บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การค้นหายีน Dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) **จากกลีบดอก** (petal) **ของปทุมมา**

จากการแยกยีน Dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) จากกลีบดอก (petal) ปทุมมา (*Curcuma* spp.) พบว่าแยกยีน *DFR* ได้ 2 fragment คือ fragment ที่มีขนาดประมาณ 500 และ 850 คู่เบสจากนั้น นำ fragment ที่ได้ส่งถ่ายเข้าสู่พลาสมิดดีเอ็นเอ pTZ57R เพื่อส่งถ่ายเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E.coli* เมื่อตรวจสอบโคลนที่ได้รับพลาสมิดแล้วนำโคลนที่ได้ไปหาลำดับเบส(DNA sequencing) เพื่อแปลลำดับนิวคลีโอไทด์มาเป็นกรดอะมิโน และทำ Blast search พบว่า fragment ที่มีขนาดประมาณ 500 คู่เบสนั้นมี reading frame ที่ 2 ซึ่งอ่านจากปลาย 5' ไปด้าน 3' ของ *DFR* gene โดยที่ fragment ไปคล้ายกับ *DFR* gene จากพืชสปีชีส์อื่น ๆ ที่มีการรายงานใน Genbank ได้แก่ *Lilium speciosum* (Adachi et al., unpublished), *Gentiana triflora* (Tanaka et al., 1996), *Eustoma grandiflorum* (Noda et al., 2004), *Vaccinium macrocarpon* (Polashock et al., 2002) และ *Solanum tuberosum* (De Jong et al., 2003) โดยมีระดับความเหมือนของกรดอะมิโนของ *DFR* gene ที่แยกได้จากปทุมมา เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ *DFR* gene จากพืชสปีชีส์อื่น ๆ คือ 65, 55, 51, 51 และ 50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังตาราง 6 โดย fragment ที่มีขนาดประมาณ 500 คู่เบสนี้จะมีความคล้ายกับยีน *DFR* ใน *Lilium speciosum* มากที่สุด

ในขณะที่ *DFR* gene ขนาดประมาณ 850 คู่เบส ที่แยกได้จากปทุมมาพบว่าลำดับกรดอะมิโนจาก reading frame 3 ซึ่งอ่านจากปลาย 5' ไปด้าน 3' มีความคล้ายกับ *DFR* gene จากพืชสปีชีส์อื่น ๆ ที่รายงานใน Genbank เช่น *Anthurium Andraeanum* (Zhang, Li & Wang, unpublished), *Citrus sinnensis* (Lo Piero et al., 2006), *Vitis vinifera* (Sparvoli et al., 1994),, *Gerbera hybrid* (Helariutta et al., 1993) และ *Rosa hybrid* (Tanaka et al., 1995) โดยมีระดับความเหมือนของกรดอะมิโนของ *DFR* gene เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ *DFR* gene จากพืช สปีชีส์อื่น ๆ คือ 96, 63, 61, 58 และ 57เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตาราง 7 โดย fragment ที่มีขนาดประมาณ 850 คู่เบสนี้จะมีความคล้ายกับยีน *DFR* ใน *Anthurium Andraeanum* มากที่สุด

จากแผนภาพ Cladogram (ภาพ 17) ดูความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืช ที่ศึกษา พบว่า *DFR* gene ของปทุมมาขนาดประมาณ 500 คู่เบส มีความใกล้ชิดกับ *Lilium speciosum* มากที่สุด และมีเปอร์เซ็นต์ระดับความเหมือนของกรดอะมิโนของ *DFR* gene ที่รายงานใน Genbank เพียง65 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *DFR* gene ที่แยกได้จากปทุมมาขนาดประมาณ 850 คู่เบส มีความใกล้ชิดกับ *Anthurium Andraeanum* มากที่สุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ระดับความเหมือนของกรดอะมิโนของ *DFR* gene ที่รายงานใน Genbank สูงถึง 96 เปอร์เซ็นต์

จากรายงานของ (Nakatsuka et al., 2003) ศึกษายีน *CHS* และ *DFR* ใน *Lilium* (lily) พบว่า ลิลลี่ 2 สายพันธุ์คือ Montreux ซึ่งจะให้สีชมพู และสายพันธุ์ Connecticut King ซึ่งให้สีเหลือง โดยสายพันธุ์ Montreux จะพบการแสดงออกของยีน *CHS* และ *DFR* ซึ่งดอกสีชมพูนั้นจะเกี่ยวข้องกับรงควัตถุแอนโทไซยานิน ในกลุ่ม cyanidine และ pelargonidine ในขณะที่สายพันธุ์ Connecticut King ซึ่งให้สีเหลืองจะพบการแสดงออกของยีน *CHS* เท่านั้น และในธรรมชาติพบว่า *Lilium speciosum* (lily) ซึ่งเป็นพืชที่มียีน *DFR* คล้ายกับยีน *DFR* ขนาดประมาณ 500 คู่เบส ของปทุมมามากที่สุด จะมีดอกสีขาวปนสีชมพูถึงแดง (ภาคผนวก ค) ในขณะที่ *DFR* gene ขนาดประมาณ 850 คู่เบส ของปทุมมา มีความคล้ายกับ *DFR* gene จากพืช *Anthurium Andraeanum* มากที่สุดนั้น และในธรรมชาติส่วนใหญ่พบว่า มีดอกสีเขาว เขียว และแดง (ภาคผนวก ค) จึงคาดว่ายีน *DFR* ที่ได้จะเกี่ยวข้องกับรงควัตถุแอนโทไซยานิน ซึ่งทำให้เกิดสีในพืชและให้สีในกลุ่ม cyanidine และ pelargonidine ซึ่งเป็นสีที่พบได้ในดอกไม้ดังกล่าว

นอกจากนี้มีรายงานการศึกษายีน *DFR* ในพืชที่มียีน *DFR* คล้ายกับพืชปทุมมาและพบว่ายีนดังกล่าวเกี่ยวข้องกับรงควัตถุแอนโทไซยานิน คือ Helariutta et al., (1993) ได้แยกยีน *DFR* จากกลีบดอก *Gentiana triflora* พบว่า ยีน *DFR* ไปคล้ายกับยีน *DFR* จากพืชสปีชีส์อื่น ๆ และการแสดงออกของยีน *DFR* ที่พบสัมพันธ์กับการสะสมของรงควัตถุแอนโทไซยานิน Noda et at., (2006) พบว่ายีน *DFR* ที่แยกจากพืช *Eustoma grandiflorum* มีการแสดงออกและสะสมรงควัตถุแอนโทไซยานินในระยะการพัฒนาของดอกที่ต่างกันไป (stage of floral development) และ Tanaka et at., (1996) ได้ศึกษายีน *DFR* ของ *Gerbera hybrid* โดยแยกยีน *DFR* จากกลีบดอก และพบการสะสมของรงควัตถุแอนโทไซยานินในระหว่างการพัฒนาของดอก (during inflorescence development)

ผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Goldsbrough, Belzile & Yoder (1994) ซึ่งได้โคลนยีน *DFR* จากมะเขือเทศ พบว่าประกอบด้วย 2 fragment เช่นกัน และงานวิจัยของ Xie et al., (2004) ได้รายงานว่า ยีน *DFR* ที่ได้จาก *Medico trancatula* ประกอบด้วย 2 fragment

โดยยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ที่ได้จากการถอดรหัสของ fragment ที่ 1คือ *MTDFR*1 ในขณะที่เอนไซม์ที่ได้จากการถอดรหัสของ fragment ที่ 2 คือ *MTDFR* 2 โดยยีน *DFR* ที่พบนั้นมีบทบาทในการควบคุมการสะสมของแอนโทไซยานิน

จากผลการทดลองแนวทางการศึกษาต่อไปคือ ส่งถ่ายยีน *DFR* เข้าพืชปทุมมา จากรายงานของ (Van der Kroll et al.,1990) การเปลี่ยนแปลงใดๆที่เกี่ยวข้องกับยีน *DFR* จะส่งผลต่อการแสดงออกของสีในที่สุด ไม่ว่าการเปลี่ยนแปลงนั้นจะเกิดขึ้นเนื่องจากการส่งถ่ายยีนโดยวิธี Antisense เพื่อยับยั้งหรือลดการแสดงออกของยีน (suppression) หรือส่งถ่ายยีนโดยวิธี Sense เพื่อเพิ่มการสะสมและแสดงออกของยีนให้มากขึ้น (over expression)

การส่งถ่ายยีน *DFR* โดยใช้วิธี Antisense นั้นเป็นกระบวนการถ่ายฝากยีน *DFR* ที่ต่อกลับทิศทาง เมื่อเกิดการลอกรหัสจากยีนที่ถ่ายฝากเข้าไป จะได้อาร์เอ็นเอสายที่เป็นคู่สมกับอาร์เอ็นเอของยีน *DFR* ในพืช เมื่อเกิดการจับเข้าคู่กัน ทำให้ไม่มีการแปลรหัสเป็นโพลีเพพไทด์หรือโปรตีน และไม่เกิดการสร้างเอ็นไซม์หรือสารซึ่งเป็นผลลัพธ์ของยีนดังกล่าว จากรายงานของ (Van der Krol et al., 1990) ส่งถ่ายยีนโดยวิธี Antisense เพื่อยับยั้งหรือลดการแสดงออกของยีน dihydroflavonol -4-reductase (*DFR*) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน โดยที่ Antisense *DFR* gene ทำให้ปริมาณรงควัตถุลดลงในพิทูเนีย หรือการส่งถ่าย Antisense *DFR* gene เข้าสู่เยอบีราสามารถเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีชมพู (Elomaa et al., 1996) และสำหรับพืช lisianthus พบว่าเกิดการเปลี่ยนสีจากม่วงไปเป็นขาว นอกจากนี้ การส่งถ่าย Antisense *DFR gene* ทำให้ *Torenia hybrida* เปลี่ยนจากดอกสีน้ำเงินเป็นสีน้ำเงินอ่อนได้ (Aida et al., 2000) ดังนั้น จึงนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาการส่งถ่ายยีน *DFR* เข้าพืชปทุมมา โดยกลไกการเกิดสีในพืชเกี่ยวข้องกับเอนไซม์หลายชนิดดังภาพ 3 เอนไซม์ที่สำคัญคือ เอนไซม์ Dihydroflavonol -4-Reductase ซึ่งทำหน้าที่ในขั้นตอนปฏิกิริยารีดักชัน เปลี่ยนสารตัวกลาง (intermediate) dihydroflavonols เป็น leucoanthocyanidin ซึ่งสารตัวนี้เปลี่ยนไปตามลำดับจนกระทั่งเป็นสารกลุ่ม cyanidine , pelargonidine และ delphinidin ซึ่งเป็นรงควัตถุแอนโทไซยานิน โดยยีน *DFR* กำหนดการสร้างเอนไซม์ดังกล่าว ดังนั้น ถ้ามีการส่งถ่ายยีน *DFR* โดยวิธี Antisense เพื่อยับยั้งหรือลดการแสดงออกของยีน (suppression) อาจทำให้ไม่มีหรือลดการสร้างสารในกลุ่ม cyanidine , pelargonidine และ delphinidin และส่งผลต่อการแสดงออกของสีในที่สุด

สำหรับการส่งถ่ายยีน โดยวิธี Sense ซึ่งเป็นกระบวนการแทรกยีนที่มีชิ้นส่วนครบถ้วนสมบูรณ์ (Full Length Gene) เข้าสู่สิ่งมีชีวิตที่ต้องการเพื่อให้สิ่งมีชีวิตชนิดนั้นสามารถสร้างโปรตีนซึ่งเป็นผลลัพธ์ของยีนที่แทรกเข้าไปนั้นออกมาได้ โดยยีนที่ว่านี้อาจได้มาจากสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นเองหรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นก็ได้ ปัจจุบันเทคนิคนี้ถูกนำมาใช้ในการสร้างพืชดัดต่อพันธุกรรมหลายชนิด เช่น ข้าว Golden Rice ฝ้าย BT เป็นต้น การส่งถ่ายยีน *DFR* โดยวิธี Sense เพื่อเพิ่มการสะสมและแสดงออกของยีนให้มากขึ้น (over expression) นั้น (Van der Kroll et al.,1989)อาจทำให้มีการสร้างสารในกลุ่ม cyanidine , pelargonidine และ delphinidin เพิ่มขึ้นส่งผลต่อการแสดงออกของสีที่มากขึ้นด้วยเช่นกัน รายงานของ (Holton, 1996) ศึกษาการส่งถ่าย Sense *DFR* gene พบว่าการส่งถ่าย Sense *DFR* gene จากพิทูเนีย ทำให้ดอกสีขาวของ *Dianthus caryophyllus* เปลี่ยนเป็นดอกสีม่วง นอกจากนี้มีการส่งถ่าย Sense *DFR gene* และทำให้ดอก *Torenia hybrida* ซึ่งมีสีน้ำเงินเปลี่ยนเป็นดอกสีขาว (Suzuki et al., 2000) เนื่องจากยีน *DFR* ที่ศึกษามีขนาดประมาณ 850 คู่เบส ดังนั้นแนวทางการศึกษาต่อไปคือ การหายีน *DFR* ที่มีชิ้นส่วนครบถ้วนสมบูรณ์ (Full Length Gene) โดยวิธี 5' Race และ 3' Race เพื่อใช้ในการส่งถ่ายยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนในพืชต่อไป

นอกจากนี้มีรายงานการส่งถ่ายยีน *DFR* โดยวิธีRNA interference (RNAi) ซึ่งเป็นกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA โดยหากเกิดอาร์เอ็นเอสายคู่ขึ้นภายในเซลล์ อาร์เอ็นเอสายคู่ที่เกิดขึ้นนี้จะถูกทำลายโดยกลุ่มของเอนไซม์นิวคลีเอสที่เรียกว่า RNA-induce silencing complex (RISC) ให้เกิดเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 22 นิวคลีโอไทด์ เรียกว่า siRNA ซึ่ง siRNA ที่เกิดขึ้นนี้จะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำลาย mRNA ที่มีลำดับเบสเหมือนกันต่อไป ซึ่งเชื่อว่ากลไกที่เกิดขึ้นนี้มีประโยชน์ในการช่วยให้สิ่งมีชีวิตสามารถต้านทานต่อไวรัสบางชนิดได้และยังใช้ในการควบคุมการแสดงออกของยีนให้แตกต่างกันไปตามช่วงการพัฒนาระยะต่าง ๆ ได้ (Scott , Amy & Gregory ., 2001) มีรายงานการศึกษาการส่งถ่ายยีน *DFR* โดยวิธีRNA interference (RNAi) เพื่อการสร้างกุหลาบดอกสีน้ำเงินโดยสถาบัน ESIRO โดย Dr. waterhouse's และคณะ โดยใช้ RNAi (RNA interference) หยุดการทำงานของยีน *DFR* ในกุหลาบสีแดง เพื่อยับยั้งปฏิกิริยา cyanidin pathway คือการสร้างสารกลุ่ม cyanidin (สีแดง) ในขณะเดียวกันก็เพิ่มการสังเคราะห์สารในกลุ่ม delphinidin (ซึ่งให้สีน้ำเงิน) ได้อย่างสมบูรณ์ และนักวิจัยจากสถาบันวิจัย Suntory ได้ใช้หลักการเดียวกันนี้ สามารถยับยั้งการสร้างสีชมพูในกุหลาบสายพันธุ์สีชมพูเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์สีน้ำเงินทดแทนได้

ยีน *DFR* ที่แยกได้จากกลีบดอก (petal) ของปทุมมาซึ่งมีสีชมพู นั้น มีความคล้ายคลึงกับยีน *DFR* จากพืชสปีชีส์อื่น ๆ ที่มีรายงานใน Genbank โดยยีน *DFR* ที่พบในพืชสปีชีส์อื่น ๆ มีบทบาทเกี่ยวข้องกับรงควัตถุแอนโทไซยานินและในธรรมชาติพบว่าส่วนใหญ่พืชดังกล่าวมีดอกสีขาว ชมพู และ แดง ดังนั้นจึงคาดว่า ยีน *DFR* ที่แยกได้จากปทุมมา จะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานินและมีบทบาทต่อการแสดงออกของสีในพืชในกลุ่ม cyanidine และ pelargonidine ซึ่งมีสีส้ม ชมพู ถึงแดง การยับยั้งหรือเพิ่มการแสดงออกของยีน *DFR* มีผลต่อการแสดงออกของสีในพืช ดังนั้น การส่งถ่ายยีน *DFR* โดยใช้วิธี Antisense , Sense และ RNAi เป็นต้น มาใช้ในการศึกษาส่งถ่ายยีน ก็น่าจะสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของดอกไม้ได้

การส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อปทุมมา พิทูเนีย และยาสูบโดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ด้วย พลาสมิด 4 ชนิด

ผลการทดลองส่งถ่ายยีนเข้าสู่ช่อดอกย่อย (coinflorescense) ของปทุมมา ใบของพิทูเนีย และยาสูบโดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ด้วย พลาสมิด 4 ชนิด คือ pSCV1.6, pBI121, pCAMBIA1303 และ pCAMBIA1304 ตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีน โดยเทคนิค GUS histochemical assay พบว่าเนื้อเยื่อช่อดอกย่อยของปทุมมาที่ส่งถ่ายด้วย pSCV1.6 เมื่อนำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงิน (transient expression) คิดเป็น 65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากที่สุดโดยพบจุดสีน้ำเงินเข้มเกิดขึ้นทั่วทั้งเนื้อเยื่อที่จะเจริญไปเป็นต้น (ภาพ 18) ส่วนเนื้อเยื่อปทุมมาที่ส่งถ่ายด้วย pBI121 เมื่อนำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงิน(transient expression) คิดเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ โดยพบจุดสีน้ำเงินที่เนื้อเยื่อแต่สีไม่เข้มเท่ากับเนื้อเยื่อปทุมมาที่ส่งถ่ายด้วย pSCV1.6 (ภาพ 18) แต่ในการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้เนื้อเยื่อปทุมมาที่ส่งถ่ายด้วย pCAMBIA 1303 และ pCAMBIA 1304 เมื่อนำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงิน (transient expression) คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน โดยพบจุดสีน้ำเงินเพียงเล็กน้อยและมีสีจาง (ภาพ 18) ในการตรวจสอบการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่พืชปทุมมา เมื่ออายุได้ 7 เดือน พบว่ามีเพียงต้นปทุมมาที่ส่งถ่ายด้วย pSCV1.6 เท่านั้น ที่สามารถเจริญเป็นต้นได้บนอาหารคัดเลือก (selective media) และเมื่อนำมาตรวจสอบอีกครั้งโดยเทคนิค GUS histochemical assay (GUS expression) พบว่าเกิดจุดสีน้ำเงิน 2 ต้นหรือ 0.83 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 19) ส่วนการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่าต้นปทุมมาที่เจริญเป็นต้นได้ภายหลังการส่งถ่ายยีนและเจริญได้บนอาหารคัดเลือก (selective medium) เกิดแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR สำหรับ *GUS* gene จำนวน 13 ต้น แสดงผลตามตารางที่ 9 โดยได้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 510 bp ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ของพลาสมิด pSCV1.6 (ภาพที่ 20)

ในการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าปทุมมา พบว่ามีการแสดงออกของ *GUS* gene และมีเปอร์เซ็นต์การตรวจพบ 0.83 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอื่น ๆ หลายชนิด เช่น Kamo (1997) ได้รายงานการส่งถ่ายยีนใน *Gladiolus* พบว่ามีประสิทธิภาพการส่งถ่ายเพียง 0.5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น จากการศึกษาการส่งถ่ายยีนของ Wang & Ge (2005) ซึ่งได้ศึกษาการส่งถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว *Fetuca aundinacea* ด้วย *A. tumefaciens* EHA105 กับ พลาสมิด pCAMBIA1305.2 พบว่ามีประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน 1.9 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยการส่งถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอื่น ๆ อีก เช่น Ledger et al. (1997) ส่งถ่ายยีนใน lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) พบว่ามีประสิทธิภาพการส่งถ่าย 1.9 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน ในขณะที่ Akasaka-Kennedy, Tomita & Ezura (2004) ศึกษาการส่งถ่ายยีนใน *Cucumis melo* L. พบว่ามีประสิทธิภาพ 2.3 เปอร์เซ็นต์

การส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ใบพิทูเนีย โดย pSCV1.6 หลังจาก co-cultivation 2 สัปดาห์ นำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงิน (transient expression) 100 เปอร์เซ็นต์ โดยพบจุดสีน้ำเงินเข้มทั่วทั้งใบ (ภาพ 21) ส่วนในเนื้อเยื่อพิทูเนียที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pBI121 ที่สุ่มนำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงิน (transient expression) 100 เปอร์เซ็นต์ โดยพบจุดสีน้ำเงินแต่ไม่เข้มทั่วทั้งใบ (ภาพ 21) แต่เมื่อใช้ pCAMBIA 1303 และ pCAMBIA 1304 แล้วนำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงิน (transient expression) คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยพบจุดสีน้ำเงินเพียงเล็กน้อย (ภาพ 21) หลังจากต้นพิทูเนียอายุได้ 3 เดือน นำมาตรวจสอบอีกครั้งหนึ่ง พบว่า ต้นพิทูเนียที่ส่งถ่ายยีนด้วย pSCV1.6 และ pBI121 เท่านั้น สามารถเจริญเป็นต้นได้ บนอาหารคัดเลือก (selective media) เมื่อนำมาตรวจสอบโดยเทคนิค GUS histochemical assay (GUS expression) พบการเกิดจุดสีน้ำเงินคิดเป็น 23 เปอร์เซ็นต์และ 13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 11 โดยพบจุดสีน้ำเงินเข้มทั่วทั้งใบและสม่ำเสมอในต้นพิทูเนียที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pSCV1.6 (ภาพที่ 22)

สำหรับการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ใบยาสูบโดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO โดยนำเนื้อเยื่อยาสูบที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pSCV1.6 หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบ พบการเกิดจุดสีน้ำเงิน (transient expression) 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เท่ากับการส่งถ่ายโดยใช้ pBI121 โดยพบจุดสีน้ำเงินแต่ไม่เข้มทั่วทั้งใบ (ภาที่ 23) ส่วนการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เนื้อเยื่อยาสูบโดยใช้ pCAMBIA 1303 และ pCAMBIA 1304 นั้นเมื่อนำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงิน (transient expression) 20 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน โดยพบจุดสีน้ำเงินเพียงเล็กน้อย (ภาที่ 23) หลังจากต้นยาสูบอายุได้ 3 เดือน นำมาตรวจสอบอีกครั้งหนึ่ง พบว่าต้นยาสูบที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pSCV1.6 และ pBI121 สามารถเจริญเป็นต้นได้บนอาหารคัดเลือก (selective media) จากนั้นจึงได้นำมา

ตรวจสอบโดยเทคนิค GUS histochemical assay (GUS expression) พบการเกิดจุดสีน้ำเงินคิดเป็น 21 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 13 โดยพบจุดสีน้ำเงินเข้มทั่วทั้งใบในยาสูบที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pSCV1.6 มากที่สุด (ภาพที่ 24)

จากผลการทดลองจะเห็นว่าแบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO เป็นสายพันธุ์ supervirulence มีความสามารถในการบุกรุกได้ดี และประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนในพิทูเนียและยาสูบ จะสูงกว่าปทุมมา ซึ่งใกล้เคียงหรือสอดคล้องกับงานวิจัยในการศึกษาการ ส่งถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น Hirsikorpi et al.(2002) ได้รายงานผลการส่งถ่ายยีนด้วย *A. tumefaciens* C58C1/pHTT204 ใน *Drosera rotudifolia* L. พบประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีน 17 เปอร์เซ็นต์ เป็นไปได้ว่าพืชใบเลี้ยงคู่จะเป็นพืชอาศัยของ *A. tumefaciens* นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยการส่งถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงคู่ที่ประสบความสำเร็จ เช่น Agarwal et al. (2004) ศึกษาการส่งถ่ายยีนด้วย *A. tumefacien* LBA4404/pBI121 ใน *Morus alba* L. พบว่าประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีน 18.6 เปอร์เซ็นต์ และ Svetla et al. (2004) ศึกษาการส่งถ่ายยีนด้วย *A. tumefacien* EHA105/pME504 ใน *Ficus carica* L. พบว่าประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนสูงสุด 10 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Pena et al. (1995) ศึกษาการส่งถ่ายยีนด้วย *A. tumefacien* EHA105/p35SGUSINT ใน Citrus พบว่าประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีน 20.6 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณารูปแบบการกระจายตัวของจุดสีน้ำเงินที่ได้จากการตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อของปทุมมา พิทูเนีย และยาสูบโดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO พบว่าพลาสมิดแต่ละชนิดให้ผลแตกต่างกัน โดย *A. tumefaciens* AGLO/pSCV1.6 เกิดจุดสีน้ำเงินเข้มมากที่สุดและเกิดทั่วทั้งใบโดยเฉพาะในยาสูบน่าจะมีเหตุผลเนื่องจากพลาสมิด pSCV1.6 เป็นพลาสมิดที่มี intron GUS จากการศึกษาของ Wang et al. (1997) และ Libiakova et al. (2000) พบว่าพลาสมิดที่มี intron อยู่ในยีนที่ต้องการส่งถ่ายจะให้ประสิทธิภาพในการแสดงออกของยีนสูงกว่ายีนที่ไม่มี intron ดังนั้น การใช้พลาสมิด pSCV1.6 จึงเป็นตัวเลือกที่เหมาะสมที่ควรเลือกใช้ในการส่งถ่ายยีน

จากการตรวจสอบการส่งถ่ายยีนในพืชปทุมมาที่สามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นได้ ด้วยเทคนิค PCR เป็นการยืนยันผลการทดลองที่ได้ด้วย primer สำหรับ *GUS* gene พบว่าปทุมมาที่ส่งถ่ายด้วย *A. tumefaciens* AGLO/pSCV1.6 เกิดแถบดีเอ็นเอ 1 แถบที่มีขนาดโมเลกุล 510 bp (ภาพ 20) ซึ่งพบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลตามที่ต้องการ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Miguel & Oliveira (1999) พบแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำ PCR สำหรับ 35S

promoter ของตัวอย่างพืชแปลงพันธุ์ (Transgenic plant) และ Niu (1998) พบแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำ PCR ของตัวอย่างพืชแปลงพันธุ์เช่นกัน

ในการศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน ยังได้มีศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ Gladiolus โดย Kamo et al. (1997) และกล้วยไม้ โดย Belarmino et al. (2000) โดยศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนของ *A. tumefaciens* 2 สายพันธุ์คือ LBA4404 และ EHA 101 โดยส่งถ่ายยีน *GUS* พบว่า *A. tumefaciens* ทั้งสองสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนเท่า ๆ กัน และจากการศึกษาของ Boase et al. (1998) ศึกษาการส่งถ่ายยีน GUS เข้าสู่เบญจมาศ สายพันธุ์ต่าง ๆ โดย *A. tumefaciens* 4 สายพันธุ์ ได้แก่ EHA105, LBA4404, MOG101 และ MOG301 เวคเตอร์ที่ใช้ส่งถ่ายคือ pMOG410 และpKIW110 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการส่งถ่าย พบว่า เบญจมาศแต่ละพันธุ์ก็เหมาะกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ที่ต่างกัน ในปีต่อมา Aida et al. (1999) ศึกษาการส่งถ่ายยีน *GUS* gene เข้าสู่ *Cyclamen persicum* โดย *A. tumefaciens* 2 สายพันธุ์เช่นกันคือ LBA4404 และ AGLO พบว่า *A. tumefaciens* สายพันธุ์ GLO/pIG121Hm เกิด transient GUS expression สีน้ำเงินเข้มและจำนวนเนื้อเยื่อที่ตรวจสอบพบว่ามีมากกว่า *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404/pIG121Hm

งานวิจัยของ Park et al. (2000) ก็สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kushikawa, Hoshino & Mii (2001) ซึ่งพบว่าการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* หากมีการเพิ่มจำนวน *vir* gene ใน T-DNA จะเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีน โดย Kushikawa, Hoshino & Mii (2001) รายงานว่าการส่งถ่ายยีนด้วย *A. tumefaciens* LBA4404/ptok233 มีประสิทธิภาพสูงกว่า *A. tumefaciens* LBA4404/pIG12Hm ทั้งนี้เนื่องจากความเป็น supervirulent gene ได้แก่ *vir B*, *vir C* และ *vir G* ที่อยู่นอกช่วง T-DNA (out side the T-DNA region) ของพลาสมิด pTOK233 แต่อย่างไรก็ตามยังต้องมีการปรับสภาวะต่าง ๆ ให้เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้สูงขึ้น เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เหมาะสม การคัดเลือกพลาสมิดที่เป็น supervirulent การทำให้เนื้อเยื่อเกิดบาดแผลก่อนขั้นตอน co-cultivation หรือการเติม factor เช่น acetocyringone พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* C58C1/pHTT204 ใน *Drosera rotundifolia* L. ได้เป็น 17 เปอร์เซ็นต์ (Hirsikorpi et al .,2002)

การส่งถ่ายด้วยวิธี Antisense technique **ของยีน** *DFR* **เข้าเนื้อเยื่อปทุมมา พิทูเนียและยาสูบโดย** *A. tumefaciens* **สายพันธุ์** AGLO

ผลการทดลองส่งถ่ายยีน *DFR* เข้าสู่ปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) หลังจาก co-cultivation 5 เดือน นำเนื้อเยื่อปทุมมา มาทำการตรวจสอบโดยเทคนิค GUS histochemical assay (GUS expression) พบว่าเกิดจุดสีน้ำเงินที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง X-gluc และ GUS คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 14) และตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR สำหรับ *GUS* gene และ 35S promotor ทุกต้นและได้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 510 bp ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ของพลาสมิด pBI121 (ภาพ 26)

ส่วนการส่งถ่ายยีน *DFR* เข้าสู่พิทูเนีย โดย pBI121 เมื่อนำพิทูเนียมาตรวจสอบโดยเทคนิค GUS histochemical assay (*GUS* expression) พบว่าเกิดจุดสีน้ำเงินคิดเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 14) โดยพบว่าปริมาณจุดสีน้ำเงินที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง X-gluc และ GUS มีสีเข้มสม่ำเสมอกระจายทั่วทั้งใบ โดยเฉพาะบริเวณเส้นกลางใบเกิดจุดสีน้ำเงินเข้มชัดเจน (ภาพ 27) และเมื่อนำต้นพิทูเนียที่เจริญเป็นต้นได้บนอาหารคัดเลือกมาตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR สำหรับ *GUS* gene และ 35S promotor ทุกต้น โดยได้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 510 bp ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ของพลาสมิด pBI121 (ภาพ 28)

สำหรับผลการส่งถ่ายยีน *DFR* เข้าสู่ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) โดย *A. tumefaciens* /pBI121 นำเนื้อเยื่อยาสูบมาตรวจสอบโดยเทคนิค GUS histochemical assay (*GUS* expression) พบว่าเกิดจุดสีน้ำเงินคิดเป็น 23 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 14) โดยมีการแสดงออกของ *GUS* gene ทำให้เกิดสีน้ำเงินกระจายทั่วทั้งใบ (ภาพ 30) เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR สำหรับ *GUS* gene และ 35S promoter ทุกต้น และได้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 510 bp ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ของพลาสมิด pBI121 (ภาพ 31)

จากผลการทดลองข้างต้นอธิบายได้ว่าสามารถส่งถ่ายยีน *DFR* โดย *A. tumefaciens* เข้าสู่ retarded shoot ของปทุมมา ใบพิทูเนีย และยาสูบได้ซึ่ง regenerate เนื้อเยื่อ และสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ซึ่งนับว่าเป็นส่วนสำคัญมากที่สุด โดยเมื่อนำมาตรวจสอบโดยเทคนิค GUS histochemical assay (GUS expression) พบจุดสีน้ำเงินที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง X-gluc และ *GUS* gene ชัดเจน จากการวิจัยนี้พบว่าประสิทธิภาพในการส่งถ่ายดีเอ็นเอนั้น มีเปอร์เซ็นต์ที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการส่งถ่ายดีเอ็นเอในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ในข้าว (Aldemita & Hodges,

1996) ข้าวโพด (Ishida et al.,1996) และข้าวสาลี (Hu et al., 2003) และได้มีการศึกษาการส่งถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานินและประสบความสำเร็จสามารถทำให้มีการเปลี่ยนแปลงสีดอกได้โดยมีศึกษาการส่งถ่าย Sense ของยีน (*F3´5´H*) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน ทำให้ดอกสีชมพูเปลี่ยนเป็นสีม่วงและเมื่อส่งถ่าย Antisense ของยีน (*F3´5´H*) สามารถทำให้ดอกสีน้ำเงินของพิทูเนียเปลี่ยนเป็นน้ำเงินซีดได้ (Shimada et al., 2001) ซึ่งสอดคล้องกับ Aida et al. (2000a) ได้ศึกษาการส่งถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน คือ ยีน *DFR* โดยวิธี Antisense พบว่าดอกแวววมยุรามีสีน้ำเงิน (Bluish)

จากรายงานของ Rosati et al. (2000) ศึกษาการส่งถ่ายยีนใน *Forsythia intermedia* ซึ่งมีดอกสีเหลือง พบว่าเมื่อส่งถ่าย sense *DFR* gene จาก *Antirrhinum* ทำให้ดอก *Forsythia intermedia* มีสีน้ำตาลเหลืองได้ เช่นเดียวกับ Holton (1996) ได้ทำการส่งถ่าย Sense *DFR* gene จากพิทูเนียเข้าไปใน *Dianthus caryophyllus* พบว่า ทำให้ดอกของ *Dianthus caryophyllus* เปลี่ยนเป็นสีม่วงได้ และ Suzuki et al. (2000) ได้ศึกษาการส่งถ่าย Sense *DFR* gene และพบว่าทำให้ดอก *Torenia hybrida* ซึ่งมีสีน้ำเงินเปลี่ยนเป็นดอกที่มีลวดลายของสีขาวและสีน้ำเงินปะปน นอกจากนี้การส่งถ่าย Antisense *DFR* gene ทำให้ *Torenia hybrida* มีสีดอกทั้งสีน้ำเงินอ่อน และสีน้ำเงินเข้มปนอยู่ด้วย (Aida et al., 2000b) ดังนั้นจะเห็นว่าการส่งถ่ายยีน ทั้งกรณี Sense และ Antisense มีผลทำให้พันธุกรรมมีการแสดงออกและเปลี่ยนแปลงให้เห็นได้อย่างชัดเจน เป็นความหวังที่เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมจะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้พืชมีคุณสมบัติที่ดีขึ้น และสามารถขจัดส่วนบกพร่องหรือลักษณะที่ไม่เป็นที่ต้องการ ออกไปได้

การศึกษาในครั้งนี้ประสบผลสำเร็จในการส่งถ่ายยีน *DFR* เข้าสู่พืชปทุมมา ด้วยวิธี Antisense technique โดยอาศัย *A. tumefaciens* ซึ่งสามารถส่งถ่ายยีนเข้าสู่ ช่อดอกย่อย (coinflorescence) และ retarded shoot ของปทุมมาและสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพัฒนาและเจริญเป็นต้น (organogenesis) ได้อย่างสมบูรณ์ และคาดหวังว่าเมื่อต้นปทุมมา(transgenic plant) มีการเจริญและพัฒนาจนกระทั่งออกดอก ซึ่งต้องใช้เวลาไม่น้อยกว่า 2 ปี จะได้ปทุมมา (transgenic plant) ที่มีสีดอกต่างไปจากเดิม เช่น ดอกสีขาว หรือสีน้ำเงิน เป็นต้น และลักษณะดังกล่าวสามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกต่อไปได้