

การถ่ายยีน *Flavonoid-3'-hydroxylase (f3' h)* และ *Flavonoid-3',5'-hydroxylase (f3' 5' h)*
เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium spp.*) โดยการยิงอนุภาค

Dendrobium Orchid Transformation with the *Flavonoid-3'-hydroxylase (f3' h)*
and *Flavonoid-3',5'-hydroxylase (f3' 5' h)* genes
by Particle Bombardment

คำนำ

สีของดอกไม้เป็นสิ่งที่สำคัญประการหนึ่งของไม้ตัดดอกซึ่งต้องพัฒนาให้มีความหลากหลายมากขึ้นเพื่อการขยายตลาด การพัฒนาพันธุ์ด้วยการผสมพันธุ์ตัวเองหรือข้ามสายพันธุ์ และการคัดเลือกจากต้นที่เกิดการกลายพันธุ์โดยธรรมชาติหรือการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ การฉายรังสี เป็นวิธีที่ต้องใช้เวลามากและอาจทำให้คุณสมบัติบางอย่างที่สำคัญเปลี่ยนแปลงไป เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมจึงเข้ามามีบทบาทในการปรับปรุงพันธุ์พืชมากขึ้น (Mori *et al.*, 2003) นักผสมพันธุ์พืชได้ให้ความสนใจในการสร้างดอกไม้สีน้ำเงินในกลุ่มไม้ตัดดอกที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ไม้ตัดดอกหลายชนิด เช่น กุหลาบ คาร์เนชั่น ทิวลิป และ เบญจมาศ ยังคงขาดดอกไม้สีน้ำเงินเนื่องจากไม่มีเอนไซม์ F3'5'H ซึ่ง Shimada *et al.* (2001) พบว่าในดอกไม้ที่มีสีน้ำเงินโดยทั่วไปประกอบด้วยรงควัตถุ delphinidin, petunidin และ malvidin ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ F3'5'H ซึ่งพืชบางชนิดอาจมีเอนไซม์ F3'5'H ดังกล่าวแต่สีดอกไม้ไม่ใช่สีน้ำเงิน เนื่องจากเอนไซม์ไม่สามารถเปลี่ยน naringenin ให้เป็นสาร delphinidin ได้ ดังนั้นเมื่อถ่ายยีน *f3' 5' h* ของพืชชนิดอื่นเข้าไปจึงสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นและสร้างสาร delphinidin ได้

กล้วยไม้โดยเฉพาะกล้วยไม้สกุลหวายเป็นไม้ตัดดอกยอดนิยมเนื่องจากมีลักษณะดอก สี ดอกสวยงาม และมีอายุการใช้งานได้นาน อุตสาหกรรมกล้วยไม้ทำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นอันดับหนึ่งในจำนวนไม้ดอกไม้ประดับทั้งหมดที่มีการส่งออก ทั้งที่เป็นดอกกล้วยไม้และต้นกล้วยไม้มีปริมาณและมูลค่าเพิ่มขึ้นโดยตลอด จึงนับได้ว่ากล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญมากซึ่งจะต้องได้รับการพัฒนากล้วยไม้ต่อไปเพื่อตอบสนองต่อความต้องการของตลาดและแข่งขันกับประเทศอื่น ๆ แต่เนื่องจากกล้วยไม้ตัดดอกในปัจจุบันขาดความหลากหลายของสีดอก การสร้างสีดอกกล้วยไม้ใหม่ ๆ น่าจะเป็นอีกหนทางที่ดีในการพัฒนาอุตสาหกรรมกล้วยไม้ตัดดอก ดังนั้นใน

การศึกษาครั้งนี้จึงต้องการศึกษาการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายเพื่อสร้างสีดอกกล้วยไม้ที่หลากหลายมากขึ้นโดยการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการถ่ายยีน $f3' h$ และ $f3' 5' h$ เข้ากล้วยไม้โดยการยิงอนุภาค

วัตถุประสงค์

เพื่อการศึกษาการตัดต่อและถ่ายยีน *Flavonoid-3'-hydroxylase* (*f3'h*) และ *Flavonoid-3',5'-hydroxylase* (*f3'5'h*) เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายโดยการยิงอนุภาค

การตรวจเอกสาร

1. กล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ใน Family Orchidaceae ซึ่งเป็น 1 ใน 3 ของ Family ที่มีจำนวนชนิดพืชมากที่สุดในโลก เป็นพืชที่มีวิวัฒนาการและการปรับตัวอย่างสูงในหลายรูปแบบ จึงสามารถกระจายพันธุ์อยู่ได้ในทุกภูมิภาคของโลก บางชนิดพบเฉพาะถิ่น บางชนิดพบทั่วไปในระดับประเทศ ระดับทวีป หรือทั่วโลก จากการสำรวจพบกล้วยไม้ที่ขึ้นตามพื้นป่า (terrestrial) 25 % ขึ้นบนต้นไม้ (epiphyte) 70 % และอีก 5 % พบขึ้นบนวัสดุได้หลายชนิด คาดว่ามีต้นกล้วยไม้ประมาณ 17,000 – 35,000 ชนิด ปัจจุบันสำรวจพบและจำแนกได้ 796 สกุล ประมาณ 19,500 ชนิด (Dressler, 1993)

แหล่งกำเนิดกล้วยไม้ป่าที่สำคัญของโลกมี 2 แหล่งใหญ่ ๆ ด้วยกันคือ ลาตินอเมริกา กับ เอเชียแปซิฟิก สำหรับในลาตินอเมริกาเป็นอาณาบริเวณอเมริกากลางติดต่อกับเขตเหนือของอเมริกาใต้ ส่วนแหล่งกำเนิดกล้วยไม้ป่าในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิกมีประเทศไทยเป็นศูนย์กลาง จากการค้นพบประเทศไทยมีพันธุ์กล้วยไม้ป่าเป็นจำนวนมากประมาณ 1,125 ชนิด จาก 177 สกุล (จิตรพรพรณ, 2546) แสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีสภาพแวดล้อมเอื้ออำนวยต่อการเจริญงอกงามของกล้วยไม้มาก และกล้วยไม้ป่าที่พบในภูมิภาคแถบนี้มีลักษณะเด่นที่เป็นเอกลักษณ์ของตนเอง แตกต่างจากกล้วยไม้ในภูมิภาคลาตินอเมริกา (มาลินี, 2542)

ลักษณะทั่วไปของกล้วยไม้ (ระพี, 2530) ประกอบด้วยส่วนที่เป็นลำต้น ราก ใบ ดอก และผลหรือที่เรียกว่า ฝัก เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเช่นเดียวกับหญ้า กล้วย อ้อย โดยสังเกตได้จากเส้นใบขนานกันตามความยาวของใบ ลำต้นมีข้อ ปล้อง เนื้อในสม่เสมอ รากของกล้วยไม้ไม่มีรากแก้ว แต่มีระบบรากเช่นเดียวกับอ้อย และกล้วยไม้บางชนิดมีระบบรากเป็นรากอากาศ

ลักษณะลำต้นกล้วยไม้บริเวณข้อมีตาที่จะแยกเป็นหน่ออ่อน หรือช่อดอก แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ Monopodial เป็นกล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตออกไปทางส่วนยอด เช่น กล้วยไม้สกุลแวนด้า (*Vanda*) และ Sympodial เป็นกล้วยไม้ที่เจริญไปตามแนวนอนด้วยเหง้า (rhizome) ส่วนที่งอกขึ้นจากพื้นคือ ลำลูกกล้วย เช่น กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*)

ใบกล้วยไม้มีลักษณะแตกต่างกันตามชนิดของกล้วยไม้ ใบของกล้วยไม้บางชนิดมีลักษณะรูปทรงกระบอก เช่น แวนด้าใบกลม บางชนิดมีใบแบนยาวและมีหน้าตัดรูปตัววี เช่น แวนด้าใบแบน กล้วยไม้บางชนิดใบมีลักษณะจีบ เช่น กล้วยไม้ในสกุลสแพโทลอตติส (*Spatholottis*) บางชนิดมีใบเล็กมาก เช่น กล้วยไม้พญาไร้ใบ (*Chiloschista usneoides* LDL)

ช่อดอกของกล้วยไม้บางชนิดมีก้านช่อสั้นมาก บางชนิดมีก้านช่อยาว กล้วยไม้บางชนิดมีก้านช่อตั้งแข็ง แต่บางชนิดกลับมีลักษณะโค้งหรือห้อยหัวลง ดอกกล้วยไม้จัดเป็นดอกสมบูรณ์เพศ คือมีทั้งเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน ประกอบด้วยกลีบ 6 กลีบ แบ่งเป็นกลีบวงนอก 3 กลีบ และกลีบวงใน 3 กลีบ โดยกลีบวงในกลีบที่สามจะเปลี่ยนรูปไป เรียกว่า ปาก อยู่ได้ เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย นอกจากนี้เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียยังอยู่บนส่วนเดียวกัน เรียกว่า เส้าเกสร แม้ว่ากล้วยไม้จะมีดอกสมบูรณ์เพศแต่มักจะไม่ได้ผสมตัวเองเนื่องจากเกสรตัวผู้อยู่ในอับที่มีฝาปิด ต้องให้แมลงหรือคนช่วยในการผสมเกสร

ฝักกล้วยไม้ หรือผล มีอายุจากการผสมเกสรไปจนถึงฝักแก่แตกต่างกันตามแต่ชนิดของกล้วยไม้ รวมทั้งสภาพสิ่งแวดล้อมและความสมบูรณ์ขององค์ประกอบในการเจริญงอกงาม ฝักกล้วยไม้ในประเภทโมโนโพเดียมักติดอยู่กับก้านในลักษณะตั้งปลายชี้ขึ้น แต่ฝักกล้วยไม้ประเภทซิมโพเดียมักจะห้อยปลายลงเป็นส่วนมาก ในฝักกล้วยไม้ที่สมบูรณ์ดีจะมีเมล็ดกล้วยไม้มากเป็นจำนวนแสนเมล็ด และเมล็ดกล้วยไม้เหล่านี้มีลักษณะเล็กเป็นผงละเอียดมากจึงปลิวกระจายไปตามลมได้ง่ายและเป็นระยะทางไกล ๆ

กล้วยไม้สกุลหวายนับว่าเป็นกล้วยไม้ดอกสวยสกุลใหญ่ที่สุดที่พบในประเทศไทย คือ พบในป่าธรรมชาติมากกว่า 130 ชนิด ระบบรากเป็นแบบกิ่งอากาศ มีรูปร่างลักษณะทั้งดอก ใบ และลำลูกกล้วยแตกต่างกันออกไปอย่างกว้างขวาง กล้วยไม้สกุลหวายมีกลีบชั้นนอกที่มีขนาดยาวไล่เลี่ยกัน กลีบนอกคู่ล่างจะเชื่อมติดกับฐานของเส้าเกสร และที่รอยต่อนี้จะปลูดอกมา เรียกกันว่า เคียว มีเรณู 4 ก้อนติดอยู่ที่ปลายของเส้าเกสร จำนวนก้อนเรณูนี้เป็นลักษณะสำคัญที่นักพฤกษศาสตร์ใช้แบ่งกล้วยไม้สกุลหวายกับสกุลอื่นเรียกออกจากกัน เพราะอีเรียมีเรณู 8 ก้อน (มาลินี, 2542)

หาวายแจ็กเกอลีน โทมัส (Dendrobium Jaquelyn Thomas) เป็นลูกผสมระหว่าง *Dendrobium gouldii* (ครรชิต, 2541) ทำให้ได้หาวายที่มีดอกสีขาวจนถึงเหลืองอ่อน ช่อดอกยาว มีจำนวนดอก 10-16 ดอกต่อช่อ ปลูกเลี้ยงได้ง่าย สามารถออกดอกได้ตลอดปี

2. อุตสาหกรรมกล้วยไม้ไทย

กล้วยไม้เป็นไม้ตัดดอกยอดนิยมเนื่องจากมีลักษณะดอกและสีอันหลากหลายสวยงาม เป็นไม้ตัดดอกที่มีอายุการใช้งานได้นาน กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของไทยเพราะเป็นไม้ส่งออกขายต่างประเทศทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายร้อยล้านบาท มีการปลูกเลี้ยงอย่างครบวงจร ตั้งแต่การผสมเกสร เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เลี้ยงลูกกล้วยไม้ เลี้ยงต้นกล้วยไม้จนกระทั่งให้ดอก ตัดดอกบรรจุหีบห่อและส่งออกเอง โดยพันธุ์กล้วยไม้ที่นิยมปลูกเป็นการค้ามากที่สุดคือ สกุลหาวาย (*Dendrobium* spp.) ได้แก่ สีม่วง (พันธุ์มาดามปอมปาดัวร์) สีขาว (พันธุ์อัลเตอร์ไอมาเย แจ็กเกอลีน โทมัส) สีชมพู (พันธุ์อินทวงศ์ แพนด้า ชีชาร์ และซอนเนีย) สีเหลือง (พันธุ์เกษมโกลด์) (<http://web.ku.ac.th/agri/orchid/orchid4.htm>)

อุตสาหกรรมกล้วยไม้ของประเทศไทยได้เจริญก้าวหน้าอย่างมาก และทำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นอันดับหนึ่งในจำนวนไม้ดอกไม้ประดับทั้งหมดที่มีการส่งออก ซึ่งการส่งออกดอกกล้วยไม้และต้นกล้วยไม้มีปริมาณและมูลค่าเพิ่มขึ้นโดยตลอด ในระยะแรกเป็นการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ โดยส่งขายมากที่สุดที่ประเทศเนเธอร์แลนด์และเยอรมนี ปัจจุบันได้ขยายตลาดออกไปมากกว่า 50 ประเทศ ในปี พ.ศ. 2542 มีการส่งออกดอกกล้วยไม้จากไทยปริมาณ 11,178 ตัน (ประมาณ 317 ล้านช่อ) มูลค่า 1,061.1 ล้านบาท ลูกค้านำเข้าใหญ่ที่สุดคือ ญี่ปุ่น อันดับรองลงมาคือ อิตาลี อเมริกา ไต้หวัน และในปี พ.ศ. 2543 ไทยส่งออกปริมาณ 13,124.7 ตัน มูลค่า 1,231.2 ล้านบาท (จิตราพรณ, 2546)

ในปัจจุบันวิชาการทางด้านพันธุศาสตร์ได้เข้ามามีบทบาทในการพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้ตัดดอก โดยมุ่งเน้นประโยชน์ในด้านการใช้ตัดดอก และมีการพัฒนาให้มีหลายรูปแบบของพันธุ์ไม้ตัดดอก เพื่อให้สอดคล้องกับตลาดและขยายการแข่งขันในตลาดระหว่างประเทศ (มาลินี, 2542) โดยพันธุ์กล้วยไม้ที่ส่งเสริมให้ปลูกคือ สกุลหาวาย (*Dendrobium*) ได้แก่ โซเนีย (Sonia) หรือบอม

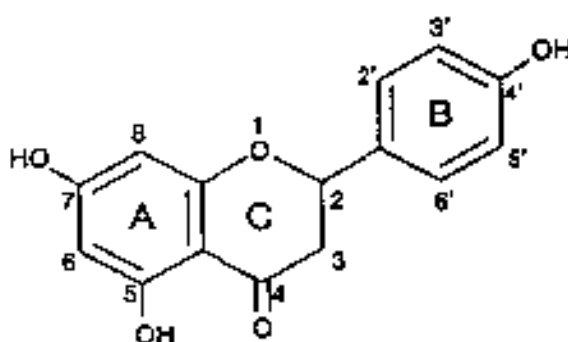
(Bom) ปอมปาดัวร์ (Pompadour) ขาวสนาน (Sanan White) แอนนา (Anna) ซากุระ (Sakura) ซาบิน (Sabin) อินทวงศ์ (Intuwong) ไวปาฮู (Waipahu) ขาว 5 เอ็น (Walter Oumae 5n) สกุลออนซิดีอิม (Oncidium) ได้แก่ โกลด์เชน ชาเวอร์ (Golden Shower) โกวเวอร์ แรมเซย์ (Gower Ramsey) สกุล ม็อคคาร่า (Mokara) ได้แก่ พรรณี (Pannee) จักกวน (Chark Kuan) คาลิปโซ (Calypso) สกุล อะแรนด้า (Aranda) ได้แก่ คริสติน (Chistrine) (<http://www.doae.go.th/plant/orchid.htm>)

3. กลไกการเกิดสีในดอกไม้

ธรรมชาติสร้างดอกไม้ให้มีสีสันสวยงามและหลากหลาย สีต่าง ๆ เหล่านี้เกิดจากสารสีเป็นปัจจัยหลักสำคัญในการกำหนดสีของดอกไม้ สารสีเป็นเม็ดสีที่พืชสร้างขึ้นโดยธรรมชาติซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) , แคโรทีนอยด์ (carotenoids) และเบตาไลน (betalains) กลุ่มแคโรทีนอยด์เป็นสารสีที่ละลายได้ในไขมันและเก็บสะสมอยู่ในคลอโรพลาสต์และโครโมพลาสต์ให้สีเหลืองสด สีส้มและสีแดง (Thammasiri *et al.*, 1987) มีการสร้างสารสีชนิดนี้มากในดอกไม้สีเหลืองและสีส้ม เช่น ดอกทานตะวัน และผลมะเขือเทศ (Bartley and Schnik, 1995) กลุ่มเบตาไลนเป็นสารประกอบในโตรเจนที่ให้สีเหลืองไปจนถึงสีแดง ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากไทโรซิน (tyrosin) และสร้างขึ้นเฉพาะใน *Caryophyllales* เท่านั้น (Stafford, 1994) สำหรับกลุ่มฟลาโวนอยด์นับว่าเป็นสารสีหลักในการสร้างสีดอกไม้เพราะให้สีที่หลากหลายตั้งแต่โทนสีเหลืองอ่อน สีส้ม สีแดง สีม่วง และสีม่วงไปจนถึงสีน้ำเงิน นอกจากนี้สารประกอบฟลาโวนอยด์ยังมีหน้าที่อีกหลายอย่างในทางชีวเคมี ทางกายภาพ และทางนิเวศวิทยา ซึ่งล้วนแล้วแต่มีความสำคัญในทางโภชนาการของทั้งคนและสัตว์ ฟลาโวนอยด์มีหน้าที่ป้องกันอันตรายจากรังสี UV-B ต่อต้านการทำลายจากเชื้อจุลินทรีย์หรือสัตว์ที่เข้ามาทำลาย ช่วยในการผสมพันธุ์และการงอกของละอองเรณู ช่วยควบคุมการเจริญเติบโตของพืชและประสิทธิภาพของเอนไซม์ ล่อแมลงให้เข้ามาผสมเกสร และยังเป็นสารอาหารต้านอนุมูลอิสระในมนุษย์ (Bohm, 1998; Harborne and Williams, 2000)

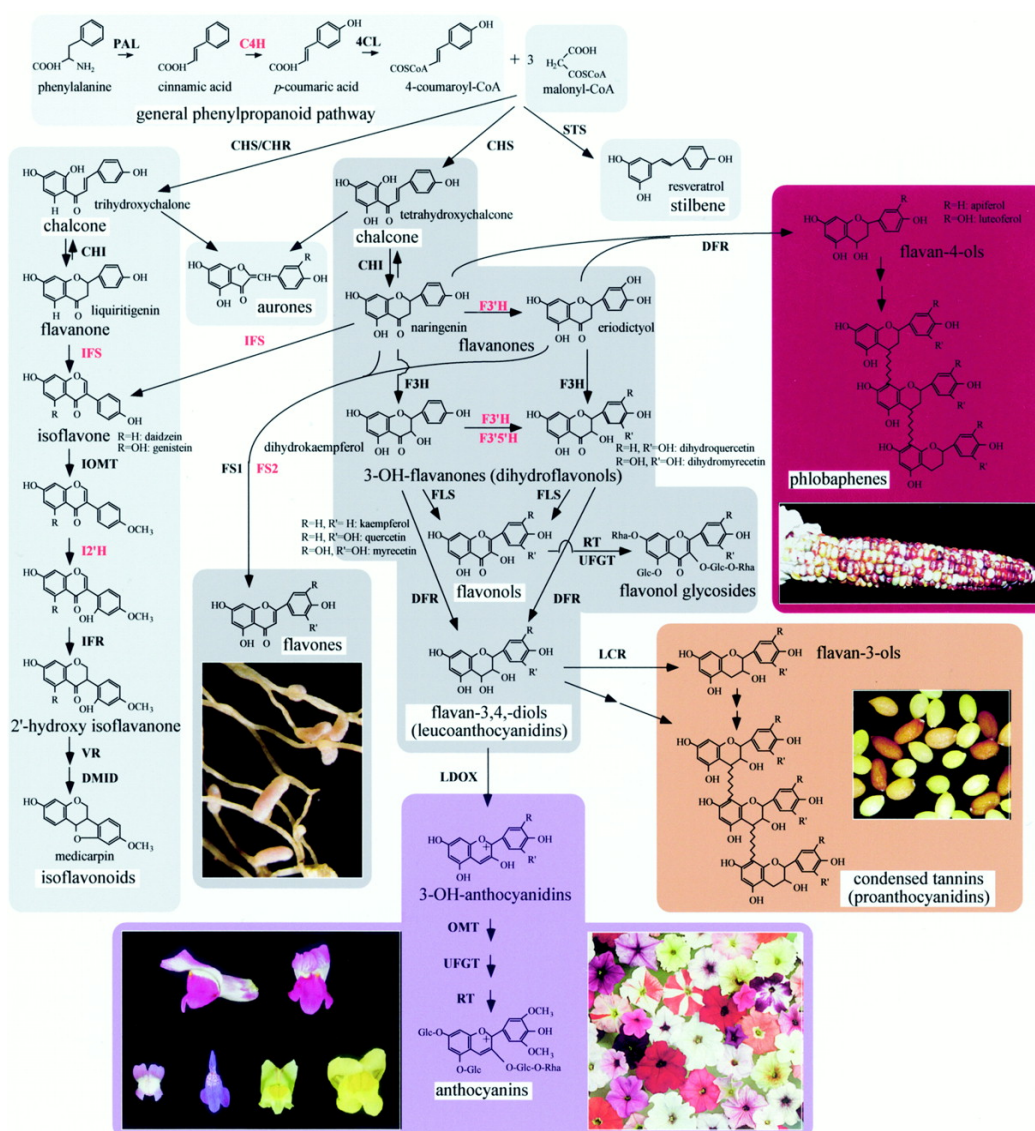
ฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารประกอบพวกฟีนิลโพรพานอยด์ (phenyl-propanoid) ซึ่งสามารถละลายได้ในน้ำและเก็บสะสมในแวคิวโอลของเซลล์โดยเฉพาะในเซลล์ epidermis ของกลีบดอก โครงสร้างของฟลาโวนอยด์ประกอบด้วยอะโรมาติกคาร์บอน 2 วง (A และ B) ต่อเข้ากับคาร์บอน 3 อะตอม (ภาพที่ 1) การเกิดออกซิเดชันที่ตำแหน่งต่าง ๆ ของคาร์บอนทั้ง 3 อะตอมและจำนวนที่เกิดขึ้นก่อให้เกิดสารประกอบฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ ที่ให้สีแตกต่างกัน โดยส่วนมากจะ

เกิดปฏิกิริยา hydroxylation ที่อะตอมคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 และ 7 แต่จะแตกต่างกันออกไปโดยการเกิดปฏิกิริยาการแทนที่ในวง B และ C โดยผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น hydroxylation, methylation, methoxylation, glycosylation, acylation, oxidation และ reduction (Madhuri and Reddy, 1999) ฟลาโวนอยด์ 6 กลุ่มใหญ่ ๆ ที่พบมากในพืชชั้นสูงคือ chalcones, flavones, flavonols, flavandiols (leucoanthocyanidins), anthocyanin และ condensed tannins (proanthocyanidins) กลุ่มที่ 7 คือ aurone พืชบางชนิดยังสามารถสร้างฟลาโวนอยด์ในรูปแบบที่พิเศษแตกต่างออกไป เช่น isoflavonoids, phlobaphenes และ stilbenes เป็นต้น (ภาพที่ 2) (Brenda, 2001)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์

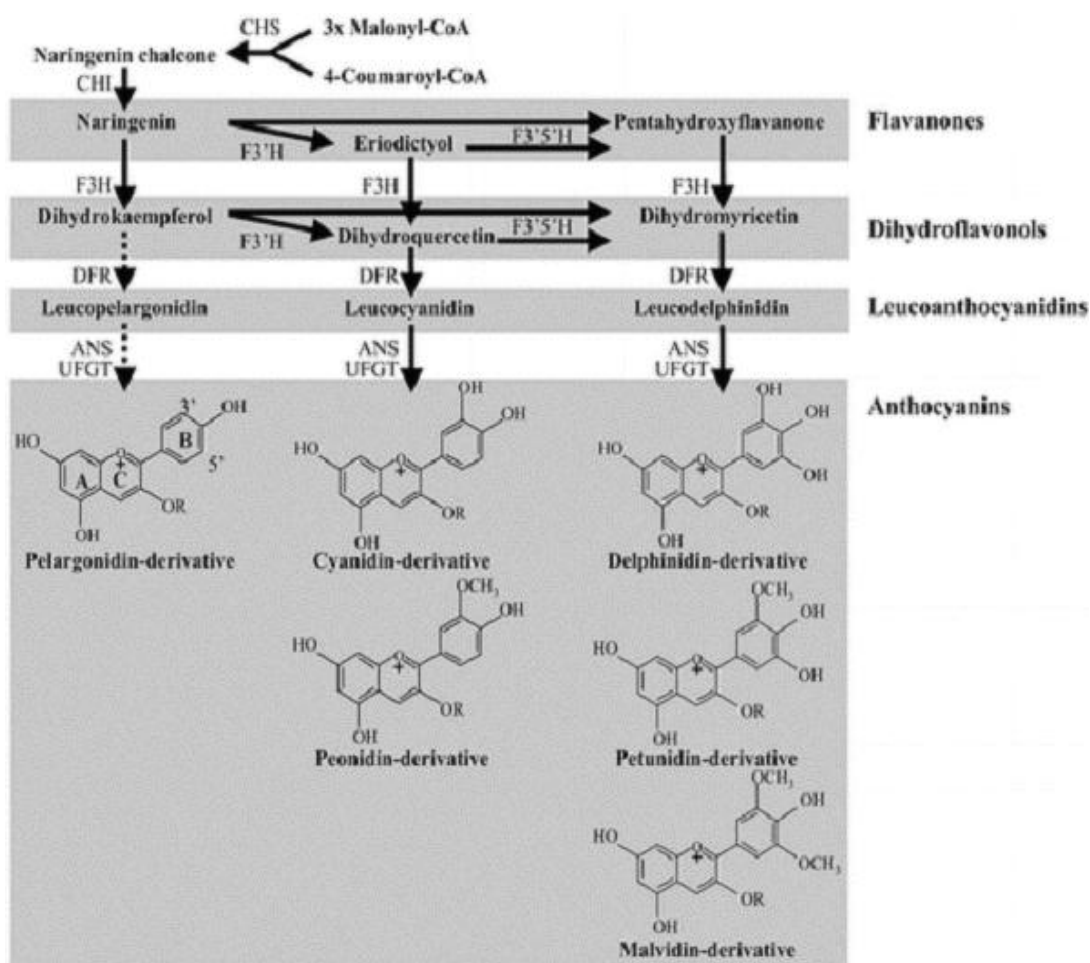
แอนโทไซยานินจัดเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์กลุ่มใหญ่ที่สุดในการให้สีของดอกไม้ เช่น สีแดง สีแดงเลือดหมู สีม่วงและสีเหลือง เป็นต้น ซึ่งมีสารสีแอนโทไซยานินอยู่ด้วยกัน 6 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ pelargonidin, cyanidin, peonidin (3' O-methyl cyanidin), delphinidin, petunidin (3' O-methyl delphinidin) และ malvidin (3',5' O-dimethyl delphinidin) สารสีเหล่านี้จะให้สีที่แตกต่างกันตามจำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลที่เพิ่มขึ้นในวง B โดยจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลที่เพิ่มขึ้นจะผลทำให้ความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงยาวขึ้น ความยาวสูงสุดในการดูดกลืนแสงของ pelargonidin, cyanidin และ delphinidin เมื่อละลายในสารละลาย HCl-methanol 0.01 % คือ 520, 535 และ 546 นาโนเมตร ตามลำดับ (Forkmann, 1991; Stevenson, 1991; Van Tunen *et al.*, 1991)



ภาพที่ 2 กระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ (Brenda, 2001)

กระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเริ่มต้นจากกระบวนการสังเคราะห์ฟีนิลโพรพานอยด์ โดยมีเอนไซม์ Phenylalanine ammonia lyase (PAL) ทำหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายกลุ่มแอมโมเนียออกจากโมเลกุลของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ซึ่งทำให้เกิดสารพวก trans-cinnamate จากนั้นเอนไซม์ cinnamate 4-hydroxylase (C4H) จะทำหน้าที่เติมหมู่ไฮดรอกซิลที่อะตอมคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของ trans-cinnamate ทำให้ได้ trans 4-coumarate ซึ่งจะไปเชื่อมต่อกับ Coenzyme A (CoA) โดยเอนไซม์ 4-coumarate CoA ligase (4CL) ได้เป็น 4-coumaroyl CoA ซึ่งถือว่าเป็นการสิ้นสุดกระบวนการสังเคราะห์ฟีนิลโพรพานอยด์ (Madhuri and Reddy, 1999)

หลังจากนั้นโมเลกุล 4-coumaroyl CoA เกิดการควบโมเลกุลกับ malonyl CoA 3 โมเลกุล โดยการทำงานของเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) ทำให้ได้สารประกอบสีเหลือง 4, 2', 4', 6'-tetrahydroxychalcone ในรูปของ naringenin chalcone จากนั้นเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) จะทำหน้าที่เปลี่ยน chalcone ไปเป็นฟลาโวนอยด์ในรูปของ naringenin ซึ่งเป็นสารไม่มีสีและเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของกระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ รวมถึงแอนโทไซยานินด้วย ฟลาโวนอยด์เกิดจากการไฮดรอกซิเลชัน naringenin ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3' โดยเอนไซม์ flavanone 3'-hydroxylase (F3'H) ได้เป็น eriodictyol และ pentahydroxyflavanone นอกจากนี้เอนไซม์ flavanone 3',5'-hydroxylase (F3'5'H) ยังสามารถทำปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน เปลี่ยน eriodictyol ไปเป็น pentahydroxyflavanone ได้เช่นเดียวกัน ไดไฮโดรฟลาโวนอยด์เกิดจาก naringenin ถูกไฮดรอกซิเลชันโดยเอนไซม์ flavanone 3-hydroxylase (F3H) ได้ dihydrokaempferol (DHK) ซึ่งยังคงเป็นสารไม่มีสี และเอนไซม์ F3'H จะทำปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน DHK ได้สารประกอบไดไฮโดรฟลาโวนอยด์อื่น ๆ คือ dihydroquercetin (DHQ) และ dihydromyricetin (DHM) นอกจากนี้เอนไซม์ F3'5'H ยังสามารถเปลี่ยน DHQ ให้เป็น DHM ได้ และเอนไซม์ F3H จะเปลี่ยนฟลาโวนอยด์ eriodictyol และ pentahydroxyflavanone เป็น ไดไฮโดรฟลาโวนอยด์ DHQ และ DHM ตามลำดับ ต่อจากนั้นลิโคแอนโทไซยานินชนิดต่าง ๆ เกิดจากเอนไซม์ dihydroflavonol-4-reductase (DFR) ไปเปลี่ยน DHK DHQ และ DHM ได้เป็น leucopelargonidin leucocyanidin และ leucodelphinidin ตามลำดับ จากนั้นเอนไซม์ anthocyanidin synthase (ANS) จะทำหน้าที่เปลี่ยนโมเลกุลให้อยู่ในรูป pelargonidin, cyanidin และ delphinidin แล้วเอนไซม์ UDP-glucose flavonoid glucosyl transferase (UGT) จะเปลี่ยนสารไม่มีสีเป็นแอนโทไซยานินที่มีสีต่าง ๆ คือ pelargonidin 3-glucoside ให้สีแดง, cyanidin 3-glucoside ให้สีม่วง และ delphinidin 3-glucoside ให้สีน้ำเงิน (Madhuri and Reddy, 1999; Mori *et al.*, 2003)



ภาพที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Mori *et al.*, 2003)

Van Tunen *et al.* (1991), Brouillard and Dangles (1993), Forkmann (1993), Mol *et al.* (1998) ได้กล่าวไว้ว่านอกเหนือจากชนิดและความเข้มข้นของแอนโทไซยานินที่สะสมอยู่ในแวคิวโอลแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการแสดงออกของสีดอกไม้ที่เกิดขึ้นอีกด้วย ได้แก่

1. การแทนที่หมู่ H ด้วยหมู่ OH ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3' 4' และ 5' ในวงแหวน B ของแอนโทไซยานินพบว่าถ้าตำแหน่งดังกล่าวถูกแทนที่ด้วยหมู่ OH มากเท่าใดก็จะทำให้โมเลกุลของสารสีเปลี่ยนสีเป็นโทนสีฟ้าอมม่วงมากขึ้นเท่านั้น และถ้ามีการแทนที่คาร์บอนตำแหน่ง 3' และ 5' ด้วยหมู่ OCH₃ จะทำให้เป็นสีแดง

2. ค่าความเป็นกรดเบส (pH) ของสารละลายในแวคคิวโอลมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสี ค่า pH ที่เป็นกรดอ่อนหรือกลางจะทำให้โมเลกุลอยู่ในรูปที่ไม่มีสี เมื่อสารละลายเป็นเบสจะทำให้เกิดสีน้ำเงินและถ้าสารละลายเป็นกรดจะทำให้เกิดสีแดง เมื่อดอกไม้มีอายุมากขึ้นสีดอกจะเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำเงินเข้มมากขึ้น สัมพันธ์กับค่า pH ที่เพิ่มมากขึ้นในแวคคิวโอล

3. การเกาะตัวของโมเลกุลสารสี (stacking) ซึ่งอาจจะเกาะกันเอง หรือเกาะกันอยู่ในรูปของสารสีร่วม (copigmentation) กับสารพวกฟลาโวนอลหรือฟลาโวน และอาจเกิดการเกาะกันระหว่างสารสีกับไอออนของโลหะ เช่น เหล็ก อะลูมิเนียม และแมกนีเซียม การจัดเรียงตัวเกาะกันของสารสีนี้ทำให้เกิดโครงสร้างที่ซับซ้อนมากขึ้น ส่งผลให้ดอกไม้มีสีที่สดขึ้นเนื่องจากสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงขึ้น

4. รูปร่างของเซลล์ที่สะสมแอนโทไซยานินมีผลต่อค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งพบว่าเซลล์ด้านในของผิวกลีบดอก *Antirrhinum majus* มีลักษณะเป็นรูปทรงกรวย ทำให้มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงได้ และส่งผลให้ดอกไม้มีลักษณะเงาล้ำก้ำมะหะบี้ แต่ถ้าพันธุ์ที่มีเซลล์ epidermis แบน ความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงจะลดน้อยลงทำให้ดอกไม้สีจาง

4. ดอกไม้สีน้ำเงิน

ดอกไม้สีน้ำเงินส่วนใหญ่เกิดจากสารสีแอนโทไซยานินชนิด delphinidin พวก delphinidin glycoside ซึ่งจะทำให้สีม่วงคราม การเปลี่ยนสีดอกไม้ไปเป็นสีน้ำเงินได้นั้นต้องอาศัยปัจจัยต่าง ๆ เช่น การเกิด copigmentation กับ ฟลาโวน และจำนวนไอออนบวกของโลหะ เป็นต้น ในธรรมชาติสีน้ำเงินจะเป็นสีที่สามารถดึงดูดความสนใจจากผึ้งให้มาผสมเกสร ดังนั้นการวิวัฒนาการของดอกไม้ที่จะเปลี่ยนแปลงสีดอกไม้ไปเป็นสีน้ำเงินจะสามารถเห็นได้ชัดในดอกไม้ที่อาศัยผึ้งช่วยในการผสมเกสรเป็นส่วนใหญ่ (Jeffrey *et al.*, 2000) สีน้ำเงินของดอกไม้ถูกจำกัดอยู่เฉพาะในพืชชั้นสูงสกุล angiosperm เท่านั้น และในพืชหลาย ๆ สกุลที่มีมาก่อนหน้านี้จะมีแอนโทไซยานินชนิด cyanidin ซึ่งให้สีแดงไปจนถึงสีแดงจัดออกมาเป็นส่วนใหญ่ซึ่งเป็นเหตุผลที่อธิบายได้ว่าทำไมพืชหลาย ๆ สกุลถึงไม่มีดอกสีน้ำเงิน

พื้นฐานทางเคมีของสารสีน้ำเงินในดอกไม้ได้มีการศึกษาครั้งแรกใน *Commelina communis* พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนของสารสีน้ำเงินนั้นเรียกว่า “commelinin” ซึ่งประกอบด้วย delphinidin glycoside, malonylawobanin, flavone copigment, flavo-commelinin และโลหะ 2 ชนิด คือ เหล็ก และแมกนีเซียม จากการตรวจสอบด้วยการ x-ray crystallography แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ารงควัตถุสีน้ำเงินที่อยู่ในแวกคิวโอของกลีบดอกนั้นประกอบด้วยสารประกอบเชิงซ้อนของแอนโทไซยานินกับฟลาโวน 6 โมเลกุล ที่จับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนและรวมกับไอออนบวกของเหล็ก 1 ไอออน กับไอออนบวกของแมกนีเซียมอีก 1 ไอออน ต่อจากนั้นได้มีการศึกษาดอกไม้สีน้ำเงินมากกว่า 14 ชนิดในสกุล angiosperm (ตารางที่ 1) ถึงผลผลิตของฟลาโวนอยด์ที่สร้างขึ้นซึ่งสามารถยืนยันได้ว่า delphinidin เป็นแอนโทไซยานินส่วนใหญ่ที่สร้างขึ้นในดอกไม้สีน้ำเงิน ถึงแม้ว่าดอกไม้สีน้ำเงินบางชนิดเช่น cornflower (*Centaurea cyanus*) และ Morning Glory (*Pharbitis nil*) จะมี แอนโทไซยานินชนิด cyanidin และ peonidin glycoside ตามลำดับ delphinidin สามารถดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุดได้ที่ 535 นาโนเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับบริเวณแสงสีน้ำเงินมากกว่าค่าการดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุดของ cyanidin หรือ peonidin glycoside ที่ 525 นาโนเมตร ดังนั้นเมื่อมีสาร delphinidin จึงไม่จำเป็นต้องมีสาร flavone ในปริมาณมากของสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถดูดกลืนคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่นสูงขึ้นเกิดเป็นสีน้ำเงิน จากการศึกษาอนุพันธ์ delphinidin ของดอกไม้สีน้ำเงินในตารางที่ 1 พบว่าสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้คือ delphinidin เกี่ยวข้องกับสีน้ำเงิน สีม่วงคราม cyanidin เกี่ยวข้องกับสีแดงถึงแดงจัดออกม่วง pelargonidin เกี่ยวข้องกับสีชมพูและสีส้ม และยังพบว่าอนุพันธ์ delphinidin ที่ไม่มี methylation เช่น petunidin และ malvidin ซึ่ง malvidin เป็นส่วนสำคัญที่ช่วยให้สีม่วงครามเปลี่ยนไปเป็นสีม่วง

จากตารางที่ 1 สามารถอธิบายได้ว่าการเกิด copigmentation เป็นกระบวนการพื้นฐานในการเปลี่ยนสีม่วงครามของ delphinidin glycoside ให้กลายเป็นสีน้ำเงิน โดยพบว่าจาก 12 ตัวอย่างใน 18 ตัวอย่างในตารางมีสารสีร่วมและ 11 ตัวอย่างที่มีสารสีร่วมพบว่ามีสารสีร่วมชนิดฟลาโวนหรือฟลาโวนอล ถึงแม้ว่าจะมีฟลาโวนหลายตัวอยู่ร่วมกับ delphinidin glycoside ในกลีบดอกไม้สีน้ำเงินแต่มีเพียงฟลาโวนที่เฉพาะเจาะจงเท่านั้นที่ทำหน้าที่เป็นสารสีร่วมซึ่งอาจสันนิษฐานได้ว่าอาจขึ้นอยู่กับความเสถียรของโครงสร้างสารประกอบเชิงซ้อนแอนโทไซยานินกับฟลาโวน และจากตารางที่ 1 พบว่ามีอัตราส่วนของฟลาโวนต่อแอนโทไซยานินในสารประกอบเชิงซ้อนแอนโทไซยานินกับฟลาโวนสูงมาก เช่น 10 ต่อ 1 แต่ยกเว้นกรณีที่มีไอออนบวกของโลหะอยู่ด้วย

เมื่อศึกษาสารสีน้ำเงินของ *Commelina communis* พบไอออนบวกของโลหะ 2 ชนิด คือ เหล็ก และแมกนีเซียม เป็นส่วนประกอบสำคัญของสารประกอบเชิงซ้อนแอนโทไซยานินกับฟลาโวน หรือกล่าวได้ว่าไอออนบวกของโลหะอาจพบอยู่ทั่วไปในดอกไม้ที่มีสีน้ำเงิน ตัวอย่างที่เห็นได้อย่างชัดเจนคือ *Hydrangea macrophylla* ที่ตรวจพบประจุของอะลูมิเนียมในดอก

ตัวอย่าง 5 ตัวอย่างจากพืช 18 ชนิดในตารางที่ 1 ได้แก่ *Campanula*, *Aconitum*, *Delphinium*, *Evolvulus* และ *Pharbitis* ซึ่งมี delphinidin หรือ peonidin glycoside ที่มีการแทนที่ polyacyl มีการเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำเงิน ทั้งนี้เนื่องจากการเกิด intramolecular copigmentation ดังนั้นเมื่อมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลภายในระหว่างแอนโทไซยานินกับ aromatic acyl group เกิดขึ้นจะทำให้สารประกอบเชิงซ้อนนั้นเสถียร

จากการศึกษาและจำแนกสารแอนโทไซยานินจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายและลูกผสม 28 สายพันธุ์ จัดแบ่งเป็นกลุ่มสีต่าง ๆ ได้แก่ สีม่วงแดง สีม่วงน้ำเงิน สีม่วงแกมเหลือง สีเทาม่วงแกมเหลืองหรือสีเหลืองส้ม และสีน้ำตาล เจดสีเหล่านี้มีอิทธิพลมาจากสารแอนโทไซยานินชนิดไซยานิดินเป็นส่วนใหญ่ และเพโอนิดินเล็กน้อย และพบว่าดอกกล้วยไม้สีน้ำเงิน 3 ชนิด ได้แก่ *Dendrobium gouldii* K280-6, *Dendrobium biggibom* 'blue' และ *Dendrobium kultana* 'blue' สีม่วงอ่อนจนถึงสีม่วงเข้มมีอิทธิพลมาจากสารสีไซยานิดิน สีส้มถึงสีแดงหรือแดงม่วงมีอิทธิพลจากเพลาโกนินดิน ปริมาณเนื้อสารแอนโทไซยานินในดอกสีม่วงสีส้มจะมีปริมาณสาร 0.13-0.18 ไมโครโมลต่อกรัมของน้ำหนักสดทั้งหมด ในขณะที่ดอกสีน้ำตาลมีสารเข้มข้นมากกว่าถึง 3.66 ไมโครโมลต่อกรัม อิทธิพลของความเป็นกรดเป็นด่างมีความแตกต่างกันเล็กน้อยตั้งแต่ pH 4.67-5.09 ในดอกสีขาว ส้ม สีม่วงและสีน้ำตาล อิทธิพลของสารสีรวมส่วนใหญ่เกิดจาก flavonol glycoside ของสารสีพวก kaempferol, quercetin, myricetin และสารอนุพันธ์ในกลุ่มที่ถูก methylate ส่วนสารกลุ่ม flavonol aglycones และการเติมน้ำตาลในตำแหน่งต่าง ๆ ของ aromatic ring มีความแตกต่างกันเล็กน้อยระหว่างกล้วยไม้สกุลหวาย *Dendrobium gouldii* และลูกผสมของ *Dendrobium Jaquelyn* Thomus การทำงานของ F3'H และ F3'5'H มีผลทำให้การสะสมสารสี quercetin, myricetin และ cyanidin ที่แตกต่างกัน ส่วนการทำงานของ F3'H และ F3'5'-O-methyltransferase มีผลต่อการสะสมสารสี isorhamnetin, syringetin และ peonidin (Kuehnle *et al.*, 1997)

นักวิจัยบางกลุ่มได้ศึกษาพื้นฐานทางเคมีของดอกไม้สีแดงม่วง เช่น กล้วยไม้ พบสารสี cyanidin และ peonidin glycoside ซึ่งมีการ acylate น้ำตาลที่ตำแหน่ง 7 และ 3' และพบว่าการจับกันด้านข้างของโมเลกุลภายในช่วยให้สีคงอยู่โดยไม่ต้องมีสารสีร่วมหรือไอออนบวกของโลหะแต่อย่างใด (Figueiredo *et al.*, 1999)

โคลนยีน *f3'5'h* จากดอกอัญชันและดอกกล้วยไม้ไพน์ริเวอร์ด้วยวิธี RACE PCR ได้ยีน *f3'5'h* ด้านปลาย 3' ขนาด 1,107 คู่เบส จากดอกอัญชัน แพลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนขนาด 291 เรสซิดิว และได้ยีนขนาด 1,115 คู่เบส จากดอกกล้วยไม้ไพน์ริเวอร์ แพลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ขนาด 291 เรสซิดิว เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน *f3'5'h* จากดอกอัญชันและดอกกล้วยไม้ไพน์ริเวอร์มาเปรียบเทียบกันพบว่ามีความคล้ายคลึงกันคิดเป็นร้อยละ 90 และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนจากพืชทั้งสองชนิดไปเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น พบว่ามีความใกล้เคียงกับเอนไซม์ F3'H จากพิทูเนีย คิดเป็นร้อยละ 66 นอกจากนี้ยังสามารถโคลนยีน *f3h* จากดอกกล้วยไม้ไพน์ริเวอร์ด้วยวิธี RT-PCR ได้ยีนขนาด 351 คู่เบส เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณกลางยีน เมื่อแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ 116 เรสซิดิว เปรียบเทียบกับพืชอื่นพบว่ามีความใกล้เคียงกับเอนไซม์ F3H จากดอกกล้วยไม้ *Bromheadia finlaysoniana* คิดเป็นร้อยละ 94 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *f3h* ด้วยวิธี RT-PCR และ Northern Hybridization ในดอกกล้วยไม้สกุลมอคลาร่า หวาย แวนด้า และแอสโคเซินด้าพบระดับการแสดงออกของยีน *f3h* ในกล้วยไม้ที่มีดอกสีขาว สีส้ม สีแดง สีม่วงน้ำเงิน และสีแดงม่วง ยกเว้นกล้วยไม้สีขาว *Dendrobium Jaquelyn Thomus*, *Den.* 5N และอัญชัน นอกจากนี้ยังตรวจพบการแสดงออกของยีน *f3'5'h* ในดอกกล้วยไม้ *Den.* Kowsanan, *Den.* Sabin, *Mokara Calipso*, *Vanda Bangkok white*, *Vancostylis Pine River* และอัญชัน (วาสนา, 2547)

กรดมาโลนิกเป็นองค์ประกอบที่พบในแอนโทไซยานินหลายชนิด มีหน้าที่ทำให้สีคงอยู่โดยการเพิ่มความเป็นกรดกับสารละลายในแวคิวโอลของกลีบดอก และการ deprotonation ของหมู่ malonyl จะป้องกันไม่ให้เกิดสภาพที่เป็นด่างซึ่งจะทำให้สีจางลงได้ (Jeffrey *et al.*, 2000)

Saito *et al.* (2002) สามารถแยกสาร polyacylated anthocyanins จาก *Anemone coronaria* 'St. Brigid' ดอกสีน้ำเงินม่วง ได้ 5 ชนิด ที่จัดเป็น delphinidin 3-O-[2-O-(2-O-(trans-caffeoyl)-beta-D-glucopyranosyl)-6-O-(malonyl)-beta-D-galactopyranoside]-7-O-[6-O-(trans-caffeoyl)-beta-D-glucopyranoside]-3'-O-[beta-D-glucuronopyranoside] และในรูปของ demalonylate คือ delphinidin 3-O-[2-O-(2-O-(trans-caffeoyl)-beta-D-glucopyranosyl)-6-O-(2-O-tartarylmalonyl)-

beta-D-galactopyranoside]-7-O-[6-O-(trans-caffeoyl)-beta-D-glucopyranoside]-3'-O-[beta-D-glucuronopyranoside] และ cyanidin ที่คล้ายกับ delphinidin 3-O-[2-O-(2-O-(trans-caffeoyl)-beta-D-glucopyranosyl)-6-O-(2-O-(tartaryl)malonyl)-beta-D-galactopyranoside]-7-O-[6-O-(trans-caffeoyl)-beta-D-glucopyranoside].

5. ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างดอกไม้สีน้ำเงิน

ยีน *flavonoid-3',5'-hydroxylase (f3'5'h)* เป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ F3'5'H ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินชนิด delphinidin ซึ่งกำหนดการสร้างสีดอกไม้สีน้ำเงินหรือสีม่วง (Shimada, 1999) F3'5'H จัดอยู่ใน cytochrome P450 family ทำหน้าที่ในการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3' และ 5' ของ naringenin และ eriodictyol ทำให้ได้ 5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavanone และเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3' และ 5' ของ dihydrokaempferol และ dihydroquercetin ทำให้ได้ dihydromyricetin ยีน *f3'5'h* ได้มีการโคลนจากดอกไม้ต่าง ๆ ได้แก่ *Petunia hybrida* (Holton *et al.*, 1993; Toguri *et al.*, 1993a; Shimada *et al.*, 1999), *Solanum melongena* (Toguri *et al.*, 1993b), *Gentiana triflora* (Tanaka *et al.*, 1996), *Eustoma grandiflorum* (Nielson และ Podivinsky, 1997), *E. russellianum* (Shimada *et al.*, 1999b), *Catharanthus roseus* (Kaltenbach *et al.*, 1999), *Campanula medium* (Shimada, 2000), *Torenia hybrida* (Suzuki *et al.*, 2000), *Vinca major* (Mori *et al.*, 2003), *Phalaenopsis* (Su and Hsu, 2003) และ canterbury bells (*Campanula medium*) (Okinaka *et al.*, 2003)

ยีน *flavonoid-3'-hydroxylase (f3'h)* เป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ F3'H ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างสีน้ำเงินและจัดอยู่ใน cytochrome P450 family (CYP75) เช่นเดียวกับ F3'5'H ทำหน้าที่เติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3' ของสารตั้งต้น เช่น kaempferol (flavonol), naringenin (flavanone) และ apigenin (flavone) (Holton and Cornish, 1995) ยีน *f3'h* โคลนครั้งแรกในพืชและตรวจสอบหน้าที่การทำงานโดย Brugliera *et al.* (1999) ต่อมาก็ได้มีการโคลนยีนนี้ใน *Arabidopsis thaliana* (Schoenbohm *et al.*, 2000) และ *Perilla frutescens* (Kitada *et al.*, 2001) ซึ่งพบว่าการแสดงออกเฉพาะในพันธุ์ที่มีใบสีแดงเท่านั้น

Holton *et al.* (1993) ได้โคลนยีน $f3'5'h$ ที่แตกต่างกัน 2 ชนิดที่แสดงออกในพิทูเนีย ทำการตรวจสอบแผนที่ด้วยวิธี Restriction-fragment length polymorphism และชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ พบว่ายีน $f3'5'h$ ทั้งสองนี้อยู่ที่ตำแหน่ง *Hf1* และ *Hf2* ซึ่งยีนที่ตำแหน่ง *Hf1* จะแสดงออกใน petal limb และ petal tube ส่วนยีนที่ตำแหน่ง *Hf2* จะแสดงออกที่ petal limb เท่านั้น

Toguri *et al.* (1993a) ได้โคลนยีนและศึกษาคุณสมบัติของ cytochrome P450 จาก cDNA ของพิทูเนีย (*Petunia hybrida*) พบว่าโปรตีน P450 ทำให้เกิดการสร้าง delphinidin ในดอกพิทูเนีย จึงคาดว่ายีน *P450* ทำหน้าที่ควบคุม F3'5'H ซึ่งเป็นเอนไซม์ในที่ใช้ในการสังเคราะห์ delphinidin ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Holton *et al.* (1993)

Nielson and Podivinsky (1997) โคลนยีน $f3'5'h$ จากดอก *lisianthus* มีความยาว 1530 คู่เบส ลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 510 เรสซิดิว น้ำหนักโมเลกุล 56.9 กิโลดาลตัน และเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนกับพืชชนิดอื่น พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีน $f3'5'h$ ใน *gentian* 77.3%, มะเขือยาว 71.9%, ยีน *Hf1* ในพิทูเนีย 73.8% และยีน *Hf2* ในพิทูเนีย 73.4% และจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Northern RNA analysis พบว่า mRNA ของยีน $f3'5'h$ แสดงออกในดอกในระยะเริ่มคลี่บาน ซึ่งสอดคล้องกับการพัฒนาสีดอก

Vetten *et al.* (1999) ทำการศึกษาความสำคัญของ cytochrome *b5* ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ F3'5'H ของ พบว่า การยับยั้งการแสดงออกของยีน โดยวิธีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้ทรานโปซอนในยีน *cytochrome b5* มีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ F3'5'H ลดลง โดยดอกพิทูเนียมีการเปลี่ยนสีจากสีม่วงไปเป็นสีม่วงแดง

Shimada *et al.* (1999) ศึกษาการแสดงออกของยีน *P450* ที่ควบคุมเอนไซม์ F3'5'H ในดอกพิทูเนีย และยาสูบแปลงพันธุ์ พบว่าพืชทั้งสองมีการแสดงออกของยีน $f3'5'h$ ในระดับที่แตกต่างกัน โดยพิทูเนียสีชมพูเปลี่ยนไปเป็นสีแดงม่วง ซึ่งพบปริมาณรงควัตถุเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ F3'5'H ค่อนข้างสูง แต่ในยาสูบมีการเปลี่ยนแปลงสีดอกเพียงเล็กน้อย

ตารางที่ 1 สารประกอบเชิงซ้อนฟลาโวนอยด์ในดอกไม้สีน้ำเงิน

ชนิดพืช	สารสี, สารสีรวมและโลหะ
Campanulaceae <i>Campanula medium</i>	Dp 3-rutinoside-7-(tri- <i>p</i> -hydroxybenzoyltrigluconide)
Compositae <i>Centaurea cyanus</i>	Succinylcyanin, apigenin 7-glucuronide-4'-malonylglucoside, Fe ³⁺ , Mg ²⁺ (6:6:1:1)
<i>Cichorium intybus</i>	Dimalonyldelphin, unknown flavone copigment
<i>Felicia amelloides</i>	Dp 3-neohesperidoside-7-malonylglucoside, swertisin 2''-rhamnoside-4'-glucoside (ratio 1:8)
<i>Senecio cruentus</i>	Dp 3-malonylglucoside-7-dicaffeoyldigluconide-3'-caffeoylglucoside
Commelinaceae <i>Commelina communis</i>	Dp 3-(<i>p</i> -coumarylglucoside)-5-(6-malonylglucoside), flavocommelinin, Fe ³⁺ , Mg ²⁺ (ratio 6:6:1:1)
Covolvulaceae <i>Evolvulus pilosus</i>	Dp 3-(dicaffeoyltrigluconide)-5-malonylglucoside
<i>Pharbitis nil</i>	Pn 3-(tricaffeoylpentagluconide)-5-glucoside
Hydrangeaceae <i>Hydrangea macrophylla</i>	Dp 3-glucoside, caffeoylquinic acid, Al ³⁺
Labiatae <i>Salvia patens</i>	Dp 3-(<i>p</i> -coumarylglucoside)-5-malonylglucoside, apigenin 7,4'-digluconide
<i>Salvia uliginosa</i>	Dp 3-(<i>p</i> -coumarylglucoside)-5-(4-acetyl-6-malonylglucoside), apigenin 7-cellobioside, apigenin 7-cellobioside-4'-glucoside
Leguminosae <i>Lupinus cv.</i>	Dp 3-malonylglucoside, apigenin 7-malonylglucoside
Nymphaeaceae <i>Nymphaea caerulea</i>	Dp 3'-(galloylgalactoside), Dp 3'-(galloylacetylgalactoside) unknown flavone copigment
Papaveraceae <i>Meconopsis betonicifolia</i>	Cy 3-malonylsambubioside-7-glucoside, kaempferol 3-gentiobioside, kaempferol 3-xylosylgentiobioside (ratio 1:5:6)
Pontederiaceae <i>Eichhornia crassipes</i>	Dp 3-gentiobioside, apigenin 7-malonylglucoside
Ranunculaceae <i>Aconitum chinense</i>	Dp 3-rutinoside-7-(di- <i>p</i> -coumarylglucoside)
<i>Delphinium hybridum</i>	Dp 3-rutinoside-7-(tetra- <i>p</i> -hydroxybenzoylpentagluconide)
Rhamnaceae <i>Ceanothus papillosus</i>	Dp 3-rutinoside-7-(<i>p</i> -coumaryl glucoside)-3'-glucoside, Dp 3-rutinoside-7,5'-(di- <i>p</i> -coumarylglucoside), kaempferol 3-xylosyl (1→2) rhamnoside

ที่มา: Harborne and Williams (1998)

Kaltenbach *et al.* (1999) ศึกษาเอนไซม์ flavonoid hydroxylase จาก *Catharanthus roseus* โดยโคลนยีนขึ้นมาโดยใช้ยีน CYP75 *Hfl* ของพิทูเนียมาค้นหาใน Library พบว่าโปรตีนที่ได้เหมือนกับโปรตีนอื่น ๆ ใน CYP75 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 68-78 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจสอบจีโนมโดยวิธี Southern blot hybridization พบว่ามีหนึ่งหรือสองยีน ตรวจสอบการแสดงออกใน *E. coli* ยีนถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนและสามารถรวมตัวกับเอนไซม์ P450 reductase จากการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์นี้คือ F3'5'H นอกจากนี้ยังตรวจสอบพบเอนไซม์ F3'H ด้วย

6. พันธุวิศวกรรมกับการสร้างดอกไม้สีน้ำเงิน

สีของดอกไม้เป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งของไม้ตัดดอก ดังนั้นจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องพัฒนาให้ดอกไม้มีสีที่หลากหลายมากขึ้น แต่การพัฒนาดอกไม้ให้มีสีสรรที่หลากหลายโดยวิธีการผสมพันธุ์ตัวเองหรือข้ามสายพันธุ์ และการคัดเลือกจากต้นที่เกิดการกลายพันธุ์โดยธรรมชาติหรือการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ การฉายรังสี เป็นวิธีที่ต้องใช้เวลานาน การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาเสริมจะช่วยการพัฒนาพันธุ์พืชให้ได้ลักษณะตามต้องการได้ (Mori *et al.*, 2003) ดอกไม้บางชนิดยังขาดสีบางประเภท เช่น กุหลาบ คาร์เนชั่น ทิวลิป และ เบญจมาศ ไม่มีดอกสีน้ำเงินเนื่องจากขาดเอนไซม์ F3'5'H นักผสมพันธุ์พืชได้ให้ความสนใจเป็นอย่างมากในการพัฒนาดอกไม้เหล่านี้ให้มีสีน้ำเงิน โดยเฉพาะการเน้นการศึกษาสารสี delphinidin, petunidin และ malvidin ซึ่งสร้างได้เมื่อมีเอนไซม์ F3'5'H เท่านั้น (Shimada *et al.*, 2001) อย่างไรก็ตามความสำเร็จในการสร้างดอกไม้สีน้ำเงินโดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมต้องคำนึงถึงปัจจัยหลาย ๆ อย่างประกอบกัน คือ 1. การชักนำยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง delphinidine (3',5' hydroxylated anthocyanin) ซึ่งทำให้เกิดสีฟ้าหรือสีน้ำเงิน 2. การรักษาสภาพ pH ของสารละลายในแวคคิวโอไลต์เป็นค่า จากการศึกษายีนควบคุม pH ในแวคคิวโอของพิทูเนีย พบว่ามีอยู่ 7 ยีน คือ *ph1-ph7* 3. การสร้างหรือชักนำให้เกิด copigmentation เพื่อเพิ่มความสดหรือความเข้มของสี

การโคลนยีน *f3'5'h* จากพิทูเนียเป็นก้าวแรกที่สำคัญในการสร้างดอกกุหลาบแปลงพันธุ์สีน้ำเงิน การถ่ายยีน *f3'5'h* เข้าไปในดอกกุหลาบที่มีการสร้าง pelargonidin หรือ cyanidin น่าจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินให้มีการสร้าง delphinidin-glucoside มากขึ้น ซึ่งจะทำให้สีดอกเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำเงิน จากการทดลองก่อน ๆ พบว่าเอนไซม์ F3'5'H ของดอกกุหลาบไม่สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็น Dihydromyricetin (DHM) ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็น

delphinidin-glucoside การเกิดสารสีร่วม (flavonol copigment) และ การควบคุมความเป็นกรดเบสของสารละลายในแวคคิวโอลเป็นอีกหนทางในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีดอกให้มีโทนสีน้ำเงินและสีม่วง บริษัท Calgene Pacific Pty Ltd (Victoria, Australia) และ บริษัท Suntory Ltd (Osaka, Japan) ได้ร่วมมือกันทำการศึกษาการปรับปรุงสีดอกไม้ ซึ่งมีจุดประสงค์ในการสร้างกุหลาบที่สามารถสร้างรงควัตถุ delphinidin โดยการถ่ายยีน *3'5'h* เข้าไป ซึ่งเป็นจุดสำคัญในการพัฒนาดอกกุหลาบสีน้ำเงินดอกแรกของโลก (Holton and Tanaka, 1994)

Gutterson (1995) ทดลองถ่ายยีน *CHS* แบบ sense เข้าคาร์เนชันสีชมพูสายพันธุ์ Manon มีผลทำให้ 10 เปอร์เซ็นต์ของคาร์เนชันที่ได้รับยีนมีดอกเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน และเมื่อถ่ายยีน *3'5'h* แบบ antisense พบว่าดอกคาร์เนชันสีแดงเปลี่ยนเป็นสีขาว นอกจากนี้ Florigene Ltd. ประเทศออสเตรเลีย และ Suntory Ltd. ประเทศญี่ปุ่น ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีน *3'5'h* และ DFR ที่โคลนได้จากพิทูเนียเข้าคาร์เนชันดอกสีขาวซึ่งขาดยีน DFR ทำให้ได้คาร์เนชันดอกสีม่วงน้ำเงิน และตั้งชื่อว่า “MoondustTM” ซึ่งนับว่าเป็นดอกไม้แปลงพันธุ์ชนิดแรกที่มีขายอยู่ในท้องตลาดทั้งในประเทศออสเตรเลียและญี่ปุ่น และกำลังพัฒนารุ่นที่มีสีเข้มขึ้น “Moonshadow” ออกสู่ตลาด

Suzuki *et al.* (1997) ได้ถ่ายยีน *CHS* และ DFR แบบ sense มีผลทำให้ดอกโทเรเนียสีน้ำเงินสายพันธุ์ Summerwave Blue เปลี่ยนเป็นสีขาว และเมื่อถ่ายยีนทั้งสองนี้เข้าไปในโทเรเนียสีเหลืองพันธุ์ T-33 พบว่าดอกมีสีเหลืองอ่อน เนื่องจากสีเหลืองของดอกโทเรเนียนี้มีผลมาจากแคโรทีนอยด์ด้วย

บริษัท Suntory จำกัด ประเทศญี่ปุ่นได้ผลิตไม้ดอกที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีพันธุวิศวกรรมออกจำหน่ายสู่ท้องตลาดจำนวน 2 พันธุ์ คือ พิตูเนียพันธุ์เซอร์ฟินา ซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า SurfinaTM และโทเรเนียที่มีชื่อทางการค้าว่า SummerwaveTM พิตูเนียพันธุ์เซอร์ฟินาเดิมนี้เป็นสายพันธุ์ที่มีดอกสีม่วงน้ำเงินเพียงสีเดียวเนื่องจากข้อจำกัดทางพันธุกรรม พิตูเนียพันธุ์ SurfinaTM ได้รับการปรับปรุงพันธุ์โดยการถ่ายยีน *flavonol synthase* ที่โคลนได้จากดอกกุหลาบ ทำให้ดอกมีสีน้ำเงินที่เข้มกว่าพิตูเนียพันธุ์เซอร์ฟินา เนื่องจากมีรงควัตถุฟลาโวนอลในระดับที่มากขึ้น และรงควัตถุแอนโทไซยานินในระดับที่น้อยลง ซึ่งฟลาโวนอลเป็นรงควัตถุร่วมกับแอนโทไซยานิน ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีผลทำให้ดอกไม้มีสีน้ำเงิน นอกจากนี้บริษัทยังได้ทำการผลิตโทเรเนียที่มีชื่อพันธุ์การค้าว่า SummerwaveTM ซึ่งมีจีโนมเป็น triploid (3n) มีทั้งเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียที่เป็นหมัน ทำให้ยากแก่การปรับปรุงพันธุ์ต่อไป สีดอกของพันธุ์ Summerwave ดังกล่าวคือสี

น้ำเงิน โดยมีแอนโทไซยานินหลักคือ malvidin-3-glucoside-5(acyl)-glucoside โดยมีมัลวิดิน (malvidin) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ delphinidin เป็นองค์ประกอบ การปรับปรุงพันธุ์ Summerwave ทำโดยการถ่ายยีน *chs* หรือ *dfr* โดยใช้โปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงในทิศทาง sense พืชแปลงพันธุ์ที่ได้มีจำนวนหลายต้นและแสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างกัน โดยมีปริมาณแอนโทไซยานินลดลง ต้นที่ถูกคัดเลือกไว้เป็นสายพันธุ์การค้าซึ่งมีลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แน่นอนคือ ดอกสีขาว ดอกสีขาว/น้ำเงิน นอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองถ่ายยีน *f3'5'h* ในทิศทาง sense ให้กับ Summerwave อีกด้วย พืชแปลงพันธุ์ที่ได้บางต้นจะให้ดอกสีชมพูซึ่งผลิตรงควัตถุ pelargonidin ที่ให้สีส้มชมพูมากกว่า malvidin ที่ให้น้ำเงิน (Tanaka *et al.*, 1998)

Shimada *et al.* (1999) ทำการทดลองโคลน cDNA TG1 จาก parairie gentian โดยการทำให้ heterologous hybridization กับ cDNA AK14 ของพิทูเนียซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์ F3'5'H แล้วศึกษาการแสดงออกของยีนเหล่านี้โดยการถ่ายเข้าไปในยาสูบและพิทูเนียที่ขาดเอนไซม์ ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ CaMV 35S จากการทดลองพบว่าพิทูเนียที่ได้รับยีนมีการเปลี่ยนแปลงสีอย่างรุนแรงจากสีชมพูไปเป็นสีแดงม่วง แต่ในทางตรงกันข้ามยาสูบที่ได้รับยีนมีสีเปลี่ยนไปเล็กน้อย

Arida *et al.* (2000) ได้ทำการทดลองพบว่าเมื่อถ่ายยีนสาย antisense ของ *CHS* หรือ *DFR* เข้าไปในโทรีเนีย (*Trorenia fournieri* Lind.) พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน antisense ของ *DFR* จะมีดอกสีน้ำเงินเข้มมากกว่าต้นที่ได้รับยีน antisense ของ *CHS* อธิบายได้ว่าการไปยับยั้งการทำงานของยีน *DFR* ทำให้เกิดการสะสมสารฟลาโวนมากขึ้น ซึ่งจะไปรวมตัวกับสารสีอื่น ๆ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (copigmentation) ทำให้โทรีเนียมีสีน้ำเงินเข้มขึ้น

Park and Kim (2000) ทดลองถ่ายยีน *f3'5'h* ที่ได้จากมะเขือยาวเข้าไปในยาสูบ *Nicotiana tobacco* โดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 จากการวิเคราะห์ด้วย Northern blot พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าไปมีการแสดงออกของยีน *f3'5'h* เป็นปกติ และพบว่าต้นที่ได้รับยีนมีกลีบดอกกลมกว่าต้นที่ไม่ได้รับยีน และสีดอกสว่างกว่า

Shimada *et al.* (2001) ได้ทำการตัดต่อยีนสีดอกของพิทูเนียด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เพื่อศึกษารูปแบบการเกิดสีและองค์ประกอบของแอนโทไซยานินโดยการถ่ายยีน *f3'5'h* สาย antisenes และ sense เข้าไปในพิทูเนีย ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์

CaMV 35S ซึ่งพบว่าพิทูเนียสีชมพูที่ขาดยีน *f3'5'h* เมื่อได้รับการถ่ายยีน *f3'5'h* สาย sense เข้าไป สีดอกเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีชมพูไปเป็นสีแดงม่วงและบางต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเกิดรูปแบบสีใหม่ ๆ เช่น รูปแบบคล้ายดาว ซึ่งมีลักษณะเป็นแฉก ๆ แต่เมื่อถ่ายยีน *f3'5'h* สาย sense เข้าไปในพิทูเนียสีน้ำเงินพบว่าจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเข้มไปเป็นสีน้ำเงินที่อ่อนลง บางต้นเป็นสีชมพูอ่อน ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าไม่เพียงแต่ยีน *f3'5'h* จะทำหน้าที่ในการสร้างหรือยับยั้งในกระบวนการสังเคราะห์ 3',5'-hydroxylated anthocyanins เท่านั้น แต่ยังสามารถไปปิดเปิดกระบวนการสังเคราะห์ 3',5'-hydroxylated anthocyanins หรือ 3'-hydroxylated anthocyanins ก็ได้

Yukiko *et al.* (2002) กล่าวว่า เอนไซม์ Cytochrome P450 (P450) มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์สารพวกฟลาโวนอยด์ซึ่งใช้กำหนดสีของดอกไม้ เอนไซม์ flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H), flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H) และ flavone synthase II (FNSII) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม P450 ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ในโทริเนีย และทำการทดลองคัดเลือกรหัสที่สร้างเอนไซม์ F3'H จาก cDNA library กลีบดอกของโทริเนีย พบว่าลำดับกรดอะมิโนของยีน *f3'h* คล้ายกับยีน *f3'h* ของ Arabidopsis และ Petunia คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 82 % และ 80 % ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ Phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่ายีน *f3'h* และ *f3'5'h* แยกออกจากกันเป็น subfamily CYP75B และ CYP75A ตามลำดับ การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *f3'h* ในยีสต์ ซึ่งให้เห็นว่าเอนไซม์ F3'H ทำหน้าที่เติมหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่ง 3' ของ naringenin, dihydrokaempferol, kaempferol และ apigenin โดยมีค่า Km เท่ากับ 0.83, 3.95, 2.96 และ 21.5 μ M ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ Northern blot พบว่าการสะสมสารพวกแอนโทไซยานินและฟลาโวนถูกควบคุมในระดับ transcription ซึ่งยีน *FNS II* ถูกควบคุมการแสดงออกที่แตกต่างจากยีน *f3'h* และ *f3'5'h* เมื่อถ่ายยีน *f3'h* ที่มีการแสดงออกตลอดเวลาเข้าไปในโทริเนียที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *f3'5'h* พบว่าโทริเนียแปลงพันธุ์ที่ได้ (SWB548/20-52) มีปริมาณแอนโทไซยานินชนิด cyanidin สูง เป็นผลให้ดอกของโทริเนียมีสีแดงขึ้น และเมื่อถ่ายยีน *FNS II* เข้าไปในโทริเนีย พบว่าโทริเนียแปลงพันธุ์ที่ได้ (SWB441/54) มีปริมาณฟลาโวนลดลง แต่ปริมาณฟลาโวนเพิ่มมากขึ้น และเป็นผลให้เกิด Co-suppression ยับยั้งการสะสมปริมาณแอนโทไซยานินในดอกด้วย ทำให้ดอกของโทริเนียมีสีจางลง

Mori *et al.* (2003) โคลนยีน *f3'5'h* จากกลีบดอกของ *Vinca major* เมื่อวิเคราะห์ด้วย Southern blot พบว่ามียีนนี้ประมาณ 3 ถึง 4 ยีน และผลจาก RT-PCR พบว่ามีการถอดรหัสของยีนในส่วนของกลีบดอกอ่อนแต่ไม่พบในใบ เมื่อถ่ายยีนนี้เข้าไปในพืชเนี่ยพบว่าบางต้นมีการแสดงออกอย่างรุนแรง คือ เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีแดงเข้มที่มีสีม่วงเข้มแทรกอยู่เป็นบางส่วน

Su and Hsu (2003) ทำการโคลนยีน *f3'5'h* จากกล้วยไม้ *Phalaenopsis* และทดลองถ่ายเข้าไปในกลีบดอกของ *Phalaenopsis* ทำให้กลีบที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าไปเปลี่ยนสีจากสีชมพูไปเป็นสีแดงม่วง แสดงว่าผลผลิตของยีน *f3'5'h* เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

Okinaka *et al.* (2003) ก่อนหน้านี้ได้ทำการทดลองพบว่าเป็นการยากมากที่จะทำให้เกิดการสะสมอนุพันธ์ของ delphinidin ที่ดีในพืชที่มีการแสดงออกของยีน *f3'5'h* ต่อมาได้ทำการโคลนยีน *f3'5'h* (Ka1) จาก canterbury bells (*Campanula medium*) และทดสอบการแสดงออกในยาสูบ พบว่าเป็นที่น่าแปลกใจเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง ยีน *f3'5'h* (Ka1) กับยีน *f3'5'h* อื่น ๆ Ka1 สามารถแปลรหัสให้โปรตีน 1 โปรตีนที่มีโครงสร้างปฐมภูมิ ซึ่งสามารถเก็บสะสมอนุพันธ์ของ delphinidin ได้เป็นอย่างดีมากกว่า 99% ของแอนโทไซยานินทั้งหมดและทำให้เกิดดอกไม้สีม่วงสีใหม่ จากผลการทดลองนี้บ่งบอกว่ายีน *f3'5'h* (Ka1) เป็นแหล่งพันธุกรรมที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการสร้างดอกไม้สีน้ำเงินด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

7. การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิง (Particle bombardment)

การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิง เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการถ่ายยีนสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยว รวดเร็ว ใช้ได้กับทุกส่วนของพืชใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยว (Sanford *et al.*, 1993) วิธีนี้พัฒนาขึ้นโดย Sanford *et al.* (1987) โดยใช้อนุภาคทังสเตนหรือทองคำขนาดเล็กประมาณ 1-4 ไมครอน เคลือบด้วยดีเอ็นเอที่ต้องการถ่ายเข้าเซลล์พืช แล้วยิงด้วยความเร็วสูงให้อนุภาคเหล่านั้นเข้าไปในเซลล์พืชโดยไม่ทำให้เซลล์พืชได้รับอันตรายแต่อย่างใด ซึ่งในช่วงแรกใช้แรงขับเคลื่อนจากการระเบิดของกระสุนดินปืน ภายหลังได้มีการพัฒนามาใช้กระแสไฟฟ้าแรงสูง (high voltage electrical arc discharge) โดย McCabe and Christou (1993) ใช้แรงดันจากก๊าซไนโตรเจน (Morikawa *et al.*, 1989) ใช้แรงอัดอากาศ (airgun device for particle bombardment) โดย Oard (1993) และใช้แรงดันก๊าซฮีเลียม (particle inflow gun, PIG) (Takenchi *et al.*, 1992) โดยแบบที่ผลิตเป็นการค้าครั้งแรกคือ เครื่องที่ใช้แรงขับเคลื่อนจากกระสุนดินปืนที่ชื่อ Biolistic PDS-1000 Dupont Company, Wilmington,

DE. เครื่องรุ่นที่ใช้แรงดันจากก๊าซฮีเลียม และสามารถควบคุมแรงขับเคลื่อนอนุภาคโลหะได้ดี มีการกระจายของอนุภาคโลหะเป็นระเบียบและเซลล์บอบช้ำน้อย ชื่อ PDS-1000/He Biolistic® Particle delivery system, BioRad Gun (Kikkent, 1993) เครื่องยิงอนุภาคชนิด PIG ได้พัฒนาขึ้นในเมืองไทยครั้งแรกโดย ผศ.ดร.วิชัย โหมยัตร์ตัน แห่งภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยพัฒนาจากเครื่องต้นแบบของ Barry Hulse (CSIRO, Division of Plant Industry, Canberra, Australia) ซึ่งเป็นชนิดที่ดัดแปลงมาจากเครื่องต้นแบบของ Finer เป็นแบบที่ใช้งานมีส่วนประกอบของเครื่องไม่ซับซ้อน และสามารถจัดสร้างได้ในราคาถูก (พรทิพย์, 2539)

จากหลักการนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับพืชหลายชนิดทั้งใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าวโพด (Klein *et al.*, 1988b; Gordon-Kamm *et al.*, 1990) ข้าว (Christou *et al.*, 1993; Cao *et al.*, 1991; Zou *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1996) ฝ้าย (Finer *et al.*, 1990; McCabe, 1993) มะละกอ (Drew *et al.*, 1996) ถั่วเหลือง (McCabe *et al.*, 1988; Christou *et al.*, 1989) ยาสูบ (Klein *et al.*, 1988a; Tomes *et al.*, 1990) หน่อไม้ฝรั่ง (Cabrera-Ponce *et al.*, 1997) และกล้วยไม้ (Chia *et al.*, 1990 ; 1994; Kuehnle and Sugii, 1992; Steinhart *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1999)

Chia *et al.* (1990) ทดลองถ่ายยีนรายงานผล (reporter gene) พวก firely luciferase เข้าสู่คัพพะของกล้วยไม้สกุลแวนด้า (Vanda) และสามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้จากโปรโตคอร์มอายุ 6 สัปดาห์หลังการถ่ายยีน

Kuehnle and Sugii (1992) ผลิตกล้วยไม้แปลงพันธุ์สกุลหวาย (Dendrobium x Jaquelyn Thomas hybrids) โดยยิงอนุภาคทั้งสเต็มที่เคลือบด้วยพลาสมิด pGA482GG/ cpPRV4 ซึ่งประกอบด้วยโปรโมเตอร์ CaMV35S ต่ออยู่กับยีนต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (*npfII*) และยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของ Papaya ringspot virus (PRV-CP) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่ไม่ใช่เชื้อสาเหตุของโรคกล้วยไม้ เข้าโปรโตคอร์มอายุ 3 เดือนของกล้วยไม้สกุลหวายที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง VW หลังจากการถ่ายยีนเป็นเวลา 3 เดือนจึงนำโปรโตคอร์มมาทำการคัดเลือกโดยเลี้ยงในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 3 เดือน โดยมีสารปฏิชีวนะกานามัยซินยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน แต่ไม่สามารถใช้คัดเลือกเป็นเวลานานได้ เนื่องจากมีผลทำให้การเจริญไปเป็นต้นลดลง ภายหลังการถ่ายยีน 21 เดือนทำการตรวจสอบผลด้วยการทำ PCR และ restriction analysis พบว่า พืชที่ต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซินทั้งหมด 13 ต้นมียีน *npfII* ทุกต้น แต่มีเพียง 1 ต้นที่ตรวจพบว่ามียีน PRV-CP

Chia *et al.* (1994) ทดลองถ่ายยีนรายงานผลพวก firefly luciferase เข้าสู่กล้วยไม้ในสกุล หวาย (*Dendrobium*) เนื่องจากการใช้สารปฏิชีวนะกานามัยซินมีประสิทธิภาพต่ำในการคัดเลือก เซลล์ที่ได้รับยีนเข้าไป การทดลองนี้จึงใช้การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *firefly luciferase* ในการคัดเลือก โดยใช้เครื่องมือวัดแสงที่ยีนนี้แสดงออก แล้วทำการแยกเซลล์ที่มียีนออกมา แต่วิธีการ นี้ยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูงจึงไม่เหมาะแก่การถ่ายยีนเข้ากล้วยไม้โดยทั่วไป โดยทำการยิงอนุภาค ทั้งสเตรนขนาด 1.3 ไมโครเมตรที่เคลือบด้วยพลาสมิด pUC19LUC กับพลาสมิด pMON530LUC ซึ่ง ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ CaMV35S ต่ออยู่กับยีน Luc เข้าโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวาย หลังจากการถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วันจึงเติมสารลูซิเฟอรินความเข้มข้น 1 mM ในอาหารที่ใช้เลี้ยง โปรโตคอร์มเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ในวันที่ 3, 7, 14, 21 และ 28 หลังการถ่ายยีน โดยใช้เครื่องมือวัดแสงตรวจสอบ พบว่า ในช่วงแรกพลาสมิด pUC19-LUC ให้ผลที่ดีกว่า พลาสมิด pMON530-LUC แต่การแสดงออกลดลงในช่วงหลัง จนท้ายสุดของการ ตรวจสอบพลาสมิด pMON530-LUC ให้ผลดีกว่าพลาสมิด pUC19-LUC หลังจากโปรโตคอร์มมี การแสดงออกของยีนพัฒนาเป็นต้นแล้ว ทำ southern blot analysis เพื่อยืนยันผลอีกครั้ง พบว่า พืชที่ นำมาตรวจสอบ 3 ต้นมียีน *Luc* อยู่

Steinhart *et al.* (1997) ทดลองถ่ายยีนรายงานผล *gus* เข้าโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุล แคทลียา (*Cattleya*) อายุ 3 สัปดาห์ โดยใช้พลาสมิด 5 ชนิด ซึ่งมีโปรโมเตอร์ต่างกัน การตรวจสอบ การแสดงออกดำเนินการภายหลังการถ่ายยีน 7-12 สัปดาห์ โดยวิธีทาง histochemical และ PCR พบว่า พลาสมิดทั้ง 5 ชนิด ให้ผลการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน

Yang *et al.* (1999) ทดลองถ่ายยีนรายงานผล *gus* เข้าโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุล ชิมบิเดียม (*Cymbidium*) อายุ 6 เดือนที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำมาถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค โดยใช้พลาสมิด pKH200 ซึ่งมียีน *gus* ต่อด้วย intron ซึ่ง จะแสดงออกได้เฉพาะในยูคาริโอต และ *nptII* เคลือบอนุภาคทอง ทำการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิง อนุภาคแบบใช้ก๊าซฮีเลียม ใช้ความดันก๊าซ 1,100-1,500 psi ระยะทางระหว่างหัวยิงกับเนื้อเยื่อ เท่ากับ 60 มิลลิเมตร การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ทำหลังจากการถ่ายยีน 3, 5, 7 วัน และ 3 เดือนตามลำดับ โดยวิธีทาง histochemical assay พบว่า มีการแสดงออกของยีน *gus* สูงมาก หลังการ ถ่ายยีน 3 วันต่อมา การแสดงออกลดลงเนื่องมาจากยีนที่ถ่ายเข้าไปไม่ได้เข้าไปแทรกอยู่ใน โครโมโซมของกล้วยไม้ และหลังจากการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์พบกล้วยไม้มียีน *gus* อยู่ร้อยละ 69.4 ทำการยืนยันผลด้วยการ

ทำ PCR พบว่า พืชที่ได้จากการคัดเลือกทั้งที่มีการแสดงออกและไม่มีการแสดงออกของยีน *gus* ต่างก็มียีน *nptII* สำหรับ Southern blot analysis และการศึกษาลำดับเบสของยีนยังไม่ได้ทำการทดลอง

Men *et al.* (2003) ได้รายงานการถ่ายยีนเข้าโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายสองชนิดด้วยเครื่อง Bio-Rad PDS-10002He Biolistic Particle Delivery System คือ *Dendrobium phalaenopsis* และ *D. nobile* โดยเคลือบอนุภาคทองด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1301 ซึ่งมียีน *gus-int* และ *hpt* โดยเลี้ยงโปรโตคอร์มในอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่ลดองค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง ที่เติมน้ำตาล mannitol 0.4 M เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปถ่ายยีน หลังจากได้รับการถ่ายยีนแล้วย้ายโปรโตคอร์มไปเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่ลดองค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง ที่ไม่เติมน้ำตาล mannitol และทำการคัดเลือกยีนในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุดเมื่อทำการคัดเลือกหลังจากถ่ายยีนไปแล้ว 2 วัน ตรวจสอบการแทรกของยีนและการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้แปลงพันธุ์โดย Southern hybridization และ Northern hybridization พบว่าไม่มีพืชแปลงพันธุ์ที่เจริญเติบโตได้ อย่างไรก็ตามพบว่ามียีน *gus* และ *hpt* อยู่และมีกล้วยไม้แปลงพันธุ์ 1 ต้นที่มียีน *gus* แทรกอยู่ในจีโนม แต่ไม่มีการแสดงออก

8. ปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิง

ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิง สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ (McCabe and Christou, 1993)

1. ปัจจัยทางกายภาพ (physical parameter) ได้แก่ ชนิดของอนุภาคโลหะที่ใช้ในการยิง ได้แก่ ทอง (gold), ทังสเตน (tungsten), พัลลาเดียม (palladium), ทองคำขาว (platinum), อิริเดียม (iridium) เป็นต้น แต่ที่นิยมใช้คือ ทอง และทังสเตน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคประมาณ 1-4 ไมโครเมตร นอกจากนี้ยังมีลักษณะรูปร่างและการจับตัวกันของอนุภาคโลหะ จำนวนอนุภาคที่ใช้ ปริมาณดีเอ็นเอต่อจำนวนอนุภาคโลหะ วิธีการเคลือบดีเอ็นเอลงบนผิวของอนุภาค ลักษณะของพาหะและโปรโมเตอร์ ระยะห่างระหว่างหัวยิงกับชิ้นส่วนพืช แรงดันก๊าซ เป็นต้น

2. ปัจจัยทางชีวภาพ (biological factor) ได้แก่ ความเหมาะสมของเนื้อเยื่อที่ใช้ยิงขนาดของเนื้อเยื่อ อายุของเนื้อเยื่อ ควรเลือกเนื้อเยื่อที่มีเซลล์ที่สามารถพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นต้นพืชได้

3. ปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ (environmental factor) ได้แก่ อุณหภูมิ ความยาวคลื่นแสง ความชื้น และปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ และความเข้ากันได้ของดีเอ็นเอที่ถ่ายเข้าไปกับดีเอ็นเอของพืชผู้รับ

Nan and Kuehnle (1995) ศึกษาเปรียบเทียบปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการถ่ายยีน *gus* ให้กับเนื้อเยื่อของกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) 5 ปัจจัย คือ ชนิดของโปรโมเตอร์ ความดันของแก๊สฮีเลียม ขนาดของอนุภาค สายพันธุ์ของพืช และชนิดของเนื้อเยื่อพืช พบว่า พลาสมิด pBI426 ที่มี CaMV 35S promoter 2 ชุด แสดงออกได้ดีกว่าพลาสมิด pBI121 ที่มี CaMV 35S promoter 1 ชุด อนุภาคทองที่มีขนาด 1.6 ไมโครเมตร ให้ผลในการถ่ายยีนดีกว่าอนุภาคทองขนาด 1.0 ไมโครเมตร รวมทั้งชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ ได้แก่ ชิ้นส่วนยอด โปรโตคอร์ม และโปรโตคอร์มไลก์บอดีให้ผลที่ต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ใช้ด้วย คือ UH44, UH232, UH503, UH800, UH1101 และ M61 แต่ความดันที่แตกต่างกันคือ 900 และ 1,100 psi ไม่มีผลต่อการถ่ายยีน ในการทดลองนี้ได้มีการเปรียบเทียบผลของการใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบใช้ดินปืนกับเครื่องยิงอนุภาคแบบใช้ก๊าซฮีเลียม แต่พบว่าเครื่องยิงอนุภาคแบบใช้ก๊าซฮีเลียมช่วยลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ได้

Rochange *et al.* (1995) ศึกษาเปรียบเทียบการใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบใช้ดินปืนกับแบบใช้ก๊าซฮีเลียมในการถ่ายฝากยีน *gus* ให้กับไซโกตของต้นยูคาลิปตัส โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการยิงด้วย พบว่า เครื่องยิงทั้ง 2 แบบใช้งานได้ดี แต่ปัจจัยทางกายภาพที่ใช้จะให้ผลต่างกัน อายุของเอ็มบริโอที่เหมาะสมคือ 6 วัน และความดันออกสโตนิกมีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของยีน *gus* ด้วย