บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.)

ปทุมมา (*C. alismatifolia* Gagnep.) เป็นไม้ล้มลุกที่มีอายุหลายปีมีหัวประเภท rhizome อยู่ใต้ดิน เป็นพืชชนิดหนึ่งที่อยู่ในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) สกุลขมิ้น (*Curcuma*) ซึ่งพืชในสกุลนี้มีอยู่ไม่น้อยกว่า 65 ชนิด (species) พบกระจายพันธุ์ตั้งแต่ทวีปออสเตรเลีย ประเทศอินโดนีเซีย เรื่อยมาจนถึงทวีปแอฟริกา โดยพบว่า มีประมาณ 30 ชนิด มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย (จีรวัฒน์, 2535) ซึ่งท้องถิ่นที่พบนั้น อาจอยู่บริเวณทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือหรือทางตอนใต้ของประเทศ โดยอาจพบในทุ่งหญ้า ป่าละเมาะ หรือป่าชื้นก็ได้

พืชในวงศ์ขิงนี้เป็นที่รู้จักของคนไทยมานานและถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ มากมาย โดยใช้ในการประกอบอาหาร ซึ่งใช้ช่อดอกอ่อนมาต้มหรือแกง ใช้เป็นเครื่องเทศ เครื่องสำอาง แต่งสีอาหาร สมุนไพรอบตัว รักษาผื่นคัน ขับลม รักษาโรคกระเพาะอาหาร ท้องร่วง แก้หวัด สมานแผล และโรคมะเร็งบางชนิด เนื่องจากมีสารออกฤทธิ์ชื่อ curcumin จึงนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรสำหรับสตรี เช่น ว่านชักมดลูก ใช้ในการต้านแบคทีเรีย ยีสต์ และราเพราะมีสารออกฤทธิ์ทางเภสัชกรรมฤทธิ์ต้านการอักเสบ (จีรวัฒน์, 2535)

นอกจากนั้นได้นำพืชสกุลนี้มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมพืชสวนโดยนิยมนำมาเป็นไม้ประดับและตกแต่งสถานที่ในประเทศไทยนิยมนำมาใช้เป็นไม้กระถางค่อนข้างมาก และเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญเนื่องจากดอกและใบที่มีความสวยงาม พืชในสกุลขมิ้นชนิดที่นิยมปลูกและต่างประเทศสนใจได้แก่ *C. alismatifolia*,*C. thorellii* และ *C. cordata* เป็นต้น

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น พืชสกุลนี้มีลำต้นใต้ดินทำหน้าที่สะสมอาหารและน้ำ เรียกว่า เหง้า ตาข้างจะเจริญเติบโตเป็นลำต้นเทียม (pseudostem) อยู่เหนือดิน โดยลำต้นเทียมนั้นเกิดจากกาบใบที่ห่อตัวกันแน่น สำหรับเหง้าจะมีลักษณะการเจริญที่แตกต่างกันไป

ใบ ประกอบด้วยกาบใบซึ่งห่อรวมตัวกันแน่นเกิดเป็นลำต้นเทียม ก้านใบซึ่งชูออกจากลำต้นเทียมในมุมที่แตกต่างกัน และแผ่นใบซึ่งเป็นใบเดี่ยวมีรูปร่างเป็นวงรีนคบบ้างป้อมบ้าง ใบและก้านใบอาจมีหรือไม่มีขนก็ได้ โดยแตกต่างกันไปตามชนิดที่พบเห็นขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่น ปลายใบป้านหรือแหลมโดยมีเส้นใบขนานแบบเฉียงขึ้น

ช่อดอก เป็นแบบช่อแน่น (compact spike) เกิดจากปลายลำต้นเทียมหรือเกิดจากเหง้าโดยตรง โดยมีใบประดับ (bract) โอบรอบโคนช่อดอกย่อย (coinflorscence) ทำให้เห็นใบประดับเรียงซ้อนกัน โดยอาจเรียงเวียนเป็นเกลียวหรือเรียงเป็นแถว เกิดเป็นช่อที่มีลักษณะเป็นทรงกระบอก

การที่มีใบประดับเรียงติดกันทำให้ส่วนโคนประมาณ 1/3 ถึง 1/2 ของใบประดับเชื่อมติดกันเกิดเป็นลักษณะคล้ายถ้วยซ้อนกัน ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของพืชสกุลนี้ ภายในถ้วยของใบประดับเป็นที่อยู่ของช่อดอกย่อย (coinflorescence) แต่ใบประดับที่อยู่ส่วนบนของช่อดอกนั้นจะไม่มีช่อดอกย่อย ใบประดับส่วนบน (coma bract) นี้มีลักษณะทางด้านรูปร่างหรือสีแตกต่างจากใบระดับปกติ โดยส่วนใหญ่นั้นโคนใบประดับส่วนบนจะไม่เชื่อมติดกัน ช่อดอกย่อยแต่ละช่อมีดอก 2-7 ดอก ซึ่งไม่มีก้านดอก

ผลและเมล็ด ภายหลังการปฏิสนธิแล้ว รังไข่ซึ่งมีไข่อ่อนอยู่ 25 -150 ใบ ตามชนิดของพืชจะขยายขนาดขึ้น โดยเริ่มต้นนั้นผลจะมีรูปหน้าตัดเป็นเหลี่ยม 3 เหลี่ยม เนื่องจากรังไข่เกิดจากผนังรังไข่ 3 อัน เชื่อมติดกัน เมื่อผลพัฒนาเต็มที่จะเห็นเป็นลักษณะ 3 พู อย่างเด่นชัด ภายในแต่ละพูจะเป็นที่อยู่ของเมล็ด มีความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ที่ปลายแหลมของแต่ละเมล็ดนั้นมีเยื่อบางสีขาวรูปหลายแฉกติดอยู่เพื่อช่วยให้เมล็ดลอยน้ำเหมาะต่อการกระจายพันธุ์ในช่วง ฤดูฝน

ราก เป็นระบบรากฝอยรากส่วนหนึ่งมีปลายที่บวมพองออกมีลักษณะเป็นตุ้มทำหน้าที่เก็บสะสมน้ำและอาหาร ไม่สามารถตัดไปขยายพันธุ์ได้ ปกติตุ้มรากนี้จะเกิดขึ้นเป็นปริมาณมากเมื่อต้นมีความสมบูรณ์เต็มที่ ดังนั้นจำนวนตุ้มรากจึงถูกนำมาใช้กำหนดคุณภาพหัวพันธุ์

ความหลากหลายของลักษณะต่าง ๆ ที่อยู่ในพืชสกุลขมิ้น ทำให้นักพฤกษศาสตร์ได้แบ่งพืชสกุลนี้ ออกเป็น 2 สกุลย่อย ตามลักษณะของใบประดับ ช่อดอก และอับเรณู แต่ในที่นี้จะยึดลักษณะสีของปากดังนี้

1. สกุลย่อย Eucurcuma หรือกลุ่มกระเจียว มีลักษณะเด่น คือ ไม่มีสีกลุ่มม่วงแดงซึ่งเกิดจากสีของกลุ่ม แอนโทไซยานิน ที่ปากกลีบสเตมิโนด ปากมักมีสีขาวหรือเหลือง พืชในกลุ่มกระเจียวนี้มีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกัน แต่มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 21 ตัวอย่างพืชสกุลนี้ ได้แก่ ฉัตรทิพย์ ฉัตรทอง อุษา พลอยชมพู และพลอยทักษิณ เป็นต้น

2. สกุลย่อย Paracurcuma หรือกลุ่มปทุมมา มีลักษณะเด่น คือ มีสีกลุ่มม่วงแดงซึ่งเกิดจากสีของกลุ่ม แอนโทไซยานินที่ปากกลีบสเตมิโนด ปากมักมีสีขาวหรือม่วง ช่อดอกเกิดจาก ตายอดหรือลำต้นเทียม พืชในกลุ่มกระเจียวนี้มีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันมาก แต่มีจำนวน

โครโมโซมพื้นฐานอยู่ในช่วง 12-18 ตัวอย่างพืชสกุลนี้ได้แก่ ปทุมมา พลอยมยุรา และเทปอักสร เป็นต้น

การขยายพันธุ์ไม้ดอกสกุลนี้ทำได้หลายวิธี คือ

1. การเพาะเมล็ด เป็นวิธีที่ต้องดำเนินการภายหลังการผสมพันธุ์จากดอกปทุมมา หลังจากดอกถ่ายละอองเรณูได้ 1-2 เดือน ควรรีบนำเมล็ดมาเพาะในกระบะบรรจุทรายผสมถ่านแกลบ อัตราส่วน 1:1 โดยให้เมล็ดจมลงในวัสดุปลูกประมาณ 0.5 -1.0 เซนติเมตร เมื่อต้นกล้ามีใบจริง 5 ใบ จึงแยกต้นกล้าไปปลูก ปกติต้นกล้าจากการเพาะเมล็ดจะใช้เวลาราว 2 ปี จึงให้ช่อดอกหรือผลิตหัวพันธุ์ได้

2. การแยกเหง้า เป็นวิธีขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ปทุมมานั้นมีเหง้าอยู่ใต้ดินในแต่ละกอนั้นจะมีเหง้าหลายเหง้าเชื่อมติดกัน เมื่อขุดเหง้าขึ้นมาแล้วจะสามารถหักหรือแยกกลุ่มของเหง้าออกจากกันเป็นเหง้าเดี่ยว ๆ ผึ่งให้แห้งแล้วจึงคลุกน้ำยาป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อราก่อนนำไปเก็บรักษาที่ร่มและเย็นต่อไป

3. การผ่าเหง้า เป็นวิธีเพิ่มชิ้นส่วนของหัวพันธุ์ให้มากขึ้น วิธีนี้เป็นการนำเหง้าที่ได้จากการแยกมาผ่าแบ่งตามยาวเป็น 2 ชิ้นเท่า ๆ กัน โดยผ่ากึ่งกลางระหว่างตาที่อยู่สองข้างของเหง้า ชิ้นเหง้าที่ได้ควรมีตาข้างที่สมบูรณ์ไม่น้อยกว่า 1 ตา และมีรากสะสมอาหารติดมาด้วยอย่างน้อย 1 ราก ป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อราโดยใช้ปูนแดงทาปิดบาดแผล

4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณต้นพืชได้มากในระยะเวลาสั้น เนื่องจากวิธีการนี้จะต้องทำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นปราศจากจุลินทรีย์จึงนิยมนำช่อดอกย่อย (coinflorescece) ซึ่งสะอาดกว่าเหง้ามาใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยนำช่อดอกย่อย (coinflorescece) ของปทุมมาที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่มี 10 mg/l BA และ 0.1 mg/l IAA เพื่อให้ช่อดอกเกิดการผันกลับเป็นต้น (Topoonyanont et al., 2004) โดยเพิ่มปริมาณเป็น 3 เท่าทุก 6 สัปดาห์ ซึ่งจะให้ต้นพืชประมาณ 500,000 ต้น ในเวลาไม่เกิน 2 ปี

โรคและการป้องกันกำจัด โรคเหง้าเน่าเป็นโรคที่ร้ายแรงที่สุดของพืชสกุลนี้ โดยโรคนี้เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* และเชื้อรา Rhizoctonia การตากดินไม่น้อยกว่า 10 วัน การใส่ปูนขาวใส่ดินก่อนปลูกช่วยลดการระบาดของโรคได้ระดับหนึ่ง หรืออาจใช้ยาปฏิชีวนะฉีดพ่น อย่างไรก็ตามวิธีการป้องกันที่ดีที่สุดคือใช้หัวพันธุ์ปลอดเชื้อและควบคุมคนเข้าบริเวณแปลงปลูก

แนวทางการพัฒนาพันธุ์ปทุมมาควรเป็นพืชหลักในการพัฒนาพืชสกุลนี้ เนื่องจากมีลักษณะดีหลายอย่าง เช่น ทรงต้นใหญ่ ชูช่อดอกเด่นสง่าเหนือทรงพุ่ม แตกกอดี แม้มีข้อเสียที่มีสีเขียวแต้มทับสีม่วงชมพูบริเวณปลายใบประดับส่วนบน ซึ่งทำให้มีลักษณะคล้ายใบเหี่ยว การปรับปรุงพันธุ์เพื่อพัฒนาพันธุ์ใหม่ให้มีลักษณะที่ดีด้านทานโรคและมีความหลากหลายของสีดอกมากขึ้นจะช่วยเพิ่มมูลค่าและคุณภาพของปทุมมาให้เป็นไม้ดอกที่สำคัญสำหรับการส่งออกในอนาคตได้มากยิ่งขึ้น ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์มีหลายวิธี และในปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เป็นวิธีการที่สามารถสร้างพืชแปลงพันธุ์ที่มีคุณสมบัติตามความต้องการได้อย่างรวดเร็ว โดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างมากคือ การส่งถ่ายยีน (genetic transformation)

การเกิดสีในพืช

โดยปกติการเกิดสีของดอกไม้ขึ้นอยู่กับรงควัตถุ ดังนี้ คือ flavonoids และ carotenoids. โดยที่รงควัตถุ carotenoid จะพบสะสมที่ chromoplasts ซึ่งกระจายอยู่ภายในไซโตพลาสซึม รงควัตถุชนิดนี้ก่อให้เกิดสีเหลือง ส้มและแดง สำหรับรงควัตถุ flavonoid พบสะสมอยู่ใน vacuole ของเซลล์และก่อให้เกิดสีแดง ม่วงและน้ำเงิน หากมีการผสมระหว่างรงควัตถุทั้งสองได้จะทำให้เกิดแถบและสีที่มีลวดลายสวยงาม

โดยปกติในพืชชั้นสูงจะมีการสังเคราะห์สารทุติยภูมิหลายชนิด เช่น Phenolics , alkaloids และ terpenoids ซึ่ง phenolics จัดเป็นสารทุติยภูมิที่พบมากที่สุด และมีส่วนประกอบเป็นวงแหวนอะโรมาติก ตัวอย่างของสารประกอบ phenolics เช่น phenols , flavonoids , tannins quinones (Kaufman et al., 1999)

flavonoids มีบทบาทสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพืช anthocyanins เป็นรงควัตถุที่จัดอยู่ในกลุ่มของ flavonoids พบในแวคิวโอลและในเนื้อเยื่อดอก และใบของพืช anthocyanin พบมากในแวคิวโอลของกลีบดอก (petal) เป็นรงควัตถุที่ทำให้เกิดสีที่แตกต่างกันในพืชผัก ผลไม้ และดอกไม้ (Martin, 1993) flavanones เป็นสารในกลุ่มของ flavonoids ที่ทำให้รสชาติของผักและผลไม้ต่างกัน (Bohm, 1998) ตัวอย่างของ flavanones เช่น naringenin พบในผลองุ่น ส้มเปรี้ยวและส้มโอ ทำให้ผลไม้เหล่านี้มีรสขม flavonols จัดอยู่ในกลุ่มของ flavonoids เช่นกันซึ่งจะช่วยดึงดูดแมลงต่าง ๆ เพื่อการถ่ายละอองเรณู และยังช่วยปกป้องอันตรายของใบจากรังสีอุลตราไวโอเลต นอกจากนี้ flavonols มีบทบาทในการสืบพันธุ์ของพิทูเนีย *(Petunia hybrida)* โดยเกี่ยวข้องกับการเจริญของละอองเรณู flavonoids ชนิดอื่น ๆ เช่น isoflavones เป็นสารประกอบที่ส่งสัญญาณระหว่างรากพืช และแบคทีเรียในดินที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้

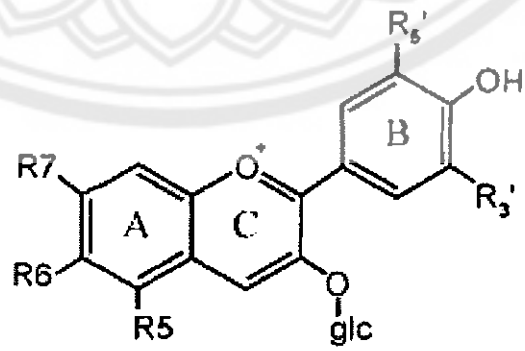
นอกจากสารทุติยภูมิจะมีประโยชน์ต่อพืชแล้วยังมีประโยชน์ต่อมนุษย์ในทางการแพทย์อีก เช่น anthocyanins มีคุณสมบัติเป็น antioxidant ซึ่งการบริโภคผักและผลไม้ที่มี anthocyanins สูง จะช่วยป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด

โครงสร้างพื้นฐานของ flavonoids และ anthocyanins

โครงสร้างพื้นฐานของ flavonoids ประกอบไปด้วยคาร์บอน 5 อะตอม (C6-C3-C6) ซึ่งมีวงแหวนอะโรมาติก 2 วง (วงแหวน A และ B) ขนาบข้างวงแหวนวงกลางซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปเฮเทอไรไซเคิล ยกเว้น chalcones และ dihydrochalcones การรวมของหมู่ไฮดรอกซิล น้ำตาล ออกซิเจน หมู่เมทธิล และอื่น ๆ ที่ตำแหน่งคาร์บอนในระหว่างปฏิกิริยาดัดแปลง ทำให้เกิด flavonoids หลายชนิด เช่น flavones (apigenin และ luteolin) , flavonols (keampferol , myricetin และ quercetin) , flavanones (hesperetin และ naringenin) , isoflavones (genistein และ daidzein)

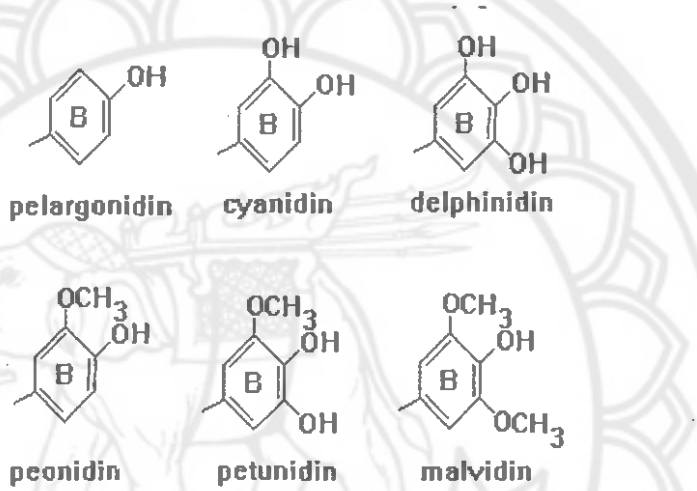
แอนโทไซยานินเป็นกลุ่มของรงควัตถุที่มีสีแดงไปจนถึงสีม่วงหรือสีน้ำเงิน (Mol et al., 1998) อยู่ในกลุ่มของ flavonoid biosynthesis pathway แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและสีไปตามค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของสารละลายในแวคิวโอลที่เปลี่ยนแปลงไป สีที่เกิดขึ้นของดอกไม้เกิดขึ้นจากกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับรงควัตถุดังกล่าว สารในกลุ่มของ anthocyanins มีประมาณ 200 หรือมากกว่า 200 ชนิด (Liew et al., 1998)

โครงสร้างทางเคมีของรงควัตถุแอนโทไซยานินที่สำคัญคือ flavan nucleus ซึ่งประกอบด้วย 3 ring คือ A-ring , B –ring , C-ring ดังภาพที่ 1



ภาพ 1 flavan nucleus **เป็นหน่วยพื้นฐานของรงควัตถุแอนโทไซยานิน** (Gross, 1987)

รงควัตถุแอนโทไซยานินจะมี flavan nucleus เป็นโครงสร้างหลัก แต่จะแตกต่างกันไปบ้างขึ้นอยู่กับ side chain ของ ring โดยเฉพาะตรงตำแหน่งของ B-ring ซึ่งเป็น ring ที่มี functional group ต่าง ๆ มาเกาะทำให้เกิดชนิดของแอนโทไซยานินที่แตกต่างกันไป สามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ pelargonidin (ส้ม-แดง) cyanidin (แดง) peonidin (แดง - แดงเข้ม) delphinidin (ม่วงอ่อน - น้ำเงิน) petunidin (ม่วง -น้ำเงิน) และ malvidin (ม่วง) (Aida et al.,2000) แต่ละกลุ่มมีโครงสร้างที่ B-ring ต่างกันดังภาพที่ 2



ภาพ 2 สูตรโครงสร้างของรงควัตถุแอนโทไซยานินทั้ง 6 กลุ่ม (Gross, 1987)

ปัจจัยที่มีผลเกี่ยวข้องกับการกำหนดสี

ในการเกิดสีมีปัจจัยหลัก ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง (pH) ใน vacuole โดยที่หากสภาพภายในเซลล์เป็นกรดสูง แอนโทไซยานินจะอยู่ในโครงสร้างที่ไม่เสถียรและไม่เกิดการแสดงออกของสี การเกาะรวมกันเองของแอนโทไซยานิน หรือการแสดงออกของสีร่วมกันกับรงควัตถุชนิดอื่น (co-pigmentation) จะช่วยเพิ่มความเสถียรและความเข้มของสีให้แก่ แอนโทไซยานิน (Mol et al., 1998) เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีระดับโมเลกุลระหว่างแอนโทไซยานิน และ co-pigment จะเสริมกันให้ปรากฏเห็นเป็นสีได้

โดยทั่วไปดอกไม้สีแดงจะมีรงควัตถุแอนโทไซยานิน ชนิดที่เรียกว่า cyanidine ส่วนดอกไม้สีน้ำเงินจะมี delphinidin แต่ดอกไม้ที่มีรงควัตถุแอนโทไซยานินเดียวกัน แต่มีสีแตกต่างกันเกิดเนื่องจากความแตกต่างของ pH ภายในเซลล์ หาก pH ในเซลล์เป็นด่างมากสีที่เกิดระหว่างการรวมตัวของแอนโทไซยานินกับ co-pigment จะให้สีน้ำเงิน (โดยที่ pH ในดินจะมีผลกระทบน้อย

มากต่อระดับ pH ในเซลล์ของดอกไม้) แสดงว่า ระดับ pH ในเซลล์ของดอกไม้จะต้องมีการควบคุมอยู่ให้คงที่ตลอดเวลา เพื่อไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีได้ง่าย (Harborne & Williams, 1992)

แอนโทไซยานิน จะเป็นสีแดงที่มีเสถียรภาพที่ pH ต่ำ แต่ที่ pH สูงขึ้นหรือความเป็นกรดน้อยลงจะเป็นสีน้ำเงิน แต่จะไม่ค่อยเสถียร ซึ่งสารประกอบระหว่างแอนโทไซยานินกับโลหะมีผลในการเพิ่มความเสถียรของโครงสร้างแอนโทไซยานิน และความคงตัวของสีดอกไม้ โดยเฉพาะต่อสีน้ำเงิน ซึ่งหน้าที่ที่สำคัญของแอนโทไซยานิน ในดอกไม้เพื่อการล่อให้เกิดการผสมเกสร นอกจากนั้นทั้ง flavoniod และ รงควัตถุแอนโทไซยานิน มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อphotoprotection, reproduction, pathogenesis and symbiosis อีกด้วย

นอกจากนั้นการสะสมของสารกลุ่มเม็ดสีในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ในบริเวณส่วนต่าง ๆ ของพืช จะมีผลต่อการให้สีที่แตกต่างกันออกไป สารกลุ่มเม็ดสี ได้แก่ flavonoids ซึ่งรวมถึง anthocyanin, carotenoid และ betalain สารประกอบสองกลุ่มแรกจะพบอยู่ทั่วไป ส่วน betalain จะพบเฉพาะใน Caryphyllales, Amaranthus และบีท และไม่พบเม็ดสีนี้อยู่รวมกับ anthocyanins อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ ก็ส่งผลต่อการมองเห็นสีของดอกไม้เช่นกัน การรวมไอออนของธาตุโลหะและเม็ดสีร่วม เช่น flavonol และ flavones จะมีผลต่อการเปลี่ยนสีของแอนโทไซยานิน โดยจะทำให้เกิดการสะสมเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความเสถียร และส่งผลให้สีดูดกลืนแสงได้ดีขึ้นจึงเป็นการเพิ่มความเข้มสี นอกจากนี้ค่าพีเอชในแวคิวโอลมีผลในการกำหนดเฉดสีของดอกไม้ด้วย ในพืชหลายชนิดพบว่าดอกไม้เมื่ออายุมากขึ้น จะมีค่าpHสูงขึ้น และส่งผลให้เกิดสีโทนฟ้าเพิ่มขึ้น โดยที่ปริมาณเม็ดสีไม่เปลี่ยนแปลง จะเห็นได้ว่าปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมค่าพีเอชในแวคิวโอลนั้น มีทั้งปัจจัยทางพันธุกรรม รูปร่างของเซลล์ในชั้นเอพิเดอร์มิสซึ่งสะสม athocyanins นั้นก็มีผลต่อการแสดงออกของสีกลีบดอกของ *Antirrhinum majus* ในต้นปกติพบว่าเซลล์เอพิเดอร์มิสชั้นใน มีลักษณะเป็นรูปกรวย ซึ่งจะดูดกลืนแสงได้ดีกว่าเซลล์แบนราบในต้นพืชกลายพันธุ์ (Harborne & Williams, 1992)

ชีวสังเคราะห์ flavonoids และ anthocyanins

ชีวสังเคราะห์ flavonoids และ anthocyanins สรุปได้ดังภาพที่ 3 คือ ขั้นตอนแรกที่เข้าสู่ชีวสังเคราะห์ flavonoids เกิดจากการกระตุ้นให้รวมตัวกันของ molonyl CoA 3 โมเลกุล และ p – coumaroyl CoA 1 โมเลกุล โดยใช้เอนไซม์ chalcone synthase (CHS) ให้ผลผลิตเป็น naringenin chalcone ซึ่งมีสีเหลือง ขั้นที่สองเป็นการทำ isomerization ของ chalcone โดยเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) ให้ผลผลิตเป็น naringenin flavanone ที่ปราศจากสี หลังจากนั้นจะมีการเติมหมู่ ไฮดรอกซี่ (OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 โดยเอนไซม์ flavanone

3 – hydroxylase (F3H) ให้สารกลุ่ม dihydroflavonol คือ dihydrokaempferol (DHK) สารประกอบนี้อาจได้รับการเติมหมู่ไฮดรอกซี่ ที่ตำแหน่งต่าง ๆ เพิ่มเติม โดยเอนไซม์ flavonoid 3' – hydroxylase (F3' H) และ flavonoid 3',5' – hydroxylase (F3' 5'H) และให้สารประกอบกลุ่ม dihydroflavonol ชนิดอื่นเพิ่มเติม ได้แก่ dihydroquercetin (DHQ) และ dihydroquercetin (DHM) จำนวนหมู่ไฮดรอคซี่บนวง B นี้มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเม็ดสีที่แตกต่างกัน สารกลุ่ม dihydroflavonol ต้องการเอนไซม์อย่างน้อย 3 ขั้นตอน สำหรับเปลี่ยนเป็นสารมีสีกลุ่ม anthocyanins เริ่มจากการกระตุ้นการรีดิวซ์สารประกอบกลุ่ม dihydroflavonol ด้วยเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) และให้สารกลุ่ม leucoanthocyanidin ได้แก่ leucocyanidin, leucodelphinidin และ leucopelargonidin ซึ่งจะถูก oxidation, dehydration และ glycosylation ให้สารกลุ่ม anthocyanin ซึ่งให้เม็ดสีแตกต่างกัน เช่น สีแดงของ cyanidin สีน้ำเงินของ delphinidin สีส้มของ pelargonidin นอกจากนี้อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยาต่างๆ เพิ่มเติม เช่น glycosylation , methylation และ acylation และให้เม็ดสี anthocyanin ที่จำเพาะในพืชแต่ละชนิด

สีของดอกไม้จัดว่ามีความสำคัญต่อลักษณะของไม้ดอก การสร้างสายพันธุ์ใหม่ที่ได้สีดอกใหม่เป็นเป้าหมายของนักปรับปรุงไม้ดอก จากการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกลไกของการสังเคราะห์รงควัตถุได้ สามารถที่จะคัดเลือกพันธุ์ที่มีสีที่ต้องการได้ (Aida et al., 2000) เป็นระยะเวลายาวนานที่บรรดานักคัดพันธุ์ไม้ดอกได้พยายามคัดเลือกพันธุ์ไม้ดอกที่มีลักษณะที่ดีที่สุด แต่ก็ยังไม่ได้สายพันธุ์ที่มีสีตามที่ต้องการทุกประการ เนื่องมาจากข้อจำกัดใน gene pool ของพืชชนิดนั้น ๆ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับรงควัตถุนั้น ๆ ไม่ปรากฏในพืชชนิดนั้น อาทิ เช่น anthocyanin แม้พบมากมายในไม้ดอกหลายชนิด แต่สีน้ำเงินเป็นรงควัตถุที่ไม่สามารถพบได้ในไม้ดอกหลายชนิด เช่น กุหลาบ คาร์เนชั่น ทิวลิป และ เบญจมาศ การค้นหาดอกไม้สีน้ำเงินเป็นเป้าหมายหลักที่สำคัญของนักคัดพันธุ์ไม้ดอก (Shimada et al ., 2001)

ใน pathway ของการสังเคราะห์ anthocyanin (ภาพที่ 3) มีเอนไซม์หลายตัวที่เกี่ยวข้อง โดยเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ chalcone synthase (CHS) , chalcone-flavanone isomerase (CHI) , flavanone 3-hydroxylase (F3H) ; flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) ; flavonoid 3' , 5'-hydroxylase (F3' 5'H) และ dihydroflavonol-4-reductase (DFR) เอนไซม์ Flavoniod 3-hydroxylase (F3'H) และ flavoniod 3'-5' hydroxylase ตามลำดับ โดยที่เอนไซม์ทั้ง 2 ตัวเป็นสมาชิกของวงศ์ cytochrome P-450 (Holton et al., 1996) ทั้งคู่จัดเป็น key enzymes ที่เกี่ยวกับกระบวนการ hydroxylation ของ B-ring ของ dihydroflavonols และ

กระบวนการ hydroxylation เป็นกุญแจในการกำหนดโครงสร้างให้เกิด anthocyanin ชนิดต่าง ๆ นอกจากนั้นยังมีเอนไซม์ที่สำคัญ เช่น dihydroflavonols 4-reductase (DFR), anthocyanidin synthase (ANS) , flavonone synthase (FLS) , flavone synthase (FNS) โดยเฉพาะ DFR เป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่ทำให้เกิด pelargonidin , cyanidin และ delphininin ได้ซึ่งทั้ง 3 ชนิดเป็นรงควัตถุที่ทำให้เกิดสีแตกต่างกันไป (Holton et al., 1996)

Dihydroflavonol 4-Reductase gene (*DFR* gene)

ปัจจุบันยีนที่เข้ารหัสการสังเคราะห์เอนไซม์เหล่านี้ถูกค้นพบแล้วในพืชหลายชนิด (Holton et al., 1995) รวมทั้งมีรายงานถึงการประยุกต์ใช้ในการเปลี่ยนแปลงสีดอกไม้โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมด้วย ในการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ anthocyanin นั้นมีรายงานการใช้วิธีการต่าง ๆ ที่ประสบผลสำเร็จ ในการค้นพบยีนดังกล่าวได้เป็นจำนวนมาก เช่น การใช้ homologous gene สามารถค้นหาโดยวิธี hybridization วิธีการเช่นนี้สามารถค้นหายีนที่ค่อนข้าง conserved เช่น *CHS* นอกจากนั้นยังมีรายงานการใช้ PCR โดยเลือกออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณ conserved region บนสายลำดับกรดอะมิโนมาใช้เป็น primers ในการสังเคราะห์ cDNA ของ *DFR* พบยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ DFR จากเนื้อส่วนดอกของกล้วยไม้ *Bromheadia finlaysoniana* โดยการใช้ homologous probe และพบว่ายีนจะแสดงออกเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อที่เป็นที่ม่วง (Liew et al.,1998) นอกจากนั้นพบว่ายีนที่สังเคราะห์ DFR ที่ได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น บาร์เล่ย์ ข้าวสาลี ข้าวโพด หรือกล้วยไม้จะมีความคล้ายกันกับยีน DFR จากพืชใบเลี้ยงคู่ Ueyama et al. (2002) รายงานการพบ flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) , flavonoid 3' , 5' - hydroxylase (F3' 5'H) และ flavone synthase II (FNSII) จากสร้อยมยุรา โดยที่การสะสม anthocyanin หรือ flavonol เกิดจากหน้าที่ของเอนไซม์แต่ละตัวที่จะทำงานควบคุมซึ่งกันและกัน

ในแง่การประยุกต์ใช้ ซึ่งมีรายงานการเปลี่ยนสีดอกไม้โดยวิธีการส่งถ่ายยีนสังเคราะห์เอนไซม์สำหรับ anthocyanin เข้าสู่พืชดอกหลายชนิด เช่น กุหลาบ คาร์เนชั่น ทิวลิป โดยสามารถเปลี่ยนสีได้สายพันธุ์ใหม่มากมาย โดยวิธีทั้ง Sense and Antisense เพื่อที่จะ ยับยั้ง (inactivate) ยีนที่มีอยู่แล้วในเซลล์พืช อาทิเช่น การส่งถ่ายยีนเพื่อไป suppression ยีน Chlacone synthase (*CHS*) หรือ dihydroflavonol-4-reductase (*DFR*) ซึ่งทั้งคู่เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุ โดยการส่งยีน *CHS* แบบ Antisense ทำให้ยับยั้งการเกิดสีในพิทูเนียและยาสูบ (Van der Krol et al., 1988) โดยที่ Antisense *DFR* gene ทำให้ปริมาณรงควัตถุลดลงใน พิทูเนีย (Van der Krol et al., 1988) หรือการส่งถ่าย Antisense *DFR* gene

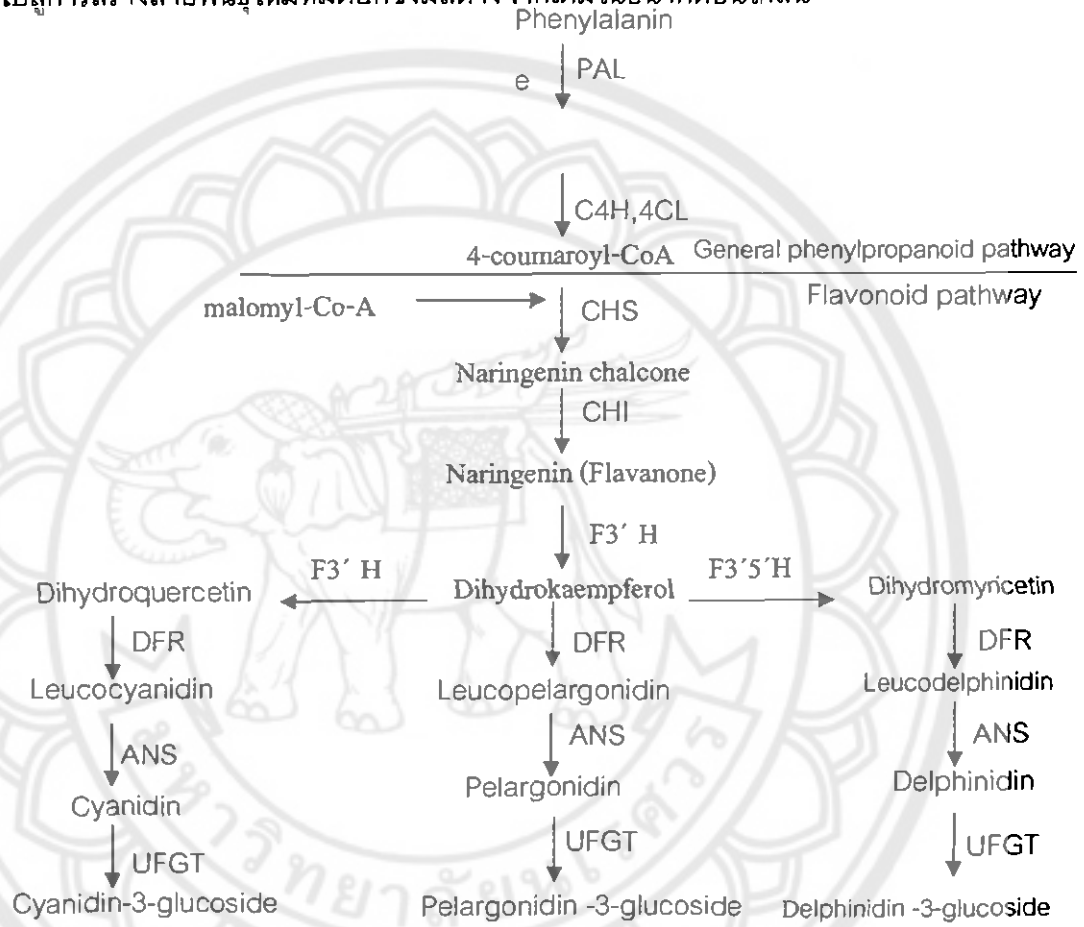
เข้าสู่เยอบีราสามารถเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีชมพู (Elomaa et al., 1996) และสำหรับพืช lisianthus พบว่าเกิดการเปลี่ยนสีจากม่วงไปเป็นขาว

ประโยชน์ของยีน *DFR* (Dihydroflavonol 4-Reductase gene) ในด้านการเปลี่ยนสีของดอกไม้จากรายงานการทำให้เกิด flavonoids ชนิดใหม่ขึ้น โดยนำ *DFR* gene ของข้าวโพดหรือ full length *DFR* gene ของเยอบีร่า ส่งถ่ายเข้าสู่พิทูเนียทำให้พิทูเนียสามารถสังเคราะห์ pelargonidin ซึ่งปกติไม่สามารถสังเคราะห์ได้และทำให้พิทูเนียมีดอกสีส้ม (Elomaa et al., 1996) ในดอกของ *Forsythia intermedia* ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อส่งถ่าย Sense *DFR gene* จาก antirrhinum ทำให้ดอก *Forsythia intermedia* มีสีน้ำตาลเหลือง (Rosati et al ., 2000) การเปลี่ยนสีดอก *Dianthus caryophyllus* โดยการส่งถ่าย Sense *DFR* gene จากพิทูเนีย ทำให้ดอกสีขาวของ *Dianthus caryophyllus* เปลี่ยนเป็นดอกสีม่วง (Holton, 1996) การยับยั้งขั้นตอนในกระบวนการสังเคราะห์ แอนโทไซยานินสามารถทำให้เกิดสีดอกต่างไปจากเดิมได้ เช่น การส่งถ่าย Sense *DFR gene* ทำให้ดอก *Torenia hybrida* ซึ่งมีสีน้ำเงินเปลี่ยนเป็นดอกสีขาวและมีลวดลายสีน้ำเงินปะปน (Suzuki et al., 2000) นอกจากนี้การส่งถ่าย Antisense *DFR gene* ทำให้ *Torenia hybrida* มีดอกสีน้ำเงินอ่อนและมีลวดลายของสีน้ำเงินเข้มปะปน (Aida et al., 2000)

จากการส่งถ่ายยีน *DFR* ไม่ว่าจะเป็นวิธี Sense หรือ Antisense เข้าสู่ torenia โดยวิธี *Agrobacterium*-mediated gene transfer พบการเกิดการเปลี่ยนสีแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม โดยที่กลุ่มแรกยังคงได้สีเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม โดยที่ในกลุ่มที่ 2 และ 3 ปรากฏว่าสีในส่วนของดอกจะจางลง นอกจากนั้นยังได้รูปแบบการเกิดสีที่แตกต่างไปจากเดิมอีกด้วย (Aida et al ., 2000) โดยเฉพาะการไป inactivate ยีนที่สังเคราะห์ DFR ทำให้เกิดการสะสมของ flavone สูง ส่งผลให้ดอกมีสีใกล้กับสีน้ำเงินมากขึ้น และ Suzuki et al., (2000) รายงานเพิ่มเติมว่าการเกิดสีขาวในส่วนกลีบดอกของ Torenia ทำให้เกิดได้โดยกระบวนการ Sense suppression ของยีน *DFR*

สำหรับการส่งถ่ายยีน Flavonol 3-5 Hydroxylase (*F3' 5'H*) เข้าสู่เนื้อเยื่อพิทูเนียภายใต้การควบคุม 35S promoter โดยวิธี Sense เข้าพิทูเนีย สามารถเพิ่มสีแดงของพิทูเนียมากขึ้นโดยเปลี่ยนเป็นสี magenta อีกทั้ง transgenic plants บางต้นจะให้แบบของสีที่ไม่เหมือนของเดิม เช่น star-shaped pattern เป็นต้น หากส่ง Antisense ของยีน *F3' 5'H* เข้าต้นสีน้ำเงินพบว่าทำให้ลดจากน้ำเงินเข้มเป็นสีน้ำเงินอ่อน หรือเปลี่ยนเป็นสีชมพู แสดงว่ายีน *F3' 5'H* นั้นเป็นตัวควบคุมหรือสวิทช์การเปิดปิดในกระบวนการสังเคราะห์ *F3' 5'H* (Shimada et al., 2001)

จะเห็นได้ว่ามีรายงานถึงการการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยเฉพาะการเปลี่ยนสีของดอกไม้ด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรมได้โดยตรง ดังนั้นในการทดลองนี้มีเป้าหมายเพื่อต้องการที่จะค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุ anthocyanin ที่สำคัญ ได้แก่ *F3'H* และ *DFR* จากปทุมมา เพื่อนำไปสู่การสร้างสายพันธุ์ใหม่ที่มีดอกซึ่งมีสีต่างจากเดิมในอนาคตอันใกล้นี้



ภาพ 3 กระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Jaakola et al., 2002)

กระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Anthocyanin synthesis pathway) เอนไซม์เกี่ยวข้องในกลไก ได้แก่ PAL , phenylalanine ammonialyase ; C4H , cinnamate – 4 – hydroxylase ; 4CL , 4-coumaryl-CoA ligase ; CHS , chalcone synthase , CHI , chalcone-flavanone isomerase , F3H , flavanone 3-hydroxylase ; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase ; F3'5'H, flavonoid 3', 5'-hydroxylase;DFR, dihydrolavonol-4-reductase;ANS, anthocyanidin synthase; 3GT, UDPG-flavonoid-3-Oglucosyltransferase; 3RT, anthocyanidin-3-glucoside rhamnosyltransferase ; FS , flavone synthase ; flavonol synthase.

การส่งถ่ายยีนเข้าสู่สิ่งมีชีวิต (genetic transformation)

การส่งถ่ายยีนเข้าสู่สิ่งมีชีวิต (genetic transformation) เทคนิคการส่งถ่ายยีนเป็นการส่งถ่ายสารพันธุกรรม (nucleic acid) ผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์ (cell wall) เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear envelope) โดยมีผลต่อการมีชีวิต (viability) ของเซลล์น้อยที่สุด การส่งถ่ายสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์พืชนั้นมีวัตถุประสงค์ในหลาย ๆ ด้าน เช่น ใช้ในการวิเคราะห์การควบคุมการแสดงออกของยีน (gene regulation) รวมทั้งศึกษาหน้าที่และการทำงานของยีนนั้น ๆ และใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไป เป็นต้น เทคนิคการส่งถ่ายยีนมีด้วยกันหลายวิธี และมีการค้นคว้า วิจัยถึงวิธีการ ปัจจัย ที่เกี่ยวข้องและมีการพัฒนาเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้อง เพื่อวัตถุประสงค์ ในการปรับปรุงพันธุ์หรือเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของพืชโดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

1. การส่งถ่ายยีนโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลง Permeability ของเซลล์

1.1 การเชื่อมเซลล์

เป็นการใช้ประโยชน์จากเทคโนโลยีโปรโตพลาสต์ โดยการรวมกันของโปรโตพลาสต์เพื่อให้เกิด somatic hybrid ซึ่งเป็นแหล่งของความแปรปรวนทางพันธุกรรม เช่นลักษณะการเป็นหมัน ความต้านทานโรค ศัตรูพืช สารปราบวัชพืช และทนต่อสภาพแวดล้อม เป็นต้น การผสมโปรโตพลาสต์ มีข้อดีคือสามารถผสมได้ระหว่างพืชคนละชนิด (interspecific hybrids) จนถึงพืชคนละสกุล (intergeneric hybrids)

1.2 การกระตุ้นด้วยไฟฟ้า

เป็นวิธีการกระตุ้นเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้า (electric field) ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความสามารถยอมให้ดีเอ็นเอจากภายนอกเข้าภายในเซลล์ได้ โดยนำโปรโตพลาสมาบ่มรวมกับสารละลายดีเอ็นเอ แล้วอาศัยความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงมาก (high–voltage electric field) กระแสไฟฟ้าที่ใช้มี 2 ระบบ คือ ระบบที่ใช้ความแรงของกระแสต่ำ ระยะเวลานาน (long pulse) และระบบที่ใช้ความแรงของประแสไฟฟ้าสูงกว่าแต่ใช้เวลาสั้น (short pulse) (สุรินทร์, 2539) การส่งถ่ายยีนด้วยวิธีใช้กระแสไฟฟ้าเกิดขึ้นกับเซลล์พืชครั้งแรกโดยมีรายงานถึงการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่โปรโตพลาสข้าวโพดพันธุ์ BMS, Black Mexican sweet แต่ยังไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ (อารีย์, 2541)

1.3 การใช้สารเคมี (chemical - mediated transfer)

วิธีนี้นิยมใช้เพื่อการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ เพราะว่าโอกาสที่ดีเอ็นเอจะเข้าไปในเซลล์มีมาก วิธีการนี้จะนำโปรโตพลาสต์ ผสมกับดีเอ็นเอ โดยจะมีสารเคมี เช่น PEG , poly-L-ornithineหรือแคลเซี่ยมเป็นตัวกระตุ้นให้พลาสมิดเข้าไปในโปรโตพลาสต์ได้ดีขึ้นเทคโนโลยีนี้ ได้รับการพัฒนาขึ้นมาตั้งแต่ปี ค.ศ.1980 เป็นต้นมา ได้มีการพยายามถ่ายทอดยีนเข้าพืชหลายชนิดและ

เพิ่มประสิทธิภาพได้ดีขึ้น โดยการปรับสภาพหลายอย่างให้เหมาะสม เช่น องค์ประกอบของสารละลายที่ใช้ ช่วงระยะเวลาการบ่ม ชนิดและประมาณของดีเอ็นเอที่ใช้ เป็นต้น แต่วิธีการนี้มีข้อจำกัดในเรื่องการชักนำให้โปรโตพลาสต์ที่ได้รับยีนเกิดเป็นแคลลัสและแคลลัสเกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ยังทำได้ยากในพืชหลายชนิด (อารีย์, 2541)

2. การส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์โดยตรง

2.1 Microinjection

วิธีการนี้เป็นกระบวนการการถ่ายยีนโดยฉีดสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์พืชโดยตรงด้วยอุปกรณ์เป็นหลอดแก้วขนาดเล็กมาก (microcapillary tube) วิธีนี้โปรโตพลาสต์ของพืชจะต้องอยู่ในสภาพเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง จึงจะทำให้ฉีดดีเอ็นเอเข้าไปได้สะดวก หรือสามารถฉีดดีเอ็นเอเข้าไปใน zygotic หรือ microspore-derived embryos เทคนิค microinjection วิธีนี้มีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนโดยไม่ต้องมีการคัดเลือกถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Saito et al., 1995) แต่มีข้อเสียที่เป็นวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยาก ใช้ทักษะความชำนาญอย่างสูงในการดำเนินการ และใช้เวลาทำแต่ละครั้งค่อนข้างนานในการส่งถ่ายยีนแต่ละเซลล์

2.2 การใช้เครื่องยิงอนุภาค (microprojectile bombardment)

วิธีนี้เป็นวิธีการส่งถ่ายยีนหรือดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์พืชโดยตรง (direct gene transfer) ใช้ความดันของก๊าซเร่งให้อนุภาคของทองหรือทังสเตนที่เคลือบด้วยสารพันธุกรรมที่ต้องการส่งถ่ายอยู่ให้มีความเร็วมากพอที่จะเข้าสู่เซลล์พืช วิธีนี้ทำได้ง่ายกว่า Microinjection เพราะครั้งหนึ่งสามารถยิงอนุภาคเข้าไปได้เป็นพัน ๆ อนุภาค ใช้กับเซลล์ที่มีผนังเซลล์ได้โดยไม่ต้องผ่านโปรโตพลาส ชิ้นส่วนของพืชที่จะนำมาใช้ส่งถ่ายยีนเข้าไปมีได้หลายชนิด พืชแต่ละชนิดก็มีเนื้อเยื่อที่เหมาะสมแตกต่างกัน เช่น อาจใช้ชิ้นส่วนของใบ (leaf disk), zygote, immature embryo, somatic embryo, callus หรือ shoot tip เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชในระดับออร์แกเนลล์ได้ เช่น การส่งถ่ายยีนเข้าไมโตคอนเดรีย หรือคลอโรพลาสต์ ซึ่งการส่งถ่ายยีนด้วยวิธีนี้ได้มีการทดลองส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชชนิดต่าง ๆ ได้เป็นผลสำเร็จโดยเฉพาะพวกพืชในเลี้ยงเดี่ยวซึ่งไม่ใช่พืชอาศัยของแบคทีเรีย *Agrobacterium* เช่นจากการศึกษาของ Koprek et al. (1996) ศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนโดย particle bombardment โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ส่งถ่ายยีนรายงานผลเข้าสู่ข้าวบาเลย์ (barley) Li et al. (1993) และ Christou (1997) ศึกษาการส่งถ่ายยีนโดยวิธี Particle gun bombardment เข้าสู่เนื้อเยื่อของข้าวเป็นผลสำเร็จ และในปีเดียวกัน Chen et al. (1998) ได้ศึกษาหาขั้นตอนวิธีการส่งถ่าย (protocol) ยีน *hph* เข้าสู่ข้าวเช่นกัน ต่อมาในปี 1999 Tang et al. ส่งถ่ายยีนที่ต้านทานต่อ bacterial blight และ ต้านทานต่อ

แมลงศัตรู sap-sucking insect pests นอกจากข้าวก็ได้มีการศึกษาในพืชชนิดอื่น Koprek et al. (1996) ศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนโดย particle bombardment ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ส่งถ่ายยีนรายงานผลเข้าสู่ข้าวบาเลย์ (barley) ต่อมา Brettschneider, Becker, & Łorz. (1997) ศึกษาประสิทธิภาพในการส่งถ่ายพลาสมิดที่มียีนรายงานผลเข้าสู่ข้าวโพด โดยศึกษาถึงสภาวะในการส่งถ่ายและผลของการบ่มเนื้อเยื่อก่อนและหลังการบอมบาร์ด และในปีต่อมา Wated et al. (1998) ศึกษาการส่งถ่ายยีน *pat* และยีน *uid*A เข้าสู่ *Lilium longiflorum* ได้สำเร็จ นอกจากพืชดอกพวก Liliaceae แล้ว Yang et al. (1999) ศึกษาการส่งถ่ายยีน *npt*II และยีน *GUS* เข้าสู่กล้วยไม้พวก *Cymbidium* ได้เป็นผลสำเร็จ

2.3 การส่งถ่ายยีนโดยอาศัยแบคทีเรีย (Agrobacterium - mediated gene transformation)

Agrobacterium เป็นแบคทีเรียแกรมลบซึ่งอาศัยอยู่ในดิน สามารถบุกรุก (infection) เข้าสู่ต้นพืชได้บริเวณที่มีบาดแผล ทำให้เกิดปุ่มปม (tumour) หรือก้อนเนื้อตรงจุดนั้น เรียกว่า crown gall disease (Weising and Kahl, 1996)

เมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นปุ่มปมนั้นมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ จะสามารถคงสภาพเช่นเดิมอยู่ได้ คือ เจริญเติบโตได้เร็วและโตได้ไม่จำกัดในสภาพแคลลัส โดยไม่ต้องใส่ฮอร์โมนพืชหรือสารเร่งการเจริญเติบโตชนิดใด แม้ว่าจะกำจัดแบคทีเรียออกไปแล้วก็ตาม แต่จะไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ กลไกที่ทำให้เกิดสภาพเช่นนี้ พบว่ามีสาเหตุมาจากพลาสมิดขนาดใหญ่ประมาณ 140 - 235 กิโลเบสที่พบใน *Agrobacterium* จึงเรียก พลาสมิดนี้ว่า พลาสมิด Ti (tumour inducing plasmid)

เชื้อ *Agrobacterium* อีกชนิดหนึ่งทำให้เกิดราก ณ บริเวณที่มีการบุกรุก (infection) ของแบคมีเรียคือ *A. rhizogenes* ซึ่งมีพลาสมิด Ri (root inducing plasmid) เนื้อเยื่อปุ่มปมที่เกิดจากการบุกรุกของ *A.tumefaciens* จะมีดีเอ็นเอบางส่วนของพลาสมิดTiขนาดประมาณ20 กิโลเบส ถูกส่งถ่ายเข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืชที่บุกรุก เรียกดีเอ็นเอที่ถูกส่งถ่ายนี้ว่า T-DNA (transferred DNA)

พลาสมิด Ti ที่พบมาก ได้แก่ ชนิด Octopine และ Nopaline เป็นต้น และจะประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ที่มีส่วนของ virulence (*vir*) gene ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการส่งถ่าย T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช ภายในส่วน T-DNA มียีนกำหนดการสร้างสาร opine เช่น nopaline synthase (*nos*), octopine synthase (*ocs*), agroclinoline synthase (*acs*) และ agropine synthase (*ags*) ส่วนอื่น ๆ ภายใน Ti - plasmid ได้แก่ จุดเริ่มต้นการจำลองโมเลกุล *(ORI)* ส่วนที่

ควบคุมการส่งถ่าย พลามิดโดยวิธี conjugation ยีนที่กำหนดให้เซลล์แบคทีเรียสามารถใช้สารพวก opine เป็นแหล่งพลังงาน เมื่อแบคทีเรียส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชแล้ว เซลล์ของพืชบริเวณที่ถูกบุกรุกจึงสามารถสร้างสาร opine ขึ้นได้ตามชนิดของพลาสมิด Ti นั้น ส่วน *Agrobacterium* ก็สามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้สาร opine ที่พืชสร้างขึ้นเป็นแหล่งพลังงานได้ และเมื่อกำจัดแบคทีเรียออกไป พืชยังคงสังเคราะห์สาร opine ได้ เนื่องจาก T-DNA ถูกส่งเข้าไปอยู่ในเซลล์พืชอย่างถาวรแล้ว

ในส่วนของ T-DNA นอกจากจะมียีนที่กำหนดการสังเคราะห์สาร opine แล้ว ยังมียีนที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนพืช (phytohormone) พวกออกซินและไซโตไคนินด้วย เป็นเหตุให้เซลล์พืชที่ได้รับ T-DNA มีการเจริญเติบโตแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วและไม่จำกัด ทำให้เกิดเป็นก้อนเนื้อเยื่อปุ่มปมที่ไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดหรือรากได้ ยีนที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนพืชที่พบคือ trytophan monooxygenase (*tms1*), indoleacetamide hydrolase (*tms2*) และ isopentenyl transferase (*tmr*) โดยพบว่ายีน *tms1*และ *tms2* กำหนดการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสาร trytophan เป็น indoleacetamide และเปลี่ยนต่อไปเป็น indoleacetic acid (IAA) ซึ่งเป็นสารพวกออกซิน ส่วนยีน *tmr* เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สร้าง isopentenyl adenosine (IPA) ซึ่งเป็นสารพวกไซโตไคนิน

ขอบเขตของ T-DNA ที่จะส่งถ่ายไปยังเซลล์พืชจะควบคุมและกำหนดโดยลำดับเบสซ้ำ ๆ (terminal repeat) 25 คู่เบส จะมีอยู่ทั้ง 2 ข้างของ T-DNA เรียก left border(LB)และ right border(RB)

การส่งถ่ายยีนโดย *Agrobacterium* ซึ่งเป็นเทคนิควิธีการที่อาศัยธรรมชาติของแบคทีเรียโรคพืชที่มีชื่อว่า *A. tumefaciens* ช่วยในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืช หลักการถ่ายทอดยีนโดยวิธีนี้คือนำเนื้อเยื่อของพืชมาทำให้เกิดรอยแผล แล้วเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย จากนั้นกำจัดแบคทีเรียด้วยยาปฏิชีวนะ ก่อนที่จะนำชิ้นส่วนของพืชไปเลี้ยงคัดเลือกในอาหาร เซลล์ที่ได้รับการถ่ายทอดยีนจะเจริญเติบโตได้แล้วนำไปชักนำให้เกิดเป็นต้น เพื่อตรวจสอบยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง พืชชนิดแรกที่ได้รับการถ่ายทอดยีนด้วยระบบนี้คือ *Daucus carota* (อารีย์, 2541) จากนั้นนักวิจัยก็ประสบความสำเร็จในการถ่ายทอดยีนเข้าพืชอีกหลายชนิด

การถ่ายทอดยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* ได้ผลดี และมีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนสูงในพืชใบเลี้ยงคู่ ไม่ค่อยได้ผลกับพวกธัญพืช รวมถึงพวกพืชใบเลี้ยงเดี่ยวชนิดอื่นด้วย แต่อย่างไรก็ตามก็ได้มีการทดลองใช้ แบคทีเรีย *Agrobacterium* ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้เป็นผลสำเร็จแล้วในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวบางชนิด (Conner & Dommisse, 1992; Rashid

et al., 1996) โดยเฉพาะ Rashid et al. (1996) รายงานการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว indica พบว่าสามารถส่งถ่ายได้เป็นผลสำเร็จและสามารถถ่ายทอดไปส่งรุ่น T1 ได้และมีการกระจายของยีนเป็นไปตามกฎของเมนเดล ต่อมาในปี Wang et al. (1997) ปรับปรุงประสิทธิภาพและการแสดงออกของยีนที่ส่งถ่ายเข้าสู่ข้าวโดยศึกษาจากยีนเครื่องหมายที่มี intron พบว่ายีนที่มี intron มีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายสูงกว่ายีนที่ไม่มี intron ต่อมาในปี 1999 Mohanty et al. ปรับปรุงการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นโดยส่งถ่ายเข้าสู่ indica rice พันธุ์ *Pusa Basmati* 1 พบว่ามีแคลลัสที่ต้านทานต่อ hygromycin B สูงถึง 56 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวน copy ตั้งแต่ 1-4 copy และมีการกระจายตัวของยีนสู่รุ่นลูกมีทั้งที่เป็นไปตามกฎของเมนเดลและไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล

นอกจากข้าวก็พบว่ามีการศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้พวก phalaenopsis โดย Belarmino et al. (2000) โดยศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนของ *A.tumefaciens* 2 สายพันธุ์คือ LBA4404 และ EHA101 โดยส่งถ่ายยีน *GUS* พบว่า *A.: tumefaciens* ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนเท่า ๆ กัน และจากการศึกษาของ Boase *et al.* (1998) ศึกษาการส่งถ่ายยีน *GUS* เข้าสู่ Chrysanthemum พันธุ์ต่าง ๆ โดย *A. tumefaciens* 4 สายพันธุ์ ได้แก่ EHA105, LBA4404, MOG101 และ MOG301 เวคเตอร์ที่ใช้ส่งถ่ายคือ pMOG410 และ pKIWI110 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการส่งถ่าย พบว่า เบญจมาศแต่ละพันธุ์ก็เหมาะกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ที่ต่างกัน

นอกจากนี้มีรายงานถึงความสำเร็จในการส่งถ่ายยีนโดยใช้ *A.tumefaciens* โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ ตามแง่มุมที่ทำการศึกษา ดังต่อไปนี้

การศึกษาการส่งถ่ายยีนใน Dicotyledonous plants and Monocotyledonous plant พบว่า สามารถส่งถ่าย *GUS* gene โดยใช้ *A. tumefaciens* Strain (AD692, AD690 and AD691)ส่งถ่าย*GUS* geneเข้าไปใน Dicotyledonousplants(soybean) and Monocotyledonous plant (rice) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

งานวิจัยต่อมาของ Naragimhulu et al. (1996) ศึกษาการส่งถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงคู่ (tobacco)และใบเลี้ยงเดี่ยว (Maize) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับ *A.tumefaciens* พบการแสดงของ *GUS* A gene และการศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวของ Frame et al., (2002) พบว่าการส่งถ่ายยีนในข้าวโพด โดยใช้ *A. tumefaciens* strain EHA101 Containing the Standard binary vector pTE102 สามารถส่งถ่าย *GUS* gene เข้าสู่ embryos

ของข้าวโพด โดยพบการแสดงออกของ *GUS* gene ซึ่งมีประสิทธิภาพการส่งถ่าย 5.5 เปอร์เซ็นต์ และก็สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

จากความสำเร็จในการส่งถ่ายยีนข้างต้น งานวิจัยได้พัฒนาขึ้นสู่ขั้นต่อมาก็คือ การหาคำตอบที่ว่ายีนที่ส่งถ่ายเข้าไปในพืชมีความคงตัว และสามารถส่งถ่ายยีนนั้นสู่รุ่นต่อไปได้หรือไม่ Cheng et al. (1997) ได้ศึกษาการส่งถ่ายยีนใน wheat โดยใช้ *A. tumefaciens* Strain C58 (ABI) Harboring the binary vertor pMON19365 พบว่าสามารถส่งถ่ายยีนได้โดยพบการแสดงออกของ *GUS* gene และการเกิดจุดสีน้ำเงินที่ใบของข้าวสาลีและพบว่ามีการกระจายตัวของยีนสู่รุ่นลูกได้

ในงานวิจัยขั้นต่อมาก็คือการทดลองส่งถ่ายยีนอื่นที่สนใจ (นอกเหนือจาก *GUS* gene) เข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยว ซึ่งก็พบวาประสบผลสำเร็จเช่นกัน ดังรายงานการวิจัยของ Datta et al. (2000) ที่ศึกษาการส่งถ่ายยีนใน indica rice โดย *A. tumefaciens* atrain LBA4404 (pNO1) และ A281(pNO1) พบว่า *A. tumefaciens* ทั้งสองสายพันธุ์ สามารถส่งถ่าย *chitinase* gene เข้าสู่ Embrgogenic calli ของข้าวได้ และพบการแสดงออกของ *chitinase* gene จากข้าวที่พัฒนาเป็นต้นได้ จากการส่งถ่ายด้วย *A. tumefaciens* ทั้ง 2 สายพันธุ์

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยในแง่มุมอื่น ที่เกี่ยวกับการถ่ายทอดยีนเช่น การใช้ Promotor gene ชนิดอื่นนอกจาก 35S Promotor ดังรายงานการวิจัยของ Fukooka et al.(2000) ที่ศึกษาส่งถ่ายยีนในพืช Monocot and Dicot โดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่าจาก การใช้ NCR promoter จาก soybean chlorotic mottle virus (SoyCMV) สามารถส่งถ่าย *GUS* gene เข้าไปในพืช Monocot(rice) and Dicot(tobacco) ได้

การศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนของ *A. tumefaciens*

จากความสำเร็จที่ได้จากการส่งถ่ายยีน แต่ยังมีข้อจำกัดก็คือ จำนวนต้นพืชที่ส่งถ่ายสำเร็จค่อนข้างต่ำ จึงมีการวิจัยศึกษาเพิ่มเติม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายทอดยีนให้ได้ในปริมาณ และคุณภาพให้ดีขึ้น Cao et al. (1998) ศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนของ *A. tumefaciens* 2 สายพันธุ์ คือ EHA105 และ LBA4404 โดยส่งถ่าย *GUS* gene พบว่า *A. tumefaciens* strain EHA105 มีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนสูงกว่า LBA4404 อย่างมีนัยสำคัญเนื่องจาก *A. tumefaciens* strain EHA105 พัฒนาสายพันธุ์มาจาก supervirulent wild-type strain

จากรายงานของ Kurshinov et al. (1999) ศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ *Brassica rapa* โดยใช้ *A. tumefaciens* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ C58C1,EHA105 และ LBA4404 โดยใช้ vector

pGV3850 และ pAL4404 พบว่า *A. tumefaciens* ทุกสายพันธุ์ สามารถส่งถ่าย *GUS* gene เข้าสู่พืชได้ แต่ *A. tumefaciens* stain LBA4404 มีประสิทธิภาพส่งถ่ายยีนเข้าสู่ *Brassica rapa* ได้สูงสุด

นอกจากนั้น Miguel & Oliveira.(1999) ศึกษาการส่งถ่ายยีนใน *Prunus dulcis* Mill. โดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่า *A. tumefaciens* Strain LBA4404/p35GUSINT, EHA105/ p35GUSINT และ EHA105/ pFAJ3003 สามารถส่งถ่ายยีนได้ทั้งหมด แต่ *A. tumefaciens* Strain EHA105/ p35GUSINT มีประสิทธิภาพการส่งถ่ายสูงสุดเช่นเดียวกับ Garfias et al.,(1997) รายงานว่างานวิจัยของ Cleene & Ley . (1976) ที่ศึกษาการส่งถ่ายยีนในพืช amaranth (Amaranthus hypochondriacus) โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ตามธรรมชาติ ไม่ประสบผลสำเร็จ ดังนั้นจึงคัดเลือกใช้สายพันธุ์ที่เป็น oncogenic พบว่า สามารถส่งถ่าย *GUS* gene ได้ ในขณะที่ Nisha et al., (2003) ศึกษาการส่งถ่ายยีนใน *Bacopa monniera* L.โดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่า สามารถส่งถ่าย *GUS* gene ได้โดย *A.tumefaciens* Strain EHA105/ pBE2113 มีประสิทธิภาพการส่งถ่ายมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์

การใช้สารเคมีบางชนิดสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนได้ดังรายงานของ Belarmino & Mii. (2000) ที่ศึกษาการส่งถ่ายยีนใน *Phalaenopsis orchid* โดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่า การเติมสาร acetosyringone ในขั้นตอน co-cultivation สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่าย *GUS* gene ได้ และจากงานวิจัยของ Suzuki & Nakano . (2002) ที่ศึกษาการส่งถ่ายยีนใน *Muscari armeniacum* โดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่าการเพิ่ม acetosyringone เข้าไปในขั้นตอน co-cultivation จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนได้ สารเคมีในกลุ่มสารปฏิชีวนะ มีผลกระทบต่อการส่งถ่ายยีนด้วยเช่นกัน Liau et al., (2003) ได้ศึกษาการส่งถ่ายยีนใน *Orcidium orchid* โดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ อัตราการส่งถ่ายยีนจะลดลงตามลำดับ การใช้สารปฏิชีวนะที่เข้มข้น 10 mg/l เป็นต้นไป การส่งถ่ายยีนไม่สามารถเกิดขึ้นได้ ดังนั้นจึงต้องใช้สารในปริมาณที่เหมาะสม

นอกเหนือจากนี้แล้วขนาดของ T-DNA ยังมีผลต่อการส่งถ่ายยีน Park et al., (2000) ศึกษาการส่งถ่ายยีนในยาสูบ ฝ้าย และ ข้าว โดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่าประสิทธิภาพการส่งถ่ายจะเพิ่มขึ้นเมื่อขนาด T-DNA ที่อยู่ใน Plasmid มีขนาดสั้น โดยเมื่อเปรียบเทียบขนาด T-DNA 4.3 kb กับ 8.4 kb จะพบว่าประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีน T-DNA ขนาด 4.3 kb จะสูงกว่า 8.4 kb แต่เมื่อนำ T-DNA ขนาดใหญ่ (8.4 kb) มาเชื่อมต่อกับ virG , virGN54D , virE หรือ ทั้ง VirG/virE จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนมากขึ้น

การศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนด้วยพลาสมิดต่างชนิด

ในการส่งถ่ายยีนเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด การคัดเลือกใช้ พลาสมิดที่เหมาะสมสามารถเพิ่มอัตราการถ่ายทอดยีนให้สูงขึ้นได้ Arokiaraj et al., (1998) ศึกษาการส่งถ่ายยีนใน *Hevea brasiliensis* โดยใช้ *A. tumefaciens* / p35SGUSINT พบว่า สามารถส่งถ่ายยีนเข้าสู่ *Hevea brasiliensis* ได้ พบการติดสีน้ำเงินและการแสดงออกของ *GUS* gene เช่นเดียวกับ Crevera et al., (1998) ศึกษาการส่งถ่ายยีนใน *Citrus sinensis* L. โดยใช้ *A.tumefaciens* strain EHA105 /p35 SGUSINT พบว่า สามารถส่งถ่าย *GUS* gene เข้าสู่ *Citrus sinensis* L. ได้ และพบการแสดงออกของยีน ในขณะที่ Niu et al., (1998) ศึกษาการส่งถ่ายยีนของ peppermint โดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่าสามารถส่งถ่าย *GUS* gene เข้าสู่พืชโดยใช้ *A.tumefaciens* straiain EHA105 /pBI121ได้

การศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อต่าง ๆ ของพืช

ในการส่งถ่ายยีนให้ประสบผลสำเร็จ การเลือกใช้ เนื้อเยื่อของพืชก็มีส่วนสำคัญ การใช้อวัยวะ (organ) ที่ต่างชนิดกัน อัตราการส่งถ่ายยีนไม่เท่ากัน และพืชแต่ละชนิดเนื้อเยื่อที่เหมาะสมก็แตกต่างกันไป จากการศึกษาของ Azmi et al. (1997) ศึกษาส่งถ่ายยีนในเนื้อเยื่อ ที่ต่างกันของ *Eucalyptus globules* โดยใช้ *A. tumefaciens* strain 82.139 ได้เป็นผลสำเร็จโดยพบว่าสามารถส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อต่างชนิดกันได้ทั้งหมด จากรายงานของ Knoll et al. (1997) ศึกษาการส่งถ่ายยีนใน *Spinacia oleracea* L. โดยใช้ *A. tumefacien* พบว่าสามารถส่งถ่าย *GUS* gene เข้าสู่ root explant ของ *Spinacia oleracea* L. ได้ เช่นเดียวกับ Dabauza et al. (1997) ศึกษาการส่งถ่ายยีนของ *Citrullus colucynthis* L. โดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่าสามารถส่งถ่าย *GUS* gene เข้าสู่ cotyledon explant ของ Citrullus ได้ และมีการแสดงออกของ gene ในรุ่นลูกด้วย สำหรับ Kamo (1997) ศึกษาการส่งถ่ายยีนใน Gladiolus โดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่าสามารถส่งถ่าย *GUS* gene เข้าไปใน Corms ของ Gladiolus ได้

นอกจากนั้นยังมีรายงานการส่งถ่ายยีนที่ประสบความสำเร็จโดยใช้เนื้อเยื่อต่าง ๆ กันในพืชหลายชนิด การส่งถ่ายยีนที่ประสบผลสำเร็จโดยใช้ shoot ประกอบด้วย Cheng et al. (1997) ส่งถ่าย *GUS* gene โดย *A. tumefaciens* ในพืชตระกูลถั่ว ต่อมามีงานวิจัยของ Zapata et al. (1999) ซึ่งทำการส่งถ่าย *GUS* gene เข้าสู่ Shoot-apex explants และพบการแสดงออกของ gene ในรุ่นลูก และมีงานวิจัยของ Yang et al. (2000) ที่ได้ส่งถ่าย *GUS* gene เข้าสู่ Shoot ในพืช *Citrus paradise* Macf. ประสบผลสำเร็จเช่นกัน นอกจากนี้เนื้อเยื่อที่นำมาศึกษาการส่งถ่ายยีนยังมีเนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ อีก เช่น การส่งถ่ายยีนใน embryos โดย Sita et al. (1998) ได้ส่งถ่าย

GUS gene เข้าสู่ Somatic embryos ใน Sandalwood เป็นผลสำเร็จ งานวิจัยต่อมา Hernandez et al. (1998) ได้ส่งถ่าย *GUS* gene เข้าสู่ embryos ของ Avocado และ Tang et al. (2000) ได้ทำการส่งถ่าย *GUS* gene เข้าสู่ embryos ของ Walnut ได้ และงานวิจัยของ Zhang et al., (2000) ได้ทำการส่งถ่าย *GUS* gene เข้าสู่ Cotyledon ของ *Chinese Cabbage* ได้เป็นผลสำเร็จ นอกจากนี้ยังพบว่า Koroch et al. (2002) ได้ส่งถ่าย *GUS* gene เข้าสู่ leaf explants ของ *Echinoda purpurea* ได้ และงานวิจัยของ Franklin & Sita. (2003) ศึกษาการส่งถ่าย *GUS* gene เข้าสู่ Root explants ของ *Solanum melongena* ได้เป็นผลสำเร็จ

การส่งถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับรงควัตถุแอนโทไซยานิน

จากรายงานของ Shimada et al .(2001) สามารถส่งถ่าย Sense ของยีน (*F3´5´H*) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน ทำให้ดอกสีชมพูเปลี่ยนเป็นสีม่วง และเมื่อส่งถ่าย Antisense ของยีน (*F3´5´H*) สามารถทำให้เกิดดอกสีน้ำเงินในพิทูเนียเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือน้ำเงินซีดได้ นอกจากนี้ Aida et al. (2000) ได้ศึกษาการส่งถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน คือ ยีน *DFR* และ *CHS* โดยวิธี Antisense พบว่าการส่งถ่ายยีน *DFR* ทำให้ดอกแวววยุรามีสีน้ำเงินและสีขาวปะปนกันอยู่ และจากการศึกษาของ Ueyama et al. (2002) ได้รายงานถึงการศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาของดอกแวววยุรา พบว่าดอกแวววยุราในระยะต่าง ๆ มีการแสดงออกของสีและการสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่มรงควัตถุ แอนโทไซยานินที่ไม่เหมือนกัน เช่นเดียวกับ Jaakola et al. (2002) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับรงควัตถุแอนโทไซยานิน ในระหว่างการพัฒนาการสุกของผลบิลเบอรี พบว่าสีของผลบิลเบอรีในระยะต่าง ๆ ของการสุกมีการสะสมเอนไซม์และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับรงควัตถุแอนโทไซยานิน และ Liew et al. (1998) ศึกษาการแสดงออกของยีน *DFR* พบว่าในเนื้อเยื่อทุกส่วนที่มีสีม่วงของกล้วยไม้มีการแสดงออกของยีน*DFR* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงวัตถุแอนโทไซยานิน

การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติบางประการของพืช มีจุดประสงค์เพื่อ ให้ได้พืชที่มีคุณสมบัติที่ต้องการหรือเพื่อปรับปรุงคุณภาพให้ดีขึ้น การปรับปรุงสีของดอกไม้ ก็เป็นสิ่งหนึ่งที่กำลังเป็นที่สนใจ และมีงานวิจัยที่ประสบผลสำเร็จ โดยการส่งถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน Elomaa et al. (1993) ศึกษาการส่งถ่าย Antisense *CHS* gene ใน *Gebera hybrida* โดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่า สามารถยับยั้งการสังเคราะห์รงควัตถุ แอนโทไซยานิน ในดอก *Gebera hybrida* ได้ จากรายงานของ Spelt et al. (2000) ศึกษาการส่งถ่าย *DFR* gene ในพิทูเนียโดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่า การแสดงออกของ *DFR gene* และสีดอกของพิทูเนีย

เปลี่ยนแปลงไป สอดคล้องกับ Yan et al. (2001) ศึกษาการส่งถ่าย *Chalcone synthase* A gene ในพิทูเนีย โดยใช้ *A. tumefaciens* LBA4404 /pBI121 plasmid พบว่าสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีดอกของพิทูเนียได้ โดยเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีขาว และ ขาวสลับม่วง

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ทำในพืชชนิดอื่น และให้ผลที่มีการเปลี่ยนแปลงที่สีของดอกหรือใบพืชได้ Liu et al., (2001) ศึกษาส่งถ่าย *tag*1-gene ที่เกี่ยวข้องการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน ในยาสูบ โดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่า สามารถทำให้สีดอกของยาสูบ เปลี่ยนจากสีแดง เป็นสีแดงที่จางลงได้

จากรายงานของ Bovy et al., (2002) ศึกษาการส่งถ่าย gene ที่เกี่ยวกับวัตถุแอนโทไซยานิน โดยใช้ *A. tumefaciens* ผลการตรวจสอบโดยใช้ HPLC Analysis พบการสะสมของ แอนโทไซยานิน มากขึ้นในใบและดอกของมะเขือเทศ ในขณะที่ Elomaa et al. (2003) ศึกษาการส่งถ่าย gene ที่เกี่ยวข้องกับรงควัตถุ แอนโทไซยานิน ที่แยกได้จาก *Gerbera hybrida* ส่งถ่ายเข้าไปในในยาสูบ โดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่าสามารถตรวจพบการสะสมของแอนโทไซยานิน ในดอกมากขึ้น และ Mathews et al. (2003) ศึกษาการส่งถ่าย gene ที่เกี่ยวข้องกับวัตถุแอนโทไซยานินในมะเขือเทศ โดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่าสามารถทำให้สีของดอกและผลของมะเขือเทศเปลี่ยนแปลงโดยสอดคล้องกับอัตราการสะสมของรงควัตถุแอนโทไซยานิน มีรายงานของ Ray et al. (2003) ศึกษาการส่งถ่าย Sense gene ที่เกี่ยวข้องกับรงควัตถุแอนโทไซยานิน ใน Alfalfa โดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่าหลังจากส่งถ่ายยีนมีการสะสมของรงควัตถุแอนโทไซยานิน ในใบของ Alfalfa มากขึ้น