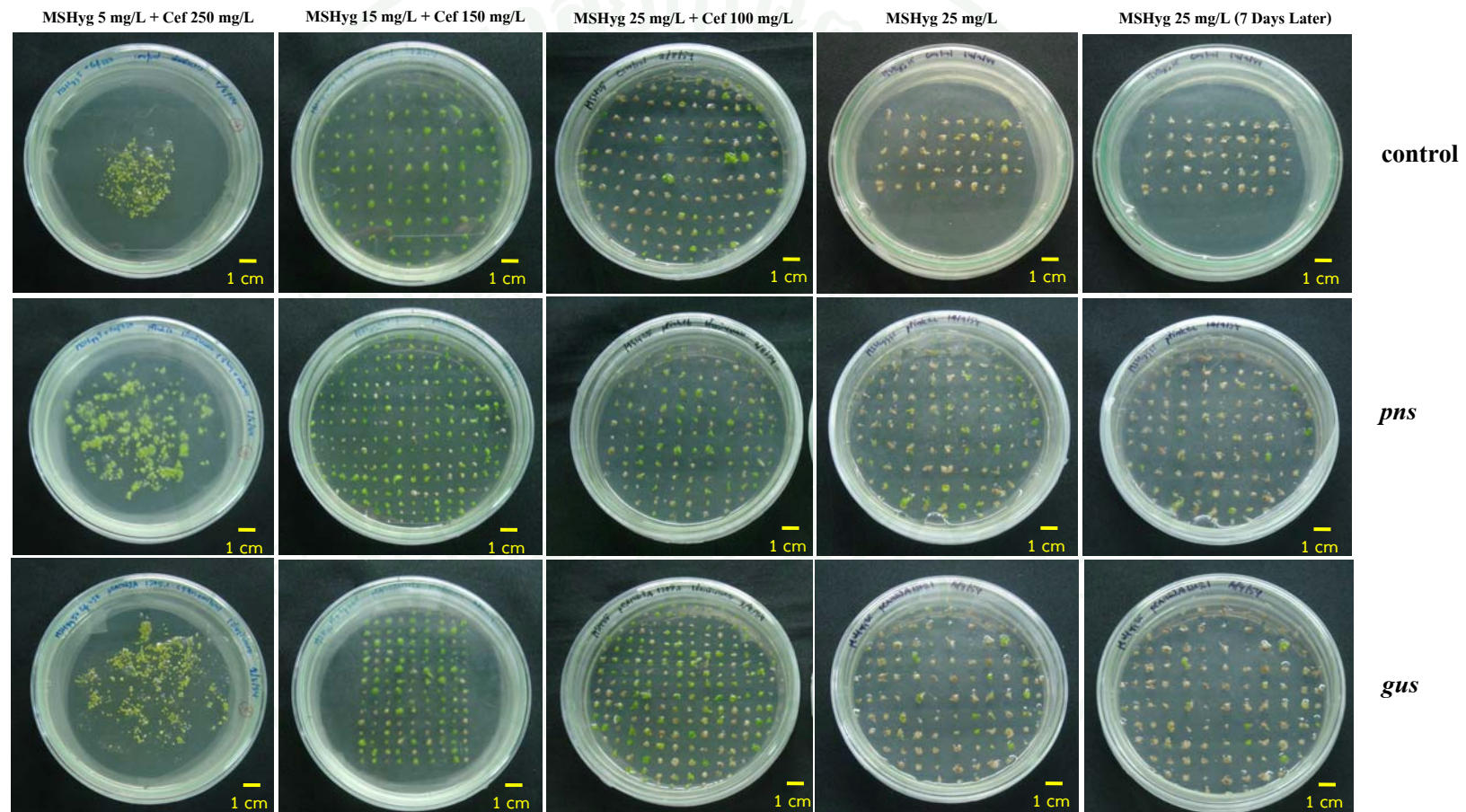
หลังการคัดเลือกโปรโตคอร์มกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวง อายุ 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าโปรโตคอร์มที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน *pns* โดยส่วนใหญ่ชีดตายเหลือร้อยละ 24.67 โปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* และ *gus* บางส่วนยังคงมีสีเขียว พัฒนาไปเป็นยอดแหลมขนาดเล็ก และบางส่วนชีดตายเหลือร้อยละ 26.3 และ 30.16 ตามลำดับ ดังภาพที่ 21 และ 22

หลังการคัดเลือกโปรโตคอร์มกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวง อายุ 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าโปรโตคอร์มที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน *pns* ชีดตายเกือบทั้งหมดเหลือร้อยละ 0.67 โปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* และ *gus* บางส่วนยังคงรอดและสีเขียว มีการพัฒนาไปเป็นยอดแหลมขนาดเล็ก และบางส่วนชีดตายเหลือร้อยละ 1.5 และ 1.67 ตามลำดับ ดังภาพที่ 21 และ 22

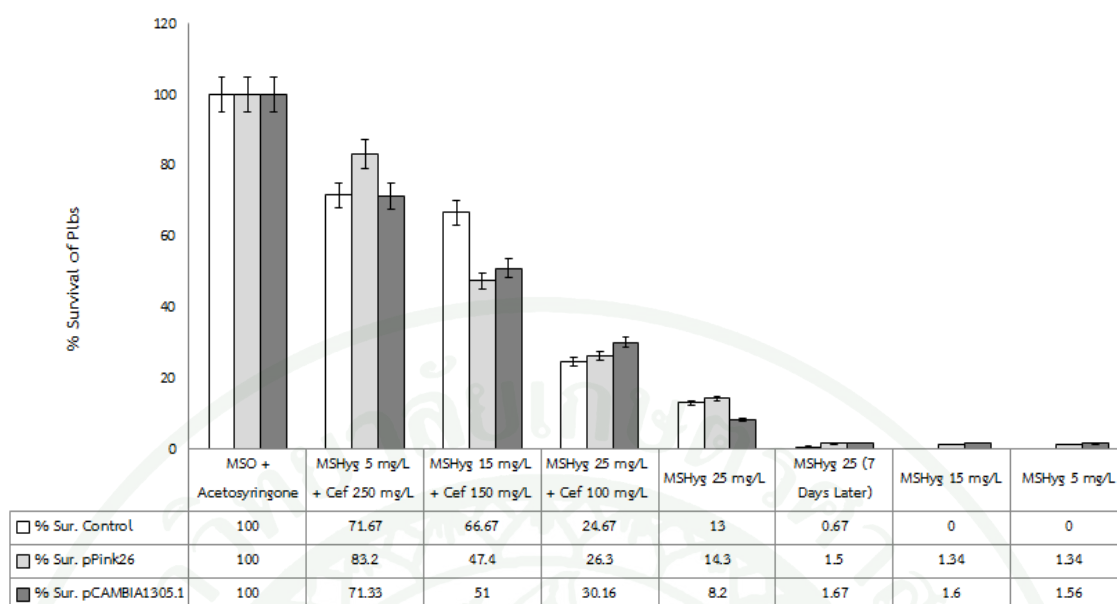
หลังจากคัดเลือกโปรโตคอร์มกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวง อายุ 4 สัปดาห์ ต่อเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าโปรโตคอร์มที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน *pns* และ *gus* ดายทั้งหมด และโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* และ *gus* ยังคงมีการเจริญและพัฒนาเป็นยอดแหลมขนาดเล็ก ดังภาพที่ 23 ซึ่งประสิทธิภาพของการถ่ายยีนเข้ากล้วยไม้แตกต่างจากประสิทธิภาพของฟิลิฐ (2545) ที่ทำการถ่ายยีนเข้าเอื้องแซะ มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนร้อยละ 17.9 สอดคล้องกับรายงานของ Ravneet and Kashmir (2010) กล่าวว่า ผลของจีโนไทป์ของแต่ละเนื้อเยื่อ มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการ inoculation และ co-cultivation ให้สูงขึ้น และอย่างไรก็ตามโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ชนิดต่างๆที่ผ่านการทำให้เกิดบาดแผลโดยการเขย่า เพื่อใช้ในการถ่ายยีน จะมีการหลั่งสารบางอย่างออกมาจากบาดแผลของเนื้อเยื่อ ส่งผลยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรีย สารดังกล่าวนี้ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ แต่เป็นสารที่พืชใช้ป้องกันการทำลายจากเชื้อโรค (Kushikawa *et al.*, 2001)

หลังการคัดเลือกโปรโตคอร์มกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวง อายุ 4 เดือน ย้ายกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซิน 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และทำการย้ายโปรโตคอร์มลงบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง VW ที่เติมผงถ่าน 0.8 เปอร์เซ็นต์ กล้วยบด 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 150 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมันฝรั่งต้ม 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า มีการเจริญเป็นต้นและราก ขนาดลำต้นสูงประมาณ 3–4 เซนติเมตร (ภาพที่ 24) ซึ่งประเภทและองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ สอดคล้องกับการทดลองของ ศิริลักษณ์ (2544) ซึ่งใช้สูตรอาหารดังกล่าวในการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Sreemanan *et al.* (2009) พบว่าสภาวะการถ่ายยีนที่ดีที่สุดสำหรับการถ่ายยีน *gus* เข้าสู่กล้วยไม้ *Dendrobium* Savin White คือความเข้มข้นของอะซิโตไซริงโคน เท่ากับ 150 ไมโครโมลาร์ ทำการ co-cultivation ในที่มืด เป็นเวลา 3 วัน และใช้ความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.6 ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองของฟิลิฐ (2545) ที่ใช้ความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย เท่ากับ 0.5 ความเข้มข้นของอะซิโตไซริงโคน เท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์ และทำการ co-cultivation ในที่มืด เป็นเวลา 3 วันเช่นเดียวกัน ซึ่งสารอะซิโตไซริงโคน เป็นสารประกอบฟีนอลิก ส่งผลในการกระตุ้นกลไกนำพา T-DNA ของพลาสมิด ในอะโกรแบคทีเรียและถ่ายยีนเข้าสู่พืช โดยเฉพาะพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น กล้วยไม้ (Shuzhen *et al.*, 2003) ซึ่งการเติมสารอะซิโตไซริงโคนขณะทำการถ่ายยีนในปริมาณที่ต่ำ คือ 100–200 ไมโครโมลาร์ พบว่าช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ (Liau *et al.*, 2003 and Dong *et al.*, 2007)

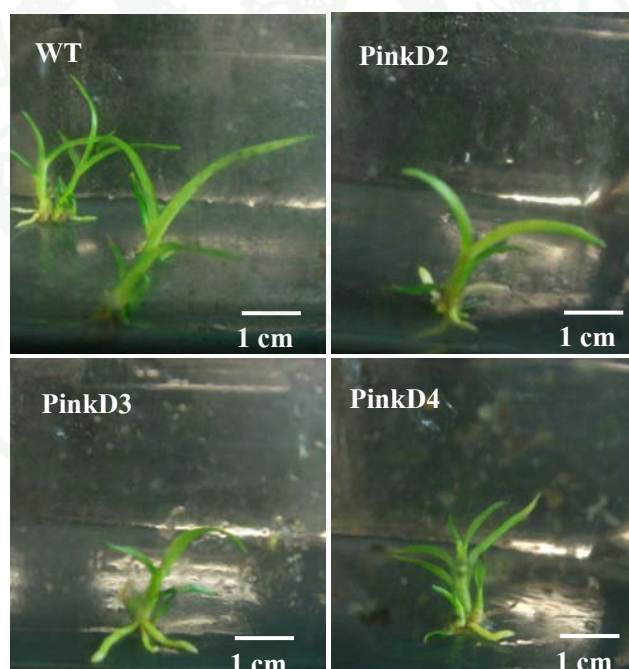
อีกทั้งยังมีรายงานของ Guo-Ling และ Adelheid (1995) ทำการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้เนื้อเยื่อ 3 ชนิด คือ ดายอด โปรโตคอร์ม และ protocorm-like body (PIbs) พบว่าการถ่ายยีนเข้า PIbs ให้ประสิทธิภาพในดีที่สุด เนื่องจาก PIbs นั้น มีส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญเป็นจำนวนมาก ในขณะที่ Chai *et al.* (2002) ได้ทดสอบชนิดของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพิษที่ใช้ในการถ่ายยีนโดยอะโกรแบคทีเรีย พบว่าการเลือกชนิดและอายุของเนื้อเยื่อกล้วยไม้เพื่อใช้ในการถ่ายยีนจึงมีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเป็นอย่างมาก การปรับปรุงวิธีการเตรียมเนื้อเยื่อกล้วยไม้เพื่อให้ได้เนื้อเยื่อเจริญมากที่สุด โดยการตัดโปรโตคอร์มที่ใช้ในการถ่ายยีนให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่ำกว่า 0.3 เซนติเมตร และการย้ายลงอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ทุกสัปดาห์เพื่อกระตุ้นให้โปรโตคอร์มเดิมเกิดโปรโตคอร์มใหม่ออกมา อาจจะช่วยทำให้ประสบความสำเร็จในการเจริญเติบโตมากขึ้น



ภาพที่ 21 การคัดเลือกโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* และ *gus* ในพลาสมิดสายผสม pPink26 บนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกลิโมนในระดับความเข้มข้นต่างกัน



ภาพที่ 22 อัตราการรอดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* ในพลาสมิด pPink26 และยีน *gus* บนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรไมซิน (Hyg) และซีฟแทกซิม (Cef) ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

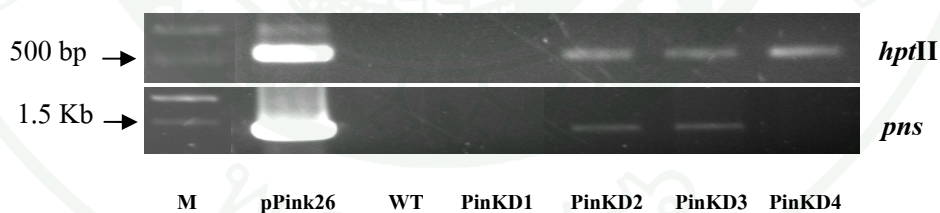


ภาพที่ 23 ลักษณะการเจริญเติบโตของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* (pPink26) บนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS ที่เติมผงถ่าน 0.8 เปอร์เซ็นต์ หลังการคัดเลือก เป็นเวลา 6 สัปดาห์

11. การตรวจสอบยีน *pns* ของมะกรูดที่ถ่ายเข้ากล้วยไม้เอื้องเงินหลวง

11.1. การตรวจสอบยีน *pns* ของมะกรูดที่ถ่ายเข้ากล้วยไม้เอื้องเงินหลวงด้วยวิธีพีซีอาร์

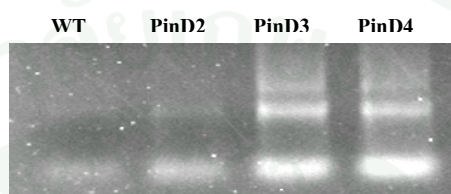
นำต้นอ่อนกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* จำนวน 4 โคลน อายุ 7 เดือน ที่ปลูกเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS มาสกัดดีเอ็นเอแบบ miniprep โดยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Dellaporta *et al.* (1983) แล้วตรวจสอบต้นกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* และ *hptII* ด้วยวิธีพีซีอาร์ ด้วยคู่ไพรเมอร์ 35S_pro กับ Pin_RT(R) สำหรับการตรวจสอบยีน *pns* และ คู่ไพรเมอร์ HPTII(F) (5'-ATG TCC TGC GGG TAA ATA GC-3') กับ HPTII(R) (5'-GCC TCC AGA AGA AGA TGT TG-3') สำหรับการตรวจสอบยีน *hptII* จากผลการตรวจสอบยีน *hptII* พบแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากการทำพีซีอาร์ขนาดประมาณ 550 คู่เบส ในทุกโคลนยกเว้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และจากผลการตรวจสอบยีน *pns* พบแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากการทำพีซีอาร์ขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส ในโคลนที่ 2 และ 3 (ชื่อโคลน PinKD2 และ PinKD3) อีกทั้งขนาดของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเท่ากับดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ของพลาสมิด pPink26 ที่มียีน *pns* และ *hptII* เป็นยีนคัดเลือก (ภาพที่ 24) แสดงให้เห็นว่าต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการคัดเลือกและสุ่มมาตรวจสอบต่างได้รับยีน *pns* และ *hptII* จากพลาสมิด pPink26 จึงทำให้ต้นกล้วยไม้ต้นทานต่อไฮโกรมัยซินและสามารถอยู่รอดได้



ภาพที่ 24 ผลผลิตพีซีอาร์ของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* สำหรับยีน *hptII* ตรวจสอบด้วยคู่ไพรเมอร์ HPTII(F) และ HPTII(R) และสำหรับยีน *pns* ตรวจสอบด้วยคู่ไพรเมอร์ 35S_pro และ Pin_RT

11.2 การแยกอาร์เอ็นเอจากกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงแปลงพันธุ์ และการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pns* ของกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงแปลงพันธุ์ด้วยวิธี relative RT-PCR

สกัดอาร์เอ็นเอจากใบต้นอ่อนกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงที่ไม่ได้และได้รับการถ่ายยีน *pns* ของมะกรูดน้ำหนัก 1 กรัม ด้วยวิธี Trizol reagent (Gibco BRL, สหรัฐอเมริกา) พบว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี (ภาพที่ 18) และนำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปใช้ในการสร้างดีเอ็นเอสายแรกด้วย Ready-To-Go You-Prime first strand beads (GE Healthcare Biosciences, สหรัฐอเมริกา) เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR

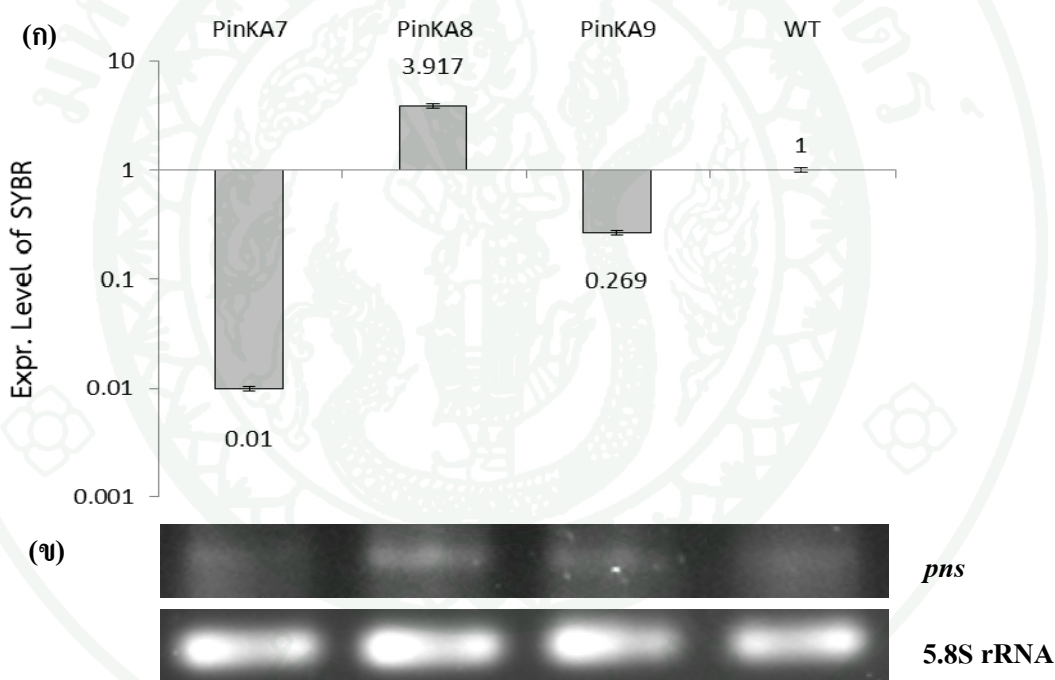


ภาพที่ 25 อาร์เอ็นเอสกัดจากใบของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวง โดยที่ WT คือ อาร์เอ็นเอกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน *pns* และ PinD2- PinD4 คือ อาร์เอ็นเอของใบของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน *pns*

ผลการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี relative RT-PCR ดังตารางที่ 9 แสดงค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ relative RT-PCR ของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* โดยคำนวณค่าตามวิธีการของ Livak and Schmittgen (2001) และตารางที่ 10 แสดงค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ relative RT-PCR ของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* ที่ถูกคำนวณด้วยโปรแกรม realplex (Eppendorf, สหรัฐอเมริกา) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PNS_RT(S)773 (5'-GGA GGC AAG GTG GTT CAT-3') และ PNS_RT(R)977 (5'-CGT CTA AAA TAC CCA AAC TGA GG-3') เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pns* โดยใช้ระดับการแสดงออกของยีนในต้นกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็น calibrator และใช้ยีน 5.8S rRNA ซึ่งเป็น internal control ในต้นกล้วยไม้เอื้องเงินหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* มาปรับระดับการแสดงออกของยีนให้อยู่ในมาตรฐานเดียวกัน เมื่อนำค่า relative expression ratio มาแสดงเป็นกราฟแท่ง ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel (Microsoft, สหรัฐอเมริกา) พบว่าต้นกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* มีการแสดงออกของยีน *pns* ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (กำหนดให้ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีค่า expression ratio เท่ากับ 1) ซึ่งระดับการแสดงออกของยีน *pns* ในระดับอาร์เอ็นเอของโคลนที่ PinKA8 มีการแสดงออกมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาร์เอ็นเอของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงที่

ไม่ได้รับการถ่ายยีน เท่ากับ 3.917 เท่า และโคลนที่ PinKA9 และ PinKA7 มีระดับการแสดงออกของยีน *pns* ที่ลดลง ดังภาพที่ 19 ตารางที่ 9-10 และดังภาพผนวกที่ 2

ความแปรปรวนในการแสดงออกของยีนในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช อาจอธิบายได้จากปัจจัยต่างๆ เช่น จำนวนชุดของยีน ตำแหน่งในการเข้าแทรกของยีน โดยถ่ายยีนเข้าไปแทรกในตำแหน่งที่ไม่เหมาะสม เช่น บริเวณ heterochromatin ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการแสดงออกของยีนน้อย ส่งผลทำให้ยีนที่ถ่ายเข้าไปไม่มีการแสดงออก (Mayer, 1995) รวมทั้งจำนวนชุดของยีนที่ถ่ายเข้าไป หากมีจำนวนชุดมากเกินไป จะทำให้พืชกระตุ้นกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีนนั้นๆ ส่งผลให้ยีนที่ถ่ายเข้าไปมีการแสดงออกที่น้อยหรือไม่แสดงออกได้เช่นกัน (Assaad et al., 1993)



ภาพที่ 26 ระดับการแสดงออกของยีน *pns* ในกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงแปลงพันธุ์ ตรวจสอบด้วยวิธี relative RT-PCR (ก) และ ปริมาณดีเอ็นเอของยีน *pns* เปรียบเทียบกับ 5.8S rRNA (control) ที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี relative RT-PCR กล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงแปลงพันธุ์ 3 โคลน เทียบกับ จำนวน 30 รอบ (ข)

ตารางที่ 9 ค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ relative RT-PCR กล้วยไม้พันธุ์เองเงินหลวงที่
ได้รับการถ่ายยีน *pns* โดยคำนวณค่าตามวิธีการของ Livak and Schmittgen (2001)

Transgenic lines	gene mean CT	5.8S rRNA mean CT	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	expression ratio
PinD2 (<i>pns</i>)	21.87	6.62	15.25	6.59	0.01038
PinD3 (<i>pns</i>)	14.54	7.85	6.69	-1.97	3.91768
PinD4 (<i>pns</i>)	16.17	5.62	10.55	1.89	0.26980
WT	17.66	9	8.66	0	1

โดยกำหนดให้

$$\Delta CT = \text{gene mean CT} - 5.8 \text{ rRNA mean CT}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT - \Delta CT_{WT}$$

$$\text{expression ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

ตารางที่ 10 ค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ relative RT-PCR ของกล้วยไม้พันธุ์เองเงินหลวง
ที่ได้รับการถ่ายยีน *pns*

Name	Ct mean SYBR	Expr. Level SYBR
WT	17.66	
PinD2 (<i>pns</i>)	21.87	0.00103
PinD3 (<i>pns</i>)	14.54	3.92
PinD4 (<i>pns</i>)	16.17	0.269
WT (5.8S rRNA)	9.00	
PinD2 (5.8S rRNA)	6.62	
PinD3 (5.8S rRNA)	7.85	
PinD4 (5.8S rRNA)	5.62	

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. ตัดต่อยีน *pns* สมบูรณ์ของมะกรูด และตัดต่อเข้าพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy ให้ชื่อโคลนว่า pPink4 ได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1,922 คู่เบส ที่ประกอบด้วยยีน *pns* สมบูรณ์ ขนาด 1809 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 603 เรสซิดิว
2. ตัดต่อยีน *pns* สมบูรณ์ของมะกรูด เข้าสู่เวกเตอร์พืช pCAMBIA 1305.1 ให้ชื่อโคลนว่า pPink26
3. เมื่อถ่ายยีน *pns* (pPink26) เข้าอะราบิดอปซิสและคัดเลือกบนอาหาร 1/2MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกราไมซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร พบอัตราการมีชีวิตรอดของเมล็ดอะราบิดอปซิสที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* ในลูกรุ่น T1-T5 เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงระดับ 83.33% ในรุ่น T5 เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ พบยีน *pns* ในต้นอะราบิดอปซิสทุกต้น และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pns* ในอะราบิดอปซิส ด้วย qRT-PCR พบการแสดงออกสูงที่สุดในอะราบิดอปซิส ให้ชื่อว่า PinkA11 ซึ่งมีระดับการแสดงออกของยีน *pns* มากที่สุด เท่ากับ 58.0 เท่าของพืชปกติ
4. อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถพบการปลดปล่อยสารหอมระเหยด้วยวิธี GC-MS ในอะราบิดอปซิสที่ได้รับการถ่ายยีน *pns* ในทุกโคลนที่ได้รับการถ่ายยีน
5. เมื่อถ่ายยีน *pns* เข้าโปรโตคอร์มกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวง พบกล้วยไม้ที่ได้รับยีน *pns* และ *gus* ร้อยละ 1.34 และ 1.56 ตามลำดับ และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *pns* ในกล้วยไม้เอื้องเงินหลวง ด้วย qRT-PCR พบการแสดงออกสูงที่สุดในกล้วยไม้แปลงพันธุ์ให้ชื่อว่า PinkA8 ซึ่งมีระดับการแสดงออกของยีน *pns* มากที่สุด เท่ากับ 3.917 เท่าของพืชปกติ

ข้อเสนอแนะ

การทดลองในครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการสร้างพลาสมิดสายผสมชื่อ pPINK26 ที่ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน *pms* ของมะกรูดในอะราบิโดปซิสและกล้วยไม้ได้ และพบการแทรกตัวของยีนแบบถาวร โดยยีนเข้าไปอยู่ในโครโมโซมของพืชแปลงพันธุ์ และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ ดังนั้นพลาสมิดสายผสม pPINK26 ที่สร้างได้ เหมาะสำหรับการนำไปใช้ในการถ่ายยีนเข้าพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจต่อไป อย่างไรก็ตามการทดลองในครั้งนี้ ยังขาดการพิสูจน์การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารหอมระเหยที่เกิดขึ้นในพืชแปลงพันธุ์ ซึ่งจะต้องดำเนินการทดลองต่อไปในอนาคต

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2548. สถิติการส่งออกพืชและผลิตผลการเกษตร ที่ผ่านการออกใบรับรอง
ศัตรูพืช ปี 2548. งานมาตรฐานและบริการตรวจพืช ฝ่ายกักกันพืช กองควบคุมพืชและวัสดุ
 การเกษตร กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- กิตติยา แสงสว่าง. 2553. การโคลนยีนเทอร์พีน ซินเทสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกลิ่นของตะไคร้หอม
และมะกรูด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ครรชิต ธรรมศิริ. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.
- คณะกรรมการกล้วยไม้แห่งชาติ. 2553. ยุทธศาสตร์การแข่งขันกล้วยไม้ไทยในตลาดโลก พ.ศ.
2554-2559.
- จรัส เชนนิล และ พิสมม มะลิสวรรณ. 2546. หอมระเหย...ศาสตร์แห่งการบำบัด. สำนักพิมพ์
 อมรินทร์บุ๊คส์เซ็นเตอร์, กรุงเทพฯ.
- จิตราพรรณ พิลึก. 2538. รายงานผลการวิจัย โครงการวิจัย ค.ป.3.2.38 การผสมพันธุ์กล้วยไม้
กระถางดอกหอมเพื่อการส่งออก.
- จิตราพรรณ พิลึก. 2542. รายงานผลการวิจัย โครงการวิจัย ค.ป.3.2.38 การผสมพันธุ์กล้วยไม้
กระถางดอกหอมเพื่อการส่งออก.
- ชลลดา วชิรเดชเสถียร. 2546. การพัฒนาผลิตภัณฑ์แชมพูผสมน้ำมันมะกรูดจากวัสดุเหลือใช้ของ
อุตสาหกรรมอาหาร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิจศิริ เรืองศิริ และ พะยอม ดันติวัฒน์. 2532. **พืชสมุนไพร**. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,
 กรุงเทพฯ.

นรินาม. 2005. **The biosynthesis of pinene**, drawn in ChemDraw by Walkerma in September

2005. แหล่งที่มา : <http://en.wikipedia.org/wiki/File:PineneBiosynthesis.png>, April 2012.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2527. **เครื่องเทศที่ใช้เป็นสมุนไพร เล่ม 2**. โรงพิมพ์อมรรณพิมพ์, กรุงเทพฯ. น.
104

พัชรียา บุญก่อแก้ว 2553 **หนังสือบัญชีรายการทรัพยากรชีวภาพกล้วยไม้ไทย สำนักงานพัฒนา
เศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน) น. 511**

พิสิฐ ชัยประเดิมศักดิ์. 2546. การศึกษาวิธีการถ่ายยีน **Chalcone reductase (chr) และ
Dihydroflavonol –4– reductase (dfr) เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายโดยไดอะโครแบคทีเรียม.**
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พิมพ์ร ลีลาพรพิสิฐ. 2547. **สุนทรบำบัด (Aromatherapy)**. โอเดียนสโตร์ กรุงเทพฯ. น. 160

มาลินี อนุพันธ์สกุล. 2542. **กล้วยไม้**. สำนักพิมพ์เกษตรบุ๊คส์ พับลิเคชั่น, กรุงเทพฯ.

ระพี ศาคริก. 2517. **การเพาะปลูกกล้วยไม้ในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย**. ชวนพิมพ์. กรุงเทพฯ.
น.865

สมชาย สุนทรสิงห์, อมร นรารางสานนท์, จุณณเกศ พานิช, โอฟาร พิทักษ์, เมธี มานะพงศ์และ
อรนนดา บุญยเลิศ. 2534. **คู่มือการผลิตไม้ตัดดอก**. กรมส่งเสริมการเกษตร กรุงเทพฯ. น.
55

สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2548. **น้ำมันหอมระเหยไทย**. สำนักพิมพ์ซี
เอ็ด ยูเคชั่น. กรุงเทพฯ. น. 55–69.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2555. **สถิตินำเข้า-ส่งออก**. แหล่งที่มา :

http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export.php, 21 มีนาคม 2555.

สาวิตรี คงเจริญสุนทร, นิพนธ์ ชมโอสถ, วิรัชมา จินดามล, จิราภรณ์ อารยะศิลป์ประร, ปราณิ ชะรัต
รัมย์, สุริวัลย์ อุ่นอารมณ และ อารยา พิทยประเสริฐกุล. 2005. 31st Congress on Science
and techonology of Thailand at Suranaree University of Technology, pp. 18–20
October 2005.

ศิริลักษณ์ มาลานิยม. 2545. **สมอ.สาร**. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กรุงเทพฯ.

สุภาพ บุญรัตนเวช, โสภณ เรืองสำราญ และอมร เพชรสม. 2524. น้ำมันหอมระเหยของมะกรูดที่
เพาะปลูก ในประเทศไทย. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ (6): น. 1–3.

ศักดิ์สิทธิ์ วัชรารัตน์. 2531. **ปัจจัยที่มีผลกระทบต่ออุปสงค์เพื่อการส่งออกกล้วยไม้ไทย**. วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ศิริลักษณ์ เจริญดี, สุริยา ดันติวิวัฒน์, จิตราพรรณ พิลึก และศรีสม สุวรรณวงษ์. 2545. **การประชุม
ทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
กรุงเทพฯ.

ศิริลักษณ์ เจริญดี. 2544. **การอนุรักษ์และการขยายพันธุ์กล้วยไม้เอื้องเงินหลวงโดยวิธีเพาะเลี้ยง
เนื้อเยื่อ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ศูนย์วิจัยกสิกรไทย. 2551. **กล้วยไม้ไทยก้าวไกลในเวทีโลก...การส่งออกปี 2551 จะขยายตัวไม่ต่ำ
กว่าร้อยละ 10**. มองเศรษฐกิจฉบับที่ 2141. แหล่งที่มา: <http://www.positioningmag.com>,
18 เมษายน 2551.

อรชร เอกภาพสากล. 2547. **มหัศจรรย์น้ำมันหอมระเหย**. สถาพรบุ๊คส์ กรุงเทพฯ. 200 น.

อรรัมภา สืบสาววงษ์. 2552 **การโคลนยีนโมโนเทอร์พีน จีนเทสที่เกี่ยวข้องกับกลิ่นของดอกแก้วและ
ดอกกล้วยไม้**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อำพล เสนาณรงค์. 2537. สถานภาพทรัพยากรพันธุกรรมพืชในประเทศไทย. ศูนย์พันธุวิศวกรรม
และ เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ,
กรุงเทพฯ. น. 69

Adams, R. P. 2001. **Identification of essential oil components by gas chromatography/
quadrupole mass spectroscopy**. Allured Publishing Corporation.

Aharoni, A., Maarten, A.B. and H.J. Bouwmeester. 2005. Volatile science? Metabolic
engineering of terpenoids in plants. **Trends Plant Sci.** 10: 594–602.

Anake Kijjoa. 2008. **Workshop on Biosynthesis of Natural Products. Department of lant
Pathology, Faculty of Agriculture**, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant
Arabidopsis thaliana. **Nature** 408: 796–815.

Assaad, F.F., K.L. Tucker and E.R. Singer. 1993. Epigenetic repeat-induced gene silencing
(RIGS) in Arabidopsis. **Plant Mol. Biol.** 22(6): 1067-1085.

Backer, A.C., B.v.d. Brink and R. Cornelis. 1986. **Flora of Java (spermatophytes only III)**.
Wolters-Noorhoff N.V., The Netherlands. 761 pp.

Belletti, N., M., Ndagijimana, C., Sisto, M.E., Guerzoni, R. Lauciotto and F. Gardini. 2004.
Evaluation of the antimicrobial activity of Citrus essences on *Saccharomyces cerevasiae*.
J Agric Food Chem. 52: 6932–6938.

Chai, M.L., C.J., Xu, K.K., Senthil, J.Y. Kim and D.H. Kim. 2002. Stable transformation
of protocorm-like bodies in Phalaenopsis orchid mediated by *Agrobacterium*
tumefaciens. **Sci. Hortic.** 96: 213–224.

Charles, H. 1950. **Orchid—third Description and Cultivation**. Harrison and Sons. Inc., London. 274 pp.

Dong, P.C., M.K. Ichiro and M. Masahiro. 2007. *Agrobacterium*–mediated transformation of protocorm–like bodies in *Cymbidium*. **Plant Cell Rep.**, 26: 735–743.

CITES Thailand. 1998. **Plant Introduction and Conservation of Wild Flora Sub–Division. Agricultural Regulatory Division**. Department of Agriculture. Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand. 160 pp.

Daley, M., V.C., Knauf, K.R. Summerfelt and J.C. Turner. 1998. Co–transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker–free transgenic plants. **Plant Cell Rep.** 17: 489–496.

Davidovich, R.R., E., Lewinsohn, E., Bar, Y., Iijima, E. Pichersky and Y. Sitrit. 2008. Overexpression of the lemon basil alpha–zingiberene synthase gene increases both mono– and sesquiterpene contents in tomato fruit. **Plant J.** 56(2): 228–238.

Dressler, R.L. 1993. **Phylogeny and Classification of the Orchid Family**. Cambridge Univ. Press, Melbourne, Australia. 314 pp.

Dorothea, T. 2006. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. **Plant Biol.** 9: 297 - 304.

Dorothea, T. and E. Pichersky. 2006. Biosynthesis of volatile terpenes in the flowers of the model plant *Arabidopsis thaliana*. **In Biology of Floral Scent**, CRC Press, 79–90.

Dubey, V.S., R. Bhalla and R. Luthra. 2003. An overview of the non–mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **J. Biosci.** 28: 637–646.

- Dudareva, N., F., Negre, D.A. Nagegowda. and I. Orlova. 2006. Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. **Critic Rev in Plant Sci.** 25 (5): 417–440.
- Ebinuma, H., E., Sugita, E., Matsunaga, S., Endo, K. Yamada and A. Komamine. 2001. Systems for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker. **Plant Cell Rep.** 20: 383–392.
- Elegbede, J., G. Abiodun and N. Michael. 2002. Monoterpenes reduced adducts formation in rats exposed to aflatoxin B1. **Afr J Biotechnol.** 1 (2): 46–49.
- Elke, L., P.B., Rainer, Ü. Bekir and E.S. Imre. 2006. An improved method for preparing agrobacterium cells that simplifies the arabidopsis transformation protocol. **Plant Met.** 2: 16 pp.
- Eran, P., P.N. Joseph and D. Natalia. 2006. **Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity Science.** 311: 808 pp.
- Giovanni, D., C., Antonella, V. Antonella and B. Ivana. 2002. **Composition of the volatile fraction of cold-pressed citrus peel oils.** In G. Dugo, A. Di Giacomo (Eds.), Citrus, the genus Citrus, Taylor and Francis, London/New York (2002), 201–317 pp.
- Glenn, T., 1993. **Hop Aroma and Flavor**, January/February 1993, Brewing Techniques. <<http://realbeer.com/hops/aroma.htm>> Accessed July 21, 2010.
- Haruyuki, K. and S. Rapee. 1975. **Beatiful Thai Orchid Species.** Aksomsampan Press, Bangkok. 186pp.
- Holtum, R.E., 1964. **A Revised Flora of Malaya.** 3rd ed., Authority Government Printing Office, Singapore. 759 pp.

- Hongying, D. and D. Xiaosheng. 2007. Effect of hygromycin on growth and development of arabidopsis seedling roots. **Pak. J. Bot.** 39(6): 2167–2173.
- Hongying, D., D., Xiaosheng, W., Zhiquing, Z. Chune and Z. Yanqing. 2011. The influences of Hygromycin B on growth of *Arabidopsis thaliana* cotyledon and leaf. **Afr J Biotechnol.** 10(77): 17742–17747.
- Isabel, N., B. Federcio and L. Francesco. 2006. Dimethylallyl Diphosphate and Geranyl Diphosphate Pools of Plant Species Characterized by Different Isoprenoid Emissions. **Plant Physiol.** 141: 721-730.
- Jesús, M.B., R., Roc, A. Isabel and S. Juan. 2008. Expression of spearmint limonene synthase in transgenic spike lavender results in an altered monoterpene composition in developing leaves. **Metab. Eng.** (10): 166–177.
- Jette, T.K. and Jonathan G. 2006. Biosynthesis of volatile terpenes in the flowers of the model plant *Arabidopsis thaliana*. **In Biology of Floral Scent**, CRC Press, 27–52.
- Joost, L., S., Wilfried, V.H., Bianca, H.V., Bianca, B., Jan, H.W.v.d.P., Linus, J.B. Harro and A.V. Harrie. 2002. Increased and Altered Fragrance of Tobacco Plants after Metabolic Engineering Using Three Monoterpene Synthases from Lemon. **Plant Physiol.** 134(1): 510–519.
- Kaiser, R. 1993. **The Scent of Orchids**. Elsevier, Amsterdam.
- Krasnyanski, S., R.A., May, A., Loskutov, T.M. Ball and K.C. Sink. 1999. Transformation of the limonene synthase gene into peppermint (*Mentha piperita* L.) and preliminary studies on the essential oil profiles of single transgenic plants. **Theor. Appl. Genet.** 99: 676–682.

Liau, C.H., S.J., You, V., Prasad, H.H., Hsiao, J.C., Lu, N.S. Yang and M.T. Chan. 2003.

Agrobacterium tumefaciens–mediated transformation of an *Oncidium* orchid. **Plant Cell Rep.** 21: 993–998.

Liu, Y., H., Wang, H.C. Ye and G.F. Li. 2005. Advances in the plant isoprenoid biosynthesis pathway and its metabolic engineering. **J. Integr. Plant Biol.** 47: 769–782.

Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real–time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods** 25: 402–408.

Lu, X.G., L.B., Zhan, B.A., Feng, M.Y., Qu, L.H. Yu and J.H. Xie. 2004. Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by d–limonene. **World J. Gastroenterol.** 10(14): 2140–2144.

Lucke, E. 1971. The effect of biotin on sowings of *Paphiopedilium*. **Am. Orchid Soc. Bull.** 40: 24–26.

Lücker, J., H. J., Bouwmeester, W., Schwab, J., Blaas, H.W.v.d.P. Linus and H.A. Verhoeven. 2001. Expression of *Clarkia* S–linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of S–linalyl–beta–D–glucopyranoside. **Plant J.** 27: 315–24.

Manosroi, J., P., Dhumtanom and A. Manosroi. 2006. Anti–proliferative activity of essential oils extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. **Cancer Res.** 235: 114–120.

Masayoshi, S., N.T., Minh–Tu, Y., S.M., Njoroge, Y., Xiaolin, W.H. C., S. Hee–Sun and P.

Marco. 2010. Compositional Analysis. **Citrus Essential Oils**, John Wiley & Sons, Inc.: 37–163.

- Mayer, P. 1995. Understanding and controlling transgene expression. **Trend Biotechnol.** 13: 332-337.
- Meyerowitz, E.M. and C.R. Somerville (eds.) 1994. **Arabidopsis**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Meinke, D.W., J.M., Cherry, C., Dean, S.D. Rounsley and M. Koornneef. 1998. Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis. **Science** 282: 662–682
- Muñoz-Bertomeu J., R., Ros, I. Arrillaga and J. Segura. 2008. Expression of spearmint limonene synthase in transgenic spike lavender results in an altered monoterpene composition in developing leaves. **Metabolic Engineering** 10: 166 – 177.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant** 15(3): 473–497.
- Ohara, K., T., Ujihara, T., Endo, F. Sato and K. Yazaki. 2003. Limonene production in tobacco with Perilla limonene synthase cDNA. **J. Exp. Bot.** 54(393): 2635–2642.
- Pragya, K. 2008. **Cell and Molecular Biology**. I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., India.
- Ravneet, K. and S. Kashmir. Orchid Transformation: Protocol, Problems and Practical Applications. **Asian J. Exp. Biol. Sci.** 1(4): 711– 718
- Sambrook, J., E.D. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Scidenfaden, G. 1985. Orchid genera in Thailand XII *Dendrobium* SW. **Opera. Bot.** 83: 1–295.

Shuzhen, M., M., Xiaotian., L., Rongwei, W. Chunhong and L. Yi. 2003. *Agrobacterium*–mediated transformation of a *Dendrobium* orchid. **Plant Cell Tiss Org**, 75: 63–71

Soheil, S.M. and B.C. Rodney. 2002. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Plant Science** 2: 1360 – 1385.

Sreeramanan, S., S. Razip and R. Xavier. 2009. Preliminary Factors Influencing Transient Expression of Gusa in *Dendrobium Savin* White Protocorm–like Bodies (PLBs) using *Agrobacterium*–mediated Transformation System. **World App. Sci. J.** 7(10): 1295–1307

Steven, J.C. and F.B. Andrew. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*–mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** 16(6): 735–743.

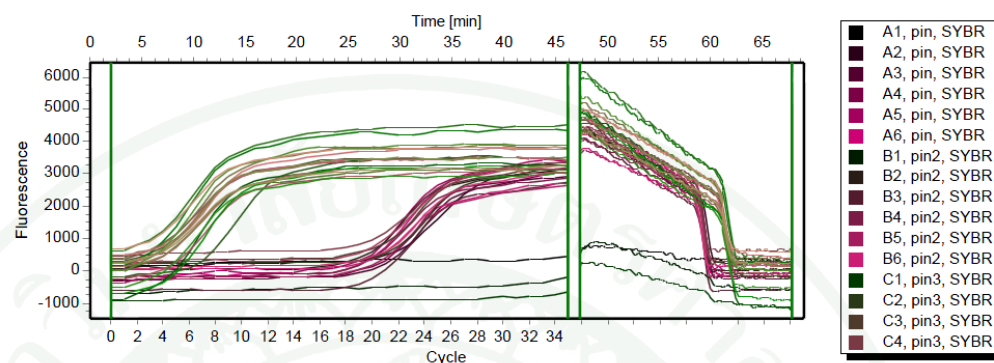
Vainstein, A., A., Lewinsohn, E. Picherky and A. Weiss. 2001. Floral Fragrance: New into an old commodity. **Plant Physiol.** 127: 1383–1389.

Xiang, L., J.A. Milc, N. Pecchioni and L.Q. Chen. 2007. Genetic aspects of floral fragrance in plants. **Biochemistry (Moscow)**. 72(4): 351–358.

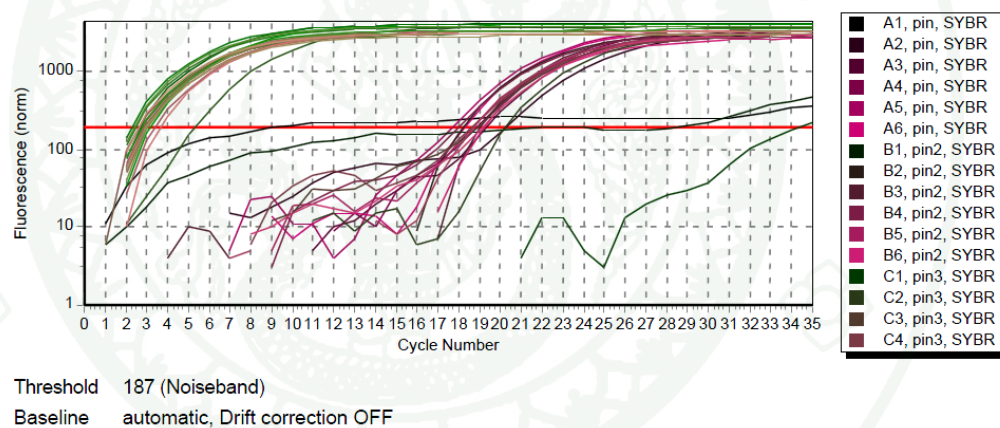
Xiuren, Z., R., Henriques, S.-S. Lin, Q.-W. Niu and N.-H. Chua. 2006. *Agrobacterium*–mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. **Nat. Protoc.** 12: 1–6.



(ก) Fluorescence Profile



(ข) Amplification Plot



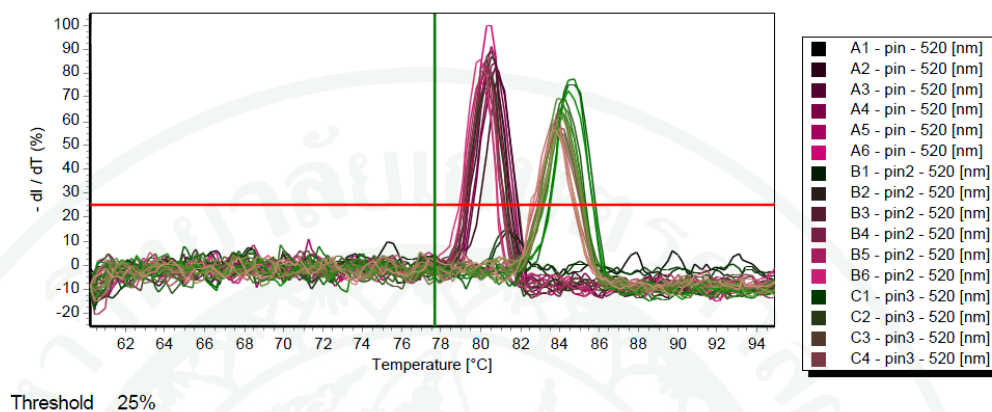
ภาพผนวกที่ 1 ข้อมูลที่ได้จากการทำ relative RT-PCR ของอะราบิโดปซิสแปลงพันธุ์รุ่น T5

ก. Fluorescent profile

ข. Amplification plot

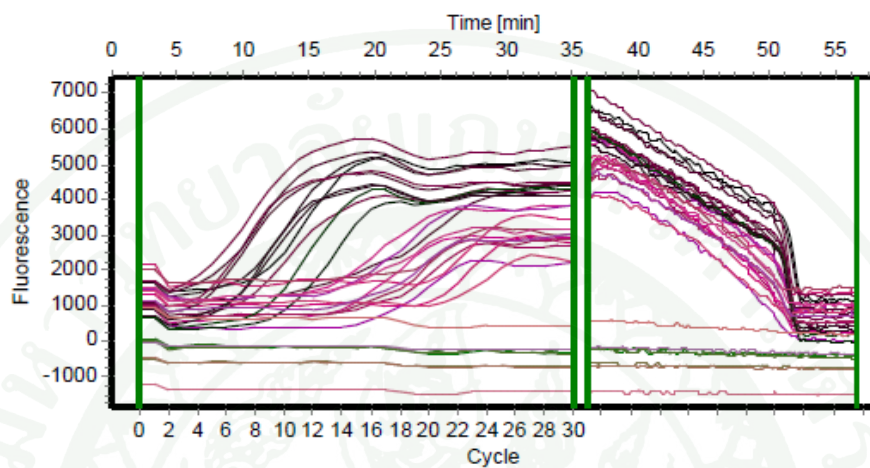
ค. Melting curve

(ค) Melting curve

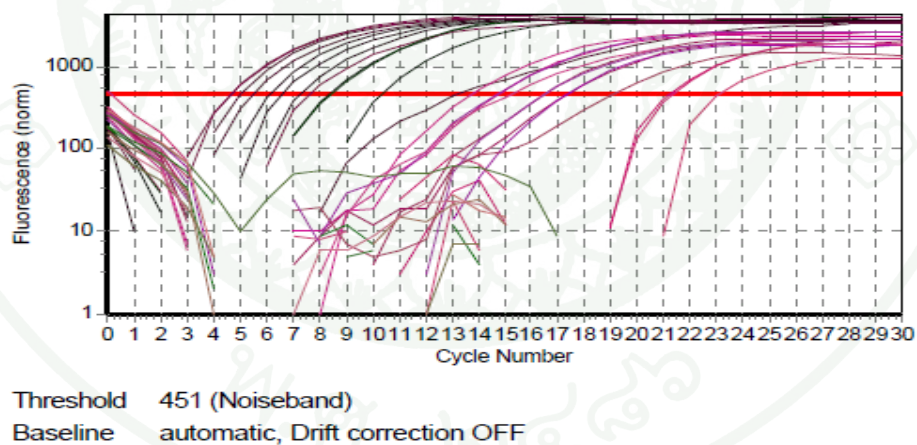


ภาพผนวกที่ 1 (ต่อ)

(ก) Fluorescence Profile



(ข) Amplification Plot



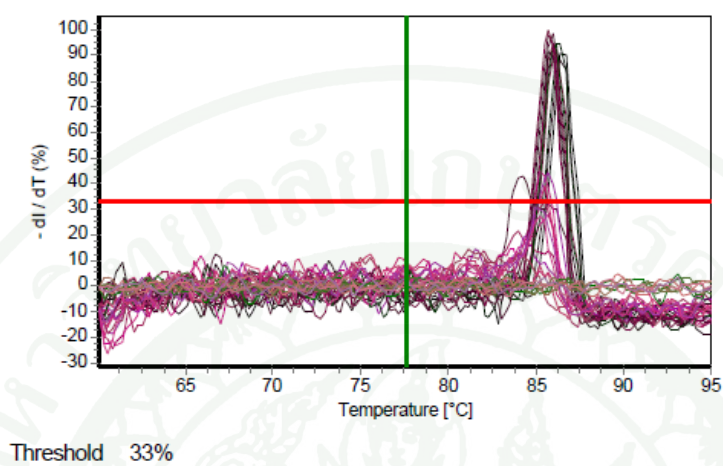
ภาพผนวกที่ 2 ข้อมูลที่ได้จากการทำ relative RT-PCR ของกล้วยไม้พันธุ์เอื้องเงินหลวงแปลงพันธุ์

ก. Fluorescent profile

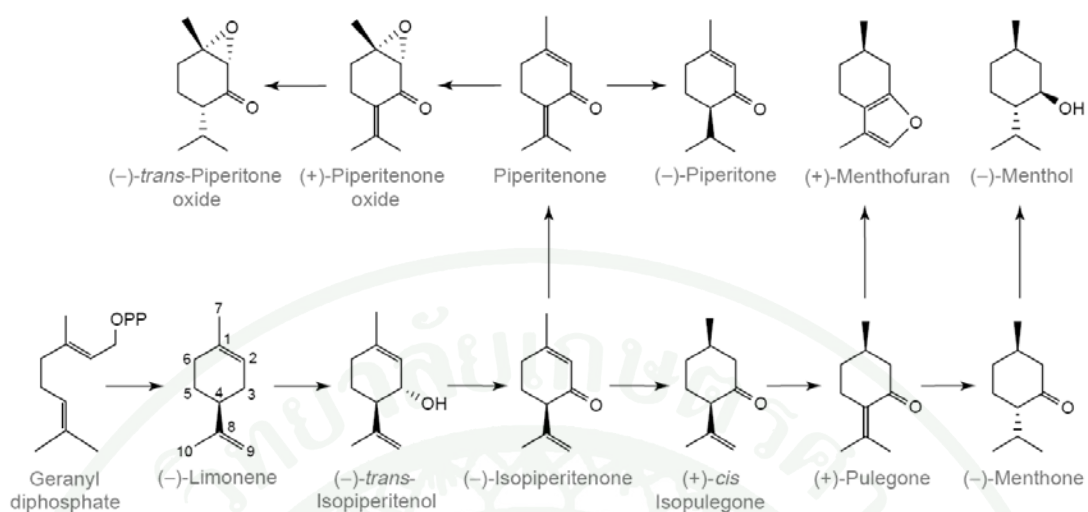
ข. Amplification plot

ค. Melting curve

(ค) Melting curve



ภาพผนวกที่ 2 (ต่อ)



ภาพผนวกที่ 5 วิธีการสังเคราะห์สารกลุ่มโมโนเทอร์ปีนใน peppermint และ cornmint

ที่มา: Soheil and Croteau (2002)

ตารางผนวกที่ 1 สารเคมีในอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) และอาหารสูตรดัดแปลง VW (Vacin and Went, 1949)

สารเคมี	ความเข้มข้น (mg/l)	
	MS (mg/l)	VW (mg/l)
Macroelements		
NH_4NO_3	1,650	-
KNO_3	1,900	525
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250
KH_2PO_4	170	250
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	-	200
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	500
Microelements		
Na_2EDTA	37.30	37.30
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.80	27.80
H_3BO_3	6.20	-
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30	5.70
$\text{ZnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.60	-
KI	0.85	-
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	-
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	-
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	-
Organic compounds		
Myo-inositol	100	100
Glycine	2	2
Nicotinic Acid (B12)	0.50	0.50
Pyridoxine HCl (B6)	0.50	0.50
Thiamine HCl (B1)	0.50	0.10

ตารางผนวกที่ 2 อาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและคัดเลือกลูกเชื้อกล้วยไม้

อาหารสังเคราะห์สูตร	องค์ประกอบ
VW	อาหารเหลวสูตรดัดแปลง VW ที่เติมน้ำตาลทราย 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และไตรแคลเซียมฟอสเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร
MS	อาหารแข็งสูตรดัดแปลง MS ที่เติมน้ำตาลทราย 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นผง 0.75 เปอร์เซ็นต์
MSO	อาหารเหลวสูตรดัดแปลง MS ที่ไม่เติมน้ำตาลและเติมผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์
MSH5 + Cef 250	อาหารเหลวสูตรดัดแปลง MS ที่เติมไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมแซฟโฟแทกซิม 250 มิลลิกรัมต่อลิตร
MSH15 + Cef 150	อาหารเหลวสูตรดัดแปลง MS ที่เติมไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมแซฟโฟแทกซิม 150 มิลลิกรัมต่อลิตร
MSH25 + Cef 100	อาหารเหลวสูตรดัดแปลง MS ที่เติมไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมแซฟโฟแทกซิม 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
MSH25	อาหารเหลวสูตรดัดแปลง MS ที่เติมไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร
MSH15	อาหารเหลวสูตรดัดแปลง MS ที่เติมไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร
MSH5	อาหารเหลวสูตรดัดแปลง MS ที่เติมไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายภาววรรณ วงศ์คำไพโร
วัน เดือน ปี ที่เกิด	30 กันยายน พ.ศ. 2528
สถานที่เกิด	อำเภอเมืองนครสวรรค์ จังหวัดนครสวรรค์
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยนเรศวร (พ.ศ. 2551)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	–
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	–
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	ภาววรรณ วงศ์คำไพโร, กิตติยา แสงสว่าง, อัจราพร ศรีบุญเลิศ และ พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์. 2554. ประสิทธิภาพการถ่ายยีนพีนินซินเทสที่แยกได้จากมะกรูด เข้าอะราบิโดปซิสด้วยอะโกรแบคทีเรีย. Thai J. Genet. 4(2): 85–93.
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2553 สัญญาเลขที่ ภค./๒๕๕๓-กท๔ ของสำนักงาน คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)