ประสิทธิภาพการถ่ายยีนพินีนซินเทสที่แยกจากมะกรูดเข้าสู่อะราบิดอปซิสด้วยอะโกรแบคทีเรียม

Efficiency of Agrobacterium transformation of pinene synthase gene isolated from kaffir lime in *Arabidopsis thaliana*

ภาวรรธน์ วงศ์คำไพร[1] กิตติยา แสงสว่าง[2] อัจราพร ศรีบุญเลิศ[2] และ พัฒนา ศรีฟ้า ฮุนเนอร์[2,3*]

Bhawat Wongkhamprai[1], Kittiya Sangsavang[2], Ajaraporn Sriboonlert[2] and Pattana Srifah Huehne[2,3*]

[1]*โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900*

[2]*ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900*

[3]*ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพฯ 10210*

[1]*Interdisciplinary Program in Genetic Engineering, The Graduate School, Kasetsart University, Bangkok 10900*

[2]*Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900*

[3]*Laboratory of Biotechnology, Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210*

******Corresponding author: fscipns@ku.ac.th*

บทคัดย่อ

เบตา-พินีนเป็นสารมอโนเทอร์พีน ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากผิวของผลมะกรูด (*Citrus hystrix*) ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำยีนพินีนซินเทส (*PNS*) ที่แยกได้จากมะกรูด มาเชื่อมเข้าเวคเตอร์ pCAMBIA1305.1 และถ่ายเข้าสู่อะราบิดอปซิส เพื่อตรวจสอบโครงสร้างของยีน โดยให้ยีน *PNS* ของมะกรูดเข้าไปแทนที่ยีน *uidA* (GUS) ทำให้การแสดงออกของยีน *PNS* ถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ CaMV35S ซึ่งอยู่ในเวคเตอร์ pCAMBIA1305.1 ที่มียีนต้านทานไฮโกรมัยซินเป็นยีนคัดเลือกในพืช หลังจากทดสอบระดับความเข้มข้นของไฮโกรมัยซินที่เหมาะสม จึงคัดเลือกอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์ที่มียีน *PNS* ซึ่งสร้างขึ้นโดยการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 และเพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2MS ที่มีไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 10 วัน แล้วเก็บเมล็ดจากอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์แต่ละต้นที่ผ่านการคัดเลือก โดยใช้ลักษณะความต้านทานต่อไฮโกรมัยซินในรุ่นที่ 1–4 (T0–T3) พบว่าการรอดชีวิตของอะราบิดอปซิสในรุ่น T0, T1, T2 และ T3 เพิ่มขึ้นด้วยอัตรา 0.27, 45.17, 70.65 และ 78.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *PNS* ของมะกรูดสามารถแทรกเข้าสู่โครโมโซมของอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์ทุกต้น เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยต้นอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์ที่ได้รับยีนนี้ จะนำไปศึกษาผลกระทบของผลผลิตของยีนต่อองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยของอะราบิดอปซิสต่อไป

ABSTRACT

β-pinene, a monoterpene, was found as a major component of an essential oil extracted from fruit peel of kaffir lime (*Citrus hystrix*) known as Makrut. In this study, the pinene synthase gene (*PNS*) previously cloned from kaffir lime was constructed into a plant expression vector, pCAMBIA1305.1, and transformed into *Arabidopsis thaliana*. The kaffir lime *PNS* was replaced *uidA* (GUS) gene which was driven by CaMV35S promoter in the pCAMBIA1305.1 vector containing hygromycin resistance gene. After testing for appropriate hygromycin concentration, the *PNS* transgenic Arabidopsis mediated by *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 were selected on 1/2MS containing 20 mg/l hygromycin for 10 days. The Arabidopsis seeds were collected from each transgenic lines of the 1st–4th generation (T0–T3) selected for hygromycin resistant. After selection, the percentage of seed survival of T0, T1, T2 and T3 transgenic Arabidopsis gradually increased at rate of

0.27, 45.17, 70.65 and 78.88, respectively. In addition, the kaffir lime *PNS* transgene was successfully integrated into the genome of all transgenic lines when detected by PCR. The obtained transgenic lines will be subjected to further study on the effects of this gene product to Arabidopsis essential oil components.

คำสำคัญ: น้ำมันหอมระเหย มะกรูด พินีน อะราบิดอปซิส อะโกรแบคทีเรียม

Keywords: essential oil, kaffir lime, pinene, Arabidopsis, Agrobacterium

บทนำ

ปัจจุบันมีสารสกัดจากธรรมชาติหลายชนิดที่นำมาทำน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ซึ่งมีประโยชน์มากต่ออุตสาหกรรมน้ำหอมและเครื่องสำอาง ข้อมูลจากกรมศุลกากรในปี พ.ศ. 2540 ระบุว่าในแต่ละปีประเทศไทยนำเข้าเครื่องหอมจากต่างประเทศ คิดเป็นมูลค่าไม่ต่ำกว่า 3,500 ล้านบาท (จำรัส และพิสสม, 2546) โดยทั่วไปน้ำมันหอมระเหยที่ซื้อขายในตลาด ผลิตจากพืชและดอกไม้ที่มีกลิ่นหอม เช่น ดอกแก้ว ดอกโมก ดอกกล้วยไม้ มะกรูด และตะไคร้หอม ด้วยความต้องการของตลาดมีแนวโน้มจะเพิ่มสูงขึ้น อุตสาหกรรมสารสกัดจากธรรมชาติจึงมีการเติบโตอย่างรวดเร็วและแพร่หลาย การค้นหาแหล่งของพืชที่มีกลิ่นหอมใหม่ๆ โดยเฉพาะพืชสมุนไพรไทยหลายชนิด ถือได้ว่าช่วยเสริมการพัฒนาตลาดเครื่องหอมเพื่อใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรม มะกรูดเป็นพืชหนึ่งที่ได้รับความสนใจในการใช้เป็นแหล่งผลิตน้ำมันหอมระเหย องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของน้ำมันหอมระเหยในมะกรูด คือ พินีน (pinene), ซาบินีน (sabinene), ลิโมนีน (limonene), ซิโทรเนลลอล (citronellal) และ เทอร์พินีนโฟร์ออล (terpinen-4-ol) (สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2548) สารเบตา-พินีนเป็นสารองค์ประกอบหลัก ที่มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหยสกัดจากผิวมะกรูดถึงร้อยละ 30.6 (นิจศิริ และพะยอม, 2532) และร้อยละ 21.4 ในกลิ่นหอมที่ระเหยออกมาจากผิวมะกรูด (กิตติยา, 2553) น้ำมันใบมะกรูดมีฤทธิ์ไล่ยุง ต้านเชื้ออะมีบา และน้ำมันผิวมะกรูดมีฤทธิ์ฆ่าแมลง (สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2548) นอกจากนี้ มีการนำสารเคมีพวกพินีน ซาบินีน ลิโมนีน และ ซิโทรเนลลอล มาใช้แต่งกลิ่นรสอาหาร เป็นส่วนประกอบของยา และเครื่องสำอาง ช่วยทำให้สดชื่นและคลายกังวล (สิริลักษณ์, 2545) การนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ศึกษายีน และวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกลิ่นในมะกรูด เป็นแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ต้องการด้วยระยะเวลาสั้น ดังจะเห็นได้จากการทดลองของ LÜcker *et al*. (2004) ได้ถ่ายยีนพินีนซินเทส (pinene synthase; *PNS*) ของมะนาวเข้าสู่ยาสูบด้วยอะโกรแบคทีเรียม พบว่าดอกยาสูบแปลงพันธุ์ปลดปล่อยสารพินีนเพิ่มมากขึ้น กิตติยา (2553) โคลนยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ PNS ที่อยู่ในวิถีการสร้างสารเทอร์พีนอยด์พวกมอโนเทอร์พีนจากมะกรูดในประเทศไทย สำหรับงานวิจัยนี้ได้สร้างพลาสมิดสายผสมของยีน *PNS* ที่แยกได้จากมะกรูดตัดต่อเข้าเวคเตอร์พืช และถ่ายยีนเข้าสู่อะราบิดอบซิสซึ่งเป็นพืชโมเดล เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการถ่ายยีนและโครงสร้างยีน *PNS* ที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนเข้าพืช ซึ่งโครงสร้างของยีนที่ได้สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชสำคัญทางเศรษฐกิจด้านน้ำมันหอมระเหยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมอะราบิดอปซิสและทดสอบระดับความเข้มข้นของไฮโกรมัยซิน

ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดอะราบิดอปซิส (*Arabidopsis thaliana*) พันธุ์ Columbia ด้วยเอทานอล 70% เป็นเวลา 15 นาที และฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 15 นาที และล้างด้วยน้ำ deionize (dH_2O) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดวางบนอาหาร 1/2 MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 0, 20, 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกปริมาณการอยู่รอดของอะราบิดอปซิส สำหรับการเตรียมอะราบิดอปซิสเพื่อการถ่ายยีน นำเมล็ดอะราบิดอปซิสที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาวางบนอาหาร 1/2 MS เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ย้ายต้นกล้าลงปลูกในกระบะที่บรรจุพีทมอสเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 45 วัน

การตัดต่อและเชื่อมยีน *PNS* กับไบนารีเวคเตอร์

นำพลาสมิด pPNS4 ที่มียีน *PNS* ของมะกรูดขนาด 1,809 คู่เบส (ได้รับการอนุเคราะห์จาก กิตติยา แสงสว่าง) มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *PNS* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 400 PNS-*Spe*I (5'-GTAGATCTGACTAGTATCTCTTAATCTG-3') กับ 401 PNS-*Eco*RV (5' TCAGATATCTTAAGCAATGATT 3') ความเข้มข้น 25 pmole อย่างละ 0.4 ไมโครลิตร ในสารละลายที่มี 10x Pfu buffer ที่มี 20 mM $MgSO_4$ 2.5 ไมโครลิตร 0.2 mM dNTPs 0.5 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase (2.5 unit) (Fermentas, แคนาดา) 0.5 ไมโครลิตร DMSO 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำให้มีปริมาตรรวมเป็น 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำส่วนผสมที่ได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Mastercycler® gradient (Eppendorf, เยอรมัน) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตราฐาน

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN สหรัฐอเมริกา) ตัดดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอนไซม์ *Spe*I และ *Eco*RV และ นำไบนารีเวคเตอร์ pCAMBIA-1305.1 มาตัดด้วยเอนไซม์ *Spe*I และ *Pml*I เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอและเวคเตอร์ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase และถ่ายเข้าสู่ *Escherichia coli* ด้วยวิธี $CaCl_2$ heat shock transformation ตามวิธีของ Sambrook *et al*. (1989) ตรวจสอบโคลนด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 187 CaMV35S (5'-GATGTGATATCTCCACTGACG-3') กับ 188 NOS (5'-GAGGATTCAATCTTAAGAAACTT-3') ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen (เกาหลีใต้)

การนำพลาสมิดเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมโดยวิธี electroporation

เตรียมเซลล์คอมพิเทนต์ของอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA 105 ตามวิธีของ Xiuren *et al.* (2006) ผสมอะโกรแบคทีเรียม (1 x 10^{10} cells/ml) กับพลาสมิด 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ให้เข้ากันแล้วดูดใส่ในคูเวตต์ ขนาด 0.1 เซนติเมตร (Biorad, แคนาดา) ที่แช่เย็น ให้กระแสไฟฟ้าด้วยเครื่อง electroporator (Eppendorf, เยอรมัน) โดยใช้ electrical pulse ของ capacitance 25 μF 2.5 kV และ resistance 200 Ohm ระยะเวลาที่ใช้อยู่ในช่วง 4-5 มิลลิวินาที หลังการให้กระแสไฟฟ้านำหลอดแช่น้ำแข็งทันที เติม LB 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง นำเซลล์เกลี่ยบนจานอาหาร LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินและไรแฟมพิซิน ที่มีความเข้มข้นอย่างละ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำโคโลนีที่เจริญได้ไปตรวจสอบผลด้วยวิธีพีซีอาร์ และตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RI

การถ่ายยีนเข้าอะราบิดอปซิสด้วยวิธี floral dip

เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่มีพลาสมิดของยีน *PNS* ในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินและไรแฟมพิซิน ที่มีความเข้มข้นอย่างละ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืด จนมีค่า OD_{600} เท่ากับ 2 ละลายตะกอนเซลล์ในสารละลายซูโครสความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสม Tween-20 เข้มข้น 0.03 เปอร์เซ็นต์ นำดอกอะราบิดอปซิสมาแช่ในสารละลายนาน 10 วินาที แล้วเก็บไว้ในที่มืด 16-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จนกระทั่งติดเมล็ด เก็บเมล็ดอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์ที่ได้มาฟอกฆ่าเชื้อดังที่กล่าวมาข้างต้น และเพาะบนอาหาร 1/2MS ที่ผสมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน แล้วนำต้นที่เจริญบนอาหารเพาะลงพีทมอสเพื่อตรวจสอบผลการถ่ายยีน

การตรวจสอบยีนที่ถ่ายเข้าอะราบิดอปซิสด้วยวิธีพีซีอาร์

สกัดดีเอ็นเอจากใบอะราบิดอปซิสหนัก 100 มิลลิกรัม ด้วยวิธีการตามคำแนะนำของ Sabai Kit (BSU, กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี) นำดีเอ็นเอมาตรวจสอบยีน *PNS* ที่ถ่ายเข้าพืชด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ใช้คู่ไพรเมอร์ระหว่างโปรโมเตอร์กับยีน คือ 187 CaMV35S และ 367 PNS 5'Pin (5' AGTAGCGTCCCATCTCTCAA 3') เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สภาวะดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 60 วินาที 55 องศาเซลเซียส 60 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที จำนวน 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยวิธีวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสในเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลอง

ระดับความเข้มข้นของไฮโกรมัยซินที่มีผลต่ออะราบิดอปซิส

สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินทุกความเข้มข้น คือ 20, 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อการเจริญเติบโตของอะราบิดอปซิส พันธุ์ Columbia โดยพบว่าอะราบิดอปซิสชะลอการงอกและลดอัตราการเจริญนับตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเมล็ดบนอาหาร 1/2MS ที่ผสมไฮโกรมัยซิน และเมื่อปลูกเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ต้นอะราบิดอปซิสบนอาหารที่มีไฮโกรมัยซินทุกความเข้มข้นตายทั้งหมด อย่างไรก็ตามอัตราการอยู่รอดของอะราบิดอปซิสที่เพาะบนอาหาร 1/2MS ที่ผสมไฮโกรมัยซิน 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความใกล้เคียงกัน ดัง Figure 1 และ Table 1 เมื่อเพาะเมล็ดอะราบิดอปซิสบน อาหาร 1/2MS ที่ปลอดสารปฏิชีวนะ เป็นเวลา 10 วัน พบว่าอะราบิดอปซิสเริ่มมีใบเลี้ยง 2 ใบ เมื่อย้ายปลูกบนพีทมอส หลังจากนั้น 6 สัปดาห์ อะราบิดอปซิสเริ่มมีดอกพร้อมสำหรับการถ่ายยีน

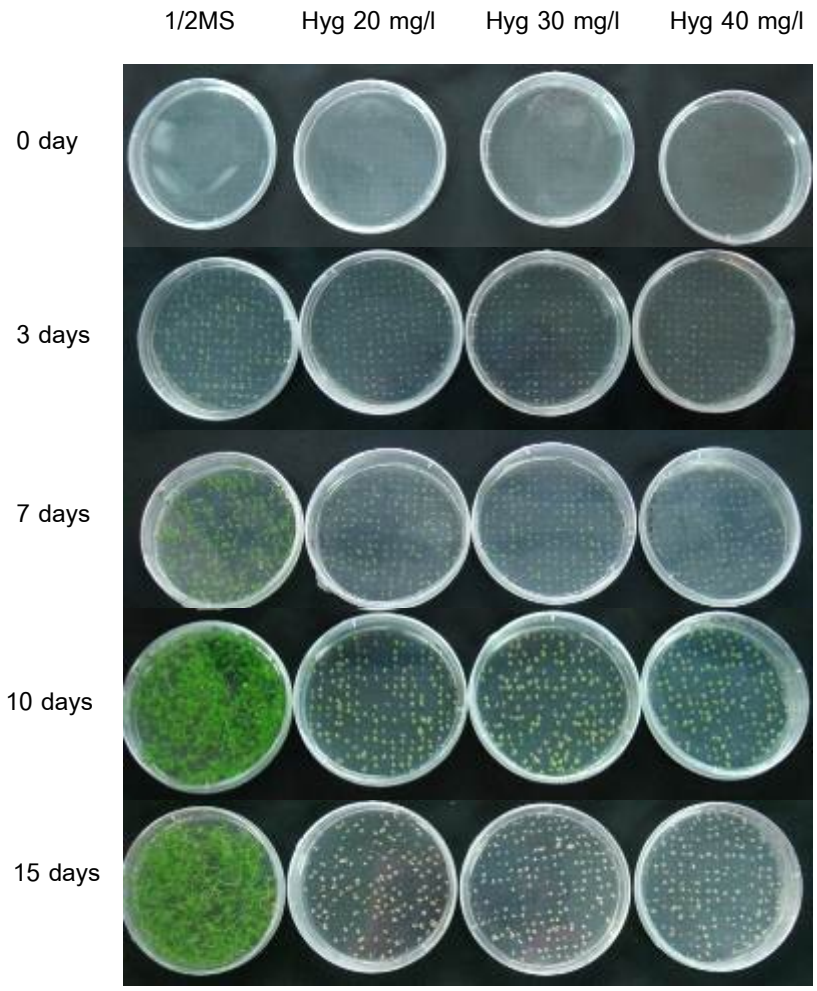

Figure 1 Effects of 0-40 mg/l hygromycin B (Hyg) on the growth of *A. thaliana* seedlings.

Table 1 Variation of hygromycin B (Hyg) concentration affecting *A. thaliana* seedling survival.

Hyg mg/l	% Survival				
	0 day	3 days	7 days	10 days	15 days
0	100	100	100	100	100
20	100	66.5	50.25	34.25	0
30	100	63.25	45.25	26.25	0
40	100	52.25	27.25	0	0

การตัดต่อยีน *PNS* เข้าเวคเตอร์ pCAMBIA1305.1

ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของยีน *PNS* ของมะกรูดที่ได้จากพลาสมิด pPNS4 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ คือ 1.8 กิโลเบส เมื่อเชื่อมเข้ากับเวคตอร์ pCAMBIA1305.1 ขนาด 11.8 กิโลเบส แล้วนำเข้าสู่ *E. coli* ได้คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว 3 โคลน นำโคลนที่ได้ไปตรวจสอบยีน *PNS* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 187 CaMV35S และ 188 NOS แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์มาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.6 และ 0.4 กิโลเบส และ *Eco*RI พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1.5 และ 0.5 กิโลเบส อย่างถูกต้อง เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับพืชชนิดอื่น พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PNS* ของมะกรูด มีความเหมือนกับยีน *PNS* ของพืชตระกูลส้ม มากกว่า 95% (Table 2) แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดที่ได้มียีนและการตัดต่อที่ถูกต้อง ดังแสดงใน Figure 2 และได้ตั้งชื่อพลาสมิดที่ได้ว่า pPink26 จากนั้นนำพลาสมิดถ่ายเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียม

Table 2 Percentage of nucleotide and amino acid identities between kaffir lime pinene synthase gene and other related genes.

Accession #	Plant species	size (bp)	% nucleotide Identity	% amino acid Identity
HQ636424	*Citrus hystrix*	888	99	91
AF514288	*Citrus limon*	888	96	85
AB266585	*Citrus jambhiri*	889	96	93
AB110641	*Citrus unshiu*	889	96	85
AB110640	*Citrus unshiu*	889	96	82

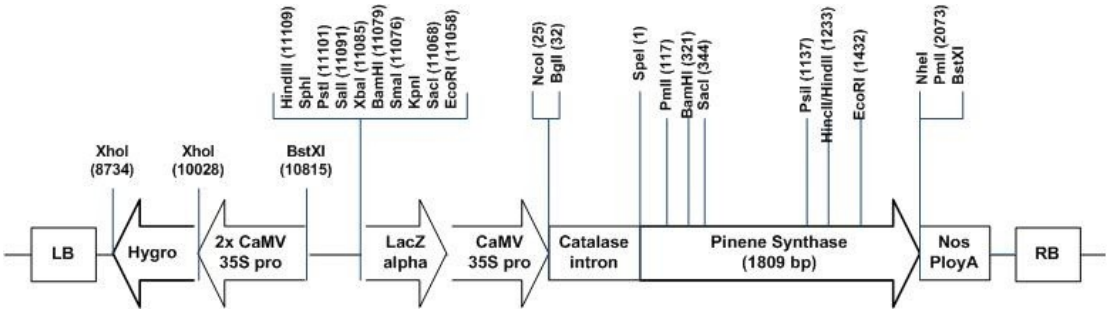

Figure 2 Pinene synthase gene construction of pPink26 for *Agrobacterium* transformation from backbone of pCAMBIA1305.1.

หลังจากนำพลาสมิด pPink26 (Figure 2) ถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Agrobacterium tumefacien* EHA105 ด้วยวิธี electroporation คัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับพลาสมิดสายผสมบนอาหารสูตร LA ที่ผสมกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สุ่มโคลน 23-26 มาตรวจสอบยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์คู่ 400 PNS-SpeI และ 401 PNS-PmlI ได้ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *PNS* ขนาด 1.8 กิโลเบส และเมื่อตรวจสอบยีนและโปรโมเตอร์ CaMV35S และเทอร์มิเนเตอร์ NOS ด้วยไพรเมอร์ 187 CaMV35S และ 188 NOS พบแถบดีเอ็นเอขนาด 2.3 กิโลเบส ซึ่งมีความถูกต้องตรงตามที่คาดหวัง (Figure 3) จึงนำอะโกรแบคทีเรียมที่มียีน *PNS* ของมะกรูด และยีนคัดเลือกไฮโกรมัยซินถ่ายเข้าอะราบิดอปซิส

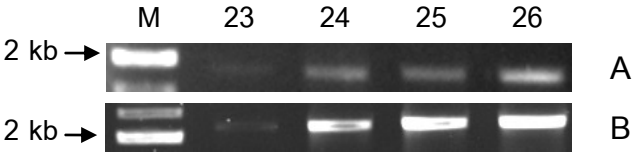

Figure 3 Detection of pinene synthase gene in Agrobacterium clones 23-26 by PCR. (A) 1.8 kb DNA fragment was amplified using 400 PNS-SpeI and 401 PNS-PmlI primers and (B) 2.3 kb DNA fragment amplified using 87 CaMV35S and 188 NOS primers.

ประสิทธิภาพของการถ่ายยีน

หลังจากเลี้ยงอะโกรแบคทีเรียมที่มีพลาสมิด pPink26 (pCaMV35S:*PNS*:Nos) จนมีความเข้มข้น OD_{600} เท่ากับ 2 และถ่ายเข้าสู่ดอกอะราบิดอปซิส อายุ 6 สัปดาห์แล้ว จึงคัดเลือกอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์บนอาหารสังเคราะห์ 1/2MS ที่ผสมไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เวลาคัดเลือกนาน 10 วัน พบว่าอะราบิดอปซิสที่ได้รับพลาสมิด pPink26 มีการเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นต้นได้เมื่อย้ายลงปลูกบนพีทมอสเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าอัตราการเจริญ ลักษณะลำต้น และใบ ของอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์ และต้นอะราบิดอปซิสที่รับพลาสมิด pCAMBIA1305.1 (pCaMV35S:*GUS*:Nos) และอะราบิดอปซิสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน มีลักษณะโดยทั่วไปไม่แตกต่างกัน (Figure 4)

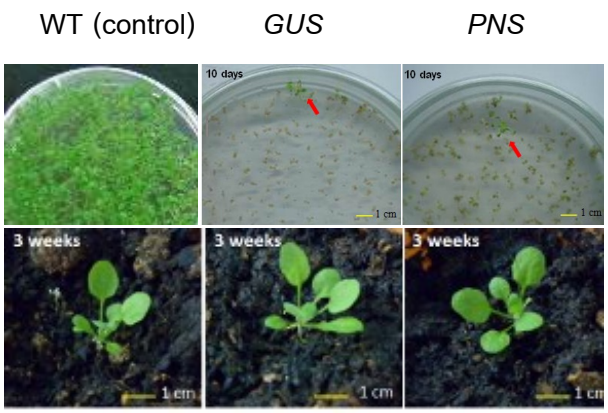

Figure 4 Growth of transgenic Arabidopsis plants transformed with either pCAMBIA1305.1 (*GUS*) or pPINK26 (*PNS*) in comparison with wild type plant. See color figure on the journal website.

หลังจากอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์เริ่มให้ฝักและติดเมล็ด (5 สัปดาห์) เก็บเมล็ดจากต้นอะราบิดอปซิส (T0) มาเพาะบนอาหารสังเคราะห์ 1/2MS ที่ผสมไฮโกรมัยซิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนับจำนวนต้นที่อยู่รอด ก่อนย้ายไปปลูกเดี่ยวในกระบะพีทมอส จากนั้นผสมตัวเองจนได้เมล็ดของอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์รุ่นที่ 1 (T1) คัดเลือกต้นที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน ผสมและคัดเลือกจนได้เมล็ดจากอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์รุ่นที่ 2 (T2) ผสมตัวเองอีกครั้งจนได้รุ่นที่ 3 (T3) จากการตรวจสอบอัตราการรอดของอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์ในแต่ละรุ่น พบว่าอัตราการรอดในรุ่น T0, T1, T2 และ T3 เพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 0.27, 45.17, 70.65, 78.88 ตามลำดับ (Table 3)

การตรวจสอบยีน *PNS* ของมะกรูดที่ถ่ายเข้าอะราบิดอปซิสด้วยวิธีพีซีอาร์

สกัดดีเอ็นเอจากใบอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์รุ่น T0, T1, T2 และT3 และตรวจสอบยีน *PNS* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 187 CaMV35S และ 367 5'PNS (5' AGTAGCGTCCCATCTCTCAA 3') เปรียบเทียบกับพลาสมิด pPink26 (positive control) พบแถบดีเอ็นเอของยีน

PNS ที่สังเคราะห์ได้ขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส เท่ากับขนาดของยีน *PNS* ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ของพลาสมิด pPink26 (Figure 5) แสดงให้เห็นว่าอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกและตรวจสอบ ต่างได้รับยีน *PNS* ของมะกรูดที่อยู่ในพลาสมิด pPink26 ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยอะโกรแบคทีเรียม

Table 3 Transformation efficiency of T0-T3 Arabidopsis explants on 1/2MS medium containing 20 mg/l hygromycin.

	Test/Total clones	#Tested seeds	% Survival
T0	2/2	750	0.27
T1	5/402	890	45.17
T2	10/1242	1758	70.65
T3	25/2558	3243	78.88

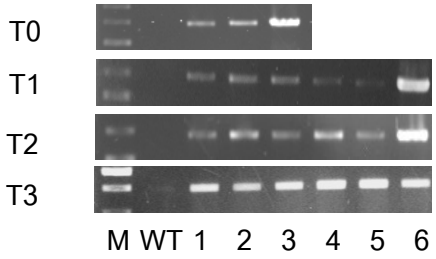

Figure 5 PCR detection of *PNS* gene to identify each of transgenic Arabidopsis lines (lane 1-5) in 4 generations (T0-T3) and wild type (WT) using pPink26 as positive control (lane 6).

วิจารณ์ผลการทดลอง

การสร้างพลาสมิดสายผสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าพืช pPink26 ประกอบด้วยยีนพินีนซินเทส ที่แยกจากผิวมะกรูด (กิตติยา, 2553) ทำโดยนำยีน *PNS* ของมะกรูดมาเชื่อมเข้ากับเวคเตอร์ pCAMBIA1305.1 โดยกำหนดให้ยีน *PNS* แทนที่ยีน *uidA* (GUS) ดังนั้นยีน *PNS* นี้จะถูกควบคุมการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอด้วยโปรโมเตอร์ CaMV35S และหยุดการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอด้วย NOS terminator และเวคเตอร์ชนิดนี้ยังประกอบด้วย ยีนคัดเลือกที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน อย่างไรก็ตาม ลักษณะทางพันธุกรรมของพืชมีอิทธิพลต่อระบบการคัดเลือก ดังนั้นการทดสอบปริมาณความเข้มข้นของไฮโกรมัยซิน ต่อการตายของอะราบิดอปซิสจึงนับว่ามีความสำคัญ จากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า ความเข้มข้นของไฮโกรมัยซินระดับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถฆ่าอะราบิดอปซิสได้ภายใน 10 วัน โดย Hongying and Xiaosheng (2007) ได้รายงานว่าไฮโกรมัยซินมีผลต่อการเจริญของราก และใบเลี้ยงของอะราบิดอปซิส โดยที่ไฮโกรมัยซินจะไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ที่มีผลต่อการเจริญของรากในคลอโรพลาสต์และไมโทรคอนเดรีย (Hongying *et al*., 2011)

ถึงแม้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนในครั้งนี้จะต่ำเพียง 0.27% ในอัตราการมีชีวิตรอดของเมล็ดในรุ่น T0 (Table 3) แต่เมื่อผสมตัวเอง อัตราการมีชีวิตรอดของเมล็ดในลูกรุ่น T1-T3 เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงระดับ 78.88% แสดงว่าการแทรกของยีนในโครโมโซมเกิดขึ้นแบบถาวร โดยยืนยันผลจากการตรวจสอบยีน *PNS* ที่ต่อเข้ากับโปรโมเตอร์ CaMV35S ด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าวด้วยวิธีพีซีอาร์ เปรียบเทียบกับอะราบิดอปซิสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน พบอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์ที่ต้านทานต่อไฮโกรมัยซินทุกต้นที่สุ่มมาทดลอง มียีน *PNS* ของมะกรูด (Figure 5) นอกจากนี้เทคนิคในการถ่ายยีนก็มีส่วนเสริมประสิทธิภาพของการถ่ายยีน วิธีการถ่ายยีนที่ใช้ในการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Xiuren *et al.* (2006) ในด้านปริมาณเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่ใช้ นอกจากนี้ส่วนประกอบของสารละลายน้ำตาลซูโครส และ Tween20 ที่ใช้ในขณะถ่ายยีนมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับรายงานของ Steven and Andrew (1998) ที่ใช้ Silwet-77 ซึ่งทำให้อัตราการมีชีวิตรอดของเมล็ดคิดเป็นร้อยละ 0.3 ระยะเวลาในการถ่ายยีนเข้าสู่ดอกอะราบิดอปซิสในงานวิจัยนี้คือ 10 วินาที สอดคล้องกับรายงานของ Logeman *et al.* (2006) และ Xiuren *et al.* (2006) ซึ่งต่างจากรายงานของ Steven and Andrew (1998) ที่ใช้เวลาจุ่มดอกลงในเชื้ออะโกรแบคทีเรียมเพียง 3-5 วินาที ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม

การทดลองในครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการสร้างพลาสมิดสายผสมชื่อ pPink26 โดยมี เวคเตอร์ pCAMBIA1305.1 เป็นแกนหลัก เมื่อนำ pPink26 ถ่ายเข้าอะราบิดอปซิสโดยการส่งผ่านยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 พบการแทรกตัวของยีนแบบถาวร โดยยีนเข้าไปอยู่ในโครโมโซมของอะราบิดอปซิสแปลงพันธุ์ทุกต้น และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ ดังนั้นพลาสมิดสายผสม pPink26 ที่สร้างได้ เหมาะสำหรับการนำไปใช้ในการถ่ายยีนเข้าพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2553 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และทุนวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

กิตติยา แสงสว่าง. 2553. *การโคลนยีนเทอร์ปีนซินเทสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกลิ่นของตะไคร้หอม และมะกรูด*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

จำรัส เซ็นนิล และ พิสสม มะลิสุวรรณ. 2546. *หอมระเหย...ศาสตร์แห่งการบำบัด*. สำนักพิมพ์อมรินทร์บุ๊คส์เซ็นเตอร์ กรุงเทพฯ

นิจศิริ เรืองศิริ และ พะยอม ตันติวัตน์. 2532. *พืชสมุนไพร*. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ

สถาบันวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2548. *น้ำมันหอมระเหยไทย*. สำนักพิมพ์ซีเอ็ดยูเคชั่น. กรุงเทพฯ. น. 55-69.

สิริลักษณ์ มาลานิยม. 2545. *สมอ.สาร*. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กรุงเทพฯ. น. 2.

Logeman, E., Rainer, P.B., Bekir, Ü. and Imre, E.S. 2006. An improved method for preparing *Agrobacterium* cells that simplifies the *Arabidopsis* transformation protocol. *Plant Methods*. 2: 16.

Lücker, J., Schwab, W., Franssen, M.C.R., Van Der Plas, L.H.W., Bouwmeester, H.J. and Verhoeven, H.A. 2004. Metabolic engineering of monoterpene biosynthesis: two-step production of (+)-trans-isopiperitenol by tobacco. *Plant J.* 39: 135–145.

Hongying, D. and Xiaosheng, D. 2007. Effect of hygromycin on growth and development of *Arabidopsis* seedling roots. *Pak. J. Bot*. 39: 2167–2173.

Hongying, D., Xiaosheng, D., Zhiqing, W., Chune, Z. and Yanqing, Z. 2011. The influences of hygromycin B on growth of *Arabidopsis thaliana* cotyledon and leaf. *Afr. J. Biotechnol*. 10: 17742–17747.

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

Sambrook, J., Fritsch, E.D. and Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Steven, J.C. and Andrew, F.B. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 16:735–743.

Xiuren Z., Rossana H., Shih-S. L., Qi-W.N. and Nam-H.C. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat. Protoc*. 1: 641–646.