

ส่วนที่ 2

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2553

โครงการวิจัยรหัส ว-ท(ด)20.51

การวิเคราะห์การทำงานของยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชันโดย RNA interference

Functional analysis of curcuminoid biosynthetic gene in turmeric by RNA interference

(1)สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, (2)อมรา ทองปาน, (3)สมพิศ
 สามีภักดิ์

(1)Surin Peyachoknakul, (2)Amara Thongpan, (3)Sompik
 Samipak

บทคัดย่อ

จากการตรวจเอกสารทราบว่า การสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์เกิดจากการทำงานร่วมกันของ เอนไซม์ 2 ชนิด คือ diketide-CoA synthase (DCS) และ curcumin synthase (CURS) ทำให้ทราบ วิธีการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ และมีรายงานการโคลนยีนทั้ง 2 ยีน ดังกล่าวแล้ว จึงออกแบบ ไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณส่วนของยีน DCS และ CURS นำแต่ละยีนมาเชื่อมต่อกันแบบกลับทิศทาง ในพลาสมิดโดยใช้ระบบ Gateway recombination ถ่ายยีนเข้าสู่ขมิ้นโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pSTARGATE ที่ตัดต่อยีน DCS และ CURS เรียบร้อย แล้ว เพื่อตรวจสอบการทำงานของยีนโดย RNA interference พบยีนที่สามารถเจริญบนอาหารคัด เลือกที่เดิมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 และ 4 ต้น (คิด เป็น 0.6 และ 0.8 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนโดยใช้ไพรเมอร์ของยีน hygromycin phosphotransferase (hpt) พบต้นที่มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 1 และ 4 ต้น ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ พบการแสดงออกของยีนทั้งในส่วนโคนต้นและ ใบ โดยต้นที่ได้รับการถ่ายยีน DCS และ CURS ที่ตรวจพบยีนเครื่องหมาย มีความเข้มของแถบดี เอ็นเอและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา RT-PCR น้อยกว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน จำนวน 1 และ 2 ต้น ตามลำดับ แสดงว่าบริเวณที่ออกแบบยีน DCS และ CURS ที่ใช้ในครั้งนี้เป็นบริเวณที่มีความสำคัญ สามารถลดการแสดงออกของยีนได้สำเร็จ

คำสำคัญ : ขมิ้นชัน, RNA interference, เคอร์คูมินอยด์

ABSTRACT

Pathway of curcuminoids biosynthesis in *Curcuma longa* was reported. They are synthesized by the coordination of two enzyme clusters, diketide-CoA synthase (DCS) and curcumin synthase (CURS). These two genes have been cloned. Therefore, specific primers were designed to amplify the fragment of DCS and CURS genes from turmeric. The

fragment from each gene was separately joined in the inverted orientation for the construction of the plasmid for RNA interference technique using Gateway recombination system. The plasmid pSTARGATE harboring the DCS or CURS gene in the RNAi construct was transformed to turmeric shoots. Cocultivation of *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 and turmeric shoot tissue was done followed by in vitro propagation of turmeric shoot on MS medium supplemented with 10 µg/ml hygromycin. Three (0.6%) and 4 (0.8%) putative DCS and CURS transformed plants were obtained. One of the DCS and all of the CURS transformed plants showed the presence of hpt marker gene by PCR. The expression of the target genes were also reduced in one DCS transformed plant with positive hpt gene and two CURS transformed plants. The result indicated that the region of DCS and CURS genes in this construct were successfully used for down regulation of these genes expression.

Key words : turmeric, *Curcuma longa*, RNA interference

(1)ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ บางเขน

(1)Faculty of Science

(2)คณะวิทยาศาสตร์ บางเขน

(2)Faculty of Science

(3)คณะวิทยาศาสตร์ บางเขน

(3)Faculty of Science

ส่วนที่ 2

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ.....2551-2553.....

โครงการวิจัยรหัส.....ว-ท(ด).20.51

ชื่อโครงการภาษาไทย.....การวิเคราะห์การทำงานของยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน

โดย RNA interference

ชื่อโครงการภาษาอังกฤษ Functional analysis of curcuminoid biosynthetic gene in turmeric by RNA
interference

ชื่อผู้วิจัยภาษาไทย.....สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล⁽¹⁾ อมรา ทองปาน⁽¹⁾ สมพิศ สามิภักดิ์⁽¹⁾

ชื่อผู้วิจัยภาษาอังกฤษ Surin Peyachoknagul⁽¹⁾ Amara Thongpan⁽¹⁾ Sompid Samipak⁽¹⁾

บทคัดย่อ

จากการตรวจเอกสารทราบว่า การสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์เกิดจากการทำงานร่วมกันของ เอนไซม์ 2 ชนิด คือ diketide-CoA synthase (DCS) และ curcumin synthase (CURS) ทำให้ทราบวิธีการ สังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ และมีรายงานการโคลนยีนทั้ง 2 ยีน ดังกล่าวแล้ว จึงออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่ม ปริมาณส่วนของยีน DCS และ CURS นำแต่ละยีนมาเชื่อมต่อกันแบบกลับทิศทางในพลาสมิดโดยใช้ระบบ Gateway recombination ถ่ายยีนเข้าสู่ขมิ้นโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pSTARGATE ที่ตัดต่อยีน DCS และ CURS เรียบร้อยแล้ว เพื่อตรวจสอบการทำงานของยีนโดย RNA interference พบยีนที่สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกที่เติมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 และ 4 ต้น (คิดเป็น 0.6 และ 0.8 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ตรวจสอบการมีอยู่ ของยีนโดยใช้ไพรเมอร์ของยีน *hygromycin phosphotransferase (hpt)* พบต้นที่มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 1 และ 4 ต้น ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ พบการแสดงออกของยีนทั้งในส่วน โคนต้นและใบ โดยต้นที่ได้รับการถ่ายยีน DCS และ CURS ที่ตรวจพบยีนเครื่องหมาย มีความเข้มของแถบ ดีเอ็นเอและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา RT-PCR น้อยกว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน จำนวน 1 และ 2 ต้น ตามลำดับ แสดงว่าบริเวณที่ออกแบบยีน DCS และ CURS ที่ใช้ในครั้งนี้เป็นบริเวณที่มีความสำคัญ สามารถลดการแสดงออกของยีนได้สำเร็จ

คำสำคัญ: ขมิ้นชัน, RNA interference, เคอร์คูมินอยด์

⁽¹⁾ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Department of Genetics, Faculty of science, Kasetsart University, Bangkok 10900 Thailand.

ABSTRACT

Pathway of curcuminoids biosynthesis in *Curcuma longa* was reported. They are synthesized by the coordination of two enzyme clusters, diketide-CoA synthase (DCS) and curcumin synthase (CURS). These two genes have been cloned. Therefore, specific primers were designed to amplify the fragment of *DCS* and *CURS* genes from turmeric. The fragment from each gene was separately joined in the inverted orientation for the construction of the plasmid for RNA interference technique using Gateway recombination system. The plasmid pSTARGATE harboring the *DCS* or *CURS* gene in the RNAi construct was transformed to turmeric shoots. Cocultivation of *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 and turmeric shoot tissue was done followed by *in vitro* propagation of turmeric shoot on MS medium supplemented with 10 µg/ml hygromycin. Three (0.6%) and 4 (0.8%) putative *DCS* and *CURS* transformed plants were obtained. One of the *DCS* and all of the *CURS* transformed plants showed the presence of *hpt* marker gene by PCR. The expression of the target genes were also reduced in one *DCS* transformed plant with positive *hpt* gene and two *CURS* transformed plants. The result indicated that the region of *DCS* and *CURS* genes in this construct were successfully used for down regulation of these genes expression.

Key words: turmeric, *Curcuma longa*, RNA interference, curcuminoid

บทนำ

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) มีถิ่นกำเนิดในประเทศแถบเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (สถาบันวิจัยพืชสมุนไพร, 2544) แต่ปลูกมากในประเทศอินเดียและจีน ส่วนของขมิ้นที่นำมาใช้ประโยชน์ คือ ลำต้นใต้ดิน ที่เรียกว่าเหง้า หรือ หัวและแง่ง เหง้าของขมิ้นมีสารสำคัญ 2 กลุ่ม คือ น้ำมันหอมระเหย และสารเคอร์คูมินอยด์ซึ่งมีสีเหลือง ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร และยาสมุนไพรหลายชนิด สารในกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ที่มีมาก คือ เคอร์คูมิน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารลดการอักเสบ ต้านการเกิดออกซิเดชัน ต้านเชื้อไวรัส HIV ต้านมะเร็ง และมีฤทธิ์ยับยั้งโปรโตซัวที่ทำให้เกิดโรคบางชนิด (Araújo and Leon, 2001) ในประเทศไทย ขมิ้นชันเป็นพืชสมุนไพรที่ได้รับความนิยม และส่งเสริมให้มีการปลูกอย่างแพร่หลาย นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร ยา และเครื่องสำอางหลายชนิด มีรายงานพบว่าสารเคอร์คูมินอยด์ในเหง้าที่มีอายุต่างกันมีปริมาณไม่เท่ากัน (Chavalittumrong and Jirawattanapong, 1992) ขมิ้นชันต่างพันธุ์ก็ผลิตสารเคอร์คูมินอยด์ได้ไม่เท่ากันและแม้แต่ในพันธุ์เดียวกันถ้าปลูกในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน ผลผลิตของสารเคอร์คูมินอยด์ก็แตกต่างกันด้วย (ชัยพัฒน์ และคณะ, 2535)

สารกลุ่มโพลีคีไทด์ (polyketide) เป็นสารที่สังเคราะห์จากสิ่งมีชีวิตทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และพืช เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ จัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) มีคุณสมบัติต้านเชื้อรา (antifungi) ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacteria) ต้านมะเร็ง (anticancer) (Hopwood and Sherman, 1990; Shen and Hutchinson, 1993) ทำให้สารกลุ่มนี้มีความสำคัญทางการแพทย์ ในการนำไปผลิตยา เช่น tetracycline,

daunorubicin, erythromycin, rapamycin และ lovastatin (Shen, 2003) การสังเคราะห์โพลีคีไทด์อาศัยการทำงานของเอนไซม์ polyketide synthase (PKS) ซึ่งทำงานคล้ายกับเอนไซม์ fatty acid synthase (FAS) ในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาว (long-chain fatty acid) ของยูแคริโอต การสังเคราะห์โพลีคีไทด์เริ่มจาก acetyl-CoA เป็นโมเลกุลเริ่มต้น (starter molecule) แล้วใช้ malonyl-CoA เป็นโมเลกุลต่อเติม (extender molecule) มาสร้างคาร์บอนสายหลัก (Hopwood and Sherman, 1990) แต่การทำงานของเอนไซม์ PKS ต่างจากเอนไซม์ FAS คือ มีความหลากหลายในการเลือกโมเลกุลเริ่มต้นและโมเลกุลต่อเติม เช่น propionyl-CoA และ butyryl-CoA ทำให้โพลีคีไทด์มีสายคาร์บอนหลักที่ต่างกัน เมื่อสังเคราะห์คาร์บอนสายหลักอาจเกิดการเชื่อมต่อกันเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) หรือวงแหวนแลคโตน (lactone ring) และมีการดัดแปลงโครงสร้างภายหลัง (post-modification) เช่น เติมหุ้มเมทิล ($-CH_3$) ไฮดรอกซิล ($-OH$) ทำให้สารที่ได้มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (อรินทิพย์, 2541; Thamchaipenet, 1999) เอนไซม์ PKS ของแบคทีเรียสามารถแบ่งได้ 3 ชนิด คือ เอนไซม์ PKS ชนิดที่ 1 (Type I PKS) ชนิดที่ 2 (Type II PKS) และชนิดที่ 3 (Type III PKS)

เอนไซม์ chalcone synthase (CHS) อยู่ใน superfamily ของเอนไซม์ PKS ชนิดที่ 3 (Austin and Noel, 2003) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ (flavonoid) โดยสังเคราะห์สารตั้งต้น (precursor) ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ naringenin chalcone ซึ่งใช้ p-coumaroyl-CoA เป็นโมเลกุลเริ่มต้นแล้วนำ malonyl-CoA 3 โมเลกุลมาต่อ (Dixon, 1999) เอนไซม์ CHS มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (antimicrobial phytoalexin) ด้านมะเร็ง (cancer chemopreventive phenylpropanoid) เป็นตัวเหนี่ยวนำ (inducer) ของสารฟลาโวนอยด์ (Schröder, 1999) จากการศึกษาเอนไซม์ CHS ในพืชต่าง ๆ พบ chalcone synthase related enzyme (CHS-like) จัดอยู่ใน superfamily ของเอนไซม์ CHS มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนของเอนไซม์ CHS ประมาณ 60-75% เช่น stilbene synthase (STS) (Schöppner and Kindl, 1984), acridone synthase (ACS) (Lukacin *et al.*, 1999), 2-pyrone synthase (2PS) (Eckermann *et al.*, 1998), phlorisovalerophenone synthase (VPS) (Okada and Ito, 2001), bibenzyl synthase (BBS) (Preisig-Mueller *et al.*, 1995), aloesone synthase (ALS) (Abe *et al.*, 2004) การทำงานของเอนไซม์ CHS-like ใช้โมเลกุลเริ่มต้นและจำนวน malonyl-CoA ต่างกันออกไป (Dixon, 1999) เช่น เอนไซม์ ALS ใช้ acetyl-CoA เป็นโมเลกุลเริ่มต้นและใช้ malonyl-CoA 6 โมเลกุลเป็นหน่วยต่อเติม (Abe *et al.*, 2004)

ยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ CHS และเอนไซม์ CHS-like เป็น multigene family โครงสร้างยีนส่วนใหญ่ประกอบด้วย 2 เอกซอน (exons) และ 1 อินทรอน (intron) ในพืชแต่ละชนิดมีความยาวของเอกซอนและอินทรอนไม่เท่ากัน ยกเว้นใน *Antirrhinum majus* มี 2 อินทรอน โดย อินทรอนที่ 2 อยู่ในเอกซอนที่ 2 เมื่อเทียบกับยีนเดียวกันในพืชอื่น (Sommer and Saedler, 1986) ยีน CHS นั้นพบได้หลายชุดต่างกันขึ้นกับชนิดพืช เช่น *Pitunia* มี 8 ยีน *Vitis* มี 3 ยีน *Ipomoea* มี 6 ยีน ใน *Antirrhinum* และ *Arabidopsis* พบเพียง 1 ยีน (Farzad *et al.*, 2005) บางยีนรู้หน้าที่แล้ว แต่บางยีนยังรู้หน้าที่ จากการทำ phylogenetic tree ของเอนไซม์ PKS ชนิดที่ 3 ที่พบในแบคทีเรียและพืช พบว่าเอนไซม์ PKS ชนิดที่ 3 จากพืชและแบคทีเรียแบ่งกลุ่มกันอย่างชัดเจน (Abe *et al.*, 2004)

จากเอกสารต่าง ๆ ที่ศึกษาเกี่ยวกับยีน CHS และ CHS-like แสดงถึงความหลากหลายของยีนนี้ โดยการทำงานของเอนไซม์ที่สร้างขึ้นจะใช้โมเลกุลตั้งต้นที่ต่างกัน และผลผลิตที่ได้มีโครงสร้างหลายแบบ ซึ่งยังคงพบหมู่คีโตน ไฮดรอกซิล หรือคาร์บอนที่มีพันธะคู่ อยู่ในโมเลกุล นับเป็นลักษณะเฉพาะของสารโพลีคีโตนด์ สารเคอร์คูมินอยด์เกิดจากปฏิกิริยาการรวมกันของ coumaroyl-CoA, feruloyl-CoA และ malonyl-CoA โดยเอนไซม์ curcuminoid synthase (Ramirez-Ahumada *et al.*, 2006) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม PKS กลุ่มที่ 3 (Brand *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์หิกรกรรมของเอนไซม์ที่ได้ พบในใบขมิ้นแต่ไม่พบในหัวจึงยังมีข้อสงสัยอยู่ จากการสืบค้นข้อมูลจากฐานข้อมูล GenBank พบว่ายีนที่มีความสำคัญในการสร้างสารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน มี 2 ยีน ได้แก่ ยีน *DCS* (diketide-CoA synthase) และ *CURS* (curcumin synthase) *DCS* ทำหน้าที่สังเคราะห์ diketide CoA ester จาก feruloyl-CoA และ malonyl-CoA โดยพบว่าเอนไซม์ *DCS* ชอบใช้ feruloyl-CoA เป็นสารตั้งต้นมากกว่า p-coumaroyl-CoA ทำให้พบปริมาณสารเคอร์คูมินมากกว่าสารอีกสองชนิด (Katsuyama *et al.*, 2009a) ส่วน *CURS* มี 3 ยีน คือ *CURS1*, *CURS2* และ *CURS3* โดยพบว่าเอนไซม์ *CURS2* และ *CURS3* เป็น isozyme กับ *CURS1* ทำหน้าที่เปลี่ยน diketide-CoA ester เป็นสารเคอร์คูมินอยด์ (Katsuyama *et al.*, 2009b) การโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ และหลังจากการโคลนยีนแล้ว วิธีที่ใช้ตรวจสอบยืนยันว่ายีนที่ได้เป็นยีนที่ต้องการจริง ปัจจุบันนิยมทำ RNA interference เพื่อดูผลที่เกิดขึ้นในพืช หลังจากยับยั้งการแสดงออกของยีนซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมาก

วิธีวิจัย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขมิ้นชัน

นำเหง้าขมิ้นชันมาเพาะเพื่อให้งอกเป็นหน่ออ่อนสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลังจากขมิ้นชันงอกแล้ว นำมาล้างทำความสะอาดเอาดินออก ตัดเฉพาะส่วนตาขมิ้นชัน ลอกเปลือกและผิวนอกออก จากนั้นล้างด้วยน้ำสบู่และน้ำไหลจากก๊อกจนสะอาด ล้างด้วย 70% เอทานอลประมาณ 30 วินาทีในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว เช้าแล้วเท 70% เอทานอลทิ้ง เติม 20% Clorox + tween-20 ประมาณ 1-2 หยด นำไปแช่ในเครื่องเขย่าประมาณ 20 นาทีให้เกิดฟอง สังเกตความขุ่นของพืชด้วย นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ทำในตู้ laminar flow) ประมาณ 3-4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จนกว่าฟองจะหมด เทน้ำกลั่นทิ้ง นำตาขมิ้นชันมาตัดส่วนเกินออกและตกแต่งให้สะอาดปลอดเชื้อ นำชิ้นตาของขมิ้นชันที่ปลอดเชื้อใส่ลงขวดอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม BA (N^6 -benzyladenine) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประมาณ 2-3 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายยอดขมิ้นชันลงอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนยอดและราก

การชักนำให้เนื้อเยื่อขมิ้นชันเกิดเหง้าและ/หรือแคลลัส

การชักนำให้เกิดเหง้าในอาหารเพาะเลี้ยง ทำโดยเลี้ยงส่วนยอดขมิ้นชันบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร และวุ้น 7.2 กรัมต่อลิตร pH 5.6-5.8

เพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด ชุดหนึ่งเลี้ยงในที่ที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และอีกชุดหนึ่งเลี้ยงในที่มืด

การชักนำให้เกิดแคลลัส ทำโดยนำส่วนตายอดขม้นชั้นมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณส่วนของยีน DCS และ CURS

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของขม้นชั้น ตามวิธีของ Agrawal *et al.* (1992) ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน DCS และ CURS จากฐานข้อมูล (database) โดยเปรียบเทียบลำดับเบส และสังเคราะห์ไพรเมอร์จากตำแหน่งที่เหมาะสม เพิ่มปริมาณส่วนของยีนที่ใช้ในการสร้าง RNAi vector โดยออกแบบไพรเมอร์ยีนละ 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ DCS-F, DCS-R, DCSI-R, CURS-F, CURS-R และ CURSi-R ลำดับเบสของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ลำดับเบส
DCS-F	5'-CAACAGCACGCCCCAGTCGA-3'
DCS-R	5'-GTGCTGTTTCATCCTGGACGAG-3'
DCSi-R	5'-CCGAGCGATCCTGGACCAGG-3'
CURS-F	5'-TCAGCTCATCCATCACGAAGTACAC-3'
CURS-R	5'-CATCATTGACGCCATCGAAGC-3'
CURSi-R	5'-ATCATCGCCGACAACCTCGG-3'

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR

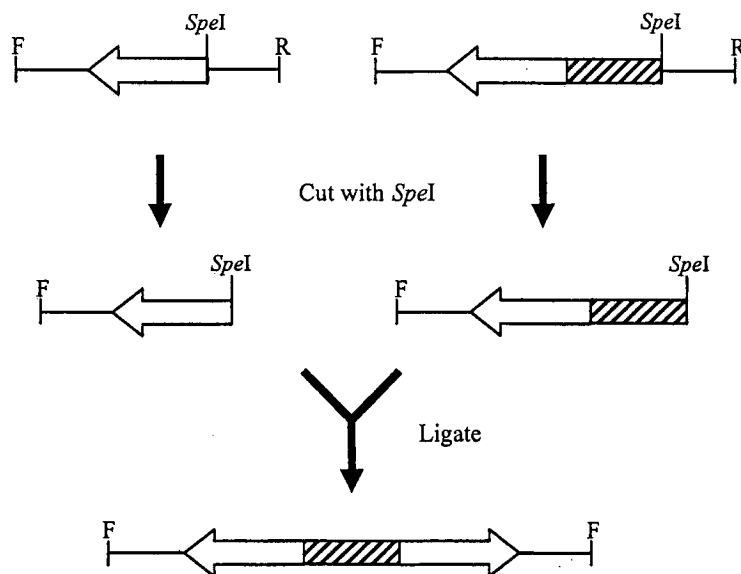
เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนทั้ง 2 ยีน จากดีเอ็นเอของขม้นชั้น ด้วยวิธี PCR โดยเริ่มบ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาทั้งหมด 40 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอนบ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที, 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที สุดท้ายบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส

เชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR กับพลาสมิด pGEM[®]-T easy vector และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* หลังจากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการโดยใช้วิธี PCR และสกัดพลาสมิดออกจากโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ เพื่อหาลำดับเบสต่อไป

การสร้างพลาสมิด RNAi vector ที่มีชิ้นส่วนของยีนหันในทิศตรงกันข้าม (inverted repeat)

เลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ในพลาสมิดในทิศทางเดียวกันของแต่ละยีน เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ F-bact และ R-bact ที่อยู่ในพลาสมิด pGEM[®]-T easy vector จากนั้นตัดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI* ตัดชิ้นส่วนที่ต้องการและสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากอะกาโรสเจล แล้วเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (ภาพที่ 1)

เชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ได้กับพลาสมิด pGEM[®]-T easy vector และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* หลังจากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการโดยใช้วิธี PCR และสกัดพลาสมิดออกจากโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ เพื่อหาลำดับเบส



ภาพที่ 1 แผนภาพแสดงการสร้างชิ้นดีเอ็นเอที่มีส่วนของ inverted repeat

การสร้างพลาสมิด RNAi vector ที่มีชิ้นส่วนของยีนหันในทิศตรงกันข้ามโดยใช้ Gateway[®] Recombination system

เพิ่มปริมาณส่วนของยีน DCSI และ CURSi ด้วยวิธี PCR ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว เชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ได้กับพลาสมิด pGEM[®]-T easy vector และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* หลังจากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ และสกัดพลาสมิดเพื่อหาลำดับเบสต่อไป

เตรียมพลาสมิด pENTRY vector ที่มีชิ้นส่วนของยีน DCSI และ CURSi

นำพลาสมิด pENTR[™] 1A vector ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และทำปฏิกิริยาดึงหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ออกด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase หลังจากนั้นตัดชิ้นพลาสมิดที่ต้องการและสกัดออกจากอะกาโรสเจล

เลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ในพลาสมิด pGEM[®]-T easy vector ในทิศทางเดียวกันของแต่ละยีน จากนั้นตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ตัดชิ้นส่วนที่ต้องการและสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากอะกาโรสเจล แล้วเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอกับพลาสมิด pENTR[™] 1A vector ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase และถ่ายเข้าสู่

แบคทีเรีย *E. coli* หลังจากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการโดยใช้วิธี PCR และสกัดพลาสมิดออกจากโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ ส่งเพื่อหาลำดับเบสต่อไป

การถ่ายชิ้นส่วนยีนเข้าสู่พลาสมิด pDESTINATION vector ด้วยปฏิกิริยา LR clonase

เลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ในพลาสมิด pENTR™ 1A vector แลกเปลี่ยนชิ้นส่วนยีนเข้าสู่พลาสมิด pSTARGATE vector ด้วยปฏิกิริยา LR clonase reaction หลังจากนั้นถ่ายพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* และคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ แล้วจึงถ่ายพลาสมิดที่ได้เข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่ต้นขมิ้นชัน

การถ่ายยีนเข้าสู่ขมิ้นชันโดย *Agrobacterium tumefaciens*

เลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pSTARGATE ที่ได้จากการทำ GATEWAY® recombination ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะ spectinomycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ rifampicin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งมีค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 – 0.6 จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารทิ้ง นำอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรละลายตะกอนเซลล์ และเติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ นำไปเลี้ยงนาน 3 ชั่วโมง ก่อนทำการปนเปื้อนกับชิ้นส่วนยอดเป็นเวลา 30 นาที โดยอาศัยคลื่นเสียง sonicate จากนั้นซับเชื้อ *A. tumefaciens* ออกด้วยกระดาษทิชชูปลอดเชื้อ ก่อนย้ายลงอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงกำจัด *A. tumefaciens* โดยล้างชิ้นส่วนยอดในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติม cefotaxime เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ซ้ำคั้น จากนั้นนำชิ้นส่วนยอดแช่ให้แห้งบนกระดาษทิชชูปลอดเชื้อ เพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตรเดิมที่เติม cefotaxime เข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และ hygeomycin 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาพแสงสีขาว ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อคัดเลือกเนื้อเยื่อขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน เป็นเวลา 2 เดือนโดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ เดือน

การตรวจสอบยีนที่ถ่ายเข้าสู่ขมิ้นชันโดยเทคนิค PCR

สกัดดีเอ็นเอจากยอดขมิ้นชันที่รอดชีวิตจากการคัดเลือกลงอาหารสูตร MS ที่เติมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเครื่องหมาย *hygromycin phosphotransferase (hpt)* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้น คือ HPT-F (5'-ATGTCCTGC GGGTAAATAGC -3') และ HPT-R (5'-GCCTCCAGAAGAAGATGTTG-3') นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณส่วนของยีนด้วยปฏิกิริยา PCR โดยเริ่มป้อนที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอนป้อนที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที สุดท้ายป้อนที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *DCS* และ *CURS* โดย semi-quantitative RT-PCR

นำส่วนของใบและโคนต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน สกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีของ Yu and Goh (2000) ละลายอาร์เอ็นเอในน้ำที่มี DEPC 30 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ชุด One-Step RT-PCR (Life Technologies) โดยปฏิกิริยา ประกอบด้วย อาร์เอ็นเอ (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร, 2X Reaction Mix 10 ไมโครลิตร, forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 1 ไมโครลิตร, RT/PLATINUM Taq Mix 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 5 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร เริ่มบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นดำเนินปฏิกิริยา ทั้งหมด 40 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอนบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที, 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที สุดท้ายบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ มาทำปฏิกิริยาแบบ semi-quantitative RT-PCR เพื่อวัดปริมาณอาร์เอ็นเอ โดยประมาณ โดยเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 18S rRNA ขนาด 101 คู่เบส เป็นยีนอ้างอิงในการปรับให้ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอต้นแบบของทุกๆ ตัวอย่างมีค่าเท่ากัน โดยออกแบบคู่ไพรเมอร์ 18S rRNA-F (5'-CCTTC CTCTAAATGATAAGGTTCAATGG-3') และ 18S rRNA-R (5'-GATTGAATGGTCCGGTGAAGTGT-3') ทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน *DCS* และ *CURS* และทำปฏิกิริยาถูกโซไฟลิเมอเรส จำนวน 15, 20, 25, 30 และ 40 รอบ ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

ผลและวิจารณ์

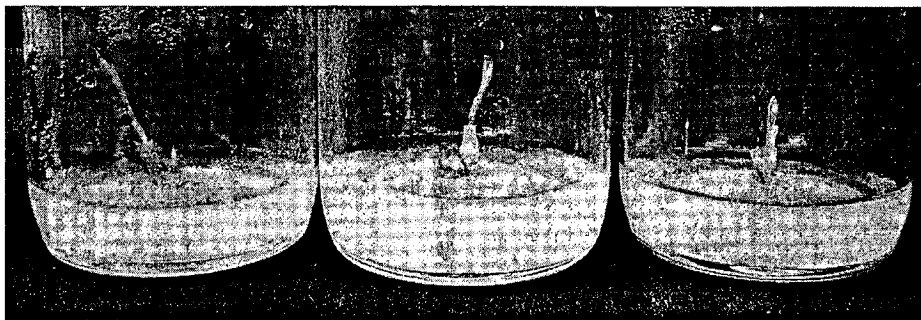
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขมิ้น

นำยอดอ่อนจากเหง้าของขมิ้นชันมาล้างด้วยน้ำสะอาด ฟอกฆ่าเชื้อด้วยเบตาดีนเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจุ่มในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที และฟอกในสารละลายไฮเตอร์ 15 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที เลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ สามารถเพิ่มจำนวนยอดและรากได้ โดยมีจำนวนยอด 2-5 ยอด จำนวนราก 1-2 ราก (ภาพที่ 2)

ชักนำให้เกิดเหง้าขมิ้นชันโดยเลี้ยงส่วนยอดขมิ้นชันบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่ที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวันและในที่มืด พบว่า ขมิ้นชันเกิดยอดและราก แต่ยังไม่เกิดเหง้าในเวลา 3 สัปดาห์ โดยขมิ้นชันที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตรที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวันเกิดยอด 1-2 ยอด สีเขียว และเกิดราก 1-2 ราก สีขาว และพบว่าเมื่อปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในอาหารเพิ่มขึ้น จำนวนและความสูงของยอดขมิ้นชันจะลดลง (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 ยอดขม้นชั้นที่ฟอกฆ่าเชื้อและเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน



MS+3BA+

ซูโครส 30 g/l

MS+3BA+

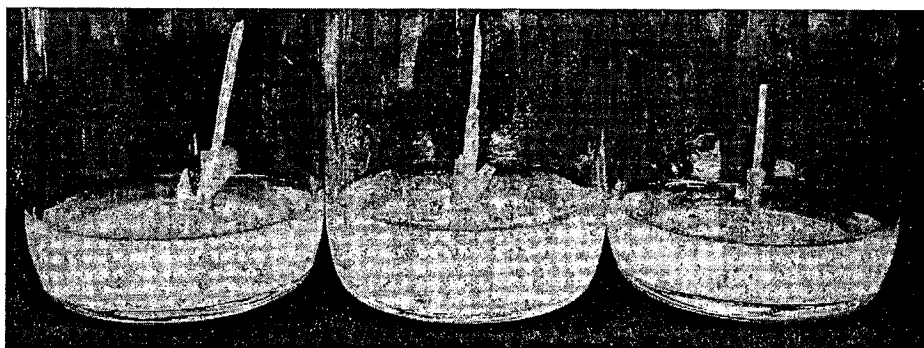
ซูโครส 60 g/l

MS+3BA+

ซูโครส 90 g/l

ภาพที่ 3 ยอดขม้นชั้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่ที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์

ขม้นชั้นที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตรในที่มืดเกิดยอด 1-2 ยอด สีขาว และพบว่า เมื่อปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในอาหารเพิ่มขึ้น จำนวนและความสูงของยอดขม้นชั้นจะลดลงเช่นเดียวกับที่เพาะเลี้ยงให้ได้รับแสง (ภาพที่ 4)



MS+3BA+

ซูโครส 30 g/l

MS+3BA+

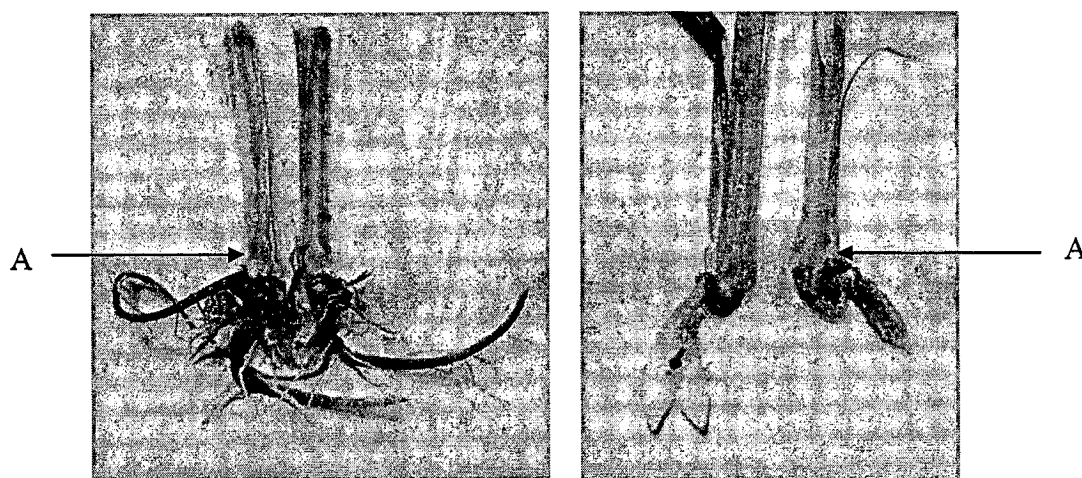
ซูโครส 60 g/l

MS+3BA+

ซูโครส 90 g/l

ภาพที่ 4 ยอดขม้นชั้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่มืด เป็นเวลา 3 สัปดาห์

การทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมในขั้นแรกยังไม่สามารถชักนำให้เกิดเหง้าในขมิ้นชันได้ จึงทดลองเปลี่ยนสูตรอาหารตามงานวิจัยของ Hashemy และคณะ (2009) โดยเลี้ยงยอดขมิ้นชันบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 และ 60 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่ให้แสง 8 และ 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าในทุกสูตรอาหารมีการแตกยอดใหม่ 1-2 ยอด มีความยาวของยอดเพิ่มขึ้น ส่วนโคนของยอดมีลักษณะอวบ พบการสะสมสารเคอร์คูมินอยด์ที่มีสีเหลืองบริเวณโคน (ภาพที่ 5) และพบว่ามีรากเกิดขึ้นจำนวนมาก โดยรากที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นสีขาวและเขียว มีขนาดใหญ่ อวบ มีขนรากจำนวนมาก แต่ไม่พบการสะสมสารสีเหลืองเกิดขึ้น



ภาพที่ 5 ยอดขมิ้นชันที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตรและให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 เดือน (A) บริเวณโคนต้นที่มีการสะสมของสารเคอร์คูมินอยด์

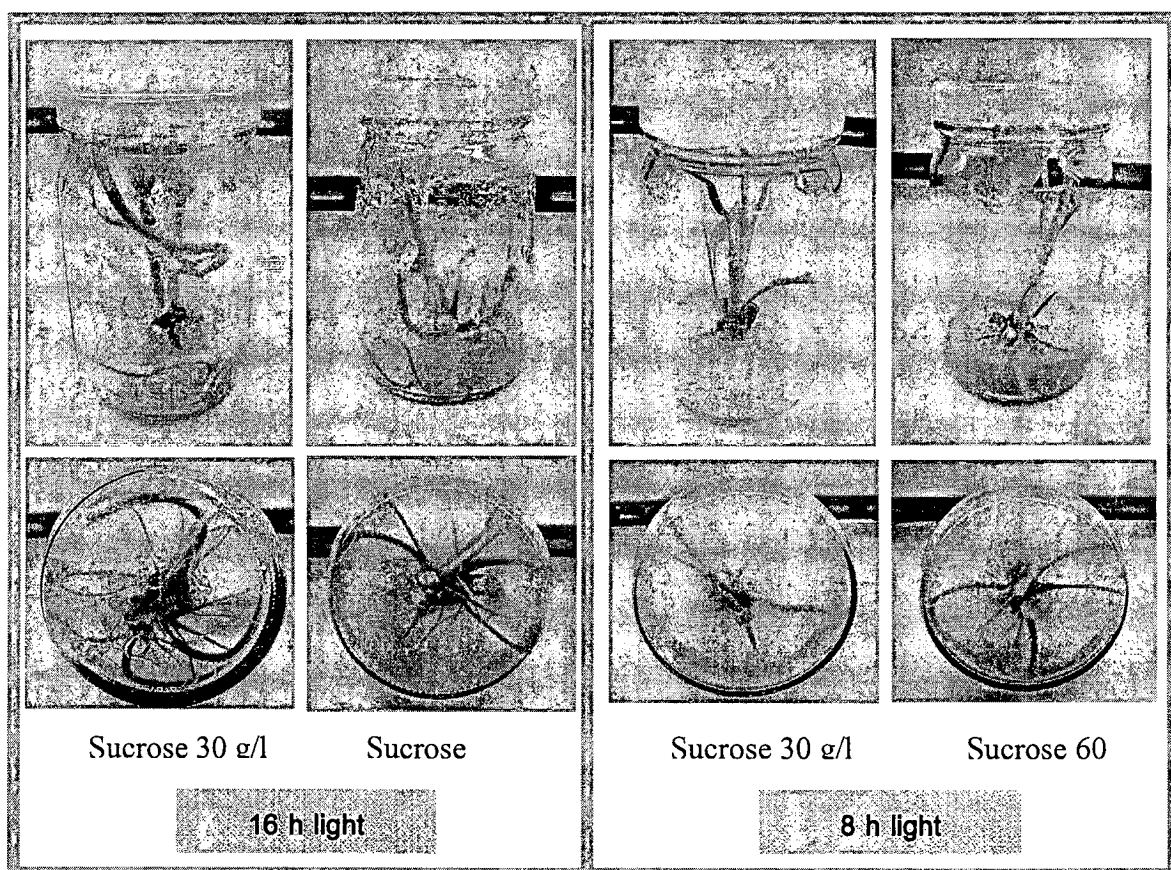
ยอดขมิ้นชันที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน มีจำนวนยอดและความยาวยอดไม่แตกต่างจากยอดที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร รากที่เกิดขึ้นในยอดที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตรจะมีจำนวนรากและความยาวรากมากกว่ายอดที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างของยอดที่เลี้ยงในที่ให้แสง 8 ชั่วโมงต่อวัน สำหรับยอดขมิ้นชันที่เลี้ยงในที่ให้แสง 8 และ 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าขมิ้นชันที่เลี้ยงในที่ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน มีความยาวรากและขนาดรากมากกว่ายอดที่เลี้ยงในที่ให้แสง 8 ชั่วโมงต่อวัน (ภาพที่ 6)

สำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสในขมิ้นชัน ทดลองนำส่วนตายอดขมิ้นชันเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ จึงหยุดการทดลองในส่วนนี้ไป

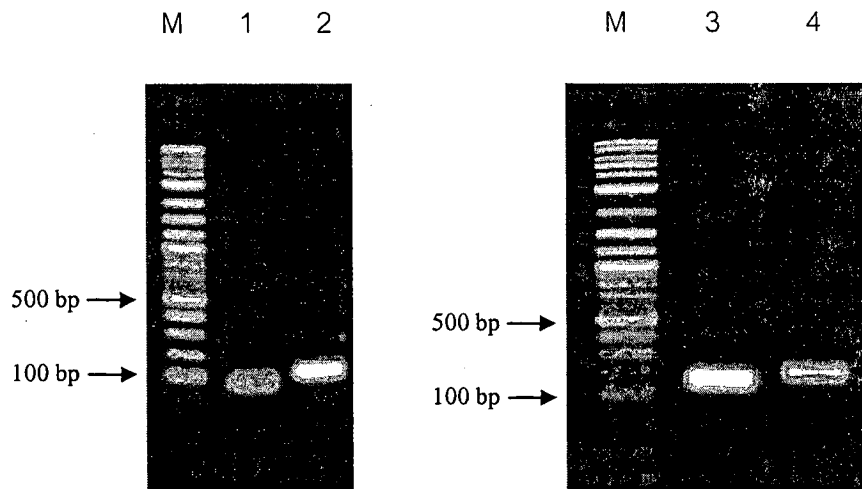
การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณส่วนของยีน DCS, DCSi, CURS และ CURSi

จากการสืบค้นข้อมูลจากฐานข้อมูล GenBank พบว่ายีนที่มีความสำคัญในการสร้างสารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน มี 2 ยีน ได้แก่ ยีน *DCS* (*diketide-CoA synthase*) และ *CURS* (*curcumin synthase*) (Katsuyama *et al.*, 2009) จึงออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณส่วนของยีน *DCS* ขนาด 90 คู่เบส และส่วนของยีนที่มีขนาดยาวขึ้นเพื่อใช้เป็นส่วนซ้ำแบบกลับทิศ (inverted repeat) สำหรับทำโครงสร้างยีนแบบ hairpin คือ *DCSi* ขนาด 196 คู่เบส และชิ้นส่วนของยีน *CURS* ขนาด 125 คู่เบส และ *CURSi* ขนาด 229 คู่เบส เพื่อทำให้เกิดโครงสร้างทำนองเดียวกัน โดยออกแบบไพรเมอร์ยีนละ 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ DCS-F, DCS-R, DCSi-R, CURS-F, CURS-R และ CURSi-R (ตารางที่ 1) โดยให้มีส่วนของลำดับเบสที่เหมือนกันของทั้งสองชิ้นในยีน *DCS* และ *CURS* ขนาด 90 คู่เบสและ 125 คู่เบสตามลำดับ แล้วนำไพรเมอร์มาใช้เพิ่มปริมาณส่วนของยีนด้วยวิธี PCR ได้ผลดังภาพที่ 7

นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR มาโคลนในพลาสมิด pGEM[®]-T easy vector และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* คัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอสอดแทรกอยู่ นำไปหาลำดับเบส พบว่า มีบางโคลนที่มีทิศทางไปทางเดียวกันตามที่ต้องการ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 6 ยอดขมิ้นชันที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 และ 60 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่ให้แสง 8 และ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 เดือน



ภาพที่ 7 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของขมิ้นชันด้วยวิธี PCR แถว M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder 1) ขั้วดีเอ็นเอส่วน DCS 2) ขั้วดีเอ็นเอส่วน CURS 3) ขั้วดีเอ็นเอส่วน DCSi และ 4) ขั้วดีเอ็นเอส่วน CURSi

>DCS : 90 bp

GTGCTGTTTCATCCTGGACGAGATGCGGAACCGCTCGGCTGCGGAGGGCCACGCCACCACCGGCGAGGGGC
TCGACTGGGGCGTGCTGTTG

>DCSi : 196 bp

CCGAGCGATCCTGGACCAGGTGGAGGCGCGGCTCGGACTGGAGAAGGACCGGCTCGCCGCGACGCGGCAC
GTACTCAGCGAGTACGGCAACATGCAGAGCGCCACGGTGCTGTTTCATCCTGGACGAGATGCGGAACCGCTCG
GCTGCGGAGGGCCACGCCACCACCGGCGAGGGGCTCGACTGGGGCGTGCTGTTG

>CURS : 125 bp

CATCATTGACGCCATCGAAGCCAAGCTGCAGCTGAGCCCGGACAAGCTCAGCACCGCCCGCCACGTCTTCAC
AGAGTACGGCAACATGCAGAGCGCCACCGTGTACTTCGTGATGGATGAGCTGA

>CURSi : 229 bp

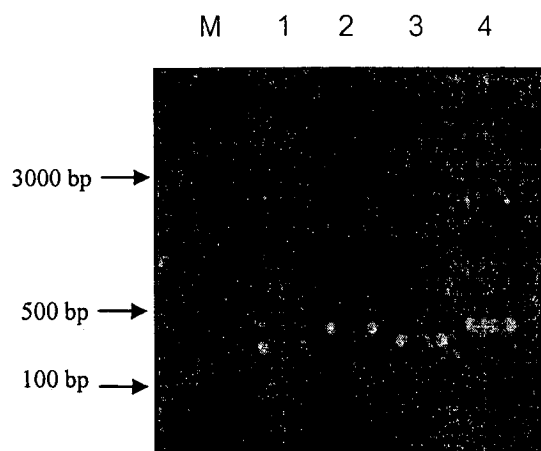
ATCATCGCCGACAACCTCGGGAGGAGCCTGGAGCGGGCGTTGGCGCCGCTGGGGGTGAGGGAGTGGAACG
ACGTCTTCTGGGTGGCGCACCCGGGCAACTGGGCCATCATTGACGCCATCGAAGCCAAGCTGCAGCTGAGCC
CGGACAAGCTCAGCACCGCCCGCCACGTCTTCACAGAGTACGGCAACATGCAGAGCGCCACCGTGTACTTCG
TGATGGATGAGCTGA

ภาพที่ 8 แสดงลำดับเบสส่วนของยีน DCS และ CURS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR อักษรตัวหนา คือ ลำดับเบสของไพรเมอร์

การสร้างพลาสมิด RNAi vector ที่มีชิ้นส่วนของยีนหันในทิศตรงกันข้าม (inverted repeat)

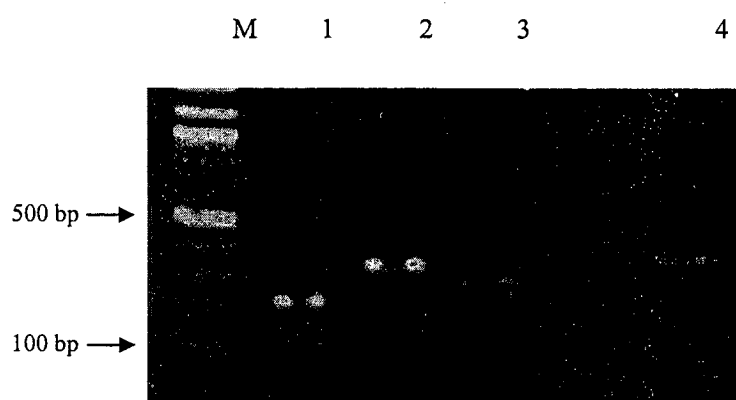
ในแต่ละยีน เลือกโคลนที่มีขั้วดีเอ็นเอแทรกอยู่ในพลาสมิดในทิศทางเดียวกัน เพิ่มปริมาณขั้วดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ F-bact และ R-bact ที่อยู่ในพลาสมิด pGEM[®]-T easy vector ได้ผลดัง ภาพที่ 9 จากนั้นตัด

ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI* และสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากอะกาโรสเจล เพื่อนำชิ้นส่วนแต่ละคู่ (DCS กับ DCSi และ CURS กับ CURSi) มาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase ตามวิธีในภาพที่ 1



ภาพที่ 9 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ F-bact และ R-bact ที่อยู่ในพลาสมิด pGEM[®]-T easy vector แถว M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder 1) ชิ้นดีเอ็นเอส่วน DCS 2) ชิ้นดีเอ็นเอส่วน DCSi 3) ชิ้นดีเอ็นเอส่วน CURS และ 4) ชิ้นดีเอ็นเอส่วน CURSi

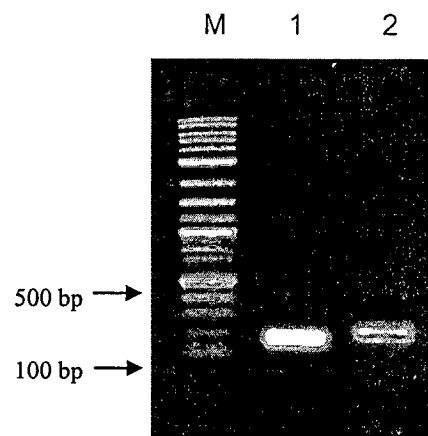
จากการทดลอง พบว่า ในขั้นตอนการตัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลนั้น ไม่สามารถแยกแถบดีเอ็นเอส่วนของ DCS เป็นแถบเดี่ยวได้ จึงได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 2 แถบ (ภาพที่ 10) เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอแต่ละคู่เข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase แต่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เชื่อมติดกันในทิศตรงข้ามมีน้อยจนไม่สามารถตรวจสอบได้จากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล จึงนำมาต่อกับพลาสมิด pGEM[®]-T easy vector และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* เพื่อเพิ่มจำนวนอีกครั้งหนึ่ง คัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเชื่อมต่อกันในทิศตรงข้าม โดยนำไปหาลำดับเบส แต่ยังไม่พบโคลนที่ต้องการจึงเปลี่ยนวิธีใหม่



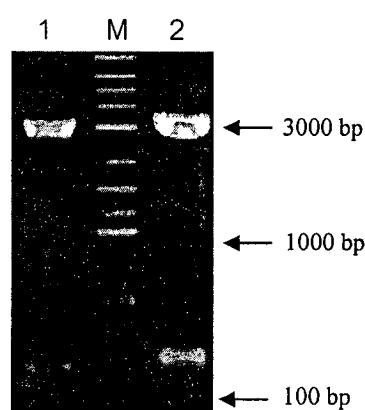
ภาพที่ 10 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI* แยกให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจล แล้วตรวจสอบผลโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสอีกครั้ง M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder 1) ชิ้นดีเอ็นเอส่วน DCS 2) ชิ้นดีเอ็นเอส่วน DCSi 3) ชิ้นดีเอ็นเอส่วน CURS และ 4) ชิ้นดีเอ็นเอส่วน CURSi

การสร้างพลาสมิด RNAi vector ที่มีชิ้นส่วนของยีนในทิศตรงข้ามโดยใช้ Gateway® Recombination system

การสร้างพลาสมิด RNAi vector โดยใช้ Gateway® Recombination system ทำโดยเพิ่มปริมาณส่วนของยีน DCSi ขนาด 196 คู่เบส และส่วนของยีน CURSi ขนาด 229 คู่เบส โดยใช้ไพรเมอร์ DCS-F กับ DCSi-R และ CURS-F กับ CURSi-R (ภาพที่ 11) นำไปโคลนในพลาสมิด pGEM®-T easy vector เลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอของแต่ละยีน ตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* หลังจากนั้นตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการและสกัดออกจากอะกาโรสเจล ดังภาพที่ 12

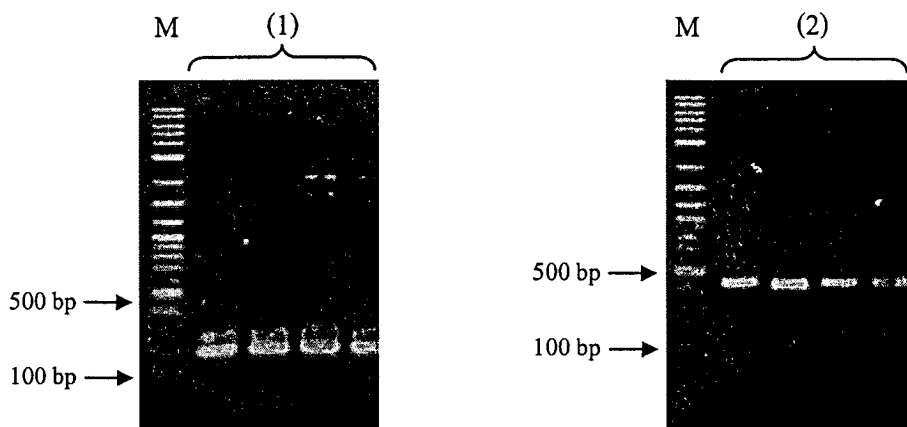


ภาพที่ 11 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR จากดีเอ็นเอของขมิ้นชัน (M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder 1) ชิ้นดีเอ็นเอจากส่วนของยีน DCS ขนาด 196 คู่เบส 2) ชิ้นดีเอ็นเอจากส่วนของยีน CURS1 ขนาด 229 คู่เบส



ภาพที่ 12 แสดงการใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากพลาสมิด pGEM®-T easy vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* แถว M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder 1) พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีน DCSi 2) พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีน CURSi

เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอที่ได้กับพลาสมิด pENTR™ 1A vector ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และดึงหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ออกด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* คัดเลือกโคลนด้วยยาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ reverse ที่อยู่บนพลาสมิด pENTR™ 1A vector กับไพรเมอร์ของยีนแต่ละยีน คือ DCS-F และ CURS-F ได้แถบดีเอ็นเอขนาด ประมาณ 400 คู่เบส (ภาพที่ 13) จากนั้นเลี้ยงเชื้อเพื่อสกัดพลาสมิดจากโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ สหาลำดับเบสได้ดัง ภาพที่ 14 จะเห็นว่า ชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ใน พลาสมิด pENTR™ 1A vector จะมีส่วนของบริเวณที่เป็น recombination site คือ *attL1* และ *attL2* อยู่ที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นดีเอ็นเอ เพื่อให้สามารถเกิดปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกับพลาสมิดอื่นที่มีบริเวณดังกล่าวเช่นเดียวกันได้



ภาพที่ 13 แสดงการใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ reverse กับไพรเมอร์ของยีน คือ DCS-F และ CURS-F แถว M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder 1) โคลนที่มีชิ้นส่วนยีน DCSi 2) โคลนที่มีชิ้นส่วนยีน CURSi และ DCSi

attL2

CAATAATGATTTTATTTTGACTGATAGTGACCTGTTGCGTTGCAACAAATTGATAAGCAATGCTTTCTTATAATGCCA
 ACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGATATCTCGAGTGCGGCCGC GATTCAACAGCACGCCCCAGTC
 GAGCCCCCTCGCCGGTGGTGGCGTGGCCCTCCGAGCCGAGCGGTTCCGCATCTCGTCCAGGATGAACAGC
 ACCGTGGCGCTCTGCATGTTGCCGTACTCGCTGAGTACGTGCCGCGTCGCGGCGAGCCGGCCCTTCTCCAG
 TCCGAGCCGCGCCTCCACCTGGTCCAGGATCGCTCGGAATCACTAGT GGTACCGGATCCAGTCGAC
 TGAATTGGTTCCTTTAAAGCCTGCTTTTTGTACAAAGTTGGCATTATAAAAAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAA
 CGAACAGGTCACATATCAGTCAAAATAAAATCATTATTTG

attL1

CURSi

attL2

CAATAATGATTTTATTTTGACTGATAGTGACCTGTTGCGTTGCAACAAATTGATAAGCAATGCTTTCTTATAATGCCA
 ACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGATATCTCGAGTGCGGCCGC ACTAGTGATATCATCGCCGACAA
 CCTCGGGAGGAGCCTGGAGCGGGCGTTGGCGCCGCTGGGGGTGAGGGAGTGAACGACGTCTTCTGGGTG

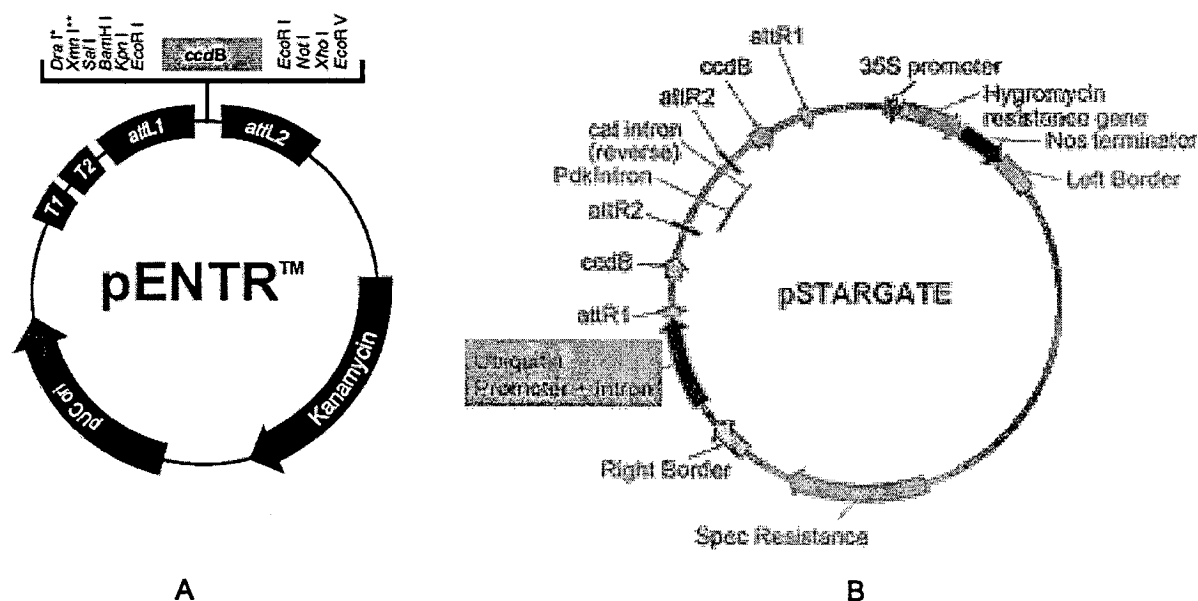
GCGCACCCGGGCAACTGGGCCATCATGGACGCCATCGAAGCCAAGCTGCAGCTGAGCCCGGACAAGCTCAG
 CACCGCCCGCCACGTCTTCACAGAGTACGGCAACATGCAGAGCGCCACCGTGTACTTCGTGATGGATGAGCT
 GAATC GGTACCGGATCCAGTCGACTGAATTGGTTCCTTTAAAGCCTGCTTTTTGTACAAAGTTGGCATT
 ATAAAAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACATCAGTCAAATAAAATCATTATTTG

attL1

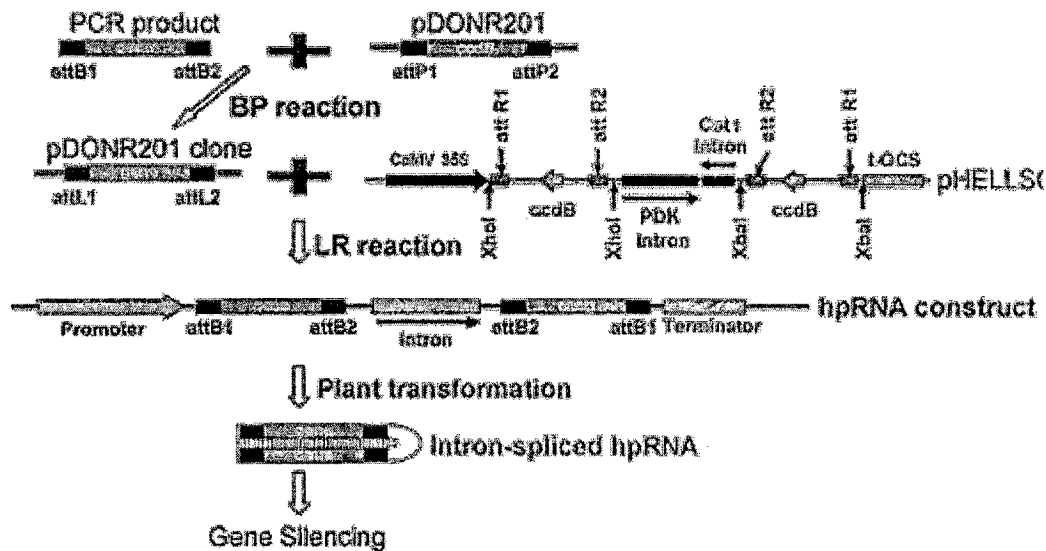
ภาพที่ 14 ลำดับเบสของยีน DCSi และ CURSi ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pENTR™ 1A vector แสดงด้วยอักษรตัวหนา แถบสีดำ คือ ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ส่วน attL1 และ attL2 คือ บริเวณที่เป็น recombination site

แลกเปลี่ยนชิ้นส่วนยีนเข้าสู่พลาสมิด pSTARGATE vector ด้วยปฏิกิริยา LR clonase

พลาสมิด pENTR™ 1A vector (ภาพที่ 15A) ซึ่งมีส่วนที่เป็น recombination site คือ attL1 และ attL2 อยู่ที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นดีเอ็นเอ ทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกับพลาสมิด pSTARGATE vector ขนาด 18,147 คู่เบส (ภาพที่ 15B) ซึ่งมีส่วนที่เป็น recombination site คือ attR1 และ attR2 อยู่ที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นส่วนยีน *ccdB* ทั้งสองยีนที่หันในทิศทางตรงกันข้าม โดยเอนไซม์ LR clonase จะชักนำให้เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างตำแหน่ง recombination site ของทั้งสองพลาสมิด ชิ้นส่วนยีนที่อยู่ในพลาสมิด pENTR™ 1A vector จะย้ายมาอยู่แทนที่ชิ้นส่วนยีน *ccdB* ในทิศทางตรงกันข้าม เกิดเป็น inverted repeat (ภาพที่ 16) หลังจากนั้นถ่ายพลาสมิดที่ได้เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* คัดเลือกโคลนด้วยยาปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธี PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 196 และ 229 คู่เบสตามลำดับ แสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอของยีน DCSi และ CURSi ได้แทรกอยู่ในพลาสมิด pSTARGATE vector เรียบร้อยแล้ว



ภาพที่ 15 แผนที่พลาสมิด (A) pENTR™ 1A vector (B) pSTARGATE vector



ภาพที่ 16 การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนยีนที่อยู่ระหว่าง attachment site ของพลาสมิด 2 พลาสมิด โดยอาศัย Gateway recombination และการเกิด double stranded RNA ในเซลล์พืช ซึ่งจะทำให้ยีนเป้าหมายหยุดการทำงาน

การถ่ายยีนเข้าสู่ขมิ้นชัน

หลังจากจัดสร้างพลาสมิด pSTARGATE ที่มีส่วนของยีน DCS และ CURS 2 ชุด แบบกลับทิศได้แล้ว จึงนำมาถ่ายยีนเข้าสู่ขมิ้นชันโดยอาศัยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 โดยตัดชิ้นส่วนของขมิ้นชันขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร เลี้ยงร่วมกับเชื้อโดยใช้คลื่นเสียง sonicate เป็นเวลา 30 นาที แล้วย้ายเนื้อเยื่อมาเลี้ยงบนอาหาร MS เป็นเวลา 2 วัน คัดเลือกเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร cefotaxime ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามวิธีของกัญญา และสุเม (2551) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าในชุดทดลองถ่ายยีน DCS จากจำนวนต้นที่ถ่ายยีนทั้งหมด 500 ต้น พบต้นที่สามารถแตกยอดใหม่ (ภาพที่ 17) เจริญเติบโตได้บนอาหารที่เติมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน จำนวน 3 ต้น คิดเป็น 0.6 เปอร์เซ็นต์ และชุดทดลองถ่ายยีน CURS1 จากจำนวนต้นที่ถ่ายยีนทั้งหมด 500 ต้น พบต้นที่สามารถแตกยอดใหม่บนอาหารคัดเลือกที่เติมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน จำนวน 4 ต้น คิดเป็น 0.8 เปอร์เซ็นต์



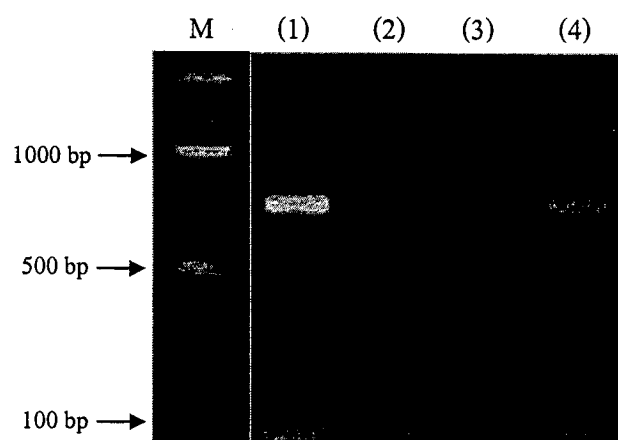
ภาพที่ 17 ยอดขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน DCS เป็นเวลา 1 เดือน

จากผลการทดลองถ่ายยีนเข้าสู่ต้นขมิ้นชันโดยอาศัยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย พบต้นที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกจำนวนน้อย อาจเนื่องจากชิ้นส่วนยอดที่ใช้ในการทดลองยังไม่เหมาะสมสำหรับ

การถ่ายยีน ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการถ่ายยีน ได้แก่ อายุ ขนาด ชิ้นส่วนที่นำมาใช้ในการถ่ายยีน (Hansen and Wright, 1999) นอกจากนั้นการเข้าบุกรุกของเชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นไปแบบสุ่ม เชื้ออาจเข้าไปบุกรุกบริเวณอื่นที่ไม่ใช่ส่วนกำเนิดยอดใหม่ ทำให้ไม่สามารถเกิดยอดที่เจริญบนอาหารคัดเลือกได้ และอีกสาเหตุหนึ่งเนื่องจากการถ่ายยีนโดยอาศัยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมานั้น มักใช้ในพืชใบเลี้ยงคู่ประสบความสำเร็จได้ดีกว่าพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เพราะการส่งสัญญาณกระตุ้นให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย้าย T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชใบเลี้ยงเดี่ยวมีน้อย ดังนั้นการเติมสารประกอบพวก phenolic เช่น acetosyringone ความเข้มข้นที่เหมาะสมสามารถกระตุ้นการเกิดการย้ายส่วน T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชได้ดีขึ้น (Curtis, 2010)

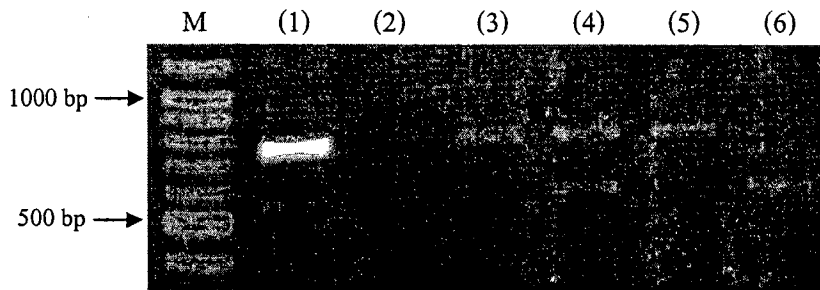
การตรวจสอบการแสดงออกของยีน

นำต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีนมาสกัดดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ HPT-F กับ HPT-R เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเครื่องหมาย *hygromycin phosphotransferase (hpt)* จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 763 คู่เบส จากชุดทดลองถ่ายยีน DCS ที่พบยอดขมิ้นชันสามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือก จำนวน 3 ต้นนั้น มีต้นที่ได้รับการถ่ายยีนหนึ่งต้นที่เกิดการปนเปื้อน จึงไม่สามารถนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้ เมื่อนำต้นที่ได้รับการถ่ายยีนที่เหลือมาตรวจสอบ พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน DCS ทั้งหมด 2 ต้น มี 1 ต้น ที่พบแถบดีเอ็นเอ ส่วนอีกต้นหนึ่งไม่พบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของยีนเครื่องหมาย *hygromycin phosphotransferase (hpt)* คือ HPT-F และ HPT-R ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 763 คู่เบส M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder 1) พลาสมิด pSTARGATE vector 2) ต้นขมิ้นชันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน 3) และ 4) ต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน DCS

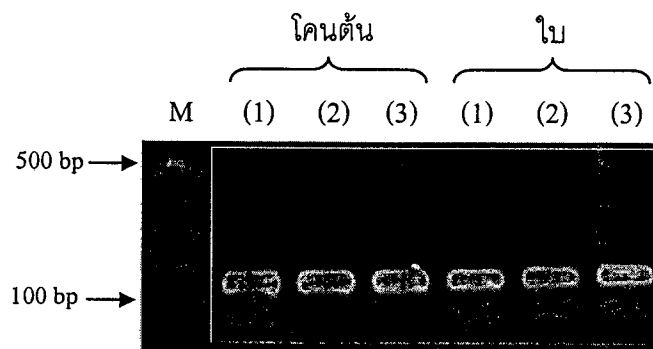
สำหรับต้นที่ได้รับการถ่ายยีน CURS พบว่ายอดที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือก เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเครื่องหมาย พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน CURS ทั้ง 4 ต้นพบแถบดีเอ็นเอของยีนเครื่องหมาย *hygromycin phosphotransferase (hpt)* เกิดขึ้น (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 แอปติเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของยีนเครื่องหมาย *hygromycin phosphotransferase (hpt)* คือ HPT-F และ HPT-R ได้แอปติเอ็นเอขนาด 763 คู่เบส M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder 1) พลาสมิด pSTARGATE vector 2) ต้นขมิ้นชันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน 3), 4), 5) และ 6) ต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน *CURS*

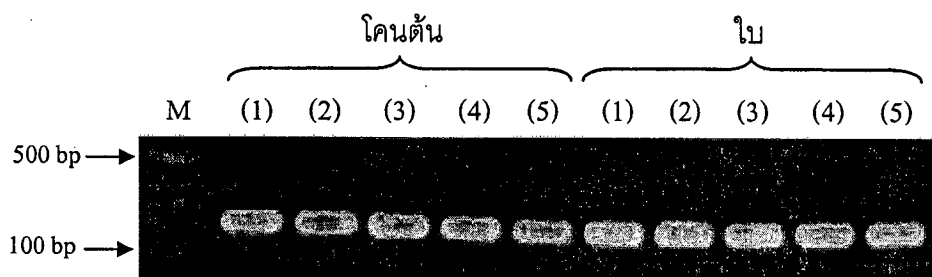
จากต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS* ทั้งหมด 2 ต้น ตรวจสอบพบแอปติเอ็นเอของยีน *hygromycin phosphotransferase (hpt)* เพียง 1 ต้น อาจเนื่องมาจากการเข้าบุกรุกของเชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นไปอย่างสุ่มในชิ้นส่วนตายอดที่นำมาถ่ายยีน เมื่อตายอดมีการพัฒนาสร้างยอดใหม่ขึ้นมา ยอดใหม่ที่เกิดขึ้นอาจไม่ได้กำเนิดมาจากเซลล์ต้นกำเนิดเดียวกัน ทำให้ยอดที่เกิดขึ้นใหม่บางยอดอาจมีและไม่มียีนที่ถ่ายเข้าไป เป็นสาเหตุที่ทำให้การตรวจสอบการถ่ายยีนด้วยปฏิกิริยา PCR แล้วไม่พบยีนดังกล่าว สำหรับต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *CURS* พบแอปติเอ็นเอของยีนเครื่องหมายในทุกต้น แสดงว่าสามารถถ่ายยีนเข้าสู่ยอดขมิ้นชันได้

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน สกัดอาร์เอ็นเอจากส่วนใบและโคนต้นของขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS* ตามวิธีของ Yu and Goh (2000) ทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน ได้แก่ DCS-F และ DCSi-R ได้แอปติเอ็นเอขนาด 196 คู่เบส ในทุกตัวอย่าง และแอปติเอ็นเอมีความหนาเท่ากัน และพบว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดจากส่วนโคนต้นขมิ้นชันและส่วนใบของขมิ้นชัน แอปติเอ็นเอที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 20)



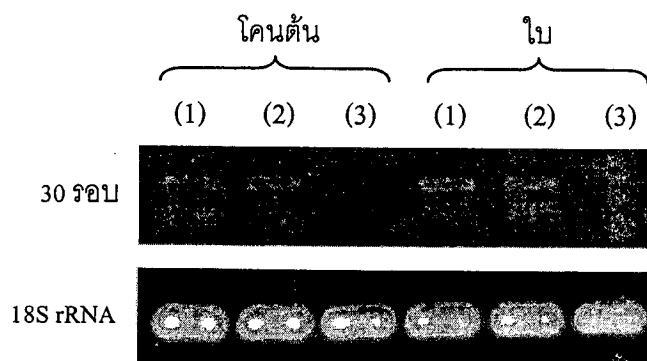
ภาพที่ 20 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนจากต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS* ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน ได้แอปติเอ็นเอขนาด 196 คู่เบส M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder 1) อาร์เอ็นเอที่สกัดจากต้นขมิ้นชันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน 2) และ 3) อาร์เอ็นเอที่สกัดจากต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS*

สกัดอาร์เอ็นเอจากต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *CURS* และเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *CURS* ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 229 คู่เบสในทุกตัวอย่าง ทั้งส่วนโคนต้นและใบมีปริมาณความเข้มของแถบดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 21)



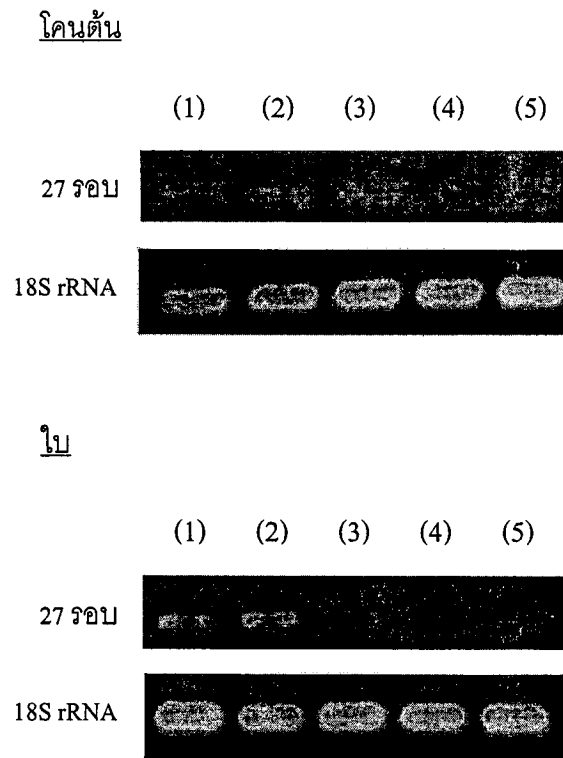
ภาพที่ 21 การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนจากต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *CURS* ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 229 คู่เบส M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder 1) อาร์เอ็นเอที่สกัดจากต้นขมิ้นชันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน 2), 3), 4) และ 5) อาร์เอ็นเอที่สกัดจากต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน *CURS*

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยการทำปฏิกิริยา RT-PCR แบบปกติ ไม่สามารถบอกได้ว่าระดับการแสดงออกของยีนในต้นปกติกับต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีความแตกต่างกันหรือไม่ จึงทดสอบโดยการทำปฏิกิริยา RT-PCR แบบกึ่งตรวจวัดปริมาณ (semi-quantitative RT-PCR) โดยทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 15, 20, 25, 30 และ 40 รอบ เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *DCS* พบความแตกต่างของความเข้มของแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นในการทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ โดยในต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน ที่ตรวจพบการมีอยู่ของยีนด้านทานยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน คือ ต้นขมิ้นชันหมายเลข (3) มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอน้อยกว่าในต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ทั้งในส่วนโคนต้นและใบของขมิ้นชัน (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนจากต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS* โดยวิธี semi-quantitative RT-PCR 1) อาร์เอ็นเอที่สกัดจากต้นขมิ้นชันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน 2) และ 3) อาร์เอ็นเอที่สกัดจากต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS*

เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *CURS* โดยวิธี semi-quantitative RT-PCR พบความแตกต่างของความเข้มของแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นในการทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 27 รอบ โดยต้นขม้นชั้นที่ได้รับการถ่ายยีนหมายเลข (4) และ (5) มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอน้อยกว่าในต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ทั้งในส่วนโคนต้นและส่วนใบ และพบว่าส่วนใบของต้นขม้นชั้นหมายเลข (3) มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอน้อยกว่าต้นปกติเช่นกัน (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนของต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *CURS1* ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR 1) อาร์เอ็นเอที่สกัดจากต้นขม้นชั้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน 2), 3), 4) และ 5) อาร์เอ็นเอที่สกัดจากต้นขม้นชั้นที่ได้รับการถ่ายยีน *CURS*

จากผลการทดลอง แสดงว่าต้นขม้นชั้นหมายเลข (3) ที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS* และต้นขม้นชั้นหมายเลข (4) และ (5) ที่ได้รับการถ่ายยีน *CURS* นั้น ชิ้นส่วนยีนที่ถ่ายได้แทรกเข้าสู่จีโนมของพืช เมื่อเกิดกระบวนการถอดรหัส ได้เป็นอาร์เอ็นเอ ชิ้นส่วนของยีนที่หันในทิศตรงข้าม (inverted repeat) เข้าคู่สมกันเป็น hairpin RNA และเกิดกระบวนการ RNA interference อาร์เอ็นเอสายคู่ถูกตัดเป็นชิ้นส่วนอาร์เอ็นเอขนาดเล็ก ซึ่งสามารถจับคู่กับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนที่เป็นบริเวณที่มีเบสคู่สมกัน ก่อให้เกิดการทำลายเอ็มอาร์เอ็นเอ ซึ่งจะทำให้ไม่สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนหรือเอนไซม์ได้ นอกจากนั้นการใช้โปรโมเตอร์ ubiquitin ที่อยู่ในพลาสมิด pSTARGATE vector เป็นตัวควบคุมการทำงานของยีน สามารถเกิดกระบวนการถอดรหัสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการได้

จากการตรวจสอบการแสดงผลของยีน *DCS* ในระดับอาร์เอ็นเอ เมื่อนำผลผลิตจากการทำ semi-quantitative RT-PCR วัดปริมาณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ พบว่าในต้นขมิ้นชันหมายเลข (3) มีความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอน้อยกว่าในตัวอย่างขมิ้นชันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน แสดงว่าปริมาณอาร์เอ็นเอของยีน *DCS* ที่สกัดได้ และนำมาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน มีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ทำให้ได้ความเข้มข้นดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยา RT-PCR ลดลงไปด้วย (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ semi-quantitative RT-PCR ของยีน *DCS* จำนวน 30 รอบ

ชิ้นส่วนพืช	ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)		
	ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน		ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน
	(1)	(2)	(3)
โคนต้น	235.3	238.9	117.0
ใบ	199.6	124.0	161.7

หมายเหตุ (1) ต้นขมิ้นชันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (2) ต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS* และไม่พบการมีอยู่ของยีน *hpt* (3) ต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS* และพบการมีอยู่ของยีน *hpt*

สำหรับต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน *CURS* เมื่อนำผลผลิตที่ได้จากการทำ semi-quantitative RT-PCR มาวัดปริมาณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ พบว่าต้นขมิ้นชันหมายเลข (4) และ (5) มีความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอน้อยกว่าในตัวอย่างขมิ้นชันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน แสดงว่าปริมาณอาร์เอ็นเอของยีน *CURS* ที่สกัดได้ และนำมาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน มีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ semi-quantitative RT-PCR ของยีน *CURS* จำนวน 27 รอบ

ชิ้นส่วนพืช	ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)				
	ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน		ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน		
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
โคนต้น	343.1	382.1	352.5	306.1	211.7
ใบ	405.3	365.5	417.1	277.0	210.0

หมายเหตุ (1) ต้นขมิ้นชันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (2), (3), (4) และ (5) ต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน *CURS1* และพบการมีอยู่ของยีน *hpt*

จากผลการทดลอง พบว่าต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีนหมายเลข (5) มีปริมาณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอลดลงมากกว่าต้นขมิ้นชันต้นอื่น สาเหตุที่การยับยั้งการแสดงออกของยีนในแต่ละต้นแตกต่างกันนี้ เนื่องจากการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยอาศัยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นไปอย่างสุ่ม ยีนที่ถ่ายเข้าไปอาจแทรกอยู่ในตำแหน่งที่ต่างกัน และจำนวนชุดของยีนที่แทรกเข้าสู่จีโนมพืชแต่ละต้นอาจมีจำนวนแตกต่างกัน จึงมีการยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ต่างกัน ดังงานวิจัยของเบญจวรรณ (2552) ได้ถ่ายยีน antisense ACO เข้าสู่ต้นกล้วยไม้หวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีจำนวนชุดของยีนแตกต่างกัน ตั้งแต่ 1-4 ชุด โดยพบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนที่มีจำนวนชุดยีน antisense มาก สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน ACO ได้มากกว่าต้นที่มีจำนวนชุดของยีน antisense น้อย ทั้งนี้เมื่อยอดขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีนมีจำนวนชุดของยีน RNAi แทรกเข้าสู่จีโนมของพืชมาก เมื่อเกิดกระบวนการถอดรหัส จึงมีจำนวน hpRNA มากเช่นกัน จึงอาจเกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนได้มากกว่า

ส่วนใบในต้นขมิ้นชันหมายเลข (3) ที่พบว่ามีความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอลดลงเมื่อเทียบกับต้นปกตินั้น เมื่อนำมาวัดความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นไม่แตกต่างจากต้นปกติ อาจเนื่องจากในขั้นตอนการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส อาจดูผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยามาหยอดลงบนอะกาโรสเจลน้อย จึงเห็นความเข้มข้นแถบดีเอ็นเอลดลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่นๆ

ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่วัดได้ จากตัวอย่างที่สกัดจากส่วนโคนต้นมีปริมาณมากกว่าตัวอย่างที่สกัดจากส่วนใบของขมิ้นชัน ดังงานวิจัยของ Katsuyama *et al.* (2009b) พบว่ามีการแสดงออกของยีนในส่วนเหง้ามากกว่าส่วนใบ เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนที่สกัดจากส่วนโคนต้น มีความเข้มข้นลดลงอย่างเห็นได้ชัดกว่าในส่วนของใบ อาจเนื่องมาจากยีนมีการแสดงออกมากในส่วนเหง้า หรือโคนต้น เมื่อเกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนบริเวณดังกล่าว จึงเห็นความแตกต่างจากต้นปกติได้ชัดเจน อย่างไรก็ตาม การถ่ายยีนโดยใช้เทคนิค RNA interference ในครั้งนี้ ประสบผลสำเร็จ สามารถถ่ายยีนเข้าสู่ขมิ้นชันได้ และต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีการแสดงออกของยีนลดลงกว่าปกติ

จากงานวิจัยของ Katsuyama *et al.* (2009a, b) กล่าวว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชันที่สำคัญ ได้แก่ ยีน *diketide-CoA synthase (DCS)* และ *curcumin synthase (CURS)* จากผลการทดลองนี้พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีน DCS และ CURS1 ทำให้ยีนมีการแสดงออกลดลง อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการยับยั้งยีนทั้งสองชนิด มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชันหรือไม่ จึงควรทำการศึกษาต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการตรวจเอกสารทราบว่าการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์เกิดจากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ *diketide-CoA synthase (DCS)* และ *curcumin synthase (CURS)* ทำให้ทราบวิธีการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ และมีรายงานการโคลนยีนทั้ง 2 ยีน ดังกล่าวแล้ว จึงต้องการตรวจสอบการทำงานของยีน

ทั้ง 2 ด้วยวิธี RNA interference โดยได้ออกแบบไพรเมอร์ เพิ่มปริมาณส่วนของยีนทั้งสอง และนำแต่ละยีนมาเชื่อมต่อกันแบบกลับทิศทางในพลาสมิด pSTARGATE vector ได้พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนยีนหันในทิศทางตรงกันข้าม จึงนำพลาสมิดมาถ่ายเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* และเลี้ยงเชื้อร่วมกับชิ้นส่วนยีนเป็นเวลา 30 นาที คัดเลือกยอดที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร cefotaxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามียอดที่ได้รับการถ่ายยีน DCS และ CURS เจริญบนอาหารคัดเลือกได้ จำนวน 3 และ 4 ยอด คิดเป็น 0.6 และ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แล

จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยปฏิกิริยา PCR พบแถบดีเอ็นเอของยีน *hygromycin phosphotransferase (hpt)* ในต้นที่ได้รับการถ่ายยีน DCS และ CURS จำนวน 1 และ 4 ต้น ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน มีการแสดงออกของยีนลดลงเมื่อเทียบกับต้นปกติ แสดงว่าสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนได้สำเร็จ ทั้งนี้ยังไม่สามารถตรวจสอบได้ว่ายีนทั้งสองชนิดมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน เนื่องจากตัวอย่างขมิ้นชันมีปริมาณน้อย ไม่สามารถนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์ได้ ควรหาวิธีตรวจสอบที่เหมาะสมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กัญจนา แซ่เตียว และ สุเม อรัญนารถ. 2551. การถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมาโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย. **ว. วิทย. กษ.** 39(3) (พิเศษ), 211-214.
- ชัยพัฒน์ จิระธรรมจารีย์, อารมย์ แสงวนิชย์ และอุดมลักษณ์ อุ่ณจิตต์วรรณะ. 2535. วิจัยปริมาณสารเคอร์คูมินในขมิ้น. น.20-22 ใน เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการ กลุ่มพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.
- เบญจวรรณ สุวรรณเนตย์. 2552. **การถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอทิลินเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์โดยใช้เวกเตอร์ pMAT21.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สถาบันวิจัยสมุนไพร. 2544. มาตรฐานสมุนไพรไทย: ขมิ้นชัน. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กระทรวงสาธารณสุข. โรงพิมพ์ ร.ส.พ. กรุงเทพฯ.
- อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต. 2541. ซิวสังเคราะห์แบบคอมบิเนทอเรียล. **ว.เกษตรศาสตร์(วิทย.)**16: 45-54.
- Abe, I., Y. Utsumi, S. Oguro and H. Noguchi. 2004. The first plant type III polyketide synthase that catalyzes formation of aromatic heptaketide. **FEBS Lett.** 562: 171-176.
- Agrawal, G.K., R.N. Pandey and V.P. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* leaves. **Biotech. Biodiv. Lett.** 2: 19-24.
- Austin, M.B. and J.P. Noel. 2003. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. **Nat. Prod. Rep.** 20: 79-110.
- Araújo, C.A.C. and L.L. Leon. 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 96: 723-728.

- Brand, S., D. Hölscher, A. Schier, A. Svaloš, J. Schröder and B. Schneider. 2006. A type III polyketide synthase from *Wachendorfia thyrsiflora* and its role in diarylheptanoid and phenylphenalenone biosynthesis. **Planta** 224: 413-428.
- Chavalittumrong, P. and W. Jirawattanapong. 1992. Variation of active constituents of *Curcuma domestica* rhizomes at different ages. **Thai J. Pharm. Sci.** 16: 165-174.
- Curtis, I.S. 2010. Genetic transformation-*Agrobacterium*. pp 199-214. In M.R. Davey and P. Anthony, eds. **Plant Cell Culture**. Wiley-Blackwell, West Sussex.
- Dixon, R.A. 1999. Plant natural products: the molecular genetic basis of biosynthetic diversity. **Curr. Opin. Biotechnol.** 10: 192-197.
- Eckermann, S., G. Schröder, J. Schmidt, D. Strack, R.A. Edrada, Y. Helariutta, P. Elomaa, M. Kotilainen, I. Kilpeläinen, P. Proksch, T.H. Teeri and J. Schröder. 1998. New pathway to polyketide in plants. **Nature** 396: 387-390.
- Farzad, M., D.F. Soria-Hernanz, M. Altura, M.B. Hamilton, M.R. Weiss and H.G. Elmendorf. 2005. Molecular evolution of the chalcone synthase gene family and identification of the expressed copy in flower petal tissue of *Viola cornuta*. **Plant Sci.** 168: 1127-1134.
- Hashemy, T., H. Maki, Y. Yamada, T.S. Kaneko and K. Syono. 2009. Effects of light and cytokinin on *in vitro* micropropagation and microrhizome production in turmeric (*Curcuma longa* L.). **Plant Biotechnol.** 26: 237-242.
- Hopwood, D.A. and D.H. Sherman. 1990. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. **Ann. Rev. Genet.** 24: 37-66.
- Katsuyama, Y., T. Kita, N. Funa and S. Horinouchi. 2009a. Curcuminoid biosynthesis by type III polyketide synthases in the herb *Curcuma longa*. **J. Biol. Chem.** 284: 11160-11170.
- Katsuyama Y., Kita T. and Horinouchi S. 2009b. Identification and characterization of multiple Curcumin synthases from the herb *Curcuma longa*. **FEBS Lett.** 583, 2799-2803.
- Lukacin, R., K. Springob, C. Urbanke, C. Ernwein, G. Schröder, J. Schröder and U. Matern. 1999. Native acridone synthases I and II from *Ruta graveolens* L. form homodimers. **FEBS Lett.** 448: 135-140.
- Okada, Y. and K. Ito. 2001. Cloning and analysis of valerophenone synthase gene expressed specifically in lupulin gland of hop (*Humulus lupulus* L.). **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 65: 150-155.
- Preisig-Mueller, R., P. Gnau and H. Kindl. 1995. The inducible 9,10-dihydrophenanthrene Pathway : characterization and expression of bibenzyl synthase and 5-adenosylhomocysteine hydrolase. **Arch. Biochem. Biophys.** 317: 201-207.

- Ramirez-Ahumada, M.C., B.N. Timmermann and D.R.Gang. 2006. Biosynthesis of curcuminoids and gigerols in turmeric (*Curcuma longa*) and ginger (*Zingiber officinale*) : Identification of curcuminoid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA thioesterase. **Phytochemistry** 67: 2017-2029.
- Schöppner, A. and H. Kindl. 1984. Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. **J. Biol. Chem.** 259: 6806-6811.
- Schröder, J. 1999. Probing plant polyketide biosynthesis. **Nat. Struct. Biol.** 6: 714-716.
- Shen, B. and C.R. Hutchinson. 1993. Enzymatic synthesis of a bacterial polyketide from acetyl and malonyl coenzyme A. **Science** 262: 1535-1540.
- Shen, B. 2003. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 7: 285-295.
- Sommer, H. and H. Saedler. 1986. Structure of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus*. **Mol. Gen. Genet.** 202: 429-434.
- Thamchaipenet, A. 1999. Multiple domain substitutions of erythromycin polyketide synthase to produce a combinatorial library. **Actinomycetologica** 13: 113-119.
- Yu, H. and C.J. Goh. 2000. Identification and characterization of three orchid MADS-box genes of the AP1/AGL9 subfamily during floral transition. **Plant Physiol.** 123: 1325-1336.