

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พืชสวน)

ปริญญานิพนธ์

พืชสวน

พืชสวน

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การถ่ายยีน *crtW* เพื่อการสร้างแอสตาแซนทีนในยาสูบ พืชเนเปีย และคาลิบรากัว โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

Transformation of *crtW* Gene for Astaxanthin Production in Tobacco, Petunia and Calibrachoa Using *Agrobacterium tumefaciens*

นามผู้วิจัย นายบัณฑิต ผดุงสวัสดิ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ธัญญา เตชะศรีวิชัย, วท.ม.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เอนกมาลย์ วงศ์ชาวัน, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์อริศรา มีนะกนิษฐ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การถ่ายยีน *crtW* เพื่อการสร้างแอสตาแซนทีนในยาสูบ พิทูเนีย และคาลิบรากัว
โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

Transformation of *crtW* Gene for Astaxanthin Production in Tobacco, Petunia and
Calibrachoa Using *Agrobacterium tumefaciens*

โดย

นายบัณฑิต ฝดุงสวัสดิ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชสวน)
พ.ศ. 2558

บดินทร์ ผดุงสวัสดิ์ 2558: การถ่ายยีน *crtW* เพื่อการสร้างแอสตาแซนทินในยาสูบ
พืทูเนีย และคาลิบรากัวโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens*
(พืชสวน) สาขาพืชสวน ภาควิชาพืชสวน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
รองศาสตราจารย์ธัญญา เตชะศีลพิทักษ์, วท.ม. 63 หน้า

การถ่ายยีน *crtW* เข้าสู่ยาสูบ พืทูเนีย และคาลิบรากัว โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 เพื่อให้พืชสร้างสารแอสตาแซนทิน โดยการเลี้ยงชิ้นส่วนใบพืชร่วมกับ *A. tumefaciens* (co-cultivation) ในอาหารสูตร MS ที่มี acetosyringone ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน คัดเลือกชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่มีกานามัยซิน ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชิ้นส่วนใบของยาสูบสามารถเจริญเกิดเป็นตาพิเศษและชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ ส่วนชิ้นส่วนใบของพืทูเนียและคาลิบรากัวสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้เท่านั้น ชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีนมีสีส้มเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน มีการสร้างแอสตาแซนทินสะสมในใบลำต้น หลอดกลีบดอก กลีบเลี้ยงและรังไข่ของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน และในแคลลัสของพืทูเนียและคาลิบรากัว ใบของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนมีปริมาณสารคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์รวมแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนอย่างมีนัยสำคัญ โดยใบของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนมีปริมาณสารคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์รวมมากกว่าใบของต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ผลการวิเคราะห์ชั้นตรงควัตถุด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) พบสารแอสตาแซนทินในชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีน แต่ไม่พบในชิ้นส่วนพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่พบในใบของยาสูบด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) พบปริมาณสารแอสตาแซนทิน 0.496 และ 0.383 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสดหนึ่งกรัมในใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 16 และ 21 ตามลำดับ แต่ไม่พบสารแอสตาแซนทินในใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เมื่อตรวจสอบโดยเทคนิค PCR พบยีน *crtW* จากชิ้นส่วนของพืชที่ได้รับการถ่ายยีน และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *crtW* โดยเทคนิค RT-PCR พบว่าชิ้นส่วนใบของยาสูบ, แคลลัสของพืทูเนียและคาลิบรากัวที่ได้รับการถ่ายยีนมีการแสดงออกของยีน *crtW*

Bodin Phadungsawat 2015: Transformation of *crtW* Gene for Astaxanthin Production in Tobacco, Petunia and Calibrachoa Using *Agrobacterium tumefaciens*. Master of Science (Horticulture), Major Field: Horticulture, Department of Horticulture. Thesis Advisor: Associate Professor Thunya Taychasinpitak, M.S. 63 pages.

Agrobacterium-mediated gene transfer method for transferring *crtW* gene was investigated in tobacco (*Nicotiana tabacum*), *Petunia hybrida* and *Calibrachoa × hybrida* by using *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105, harboring a plasmid containing the *crtW* gene from *Brevundimonas* sp. strain SD212 under 35S promoter with kanamycin resistant gene, used as a selectable marker. Co-cultivation was performed by soaking leaf disks of each plant species in *A. tumefaciens* solution with 20 ppm acetosyringone and cultured on MS medium containing 20 ppm acetosyringone for three days in the dark, and selection was carried out on selective MS medium containing 200 ppm kanamycin. Inoculated leaf explants of tobacco were regenerated to whole plants, whereas inoculated leaf explants of Petunia and Calibrachoa were produced putative transformed callus tissue that demonstrated orange color. Transformed tobacco plants showed astaxanthin accumulation in leaf, stem, sepal, corolla tube, glandular hair, and nectary. TLC analysis revealed astaxanthin accumulation in the transformed tobacco plants (leaf, sepal, corolla tube, glandular hair, and nectary) and the transformed callus tissues of Petunia and Calibrachoa. HPLC analysis indicated that the transformed tobacco leaves contained astaxanthin 0.496 and 0.383 mg/g FW. The mean of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and total carotenoids content determined by spectrophotometry showed significantly difference between transformed and non-transformed tobacco leaves that chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and total carotenoids content in transformed tobacco leaves was higher than non-transformed tobacco leaves. Presences of *crtW* gene in the transformed tobacco leaves, Petunia and Calibrachoa calluses were validated by PCR, and results from RT-PCR confirmed *crtW* expression in the plant tissues.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ชัยญะ เตชะศีลพิทักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เมธามลย์ วงศ์ขาวจันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำต่างๆ ในการวิจัย ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งสำเร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์จิตรพรณ เทียมปโยธ ผู้ทรงคุณวุฒิซึ่งเป็นผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย และ อาจารย์ ดร.พิจิตรา แก้วสอน ประธานการสอบ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติในการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2558

ขอขอบพระคุณ Innovation Advancement Organization และ Leading Graduate School Program, Tokyo University of Agriculture and Technology ประเทศญี่ปุ่น ในการสนับสนุนการแลกเปลี่ยนเพื่อทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ Assistant Professor Dr. Sakae Suzuki, Horticultural Science Laboratory, Tokyo University of Agriculture and Technology สำหรับความอนุเคราะห์สถานที่สารเคมี และอุปกรณ์ตลอดการทำวิจัย และให้คำแนะนำตลอดการทำวิจัย และขอขอบคุณ คุณ Tomohiro Kitayama สำหรับพลาสมิดที่ใช้เป็นดีเอ็นเอเวกเตอร์ใน *Agrobacterium tumefaciens* ที่มียีน *crtW* เพื่อใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.จารุวรรณ สิทธิพล ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่ช่วยคำปรึกษาในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณครอบครัวที่ให้อำลังใจตลอดการวิจัย และให้การสนับสนุนการศึกษาแก่ข้าพเจ้าจนสำเร็จลุล่วงด้วยดีด้วยดีตลอดมา

บดีรินทร์ ผดุงสวัสดิ์
กรกฎาคม 2558

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	14
อุปกรณ์	14
วิธีการ	19
ผลและวิจารณ์	26
สรุปและข้อเสนอแนะ	46
สรุป	46
ข้อเสนอแนะ	47
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	48
ภาคผนวก	51
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	63

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์	15
2 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชิ้นส่วนใบยาสูบ แคลลัสของพืชเนื้อเยื่อและคาลิบรากัวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและได้รับการถ่ายยีน	34
3 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>crtW</i> และ <i>nptII</i> ด้วยเทคนิค PCR ในดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชิ้นส่วนใบยาสูบ แคลลัสของพืชเนื้อเยื่อและคาลิบรากัวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและได้รับการถ่ายยีน	36
4 ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากชิ้นส่วนใบของยาสูบ แคลลัสของพืชเนื้อเยื่อและคาลิบรากัวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและถ่ายยีน	39
5 ค่าที่วัดโดยระบบสี $L^*a^*b^*$ ในใบของยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และที่ได้รับการถ่ายยีนตั้งแต่ 1 ถึง 24	42
6 ปริมาณสารแอสตาแซนทีนที่พบในใบของยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และที่ได้รับการถ่ายยีนตั้งแต่ 16 และ 21	44
7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470, 653 และ 666 นาโนเมตรและปริมาณสารที่พบโดยคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสง	45

ตารางผนวกที่

1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962)	52
2 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร yeast extract peptone (YEP)	53
3 ส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR)	53
4 ส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)	54

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 กระบวนการสร้างสาร flavonoid ในพืชมะเขือเทศ	7
2 โครงสร้างของสารแอสตาแซนทีน	8
3 กระบวนการสังเคราะห์สารแอสตาแซนทีนที่พบใน <i>Agrobacterium aurantiacum</i>	9
4 ยาสูบ, <i>Nicotiana tabacum</i> L. 'Petit Havana SR1'	16
5 พืชมะเขือเทศ, <i>Petunia hybrida</i> Surfinia® 'Patio Yellow'	16
6 พืชมะเขือเทศ, <i>Petunia hybrida</i> 'Yellow'	17
7 คาลิบราควัว, <i>Calibrachoa x hybrida</i> Million Bells® 'Neon Yellow'	17
8 แผนที่โครงสร้างและขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอ pRI201-AN (Takara, Japan) ที่ใช้ในการทดลอง	18
9 แผนภาพแสดงพลาสมิดที่มียีน <i>crtW</i> ในตำแหน่ง MCS 1 บนพลาสมิดดีเอ็นเอ pRI201-AN (Takara, Japan) <i>RB</i> right border, <i>LB</i> left border, <i>35Sp</i> cauliflower mosaic virus 35S promoter, <i>tp</i> transit peptide, <i>hspT</i> heat shock protein terminator, <i>nptII</i> neomycin phosphotransferase, <i>NOSp</i> nopaline synthase promoter และ <i>NOST</i> nopaline synthase terminator	18
10 ชิ้นส่วนใบยาสูบที่เกิดตาพิเศษ (adventitious bud) และเจริญเป็นต้นในอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่มีกานามัยซินความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม meropenem 10 มิลลิกรัมต่อลิตร, BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	28
11 ตัวอย่างต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ซ้าย) และที่ได้รับการถ่ายยีน (ขวา)	29
12 ใบของยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ซ้าย) และที่ได้รับการถ่ายยีน (ขวา)	30
13 ภาพตัดตามขวางที่กำลังขยาย 200 เท่าของใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ก) และที่ได้รับการถ่ายยีน (ข)	30
14 ดอกของต้นยาสูบที่ระดับการพัฒนาการของดอกในระยะต่างๆ ในต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (แถวบน) และที่ได้รับการถ่ายยีน (แถวล่าง)	31
15 ภาพตัดตามขวางที่กำลังขยาย 200 เท่า บริเวณหลอดกลีบดอกของยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ก) และที่ได้รับการถ่ายยีน (ข)	31
16 เกสรเพศเมียของดอกยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ซ้าย) และที่ได้รับการถ่ายยีน (ขวา)	32

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
17 ภาพตัดตามขวางที่กำลังขยาย 200 เท่า ของกลีบดอกยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ก) และที่ได้รับการถ่ายยีน (ข)	32
18 แคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนมีสีส้มจากการสะสมสารแอนธราแซนทินในคาลิบรากัว (ก) พืชเนี่ยจากบริษัท Suntory Flowers Ltd. (ข) และ พืชเนี่ยจากบริษัท Sakata Seed Corp. (ค) ที่ได้รับการถ่ายยีนมีสีส้มจากการสะสมของสารแอนธราแซนทิน เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีเพียงสีเขียวจากการสะสมของคลอโรฟิลล์คาลิบรากัว (ง) พืชเนี่ยจากบริษัท Suntory Flowers Ltd. (จ) และพืชเนี่ยจากบริษัท Sakata Seed Corp. (ฉ)	33
19 ผลจากปฏิกิริยา PCR กับไพรเมอร์จำเพาะ <i>crtW</i> (ซ้าย) และ <i>nptII</i> (ขวา) แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis) ในตัวอย่างจากต้นยาสูบ แถวที่ 1 คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, แถวที่ 2 คือ LjUbip- <i>crtW</i> , แถวที่ 3-7 คือ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 1, 2, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ แถว M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน Wide-Range DNA Ladder 50-10,000 คู่เบส	37
20 ผลจากปฏิกิริยา PCR กับไพรเมอร์จำเพาะ <i>crtW</i> (ซ้าย) และ <i>nptII</i> (ขวา) แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis) ในตัวอย่างจากต้นยาสูบ แถวที่ 1 คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, แถวที่ 2 คือ LjUbip- <i>crtW</i> , แถวที่ 3-7 คือ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 7, 8, 12, 14 และ 18 ตามลำดับ แถว M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน Wide-Range DNA Ladder 50-10,000 คู่เบส	38
21 ผลจากปฏิกิริยา PCR กับไพรเมอร์จำเพาะ <i>crtW</i> แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis) ในตัวอย่างจากแคลลัสของพืชเนี่ยและคาลิบรากัว แถวที่ P คือ LjUbip- <i>crtW</i> , แถวที่ 1 คือ แคลลัสของคาลิบรากัวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, แถวที่ 2 คือ แคลลัสของพืชเนี่ยจากบริษัท Suntory Flowers Ltd. ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, แถวที่ 3 คือ แคลลัสของพืชเนี่ยจากบริษัท Sakata Seed Corp. ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, แถวที่ 4-6 คือ แคลลัสของคาลิบรากัวที่ได้รับการถ่ายยีน, แถวที่ 7-9 คือ แคลลัสของพืชเนี่ยจากบริษัท Suntory Flowers Ltd. ที่ได้รับการถ่ายยีน, แถวที่ 10-12 คือ แคลลัสของพืชเนี่ยจากบริษัท Sakata Seed Corp. ที่ได้รับการถ่ายยีนตามลำดับ	38

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
22	การแสดงผลของยีน <i>crtW</i> แถวที่ 1 คือยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, แถวที่ 2-4 คือยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 1, 15 และ 16, แถวที่ 5-7 คือแคลลัสของคาลิบรากัว, พิทูเนีย (Suntory Flowers Ltd.) และพิทูเนีย (Sakata Seed Corp.) ที่ได้รับการถ่ายยีน, แถวที่ 8-10 คือ แคลลัสของคาลิบรากัว, พิทูเนีย (Suntory Flowers Ltd.) และพิทูเนีย (Sakata Seed Corp.) ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ตามลำดับ แถว M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน Wide-Range DNA Ladder 50-10,000 คู่เบส
23	ผล TLC เปรียบเทียบชนิดตรงควัตถุที่พบในชิ้นส่วนพืชส่วนต่างๆของยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ซ้าย) และยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน (ขวา) ใน (ก) ใบ (ข) หลอดกลีบดอก (ค) กลีบเลี้ยง (ง) รังไข่ และผล TLC เปรียบเทียบระหว่างแคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ซ้าย) และได้รับการถ่ายยีน (ขวา) ใน (จ) คาลิบรากัว (ฉ) พิทูเนียจากบริษัท Suntory Flowers Ltd. และ (ช) พิทูเนียจากบริษัท Sakata Seed Corp.
	40
	41
ภาพผนวกที่	
1	การปรับสภาพต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนในขณะออกปลูกภายนอกขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องระบบปิดที่ควบคุมแสงและอุณหภูมิ
2	ตัวอย่างต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนอายุ 10 วันหลังจากการออกปลูก
3	การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชใน agar 4 เปอร์เซนต์ เพื่อใช้สำหรับการตัดเนื้อเยื่อตามขวางด้วยเครื่อง Microslicer รุ่น DTK-1000
4	เครื่อง Microslicer รุ่น DTK-1000
5	การจุ่มส่วนล่างของแผ่น TLC aluminum plate ลงในสารละลาย petroleum ether : acetone สัดส่วน 8 ต่อ 2 ในแก้วระบบปิด ในขณะทำ Thin layer chromatography (TLC)
6	ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตาแซนทินในตัวอย่างใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยวิธี HPLC
7	ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตาแซนทินในตัวอย่างใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 16 โดยวิธี HPLC
	55
	55
	56
	56
	57
	58
	59

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
8 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตาแซนทินในตัวอย่างใบยาสูบที่ได้รับ การถ้ายืนต้นที่ 21 โดยวิธี HPLC	60
9 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตาแซนทินในตัวอย่างใบยาสูบที่ได้รับ การถ้ายืนต้นที่ 21 โดยวิธี HPLC	61
10 กราฟมาตรฐานพื้นที่ใต้กราฟต่อความเข้มข้นของสารแอสตาแซนทินที่สร้างโดย โปรแกรม LC solution โดยใช้สารละลายที่เตรียมจากสารแอสตาแซนทิน มาตรฐานที่ความเข้มข้น 8, 16, 32, 64 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร	62

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

3',5'AMT	=	anthocyanidin 3'5' O-methyltransferase
3'AMT	=	anthocyanidin 3' O-methyltransferase
35Sp	=	cauliflower mosaic virus 35S promoter
3GT	=	3 glucosyltransferase
4CL	=	4-coumaroyl:CoA-ligase
5GT	=	5 glucosyltransferase
AAT	=	anthocyanidin 3-rutinoside acyltransferase
ANS	=	anthocyanidin synthase
ART	=	anthocyanidin 3-glucosyltransferase
BA	=	6-Benzylaminopurine
bp	=	base pairs
C4H	=	cinnamate-4-hydroxylase
CHI	=	chalcone flavanone isomerase
CHS	=	chalcone synthase
<i>crtW</i>	=	beta-carotene ketolase gene
DFR	=	dihydroflavonol 4-reductase
<i>dfr</i>	=	dihydroflavonol-4-reductase gene
F3'5'H	=	flavonoid 3'5' hydroxylase
F3'H	=	flavonoid 3' hydroxylase
F3H	=	flavanone 3-hydroxylase
FLS	=	flavonol synthase
HPLC	=	high-performance liquid chromatography
hspT	=	heat shock protein terminator
LB	=	left border
MCS	=	multiple cloning site
MS medium	=	Murashige and Skoog's medium
NAA	=	1-Naphthaleneacetic acid
NOSp	=	nopaline synthase promoter
NOST	=	nopaline synthase terminator
<i>nptII</i>	=	neomycin phosphotransferase
PAL	=	phenylalanine ammonia lyase

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

PCR	=	polymerase chain reaction
RB	=	right border
RT-PCR	=	reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
TAE buffer	=	Tris-acetate-EDTA buffer
T-DNA	=	transfer DNA
TDZ	=	thidiazuron
TE buffer	=	Tris-EDTA buffer
TLC	=	thin-layer chromatography
tp	=	transit peptide
YEP	=	yeast extract peptone medium

การถ่ายยีน *crtW* เพื่อการสร้างแอสตาแซนทินในยาสูบ พิทูเนีย และ คาลิบรากัวโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

Transformation of *crtW* Gene for Astaxanthin Production in Tobacco, Petunia and Calibrachoa Using *Agrobacterium tumefaciens*

คำนำ

พิทูเนียและคาลิบรากัว เป็นไม้ดอกทางการค้า อยู่ในวงศ์ Solanaceae ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาการตัดต่อพันธุกรรมเพื่อเปลี่ยนแปลงวิถีกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ และในปัจจุบันยังไม่มีพิทูเนียดอกสีเหลืองเข้ม พบเพียงดอกสีเหลืองอ่อน

การตัดต่อพันธุกรรม เป็นวิธีหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะใหม่ โดยถ่ายยีนที่ต้องการจากสิ่งมีชีวิตอื่นเข้าสู่พืช ทำให้พืชสามารถเกิดการแสดงลักษณะตามที่ต้องการ มีงานวิจัยหลายงานที่ตัดต่อพันธุกรรมโดยเปลี่ยนแปลงกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบแคโรทีนอยด์ในพืชวงศ์ Solanaceae โดยใช้ *Agrobacterium* เช่น การถ่ายยีน *crtZ* และ *crtW* จาก *Paracoccus* เข้าสู่ยาสูบ ส่งผลให้มีการสังเคราะห์สารคีโตแคโรทีนอยด์ (ketocarotenoid) เพิ่มขึ้นในใบและรังไข่ (Ralley *et al.*, 2004) หรือการถ่ายยีน *crtO* จาก *Synechocystis* ส่งผลให้มีการสังเคราะห์สารคีโตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นในใบ รังไข่ และกลีบดอก (Gerjets *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007)

นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยที่ใช้การตัดต่อพันธุกรรมเพื่อเปลี่ยนแปลงสีของดอก เช่น ในพิทูเนีย โดยถ่ายยีน *dfr* จากพืชชนิดอื่น เช่น *Agapanthus praecox* subsp. *orientalis* (Leighton) Leighton (Mori *et al.*, 2014) และ *Calibrachoa hybrida* (Chu *et al.*, 2014) เข้าสู่พิทูเนีย, *Petunia hybrida* โดยพิทูเนียที่ได้รับการตัดต่อพันธุกรรมเกิดการเปลี่ยนสีของกลีบดอกเนื่องจากสามารถสร้างเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนสารกลุ่ม dihydroflavonols เป็นสารกลุ่ม leucoanthocyanidins หลังจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสารกลุ่ม anthocyanin ซึ่งมีสีต่อไป หรือการถ่ายยีน *crtW* เข้าสู่ *Lotus japonicus* ทำให้ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีการสังเคราะห์แอสตาแซนทิน ส่งผลให้ใบและดอกมีการเปลี่ยนแปลงสี โดยใบมีสีเขียวอมส้ม และดอกมีสีส้มเข้มขึ้น (Suzuki *et al.*, 2007)

การวิจัยในครั้งนี้ จึงได้ศึกษาวิธีการถ่ายยีนเพื่อเปลี่ยนแปลงวิถีกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในยาสูบ พืชทุเนี่ย และคาลิบรากัว ซึ่งมีความเป็นไปได้ในการมีสีดอกไม้ใหม่ที่หลากหลายและนำไปสู่การสร้างเทคนิคใหม่ในการปรับปรุงลักษณะสีดอกต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อถ่ายยีนเปลี่ยนแปลงกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในยาสูบ พืชเหนียว และคาลิ-
บรากัว และพืชที่ได้รับการถ่ายยีนมีการสังเคราะห์สารแอสเตอร์แซนทิน

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

พิทูเนีย (*Petunia*) และคาลิบรากัว (*Calibrachoa*) ถูกจำแนกอยู่ในวงศ์ Solanaceae มีการกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวางในอเมริกาใต้ จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพิทูเนียและคาลิบรากัว พบว่าพิทูเนียและคาลิบรากัวมีบรรพบุรุษร่วมกัน พิตูเนียและคาลิบรากัวเคยถูกจัดให้อยู่ในสกุลเดียวกัน จากการศึกษาการวิวัฒนาการโดยใช้เครื่องมือศึกษาระดับโมเลกุล พบว่าบรรพบุรุษของพิทูเนีย คาลิบรากัวและสกุลอื่นในเผ่า Petunieae มีระยะห่างทางพันธุกรรมที่ห่างกันมาก (Fregonezi *et al.*, 2013)

พิทูเนียเป็นไม้ดอกพุ่มต้นเดี่ยว ทรงพุ่มสมมาตรตามรัศมี ส่วนใหญ่เป็นพืชรปีเดียว เป็นไม้เนื้ออ่อน ลำต้นสูงประมาณ 30 เซนติเมตร ใบคล้ายใบยาสูบ แต่มีขนาดเล็กกว่า ใบกว้างประมาณ 5 เซนติเมตร ยาว 8-10 เซนติเมตร มีขนอยู่ทั่วไป ตามใบมีต่อมสร้างยางเหนียว ลักษณะใบเป็นรูปไข่ ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ ดอกมีรูปร่างเป็นรูปกรวย ดอกมีทั้งชนิดดอกเดี่ยวหรือดอกช่อ วงกลีบเลี้ยงมีสันไม่ชัดเจนหรือเป็นสันเว้าลึก การเรียงกลีบเป็นแบบช้อนเหลื่อม กลีบรองดอก แยกเป็น 5 แฉก มีคอดอกยาว ไม่มีกึ่งงัน (brachyblast) อับละอองเรณูมีสี่เหลี่ยม สีส้มเงิน หรือสีม่วง

คาลิบรากัวเป็นไม้ดอกพุ่มต้นเดี่ยว ทรงพุ่มสมมาตรตามรัศมีหรือด้านข้าง เป็นพืชรปีเดียวหรือหลายปี เป็นไม้เนื้อแข็ง มีลักษณะคล้ายคลึงกับพิทูเนีย ใบยาวเรียวขนาดเล็ก ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ แต่ไม่มีขนที่มีต่อมสร้างยางเหนียวเหมือนกับพิทูเนีย ดอกรูปกรวย ดอกเป็นชนิดดอกเดี่ยว วงกลีบเลี้ยงมีสัน 5 หรือ 10 อัน หักเว้าแคบไปถึงส่วนปลาย มีสีดอกหลากหลายกว่าพิทูเนีย อาจมีหรือไม่มีกึ่งงัน อับละอองเรณูมีสี่เหลี่ยม

ยาสูบ อยู่ในวงศ์ Solanaceae เป็นไม้ล้มลุก สูง 0.6 - 2 เมตร ตามลำต้นและยอดมีขนอ่อนปกคลุม ทุกส่วนของต้นมีต่อมสร้างน้ำยางเหนียว ใบเป็นใบเดี่ยวออกเรียงสลับ รูปไข่แกมขอบขนาน กว้าง 10 - 20 เซนติเมตร ยาว 30 - 60 เซนติเมตร ปลายใบมน โคนใบเรียวสอบ ท้องใบและหลังใบมีขนปกคลุม ขอบใบเรียบและเป็นคลื่นเล็กน้อย ดอก เป็นดอกช่อออกที่ปลายยอด มีกลีบดอก สีชมพูปนขาว 5 กลีบ ส่วนโคนเชื่อมติดกันเป็นรูปประฆัง ปลายกลีบแหลม มีขนขาวปกคลุม กลีบเลี้ยงสีเขียว ปลายแยกเป็นแฉกแหลม ผล เป็นผลแห้ง รูปขอบขนาน ผลอ่อนสีเขียว เมื่อแก่สีน้ำตาล แตกออกได้ ด้านในมีเมล็ดสีน้ำตาลจำนวนมาก (Gerats and Strommer, 2009)

กระบวนการสร้างรงควัตถุในกลีบดอกพิทูเนีย

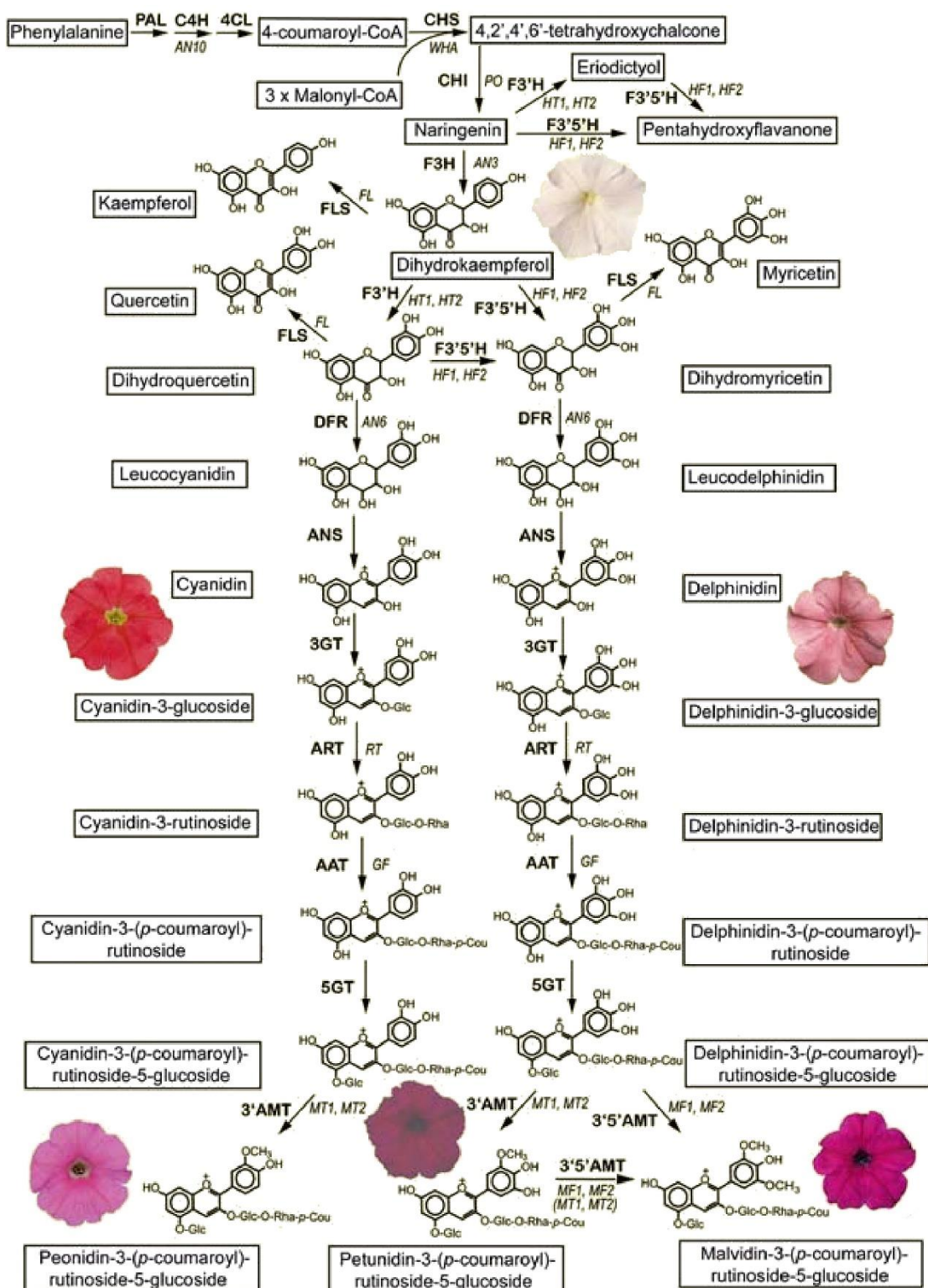
สีของดอกในวงกลีบดอกของพิทูเนียเกิดจากหลายปัจจัย เช่น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและองค์ประกอบของสารโดยการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน การสะสมแอนโทไซยานินในเนื้อเยื่อ รูปร่างของเซลล์และการจัดเรียงเนื้อเยื่อชั้นผิวกลีบดอก และค่า pH ในแวคิวโอล โดยเมื่อมีค่า pH เป็นกรดอ่อนๆ ประมาณ pH 5 จะแสดงสีแดง และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเมื่อมีค่าความเป็นกรดลดลง

กระบวนการสร้างรงควัตถุในกลีบดอกพิทูเนีย เริ่มจากเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) เป็นเอนไซม์อันดับแรกในวิถีการสังเคราะห์สาร flavonoid เป็นเอนไซม์ทำหน้าที่รวมโมเลกุลของ malonyl-CoA 3 โมเลกุลเข้ากับ 4-coumaryl-CoA ได้เป็นสารประกอบ naringenin-chalcone (tetrahydroxychalcone) การสะสมสาร chalcone สามารถแสดงสีเหลืองในกลีบดอกและอับละอองเรณู แต่ทว่าการสะสมสาร chalcone ในเนื้อเยื่อพบได้ยาก เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ chalcone flavanone isomerase (CHI) จะเปลี่ยนสาร chalcone อย่างรวดเร็ว เป็นสารฟลาโวนน naringenin ที่ไม่มีสี จากนั้นสาร naringenin จะถูกเปลี่ยนเป็นสาร dihydrokaempferol โดยการทำงานของเอนไซม์ flavanone 3 β -hydroxylase (F3H) ซึ่งยังคงเป็นสารไม่มีสี จากนั้น dihydrokaempferol จะถูกเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) ในตำแหน่ง B-ring ของ dihydrokaempferol โดยการทำงานของเอนไซม์ flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) และ flavonoid 3'5'-hydroxylase (F3'5'H) ซึ่งจุดนี้จะมีความสำคัญมากต่อการกำหนดสีของดอก ถ้าการเติมหมู่ไฮดรอกซิลเกิดที่ตำแหน่ง 3' จะได้สาร dihydroquercetin ซึ่งเมื่อสิ้นสุดวิถีจะได้เป็นรงควัตถุในกลุ่ม cyanidin ให้โทนสีแดงหรือบานเย็น ในขณะที่ถ้าการเติมหมู่ไฮดรอกซิลเกิดที่ตำแหน่ง 5' จะได้สาร dihydromyricetin ซึ่งเมื่อสิ้นสุดวิถีจะได้เป็นรงควัตถุในกลุ่ม delphinidin ให้โทนสีน้ำเงินหรือม่วง ในพืชบางชนิด เช่น กุหลาบและคาร์เนชั่นจะไม่มีเอนไซม์ F3'5'H ทำให้พืชกลุ่มนี้ไม่สามารถให้ดอกสีน้ำเงินได้ตามธรรมชาติ จากนั้นสาร dihydroflavonols จะถูกเปลี่ยนเป็น leucoanthocyanidins โดยเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) ในพิทูเนียจะพบยีน *dfr* 3 ชนิด คือ *dfr-A*, *dfr-B* และ *dfr-C* แต่ในการแสดงออกที่เนื้อเยื่อดอกจะปรากฏเพียง *dfr-A* เท่านั้น ซึ่งการแสดงออกของยีน *dfr-A* จะถูกกระตุ้นในช่วงการพัฒนาของดอกและมีการแสดงออกถึงจุดสูงสุดในระยะก่อนกลีบดอกบาน โดยทั่วไปการทำงานของเอนไซม์ DFR ในพิทูเนียนั้นจะเปลี่ยนสาร dihydromyricetin เป็น leucodelphinidin เนื่องจาก dihydroquercetin พบได้น้อย และไม่สามารถเปลี่ยน dihydrokaempferol เป็น pelargonidin จึงเป็นเหตุผลว่าพิทูเนียพันธุ์กลายที่มีดอกสีส้ม ซึ่งเกิดจากการสะสมของ pelargonidin ไม่พบตามธรรมชาติ โดยลักษณะนี้เกิดจากการถ้ายีน *dfr* ที่โคลนจากข้าวโพด เยอบีร่า หรือกุหลาบ ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ DFR ที่เปลี่ยนสาร

dihydrokaempferol เป็น leucopelargonidin และเมื่อสิ้นสุดวิถีได้เป็น Pelargonidins ที่ให้สีส้ม อีฐหรือส้มแดง

สาร leucocyanidin และ leucodelphinidin ที่ไม่มีสี จะถูกเปลี่ยนเป็น anthocyanidins ซึ่งมีสี โดยเอนไซม์ anthocyanidin synthase (ANS) จากนั้นสาร anthocyanidins จะผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น การเติมหมู่น้ำตาล (glycosylation) การเติมหมู่เอซิล (acylation) และการเติมหมู่เมทิล (methylation) โดยสาร anthocyanidins ที่พบในพืชเนื้อจะเกิดการเติมหมู่น้ำตาลที่ตำแหน่ง 3- เป็น anthocyanidin-3-glucosides โดยเอนไซม์ anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase (3GT) และสาร anthocyanidin-3-glucosides จะเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่น้ำตาล rhamnose (Rhamnosylation) โดยเอนไซม์ rhamnosyltransferase (ART) การเติมหมู่เอซิลด้วย *p*-coumaric acid โดยการทำงานของเอนไซม์ anthocyanidin 3-rutinoside acyltransferase (AAT) โดยจะเกิดขึ้นได้ต้องมีการเติมหมู่น้ำตาลที่ตำแหน่ง 5- โดย anthocyanidin 5-O-glucosyltransferase (5GT)

การเติมหมู่เมทิลใน anthocyanin ในพืชเนื้อจะขึ้นอยู่กับยีนสองคู่ คือ *MT1* กับ *MT2* ซึ่งควบคุมการเติมหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง 3- และ *MF1* กับ *MF2* ซึ่งควบคุมการเติมหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง 3- และ 5-เมื่ออัลลีล *MT1* หรือ *MT2* แสดงลักษณะเด่น จะเกิดการสังเคราะห์ petunidin (สีม่วง) หรือ peonidin (สีบานเย็น) เป็นหลัก อาจพบ malvidin บ้างได้สูงสุดประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ของแอนโทไซยานินทั้งหมด ส่วนเมื่ออัลลีล *MF1* กับ *MF2* แสดงลักษณะเด่น จะเกิดการสังเคราะห์ malvidin (สีน้ำเงินหรือสีน้ำเงินม่วง) เป็นหลัก ดังภาพที่ 1 (Gerats and Strommer, 2009)



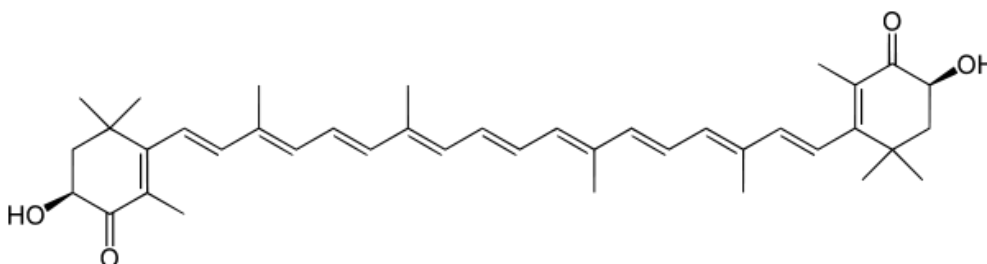
ภาพที่ 1 กระบวนการสร้างสาร flavonoid ในพืชมะเขือเทศ

ที่มา: Gerats and Strommer (2009)

แอสตาแซนทิน

สารแอสตาแซนทิน (3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione) เป็นสารรงควัตถุในกลุ่มแคโรทีนอยด์ โดยแคโรทีนอยด์เป็นกลุ่มรงควัตถุสำคัญที่สังเคราะห์ขึ้นได้เองตามธรรมชาติสามารถพบได้ทั่วไปในแบคทีเรีย พืช รา และสัตว์ ให้สีตั้งแต่สีเหลืองถึงสีแดง สีของดอกไม้ ผลไม้และผักจะขึ้นอยู่กับสารของแคโรทีนอยด์ทั้งในชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ แคโรทีนอยด์ยังพบได้ในสัตว์จำพวกแมลง ปลา และนก นอกจากนี้มีการใช้แคโรทีนอยด์ในอุตสาหกรรมอาหาร เพราะแคโรทีนอยด์เป็นสารตั้งต้นในการสร้างวิตามินเอ เป็นส่วนสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์ จึงมีการใช้ในอุตสาหกรรมด้านเภสัชกรรม อาหารเสริม ผสมในอาหารสัตว์ และเป็นสารให้สีในเครื่องสำอาง แคโรทีนอยด์ถูกสร้างในสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงและในแบคทีเรียหรือเชื้อราบางชนิด ส่วนในสัตว์ไม่สามารถสร้างได้แต่สามารถได้รับจากอาหาร ซึ่งการเพิ่มการสังเคราะห์ทั้งในชนิดและปริมาณของการสร้างแคโรทีนอยด์ในพืชจะเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรรม และเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมจากที่กล่าวในข้างต้น (Mann *et al.*, 2000)

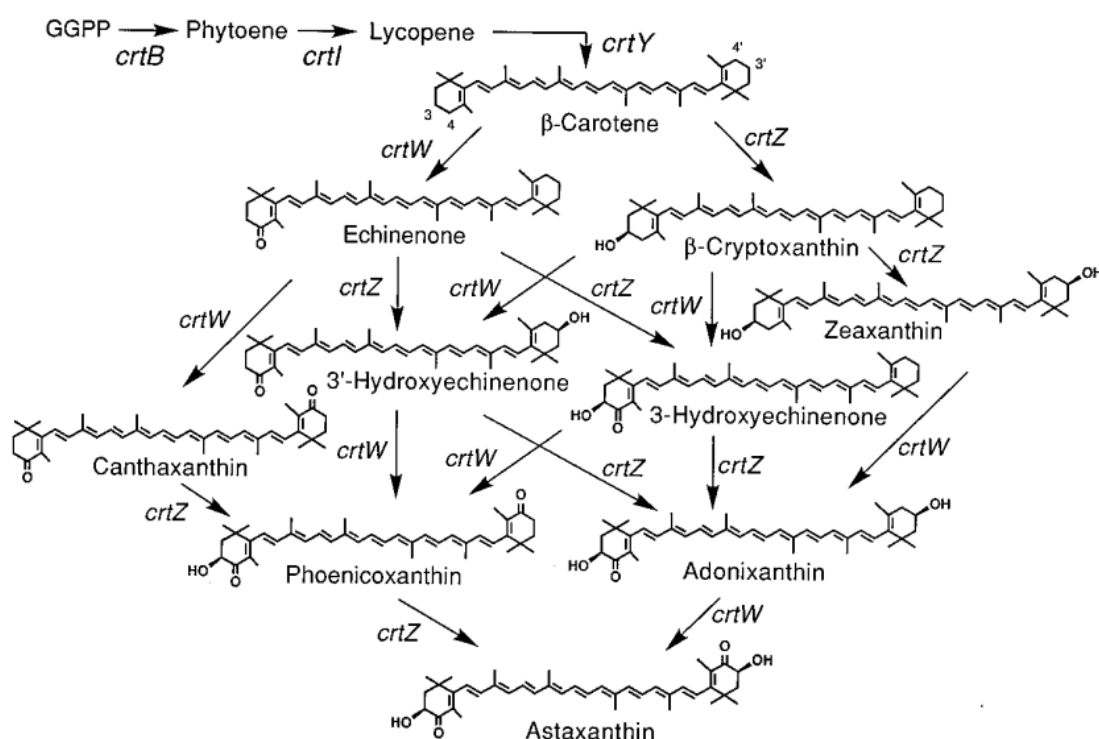
สารแอสตาแซนทินสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำบางชนิด เช่น แบคทีเรีย *Brevundimonas* sp., ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. หรือสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* นอกจากนี้ยังสามารถพบสารแอสตาแซนทินในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงบางชนิดด้วยเช่นกัน เช่น ขนและผิวหนังในนก flamingo, scarlet ibis และ roseate spoonbill หรือสัตว์จำพวกกิ้งก่าปูปบางชนิด หรือในปลาแซลมอน นอกจากนี้พบในพืชในสกุล *Adonis* เช่น summer pheasant's eye (*Adonis aestivalis*) (Cunningham and Gantt, 2011)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของสารแอสตาแซนทิน

มีงานวิจัยหลายงานที่ตัดต่อพันธุกรรมให้มีการสร้างแอสตาแซนทินในพืชที่สามารถบริโภคได้ เช่น ในข้าวโพด (*Zea mays*; Zhu *et al.*, 2008), มันฝรั่ง (*Solanum phureja*, *S. tuberosum*; Morris *et al.*, 2006; Gerjets and Sandmann, 2006), มะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*; Fraser *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2013), แครอท (*Daucus carota*; Jayaraj *et al.*, 2008), rapeseed (*Brassica napus*; Fujisawa *et al.*, 2009) และผักกาดหอม (*Lactuca sativa*; Harada *et al.*, 2014)

ยีน *crtW* พบในสิ่งมีชีวิตบางชนิด เช่น แบคทีเรียที่อาศัยในน้ำเค็ม *Brevundimonas* sp., ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. หรือสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* และพบในไม้ดอก *Adonis aestivalis* โดยมีการสะสมแอสตาแซนทินที่กลีบดอก โดยยีน *crtW* สร้างเอนไซม์ β, β -carotenoid 4,4'-ketolase (4,4'-oxygenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน β -carotene เป็นสารแอสตาแซนทิน (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์สารแอสตาแซนทินที่พบใน *Agrobacterium aurantiacum*

ที่มา: Misawa *et al.* (1995)

การถ่ายยีนเข้าสู่พืช

การถ่ายยีนในพืชทำได้สำเร็จในพืชหลายชนิด เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนหรือกระบวนการต่างของพืช และการสร้างพืชตัดต่อพันธุกรรม (transgenic plant) ที่มีลักษณะตามที่เราต้องการได้ในระยะเวลาสั้น จึงเป็นประโยชน์ในการดำเนินการปรับปรุงพันธุ์พืช เทคนิคการถ่ายยีนในพืชมีหลายวิธี เช่น

1. การถ่ายยีนโดยตรง (direct gene transfer) เป็นการส่งถ่ายยีนเข้าสู่โปรโทพลาสต์ของพืช (เซลล์พืชที่ปราศจากผนังเซลล์) โดยไม่ต้องอาศัยพาหะซึ่งเป็นตัวนำสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์ เช่น การใช้สารเคมี polyethylene glycol (PEG)

2. การถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) โดยกระแสไฟฟ้าจะทำให้เกิดช่องหรือรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของโปรโทพลาสต์ ในขณะที่เซลล์โปรโทพลาสต์รวมกับสารละลายดีเอ็นเอหรือโครโมโซม ดีเอ็นเอจะมีโอกาสเข้าสู่โปรโทพลาสต์ ขนาดของกระแสไฟฟ้าที่ใช้และเวลาขึ้นอยู่กับขนาดของโปรโทพลาสต์

3. การถ่ายยีนโดยใช้เข็มฉีดยา (microinjection) วิธีนี้จะมีความจำกัดในพืชเนื่องจากพืชมีแวคิวโอลสำหรับเก็บเอนไซม์หรือสารพิษบางชนิด ขณะฉีดจึงต้องระมัดระวังไม่ให้โดนแวคิวโอล เพราะถ้าเมื่อแวคิวโอลแตก อาจจะทำให้เซลล์ตายได้

4. การถ่ายยีนโดยใช้การใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment หรือ biolistic technique) โดยเคลือบดีเอ็นเอที่ต้องการถ่ายเข้าสู่เซลล์บนอนุภาคทังสเตนหรือทองคำขนาดเล็กประมาณ 1-4 ไมครอน จากนั้นยิงด้วยความเร็วสูง อนุภาคจะเข้าสู่ภายในเซลล์พืชโดยนำเอาดีเอ็นเอเข้าไปด้วย

5. การถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ (*Agrobacterium*-mediated gene transfer)

Agrobacterium เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถเข้าสู่ต้นพืชได้ในบริเวณที่มีบาดแผล ทำให้เกิดเป็นปุ่มปม เรียกว่า crown gall disease ภายในเซลล์ *Agrobacterium* มี extra-chromosomal plasmid ขนาดใหญ่ ขนาดประมาณ 140-235 กิโลเบส โดยพบว่ามี Ti (tumor inducing) plasmid ใน *A. tumefaciens* และ Ri (root inducing) plasmid ใน *A. rhizogenes* ซึ่งเนื้อเยื่อปุ่มปมที่เกิดจากการบุกรุกของ *A. tumefaciens* จะมีดีเอ็นเอบางส่วนของพลาสมิด Ti

ขนาดประมาณ 20 กิโลเบสถูกถ่ายทอดเข้าไปและแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืช เรียกดีเอ็นเอส่วนนี้ว่า transferred DNA (T-DNA) การแทรกตัวของ T-DNA ซึ่งมียีนสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซินและไซโตไคนินเข้าสู่จีโนมของพืช ส่งผลให้พืชเกิดการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วแต่ไม่พัฒนาไปเป็นยอดหรือรากได้ กระบวนการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชควบคุมโดยกลุ่มยีนที่เรียกว่า virulence ซึ่งอยู่ใน Ti plasmid กระบวนการส่งถ่ายนี้จะถูกกระตุ้นด้วยสารประกอบฟิโนลิกจากพืช คือ acetosyringone ซึ่งพืชจะสร้างและปลดปล่อยสารนี้เมื่อเกิดบาดแผล ต่อมานักวิทยาศาสตร์ได้ศึกษากลไกการถ่ายยีนเหล่านี้ พบว่าสามารถตัดยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคออกแล้วใส่ยีนใหม่ที่ต้องการแทนที่ยีนที่ก่อให้เกิดโรคได้ เมื่อพืชถูกบุกรุกด้วยเชื้อ ยีนที่ต้องการจะถูกถ่ายเข้าสู่พืชได้ การถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยใช้ *Agrobacterium* มีหลายวิธี เช่น การเลี้ยง *Agrobacterium* ร่วมกับโปรโทพลาสต์ (co-cultivation with protoplast) หรือชิ้นส่วนใบที่ตัดเป็นรูปวงกลม (leaf disk method) หรือชิ้นส่วนพืชอื่นๆ เช่น ใบเลี้ยง ก้านใบ ลำต้นอ่อน ตัดเป็นชิ้นเพื่อให้เกิดบาดแผล (สุรินทร์, 2548)

งานวิจัยด้านการถ่ายยีนที่เกี่ยวข้อง

มีงานวิจัยหลายงานที่ทำการศึกษาการถ่ายยีนเพื่อเปลี่ยนแปลงวิธีการสร้างรงควัตถุในพืช เช่น Mann *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาโดยเปลี่ยนแปลงวิธีการสร้างแคโรทีนอยด์ในยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) เพื่อให้มีการสร้างแอสตาแซนทีนในโครโมพลาสต์ โดยถ่ายยีน *crtO* จากสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ β -carotene ketolase โดยยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถสร้างแอสตาแซนทีนสะสมในโครโมพลาสต์ในเนื้อเยื่อของรังไข่ ส่งผลให้รังไข่มีการเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีแดงเนื่องจากการสะสมสารแอสตาแซนทีน และสารสี-โตแคโรทีนอยด์ตัวอื่นๆ

Horsch *et al.* (1985) ได้ถ่ายยีนโดยเลี้ยงชิ้นส่วนของใบพืชร่วมกับอะโกรแบคทีเรียที่มีการดัดแปลงส่วนของพลาสมิดที่มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน (*nptII*) และยีนสร้างสาร nopaline (*nos*) ในพืทูเนีย (*Petunia hybrida*) 'Mitchell' ในยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) 'Samson', 'Havana 425' และในมะเขือเทศ 'L2' ในอาหารที่มี BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นย้ายลงอาหารสูตรเดิมที่มีการเติมกานามัยซิน 300 มิลลิกรัมต่อลิตรและคาเบนิซิลิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีการเกิดตาพิเศษภายใน 2-4 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายยอดลงอาหารใหม่ที่มีกานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และคาเบนิซิลิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเกิดรากจึงนำออกปลูกลงดิน พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีการสร้างสาร nopaline และมีความต้านทานต่อกานามัยซิน เมื่อตรวจสอบพืชที่ถ่ายยีนด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนพืชและใช้ดีเอ็นเอพลาสมิดเดียวกับที่ใช้ในการ

ถ่ายยีนเป็นตัวติดฉลากพบการปรากฏแถบดีเอ็นเอซึ่งสามารถยืนยันว่าพืชได้รับการถ่ายยีนเหล่านี้

มีงานวิจัยหลายงานที่ใช้วิธีการถ่ายยีนโดยใช้การเลี้ยงชิ้นส่วนใบร่วมกับอะโกรแบคทีเรียโดยอ้างอิงวิธีของ Horsch *et al.* เช่น Zhu *et al.* (2007) ถ่ายยีน *crtO* จากไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. เข้าสู่ยาสูบ (*Nicotiana glauca*) ยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนพบการสร้างสารคีโตแคโรทีนอยด์ ทั้งในใบและดอก เช่น 4'-ketolutein, echinenone, 3'-hydroxyechinenone และ 4-ketozeaxanthin แต่ไม่พบการสร้างสารแอสตาแซนทิน

Gerjets *et al.* (2007) ถ่ายยีน *crtO* และ *crtW* จากไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* เข้าสู่ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) โดยยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนพบการสร้างสารคีโตแคโรทีนอยด์ ทั้งในใบและดอก เช่น 4-ketolutein, 3-hydroxyechinenone, 4-ketozeaxanthin และ 3'-hydroxyechinenone

Mori *et al.* (2004) ได้ถ่ายยีน *VmFH1* จาก *Vinca major* เข้าสู่พิทูเนีย ซึ่งเป็นยีนที่สร้างเอนไซม์ 3',5'-hydroxylase เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoid ที่มีสีน้ำเงินหรือสีม่วง ส่งผลให้ดอกพิทูเนียที่ได้รับการถ่ายยีนมีการสร้างแอนโทไซยานินที่ให้สีม่วงเพิ่มมากขึ้น ทำให้มีการเปลี่ยนสีของดอกจากสีแดงเป็นสีแดงเข้ม เนื่องจากการสร้าง 3',5'-hydroxylated anthocyanins เพิ่มมากขึ้น

Harada *et al.* (2014) ทำการทดลองถ่ายยีน *crtZ* และ *crtW* จากแบคทีเรีย *Brevundimonas* sp. strain SD212 เข้าสู่ผักกาดหอม (*Lactuca sativa*) โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค particle bombardment โดยเคลือบดีเอ็นเอกับอนุภาคทองคำแล้วยิงเข้าสู่ด้านหลังใบของชิ้นส่วนใบของผักกาดหอมที่เลี้ยงบนอาหารที่มี BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดการถ่ายยีนสำเร็จและชักนำให้เจริญเป็นต้นได้ ผักกาดหอมที่ได้รับการถ่ายยีนมีการสร้างสารคีโตแคโรทีนอยด์ในลำต้น ใบ และดอก

มีงานวิจัยที่ทำการถ่ายยีนเข้าสู่พิทูเนียโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย เช่น การถ่ายยีน *dfr* จาก *Agapanthus praecox* subsp. *orientalis* (Leighton) Leighton เข้าสู่พิทูเนีย *Petunia hybrida* 'W85' ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไม่มียีน *dfr* ดอกมีสีขาว โดยอ้างอิงวิธีของ Horsch *et al.* พิตูเนียที่ได้รับการถ่ายยีนจะมีสีม่วงแดงซึ่งแสดงว่ายีน *dfr* จาก *A. praecox* subsp. *orientalis* สามารถแสดงออกในพิทูเนีย นอกจากนี้ยังมีการยืนยันว่ามีการถ่ายยีนสำเร็จโดยใช้การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุล (Mori *et al.*, 2014) และถ่ายยีน *dfr* จาก *Calibrachoa hybrida* เข้าสู่พิทูเนีย (*Petunia hybrida*) 'Lx', '9702' และ '2512' โดยอ้างอิงวิธีของ Horsch *et al.* เช่นกัน แต่มี

การเปลี่ยนสูตรอาหารโดยใช้ IBA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้ยาปฏิชีวนะ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และกานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตรสำหรับการคัดเลือกชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีน (Chu *et al.*, 2014) ซึ่งจากงานวิจัยทั้ง 2 งานนี้ พืชเนยที่ได้รับการตัดต่อพันธุกรรมเกิดการเปลี่ยนสีของกลีบดอก เนื่องจากสามารถสร้างเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนสารกลุ่ม dihydroflavonols เป็นสารกลุ่ม leucoanthocyanidins หลังจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสารแอนโทไซยานินซึ่งมีสีต่อไป

Thirukkumaran *et al.* (2007) ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดต้นและการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียในพืชเนย (*Petunia hybrida*) 'Mitchell' โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มี Thidiazuron (TDZ) สำหรับการชักนำชิ้นส่วนของพืชเนยให้เกิดตาพิเศษ (adventitious bud) และเจริญเป็นต้น โดยความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสมสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ดีที่สุด คือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่เมื่อความเข้มข้นที่สูงเช่น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรจะยับยั้งการเกิดตาพิเศษ

Azadi *et al.* (2010) ทำการถ่ายยีนใน *Lilium × formolongi* โดย *A. tumefaciens* strain EHA101 โดยบนดีเอ็นเอพลาสมิดมียีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ 7 ตัว ประกอบด้วยยีนจากสิ่งมีชีวิต *Pantoea ananatis* (*crtE*, *crtB*, *crtI* และ *crtY*), *Brevundimonas* sp. strain SD212 (*crtZ* และ *crtW*) และ *Paracoccus* sp. strain N81106 (*idi*) ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีการสร้างสารแอสตาแซนทิน และสารคีโตแคโรทีนอยด์ตัวอื่นๆ สำเร็จ

Husunuma *et al.* (2008) ทำการถ่ายยีน *crtZ* และ *crtW* จาก *Brevundimonas* sp. strain SD212 ในยาสูบ *N. tabacum* L. 'Xanthi' โดยการใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment) โดยออกแบบเวกเตอร์ให้เกิดการแทรกของยีนในตำแหน่งของดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ (transplastomic engineering) ต้นยาสูบที่ได้รับถ่ายยีนมีการสร้างสารแอสตาแซนทินในปริมาณที่มากกว่าการถ่ายยีนโดยอะโกรแบคทีเรียที่เกิดการแทรกของชุดยีนบนโครโมโซมในนิวเคลียส

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง
 - 1.1 ต้นยาสูบ, *Nicotiana tabacum* L. 'Petit Havana SR1'
 - 1.2 ต้นพิทูเนีย, *Petunia hybrida* Surfinia® 'Patio Yellow' (Suntory Flowers Ltd., Japan)
 - 1.3 ต้นพิทูเนีย, *Petunia hybrida* 'Yellow' (Sakata Seed Corp., Japan)
 - 1.4 ต้นคาลิบรากัว, *Calibrachoa × hybrida* Million Bells® 'Neon Yellow' (Suntory Flowers Ltd., Japan)
2. เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่พืช
A. tumefaciens สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอเวกเตอร์ที่มียีน *crtW* จาก *Brevundimonas* sp. strain SD212 ที่ต่อกับ transit peptide (tp) แทรกในตำแหน่ง multiple cloning site 1 ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pRI201-AN (TaKaRa, Japan) ภายใต้โปรโมเตอร์ Cauliflower mosaic virus 35S และมียีน *nptII* ซึ่งเป็นยีนต้านทานกานามัยซินเพื่อใช้สำหรับการคัดเลือกชิ้นส่วนใบพืชที่ได้รับการถ่ายยีน สร้างโดยคุณ Tomohiro Kitayama, Tokyo University of Agriculture and Technology (ภาพที่ 8 และ 9)
3. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และการถ่ายยีน
 - 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น ตู้ Laminar air flow ดำมืด ใบมีดผ่าตัด ปากคีบ จานเพาะเชื้อ
 - 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง *A. tumefaciens* และเนื้อเยื่อพืช เช่น หม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง เตาไมโครเวฟ เครื่องชั่งไฟฟ้า ช้อนตักสาร เครื่องกวนสาร แท่งแม่เหล็ก เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง กระบอกตวง บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ ไมโครปิเปต เป็นต้น
 - 3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการถ่ายยีน เช่น เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง หลอดเซ็นทริฟิวซ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ไมโครปิเปต
 - 3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการตรวจสอบการถ่ายยีนระดับโมเลกุล เช่น เครื่อง TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Touch (TaKaRa, Japan) สำหรับการทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR), เครื่อง NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA), เครื่อง Mupid-2plus Electrophoresis (Optima, Japan) เป็นต้น

4. สารเคมี

4.1 สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ซูโครส และ gellan gum (Wako, Japan) เป็นต้น

4.2 สารเคมีสำหรับการถ่ายยีน เช่น กานามัยซิน; kanamycin sulfate (Wako Pure Chemical, Japan), meropenem (Sumitomo Dainippon Pharma, Japan), acetosyringone (Wako Pure Chemical, Japan)

4.3 สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง *Agrobacterium* เช่น สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสูตร yeast extract peptone (YEP)

4.4 สารเคมีสำหรับการตรวจสอบการถ่ายยีนระดับโมเลกุล เช่น สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอ, สารเคมีสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Japan), agarose gel (Wako, Japan), PCR Amplification Kit (TaKaRa, Japan), TaKaRa RNA PCR kit (AMV) Ver.3.0 (TaKaRa, Japan), Agarose gel (Wako Pure Chemical, Japan), ดีเอ็นเอมาตรฐาน Wide-Range DNA Ladder 50-10,000 คู่เบส (TaKaRa, Japan), ไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *crtW* และ *nptII* ที่มีลำดับเบสจำเพาะกับ *tp-crtW* และ *nptII* (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับเบส
<i>crtW</i>	<i>tp-crtW</i>	5'-TCTAGAGAGCTTTGCAATTCA-3' 5'-GGATCCTCAAGACTCTCCTCT-3'
<i>nptII</i>	<i>nptII</i>	5'-CTGAATGAACTGCAGGACGAGG-3' 5'-GCCAACGCTATGTCCTGATAGC-3'



ภาพที่ 4 ยาสูบ, *Nicotiana tabacum* L. 'Petit Havana SR1'



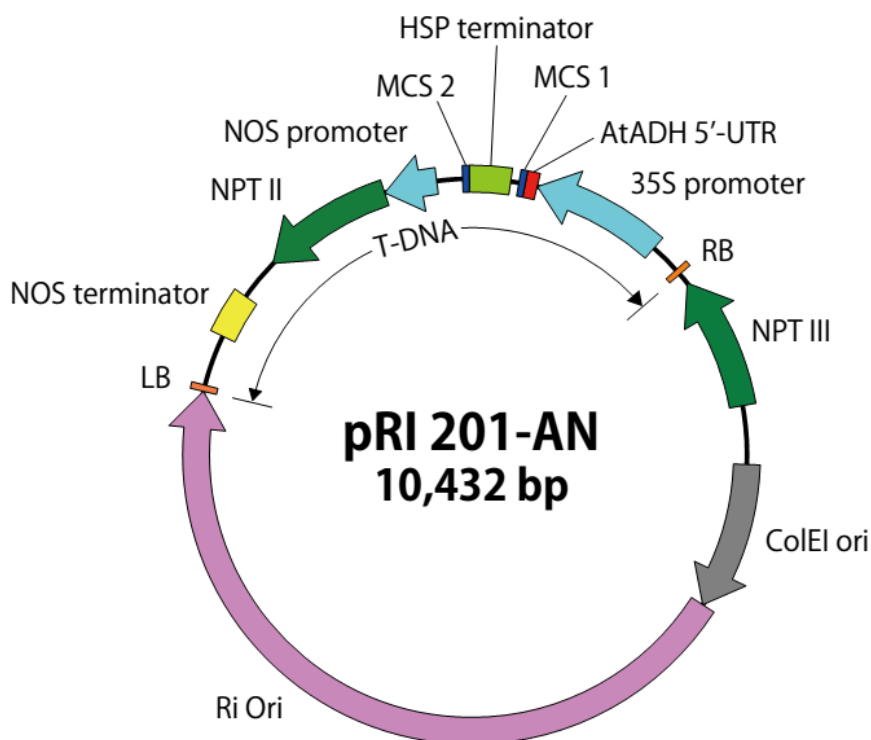
ภาพที่ 5 พิทูเนีย, *Petunia hybrida* Surfinia® 'Patio Yellow'



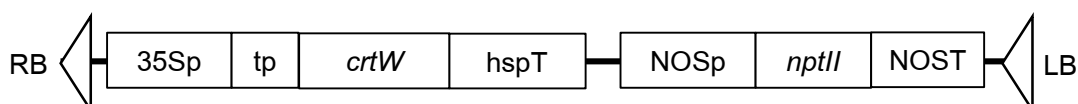
ภาพที่ 6 พิทูเนีย, *Petunia hybrida* 'Yellow'



ภาพที่ 7 คาลิบรากัว, *Calibrachoa* × *hybrida* Million Bells® 'Neon Yellow'



ภาพที่ 8 แผนที่โครงสร้างและขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอ pRI201-AN (Takara, Japan) ที่ใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 9 แผนภาพแสดงพลาสมิดที่มียีน *crtW* ในตำแหน่ง MCS 1 บนพลาสมิดดีเอ็นเอ pRI201-AN (TaKaRa, Japan) *RB* right border, *LB* left border, *35Sp* cauliflower mosaic virus 35S promoter, *tp* transit peptide, *hspT* heat shock protein terminator, *nptII* neomycin phosphotransferase, *NOSp* nopaline synthase promoter และ *NOST* nopaline synthase terminator

วิธีการ

การเตรียมพืชสำหรับการทดลอง

ยาสูบ

แช่เมล็ดในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่มีความเข้มข้นของคลอรีน 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสม Tween-20 ปริมาตร 1-2 หยด เป็นระยะเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ย้ายเมล็ดลงอาหารแข็งสูตร MS ที่มีซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ gellan gum 2 เปอร์เซ็นต์

พืชน้ำและคาลิบรากัว

นำลำต้นที่มีตาข้างมาตัดเป็นชิ้นให้ได้ความยาวประมาณ 1 นิ้ว ล้างด้วยน้ำไหลผ่านให้สะอาด แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (Antiformin®, Wako Pure Chemical, Japan) ที่มีความเข้มข้นของคลอรีน 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสม Tween-20 1-2 หยด เป็นระยะเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ย้ายชิ้นส่วนพืชลงอาหารแข็งสูตร MS ที่มีซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ gellan gum 2 เปอร์เซ็นต์

การเตรียมเชื้อ *Agrobacterium* สำหรับการถ่ายยีน

นำ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิดที่มียีน *crtW* ที่ต่อกับโปรโมเตอร์ 35S ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาเพิ่มจำนวนในอาหารเหลวสูตร YEP 10 มิลลิลิตร เติมนานามัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน เชื้อ *A. tumefaciens* จะมีการเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว โดยอาหารเหลวจะมีลักษณะขุ่น จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้งแล้วเติมอาหารเหลวสูตร YEP 10 มิลลิลิตร เติม acetosyringone 10 มิลลิกรัมต่อลิตร คูดสารละลายขึ้นลงให้สารละลายเข้ากัน ได้เป็นสารแขวนลอยที่ใช้สำหรับการถ่ายยีน

การทดลองที่ 1 การถ่ายยีนในยาสูบโดยใช้ *Agrobacterium*

เทสารแขวนลอย *A. tumefaciens* สำหรับถ่ายยีนลงบนจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษกรองที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำชิ้นส่วนใบวางบนกระดาษกรองที่ชุ่มด้วยสารแขวนลอย *A. tumefaciens* ตัดชิ้นส่วนใบให้มีขนาดประมาณ 5 มิลลิเมตร จากนั้นซับสารแขวนลอยออกบางส่วนด้วยกระดาษกรองที่นิ่งฆ่าเชื้อ และย้ายชิ้นส่วนใบลงบนอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* ร่วมกับชิ้นส่วนใบพืช (co-cultivation medium) สูตร MS ที่เติม acetosyringone

20 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ gellan gum 2 เปอร์เซ็นต์ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้ว 3 ครั้งแล้วย้ายลงอาหาร สำหรับคัดเลือกชิ้นส่วนส่วนพืชที่เกิดการถ่ายยีน (selection medium) สูตร MS ที่มียาปฏิชีวนะคือ กานามัยซิน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร, meropenem 10 มิลลิกรัมต่อลิตร, BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ gellan gum 2 เปอร์เซ็นต์ ทำการย้ายชิ้นส่วนพืชลงอาหารใหม่ลงอาหารใหม่ทุกๆ 1 สัปดาห์ เพื่อป้องกันการเติบโตและกำจัด *A. tumefaciens* ในชิ้นส่วนพืชอย่างสมบูรณ์

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *crtW* และ *nptII* ในพืชที่ได้รับการถ่ายยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR)

การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนของพืช นำชิ้นส่วนพืชใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม TE buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และ SDS 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บดให้ละเอียด นำไปบดใน dry bath incubator อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม ammonium acetate 5 โมลาร์ ปริมาตร 110 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่อง vortex ประมาณ 1 นาที แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เก็บเฉพาะของเหลวส่วนใสด้านบนใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติม isopropanol 400 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาให้สารละลายเข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งของเหลวด้านบน เติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบาๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำอีกครั้งโดยทิ้งของเหลวด้านบน เติมเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งของเหลวด้านบน เปิดฝาให้เอทานอลระเหยออกจนหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 ไมโครลิตร วัดความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง NanoDrop 2000 spectrophotometer เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การทำพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบการมียีน *crtW* หรือ *nptII* โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน โดยเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Touch โดยใช้ชุด PCR Amplification Kit ใช้ TaKaRa Taq™ DNA Polymerase ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร, dNTP Mixture ปริมาตร 1.6 ไมโครลิตร และ 10X PCR Buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ โดยขั้นตอนแรกใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนที่สองใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามลำดับจำนวน 25 รอบ และขั้นตอนสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจสอบผลโดยการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis) โดยเติม 10X Loading Buffer (TaKaRa, Japan) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากนั้นแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอใน agarose 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1X TAE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 22 นาที เทียบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Wide-Range DNA Ladder 50-10,000 คู่เบส จากนั้นนำเจลมาย้อมด้วยสารละลาย Ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลได้แสงอัลตราไวโอเลต บันทึกภาพ

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *crtW* โดยเทคนิค RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)

การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

สกัดอาร์เอ็นเอรวมจากตัวอย่างที่ได้จากการถ่ายยีนโดยใช้ RNeasy Plant Mini Kit ตรวจสอบความเข้มข้นของตัวอย่างอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop 2000 spectrophotometer

การทำ RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)

ทำการรีเวอร์สทรานสคริปชันอาร์เอ็นเอรวมเป็น complementary DNA (cDNA) โดยใช้ TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 เติม AMV Reverse Transcriptase XL ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, RNase Inhibitor ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร, Oligo dT-Adaptor primer ปริมาตร

0.5 ไมโครลิตร, RNase Free distilled H₂O ปริมาตร 4.75 ไมโครลิตร, 10X RT-PCR Buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, dNTP Mixture ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ MgCl₂ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ขั้นตอนแรกใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ขั้นตอนที่สองใช้อุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และขั้นตอนสุดท้ายอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *crtW* ขั้นตอนแรกใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนที่สองใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามลำดับ จำนวน 25 รอบ และขั้นตอนสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจสอบผลโดยการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis) โดยเติม 10X Loading Buffer (TaKaRa, Japan) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ จากนั้นแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอใน agarose 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1X TAE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 22 นาที เทียบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Wide-Range DNA Ladder 50-10,000 คู่เบส จากนั้นนำเจลมาย้อมด้วยสารละลาย Ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต บันทึกภาพ

การตรวจสอบลักษณะของพืชที่ได้รับการถ่ายยีน

ดูลักษณะการเรียงตัวของเซลล์และการมีรงควัตถุโดยตัดเนื้อเยื่อตามขวาง เริ่มจากการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อโดยตัดชิ้นส่วนพืชให้มีขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร จุ่มชิ้นส่วนพืชในสารละลาย agar 4 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส เมื่อ agar แข็งตัว จึงใช้มีดตัด agar ที่มีชิ้นส่วนพืชให้มีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋ากว้างประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นนำตัวอย่างเนื้อเยื่อไปตัดตามขวางด้วยเครื่อง Microslicer รุ่น DTK-1000 (Dosaka-em, Japan) โดยตัดตามขวางชิ้นส่วนใบหนา 70 ไมโครเมตร และชิ้นส่วนจากดอกหนา 150 ไมโครเมตร ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง บันทึกภาพ

การตรวจสอบชนิดของรงควัตถุโดยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

ตรวจสอบชนิดของรงควัตถุที่พบในชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีน *crtW* เทียบกับชิ้นส่วนพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนโดยชั่งชิ้นส่วนพืชน้ำหนัก 0.1 กรัม บดชิ้นส่วนพืชพร้อมกับ silica gel น้ำหนัก 0.2 กรัมให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา นำใส่หลอดเซ็นทรีฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม diethyl ether ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลาประมาณ 1 นาที ดูเฉพาะสารละลายหยดเป็นหยดขนาดเล็กลงบนแผ่น TLC silica gel

aluminum sheet (Merck, Germany) จากนั้นจุ่มส่วนล่างของแผ่น TLC silica gel aluminum sheet ลงในสารละลาย petroleum ether : acetone สัดส่วน 8 ต่อ 2 ในแก้วระบบปิด เมื่อรงควัตถุเคลื่อนที่จากส่วนล่างถึงส่วนปลายของแผ่น TLC silica gel aluminum sheet จึงนำออกจากแก้ว ผึ่งให้สารละลายระเหยออกจนหมด บันทึกภาพ

การตรวจสอบสีของใบ

ตรวจสอบสีของใบพืชที่ได้รับการถ่ายยีนเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนในขอบเขตสีแบบ $L^*a^*b^*$ color space โดยเครื่อง CR-300 head Chroma Meter (Minolta, Japan) โดยทำการวัดค่าสามครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตาแซนทินโดยเทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC)

วิเคราะห์ปริมาณสารแอสตาแซนทินในตัวอย่างใบโดยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) โดยการเก็บตัวอย่างใบแช่ในไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างมาสกัดในตัวทำละลาย โดยชั่งตัวอย่าง 0.05 กรัม ละลายใน methanol 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง ดูดเอาเฉพาะส่วนใส กรองด้วย PTFE membrane ขนาด 40 ไมครอน จากนั้นฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าสู่เครื่อง HPLC รุ่น 10A VP (Shimadzu, Japan) โดยใช้ Symmetry C8 Column, $5\ \mu\text{m}$, $3.9\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$ (Waters, USA) ใช้ methanol และน้ำกลั่นอัตราส่วน 80 : 20 เป็นตัวละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) อัตราการไหลที่ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ระยะเวลา Retention time 30 นาทีต่อการทดลอง 1 ตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 474 นาโนเมตร ใช้สารแอสตาแซนทินมาตรฐาน ความเข้มข้น 16, 32, 64 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการทำการฟิสิกส์มาตรฐาน และวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตาแซนทินในสารละลายตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม LC solution (Shimadzu, Japan)

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และสารแคโรทีนอยด์รวมโดยวิธี Spectrophotometry

วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์รวมโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Wellburn (1994) โดยการชั่งตัวอย่างพืช 0.5 กรัมบดใน methanol 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง จากนั้นดูดสารละลายเฉพาะส่วนใสนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer รุ่น T80 (PG Instruments, United Kingdom) ที่ความยาวคลื่น

470, 653 และ 666 นาโนเมตร โดยบันทึกค่าด้วยโปรแกรม UVWin 5.1.1 (PG Instruments, United Kingdom) และคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์รวม ดังสมการ

$$\begin{aligned}\text{คลอโรฟิลล์เอ} &= [(15.65 \times A_{666}) - (7.34 \times A_{653})] \times \text{dilution} \\ \text{คลอโรฟิลล์บี} &= [(27.05 \times A_{653}) - (11.21 \times A_{666})] \times \text{dilution} \\ \text{แคโรทีนอยด์รวม} &= \frac{[(1000 \times A_{470}) - (2.86 \times C_a) - (129.2 \times C_b)]}{221}\end{aligned}$$

เมื่อ C_a คือ คลอโรฟิลล์เอ

C_b คือ คลอโรฟิลล์บี

A_{470} คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร

A_{653} คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 653 นาโนเมตร

A_{666} คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 666 นาโนเมตร

การทดลองที่ 2 การถ่ายยีนในพืชเนยและคาลิบรากัวโดยใช้ *Agrobacterium*

เทสารแขวนลอย *A. tumefaciens* สำหรับถ่ายยีนลงบนจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำชิ้นส่วนใบวางบนกระดาษกรองที่ชุ่มด้วยสารแขวนลอย *A. tumefaciens* จากนั้นตัดชิ้นส่วนใบให้มีขนาดประมาณ 5 มิลลิเมตร จากนั้นซับให้พอแห้งบนกระดาษกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อ และย้ายชิ้นส่วนใบลงบนอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ *A. tumefaciens* ร่วมกับชิ้นส่วนใบพืช สูตร MS ที่มีซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ gellan gum 2 เปอร์เซ็นต์ TDZ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ acetosyringone 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บในที่มืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งแล้วย้ายลงอาหารสูตร MS ที่มีซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ gellan gum 2 เปอร์เซ็นต์ TDZ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และยาปฏิชีวนะคือ กานามัยซิน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ meropenem 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกำจัด *A. tumefaciens* และย้ายลงอาหารใหม่ทุกๆ 1 สัปดาห์

ทำการตรวจสอบการมียีน *crtW* และ *nptII* ในพืชที่ได้รับการถ่ายยีนโดยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR) ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *crtW* โดยการทำ RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) ตรวจสอบลักษณะของพืชที่ได้รับการถ่ายยีน การตรวจสอบชนิดของรงควัตถุที่พบในชิ้นส่วนพืชโดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) ตามวิธีในการทดลองที่ 1

สถานที่ทำการทดลอง

Horticultural Science Laboratory, Department of Biological Production, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology ประเทศญี่ปุ่น

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลองตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2557 สิ้นสุด เดือนเมษายน พ.ศ. 2558

ผลและวิจารณ์

การถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium*

สามารถถ่ายยีน *crtW* ในยาสูบได้สำเร็จ สามารถคัดเลือกชิ้นส่วนใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนในอาหารสูตร MS ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร, meropenem 10 มิลลิกรัมต่อลิตร, BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดการเจริญเป็นตาพิเศษ (adventitious bud) บริเวณที่เกิดรอยตัดและเจริญเป็นต้น (ภาพที่ 10) สามารถเจริญเติบโตและนำออกปลูกในห้องระบบปิดที่มีการควบคุมแสงและอุณหภูมิ ได้ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนจำนวนทั้งหมด 24 ต้น โดยต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกับกับต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนหลายประการ เช่น มีการเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเขียวอมส้มหรือน้ำตาล ใบใบ กลีบเลี้ยง และขนต่อม (glandular hair) ส่วนของรังไข่มีการเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีแดง และหลอดกลีบดอกเปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีส้มอ่อน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการสร้างสารแอสตาแซนทินสะสมในส่วนต่างๆ ของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่ 11-17)

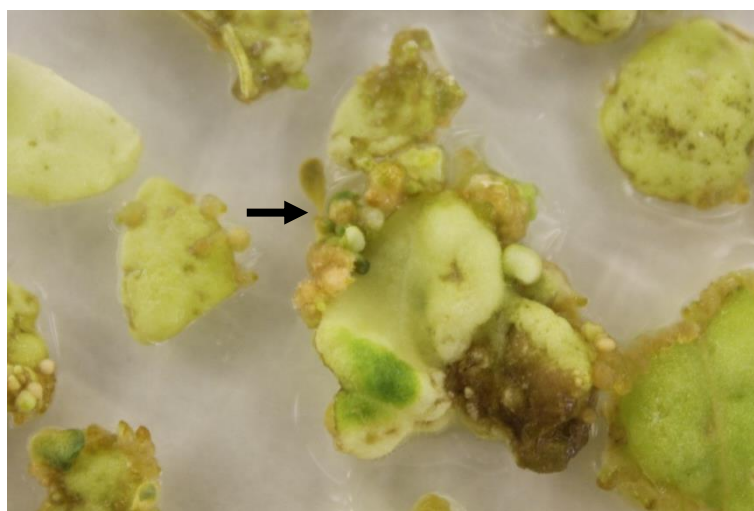
การสะสมสารแอสตาแซนทินเกิดที่บริเวณโครโมพลาสต์ในเซลล์ โดยภาพตัดตามขวางของใบยาสูบ (ภาพที่ 13ข) และส่วนของดอกบริเวณหลอดกลีบดอก (ภาพที่ 15ข) จากต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนมีโครโมพลาสต์สีส้มซึ่งเกิดจากการสะสมของสารแอสตาแซนทินอยู่ในเซลล์ ในขณะที่ภาพตัดตามขวางในต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ไม่พบโครโมพลาสต์สีส้มในใบ พบเพียงเซลล์ที่มีสีเขียวจากคลอโรฟิลล์ (ภาพที่ 13ก) และไม่พบในส่วนของหลอดกลีบดอกซึ่งปรากฏเพียงเซลล์ที่ไม่มีสี (ภาพที่ 15ก) โดยปกติรงควัตถุในกลุ่มแคโรทีนอยด์จะมีการสะสมที่โครโมพลาสต์ซึ่งมีความแตกต่างจากรงควัตถุในกลุ่ม flavonoid ที่จะมีการสะสมในแวคิวโอลซึ่งในกลีบดอกของยาสูบทั้งที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีนจะไม่พบโครโมพลาสต์ มีเพียงการสะสมสารแอนโทไซยานินในแวคิวโอล ทำให้กลีบดอกของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนยังคงสีชมพูเช่นเดียวกับดอกยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่ 17) การแสดงออกของยีน *crtW* ให้มีการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารแอสตาแซนทินให้เกิดที่โครโมพลาสต์จำเป็นต้องอาศัยลำดับเบสของ transit peptide (tp) จาก Rubisco small subunit ของถั่วเชื่อมเข้ากับยีน *crtW* เนื่องจาก transit peptide เป็นโปรตีนที่มีเป้าหมายไปยังโครโมพลาสต์ ส่งผลให้เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ที่ถอดรหัส (transcription) ได้จากยีน *crtW* ถูกส่งไปยังโครโมพลาสต์พร้อมกับ transit peptide และเกิดกระบวนการแปลรหัส (translation) ได้เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารแอสตาแซนทินที่โครโมพลาสต์

การถ่ายยีน *crtO* เข้าสู่ยาสูบของ Mann *et al.* (2000) ยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนมีการเปลี่ยนแปลงสีที่รังไข่ของยาสูบ จากสีเหลืองเป็นสีแดงเนื่องจากการสะสมสารแอสตาแซนทินปริมาณมาก เมื่อตรวจสอบโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบปริมาณสารแอสตาแซนทินสะสมที่ใบในปริมาณที่น้อยมาก โดยพบน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ของสารแคโรทีนอยด์รวม และไม่พบการสะสมสารแอสตาแซนทินในกลีบเลี้ยง และบริเวณหลอดกลีบดอก โดยแตกต่างจากงานวิจัยนี้ ซึ่งพบการสะสมของสารแอสตาแซนทินในลำต้น กลีบเลี้ยง หลอดกลีบดอก และขนต่อม (glandular hair) ด้วย ซึ่งอาจเกิดจากการใช้โปรโมเตอร์ และ transit peptide คนละชนิดกัน โดยจากการทดลองของ Mann *et al.* ใช้โปรโมเตอร์ Pds (phytoene desaturase) และ transit peptide จากมะเขือเทศ ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยนี้ที่ใช้โปรโมเตอร์ 35S Cauliflower mosaic virus และ transit peptide จากถั่ว จึงอาจทำให้ประสิทธิภาพในการแสดงออกของยีนที่โครโมพลาสต์มีความแตกต่างกัน เป็นผลให้มีการสะสมสารแอสตาแซนทินในบริเวณส่วนต่างๆ ของพืชแตกต่างกันด้วยเช่นกัน

สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sakae *et al.* (2007) ที่ได้ทำการทดลองเบื้องต้นโดยถ่ายยีน *crtW* จาก *Agrobacterium auranticum* ที่เชื่อมกับลำดับเบสของ transit peptide เข้าสู่ยาสูบ (*N. tabacum*) รังไข่ของยาสูบมีการสะสมสารคีโตแคโรทีนอยด์ในโครโมพลาสต์ ซึ่งเป็นการยืนยันว่าโปรตีนที่สังเคราะห์จาก *tp-crtW* ถูกส่งไปยังโครโมพลาสต์ และมีการสร้างสารแอสตาแซนทินสะสมในโครโมพลาสต์ จากนั้นทำการทดลองถ่ายยีนเข้าสู่ *Lotus japonicus* ผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองเบื้องต้น โดยพบโครโมพลาสต์สีส้มที่เกิดจากการสะสมสารคีโตแคโรทีนอยด์ตัวอื่นๆ และสารแอสตาแซนทิน ส่งผลให้ใบและดอกเกิดการเปลี่ยนแปลงสี โดยใบมีสีเขียวอมส้ม และกลีบดอกมีสีเหลืองส้มเข้มขึ้น ซึ่งในกลีบดอก *L. japonicus* นั้นมีการสะสมของรงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์ในโครโมพลาสต์ โดยแตกต่างจากกลีบดอกของยาสูบจากในต้นที่ได้รับการถ่ายยีนซึ่งปรากฏเพียงสีชมพู ที่เกิดจากการสะสมรงควัตถุกลุ่มแอนโทไซยานินในแวคิวโอลเท่านั้น ดังนั้นการถ่ายยีน *crtW* เพื่อให้มีการสร้างสารแอสตาแซนทินหรือสารคีโตแคโรทีนอยด์ตัวอื่นเพื่อการเปลี่ยนแปลงสีในกลีบดอกให้มีสีเหลืองส้มเข้มขึ้นนั้น จะต้องคำนึงถึงชนิดพืชที่มีดอกที่มีการสะสมรงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์ในโครโมพลาสต์เป็นสำคัญ

แต่พบว่าชิ้นส่วนใบของพืหนุยและคาลิบรากัวไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ จากการทำการทดลองเบื้องต้น การเลี้ยงชิ้นส่วนใบพืชโดยใช้อาหารสูตร MS ที่มี BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร อ้างอิงจากงานวิจัยของ Horsch *et al.* (1985) และ Mori *et al.* (2014) สามารถชักชิ้นส่วนใบให้เกิดแคลลัสเล็กน้อยและตายในที่สุด ต่อมาจึงได้ทำการทดลองโดยปรับเปลี่ยนสูตรอาหาร โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มี TDZ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อ้างอิงจากงานวิจัยของ Thirukkumaran *et al.* (2007) แต่ก็สามารถชักนำได้เพียงแคลลัสได้ เนื่องจากชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้อาจมีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อการชัก

ทำให้เกิดต้นจากชิ้นส่วนใบที่แตกต่างกัน ซึ่งคาดว่าอาจเกิดจากสายพันธุ์ของพิทูเนียและคาลิบรากัวที่ใช้มีความแตกต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมา แต่แคลลัสของพิทูเนียและคาลิบรากัวที่เจริญจากชิ้นส่วนใบที่ใช้ในการถ่ายยีนเหล่านี้ได้รับการถ่ายยีนสำเร็จ ซึ่งสามารถตรวจสอบการมีอยู่ของยีนโดยการทำ PCR กับไพรเมอร์จำเพาะ นอกจากนี้แคลลัสของพิทูเนียและคาลิบรากัวที่ได้รับการถ่ายยีนบางส่วนมีสีส้ม ซึ่งเกิดจากการสะสมของสารแอสตาแซนทิน โดยมีสีแตกต่างจากแคลลัสของพิทูเนียและคาลิบรากัวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนซึ่งมีเพียงสีเขียวของคลอโรฟิลล์เท่านั้น (ภาพที่ 18)



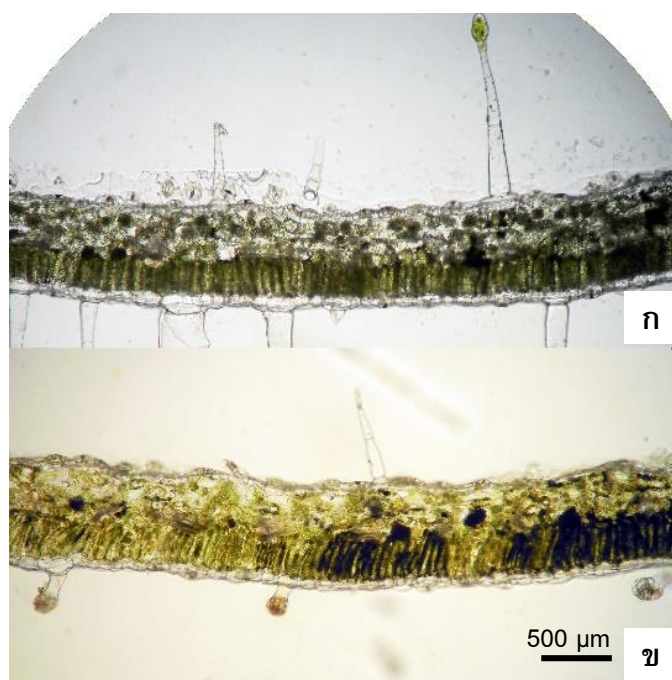
ภาพที่ 10 ชิ้นส่วนใบยาสูบที่เกิดตาพิเศษ (adventitious bud) และเจริญเป็นต้นในอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่มีกานามัยซินความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม meropenem 10 มิลลิกรัมต่อลิตร, BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 11 ตัวอย่างต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ซ้าย) และที่ได้รับการถ่ายยีน (ขวา)



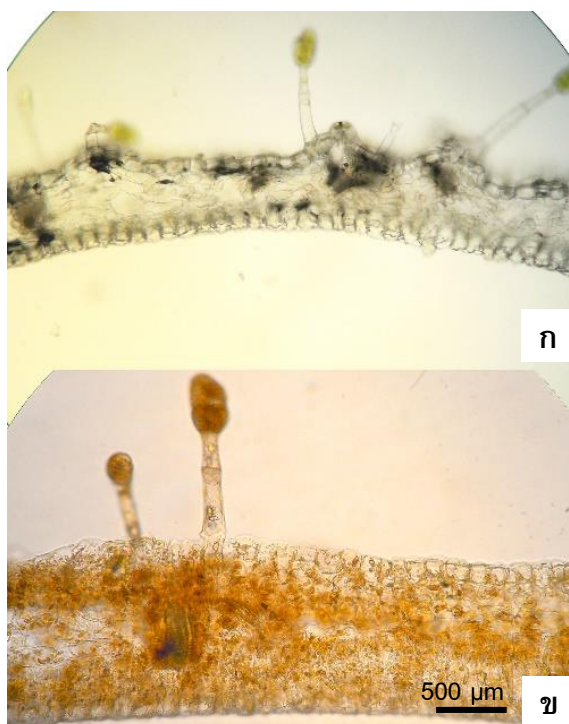
ภาพที่ 12 ใบของยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ซ้าย) และที่ได้รับการถ่ายยีน (ขวา)



ภาพที่ 13 ภาพตัดตามขวางที่กำลังขยาย 200 เท่าของใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ก) และที่ได้รับการถ่ายยีน (ข)



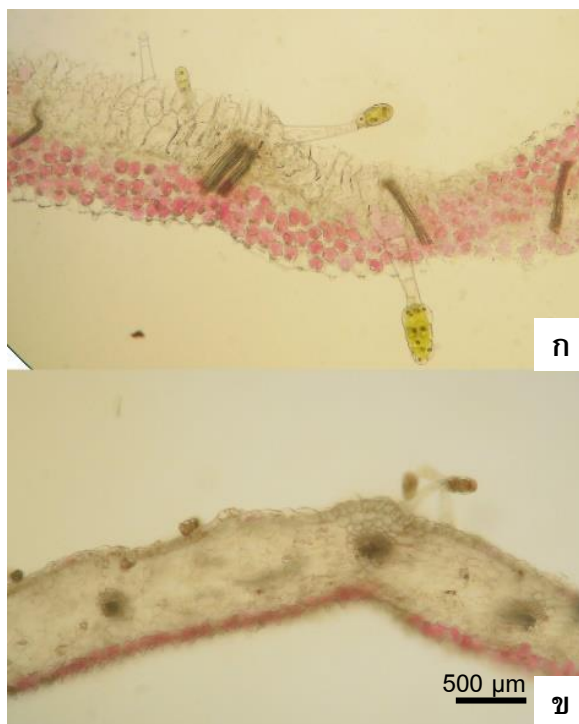
ภาพที่ 14 ดอกของต้นยาสูบที่ระดับการพัฒนาการของดอกในระยะต่างๆ ในต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (แถวบน) และที่ได้รับการถ่ายยีน (แถวล่าง)



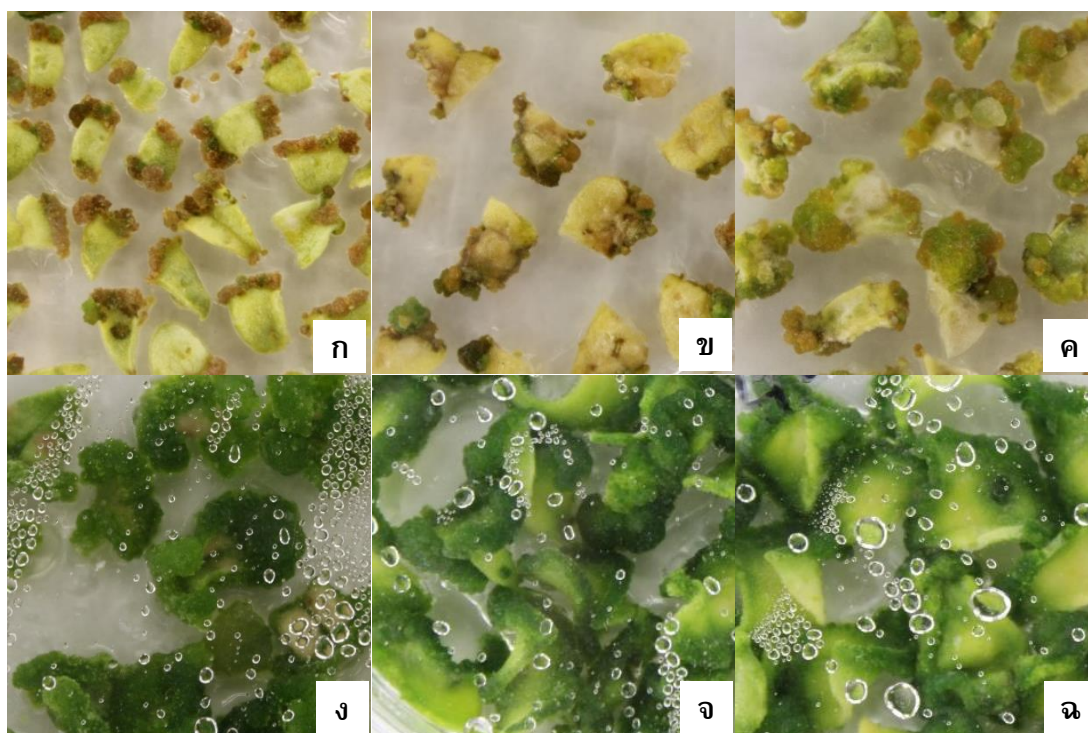
ภาพที่ 15 ภาพตัดตามขวางที่กำลังขยาย 200 เท่า บริเวณหลอดกลีบดอกของยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ก) และที่ได้รับการถ่ายยีน (ข)



ภาพที่ 16 เกสรเพศเมียของดอกยาสูปที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ซ้าย) และที่ได้รับการถ่ายยีน (ขวา)



ภาพที่ 17 ภาพตัดตามขวางที่กำลังขยาย 200 เท่า ของกลีบดอกยาสูปที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ก) และที่ได้รับการถ่ายยีน (ข)



ภาพที่ 18 แคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนมีสีส้มจากการสะสมสารแอนตาแซนทีนในคาลิบรากัว (ก) พืชเนี่ยจากบริษัท Suntory Flowers Ltd. (ข) และ พืชเนี่ยจากบริษัท Sakata Seed Corp. (ค) ที่ได้รับการถ่ายยีนมีสีส้มจากการสะสมของสารแอนตาแซนทีน เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีเพียงสีเขียวจากการสะสมของคลอโรฟิลล์คาลิบรากัว (ง) พืชเนี่ยจากบริษัท Suntory Flowers Ltd. (จ) และพืชเนี่ยจากบริษัท Sakata Seed Corp. (ฉ)

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *crtW* และ *nptII* ในพืชที่ได้รับการถ่ายยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR)

จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *crtW* และ *nptII* ในพืชที่ได้รับการถ่ายยีนโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR) โดยเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ จากดีเอ็นเอที่สกัดได้ เป็นแม่แบบทำปฏิกิริยา PCR กับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *tp-crtW* (950 คู่เบส) และ *nptII* (500 คู่เบส) จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้มาแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าใน agarose ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (Agarose gel electrophoresis) พบการปรากฏแถบดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนทุกต้น และในแคลลัสของพืชเนี่ยและคาลิบรากัว (ตารางที่ 3) ซึ่งสามารถยืนยันความสำเร็จของการถ่ายยีน *crtW* เข้าสู่พืช (ภาพที่ 19-21)

เนื่องจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ (ตารางที่ 2) มีความเข้มข้นที่สูงมาก ก่อนการทำปฏิกิริยา PCR จึงนำมาลดความเข้มข้นให้เจือจางลง 3 เท่าด้วยน้ำกลั่น โดยจากการทดลองเบื้องต้นในการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยไม่ลดความเข้มข้นลงนั้น พบว่าบางครั้งไม่สามารถเกิดการเพิ่มจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบางตัวอย่างได้ ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้เพื่อเป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR มีปริมาณที่มากเกินไป ส่งผลให้การจับของไพรเมอร์จำเพาะกับดีเอ็นเอแม่แบบมีประสิทธิภาพลดลง ในขณะที่การทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่ลดความเข้มข้นลง 3 เท่า สามารถเกิดการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ตามปกติในทุกๆ ตัวอย่าง

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชิ้นส่วนใบยาสูบ แคลลัสของพิทูเนียและคา-ลิบรากัวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและได้รับการถ่ายยีน

ชิ้นส่วนพืช	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)
ยาสูบต้นควบคุม	2,443.7
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 1	1,928.6
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 2	1,459.6
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 3	1,531.0
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 4	2,018.6
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 5	1,355.6
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 6	1,190.6
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 7	2,177.5
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 8	1,314.2
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 9	2,370.6
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 10	2,066.3
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 11	948.1
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 12	4347.0
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 13	1,745.2
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 14	2,859.2
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 15	1,507.0
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 16	2,049.1
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 17	2,206.3
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 18	3,567.1

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชิ้นส่วนพืช	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 19	3,002.5
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 20	2,505.2
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 21	1,807.9
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 22	1,808.2
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 23	1,954.7
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 24	1,760.9
พิทูเนีย (Suntory Flowers Ltd.) ควบคุม	432.2
พิทูเนีย (Suntory Flowers Ltd.) ที่ได้รับการถ่ายยีน	301.8
พิทูเนีย (Suntory Flowers Ltd.) ที่ได้รับการถ่ายยีน	470.7
พิทูเนีย (Suntory Flowers Ltd.) ที่ได้รับการถ่ายยีน	703.4
พิทูเนีย (Sakata Seed Corp.) ควบคุม	470.4
พิทูเนีย (Sakata Seed Corp.) ที่ได้รับการถ่ายยีน	1,786.2
พิทูเนีย (Sakata Seed Corp.) ที่ได้รับการถ่ายยีน	999.9
พิทูเนีย (Sakata Seed Corp.) ที่ได้รับการถ่ายยีน	1,026.1
คาลิบรากัวควบคุม	30.2
คาลิบรากัวที่ได้รับการถ่ายยีน	1,168.7
คาลิบรากัวที่ได้รับการถ่ายยีน	837.4
คาลิบรากัวที่ได้รับการถ่ายยีน	1,260.1

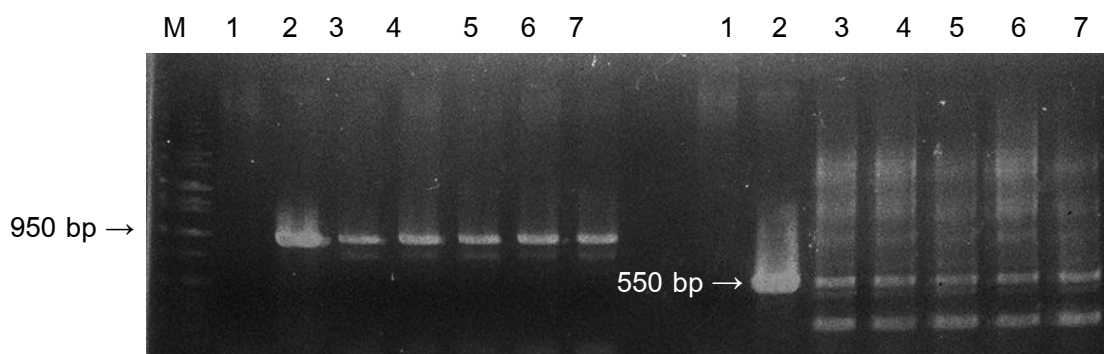
ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *crtW* และ *nptII* ด้วยเทคนิค PCR ในดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชิ้นส่วนใบยาสูบ แคลลัสของพิทูเนียและคาลิบรากว้าที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและได้รับการถ่ายยีน

ชิ้นส่วนพืช	ยีน <i>crtW</i>	ยีน <i>nptII</i>
ยาสูบต้นควบคุม	-	-
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 1	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 2	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 3	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 4	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 5	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 6	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 7	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 8	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 9	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 10	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 11	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 12	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 13	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 14	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 15	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 16	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 17	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 18	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 19	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 20	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 21	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 22	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 23	+	+
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 24	+	+
พิทูเนีย (Suntory Flowers Ltd.) ควบคุม	+	+
พิทูเนีย (Suntory Flowers Ltd.) ที่ได้รับการถ่ายยีน	+	+

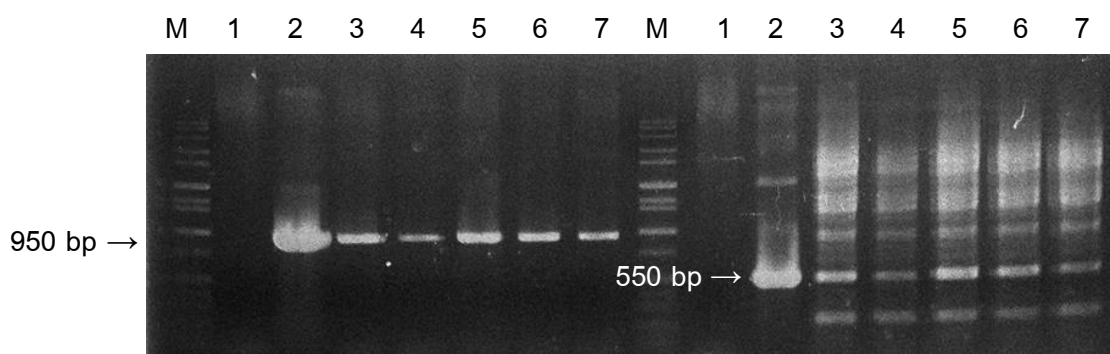
ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชิ้นส่วนพืช	ยีน <i>crtW</i>	ยีน <i>nptII</i>
พืชนิยม (Suntory Flowers Ltd.) ที่ได้รับการถ่ายยีน	+	+
พืชนิยม (Suntory Flowers Ltd.) ที่ได้รับการถ่ายยีน	+	+
พืชนิยม (Sakata Seed Corp.) ควบคุม	+	+
พืชนิยม (Sakata Seed Corp.) ที่ได้รับการถ่ายยีน	+	+
พืชนิยม (Sakata Seed Corp.) ที่ได้รับการถ่ายยีน	+	+
พืชนิยม (Sakata Seed Corp.) ที่ได้รับการถ่ายยีน	+	+
คาลิบรากัวควบคุม	+	+
คาลิบรากัวที่ได้รับการถ่ายยีน	+	+
คาลิบรากัวที่ได้รับการถ่ายยีน	+	+
คาลิบรากัวที่ได้รับการถ่ายยีน	+	+

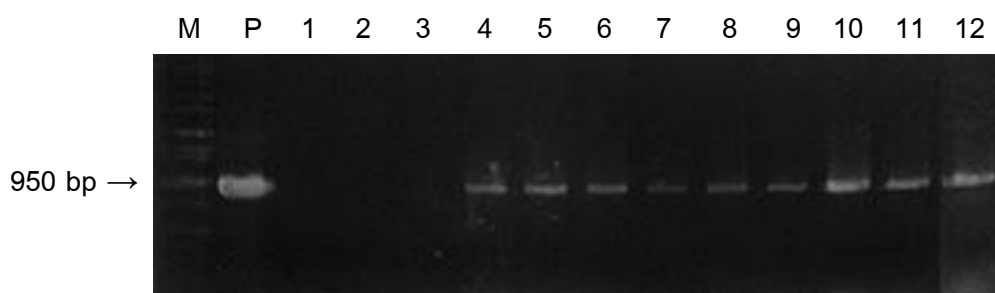
หมายเหตุ + คือ ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และ – คือ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ



ภาพที่ 19 ผลจากปฏิกิริยา PCR กับไพรเมอร์จำเพาะ *crtW* (ซ้าย) และ *nptII* (ขวา) แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis) ในตัวอย่างจากต้นยาสูบ แถวที่ 1 คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, แถวที่ 2 คือ LjUbip-*crtW*, แถวที่ 3-7 คือ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 1, 2, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ แถว M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Wide-Range DNA Ladder 50-10,000 คู่เบส



ภาพที่ 20 ผลจากปฏิกิริยา PCR กับไพรเมอร์จำเพาะ *crtW* (ซ้าย) และ *nptII* (ขวา) แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis) ในตัวอย่างจากต้นยาสูบ แถวที่ 1 คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, แถวที่ 2 คือ LjUbip-*crtW*, แถวที่ 3-7 คือ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 7, 8, 12, 14 และ 18 ตามลำดับ แถว M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Wide-Range DNA Ladder 50-10,000 คู่เบส



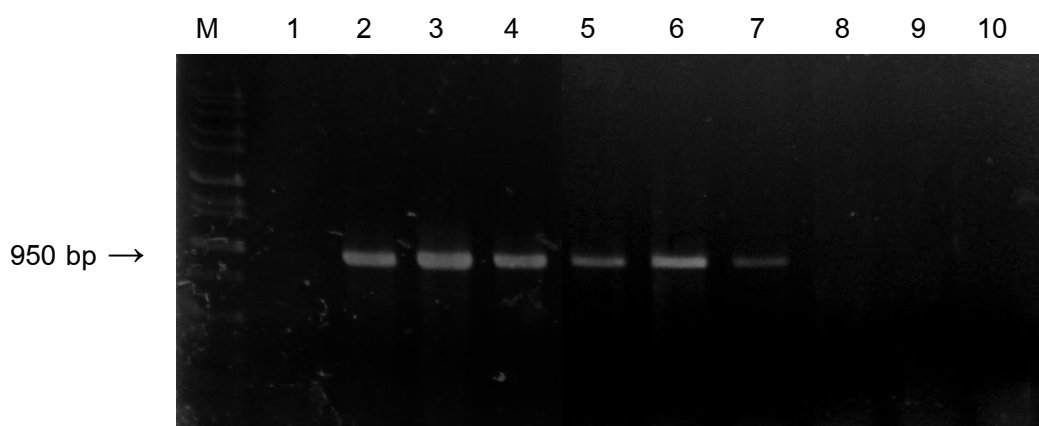
ภาพที่ 21 ผลจากปฏิกิริยา PCR กับไพรเมอร์จำเพาะ *crtW* แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ในตัวอย่างจากแคลลัสของพิทูเนียและคาลิบรากัว แถวที่ P คือ LjUbip-*crtW*, แถวที่ 1 คือ แคลลัสของคาลิบรากัวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, แถวที่ 2 คือ แคลลัสของพิทูเนียจากบริษัท Suntory Flowers Ltd. ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, แถวที่ 3 คือ แคลลัสของพิทูเนียจากบริษัท Sakata Seed Corp. ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, แถวที่ 4-6 คือ แคลลัสของคาลิบรากัวที่ได้รับการถ่ายยีน, แถวที่ 7-9 คือ แคลลัสของพิทูเนียจากบริษัท Suntory Flowers Ltd. ที่ได้รับการถ่ายยีน, แถวที่ 10-12 คือ แคลลัสของพิทูเนียจากบริษัท Sakata Seed Corp. ที่ได้รับการถ่ายยีน ตามลำดับ แถว M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Wide-Range DNA Ladder 50-10,000 คู่เบส

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *crtW* โดยเทคนิค RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *crtW* โดยนำชิ้นส่วนใบยาสูบ และแคลลัสบางส่วนของพิทูเนียและคาลิบรากัวมาสกัดอาร์เอ็นเอรวม จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา RT-PCR อาร์เอ็นเอจะถูกถอดรหัสกลับไปเป็น complementary DNA (cDNA) จากนั้นจึงเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอจาก cDNA ที่ได้กับไพรเมอร์จำเพาะกับยีน *crtW* ด้วยปฏิกิริยา PCR จากนั้นแยกขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis) พบว่าการทำ RT-PCR จากอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน มีการปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 950 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่จำเพาะกับยีน *crtW* ในขณะที่อาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเนื่องจากไม่สามารถเกิดการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับไพรเมอร์จำเพาะได้ แสดงว่าเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน *crtW* มีการแสดงออกของยีน *crtW* โดย cDNA ที่ถอดรหัสกลับจากอาร์เอ็นเอสามารถเกิดการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *crtW* ได้ แสดงว่าอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดมาได้จากเนื้อเยื่อนั้น มีอาร์เอ็นเอที่ถูกถอดรหัสมาจากยีน *crtW* จึงสามารถยืนยันได้ว่าการแสดงออกของยีน *crtW* ในเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่ 22)

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากชิ้นส่วนใบของยาสูบ แคลลัสของพิทูเนีย และคาลิบรากัวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและถ่ายยีน

ชิ้นส่วนพืช	ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)
ยาสูบต้นควบคุม	67.1
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 1	92.8
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 15	1,707.3
ยาสูบถ่ายยีนต้นที่ 16	116.5
พิทูเนีย (Suntory Flowers Ltd.) ควบคุม	435.3
พิทูเนีย (Suntory Flowers Ltd.) ที่ได้รับการถ่ายยีน	75.5
พิทูเนีย (Sakata Seed Corp.) ควบคุม	494.2
พิทูเนีย (Sakata Seed Corp.) ที่ได้รับการถ่ายยีน	497.8
คาลิบรากัวควบคุม	172.6
คาลิบรากัวที่ได้รับการถ่ายยีน	779.0



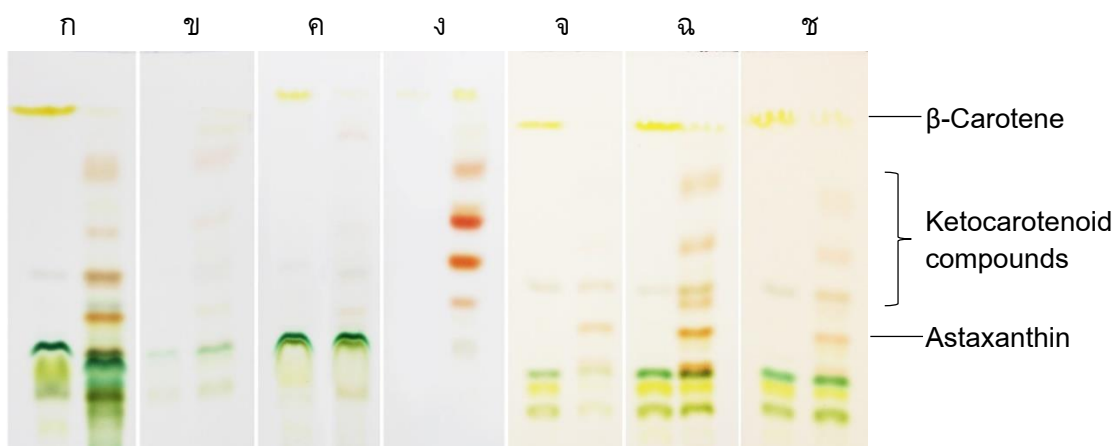
ภาพที่ 22 การแสดงออกของยีน *crtW* แถวที่ 1 คือยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, แถวที่ 2-4 คือยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 1, 15 และ 16, แถวที่ 5-7 คือแคลลัสของคาลิบรากัว, พิทูเนีย (Suntory Flowers Ltd.) และพิทูเนีย (Sakata Seed Corp.) ที่ได้รับการถ่ายยีน, แถวที่ 8-10 คือ แคลลัสของคาลิบรากัว, พิทูเนีย (Suntory Flowers Ltd.) และพิทูเนีย (Sakata Seed Corp.) ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนตามลำดับ แถว M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน Wide-Range DNA Ladder 50-10,000 คู่เบส

การตรวจสอบชนิดของรงควัตถุโดยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

จากการตรวจสอบชนิดของรงควัตถุที่พบในชิ้นส่วนพืชโดยวิธี Thin layer chromatography พบว่าในใบ หลอดกลีบดอก กลีบเลี้ยงและรังไข่ในยาสูบ, แคลลัสของพิทูเนีย และคาลิบรากัวที่ได้รับการถ่ายยีนมีการสะสมของแอสตาแซนทินซึ่งมีสีออกส้มแดง ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่มีการสะสมของแอสตาแซนทิน แต่พบว่าการสะสมของเบต้าแคโรทีนที่สูงกว่าอันเนื่องมาจากในวิถีการสร้างแอสตาแซนทินมีการสร้างมาจากเบต้าแคโรทีนในรังไข่ของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนจะปรากฏแถบสีของแอสตาแซนทิน และสารคีโตแคโรทีนอยด์ตัวอื่นๆ สีเข้มอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าในรังไข่มีการสะสมสารแอสตาแซนทิน และสารคีโตแคโรทีนอยด์ตัวอื่นๆ ในปริมาณที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนพืชอื่นๆ ที่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่ 23)

นอกจากสารแอสตาแซนทินที่พบในชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีนแล้ว ยังพบสารคีโตแคโรทีนอยด์ตัวอื่นๆ ที่ให้สีส้มแดงเช่นกัน โดยสารคีโตแคโรทีนอยด์เหล่านี้จะเป็นสารตัวกลางที่อยู่ระหว่างวิถีกระบวนการสังเคราะห์สารแอสตาแซนทินจากเบตาแคโรทีน (Misawa, 1995) เนื่องจากในกระบวนการในการสังเคราะห์สารแอสตาแซนทินจะอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ที่ได้สร้างจากยีนตัวอื่นๆ เช่น กระบวนการสังเคราะห์สารแอสตาแซนทินที่พบใน

Agrobacterium aurantiacum จะมีการทำงานร่วมกันของยีน *crtW* ร่วมกับ *crtZ* แต่ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการถ่ายยีนเพียง *crtW* เท่านั้น จึงอาจทำให้มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์สารแอสตาแซนทินได้ปริมาณลดลง จึงได้สารแอสตาแซนทินในปริมาณที่ต่ำ และได้สารตัวกลางคือ-โทแคโรทีนอยด์ระหว่างกระบวนการสังเคราะห์ตัวอื่นๆ มาแทน



ภาพที่ 23 ผล TLC เปรียบเทียบชนิดตรงควัตถุที่พบในชิ้นส่วนพืชส่วนต่างๆ ของยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ซ้าย) และยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน (ขวา) ใน (ก) ใบ (ข) หลอดกลีบดอก (ค) กลีบเลี้ยง (ง) รังไข่ และผล TLC เปรียบเทียบระหว่างแคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ซ้าย) และที่ได้รับการถ่ายยีน (ขวา) ใน (จ) แคลลัสราก (ฉ) พืชเหี่ยวจากบริษัท Suntory Flowers Ltd. และ (ช) พืชเหี่ยวจากบริษัท Sakata Seed Corp.

การตรวจสอบสีของใบ

จากการตรวจสอบสีของต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (control) และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน (ต้นที่ 1-24) โดยใช้ระบบสี $L^*a^*b^*$ ค่าที่ได้แสดงและตัวอย่างสี (ตารางที่ 5) เมื่อทำการทดสอบค่าเฉลี่ยทางสถิติค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey พบว่าค่าเฉลี่ยของค่า L , a และ b ในระบบสี $L^*a^*b^*$ ในใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีความแตกต่างกับใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน แต่สีใบระหว่างใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนในจำนวน 24 ต้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ใบของต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีสีเขียว ในขณะที่ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนมีสีเขียวอมส้มหรือสีน้ำตาล โดยแต่ละต้นจะมีสีแตกต่างกันออกไป เนื่องจากการแทรกของยีน *crtW* โดยอะโครแบคทีเรียจะเกิดแบบสุ่มเข้าสู่บริเวณโครโมโซมของยาสูบแตกต่างกัน ทำให้ยาสูบมีการแสดงออกยีน *crtW* แตกต่างกัน รวมไปถึงอาจจะมีจำนวนชุดของยีนที่แทรกเข้าไปแตกต่างกัน

กัน หากต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนมีจำนวนชุดของยีนแทรกเข้าไปในจีโนมหลายชุด จะทำให้เกิดการแสดงออกของยีนเกิดขึ้นได้มากกว่าต้นยาสูบที่เกิดการแทรกของยีนในจีโนมเพียงชุดเดียว

ตารางที่ 5 ค่าที่วัดโดยระบบสี L*a*b* ในใบของยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และที่ได้รับการถ่ายยีนตั้งแต่ 1 ถึง 24

ต้นยาสูบ	L*a*b* color space			ตัวอย่างสี
	L	a	b	
ต้นควบคุม	62.65 ^a	-19.90 ^g	59.46 ^a	
ถ่ายยีนต้นที่ 1	45.94 ^{bc}	-7.66 ^{bcde}	39.71 ^{cdef}	
ถ่ายยีนต้นที่ 2	43.05 ^c	-6.46 ^{abc}	37.37 ^{ef}	
ถ่ายยีนต้นที่ 3	44.86 ^{bc}	-8.48 ^{cde}	39.49 ^{cdef}	
ถ่ายยีนต้นที่ 4	43.61 ^c	-5.23 ^a	36.04 ^f	
ถ่ายยีนต้นที่ 5	46.28 ^{bc}	-8.01 ^{cde}	40.70 ^{cdef}	
ถ่ายยีนต้นที่ 6	45.61 ^{bc}	-8.57 ^{cde}	41.56 ^{cdef}	
ถ่ายยีนต้นที่ 7	44.72 ^{bc}	-6.55 ^{abc}	36.99 ^f	
ถ่ายยีนต้นที่ 8	46.02 ^{bc}	-8.96 ^{def}	39.28 ^{cdef}	
ถ่ายยีนต้นที่ 9	47.37 ^{bc}	-8.14 ^{cde}	42.30 ^{bcdef}	
ถ่ายยีนต้นที่ 10	45.25 ^{bc}	-6.49 ^{abc}	38.54 ^{def}	
ถ่ายยีนต้นที่ 11	46.11 ^{bc}	-8.05 ^{cde}	40.44 ^{cdef}	
ถ่ายยีนต้นที่ 12	43.61 ^c	-7.03 ^{abcd}	39.62 ^{cdef}	
ถ่ายยีนต้นที่ 13	49.81 ^b	-10.81 ^f	44.94 ^{bcde}	
ถ่ายยีนต้นที่ 14	45.81 ^{bc}	-8.42 ^{cde}	40.37 ^{cdef}	
ถ่ายยีนต้นที่ 15	43.84 ^c	-5.58 ^{ab}	37.62 ^{ef}	
ถ่ายยีนต้นที่ 16	44.60 ^{bc}	-6.76 ^{abc}	39.00 ^{cdef}	
ถ่ายยีนต้นที่ 17	42.69 ^c	-5.03 ^a	35.44 ^f	
ถ่ายยีนต้นที่ 18	45.06 ^{bc}	-8.34 ^{cde}	38.99 ^{cdef}	
ถ่ายยีนต้นที่ 19	45.08 ^{bc}	-9.24 ^{ef}	44.82 ^{bcde}	
ถ่ายยีนต้นที่ 20	46.51 ^{bc}	-6.76 ^{abc}	46.45 ^{bc}	

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ต้นยาสูบ	L*a*b* color space			ตัวอย่างสี
	L	a	b	
ถ่ายยีนต้นที่ 21	46.16 ^{bc}	-8.44 ^{cde}	46.03 ^{bcd}	
ถ่ายยีนต้นที่ 22	49.82 ^b	-9.45 ^{ef}	49.49 ^b	
ถ่ายยีนต้นที่ 23	47.45 ^{bc}	-6.70 ^{abc}	45.54 ^{bcd}	
ถ่ายยีนต้นที่ 24	45.87 ^{bc}	-7.87 ^{cde}	44.72 ^{bcde}	
F-test	**	**	**	
C.V. (%)	3.86	-8.36	5.85	

หมายเหตุ

** ระดับนัยสำคัญ 99 เปอร์เซนต์

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันภายในสดมภ์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ จากการทดสอบด้วยวิธี Tukey

การวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตาแซนทินโดยเทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC)

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตาแซนทินในตัวอย่างใบของยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และได้รับการถ่ายยีนโดยวิธี High-performance liquid chromatography การวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตาแซนทินในใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนจะทำในต้นที่ 16 และต้นที่ 21 เนื่องจากมีจำนวนใบที่ไม่อ่อนหรือแก่จนเกินไปจำนวนมากในระยะเวลาเจริญเติบโตในช่วงเวลานั้น ซึ่งมีความเหมาะสมแก่การตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ พบว่าในตัวอย่างใบของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 16 และต้นที่ 21 มีปริมาณสารแอสตาแซนทิน 0.496 และ 0.383 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัมตามลำดับ และไม่พบสารแอสตาแซนทินในใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยระยะเวลา Retention time ปรากฏพีคสูงสุดของสารแอสตาแซนทินอยู่ในช่วง 4.806 ถึง 4.974 นาทีที่ความยาวคลื่น 474 นาโนเมตร (ตารางที่ 6)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารแอสตาแซนทินที่สามารถสังเคราะห์ได้จากพืชที่ถ่ายยีนเพื่อเปลี่ยนวิถีการสร้างจากงานวิจัยต่างๆ เช่น ในยาสูบ *N. tabacum* 'Xanthi' โดยยีน *crtW/crtZ* จาก *Brevundimonas* sp. SDS212 โดยเกิดการแทรกของยีนในพลาสมิด (Hasunuma *et al.*,

2008) มีการสร้างสารแอสตาแซนทิน 5.44 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงมากเมื่อเทียบกับการถ่ายยีนในการทดลองครั้งนี้ ในยาสูบ *N. tabacum* 'Petit Havana SR1' โดยยีน *crtW* จาก *Brevundimonas* sp. SDS212 โดยเกิดการแทรกของยีนในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ แม้จะมีความแตกต่างในเรื่องประเภทของตัวอย่างก็ตาม (ตัวอย่างแห้งและตัวอย่างสด) ซึ่งเป็นไปได้ว่าการสังเคราะห์สารแอสตาแซนทินอย่างมีประสิทธิภาพนั้นจำเป็นต้องอาศัยการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์สารแอสตาแซนทินมากกว่า 1 ตัว กล่าวคือเพียงยีน *crtW* ตัวเดียวนั้นไม่อาจทำให้การสังเคราะห์แอสตาแซนทินเป็นไปอย่างสมบูรณ์ แต่ต้องอาศัยยีนตัวอื่นๆ เช่น *crtZ* หรือ *crtO* เป็นต้น

ตารางที่ 6 ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่พบในใบของยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 16 และ 21

ตัวอย่างใบยาสูบ	ปริมาณสารแอสตาแซนทิน (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม)
ต้นควบคุม	-
ถ่ายยีนต้นที่ 16	0.496
ถ่ายยีนต้นที่ 21	0.383

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และสารแคโรทีนอยด์รวมโดยวิธี Spectrophotometry

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และสารแคโรทีนอยด์รวมโดยวิธี Spectrophotometry โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงแทนสูตรคำนวณตามวิธีของ Wellburn (1994) การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และสารแคโรทีนอยด์รวมในใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนจะทำในต้นที่ 16 และต้นที่ 21 เนื่องจากมีจำนวนใบที่ไม่อ่อนหรือแก่จนเกินไปจำนวนมากในระยะการเจริญเติบโตในช่วงเวลานั้น ซึ่งมีความเหมาะสมแก่การตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ พบว่าในใบของต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและต้นที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 16 และ 21 มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 21 มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บีสูงกว่าต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 16 และพบว่าต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บีต่ำที่สุด

และพบว่าปริมาณแคโรทีนอยด์รวมระหว่างใบจากต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนกับต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีค่าแตกต่างกัน โดยใบจากต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนมีปริมาณแคโรที-

นอยด์รวมสูงกว่าต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และไปจากต้นที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 16 และ 21 มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมมีค่าไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 7) มีความเป็นไปได้ว่าการถ่ายยีน *crW* เข้าสู่ต้นยาสูบทำให้มีการเพิ่มการสังเคราะห์รงควัตถุกลุ่มแคโรทีนอยด์เพิ่มสูงขึ้น

ตารางที่ 7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470, 653 และ 666 นาโนเมตรและปริมาณสารที่พบโดยคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสง

ตัวอย่าง ใบยาสูบ	ค่าดูดกลืนแสงที่ความ ยาวคลื่น (นาโนเมตร)			ปริมาณสารที่คำนวณได้ (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสด 1 กรัม)		
	470	653	666	คลอโรฟิลล์เอ	คลอโรฟิลล์บี	แคโรทีนอยด์ รวม
ต้นควบคุม	0.204	0.165	0.249	0.268±0.02 ^a	0.168±0.03 ^a	1.174±0.17 ^a
ถ่ายยีนต้นที่ 16	0.570	0.389	0.604	0.660±0.08 ^b	0.374±0.00 ^b	3.594±0.63 ^b
ถ่ายยีนต้นที่ 21	0.695	0.527	0.830	0.912±0.00 ^c	0.494±0.05 ^c	4.047±0.34 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกัน หมายความว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ จากการทดสอบด้วยวิธี Duncan

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ได้วิธีการในการถ่ายยีน *crtW* ในต้นยาสูบ พืชเนื้ และคาลิบรากัว โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นในยาสูบได้เป็นต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *crtW* สำเร็จ แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นในพืชเนื้และคาลิบรากัว เนื่องจากสูตรอาหารอาจไม่เหมาะสม ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนมีการสังเคราะห์สารแอสตาแซนทินสะสมในโครโมพลาสต์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีมีสีส้มในใบ ลำต้น กลีบเลี้ยง หลอดกลีบดอก และรังไข่

ใบของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนมีปริมาณสารคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์รวมแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนอย่างมีนัยสำคัญ ผลการวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันด้วยวิธี TLC พบสารแอสตาแซนทินในชั้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายยีน แต่ไม่พบในชั้นส่วนพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตาแซนทินที่พบในใบของยาสูบด้วยวิธี HPLC พบปริมาณสารแอสตาแซนทิน 0.496 และ 0.383 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสดหนึ่งกรัมในใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 16 และ 21 ตามลำดับ แต่ไม่พบสารแอสตาแซนทินในใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *crtW* ในตัวอย่างพืชโดยวิธี PCR กับไพรเมอร์จำเพาะพบยีน *crtW* จากชิ้นส่วนใบของต้นยาสูบ แคลลัสของพืชเนื้และคาลิบรากัวที่ได้รับการถ่ายยีน และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *crtW* โดยวิธี RT-PCR พบว่าชิ้นส่วนใบของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน แคลลัสของพืชเนื้และคาลิบรากัวมีการแสดงออกของยีน *crtW*

ข้อเสนอแนะ

วิธีการถ่ายยีน *crtW* โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเข้าสู่ชิ้นส่วนของพืชมีประสิทธิภาพสามารถเกิดการถ่ายยีนได้สำเร็จ ซึ่งวิธีการถ่ายยีนนี้สามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานใช้อ้างอิงในการวิจัยศึกษาครั้งต่อไป สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับพืชที่ใกล้เคียงอย่างเช่นพืชในวงศ์ Solanaceae

ถึงแม้ว่าการศึกษาในครั้งนี้จะไม่ประสบความสำเร็จในการชักนำแคลลัสของพิทูเนียและคาลิบรากัวให้เจริญกลายเป็นต้นได้ ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญของการสร้างพืชตัดต่อพันธุกรรมเนื่องจากสายพันธุ์ของพิทูเนียและคาลิบรากัวที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้เป็นสายพันธุ์การค้าซึ่งมีความแตกต่างโดยเป็นคนละสายพันธุ์กับงานวิจัยที่ผ่านๆ มา อาจจะต้องมีการพัฒนาสูตรอาหารให้มีความเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นจากชิ้นส่วนใบของพิทูเนียและคาลิบรากัวต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2548. พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Azadi, P., N.V. Otang, D.P. Chin, I. Nakamura, M. Fujisawa, H. Harada, N. Misawa and M. Mii. 2010. Metabolic engineering of *Lilium* $\times$ *formolongi* using multiple genes of the carotenoid biosynthesis pathway. **Plant Biotechnol Rep.** 4: 269-280.
- Cunningham, F.X. and E. Gantt. 2011. Elucidation of the pathway to astaxanthin in the flowers of *Adonis aestivalis*. **Plant Cell.** 23: 3055-3069.
- Chu, Y., J. Pan, A. Wu, R. Cai and H. Chen. 2014. Molecular cloning and functional characterization of dihydroflavonol-4-reductase gene from *Calibrachoa hybrida*. **Sci. Hortic.** 165: 398-403.
- Fraser, P.D., E.M.A. Enfissi and P.M. Bramley. 2009. Genetic engineering of carotenoid formation in tomato fruit and the potential application of systems and synthetic biology approaches. **Arch. Biochem. Biophys.** 483: 196-204.
- Fregonezi, J.N., C. Turchetto, S.L. Bonatto and L.B. Freitas. 2013. Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical Pampas grassland. **Bot. J. Linn. Soc.** 171: 140-153.
- Fujisawa, M., E. Takita, H. Harada, N. Sakurai, H. Suzuki, K. Ohyama, D. Shibata and N. Misawa. 2009. Pathway engineering of *Brassica napus* seeds using multiple key-enzyme genes involved in ketocarotenoid formation. **J. Exp. Bot.** 60: 1319-1332.
- Gerats, T. and J. Strommer. 2009. **Petunia Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics.** 2nd ed. Springer-Verlag New York, Inc., USA.
- Gerjets, T. and G. Sandmann. 2006. Ketocarotenoid formation in transgenic potato. **J. Exp. Bot.** 57: 3639-3645.

- Gerjets, T., M. Sandmann, C. Zhu and G. Sandmann. 2007. Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in leaves and flowers of tobacco species. **Biotechnol. J.** 2: 1263-1269.
- Harada, H., T. Maoka, A. Osawa, J. Hattan, H. Kanamoto, K. Shindo, T. Otomatsu and N. Misawa. 2014. Construction of transplastomic lettuce (*Lactuca sativa*) dominantly producing astaxanthin fatty acid esters and detailed chemical analysis of generated carotenoids. **Transgenic Res.** 23: 303-315.
- Hasunuma, T., S. Miyazawa, S. Yoshimura, Y. Shinzaki, K. Tomizawa, K. Shindo, S.K. Choi, N. Misawa and C. Miyake. 2008. Biosynthesis of astaxanthin in tobacco leaves by transplastomic engineering. **The Plant Journal.** 55: 857-868.
- Horsch, R.B., J.E. Fry, N.L. Hoffmann, D. Eichholtz, S.G. Rogers, and R.T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science.** 227, 1229-1231.
- Huang, J.C., Y.J. Zhong, J. Liu, G. Sandmann and F. Chen. 2013. Metabolic engineering of tomato for high-yield production of astaxanthin. **Metab. Eng.** 17: 59-67.
- Jayaraj, J., R. Devlin and Z. Punja. 2008. Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants. **Transgenic Res.** 17: 489-501.
- Mann, V., M. Harker, I. Pecker and J. Hirschberg. 2000. Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. **Nat. Biotechnol.** 18: 888-892.
- Misawa, N., Y. Satomi, K. Kondo, A. Yokoyama, S. Kajiwara, T. Saito, T. Ohtani and W. Miki. 1995. Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. **J. Bacteriol.** 177: 6575-6584.

- Mori, S., H. Kobayashi, Y. Hoshi, M. Kondo and M. Nakano. 2004. Heterologous expression of the flavonoid 3',5'-hydroxylase gene of *Vinca major* alters flower color in transgenic *Petunia hybrida*. **Plant Cell Rep.** 22: 415-421.
- Mori, S., M. Otani, H. Kobayashi and M. Nakano. 2014. Isolation and characterization of the dihydroflavonol 4-reductase gene in the monocotyledonous ornamental *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Leighton) Leighton. **Sci. Hortic.** 166: 24-30.
- Morris, W.L., L.J. Ducreux, P.D. Fraser, S. Millam and M.A. Taylor. 2006. Engineering ketocarotenoid biosynthesis in potato tubers. **Metab. Eng.** 8: 253-263.
- Murashige, T and F. Skoog. 1962. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant.** 15: 473-497.
- Suzuki, S., M. Nishihara, T. Nakatsuka, N. Misawa, I. Ogiwara and S. Yamamura. 2007. Flower color alteration in *Lotus japonicus* by modification of the carotenoid biosynthetic pathway. **Plant Cell Rep.** 26: 951-959.
- Thirukkumaran, G., O.V. Ntui, R.S. Khan and M. Mii. 2007. Thidiazuron: an efficient plant growth regulator for enhancing *Agrobacterium*-mediated transformation in *Petunia hybrida*. **Plant Cell Tiss Organ Cult.** 99: 109-115.
- Wellburn, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **J. Plant Physiol.** 144: 307-313.
- Zhu, C., T. Gerjets and G. Sandmann. 2007. *Nicotiana glauca* engineered for the production of ketocarotenoids in flowers and leaves by expressing the cyanobacterial *crtO* ketolase gene. **Transgenic Res.** 16: 813-821.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962)

สารเคมี	มิลลิกรัมต่อลิตร
Macronutrients	
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
Micronutrients	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22.300
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.930
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
KI	0.830
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
H_3BO_3	6.200
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025
Fe-EDTA solution	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.850
Na_2EDTA	37.250
Organic compounds	
Myo-inositol	100
Nicotinic acid	0.500
Pyridoxine HCl	0.500
Thiamin HCl	0.100
Glycine	2
Other	
Sucrose	30000
pH 5.6-5.8	

ตารางผนวกที่ 2 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร yeast extract peptone (YEP)

สารเคมี	กรัมต่อลิตร
Macronutrients	
yeast extract	10
Bacto peptone	10
NaCl	5
pH 7.0	

ตารางผนวกที่ 3 ส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR)

สาร	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10X PCR Buffer		2.0
dNTP Mixture	2.5 mM	1.6
Primer 1	20 pmol/μl	0.5
Primer 2	20 pmol/μl	0.5
TaKaRa <i>Taq</i>	5 units/μl	0.1
DNA template		1.0
dH ₂ O		14.3

ตารางผนวกที่ 4 ส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)

สาร	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
RT-PCR		
10X RT-PCR Buffer		1.00
MgCl ₂	25 mM	2.00
dNTP Mixture	10 mM	1.00
RNase inhibitor	40 units/μl	0.25
AMV reverse transcriptase XL	5 units/μl	0.50
Oligo dT-adapter primer	2.5 pmol/μl	0.50
RNase free dH ₂ O		4.75
RNA sample		
PCR		
10X PCR Buffer		2.00
dNTP Mixture	2.5 mM	1.60
Primer 1	20 pmol/μl	0.50
Primer 2	20 pmol/μl	0.50
TaKaRa <i>Taq</i>	5 units/μl	0.10
cDNA		5.00
dH ₂ O		10.30



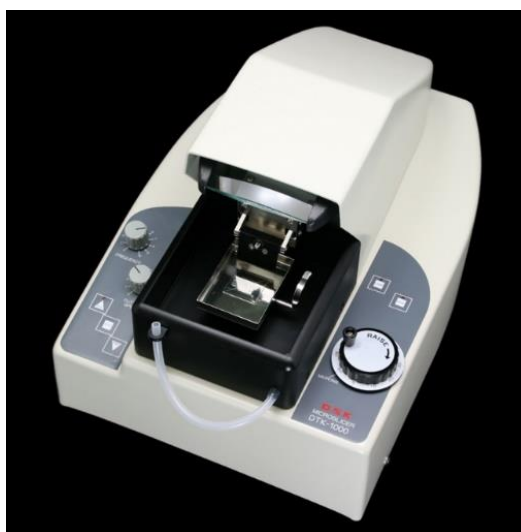
ภาพผนวกที่ 1 การปรับสภาพต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนในขณะออกปลูกลงภายนอกขวด เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องระบบปิดที่ควบคุมแสงและอุณหภูมิ



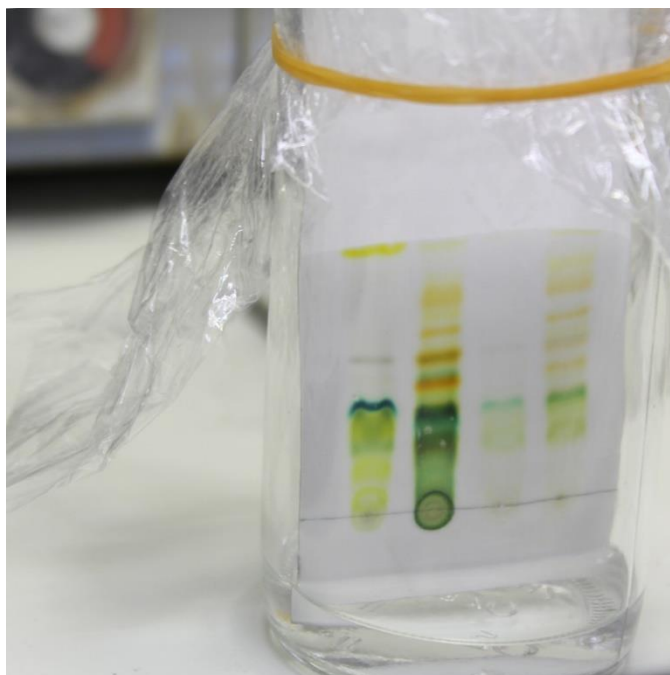
ภาพผนวกที่ 2 ตัวอย่างต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนอายุ 10 วันหลังจากการออกปลูกลง



ภาพผนวกที่ 3 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชใน agar 4 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้สำหรับการตัดเนื้อเยื่อตามขวางด้วยเครื่อง Microslicer รุ่น DTK-1000



ภาพผนวกที่ 4 เครื่อง Microslicer รุ่น DTK-1000



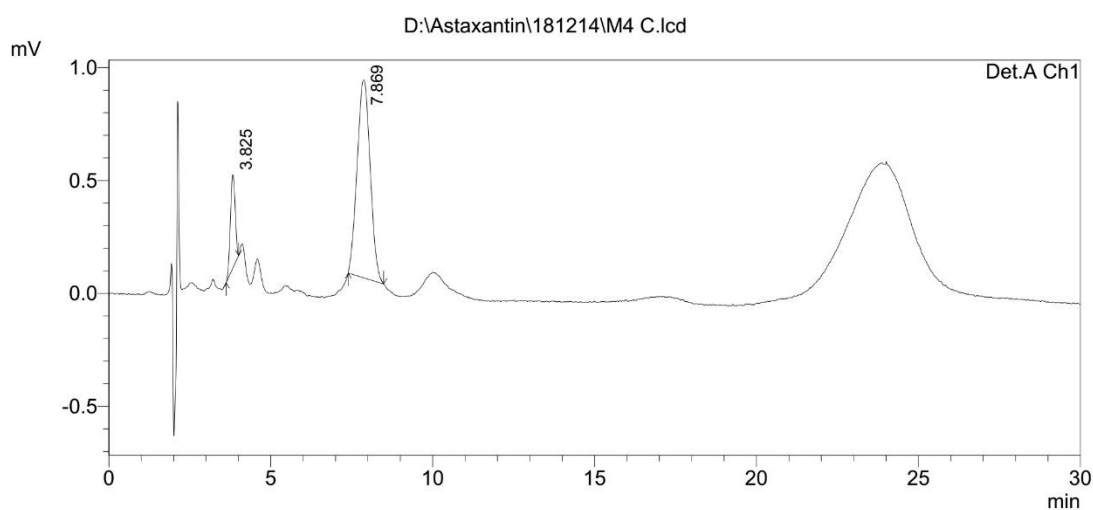
ภาพผนวกที่ 5 การจุ่มส่วนล่างของแผ่น TLC aluminum plate ลงในสารละลาย petroleum ether : acetone สัดส่วน 8 ต่อ 2 ในแก้วระบบปิด ในขณะที่ทำ Thin layer chromatography (TLC)

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

D:\Astaxantin\181214\M4 C.lcd

Acquired by : Admin
 Sample Name :
 Sample ID :
 Vial # : 8
 Injection Volume : 10 uL
 Data File Name : M4 C.lcd
 Method File Name : Astaxantin2.lcm
 Batch File Name : batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 1/1/2545 12:11:15
 Data Processed : 1/1/2545 12:41:19

<Chromatogram>



PeakTable

Detector A Ch1 474nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	3.825	4303	416	14.891	32.202
2	7.869	24595	876	85.109	67.798
Total		28898	1292	100.000	100.000

Quantitative Results

Detector A

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.
1	Astaxanthin	0.000	0	0	0.000

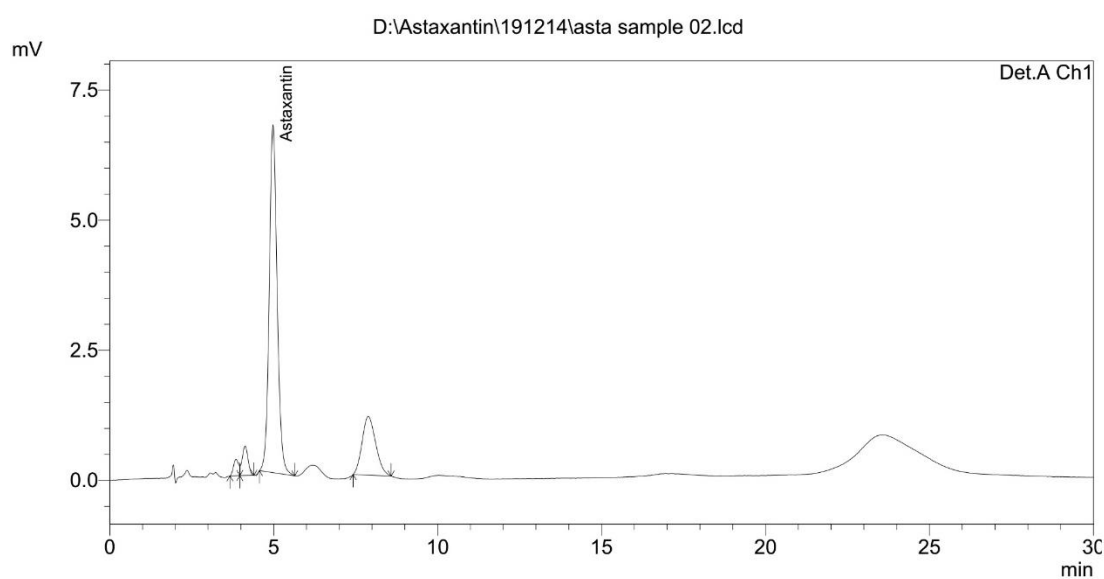
ภาพผนวกที่ 6 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตาแซนทินในตัวอย่างใบยาสูบที่ไม่ได้
 รับการถ่วงยีน โดยวิธี HPLC

==== Shimadzu LCsolution LC Data Image ====

Sample Information

Acquired by : Admin
 Sample Name : M4 T1
 Sample ID : asta 2
 Vial# : 17
 Injection Volume : 10 uL
 Data Filename : asta sample 02.lcd
 Method Filename : Astaxantin2.lcm
 Batch Filename : batch.lcb
 Report Filename : Default.lcr
 Date Acquired : 19/12/2557 16:42:01
 Data Processed : 19/12/2557 17:12:06

<Chromatogram>



PeakTable

Detector A Ch1 474nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
1		3.847	3454	316	0.000	
2		4.122	7061	567	0.000	
3	Astaxanthin	4.974	111218	6685	12.395	ppm
4		7.875	32433	1128	0.000	
Total			154166	8697		

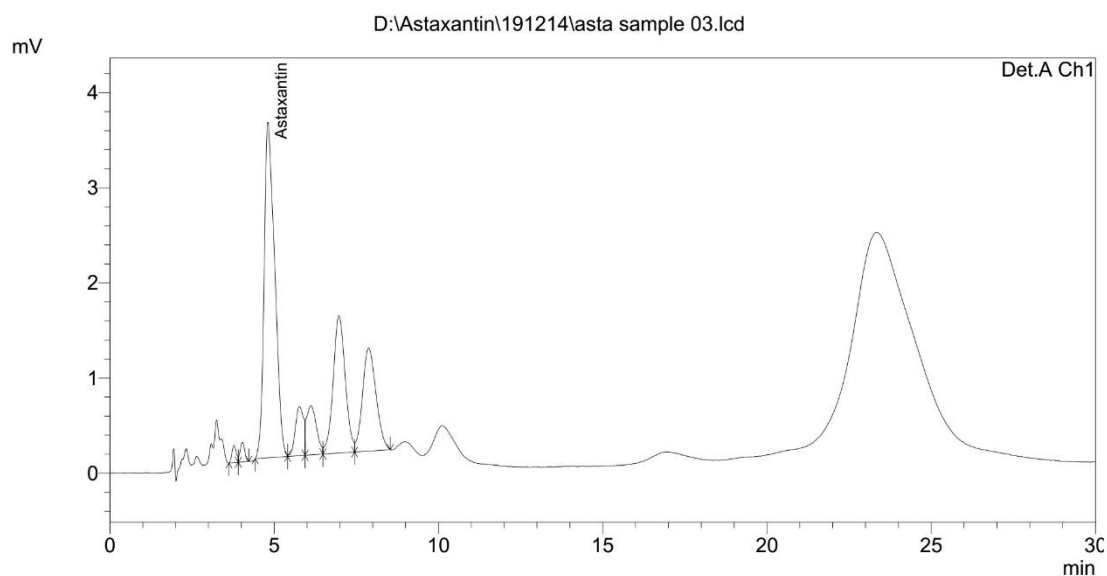
ภาพผนวกที่ 7 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตาแซนทินในตัวอย่างใบยาสูบที่ได้รับ
 การถ่ายยีนต้นที่ 16 โดยวิธี HPLC

==== Shimadzu LCsolution LC Data Image ====

Sample Information

Acquired by : Admin
 Sample Name : M4 T2
 Sample ID : asta 3
 Vial# : 18
 Injection Volume : 10 uL
 Data Filename : asta sample 03.lcd
 Method Filename : Astaxantin2.lcm
 Batch Filename : batch.lcb
 Report Filename : Default.lcr
 Date Acquired : 19/12/2557 17:14:08
 Data Processed : 19/12/2557 17:44:13

<Chromatogram>



PeakTable

Detector A Ch1 474nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
1		3.772	1684	178	0.000	
2		4.027	1986	210	0.000	
3	Astaxanthin	4.806	78558	3529	8.321	ppm
4		5.766	9254	516	0.000	
5		6.116	10794	518	0.000	
6		6.964	37020	1443	0.000	
7		7.873	30928	1085	0.000	
Total			170223	7480		

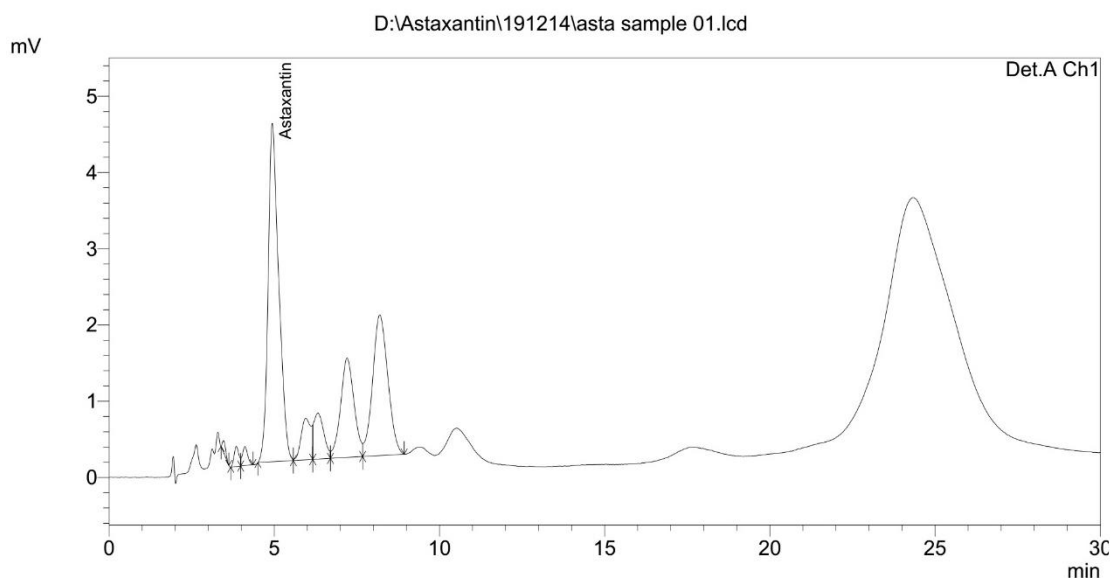
ภาพผนวกที่ 8 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตาแซนทินในตัวอย่างใบยาสูบที่ได้รับ
 การถ่ายยีนต้นที่ 21 โดยวิธี HPLC

==== Shimadzu LCsolution LC Data Image ====

Sample Information

Acquired by : Admin
 Sample Name : M4 T2
 Sample ID : asta 1
 Vial# : 16
 Injection Volume : 10 uL
 Data Filename : asta sample 01.lcd
 Method Filename : Astaxantin2.lcm
 Batch Filename : batch.lcb
 Report Filename : Default.lcr
 Date Acquired : 19/12/2557 16:09:56
 Date Processed : 19/12/2557 16:40:01

<Chromatogram>



PeakTable

Detector A Ch1 474nm

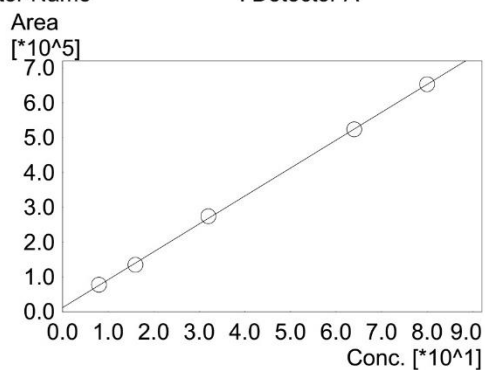
Peak#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
1		3.459	1050	148	0.000	
2		3.847	2667	264	0.000	
3		4.109	2749	249	0.000	
4	Astaxanthin	4.937	98772	4438	10.843	ppm
5		5.925	11556	534	0.000	
6		6.320	12545	604	0.000	
7		7.201	37172	1304	0.000	
8		8.189	59132	1847	0.000	
Total			225644	9388		

ภาพผนวกที่ 4 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ปริมาณสารแอสตาแซนทินในตัวอย่างใบยาสูบที่ได้รับ
 การถ่ายยีนต้นที่ 21 โดยวิธี HPLC

==== Shimadzu LCsolution Calibration Curve ====

<Calibration Curve>

ID# : 1
 Name : Astaxantin
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=8016.92 \cdot x+11845.5$
 $Rr1=0.9998629$ $Rr2=0.9997258$
 MeanRF:8597.65 RFSD:618.683 RFRSD:7.19596
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 WeightedRegression : None
 Detector Name : Detector A



#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	8.000	77294.9	77295
2	16.000	134661.2	134661
3	32.000	274202.7	274203
4	64.000	523387.0	523387
5	80.000	653065.1	653065

ภาพผนวกที่ 5 กราฟมาตรฐานพื้นที่ใต้กราฟต่อความเข้มข้นของสารแอสตาแซนทินที่สร้าง
 โดยโปรแกรม LC solution โดยใช้สารละลายที่เตรียมจากสารแอสตาแซนทิน
 มาตรฐานที่ความเข้มข้น 8, 16, 32, 64 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นายบดินทร์ ผดุงสวัสดิ์
เกิดวันที่	5 ตุลาคม 2533
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2555)
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา ปี พ.ศ. 2558 จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)