

การถ่ายยีน *flavanone 3-hydroxylase (F3H)* ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) เข้าสู่
บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค

RNAi-Mediated Silencing of the *Flavanone 3-Hydroxylase* Gene into *Nelumbo nucifera*
Gaertn. Using Particle Bombardment

ชาตรี กอนี^{1,2} สุเมธ อรัญนารถ¹ นงลักษณ์ ภารินทวงศ์¹ และกัญญา แซ่เตียว¹

บทคัดย่อ

Flavanone 3-hydroxylase (F3H) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เกี่ยวข้องกับการเกิดสีของดอกไม้ การศึกษาการถ่ายยีน *F3H* ในพลาสมิด pJA8*F3H* เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNA interference (RNAi) และมีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ภายหลังการถ่ายยีนชิ้นส่วน shoot cluster จำนวนทั้งหมด 105 ชิ้น คัดเลือกบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม Benzylaminopurine (BA) 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารคัดเลือก glufosinate ammonium 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 16 สัปดาห์มีจำนวนต้นที่รอด 27 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 28.35 เปอร์เซ็นต์และเลือกต้นบัวหลวงที่สมบูรณ์มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีนทั้งหมด 5 ต้น ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *F3H* และยีน *phosphinothricin - acetyl transferase (bar gene)* ภายหลังจากการถ่ายยีน โดยวิธีพีซีอาร์ ด้วยชุดไพรเมอร์ *F3H* sense F และ *F3H* sense R ซึ่งมีความจำเพาะกับยีน *F3H* พบว่าเกิดแถบ DNA ขนาด 308 คู่เบส ส่วนการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *bar* ด้วยชุดไพรเมอร์ *bar* gene F และ *bar* gene R ซึ่งมีความจำเพาะกับยีน *bar* เป็นยีนคัดเลือกในพืช พบว่าเกิดแถบ DNA ขนาด 430 คู่เบส ซึ่งพบการมีอยู่ของยีนทั้งหมด 5 ต้น คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์นำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RT-PCR ผลการตรวจสอบยีน *F3H* ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *F3H* ของบัวหลวงในต้นที่มีการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJA8*F3H* มีการแสดงออกที่ลดลงอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

คำสำคัญ : ฟลาโวนอยด์ไฮดรอกซีเลส แอนโทไซยานิน อาร์เอ็นเออินเตอร์เฟอเรนซ์

Abstract

Flavanone 3-hydroxylase (F3H) is an important enzyme in the synthesis anthocyanin pathway involved in color production in flower plants. In this study transformation of *F3H* gene in pJA8*F3H* plasmid which can stimulate the process of RNA interference (RNAi) and subsequently inhibits the expression of *F3H*, into lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) cv. Buntharik by particle bombardment was evaluated. After bombardment, 105 pieces of shoot clusters of lotus were selected on MS medium supplemented with 5µM BA and 10 mg/L glufosinate ammonium for 16 weeks. The results found that 27 pieces of shoot clusters survived (28.35%). And selection mature plants for existence detection gene 5 pieces. The PCR analysis of *F3H* gene was determined by primer *F3H* sense F and *F3H* sense R which specific to *F3H* gene of 308 nucleotides and *bar* gene was determined by primer *bar* gene F and *bar* gene R which specific to gene phosphinothricin-acetyl transferase (*bar* gene) of 430 nucleotides. The result found that existence of gene

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กรุงเทพฯ 10900

5 pieces total of 100 percent. The expression of *F3H* gene was detected by RT-PCR technique. The results showed that the expression of *F3H* gene reduced in transgenic plants comparing with the lotus non - transgenic plants.

Keywords: *flavanone 3-hydroxylase*, anthocyanin, RNA interference

บทนำ

บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gærtn.) เป็นพืชที่นับว่าเป็นสัญลักษณ์แห่งความดีงามในทางพระพุทธศาสนา ซึ่งนับตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันคนไทยยังนิยมนำดอกบัวมาใช้บูชาพระ (เสริมลาภ, 2547) ยากที่จะหาไม้ดอกชนิดอื่นมาทดแทนได้ บัวหลวงมีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (คณิตา, 2535) บัวหลวงเป็นไม้น้ำประเภทล้มลุก อายุหลายปี น้ำยางขาวเมื่อถูกอากาศจะเป็นเส้นใย เหง้าและไหลอยู่ใต้ดินโคลน ก้านใบยาวและแข็งชูขึ้นเหนือระดับผิวน้ำ ลักษณะใบเกือบกลม ขอบใบเป็นคลื่น ดอกเป็นดอกเดี่ยว กลีบดอกร่วงเร็ว ฐานรองดอกเป็นรูปกรวย (สุรเชษฐและปัญญา, 2535) สีของดอกไม้เป็นลักษณะที่ดึงดูดที่สุดของไม้ดอกไม้ประดับ และเป็นปัจจัยหลักในการกำหนดมูลค่าของดอกไม้ ในประเทศไทยมีบัวหลวงอยู่เพียง 2 สี คือ บัวหลวงพันธุ์ทริกลีขาวและบัวหลวงพันธุ์สีชมพู ดังนั้นการพัฒนาสีของดอกบัวหลวงให้มีสีที่แปลกและไม่เคยมีมาก่อนในธรรมชาติ จึงเป็นเป้าหมายหลักในการปรับปรุงพันธุ์ (คำรพ, 2553) ซึ่งสีของดอกไม้แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารสี (pigment) เช่น กลุ่มฟลาโวนอยด์ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และแอนโทไซยานิน เป็นสารกลุ่มหลักที่ให้สีแก่พืช มีโทนสีกว้างตั้งแต่สีเหลืองอ่อนจนถึงแดง ม่วงและน้ำเงิน (มณฑินี, 2550) ยีน *flavanone 3-hydroxylase* (*F3H*) เป็นยีนที่สำคัญในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ซึ่งให้สีในดอกไม้ต่างๆ (Qwens *et al.*, 2008) การถ่ายโอนชิ้นส่วนของยีน *F3H* ในเวกเตอร์ pCR8-*F3H* เข้าสู่เวกเตอร์ pJAWOHL8 (pJA8*F3H*) ด้วยปฏิกิริยา recombination reaction (LR) (ชัยวรกุล, 2555) โดยเวกเตอร์ pJAWOHL8 เป็นเวกเตอร์ที่สามารถสร้าง RNA รูปแบบ inverted repeat ในเวกเตอร์ pJA8*F3H* มียีนคัดเลือกในพืชคือ *phosphinothricin acetyl transferase* (bar gene) ซึ่งต้านทานต่อยากำจัดวัชพืช basta (glufosinate amonium) (Figure. 1) ได้จากแบคทีเรีย *Streptomyces hygroscopicus* (Daud *et al.*, 2009) ซึ่งเมื่อทำการถ่ายโอนยีน *F3H* เข้าสู่พืช จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi ยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ในพืช โดยทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมของยีน *F3H* มีผลไปขัดขวางการสังเคราะห์สารกลุ่มแอนโทไซยานินทำให้ดอกไม้มีสีขาว (Britsch *et al.*, 1992) ในขณะที่ Ono *et al.* (2006) ได้ศึกษาการถ่ายยีน 4'CGT และยีน AS ร่วมด้วยการยับยั้งการแสดงออกของยีน *dihydroflavonol 4-reductase* (*DFR*) ด้วยเทคนิค RNAi ผลคือดอกแวมยुरาเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของวิถีสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเปลี่ยนแปลงสีของดอกไม้ที่มีข้อจำกัดในการพัฒนาสายพันธุ์ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษายีน *flavanone 3-hydroxylase* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ภายหลังจากการถ่ายยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์พันธุ์บุณฑริก ด้วยวิธีการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค

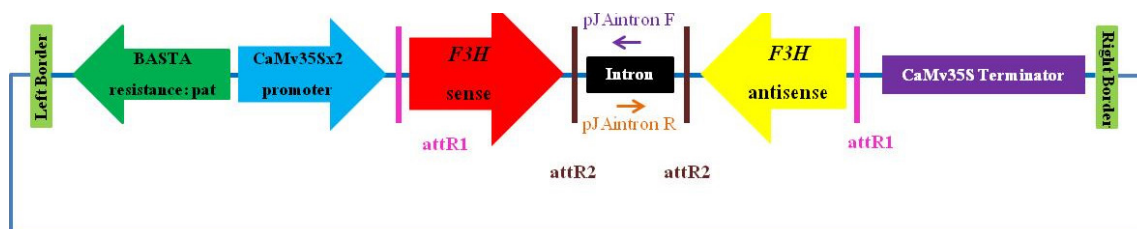


Figure 1 T-DNA of the pJA8*F3H* RNAi (*F3Hi*) plasmid construct containing bar gene and *F3Hi* gene under the control of the CaMV35S promoter (ชัยวรกุล 2555).

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การฟอกฆ่าเชื้อ

เก็บเมล็ดบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่มีความสมบูรณ์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม นำมาล้างน้ำให้สะอาดโดยใช้ น้ำยาล้างจาน (sodium lauryl ether sulfate 3.5 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นให้น้ำไหลผ่านเป็นเวลา 30 นาที นำเมล็ดบัวมา ฟอกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยคลอโรกซ์ 50 เปอร์เซ็นต์ (sodium hypochloride 3.5 เปอร์เซ็นต์) หยด Tween 2 หยด เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที 3 ครั้ง

2. การชักนำให้เกิดแคลลัสและยอด

นำเมล็ดบัวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดเอาชิ้นส่วนตายออกจากคัพภะให้มีขนาด 3 มิลลิเมตร จากนั้น เลี้ยงบนอาหาร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม Thidiazuron (TDZ) 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 เดือน เปลี่ยนอาหารทุกเดือน เพื่อชักนำให้เกิด แคลลัส จากนั้นย้ายลงในอาหาร MS ที่เติม Benzylaminopurine (BA) 50 ไมโครโมลาร์ (รวิฐ, 2554) โดยเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อชักนำให้เกิดยอดและเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน

3. การถ่ายยีน flavanone 3-hydroxylase (*F3H*) เข้าสู่พืชโดยเครื่องยิงอนุภาค

ทำการปรับสภาพ osmotic ของชิ้นส่วน shoot cluster โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม mannitol 2 โมลาร์ และ sorbitol 2 โมลาร์ ตัดกระดาศกรของรูปวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 2.5 เซนติเมตร วางไว้บนอาหาร แล้ว นำชิ้นส่วน shoot cluster 21 ชิ้นส่วนต่อจาน จำนวน 5 จาน รวมชิ้นส่วนทั้งหมด 105 ชิ้น วางไว้บนกระดาศกรของเป็น เวลา 12-24 ชั่วโมง ก่อนการถ่ายยีน จากนั้นถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาคทำตามวิธีของ Buathong *et al.* (2013) โดย เครื่องยิงอนุภาค แบบ PDS 1000/He (BioRad, USA) นำจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีชิ้นส่วน shoot cluster ของบัว หลวงมววางบนชั้นวางให้อยู่ห่างจากระดับยีนเป้าหมาย 9 เซนติเมตร จากนั้นปรับอากาศในตู้เลี้ยงเป็นสุญญากาศจนถึง ระดับ 26-28 นิ้วปรอท ใช้ความดันขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ในการยิงอนุภาค นำเนื้อเยื่อที่ผ่านการถ่ายยีนแล้ว มาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม BA 50 ไมโครโมลาร์ และ glufosinate ammonium 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 16 สัปดาห์ ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เลือกต้นบัวหลวงที่มีความสมบูรณ์สามารถเจริญเติบโตได้ ในอาหารคัดเลือก จำนวน 5 ต้น และต้นบัวหลวงปกติที่ไม่ได้ผ่านการถ่ายยีนมาทำการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน และ ตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่อไป

4. การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *F3H* และยีน *bar* gene ด้วยวิธีพีซีอาร์

4.1 การเตรียม DNA

เตรียมเนื้อเยื่อใบของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่ไม่ผ่านและผ่านการถ่ายโอนของเวกเตอร์ pJA8F3H 40-50 มิลลิกรัม บดละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวและสกัดแยก DNA ตามวิธีการของ Doyle and Dickson (1987) ละลายตะกอนด้วย TE-buffer นำไปตรวจสอบ ด้วยวิธีการ gel electrophoresis และวัดปริมาณและคุณภาพ DNA ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เก็บ DNA ที่เหลือที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.2 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *F3H* (flavanone 3-hydroxylase)

เพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *F3H* ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยใช้ DNA ปริมาณ 1 ไมโครลิตร สำหรับปฏิกิริยา พีซีอาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH_2O ปริมาตร 12.8 ไมโครลิตร, 10x Taq buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, MgCl_2 ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, forward primer (F3H sense F 5'- GAG AAG CTC CGG TTC GAC AT -3') ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, reverse primer (F3H sense R 5'- TAG TTC ACC ACC ATC TTC TGG -3') ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ 5 U Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร (Fermentas, USA) ทำปฏิกิริยาในเครื่องพีซีอาร์ (Biometra, Germany) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ, ที่ 94 องศาเซลเซียส 45

วินาที, 58 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 50 วินาที 35 รอบ และ ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ด้วยวิธีการ gel electrophoresis เปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

4.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนคัดเลือกในพืชคือ *phosphinothricin-acetyl transferase (bar gene)*

เพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *bar gene* ของบัวหลวงพันธุ์นุททริก โดยใช้ DNA ปริมาณ 1 ไมโครลิตร สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH_2O ปริมาตร 12.8 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, MgCl_2 ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, forward primer (*bar gene* F 5'- TTG ACC GTG CTT GTC TGC AT -3') ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, reverse primer (*bar gene* R 5'- AAG GCG GGA AAC GAC AAT CT -3') ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ 5 U *Taq* DNA polymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร (Fermentas, USA) ทำปฏิกิริยาในเครื่องพีซีอาร์ (Biometra, Germany) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ, ที่ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 58 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 50 วินาที 35 รอบ และ ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ด้วยวิธีการ gel electrophoresis เปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

5. การตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

5.1 การเตรียม RNA

เตรียมเนื้อเยื่อใบของบัวหลวงพันธุ์นุททริก ที่ไม่ผ่านและผ่านการถ่ายโอนของเวกเตอร์ pJA8F3H 100 มิลลิกรัม บดละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว และสกัดแยก RNA ตามวิธีการของ Invitrap® Spin Plant RNA Mini Kit (Stratag molecular, Germany) นำไปตรวจสอบ ด้วยวิธีการ gel electrophoresis เปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA) และวัดปริมาณและคุณภาพ RNA ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เก็บ RNA ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นการกำจัด DNA ออกจาก RNA โดยใช้เอนไซม์ *DNase I* ตามวิธีการของ Thermo scientific (thermoscientific, EU)

5.2 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) จาก RNA โดยเอนไซม์ reverse transcriptase

สังเคราะห์ cDNA โดยใช้ RNA ของบัวหลวงพันธุ์นุททริก ที่ไม่ผ่านและผ่านการถ่ายโอนของเวกเตอร์ pJA8F3H ตามวิธีการของ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, USA) โดยเตรียมปฏิกิริยา reverse transcription ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DEPC ปริมาตร 11.5 ไมโครลิตร, 5x buffer RT ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, dNTP ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, Oligo-dt primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 40 unit/μl Ribolock™ RNase Inhibitor ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 200 unit/μl RevertAid Reverse Transcriptase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ RNA ของบัวหลวง ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร ให้เข้ากันดีแล้วนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เก็บ cDNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5.3 การปรับความเข้มข้น cDNA เริ่มต้นให้เท่ากันด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง

ปรับความเข้มข้นของ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากเนื้อเยื่อบัวหลวงพันธุ์นุททริก ที่ไม่ผ่านและผ่านการถ่ายโอนของเวกเตอร์ pJA8F3H โดยการเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *18S rRNA* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ cDNA ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร เป็น DNA ต้นแบบ เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH_2O ปริมาตร 12.8 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, MgCl_2 ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, cDNA ของบัวหลวง ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 5 unit/μl *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร, forward primer (*18-SF* primer 5'- GGCTCGAAGACGATCAGATACCG-3') ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ reverse

primer (18-SF primer 5'GTACAAAGGGCAGGGACGTAGTCAA-3') ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมแล้วนำไปทำปฏิกิริยาดำเนินการด้วยเครื่องพีซีอาร์ โดยตั้งอุณหภูมิ 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที, 24 รอบ ที่ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 58 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 50 วินาที และ 1 รอบ ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ตรวจวัดขนาดและความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *18S rRNA* ด้วยวิธีการ gel electrophoresis เปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

5.4 การตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* (flavanone 3-hydroxylase)

สังเคราะห์ยีน *F3H* จาก cDNA ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยใช้ cDNA ปริมาณ 1 ไมโครลิตร สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH₂O ปริมาตร 12.8 ไมโครลิตร, 10x Taq buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, forward primer (F3H sense F 5'- GAG AAG CTC CGG TTC GAC AT -3') ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, reverse primer (F3H sense R 5'- TAG TTC ACC ACC ATC TTC TGG -3') ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ 5 U Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร (Fermentas, USA) ทำปฏิกิริยาในเครื่องพีซีอาร์ (Biometra, Germany) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ, ที่ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 58 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 50 วินาที 35 รอบ และที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ ตรวจวัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีการ gel electrophoresis เปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ภายหลังจากการถ่ายยีน *flavanone 3-hydroxylase* ด้วยเทคนิค RNAi เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ด้วยวิธีการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค โดยขึ้นส่วน shoot cluster ที่ทำการถ่ายโอนพลาสมิด 21 ชิ้นต่อจาน จำนวน 5 จาน รวมขึ้นส่วนทั้งหมด 105 ชิ้น จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการถ่ายยีนแล้วมาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม BA 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ glufosinate ammonium 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 16 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เมื่อพิจารณาผลของจำนวนยอดเฉลี่ยต่อขึ้นพบว่าในสัปดาห์ที่ 14 มีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อขึ้นมากที่สุด คือ 2.50 ± 0.65 ยอด ส่วนในสัปดาห์ที่ 2 มีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อขึ้นน้อยที่สุด คือ 1.90 ± 0.44 ยอด เมื่อพิจารณาผลของความยาวยอดเฉลี่ยต่อขึ้น พบว่าในสัปดาห์ที่ 14 มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด คือ 1.14 ± 0.23 เซนติเมตร ส่วนในสัปดาห์ที่ 2 มีความยาวยอดเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 0.82 ± 0.16 เซนติเมตร และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในสัปดาห์ที่ 2 มากที่สุด คือ 64.05 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในสัปดาห์ที่ 16 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยที่สุด คือ 28.35 เปอร์เซ็นต์ (Table 1)

Table 1 Average number of shoot, shoot length (cm), number of plant survival and percentage of plant survival after gene transformation by particle bombardment technique on MS supplemented with 50µM BA and 10mg/l glufosinate ammonium.

Weeks	2	4	6	8	10	12	14	16
Number of shoot	1.90 ± 0.44	2.24 ± 0.30	2.48 ± 0.39	2.18 ± 0.50	2.38 ± 0.33	2.35 ± 0.63	2.50 ± 0.65	2.47 ± 0.67
Shoot length(cm)	0.82 ± 0.16	0.83 ± 0.16	0.96 ± 0.13	0.97 ± 0.13	1.04 ± 0.13	1.13 ± 0.20	1.14 ± 0.23	1.20 ± 0.19
Plant survival	61	55	47	43	40	27	27	27
% Plant survival	64.05	57.77	49.35	45.15	42.00	28.35	28.35	28.35

¹⁴total number 105 pieces

ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *F3H* และยีน *bar* ด้วยวิธีพีซีอาร์

ภายหลังจากการถ่ายยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุญทริก ด้วยวิธีการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค เลือกต้นบัวหลวงที่มีความสมบูรณ์สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารคัดเลือกจำนวน 5 ต้น และต้นบัวหลวงปกติที่ไม่ได้ผ่านการถ่ายยีนมาสกัด DNA แล้วนำ DNA ที่ได้มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะยีน *F3H* และยีน *bar* ด้วยวิธีพีซีอาร์ จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

จากผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน ซึ่งพบการมีอยู่ของยีน *F3H* และยีน *bar* ทั้งหมดที่เลือกมา 5 ต้น คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ โดยการมีอยู่ของยีน *F3H* ด้วยชุดไพรเมอร์ *F3H* sense F และ *F3H* sense R ซึ่งมีความจำเพาะกับยีน *flavanone 3-hydroxylase (F3H)* พบว่าเกิดแถบ DNA 2 แถบ แถบด้านล่างเป็น primer dimer และแถบบนบน DNA ของยีน *F3H* ขนาด 308 คู่เบส ของต้นบัวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนโดยพลาสมิด ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบ DNA ที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pJA8F3H (Figure 2) ส่วนการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *bar* ด้วยชุดไพรเมอร์ *bar* gene F และ *bar* gene R ซึ่งมีความจำเพาะกับยีน *phosphinothricin-acetyl transferrase (bar gene)* เป็นยีนคัดเลือกในพืช พบว่าเกิดแถบ DNA ขนาด 430 คู่เบส ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนโดยพลาสมิด ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบ DNA ที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pJA8F3H ส่วนต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนโดยพลาสมิดไม่พบการมีอยู่ของยีน *bar* (Figure 3) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Malabadi and Nataraja. (2007) ได้ทำการทดลองถ่ายโอนพลาสมิด pAHC25 มียีนคัดเลือกยีน *bar* เข้าสู่ embryogenic ของต้นสน (*Pinus wallichiana*) ผลการทดลองพบว่าเมื่อนำไปทดสอบพีซีอาร์กับยีน *bar* พบมากถึง 52 เปอร์เซ็นต์ ในต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดพบชิ้นยีน *bar* ที่มีความยาว 430 คู่เบสเมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lohar *et al.* (2001) ได้ทำการถ่ายโอนพลาสมิด pTAB10 ซึ่งต้านทานต่อยีน *Phosphinothricin acetyl transferase (basta)* เข้าไปในต้นถั่ว *Lotus japonicas* โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ทดสอบโดยวิธี PCR ที่ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีน *bar* พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดพบชิ้นยีน *bar* ที่มีความยาว 310 คู่เบส สามารถเจริญได้ในอาหารคัดเลือกที่มีสารกำจัดวัชพืช basta ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

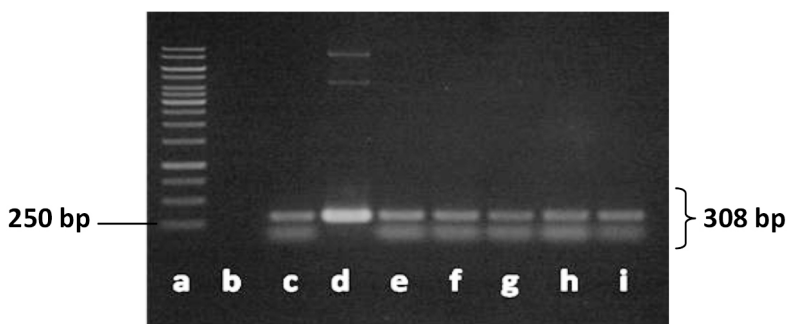


Figure 2 PCR analysis of the transformation plants by *F3H* specific primers (308bp) (a) marker 1 kb ladder; (b) no template; (c) control with non transformation plant; (d) positive control pJA8F3H plasmid; (e-i) transformant plants.

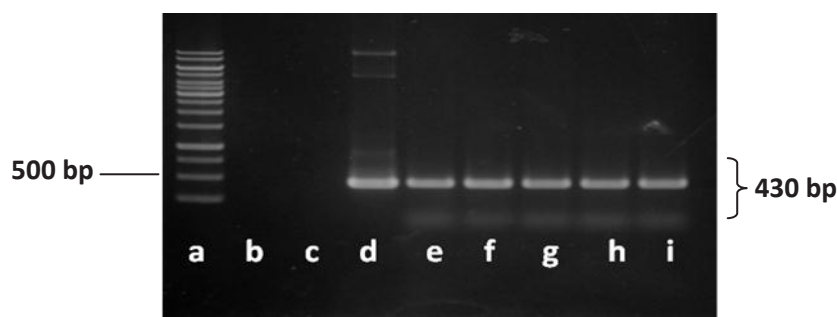


Figure 3 PCR analysis of the transformant plants by bar gene specific primers (430bp) (a) marker 1 kb ladder; (b) no template; (c) control with non transformation plant; (d) positive control pJA8F3H plasmid; (e-i) transformant plants.

ผลการตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

จากผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *F3H* และยีน *bar* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์แล้ว เพื่อเป็นการยืนยันการแสดงออกของยีน *F3H* จึงทำการตรวจสอบด้วยการใช้เทคนิค RT-PCR โดยการสกัด RNA ของบัวหลวงในต้นที่ได้รับการถ่ายยีนและต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน แล้วทำการเปลี่ยน mRNA เป็น complementary DNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นปรับความเข้มข้นของ cDNA เริ่มต้นให้เท่ากัน โดยเปรียบเทียบจากความเข้มของแถบ DNA ของยีน 18s rRNA ตรวจสอบด้วยวิธีการ gel electrophoresis จากนั้นนำ cDNA ที่ได้จากการปรับความเข้มข้นให้เท่ากันข้างต้นแล้วทำพีซีอาร์โดยใช้ cDNA เป็น DNA แม่แบบ ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะยีน *F3H* เพื่อตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *F3H* ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJA8F3H มีการแสดงออกที่ลดลงอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* อย่างมาก (Figure 4) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jiang *et al.* (2013) การศึกษาโครงสร้าง RNAi gene-silencing vector ที่มี *F3H* RNAi vector ฉีดเข้าไปในผลของสตอเบอร์รี่ภายหลังจากการปฏิสนธิ 14 วัน จากนั้นทำการทดสอบ RT-PCR ผลการทดลองได้แสดงว่ายีน *F3H* มีการลดลงประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับควบคุม และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nagamatsu *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *F3'H* ด้วยเทคนิค RNAi ในถั่วเหลือง (*Glycine max*) ทำการสกัด RNA จากส่วนของใบมาตรวจ โดยวิธี RT-PCR พบว่าต้นถั่วเหลืองที่ได้รับการถ่ายเวกเตอร์ CMV-A1:sF3'H1 (RNAi) มีการแสดงออกของยีน sF3'H1 ที่ลดลงและพบการสะสมของยีน sF3'H1 ที่เพิ่มขึ้นในต้นพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายของเวกเตอร์ซึ่งบ่งบอกได้ว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและเป็นเทคนิคที่ใช้การอย่างแพร่หลายในการสร้างพืชตัดแต่งพันธุกรรม



Figure 4 RT-PCR analysis of the transformant plants using the reference *18S rRNA* gene by *F3H* specific primers(308bp) (a) marker 1 kb ladder; (b) no template; (c) control with non transformant plants; (d-h) transformant plants.

สรุปผลการทดลอง

ผลการถ่ายยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์นพทรัก ด้วยวิธีการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค ขึ้นส่วน shoot cluster ทั้งหมด 105 ชิ้น ในสัปดาห์ที่ 16 พบว่าจำนวนต้นที่รอด 27 ต้น คิดเป็น 28.35 เปอร์เซ็นต์ จากผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *F3H* และยีน *bar* ที่เลือกมา 5 ต้น พบการมีอยู่ของยีนทั้งหมด 5 ต้น คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบยีน *F3H* เกิดแถบ DNA ขนาด 308 คู่เบส ของต้นบัวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนโดยพลาสมิด ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบ DNA ที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pJA8F3H ส่วนการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *bar* พบว่าเกิดแถบ DNA ขนาด 430 คู่เบส ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบ DNA ที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pJA8F3H ส่วนต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนโดยพลาสมิดไม่พบการมีอยู่ของยีน *bar* การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยวิธี RT-PCR ชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *F3H* ของบัวหลวงในต้นที่การถ่ายโอนเวกเตอร์ pJA8F3H มีการแสดงออกที่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* อย่างมาก

เอกสารอ้างอิง

- คณิดา เลขะกุล และคณะ. 2535. บัวราชินีแห่งแม่น้ำ: มุลนิธบัวหลวง ร. 9. ด้านสหภาพการพิมพ์: กรุงเทพฯ. คำพร รัตนสุด. 2553. วิศวกรรมเมแทบอลิกของสีดอกไม้วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 38(2): 171-181.
- ชัยวรกุล ไชยปัญญาทอง. 2555. “การโคลนยีน flavanone 3-hydroxylase (*F3H*) จากปทุมชาติ (*Nelumbo nucifera* Gaertn) และอชุลชาติ (*Nymphaea* spp.) และการสร้าง DNA สายผสมเพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNA interference.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- มณฑินี ชีวรักษ์. 2550. การผลิตไม้ดอกสีเหลืองโดยการเปลี่ยนวิถีสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์.วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 25: 95-102.
- รวีรุธ บัวทอง. 2554. “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยีน antisense ของ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์นพทรักโดยวิธียิงอนุภาค.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สุรเชษฐ จิตตะวิกุล และปัญญา โพธิ์ฐิตรัตน์. 2535. เทคนิคการปลูกบัว. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- เสริมลาภ วสุวัต และปริมลาภ ชูเกียรติมัน. 2547. บัวประดับในประเทศไทย 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. เนชั่นบุ๊คส์: กรุงเทพฯ.
- Britsch, L., B. Ruhnau-Brich, and G. Forkmann. 1992. Molecular cloning, sequence analysis, and *in vitro* expression of

- flavonone 3 beta-hydroxylase from *Petunia hybrid*. Journal of Biotechnology. Chem. 267: 5380-5387.
- Buathong, R., K. Saetiew, S. Phansiri, N. Parithawong and S. Arunyanart. 2013. Tissue culture and transormation of the antisense DFR gene into lotus (*Nelumbo nucifera* Gaerth.) through partice bombardment. Science Horticultural. 161: 216-222.
- Daud, M.K., M.T. Variath, S. Ali, M. Jamil, M.T. Khan, M. Shafi and Z. Shuijil. 2009. Genetic transformation of *Bar* Gene and its inheritance and segregation behavior in the resultant transgenic cotton germplasm (BR001). Journal of Biotechnology. 41(5): 2167-2178.
- Doyle, J. J and E. E. Dickson. 1987. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. Taxon. 36: 715-722.
- Jiang, F., W. Jia-Yi, J. Hai-Feng, J. Wen-Suo, W. Hong-Qing and X. Min. 2013. RNAi-Mediated siencing of the flavanone 3-hydroxylase gene and its effect on flavonoid biosynthesis in strawberry fruit. Journal Plant Growth Regulator. 32: 182-190.
- Lohar, D. P., K. Schuller, D. M. Buzas, P. M. Gresshoff and J. Stiller. 2001. Transformation of *Lotus japonicas* using the herbicide resistance *bar* gene as a selectable marker. Journal of Experimental Botany. 52: 1697-1702.
- Malabadi, R. B and K. Nataraja. 2007. Stable transformation and recovery of transgenic plant by particle bombardment in *Pinus wallichiana* A.B. Jacks (Himalayan Blue Pine). Biotechnology. 6(1): 105-111.
- Nagamatsu, A., C. Masuta, H. Matsuura, K. Kitamura, J. Abe and A. Kanazawa. 2009. Down regulation of flavonoid 3'-hydroxylase gene expression by virus-induced gene silencing in soybean reveals the presence of a threshold mRNA level associated with pigmentation in pubescence. Journal of Plant Physiology. 166: 32-39.
- Ono, E., M. Fukuchi-Mizutani, N. Nakamura, Y. Fukui, K. Yonekura-Sakakibara, M. Yamaguchi, T. Nakayama, T. Tanaka, T. Kusumi and Y. Tanaka. 2006. Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. Plant Biology. 103: 11075-110.
- Qwens, D.K., K.C. Crosby, J. Runac, B.A. Howard and B.S.J. Winkel. 2008. Biochemical and genetic characterization of *Arabidopsis* flavanone 3'-hydroxylase. Plant Molecular Biology. Biochem. 46: 833-843.