ผลของสภาวะเครียดทางกายภาพต่อชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์และการแสดงออกของยีนในพืช

EFFECTS OF ABIOTIC STRESSES ON PLANT FLAVONOID BIOSYNTHESIS AND GENE EXPRESSION

รุทธ์ มณีประเสริฐ
RUT MANEEPRASERT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2550

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของสภาวะเครียดทางกายภาพต่อชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ และการแสดงออกของยีนในพืช

EFFECTS OF ABIOTIC STRESSES ON PLANT FLAVONOID BIOSYNTHESIS AND GENE EXPRESSION

รุทธ์ มณีประเสริฐ

RUT MANEEPRASERT

เลขหมู่....................
เลขทะเบียน 74424
วัน,เดือน,ปี 28 ก.ย. 2550

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

EFFECTS OF ABIOTIC STRESSES ON PLANT FLAVONOID BIOSYNTHESIS AND GENE EXPRESSION

RUT MANEEPRASERT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2007

COPYRIGHT 2007
SCHOOL OF GRADUATS STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสภาวะเครียดทางกายภาพต่อชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์และการแสดงออกของยีนในพืช
นักศึกษา	นายรุทธ์ มณีประเสริฐ
รหัสประจำตัว	46063415
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2550
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร. กนกพร สมพรไพลิน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร. วิรัตน์ ภูวิวัฒน์

บทคัดย่อ

เฟลโวนอยด์เป็นสารกลุ่มพอลิฟีนอลิกที่มีความหลากหลาย พืชได้สังเคราะห์สารกลุ่มนี้ตอบ สนองต่อความเครียดชนิดต่างๆ เป็นที่ทราบกันดีว่าสารทุติยภูมิในพืชนี้จะทำหน้าที่ปกป้องตัวเอง ในการศึกษานี้ ได้ทำการตรวจสอบกลไกการตอบสนองของสารเฟลโวนอยด์ต่อความเครียดที่แตกต่างกันในกะเพราแดงโดยใช้สภาวะในหลอดทดลอง พืชอายุ 4 สัปดาห์จะถูกบ่มในสภาวะความเข้มข้นของสารออสโมติก (เกลือ, น้ำตาลซูโครส และวุ้น) ความเข้มแสง และสภาวะที่มีอุณหภูมิแบบสลับ ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากพืชที่ได้จากแต่ละสภาวะ ภายใต้ความยาวคลื่นเฉพาะสำหรับสารเฟลโวนอยด์แต่ละชนิด ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าพืชที่ปลูกในเกลือความเข้มข้นต่ำ (50-200 มิลลิโมลาร์) น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง (ร้อยละ 4-6) วุ้นความเข้มข้นสูง (0.9%) และอุณหภูมิแบบสลับ (กลางวัน/กลางคืน 25/4°C หรือ 25/37 $^{\circ}$C) จะให้ปริมาณสารกลุ่มแอนโทไซยานินที่สูงขึ้น การสังเคราะห์สารประกอบเฟลโวนอลเพิ่มขึ้นในต้นพืชที่เจริญในความเข้มข้นของน้ำตาลและวุ้นสูง และในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทั้ง 2 แบบ สารประกอบเฟลโวนจะตอบสนองโดยตรงต่ออุณหภูมิต่ำและสูง ความเข้มแสงที่สูงจะนำไปสู่การชักนำวิถีชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ทั้งหมด ได้ใช้ต้นยาสูบแปลงพันธุ์ที่ทำการเพิ่มหรือลดการแสดงออกของอะราบิดอปซิส cDNA ซึ่งให้รหัสของเอนไซม์ในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ สำหรับยืนยันหน้าที่ในการป้องกันตัวเอง ต้นยาสูบที่มีการแสดงออกของยีนแต่ละชนิดที่ให้เอนไซม์แคลโคลซินเทส (CHS) เฟลโวนอยด์ 3' ไฮดรอกซีเลส (F3'H) หรือไดไฮโดรเฟลโวนอล 4 รีดักเทส (DFR) แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มปริมาณสารเฟลโวนอยด์กลุ่มตามที่คาดหมาย พืชที่มีสารกลุ่มเฟลโวนอยด์สูงจะส่งเสริมให้มีประสิทธิภาพในการทนต่อสภาวะเครียด โดยเฉพาะต้นแปลงพันธุ์ที่ได้รับยีน *CHS* เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ปราศจากความเครียดต้นยาสูบปกติและต้นแปลงพันธุ์ที่มียีน *CHS* จะมีการแสดงออกของสารกลุ่มเฟลโวนและแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นแตกต่างกัน

ตอบสนองต่อสภาวะเครียดแต่ละชนิด ต้นยาสูบที่ได้รับน้ำตาลและวุ้นจะมีระดับของสารประกอบเฟลโวนอลเพิ่มขึ้นด้วยในทุกสภาวะเครียดที่ใช้ทดสอบ ยาสูบดัดแปลงพันธุ กรรมที่ได้รับยีน *F3'H* หรือ *DFR* ในทิศทางแบบ antisense จะให้ปริมาณของสารกลุ่มเฟลโวนที่สูงกว่าต้นที่มียีนในทิศทางแบบ sense ในขณะที่ต้นยาสูบแปลงพันธุ์ที่มียีนในทิศทางแบบ sense จะพบการสะสมแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น

Thesis Title	Effects of Abiotic Stresses on Plant Flavonoid Biosynthesis and Gene Expression
Student	Mr. Rut Maneeprasert
Student ID	46063415
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2007
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. kanokporn Sompornpailin
Thesis Co Advisor	Assoc. Prof. Dr. Wirat Phuwiwat

ABSTRACT

Flavonoids are a diverse class of polyphenolic compounds that are synthesized in plants response to various stresses. These plant secondary metabolites are known to be a protective agent in plant. In this study, the respond mechanism of flavonoids toward different abiotic stresses was investigated in red basil (*Ocimum sanctum* Linn.) by using *in vitro* condition. Four-week old plants were incubated in different levels of osmoticum concentration (salt, sucrose, and agar), light intensity and also alternating temperature conditions. Absorbance of plant extractions received from each condition was measured under specified wavelengths for each type of flavonoid compounds. Results show that anthocyanin was increased in plants grew under low salt concentration (50-200 mM), high sucrose concentration (4-6%), high agar concentration (9%) and alternating temperature (25/4°C or 25/37°C day/night). Plants increased the synthesis of flavonol compounds in high sucrose and agar concentration and also both condition of alternating temperature. Flavone compounds directly response to low and high temperatures. High light intensity lead to induce the all of flavonoid biosynthetic pathway. Transgenic tobacco plants overexpressing and repressing *Arabidopsis* cDNA encoding enzymes in flavonoid biosynthesis were created and used to confirm the protective function. The tobacco expression of each genes encoding chalcone synthase (CHS), flavonoid 3' hydroxylase (F3'H) or dihydroflavonol 4 reductase (DFR) resulted in a significant increase of the expected group of flavonoid compounds. The flavonoid-enriched plants showed improved stresses tolerant capacity, especially in *CHS* tranagenic plant. Comparing to non stresses condition, expression of flavone and anthocyanin compound in wide type tobacco and transgenic tobacco with *CHS* differently increased response

to each treated stresses. Sugar and agar treated tobaccos also showed the high level of flavonol compound. In all stress conditions, transgenic tobacco with antisense F3'H or DFR gave higher yield of flavone than transgenic tobacco with sense F3'H or DFR while, transgenic tobacco with sense F3'H or DFR revealed high accumulation of anthocyanin.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถประสบความสำเร็จได้ เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพลิน ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และ รศ.ดร.วิรัตน์ ภูววิฒน์ เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่ามาให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ ตลอดจนแนวทางในการแก้ไขปัญหาที่เป็นประโยชน์ระหว่างการค้นคว้าวิจัย รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์ ผศ. นวรัตน์ ปานแย้ม และ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล ที่กรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณโครงการย่อยบัณฑิตศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษา และเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมี ตลอดจนการอำนวยความสะดวกต่างๆระหว่างทำงานวิจัย

ขอกราบขอบคุณกำลังใจจากคุณพ่อ คุณแม่ พี่ชาย คุณลุง คุณป้า จนถึงคุณตวงพร ตู้โกเมน ที่ให้กำลังใจ ให้ข้อเสนอแนะ ให้ความช่วยเหลือต่างๆเสมอมา

ขอขอบคุณ คุณณัฐกานต์ สุโกมล คุณสุธี ชุติไพจิตร คุณศราวุฒิ จันทร์ห้างหว้า และคุณสุดใจ ศรีคงแก้ว ตลอดจนเพื่อนๆ น้องๆ นักศึกษาทุกคน คำปรึกษา ตลอดจนเป็นกำลังใจให้ตลอดมา ทำให้งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ทบวงมหาวิทยาลัย

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

รุทธ์ มณีประเสริฐ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ III
กิตติกรรมประกาศ V
สารบัญ VI
สารบัญตาราง VIII
สารบัญภาพ IX

บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร 4
2.1 กะเพราแดง 4
2.2 เฟลโวนอยด์ 4
2.3 ชีวสังเคราะห์และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ 7
2.4 ยีนควบคุมและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ 11
2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และสะสมสารเฟลโวนอยด์ในพืช 12
2.6 ประโยชน์ของเฟลโวนอยด์ 13
2.7 การปรับตัวเข้ากับสภาวะเครียดของพืช 15

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 16
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 16
3.2 วิธีการวิจัย 17
3.2.1 การศึกษาการผลิตสารในวิถีชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ต่อการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของต้นกะเพราแดง 17
3.2.2 การศึกษาแนวทางการถ่ายโอนยีนกลุ่มเฟลโวนอยด์เข้าสู่ยาสูบโดยอะโกรแบคทีเรียม 19

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.2.3 การศึกษาผลของต้นยาสูบที่ได้รับยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ เมื่อได้รับสภาวะเครียด 20

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 22

4.1 การศึกษาการผลิตสารในวิถีชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ต่อการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของต้นกะเพราแดง 22

4.1.1 ปัจจัยด้านแรงดันออสโมติก 22

4.1.2 ปัจจัยด้านอุณหภูมิ 28

4.1.3 ปัจจัยด้านแสง 30

4.2 การศึกษาแนวทางการถ่ายโอนยีนกลุ่มเฟลโวนอยด์เข้าสู่ยาสูบโดยอะโกรแบคทีเรียม 32

4.3 การศึกษาผลของต้นยาสูบที่ได้รับยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ เมื่อได้รับสภาวะเครียด 38

4.3 1 ผลของแรงดันออสโมติกต่อการแสดงออกของยาสูบ 38

4.3 2 ผลของอุณหภูมิต่อการแสดงออกของยาสูบ 53

4.3 1 ผลของความเข้มแสงต่อการแสดงออกของยาสูบ 58

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 64

บรรณานุกรม 66

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 73

ภาคผนวก ข ขั้นตอนการทดลองด้านอณูชีววิทยา 75

ประวัติผู้เขียน 79

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 แสดงความยาวคลื่นแสงที่ให้ผลในการดูดกลืนแสงได้สูงสุดในกลุ่มเฟลโวนอยด์.................18

4.1 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในสภาวะที่มีระดับเกลือความเข้มข้นต่างๆ แสดงปฏิสัมพันธ์ของความเข้มข้นเกลือกับสารเฟลโวนอยด์จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์จากสารสกัดเข้มข้น 100 มก./มล. เป็นระยะ เวลา 15 วัน 42

4.2 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในสภาวะที่มีระดับน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ แสดงปฏิสัมพันธ์ของความเข้มข้นน้ำตาลกับสารเฟลโวนอยด์จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์จากสารสกัดเข้มข้น 100 มก./มล. เป็นระยะ เวลา 15 วัน 47

4.3 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในสภาวะที่มีระดับวุ้นความเข้มข้นต่างๆ แสดงปฏิสัมพันธ์ของความเข้มข้นวุ้นกับสารเฟลโวนอยด์จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์จากสารสกัดเข้มข้น 100 มก./มล. เป็นระยะเวลา 15 วัน 52

4.4 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในสภาวะที่มีระดับอุณหภูมิต่างๆ แสดงปฏิสัมพันธ์ของอุณหภูมิกับสารเฟลโวนอยด์ จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์จากสารสกัดเข้มข้น 100 มก./มล. เป็นระยะเวลา 15 วัน 57

4.5 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในสภาวะที่มีระดับความเข้มแสงต่างๆ แสดงปฏิสัมพันธ์ของความเข้มแสงกับสารเฟลโวนอยด์ จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์จากสารสกัดเข้มข้น 100 มก./มล. เป็นระยะเวลา 15 วัน 62

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 ต้นกะเพราแดง....4

2.2 โครงสร้างของสารเฟลโวนอยด์....5

2.3 โครงสร้างและอนุพันธ์ของสารเฟลโวนอยด์ชนิดต่างๆ 5

2.4 วิถีชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์....8

3.1 ตัวอย่างต้นยาสูบที่ใช้ทำการทดลอง 21

4.1 ต้นกะเพราและสีของสารสกัดกะเพราในอาหารที่มีเกลือระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ 22

4.2 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกะเพราในสภาวะที่มีเกลือ แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารเฟลโวนอยด์แต่ละกลุ่มกับระดับความเข้มข้นของเกลือ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์....23

4.3 ต้นกะเพราและสีของสารสกัดกะเพราในอาหารที่มีน้ำตาลระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ 24

4.4 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกะเพราในสภาวะที่มีน้ำตาล แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารเฟลโวนอยด์แต่ละกลุ่มกับระดับความเข้มข้นของน้ำตาล เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ 25

4.5 ต้นกะเพราและสีของสารสกัดกะเพราในอาหารที่มีวุ้นระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ 26

4.6 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกะเพราในสภาวะที่มีวุ้น แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารเฟลโวนอยด์แต่ละกลุ่มในอาหาร MS ที่มีวุ้นความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ 27

4.7 ต้นกะเพราและสีของสารสกัดกะเพราในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ 28

4.8 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกะเพราในสภาวะที่มีระดับอุณหภูมิสูงหรือต่ำ แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารเฟลโวนอยด์แต่ละกลุ่มกับระดับอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ 29

4.9 ต้นกะเพราและสีของสารสกัดกะเพราในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มแสงที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ 30

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.10 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกะเพราในสภาวะที่มีระดับความเข้มแสง
แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารเฟลโวนอยด์แต่ละกลุ่มกับระดับความเข้มข้นแสง
เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ 31

4.11 ภาพเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่คาดว่าเป็น
F3'H ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ 32

4.12 พลาสมิดดีเอ็นเอ yT&A+*F3'H*) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI 33

4.13 ภาพแสดงตัวอย่างของพลาสมิดพลาสมิดดีเอ็นเอ (yT&A+*F3'H*)
ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI 33

4.14 ภาพแสดงตัวอย่างของพลาสมิดที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HIและ *Hin*dIII 34

4.15 ภาพแสดงตัวอย่างของพลาสมิด pBI121+*F3'H* ที่ตัดด้วยเอนไซม์
*Eco*RI และ *Bgl*II เพื่อวิเคราะห์ทิศทางการเข้า 35

4.16 ภาพแสดงพลาสมิด pBI121+*F3'H* ที่ตัดด้วยเอนไซม์
*Eco*RI และ *Bgl*II เพื่อวิเคราะห์ทิศทางการเข้า 35

4.17 การเจริญของยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *F3'H* ด้วยอะโกรแบคทีเรียม ในอาหารสูตร
MS ที่มียายาปฏิชีวนะคาร์นามัยซิน (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 36

4.18 ผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ของสารสกัดดีเอ็นเอจากยาสูบ 37

4.19 ยาสูบที่เจริญในอาหาร MS ที่มีเกลือความเข้มข้น 50 mM เป็นระยะเวลา 15 วัน 38

4.20 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านเกลือ
แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนกับความเข้มข้นเกลือ
จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดง ออกของยีนจาก
ชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ 39

4.21 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านเกลือ
แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนอลกับความเข้มข้นเกลือ
จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีน
จากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ 40

4.22 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านเกลือ
แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มแอนโทไซยานินกับความเข้มข้นเกลือ
จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีน
จากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ 41

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.23 ยาสูบที่เจริญในอาหาร MS ที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 5% เป็นระยะเวลา 15 วัน 43

4.24 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านน้ำตาล แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนกับความเข้มข้นน้ำตาล จากยาสูบสายพันธุ์ปกติ และสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีน จากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ 44

4.25 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านน้ำตาล แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนอลกับความเข้มข้นน้ำตาล จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีน จากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ 45

4.26 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านน้ำตาล แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มแอนโทไซยานินกับความเข้มข้นน้ำตาล จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีน จากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ 100 มก./มล. 46

4.27 ยาสูบที่เจริญในอาหาร MS ที่มีวุ้นความเข้มข้น 0.9% เป็นระยะเวลา 15 วัน 48

4.28 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านวุ้น แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนกับความเข้มข้นวุ้น จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีน จากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์..................... 49

4.29 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านวุ้น แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนอลกับความเข้มข้นวุ้น จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีน จากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ 50

4.30 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านวุ้น แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มแอนโทไซยานินกับความเข้มข้นวุ้น จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีน จากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์...................... 51

4.31 ยาสูบที่เจริญที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 4°C ในช่วงเวลากลางคืน 8 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 15 วัน 53

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.32 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านอุณหภูมิ แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนกับอุณหภูมิ จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์. 54

4.33 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านอุณหภูมิ แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนอลกับอุณหภูมิ จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์มก./มล. 55

4.34 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านอุณหภูมิ แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มแอนโทไซยานินกับอุณหภูมิ จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ 56

4.35 ยาสูบที่เจริญในชั้นเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มแสง 1000 ลักซ์ เป็นระยะเวลา 15 วัน 58

4.36 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านแสง แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนกับความเข้มแสง จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์. 59

4.37 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านแสง แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนอลกับความเข้มแสง จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดง ออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ 60

4.38 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านแสง แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มแอนโทไซยานินกับความเข้มแสง จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ 61

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

สภาวะเครียดทางกายภาพ ได้แก่ สภาพพื้นดินที่ใช้เพาะปลูกมีความเค็ม ความแห้งแล้ง รวมถึงอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมล้วนเป็นปัญหาสำคัญที่พบในการทำเกษตรกรรมในทุกพื้นที่ของโลก สภาวะเครียดเหล่านี้ที่มีผลกระทบต่อพืชที่เพาะปลูก ส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชลดลงหรืออาจตายได้ถ้าได้รับสภาวะเครียดเป็นเวลานาน พืชจะมีการปรับตัวทางสรีรวิทยาและการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีเพื่อตอบสนองต่อสภาวะเหล่านี้ โดยจะมีการกระตุ้นให้สร้างสารก่ออนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROSs) ขึ้นภายในเซลล์พืช เพื่อให้พืชสามารถต้านทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ สารก่ออนุมูลอิสระเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นสัญญาณโมเลกุลไปกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อสภาวะเครียดในด้านต่างๆ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารเมแทบอลิซึมภายในเซลล์พืชเพื่อให้ทนต่อสภาวะเครียดดังกล่าว สารทุติยภูมิเป็นสารกลุ่มสำคัญที่พืชสังเคราะห์ขึ้นต่อสภาวะเครียด สารที่สำคัญและพบได้ในพืชทั่วไปคือสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ (flavonoid) โดยในปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงการสังเคราะห์สารในกลุ่มนี้อย่างมากมายในพืชหลายชนิด

เฟลโวนอยด์มีโครงสร้างแตกต่างกันมากกว่า 6400 ชนิด (Martens *et al.* 2003) จัดอยู่ในสารกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compound) สารเหล่านี้สามารถจำแนกคุณลักษณะที่มีความแตกต่างกัน ในปัจจุบันมีการศึกษาทั้งในด้านพันธุศาสตร์ เคมี ชีวเคมี ถึงความสัมพันธ์ของการผลิตสารเฟลโวนอยด์ชนิดต่างๆ ในพืชแต่ละชนิดที่ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นต่างๆ เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการสะสมสารที่เกิดขึ้นในพืช ตลอดถึงแนวทางการนำไปใช้ประโยชน์จากสารเหล่านี้ เฟลโวนอยด์ในเนื้อเยื่อพืชจะมีหน้าที่ทางชีวภาพที่หลากหลายดังนี้คือ เป็นสารให้เม็ดสีซึ่งเกี่ยวข้องกับการผสมเกสรของพืช มักพบในส่วนของใบพืชและส่วนที่ได้รับแสงของต้นพืชโดยจะตอบสนองต่อรังสี UV-B นอกจากนี้เฟลโวนอยด์ยังทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของยีนในแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดปุ่มปม (crown gall) เช่น *Agrobacterium tumefaciens* เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ทั้งในพืชและในสัตว์ และยังมีผลด้านชีวเคมีกายภาพ นิเวศน์วิทยา ปัจจุบันมีการใช้สารกลุ่มเฟลโวนอยด์ในด้านส่งเสริมสุขภาพในหลายด้าน มีรายงานถึงฤทธิ์ทางเภสัชเวช ช่วยในการควบคุมน้ำหนัก จึงมีการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา (Harborne and William. 2000)

มีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ กับการเพิ่มความต้านทานต่อสภาวะเครียดในพืช (Grayer *et al.* 1995 ; Lo *et al.* 1998) และคุณสมบัติของสารเฟลโวนอยด์ในการป้องกันรังสี UV-B พบการสะสมของสารกลุ่มนี้ในชั้นอิพิเดอร์มิสของใบและเนื้อเยื่อพืชที่

สัมผัสกับรังสี UV-B เช่น ละอองเรณู และ เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด จากการศึกษาในอะราบิดอปซิสสายพันธุ์กลายที่ยีน *CHI* หรือ *CHS* ซึ่งเป็นยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์พบว่าอะราบิดอปซิสสายพันธุ์ดังกล่าวไวต่อรังสี UV-B มากกว่าปกติ (Meer *et al.* 1993) ส่วนสายพันธุ์กลายที่มีการผลิตสารฟีนอลิกโดยเฉพาะกลุ่มเฟลโวนอยด์มากกว่าปกติจะสามารถทนต่อรังสี UV-B ได้เพิ่มขึ้น (Lois and Buchanan. 1994) เฟลโวนอยด์มีความสำคัญในการควบคุมการขนส่งฮอร์โมนออกซินในพืช ซึ่งฮอร์โมนชนิดนี้มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะเครียด อะราบิดอปซิสสายพันธุ์กลายซึ่งขาดกิจกรรมของเอนไซม์ CHS มีการสะสม indole acetic acid (IAA) ที่รากส่วนบนมากขึ้นและที่ปลายรากมีการสะสมของฮอร์โมนชนิดนี้ลดลง (Pelletier *et al.* 1999)

กะเพราแดง (*Ocimum sanctum* Linn.) เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีการปลูกอย่างแพร่หลายในประเทศไทย และพบว่ามีการสะสมของสารเฟลโวนอยด์ตอบสนองต่อสภาวะเครียดได้อย่างชัดเจนจึงเหมาะสมที่จะนำมาศึกษาถึงชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มนี้ การศึกษาพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ในสภาวะแวดล้อมต่างๆของพืช (แสง อุณหภูมิ ความแห้งแล้ง) ในการทดลองนี้ใช้ต้นยาสูบเป็นพืชทดลองในการถ่ายโอนยีนเนื่องจากมีความสะดวกในการทำงาน ทำให้คาดว่าน่าจะทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างการสะสมของสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์กับการต้านทานสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเหล่านี้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการตอบสนองของสารต่างๆในวิถีชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ ในต้นกะเพราแดงภายใต้สภาวะเครียดต่างๆ

1.2.2 เพื่อศึกษาแนวทางการถ่ายโอนยีนกลุ่มเฟลโวนอยด์เข้าสู่ต้นยาสูบ โดยการใช้อะโกรแบคทีเรียม

1.2.3 เพื่อศึกษาการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของต้นยาสูบ ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาสภาวะเครียดทางกายภาพ ที่มีผลต่อการชักนำการเกิดการสะสมของสารทุติยภูมิกลุ่มเฟลโวนอยด์ในพืชทดลองคือกะเพราแดงโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้นำต้นพืชมาให้สภาวะเครียดทางกายภาพต่างๆ ได้แก่ ความเข้มแสง อุณหภูมิ ความแห้งแล้ง และตรวจสอบการแสดงออกของสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ตอบสนองต่อความเครียดดังกล่าว นอกจากนี้ยังทำการศึกษาการถ่ายโอนยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์เข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม คัดเลือกต้นที่

ได้รับการถ่ายโอนยีน เพื่อใช้สำหรับศึกษาการแสดงออกของฟีโนไทป์ที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดของต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีนเข้าไป

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงการแสดงออกของสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ ที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดรูปแบบต่างๆ

1.4.2 ทราบกลไกการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของยาสูบ เมื่อได้รับการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์

บทที่ 2
หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 กะเพราแดง

ภาพที่ 2.1 ต้นกะเพราแดง (*Ocimum sanctum* Linn.)

ที่มา : http://www.rspg.thaigov.net/plants_data/index.htm

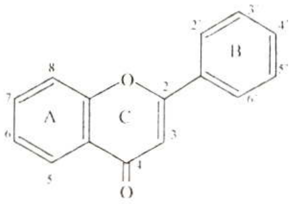
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กะเพราในประเทศไทย มี 3 พันธุ์ คือ กะเพราแดง กะเพราขาว และกะเพราลูกผสม ระหว่างกะเพราแดงและกะเพราขาว กะเพราเป็นไม้ล้มลุกลำต้นและใบมีขนอ่อนใบมีกลิ่นหอมฉุน ดอกจะออกรวมเป็นช่อ ใบมีกลิ่นหอมฉุน ใบและกิ่งก้าน กะเพราแดงจะมีสีเขียวแกมม่วงแดง รสเผ็ดร้อน เป็นยาธาตุ แก้ปวดท้อง ท้องขึ้น จุกเสียด ใช้แต่งกลิ่นแต่งรสได้

2.2 เฟลโวนอยด์

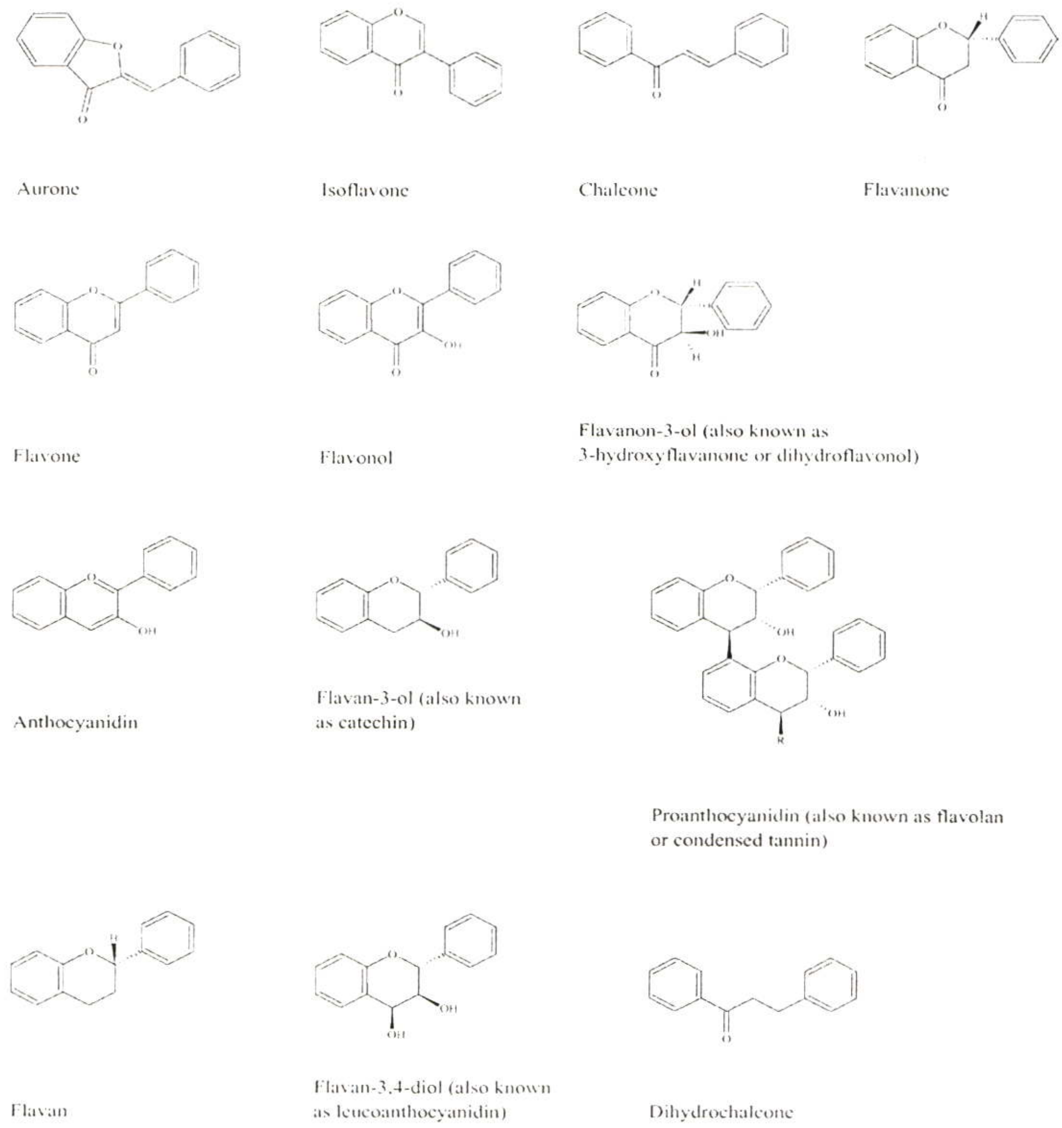
เฟลโวนอยด์เป็นกลุ่มของสารที่ทำให้เกิดสีสันต่างๆ ของพืชในธรรมชาติ แบ่งออกตามโครงสร้างได้มากกว่า 10 กลุ่ม และในแต่ละกลุ่มยังแบ่งออกเป็นชนิดต่างๆ ได้อีก จากการศึกษาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1962 ทำให้ทราบถึงบทบาทของเฟลโวนอยด์ในแง่ต่างๆ ต่อพืชและสิ่งแวดล้อมอันรวมถึงมนุษย์และสัตว์

เฟลโวนอยด์เป็นกลุ่มของสารที่มีคาร์บอน 15 ตัว จัดเรียงตัวในระบบ 3 วง คือ A B และ C โดยมี A และ B เป็น วงฟีนิล (phenyl ring) และ C เป็น วงแลคโตน (lactone ring) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ วง C ทำให้แยกเฟลโวนอยด์ออกเป็นชนิดต่างๆ (ภาพที่ 2.2) และการเติมหมู่ไฮดรอกซี (hydroxylation) ที่ วง A และ B ตามตำแหน่งต่างๆ ทำให้เกิดอนุพันธ์ของเฟลโวนอยด์มากมายหลายชนิด (Madhuri and Reddy. 1999)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของสารเฟลโวนอยด์

ที่มา : Tim *et al.* (2005)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างอนุพันธ์ชนิดต่างๆของสารเฟลโวนอยด์

ที่มา : Tim *et al.* (2005)

2.2.1 แชลโคน (chalcone) และออโรน (aurone)

สารนี้มีโครงสร้างที่ วง C ผิดจากกลุ่มอื่นๆ เมื่อถูกไอแอมโมเนียเปลี่ยนจากเหลืองเป็นแดงจึงเรียกสารกลุ่มนี้ว่า แอนโทชเลอร์ (antochlor) แชลโคนให้สีเหลืองเข้ม ได้แก่ สีของดอกไม้ในวงศ์ Compositae Oxalidaceae Scrophulariaceae Liliaceae และ Acanthaceae เป็นต้น สารออโรนพบในดอก ใบ เปลือก และเนื้อไม้ให้สีเหลืองทอง เช่น Sulfuretin ในดอกรักเร่ (*Dahli a spp.*) และ hispidol glucoside ในถั่วเหลือง (*Glycine spp.*) (Tanaka *et al.* 1998)

2.2.2 เฟลวาโนน (flavanone) และ ไดไฮโดรเฟลโวนอล (dihydroflavanol)

สารเหล่านี้ให้สีเหลืองอ่อนหรือไม่มีสีพบได้ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ สารที่พบมากคือกลุ่มของ ไกลโคไซด์ เช่น เฮสเพอริดีน (hesperidin) และ แนรินจิน (naringin) จากเปลือกส้ม ซึ่งมีรสขมนิยมใช้ในอุตสาหกรรมและเภสัชกรรม ในปัจจุบันรู้จักเฮสเพอริดินในชื่อว่าซิตรัสไบโอเฟลโวนอยด์ (citrus bioflavonoid) ซึ่งพบในเปลือกส้มที่ยังไม่สุกใช้เสริมความแข็งแรงของหลอดเหลือดฝอย เฟลโวนอยด์ทั้งสองตัวมีความคงทนต่อกรดเกลือแต่จะสลายตัวให้แคลโคนเมื่ออุ่นกับด่าง นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อราได้ จึงใช้ในการเก็บรักษาไม้ (Britsch *et al.* 1993)

2.2.3 เฟลโวนอล (flavonol)

เฟลโวนอลเกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนิน (lignification) ในใบและเนื้อไม้ และมักพบในดอกไม้โดยเป็นสารเม็ดสีชนิดหนึ่ง ซึ่งจะช่วยล่อแมลงเพื่อให้เกิดการผสมเกสรจึงมีความสำคัญต่อพืชยืนต้นเพื่อการดำรงเผ่าพันธุ์ ส่วนในพืชชั้นต่ำ จุลินทรีย์โดยเฉพาะในแบคทีเรียและสาหร่ายพบว่ามีเฟลโวนอลปริมาณที่ต่ำมากหรือแทบไม่มีเลย สำหรับเชื้อรา *Aspergillus candidas* พบว่ามีคลอร์เฟลโวนิน (chlorflavonin) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น แบคทีเรีย เฟลโวนอลกลัยโคไซด์ที่ใช้ในเภสัชกรรมคือ รูทินจากใบอีหรุด (*Ruta graveoleus*) มีคุณสมบัติเสริมความแข็งแรงของหลอดเลือดฝอย (อ้อมบุญ ล้วนรัตน์. 2536)

2.2.4 เฟลโวน (flavone)

มักพบในเปลือกไม้ แก่นไม้ ผล และราก ให้สีเหลืองอ่อนถึงแก่ ตัวอย่างของ เฟลโวนที่รู้จักกันดีคือ โมริน (Morin หรือ 5,7,2,4-tetrahydroxy flavonol) จากเปลือกของขนุน (*Artocarpus* spp.) (อ้อมบุญ ล้วนรัตน์. 2536)

2.2.5 ไอโซเฟลโวนอยด์ (isoflavonoid)

ไอโซเฟลโวนอยด์มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายตัว เช่น โรทีโนน จาก *Derris* spp. มีฤทธิ์เบื่อปลา ส่วนโคเมสตรอล (coumestrol) จากพืชตระกูลถั่วเป็นไฟโตอะเลกซิน (phytoalexin) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนผิวของพืช (Basile *et al.* 2003)

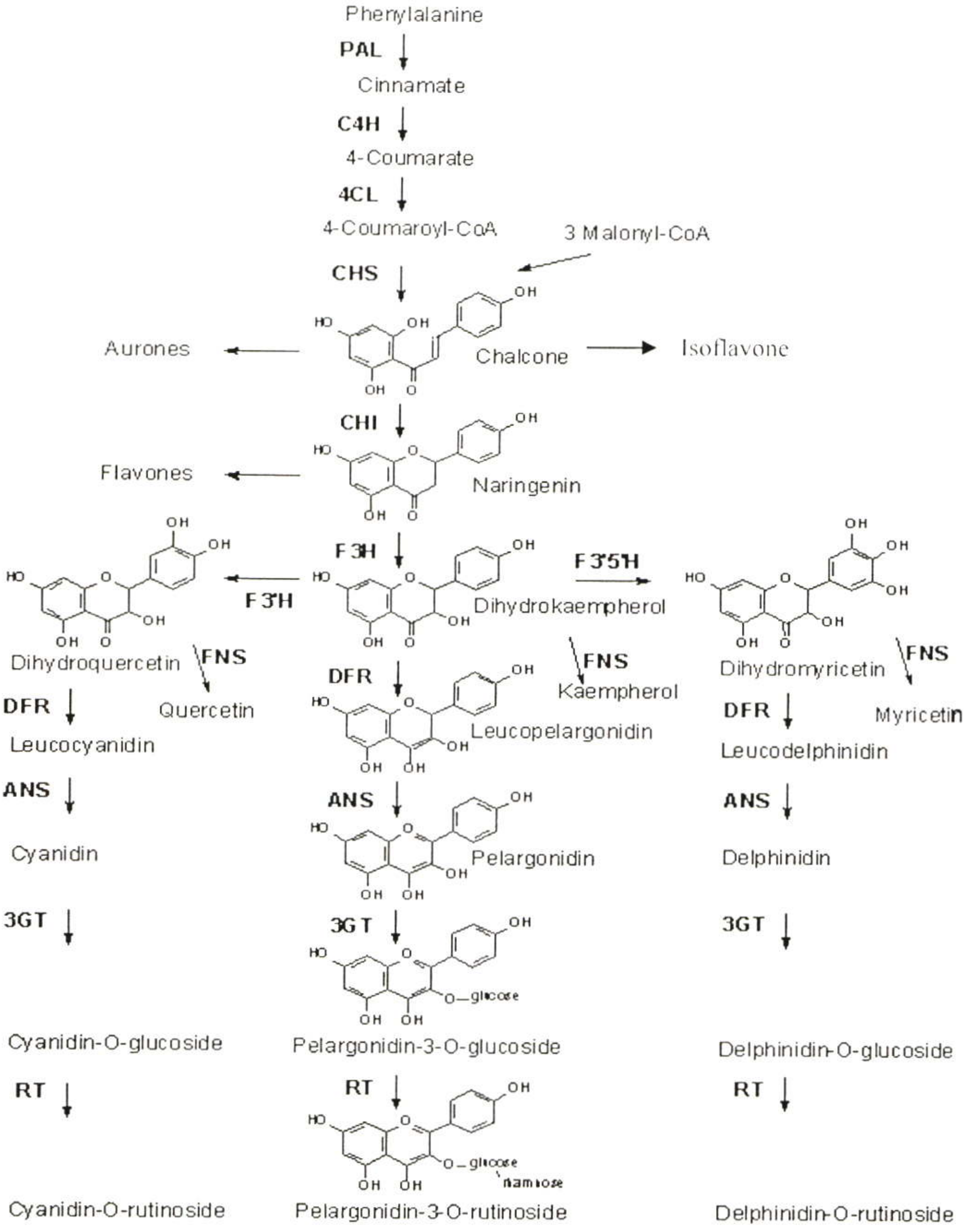
2.2.6 แอนโทไซยานิน (anthocyanin)

แอนโทไซยานินเป็นสารกลุ่มเม็ดสีที่มีการสะสมอยู่ในแวคคิวโอล ของเนื้อเยื่อดอกและใบของพืช (Meer *et al.* 1993) สารกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น เป็นสารส่งสัญญาณของวิถีการถ่ายทอดสัญญาณในหลายวิถี การจับกันระหว่างพืชและเชื้อโรค การป้องกันตัวเองของพืช การตอบสนองต่อแสง UV-B การตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ มีรายงานถึงการชักนำให้สะสมสารกลุ่มแอนโทไซยานินในข้าวฟ่าง เมื่อพืชถูกเชื้อโรครบกวนเช่นเดียวกับในข้าวโพด มีรายงานการสะสมของสารกลุ่มนี้เมื่อถูกหนอนรบกวน (Davies. 1989) และยังมีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนโทไซยานินที่มีผลต่อการเพิ่มความต้านทานต่อหนอนที่มารบกวนในพืชอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีการใช้สารกลุ่มนี้ในทางเภสัชเวชและเป็นอาหารเสริมสุขภาพ เช่น ให้ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ สามารถช่วยลดปริมาณคลอเลสเตอรอลและต่อต้านการเกิดมะเร็ง (Xie *et al.* 2004)

2.3 ชีวสังเคราะห์และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เฟลโวนอยด์

ชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์นั้นให้ผลผลิตเป็นสารสีซึ่งสามารถตรวจสอบได้ง่าย จึงนิยมใช้ชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มนี้เป็นต้นแบบ สำหรับศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของยีนและหน้าที่ของยีนโดยเฉพาะการควบคุมการแสดงออกของยีนได้มีการแยกยีน ศึกษาหน้าที่และรูปแบบการแสดงออกของยีนซึ่งได้จากชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชหลายชนิด เช่น อะราบิดอปซิส สแนปดรากอน พิทูเนีย และข้าวโพด ชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มนี้สามารถสรุปได้ดังภาพที่ 2.4

สารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ คือ ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ซึ่งมาจากวิถีฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid pathway) จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น 4-คูมาโรอิลโคเอ (4-coumaroyl-CoA) 3 ขั้นตอน โดยเอนไซม์ฟีนิลอะรานีนแอมโมเนียไลเอส (phenylalanine ammonia lyase; PAL) ซินนาเมท-4-ไฮดรอกซีเลส (cinnamate-4-hydroxylase; C4H) และ 4-คูมาเรทโคเอไลเกส (4-coumarate-CoA ligase; 4CL) จากนั้นจะเกิดการกระตุ้นให้รวมตัวกันของ 4-คูมาโรอิวโคเอ 1 โมเลกุลกับ มาโรนิลโคเอ (malonyl CoA) 3 โมเลกุล จากการกระตุ้นของเอนไซม์แคลโคลซินเทส (chalcone synthase; CHS) ให้ได้เป็น4,2',4',6'เททระไฮดรอกซีแคลโคล (4,2',4',6'-tetrahydroxy chalcone) (Holton and Cornisch. 1995; Tanaka *et al.* 1998) ได้มีการแยกยีนและ cDNA ที่แปลรหัสมาเป็น CHS จากพืชหลายชนิด มีการศึกษาถึงการแสดงออกของยีน *CHS* โดยยีน *CHS* นี้ได้รับความนิยมอย่างมากในการนำไปใช้ในการศึกษาทางด้านพันธุวิศวกรรม มีหลายตัวอย่างที่ทำการศึกษาหน้าที่ของยีนโดยการทำ co-suppression หรือ down regulation เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *CHS* มีผลทำให้ให้ดอกไม้ที่มีสีเปลี่ยนไปเป็นสีขาวบริสุทธิ์ แต่อย่างไรก็ตาม



ภาพที่ 2.4 วิถีชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ ตัวพิมพ์ใหญ่คือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง PAL, phenylalanine ammonia lyase; C4H, cinnamate-4-hydroxylase; 4CL; 4-coumarate-CoA ligase; CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; F3',5'H, flavonoid 3',5'-hydroxylase; DFR, dihydroflavonol 4 reductase; ANS, anthocyanidin synthase; 3GT, anthocyanin glucosyltransferase; RT, rhamnosyl transferase; FNS, flavone synthase

ที่มา : Holton and Cornisch. (1995)

การที่ยับยั้งการแสดงออกของชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์จะทำให้เกิดผลข้างเคียง เช่น การทำให้เกิดการเป็นหมัน (Napoli *et al.* 1999 ; Deroles *et al.* 1998)

ขั้นตอนที่สองเป็นการเกิดไอโซเมอร์ (isomerization) ของสารแคลโคล โดยเอนไซม์แคลโคลไอโซเมอร์เลส (chalcone isomerase; CHI) ให้สารแนรินเจนนินเฟลวาโนน (naringenin flavanone) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ไม่มีสี ปฏิกิริยาไอโซเมอร์ไรซ์เซชั่นนี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารแนรินเจนนินเฟลวาโนนโดยอัตโนมัติ แม้ว่าจะอยู่ในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ CHI ก็ตาม (Holton and Cornisch. 1995) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในดอกเอสเตอร์ (*Callistephus chinensis*) และ คาร์เนชั่น (*Dianthus cayophyllus*) สายพันธุ์กลายของยีน *CHI* พบว่ามีกลีบดอกสีเหลือง และอะราบิดอปซิสสายพันธุ์กลายของยีน *CHI* ก็มีการเปลี่ยนสีของเปลือกที่หุ้มเมล็ด (Forkmann and Heller. 1999) นอกจากนี้ยังมีการพบสีเหลืองของแนรินเจนนินแคลโคลที่เปลือกของผลมะเขือเทศที่มียีน *CHS* ที่กลายพันธุ์ด้วย (Muir *et al.* 2001) ทั้งๆที่ไม่ควรพบสีเหลือง เพราะสีเหลืองของแนรินเจนนินแคลโคล จะเกิดปฏิกิริยาไอโซเมอร์ไรซ์เซชั่นไปเป็นแนรินเจนนินเฟลวาโนนซึ่งตัวมันเองไม่มีสี เอนไซม์ CHI มี 2 ชนิด เอนไซม์ชนิดแรกนั้นสามารถเกิดปฏิกิริยาไอโซเมอร์ไรซ์เซชั่นที่ตำแหน่ง 6’-hydroxy และ 6’-deoxy chalcone และชนิดที่ 2 สามารถเปลี่ยนสาร 6’-hydroxy chalcone เท่านั้นให้เป็นเฟลวาโนน ถึงแม้ว่าเคยมีคนคิดว่าเอนไซม์ CHI ชนิดแรกนั้นมีอยู่ในเฉพาะพืชตระกูลถั่วเท่านั้น แต่ก็มีรายงานเร็วๆนี้ว่าเอนไซม์แคลโคลไอโซเมอร์เลสของยาสูบสามารถเกิดปฏิกิริยาไอโซเมอร์ไรซ์เซชั่น กับ 6’ ดีออกซีแคลโคลไอโซเคอร์วริทิเจนนิน (6’ deoxychalcone isoliquiritigenin) ให้เป็น 5’ ดีออกซีเฟลวาโนน ไอโซเคอร์วริทิเจนนิน (5’ deoxy flavonone liquiritigennin) ได้ด้วยเหมือนกัน (Joung *et al.* 2003)

หลังจากนั้นจะมีการเติมหมู่ไฮดรอกซี (hydroxyl group; OH) เข้าไปที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของสารแนรินเจนนินเฟลวาโนน โดยเอนไซม์เฟลวาโนน 3 ไฮดรอกซีเลส (flavanone-3-hydroxylase; F3H) ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มของ 2-ออกโซกลูตาเรทดีเพนเดนท์ ไดออกซีจีเนส (2-oxoglutarate-dependent dioxygenase) ให้สารกลุ่มไดไฮโดรเฟลโวนอลคือสาร ไดไฮโดรเคเอ็มฟีรอล (dihydrokaempherol; DHK) (Rice-Evans *et al.* 1997) จากการศึกษาของ Britsch และคณะ (1993) ได้ศึกษาลำดับการเรียงตัวของดีเอ็นเอของ *F3H* ในพืชหลายชนิดเปรียบเทียบกันและจากการศึกษาเกี่ยวกับการทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยสูญเสียกิจกรรมของ F3H พบว่ามีผลไปขัดขวางการสังเคราะห์สารกลุ่มแอนโทไซยานินทำให้ดอกไม้มีสีขาว (Britsch *et al.* 1992 ; Martin *et al.* 1991) สารนี้อาจจะได้รับการเติมหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งต่างๆเพิ่มเติม โดยเอนไซม์เฟลโวนอยด์ 3’ ไฮดรอก ซีเลส (flavonoid 3’hydroxylase; F3’H) และเฟลโวนอยด์3’,5’ไฮดรอกซีเลส (flavonoid 3’, 5’hydroxylase; F3’,5’H) จะได้สารกลุ่มไดไฮโดรเฟลโวนอลชนิดอื่นเพิ่มเติม ได้แก่ ไดไฮโดรเควอร์เซติน (dihydroquercetin ; DHQ) และไดไฮโดรไมริซิติน (dihydromyricetin; DHM)

การเปลี่ยนสารกลุ่มไดไฮโดรเฟลโวนอลไปเป็นสารกลุ่มแอนโทไซยานินต้องการเอนไซม์อย่างน้อยอีก 3 ชนิด โดยเริ่มจากกระตุ้นการรีดิวซ์สารกลุ่มนี้ด้วยเอนไซม์ไดไฮโดรเฟลโวนอล 4 รีดักเทส (dihydroflavonol 4-reductase; DFR) และสารกลุ่มลิวโคแอนโทไซยานิดิน (leucoantho cyanidin) ได้แก่ ลิวโคไซยานิดิน (leucocyanidin) ลิวโคเพลาโกนิดิน (leucopelargonodin) และลิวโคเดลฟินิดิน (leucodelphinidin) ซึ่งถูกออกซิเดชั่น (oxidation) ดีไฮเดรชั่น (dehydration) และไกลโคซิลเลชั่น (glycosylation) โดยลิวโคแอนโทไซยานิดินจะถูกเปลี่ยนไปเป็นแอนโทไซยานิดินโดยแอนโทไซยานินซินเทส (anthocyaninsynthase; ANS) ซึ่งเป็นสมาชิกอีกตัวของกลุ่ม 2-ออกโซกลูตาเรทดีเพนเดนท์ ซึ่ง ANS นี้มีความคล้ายคลึงกับ F3H และ เฟลโวนอล ซินเตส (flavonol synthase; FLS) อย่างมาก (Martin *et al.* 1991 and Tanaka *et al.* 1998)

มีการแยก cDNA หรือยีน *ANS* จากพืชหลายชนิดทั้งในอะราบิดอปซิส แอนเทอร์รินัม พิทูเนีย องุ่น และข้าวโพด นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสายพันธุ์กลายของยีน *ANS* ในพืชเหล่านี้อีกด้วย (Martin *et al.* 1991 ; Jackson *et al.* 1992 ; Bradley *et al.* 1998; Pelletier *et al.* 1999) สารกลุ่มเฟลโวนอยด์เหล่านี้ต้องการเอนไซม์ glutathione S-transferase (GST) และทรานส์พอร์เตอร์ (transporters) ซึ่งเรียกว่า กลูทาไทโอนพัมพ์ (glutathione pump) สำหรับเคลื่อนย้ายสารจากไซโทพลาสซึมเข้าสู่แวคิลโอล

จำนวนไฮดรอกซีบนวง B ในโครงสร้างของไดไฮโดรเฟลโวนอล มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเม็ดสีที่แตกต่างกันในส่วนต่างๆของพืช โดยสีสันของพืชจะถูกกำหนดโดยอัตราส่วนระหว่างแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin): กลุ่มของสารเคมีในแอนโทไซยานินที่ให้สีสันที่จำเพาะและโครงสร้างของแอนโทไซยานิดินที่ได้รับการเปลี่ยนแปลง เช่น การถูกเติมหมู่เอซิล กลูโคส หรือหมู่เมธิล นอกจากนี้การเปลี่ยนสีของเอนโทไซยานินยังขึ้นกับค่า pH ในแวคคิวโอล และเม็ดสีอื่นที่อยู่ร่วมกัน Holton และ คณะ . (1993) ได้รายงานว่าการเติมหมู่ไฮดรอกซี่ (hydroxylation) ให้กับวง B ของเฟลโวนอยด์ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นในการกำหนดเม็ดสีสารเฟลโวนอยด์ ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซี่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 โดยเอนไซม์ F3H จะให้สารกลุ่มเพลาโกนิดิน (pelargonidin) ซึ่งมีสีโทนส้ม การเติมหมู่ไฮดรอกซี่โดยเอนไซม์กลุ่มไซโตโครม cytochrome P450 ตัวอื่นเพิ่มเติม จะชักนำให้ดอกไม้เปลี่ยนแปลงสีได้ เช่น เอนไซม์ F3'H จะซักนำให้เติมหมู่ไฮดรอกซี่ที่ตำแหน่งที่ 3 ของวง B และให้สารกลุ่มไซยานิดินซึ่งมีสีโทนชมพูแดง และเอนไซม์ F3',5'H จะชักนำให้เกิดการเติมหมู่ไฮดรอกซี่ที่ตำแหน่งที่ 3 และ หรือ 5 ของ วง B และให้สารกลุ่มเดลฟินิดิน (delphinnidin) ซึ่งให้สีโทนม่วงน้ำเงิน

ในส่วนพืชส่วนใหญ่พบว่าเอนไซม์ F3'H และเอนไซม์ F3',5'H มีความสำคัญในการกำหนดเม็ดสี (Holton and Tanaka. 1994) ได้มีการแยกยีน *F3',5'H* จากต้นพิทูเนียโดยอาศัยการพื้นฐานความ คล้ายคลึงของลำดับเบสกับเอนไซม์กลุ่ม P450 ชนิดอื่นๆ พบว่ายีนกลุ่มนี้แสดงออกสูงในดอกไม้ (Holton *et al.* 1993) และยีนของ *F3'H* ก็สามารถแยกได้โดยใช้เทคนิคเดียวกัน

(Burbulis and Winkel-Shirley. 1999) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ายีน *F3',5'H* เพียงลำพังไม่สามารถเปลี่ยนแปลงสีของดอกกุหลาบ (*Rosa* spp.) และดอกคาร์เนชั่น ปกติดอกไม้เหล่านี้จะไม่ให้เม็ดสีสีน้ำเงินม่วง ซึ่งคาดว่าอาจต้องอาศัยเอนไซม์ตัวอื่นร่วมในการทำงาน (Brugliera *et al.* 2000)

อย่างไรก็ตามได้มีรายงานเอนไซม์ F3',5'H ของต้นพิทูเนียต้องการ cytochrome b5 (cty b5) ที่จำเพาะ เพื่อให้เกิดความสามารถในการทำงานสูงสุดโดยคาดว่า cty b5 จะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนต่อเอนไซม์ NADPH : cytochrome P450 reductase เพื่อให้เอนไซม์สามารถจับกับโปรตีน cytohrome P450 มีรายงานถึงการนำยีน *F3',5'H* และ *cyt b5* จากพิทูเนียถ่ายโอนเข้าไปในต้นคาร์เนชั่นพร้อมกัน พบว่าสีของดอกเปลี่ยนแปลงจากเดิมสีขาวไปเป็นม่วงเข้ม (Brugliera *et al.* 2000) ในปัจจุบันได้มีรายงานการศึกษาถึงการสร้างสารแอนโทไซยานิน รวมถึงแนวทางการใช้ประโยชน์จากสารกลุ่มนี้ โดยอาศัยความรู้ทางพันธุศาสตร์ เคมี และชีวเคมี แต่มีวิถีการสังเคราะห์สารกลุ่มนี้มีความสลับซับซ้อน จึงไม่ทราบแนวทางการควบคุมการผลิตที่ชัดเจนในระดับโมเลกุล (Toda *et al.* 2002)

2.4 ยีนควบคุมและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์

มีการจัดจำแนกยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ ในพืชหลายชนิด ยีนควบคุมแบ่งเป็นประเภทต่างๆ ได้ตามโดเมนซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ร่วมกัน ในที่นี้จะกล่าวถึงยีนควบคุมที่มีโดเมน MYB และ basic helix-loop-helix (bHLH) ซึ่งยีน 2 กลุ่มนี้ ได้มีการโคลนและศึกษาการแสดงในพืชหลายชนิด

2.5.1 MYB

โปรตีน MYB จัดเป็นทรานสคริปชันแฟคเตอร์ (transcription factor) ซึ่งมีบริเวณที่สำคัญอยู่ 2 บริเวณ ได้แก่ บริเวณที่ใช้จับกับดีเอ็นเอและบริเวณที่กระตุ้นให้เกิดการลอกรหัส (activation domain) การจำแนก MYB จะใช้บริเวณรีพีท (repeat : R) ซึ่งอยู่ภายในบริเวณที่ใช้จับกับดีเอ็นเอ MYB ในสัตว์มักจะมีรีพีท 3 ชนิด คือ R1, R2 และ R3 ส่วนในพืชมักจะมีเพียง R2 และ R3 เท่านั้น แต่ก็มีพืชบางชนิดที่มีเพียงรีพีทชนิดเดียวหรืออาจมีทั้ง 3 ชนิด แต่ละรีพีทประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 50 ตัว ภายในรีพีทเดียวกันจะมีบริเวณอนุรักษ์ร่วมกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งมีทริปโตเฟนจำนวน 3 ตัวที่อยู่ห่างกันภายในรีพีท จับกันด้วยพันธะทางเคมี ทำให้สายโพลีเพปไทด์เกิดโครงสร้างสามมิติเป็นลักษณะ helix-turn-helix สำหรับในพืชทริปโตเฟนตัวแรกภายใน R3 อาจถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก (aromatic amino acid) ชนิดอื่น (Martin and Paz-Ares. 1997)

2.5.2 bHLH (MYC)

ทรานสคริปชันเฟคเตอร์กลุ่มนี้ที่ปลายด้านหนึ่งของหมู่คาร์บอกซิล จะประกอบด้วย α-helix 2 บริเวณ ได้แก่ helix I และ helix II แต่ละ helix จะมีกรดอะมิโนประมาณ 15-20 ตัว และมี loop สั้นๆเป็นตัวเชื่อมระหว่าง helix เกิดเป็นโครงสร้างตติยภูมิแบบ helix-turn-helix (HLH) ส่วนทางปลายอะมิโนประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นเบสจำนวนมาก โปรตีนที่มีโดเมน bHLH นี้จะจับกับโปรตีนที่มีโดเมนเดียวกันที่บริเวณ HLH เกิดเป็นไดเมอร์ (dimmer) หากโปรตีนที่มีโดเมนนี้เป็นโปรตีนที่เหมือนกันมาจับกัน จะเรียกว่า โฮโมไดเมอร์ (homodimer) ส่วนด้านปลายอะมิโนจะเป็นบริเวณที่เข้าจับกับดีเอ็นเอ โดยบริเวณที่จะเข้าไปจับและประสิทธิภาพในการจับขึ้นอยู่กับโปรตีนที่มาจับกันเป็นไดเมอร์ (Caboche *et al.* 2000)

2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และสะสมสารเฟลโวนอยด์ในพืช

2.6.1 การชักนำด้วยแสง (photo induction)

เนื่องจากแสงเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการผลิตสารเฟลโวนอยด์ ดังนั้นการวิจัยส่วนใหญ่จึงมุ่งศึกษาถึงการชักนำด้วยแสง (Lois and Buchanan. 1994) โดยศึกษาแสงที่ความยาวคลื่นในช่วง UV-B หรือช่วงที่มองเห็นได้ (280-320 nm)และช่วง far-red มีการทำวิจัยเพื่อสนับสนุนเรื่องการชักนำด้วยแสง ในการศึกษาเริ่มต้นนั้นมีการใช้อะราบิดอปซิสสายพันธุ์กลายที่ขาดกิจกรรมของเอนไซม์ CHS และ CHI เพื่อศึกษาหน้าที่ของการป้องกันรังสี UV-B ของสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ (Li *et al.* 1993) มีการศึกษาถึงสารแอนโทไซยานินซึ่งเป็นสารที่สำคัญในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ โดยทำการศึกษาถึงกลไกการยับยั้งการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในที่มืด (Dong *et al.* 1998) นอก จากนี้การศึกษาถึงปริมาณรังสี UV-B ที่มากเกินไปจะทำให้ดีเอ็นเอเสียหายและยับยั้งการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Buchhloz *et al.* 1995)

2.5.2 การชักนำด้วยอุณหภูมิต่ำ (cold temperature induction)

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิต่ำโดยใช้เทคนิค DNA micro array พบว่ายีนที่กำหนดรหัสของเอนไซม์ในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ มีการแสดงออกมากขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำ ตัวอย่างเช่น พบว่ามีการแสดงออกของยีน *F3H* และ *CHI* ในอะราบิดอปซิส (Sarah and Thomasshow. 2002) และยังมีการพบการแสดงออกของยีน *PAL* และ *CHS* ที่เพิ่มขึ้น (Levya *et al.* 1995) นอกจากนี้การศึกษาเกี่ยวกับการชักนำการสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยใช้อุณหภูมิต่ำ พบว่ามีการชักนำให้เกิดแอนโทไซยานินในต้นอะราบิดอปซิสขณะที่ต้นยังอ่อนอยู่ (Leyva *et al.* 1995; Shichijo *et al.* 1993) และข้าวโพด (Christie *et al.* 1994) โดยวิถีสังเคราะห์ของแอนโทไซยานินมีความเกี่ยวข้องกับยีน *cor* (cold-regulation) แต่มีข้อสังเกตว่าที่อุณหภูมิต่ำมากๆ จะลดความสามารถในการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน และจากการศึกษาของ

Mckown *et al.* (1996) สนับสนุนว่าการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและการทนต่ออุณหภูมิที่เย็นจัด มีความเกี่ยวข้องกันทั้งในด้านวิถีสังเคราะห์และวิถีในการควบคุม อย่างไรก็ตามพบว่าในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำและไม่มีแสงจะไม่มีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเกิดขึ้น เช่นเดียวกับข้อสรุปของ Mol *et al.* (1996) ที่ว่ากลไกการชักนำด้วยอุณหภูมิต่ำ และบทบาทหน้าที่ของแสงต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินนั้นยังคงไม่สามารถอธิบายได้

2.5.3 การชักนำทางด้านออสโมติก (Osmotic induction)

เนื่องจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์นั้น ให้ผลผลิตเป็นสารสีซึ่งสามารถตรวจสอบได้ง่ายโดยเฉพาะสารกลุ่มแอนโทไซยานินที่แสดงให้เห็นถึงสีที่แตกต่างกันโดยบริเวณที่สามารถพบว่ามีการสะสมของแอนโทไซยานินมากอยู่ในบริเวณแวคคิวโอลของเซลล์ที่เนื้อเยื่อชั้นนอก (Li *et al.* 1993 ; Lois and Buchanan. 1994) จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชหลายๆ ชนิดพบว่าการสะสมของแอนโทไซยานินเกิดเนื่องมาจากสภาวะเครียดทางออสโมติก (osmotic pressure) โดยการชักนำของน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส (Tholakalabavi *et. al.* 1994) ซูโครส (Cormier *et al.* 1989) และแมนนิทอล (Tholakalabavi *et al.* 1997) ในใบของอะราบิดอปซิส (Mita *et al.* 1997) จะสะสมแอนโทไซยานินเมื่อเลี้ยงในอาหารที่น้ำตาลชนิดต่างๆ นอกจากนี้การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับสภาวะแวดล้อมภายนอกก็ให้ผลที่คล้ายกัน โดยพบว่าการสะสมแอนโทไซยานินมักจะถูกชักนำให้เกิดขึ้นในสภาวะที่มีเกลือ เช่น พบในรากข้าวโพดที่ขึ้นในบริเวณดินที่มีความเค็มสูง (Kaliamoorthy and Rao. 1994) การสะสมของแอนโทไซยานินในใบของต้น *Monis alba* (Ramanjulu *et al.* 1993) เมื่อเจริญในสภาพที่มีดินเค็ม

2.6 ประโยชน์ของเฟลโวนอยด์

2.6.1 ช่วยในการผสมเกสร

การผสมเกสรพันธุ์สามารถพัฒนาดำรงพันธุ์อยู่ต่อได้ไป พืชต้องมีการปรับตัวโดยมีการพัฒนาในส่วนของใบ ดอก มีสีสันสวยงามเพื่อช่วยดึงดูดแมลง หรือมีรูปทรงเอื้ออำนวยต่อการผสมเกสร เช่น การทำให้สีดอกมีสีสันสวยงามเป็นต้น เนื่องจากแอนโทไซยานินดูดกลืนแสงได้ดีในช่วงรังสี UV-B (Dooner *et al.* 1991 ; Koes *et al.* 1994 ; Dixon and Paiva. 1995) จึงช่วยให้แมลงที่ไวต่อรังสีนี้มาช่วยผสมเกสรได้ดีด้วย

2.6.2 ช่วยดูดกลืนรังสี UV-B

รังสี UV-B มีความยาวคลื่นสั้นทำให้มีพลังงานสูงเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต ขัดขวางการจำลองตัวของดีเอ็นเอ และมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ระดับยีนหรืออาจถึงขั้นกลายพันธุ์ในธรรมชาติ เฟลโวนอยด์มีบทบาทสำคัญในการป้องกันรังสี UV-B เพราะมีการสะสมของสาร

แอนโทไซยานินภายในเซลล์บริเวณรอบนอกของส่วนต่างๆของพืช (Li *et al.* 1993) เพื่อคอยดูดซับหรือกรองรังสี UV-B ไว้ ทำให้ดีเอ็นเอที่อยู่ภายในเซลล์ไม่ได้รับอันตราย มีการศึกษาพบว่าในใบของอะราบิดอปซิสนั้นมีปริมาณของเฟลโวนอยด์ เช่น เคเอ็มฟีรอล และ มีสารจำพวกไซแนปแพลตเอสเทอร์ (sinapate ester) เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับแสง UV-B ที่เพิ่มขึ้น (Lois and Buchanan. 1994)

2.6.3 ช่วยดูดซับอนุมูลอิสระ

เฟลโวนอยด์ทำหน้าที่เป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ (Rice-Evans *et al.* 1997) ในกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะกระบวนการออกซิเดชั่น ในแง่ของประโยชน์ด้านโภชนาการมีรายงานว่าสารต้านอนุมูลอิสระช่วยลดความเสี่ยงจาก โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน โรคมะเร็ง โดยทำหน้าที่ยับยั้งการรวมตัวระหว่างออกซิเจนกับคลอเลสเตอรอลชนิดความหนาแน่นต่ำ (LDL-cholesterol) ซึ่งเป็นไขมันที่ไม่ดีในขณะเดียวกันก็ช่วยเพิ่มปริมาณของคลอเลสเตอรอลชนิดความหนาแน่นสูง (HDL- cholesterol) ซึ่งเป็นไขมันที่ดีมีประโยชน์ให้สูงขึ้น

2.6.4 ต่อต้านจุลินทรีย์

ได้มีการศึกษาและทดลองในสารกลุ่มเฟลโวนอยด์หลายชนิด พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งและต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น ต่อต้านต่อเชื้อแบคทีเรีย (Tereschuk *et al.* 1980) ต่อต้านเชื้อรา (Harborne and Williams. 2000) และต่อต้านไวรัส (Forkmann 1991) โดยพบการสะสมของสาร 3-ดีออกซีแอนโทไซยานิดิน (3-deoxyanthocyanidins) ในข้าวฟ่างแสดงลักษณะเป็นพิษต่อเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในพืช (Lo *et al.* 1996) ข้าวฟ่างสายพันธุ์ที่มีเฟลวาน 4 ออล (flavan 4-ol) สูงจะสามารถต้านทานเชื้อราได้เพิ่มมากขึ้น (Jambunathan *et al.* 1990) รูปแบบการสะสมของสารกลุ่มแนรินเจนนินในพืชจะมีผลทำให้โรคไหม้เข้าทำลายใบพืชได้แตกต่างกัน (Dillon *et al.* 1997) โดยจะไปมีผลต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา ที่ก่อให้เกิดโรคใบไหม้ซึ่งอาจเป็นเพราะสารมีคุณสมบัติเป็นไลโปฟิลิค (lipophilic) นอกจากนั้นยังพบว่าสารสกัดจากแอนโทไซยานินจากใบข้าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomanas* ได้ (Padmavati *et al.* 1997)

2.6.5 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

มีการนำความรู้เกี่ยวกับสารเฟลโวนอยด์โดยเฉพาะแอนโทไซยานิน มีการนำมาใช้มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มตลอดเวลา ทั้งในด้านคุณภาพและการเก็บรักษาเช่น การแปรรูปอาหารต้องรักษาคุณค่าของสารแอนโทไซยานินให้คงเดิมมากที่สุด การเก็บหรือการบรรจุภัณฑ์ ต้องทำโดยกรรมวิธีที่จะไม่ทำให้คุณสมบัติของสารนี้เปลี่ยนไป รวมถึงการสกัดสารเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ในการทำสีผสมอาหารในรูปแบบต่างๆ (Harbowy and Balentine. 1997)

2.7 การปรับตัวเข้ากับสภาวะเครียดของพืช

กลไกต่างๆ ที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดในพืช เพื่อทำให้พืชนั้นสามารถปรับเปลี่ยนตัวเองให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ โดยเริ่มจากการมีการส่งสัญญาณ (signal transduction) ภายใต้สภาวะเครียด (Zhu. 2001) เพื่อให้เซลล์ต่างๆรับรู้ถึงสภาวะที่เกิดขึ้นกับตัวพืชเอง พืชจะมีการตอบสนองโดยการสะสมสารต่างๆ เพื่อให้พืชสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะเครียด ยีนที่แสดงออกภายใต้สภาวะเครียดจะให้โปรตีนหลายชนิดแต่ละชนิดมีหน้าที่แตกต่างกันออกไป เพื่อประโยชน์ในด้านการปรับตัวของพืชที่หลากหลาย เช่น ผลิตสารที่ไปเพิ่มหรือไปปรับแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ เช่น น้ำตาลแอลกอฮอล์ (sugar alcohol) ไกลซีน เบต้าอีน (glycine betanine) โพรลีน (proline)โพลีเอมีน (polyamines: PAs) เป็นต้น รักษาโครงสร้างของโปรตีนหรือเอนไซม์ ขจัดสารก่ออนุมูลอิสระ (oxygen species : ROSs) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ กลไกการลด ROSs ของพืชนั้นจะมีการสร้างเอมไซม์ต่างๆ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase: SOD) แอ็สคอเบทเปอร์ออกซิเดส (ascorbate peroxidase : ASX) กลูตาไทโอนทรานสเฟอเรส (glutathione transferases; GST) และสารที่ไม่ใช้เอมไซม์ (Bohnert and Jensen. 1996)

ปัจจุบันได้ศึกษาในพืชชั้นสูงพบว่ามีวิถีชีวเคมีที่หลากหลาย ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียด แม้ว่าจะเห็นได้ไม่ชัดเจน แต่ก็มี 2 วิถีที่สามารถเห็นได้อย่างชัดเจน และนำมาศึกษาคือ การตอบสนองต่อปัจจัยภายนอกของกรดแอบส์ไซซิก (abscisic acid : ABA) และในวิถีชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ (flavonoid biosynthesis pathway) โดยการตอบสนองต่อกรดแอบไซซิก มีการศึกษากันอย่างมากมายในพืชทดลองอะราบิดอปซิส (Pastori and Foyer. 2002) ส่วนในธัญพืชหลักอื่นๆ ที่สำคัญทางเกษตรกรรมรวมถึงข้าวด้วยยังพบการศึกษาไม่มากนัก มีสิ่งหนึ่งที่พบได้ทั่วไประหว่างกรดแอบไซซิกและเฟลโวนอยด์ คือบทบาทของ MYB และ MYC ที่เป็นตัวกระตุ้นการลอกรหัสของยีนที่แสดงออก โดยยีน *Atmyb2* และ *rd22BP1* ในอะราบิดอปซิส จะควบคุมยีน *rd22* ในการตอบสนองต่อ กรดแอบไซซิกที่ได้รับ ส่วนในข้าวโพด (maize) ผลิตภัณฑ์ของยีน *C1-myb* จะควบคุมการแสดงออกของยีนในวิถีเฟลโวนอยด์โดยทำงานร่วมกับโปรตีนกลุ่ม MYC ที่กำหนดรหัสโดยยีน *R* (Lloyd *et al.* 1992; Grotewold *et al.* 1994) อย่างไรก็ตาม มีรายงานน้อยมากที่ศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองต่อความเครียด ความแห้งแล้ง และความเค็ม ของยีนในวิถีเฟลโวนอยด์ แต่รายงานนี้ก็เป็นหนึ่งในนั้นที่ศึกษาวิถีชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์และการตอบสนองต่อความเครียดของพืชชั้นสูง (Chalker-Scott. 1999) โดยยีนในวิถีชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์นั้นจะกำหนดหน้าที่ในธัญพืชหลัก 2 ชนิด คือ ข้าวโพด และข้าว มีรายงานว่าวิถีเฟลโวนอยด์ในข้าวจะตอบสนองต่อความเครียดที่เป็นทั้งปัจจัยภายในและภายนอก โดยสะสมเฟลโวนอยด์เพื่อตอบสนองต่อรังสี UV-B (Reddy *et al.* 1994) ความเย็น (Chiristie *et al.* 1994) และความแห้งแล้ง (Alexieva *et al.* 2001) ซึ่งรายงานทั้งหมดนี้ใช้วิธีดูลักษณะที่แสดงออก และการวิเคราะห์ทางเคมีเป็นหลัก ทำให้ไม่ทราบข้อมูลการแสดงออกของยีนเฟลโวนอยด์เมื่อได้รับความเครียด

บทที่ 3
การดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เมล็ดพันธุ์พืช

- กะเพราแดง
- ยาสูบ

3.1.2 อาหารที่ใช้ในการทดลอง

- อาหารสูตร MS สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB, YEB, 2xYT, SOB และ SOC

3.1.3 สารเคมี

- สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการโคลนยีน
- สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์
- สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเพื่อเลี้ยงเชื้อและทำการคัดเลือกโคลน
- สารเคมีที่ใช้ในการทำ competent cell
- สารเคมีที่ใช้ในการทำ transformation
- สารเคมีที่ใช้ในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิส
- สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1.4 อุปกรณ์ที่ใช้

3.1.4.1 ประเภทเครื่องแก้ว

- บีกเกอร์
- ปิเปต
- ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- จาน petri-dish
- แท่งแก้วคน
- ขวดวัดปริมาตร
- กระบอกตวง

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.1.4.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ

- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV-50, Japan)
- เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) (Hermle Z383K, Germany)
- ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS12,Thailand)
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gellenkamp T4901 UK)
- ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) (Scientific Promotion Binder,Thailand)
- ตู้อบไอร้อน (Hot air oven) (Data Laboratory 1375FX, Thailand)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Cyberscan 2000)
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ (Ultra-low temperature freezer) Sanyo
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Shimadzu UV-1601, Japan)
- ชุดอุปกรณ์ถ่ายรูปและวิเคราะห์อะกาโรสเจล (Gel documentation) (Syngene MD1 1019, Japan)

3.1.4.3 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- แสง 500-1000 ลักซ์
- อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การศึกษาการผลิตสารในวิถีชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ต่อการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของต้นกะเพราแดง

3.2.1.1 การเตรียมพืชและวิธีทดลอง

ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดกะเพราประมาณ 150 เมล็ดในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมไฮเตอร์® (สารออกฤทธิ์โซเดียมไฮโปรคลอไรต์ 6%) 1 มิลลิลิตร นาน 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงให้เมล็ดตกตะกอนด้วยความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทไฮเตอร์ทิ้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 8 ครั้ง นำเมล็ดวางบนอาหาร MS (Murashige and Skoog. 1962) (ภาคผนวก ก) ในการทดลองนี้เพาะเลี้ยงต้นกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้ออายุ 4 สัปดาห์มาเลี้ยงในอาหาร MS สูตรปกติที่มีการเติมสารบางอย่างเพิ่มหรือลดจากสูตรปกติ ทำการบ่มขวด

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 °C ให้แสงสว่างความเข้มแสงประมาณ 500 ลักซ์ 16 ชั่วโมง และมืด 8 ชั่วโมงตอนกลางคืน ยกเว้นในสภาวะที่ทดสอบปัจจัยด้านอุณหภูมิ

สำหรับปัจจัยแรงดันออสโมติก ใช้อาหารสูตร MS ที่มีการเติมเกลือความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, และ 400 mM น้ำตาลความเข้มข้น 2, 3, 4, 5 และ 6% และวุ้นความเข้มข้น 7, 8, 9 และ 10% นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C ความเข้มแสงประมาณ 500 ลักซ์ เป็นระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์

ในการทดลองปัจจัยด้านอุณหภูมิจะปลูกกะเพราในอาหาร MS ปกติในช่วงเวลากลางวันจะเพาะเลี้ยงกะเพราที่อุณหภูมิห้องปกติ ส่วนในช่วงเวลากลางคืนนำชุดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 °C ปัจจัยด้านแสงจะปลูกกะเพราในอาหาร MS แล้วนำต้นกะเพราไปบ่มที่ความเข้มแสง 500 และ 1000 ลักซ์

3.2.1.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มเฟลโวนอยด์

นำกะเพราสดน้ำหนัก 0.5 กรัมจากการทดลองที่ 3.2.1 มาเติมสารสกัดระหว่างเมทานอลและไฮโดรคลอลิก (99:1) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมน้ำลงไป 2 มิลลิลิตร นำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงทำให้เซลล์แตกนำ ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นำสารละลายส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเฉพาะของสารนั้นๆ (Harborne. 1998) ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงความยาวคลื่นแสงที่ให้ผลในการดูดกลืนแสงได้สูงสุดในกลุ่มเฟลโวนอยด์

ชนิดของสาร	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)
แอนโทไซยานิน	
เพลาโกนิดิน	520
ไซยานิดิน	535
เดลฟินิดิน	520
เฟลโวนอล	
เคเอ็มฟีรอล	368
เคอร์วเซติน	374
ไมริซิติน	378
เฟลโวน	
อะพิจินิน	336
ลูทิโอลิน	350

ที่มา : Harbone (1998)

การวางแผนการทดลองในแต่ละปัจจัยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design,CRD) จำนวน 4 ซ้ำ วิเคราะห์ ANOVA ดูความแตกต่างของชุดทดลองแล้ววิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple-range test (DMRT)

3.2.2 การศึกษาแนวทางการถ่ายโอนยีนกลุ่มเฟลโวนอยด์เข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

3.2.2.1 การโคลนยีน

ใช้ cDNA จากต้นอะราบิดอปซิส (*Arabidopsis thaliana*) เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสำหรับทำพีซีอาร์ โดยไพร์เมอร์ที่ใช้ ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของอะราบิดอปซิสจาก GenBank และติดอะแดปเตอร์ (adaptor) ที่ปลายด้วย *BamHI* ซึ่งมีลำดับดังนี้

F3'HF*BanHI*site 5'CGG GAT CCA TGG CAA CTC TAT TTC TCA C3'

F3'HR*BanHI*site 5'CGG GAT CCA CCC GAC CCG AGT CCA TAA A3

การทำพีซีอาร์ใช้ cDNA เริ่มต้น 1 ไมโครกรัมเติม 10x Taq buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 10 mM dNTP ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10 μM ไพรเมอร์ F3'HF*BanHI*site และ F3'HR*BanHI*site ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เอนไซม์ Tag DNA polymerase ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร และเติมน้ำให้ครบ 50 ไมโครลิตร นำไปเพิ่มปริมาณด้วยเครื่องพีซีอาร์ของ EPPENDORF รุ่น MASTER CYCLER EP GRADIENTS โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Predenaturation	ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที	
3 step cycling		
Denaturation	ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที	35 รอบ
Annealing	ที่ 55 องศาเซลเซียส สำหรับยีน *F3'H* นาน 2 นาที	
Extension	ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที	
Final extension	ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที	

ตรวจสอบผลพีซีอาร์ที่ได้โดยใช้เทคนิคอิเล็คโตรโฟรีซีสบนอะกาโรส 1.0 % ใช้กระแสไฟ 100โวลต์ นาน 30 นาที เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับเวคเตอร์ (ligation) ใช้เวคเตอร์ yT&A (Promega) 1 ไมโครลิตร ligation buffer A 1 ไมโครลิตร ligation buffer B 1 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอ 4 ไมโครลิตร T4 DNA

ligase 1 ไมโครลิตร บ่มที่ 16 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ NAVA BLUE และสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยวิธีย่อยด้วยด่าง (alkaline lysis : SDS) ตามวิธีของ กนกพร สมพรไพลิน (2547) (ในภาคผนวก ข.) หลังจากนั้นดีเอ็นเอที่ได้จะนำไปเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pBI121 ซึ่งจะถ่ายเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมต่อไป (ภาคผนวก ข.) และคัดเลือกโคลนบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะคาร์นามัยซิน (kanamycin; Km) ทำการสกัดดีเอ็นเอจากอะโกรแบคทีเรียมที่ได้ และใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการยืนยันผลการถ่ายโอนยีน จากนั้นนำอะโกรแบคทีเรียมที่ได้ไปถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบด้วยวิธี Freeze-thaw ตามวิธีของ กนกพร สมพรไพลิน (2546) การคัดเลือกต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ Km นำต้นยาสูบที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอ (ภาคผนวก ข.) เพื่อตรวจสอบผลถ่ายโอนยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ ตรวจสอบต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ตามเงื่อนไขการทำงานดังนี้

การทำพีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากยาสูบ 1 ไมโครกรัมเติม 10x Taq buffer 5 ปริมาตรไมโครลิตร 10 mM dNTP ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10 μM ใช้ไพรเมอร์ F3'HF*BanH*Isite และ F3'HR*BanH*Isite สำหรับ ยาสูบ F3'H และสำหรับยาสูบ DFR .ใช้ ไพรเมอร์ DFRF*BanH*Isite และ F3'HR*BanH*Isite สำหรับ ยาสูบ F3'H ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เอนไซม์ Tag DNA polymerase ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร และเติมน้ำให้ครบ 50 ไมโครลิตร นำไปเพิ่มปริมาณด้วยเครื่องพีซีอาร์ของ EPPENDORF รุ่น MASTER CYCLER EP GRADIENTS โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Predenaturation	ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที	
3 step cycling		
Denaturation	ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที	35 รอบ
Annealing	ที่ 55 องศาเซลเซียส สำหรับยีน *F3'H* ที่ 52 องศาเซลเซียส สำหรับยีน *DFR* นาน 2 นาที	
Extension	ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที	
Final extension	ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที	

จำนวน 40 รอบ ตรวจสอบผลพีซีอาร์ ที่ได้โดยทำอิเล็คโตรโฟรีซีสบนอะกาโรส 1.0 % ใช้กระแสไฟ100โวลต์ นาน 30 นาที เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.3 การศึกษาผลของต้นยาสูบที่ได้รับยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์เมื่อได้รับสภาวะเครียด

หลังจากที่ได้คัดเลือกต้นยาสูบตัดต่อพันธุกรรมที่มียีน *F3'H* แล้ว จะทำการเพิ่มปริมาณต้นยาสูบให้ได้ปริมาณมากเพื่อนำมาทดสอบกับสภาวะเครียดอีกครั้ง นอกจากนี้ยังมีการทดสอบต้น

ทดสอบสภาวะเครียดมีอายุประมาณ 15 วัน ต้นมีความสูงประมาณ 3 ใน 4 ของขวดขนาด 8 ออนซ์ มีใบประมาณ 4-5 ใบ และมีความยาวรากประมาณ 2 เซนติเมตร ดังแสดงในภาพที่ 3.1

ภาพที่ 3.1 ตัวอย่างต้นยาสูบที่ใช้ทำการทดลอง

การทดสอบด้วยสภาวะเครียดใช้ปัจจัยดังนี้

3.2.3.1 ปัจจัยแรงดันออสโมติก

อาหาร MS ที่มีการเติมเกลือความเข้มข้น 50 mM อาหาร MS ที่มีการเติมน้ำตาลความเข้มข้น 5% และอาหาร MS ที่มีวุ้นความเข้มข้น 0.9% นำต้นยาสูบที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 500 ลักซ์ เป็นเวลา 15 วัน

3.2.3.2 ปัจจัยด้านอุณหภูมิ

ปลูกยาสูบในอาหาร MS ในช่วงเวลากลางวันบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนในช่วงเวลากลางคืนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน

3.2.3.3 ปัจจัยด้านแสง

ปลูกยาสูบในอาหาร MS นำไปบ่มในชั้นเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ เป็นเวลา 15 วัน

ในการศึกษาผลของยาสูบที่ได้รับยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ เมื่อได้รับสภาวะเครียด ใช้แผนการทดลองในแต่ละปัจจัยแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design,CRD) จำนวน 4 ซ้ำ หลังจากทดลองครบ 15 วันตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของต้นยาสูบ จากนั้นนำมาสกัดสารเพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อดูการตอบสนองของสารที่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์เมื่อต้นยาสูบได้รับสภาวะเครียด เปรียบเทียบกับต้นยาสูบปกติที่ได้รับสภาวะเครียดเช่นเดียวกันกับวิธีการในข้อ 3.2.1.2 วิเคราะห์ ANOVA ดูความแตกต่างของชุดทดลองแล้ววิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple-range test (DMRT)

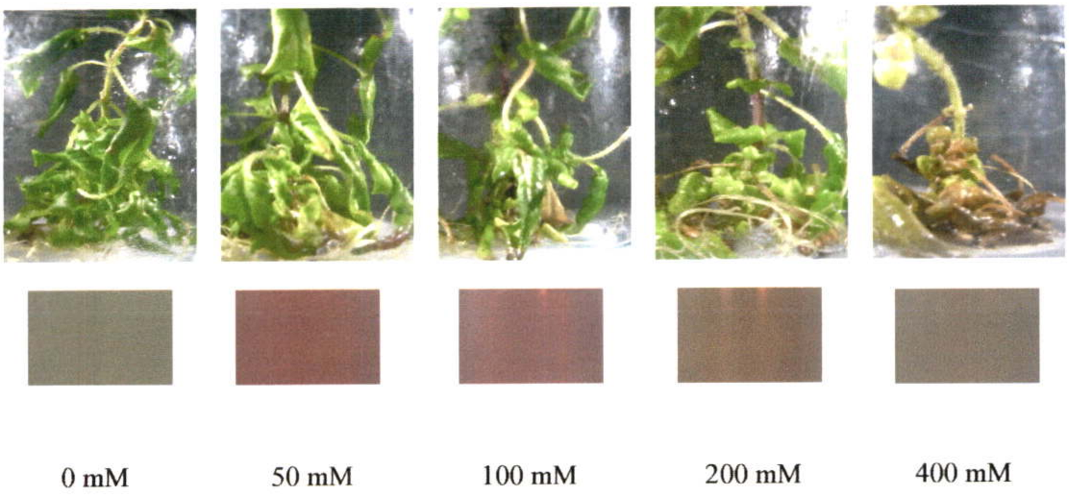
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การศึกษาการผลิตสารในวิถีชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ ต่อการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของต้นกะเพราแดง

4.1.1 ปัจจัยด้านแรงดันออสโมติก

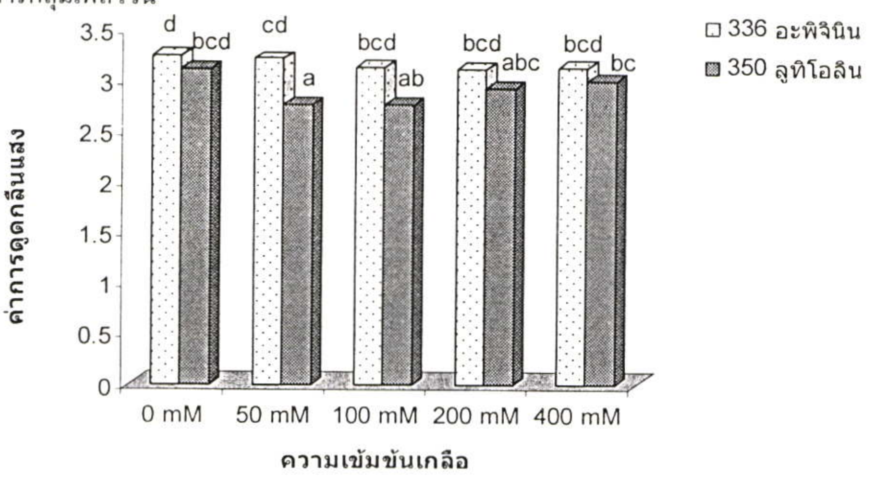
4.1.1.1 ผลของเกลือต่อการผลิตสารในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์

ต้นกะเพราที่เจริญในอาหาร MS ที่ไม่มีการเติมเกลือให้ลักษณะลำต้นและใบมีสีเขียว เมื่อระดับความเข้มข้นเกลือสูงขึ้น (50, 100 และ 200 mM) จะพบการเปลี่ยนแปลงของลำต้นที่มีสีแดงเข้มขึ้น ขณะที่ใบก็มีสีเข้มขึ้นที่คาดว่าน่าจะมีการสะสมของเม็ดสีของสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน ดังรายงานของ Ramanjulu และคณะ (1993) พบว่ามีการสะสมของแอนโทไซยานินในใบและลำต้นของต้น *Monis alba* ซึ่งหลังจากการศึกษาบริเวณที่มีการสะสมของแอนโทไซยานินโดยการตัดตามขวางของเนื้อเยื่อพืช และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำพบว่ามีการสะสมของเม็ดสีแอนโทไซยานินบริเวณแวคคิวโอล ในขณะที่สารสกัดกะเพราพบว่ามีสีแดงมากที่ระดับความเข้มข้นเกลือ 50 และ 100 mM สำหรับที่ระดับความเข้มข้นของเกลือ 400 mM ต้นกะเพรามีลักษณะการเจริญที่ผิดปกติใบมีสีเหลืองซีดและเริ่มร่วง คาดว่าความเข้มข้นเกลือสูงเกินไป

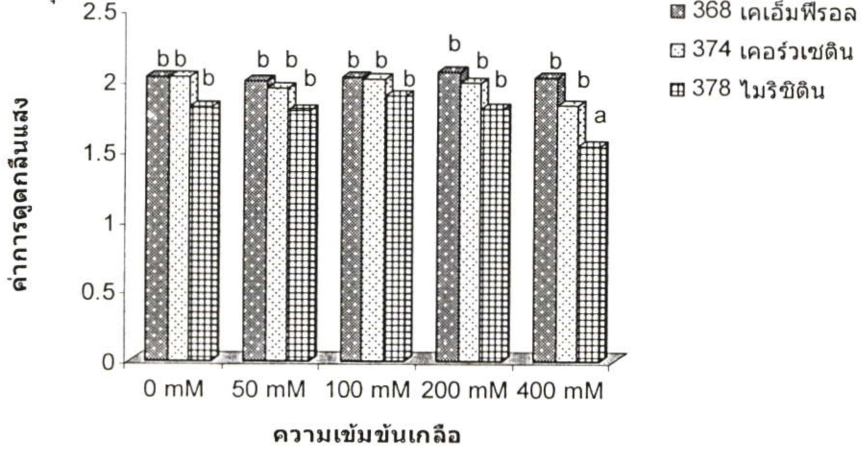


ภาพที่ 4.1 ต้นกะเพราและสีของสารสกัดกะเพราในอาหารที่มีเกลือระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

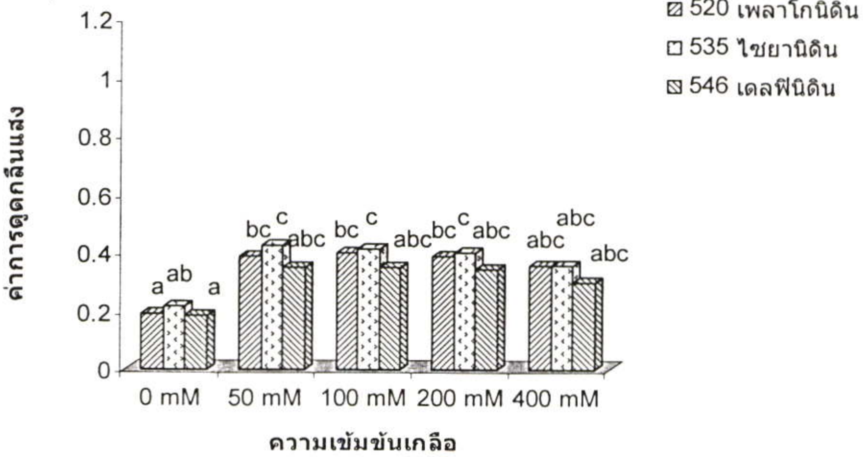
ก. สารกลุ่มเฟลโวน



ข. สารกลุ่มเฟลโวนอล



ค. สารกลุ่มแอนโทไซยานิน

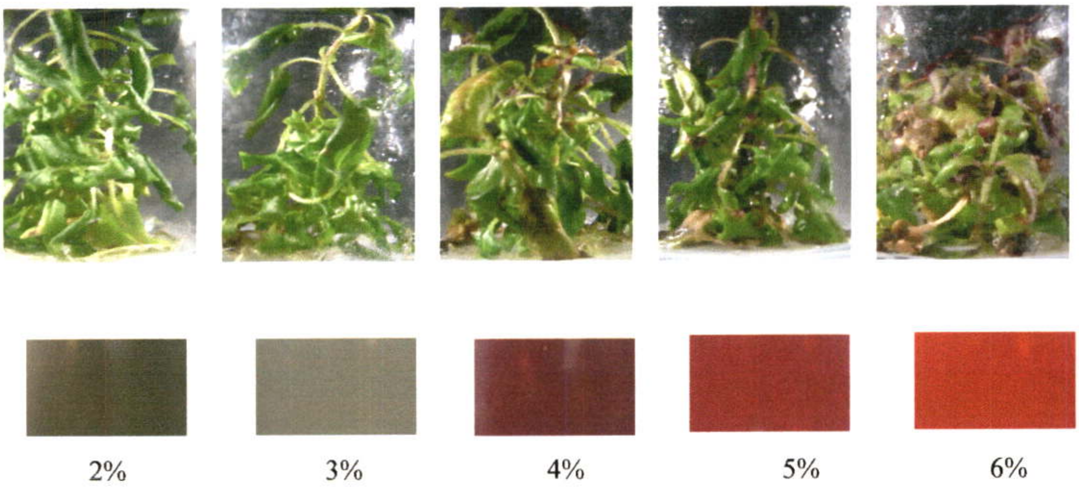


ภาพที่ 4.2 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกะเพราในสภาวะที่มีเกลือ แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารเฟลโวนอยด์แต่ละกลุ่มกับระดับความเข้มข้นของเกลือ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยใช้สารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล. ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT p = 0.5)

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากต้นกะเพราที่ได้รับเกลือ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองควบคุมที่ไม่ได้รับเกลือ พบว่าต้นกะเพราที่ได้รับเกลือในช่วง 50-200 mM ให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มเฟลโวนและเฟลโวนอลไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุม ในส่วนของสารในกลุ่มแอนโทไซยานินมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการทดลองควบคุม โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้นเกลือ 50-100 mM มีค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนดังแสดงภาพที่ 4.2

4.1.1.2 ผลของน้ำตาลต่อการผลิตสารในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์

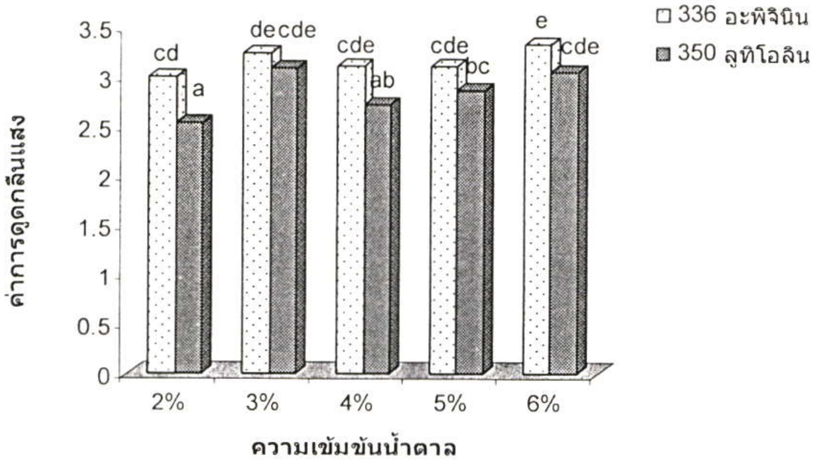
ต้นกะเพราที่เจริญในอาหาร MS ที่มีน้ำตาล 2% และ 3% พบว่ามีลำต้นและใบสีเขียวอ่อน เมื่ออาหาร MS มีความเข้มข้นของระดับน้ำตาลสูงขึ้น (4% 5% และ 6%) การเจริญของลำต้นและใบจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีแดง ในขณะที่สารสกัดให้สีแดงขึ้นเช่นเดียวกัน ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล 6% จะเห็นว่าการเจริญของต้นกะเพราผิดปกติ สังเกตว่าใบมีขนาดเล็กแตกออกเป็นพุ่มและปลายยอดมีสีแดงดังภาพ 4.3



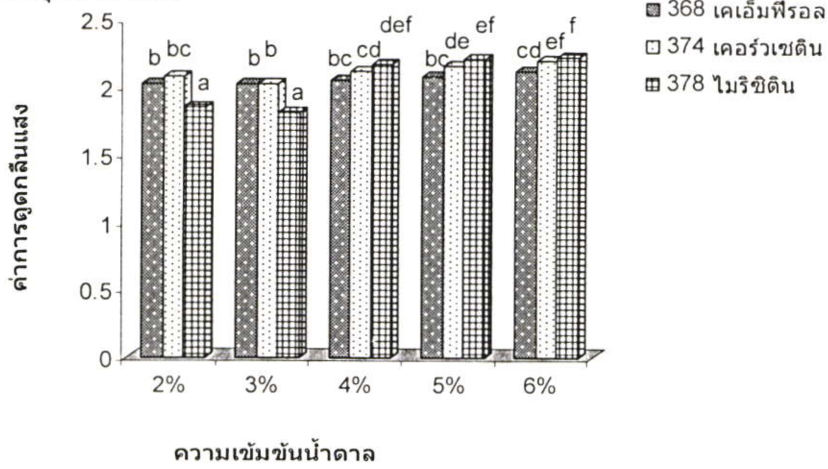
ภาพที่ 4.3 ต้นกะเพราและสีของสารสกัดกะเพราในอาหารที่มีน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

สารในกลุ่มเฟลโวนและเฟลโวนอล มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก เมื่อเทียบกับการทดลองควบคุม (น้ำตาล 3%) สารไมริซิตินซึ่งเป็นกลุ่มของเฟลโวนอลมีแนวโน้มการสะสมสูงขึ้นที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล 4% ขึ้นไป สำหรับสารกลุ่มแอนโทไซยานินมีค่าการดูดกลืนมีแนวโน้มสูงขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล 5 และ 6% มีความแตกต่างทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 4.4

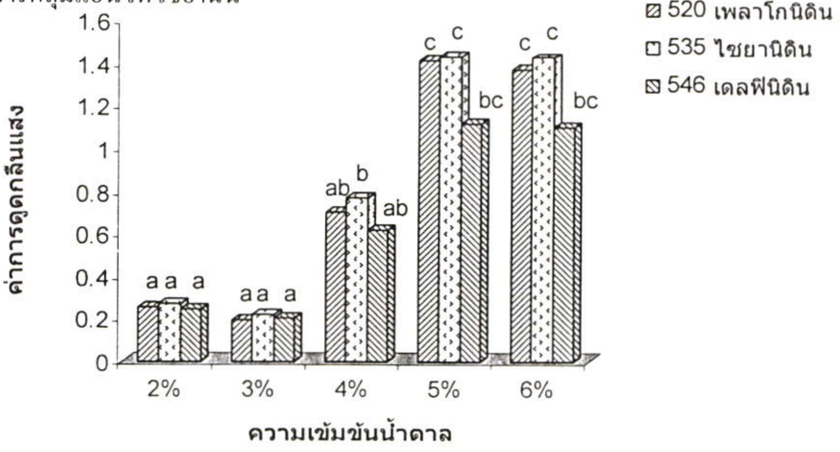
ก. สารกลุ่มเฟลโวน



ข. สารกลุ่มเฟลโวนอล



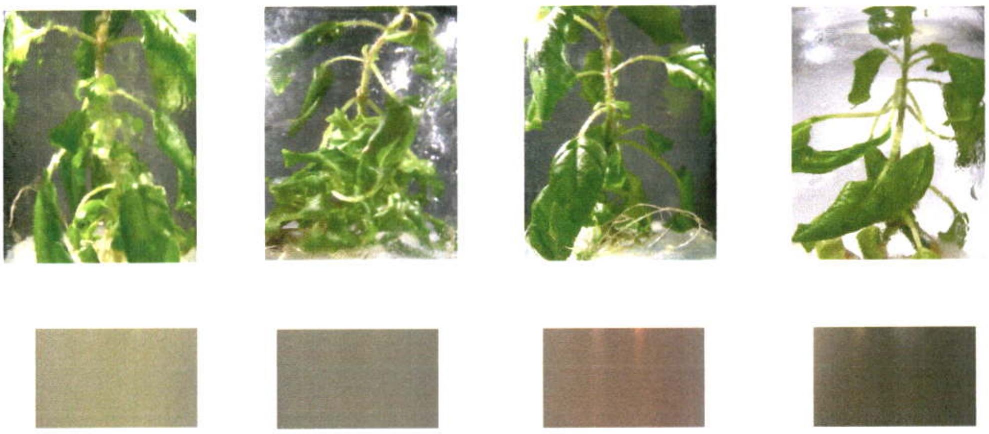
ค. สารกลุ่มแอนโทไซยานิน



ภาพที่ 4.4 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกะเพราในสภาวะที่มีน้ำตาล แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารเฟลโวนอยด์แต่ละกลุ่มกับระดับความเข้มข้นของน้ำตาล เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยใช้สารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล.ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT p = 0.5)

4.1.1.3 ผลของวุ้นต่อการผลิตสารในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์

อาหาร MS ที่มีความเข้มข้นของวุ้น 0.7% และ 0.8% จะมีลำต้นและใบสีเขียวอ่อน เมื่อระดับความเข้มข้นของวุ้นสูงขึ้นโดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้นของวุ้น 0.9% ใบจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มมากขึ้นและส่วนของลำต้นจะมีสีแดง ในขณะที่สารสกัดให้สีแดงขึ้นเช่นเดียวกัน ส่วนกะเพราที่เจริญในอาหาร MS ที่ระดับความเข้มข้นวุ้น 1% .ให้ปริมาณสารแอนโทไซยานิลดลง สังเกตได้จากสีของลำต้นและสารสกัดกะเพรา ดังแสดงในภาพ 4.5

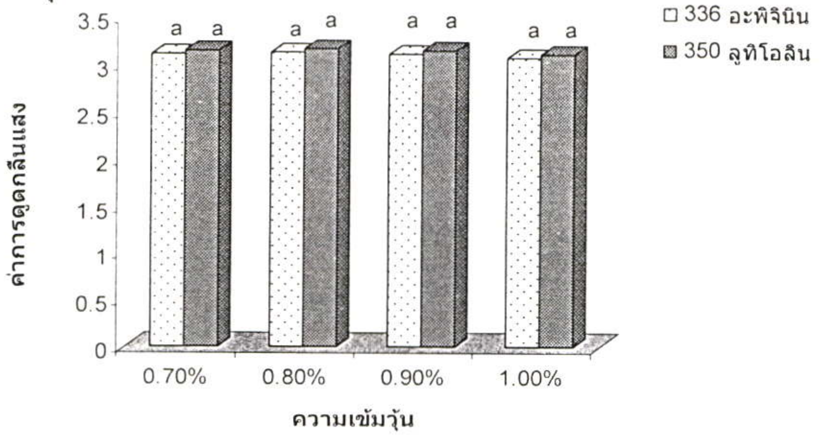


0.7% 0.8% 0.9% 1.0%

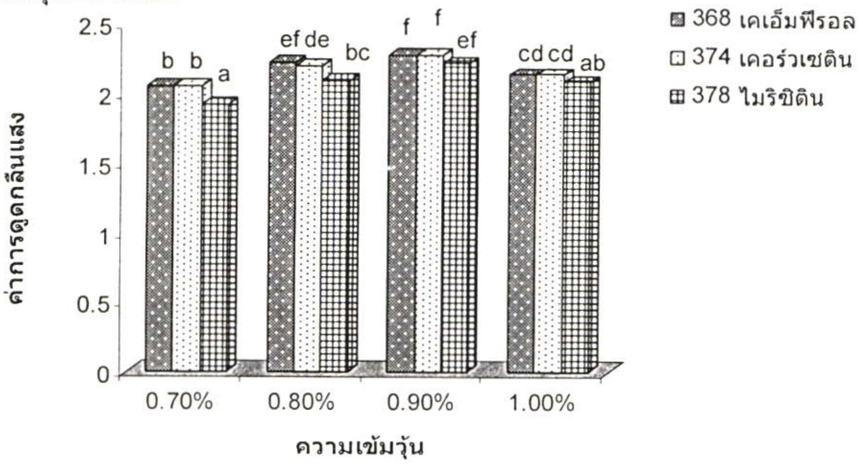
ภาพที่ 4.5 ต้นกะเพราและสีของสารสกัดกะเพราในอาหารที่มีวุ้นระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มเฟลโวนของสารสกัดกะเพราที่เจริญในอาหาร MS ที่มีระดับความเข้มข้นวุ้นที่แตกต่างกันในทุกระดับความเข้มข้นพบว่ามีค่าไม่แตกต่างทางสถิติ สำหรับค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกะเพราที่เจริญในอาหาร MS ที่ระดับความเข้มข้นวุ้นที่ 0.9% จะมีการแสดงออกของสารกลุ่มเฟลโวนอลและแอนโทไซยานิน มากกว่าที่ระดับความเข้มข้นของวุ้นอื่นๆ และค่าที่ได้มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเทียบกับชุดทดลองควบคุมคือ อาหาร MS ที่มีระดับความเข้มข้นวุ้น 0.8 %

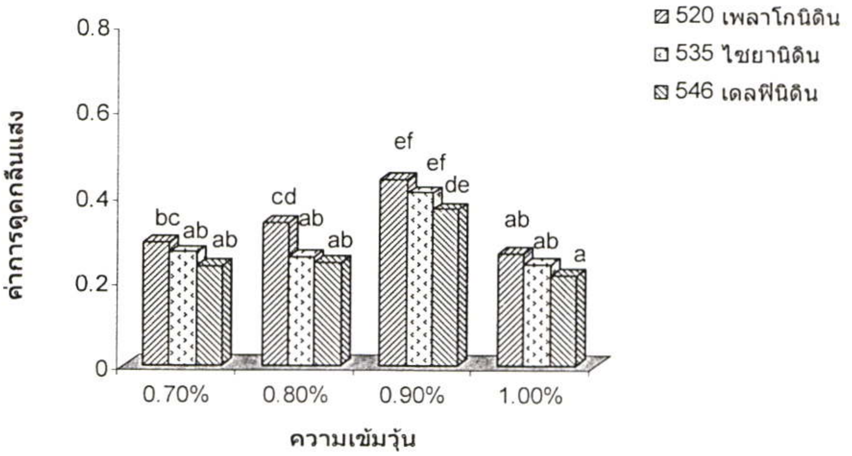
ก. สารกลุ่มเฟลโวน



ข. สารกลุ่มเฟลโวนอล



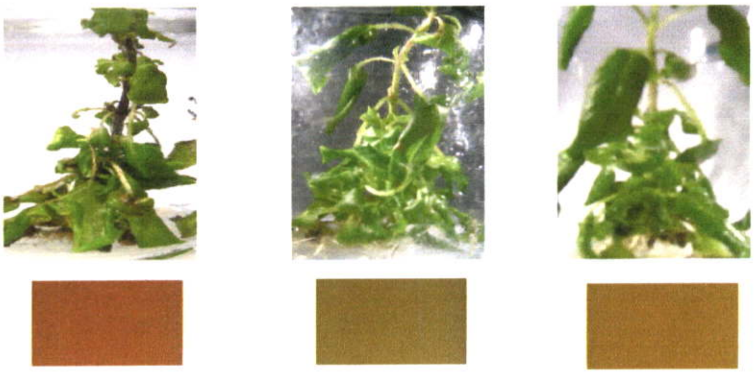
ค. สารกลุ่มแอนโทไซยานิน



ภาพที่ 4.6 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกะเพราในสภาวะที่มีวุ้น แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารเฟลโวนอยด์แต่ละกลุ่มกับระดับความเข้มข้นของวุ้น เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยใช้สารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล. ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT p = 0.5)

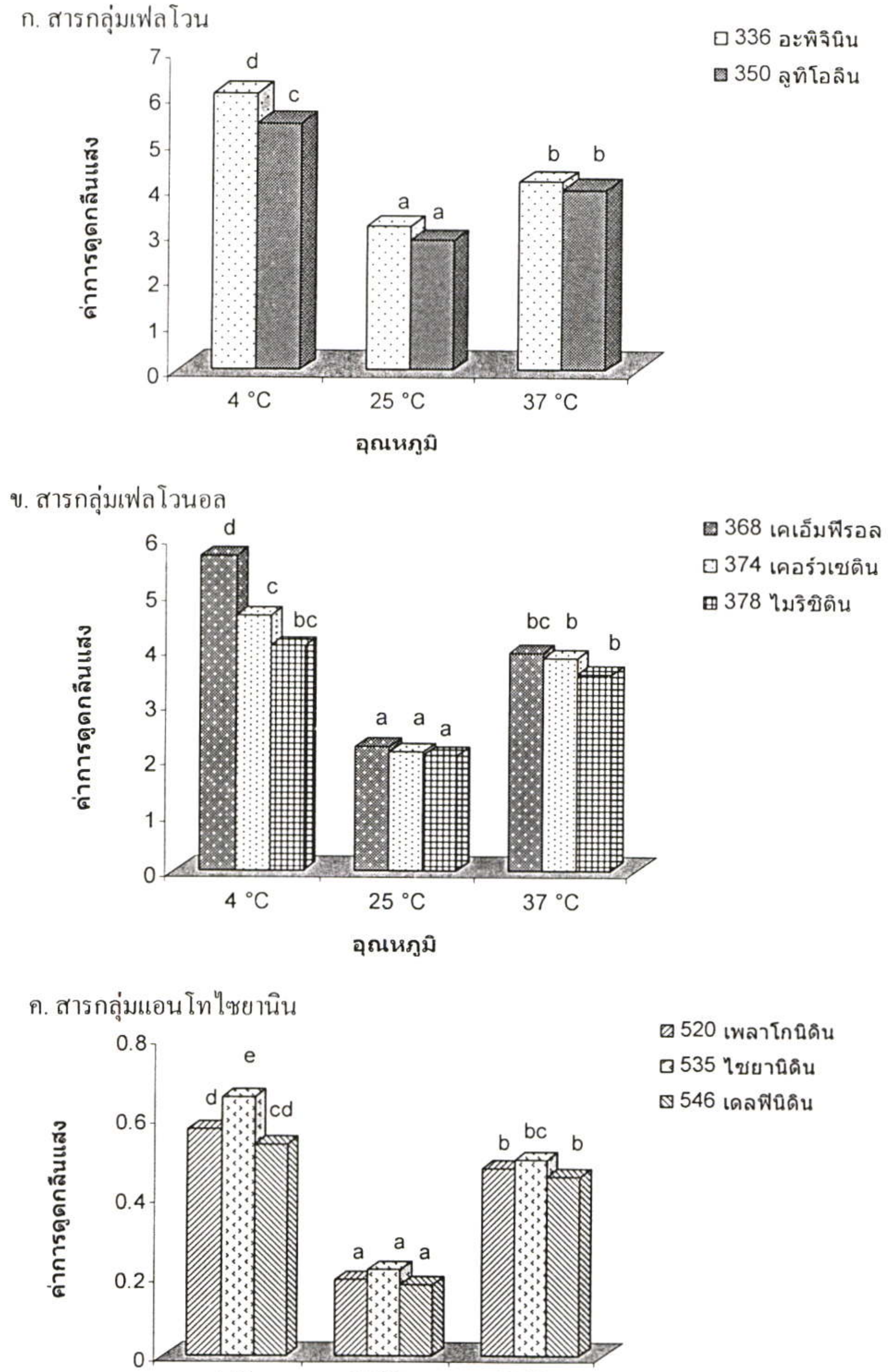
4.1.2 ปัจจัยด้านอุณหภูมิ

กะเพราที่ปลูกในอุณหภูมิในห้องเพาะเลี้ยงปกติคือ 25°C ต้นกะเพราที่ได้จะมีลำต้นและใบสีเขียวมีการแตกใบใหม่จำนวนมาก ขณะที่กะเพราที่ปลูกในอุณหภูมิปกติในห้องเพาะเลี้ยง 16 ชั่วโมงในช่วงเวลากลางวันและนำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 4°C ในช่วงเวลากลางคืนประมาณ 8 ชั่วโมง พบว่ากะเพรามีลำต้นสีแดงเข้มใบมีสีเขียวเข้มและมีใบบางใบที่มีสีเหลือง มีลักษณะใบหงิกงอ การเจริญเติบโตของกะเพราไม่สมบูรณ์ ในขณะที่สารสกัดกะเพราที่ได้มีสีแดงคาดว่าน่าจะมีการสะสมของสารแอนโทไซยานิน ส่วนกะเพราที่ปลูกในอุณหภูมิปกติในห้องเพาะเลี้ยง 16 ชั่วโมง และในช่วงเวลากลางคืนนำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C ในช่วงเวลากลางคืนประมาณ 8 ชั่วโมง การเจริญเติบโตมีลักษณะใกล้เคียงกับต้นกะเพราของชุดทดลองควบคุม สังเกตว่ามีใบที่มีความสมบูรณ์มีขนาดใหญ่และสารสกัดที่ได้มีสีเข้มกว่ากะเพราจากชุดทดลองควบคุม



ภาพที่ 4.7 ต้นกะเพราและสีของสารสกัดกะเพราในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

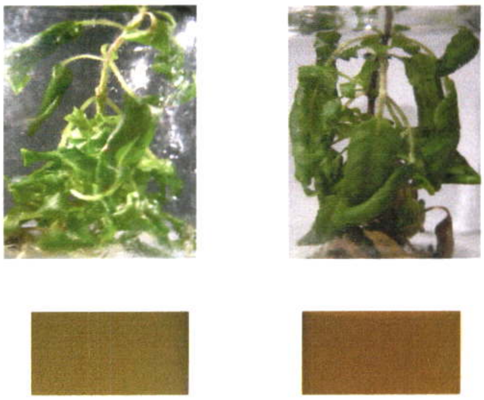
จากกราฟค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกะเพรา (ภาพที่ 4.8) พบว่าสารกลุ่มเฟลโวนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 4°C และมีการเพิ่มในปริมาณที่มากกว่าเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C และอุณหภูมิปกติ สารกลุ่มเฟลโวนอลและแอนโทไซยานินมีแนวโน้มการแสดงออกเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันกับสารกลุ่มเฟลโวน โดยสารทั้ง 3 กลุ่มมีความแตกต่างทางสถิติทั้งหมด ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 อาจเป็นไปได้ว่าการสะสมสารกลุ่มนี้ในช่วยให้พืชมีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมได้ดี ดังรายงานของ Jaakola และคณะ (2002) มีรายงานการสะสมของสารเฟลโวนอยด์เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะแอนโทไซยานิน



ภาพที่ 4.8 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกะเพราในสภาวะที่มีระดับอุณหภูมิสูงหรือต่ำ แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารเฟลโวนอยด์แต่ละกลุ่มกับระดับอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยใช้สารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล .ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT p = 0.5)

4.1.3 ปัจจัยด้านแสง

โดยปกติแล้วห้องเพาะเลี้ยงจะใช้แสงไฟที่มีความเข้มแสง 500 ลักซ์ พบว่ากะเพราในชุดทดลองควบคุมหรือความเข้มแสง 500 ลักซ์ จะมีลำต้นและใบสีเขียว ต้นกะเพราที่นำไปเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มแสง 1000 ลักซ์ ซึ่งพบว่ามีสีแดงและใบมีสีเขียวเข้มก้านใบมีสีแดง ส่วนสารสกัดที่ได้มีสีของสารสกัดออกสีแดงเข้มกว่า

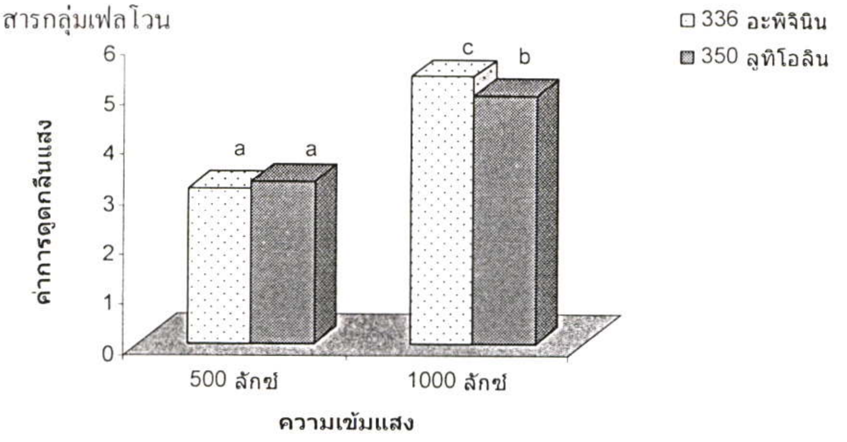


500 ลักซ์ 1000 ลักซ์

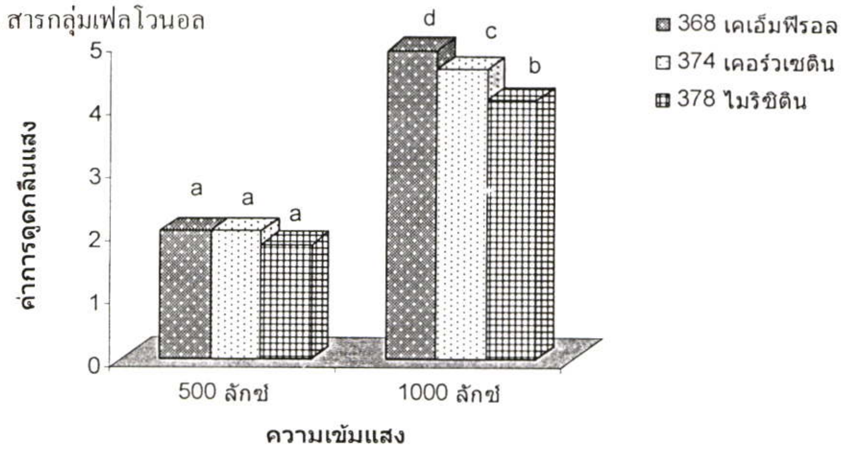
ภาพที่ 4.9 ต้นกะเพราและสีของสารสกัดกะเพราในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มแสง ที่แตกต่างกันที่อายุ 4 สัปดาห์

ต้นกะเพราที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ต้นมีสีเข้มขึ้นและให้สารสกัดที่มีแนวโน้มของสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ทุกกลุ่ม มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับชุดทดลองควบคุม มีความแตกต่างทางสถิติ (ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05) โดยสารกลุ่มเฟลโวนและเฟลโวนอลการแสดงออกของสารมีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า ในขณะที่สารกลุ่มแอนโทไซยานินการแสดงออกเพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่า ดังภาพที่ 4.10 และ ตารางที่ 4.5 เช่นในกรณีศึกษาของ Ambasht และ Agrawal (1995) แสดงให้เห็นว่าเมื่อพืชได้รับแสง UV-B มีผลทำให้เกิดการสะสมของสารกลุ่มเฟลโวนอยด์และแอนโทไซยานินมากขึ้นในผัก กาดหอม ในขณะที่มีการสะสมน้อยลงเมื่อไม่ได้รับแสง UV-B นอกจากนี้มีรายงานเกี่ยวกับการปกป้องพืชจากการทำลายของรังสี UV-B พบว่าสารกลุ่มเฟลโวนและเฟลโวนอล สามารถปกป้องพืชจากการทำลายของรังสี UV-B ได้ โดยรับการเติมหมู่เมททิลเข้าไป ซึ่งอาจไปมีผลทำให้เกิดการเบี่ยงเบนค่าความยาวคลื่นได้ (Harborne and Willaims. 2000)

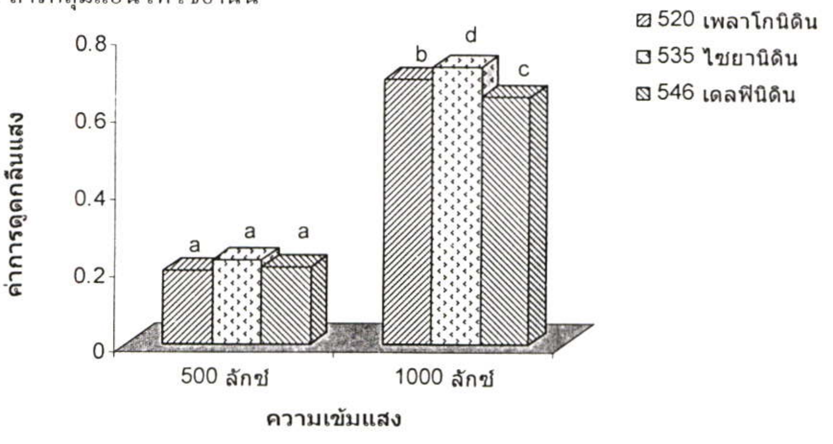
ก. สารกลุ่มเฟลโวน



ข. สารกลุ่มเฟลโวนอล



ค. สารกลุ่มแอนโทไซยานิน

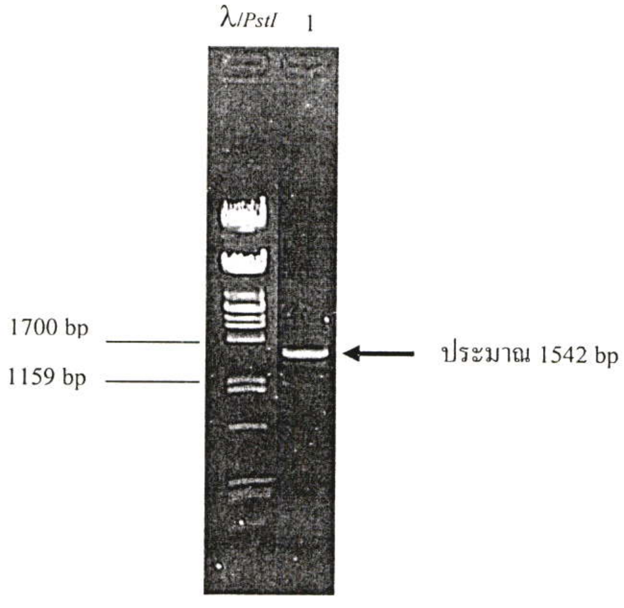


ภาพที่ 4.10 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกะเพราในสภาวะที่มีระดับความเข้มแสง แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารเฟลโวนอยด์แต่ละกลุ่มกับระดับความเข้มข้นแสง เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยใช้สารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล. ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT p = 0.5)

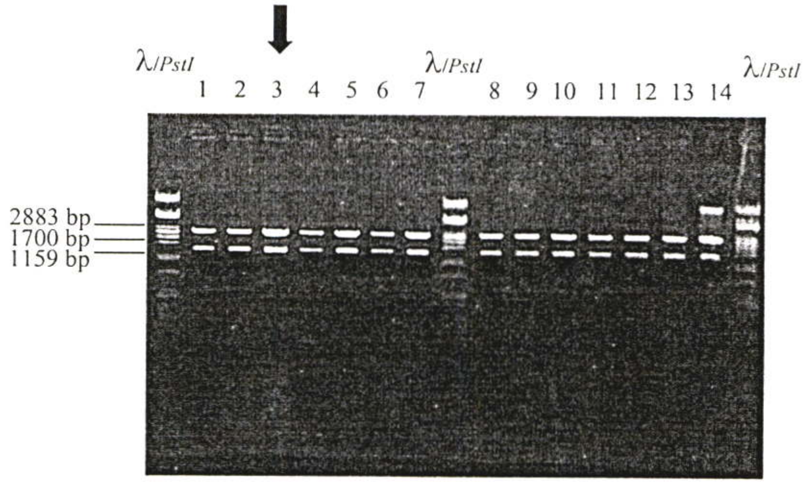
4.2 การศึกษาแนวทางการถ่ายโอนยีนกลุ่มเฟลโวนอยด์เข้าสู่ยาสูบ โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

4.2.1 การโคลนยีน *F3'H* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

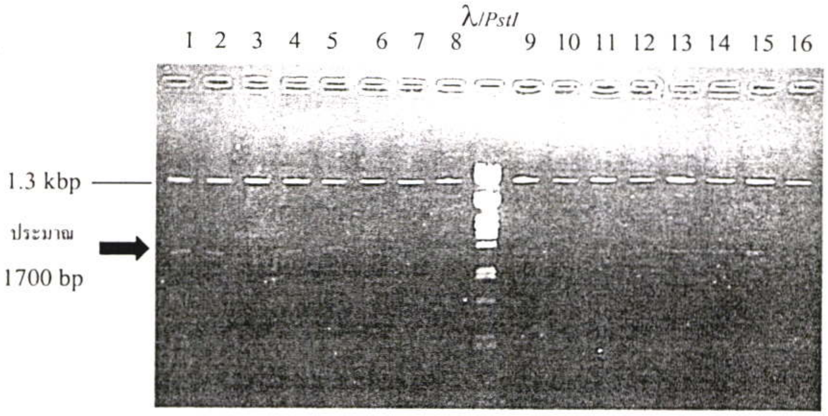
จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ พบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับ *F3'H* (1542 bp) เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Pst*I ดังแสดงในภาพ 4.11 นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด yT&A แล้วถ่ายเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ NAVA BLUE เลือกโคโลนีที่มีสีขาว (คาดว่าจะเป็นโคโลนีที่ได้รับการถ่ายโอนยีน) นำมาสกัดพลาสมิดแล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ*Bam*HI เพื่อตรวจสอบโคโลนีที่ได้รับการถ่ายโอนยีนให้ผลดังภาพที่ 4.12 สังเกตว่าได้ดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกับ *F3'H* (1542 bp) และพลาสมิด yT&A ขนาดประมาณ 2700 bp เลือกโคลนเบอร์ 3 มาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI อีกครั้งเพราะมีดีเอ็นเอที่ต้องการปริมาณมาก (แบนมีความเข้ม) เพื่อนำดีเอ็นที่คาดว่าน่าจะเป็น *F3'H* เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pBI121 หลังจากถ่ายเข้าสู่เชื้อ *E. coli* จะสกัดพลาสมิดแล้วทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI อีกครั้งพบว่ามีดีเอ็นเอ 2 แถบคือ pBI121 (13000 bp) และ ดีเอ็นเอที่คาดว่าน่าจะเป็น *F3'H* (1542 bp) ในโคลนเบอร์ 1, 2, 4, 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14 และ 15 (ภาพที่ 4.13)



ภาพที่ 4.11 ภาพเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่คาดว่าเป็น *F3'H* ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ λ/*Pst*I คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 คือ ดีเอ็นเอตัวอย่างจากการทำพีซีอาร์

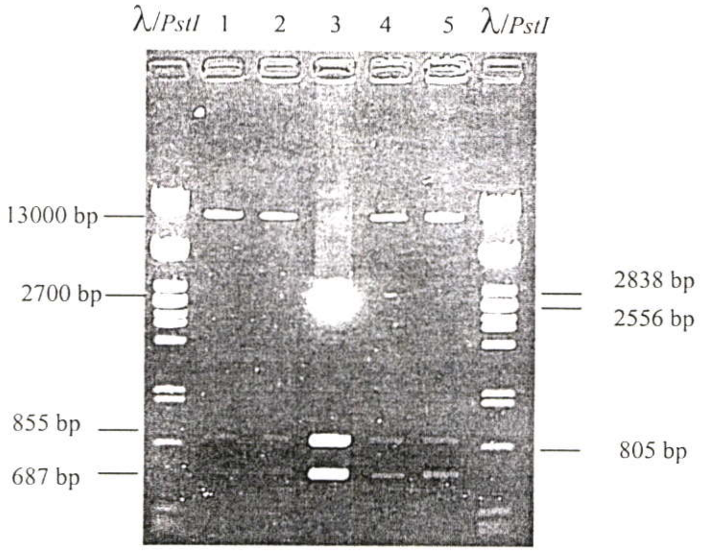


ภาพที่ 4.12 พลาสมิดดีเอ็นเอ (yT&A+*F3'H*) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI



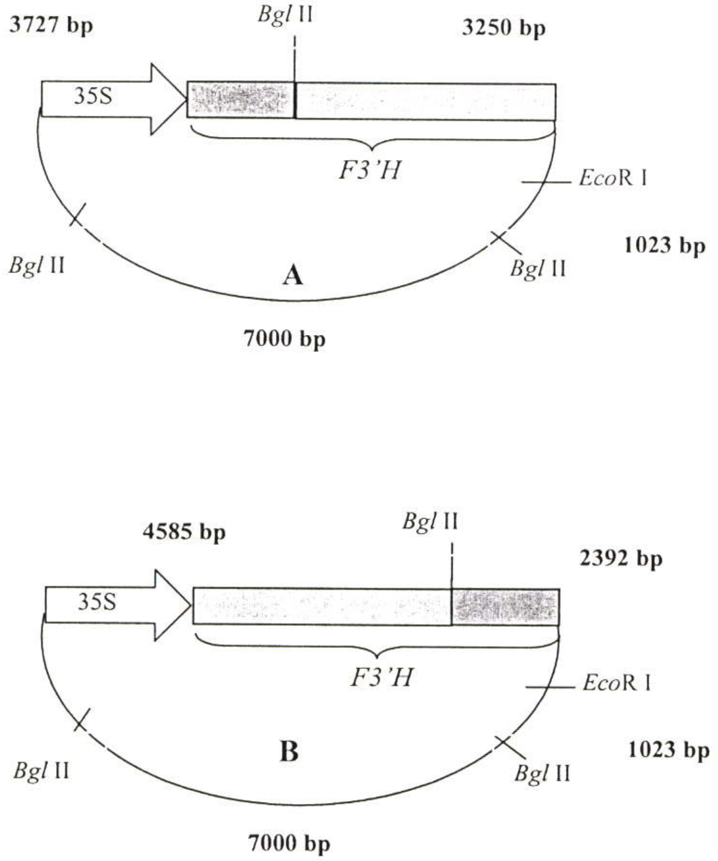
ภาพที่ 4.13 ภาพแสดงตัวอย่างของพลาสมิด pBI121+*F3'H* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI

การตรวจสอบ *F3'H* ที่เชื่อมต่ออยู่กับเวคเตอร์ pBI121 จากข้อมูลของ GenBank พบว่าใน *F3'H* มีตำแหน่งของจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII ที่ตำแหน่ง 855 bp ถ้าใช้ *Hind*III และ*Bam*HI ตัด pBI21+ *F3'H* จะได้ชิ้นส่วนที่มีขนาด 855 bp และ 687 bp และชิ้นส่วน pBI21 ประมาณ 13000 kb และ ถ้าเอา yT&A+ *F3'H* มาตัดเปรียบเทียบเป็นตัวควบคุม จะพบดีเอ็นเอขนาด 855 bp และ 687 bp และชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2700 bp ของ yT&A ตามภาพที่ 4.14

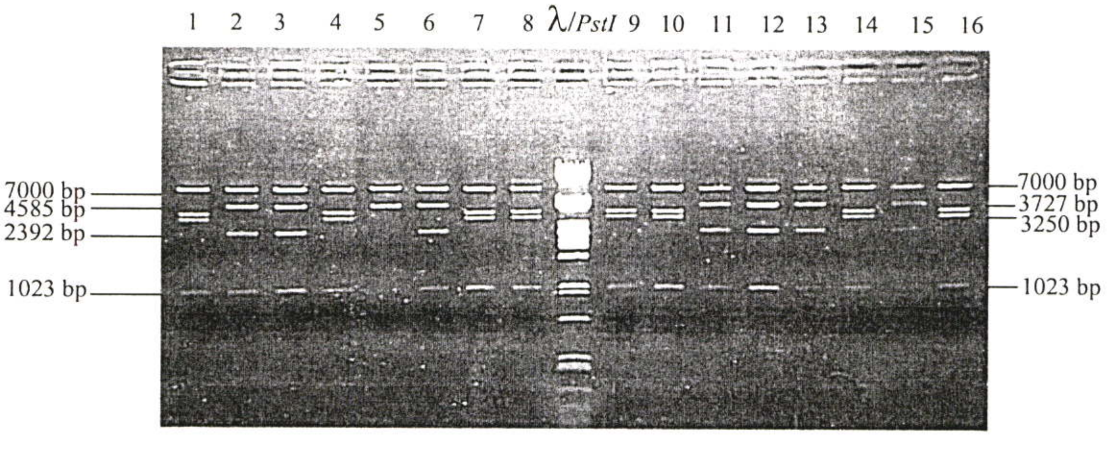


ภาพที่ 4.14 ภาพแสดงพลาสมิดที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hin*dIII (1) pBI121+*F3'H* เบอร์ 1 (2) pBI121+*F3'H* เบอร์ 2 (3) yT&A+ *F3'H* (4) pBI121+*F3'H* เบอร์ 12 (5) pBI121+*F3'H* เบอร์ 13 และ λ/*Pst*I คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

การวิเคราะห์ทิศทางการเข้าจับกับพลาสมิด pBI121 กับ *F3'H* เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของ GenBank พบว่าในพลาสมิด pBI121 จะมีจุดตัดของเอนไซม์ *Bgl*II 2 ตำแหน่ง และ *Eco*RI 1 ตำแหน่ง ส่วนของ *F3'H* มีจุดตัดของ *Bgl*II 1 ตำแหน่ง ดังนั้นเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะพบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ 4 ชิ้น คือ 1023, 3250, 3727 และ 7000 bp เมื่อ *F3'H* ซึ่งแทรกอยู่ใน pBI121 ในทิศทางการแสดงออกของโปรโมเตอร์ 35S (sense) ในกรณีที่ *F3'H* แทรกอยู่ใน pBI121 เข้ากลับทิศทางกับการแสดงออกของโปรโมเตอร์ (antisense) จะพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1023, 2392, 4885 และ 7000 bp ดังแสดงในภาพ 4.15 และในภาพที่ 4.16 เป็นภาพการตัดพลาสมิด pBI121 +*F3'H* ด้วยเอนไซม์ *EcoR*I และ *Bgl*II พบว่าทิศทางการเข้าถูกทิศทาง (*F3'H*s) ได้แก่ โคลนเบอร์ 1, 4, 7, 8, 9, 10, 14 และ 16 และการเข้ากลับทิศทาง (*F3'H*as) ได้แก่ โคลนเบอร์ 2, 3, 6, 11, 12, 13 และ 15



ภาพที่ 4.15 ภาพแสดงตัวอย่างของพลาสมิด pBI121+*F3'H* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Bgl*II เพื่อวิเคราะห์ทิศทางการเข้า A คือ เข้าถูกทิศทางในการแสดงออกของโปรโมเตอร์ 35S B คือ เข้ากลับทิศทางกับการแสดงออกของโปรโมเตอร์ 35S



ภาพที่ 4.16 ภาพแสดงพลาสมิด pBI121+*F3'H* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Bgl*II เพื่อวิเคราะห์ทิศทางการเข้าจับพลาสมิด pBI121

การวิเคราะห์การเชื่อมต่อระหว่างพลาสมิดและชิ้นดีเอ็นเอจะคัดเลือกโคลนเบอร์ 10 เป็นตัวแทนของการเข้าถูกทิศทาง และโคลนเบอร์ 3 เป็นตัวแทนของการเข้ากลับทิศทาง เพื่อทำการถ่ายโอนเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ต่อไป

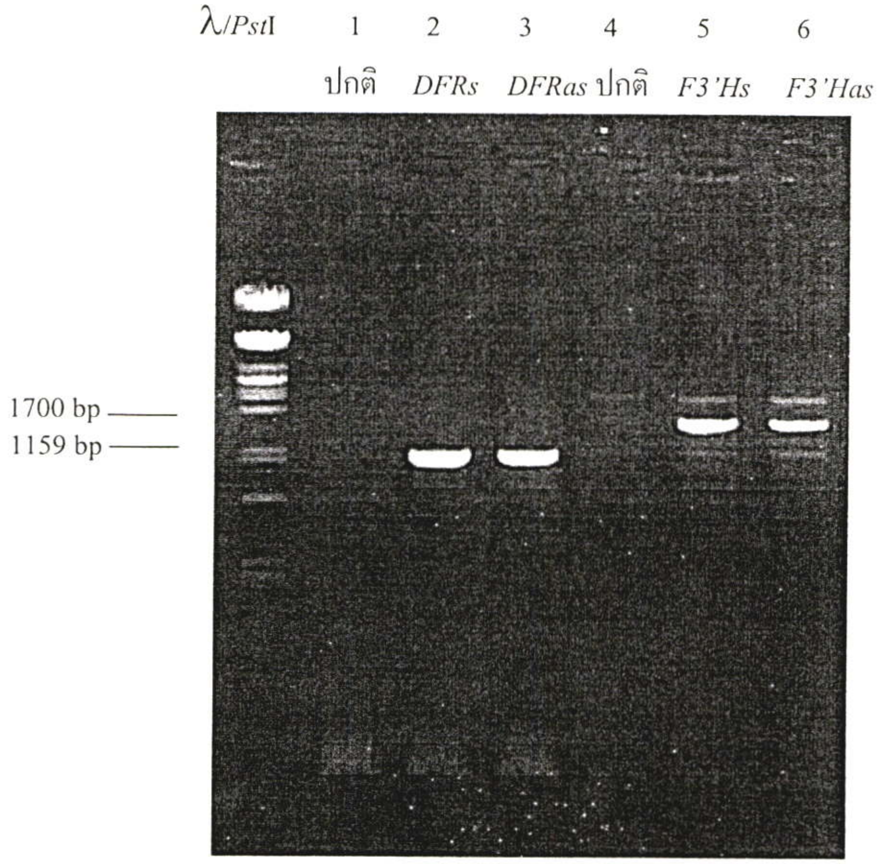
4.2.2 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

เมื่อได้โคโลนีของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่ได้รับพลาสมิด pBI121+ *F3'H* จะถ่ายใส่ใบยาสูบรูปสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร ศึกษาการเจริญเติบโตของยาสูบ พบว่าการเจริญของใบยาสูบเมื่อได้รับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่ได้รับพลาสมิด pBI121+ *F3'H* เมื่อผ่านไป 3 วันใบยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง พอถึงช่วงวันที่ 10 พบว่าจะมีการเจริญของเซลล์แคลลัส โดยเริ่มจากบริเวณขอบใบซึ่งเป็นบริเวณที่สัมผัสกับอาหารมากกว่าบริเวณใจกลางใบ เมื่อเวลาผ่านไป 20 วัน แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น และที่เวลา 30 วัน แคลลัสบางแคลลัสเริ่มมีการแทงยอดอ่อน จากนั้นประมาณช่วง 40-50 วันสามมารถตัดยอดออกมาเลี้ยงในอาหารใหม่และต้นยาสูบจะเริ่มมีการเจริญของราก ดังภาพที่ 4.17

3 วัน 12 วัน 20 วัน 30 วัน 40 วัน

ภาพที่ 4.17 การเจริญของยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *F3'H* ด้วยอะโกรแบคทีเรียม ในอาหารสูตร MS ที่มียาปฏิชีวนะคาร์นามัยซิน (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ระยะเวลาต่างๆ

การตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดจากยาสูบ เพื่อยืนยันผลในการถ่ายโอนยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์พบว่ายาสูบปกติไม่พบชิ้นดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกับ *DFR* และ *F3'H* แสดงในภาพที่ 4.18 ในภาพการตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส เบอร์ 1 และ 4 โดยยาสูบ DFRs และ DFRas พบชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1149 bp ในขณะที่ยาสูบยาสูบ F3'Hs และ F3'Has พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1542 bp จึงยืนยันได้ว่าการถ่ายโอนยีนครั้งนี้มีการเข้าไปของชิ้นดีเอ็นเอที่เราต้องการ



ภาพที่ 4.18 ผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ของสารสกัดดีเอ็นเอจากยาสูบ โดย (1) ยาสูบปกติใช้ไพรเมอร์ DFRF*Bam*HIsite และDFRR*Bam*HIsite (2) ยาสูบแปลงพันธุ์ที่มียีน *DFRs* ใช้ไพรเมอร์ DFRF*Bam*HIsite และ DFRR*Bam*HIsite (3) ยาสูบแปลงพันธุ์ที่มียีน *DFRas* ใช้ไพรเมอร์ DFRF*Bam*HIsite และ DFRR*Bam*HIsite (4) ยาสูบปกติ ใช้ไพรเมอร์ F3'HF*Bam*HIsite และ F3'HR *Bam*HIsite (5) ยาสูบแปลงพันธุ์ที่มียีน *F3'Hs* ใช้ไพรเมอร์ F3'HF*Bam*HIsite และ F3'HR*Bam*HIsite และ (6) ยาสูบแปลงพันธุ์ที่มียีน *F3'Has* ใช้ไพรเมอร์ F3'HF*Bam*HIsite และ F3'HR*Bam*HIsite

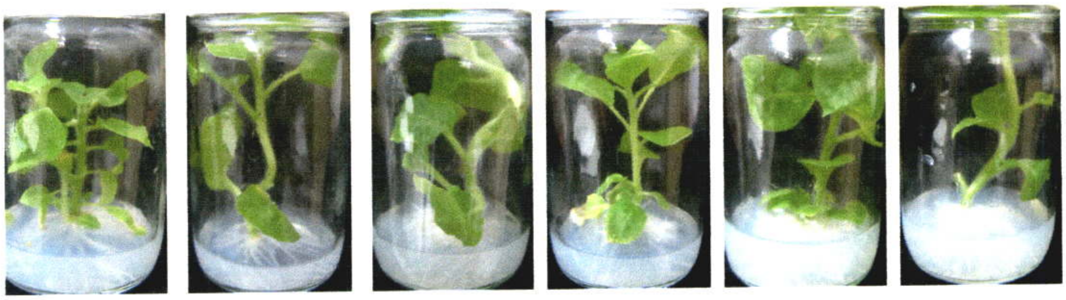
4.3 การศึกษาผลของต้นยาสูบที่ได้รับยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ เมื่อได้รับสภาวะเครียด

การเรียกชื่อยาสูบที่มีการเพิ่มการแสดงออกของยีนสำหรับยีน *CHS* เรียกยาสูบ CHS, ยีน *F3'Hs* เรียกยาสูบ F3'Hs, ยีน *F3'Has* เรียกยาสูบ F3'Has, ยีน *DFRs* เรียกยาสูบ DFRs และ ยีน *DFRas* เรียกยาสูบ DFRas

4.3.1 ผลของแรงดันออสโมติกต่อการแสดงออกของยาสูบ

4.3.1.1 ผลของระดับความเข้มข้นเกลือต่อการแสดงออกของยาสูบ

ผลของเกลือต่อการเจริญเติบของต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ เปรียบเทียบกับต้นที่ดัดแปลงพันธุกรรมในอาหาร MS ที่มีเกลือความเข้มข้น 50 mM พบว่าต้นยาสูบปกติจะมีการเจริญที่ผิดปกติ ลำต้นแคระแกร็นมีใบที่โคนต้นเหลืองซีดเฉลี่ย 3 ใบ ยาสูบ CHS, F3'Hs, F3'Has, DFRs และ DFRas มีการเจริญคล้ายกัน คือ ต้นยาสูบมีการยืดของลำต้น ใบสีเขียวปกติ ดังภาพที่ 4.19

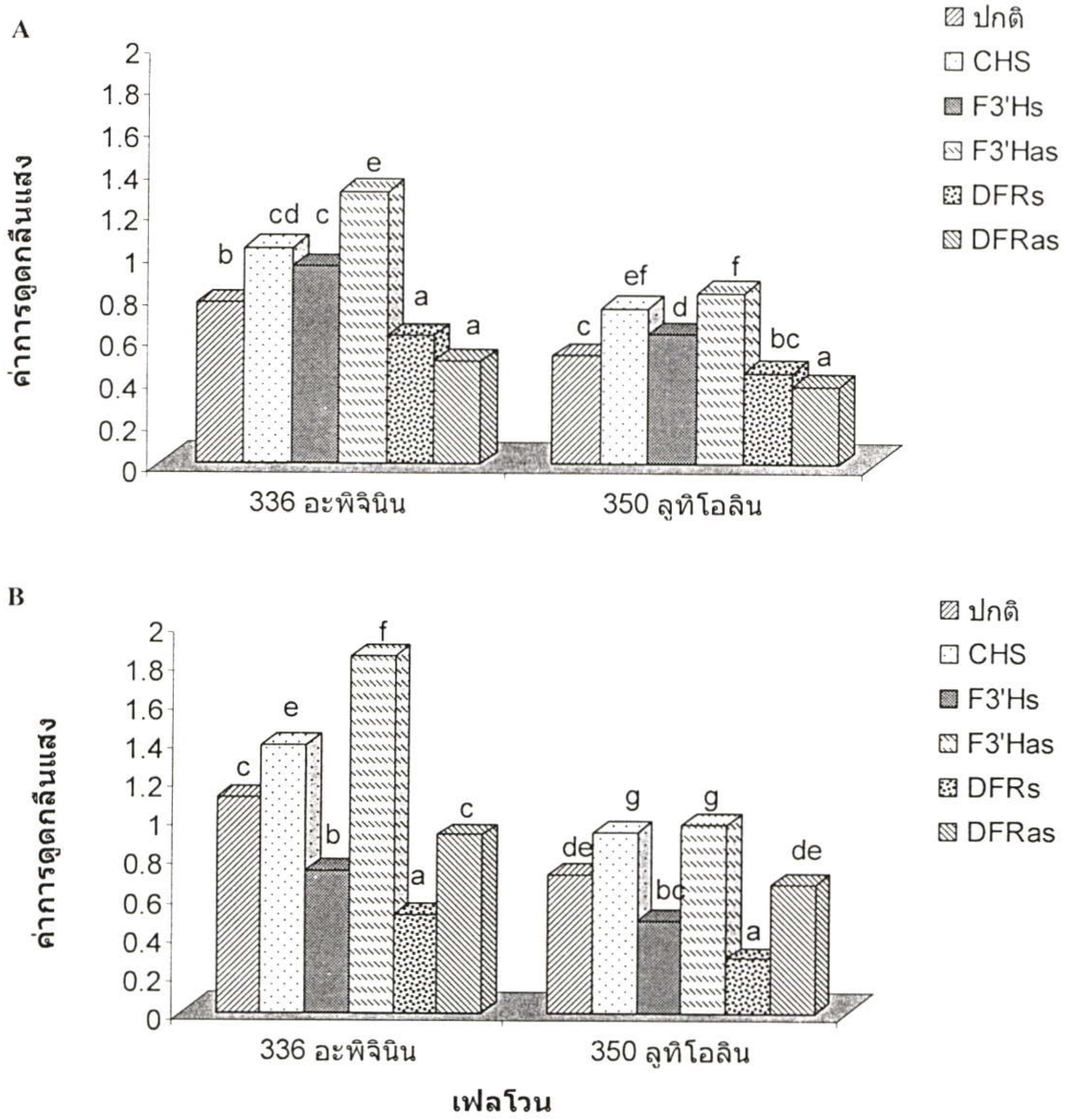


ปกติ CHS F3'Hs F3'Has DFRs DFRas

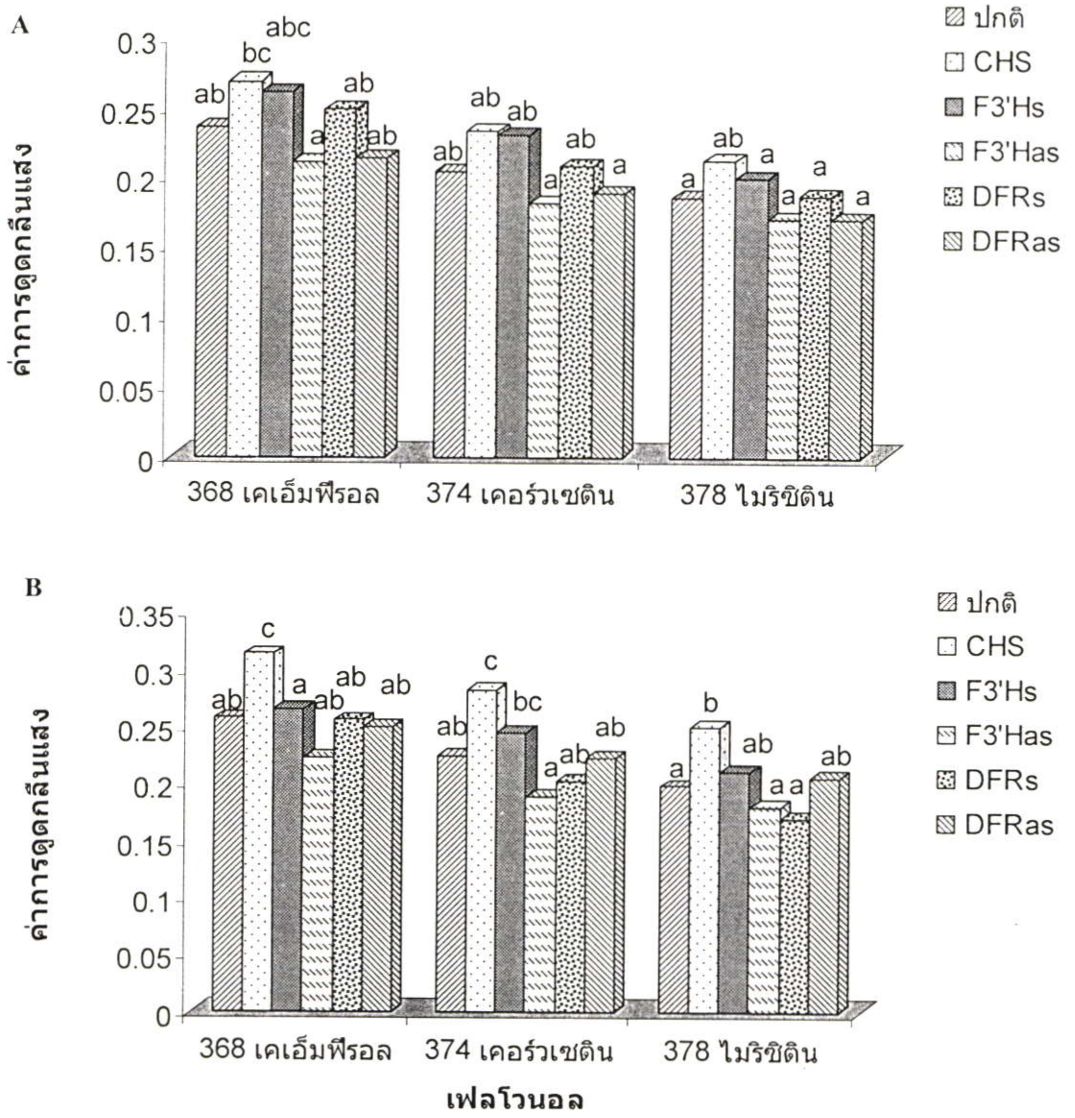
ภาพที่ 4.19 ยาสูบที่เจริญในอาหาร MS ที่มีเกลือความเข้มข้น 50 mM เป็นระยะเวลา 15 วัน

ค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวน จากสารสกัดยาสูบที่ได้รับเกลือความเข้มข้น 50 mM พบว่ายาสูบปกติ CHS, F3'Has และ DFRas มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น ส่วนยาสูบที่มียีน F3'Hs และ DFRs มีการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงดังภาพที่ 4.20 และตารางที่ 4.1

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนอล หลังจากที่ได้รับเกลือความเข้มข้น 50 mM พบว่ายาสูบเกือบทุกชนิดมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ยกเว้นยาสูบ CHS ที่ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น และมีความแตกต่างทางทางสถิติ ในขณะที่ยาสูบ DFRs มีค่าการดูดกลืนแสงคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 4.21 และตารางที่ 4.1



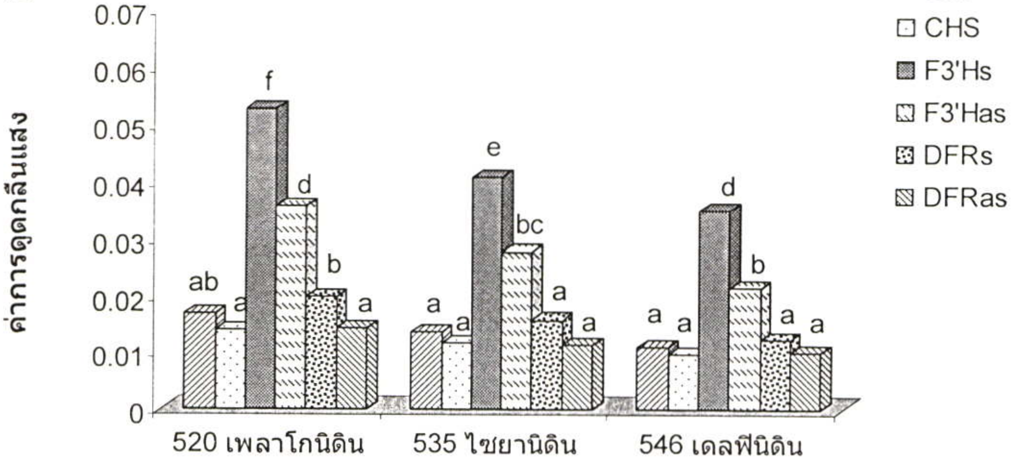
ภาพที่ 4.20 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านเกลือ แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนกับความเข้มข้นเกลือ จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล. A คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นเกลือ 0 mM ที่เวลา 15 วัน B คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นเกลือ 50 mM ที่เวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT $p = 0.5$)



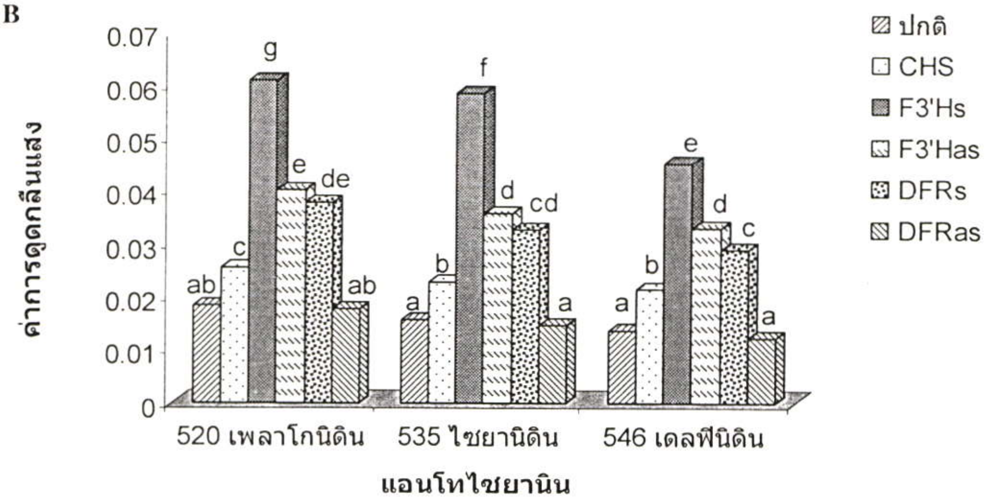
ภาพที่ 4.21 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านเกลือ แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนอลกับความเข้มข้นเกลือ จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล. A คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นเกลือ 0 mM ที่เวลา 15 วัน B คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นเกลือ 50 mM ที่เวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT p = 0.5)

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบกลุ่มแอนโทไซยานิน พบว่ายาสูบปกติ และ DFRas มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนยาสูบ CHS, F3'Hs, F3'Has และ DFRs มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นมีความแตกต่างทางสถิติ ดังได้ดังแสดงในภาพที่ 4.22 และตารางที่ 4.1

A



B



ภาพที่ 4.22 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านเกลือ แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มแอนโทไซยานินกับความเข้มข้นเกลือจากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล. A คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นเกลือ 0 mM ที่เวลา 15 วัน B คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นเกลือ 50 mM ที่เวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกันจากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT p = 0.5)

ตารางที่ 4.1 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในสภาวะที่มีระดับเกลือความเข้มข้นต่างๆ แสดงปฏิสัมพันธ์ของความเข้มข้นเกลือกับสารเฟลโวนอยด์จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดเข้มข้น 100 มก./มล. เป็นระยะเวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT p = 0.5)

เกลือ 0 mM	อะพิจินิน	ลูทิโอลิน	เคเอ็มฟีรอล	เคอร์วเซติน	ไมริซิติน	เพลาโกนิดิน	ไซยานิดิน	เดลฟินิดิน
ปกติ	0.77^{b}	0.51^{c}	0.23^{ab}	0.20^{ab}	0.18^{a}	0.016^{ab}	0.013^{a}	0.011^{a}
CHS	1.03^{cd}	0.74^{cf}	0.26^{bc}	0.23^{ab}	0.21^{ab}	0.014^{a}	0.011^{a}	0.009^{a}
F3'Hs	0.94^{c}	0.62^{d}	0.26^{abc}	0.23^{ab}	0.20^{a}	0.052^{f}	0.040^{c}	0.035^{d}
F3'Has	1.30^{e}	0.82^{f}	0.21^{a}	0.18^{a}	0.17^{a}	0.035^{d}	0.027^{bc}	0.021^{b}
DFRs	0.61^{a}	0.44^{bc}	0.24^{ab}	0.20^{ab}	0.18^{a}	0.019^{b}	0.015^{a}	0.012^{a}
FRas	0.49^{a}	0.37^{a}	0.21^{ab}	0.18^{a}	0.17^{a}	0.014^{a}	0.011^{a}	0.010^{a}
เกลือ 50 mM	**อะพิจินิน**	**ลูทิโอลิน**	**เคเอ็มฟีรอล**	**เคอร์วเซติน**	**ไมริซิติน**	**เพลาโกนิดิน**	**ไซยานิดิน**	**เดลฟินิดิน**
ปกติ	1.11^{c}	0.70^{de}	0.25^{ab}	0.22^{ab}	0.19^{a}	0.018^{ab}	0.015^{a}	0.013^{a}
CHS	1.38^{e}	0.92^{g}	0.31^{c}	0.28^{c}	0.25^{b}	0.025^{c}	0.022^{b}	0.021^{b}
F3'Hs	0.73^{b}	0.47^{bc}	0.26^{a}	0.24^{bc}	0.21^{ab}	0.060^{g}	0.058^{f}	0.045^{e}
F3'Has	1.83^{f}	0.97^{g}	0.22^{ab}	0.19^{a}	0.18^{a}	0.041^{c}	0.035^{d}	0.030^{d}
DFRs	0.50^{a}	0.28^{a}	0.25^{ab}	0.20^{ab}	0.17^{a}	0.037^{de}	0.032^{cd}	0.028^{c}
DFRas	0.91^{ce}	0.66^{de}	0.25^{ab}	0.22^{ab}	0.20^{ab}	0.017^{a}	0.014^{a}	0.012^{a}

4.3.1.2 ผลของระดับความเข้มข้นน้ำตาลต่อการแสดงออกของยาสูบ

ผลของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของต้นยาสูบ พบว่ายาสูบสายพันธุ์ปกติมีลำต้นแคระแกร็นมีใบประมาณ 3-5 ที่มีใบสีเหลืองซีดปลายใบหงิกงอ ลำต้นไม่มีการยืดขยายตัวออก ในขณะที่ยาสูบ CHS และ F3'Hs ลำต้นมีการยืดออกถึงฝาขวด ใบมีขนาดใหญ่สีเขียวสดไม่มีใบเหลืองซีด โดยเฉพาะในยาสูบCHS มีลำต้นและใบที่สมบูรณ์ ส่วนยาสูบ F3'Has ต้นยาสูบมีลำต้นใหญ่แต่ลำต้นมีการเจริญยืดตัวที่ผิดปกติ และมีใบที่โคนต้นเฉลี่ย 1-2 ใบที่หงิกงอ ปลายใบไหม้ ยาสูบ DFRs และ DFRas การเจริญใกล้เคียงกัน ดังภาพที่ 4.23

ปกติ CHS F3'Hs F3'Has DFRs DFRas

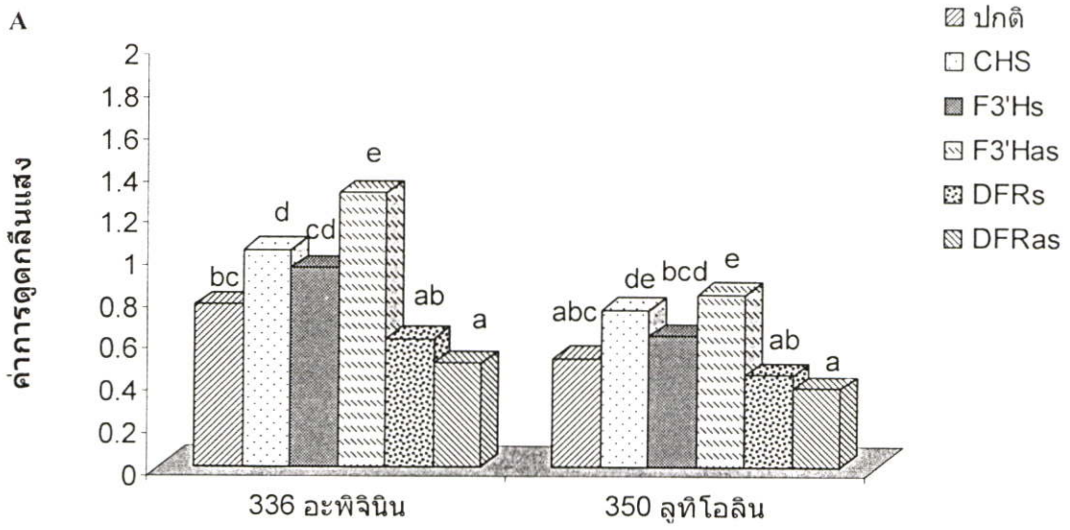
ภาพที่ 4.23 ยาสูบที่เจริญในอาหาร MS ที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 5% เป็นระยะเวลา 15 วัน

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวน พบว่ายาสูบทุกตัวยกเว้นยาสูบ F3'Hs และ DFRs มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในอาหารที่มีน้ำตาลเพิ่มขึ้น ยาสูบ F3'Hs และ DFRs มีค่าการดูดกลืนแสงของเฟลโวนลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ยาสูบปกติ และ CHS มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสารเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ดังภาพที่ 4.24 และตารางที่ 4.2

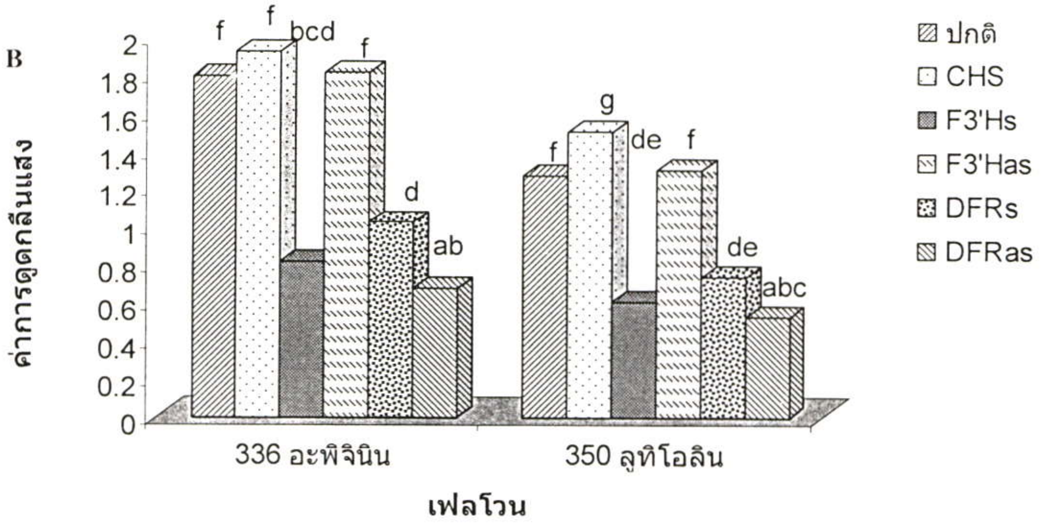
ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนอล พบว่ายาสูบปกติ และ CHS มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นมีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนยาสูบ F3'Hs, F3'Has และ DFRas มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ยาสูบ DFRs มีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเล็กน้อยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังภาพที่ 4.25 และตารางที่ 4.2

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบกลุ่มแอนโทไซยานิน พบว่ายาสูบปกติมีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเล็กน้อย ยาสูบ CHS, F3'Hs, DFRs และ DFRas มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นมีความแตกต่างทางสถิติ ดังได้ดังแสดงในภาพที่ 4.26 และตารางที่ 4.2 สำหรับยาสูบ DFRas ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ควรจะลดลงแต่ผลการทดลองกลับมีค่ามากขึ้น น่าจะมาจากความผิดพลาดเกี่ยวกับอายุของต้นที่นำมาใช้ทดลองอาจเป็นต้นที่มีอายุมากเกินไป

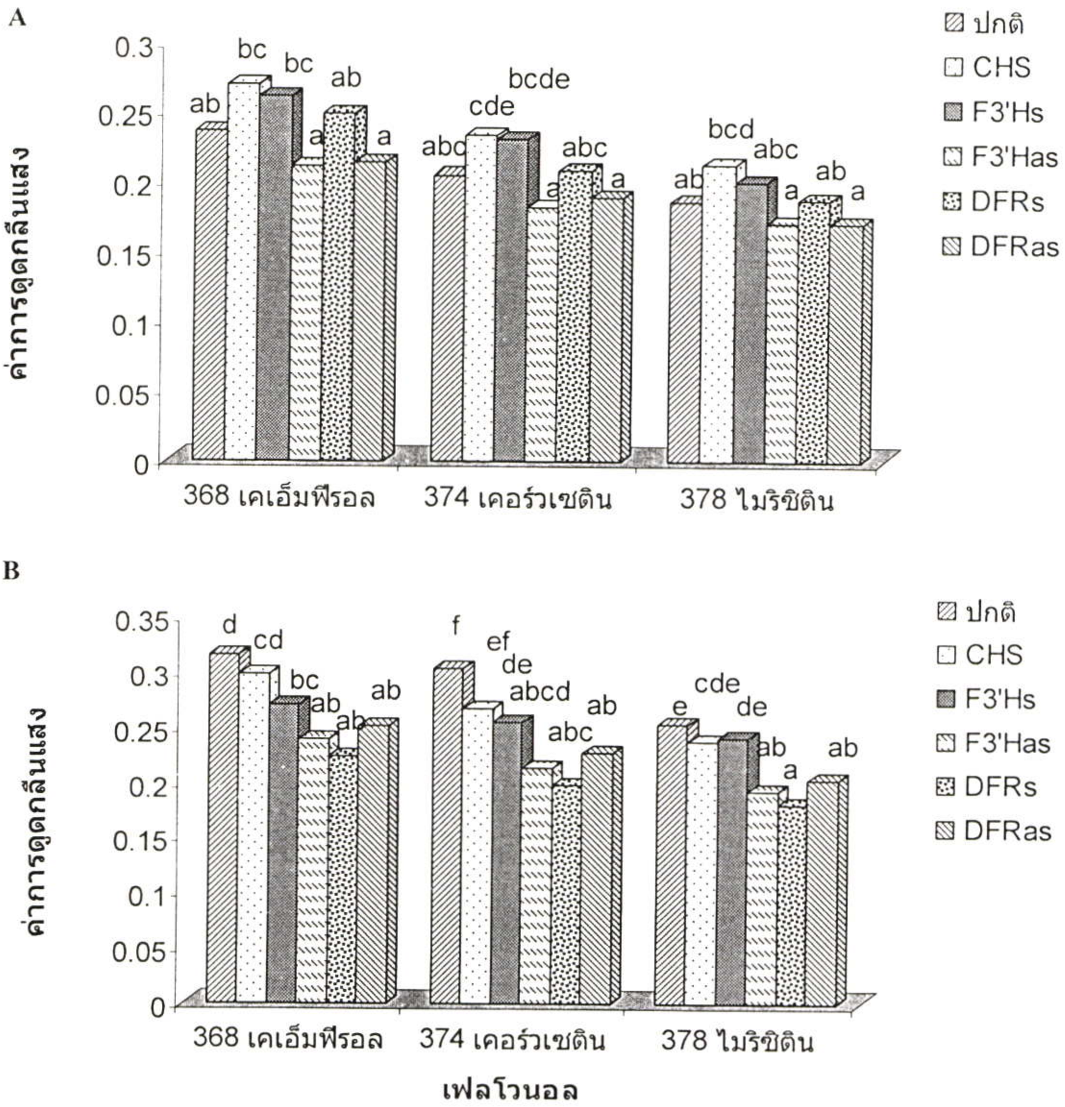
A



B

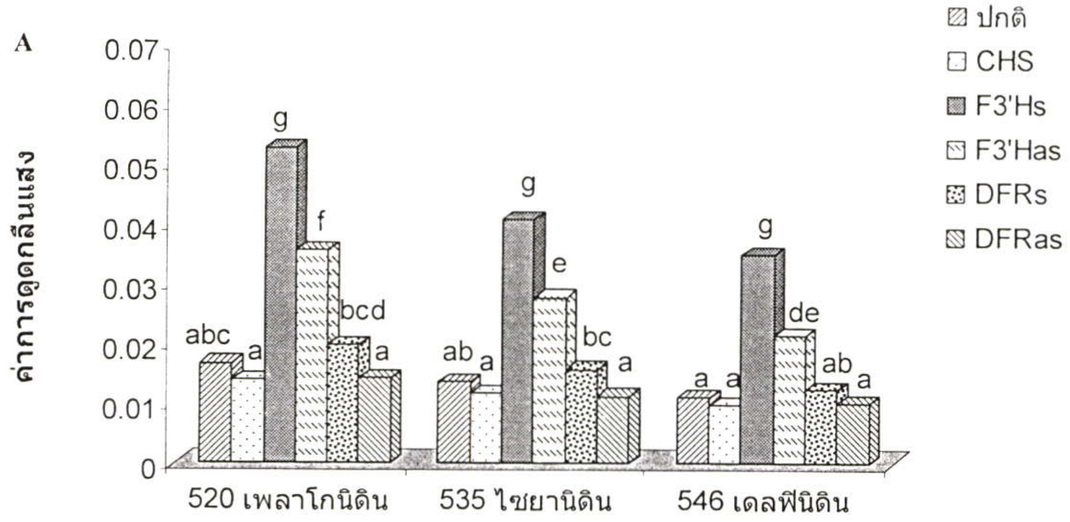


ภาพที่ 4.24 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านน้ำตาล แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนกับความเข้มข้นน้ำตาล จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล. A คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นน้ำตาล 3% ที่เวลา 15 วัน B คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นน้ำตาล 5% ที่เวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT $p = 0.5$)

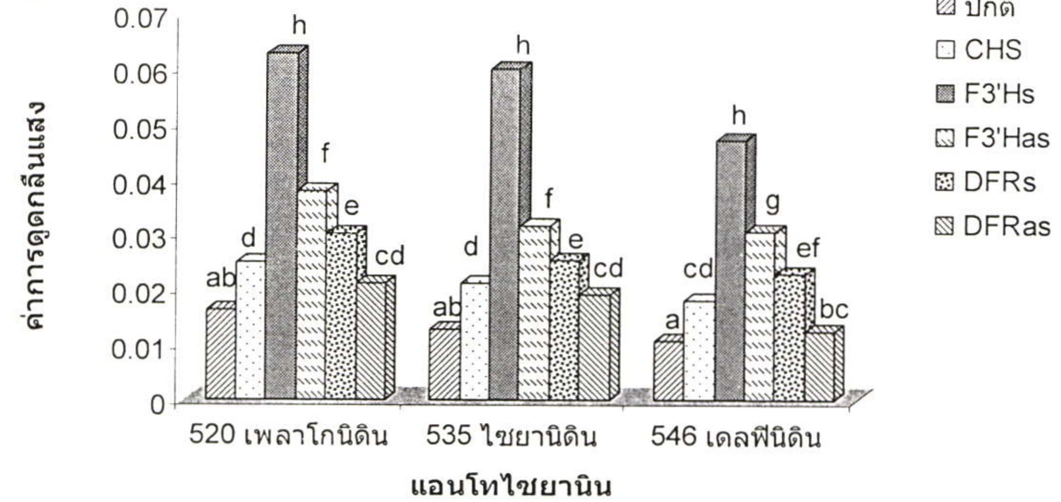


ภาพที่ 4.25 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านน้ำตาล แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนอลกับความเข้มข้นน้ำตาล จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล. A คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นน้ำตาล 3% ที่เวลา 15 วัน B คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นน้ำตาล 5% ที่เวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT $p = 0.5$)

A



B



ภาพที่ 4.26 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านน้ำตาล แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มแอนโทไซยานินกับความเข้มข้นน้ำตาล จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล. A คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นน้ำตาล 3% ที่เวลา 15 วัน B คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นน้ำตาล 5% ที่เวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT $p = 0.5$)

ตารางที่ 4.2 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในสภาวะที่มีระดับน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ แสดงปฏิสัมพันธ์ของความเข้มข้นน้ำตาลกับสารเฟลโวนอยด์ จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดเข้มข้น 100 มก./มล. เป็นระยะเวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT p = 0.5)

น้ำตาล 3%	อะพิจินิน	ลูทิโอลิน	เคเอ็มฟีรอล	เคอร์วเซติน	ไมริซิติน	เพลาโกนิดิน	ไซยานิดิน	เดลฟินิดิน
ปกติ	0.77^{bc}	0.51^{abc}	0.23^{ab}	0.20^{abc}	0.18^{ab}	0.016^{ab}c	0.013^{ab}	0.011^{a}
CHS	1.03^{d}	0.74^{dc}	0.26^{bc}	0.23^{cdc}	0.21^{bcd}	0.014^{a}	0.011^{a}	0.009^{a}
F3'Hs	0.94^{cd}	0.62^{bcd}	0.26^{bc}	0.23^{bcdc}	0.20^{abc}	0.052^{g}	0.040^{g}	0.035^{g}
F3'Has	1.30^{e}	0.82^{e}	0.21^{a}	0.18^{a}	0.17^{a}	0.035^{f}	0.027^{c}	0.021^{dc}
DFRs	0.61^{ab}	0.44^{ab}	0.24^{ab}	0.20^{abc}	0.19^{ab}	0.019^{bcd}	0.015^{bc}	0.012^{ab}
DFRas	0.49^{a}	0.37^{a}	0.21^{a}	0.18^{a}	0.17^{a}	0.014^{a}	0.011^{a}	0.010^{a}
น้ำตาล 5%	**อะพิจินิน**	**ลูทิโอลิน**	**เคเอ็มฟีรอล**	**เคอร์วเซติน**	**ไมริซิติน**	**เพลาโกนิดิน**	**ไซยานิดิน**	**เดลฟินิดิน**
ปกติ	1.79^{f}	1.27^{f}	0.31^{d}	0.30^{f}	0.25^{c}	0.016^{ab}	0.012^{ab}	0.010^{a}
CHS	1.92^{f}	1.50^{g}	0.29^{cd}	0.26^{ef}	0.23^{cdc}	0.024^{d}	0.021^{d}	0.018^{cd}
F3'Hs	0.80^{bcd}	0.61^{dc}	0.27^{bc}	0.25^{dc}	0.24^{dc}	0.063^{h}	0.060^{h}	0.047^{h}
F3'Has	1.80^{f}	1.30^{f}	0.23^{ab}	0.21^{abcd}	0.19^{ab}	0.038^{f}	0.031^{f}	0.030^{g}
DFRs	1.02^{d}	0.74^{dc}	0.22^{ab}	0.19^{abc}	0.17^{ab}	0.030^{c}	0.025^{c}	0.023^{cf}
DFRas	0.67^{ab}	0.52^{ab}	0.25^{ab}	0.22^{ab}	0.20^{a}	0.021^{cd}	0.019^{cd}	0.012^{bc}

4.3.1.3 ผลของระดับความเข้มข้นวุ้นต่อการแสดงออกของยาสูบ

ผลของความเข้มข้นวุ้นต่อการเจริญเติบของต้นยาสูบ พบว่ายาสูบสายพันธุ์ปกติมีลำต้นมีการยืดตัว มีใบประมาณ 3-5 ใบ โดยเฉลี่ยที่เริ่มแสดงอาการเหลืองซีดปลายใบใหม้ ในขณะที่ยาสูบ CHS, F3'Hs, F3'Hs, DFRs และ DFRas ลำต้นมีการยืดออกถึงฝาขวด ใบมีขนาดใหญ่สีเขียวสดไม่มีใบเหลืองซีด โดยเฉพาะในยาสูบCHS และ F3'H มีลำต้นและใบที่สมบูรณ์ ส่วนยาสูบ F3'Has ต้นยาสูบมีลำต้นขนาดเล็ก ลำต้นยืดตัวออกและมีใบเฉลี่ย 1-2 ใบที่เริ่มเหลืองส่วนใหญ่อยู่บริเวณโคนต้น ดังภาพ 4.27

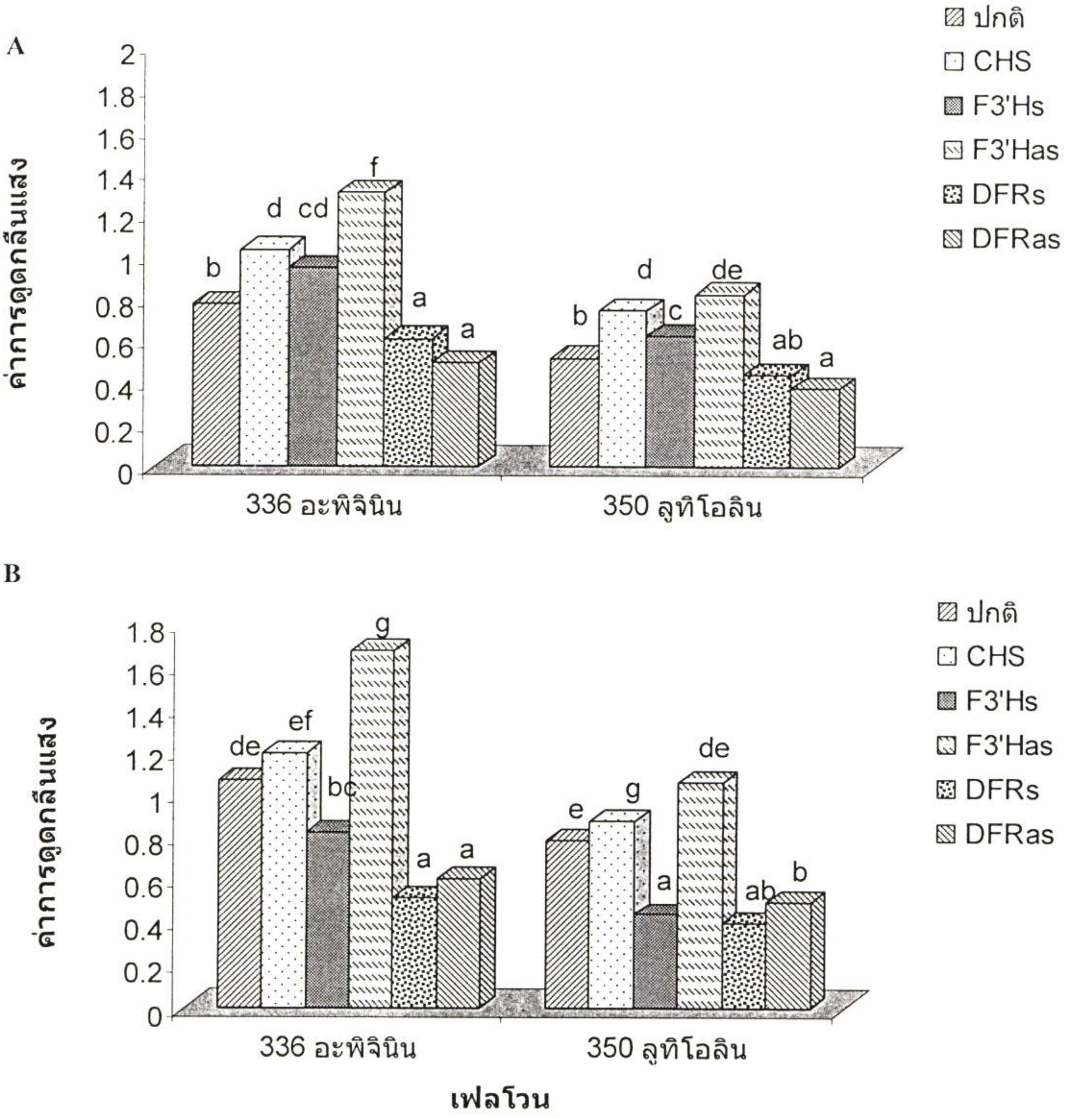
ปกติ CHS F3'Hs F3'Has DFRs DFRas

ภาพที่ 4.27 ยาสูบที่เจริญในอาหาร MS ที่มีวุ้นความเข้มข้น 0.9% ที่เวลา 15 วัน

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวน พบว่ายาสูบปกติ, CHS, F3'Has และ DFRas มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นมีความแตกต่างทางสถิติ เมื่ออยู่ในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นวุ้นสูงขึ้น ในขณะที่ยาสูบ F3'Hs และ DFRs มีค่าการดูดกลืนแสงของเฟลโวนลดลงเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ยาสูบ F3'Has มีการแสดงออกของเฟลโวนสูงสุด แม้ว่าการเจริญของต้นยาสูบปกติจะไม่สมบูรณ์ ดังภาพที่ 4.28 และตารางที่ 4.3

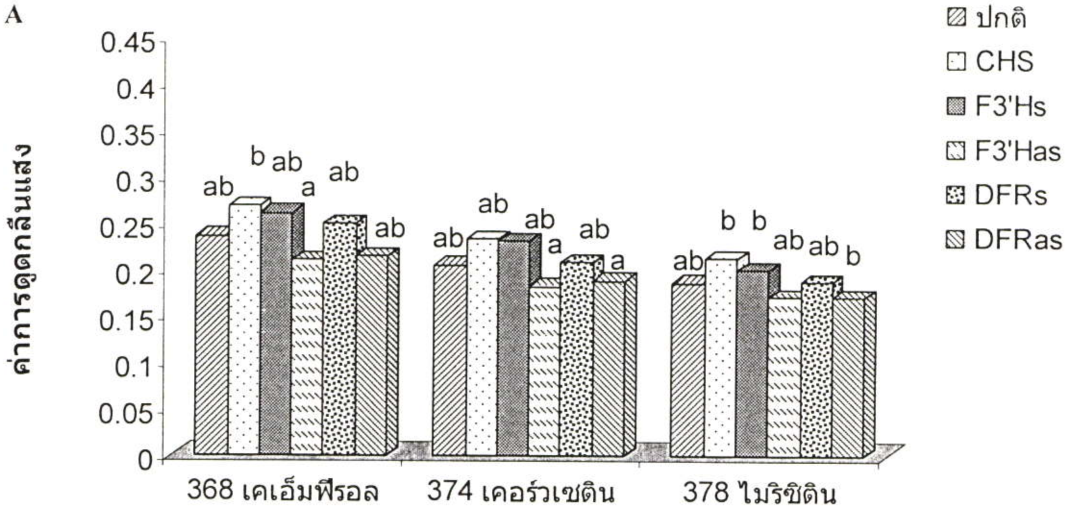
ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนอล พบว่ายาสูบปกติ และ CHS มีค่าการดูดกลืนแสงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนยาสูบ F3'Has และ DFRas มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังภาพที่ 4.29 และตารางที่ 4.3

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบกลุ่มแอนโทไซยานิน พบว่ายาสูบทุกชนิดยกเว้นยาสูบ DFRas มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น โดยที่แนวโน้มของค่าการดูดกลืนแสงมีค่ามากขึ้นในยาสูบ CHS และ DFRs มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่ามีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ยาสูบ F3'H ก็มีการสะสมของแอนโทไซยานินมากที่สุด ยาสูบ DFRas มีค่าลดลงตรงตามสมมติฐานที่การเข้ากลับทิศทางของยีน *DFR* กับการแสดงออกของโปรโมเตอร์ไปขัดขวางการให้เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ดังภาพที่ 4.30 และตารางที่ 4.3

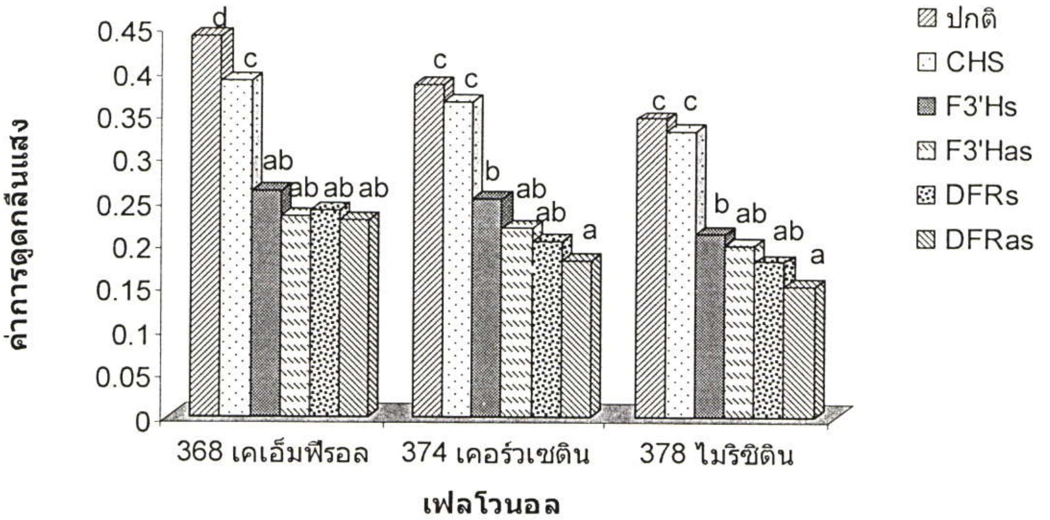


ภาพที่ 4.28 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านวุ้น แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนกับความเข้มข้นวุ้น จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล. A คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นวุ้น 0.8% ที่เวลา 15 วัน B คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นวุ้น 0.9% ที่เวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT $p = 0.5$)

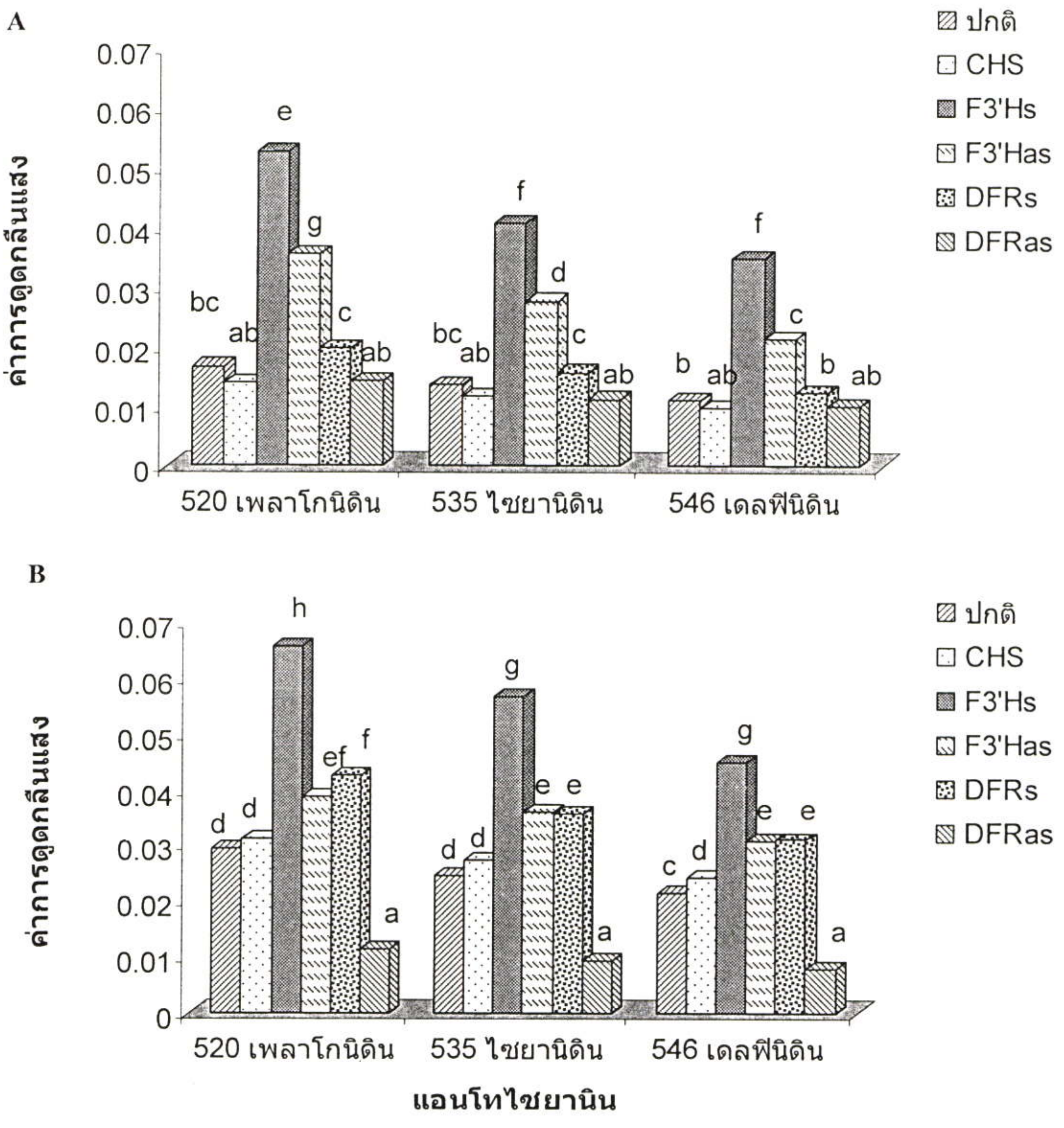
A



B



ภาพที่ 4.29 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านวุ้น แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนอลกับความเข้มข้นวุ้น จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล. A คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นวุ้น 0.8% ที่เวลา 15 วัน B คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นวุ้น 0.9% ที่เวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT p = 0.5)



ภาพที่ 4.30 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านวุ้น แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มแอนโทไซยานินกับความเข้มข้นวุ้น จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล. A คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นวุ้น 0.8% ที่เวลา 15 วัน B คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มข้นวุ้น 0.9% ที่เวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT $p = 0.5$)

ตารางที่ 4.3 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในสภาวะที่มีระดับวุ้นความเข้มข้นต่างๆ แสดงปฏิสัมพันธ์ของความเข้มข้นวุ้นกับสารเฟลโวนอยด์จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดเข้มข้น 100 มก./มล. เป็นระยะเวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT p = 0.5)

วุ้น 0.8%	อะพิจินิน	ลูทิโอลิน	เคเอ็มฟีรอล	เคอร์วเซติน	ไมริซิติน	เพลาโกนิดิน	ไซยานิดิน	เดลฟินิดิน
ปกติ	0.77^{b}	0.51^{b}	0.23^{ab}	0.20^{ab}	0.18^{ab}	0.016^{bc}	0.013^{bc}	0.011^{b}
CHS	1.03^{d}	0.74^{d}	0.26^{b}	0.23^{ab}	0.21^{b}	0.014^{ab}	0.011^{ab}	0.009^{ab}
F3'Hs	0.94^{cd}	0.62^{c}	0.26^{ab}	0.23^{ab}	0.20^{b}	0.052^{g}	0.040^{f}	0.035^{f}
F3'Has	1.30^{f}	0.82^{dc}	0.21^{a}	0.18^{a}	0.17^{ab}	0.035^{c}	0.027^{d}	0.021^{c}
DFRs	0.61^{a}	0.44^{ab}	0.24^{ab}	0.20^{ab}	0.19^{ab}	0.019^{c}	0.015^{c}	0.012^{b}
DFRas	0.49^{a}	0.37^{a}	0.21^{ab}	0.18^{a}	0.17^{b}	0.014^{ab}	0.011^{ab}	0.010^{ab}
วุ้น 0.9%	อะพิจินิน	ลูทิโอลิน	เคเอ็มฟีรอล	เคอร์วเซติน	ไมริซิติน	เพลาโกนิดิน	ไซยานิดิน	เดลฟินิดิน
ปกติ	1.07^{dc}	0.79^{de}	0.44^{d}	0.38^{c}	0.34^{c}	0.029^{d}	0.0245^{d}	0.021^{c}
chs	1.19^{ef}	0.88^{e}	0.38^{c}	0.36^{c}	0.33^{c}	0.031^{d}	0.0272^{d}	0.024^{d}
f3'hs	0.82^{bc}	0.44^{ab}	0.26^{ab}	0.25^{b}	0.21^{b}	0.066^{h}	0.057^{g}	0.045^{g}
f3'has	1.68^{g}	1.06^{g}	0.23^{ab}	0.21^{ab}	0.19^{ab}	0.038^{ef}	0.036^{e}	0.031^{e}
dfrs	0.52^{a}	0.40^{a}	0.24^{ab}	0.20^{ab}	0.18^{ab}	0.042^{f}	0.035^{e}	0.031^{e}
dfras	0.60^{a}	0.50^{b}	0.22^{ab}	0.18^{a}	0.15^{a}	0.011^{a}	0.009^{a}	0.008^{a}

4.3.2 ผลของอุณหภูมิต่อการแสดงออกของยาสูบ

การเจริญของต้นยาสูบปกติพบว่า มีใบเฉลี่ย 4-6 ใบที่มีอาการหงิกที่ปลายใบไหม้ ส่วนยาสูบ CHS, F3'Hs, และ DFRs มีการเจริญลักษณะใกล้เคียงกัน มีการยืดของลำต้นและมีใบสีเขียวเข้ม ในขณะที่ยาสูบ F3'Has และ DFRas มีลักษณะใบใกล้เคียงกันสีเขียวอมเหลือง และมีการยืดตัวของลำต้นแต่มีขนาดของลำต้นค่อนข้างเล็ก สำหรับยาสูบ DFRas มีบางใบเฉลี่ย 1-2 ใบ ที่ใบเริ่มเหลืองซีด ดังภาพที่ 4.31

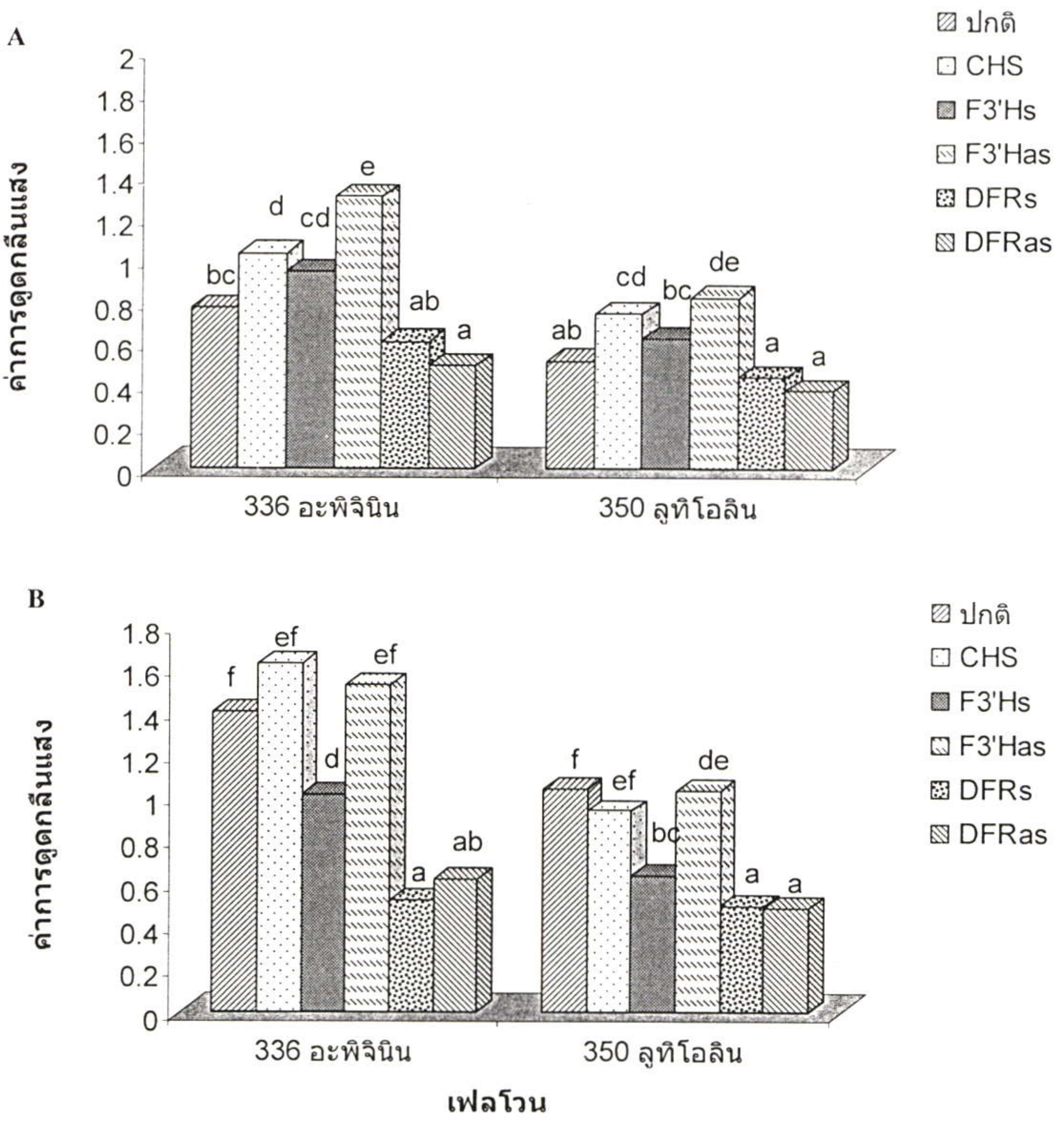
ปกติ CHS F3'Hs F3'Has DFRs DFRas

ภาพที่ 4.31 ยาสูบที่เจริญที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 4°C ในช่วงเวลากลางคืน 8 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 15 วัน

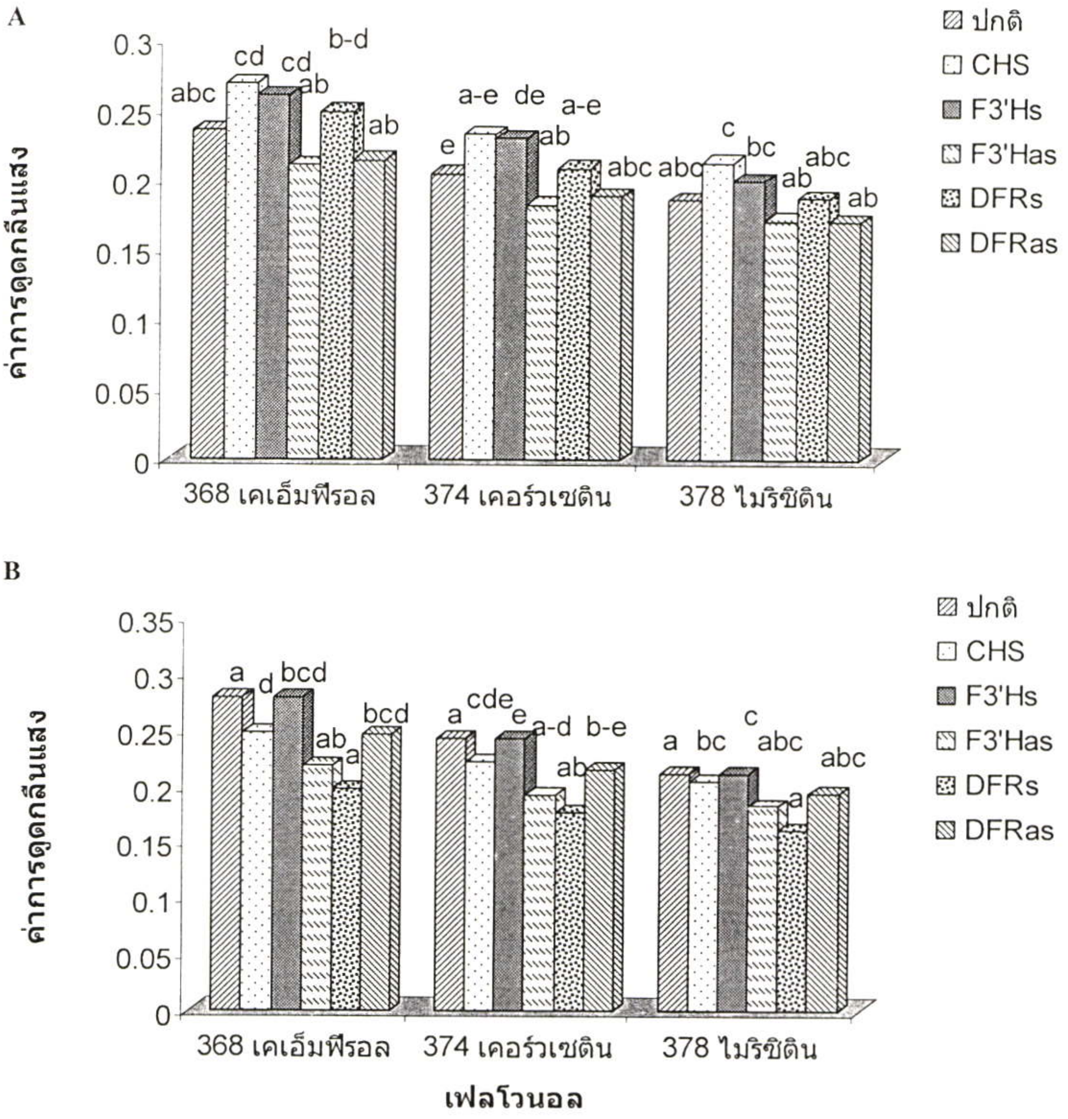
ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวน พบว่ายาสูบปกติ CHS, F3'Has และ DFRas มีค่าการดูดกลืนแสงที่มากขึ้นมีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ยาสูบ F3'Hs และ DFRs มีค่าการดูดกลืนแสงลดลง แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังภาพที่ 4.32 และตารางที่ 4.4 มีรายงานของ Leyva และคณะ (1995) พบว่าอุณหภูมิต่ำมีส่วนกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ CHS

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนอล พบว่ายาสูบเกือบทุกชนิดมีค่าการดูดกลืนแสงของสารทั้งสามตัวลดลง ยกเว้นยาสูบ F3'Hs และ DFRas ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังภาพที่ 4.33 และตารางที่ 4.4

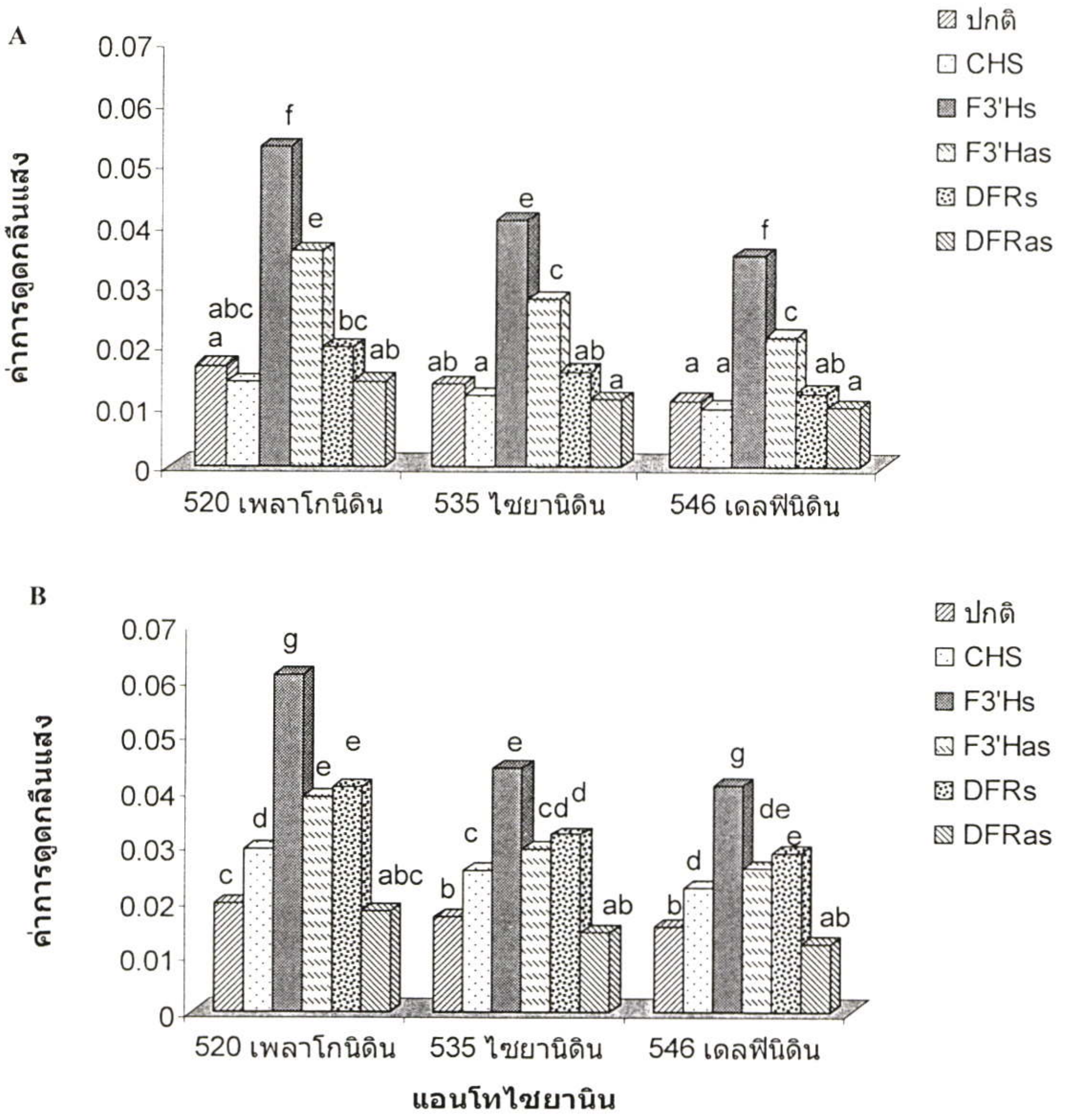
ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในกลุ่มแอนโทไซยานิน พบว่ายาสูบเกือบทุกชนิดมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น มีความแตกต่างทางสถิติ ยกเว้นยาสูบ DFRas มีการสะสมของแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นเล็กน้อย สำหรับยาสูบ CHS และ DFRs สังเกตได้ว่ามีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเกือบ 2 เท่า ดังแสดงในภาพที่ 4.34 และตารางที่ 4.4 แสดงว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้น่าจะมีการตอบสนองต่ออุณหภูมิต่ำได้ดี ดังมีรายงานของ Takashi และคณะ (2005)



ภาพที่ 4.32 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านอุณหภูมิ แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนกับอุณหภูมิ จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล. A คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่ลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°C ที่เวลา 15 วัน B คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 4°C ช่วงเวลากลางคืน ที่เวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT p = 0.5)



ภาพที่ 4.33 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านอุณหภูมิ แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนอลกับอุณหภูมิ จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล. A คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°C ที่เวลา 15 วัน B คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 4°C ช่วงเวลากลางคืน ที่เวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT $p = 0.5$)



ภาพที่ 4.34 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านอุณหภูมิ แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มแอนโทไซยานินกับอุณหภูมิ จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล. A คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°C ที่เวลา 15 วัน B คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 4°C ช่วงเวลากลางคืน ที่เวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT p = 0.5)

ตารางที่ 4.4 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในสภาวะที่มีระดับอุณหภูมิต่างๆ แสดงปฏิสัมพันธ์ของอุณหภูมิกับสารเฟลโวนอยด์ จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดเข้มข้น 100 มก./มล. เป็นระยะเวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT p = 0.5)

25 °C	อะพิจินิน	ลูทิโอลิน	เคเอ็มฟีรอล	เคอร์วเซติน	ไมริซิติน	เพลาโกนิดิน	ไซยานิดิน	เดลฟินิดิน
ปกติ	0.77^{bc}	0.51^{ab}	0.23^{abc}	0.20^{a-d}	0.18^{abc}	0.016^{abc}	0.013^{ab}	0.011^{a}
CHS	1.03^{d}	0.74^{cd}	0.26^{cd}	0.23^{e}	0.21^{c}	0.014^{a}	0.011^{a}	0.009^{a}
F3'Hs	0.94^{cd}	0.62^{bc}	0.26^{cd}	0.23^{de}	0.20^{bc}	0.052^{f}	0.040^{e}	0.035^{f}
F3'Has	1.30^{e}	0.82^{de}	0.21^{ab}	0.18^{ab}	0.17^{ab}	0.035^{e}	0.027^{c}	0.021^{c}
DFRs	0.61^{ab}	0.44^{a}	0.24^{bcd}	0.20^{a-e}	0.19^{abc}	0.019^{bc}	0.015^{ab}	0.012^{ab}
DFRas	0.49^{a}	0.37^{a}	0.21^{ab}	0.18^{abc}	0.17^{ab}	0.014^{ab}	0.011^{a}	0.010^{a}
4 °C	อะพิจินิน	ลูทิโอลิน	เคเอ็มฟีรอล	เคอร์วเซติน	ไมริซิติน	เพลาโกนิดิน	ไซยานิดิน	เดลฟินิดิน
ปกติ	1.40^{ef}	1.04^{f}	0.19^{a}	0.17^{a}	0.21^{a}	0.021^{c}	0.017^{b}	0.015^{b}
chs	1.63^{f}	0.94^{ef}	0.24^{bcd}	0.22^{cde}	0.20^{bc}	0.029^{d}	0.025^{c}	0.022^{d}
f3'hs	1.01^{d}	0.63^{bc}	0.28^{d}	0.24^{e}	0.21^{c}	0.061^{g}	0.044^{e}	0.040^{g}
f3'has	1.53^{ef}	1.03^{f}	0.21^{ab}	0.19^{abcd}	0.18^{abc}	0.038^{e}	0.029^{cd}	0.025^{dc}
dfrs	0.51^{a}	0.47^{ab}	0.20^{a}	0.17^{ab}	0.16^{a}	0.040^{e}	0.032^{d}	0.028^{e}
dfras	0.62^{ab}	0.48^{ab}	0.24^{bcd}	0.21^{bcde}	0.19^{abc}	0.018^{abc}	0.014^{ab}	0.012^{ab}

4.3.3 ผลของความเข้มแสงต่อการแสดงออกของยาสูบ

การเจริญของต้นยาสูบปกติพบว่า มีใบเฉลี่ย 2-3 ใบที่มีใบหงิกและไหม้ที่ปลายใบไหม้ ลำต้นมีการยืดสูงขึ้นมีบางใบที่สีเขียวซีด แต่ที่ปลายยอดสีเขียวเข้ม ส่วนยาสูบ CHS, F3'Hs, และ F3'Has การเจริญเติบโตมีลักษณะใกล้เคียงกัน มีการยืดของลำต้นและมีใบสีเขียวเข้ม ในขณะที่ยาสูบ DFRs และ DFRas มีลักษณะใบใกล้เคียงกันสีเขียวอมเหลืองและมีการยืดตัวของลำต้นแต่มีขนาดของลำต้นค่อนข้างเล็ก สำหรับยาสูบ DFRas มีบางใบเฉลี่ย 1-2 ใบที่ใบเริ่มเหลืองซีด ดังภาพที่ 4.35

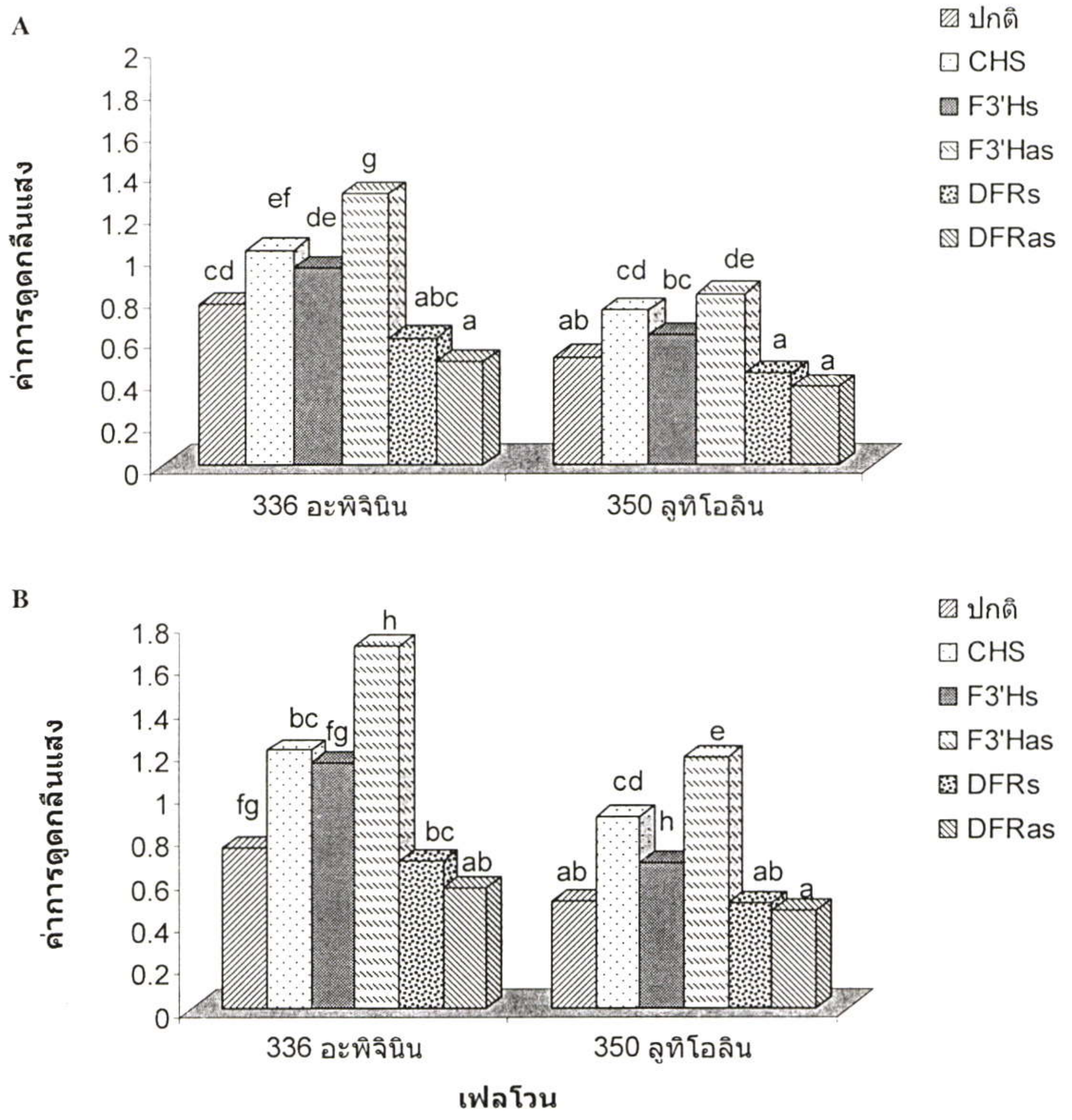
ปกติ CHS F3'Hs F3'Has DFRs DFRas

ภาพที่ 4.35 ยาสูบที่เจริญในชั้นเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มแสง 1000 ลักซ์ เป็นระยะเวลา 15 วัน

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวน พบว่ายาสูบทุกชนิดมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นยกเว้นยาสูบปกติ โดยค่าการดูดกลืนแสงของยาสูบ CHS, F3'Hs และ F3'Has มีความต่างทางสถิติ ขณะที่ยาสูบ DFRs และ DFRas มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังภาพที่ 4.36 และตารางที่ 4.5

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนอล พบว่ายาสูบ CHS, F3'Has และ DFRas ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ส่วนยาสูบที่เหลือมีค่าการดูดกลืนแสงลดลง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังภาพที่ 4.37 และตารางที่ 4.5

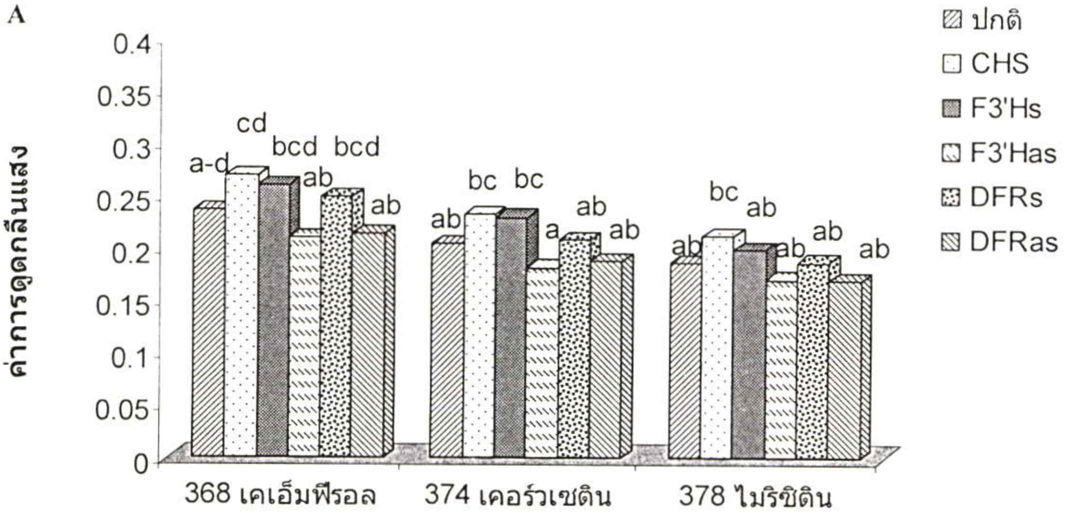
ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบกลุ่มแอนโทไซยานิน พบว่ายาสูบทุกชนิดมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นยกเว้นยาสูบปกติไม่มีการเปลี่ยนแปลง สำหรับยาสูบ CHS, F3'Hs, F3'Has และ DFRs พบว่าที่มีค่าการดูดกลืนแสงในกลุ่มแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น ดังและภาพที่ 4.38 และตารางที่ 4.5



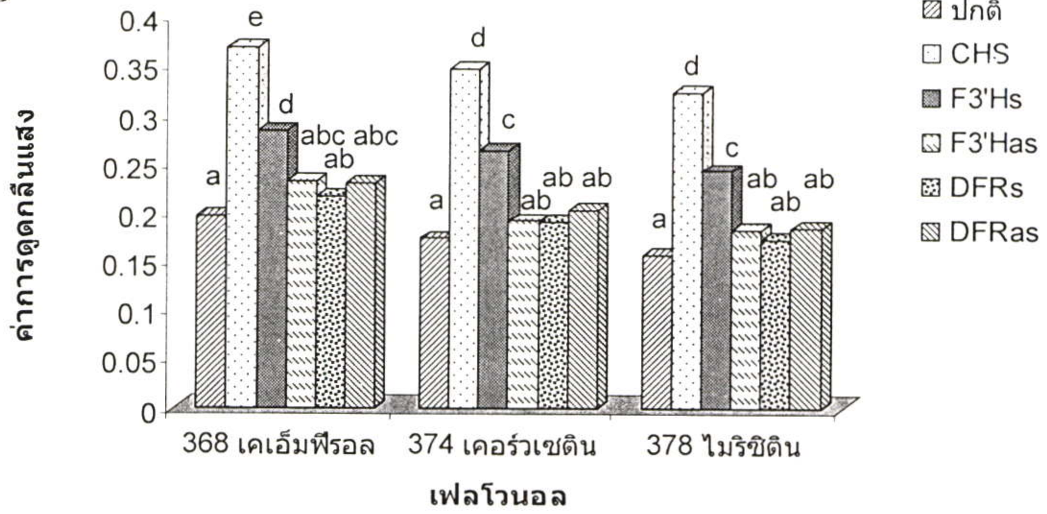
ภาพที่ 4.36 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านแสง แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนกับความเข้มแสง จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล. A คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ ที่เวลา 15 วัน B คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ ที่เวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT p = 0.5)

=

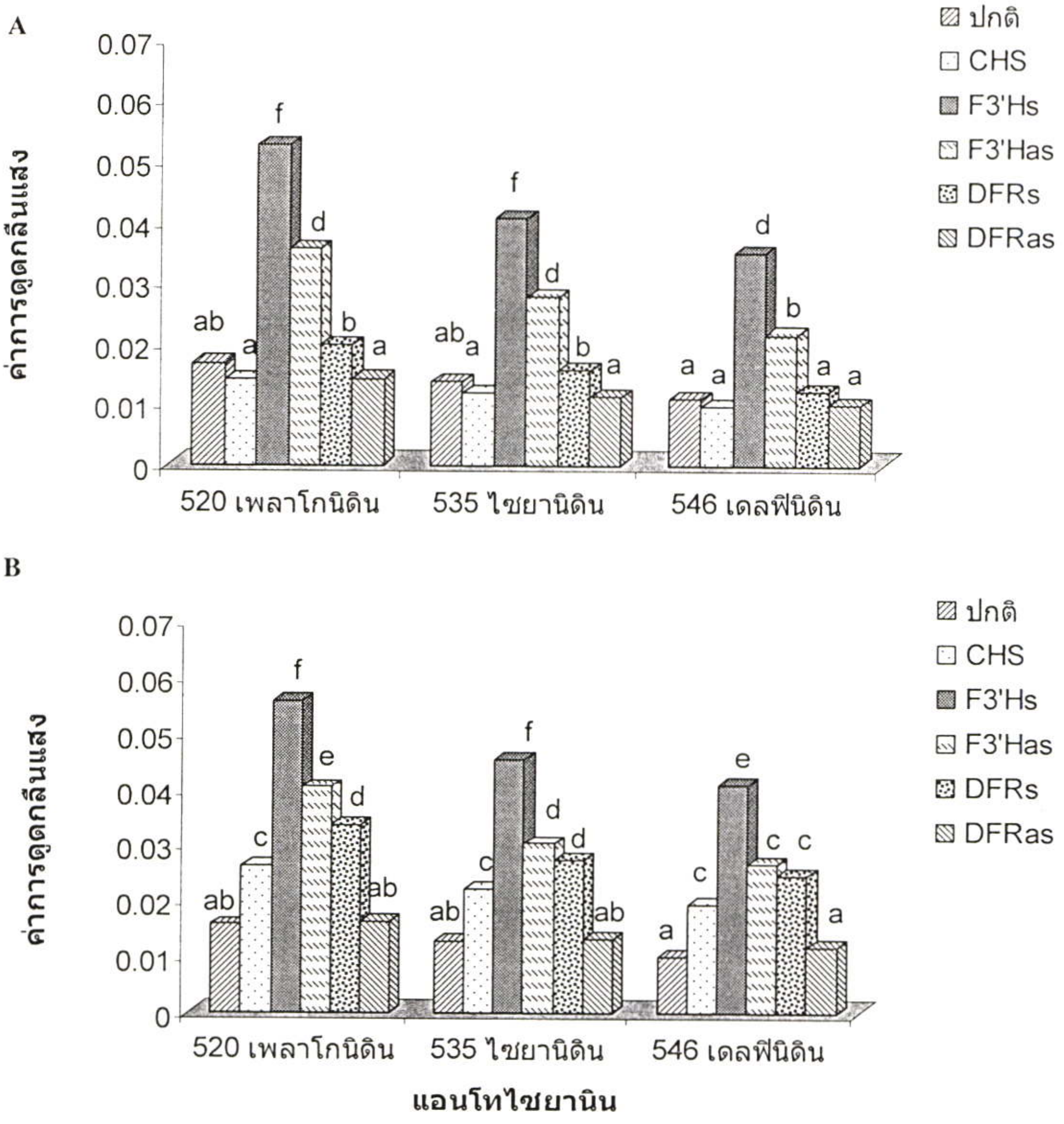
A



B



ภาพที่ 4.37 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านแสง แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มเฟลโวนอลกับความเข้มแสง จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล. A คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ ที่เวลา 15 วัน B คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ ที่เวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT $p = 0.5$)



ภาพที่ 4.38 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในการทดสอบปัจจัยด้านแสง แสดงปฏิสัมพันธ์ของสารสกัดยาสูบกลุ่มแอนโทไซยานินกับความเข้มแสง จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดความเข้มข้น 100 มก./มล. A คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มแสง 500 ลักซ์ ที่เวลา 15 วัน B คือ กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากต้นยาสูบที่เลี้ยงที่ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ ที่เวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT p = 0.5)

ตารางที่ 4.5 ผลค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดยาสูบในสภาวะที่มีระดับความเข้มแสงต่างๆ แสดงปฏิสัมพันธ์ของความเข้มแสงกับสารเฟลโวนอยด์ จากยาสูบสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เพิ่มการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ จากสารสกัดเข้มข้น 100 มก./มล. เป็นระยะเวลา 15 วัน (ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ DMRT p = 0.5)

แสง 500 ลักซ์	อะพิจินิน	ลูทิโอลิน	เคเอ็มฟีรอล	เคอร์วเซติน	ไมริซิติน	เพลาโกนิดิน	ไซยานิดิน	เดลฟินิดิน
ปกติ	0.77 [cd]	0.51 [ab]	0.23 [abcd]	0.20 [ab]	0.18 [ab]	0.016 [ab]	0.013 [ab]	0.011 [a]
CHS	1.03 [ef]	0.74 [cd]	0.26 [cd]	0.23 [bc]	0.21 [bc]	0.014 [a]	0.011 [a]	0.009 [a]
F3'Hs	0.94 [de]	0.62 [bc]	0.26 [bcd]	0.23 [bc]	0.20 [ab]	0.052 [f]	0.040 [f]	0.035 [d]
F3'Has	1.30 [g]	0.82 [de]	0.21 [ab]	0.18 [a]	0.17 [ab]	0.035 [d]	0.027 [d]	0.021 [b]
DFRs	0.61 [abc]	0.44 [a]	0.24 [bcd]	0.20 [ab]	0.19 [ab]	0.019 [b]	0.015 [b]	0.012 [a]
DFRas	0.49 [a]	0.37 [a]	0.21 [ab]	0.18 [ab]	0.17 [ab]	0.014 [a]	0.011 [a]	0.010 [a]
แสง 1000 ลักซ์	อะพิจินิน	ลูทิโอลิน	เคเอ็มฟีรอล	เคอร์วเซติน	ไมริซิติน	เพลาโกนิดิน	ไซยานิดิน	เดลฟินิดิน
ปกติ	0.75 [bc]	0.50 [ab]	0.19 [a]	0.17 [a]	0.15 [a]	0.015 [ab]	0.013 [ab]	0.010 [a]
chs	1.21 [fg]	0.90 [e]	0.37 [e]	0.34 [d]	0.32 [d]	0.026 [c]	0.022 [c]	0.019 [c]
f3'hs	1.15 [fg]	0.68 [cd]	0.28 [d]	0.26 [c]	0.24 [c]	0.056 [f]	0.045 [f]	0.041 [c]
f3'has	1.7 [h]	1.17 [h]	0.23 [abc]	0.19 [ab]	0.18 [ab]	0.040 [e]	0.030 [d]	0.026 [c]
dfrs	0.69 [bc]	0.49 [ab]	0.21 [ab]	0.19 [ab]	0.17 [ab]	0.033 [d]	0.027 [d]	0.024 [c]
dfras	0.56 [ab]	0.45 [a]	0.23 [abc]	0.20 [ab]	0.18 [ab]	0.016 [ab]	0.013 [ab]	0.012 [a]

จากการทดลองจะสังเกตได้ว่า เมื่อต้นยาสูบอยู่ในสภาวะที่มีเกลือ 50 mM อุณหภูมิต่ำแบบสลับ (กลางวัน/กลางคืน : 25/4°C) และความเข้มแสงสูง (1000 ลักซ์) จะมีการแสดงออกของสารเฟลโวนอยด์ที่อยู่ต้นและปลายชีวสังเคราะห์ ได้แก่ สารกลุ่มเฟลโวน และแอนโทไซยานิน ตามลำดับเพิ่มสูงขึ้นกว่าสภาวะปกติ ส่วนต้นยาสูบที่อยู่ในวุ้น 0.9% จะมีการแสดงออกของสารเฟลโวนอยด์กลุ่มที่อยู่ปลายชีวสังเคราะห์ ได้แก่ เฟลโวนอล และแอนโทไซยานิน ในการเพิ่มความต้านทานต่อสภาวะเครียดของพืชนั้น คาดว่าน่าจะต้องการสารกลุ่มเฟลโวนอยด์มากกว่า 1 ชนิด เนื่องจากการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ต้นชีวสังเคราะห์ให้ประสิทธิภาพการทนต่อสภาวะเครียด มากกว่าการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ปลายชีวสังเคราะห์

การทดลองเกี่ยวกับการตอบสนองต่อสภาวะเครียด ที่มีผลต่อการแสดงออกของสารเฟลโวนอยด์ในยาสูบชนิดต่างๆ โดยได้เลียนแบบปัจจัยและสภาวะต่างๆที่ใช้ในการทดสอบการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของสารในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ในกะเพราแดง ที่ให้แนวโน้มในการผลิตสารหรือการสะสมของสารเฟลโวนอยด์ที่มากที่สุด อาจทำให้การทดลองมีความผิดพลาดได้ เพราะพืชแต่ละชนิดตอบสนองต่อสภาวะเครียดได้ไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีรวิทยาของพืชแต่ละชนิดนั้นๆ ดังเช่นในการทดลองนี้กะเพราทนต่อสภาวะเครียดด้านความเข้มแสงได้ดีกว่ายาสูบอาจต้องทำการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดลองในยาสูบ เพื่อศึกษาถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสภาวะเครียดในการชักนำให้เกิดการสะสมของสารเฟลโวนอยด์มากที่สุดในยาสูบ จะทำให้การทดลองครั้งนี้มีความเหมาะสมยิ่งขึ้น การศึกษาแนวทางการถ่ายโอนยีนครั้งนี้เป็นการถ่ายยีนในกลุ่มของยีนโครงสร้างเพียงอย่างเดียว ในอนาคตหากมีการศึกษาเกี่ยวกับยีนควบคุมด้วยน่าจะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองและปรับตัวเข้ากับสภาวะเครียดของพืชได้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น

การวิเคราะห์ปริมาณสารเฟลโวนอยด์นี้ เป็นการศึกษาเพื่อดูแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงการสะสมของสารชนิดต่างในกลุ่มเฟลโวนอยด์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งอาจจะมีข้อผิดพลาดเกิด ขึ้นคืออันเนื่องมาจากการบดบังของสารประกอบตัวอื่นๆในสารสกัด ดังนั้นการวัดการดูดกลืนแสงของความยาวคลื่นแสงเฉพาะของสารแต่ละตัวนั้นจึงเป็นการบอกคร่าวๆ ถึงแนวโน้มในการเปลี่ยน แปลงของการแสดงออกของสารในแต่ละตัวเมื่อได้รับสภาวะเครียด เพื่อให้ทราบถึงความชัดเจนของทิศทางการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น อาจใช้เทคนิคการวิเคราะห์สารเพื่อให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นเช่น การใช้ HPLC หรือ GC เพื่อใช้ยืนยันผลการทดลองอีกครั้ง

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 การศึกษาการผลิตสารในวิถีชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ ต่อการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของต้นกะเพราแดง

การศึกษาปัจจัยด้านแรงดันออสโมติก ต่อการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของกะเพราแดง ปริมาณเกลือ น้ำตาล และวุ้นที่เพิ่มขึ้น มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของเกลือ 50 ถึง 200 mM มีการสะสมสารกลุ่มแอนโทไซยานินมากกว่าการทดลองควบคุม ในขณะที่สารกลุ่มเฟลโวนและเฟลโวนอลมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ส่วนความเข้มข้นของน้ำตาลที่ระดับ 5 และ 6% จะชักนำให้เกิดการสะสมของสารในกลุ่มแอนโทไซยานินมาก ในขณะที่สารในกลุ่มเฟลโวนอลและเฟลโวนไม่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับการทดลองควบคุม วุ้นที่ระดับ 0.9% มีผลต่อการสะสมของสารเฟลโวนอลและแอนโทไซยานินในขณะที่สารกลุ่มเฟลโวนไม่มีการเปลี่ยนแปลง ปริมาณน้ำตาลมีผลต่อการชักนำให้สะสมสารกลุ่มแอนโทไซยานินได้สูงกว่าเกลือและความเข้มข้นวุ้น

อุณหภูมิมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารเฟลโวนอยด์ในทุกกลุ่ม แต่ที่อุณหภูมิต่ำ(4°C) มีแนวโน้มการชักนำให้เกิดการสะสมเฟลโวนอยด์มากกว่าที่อุณหภูมิสูง(37°C) อาจเนื่องมาจากสารแต่ละชนิดมีผลต่อกลไกภายในต้นกะเพราในการตอบสนองต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกัน นอกจากนี้พบว่าแสงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารเฟลโวนอยด์ในทิศทางเดียวกัน คือมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้นในทุกๆ กลุ่มของสารเฟลโวนอยด์

5.2 การศึกษาผลของต้นยาสูบที่ได้รับยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ เมื่อได้รับสภาวะเครียด

การเปรียบเทียบการผลิตสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ของต้นยาสูบที่ได้รับ และไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน (ต้นยาสูบปกติ) พบว่าต้นยาสูบ CHS, F3'Hs และ F3'Has ให้ค่าการดูดกลืนแสงสารกลุ่มเฟลโวนเพิ่มขึ้น ส่วนเฟลโวนอลนั้นมียาสูบ CHS และ F3'Hs ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น ยาสูบ F3'Hs และ F3'Has ให้ค่าการดูดกลืนแสงในกลุ่มแอนโทไซยานินเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน

ยาสูบปกติเมื่อทดสอบในสภาวะที่มีเกลือ 50 mM และ วุ้นความเข้มข้น 0.9% มีค่าการดูดกลืนแสงของสารเฟลโวนอยด์เพิ่มขึ้นทั้ง 3 ตัว ในขณะที่ทดสอบในอาหาร MS ที่มีน้ำตาลความ

เข้มข้น 5% พบว่าสารเฟลโวนกับเฟลโวนอลมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น ในขณะที่การทดสอบด้านอุณหภูมิพบว่า ที่อุณหภูมิ 4°C มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเฉพาะสารกลุ่มเฟลโวนและแอนโทไซยานิน ในขณะที่ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ ไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสง คาดว่าความเข้มแสงที่สูงเกินไปอาจมีผลทำให้อุณหภูมิของขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูงเกินไป ซึ่งมีผลต่อการเจริญของต้นยาสูบมากกว่ากะเพรา

ยาสูบ CHS มีการตอบสนองต่อสภาวะเครียดในทิศทางคล้ายต้นกับปกติแต่มีการแสดงออกของยีนสูงกว่า ยกเว้นในอาหาร MS น้ำตาล5% ที่พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงของสารแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นด้วย ส่วนในปัจจัยด้านแสงพบค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มทุกกลุ่ม .ที่ปัจจัยด้านอุณหภูมิพบว่าสารกลุ่มเฟลโวนและแอนโทไซยานินมีค่าเพิ่มขึ้น

ยาสูบ F3'Hs เมื่อทดสอบด้วยเกลือ น้ำตาล และ วุ้น มีการผลิตเฟลโวนลดลง ในขณะที่ในการทดลองเรื่องแสงและอุณหภูมิมีค่าการดูดกลืนแสงของเฟลโวนเพิ่มขึ้น ส่วนสารกลุ่มเฟลโวนอลไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงในการทดสอบปัจจัยด้านแรงดันออสโมติก แต่เฟลโวนอลจะมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น ในการทดสอบเรื่องเกี่ยวกับปัจจัยเรื่องแสงและอุณหภูมิ ส่วนสารกลุ่มแอนโทไซยานินพบว่า การทดลองเรื่องเกลือ น้ำตาล และ วุ้น ให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแอนโทไซยานินเพิ่มมากขึ้น ขณะที่แสงและอุณหภูมิมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มแอนโทไซยานินเพียงเล็กน้อย

การทดสอบภายใต้สภาวะเครียดของยาสูบ F3'Has ให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารเฟลโวนสูงขึ้นทุกสภาวะ โดยเฉพาะการทดสอบเกี่ยวกับ เกลือ น้ำตาล และ วุ้น ซึ่งสูงกว่าค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบเรื่องแสงและอุณหภูมิ การทดสอบเกี่ยวกับ เกลือ และ อุณหภูมิ ให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารเฟลโวนอลไม่เปลี่ยนแปลง ขณะที่การทดสอบในเรื่องของ น้ำตาล วุ้น และ แสง มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น

ยาสูบ DFRs หลังจากทดสอบด้วยสภาวะเครียด พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวนจะเพิ่มขึ้นในการทดสอบเรื่องของน้ำตาล ส่วนการทดสอบสภาวะอื่นๆมีทิศทางไม่แน่นอน ส่วนใหญ่มีแนวโน้มคงที่ สารเฟลโวนอลมีค่าการดูดกลืนแสงไม่เปลี่ยนแปลงในทุกวิธีที่ทดสอบ ส่วนสารแอนโทไซยานินมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในทุกวิธีที่ใช้ทดสอบ

ยาสูบ DFRas มีค่าการดูดกลืนแสงของสารกลุ่มเฟลโวนเพิ่มขึ้นในการทดสอบด้วย เกลือ น้ำตาล วุ้น อุณหภูมิ แสง แต่มีค่าน้อยกว่าค่าการดูดกลืนแสงในต้นยาสูบปกติ สารเฟลโวนอลมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นในการทดสอบด้วย เกลือ น้ำตาล อุณหภูมิ แสง ในขณะที่วุ้นไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนสารแอนโทไซยานินมีค่าเพิ่มขึ้นในการทดสอบด้วยน้ำตาล ส่วนการทดสอบอื่นๆไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือมีแนวโน้มลดลง

บรรณานุกรม

กนกพร สมพรไพลิน.2545."ผลของชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินต่อการควบคุมสีในพืช." **วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง**. 10(1): 23-27.

กนกพร สมพรไพลิน. 2546. **บทปฏิบัติการเทคโนโลยีทางพืช.** เรื่อง การถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์ของต้นยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม." คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กนกพร สมพรไพลิน. 2547. **บทปฏิบัติการวิชาพันธุวิศวกรรม.** คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สำนักงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. 2544. "ข้อมูลพันธุ์ไม้"

[Online]. Available http://www.rspg.thaigov.net/plants_data/index.htm

อ้อมบุญ ล้วนรัตน์. 2536. "**การสกัดและตรวจสอบสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ**." กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. 2001. "The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat." **Plant, Cell & Environment**. 24 (12): 1337–1344.

Ambasht, N.K. and Agrawal, M. 1995. "Physiological responses of field grown *Zea mays* L. plants to enchanced UVB radiation." **Biotronics**. 24: 15-23.

Basile, A., Sorbo, S., LÓpez-Sáeb, J.A. and Cobianch, C.R. 2003. "Effect of seven pure flavonoids from mosses on germination and growth of *Tortula muralis* HEDW. (Bryophyta) and *Raphanus sativus* L. (Magnoliophyta)." **Phytochem**. 62 (7) : 1145-1152.

Bohnert, H. J. And Jensen, R. G. 1996. "Strategies for Engineering Water Stress Tolerance in Plants." **Trends in Biotech**. 14: 89-97.

Bradley, J. M., K. M. Davies, S. C. Deroles, S. J. Bloor and Lewis, D. H. 1998. "The maize LC regulatory gene up-regulates the flavonoid biosynthetic pathway of Petunia." **Plant J.** 13: 381–392.

Britsch, L., B. Ruhnau-Brich and Forkmann, G. 1992. "Molecular cloning, sequence analysis, and in vitro expression of flavanone 3 beta-hydroxylase from Petunia hybrida." **J. Biol. Chem.** 267: 5380– 5387.

Britsch, L., J. Dedio, H. Saedler and Forkmann, G. 1993. "Molecular characterization of flava none 3 beta-hydroxylases consensus sequence comparison with related enzymes and the role of conserved histidine residues." **Eur. J. Biochem.** 217: 745–754.

Brugliera, F.,D. Tull,TA. Holton, M. Karan, N. Treloar, K. Simpson, J. Skurczynska and Mason, JG. 2000. " Introduction of a cytochrome b5 enhances the activity of flavonoid 3'5' hydroxylase (a cytochrome P450) in transgenic carnation." **Sixth International Congress of Plant Molecular Biology**. 1: 6-8.

Burbulis, IE. and Winkel-Shirley, B. 1999. "Interactions among enzymes of the arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway." Proc **Natl. Acad. Sci. USA**. 96: 12929-34.

Buchhloz, G., B. Ehmann and Wellmann, E. 1995. "Ultraviolet light inhibition of phytochro meinduced flavonoid biosynthesis and DNA photolyase formation in mustard cotyledons (*Sinapis alba* L.)." **Plant Physiol**. 108: 277-234.

Caboche, M., I. Debeuejon, C. Jond, L. Lepiniec and Nesi, N. 2000. "The *TT8* gene encodes a basic-helix-loop-helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in Arabidopsis siliques." **Plant Cell**. 12: 1863-1878.

Chalker-Scott, L. 1999. "Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses." **Photochem.& Photobiol**. 70: 1–9.

Christie, P. J., M. R. Alfenito and Walbot, V. 1994. " Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedling." **Planta**. 194: 541-549.

Cormier, F., H. A. Crevier and Do, C. B. 1989. "Effect of sucrose concentration on the accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension." **Can. J. Bot**. 68: 1822-1825.

Davies, K.M., S.J. Bloor, G.B. Spiller and Deroles, S.C. 1989. "Production of yellow colour in flowers: redirection of flavonoid biosynthesis in Petunia." **Plant J.** 13 : 259–266.

Deroles, S. C., J. M. Bradley, K. E. Schwinn, K. R. Markham, S. Bloor, D. G. Manson and Davies, K. M. 1998. "An antisense chalcone synthase cDNA leads to novel colour patterns in lisianthus (*Eustoma grandiflorum)*." **Mol. Breed.** 4: 59–66.

Dillon K., M. Vivian Jonathan Overton, J. Renée Grayer and Harborne, J.B. 1997. "Differences in phytoalexin response among rice cultivars of different resistance to blast." **Phytochem.** 44: 599-603.

Dixon, R. A. and Paiva, N.L. 1995. "Stress-induced phenylpropanoid metabolism." **Plant Cell.** 7: 1085–1097.

Dong, Y.H., L. Beuning., K. davies., D. Mitra., B. Morris and Kootstra, A. 1998. "Expression of pigmentation genes and photo-regulation of anthocyanin biosynthesis in developing Royal Gala apple flowers." **J. Plant Physio**l. 25: 245-252.

Dooner, H. K., T. P. Robbins and Jorgensen, R.A. 1991. "Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis." **Annu. Rev. Genet.** 25: 173–199.

Forkmann, G. 1991. "Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and extension by genetic engineering." **Plant Breed**. 106: 1–26.

Forkmann, G. and Heller, W. 1999. "**Biosynthesis of flavonoids. In: Comprehensive Natural Products Chemistry.**" 713–748.

Grayer, R. J., J. B., Harborne, J. Overton and Dillon, V. M. 1995. "Flavonoid phytoalexins and resistance of rice plants against the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*." **In: Flavonoids and Bioflavonoids.** 119.

Grotewold, E., B. J. Drummond, B. Bowen and Peterson, T. 1994. "The *Myb*-homologous *P* gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset." **Cell**. 76: 543–553.

Harborne, J. B. 1998. "**Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis.**" 60-75.

Harborne, J. B. and Williams, C.A. 2000. "Advances in flavonoid research since 1992." **Phytochemistry**. 55: 481-504.

Harbowy, M.E. and Balentine, D.A. 1997. "Tea chemistry" **Plant Sci.** 16: 415–480.

Holton, T. A. and Cornisch, E. C. 1995. "Genetics and biochemistry of anthocyanin bio synthesis." **Plant Cell.** 7: 1071–1083.

Holton, T. A. and Tanaka, Y. 1994. "Blue roses - a pigment of our imagination." **Trends in Biotech**. 12: 40-42.

Holton, T. A., F. Brugliera., D. R. Lester., Y. Tanaka., C. D. Hyland., J. G. Menting., C. Y. Lu., E. Farcy ., T. W. Stevenson and Cornisch, E. C. 1993. "Cloning and expression of cytochrome-P450 genes controlling flower colour." **Nature.** 366: 276-279.

Jackson, D.,K. Roberts and Martin, C. 1992. "Temporal and spatial control of expression of anthocyanin biosynthetic genes in developing flowers of *Anthirrinum majus*." **Plant J.** 2: 425–434.

Jaakola, L., K. Maatta, A.M. Pirttila, R. Torronen, S. Karenlampi and Hohtola, A. 2002. "Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development." **Plant Physiol.** 130(2):729-739.

Jambunathan, S., B. S. Banos, M. Hernandez-Lopez and Bosquez-Molina, E. 1990. "Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts." **Mexican Journal of phytopathology**. 82: 322-328.

Joung, J. Y., M. Kasthuri, J. Y. Park, W. J. Kang, H. S. Kim, B. S. Yoon, H. Joung and Jeon, J. H. 2003. " An overexpression of chalcone reductase of *Pueraria montana* var. lobata alters biosynthesis of anthocyanin and 50-deoxy flavonoids in transgenic tobacco." **Biochem. Biophys**. 3003: 326–331.

Kaliamoorthy , S. and Rao, A. S. 1994. "Effect of salinity on anthocyanin accumulation in the root of maize." **Ind. J. Plant Physiol**. 37: 169-170.

Koes, R. E., F. Quattrocchio and Mol, J. N. M. 1994. "The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution." **Bio. Essays**. 16: 123–132.

Leyva, A., J. A. Jarillo., J. Salinas and Martinez-Zapater, J. M. 1995. "Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner." **Plant Physiol**. 108: 39-46.

Li, J.,T. M. Qu-Lee and Last, R. L. 1993. "Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation." **Plant Cell**. 5:171-179.

Lloyd, A. M., V. Walbot and Davis, R. W. 1992. "*Arabidopsis* and *Nicotiana* anthocyanin production activated by maize regulators *R* and *C1*.". **Science**. 258:1773–1775.

Lo, S., I. Weiergang., C. Bonham., J. Hipskind, K. Wood and Nicholson, R.L. 1996. "Phytoalexin accumulation in sorghum: Identification of a methyl ether of luteolinidin." **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 49: 21-31.

Lois R. and Buchanan, BB. 1994. "Severe sensitivity to ultraviolet radiation in an *Arabidopsis* mutant deficient in flavonoid accumulation." **Planta**. 194: 504–509

Madhuri, G. and Reddy, A.R. 1999. "Plant Biotechnology of Flavonoids." **Plant Biotech.** 16 (3) : 179-199.

Martens, S., J. Knott., A.S. Christian., L. Janvari., S. Yu and Forkmann, G. 2003. "Impact of biochemical pre-studies on specific metabolic engineering strategies of flavonoid biosynthesis in plant tissues." **Biochem. Eng. J.** 14 : 227-235

Martin, C., A. Prescott, S. Mackay, J. Bartlett and Vrijlandt, E. 1991. "Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*." **Plant J.** 1: 37-49.

Martin, C. and Paz-Ares, J. 1997. "MYB transcription factors in plants." **Trends in Genetics**. 13(2): 67-73.

Mckown, R., G. Kuroki and Warren, G. 1996. "Cold responses of *Arabidopsis* mutants impaired in freezing tolerance." **J. Exp. Bot.** 47: 1919-1925.

Meer, I.M. van der, Stuitje, A.R. and Mol, J.N.M. 1993. "Regulation of general phenylpropanoid and Flavonoid Gene Expression. " **Plant J**. 12:125-155.

Mita, S., N. Murano, M. Akaike and Nakamura, K. 1997. "Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars." **Plant J**. 11: 841-851.

Mol, J., G. Jenkins., E. Schafer and Weiss, D. 1996. "Signal perception, transduction, and gene expression involed in anthocyanin biosynthesis." **Crit. Rev. Plant Sci**. 15: 525-557.

Muir, S. R., G. J. Collins, S. Robinson, S. Hughes, S. Bovy, C. H. De Vos, A. J. van Tunen and Verhoeyen, M. E. 2001. "Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols." **Nature Biotechnol**. 19: 470–474.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures." **Plant Physiol.** 15: 473–497.

Napoli, C. A., D. Fahy, H. Y. Wang and Taylor, L. P. 1999. "White anther: a Petunia mutant that abolishes pollen flavonol accumulation, induces male sterility, and is complemented by a chalcone synthase transgene." **Plant Physiol**. 120: 615–622.

Padmavati, P., G. Gutkind, R. V. Rondina de , R. Torres and Coussio, J. D. 1997. "Genus *Baccharis*. II. Antimicrobial activity of *B. crispa* and *B.notosergila*." **Planta Med**. 49:128.

Pastori, G. M. and Foyer, H. C. 2002. "Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls." **Plant Physiol**. 129: 460–468.

Pelletier, M. K., I. E. Burbulis and Winkel-Shirley, B. 1999. "Disruption of specific flavonoid genes enhances the accumulation of flavonoid enzymes and end-products in *Arabidopsis* seedlings." **Plant Mol. Biol.** 40: 45–54.

Ramanjulu, S., K. Veeranjaneyulu and Sudhakar, C. 1993. "Physiological changes induced by NaCl in mulberry var." **Ind. J. Plant Physiol**. 36: 273-275.

Rice-Evans, C. A., N. J. Miller and Paganga, G. 1997. "Antioxidant properties of phenolic compounds." **Trends in Plant Sci.** 2: 2152–2159.

Reddy, V.S., K.V. Goud, R. Sharma and Reddy, A.R. 1994. "Ultraviolet-B-responsive anthocyanin production in a rice cultivar is associated with a specific phase of phenylalanine ammonialyase biosynthesis." **Plant Physiol**. 105 :1059–1066.

Sarah F. and Thomasshow Michael, F. 2002. " *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway." **Plant Cell.** 14: 1675-1690.

Shichijo, C., T. Hamada., M. Hiraoka., C. B. Johnson and Hashimoto, T. 1993. "Enhancement of red-light-induced anthocyanin synthesis in sorghum first internodes by moderate low temperature given in the pre-irradiation culture period." **Planta**. 191: 238-245.

Takashi N., N. Masahiro, M. Keiichiro and Saburo, Y. 2005. "Two different mutations are involved in the formation of white-flowered gentian plants." **Plant Sci.** 169: 949-958.

Tanaka, Y., S. Tsuda and Kusumi, T. 1998. "Metabolic engineering to modify flower color." **Plant Cell. Physiol**. 39: 1119–1126.

Tim T.P. and Andrew Lamb, J. 2005. "Antimicrobial activity of flavonoids." **J. of Antimicrobial Agents**. 26 : 343–356.

Tereschuk, M. L., M. V. Riera, G. R. Castro and Abdala, L. R. 1997. "Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*." **J. Ethnopharmacol**. 56: 227–32.

Tholakalabavi, A., J. J. Zwiabek and Thorpe, R. A. 1997. "Osmotically-stressed poplar cell culture: anthocyanin accumulation, deaminase activity, and solute composition." **J. Plant Physiol**. 151: 489-496.

Toda K., D. Yang, N. Yamanaka, S. Watanabe, K. Harada and Takahashi, R. 2002. "A single-base deletion in soybean flavonoid 3'-hydroxylase gene is associated with gray pubescence color." **Plant Mol. Biol**. 50: 187–196.

Xie, D.Y., Jackson, A., Cooper, J.D., Ferreira, D. and Paiva, N.L. 2004. "Molecular and Biochemical Analysis of Two cDNA Clones Encoding Dihydroflavonol-4-Reductase from *Medicago truncatula*." **Plant Physiol.** 134 (3) : 979-994.

Zhu, J. K. 2001. "Plant Salt Tolerance." **Trends Plant Sci**. 6: 66-71.

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 ให้เติม Agar 15 กรัม/ลิตร)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YEB

Bacto beef extract	5	กรัม/ลิตร
Bacto yeast extract	1	กรัม/ลิตร
Bacto peptone	5	กรัม/ลิตร
Sucrose	5	กรัม/ลิตร
$MgSO_4$	2	มิลลิโมลาร์

ปรับพีเอชให้เป็น 7.2

(หากเป็นอาหารแข็ง ให้เติม Agar 15 กรัม/ลิตร)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2XYT

Bacto tryptone	16	กรัม/ลิตร
Bacto yeast extract	10	กรัม/ลิตร
NaCl	10	กรัม/ลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.2

(หากเป็นอาหารแข็ง ให้เติม Agar 15 กรัม/ลิตร)

4. 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

5. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOC

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB	1	ลิตร
กลูโคสเข้มข้น 2 โมลาร์	10	มิลลิลิตร

6. อาหารสูตร MS

สูตรอาหาร MS	ชื่อสารเคมี	ความเข้มข้น (เท่า)	จำนวนที่ใช้ (มิลลิกรัม)ต่อลิตร
stock 1	NH_4NO_3	100x	165
	KNO_3		192
	$MgSO_4.7H_2O$		37
	KH_2PO_4		17
stock 2	$CaCl_2.2H_2O$	100x	44
stock 3	H_3BO_3	1000x	3.1
	KI		0.415
	$Na_2MoO_4.2H_2O$		0.125
	$CoCl_2.6H_2O$		0.0125
stock 4	$MnSO_4.4H_2O$	100x	2.23
	$ZnSO_4.7H_2O$		0.86
	$CuSO_4.5H_2O$		0.0025
stock 5	Na_2EDTA	100x	3.73
	$FeSO_47H_2O$		2.78
stock 6	Inositol	100x	5
	Nicotinic acid		0.025
	Pyridoxin HCl		0.025
	Thiamine HCl		0.005
	Glycine		0.1

ภาคผนวก ข
ขั้นตอนการทดลองด้านอณูชีววิทยา

1. การแยกดีเอ็นเอจากเจล (กนกพร สมพรไพลิน 2547.)
   1.1 ทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิสเพื่อแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการแล้ว ตัดเจลส่วนที่มีชิ้นดีเอ็นเอนั้นใส่ในหลอด1.5 มิลลิลิตร
   1.2 เติม capture buffer ลงในหลอดจากข้อ 1 ในอัตราส่วน capture buffer 10 ไมโครลิตรต่อเจลหนัก 10 มิลลิกรัม
   1.3 บ่มที่ 60 $^{\circ}$C นาน 5-15 นาที จนกว่าเจลจะละลายหมด
   1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่ำ เพื่อให้ของเหลวในหลอดตกลงมารวมกัน
   1.5 ย้ายของเหลวในหลอด eppendorf ไปใส่ในจีเอฟเอกซ์คลอลัมน์ (GFX column) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที
   1.6 นำจีเอฟเอกซ์คลอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 $^{\circ}$C ดีเอ็นเอจะจับกับคอลัมน์
   1.7 เติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในจีเอฟเอกซ์คลอลัมน์อันเดิม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 $^{\circ}$C
   1.8 ย้ายจีเอฟเอกซ์คลอลัมน์ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติมน้ำดีไอออไนซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 20 ไมโครลิตร ลงไปในคอลัมน์ เพื่อละลายดีเอ็นเอที่ติดกับคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที
   1.9 นำจีเอฟเอกซ์คลอลัมน์ที่ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 $^{\circ}$C
   1.10 นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ออก จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร

2. การทำคอมพีเทนท์เซลล์ (กนกพร สมพรไพลิน 2546.)
   2.1 ถ่ายเชื้อ *E. coli* 1 โคโลนีลงในอาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่งมีแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 $^{\circ}$C นานข้ามคืน โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที
   2.2 ถ่ายเชื้อจากข้อ 1 ลงในอาหาร 2XYT ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ซึ่งมีแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์โดยใช้เชื้อปริมาตรเท่ากับ 1-2 เปอร์เซ็นต์ของอาหารบ่มที่ 37 $^{\circ}$C โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จนวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรได้ประมาณ 0.4-0.5

2.3 นำเซลล์แขวนลอยไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 °C

2.4 เทส่วนอาหารทิ้ง แล้วทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งโดยใช้ TFB buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2.5 วางบนน้ำแข็ง 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 °C

2.6 เทส่วนใสทิ้ง แล้ววางหลอดบนน้ำแข็ง ทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งโดยใช้ TFB buffer ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

2.7 เติม DMSO 30 ไมโครลิตร เขย่าให้ผสมกันพอดี

2.8 แบ่งเซลล์แขวนลอยลงในหลอด eppendorf หลอดละ 200 ไมโครลิตร

2.9 เก็บเซลล์ที่ -70 °C

3. การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์โดยวิธี heat-shock และการคัดเลือกโคลน (กนกพร สมพรไพลิน 2547.)

3.1 การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์

3.1.1 นำคอมพีเทนท์เซลล์ซึ่งเก็บที่ -70 °C มาละลายโดยวางบนน้ำแข็ง

3.1.2 ดูดคอมพีเทนท์เซลล์ที่ละลายแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด eppendorf ซึ่งแช่บนน้ำแข็ง แล้วเติม ligation solution และผสมให้เข้ากันโดยการปิเปตขึ้นลง วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

3.1.3 นำไปบ่มที่ 42 °C เป็นเวลา 1 นาที

3.1.4 เติมอาหาร SOC ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.2 การคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าได้รับเวคเตอร์ yT&A ที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่

3.2.1 เตรียมเพลตที่มีอาหาร LB ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน สเปรดเซลล์แขวนลอยที่เหลือบนเพลตที่เตรียมไว้ บ่มที่ 37 °C

4. การสกัดพลาสมิด (กนกพร สมพรไพลิน 2547.)

4.1 ถ่ายโอนโคโลนีเดี่ยวบนเพลตที่มีอาหาร LB ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะคาร์นามัยซิน ลงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะคาร์นามัยซิ100 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 °C นานข้ามคืน โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

4.2 นำสารละลายแขวนลอยของเซลล์ ใส่หลอด eppendorf แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความ เร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 °C 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 °C

4.7 ย้ายของเหลวส่วนบนไปใส่หลอด eppendorf ใหม่ แล้วเติมเอทานอลที่เย็นจัดเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

4.8 นำไปเก็บที่ -70 °C นาน 10-15 นาที

4.9 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 °C แล้วเทเอทานอลทิ้ง

4.10 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

4.11 นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งโดยใช้ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 °C แล้วเทเอทานอลทิ้ง

4.12 ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยการคว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชูหรือใช้เดซิเคเตอร์

4.13 ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร100 ไมโครลิตร ซึ่งมี *RNase* เข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.14 เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 °C

5. การเตรียมเชื้อและการถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมโดยวิธี Freeze-thaw (กนกพร สมพรไพลิน 2546.)

5.1 เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียมในอาหารเหลวสูตร YEB หรือ LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

5.2 นำสารละลายเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาวางบนน้ำแข็ง 10 นาที

5.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่ 4 °C

5.4 เทส่วนบนทิ้ง นำตะกอนเซลล์มาละลายในแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บนน้ำแข็ง

5.5 นำเซลล์แขวนลอยในแคลเซียมคลอไรด์มา 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ใหม่และผสมเวคเตอร์ที่มียีนที่สนใจประมาณ 2 ไมโครกรัม โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ 2-3 ครั้ง บนน้ำแข็ง

5.6 นำสารละลายนี้แช่ในไนโตรเจนเหลวจนเป็นน้ำแข็ง แล้วนำมาไว้ที่ 37 °C นาน 4 นาที จากนั้นเติมอาหาร YEB 1 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 °C เขย่า 200 รอบต่อนาที นาน 4 ชั่วโมง

5.7 นำสารละลายดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3500 รอบต่อนาที 5 นาที ที่ 4 °C

5.8 เทอาหารส่วนบนทิ้งไป ทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งด้วยอาหารสูตร YEB ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

5.9 สเปรดเซลล์บนอาหารแข็งสูตร YEB ที่มียาปฏิชีวนะคาร์นามัยซิน

6. การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม (กนกพร สมพร ไพลิน 2547.)

6.1 เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียมดิสอาร์มสายพันธุ์ LBA4404/pBI121 ที่มียีน *NPTII* ซึ่งให้เอนไซม์นีโอไมซินฟอสโฟทรานส์เฟอเรส และยีน *GUS* ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ที่รุนแรง (35S CaMV) ในอาหารเหลวสูตร YEB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะคาร์นามัยซินนานข้ามคืน อุณหภูมิ 28 °C เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที

6.2 นำเซลล์แขวนลอยของเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาใส่ในอาหารเหลวสูตร YEBปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่มียาปฏิชีวนะคาร์นามัยซิน และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 °C เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.8

6.3 นำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

6.4 เทส่วนอาหารทิ้งไป แล้วทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งในสารละลายซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ Tween-80 0.5 เปอร์เซ็นต์

6.5 นำใบของพิทูเนียที่ปราศจากเชื้อมาทำให้เกิดบาดแผลโดยตัดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจตุรัส และจุ่มในเซลล์แขวนลอยที่ได้จากข้อ 6.4 เป็นเวลา 60 วินาที

6.6 นำชิ้นส่วนของพืชดังกล่าววางบนเพลต ที่มีกระดาษทิชชูซึ่งปราศจากเชื้อ เพื่อกำจัดอะโกรแบคทีเรียมส่วนเกินออก

6.7 วางชิ้นส่วนของพืชบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่

6.8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 °C โดยมีการให้แสง 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง ต่อวัน หลังจากบ่มเนื้อเยื่อประมาณ 2-3 วัน อะโกรแบคทีเรียมจะย้ายส่วน T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชตรงบริเวณรอยตัดของพืช และ T-DNA นี้จะเข้าไปรวมกับโครโมโซมพืช

6.9 ย้ายชิ้นส่วนพืชลงในอาหารชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ ที่สามารถฆ่าอะโกรแบคทีเรียมได้ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28°C โดยมีการให้แสง 16 ชั่วโมง และมืด 8 ชั่วโมง ต่อวัน

6.10 ทำการย้ายชิ้นส่วนพืชบนอาหารใหม่ตามข้อ 6.9 ทุกๆ 2 สัปดาห์และคัดเลือกต้นที่คาดว่าได้รับยีน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นาย รุทธ์ มณีประเสริฐ
วัน/เดือน/ปี เกิด	14 พฤษภาคม 2523 ที่โรงพยาบาลศิริราช กรุงเทพมหานคร
ปี พ.ศ. 2542-2546	ศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปี พ.ศ. 2546-2550	ศึกษาระดับปริญญาโท วท.ม. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ที่อยู่ 275 ม.1 ต. หลักสาม อ. บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร 74120