

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเพิ่มการแสดงผลออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เพลโวนอยด์ในยาสูบและผลใน
การต้านทานต่อโรคพืช



นางสาวคนैया

เกตุมาหะกุล

นางสาวศิวพร

วงมันคง

ร.พ.

๐ 1237

๖๕ ๕๐

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....**72595**
วัน,เดือน,ปี...**20 ส.ย. 2550**

b. **117698A1**
i.....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Overexpression of Flavonoid Biosynthetic Genes in Tobacco and Effects on
Plant Disease Resistance**



**A Special Project Submitted in Partial of the Requirement for the Degree of
Bachelor of Science**

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง การเพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ในยาสูบและ
ผลในการต้านทานต่อโรคพืช

นักศึกษา นางสาวศันยา เกตุมหาตระกูล รหัส 46050120

นางสาวศิวพร วงม่นคง รหัส 46050144

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพลิน

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์	
กรรมการ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล	
กรรมการ ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพลิน	



(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ.ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	การเพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ในยาสูบและผลในการต้านทานต่อโรคพืช
นักศึกษา	นางสาวศนัญญา เกตุมหาตระกูล รหัส 46050120 นางสาวศิวพร วงมั่นคง รหัส 46050144
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2549
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.กนกพร สมพร โพลิน

บทคัดย่อ

ฟลาโวนอยด์เป็นสารทุติยภูมิที่พบในพืชมีบทบาทหน้าที่หลากหลาย รวมทั้งความต้านทานต่อโรคพืช ในการทดลองนี้ทำการศึกษาการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์เข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม ชีนเหล่านี้ประกอบด้วย ยีนควบคุมที่ทำการศึกษาในกลุ่ม bHLH ได้แก่ *TT8 MYC-RP* และยีนควบคุมในกลุ่ม R2R3-MYB ได้แก่ *MYB-P1* ส่วนยีนโครงสร้าง ได้แก่ chalcone synthase (*CHS*) และ dihydroflavonol-4-reductase (*DFR*) ต้นยาสูบที่เพิ่มการแสดงออกของยีน *CHS* และ *DFR* ใช้สำหรับศึกษาความสามารถในการต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *glycinia* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดในถั่วเหลือง หลังจากต้นพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน *CHS* และ *DFR* ได้รับการติดเชื้อโรคพืช พบว่าใบยาสูบมีการสะสมสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มสูงขึ้นกว่าเมื่อไม่ได้รับการติดเชื้อ และมีการสะสมสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าใบยาสูบปกติทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อด้วย ซึ่งสามารถตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ปริมาณของสารกลุ่มเบนโซควิโนน และฟลาโวนอยด์ (ออโรน ฟลาโวนเฟลวานอน ฟลาโวนอล แอนโทไซยานิน และแทนนิน) ในต้นยาสูบที่มียีน *CHS* เมื่อได้รับการติดเชื้อจะมีการผลิตสารทุกกลุ่มที่ทำการศึกษาเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจากเมื่อไม่ได้รับการติดเชื้อ ในขณะที่ต้นยาสูบที่มียีน *DFR* และต้นยาสูบปกติไม่มีความแตกต่างทางสถิติทั้งที่ได้รับการติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ และลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นยาสูบเมื่อได้รับการติดเชื้อ พบว่าต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และต้นยาสูบที่มียีน *DFR* สามารถทนต่อโรคพืชได้ดีกว่าต้นยาสูบปกติ เช่น มีลักษณะของใบที่เขียวกว่าต้นยาสูบปกติ แต่ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* มีแนวโน้มทนได้ดีกว่าต้นยาสูบที่มียีน *DFR* ในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการสะสมสารในช่วงต้นวิถีชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการต้านทานต่อโรคพืช

Special Project Title	Overexpression of Flavonoid Biosynthetic Genes in Tobacco and Effects on Plant Disease Resistance
Name	Danaiya Ketmahatrakul Sivaporn Wongmunkong
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2006
Special Project Advisor	Asst. Prof. Dr. Kanokporn Sompornpailin

Abstract

Flavonoids are plant secondary metabolites with various biological function, including plant protection against pathogen. In this study, the *Agrobacterium* mediated transformation of tobacco was performed using genes involved in flavonoids biosynthesis. These genes included regulatory genes in bHLH family (*TT8* and *MYC-RP*) and R2R3-MYB family (*MYB-P1*), as well as structural genes encoding chalcone synthase (*CHS*) and dihydroflavonol-4-reductase (*DFR*). The effects of *CHS* and *DFR* overexpression in tobacco were determined as the ability to inhibit the infection of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, the plant pathogen causing bacterial blight of soybean. After infection of the *CHS* and *DFR* transgenic plants, the accumulation of phenolic compounds in tobacco leaves was examined under fluorescence microscope. There was the greater increase in phenolic compounds in treated transgenic leaves than those in untreated transgenic leaves, as well as in treated and untreated leaves of wild type tobacco. The levels of benzoquinones and flavonoids (aurones, flavones, flavanones, flavonols, anthocyanin and tannin) were increased significantly in *CHS* transgenic plants that were treated with pathogen while those in *DFR* transgenic plants and wild type plant didn't change after infection. The treated *CHS* and *DFR* transgenic plants showed the better physiological characteristics, such as more green leaves, than the treated wild type plants. Between these two transgenic lines, *CHS* transgenic plants exhibited the greater ability to tolerate this pathogen than *DFR* transgenic plants. This study indicated that the accumulation of flavonoid compounds in the early biosynthetic pathway might be related with the ability of plant to inhibit the pathogen infection.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการพิเศษตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยโครงการพิเศษนี้ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มการส่งออกของอินจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ในยาสูบและผลในการต้านทานต่อโรคพืช ซึ่งต้องขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพฑิณ ที่สละเวลามาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และให้คำปรึกษาตลอดการดำเนินงานโครงการพิเศษนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.มาลินี ดันติยาภรณ์ และรศ.ดวงใจ โอษฐ์กุล ที่เสียสละเวลามาเป็นประธานกรรมการ และกรรมการในการสอบโครงการพิเศษนี้

ขอขอบคุณพี่ท็อป พี่ที พี่ผึ้ง พี่ไน้ด พี่ถั่วเขียว และเพื่อนๆทุกคน ที่ได้ช่วยเหลือทุกอย่างจนโครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี



คณิชา เกตุมหาตระกูล
ศิวพร วงษ์มันคง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
Abstract.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงการพิเศษ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ.....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....	3
บทที่ 2 หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 สารเฟลโวนอยด์.....	4
2.2 ชีวสังเคราะห์ของเฟลโวนอยด์.....	8
2.3 การควบคุมชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์.....	11
2.4 ยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในอะราบิโดปซิส.....	13
2.5 วิธีวิเคราะห์เฟลโวนอยด์.....	15
2.6 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืช.....	15
2.7 เทคนิคพีซีอาร์ (PCR).....	19
2.8 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	20
2.9 โรคพืช.....	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
3.1 อุปกรณ์.....	24

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2 วิธีการทดลอง.....	25
3.2.1 การโคลนยีน.....	25
3.2.2 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ <i>Agrobacterium</i> expression vector	28
3.2.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียม.....	29
3.2.4 การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม.....	31
3.2.5 การคัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน.....	31
3.2.6 ตรวจสอบการแสดงออกของพืชทดลองที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมาทดสอบการ ต้านทานต่อโรคพืช.....	31
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	33
4.1 การโคลนยีน.....	33
4.1.1 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ.....	33
4.1.2 ผลการเชื่อมต่อและการถ่ายโอนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ <i>E.coli</i>	34
4.1.3 ผลการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pGEM.....	36
4.2 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ <i>Agrobacterium</i> expression vector.....	36
4.2.1 ผลการเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอ.....	36
4.2.2 ผลการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิดที่เป็น <i>Agrobacterium</i> expression vector.....	39
4.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียม.....	41
4.3.1 ผลการตรวจสอบการถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมด้วยเทคนิคฟิชีอาร์.....	41
4.4 การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม.....	42
4.4.1 การถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเข้าสู่ต้นยาสูบ.....	42
4.4.2 ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน	42
4.5 การคัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน.....	43

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6 ตรวจสอบการแสดงออกของพืชทดลองที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมาทดสอบการต้านทานต่อโรคพืช.....	44
4.6.1 ผลการตรวจสอบการผลิตสารประกอบฟีนอลิกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์.....	44
4.6.2 ตรวจสอบการผลิตสารด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์.....	45
4.6.3 ผลการตรวจสอบด้วยการสังเกตลักษณะทางสรีรวิทยาของใบยาสูบ.....	51
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....	53
5.1 การโคลนยีน.....	53
5.2 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ <i>Agrobacterium</i> expression vector.....	53
5.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย.....	53
5.4 การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย.....	53
5.5 การคัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน.....	54
5.6 การแสดงออกของพืชทดลองที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมาทดสอบการต้านทานต่อโรคพืช.....	54
เอกสารอ้างอิง.....	56
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	58
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการทดลอง.....	60

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แอนโทไซยานิน (anthocyanin) ที่พบในธรรมชาติ.....	8
2 ตำแหน่งยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ในเมล็ดอะราบิดอปซิส.....	11
3 แสดงยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชต่างๆ.....	13
4 เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ.....	16
5 ปฏิริยาการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ <i>Agrobacterium</i> expression vector.....	29
6 สายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียที่ใช้ในการถ่ายโอนเวกเตอร์แต่ละชนิด.....	30
7 จำนวนใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนชิ้นส่วนของยีนควบคุมชนิดต่างๆ และสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้.....	42
8 การผลิตสารประกอบฟีนอลิกในต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน <i>DFR</i> และต้นยาสูบที่มียีน <i>CHS</i>	44
9 แสดงการเตรียม stock ของอาหารสูตร MS.....	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 ความเสียหายจากศัตรูพืช และผลที่ได้รับโดยประมาณจากการป้องกันพืชในแต่ละกลุ่มจากพืชปลูกสำคัญของโลก ระหว่างปี พ.ศ. 2531-2533.....	1
2 โครงสร้างหลักของเฟลโวนอยด์.....	4
3 การเปลี่ยนแปลงจากไอโซเฟลโวน (isoflavones) เป็น ไอโซเฟลโวนอยด์(isoflavonoids) ชนิดอื่น ๆ.....	6
4 ส่วนประกอบของเมล็ดอะราบิโดปซิส.....	7
5 โครงสร้างของเฟลโวนอยด์.....	9
6 ชีวสังเคราะห์ของเฟลโวนอยด์.....	10
7 การทำงานร่วมกันของ โปรตีน bHLH MYB และ WDR.....	14
8 แสดงจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์บนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ <i>TT8</i>	27
9 แสดงผลการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์สำหรับชิ้น <i>TT8</i> จากเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์.....	33
10 โคลนีนของ <i>E. coli</i> ที่ได้รับเวกเตอร์ pGEM บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ แอมพิซิลิน IPTG และ X-gal.....	34
11 แสดงผลการสกัดพลาสมิดจากโคลนีนีสีขาวจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอ.....	35
12 ผลการตัดพลาสมิด pGEM ด้วย <i>Bam</i> HI เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่คาดว่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1556 คู่เบสแทรกอยู่.....	35
13 ผลการตัดพลาสมิด pGEM ที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Bgl</i> II เพื่อตรวจสอบชนิดของชิ้นดีเอ็นเอ.....	36
14 การแยกชิ้นดีเอ็นเอของ <i>TT8</i> ออกจากพลาสมิด pGEM โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และตรวจสอบผลโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส.....	37
15 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ <i>TT8</i> บริสุทธิ์.....	37
16 การแยกชิ้นดีเอ็นเอของ <i>MYB-P1</i> และ <i>MYC-RP</i> ออกจากพลาสมิด pHTT202 โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และตรวจสอบผลโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส.....	38
17 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ <i>MYC-RP</i> และ <i>MYB-P1</i>	39
18 ผลการตัดพลาสมิด pBI121 ด้วย <i>Bam</i> HI เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่คาดว่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอ <i>TT8</i> <i>MYC-RP</i> และ <i>MYB-P1</i> แทรกอยู่.....	40

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
19 ผลการตรวจสอบการถ่ายโอนอินเข้าสู่อะ โกรแบคทีเรียบัด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	41
20 ชิ้นส่วนไบยาซูบที่รับการถ่ายโอนอินโดยอะ โกรแบคทีเรียบั.....	42
21 การพัฒนาไปเป็นแคลัสของไบยาซูบ.....	43
22 แสดงภาพยอดที่สามารถเจริญจากแคลัสได้.....	43
23 ระดับคะแนนของการผลิตสารประกอบฟีนอลิก.....	44
24 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเบนโซควิโนน.....	45
25 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มออโรน.....	46
26 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลวโนน.....	46
27 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลวาโนน.....	47
28 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลวโนล.....	49
29 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแอนโทไซยานิน.....	50
30 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแทนนิน.....	51
31 ผลการตรวจสอบการสังเกตทางสรีระวิทยาของต้นยาซูบ.....	52

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญที่มาของโครงการพิเศษ

ศัตรูพืชได้สร้างความเสียหายต่อผลผลิตการเกษตรเป็นอย่างมาก จากการประมาณความเสียหายในพืชปลูกสำคัญของโลก (รูปที่ 1) สูงถึงประมาณร้อยละ 42.1 ถึงแม้ว่าจะมีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชแล้ว ในจำนวนนี้มีสาเหตุจากวัชพืชร้อยละ 13.2 แมลงและสัตว์ศัตรูพืชรวมกันร้อยละ 15.6 โรคพืชร้อยละ 13.3 (Oerke และ คณะ, 1994) แต่ถ้าพืชขาดการป้องกันแล้วความเสียหายจะสูงขึ้นไปถึงร้อยละ 69.8 แยกเป็นจากวัชพืชสูงสุดถึงร้อยละ 29.6 จากแมลงและสัตว์ศัตรูพืชร้อยละ 22.7 และจากโรคพืชร้อยละ 17.5



รูปที่ 1 ความเสียหายจากศัตรูพืช และผลที่ได้รับโดยประมาณจากการป้องกันพืชในแต่ละกลุ่ม จากพืชปลูกสำคัญของโลก ระหว่างปี พ.ศ. 2531-2533
ที่มา : Oerke และคณะ (1994)

การซื้อขายแลกเปลี่ยนสินค้าอาหารและเกษตรในระบบการค้าโลก ในปัจจุบันนั้นพบว่าศัตรูพืชและสารฆ่าศัตรูพืชและสัตว์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ได้กลายเป็นประเด็นสำคัญยิ่งในข้อเจรจาต่อรอง ส่วนหนึ่งเกิดจากกระแสความต้องการของผู้บริโภคส่วนใหญ่ในปัจจุบัน ที่ต้องการสินค้าอาหารและเกษตรที่มีคุณภาพ ปลอดภัย และถูกสุขอนามัย ขณะที่บางประเทศได้ถือโอกาสใช้เป็นเครื่องมือกีดกันทางการค้ารูปแบบใหม่ ด้วยการกำหนดมาตรฐานคุณภาพ มาตรฐาน

สุขอนามัยและสุขอนามัยพืช รวมทั้งเรื่องของสิ่งแวดล้อม เพื่อปกป้องผู้บริโภค เกษตรกร และระบบความมั่นคงทางอาหารในประเทศของตน ดังนั้นแนวทางการแก้ปัญหาศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพสูง และลดการใช้สารเคมีอันตราย เพื่อให้ผลผลิตเป็นที่ยอมรับทั้งตลาดภายในและต่างประเทศ จึงเป็นเรื่องที่จำเป็นอย่างยิ่งสำหรับเกษตรกรในสภาวะปัจจุบัน (ธวัชชัย, 2540)

ในสภาวะปกติพืชสามารถป้องกันตัวเองจากศัตรูพืชได้ เนื่องจากมีกลไกการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) จากกระบวนการชีวสังเคราะห์ ซึ่งสารนี้ไม่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตตามปกติของพืช แต่สร้างขึ้นเมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียดที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิตทำให้พืชสามารถทนต่อสภาวะต่างๆเหล่านั้นได้ ดังนั้นเมื่อมีศัตรูพืชหรือโรคพืชเข้าทำลายพืช ก็จะสามารถผลิตสารทุติยภูมิขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวเอง

สารฟีนอลอยด์จัดเป็นสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compounds) ที่พืชสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อโรคพืช สารกลุ่มนี้มีโครงสร้างหลากหลายแบบ จัดเป็นสารทุติยภูมิที่พืชผลิตขึ้นเพื่อทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเองของพืชจากการเบียดเบียนจากสัตว์ การติดเชื้อ เป็นเกราะป้องกันรังสียูวีบีเป็นสัญญาณในการอยู่ร่วมกันแบบซิมไบโอซิส ระหว่างพืชกับจุลินทรีย์และ คิงดอมแมลงมาช่วยในการผสมพันธุ์ (Dong และคณะ, 2001) นอกจากนี้ยังมีบทบาทในแง่ต่างๆอีกเช่น นำมาใช้เป็นสีผสมอาหาร เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในมนุษย์ (Lu and Yang, 2006)

ในการทดลองนี้เน้นการศึกษาการเพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์ฟีนอลอยด์ในยาสูบ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านทานต่อโรคพืช โดยใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมร่วมกับการถ่ายโอนยีนจากชีวสังเคราะห์ดังกล่าวเข้าสู่พืช รวมไปถึงการศึกษาผลการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์ฟีนอลอยด์ต่อประสิทธิภาพในการต้านทานต่อโรคพืช

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

- 1.2.1 เพิ่มจำนวนยีนจากชีวสังเคราะห์ฟีนอลอยด์เพื่อใช้ในการแสดงออกในยาสูบ
- 1.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนจากชีวสังเคราะห์ฟีนอลอยด์เข้าสู่ยาสูบ
- 1.2.3 ศึกษาผลการแสดงออกของยีนในต้นยาสูบต่อประสิทธิภาพการต้านทานต่อโรคพืช

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

เพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนยีนจากชีวสังเคราะห์ฟีนอลอยด์ และประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนโดยใช้เอกราบแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) เข้าสู่ยาสูบ และตรวจสอบการต้านทานต่อโรคพืชของพืชหลังจากการถ่ายโอนยีนจากชีวสังเคราะห์ฟีนอลอยด์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 สามารถเพิ่มจำนวนยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ด้วยเทคนิค PCR
- 1.4.2 เวกเตอร์ที่มียีนที่สนใจอยู่ภายในอะโกรแบคทีเรียมที่ใช้สำหรับการถ่ายโอนยีน
- 1.4.3 ทราบผลในการต่อต้านโรคพืชของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

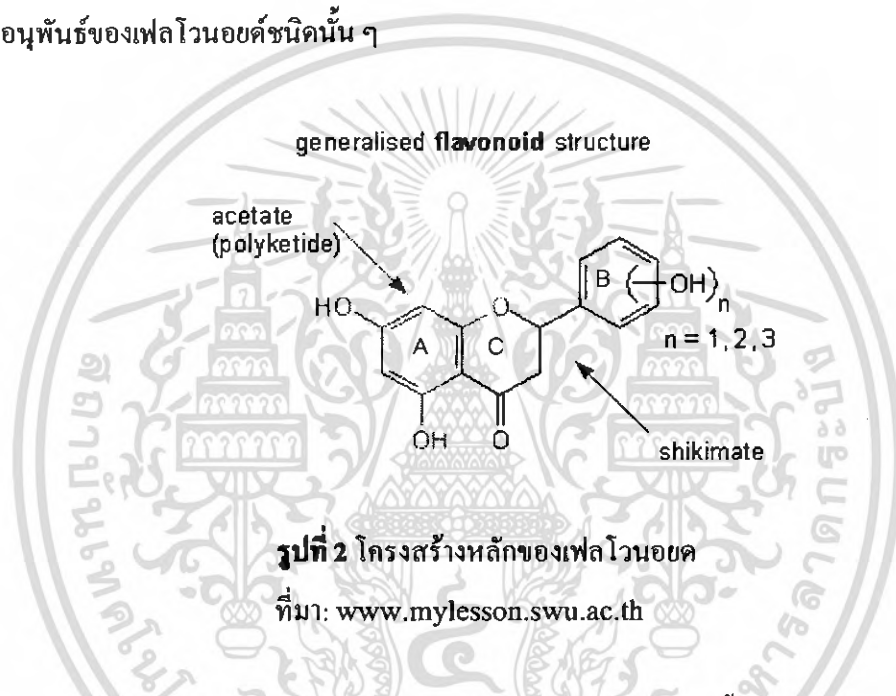
- 1.5.1 เพิ่มจำนวนยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ด้วยเทคนิค PCR
- 1.5.2 เชื่อมต่อยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์เข้ากับพลาสมิด
- 1.5.3 การเพิ่มปริมาณพลาสมิดที่มียีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์เชื่อมต่ออยู่
 - 1.5.3.1 ทำการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ในอาหารเหลว
 - 1.5.3.2 ทำการถ่ายโอนพลาสมิดที่มียีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์เชื่อมต่ออยู่เข้าสู่ *E. coli* เพื่อคัดลอกและเพิ่มปริมาณพลาสมิดดังกล่าว
 - 1.5.3.3 คัดเลือกพลาสมิดที่มียีนที่แทรกอยู่อย่างถูกต้อง
- 1.5.4 ขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียม
 - 1.5.4.1 ทำการเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียมในอาหารเหลว
 - 1.5.4.2 ทำการถ่ายโอนยีนที่ต้องการเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมโดยวิธี Freeze thaw
- 1.5.5 การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม
 - 1.5.5.1 ทำการเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่ต้องการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบในอาหารเหลว
 - 1.5.5.2 นำต้นยาสูบมาทำการถ่ายโอนยีน โดยการใช้อะโกรแบคทีเรียม
 - 1.5.5.3 ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน
- 1.5.6 การคัดเลือกต้นยาสูบที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน
 - 1.5.6.1 คัดเลือกต้นยาสูบที่มีลักษณะสมบูรณ์
 - 1.5.6.2 ทำการย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่มียาปฏิชีวนะเพื่อทำการคัดเลือกต้นยาสูบที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน
- 1.5.7 ขั้นตอนการทดสอบความต้านทานต่อโรคพืช
 - 1.5.7.1 นำต้นยาสูบที่คัดเลือกแล้วคาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีนมาทดสอบความต้านทานต่อโรคพืชโดยนำมาทดสอบกับจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในพืช
 - 1.5.7.2 ตรวจสอบการทำลายเซลล์ของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ต้นยาสูบปกติ)

บทที่ 2

หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารฟลาโวนอยด์ (flavonoid)

สารกลุ่มฟลาโวนอยด์มีโครงสร้างหลักที่ประกอบด้วยคาร์บอน 15 ตัว จัดเรียงตัวเป็นวง 3 วง คือ วง เอ (A) วง บี (B) และวง ซี (C) โดยวงเอ และบีเป็นวงฟีนิล (phenyl ring) ส่วนวงซีเป็นวงแลคโตน (lactone ring) ดังรูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่วงซีทำให้มีการแยกฟลาโวนอยด์ออกเป็นกลุ่มย่อยได้ต่าง ๆ กัน และการเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) ที่วงเอ และบี ทำให้เกิดอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ชนิดนั้น ๆ



สารประกอบฟลาโวนอยด์มีอยู่มากมายในธรรมชาติ จากการศึกษาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1962 ทำให้ทราบถึงบทบาทของฟลาโวนอยด์ในแง่ต่างๆ ของพืชและ สิ่งแวดล้อมอันรวมถึงมนุษย์และสัตว์ เช่น การล่อแมลงและนกให้มาช่วยแพร่พันธุ์พืชด้วยการผสมเกสร ฟลาโวนอยด์ยังช่วยป้องกันพืชจากการรุกรานของราและแบคทีเรียอีกด้วย และยังเป็นสารที่มีคุณค่าทางอาหาร ในที่นี้จะกล่าวถึงฟลาโวนอยด์บางกลุ่ม พร้อมทั้งตัวอย่างอนุพันธ์ที่สำคัญ (รูปที่ 5)

2.1.1 แคนโธน (chalcone) และออโรน (aurone)

สารนี้มีโครงสร้างที่วงซีผิดจากกลุ่มอื่นๆ เมื่อถูกไอของแอมโมเนียจะเปลี่ยนจากเหลืองเป็นแดงจึงเรียกละสารกลุ่มนี้ว่า แอนโทคลอร์ (antochlor) สารแคลโคโนนี้จะให้สีเหลืองเข้ม ได้แก่ สีของดอกไม้ในวงศ์ Compositae Oxalidaceae Scrophulariaceae Liliaceae และ Acanthaceae เป็นต้น ส่วนสารออโรนพบในดอก ใบ เปลือก และเนื้อไม้ให้สีเหลืองทอง เช่น ซัลฟูเรทิน (sulfuretin)

ในดอกกรักร์ (*Dahlia spp.*) และฮิสพิดอลกลูโคไซด์ (hispidol glucoside) ในถั่วเหลือง (*Glycine spp.*)

2.1.2 เฟลโวน (flavones)

มักพบเฟลโวนในส่วนของเปลือกต้น แก่น ผล และ ราก เฟลโวนที่พบในเปลือกต้นของพืชพวกขนุน (*Artocarpus*) และหม่อน (*Morus*) วงศ์ Moraceae มีลักษณะเฉพาะคือ มีหน่วยของไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid) ในโมเลกุลกาเลนจิน (galangin)

2.1.3 ไอโซเฟลโวนอยด์ (Isoflavonoids)

เป็นกลุ่มสารที่พืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมเช่นเดียวกับสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์ กระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มนี้แยกจากกลุ่มเฟลโวนอยด์ที่สารตั้งต้นของแคลโคน เมื่อแคลโคน เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเฟลโวนแล้วจะเกิดการย้ายตำแหน่งของวง (ring migration) มีผลให้วงบีเปลี่ยนตำแหน่งและได้สารตัวแรกในกลุ่มที่เรียกว่า ไอโซเฟลโวน (isoflavone) สาร ไอโซเฟลโวนเป็นสารตั้งต้นของไอโซเฟลโวนอยด์อีกหลายชนิด ดังรูปที่ 3 ไอโซเฟลโวนอยด์พบมากในพืชตระกูลถั่ว สารที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ ไอโซเฟลโวน (isoflavone) และคูเมสแตน (coumestran)

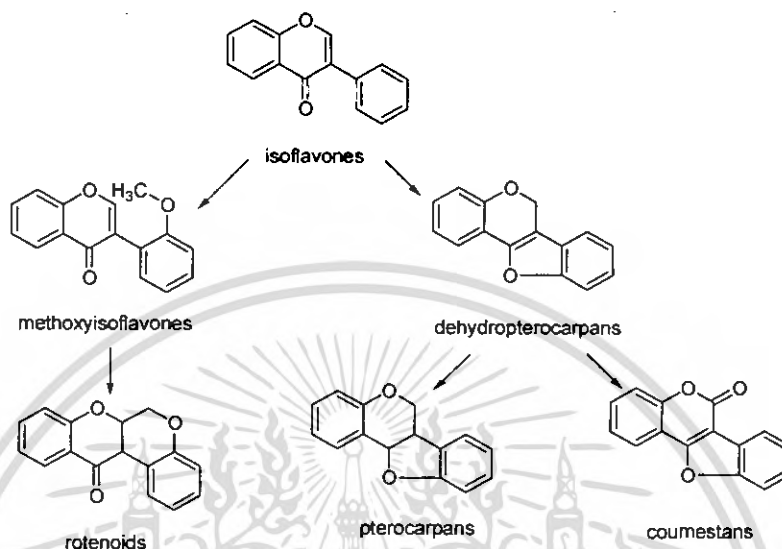
2.1.3.1 ไอโซเฟลโวน (isoflavones)

ตัวต่างๆ โดยเฉพาะถั่วเหลืองเป็นแหล่งสะสมไอโซเฟลโวน เช่น เดียดซิน (daidzein) และเจนนิสทิน (genistein) ซึ่งไอโซเฟลโวนเป็นที่รู้จักกันดีในนามของไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogens) หมายถึงกลุ่มสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายเอสโตรเจน (estrogen) และสามารถจับกับตัวรับเอสโตรเจน (estrogenic receptor) ได้ ประโยชน์ของไฟโตเอสโตรเจน คือสามารถป้องกันสภาวะเสื่อมต่างๆ ของร่างกายได้ เช่นป้องกันการเกิดมะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก ป้องกันการเกิดโรคเกี่ยวกับระบบหัวใจและหลอดเลือด ป้องกันการเกิดภาวะกระดูกพรุนและปัญหาวัยทอง

ความสามารถในการจับกับตัวรับเอสโตรเจนของไอโซเฟลโวนอ่อนกว่าความสามารถของเอสโตรเจนเอสตราไดออล (estrogen estradiol) ถึง 1000 เท่า แต่ที่น่าสนใจคือไอโซเฟลโวนมีทั้งคุณสมบัติการเป็นเอสโตรเจน และด้านการทำหน้าที่ของเอสโตรเจน (anti-estrogenic) กล่าวคือ ในกรณีที่ร่างกายขาดเอสโตรเจนสารกลุ่มไอโซเฟลโวนที่มีอยู่ในร่างกายจะทำหน้าที่ทดแทนเอสโตรเจนได้ ในกรณีที่ร่างกายมีเอสโตรเจนมากเกินไปไอโซเฟลโวนสามารถเข้าไปแย่งจับที่ตัวรับเอสโตรเจน เป็นการป้องกันไม่ให้ตัวรับเอสโตรเจนถูกกระตุ้นมากเกินไป ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับมะเร็งได้

2.1.3.2 กูเมสแทน (coumestans)

สารในกลุ่มกูเมสแทน (รูปที่ 3) เช่น กูเมสทรอล (coumestrol) พบได้มากในพืชจำพวกถั่ว โดยเฉพาะถั่วเหลืองเป็นสารที่มีฤทธิ์เป็นไฟโตรเอสโตรเจน และมีฤทธิ์แรงกว่าไอโซเฟลโวนถึง 6 เท่า



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงจากไอโซเฟลโวน (isoflavones) เป็นไอโซเฟลโวนอยด์ (isoflavonoids) ชนิดอื่น ๆ

ที่มา : <http://coursewares.mju.ac.th/section2/pt331/06.htm>

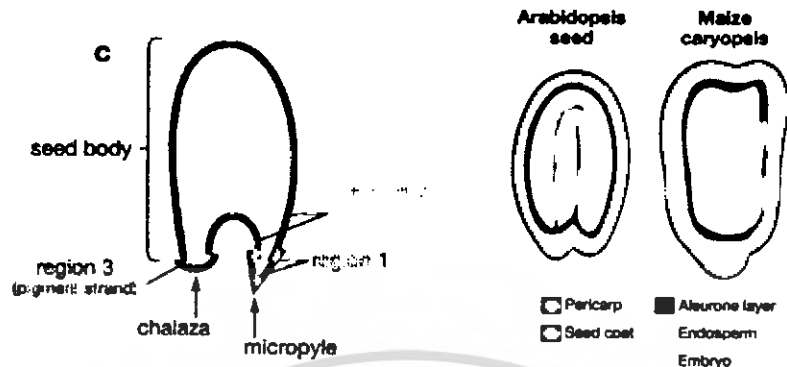
2.1.4 เฟลโวนอล (flavonols)

เป็นสารที่ไม่มีสีแต่สามารถดูดกลืนรังสีในช่วงใกล้แสงยูวี ซึ่งเป็นช่วงคลื่นที่แมลงสามารถมองเห็นได้ ดังนั้น เฟลโวนอลจึงมีบทบาทสำคัญในการล่อแมลงเพื่อการผสมเกสร เฟลโวนอลที่พบมากในพืชชั้นสูงได้แก่ เคเอ็มพีรอล (kaempferol) และ เควอร์เซติน (quercetin) และที่พบได้บ้างได้แก่ ไมริเซติน (myricetin) และ กาเลนจิน

2.1.5 โปรแอนโทไซยานิน

ส่วนมากโปรแอนโทไซยานิน (หรือแทนนิน) จะพบในเมล็ดและเป็นพอลิเมอร์ที่มาจาก 2 สเตอริโอไอโซเมอร์ (stereoisomers) คือ เอพิแคเทชิน (epicatechin) และคาเทชิน (catechin) การสะสมในเปลือกหุ้มเมล็ดทำหน้าที่ป้องกันเอ็มบริโอและเอนโดสเปิร์ม การเกิดออกซิเดชันของสารกลุ่มนี้มีผลให้เมล็ดแห้งและเกิดเป็นสีน้ำตาลเมื่อเมล็ดโตเต็มที่ เปลือกหุ้มเมล็ดเกิดจากการเปลี่ยนรูปของเนื้อเยื่อปกคลุมและเนื้อเยื่อคานลา (chalaza) ของไขหลังจากการผสมพันธุ์การสร้างโปร

แอนโทไซยานินพบที่เอนโดเทเลียม และเนื้อเยื่อชั้นในสุด แต่แสดงออกที่บริเวณคาเลซา และมีการสะสมที่เปลือกหุ้มเมล็ด (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ส่วนประกอบของเมล็ดอะราบิโดปซิส

ที่มา : Lepiniec และคณะ (2006)

2.1.6 แอนโทไซยานิน (anthocyanin)

แอนโทไซยานิน เป็นสารกลุ่มเม็ดสีที่สะสมอยู่ในเวทิลไฮลของเนื้อเยื่อดอกและใบของพืช ซึ่งพบในพืชบนดินทั่วไป ยกเว้นพืชกลุ่มกระบองเพชรและพืชกลุ่มที่เป็นพืชหัว สารกลุ่มนี้มีหลายชนิด (ตารางที่ 1) ให้สีตั้งแต่สีแดง สีแดงเข้ม และสีฟ้าไปจนถึงสีม่วง (Sullivan, 1998) แอนโทไซยานินมีบทบาทที่สำคัญในพืชหลายอย่าง เช่น การล่อแมลงเพื่อให้แมลงมาผสมเกสร และให้แมลงติดกับดักพืชที่กินแมลงเป็นอาหาร ตัวอย่างเช่น ต้น *Certain bromeliads* จะเปลี่ยนเป็นสีแดงสดขณะก่อนและระหว่างที่มีการผสมเกสร แต่เมื่อผสมเกสรเสร็จแล้วก็จะรีบเปลี่ยนสีกลับมาเป็นสีเขียวที่ได้จากคลอโรฟิลล์เพื่อช่วยในการสังเคราะห์แสง และเป็นสารส่งสัญญาณของวิถีการถ่ายทอดสัญญาณในหลายวิถี การจับกันระหว่างพืชและเชื้อโรค การป้องกันตัวเองของพืช การตอบสนองต่อแสงยูวีบี การตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ มีรายงานถึงการชักนำให้สะสมสารกลุ่มแอนโทไซยานินในข้าวฟ่าง เมื่อพืชถูกเชื้อโรครบกวนเช่นเดียวกับในข้าวโพด และยังมีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนโทไซยานินกับการเพิ่มความต้านทานหนอนรบกวนในพืชอีกด้วย

นิยมใช้ชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มนี้เป็นต้นแบบสำหรับศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของยีน และหน้าที่ของยีน โดยมีการศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตบนพื้นฐานทางชีวเคมีจากการสนับสนุนของทฤษฎี หนึ่งยีนหนึ่งเอนไซม์ (one gene-one enzyme) ซึ่งเป็นทฤษฎีที่สำคัญของชีววิทยาโมเลกุล ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาโดยการแยกยีนเพื่อศึกษาหน้าที่ และรูปแบบการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์ฟลาวอยด์ในพืชหลายชนิด เช่น อะราบิโดปซิส (*Arabidopsis*) และพิทูเนีย (*Petunia*)

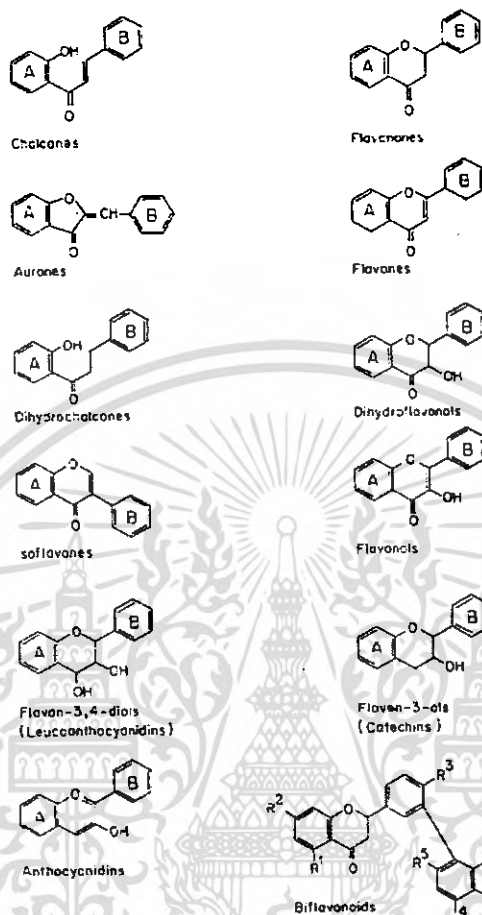
ตารางที่ 1 แอนโทไซยานิน (anthocyanin) ที่พบในธรรมชาติ (Mazza และ Miniati, 1993)

NAME	Substitution Pattern							Color
	3	5	6	7	3'	4'	5'	
Apigeninidin	H	OH	H	OH	H	OH	H	Orange
Aurantidin	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Orange
Capensinidin	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	Bluish-red
Cyanidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Orange-red
Delphinidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Bluish-red
Europinidin	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Bluish-red
Hirsutidin	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Bluish-red
6-Hydroxycyanidin (6 OHCy)	OH	OH	H	OH	OH	H		Red
Luteolinidin (Lt)	H	OH	OH	OH	OH	OH	H	Orange
Malvidin (Mv)	OH	OH	H	OH	OMe	OMe	OMe	Bluish-red
5-Methylcyanidin (5-Mcy)	OH	OMe	H	OH	OH	H		Orange-red
Pelargonidin (Pg)	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Orange
Peonidin (Pn)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Orange-red
Petunidin (Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Bluish-red
Pulchellidin (Pl)	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Bluish-red
Rosinidin (Rs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Red
Tricetinidin (Ti)	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Red

2.2 ชีวิตสังเคราะห์ของเฟลโวนอยด์ (กนกพร, 2545)

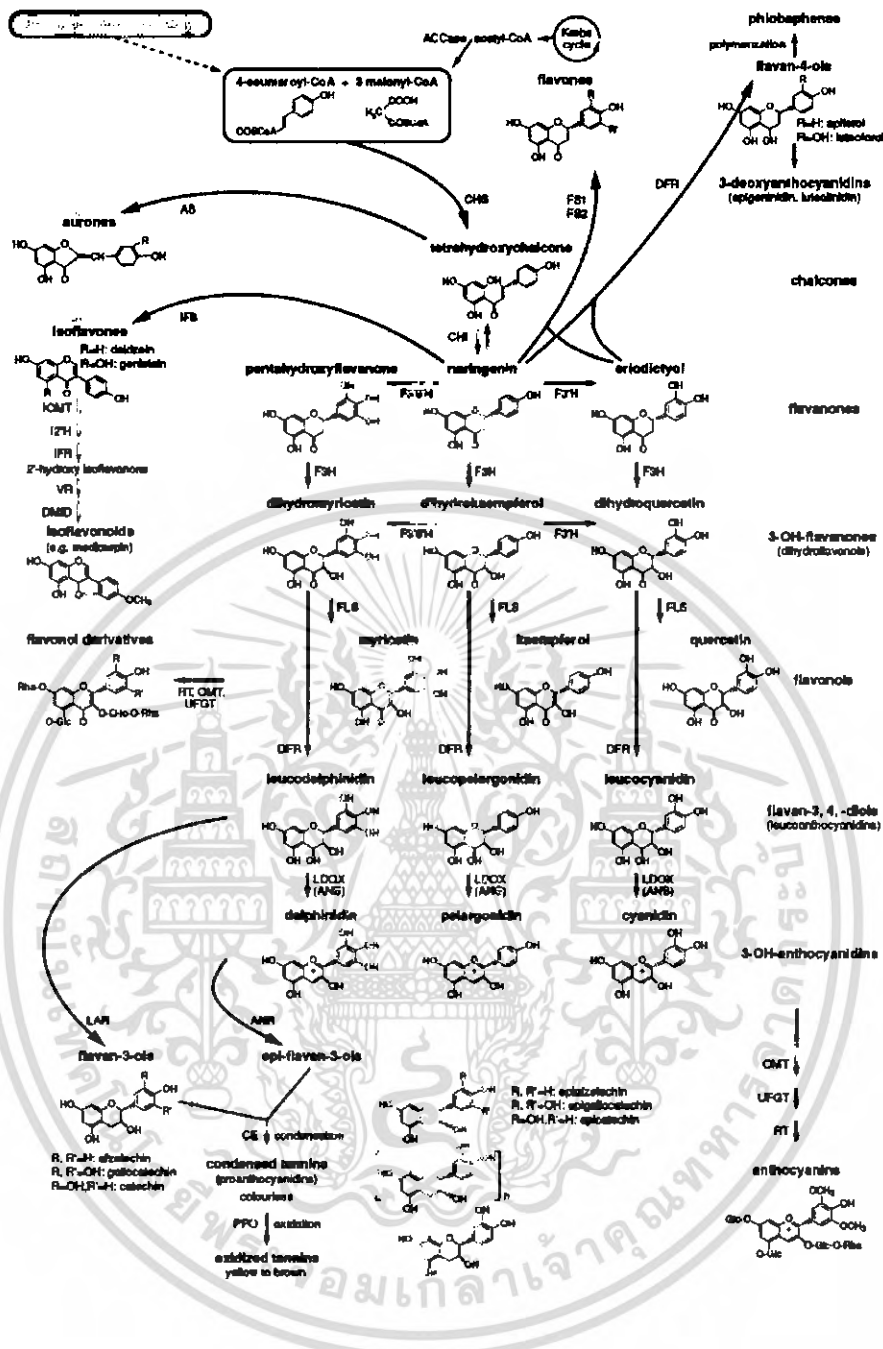
ชีวิตสังเคราะห์ของเฟลโวนอยด์เริ่มจากการกระตุ้นให้รวมตัวกันของมาโลนิล โคเอ (malonyl CoA) ซึ่งได้รับจากวิถีอะซิเตท-มาโลเนต (acetate-malonate pathway) กับคูมาโรลิล โคเอ (4-coumaroyl-CoA) ซึ่งได้จากวิถีชีวิตสังเคราะห์ชิคิเมท (shikimate pathway) ด้วยเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) ได้เป็นแซลโคน (chalcone) มีสี่เหลี่ยม ขั้นตอนที่สองเป็นการเกิดไอโซเมอร์ (isomerization) ของสารแซลโคน โดยเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) ให้สารแนรินเจนิน (naringenin flavonone) ไม่มีสี หลังจากนั้นจะมีการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 โดยเอนไซม์ flavanone-3-hydroxylase (F3H) ให้สารกลุ่มไดไฮโดรเคอเฟลโวนอล คือ สารไดไฮโดรเคอเอ็มพีรอล (dihydrokaempferol) สารนี้อาจจะได้รับการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่

ตำแหน่งต่างๆ โดยเอนไซม์ flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) และ flavonoid 3', 5'-hydroxylase (F3'5'H) และให้สาร กลุ่มไอโซโครเฟลวอนอลชนิดอื่นเพิ่มเติม ได้แก่



รูปที่ 5 โครงสร้างของเฟลวอนอยด์

ไดไฮโดรควเอร์ซีทิน (dihydroquercetin) และไดไฮโดรเมอริซีทิน (dihydromyricetin) ในการเปลี่ยนสารกลุ่มไอโซโครเฟลวอนอลเป็นสารที่มีกลุ่มแอนโทไซยานินนั้นต้องการเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด เริ่มจากกระตุ้นการรีดิวซ์สารกลุ่มนี้ด้วยเอนไซม์ dihydroflavonol reductase (DFR) และสารกลุ่มลิวโคแอนโทไซยานิดิน (leucoanthocyanidin) ได้แก่ ลิวโคไซยานิดิน (leucocyanidin) ลิวโคเพลาโกนินิดิน (leucopelargonidin) และ ลิวโคเดลฟินินิดิน (leucodelphinidin) ถูกออกซิเดชัน (oxidation) ดีไฮเดรชัน (dehydration) และไกลโคซิลเลชัน (glycosylation) ให้สารกลุ่มแอนโทไซยานิน ซึ่งให้เม็ดสีแตกต่างกัน ได้แก่ ไซยานิดิน เฟลาโกนินิดิน และ เดลฟินินิดิน ซึ่งให้สีแดง ส้ม และม่วงตามลำดับ (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 ชีวสังเคราะห์ของฟลาโวนอยด์

ACCase (acetyl CoA carboxylase), ANS (anthocyanidin synthase), AS (aureusidin synthase), DFR (Dihydroflavonol 4-reductase), DMID (7,2'-dihydroxy, 4'-Methoxyisoflavanol dehydratase), F3H (flavanone 3-hydroxylase), F3'H (flavonoid 3'-hydroxylase), F3'5'H (flavonoid 3'5' hydroxylase), FLS (flavonol synthase), FSI/FS2 (flavone synthase), I2'H (isoflavone 2'-hydroxylase), IFR (isoflavone reductase), IFS (isoflavone synthase), IOMT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(isoflavone *O*-methyltransferase), LAR (leucoanthocyanidin reductase), LDOX (leucoanthocyanidin dioxygenase), OMT (*O*-methyltransferase), RT (rhamnosyl transferase), UFGT (UDP flavonoid glucosyl transferase), VR (vestitone reductase)

ที่มา : Lepiniec และคณะ (2006)

2.3 การควบคุมชีวสังเคราะห์ฟเลโวนอยด์

ยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ฟเลโวนอยด์มี 2 กลุ่มคือ ยีนโครงสร้าง (structural genes) และ ยีนควบคุม (regulatory genes)

ตารางที่ 2 ตำแหน่งยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ฟเลโวนอยด์ในเมล็ดอะราบิโดปซิส

Locus	Seed coat color ^a	Gene product
Structural genes		
<i>tt3</i>	Yellow	Dihydroflavonol reductase (DFR)
<i>tt4</i>	Yellow	Chalcone synthase (CHS)
<i>tt5</i>	Yellow	Chalcone isomerase (CHI)
<i>tt6</i>	Pale brown spotted	Flavanone-3-hydroxylase (F3H)
<i>tt7</i>	Pale brown spotted	Flavanone-3'-hydroxylase (F3'H)
<i>tt10</i>	Dark yellow/brown C ^c	Polyphenol oxydase (PPO)
<i>tt12</i>	Pale brown	MATE secondary transporter
<i>tt15</i>	Pale brown/brown CM	Glycosyltransferase (GT)
<i>tt18/ rds4/ tt11</i>	Yellow	Leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) ^d
<i>tt19/tt14</i>	Dark yellow ^s	Glutathione S-transferase (GST)
<i>bun</i>	Pale gray/gray CM	Anthocyanidin reductase (ANR)
<i>abu10</i>	Pale brown	Autoinhibited H ⁺ -ATPase isoform 10
Regulatory genes		
<i>tt1</i>	Yellow/brown CM	Transcription factor WIP-type Zn-Finger
<i>tt2</i>	Yellow	Transcription factor AtLYB123
<i>tt8</i>	Yellow	Transcription factor AtbHLH042
<i>tt16/nls</i>	Yellow/brown CM	Transcription factor MADS AtAGL32
<i>ttg1</i>	Yellow	Regulatory protein ("WD40" or "WDR")
<i>ttg2</i>	Yellow	Transcription factor AtWRKY44
Other loci		
<i>tt9</i>	Pale gray/dark CM	Unknown
<i>tt13</i>	Pale brown	Unknown
<i>tt17</i>	Pale brown	Unknown
<i>rds1, 3, 5, 6</i>	Pale brown	Unknown
<i>ttk2</i>	Pale brown	Unknown

ที่มา : Lepiniec และคณะ (2006)

2.3.1 ยีนโครงสร้าง (structural genes)

ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในชีวสังเคราะห์ฟเลโวนอยด์ กลุ่มที่เป็นยีนโครงสร้างมีหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2 ตัวอย่างของยีนโครงสร้างที่ทำการศึกษได้แก่

2.3.1.1 Chalcone syntase (CHS)

เป็นเอนไซม์ขั้นตอนแรกของชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชหลายชนิด เช่น พืชตระกูลถั่ว ข้าวโพด พืชเนื้ สแนปครากอน และอะราบิดอปซิส ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาที่เกิดจากการรวมกันของมาโลนิล โคเอ และคูมาโลลิต โคเอ ให้เปลี่ยนเป็นแอนรินเจนนิน แชลโคน ซึ่งแอนรินเจนนิน แชลโคนนี้เป็นสารตั้งต้น (precursor) ที่สำคัญในการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ในชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ตัวอื่น ๆ ต่อไป

2.3.1.2 Dihydroflavonol – 4 – reductase (DFR) (Brenda, 2001)

เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชหลายชนิด ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาเพื่อช่วยในการเปลี่ยนสารตัวกลางที่เป็นไดไฮโดรฟลาโวนอลให้เป็นแอนโทไซยานินต่อไป การแสดงออกของยีน *DFR* นี้เกี่ยวข้องกับยีนควบคุมหลายชนิด เช่น ยีน *TT8* ที่พบในอะราบิดอปซิส

2.3.2 ยีนควบคุม (regulatory genes) (Lepiniec และคณะ, 2006)

ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีนควบคุม ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนในชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน พบในพืชหลายชนิด เช่น ข้าวโพด พืชเนื้ และอะราบิดอปซิส โดยโปรตีนควบคุมในพืชกลุ่มที่นิยมศึกษาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ MYB และ bHLH ส่วนอีกกลุ่มคือ WD40 repeats (WDR) โปรตีนทั้ง 3 กลุ่มนี้เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (transcription factor) ที่มีหน้าที่สำคัญคือ เป็นโปรตีนที่มีบริเวณจับกับดีเอ็นเอหรือโปรตีน (DNA or protein binding domain) เพื่อกระตุ้นให้เกิดการลอกรหัส (DNA activation domain)

โปรตีนควบคุมที่พบในข้าวโพดคือ โปรตีน C1/P11 และ โปรตีน R/B/Lc/Sn-family ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม MYB และ bHLH ตามลำดับ ในพืชชนิดเดียวกันมีโปรตีนควบคุมกลุ่มเดียวกันมากกว่าหนึ่งแบบ แต่พบว่าแต่ละแบบมีการแสดงออกที่บริเวณที่แตกต่างกัน เช่น บริเวณออลิวโรน (aleurone) สกูเทลลัม (scutellum) และเอ็มบริโอ ยังพบยีนที่ให้โปรตีนควบคุมกลุ่ม bHLH ในพืชต่างชนิด เช่น ยีน *DELILA* ยีน *ANI* และ *JAF13* ซึ่งพบใน *Antirrhinum* และต้น *Petunia* ส่วนโปรตีนบางตัวในกลุ่ม WD40 repeats (WDR) ที่เกี่ยวข้องในชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เช่น โปรตีน AN11 ใน *Petunia* โปรตีน PFWD ใน *Perilla* และ โปรตีน PAC1 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดสีในบริเวณออลิวโรน และสกูเทลลัมในเมล็ดข้าวโพด ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชต่างๆ

โดเมน	ข้าวโพด	พืชมะเขือ	สแนปครากอน	เพอริลา	อะราบิดอปซิส
bHLH	<i>r, b, sn, lc</i>	<i>jaf13, an1</i>	<i>delila</i>	<i>Myc-rp,</i> <i>Myc-F3G1</i>	<i>tt8</i>
MYB	<i>c1, pl</i>	<i>an2, mybPh3</i>	<i>rosea</i>	<i>Myb-p1,</i> <i>Myb-C05</i>	<i>tt2, pap1,</i> <i>pap2</i>
WD40	<i>pac1</i>	<i>an11</i>	-	<i>PFWD</i>	<i>ttg1</i>

ที่มา : Yamazaki และคณะ (2002)

2.4 ยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในอะราบิดอปซิส

ยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในอะราบิดอปซิสมี 6 ตำแหน่ง คือ *TT1 TT2 TT8 TT16 TTG1* และ *TTG2* แสดงในตารางที่ 3 ซึ่งตัวอย่างของยีนควบคุมที่ได้มีการศึกษาแล้ว มีดังนี้

2.4.1 *TT1*

เป็นรหัสโปรตีน zinc-finger มีการแสดงออกที่ชั้นเซลล์ของแอนโดเทเลียมในเมล็ดที่กำลังพัฒนา และมีความจำเป็นต่อการสะสมของโปรแอนโทไซยานินในแอนโดเทเลียม

2.4.2 *TT2*

เป็นยีนควบคุมรหัสของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ในกลุ่มโดเมน myb (โปรตีนR2R3-MYB) และเป็นปัจจัยหลักในการควบคุมให้มีกระบวนการสร้างโปรแอนโทไซยานิน และมีการแสดงออกในแอนโดเทเลียม สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของยีน *BAN (BANYULS)* ซึ่งกำหนดรหัสเอนไซม์ที่นำสารตัวกลางเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์คาเทชิน และโปรแอนโทไซยานินในเมล็ดอ่อน และรากได้

2.4.3 *TT8*

เป็นยีนที่ควบคุมรหัสของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ในกลุ่มของ bHLH จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนภายในโดเมนนี้ และจากการศึกษาการแสดงออกของยีนโครงสร้างต่างๆ ของชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ ในอะราบิดอปซิสที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *TT8* พบว่า ยีน *TT8* จำเป็นสำหรับการแสดงออกของยีน *DFR* ซึ่งควบคุมขั้นตอนแรกในการเปลี่ยนสารตัวกลาง (intermediate) ในวิถีให้เข้าสู่การสร้างแอนโทไซยานิน และโปรแอนโทไซยานิน นอกจากนี้ *TT8* จำเป็นสำหรับการแสดงออกของยีน *BAN*

2.4.4 TT16

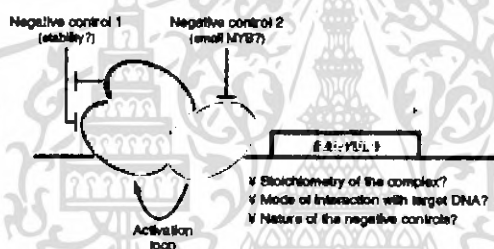
เป็นรหัสโปรตีน MADS box ของกลุ่ม B-sister ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดดอก การพัฒนา เมล็ด การทำปฏิกริยากับ โปรตีน homeotic ของดอกไม้ ซึ่งมีความจำเป็นต่อการสะสมของโปรแอนโทไซยานินในแอนโดเทเลียม

2.4.5 TTGI

เป็นยีนที่มีผลต่อการผลิตแอนโทไซยานินระหว่างการเจริญเติบโตจากเมล็ดกลายเป็นต้น มีการแสดงออกในเมล็ด ทำหน้าที่เร่งการพัฒนาของขนที่ใบ (trichomes) และขนราก และการสะสมของเมือกในเมล็ด

2.4.6 TTG2

เป็นยีนควบคุมที่ทำให้โปรตีนกลุ่ม WRKY ถ้ายีนนี้เกิดการกลายพันธุ์จะชักนำให้เมล็ดการเป็นสีเหลือง มีผลต่อการเกิดเมือก และการพัฒนาของขนใบ แต่ไม่เกี่ยวข้องกับรูปร่างของราก และมีการควบคุมการสะสมโปรแอนโทไซยานินไปในทิศทางเดียวกับ TTGI



รูปที่ 7 การทำงานร่วมกันของโปรตีน bHLH MYB และ WDR

ที่มา : Lepiniec และคณะ (2006)

การควบคุมร่วมกันในการแสดงออกของยีนโครงสร้างจะมีผลต่อการสะสมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในพืช จากข้อมูลการทดลองในข้าวโพดที่แสดงให้เห็นว่า C1 (MYB) และ R (bHLH) ทำหน้าที่ร่วมกันในการกระตุ้นชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Goff และคณะ 1992) ในพืชต่างชนิดกันจะมียีนที่มีบริเวณอนุรักษ์ซึ่งถอดและแปลรหัสให้โปรตีนซึ่งมีโดเมน MYB และ bHLH เช่นเดียวกัน จึงคาดว่าโปรตีนที่มีโดเมน MYB และ bHLH จึงน่าจะมีการทำงานในลักษณะเดียวกัน การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่ากลุ่มของโปรตีนที่ประกอบด้วย TT2 TT8 และ TTGI สามารถจับกับ โปรโมเตอร์ของ *BAN* เพื่อกระตุ้นการถอดรหัสของยีน *BAN* ในพืช ดังรูปที่ 7 (Baudry และคณะ 2004) เป็นที่น่าสนใจว่า กิจกรรมที่สัมพันธ์กันของ MYB / bHLH / WDR ใน *Arabidopsis thaliana* ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิด trichome การเกิดขนราก และการเกิดเมือกที่เปลือกเมล็ดอีกด้วย

2.5 วิเคราะห์เฟลวอนอยด์

2.5.1 การสกัด (Dong และคณะ, 2001)

การสกัดเฟลวอนอยด์จากพืชตัวอย่างสามารถสกัดได้โดยการนำตัวอย่างใบไม้มาบดให้ละเอียด จากนั้นเติมสารสกัดเฟลวอนอยด์ที่ประกอบด้วยเมทานอล และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง สารสกัดที่ได้มีลักษณะขุ่น จากนั้นนำไปกรองหรือปั่นเหวี่ยงได้ เนื่องจากเฟลวอนอยด์ที่สกัดได้ในสารละลายที่เป็นน้ำนั้นไม่คงตัวเมื่ออยู่ภายใต้แสงที่เข้มที่มีอุณหภูมิสูง ดังนั้นในระหว่างขั้นตอนการสกัดจึงควรหลีกเลี่ยงสภาวะดังกล่าว

2.6 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืช

มีขั้นตอนดังนี้

1. ศึกษารายละเอียดของยีนที่ต้องการถ่าย โอนเข้าสู่พืชและทำการ โคลนยีน
2. พัฒนาระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนพืช ให้พัฒนาเป็นต้นพืช (plant regeneration) ซึ่งจำเป็นสำหรับการพัฒนาเซลล์หรือ เนื้อเยื่อพืชที่ถ่ายยีนแล้วให้เป็นต้นพืช
3. ถ่ายยีน (หรือดีเอ็นเอ) เข้าสู่พืช (gene transfer to plant) ด้วยวิธีการที่เหมาะสมกับชนิดพืช

2.6.1 การโคลนยีน (<http://www.kr.ac.th/ebook2/sakdanai/04.html>)

การโคลน (cloning) หมายถึงการเพิ่มปริมาณผลผลิตให้เหมือนกับต้นแบบ ผลผลิตที่ได้จากการโคลนเรียกว่า โคลน (clone) การโคลนยีนหรือดีเอ็นเอมีขั้นตอนดังนี้คือ

2.6.1.1 การเตรียมยีนหรือดีเอ็นเอที่ต้องการ เตรียมได้จาก

1. การสกัดดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต
2. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เป็นการสร้างยีนขึ้นมาโดยตรง ซึ่งยีนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ครั้งแรกคือยีนของ alanine tRNA ซึ่งมีกรดอะมิโนต่อกันเพียง 14 ตัว โดยยีนที่สังเคราะห์ขึ้นนี้เป็นยีนท่อนสั้นๆ แต่ยีนของโปรตีนและเอนไซม์ต่างๆ ไปมักมีความยาวหลายร้อยหรือเป็นพันเบสสังเคราะห์ได้ยาก หรือกล่าวได้ว่าสังเคราะห์ไม่ได้
3. การสร้างยีนโดยอาศัย mRNA เป็นแม่แบบทำได้โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase หรือ RNA-directed โดย DNA polymerase ทำหน้าที่สร้างดีเอ็นเอโดยอาศัย mRNA เป็นแม่แบบโดยตรง เอนไซม์นี้สามารถสกัดได้จากไวรัสชนิด RNA virus เช่น avian myeloblastosis virus (AMV) โดยอาศัยความจำเพาะของการจับคู่เบส สายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจะมีการเรียงตัวของเบสสอดคล้องกันกับการเรียงตัวของเบสบนสาย mRNA สายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้น โดยวิธีนี้จึงได้ชื่อว่า complementary DNA หรือ cDNA

ดีเอ็นเอจากแหล่งต่างๆ ดังกล่าว นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้มีขนาดต่างๆ เพื่อเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้เป็นเอนไซม์ที่สามารถจดจำลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่ตัด อาจเป็นการจดจำ 4 หรือ 6 คู่เบส ตัวอย่างเช่น *EcoRI*, *SmaI* สามารถจดจำลำดับ 6 คู่เบส ส่วน *TaqI*, *AluI* และ *HaeIII* สามารถจดจำลำดับ 4 คู่เบส เป็นต้น ตัวอย่างของเอนไซม์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์และลำดับเบสที่จดจำได้ แสดงไว้ที่ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ

เอนไซม์	จุลินทรีย์ที่ผลิต	ลำดับเบสและตำแหน่งที่ตัด
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter</i>	5'-A-G-C-T-3' 3'-T-C-G-A-5'
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	5'-G-G-A-T-C-C-3' 3'-C-C-T-A-G-G-5'
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	5'-G-A-A-T-T-C-3' 3'-C-T-T-A-A-G-5'
<i>EcoRII</i>	<i>Escherichia coli</i>	5'-C-C-T-G-G-3' 3'-G-G-A-C-C-5'
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aeryptius</i>	5'-G-G-C-C-3' 3'-C-C-G-G-5'
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae b</i>	5'-A-A-G-C-T-T-3' 3'-T-T-C-G-A-A-5'
<i>PstI</i>	<i>Providencia sturtii</i>	5'-C-T-G-C-A-G-3' 3'-G-A-C-G-T-C-5'
<i>SaII</i>	<i>Streptomyces albus</i>	5'-G-T-C-G-A-C-3' 3'-C-A-G-C-T-G-5'

2.6.1.2 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ (vector)

เวกเตอร์ คือ ดีเอ็นเอใดๆ ที่มีลักษณะเป็นหน่วยที่สามารถจำลองตัวเองได้ (replicon) หรือจะสามารถแทรกตัวเข้าไปในส่วนของดีเอ็นเอของเซลล์ผู้รับได้โดยวิธีรีคอมบิเนชัน เวกเตอร์จะทำหน้าที่ 2 อย่าง คือ ป้องกันไม่ให้ชิ้นหรือชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจถูกย่อยทำลายโดยเอนไซม์ภายในเซลล์ผู้รับ และช่วยให้มีการจำลองตัวเองเพื่อเพิ่มปริมาณและถ่ายทอดไปยังเซลล์รุ่นต่อไปได้ การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวกเตอร์มี 3 วิธี คือ

1. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียวที่เกิดจากการตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (cohesive end ligation)
2. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายทู่ (blunt end ligation)
3. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่มีปลายเป็นเบสคู่สม เกิดจากการต่อเบสชนิดเดียวกันเข้าไปที่ปลาย ' ของดีเอ็นเอโมเลกุลหนึ่ง โดยใช้เอนไซม์เทอร์มินอล ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ิล ทรานสเฟอเรส (terminal deoxyribodinucleotidyl transferase) เติมไฮโมพอลิเมอร์ที่เป็นคู่สมกันที่ปลายสองข้างของดีเอ็นเอ การเชื่อมต่อขึ้นดีเอ็นเออาจไม่ได้ใช้วิธีหนึ่งวิธีใดเพียงวิธีเดียว แต่ใช้หลายวิธี หรือต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน

2.6.1.3 การนำ Recombinant vector เข้าสู่ host cells

การนำเวกเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์ผู้รับ เช่น *E. coli* โดยทำให้เซลล์ผู้รับอยู่ในสภาพที่พร้อมหรือเหมาะสม เรียกว่า เซลล์คอมพีเทนต์ (competent cell) ซึ่งสามารถกระทำได้ด้วยการใช้สารเคมี เช่น CaCl_2 , MgCl_2 , CoCl_2 , KCl , dimethylsulfoxide ร่วมกับอุณหภูมิ 0 - 42 องศาเซลเซียส หรือใช้ไฟฟ้าเพื่อให้เกิดรูหรือช่องที่เชื่อมหุ้มเซลล์ หลังจากนั้นก็นำเวกเตอร์ลูกผสมเข้าไปในเซลล์ผู้รับ เรียกกระบวนการนี้ว่าทรานสฟอร์มเมชัน (transformation) และเรียกเซลล์ผู้ที่มีเวกเตอร์ลูกผสมนี้ว่า ทรานสฟอร์มแมนต์ (transformant)

ประสิทธิภาพของการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยวิธีทรานสฟอร์มเมชันนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด เช่น รูปร่างและขนาดของพลาสมิด ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์ และวิธีการเตรียมเซลล์สำหรับการถ่ายโอน เป็นต้น

2.6.1.4 การตรวจหาโคลนที่ต้องการ

วิธีการตรวจหาโคลนที่ต้องการนั้น ทำได้หลายวิธีขึ้นกับเวกเตอร์ที่ใช้และที่มาของโคลน โดยมีวิธีในการตรวจหาโคลนที่ต้องการได้หลายวิธี ดังนี้

1. การคัดเลือกจากฟีโนไทป์ (phenotypic selection)
2. คัดเลือกโดยใช้แอนติบอดี (antibody) เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับกับระบบภูมิคุ้มกัน
3. การคัดเลือกโดยการทำเทคนิคโคโลนีไฮบริไดเซชัน (colony hybridization) คือการวิเคราะห์ดีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอที่โคลนได้ จากผลของโคโลนีไฮบริไดเซชัน จากนั้นสกัดพลาสมิดจากโคโลนีที่ต้องการแล้วนำมาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และหาลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ต่อไป นอกจากนี้เพิ่มปริมาณยีนที่โคลนได้แล้วยังสามารถทำให้แบคทีเรียสร้าง โปรตีนฮอโมน อินเทอเฟอรอน หรือเอนไซม์ต่างๆ ได้อีกด้วย

2.6.2 วิธีการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืช

ปัจจุบันมี 2 วิธีการที่นิยมใช้ ได้แก่

1. การใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium*-mediated gene transfer)
2. การใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment)

ทั้ง 2 วิธีนี้เป็นการถ่ายยีนเข้าสู่โครโมโซมในเซลล์พืช จากนั้นจึงจะเพาะเลี้ยง ชักนำและพัฒนา เซลล์พืชที่มียีนเพิ่มเข้ามาในโครโมโซมเดิมให้เจริญเป็นต้นพืชต้นใหม่

2.6.2.1 วิธีการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

ชิ้นส่วนพืชที่ใช้อาจเป็นใบเลี้ยง (cotyledon) หรือคั่นอ่อน (hypocotyl) หรือ ใบจริงของพืช เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เติมฮอร์โมนต่างๆ ให้เหมาะสมแล้วสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นพืชได้ จึงนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งในการถ่ายยีน วิธีถ่ายยีนวิธีนี้มีขั้นตอนสรุปได้ดังนี้

1. ตัดชิ้นส่วนใบเลี้ยงหรือคั่นอ่อนให้มีขนาดพอเหมาะ เพื่อให้แบคทีเรียเข้าสู่เซลล์พืชได้
2. เตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียซึ่งภายในเซลล์บรรจุพลาสมิด 2 ชนิด (binary vectors) คือ

2.1 helper plasmid หรือ disarmed plasmid เป็นพลาสมิดที่ประกอบด้วย trans-acting element ได้แก่ *vir* gene ซึ่งจำเป็นต่อการเข้าสู่เซลล์พืชของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

2.2 autonomous vector หรือ bacterial plasmid เป็นพลาสมิดที่ประกอบด้วย cis-acting element คือ ยีนเป้าหมายที่ต้องการถ่ายเข้าสู่พืชพร้อมด้วย promoter และ terminator โดยมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ RB (right border) และ LB (left border) ขนาบข้างไว้ เมื่อต้องการถ่ายยีนที่อยู่ใน autonomous vector นี้เข้าสู่พืชโดยการย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์อะโกรแบคทีเรียที่มี helper plasmid อยู่แล้ว จากนั้นเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียบนอาหารแข็งให้ได้โคโลนีเดี่ยวแล้วย้ายโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว

4. นำชิ้นส่วนพืชที่ตัดไว้ในข้อ 1 มาใส่แช่ในเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เตรียมไว้
5. ย้ายชิ้นพืชออกจากบนอาหารแข็งเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
6. ย้ายชิ้นพืชออกจากเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสำหรับเพาะเลี้ยงชักนำยอดหรือแคลลัส ซึ่งเดิมสารปฏิชีวนะกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย เพื่อเพาะเลี้ยง explant ให้เป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ต่อไป

2.6.2.2 วิธีการถ่ายยีนด้วยการใช้เครื่องยิงอนุภาค

วิธีนี้ใช้อุปกรณ์ที่มีแรงดันในการขับเคลื่อนอนุภาคโลหะที่เคลือบผิวภายนอกไว้ ด้วยดีเอ็นเอที่จะถ่ายเข้าสู่พืชให้เข้าไปในเซลล์พืช แต่กระบวนการภายในเซลล์เพื่อย้ายดีเอ็นเอเข้าไปสอดแทรกในโครโมโซมพืชนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด สามารถนำมาใช้กับเซลล์ได้หลายชนิดทั้งพืช สัตว์ สาหร่ายสีเขียว เซลล์เดียว และยีสต์ สำหรับพืชใช้ได้กับชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่อยู่ในสภาพเซลล์แขวนลอย แคลลัส เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส คัพภะ คั่นอ่อน และใบเลี้ยงคู่แรกของ ต้นกล้า ใช้ได้กับพืชใบเลี้ยงคู่ทั่วไป เช่น ฝ้าย มะละกอ ยาสูบ ถั่ว และพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง

อนุภาคโลหะที่นิยมใช้ได้แก่ ทังสแตน และทอง นำมาเคลือบผิวภายนอกด้วยดีเอ็นเอซึ่งเป็นพลาสมิดสายผสมที่มียีนเป้าหมายสอดแทรกอยู่สารที่ช่วยเคลือบดีเอ็นเอติดกับอนุภาค ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ และสเปออร์มิดีน (spermidine) จากนั้นอาจผสมอนุภาคกับเอทานอล หรือ สารละลายชนิดอื่นตามวิธีการเฉพาะที่ระบุไว้สำหรับอุปกรณ์แต่ละแบบ

2.6.3 การเพาะเลี้ยง และคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีน

เซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนจะมี selectable marker บางชนิดที่แสดงออกได้ในเซลล์พืช และทำให้เซลล์ดังกล่าวเจริญได้อาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารบางชนิดที่สอดคล้องกับ คุณสมบัติของ marker เช่น เจริญได้ในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ คานามัยซิน ซึ่งเป็นผลมาจากยีน *NPT II* หรือ เจริญได้ในอาหารที่เติมสารเคมีกำจัดวัชพืช bialaphos ซึ่งเป็นผลมาจากยีน *bar* เป็นต้น ปัจจุบันการใช้ selectable marker ชนิดอื่นอีก เช่น ยีนควบคุมการใช้น้ำตาลบางชนิด เซลล์ที่เจริญได้จะพัฒนาเป็นลำต้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการพัฒนาเซลล์และเนื้อเยื่อจนเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงขึ้นกับชนิดพืช ซึ่งมักจะใช้เวลาไม่น้อยกว่า 2-3 เดือน

2.6.4 การตรวจสอบต้นพืชคัดแปลงพันธุกรรม

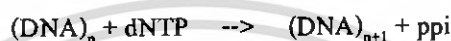
ต้นพืชที่พัฒนามาจากเซลล์และเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน จัดเป็น transgenic plant หรือ พืชคัดแปลงพันธุกรรมรุ่นแรก (R_0) การตรวจสอบทำได้ทั้งการใช้วิธีการทางอณูชีววิทยาและชีววิทยาการวิเคราะห์และตรวจสอบว่าพืช R_0 แต่ละต้นมียีนเป้าหมาย สอดแทรกอยู่ในโครโมโซมหรือไม่นิยมทำโดยการสกัดดีเอ็นเอจากโครโมโซมของพืช แล้วย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) แล้วใช้เทคนิค Southern blot analysis ย้ายดีเอ็นเอจากเจลไปสู่แผ่นเมมเบรน เพื่อตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่มียีนเป้าหมายอยู่โดยใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) นอกจากนี้อาจตรวจหาในเป้าหมายบนโครโมโซมพืชด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ได้อีกวิธีหนึ่ง การตรวจสอบผลผลิตของยีนเป้าหมาย ในพืช R_0 ทำได้จากการตรวจสอบ mRNA ด้วยเทคนิค Northern hybridization หรือ เทคนิค RT-PCR และทำได้โดยการตรวจสอบโปรตีนที่เป็นผลผลิตยีนด้วยเทคนิค ELISA และ Western blot analysis หรือตรวจหาเอนไซม์ที่เป็นผลผลิตของยีนด้วยเทคนิคทางชีวเคมี

ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบคุณภาพของพืชคัดแปลงพันธุกรรมที่ได้ว่า มีลักษณะทางพันธุกรรมเปลี่ยนไปตรงตามความต้องการ อาจจำเป็นต้องใช้วิธีทดสอบทางชีววิทยา เช่น การตรวจดูความต้านทานโรค แมลงศัตรูพืช โดยการปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืชให้กับพืชที่ได้รับการถ่ายยีนหรือให้แมลงดูดกินกักกินพืชที่ได้รับการถ่ายยีน แล้วประเมินคุณภาพพืชที่ได้รับการถ่ายยีนว่าดีกว่าพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนหรือไม่อย่างไร

2.7 เทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

พีซีอาร์เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยอาศัยหลักการของการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองหรือเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการทำการศึกษาให้มีปริมาณสูงกว่าเดิมหลายล้านเท่า ปฏิกิริยาแต่ละรอบของขั้นตอนได้แก่

1. ดีเนเจอร์ชัน (denaturation) ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่ แยกจากกันเป็นสายเดี่ยว ที่อุณหภูมิสูง ประมาณ 90- 95°C
2. ไพร์เมอร์แอนนิลลิง (primer annealing) ใช้ไพร์เมอร์ 2 สายเข้าไปจับคู่สมบนดีเอ็นเอสายเดี่ยว ที่เป็นแม่พิมพ์ (template) เกิดที่อุณหภูมิประมาณ 40- 60°C
3. ไพร์เมอร์เอ็กซ์เทนชัน (primer extension) การต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ เข้าที่ปลาย 3' - OH ของไพร์เมอร์ ด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมต่อโมเลกุลของ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (deoxyribonucleotides) ทั้ง 4 ชนิด dATP dGTP dCTP และ dTTP เข้าที่ปลาย 3' อีสเตรของสาย DNA ครั้งละหนึ่งโมเลกุลดังปฏิกิริยา และมีแมกนีเซียมไอออนเป็น โคแฟกเตอร์ (co-factor)



2.7.1 การนำเทคนิคพีซีอาร์มาใช้ประโยชน์ในงานวิจัยทางโรคพืช ทำให้ทั้งงานวิจัยพื้นฐาน และงานวิจัยประยุกต์

1. งานวิจัยพื้นฐาน เช่น การโคลนยีนหรือบางส่วนของยีนของเชื้อสาเหตุโรคพืชจำพวกไวรัส เพื่อนำยีนหรือบางส่วนของยีนที่สังเคราะห์ได้มาวิเคราะห์หาลำดับเบส แล้วศึกษาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับยีนของเชื้อโรค
2. งานวิจัยประยุกต์ เช่น การสร้างดีเอ็นเอเครื่องหมาย เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคและตรวจลักษณะพันธุกรรมที่ต้านทานโรค

2.8 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

อิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต สารละลายดีเอ็นเอจึงมีประจุเป็นลบที่พีเอชกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมีหมู่ฟอสเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้นพบว่าประจุต่อมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับขนาดเป็นส่วนใหญ่ นอกจากประจุแล้วอัตรา การเคลื่อนที่ขึ้นขึ้นอยู่กัขนาดรูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้า บัพเฟอร์ที่ใช้ เปอร์เซ็นต์และชนิดของเจล หากเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดกว่า 500 คู่เบส นิยมใช้ เจลอะกาโรส (agarose gel) 1% (w/v) เป็นเจลตรวจหา แต่หากเป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นกว่า 500 คู่เบส นิยมใช้ เจลอะกาโรส 2% (w/v) หรือเจลอะคริลามายด์ (acrylamide) 5% (w/v) เป็นเจลในการตรวจหา

2.9 โรคพืช

การเปลี่ยนแปลงใดๆ ที่ผิดไปจากพืชปกติ เกิดจากการถูกรบกวนอย่างต่อเนื่อง หากเกิดจากสิ่งมีชีวิตเรียกว่า โรคมีเชื้อ (parasitic diseases) สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ พืช และสัตว์ที่มีขนาดเล็กหลายชนิดเป็นเชื้อสาเหตุที่ทำให้พืชผิดปกติไป สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำที่เป็นเชื้อสาเหตุสำคัญ เช่น รา แบคทีเรีย ไวรัส ไฟโตพลาสมา (phytoplasma) และไวรอยด์ (viroid) และสาเหตุที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต ได้แก่ สภาพแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการปลูกพืชนั้นๆ ไม่เหมาะสม หรือมีความผิดปกติผันแปรไปในลักษณะต่าง ๆ เช่น ภัยหรือธาตุอาหาร น้ำ สภาพภูมิอากาศ เป็นต้น โรคพืชที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคอาจเรียกว่าโรคติดเชื้อหรือโรคระบาด และโรคพืชที่เกิดจากสภาพแวดล้อม เรียกว่าโรคไม่ติดเชื้อหรือโรคที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต (ธวัชชัย, 2540)

ความเสียหายเนื่องจากโรคพืชส่งผลต่อ สภาพแวดล้อม คุณภาพและปริมาณของผลผลิตลดลง มีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์ เช่น อะฟลาทอกซิน เกิดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจ และชักนำให้จุลินทรีย์คือสาร

เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์เซลล์เดี่ยว มีผนังแข็งห่อหุ้มเซลล์ (cell wall) รูปร่างจึงคงที่ แต่ละเซลล์มีขนาดเล็กมากต้องใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงจะเห็นเซลล์ชัดเจน แบคทีเรียบางชนิดสามารถเคลื่อนที่ได้เองด้วยหาง บางชนิดสามารถสร้างสปอร์ที่คงทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ แบคทีเรียมีการทวีจำนวนเพิ่มขึ้นด้วยการแบ่งเซลล์ ส่วนใหญ่แบคทีเรียสาเหตุโรคพืชมีรูปร่างเป็นท่อนสั้นและไม่สร้างสปอร์ แต่จะมีชั้นเมือกหรือแคปซูลห่อหุ้มผนังด้านนอกเซลล์อีกชั้นหนึ่ง จึงช่วยให้มีอายุยืนและทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีขึ้น แบคทีเรียสามารถผลิตสารพิษและเอนไซม์ทำลายพืชให้ได้รับความเสียหายได้ แบคทีเรียบางชนิดสร้างสารเร่งการเจริญเติบโตไปทำให้เซลล์พืชเจริญมากผิดปกติ เกิดอาการบวมพอง เป็นปุ่มปม แบคทีเรียเข้าทำลายพืชได้ทางแผลที่เกิดขึ้นตามผิวพืชและทางช่องเปิดธรรมชาติ เช่น ปากใบ แบคทีเรียมักจะถูกยับยั้งการเจริญได้ง่ายโดยการปฏิชีวนะแทบทุกชนิด รวมทั้งสารประกอบที่มีธาตุทองแดงเป็นส่วนผสม แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคพืชมีประมาณ 200 ชนิด การแพร่กระจายของแบคทีเรียไปสู่ที่ต่างๆ เป็นไปในลักษณะเช่นเดียวกับการแพร่ระบาดของเชื้อรา ตัวอย่างของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคพืช ดังนี้

1. *Pseudomonas*

ลักษณะเซลล์เป็นแท่งขนาด 0.5-1 1.5-4 เคลื่อนที่ได้ด้วย polar lagella 1 หรือมากกว่า 1 เส้น แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่สร้างสีเรืองแสงละลายน้ำได้ (diffusible fluorescent pigment) ตัวอย่างเช่น *P. syringae* pv. *glycinea* สาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วเหลือง และกลุ่มที่ไม่สร้างสารเรืองแสง ตัวอย่างเช่น *Pseudomonas corrugata* สาเหตุโรคไส้ดำ (pith necrosis) ของมะเขือเทศ

2. *Xanthomonas*

ลักษณะเซลล์คล้ายกับ *Pseudomonas* แต่มีแฟลกเจลลา (flagella) เพียงเส้นเดียว ลักษณะสำคัญคือ โคลินีสีลีลิ่งเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และเป็นเม็ดสีไม่ละลายน้ำ (non diffusible) ทุกสปีชีส์ (species) สามารถทำให้เกิดโรครักกับพืชได้ยกตัวอย่างเช่น *X. campestris* pv. *vesicatoria* สาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศและพริก

3. *Erwinia*

เซลล์เป็นท่อนตรงขนาด 0.5-1 1-3 เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) มีหลายชนิดที่เป็นสาเหตุของโรครักกับพืชซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ

3.1 กลุ่ม amylovora เป็นกลุ่มที่ไม่สร้างเอ็นไซม์ pectolytic พวกนี้ทำให้พืชแสดงอาการเนื่อเยื่อตายหรือเหี่ยวเฉาตัวอย่างเช่น *E. amylovora* สาเหตุโรคไหม้ของพืชตระกูลแอปเปิ้ล

3.2 กลุ่ม carotovora เป็นกลุ่มที่สร้าง pectolytic enzyme ที่ทำให้เกิดอาการเน่าและตัวอย่างเช่น *E. carotovora* pv. *carotovora*

4. *Agrobacterium*

เซลล์เป็นท่อนขนาด 0.8 1.5-3 เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์เช่นกัน โคลินีสีลีลิ่งและมีสีและมักสร้างเมือกจำนวนมาก มักอาศัยอยู่ในดินรอบ ๆ รากพืช ตัวอย่างเช่น *A. tumefaciens* สาเหตุโรค crown gall ของพืชหลายชนิด

5. *Xylella*

เป็นแบคทีเรียที่เพิ่งมีการค้นพบว่าสามารถทำให้เกิด โรครักกับพืชได้ ลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวขนาด 0.3 1-4 มักต่อกันเป็นสายยาวในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิด ไม่มีแฟลกเจลลา ไม่สร้างสีเจริญได้ยากในอาหารเลี้ยงเชื้อ (fastidious) เข้าทำลายท่อน้ำ (Xylem) ของพืชหลายชนิด ตัวอย่างเช่น *Xylella fastidiosa* สาเหตุโรคขอบใบแห้งขององุ่น (Pierce's Disease) เชื้อในกลุ่มนี้เคยมีชื่อว่า Rickettsia-like organism

6. *Acidovorax*

จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ โรครักกับพืชจีนัสใหม่ ซึ่งถูกแยกออกจากจีนัส *Pseudomonas* เนื่องจากมีลักษณะหลายประการต่างไปจาก *Pseudomonas* เช่น สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่ค่อนข้างเป็นกรด มีแฟลกเจลลาเพียง 1 เส้นบริเวณปลายเซลล์ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 S ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA) ต่างจาก *Pseudomonas* ตัวอย่างเช่น สาเหตุโรครักกับพืชที่สำคัญคือ *Acidovorax avenae citrulli* ที่ทำให้เกิดโรคผลช้ำ (fruit blotch) ในแตงโม ซึ่งในอดีตเคยเรียกว่า *P. citrulli*

7. *Ralstonia*

จัดเป็นเชื้อสาเหตุโรครักกับพืชจีนัสใหม่เช่นกัน แต่เดิมเคยได้รับการจัดแบ่งอยู่ในจีนัส *Pseudomonas* เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกันกับเชื้อ *Pseudomonas* เกือบทุกประการ

แต่เมื่อได้มีการศึกษารายละเอียดองค์ประกอบของ 16S ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA) พบว่าต่างจาก *Pseudomonas* จึงได้รับการตั้งชื่อใหม่เป็น *Ralstonia* ตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่สำคัญคือ *R. solanacearum* ที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวเฉา (bacterial wilt) ในมะเขือเทศ

จากการศึกษาพบว่า โรคใบจุดนูนของถั่วเหลืองที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* พบว่าทำความเสียหายกับถั่วเหลืองที่ปลูกในประเทศต่างๆ ทั่วโลก (Sinclair, 1975) โดยมีความสำคัญมากในสภาพภูมิอากาศแบบร้อนชื้นและกึ่งร้อนชื้น จัดเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในการผลิตถั่วเหลืองของประเทศไทย โรคใบจุดนูนทำให้ใบถั่วเหลืองถูกทำลายและใบที่ถูกทำลายมากอาจจะร่วงทำให้ผลผลิตลดลง ขนาดและจำนวนเมล็ดลดลง เชื้อนี้สามารถแพร่กระจายได้ดีในแปลงปลูกโดยแมลง ลม ฝน และอาศัยในเศษซากพืชที่ยังไม่สลายตัวทำให้อยู่ข้ามฤดูการปลูกได้ (สุตฤติ, 2527)

จากการศึกษาพบว่าโรคที่เกิดจากแบคทีเรียในถั่วเหลืองโดยทั่วไปเกิดจาก *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* เมื่อพืชได้รับการติดเชื้อจากแบคทีเรียแล้ว พืชจะมีการตอบสนอง 2 แบบคือ

1. พืชจะยอมให้เชื้อที่ก่อโรคมีการเจริญเติบโต และกระจายตัวอยู่ในเซลล์พืช
2. พืชจะมีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ก่อโรคเพื่อไม่ให้เชื้อที่ก่อโรคมีการแพร่กระจายออกไป ดังนั้นจึงส่งผลให้บริเวณที่มีการติดโรคมีการตายของเซลล์พืชเกิดขึ้น เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคไปยังบริเวณใกล้เคียงที่ไม่มีการติดโรค

การตอบสนองทางโมเลกุลของพืช เช่น ถั่วเหลือง และมะเขือเทศ เมื่อมีการติดเชื้อโรคส่งผลให้มีการเพิ่มการทำงานของยีนหลายชนิดในวิถีชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ เช่น เอนไซม์ chalcone synthase (CHS) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่ช่วยในการสังเคราะห์สารตั้งต้นที่สำคัญในการผลิตสารทุติยภูมิรวมทั้ง ฟลาวานอน ฟลาโวนอล และแอนโทไซยานิน เป็นต้น โดยเอนไซม์ CHS นี้จะถูกกระตุ้นให้มีการถอดรหัสมากขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อโรคเพื่อช่วยให้พืชมีการตอบสนองต่อเชื้อโรคที่ว่องไวมากขึ้น ส่งผลให้พืชมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อโรคไม่ให้เข้ามาทำลายเซลล์พืชได้มากขึ้น (Zabala และคณะ, 2006)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 ต้นยาสูบ

3.1.2 เชื้ออะโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium tumefaciens*)

3.1.3 เชื้อ *E. coli*

3.1.4 สารเคมี

3.1.4.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเพื่อเลี้ยงเชื้อและทำการคัดเลือกโคลน

3.1.4.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำ competent cell

3.1.4.3 สารเคมีที่ใช้ในการถ่ายโอนยีน

3.1.4.4 สารเคมีที่ใช้ในการอิเล็กโทรโพรพัชัน

3.1.4.5 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1.5 อุปกรณ์ที่ใช้

3.1.5.1 ประเภทเครื่องแก้ว

- บีกเกอร์
- ปิเปต
- ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- จาน petri-disc
- แท่งแก้วคน
- ขวดวัดปริมาตร
- กระจกบด

3.1.5.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ

- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ไมโครปิเปตและทิปขนาดต่างๆ
- ซ้อนตักสาร
- มีดผ่าตัดขนาดต่างๆ
- ปากคีบ
- เครื่องชั่งสารไฟฟ้าแบบหยาบและแบบละเอียด
- เครื่องวัดความเป็นกรดค่า (pH meter)
- เตาอบไมโครเวฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ตู้เย็น
- หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- เตาอบความร้อน (hot air oven)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- Water bath
- Laminar air flow cabinet
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
- เครื่องเขย่า (shaker)
- ตู้บ่ม (incubator)
- อุปกรณ์ทำอิเล็กทรอนิกส์

3.1.6 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การโคลนยีน

3.2.1.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

ใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้น *TT8* ในช่วง open reading frame (ORF) โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมซึ่งมีปฏิกิริยาของการทำพีซีอาร์ ดังนี้

cDNA จาก <i>Arabidopsis thaliana</i>	1	ไมโครลิตร
dNTP (10mM)	1	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ (25mM)	4	ไมโครลิตร
10X buffer	5	ไมโครลิตร
แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (5U/ μ l)	0.3	ไมโครลิตร
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์	1	ไมโครลิตร
รีเวอร์สไพรเมอร์	1	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	36.7	ไมโครลิตร
รวม	50	ไมโครลิตร

มีสภาวะในการทำพีซีอาร์ คือ การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพตามธรรมชาติ (denaturing) ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที การทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอ (annealing) ที่ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และการต่อเติมสายดีเอ็นเอ (extension) จากไพรเมอร์โดยการทำงานของเอนไซม์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที โดยทำทั้งหมด 40 รอบ

ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับ *TT8* มีลำดับเบสเป็นดังนี้

ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ 5'-CGGGATCCATGGATGAATCAAGTATTA-3'

รีเวอร์สไพร์เมอร์ 5'CGGGATCCATGATTAGTATCATGTATT-3'

และตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้น เจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน หลังจากนั้นแยก ชิ้นส่วนออกจากเจลอะกาโรส โดยใช้วิธีตามGFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit ของ Amersham Pharmacia Biotech และละลายดีเอ็นเอในน้ำ 15 ไมโครลิตร

3.2.1.2 ทำการเชื่อมต่อ และถ่ายโอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ *E. coli*

หลังจากแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ที่มีขนาดตามต้องการออกจาก เจล และเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับเวกเตอร์pGEM โดยใช้เทคนิค T-A cloning โดยปฏิบัติของการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ ประกอบด้วย

ชิ้นดีเอ็นเอ T78	3	ไมโครลิตร
เวกเตอร์ pGEM	1	ไมโครลิตร
2X ligase buffer	5	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase	1	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

บ่ม 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วบ่ม 22 องศาเซลเซียส ประมาณ 4 ชั่วโมงก่อนทำการถ่าย โอน ถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ เข้าสู่ *E. coli* และ คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการเลี้ยงสารแขวนลอยเซลล์ที่ ผ่านการถ่ายโอนยีนบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน IPTG และ X-gal บ่มที่ 37 องศา เซลเซียส นานข้ามคืน และสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกได้ ตรวจสอบพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอ แทรกอยู่โดยการ ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI มีปฏิกริยาดังนี้

พลาสมิดที่คัดเลือกได้	3	ไมโครลิตร
10X buffer E	1	ไมโครลิตร
<i>Bam</i> HI (10 unit/ μ l)	0.15	ไมโครลิตร
BSA	0.1	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	5.75	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

แล้วตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้น เจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.1.3 ทำการตรวจสอบชิ้นส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pGEM

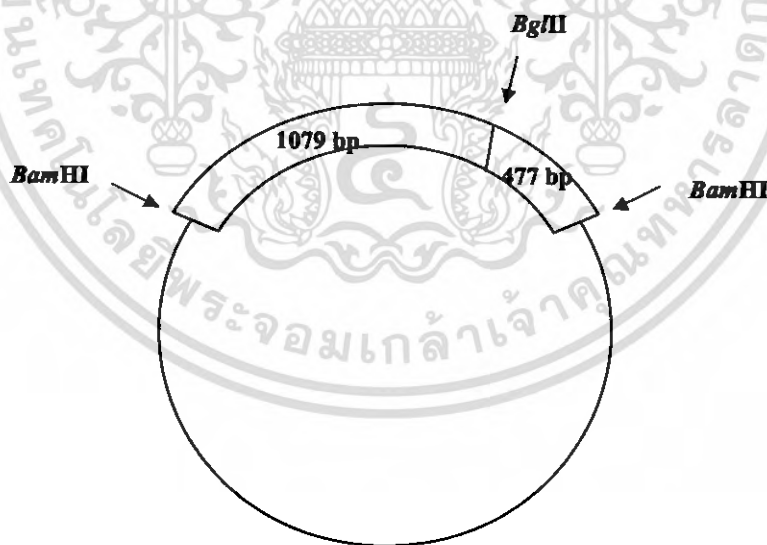
ตรวจสอบชิ้นส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิดว่าเป็นชิ้น *TT8* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ชิ้น *TT8* ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Bgl* II มีปฏิกิริยาดังนี้

ดีเอ็นเอ	4	ไมโครลิตร
10X buffer D	1	ไมโครลิตร
<i>Bam</i> HI (10 unit/ μ l)	0.15	ไมโครลิตร
<i>Bgl</i> II (10 unit/ μ l)	0.15	ไมโครลิตร
BSA	0.1	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	4.65	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

ปัม 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

แล้วตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน จากข้อมูลของ GenBank *TT8* ไม่มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *Bam*HI แต่มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *Bgl*II ซึ่งการตัดจำเพาะของเอนไซม์ทั้งสองแสดงคังรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์บนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *TT8*

3.2.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ *Agrobacterium* expression vector

3.2.2.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ

เมื่อพบว่าชิ้นส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pGEM เป็น TT8 ให้แยกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI มีปฏิกิริยาดังนี้

พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอ TT8	65	ไมโครลิตร
10X buffer E	14	ไมโครลิตร
BamHI (10 unit/ μ l)	6	ไมโครลิตร
BSA	1.4	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	53.6	ไมโครลิตร
รวม	140	ไมโครลิตร

บ่ม 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

และชิ้นดีเอ็นเอ MYC-RP กับ MYB-PI ได้จากการตัดแยกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI ออกจากพลาสมิด pHTT202 (pHTT202 ที่มีชิ้น MYC-RP และ pHTT202 ที่มีชิ้น MYB-PI ได้จากมหาวิทยาลัยชิบะ ประเทศญี่ปุ่น) มีปฏิกิริยาดังนี้

พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอ MYC-RP หรือ MYB-PI	74	ไมโครลิตร
10X buffer E	14	ไมโครลิตร
BamHI (10 unit/ μ l)	6	ไมโครลิตร
BSA	1.4	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	44.6	ไมโครลิตร
รวม	140	ไมโครลิตร

บ่ม 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

จากนั้นทำให้ชิ้นดีเอ็นเอนั้นบริสุทธิ์โดยใช้วิธีตาม GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit ของ Amersham Pharmacia Biotech และละลายดีเอ็นเอในน้ำ 15 ไมโครลิตร

3.2.2.2 การเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิดที่เป็น *Agrobacterium* expression vector

นำชิ้นดีเอ็นเอ TT8 ที่ตรวจสอบแล้ว และ MYC-RP กับ MYB-PI ที่แยกได้ เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pBI121 ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อเป็นดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ปฏิบัติการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ *Agrobacterium* expression vector

	pBI121 เชื่อมต่อกับ <i>TT8</i>	pBI121 เชื่อมต่อกับ <i>MYC-RP</i>	pBI121 เชื่อมต่อกับ <i>MYB-PI</i>
DNA	3.5 ไมโครลิตร	3.5 ไมโครลิตร	3.5 ไมโครลิตร
2x ligase buffer	7.5 ไมโครลิตร	7.5 ไมโครลิตร	7.5 ไมโครลิตร
vector	2.5 ไมโครลิตร	2.5 ไมโครลิตร	2.5 ไมโครลิตร
T4 DNA ligase	1.5 ไมโครลิตร	1.5 ไมโครลิตร	1.5 ไมโครลิตร
รวม	15 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร

จากนั้นบ่มที่ 22 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

ถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ทำการเชื่อมต่อเข้าสู่ *E. coli* และคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนยีนบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน สำหรับเวกเตอร์ pBI121 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วทำการสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกได้ ทำการคัดเลือกพลาสมิดที่คาดว่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจแทรกอยู่ โดยการใช้น้ำต้มสุกตัดจำเพาะ *Bam*HI โดยมีปฏิริยาดังนี้

พลาสมิดที่ได้รับการคัดเลือก	2	ไมโครลิตร
10X buffer E	1	ไมโครลิตร
<i>Bam</i> HI (10 unit/ μ l)	0.15	ไมโครลิตร
BSA	0.1	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	6.75	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

บ่ม 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

แล้วตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่โกรแบคทีเรีย

การสร้างสายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของยีนควบคุมโดยถ่ายโอนพลาสมิดที่มียีนที่ต้องการเข้าสู่โกรแบคทีเรียต้องคำนึงถึงระบบการทำงานของพลาสมิดด้วย ระบบการทำงานของพลาสมิด pHTT202 เป็นแบบ co-integrate vector จึงต้องมีการเลือกใช้สายพันธุ์ของอะโกรแบคทีเรียดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียที่ใช้ในการถ่ายโอนเวกเตอร์แต่ละชนิด

ยีนที่ทำการทดลอง	เวกเตอร์ที่ใช้	สายพันธุ์ <i>Agrobacterium</i> ที่ใช้
<i>MYC-RP</i> sense	pHTT202	C58C1 pGV3850
<i>MYB-PI</i> sense	pHTT202	C58C1 pGV3850

* pHTT202 ที่มียีน *MYC-RP* และ pHTT202 ที่มียีน *MYB-PI* ได้จากมหาวิทยาลัยชิบะ ประเทศญี่ปุ่น

ถ่ายโอนยีนพลาสมิดที่มียีนที่ต้องการเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินสำหรับเวกเตอร์ pHTT202 บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

3.2.3.1 ตรวจสอบการถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์

สกัดพลาสมิดจากโคลนอะโกรแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และคาดว่ามีส่วนดีเอ็นเอที่ทำการถ่ายโอนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมาตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่สามารถจับกับชิ้นส่วน CaMV 35S promoter สำหรับการตรวจสอบอะโกรแบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายโอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ซึ่งมีปฏิกิริยาของการทำพีซีอาร์ ดังนี้

พลาสมิดที่สกัดได้จากอะโกรแบคทีเรีย	1.7	ไมโครลิตร
dNTP (10mM)	1	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ (25mM)	5	ไมโครลิตร
10X buffer	5	ไมโครลิตร
แทคคีเอ็นเอพอลิเมอเรส (5unit/ μ l)	0.3	ไมโครลิตร
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์	2	ไมโครลิตร
รีเวอร์สไพรเมอร์	2	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	33	ไมโครลิตร
รวม	50	ไมโครลิตร

มีสถานะในการทำพีซีอาร์ คือ การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพตามธรรมชาติ (denaturing) ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที การทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอ (annealing) ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และการต่อเติมสายดีเอ็นเอ (extension) จากไพรเมอร์โดยการทำงานของเอนไซม์แทคคีเอ็นเอพอลิเมอเรส ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยทำทั้งหมด 40 รอบ

ไพรเมอร์ CaMV 35S promoter ที่ใช้ในการตรวจสอบมีลำดับเบสเป็นดังนี้

ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ 5'-TGCGAAGGATAGGATTGTGC -3'

รีเวอร์สไพรเมอร์ 5'-GGATTGATGTGAACATGGTGGAG -3'

และตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส เปรียบเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.4 การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

3.2.4.1 การถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเข้าสู่ต้นยาสูบ

ใช้อะโกรแบคทีเรียมที่สร้างขึ้นในข้อ 3.2.3 ในถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ โดยจุ่มใบ ยาสูบที่ตัดให้มีขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร ลงในสารละลายแขวนลอยของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ pHTT202 + *MYC-RP* sense และ pHTT202 + *MYB-PI* sense เป็นเวลา 20 นาที อย่างละ 50 ใบ และทำการเลี้ยงใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนบนอาหาร MS สูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นทำการย้ายไปวางบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน และคาเบนนิจิลิน เพื่อทำการฆ่าอะโกรแบคทีเรียม ทุก 2 สัปดาห์ทำการเปลี่ยนอาหาร

3.2.4.2 ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน

การศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน โดยทำการนับจำนวนใบที่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ และจากแคลลัสเจริญเป็นยอดบนอาหาร MS ปกติที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน และคาเบนนิจิลิน

3.2.5 การคัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน

ทำการคัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีนส่วน T-DNA ที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะคานามัยซิน จะเจริญบนอาหาร MS ปกติที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน และคาเบนนิจิลินได้ แล้วคัดเลือกต้นพืชทดลองที่มีลักษณะที่สมบูรณ์ คือ ส่วนของลำต้น ใบมีสีเขียว และมีราก แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS ปกติ

3.2.6 ตรวจสอบการแสดงออกของพืชทดลองที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมาทดสอบการต้านทานต่อโรคพืช

นำพืชทดลอง (ต้นพืชปกติ ต้นพืชที่มียีน *DFR* และ *CHS*) ที่มีลักษณะสมบูรณ์ และมีลักษณะใกล้เคียงกันนำมาทดสอบการต้านทานต่อโรคพืช ในการทดลองนี้ใช้ *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุดในพืช

3.2.6.1 ตรวจสอบการผลิตสารประกอบฟีนอลิกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

นำใบของต้นพืชทดลอง (ต้นพืชปกติ ต้นพืชที่มียีน *DFR* และ *CHS*) มาทดสอบกับเชื้อด้วยการเจาะรูลงบนใบ และแช่ลงในสารละลายแบคทีเรีย (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรของสารละลายแบคทีเรีย เท่ากับ 0.1) และดูผลการผลิตสารประกอบฟีนอลิกซึ่งตอบสนองต่อเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* ที่ระยะเวลา 3 วัน โดยส่องดูการเรืองแสงบริเวณที่ถูกบุกรุกด้วยเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Nikon eclipse 80i : exciter filter 330-380 nm, dichroic mirror 400 nm, barrier filter 420 nm) เปรียบเทียบกับต้นพืชควบคุมที่ไม่ถูกบุกรุกด้วยเชื้อ

3.2.6.2 ตรวจสอบการผลิตสารด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

นำต้นพืชทดลอง (ต้นพืชปกติ ต้นพืชที่มียีน *DFR* และ *CHS*) มาทดสอบโดยการฉีดสารละลายแบคทีเรียลงบนใบพืช 0.1 มิลลิลิตร (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรของสารละลายแบคทีเรีย เท่ากับ 0.1) นำต้นพืชทดลองมาสกัดสารที่ 7 วัน และดูการผลิตสารกลุ่มเบนโซควิโนน (benzoquinones) และเฟลโวนอยด์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ในช่วงค่าการดูดกลืนแสง 250-550 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับต้นพืชควบคุมที่ไม่ถูกบุกรุกด้วยเชื้อ

3.2.6.3 การตรวจสอบด้วยการสังเกตลักษณะทางสรีรวิทยาของใบชาสุบ

นำต้นพืชทดลอง (ต้นปกติ มียีน *DFR* และ *CHS*) ที่มีลักษณะสมบูรณ์ มาทดสอบการต้านทานต่อโรคพืช ซึ่งใช้ *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* เพื่อทำให้เกิดโรคในต้นชาสุบทดลอง เปรียบเทียบกับต้นพืชควบคุมที่ไม่ถูกบุกรุกด้วยเชื้อ และสังเกตลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นชาสุบทดลองที่ระยะเวลา 1 เดือน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

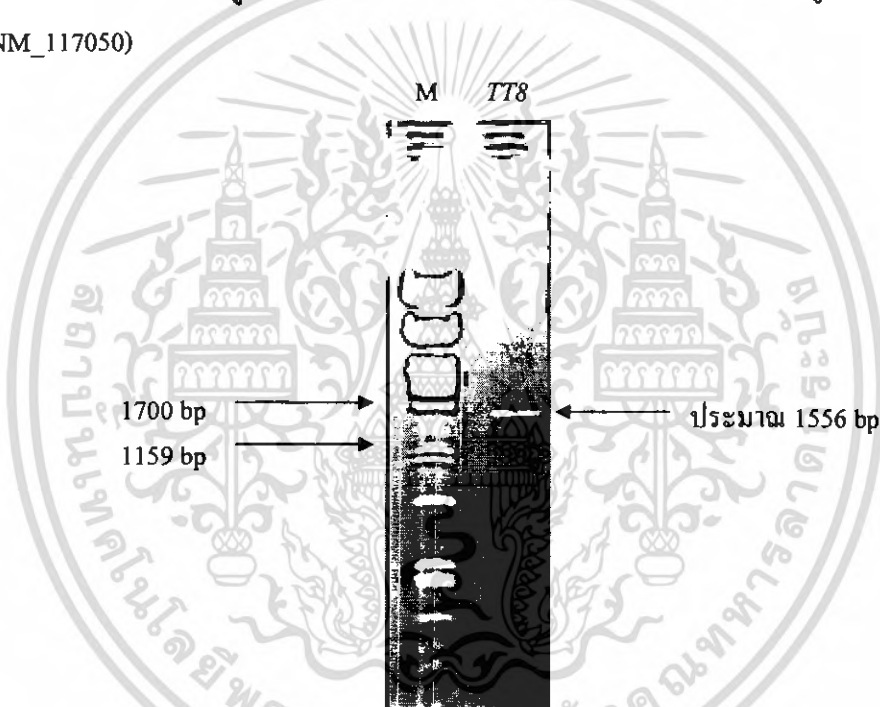
บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การโคลนยีน

4.1.1 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

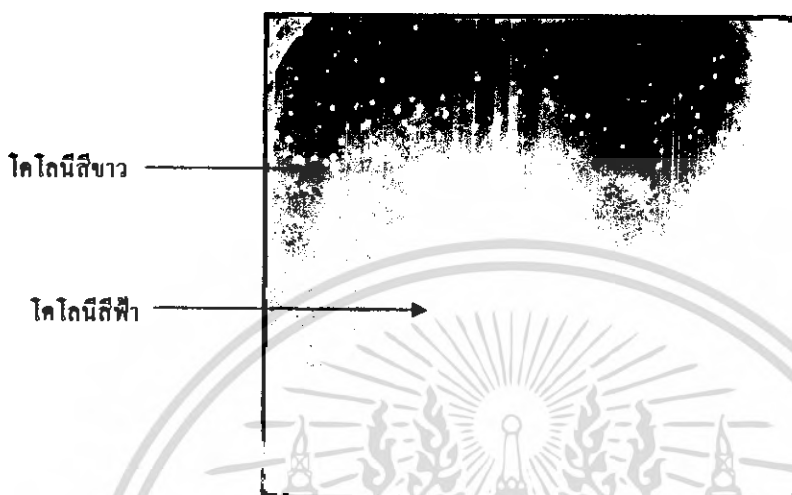
ใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *TT8* และตรวจผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลเป็นดังรูปที่ 9 คาดว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้น่าจะเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *TT8* เนื่องจากมีขนาดอยู่ระหว่าง 1159 และ 1700 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับข้อมูลใน GenBank บริเวณ ORF ของ *TT8* มีขนาด 1556 คู่เบส (accession no. NM_117050)



รูปที่ 9 แสดงผลการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์สำหรับยีน *TT8* จากเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ (M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน *TT8* หมายถึง ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์)

4.1.2 ผลการเชื่อมต่อและการถ่ายโอนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ *E. coli*

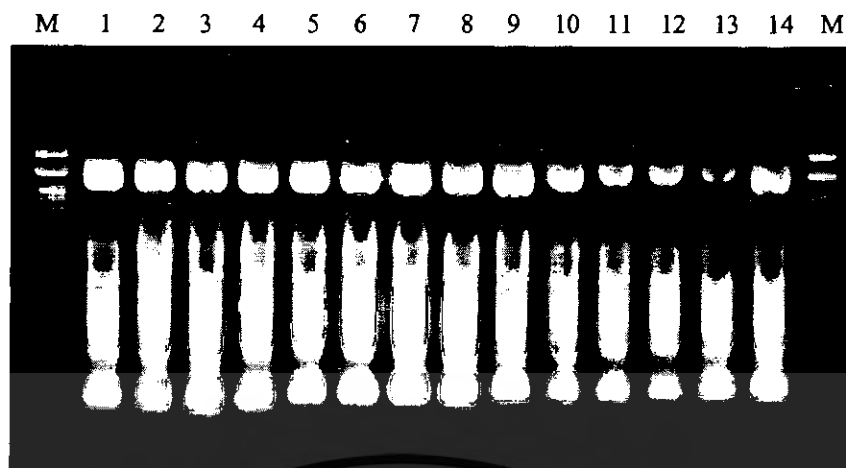
เมื่อทำการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากเจลและนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM นำสารละลายที่ทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* และทำการคัดเลือกโคลนที่คาดว่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ ได้ผลดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 โคโลนีของ *E. coli* ที่ได้รับเวกเตอร์ pGEM บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ แอมพิซิลิน IPTG และ X-gal

เซลล์ที่ได้รับพลาสมิด pGEM จะสามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เนื่องจากภายในพลาสมิดมียีนต้านยาปฏิชีวนะชนิดนี้อยู่ ซึ่งโคโลนีที่ได้จะมี 2 ลักษณะ ได้แก่ โคโลนีสีขาว ซึ่งคาดว่าพลาสมิดนี้มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ การแทรกของชิ้นดีเอ็นเอนี้จะเกิดในยีน *lacZ* ทำให้ได้เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสที่มีลักษณะผิดปกติ จึงไม่สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้น (X-gal) ให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีฟ้าได้ และโคโลนีสีฟ้า ซึ่งคาดว่าพลาสมิดไม่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ ทำให้เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสสามารถทำงานได้ตามปกติ จึงสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้น (X-gal) ให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีฟ้า จึงเห็นโคโลนีเป็นสีฟ้า

คัดเลือกโคลนของ *E. coli* ที่ให้โคโลนีสีขาวซึ่งคาดว่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ มาสกัดพลาสมิดและตรวจผลการสกัดพลาสมิดโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลเป็นดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 แสดงผลการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีสีขาวจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอ (1-14 คือ หมายเลข โคลนของพลาสมิดที่สกัดได้ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

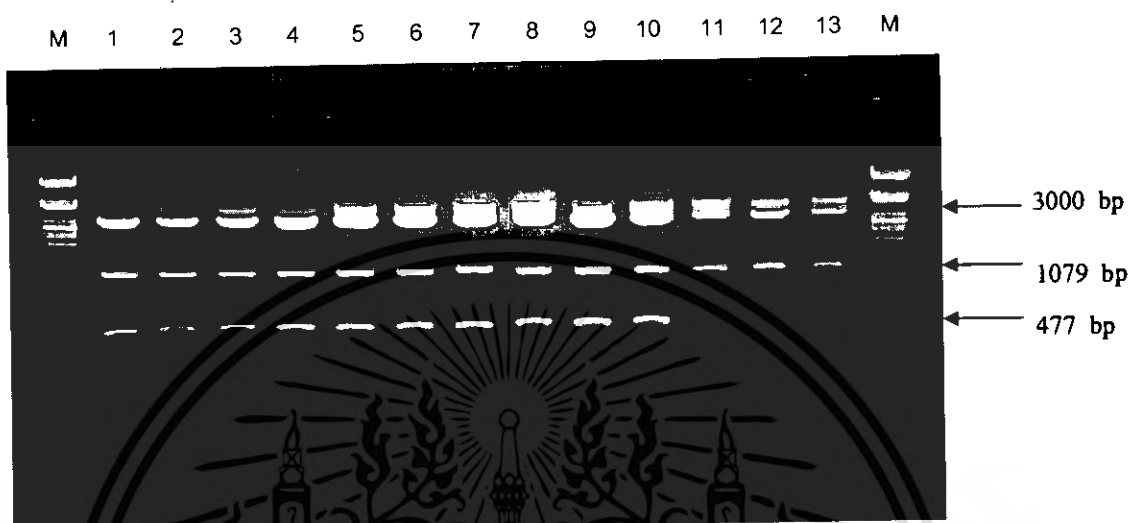
การคัดเลือกพลาสมิด pGEM ที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และตรวจผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานได้ผลเป็นดังรูปที่ 12 พบว่าโคลนหมายเลข 1 ถึง 14 มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1556 คู่เบสแทรกอยู่ ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์



รูปที่ 12 ผลการตัดพลาสมิด pGEM ด้วย *Bam*HI เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่คาดว่ามีส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1556 คู่เบสแทรกอยู่ (1-14 คือ หมายเลข โคลนของพลาสมิดที่สกัดได้ซึ่งเป็นหมายเลขเดิมกับรูปที่ 9 และตัดด้วย *Bam*HI – คือ เบื้อง โคลนของพลาสมิดด้านข้าง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

4.1.3 ผลการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pGEM

ทำการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Bg*III ตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลเป็นดังรูปที่ 13



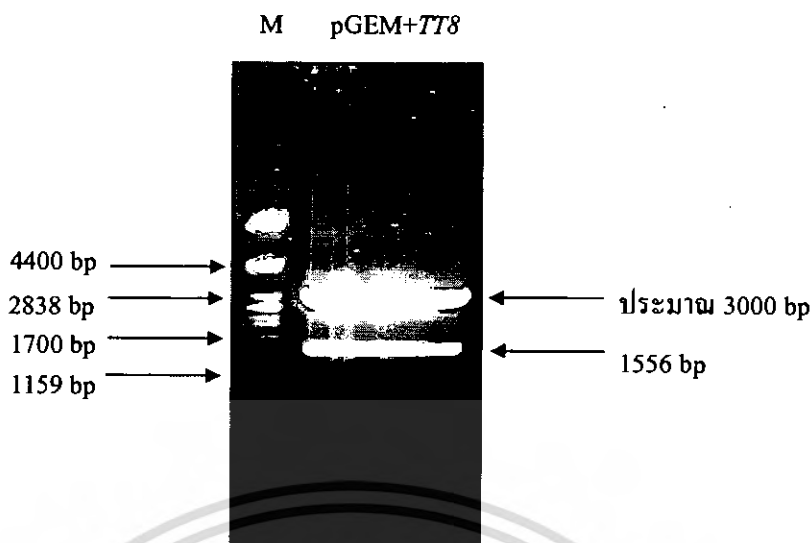
รูปที่ 13 ผลการตัดพลาสมิด pGEM ที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Bg*III เพื่อตรวจสอบชนิดของชิ้นดีเอ็นเอ (1-13 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิดที่สกัดได้ ซึ่งตัดด้วย *Bam*HI และ *Bg*III M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

หลังจากการตัดพลาสมิดด้วย *Bam*HI และ *Bg*III ในเบื้องต้นคาดว่าโคลนของพลาสมิดที่สกัดได้น่าจะเป็น *TT8* เนื่องจากพบแถบของดีเอ็นเอ 3 ชั้น ได้แก่ แถบของเวกเตอร์ซึ่งมีขนาดประมาณ 3000 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอ 2 ชั้น ซึ่งมีขนาด 477 และ 1079 คู่เบส ใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยนำลำดับเบสของ ORF *TT8* มาหาจุดตัดของ *Bg*III

4.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับ *Agrobacterium* expression vector

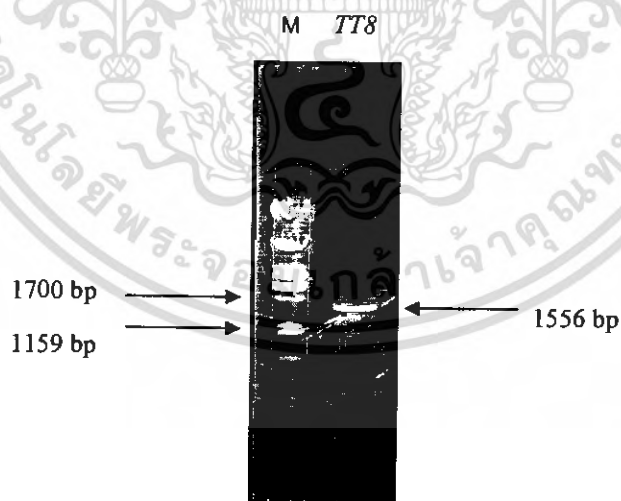
4.2.1 ผลการเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

ตัดชิ้นดีเอ็นเอของยีน *TT8* ที่ต้องการออกจากพลาสมิด pGEM ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *TT8* และ พลาสมิด pGEM ขนาดใกล้เคียง 1556 และ 3000 คู่เบส ตามลำดับดังรูปที่ 14



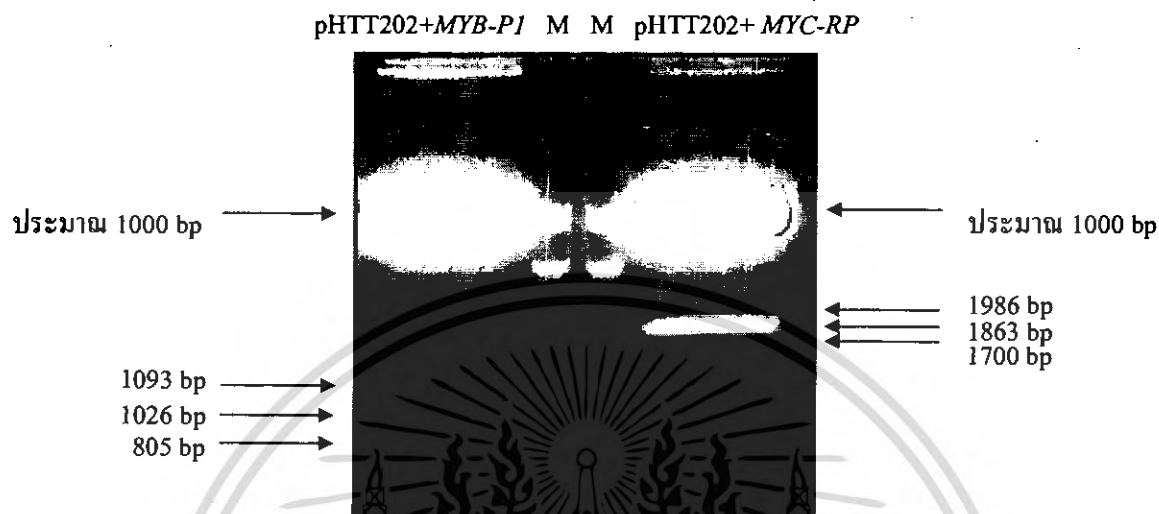
รูปที่ 14 การแยกชิ้นดีเอ็นเอของ *TT8* ออกจากพลาสมิด pGEM โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และตรวจสอบผลโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (pGEM+*TT8* คือ พลาสมิด pGEM ที่มีชิ้นดีเอ็นเอ *TT8* และทำการตัดด้วย *Bam*HI M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

ตัดแยกชิ้นส่วน *TT8* มาจากเจล แยกชิ้นส่วน *TT8* จากเจลโดยวิธีใช้วิธีตามGFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit ของ Amersham Pharmacia Biotech ตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *TT8* บริสุทธิ์ ซึ่งมีขนาดใกล้เคียง 1556 คู่เบส ดังรูปที่ 15



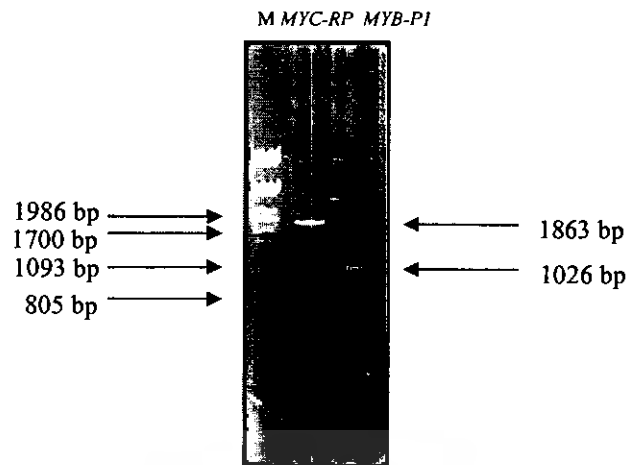
รูปที่ 15 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *TT8* บริสุทธิ์ (*TT8* คือ ชิ้นดีเอ็นเอ *TT8* M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

แยกชิ้นดีเอ็นเอของยีน *MYB-PI* และ *MYC-RP* ออกจากพลาสมิด pHTT202 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *MYB-PI* *MYC-RP* และพลาสมิด pHTT202 ขนาดใกล้เคียง 1026 1863 และ 10000 คู่เบส ตามลำดับดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 การแยกชิ้นดีเอ็นเอของ *MYB-PI* และ *MYC-RP* ออกจากพลาสมิด pHTT202 โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และตรวจสอบผลโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (pHTT202+*MYB-PI* คือ พลาสมิด pHTT202 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอ *MYB-PI* และทำการตัดด้วย *Bam*HI pHTT202+*MYC-RP* คือ พลาสมิด pHTT202 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอ *MYC-RP* และทำการตัดด้วย *Bam*HI M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

และเมื่อนำเจลที่ได้มาแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยวิธีใช้วิธีตาม GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit ของ Amersham Pharmacia Biotech ตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *MYB-PI* และ *MYC-RP* มีขนาดใกล้เคียง 1026 และ 1863 คู่เบสตามลำดับ ดังรูปที่ 17

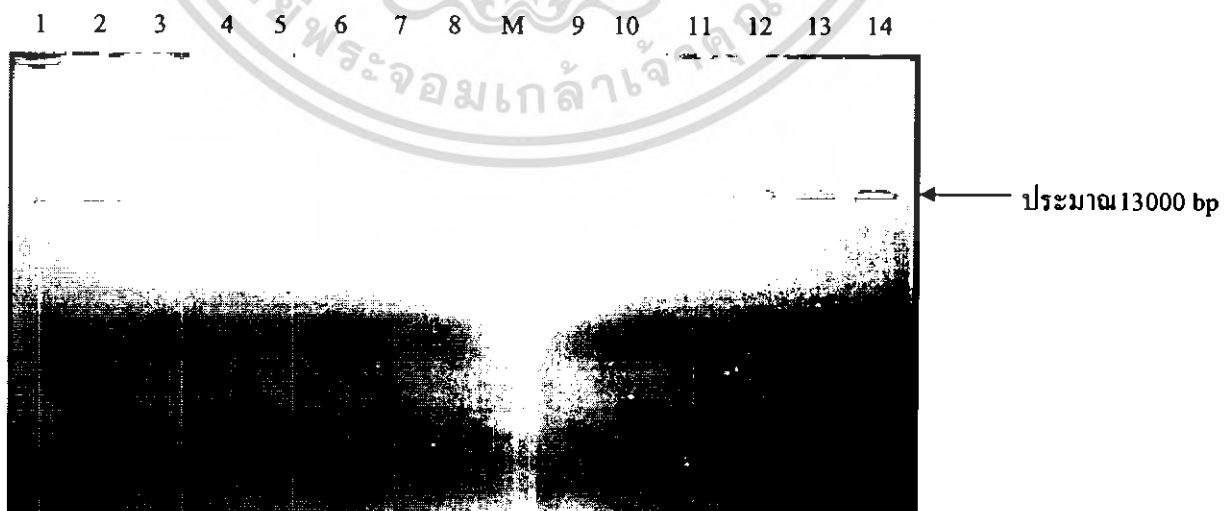


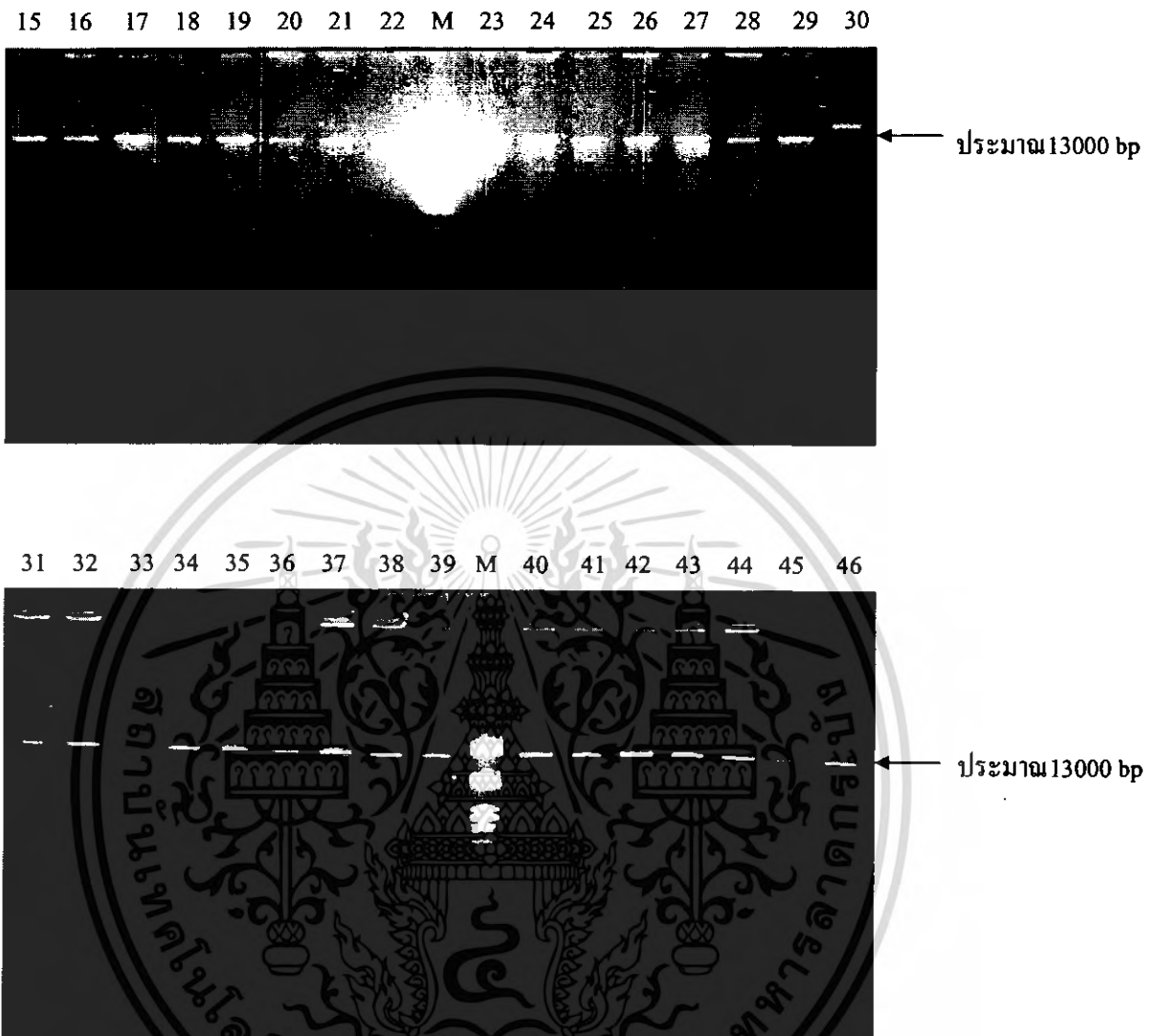
รูปที่ 17 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ MYC-RP และ MYB-P1 (MYC-RP คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ MYC-RP MYB-P1 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ MYB-P1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

4.2.2 ผลการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิดที่เป็น *Agrobacterium* expression vector

จากการถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ TT8 MYC-RP และ MYB-P1 กับเวกเตอร์ pBI121 เข้าสู่ *E. coli* ทำการคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิด pBI121 โดยการเลี้ยงเซลล์บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน

ทำการคัดเลือกโคลนของ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBI121 แบบสุ่ม และสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือก ผลการสกัดพลาสมิด pBI121 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอ TT8 MYC-RP และ MYB-P1 แทรกอยู่ โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI ตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าโคลนหมายเลข 1 ถึง 46 ไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอแทรกอยู่ในพลาสมิด pBI121 ผลเป็นดังรูปที่ 18





รูปที่ 18 ผลการตัดพลาสมิด pBI121 ด้วย *Bam*HI เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่คาดว่ามีชิ้นดีเอ็นเอ *TT8* *MYC-RP* และ *MYB-P1* แทรกอยู่ (1-14 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิดที่สกัดได้ซึ่งเชื่อมต่อกับ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *TT8* และตัดด้วย *Bam*HI 15-30 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิดที่สกัดได้ซึ่งเชื่อมต่อกับ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *MYC-RP* และตัดด้วย *Bam*HI 31-46 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิด ที่สกัดได้ซึ่งเชื่อมต่อกับ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *MYB-P1* และตัดด้วย *Bam*HI และ M คือ ดีเอ็นเอ มาตรฐาน)

4.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย

การสร้างสายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของยีนเนื่องจากพลาสมิด pBI121+*IT8* pBI121+ *MYC-RP* และ pBI121+ *MYB-PI* จากการตรวจสอบพบว่าไม่สามารถเชื่อมต่อกันได้ (จากรูปที่ 14) จึงใช้ pHTT202 + *MYC-RP* และ pHTT202 + *MYB-PI* (ได้จากมหาวิทยาลัยชิบะ ประเทศญี่ปุ่น) มาทำการถ่ายโอนพลาสมิด ดังกล่าวเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ C58C1 pGV3850 เพื่อสร้างสายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของยีนชนิดดังกล่าว

4.3.1 ผลการตรวจสอบการถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจสอบการถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย และตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานได้ผลดังรูปที่ 19



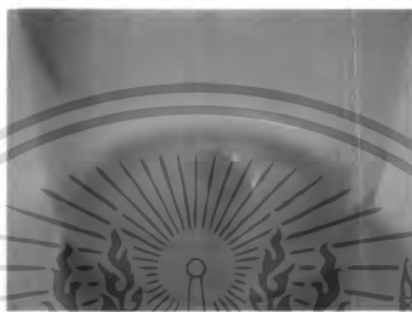
รูปที่ 19 ผลการตรวจสอบการถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (หมายเลข 1 คือ pHTT202 + *MYB-PI* หมายเลข 2 และ 3 คือ พลาสมิดที่สกัดจากอะโกรแบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายโอนยีน pHTT202 + *MYB-PI* หมายเลข 4 คือ pHTT202 + *MYC-RP* หมายเลข 5 และ 6 คือ พลาสมิดที่สกัดจากอะโกรแบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายโอนยีนคือ pHTT202 + *MYC-RP* N คือ ดีเอ็นเอที่สกัดจากอะโกรแบคทีเรียที่ไม่ได้รับเวกเตอร์ pHTT202 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

คาดว่าพลาสมิดที่ถ่ายโอนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย เนื่องจากเกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 385 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับข้อมูลใน GenBank เมื่อใช้ไพรเมอร์ CaMV 35S ที่มีคู่สมกับบริเวณ CaMV 35S promoter ใน pHTT202 ในขณะที่อะโกรแบคทีเรียที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีนไม่ปรากฏแถบดังกล่าว

4.4 การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

4.4.1 การถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเข้าสู่ต้นยาสูบ

เมื่อนำเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ pHTT202 + *MYC-RP* และ pHTT202 + *MYB-PI* ที่ได้จากในข้อ 4.3 มาทำการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ใบยาสูบ เลี้ยงชิ้นส่วนใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นเวลา 3 วัน ก่อนย้ายลงในอาหารสูตรเดียวกันที่มียาปฏิชีวนะคาร์เบนนิซิลินเพื่อฆ่าอะโกรแบคทีเรีย และยาปฏิชีวนะคานามัยซิน เพื่อคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีน ดังรูปที่ 20



รูปที่ 20 ชิ้นส่วนใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน โดยอะโกรแบคทีเรีย

4.4.2 ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน

ทำการนับจำนวนใบที่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสแล้วทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนของอะโกรแบคทีเรียในแต่ละสายพันธุ์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 จำนวนใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนชิ้นส่วนของยีนควบคุมชนิดต่างๆ และสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้

สายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของยีนควบคุมชนิดต่างๆ	จำนวนใบที่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้	เปอร์เซ็นต์ใบที่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้
pHTT202 + <i>MYC-RP</i> sense	2 ใบ	8 %
pHTT202 + <i>MYB-PI</i> sense	6 ใบ	24 %

การคัดเลือกใบเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนจะทำการคัดเลือกใบที่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ (ดังรูปที่ 21) ซึ่งเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหาร MS ปกติ ที่มียาปฏิชีวนะคาร์เบนนิซิลินเพื่อฆ่าอะโกรแบคทีเรีย และยาปฏิชีวนะคานามัยซิน แคลลัสจะสามารถเจริญไปเป็นยอดได้ทำให้สามารถคัดเลือกต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์ซึ่งคาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีนได้



รูปที่ 21 การพัฒนาไปเป็นแคลลัสของใบยาสูบ

4.5 การคัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน

คัดเลือกโดยเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินแล้วสามารถเจริญเป็นยอด และจากยอดสามารถเจริญเป็นต้นพืชที่มีลักษณะสมบูรณ์ คือ ส่วนของลำต้น ใบมีสีเขียว และมีราก พบว่าแคลลัสที่คาดว่าจะยีน *MYC-RP* และ *MYB-PI* สามารถเกิดยอดได้ 4 และ 16 ยอด ตามลำดับ แต่จากยอดเมื่อทำการคัดเลือกโดยเลี้ยงต้นพืชในอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินระยะเวลา 2 เดือนพบว่ายอดที่คาดว่าจะยีน *MYC-RP* และ *MYB-PI* พบว่าไม่มีรากเกิดขึ้น ลักษณะยอดบางส่วนแห้งเหลืองถึงขาวซีด แต่ยังมีบางส่วนยังสามารถเจริญเป็นต้นพืชได้ ดังรูปที่ 22 และมียอดที่ยีน *MYC-RP* และ *MYB-PI* เหลือ 1 และ 2 ยอดตามลำดับ



(ก)

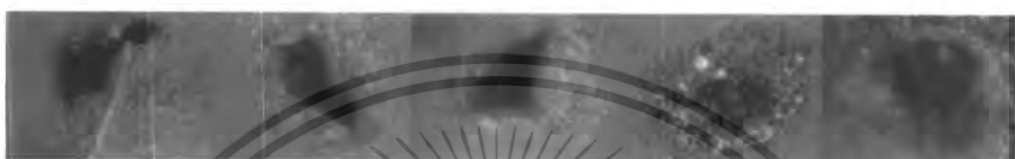
(ข)

รูปที่ 22 แสดงภาพยอดที่สามารถเจริญจากแคลลัสได้ (รูป (ก) คือภาพของยอดที่เจริญจากแคลลัสได้ และทำการคัดเลือกโดยทำการเลี้ยงต้นพืชในอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินระยะเวลา 2 อาทิตย์ และรูป (ข) คือภาพของยอดที่เจริญจากแคลลัสได้ของ และทำการคัดเลือกโดยทำการตัดยอดเพื่อเลี้ยงเป็นต้นพืชในอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินระยะเวลา 2 เดือน)

4.6 ตรวจสอบการแสดงออกของพืชทดลองที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมาทดสอบการต้านทานต่อโรคพืช

4.6.1 ผลการตรวจสอบการผลิตสารประกอบฟีนอลิกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

นำพืชทดลอง (มียีน *CHS* และ *DFR*) ที่มีลักษณะสมบูรณ์ และมีลักษณะใกล้เคียงกัน นำมาทดสอบการต้านทานต่อโรคพืช ซึ่งใช้ *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea* เพื่อให้ติดเชื้อโรคในต้นยาสูบ โดยใช้ต้นยาสูบปกติเป็นตัวควบคุม ระดับการผลิตสารประกอบฟีนอลิกให้เป็นระดับคะแนนดังรูปที่ 23 ผลในการผลิตสารประกอบฟีนอลิกแสดงดังตารางที่ 8



(ก) (ข) (ค) (ง) (จ)

รูปที่ 23 ระดับคะแนนของการผลิตสารประกอบฟีนอลิก (รูป(ก) คือ ระดับ 0 รูป(ข) คือ ระดับ 1 รูป(ค) คือ ระดับ 2 รูป(ง) คือ ระดับ 3 รูป(จ) คือ ระดับ 4)

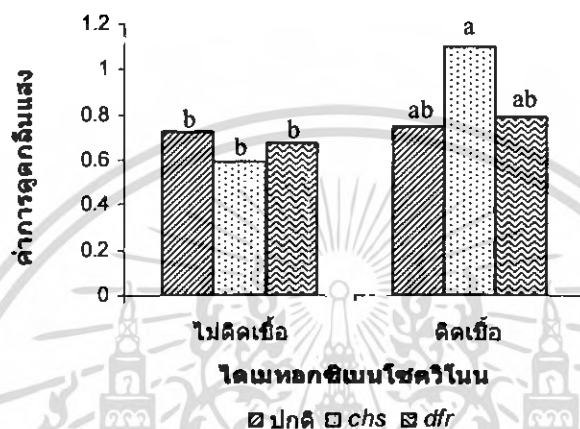
ตารางที่ 8 การผลิตสารประกอบฟีนอลิกในต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และต้นยาสูบที่มียีน *DFR*

จำนวนซ้ำ	ต้นยาสูบ	ปกติ		มียีน <i>CHS</i>		มียีน <i>DFR</i>	
		ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ
1		ระดับ 1	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ 3	ระดับ 3
2		ระดับ 2	ระดับ 2	ระดับ 1	ระดับ 3	ระดับ 2	ระดับ 4
3		ระดับ 1	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ 3	ระดับ 3
4		ระดับ 3	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ 4	ระดับ 1	ระดับ 2
5		ระดับ 0	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ 3	ระดับ 1	ระดับ 2
	เฉลี่ย	1.4 ^c	1.6 ^c	2.2 ^{abc}	3.2 ^a	2 ^{bc}	2.8 ^{ab}

* ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT (p=0.05)

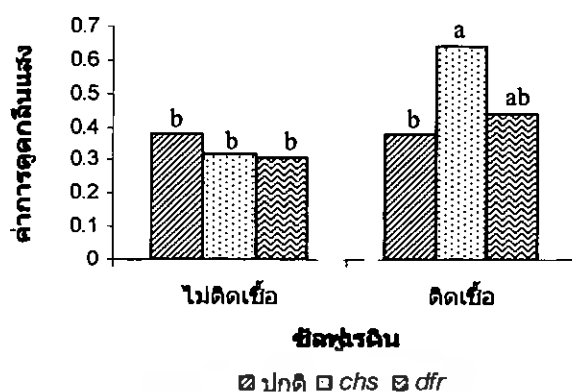
4.6.2 ตรวจสอบการผิติดสารด้วยเครื่องสเปกโทโฟโตมิเตอร์

เมื่อทำการสกัดสาร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่จำเพาะต่อสารนั้น สารในกลุ่มเบนโซควิโนนคือ โดเมทอกซิเบนโซควิโนน พบว่าค่าการดูดกลืนแสงในสารสกัดจากต้นยาสูบที่มีขึ้น *CHS* ที่ติดเชื้อมีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มีขึ้น *CHS* ต้นยาสูบที่มีขึ้น *DFR* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่สารสกัดจากต้นยาสูบปกติ และต้นยาสูบที่มีขึ้น *DFR* ทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อพบว่าไม่แตกต่างทางสถิติ ดังรูปที่ 24



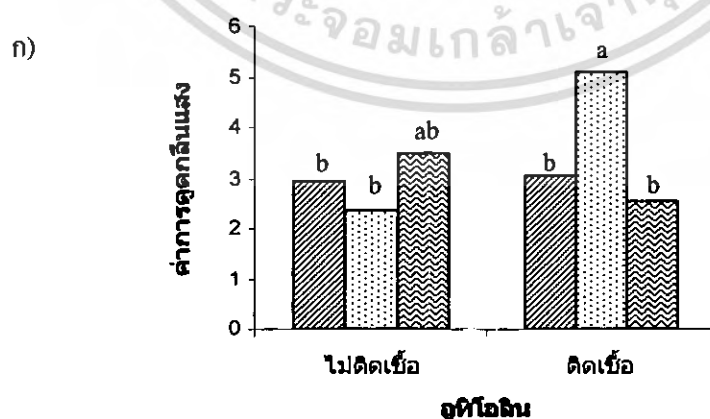
รูปที่ 24 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเบนโซควิโนน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มีขึ้น *CHS* และต้นยาสูบที่มีขึ้น *DFR* ทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ สารโดเมทอกซิเบนโซควิโนนที่ 377 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 6 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p < 0.05$)

สารกลุ่มออกโรน พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารซัลฟูเรตินในสารสกัดจากต้นยาสูบที่มีขึ้น *CHS* เมื่อติดเชื้อมีค่ามากกว่าสารสกัดจากต้นยาสูบปกติที่ติดเชื้อ รวมถึงต้นยาสูบต้นปกติ ต้นยาสูบที่มีขึ้น *CHS* และต้นยาสูบที่มีขึ้น *DFR* ที่ไม่ติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 25

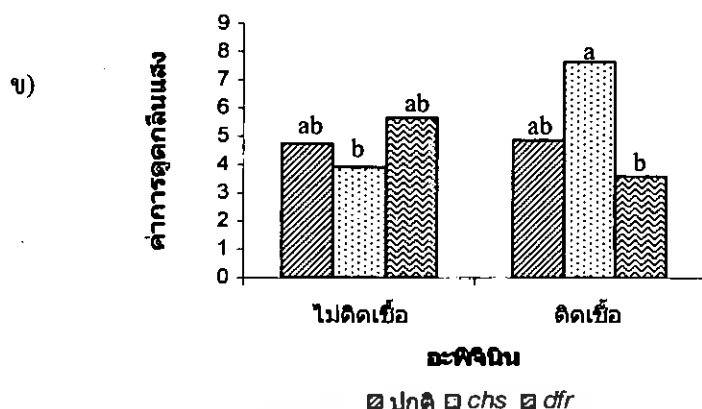


รูปที่ 25 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มออโรน จัลฟูเรตินที่ 399 นาโนเมตร ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน CHS และต้นยาสูบที่มียีน DFR ทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 6 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

สารกลุ่มเฟลโวน พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารลูทิโอลินในสารสกัดจากต้นยาสูบที่มียีน CHS เมื่อติดเชื้อมีค่ามากกว่าสารสกัดต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน DFR ที่ติดเชื้อ รวมถึงต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน CHS และต้นยาสูบที่มียีน DFR ที่ไม่ติดเชื้อ ส่วนสารอะพิจนินปรากฏว่าสารสกัดจากต้นยาสูบที่มียีน CHS เมื่อติดเชื้อมีค่ามากกว่าสารสกัดจากต้นยาสูบที่มียีน DFR ที่ติดเชื้อ และต้นยาสูบที่มียีน CHS ที่ไม่ติดเชื้อ แต่สารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน DFR ที่ติดเชื้อ มีค่าการดูดกลืนแสงไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน DFR และต้นยาสูบที่มียีน CHS ที่ไม่ติดเชื้อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 26

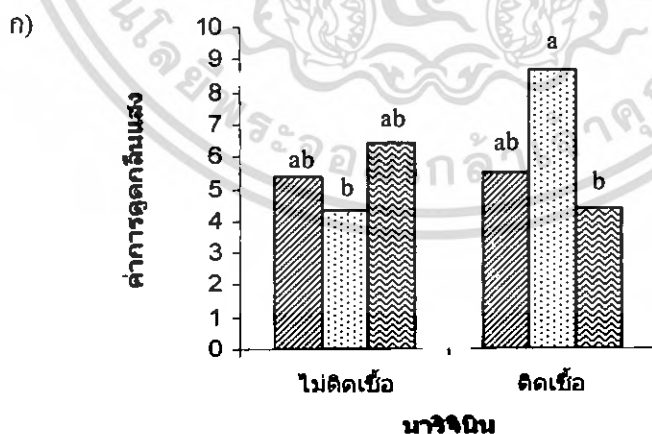


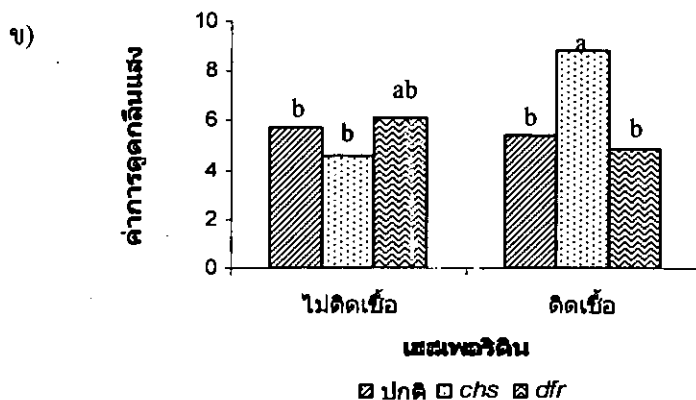
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 26 ผลการวัดค่าการดุดกลิ่นแสงของสารกลุ่มเฟลโวน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน CHS และต้นยาสูบที่มียีน DFR ทั้งที่ดิดเชื้อและไม่ดิดเชื้อ ก) สารลูทีโอลินที่ 350 นาโนเมตร ข) สารอะพีเจนินที่ 336 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 6 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

สารในกลุ่มเฟลโวน พบว่าค่าการดุดกลิ่นแสงของสารนารีจินิก และเฮสเพอริตินในสารสกัดจากต้นยาสูบที่มียีน CHS ที่ดิดเชื้อมีค่ามากกว่าสารสกัดจากต้นยาสูบที่มียีน CHS ที่ไม่ดิดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ค่าการดุดกลิ่นแสงของสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน DFR ที่ดิดเชื้อ ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน CHS และต้นยาสูบที่มียีน DFR ที่ไม่ดิดเชื้อ ดังรูปที่ 27

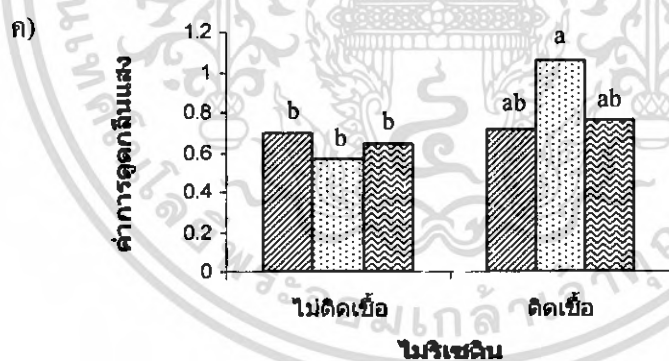
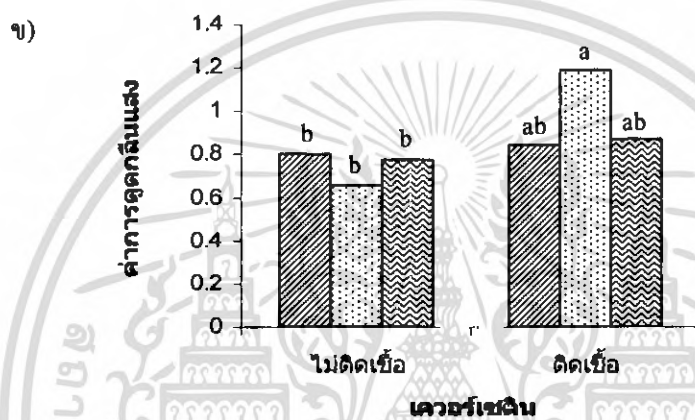
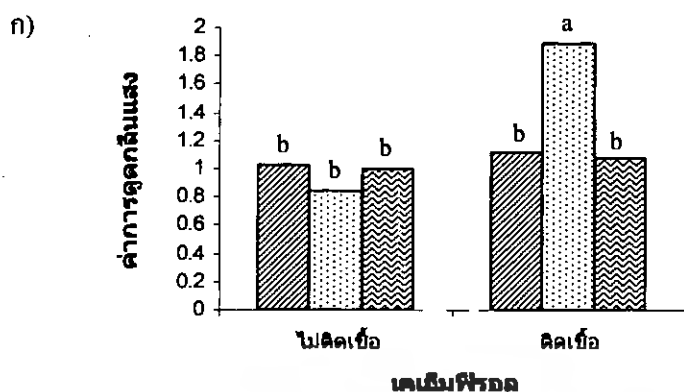




รูปที่ 27 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลวาโนน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน CHS และต้นยาสูบที่มียีน DFR ทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ ก) สารนาโรจินที่ 330 นาโนเมตร ข) สารเฮสเพอริดินที่ 300 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 6 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

สารในกลุ่มเฟลวาโนล พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารเคเอ็มพีรอล เคอร์เซติน และไมริเซตินในสารสกัดจากต้นยาสูบที่มียีน CHS ที่ติดเชื้อมีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ยาสูบที่มียีน CHS และยาสูบที่มียีน DFR ที่ไม่ติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน DFR ที่ติดเชื้อไม่แตกต่างทางสถิติกับต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน CHS ต้นยาสูบที่มียีน DFR ดังรูปที่ 28

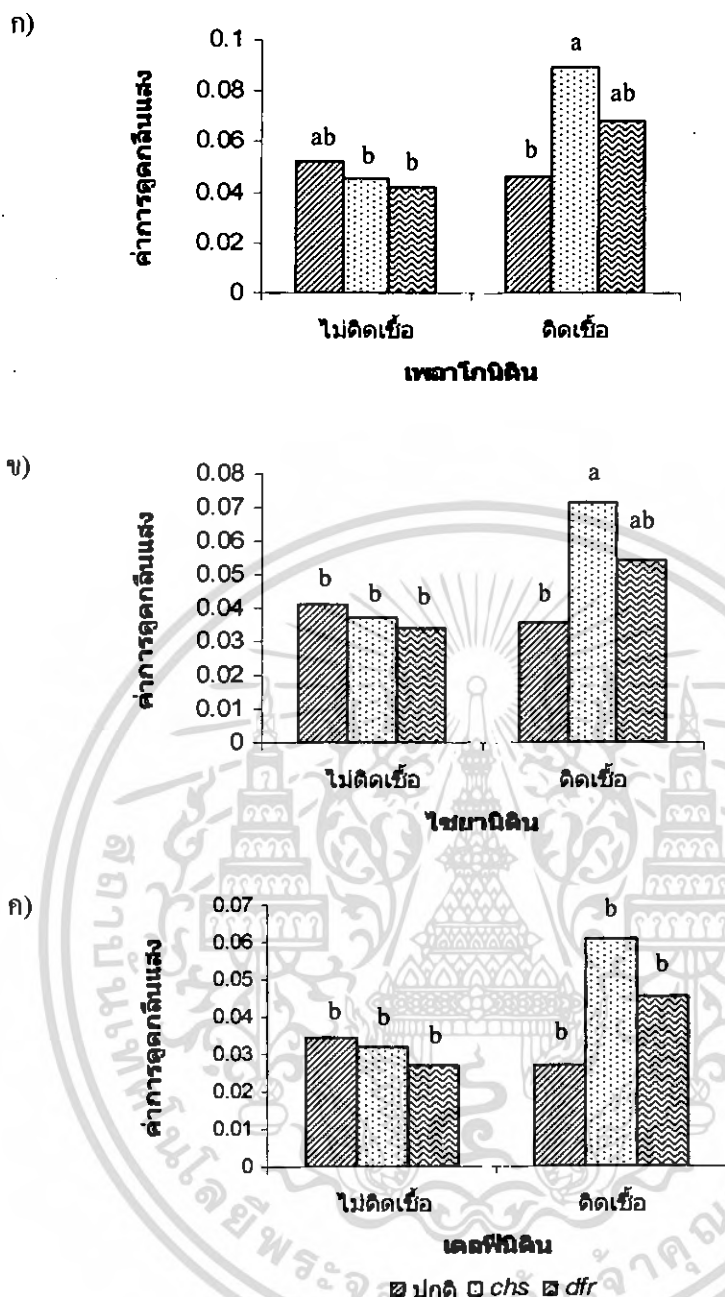
สารในกลุ่มแอนโทไซยานิน พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารเพลาโกนินดิน ไชยานินดิน และเคลฟินิดินในสารสกัดจากต้นยาสูบที่มียีน CHS ที่ติดเชื้อมีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ยาสูบที่มียีน CHS และยาสูบที่มียีน DFR ที่ไม่ติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากต้นยาสูบที่มียีน DFR ที่ติดเชื้อมีค่าเพิ่มมากขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับต้นยาสูบที่มียีน DFR ที่ไม่ติดเชื้อ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน DFR ทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อปรากฏว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังรูปที่ 29



▨ ปกติ □ chs ▤ dfr

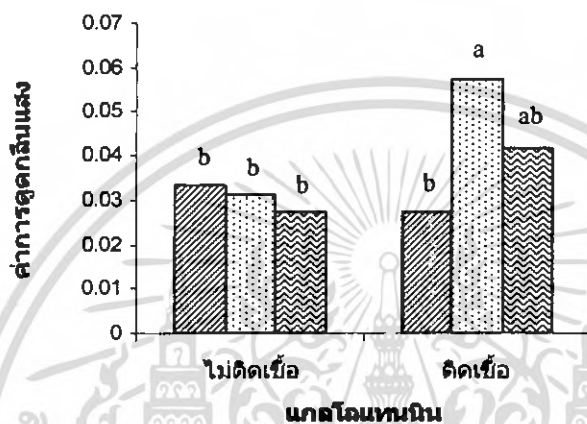
รูปที่ 28 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มฟลูออโรโพลีเมอร์ ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มีเชื้อ *CHS* และต้นยาสูบที่มีเชื้อ *DFR* ทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ ก) สารเคเอ็มพีรอลที่ 368 นาโนเมตร ข) สารเคอร์เซดินที่ 374 นาโนเมตร ค) สารโมริเซดินที่ 378 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 6 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 29 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแอนโทไซยานิน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มีเชื้อ *CHS* และต้นยาสูบที่มีเชื้อ *DFR* ทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ ก) สารเพลาโกนินดินที่ 520 นาโนเมตร ข) สารไชยานินดินที่ 535 นาโนเมตร ค) สารเคลฟีนินดินที่ 546 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 6 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

สารในกลุ่มแทนนิน พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารแกลโลแทนนินในสารสกัดจากต้นยาสูบที่มีชั้น *CHS* ที่ติดเชื้อมีค่าการดูดกลืนแสงของสารแกลโลแทนนินมากกว่าสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ยาสูบที่มีชั้น *CHS* และยาสูบที่มีชั้น *DFR* ที่ไม่ติดเชื้อมีความสำคัญทางสถิติ ขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากต้นยาสูบที่มีชั้น *DFR* ที่ติดเชื้อมีค่าเพิ่มมากขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับต้นยาสูบที่มีชั้น *DFR* ที่ไม่ติดเชื้อ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มีชั้น *DFR* ทั้งที่ติดเชื้อมีและไม่ติดเชื้อมีค่าการดูดกลืนแสงไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังรูปที่ 30

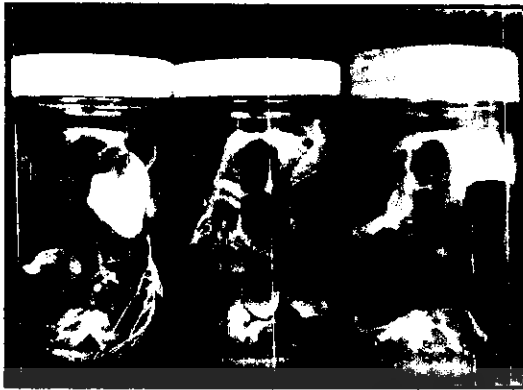


รูปที่ 30 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแทนนิน ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มีชั้น *CHS* และต้นยาสูบที่มีชั้น *DFR* ทั้งที่ติดเชื้อมีและไม่ติดเชื้อมี สารแกลโลแทนนินที่ 550 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 6 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

4.6.3 ผลการตรวจตอบด้วยการสังเกตลักษณะทางสรีรวิทยาของใบยาสูบ

ต้นพืชทดลอง (มีชั้น *DFR* และ *CHS*) เมื่อนำมาทดสอบการต้านทานต่อโรคพืช *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea* เพื่อทำให้เกิดโรคในต้นยาสูบทดลอง โดยใช้ต้นยาสูบปกติเป็นตัวควบคุม จากนั้นสังเกตลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นยาสูบทดลองหลังจากติดเชื้อเป็นระยะเวลา 1 เดือน ดังรูปที่ 31

จากรูปที่ 31 (ก) และ (ข) พบว่าต้นยาสูบที่มีชั้น *CHS* และ ต้นยาสูบที่มีชั้น *DFR* สามารถทนต่อโรคได้ดีกว่าต้นยาสูบปกติ และต้นยาสูบที่มีชั้น *CHS* มีแนวโน้มทนได้ดีกว่าต้นยาสูบที่มีชั้น *DFR*



(ก)



(ข)

รูปที่ 31 ผลการตรวจสอบการสังเกตทางสรีรวิทยาของต้นยาสูบ รูป (ก) คือภาพของต้นยาสูบที่ไม่ติดโรค และรูป (ข) คือภาพของต้นยาสูบที่ทำให้ติดโรคโดย *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 การโคลนยีน

จากการโคลนยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์จาก cDNA ของอะรามิโดปซิสโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ร่วมที่สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ครอบคลุมบริเวณ ORF ของ *TT8* แล้วนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้เชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pGEM เพื่อเพิ่มจำนวน และทำการตรวจสอบโคลน พบว่าได้โคลนที่เป็น *TT8* จำนวนทั้งหมด 14 โคลน จากนั้นนำโคลนที่เป็น *TT8* ทั้ง 14 โคลนมาตรวจสอบโคลนที่คาดว่าจะจะเป็น *TT8* โดยหลังจากตรวจสอบ พบว่าได้โคลนที่เป็น *TT8* ทั้งหมด 13 โคลน จากนั้นนำโคลน *TT8* มาทำให้บริสุทธิ์เพื่อแยกเอาเฉพาะชิ้นส่วนยีน *TT8* ที่ต้องการเท่านั้น

5.2 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ *Agrobacterium* expression vector

เมื่อนำพลาสมิด pBI121 ที่คาดว่าจะได้รับชิ้นส่วนของยีน *TT8 MYC-RP* และ *MYB-P1* มาตรวจสอบโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI พบว่าสามารถโคลนยีน *TT8* ได้แต่ไม่สามารถเชื่อมต่อชิ้นส่วนของยีน *TT8 MYC-RP* และ *MYB-P1* เข้าสู่ *Agrobacterium* expression vector (pBI121) ได้

5.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่โกรแบคทีเรีย

เนื่องจากไม่สามารถทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนของยีน *TT8 MYC-RP* และ *MYB-P1* เข้าสู่เวกเตอร์ pBI121 ได้ ดังนั้นจึงเปลี่ยนมาใช้เวกเตอร์ pHTT202 ที่มียีน *MYC-RP* และ *MYB-P1* (ได้รับมาจากมหาวิทยาลัยชิบะ) เพื่อใช้ในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่โกรแบคทีเรีย จากนั้นนำโคลนที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีนดังกล่าวมาตรวจสอบโดยเทคนิคพีซีอาร์และใช้ไพรเมอร์ CaMV 35S ที่มีคู่สมกับบริเวณ CaMV 35S promoter ใน pHTT202 พบว่าโคลนที่ได้มีเวกเตอร์ pHTT202 ที่มียีน *MYC-RP* และ *MYB-P1* แทรกอยู่ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอจากโคลนปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน

5.4 การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้โกรแบคทีเรีย

5.4.1 การถ่ายโอนยีนโดยใช้โกรแบคทีเรียเข้าสู่ยาสูบ

การศึกษาการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบ โดยถ่ายโอน pHTT202 ที่มียีน *MYC-RP* และ *MYB-P1* แทรกอยู่ โดยใช้เชื้อโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ C58C1 pGV3850 ใบยาสูบที่ได้รับการถ่าย

โหนดเตอร์ pHTT202 ที่มียีน *MYC-RP* แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์มีการเจริญไปเป็นแคลลัสได้ 2 ใบ จากทั้งหมด 50 ใบ คิดเป็น 8 เปอร์เซ็นต์ และ เวกเตอร์ pHTT202 ที่มียีน *MYB-P1* แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์มีการเจริญไปเป็นแคลลัสได้ 6 ใบ จากทั้งหมด 50 ใบ คิดเป็น 24 เปอร์เซ็นต์

5.4.2 ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน

จากใบยาสูบที่พัฒนาเป็นแคลลัสที่ได้รับการถ่ายโอนยีนของ pHTT202 ที่มียีน *MYC-RP* และ *MYB-P1* แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ พบว่าสามารถเจริญไปเป็นแคลลัสได้ 8 และ 24 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นเพราะเวกเตอร์ pHTT202 เป็นระบบ co-integrate vector จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนได้น้อย

5.5 การคัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน

เมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการถ่ายโอนยีน pHTT202 ที่มียีน *MYC-RP* และ *MYB-P1* แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์มาชักนำให้เกิดยอดพบว่าแคลลัสที่ได้สามารถเจริญเป็นยอดที่มีลักษณะใบเขียว ลำต้นแข็งแรงได้ 4 และ 16 ยอด ตามลำดับ แต่เมื่อนำยอดที่ได้ไปเลี้ยงในอาหาร MS ปกติ ที่มีคานามัยซิน พบว่าไม่มีรากเกิดขึ้น ลักษณะยอดบางส่วนแห้งเหลืองถึงขาวซีด แต่ยังมีบางส่วนยังสามารถเจริญเป็นต้นพืชได้ และมียอดของยีน *MYC-RP* และ *MYB-P1* เหลือ 1 และ 2 ยอด ตามลำดับ

5.6 การแสดงออกของพืชทดลองที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมาทดสอบการต้านทานต่อโรคพืช

5.6.1 ผลการตรวจสอบการผลิตสารประกอบฟีนอลิกภายใต้กึ่งห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิห้อง

การผลิตสารประกอบฟีนอลิกของต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และ *DFR* ที่ติดเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *glycinica* มีการผลิตสารประกอบกลุ่มนี้มากกว่าต้นยาสูบที่มียีน *CHS* *DFR* ที่ไม่ติดเชื้อ และต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมีการผลิตสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าต้นยาสูบปกติ จึงสรุปได้ว่าต้นยาสูบที่มียีน *CHS* มีการผลิตสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมาคือต้นยาสูบที่มียีน *DFR* และต้นยาสูบปกติมีการผลิตน้อยที่สุด

5.6.2 ผลการตรวจสอบการผลิตสารด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

จากการศึกษาปริมาณของสารในกลุ่มเบนโซควิโนน และฟลาวอนอยด์โดยใช้วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นจำเพาะของสารแต่ละชนิด เมื่อนำสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และต้นยาสูบที่มียีน *DFR* มาวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าต้นยาสูบที่มียีน *CHS* มีการผลิตสารทั้ง 7 กลุ่ม (เบนโซควิโนน ออโรน ฟลาวอน ฟลวาโนน ฟลาวอนอล แอนโทไซยานิน

และแทนนิน) เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน *DFR* ทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ ขณะที่ต้นยาสูบที่มียีน *DFR* ที่ติดเชื้อมีการผลิตสารกลุ่มแอนโทไซยานิน และแทนนินเพิ่มมากขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบปกติที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ

5.6.3 ผลการตรวจดูด้วยลักษณะทางสรีรวิทยา

เมื่อสังเกตลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นยาสูบที่มียีน *CHS* *DFR* และต้นยาสูบปกติที่ติดเชื้อจาก *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* พบว่าต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และ *DFR* สามารถทนต่อโรคได้ดีกว่าต้นยาสูบปกติ โดยต้นยาสูบที่มียีน *CHS* มีแนวโน้มในการทนต่อโรคได้ดีกว่าต้นยาสูบที่มียีน *DFR* และต้นยาสูบปกติ จึงสรุปได้ว่า ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* มีแนวโน้มในการต้านทานต่อโรคพืช *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* ได้ดี และกลุ่มสารในชีวสังเคราะห์ฟลโวนอยด์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานต่อโรคพืชคือ กลุ่มสาร ในช่วงต้นของวิถีชีวสังเคราะห์ฟลโวนอยด์



เอกสารอ้างอิง

- กนกพร สมพรไพหลิน. 2547. บทปฏิบัติการวิชาพันธุวิศวกรรม. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- กนกพร สมพรไพหลิน. 2548. บทปฏิบัติการวิชาเทคโนโลยีชีวภาพของพืช. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- กนกพร สมพรไพหลิน. 2545. ผลของชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินต่อการควบคุมสีในพืช. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 10(1): 23-27.
- รัชชัย รัตนเลิศ. 2540. ศัตรูพืชและการจัดการ. เทคโนโลยีสารกำจัดวัชพืช.
- สตฤดี ประเทืองวงศ์. 2527. โรคพืชไรโบเลี้ยงอยู่ในโรคพืชทั่วไปและบทปฏิบัติการ. ภาควิชาโรคพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ : 169 – 222.
- Baudry, A., Heim, M.A., Dubreucq, B., Caboche, M., Weisshaar, B. and Lepiniec, L. 2004. *TT2*, *TT8*, and *TTG1* synergistically specify the expression of *BANYULS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 39 : 366-380.
- Winkel-Shirley, B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology and Biotechnology. *Plant Physiol.* 26: 485-493.
- Goff, S.A., Cone, K.C., and Chandler, V.L. 1992. Functional analysis of the transcription activator encoded by the maize B-gene: Evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes Dev.* 6 : 864-875.
- Zabala, G., Zou, J., Tuteja, J., Gonzalez, D.O., Clough, S.J. and Vodkin, L.O. 2006. Transcriptome changes in the phenylpropanoid pathway of *Glycine max* in response to *Pseudomonas syringae* infection. *BMC Plant Biol.* 6:26
- Sullivan, J. 1998. Anthocyanin. [Online] Available <http://www.charlies-web.com/specialtopics/anthocyanin.html>
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J. M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N. and Caboche, M. 2006. Genetics and Biochemistry of Seed Flavonoid. *Annu.Rev. Plant Biol.* 57 : 405-430.
- Mazza, G. and Miniati, E. 1993. Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 12–13.
- Oerke, E.-C., Dehne, H.-W., Schonbeck, F. and Weber, A. 1994. Crop Production and Crop Protection: Estimated Losses in Major Food and Cash Crops. Elsevier, Amsterdam.

- Lu, Q.N. and Yang, Q. 2006. cDNA cloning and expression of anthocyanin biosynthetic genes in wild potato (*Solanum pinnatisectum*). Unpublished
- Sinclair, J.B. and O.D. Dhingra. 1975. An Annotated Bibliography of Soybean Disease 1882-1974. Int. Soybean Program. University of Illinois, Urbana. 280 p.
- Dong, X., Edward L. Braun and Grotewold, E. 2001. Functional Conservation of Plant Secondary Metabolic Enzymes Revealed by Complementation of Arabidopsis Flavonoid Mutants with Maize Genes. *Plant Physiol.* 127 : 46-57
- Yamazaki, M., Makita, Y., Springob, K. and Saito K. 2002. Regulatory mechanisms for anthocyanin biosynthesis in chemotypes of *Perilla frutescens* var. *crispa*. *Biochemical Engineering.* 14 : 191-197
- Gong, Z.Z., Yamagishi, E., Yamazaki, M. and Saito, K. 1999. A constitutively expressed *Myc*-like gene involved in anthocyanin biosynthesis from *Perilla frutescens*: molecular characterization, heterologous expression in transgenic plants and transactivation in yeast cells. *Plant Mol. Biol.* 41: 33-44
- Gong, Z.Z., Yamazaki, M. and Saito, K. 1999. A light-inducible Myb-like gene that is specifically expressed in red *Perilla frutescens* and presumably acts as a determining factor of the anthocyanin forma. *Mol. Gen. Genet.* 262: 65-72
- <http://classroom.psu.ac.th/users/yhamroe/510-111web/lecture/chapter12/tsld009.htm>
- <http://coursewares.mju.ac.th/section2/pt331/06htm>
- http://cyberlab.lh1.ku.ac.th/elearn/faculty/agriculture/agri06/lecture_8.htm
- <http://www.biotech.or.th/biotechnology-th/newsdetail.asp?id=2005>
- <http://www.forest.go.th/Ferd/ferdTHAI/pathology.html>
- <http://www.ipst.ac.th/biology/Teacher-corner/Chapter18GenDNATech.pdf>
- <http://www.kr.ac.th/ebook2/sakdanai/04.html>
- <http://www.mylesson.swu.ac.th>
- <http://www.sut.ac.th/e-texts/Agri/myweb2/link103.htm>

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani)

Bacto tryptone	10	กรัม/ลิตร
Bacto yeast extract	5	กรัม/ลิตร
NaCl	10	กรัม/ลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.2

(หากเป็นอาหารแข็ง ให้เติมวุ้น 15 กรัม/ลิตร)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB

Bacto tryptone	2	กรัม/ลิตร
Bacto yeast extract	0.2	กรัม/ลิตร
NaCl	0.0585	กรัม/ลิตร
KCl	0.0186	กรัม/ลิตร
MgCl ₂	10	มิลลิโมลาร์
MgSO ₄	10	มิลลิโมลาร์

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOC

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB	1	ลิตร
กลูโคสเข้มข้น 2 โมลาร์	10	มิลลิลิตร

4. อาหารสูตร MS

ตารางที่ 9 แสดงการเตรียม stock ของอาหารสูตร MS

สูตรอาหาร MS	ชื่อสารเคมี	ความเข้มข้น (เท่า)	จำนวนที่ใช้ (มิลลิกรัม)ต่อลิตร
stock 1	NH_4NO_3	100x	165
	KNO_3		192
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		37
	KH_2PO_4		17
stock 2	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100x	44
stock 3	H_3BO_3	1000x	3.1
	KI		0.415
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0.125
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		0.0125
stock 4	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	100x	2.23
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0.86
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		0.0025
stock 5	Na_2EDTA	100x	3.73
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		2.78
stock 6	Inositol	100x	5
	Nicotinic acid		0.025
	Pyridoxin HCl		0.025
	Thiamine HCl		0.005
	Glycine		0.1

5. อาหารสูตรชักนำแคลัส

อาหารสูตร MS เดิม	Adenine	40	มิลลิกรัม/ลิตร
	MES	0.5	กรัม/ลิตร
	Sucrose	20	กรัม/ลิตร
	BAP	1.0	มิลลิกรัม/ลิตร
	IAA	0.1	มิลลิกรัม/ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการทดลอง

1. การแยกดีเอ็นเอจากเจล (Amersham Biosciences Crop.)

- 1.1 ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสเพื่อแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการแล้ว ตัดเจลส่วนที่มีชิ้นดีเอ็นเอนั้นใส่ในหลอด eppendorf
- 1.2 เติม capture buffer ลงในหลอดจากข้อ 1 ในอัตราส่วน capture buffer 10 ไมโครลิตรต่อเจล หนึ่ง 10 มิลลิกรัม
- 1.3 บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 5-15 นาที จนกว่าเจลจะละลายหมด
- 1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่ำ เพื่อให้ของเหลวในหลอดตกลงมารวมกัน
- 1.5 ย้ายของเหลวในหลอด eppendorf ไปใส่ในจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ (GFX column) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที
- 1.6 นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอจะจับกับคอลัมน์
- 1.7 เติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในจีเอฟเอกซ์คอลัมน์อันเดิม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 1.8 ย้ายจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ใส่ในหลอด eppendorf หลอดใหม่ แล้วเติมน้ำดีไอออไนซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 20 ไมโครลิตร ลงไปในคอลัมน์ เพื่อละลายดีเอ็นเอที่ติดกับคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที
- 1.9 นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ที่ใส่ในหลอด eppendorf ไปปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 1.10 นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ออก จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในหลอด eppendorf

2. การทำคอมพิเทนท์เซลล์ (กนกพร, 2547)

- 2.1 ถ่ายเชื้อ *Escherichia coli* 1 โคลนีสลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่งมีแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที
- 2.2 ถ่ายเชื้อจากข้อ 1 ลงในอาหาร LB ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ซึ่งมีแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ โดยใช้เชื้อปริมาณเท่ากับ 1-2 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จนวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรได้ประมาณ 0.4-0.5

- 2.3 นำเซลล์แขวนลอยไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 2.4 เทส่วนอาหารทิ้ง แล้วทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งโดยใช้ TFB buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
- 2.5 วางบนน้ำแข็ง 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 2.6 เทส่วนใสทิ้ง แล้ววางหลอดบนน้ำแข็ง ทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งโดยใช้ TFB buffer ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
- 2.7 เติม DMSO 30 ไมโครลิตร เข้าให้ผสมกันพอดี
- 2.8 แบ่งเซลล์แขวนลอยลงในหลอด eppendorf หลอดละ 200 ไมโครลิตร
- 2.9 เก็บเซลล์ที่ -70 องศาเซลเซียส

3. การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์โดยวิธี heat-shock และการคัดเลือกโคลน

- 3.1 การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์
 - 3.1.1 นำคอมพีเทนท์เซลล์ซึ่งเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส มาละลายโดยวางบนน้ำแข็ง
 - 3.1.2 ดูดคอมพีเทนท์เซลล์ที่ละลายแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด eppendorf ซึ่งแช่บนน้ำแข็ง แล้วเติม ligation solution และผสมให้เข้ากัน โดยการปิเปตขึ้นลง วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
 - 3.1.3 นำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
 - 3.1.4 เติมอาหาร SOC ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 3.2 การคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าได้รับเวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, Co., Ltd.) ที่มีดีเอ็นเอแทรกอยู่
 - 3.2.1 เตรียมเพลตที่มีอาหาร LB ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน สเปรดเซลล์แขวนลอยที่เหลือนบนเพลตที่เตรียมไว้ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

4. การสกัดพลาสมิด

- 4.1 ถ่ายโอนโคโลนีเดี่ยวบนเพลตที่มีอาหาร LB ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะคานามัยซิน ลงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะคานามัยซิน (100 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

- 4.2 นำสารละลายแขวนลอยของเซลล์ ใส่หลอด eppendorf แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการเก็บเซลล์
- 4.3 เทส่วนอาหารทิ้ง เติม TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นวางหลอดบนน้ำแข็ง
- 4.4 เติม Solution II ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววางบนน้ำแข็ง 5 นาที
- 4.5 เติม Solution III ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววางบนน้ำแข็ง 5 นาที
- 4.6 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 4.7 ย้ายของเหลวส่วนบนไปใส่หลอด eppendorf ใหม่ แล้วเติมเอทานอลที่เย็นจัดเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
- 4.8 นำไปเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที
- 4.9 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทเอทานอลทิ้ง
- 4.10 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
- 4.11 นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทเอทานอลทิ้ง
- 4.12 ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง โดยการคว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชูหรือใช้เดซิเคเตอร์
- 4.13 ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งมี RNase เข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 4.14 เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมเชื้อและการถ่ายโอนยีนเข้าสู่โครแบคทีเรียโดยวิธี freeze-thaw

(กนกพร, 2547)

- 5.1 เลี้ยงเชื้อโครแบคทีเรียในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน
- 5.2 นำสารละลายเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาวางบนน้ำแข็ง 10 นาที
- 5.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 5.4 เทส่วนบนทิ้ง นำตะกอนเซลล์มาละลายในแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บนน้ำแข็ง
- 5.5 นำเซลล์แขวนลอยในแคลเซียมคลอไรด์มา 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด eppendorf ใหม่ และผสมเวคเตอร์ที่มีอินที่สนใจประมาณ 2 ไมโครกรัม โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ 2-3 ครั้ง บนน้ำแข็ง

- 5.6 นำสารละลายนี้แช่ในไนโตรเจนเหลวจนเป็นน้ำแข็งแล้วนำมาบ่ม ไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จากนั้นเติมอาหาร LB 1 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที นาน 4 ชั่วโมง
- 5.7 นำสารละลายดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 5.8 เทอาหารส่วนบนทิ้งไป ทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งด้วยอาหารสูตร LB ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
- 5.9 สเปรดเซลล์บนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน

6. การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย (กนกพร, 2547)

- 6.1 เลี้ยงเชื้ออะ โกรแบคทีเรียดิสอาร์มสายพันธุ์ C58C1 pGV3850/pHTT202 ในอาหารเหลว สูตร LB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน นานข้ามคืน อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที
- 6.2 นำเซลล์แขวนลอยของเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตรมาใส่ในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรประมาณ 0.8
- 6.3 นำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
- 6.4 เทส่วนอาหารทิ้งไป แล้วทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งในสารละลายซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์กับ Tween-80 0.5 เปอร์เซ็นต์
- 6.5 นำใบยาสูบที่ปราศจากเชื้อมาทำให้เกิดบาดแผล โดยตัดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจตุรัสและจุ่มในเซลล์แขวนลอยที่ได้จากข้อ 6.4 เป็นเวลา 20 นาที
- 6.6 นำชิ้นส่วนของพืชดังกล่าววางบนพลาสติก ที่มีกระดาษทิชชูซึ่งปราศจากเชื้อ เพื่อกำจัดเชื้ออะ โกรแบคทีเรียส่วนเกินออก
- 6.7 วางชิ้นส่วนของพืชบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่
- 6.8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงอย่างต่อเนื่อง 3 วัน หลังจากบ่มเนื้อเยื่อ ประมาณ 3 วัน อะโกรแบคทีเรียจะย้ายส่วน T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช ตรงบริเวณรอยตัดของพืช และ T-DNA นี้จะเข้าไปรวมกับโครโมโซมพืช
- 6.9 ย้ายชิ้นส่วนพืชลงในอาหารชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ที่สามารรถฆ่าอะ โกรแบคทีเรียได้จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงอย่างต่อเนื่อง

- 6.10 ทำการย้ายชิ้นส่วนพืชบนอาหารใหม่ตามข้อ 6.9 ทุกๆ 2 สัปดาห์และคัดเลือกต้นที่คาดว่าจะได้รับชิ้น

7. การสกัดดีเอ็นเอจากพืช (กนกพร, 2548)

- 7.1 ใส่ใบไม้ 50-100 มิลลิกรัมในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายสกัดดีเอ็นเอ 150 ไมโครลิตร
- 7.2 ใช้แท่งแก้วคละเอียดจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกัน
- 7.3 เติมสารละลายสกัดดีเอ็นเอ 300 ไมโครลิตร และสารละลายผสม phenol/chloroform/isoamylalcohol 450 ไมโครลิตร แล้วปิดฝาและเขย่าประมาณ 1 นาที
- 7.4 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- 7.5 นำสารละลายส่วนบนไปใส่ในหลอดใหม่ เติมเอทานอลบริสุทธิ์ปริมาตร 2 เท่าผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา
- 7.6 วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- 7.7 เทของเหลวทิ้ง ล้างส่วนตะกอนข้างล่างด้วย เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 500 ไมโครลิตร
- 7.8 ปั่นด้วยความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
- 7.9 เทของเหลวทิ้ง และทำให้แห้ง (คว่ำบนกระดาษซับที่สะอาด)
- 7.10 ละลายตะกอนใน TE ซึ่งมี RNase ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ประมาณ 50 ไมโครลิตร
- 7.11 นำสารละลายดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร นำมาหยอดใน เจลอะกาโรส 0.7 เปอร์เซ็นต์ เพื่อดูปริมาณดีเอ็นเอ

8. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิก

- 8.1 ชั่งน้ำหนักพืชสด 0.5 กรัม
- 8.2 เติมสารสกัด เมทานอลและไฮโดรคลอริก (99:1) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเติมน้ำลงไป 2 มิลลิลิตร
- 8.3 นำไปเขย่าเพื่อให้เซลล์แตก นาน 2 ชั่วโมง และเติมคลอโรฟอร์ม ครึ่งหนึ่งของสารละลายสกัด
- 8.4 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที 10 นาที
- 8.5 นำสารละลายส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเฉพาะของสารนั้นๆ

- 8.6 ค่าที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี Duncan's new multiple-range test (DMRT) และ ANOVA ซึ่งการวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้