รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : แผนงานวิจัยการควบคุมอาการไส้สีน้ำตาลในสับปะรดผลสดพันธุ์ตราดสีทอง

2. โครงการวิจัย : การศึกษากลไกควบคุมการทำงานของยีนสังเคราะห์เอนไซม์ PPO ต่อการเกิดอาการไส้สีน้ำตาลในสับปะรดผลสดพันธุ์ตราดสีทองโดยเทคนิค Antisense Gene Knockdown

กิจกรรม : การศึกษากลไกควบคุมการทำงานของยีนสังเคราะห์เอนไซม์ PPO ต่อการเกิดอาการไส้สีน้ำตาลในสับปะรดผลสดพันธุ์ตราดสีทองโดยเทคนิค Antisense Gene Knockdown

กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การศึกษากลไกควบคุมการทำงานของยีนสังเคราะห์เอนไซม์ PPO ต่อการเกิดอาการไส้สีน้ำตาลในสับปะรดผลสดพันธุ์ตราดสีทองโดยเทคนิค Antisense Gene Knockdown

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Study of PPO Gene Expression Regulating Internal Browning in Pineapple cv. 'Trad-See-Thong' Using Antisense Gene Knockdown Approach

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นายพงศกร สรรค์วิทยากุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : นางสาววรางคณา มากกำไร[1]
นางสาววีรา คล้ายพุก[1]
นางสาวหยกทิพย์ สุดารีย์[1]
นางสาวอุทัยวรรณ ทรัพย์แก้ว[1]

5. บทคัดย่อ

ปัญหาสำคัญที่เกิดกับผลสับปะรดผลสดเกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลานาน เช่น การขนส่งทางเรือหรือห้องเย็น ทำให้เกิด อาการไส้สีน้ำตาล ทำให้เกิดปัญหาเรื่องราคาและคุณภาพซึ่งต้องแข่งขันกับประเทศอื่น สับปะรดพันธุ์ตราดสีทอง มีคุณสมบัติที่ดี ทั้งเรื่องรสชาติและสีสันแต่มีปัญหาเรื่องไส้สีน้ำตาลที่เกิดขึ้นระหว่างการขนส่งรุนแรงมาก หากว่าสามารถแก้ในเรื่องอาการไส้สีน้ำตาลได้จะช่วยส่งเสริมการส่งออกให้เกษตรกรและผู้ประกอบการสามารถขยายตลาดการส่งออกและเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตร ในงานวิจัยนี้ เป็นการทดลองโคลนชิ้นยีน PPO1 และ PPO2 จากสับปะรดพันธุ์ตราดสีทองแล้วตัดต่อเข้าสู่ เวคเตอร์ pRNAi-GG และ

[1] สถาบันวิจัยพืชสวน

ถ่ายเวคเตอร์ที่ได้รับการตัดต่อแล้วทั้ง 2 ชนิด เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมชนิด AGL1 ได้ Transformant 2 ชนิดซึ่งพร้อมสำหรับใช้ถ่ายยีนเพื่อสร้างระบบ Silencing ยีน PPO1/2 คือ AGL1 PPO1_RNAi-GG และ AGL1 PPO2_RNAi-GG นำ Transfomant ทั้ง 2 ชนิด Inoculate แบบฉีดโดยตรงเข้าสู่ผลสับปะรดพันธุ์ตราดสีทองที่พร้อมเก็บเกี่ยวส่งขาย บ่มเชื้อไว้ 1 คืน ที่ 28°C จากนั้นเก็บผลสับปะรดที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนแล้วเข้าห้องเย็น 15°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ – 3 สัปดาห์ พบว่าผลสับปะรดที่ได้รับการ Inoculate แบบฉีดโดยตรงโดย AGL1 PPO2_RNAi-GG มีอาการไส้สีน้ำตาลลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ดีผลสับปะรดที่ได้รับการ Inoculate แบบฉีดโดยตรงโดย AGL1 PPO1_RNAi-GG เกิดอาการไส้สีน้ำตาลเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมโดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จึงสามารถสรุปได้ได้ว่ายีน PPO2 อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับอาการไส้สีน้ำตาลที่รุนแรงในสับปะรดพันธุ์ตราดสีทองและสามารถวิจัยและพัฒนาต่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์สับปะรดพันธุ์ตาดสีทองต่อไปได้

6. คำนำ

สับปะรด (*Ananas comosus*) เป็นพืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนมีแหล่งกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกาใต้สำหรับประเทศไทยมีการปลูกสับปะรดกระจายอยู่ทั่วไปมานานแล้วแต่มีปริมาณไม่มากนักโดยมีแหล่งปลูกที่สำคัญคือ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี ระยอง และชุมพร สับปะรดเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งภายในประเทศและต่างประเทศไทย ประเทศไทยเป็นประเทศที่ผลิตสับปะรดได้เป็นอันดับ 4 ของโลก หรือผลิตได้ร้อยละ 19 ของผลผลิตสับปะรดรวมทั้งโลก รองลงมาคือฟิลิปปินส์และบราซิล โดยคาดว่าในปีนี้จะมีผลผลิตประมาณ 2.5 ล้านตัน ทั้งนี้ ผลผลิตเฉลี่ยของไทยอยู่ที่ประมาณ 4 ตันต่อไร่ พื้นที่การปลูกทั่วประเทศ มีประมาณ 640,000 ไร่ ขณะที่ทั่วโลกมีปริมาณการผลิตสับปะรดอยู่ที่ 9.4 ล้านตัน ตลาดสับปะรดที่สำคัญของโลกอยู่ในอเมริกา สหภาพยุโรปและญี่ปุ่น ซึ่งในสหภาพยุโรปตลาดหลักของไทย คือ เนเธอร์แลนด์และเยอรมนี

ในส่วนของสับปะรดผลสดประเทศไทยสามารถผลิตสับปะรดทานสดได้มากถึงปีละ 2-3 แสนตัน โดยมีประเทศสิงคโปร์เป็นผู้นำเข้ารายใหญ่ของไทย 1,500-2,000 ตันต่อปี รองลงมาคือ ญี่ปุ่น 250 ตันต่อปีและมาเลเซีย 100-200 ตันต่อปี อย่างไรก็ตาม ไทยสามารถส่งออกได้เพียง 3,000 ตันต่อปี ที่เหลือเป็นการบริโภคในประเทศ โดยสายพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นสับปะรดสำหรับทานสด ได้แก่ นางแล ตราดสีทอง ภูเก็ต สวี และมีบางส่วนเป็นพันธุ์ปัตตาเวีย (เดลินิวส์ 25 พฤษภาคม 2555)

ปัญหาสำคัญที่เกิดกับผลสับปะรดผลสดเกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลานาน ๆ เช่น การขนส่งทางเรือหรือห้องเย็น คือ อาการไส้สีน้ำตาล (T.B.T. Nguyen. 2003) ซึ่งเป็นตัวกำหนดอายุการเก็บรักษาของผลสับปะรด โดยมีลักษณะเป็นจุดสีคล้ำบริเวณเนื้อผลภายในใกล้แกนกลางของผล และจะมีขนาดขยายใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งผู้ส่งออกส่วนมากมีปัญหาเรื่องราคาและคุณภาพซึ่งต้องแข่งขันกับประเทศอื่น

สับปะรดพันธุ์ตราดสีทอง มีคุณสมบัติที่ดี ทั้งเรื่องรสชาติและสีสันแต่มีปัญหาเรื่องไส้สีน้ำตาลที่เกิดขึ้นระหว่างการขนส่งรุนแรงมาก ถึงแม้พันธุ์นี้จะเป็นพันธุ์ที่ตลาดต้องการมากและมีผู้พยายามส่งออกหลายครั้งแต่ก็ประสบความล้มเหลว สับปะรดตราดสีทองจึงถือเป็นพันธุ์ที่มีศักยภาพสามารถมีส่วนแบ่งตลาดสับปะรดในต่างประเทศเพิ่มขึ้นได้อย่างต่อเนื่อง เพราะสับปรดพันธุ์นี้มีจุดเด่นที่สีสัน และแตกต่างจากสับปะรดผลสดที่มีจำหน่ายอยู่ทั่วไปในตลาดขณะนี้หากว่าสามารถแก้ในเรื่องอาการไส้สีน้ำตาลได้

ทั้งนี้ความรุนแรงของอาการไส้สีน้ำตาลอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ซึ่งทำปฏิกิริยาอ๊อกซิเดชั่นกับสารจำพวกเฟนอลิก คือ Polyphenol oxidase (PPO) (Clemente and Pastore, 1998) โดยพบว่า ปฏิกิริยา Polyphenol oxidase (PPO) เพิ่มขึ้นหากเกิด Strees ต่อเนื่องในขณะที่ผลไม้ถูกหั่นเป็นชิ้นซึ่งจะลดระยะเวลา

การเก็บรักษา (Saltveit (2000)) นอกจากนี้อาการแผลสีน้ำตาลจะรุนแรงมากหากผลไม้ที่ถูกแช่เย็นไว้ถูกนำออกมาใช้เป็นชิ้นๆ หรือหั่น เช่นเดียวกับการถูกอ๊อกซิเจนซึมเข้าไปบริเวณผิวซึ่งยิ่งทำให้ปฏิกิริยาอ๊อกซิเดชั่นรุนแรงขึ้น (Weller et al. (1997))

Polyphenol oxidase หรือ PPO enzyme เป็นเอนไซม์หลักใน Phenylpropanoid pathway (Va´mos-Vigya´zo´, 1981) ซึ่งสามารถสังเคราะห์ phenolic compounds ได้เช่น กรด Chlorogenic และสารอนุพันธุ์ของกรดคาเฟอิกซึ่งอาจเป็นสารตั้งต้นของอาการแผลสีน้ำตาล (Lattanzio et al., 1989; Tomas-Barberan et al.,1997).

ในสับปะรดพบว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์ PPO เพิ่มขึ้นในสับปะรดที่มีอาการไส้สีน้ำตาล (Raimbault A.K. et al. 2011) จากข้อมูลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ PPO อาจมีความเกี่ยวข้องกับ อาการไส้สีน้ำตาล งานทดลองชิ้นนี้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของยีน เอนไซม์ และอาการไส้สีน้ำตาลหากมีความเกี่ยวข้องกัน

ได้มีการศึกษาเอนไซม์ PPO ในพืชชนิดอื่นนอกจากสับปะรดด้วยเช่นกัน โดยพบว่าเมื่อทำการ silencing ยีน polyphenol oxidase (PPO) โดยการสร้าง antisense vector ในมันฝรั่งทำให้อาการแผลสีน้ำตาลลดลงอย่างเห็นได้ชัด (C. W. B. Bachem et al. 1994; Coetzer C. et al. 2001) นอกจากนี้ยังมีความพยายามในการผลิตสับปะรด GMOs โดยการถ่ายยีน antisense ยีน PPO โดยวิธี Balistic และใช้ Agrobaterium ด้วย (L. Ko et al. การทดลองยังไม่ตีพิมพ์) และมีการผลิตสายพันธุ์สับปะรด ซึ่งได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อลดอาการไส้สีน้ำตาล โดย Queensland Department of Primary Industries ประเทศออสเตรเลีย ทั้งนี้หน่วยงานดังกล่าวได้ทำการ silencing gene PPO และได้ทำการขออนุญาต และทดสอบความปลอดภัยทางชีวภาพ เพื่อปลูกสับปะรดสายพันธุ์ดังกล่าวตั้งแต่ปี 2546 ที่ผ่านมา (APPLICATION FOR LICENCE FOR INTENTIONAL RELEASE OF A GMO INTO THE ENVIRONMENT: Application No. DIR 0028/2002)

ดังนั้นการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ PPO นี้ และปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ pH และออกซิเจน ที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน อาจนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจในกลไกการเกิดอาการ IB ซึ่งจะเป็นการปูทางไปสู่วิธีการแก้ปัญหาอาการ IB ในสับปะรดผลสดพันธุ์ตราดสีทองต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง PCR
2. Dry bath
3. ตู้เย็นเก็บตัวอย่าง
4. เครื่อง Run Gel electrophoresis
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง Centrifuge
6. ตู้ Incubator

วิธีการ

7.1 การศึกษาข้อมูลยีน PPO โดยวิธี Bioinformatic

สืบค้นยีน Polyphenol Oxydase (PPO) บนฐานข้อมูล NCBI พบยีน 2 ชนิด ในสับปะรดคือ PPO1และ PPO2 มี Gene bank number คือ AY149881.1 และ AY149882.1 นำสายรหัสพันธุกรรมของยีน PPO1 และ PPO2 มาวิเคราะห์ โดยโปรแกรม Vector NTI และ ฐานข้อมูล Blast nucleotide & Protein เพื่อวิเคราะห์สายรหัสพันธุกรรมโดยละเอียด

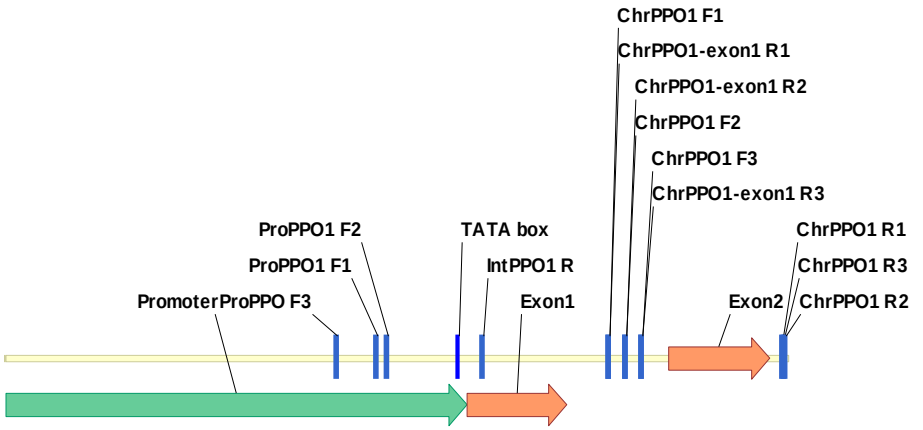
7.2 การตรวจสอบความถูกต้องและการโคลนชิ้นยีนเพื่อสร้าง Silencing vector

- ตรวจสอบความถูกต้องของยีนตามฐานข้อมูลโดย ออกแบบ Primer จากสายรหัสพันธุกรรมตามฐานข้อมูล ในส่วน Promoter intron และ exon ส่วนปลาย เพื่อตรวจสอบสายรหัสพันธุกรรมว่าถูกต้องตรงตามฐานข้อมูลหรือไม่โดยเป็นการออกแบบ Primer แบบสุ่มตามลักษณะที่เหมาะสมกระจายตามจุดต่างๆบนยีนและคาดคะเนความยาวของ Amplicon (ภาพที่ 1, ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดง Primer ที่ออกแบบเพื่อใช้ตรวจสอบรหัสพันธุกรม

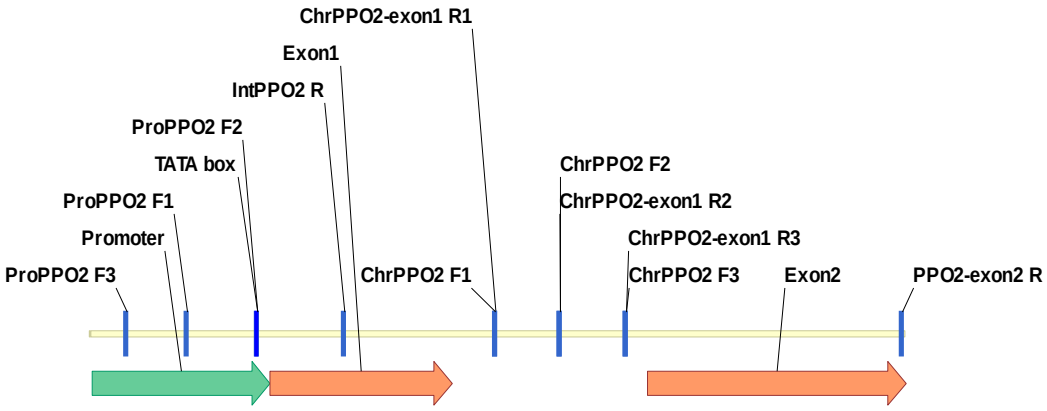
หมายเหตุ	Name	Sequence(5'-3')	Tm(oC)	Size(bp)
ใช้แอมส่วน Promoter ของยีน PPO1	ProPPO1_F1	CATTTCTATTTCCTAAGCCA	44.3	20
ใช้แอมส่วน Promoter ของยีน PPO1	ProPPO1_F2	AGAATAGACTGGACTTAATGTAG	41.7	23
ใช้แอมส่วน Promoter ของยีน PPO1	ProPPO1_F3	TTGTAGGATTGTTGGAGTTA	42.1	20
ใช้แอมส่วน Intron หลัง exon1	ChrPPO1-exon1_R1	GGACCACTCAATTCTAACC	42.9	19
ใช้แอมส่วน Intron หลัง exon1	ChrPPO1-exon1_R2	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGTTG	43	22
ใช้แอมส่วน Intron หลัง exon1	ChrPPO1-exon1_R3	AGTATCTGAGACCCAAGTTC	41.9	20
ใช้แอมส่วน Intron ก่อน exon2	ChrPPO1_F1	GGTTAGAATTGAGTGGTCC	42.9	19
ใช้แอมส่วน Intron ก่อน exon2	ChrPPO1_F2	CAACTCTCTCTCTCTCTCTC	43	22
ใช้แอมส่วน Intron ก่อน exon2	ChrPPO1_F3	GAACTTGGGTCTCAGATACT	41.9	20
ใช้แอมส่วน หลัง exon2	ChrPPO1_R1	GACTACAACAACATGGCTG	42.8	19
ใช้แอมส่วน หลัง exon2	ChrPPO1_R2	TCCAAACATACCCCACAT	44.9	18
ใช้แอมส่วน หลัง exon2	ChrPPO1_R3	CCACATATCGACTACAACAA	43	20
ใช้แอมส่วน Promoter ของยีน PPO2	ProPPO2_F1	AAAGAAAGAGCAAGAAATGT	42.8	20
ใช้แอมส่วน Promoter ของยีน PPO2	ProPPO2_F2	CTATAAATACGGCATCACAA	43.2	20
ใช้แอมส่วน Promoter ของยีน PPO2	ProPPO2_F3	TAAACCAAGCGGTGTGA	44.6	17
ใช้แอมส่วน Intron หลัง exon1	ChrPPO2-exon1_R1	AAGATTTATACTCGACTCCTC	41.6	21
ใช้แอมส่วน Intron หลัง exon1	ChrPPO2-exon1_R2	GTGGATTGTAAACTTAGCAT	41.1	20
ใช้แอมส่วน Intron หลัง exon1	ChrPPO2-exon1_R3	GGTTGGTATTCGAGGCT	44.1	17
ใช้แอมส่วน Intron ก่อน exon2	ChrPPO2_F1	GAGGAGTCGAGTATAAATCTT	41.6	21
ใช้แอมส่วน Intron ก่อน exon2	ChrPPO2_F2	ATGCTAAGTTTACAATCCAC	41.1	20
ใช้แอมส่วน Intron ก่อน exon2	ChrPPO2_F3	AGCCTCGAATACCAACC	44.1	17
ใช้แอมส่วนปลายของ exon2 ยีน PPO2	PPO2-exon2_R	TTACTATAGGGCACGCG	44.2	17
แอมภายในยีน PPO1	IntPPO1_R	TTGTTGCTCCTTAGATTTG	42.7	19
แอมภายในยีน PPO2	IntPPO2_R	AGCTTGAAGTCCACGAT	41.3	17

ภาพที่ 1 แสดงรายละเอียดตำแหน่ง Primer บนยีน PPO1 และ PPO2



Polyphenol oxidase (PPO1) gene

7074 bp



Polyphenol oxidase (PPO2) gene

3930 bp

ดำเนินการตรวจสอบยีนทั้ง 2 ชนิดโดยวิธี PCR โดย GoTaq® Green Master Mix ที่ปริมาตร 25 µl โดยมีส่วนผสมดังนี้

ตารางที่ 2 แสดงส่วนผสม PCR Master mix

Component	Volume	Final concentration
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12.5	1X
Upstream primer, 10µM	0.5	0.1 uM
downstream primer, 10µM	0.5	0.1 uM
DNA template	5	200 ng
Nuclease-Free Water to	25	NA

และใช้โปรแกรมการตรวจวิเคราะห์ PCR ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 3 แสดงโปรแกรมการทำงานของ PCR

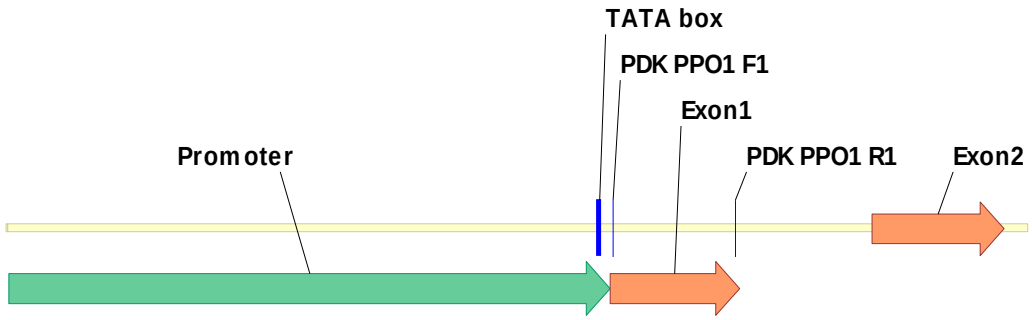
State	Temperature	Time
Denaturation	95°C	2 min
Denaturation	95°C	30 sec
Annealing	48-50 °C	45 sec (30 cycles)
Elongation	72 °C	1 min
Final Elongation	72 °C	7 min
Cooling down	4 °C	∞

- เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของยีนตามฐานข้อมูลแล้วจึงออกแบบ Primer เพื่อการโคลนชิ้นส่วนยีนเพื่อนำไปใช้ตัดต่อสร้าง Silencing Vector pRNAi-GG สำหรับ Transform สำหรับถ่ายเข้าสู่ Agrobacterium ชนิด AGL1 รวมทั้งวิเคราะห์ข้อมูลสายรหัสพันธุกรรม ทั้งนี้ออกแบบ Primer ให้อยู่ภายใน exon ของยีน PPO1 และ 2 โดยเพิ่มเบสที่จำเป็นสำหรับใช้ในการตัดต่อเข้าสู่เวคเตอร์ pRNAi-GG คือ Restriction site BsaI 5’-GGTCTC-3’ และ specific เบส 5’-AGGAG-3’ ที่ส่วนหน้าของ Primer Forward ในส่วนของ Reverse Primer เพิ่ม Restriction site BsaI 5’-GGTCTC-3’ และ specific เบส 5’-ATCGT-3’ เช่นเดียวกัน (Puyan *et al.* 2012.) (ภาพที่ 2, ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงรายละเอียด Primer ที่สังเคราะห์

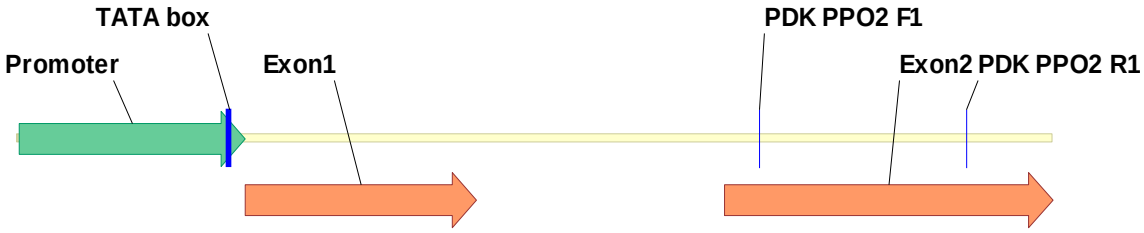
หมายเหตุ	Name	Sequence(5'-3')	Tm(°C)	Size(bp)
ใช้แอมส่วน Exon ของยีน PPO1	PDK_PPO1_F1	GGTCTCAGGAGGCTTCCCAACCAATAACACC	51.1	20
ใช้แอมส่วน Exon ของยีน PPO1	PDK_PPO1_R1	GGTCTCATCGTACGGCGAGGTTGTGGTTA	51.1	18
ใช้แอมส่วน Exon ของยีน PPO2	PDK_PPO2_F1	GGTCTCAGGAGAACCAACCCAACGACGAA	50.08	18
ใช้แอมส่วน Exon ของยีน PPO2	PDK_PPO2_R1	GGTCTCATCGTGGGCAGATTACATACGCATTTA	51.5	22

ภาพที่ 2 แสดงตำแหน่ง Primer ที่ใช้สำหรับ Clone ชิ้นยีนบางส่วนสำหรับตัดต่อเข้าสู่เวคเตอร์



Polyphenol oxidase (PPO1) gene

7074 bp



Polyphenol oxidase (PPO2) gene

3930 bp

ดำเนินการ โคลนชิ้นยีนทั้ง 2 ชนิดโดยวิธี PCR โดยระบบ Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase ที่ปริมาตร 50 µl โดยมีส่วนผสมดังนี้

ตารางที่ 5 แสดง PCR Master mix โดยระบบ Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase

Component	Volume (µl)	Final concentration
5X Phusion HF buffer	10	1X
10 mM dNTPs	1	200 µM
Upstream primer, 10µM	2.5	0.5 µM
Downstream primer, 10µM	2.5	0.5 µM
Phusion DNA polymerase	0.5	0.02 U/µl
DNA template	200 ng	200 ng
Nuclease-Free Water to	50	NA

และใช้โปรแกรม PCR ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 6 แสดง PCR Phusion Program

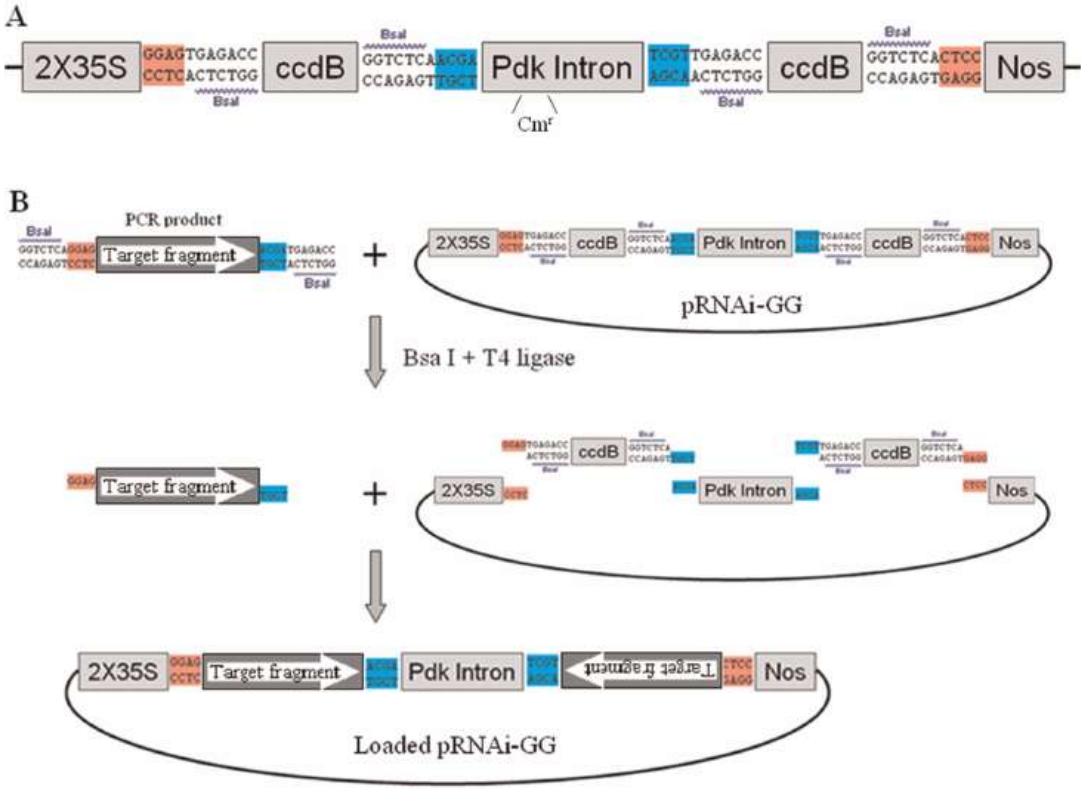
State	Temperature	Time
Denaturation	98°C	30 sec
Denaturation	98°C	10 sec
Annealing	48-60 °C	30 sec (30 cycles)
Elongation	72 °C	1 min
Final Elongation	72 °C	7 min
Cooling down	4 °C	∞

7.3 การตัดต่อเวคเอตร์ pRNAi-GG และการถ่ายเวคเตอร์เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียม AGL1

นำชิ้นยีน PPO1 และ PPO2 ที่โคลนได้ตัดต่อเข้าสู่ Vector pRNAi-GG โดยวิธี Single Digestion-Ligation PCR product ดังกล่าวได้จากการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย Primer ggTcTcAggAg- gene specific forward primer และ ggTc

TcATcgT- gene specific reverse primer (Primer PDK_PPO1 F1, PDK PPO1 R1, PDK_PPO2 F1,PDK_PPO2 R1) จากนั้นจึงผสม PCR product ที่ได้ ปริมาณ 50 ng กับ pRNAi-GG vector 200 ng และ BsaI enzyme (NEB) 5 units และ T4 DNA ligase 10 units (Promega, high concentration ligase - 20 u/µl) ใน 10 µl 1X ligation buffer (Promega) จากนั้น บ่มส่วนผสมทั้งหมดที่ 37°C 2 min 16°C 5 min 35 cycles และ 50°C 5 min (final digestion) และ 80°C 5 min (heat inactivation) (ภาพที่ 3) จากนั้นจึงผสม mixture ทั้งหมดที่ได้จากกระบวนการ Single-digestion ligation ปริมาตร 10 µl กับ E. coli DH5 alpha competent Cells (ซึ่งเตรียมดังนี้ 1.นำ DH5 alpha ไปเลี้ยง 1 คืน ที่ 37°C จากนั้นนำเชื้อที่ผ่านการเลี้ยง 1 คืน ไปเจือจางกับ อาหาร LB broth อัตราส่วน 1:50 2.เลี้ยงเชื้อที่เจือจางแล้วที่ 37°C เขย่า 200 rpm จนถึง early log phase (OD600 = 0.25-0.4) 3. ในระหว่างที่เซลล์กำลังโตนั้นนำ 2XTSS solution (LB broth ผสมกับ 20% (wt/vol) PEG (molecular weight 3350 หรือ 8000), 10% (vol/vol) DMSO, 40 mM Mg^{2+} ($MgSO_4$ หรือ $MgCl_2$), ที่ pH 6.5 มาละลายช้าๆ และเจือจางกับน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1 และแช่น้ำแข็งเอาไว้ 4. นำเชื้อที่เลี้ยงจนได้ค่า OD ที่ต้องการแล้ว มาแบ่งใส่หลอด 1.5 ml หลอดละ 1 ml แล้วนำไปปั่นตกตะกอน 5000g ที่ 4°C 1-2 นาที 5. ดูดของเหลวใสส่วนบนออกแล้วเติม 1XTSS solution ที่เจือจางแล้ว 0.1 ml แล้วแช่หลอดไว้ในน้ำแข็ง 6. ผสมเซลล์กับสารละลายเบาๆด้วย Pipet 7. เก็บสารละลายเซลล์โดยนำไปทำให้เย็นตัวอย่างรวดเร็วด้วย liquid nitrogen ทันทีแล้วเก็บไว้ที่ -80°C, (Chung *et al*.1989) และดำเนินการ Transformation โดยวิธี Heat shock โดยนำเชื้อที่เตรียมไว้มาละลายจากนั้นเติม mixture ผสมให้เข้ากันแช่น้ำแข็งไว้ 10 นาที แล้วนำไปบ่มที่ ที่ 42°C 2-5 นาที แล้วแช่น้ำแข็ง 10 นาที เติม LB broth 1ml แล้วน้ำไปเลี้ยง ที่ 37°C เขย่า 200 rpm นำเชื้อที่ผ่านการ Transformation แล้ว ไปเลี้ยงบน อาหารเลี้ยงเชื้อ LB ผสม kanamycin 25 mg/L และ chloramphenicol 5 mg/L (chloramphenicol resistance gene อยู่ใน Pdk intron) เพื่อคัดเลือก

Transformant ที่ได้รับ recombinants vector จากผลการทดลอง คัดเลือกเชื้อ E. coli DH5 alpha ที่โตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำ Single colony เลี้ยง 37°C 1 คืน



ภาพที่ 3 กระบวนการตัดต่อยีนเข้าสู่ Vector pRNAi-GG โดยวิธี Single Digestion-Ligation

นำเชื้อที่เลี้ยง O/N ไปสกัด Vector pRNAi-GG: PPO1, : PPO2 ตรวจสอบความถูกต้องและ Transform เข้าสู่ Agrobacterium AGL1 โดยวิธี Freeze-thaw 1.นำ Agrobacterium ที่เลี้ยงบน Antibiotic ที่เหมาะสมมา 1 colony ผสมกับ liquid YENB 3 ml ในหลอด 15 ml เลี้ยงที่ 30°C O/N โดยเติม carbenicillin 50 mg/L 2. ผสม liquid YENB 50 ml กับ เชื้อ O/N ที่เลี้ยงไว้ ใน flask 250 ml นำไปเลี้ยงที่ 30°C จนได้ OD600 ระหว่าง 0.5 และ 1.0 (หรือประมาณ 4-5 ชม.) 3. นำเชื้อที่เลี้ยงได้แล้วแช่ในน้ำแข็ง 5-10 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ 3000 rpm 4°C 5 นาที 4. ดูดน้ำใสส่วนบนออก แล้วนำตะกอนเซลล์ ไปผสมกับ CaCl2 20 mM 1 ml ดูด สารละลายเชื้อ 0.1 ml ใส่หลอด 1.5 ml ใหม่ 5. เติม plasmid DNA 1 µg ในแต่ละหลอดที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากัน นำหลอดสารละลายแบคทีเรียไปแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นละลายที่ 37°C 5 นาที 6. เติม liquid YENB 1 ml ในแต่ละหลอด แล้วเปลี่ยนไปใส่หลอด 15 ml บ่มที่ 30°C 2 ชั่วโมง 7. นำสารละลายแบคทีเรียที่ได้ใส่หลอด 1.5 ml แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ 4,000 rpm ดูดสารละลายที่เหลือออกให้เหลือ 100 µl 8. Spread เชื้อบน Plate LB คัดเลือก Transformant ด้วย Antibiotic Kanamycin ที่ 30°C ประมาณ 2-3 วัน เพื่อนำไปใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่ผลสับปะรดต่อไป

7.4 การ Inoculate เชื้อ Agrobaterium สู่ผลสัปปะรดเพื่อทดสอบการแสดงออกของยีน PPO1, PPO2

คัดเลือกตัวอย่างสัปปะรดที่อายุ ตาเปิด 1 – 2 ตา จำนวน 24 ผล เพื่อเตรียมการทดลอง 2 ชุด รวม 6 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำประกอบด้วย 4 Treatment คือ T1: AGL1 pRNAi-GG: PPO1 T2: AGL1 pRNAi-GG: PPO2 T3: AGL1 pRNAi-GG: PPO1+PPO2 T4: H_2O โดยชุดที่ 1 จะเก็บไว้ 2 สัปดาห์ ที่ 13°C (รวมวันที่ Inoculate) และ ชุดที่ 2 จะเก็บไว้ 3 สัปดาห์ ที่ 13°C (ภาพที่ 4)

ภาพที่ 4 แสดงการแบ่งซ้ำและ Treatment ของชุดการทดลอง

เตรียมเชื้อ Agrobacterium ที่ได้รับการ Transform Vector pRNAi-GG: PPO2 โดยนำเชื้อมาเลี้ยงบน Plate LB ผสม kanamycin 25 mg/L และ chloramphenicol 5 mg/L จากนั้น นำ Single Colony ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 1 ลิตร ผสม kanamycin 25 mg/L ที่ 30°C 1 คืน

นำเชื้อที่ได้ฉีดเข้าผลสัปปะรดทั้ง 2 ชุดการทดลอง โดยฉีด เชื้อปริมาตร 10 ml 3 จุด ส่วนบน ส่วน กลาง และ ส่วนล่างของผลสัปปะรด บ่มที่ 30°C 2 คืน แล้วลดอุณหภูมิลงเหลือ 13°C (ภาพที่ 5)

ภาพที่ 5 แสดงกระบวนการฉีด Agrobacterium เข้าสู่ผลสับปะรด เพื่อให้เกิด Transient transformation

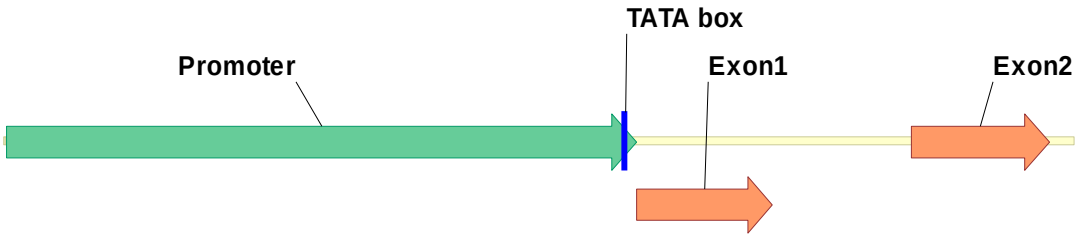
เวลาและสถานที่ : ดำเนินงานวิจัยที่ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพและสถาบันวิจัยพืชสวน 2558 - 2560

8. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

8.1 การศึกษาข้อมูลยีน PPO โดยวิธี Bioinformatic

จากการสืบค้นยีน Polyphenol Oxydase (PPO) บนฐานข้อมูล NCBI พบยีน 2 ชนิด ในสับปะรดคือ PPO1และ PPO2 มี Gene bank accession number คือ AY149881.1 และ AY149882.1

เมื่อนำสายรหัสพันธุกรรมของยีน PPO1 (Gene bank accession number: AY149881.1) มาวิเคราะห์โดยโปรแกรม Vector NTI พบว่า สายรหัสพันธุกรรมยาว 7,074 bp (Figure1.)ประกอบด้วย โพรโมเตอร์ขนาด 4,170 bp และ พบ Exon1 ถัดจากโพรโมเตอร์ขนาด 900 bp และขั้นด้วย Intron ขนาด 919 bp และต่อด้วย Exon2 ขนาด 915 bp ดังนั้นขนาดของยีนไม่รวมโพรโมเตอร์มีขนาด 2,734 bp

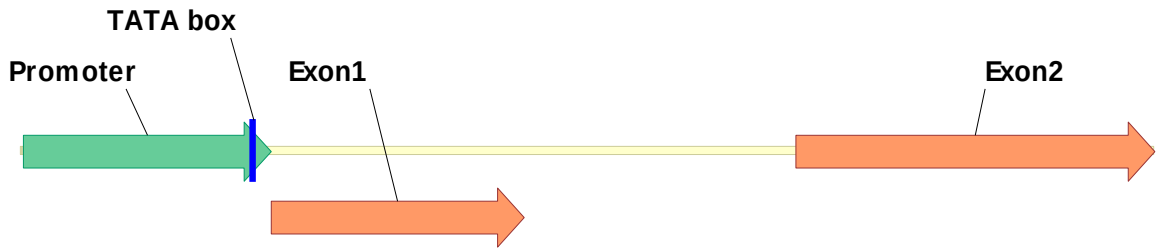


Polyphenol oxidase (PPO1) gene

7074 bp

ภาพที่ 6 แสดงองค์ประกอบของยีน PPO1

เมื่อนำรหัสพันธุกรรมของยีน PPO2 Gene bank accession number: AY149882.1 มาวิเคราะห์พบว่าสายรหัสพันธุกรรมยาว 3,930 bp ประกอบด้วยโพรโมเตอร์ขนาด 860 bp และ พบ Exon1 ถัดจากโพรโมเตอร์ขนาด 879 bp และขั้นด้วย Intron ขนาด 943 bp และต่อด้วย Exon2 ขนาด 1,248 bp ดังนั้นขนาดของยีนไม่รวมโพรโมเตอร์มีขนาด 3,070 bp



Polyphenol oxidase (PPO2) gene

3930 bp

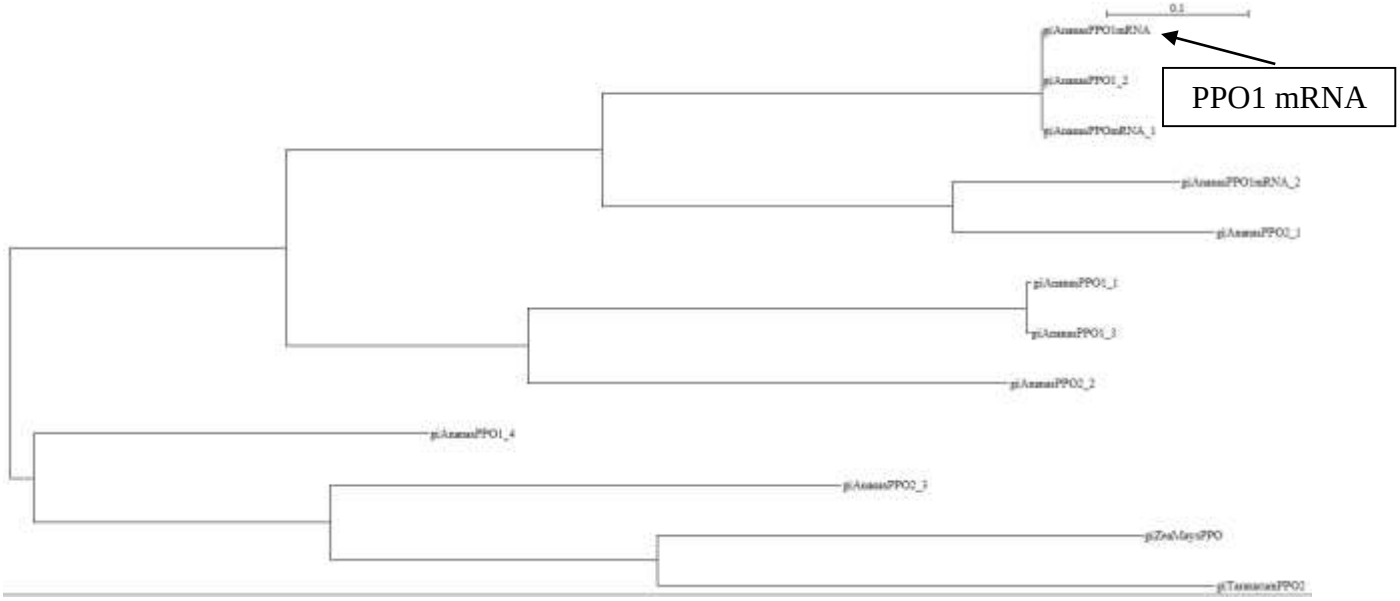
ภาพที่ 7 แสดงองค์ประกอบของยีน PPO2

นำสายรหัสพันธุกรรมของยีน PPO1 และ PPO2 ในส่วนของ exon1 และ exon2 มาเชื่อมกันเป็น mRNA แล้วนำไป Blast กับฐานข้อมูล NCBI พบว่ายีน PPO1 มีสายรหัสพันธุกรรมบางส่วนมีความเหมือนกับข้าวโพด (Zea mays Linn.) และต้นทัมโปโปะ (Taraxacum officinale.) สองชนิดเท่านั้น (ภาพที่ 6,7)

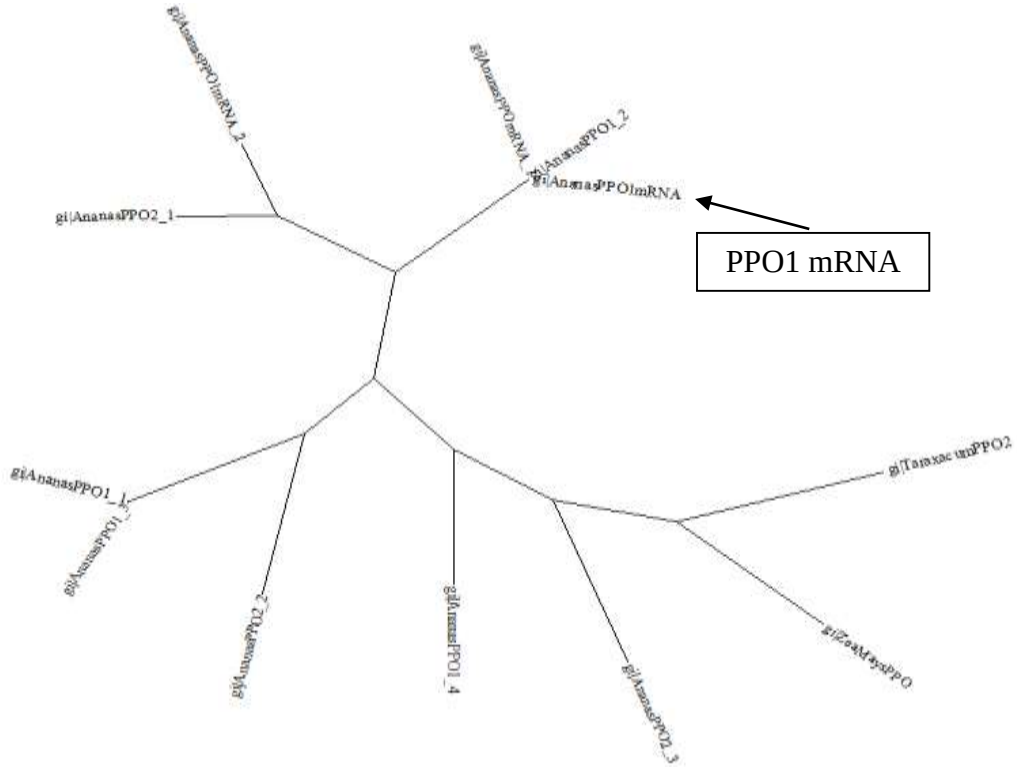
ในขณะที่ ยีน PPO2 เมื่อเทียบกับยีน PPO1 พบว่ามีในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวถึง 23 ชนิดที่มียีน PPO2 อยู่คือ ข้าวสาลี (Triticum aestivum) ข้าวพื้นเมืองแอฟริกา (Oryza brachyantha), ข้าวญี่ปุ่น (Oryza sativa Japonica Group), ข้าวฟ่าง (Sorghum bicolor), ข้าวโพด (Zea mays), purple false brome (Brachypodium distachyon), perennial ryegrass (Lolium perenne), wild emmer wheat (Triticum dicoccoides), Triticum urartu หญ้าชนิดHordeum chilense, หญ้าชนิด Aegilops tauschii, small spelt (Triticum monococcum), wild einkorn (Triticum monococcum subsp. aegilopoides), หญ้าชนิด Setaria viridis, ข้าวฟ่างหางหมา (Setaria italica), ข้าวป่า (Oryza officinalis), two-rowed barley (Hordeum vulgare subsp. vulgare),ข้าว (Oryza sativa), สายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองแอฟริกา (Oryza glaberrima) สายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองแอฟริกา (Oryza barthii), ข้าวป่าพบในเอเชีย (Oryza nivara), ข้าวอินเดีย (Oryza sativa Indica Group) (ภาพที่ 8, 9, 10)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการที่มียีน PPO2 อยู่ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิดนั้น แสดงว่ายีน PPO2 อาจเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ด้วยเหตุนี้วิวัฒนาการของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเหล่านี้จึงยังคงเก็บรักษายีนชนิดนี้ไว้และไม่สูญหายไป ในขณะที่ยีน PPO1 พบว่ามีอยู่เพียงในข้าวโพดและไม้ดอกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นเพียงบางส่วนของยีนเท่านั้น ยีน PPO1จึงอาจเป็นยีนที่จำเพาะเจาะจงกับสัปปะรดและไม่จำเป็นกับพืชชนิดอื่นๆ

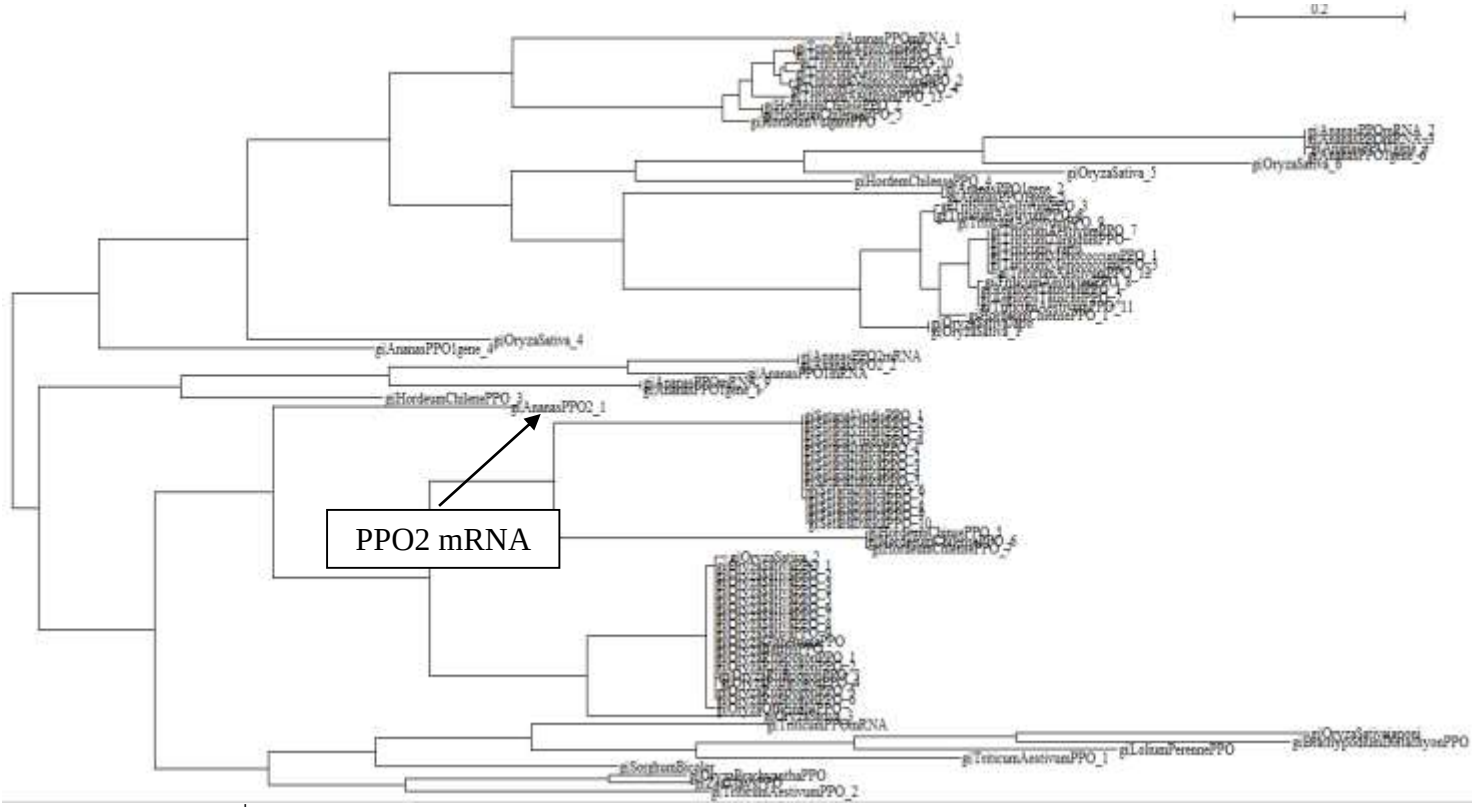
เมื่อนำสาย mRNA ของยีน PPO1 และ PPO2 ไป Translate โดยโปรแกรม Vector NTI เมื่อได้ Direct strand มาแล้วจึงนำสายเปปไทด์ ไป Blast กับฐานข้อมูลโปรตีน พบว่าโปรตีนทั้งสองชนิดมีลักษณะโครงสร้างที่คล้ายกันมาก และมี Tyrosinase superfamily เหมือนกัน รวมถึงลักษณะโครงสร้างโปรตีน PPO1 เหมือนกัน อนึ่งสิ่งที่แตกต่างคือระยะห่างระหว่างโครงสร้างและส่วนต้นของโปรตีนที่มีความเฉพาะเจาะจงของแต่ละโปรตีน (ภาพที่ 13 A, B) อย่างไรก็ดีเมื่อนำโปรตีนทั้งสองมาเปรียบเทียบกันพบว่ามีความแตกต่างกัน 28.4% (ภาพที่ 13C)



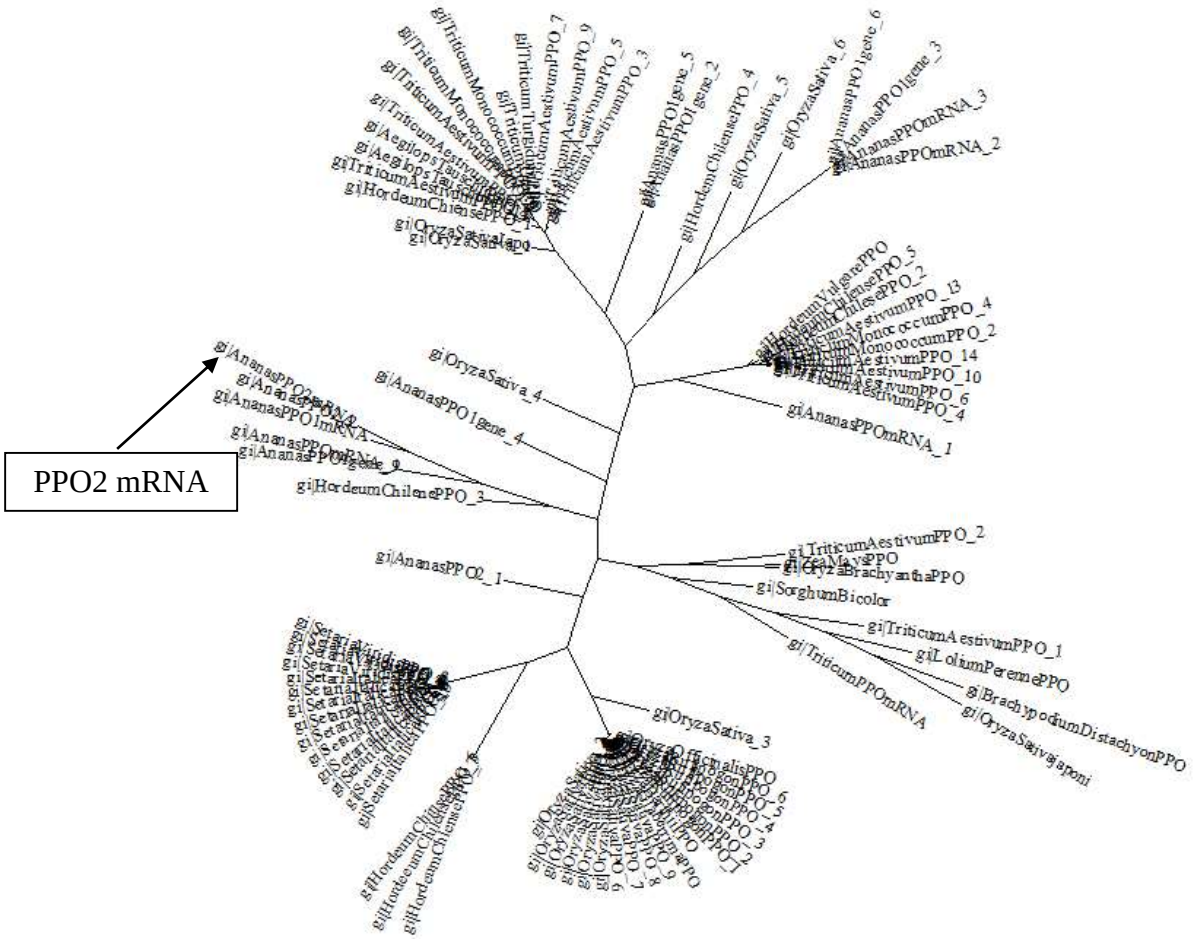
ภาพที่ 8 แสดงผล Parsimony tree ของ PPO1 mRNA เปรียบเทียบกับ Homologue sequence บนฐานข้อมูลนิวคลีโอไทน์ NCBI



ภาพที่ 9 แสดงผล Circular parsimony tree ของ PPO1 mRNA
เปรียบเทียบกับ Homologue sequence บนฐานข้อมูลนิวคลีโอไทน์ NCBI



ภาพที่ 10 แสดงผล Parsimony tree ของ PPO2 mRNA เปรียบเทียบกับ Homologue sequence
บนฐานข้อมูลนิวคลีโอไทน์ NCBI



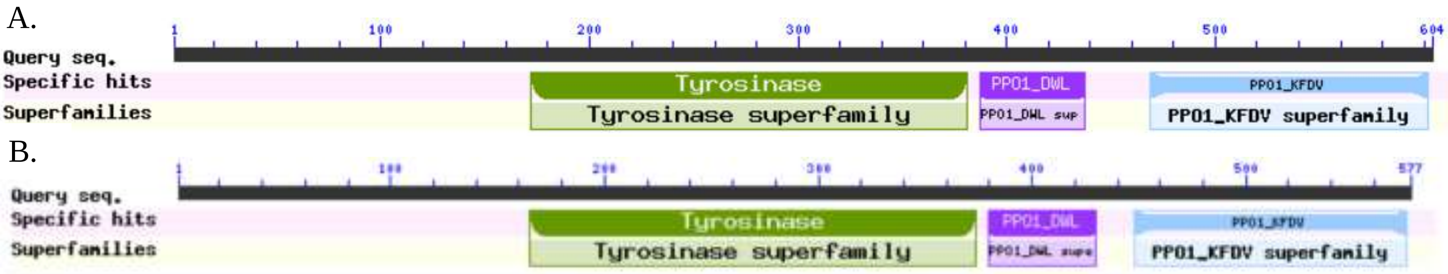
ภาพที่ 11 แสดงผล Circular parsimony tree ของ PPO2 mRNA
เปรียบเทียบกับ Homologue sequence บนฐานข้อมูลนิวคลีโอไทน์ NCBI

Lineage Report

Poales [monocots]

. Ananas comosus	2335	13 hits	[monocots]	Ananas comosus polyphenol oxidase mRNA, partial cds
. Triticum aestivum (wheat)	572	15 hits	[monocots]	Triticum aestivum polyphenol oxidase (PPO) mRNA, partial cds
. Oryza brachyantha	560	1 hit	[monocots]	PREDICTED: Oryza brachyantha polyphenol oxidase, chloroplas
. Oryza sativa Japonica Group (Japonica rice)	486	21 hits	[monocots]	Oryza sativa Japonica Group Os04g0624500 (Os04g0624500) mRN
. Sorghum bicolor (milo)	473	1 hit	[monocots]	Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA
. Zea mays (maize)	462	2 hits	[monocots]	Zea mays polyphenol oxidase II (LOC100283178), mRNA >gi|195
. Brachypodium distachyon (purple false brome)	267	1 hit	[monocots]	PREDICTED: Brachypodium distachyon polyphenol oxidase I, ch
. Lolium perenne (perennial ryegrass)	254	1 hit	[monocots]	Lolium perenne polyphenol oxidase (PPO) gene, partial cds
. Triticum dicoccoides (wild emmer wheat)	228	1 hit	[monocots]	Triticum turgidum subsp. dicoccoides polyphenol oxidase (Pp
. Triticum urartu	228	1 hit	[monocots]	Triticum urartu polyphenol oxidase (Ppo-A1) gene, Ppo-A1c a
. Hordeum chilense	222	10 hits	[monocots]	Hordeum chilense polyphenol oxidase 1 (PPO1) gene, PPO1-H7
. Aegilops tauschii	222	2 hits	[monocots]	Aegilops tauschii truncated polyphenol oxidase (Ppo-D1) gen
. Triticum monococcum (small spelt)	222	2 hits	[monocots]	Triticum monococcum polyphenol oxidase (Ppo-A1) gene, Ppo-A
. Triticum monococcum subsp. aegilopoides (wild einkorn)	222	2 hits	[monocots]	Triticum monococcum subsp. aegilopoides polyphenol oxidase
. Setaria viridis	211	3 hits	[monocots]	Setaria viridis Si7PPO gene for polyphenol oxidase, complet
. Setaria italica	211	12 hits	[monocots]	Setaria italica Si7PPO gene for polyphenol oxidase, complet
. Oryza officinalis	185	1 hit	[monocots]	Oryza officinalis strain yaoyong polyphenol oxidase (PPO) g
. Hordeum vulgare subsp. vulgare (two-rowed barley)	172	1 hit	[monocots]	Hordeum vulgare subsp. vulgare HvPPO1 gene for polyphenol o
. Oryza sativa (red rice)	169	22 hits	[monocots]	Oryza sativa cultivar 2003-C-1470 polyphenol oxidase (PPO)
. Oryza glaberrima	169	1 hit	[monocots]	Oryza glaberrima strain G7 polyphenol oxidase (PPO) gene, c
. Oryza barthii (African wild rice)	169	1 hit	[monocots]	Oryza barthii strain w6 polyphenol oxidase (PPO) gene, comp
. Oryza rufipogon (red rice)	169	19 hits	[monocots]	Oryza rufipogon strain w1727 polyphenol oxidase (PPO) gene,
. Oryza nivara	169	2 hits	[monocots]	Oryza nivara strain G12 polyphenol oxidase (PPO) gene, comp
. Oryza sativa Indica Group (Indica rice)	169	3 hits	[monocots]	Oryza sativa (indica cultivar-group) strain tx9 polyphenol

ภาพที่ 12 แสดงสายพันธุ์พืชที่มียีน PPO2 หรือประกอบด้วยส่วนของยีน PPO2



ภาพที่ 13 A. แสดงผลการ Blast สายรหัสเปปไทด์โปรตีน PPO1

B. แสดงผลการ Blast สายรหัสเปปไทด์โปรตีน PPO2

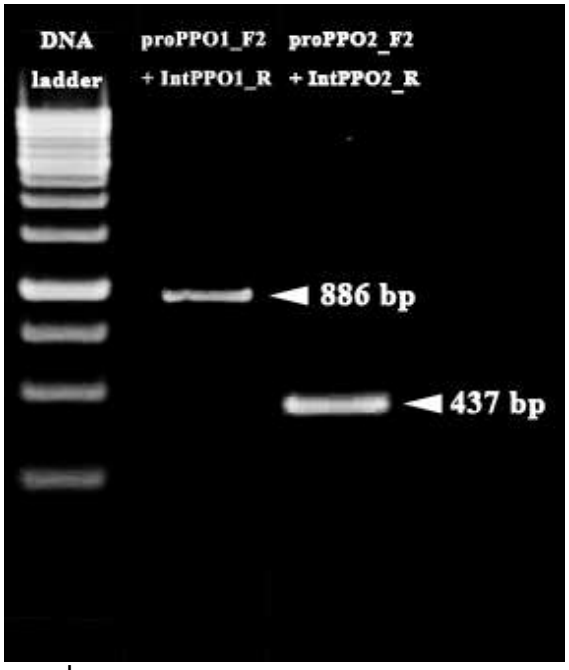
C.

```
                                                                 Section 1
                   (1) 1              10               20               30               40              51
      ... protein  (1) MATLSKIASQPITPPLSPLPPLHAPSLTKSFTTTFLSPVGVPNHPVIRSHA
     Protein PPO2  (1) -MASLRILAHPTNNNSTLSSPSFACSFSQQKLHRHLPPPCKSPKPPRRKMI
        Consensus  (1)      KI A P     S   P  A S S        L P       P  R
                                                                 Section 2
                  (52) 52       60               70               80               90            102
      PPO1 protein (52) NLRSNKRMPTSLRAASPAATYSWALGGLYGATTGLGLNRRAAAAPILAPDL
     Protein PPO2 (51) SCKSEK------SRGIDRRDLLLGVGGLYGAAAGLGLDRRAVGAPIQAPDI
        Consensus (52)   KS K          A         ALGGLYGA GLGL RRA AAPI APDI
                                                                 Section 3
                 (103) 103      110              120              130              140           153
     PPO1 protein (103) STCGPPADLPASARPTVCCPPYQSTIIDFKLPPRSAPLRVRPAAHLVDADY
     Protein PPO2 (96) STCGPPADLPATAPPTDCCPPYQSTIVDFKLPPRSDPLRVRPAAQSVDADY
       Consensus (103) STCGPPADLPASA PT CCPPYQSTIIDFKLPPRS PLRVRPAA  VDADY
                                                                 Section 4
                 (154) 154      160              170              180              190           204
     PPO1 protein (154) LAKYKKAVELMRALPADDPRNFVQQAKVHCAYCDGAYDQIGFPDLEIQIHN
     Protein PPO2 (147) LAKYKKAVELMKALPADDPRNFTQQANVHCAYCDGAYDQIGFPDLEIQVHS
       Consensus (154) LAKYKKAVELMKALPADDPRNF QQA VHCAYCDGAYDQIGFPDLEIQIH
                                                                 Section 5
                 (205) 205    210              220              230              240              255
     PPO1 protein (205) SWLFFPWHRFYLYSNERILGKLIGDDTFALPFWNWDAPGGMQFPSIYTDPS
     Protein PPO2 (198) SWLFFPWHRFYLYFNERILGKLIGDDTFALPFWNWDAPGGMQIPAIYADAS
       Consensus (205) SWLFFPWHRFYLY NERILGKLIGDDTFALPFWNWDAPGGMQ PAIY D S
                                                                 Section 6
                 (256) 256                  270              280              290              306
     PPO1 protein (256) SSLYDKLRDAKHQPPTLIDLDYNGTDPTFSPEEQINHNLAVMYRQVISSGK
     Protein PPO2 (249) SPLYDKLRNAKHQPPTLVDLDYNGTDPTFTPEQQIAHNLTIMYRQVISGGK
       Consensus (256) S LYDKLR AKHQPPTLIDLDYNGTDPTFSPE QI HNL IMYRQVIS GK
                                                                 Section 7
                 (307) 307                  320              330              340              357
     PPO1 protein (307) TPELFMGSAYRAGDQPDPGAGSVEQKPHGPVHVWTGDRNQPNREDMGTLYS
     Protein PPO2 (300) TPELFMGAAYRAGDAPDPGAGTLELVPHNTMHLWTGDPNQPNDEDMGTFYA
       Consensus (307) TPELFMGAAYRAGD PDPGAGSLE   PH   MHLWTGD NQPN EDMGT YA
                                                                 Section 8
                 (358) 358                  370              380              390              408
     PPO1 protein (358) AAWDPVFFAHHGNIDRMWYVWRNLGGKHRNFTDPDWLNASFLFYDENAQLV
     Protein PPO2 (351) AARDPIFFAHHGNVDRMWYVWRKLGGTHRDFTDPDWLNASFLFYDENAQLV
       Consensus (358) AA DPIFFAHHGNIDRMWYVWR LGG HR FTDPDWLNASFLFYDENAQLV
                                                                 Section 9
                 (409) 409                  420              430              440              459
     PPO1 protein (409) RVKVKDCLEADAMRYTYQDVEIPWLKAKPTPKSALQKIKSKVSTLKATPRG
     Protein PPO2 (402) RVKVKDCLEADALRYTYQDVDIPWISAKPTP--------------KKTPGG
       Consensus (409) RVKVKDCLEADALRYTYQDVDIPWI AKPTP              K TP G
```

C. แสดงการเปรียบเทียบระหว่างโปรตีน PPO1 และ PPO2

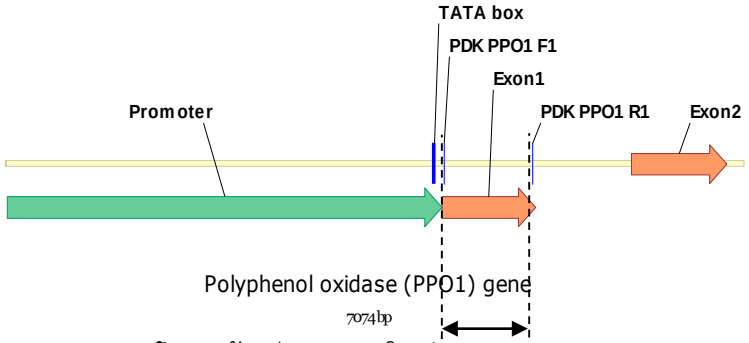
8.2 การตรวจสอบความถูกต้องและการโคลนชิ้นยีนเพื่อสร้าง Silencing vector

ตรวจสอบข้อมูลยีน *ppo1* และยีน *ppo2* โดยคู่ไพรเมอร์ proPPO1_F2 และ IntPPO1_R สำหรับยีน ppo1 และ คู่ไพรเมอร์ proPPO2_F2 และ IntPPO2_R สำหรับยีน ppo1 (ตารางที่ 1) โดยวิธี PCR ซึ่งตรวจพบยีนถูกต้องตามฐานข้อมูล (ภาพที่ 14) ทั้งนี้ได้ PCR product ขนาด 886 bp สำหรับยีน *ppo1* และ 437 bp สำหรับยีน *ppo2* จากนั้นนำ PCR product ไปวิเคราะห์โดยการถอดรหัสสายพันธุกรรมพบว่ายีน *ppo1* มีความแตกต่างจากรหัสพันธุกรรมซึ่งได้จากฐานข้อมูล 2 ตำแหน่งบริเวณ exon1 ในขณะที่ยีน *ppo2* รหัสเบสเหมือนกับฐานข้อมูลทุกประการ



ภาพที่14 การทำปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของยีน ppo1 และ ppo2 ตามฐานข้อมูล PCR product ของยีน ppo1 มีขนาด 886 bp และ ppo2 มีขนาด 437 bp

เมื่อยืนยันความถูกต้องของยีน ppo1 และ ยีน ppo2 แล้วจึงดำเนินการ Clone ชิ้นยีนด้วย Primer PDK_PPO1 F1 และ PDK PPO1 R1 เพื่อนำไปใช้ในการตัดต่อเข้าสู่ เวคเอตร์ pRNAi-GG



ภาพที่ 15 แสดงภาพโครงสร้างยีน PPO1 ในสับปะรด ขนาด 7 kbp และตำแหน่ง

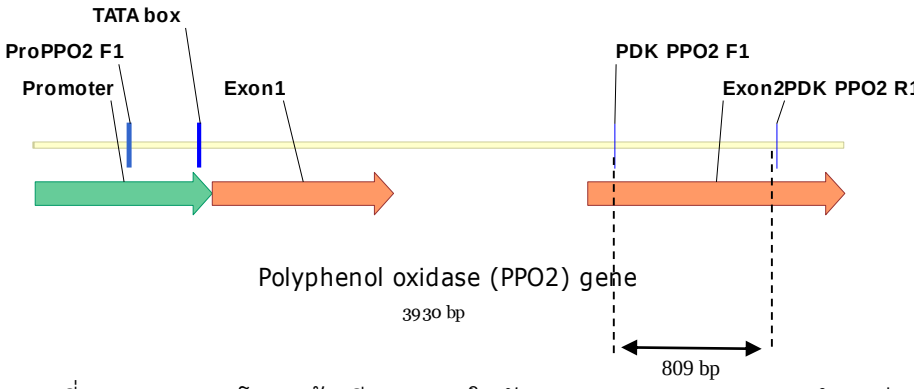
primer PDK_PPO1 F1 และ PDK_PPO1 R1 บน Exon 1 ยีน PPO1

จากการทดลองพบว่าได้ชิ้น DNA จากการโคลน ความยาว 866 bp ทั้งนี้เมื่อนำ PCR Product ของยีน ppo1 ที่ได้มาถอดรหัสพบว่าได้รหัสพันธุกรรมได้ดังต่อนี้:

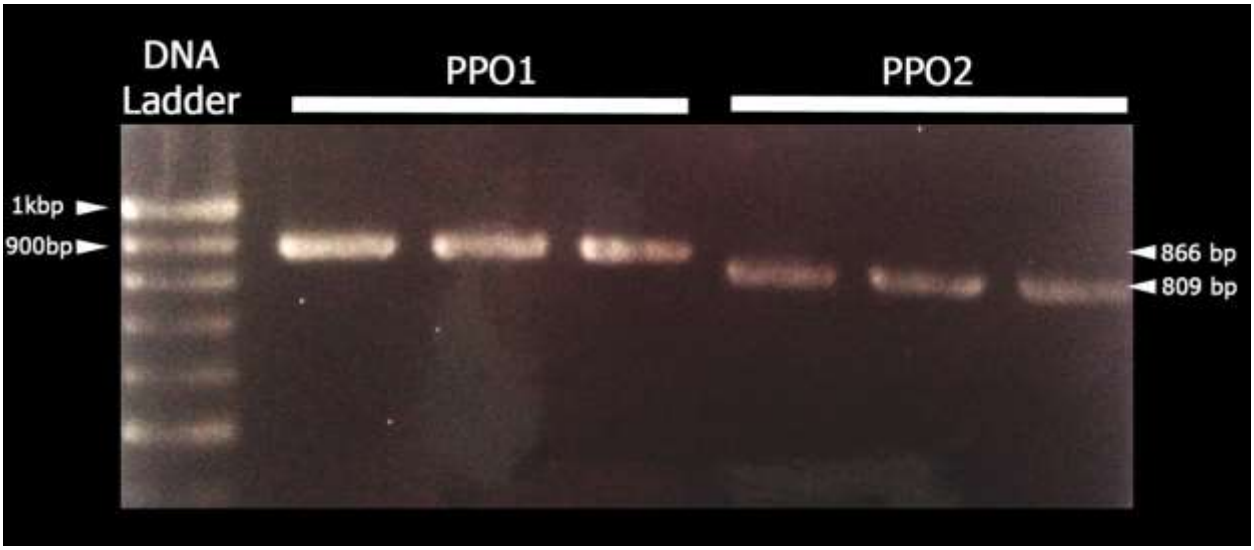
5’CTTTGCATGCTCCTTCTCTCACCAAAAGCTTCACCACCACCTTCCTCTCCCTTGTAGGAGTCCCA
AACCACCGCGTCATAAGATCTCTTGCAAATCTAAGGAGCAACAAGAGAATGCCGACAAGCCTGCGG
GCCGCATAGACCGCCGCGACCTACTCCTGGGCCTCGGCGGGCTTTACGGTGCCACCACTGGGCTCG
GCCTCAACCGTCGAGCGGCCGCTGCCCCTATCCTGGCTCCCGACCTCTCAACTTGTGGGCCACCTG
CCGACCTCCCTGCCTCCGCCCGACCGACAGTTTGCTGCCCGCCATACCAATCCACCATCATCGACTT
CAAGCTCCCCCCGCGATCTGCTCCGCTTCGCGTCCGGCCTGCGGCCCACTTGGTTGACGCCGACTA
CCTGGCCAAGTATAAGAAGGCAGTCGAGCTCATGAGGGCCCTGCCGGCCGACGACCCGCGCAACTT
CGTACAGCAAGCGAAAGTGCACTGTGCGTACTGCGACGGCGCGTATGACCAAATCGGCTTCCCCGA
TCTCGAGATCCAGATCCACAACTCGTGGCTCTTCTTTCCTTGGCACCGGTTCTACCTCTACTTCAAC
GAGCGCATACTCGGGAAACTTATCGGCGACGACACGTTCGCGCTGCCTTTCTGGAACTGGGACGCG
CCGGGGGGCATGCAGTTCCCGTCTATCTACACGGACCCTTCATCCTCGCTATATGACAAGCTGCGT
GATGCGAAGCACCAGCCGCCGACTTTGATTGACCTCGACTACAATGGCACCGATCCTACCT3’

ในส่วนของยีน ppo2 ดำเนินการ Clone ชิ้นยีนด้วย Primer PDK_PPO2 F1 และ PDK PPO2 R1 จากการทดลองพบว่าได้ชิ้น DNA จากการโคลน ความยาว 809 bp ทั้งนี้เมื่อนำ PCR Product ของยีน ppo1 ที่ได้มาถอดรหัสพบว่าได้รหัสพันธุกรรมได้ดังต่อนี้:

5’CGTTCTACGCGGCGGCGCGGGACCCCATCTTCTTCGCCCACCACGGCAACGTCGACCGCATGTGG
TACGTGTGGCGGAAACTCGGGGGCACGCACCGCGATTTCACCGACCCCGACTGGCTCAACGCGTCC
TTCCTCTTCTACGACGAGAACGCGCAGCTCGTCCGCGTCAAAGTAAAGGACTGCTTGAGCGCCGAC
GCGCTGCGGTACACGTACCAGGACGTCGACATCCCGTGGATCAGTGCGAAGCCGACGCCGAAGAAA
ACACCGGGGGGCGCTGCGCCTTCCACGACAGAGGCTATATTTCCGGTGGTGCTGGATAAGCCGGTG
AGCTCTACGGTGGCGAGGCCGAAGACGGGGAGGAGTACTGGGGAGGAGGAGGTGTTGGTGGTGGA
GGGAATCGAGCTGGACAAGGACGTGGCCGTGAAGTTCGACGTGTATATAAACGCGCCGGACAACG
AAGGGGTGGGGCCGGAGGCGAGCGAGTTCGCAGGGAGCTTCGTCCAGGTGCCGCACAAGCACAAG
AAGGGGAAGAAGGAGAAGGCGAGGATTAAAACGACGCTCAGGCTCGGGATAACGGACCTGCTCGA
GGACATCGGCGCCGAGGACGACGAGAGCGTGCTCGTCACGCTCGTGCCGAGGATAGGCGAGGGGT
TGGTCAAGGTTGGTGGGCTAAGGATCGATTTCTCCAAGTGATCAGCAGCAAATTAACTATACATGA
AAGTAAAAAAAATTGCATT3'



ภาพที่ 16 แสดงภาพโครงสร้างยีน PPO2 ในสับปะรด ขนาด 3 kbp และตำแหน่ง primer PDK_PPO2 F1 และ PDK_PPO2 R1 บน Exon 2 ยีน PPO2



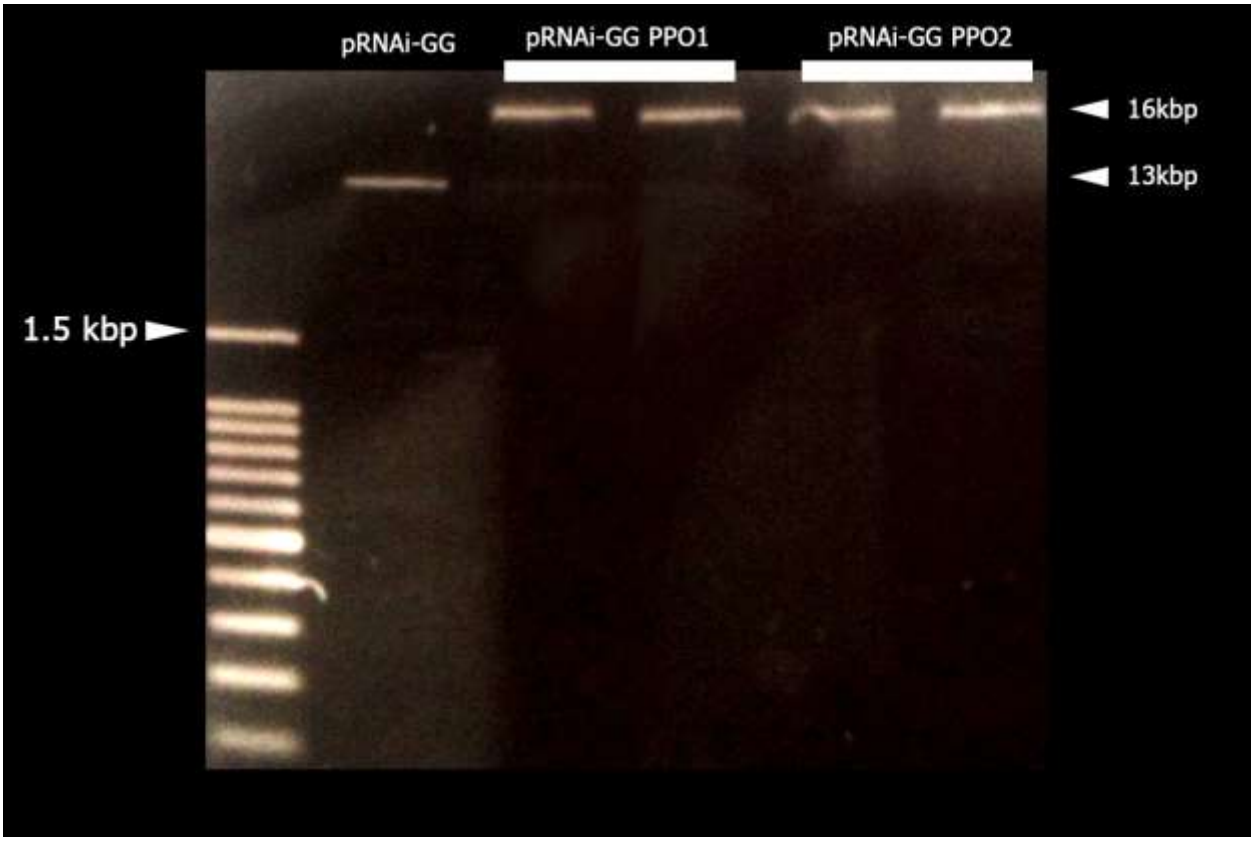
ภาพที่ 17 แสดงภาพการโคลนชิ้นยีนบางส่วนของยีน PPO1 ขนาด 866 bp และ ยีน PPO2 ขนาด 809 bp

8.3 การตัดต่อเวคเตอร์ pRNAi-GG และการถ่ายเวคเตอร์เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียม AGL1

นำชิ้นยีน PPO1 และ PPO2 ที่โคลนได้ตัดต่อเข้าสู่ Vector pRNAi-GG โดยวิธี Single Digestion-Ligation แล้ว Transform ด้วยวิธี Heat shock เข้าสู่ E. coli DH5 alpha competent Cells เลี้ยงบน อาหารเลี้ยงเชื้อ LB ผสม kanamycin 25 mg/L และ chloramphenicol 5 mg/L เพื่อคัดเลือก Transformant ที่ได้รับ recombinants vector จากผลการทดลองพบว่าประสบความสำเร็จในการได้ Transformant สำหรับยีน PPO1 และ PPO2 พบว่าได้ Colony จำนวนมาก เมื่อนำ single colony Transformant ไปเลี้ยงสกัด recombinants vector แล้วนำไป ตรวจสอบข้อมูลยีน *ppo1* และยีน *ppo2* โดยนำไปตัดด้วย Restrcition enzyme BsaI จาก ผลการทดลองพบว่า เอนไซม์ BsaI สามารถตัด WT pRNAi-GG ได้ โดยพบขนาดอยู่ที่ประมาณ 13 kbp แต่ไม่

สามารถตัด pRNAi-GG PPO1 และ pRNAi-GG PPO2 ได้โดยพบขนาดของเวคเตอร์อยู่ที่ 16 kbp ซึ่งในส่วนของ WT pRNAi-GG เอนไซม์ BsaI สามารถตัดชิ้นยีน ccdB ซึ่งเป็น Insert ภายในออกได้ทั้งหมดประมาณ 3kb (ภาพที่ 18) ทั้งนี้การใช้ PDK intron ซึ่งมี chloramphenicol Resistance ยีน อยู่ภายในสามารถซึ่งหากแบคทีเรียสามารถโตในอาหารที่มี chloramphenicol ได้โครงสร้างภายในเวคเตอร์ต้องถูกต้อง ทั้งนี้จากผลการทดลองสามารถยืนยันความถูกต้องของเวคเตอร์ได้

ภาพที่ 18 แสดงภาพการตัดเวคเตอร์ที่สกัดได้เพื่อตรวจสอบด้วย Restrcition enzyme BsaI ใน pRNAi-GG และ เวคเตอร์ pRNAi-GG PPO1 และ PPO2



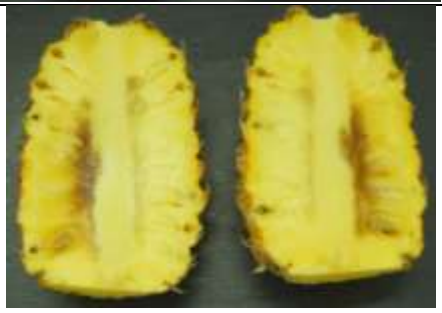
นำเวคเตอร์ที่สกัดได้ถ่ายเข้าสู่ Agrobacterium AGL1 โดยวิธี Freeze-thaw คัดเลือก Transformant ด้วย Antibiotic Kanamycin พบว่าได้ Transformant ประมาณ 50 โคโลนี ต่อ plate ทั้งนี้เตรียมดำเนินการเก็บตัวอย่าง สัปปะรด เพื่อ Inoculate กับเชื้อ และ Transform ยีนเข้าสู่ผลสัปปะรด

8.4 การ Inoculate เชื้อ Agrobaterium สู่ผลสัปปะรดเพื่อทดสอบการแสดงออกของยีน PPO1, PPO2

จากผลการทดลองของสับปะรดทั้ง 2 ชุด คือที่ 2 และ 3 สัปดาห์ พบว่าเชื้อ Agrobacterium (AGL1) pRNAi-GG: PPO2 สามารถ Infect ผลสัปปะรดได้และทำให้เกิดกระบวนการ Silencing gene PPO2 เป็นผลให้อาการไส้สีน้ำตาลที่เกิดขึ้นกับชุดควบคุมในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญและเห็นได้ชัดเจน โดยในส่วนของ Agrobacterium (AGL1) pRNAi-GG: PPO2 มีอาการไส้สีน้ำตาลลดลงอย่างชัดเจน ถึง 5 ใน 6 ซ้ำ

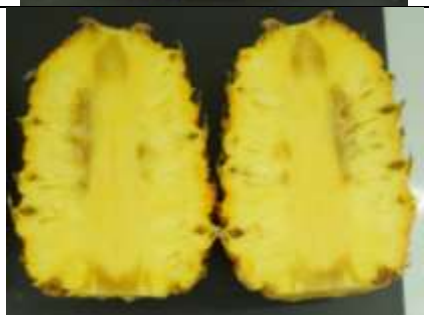
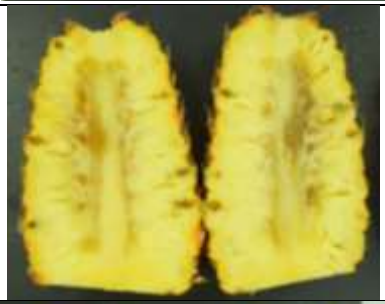
ของชุดการทดลอง หรือ ลดลง 83.33% จึงสามารถกล่าวได้ว่ายีน PPO2 มีส่วนเกี่ยวข้องอย่างมากกับอาการไส้สีน้ำตาลในสับปะรดพันธุ์ตราดสีทอง อย่างไรก็ดีในส่วนของ Agrobacterium (AGL1) pRNAi-GG: PPO1 ยีน PPO1 พบว่าผลการทดลองไม่มีความแตกต่างมากนักกับชุดควบคุม (ผลการทดลองไม่ได้แสดง) จึงสามารถสรุปได้ว่า ยีน PPO2 มีผลมากที่สุดต่อการเกิดอาการไส้สีน้ำตาลในสับปะรดพันธุ์ตราดสีทอง อย่างไรก็ดีในส่วนของสัปดาห์ที่ 3 (ชุดที่ 2) ผลสับปะรดทั้งในส่วนของชุดควบคุมและชุดทดลองได้ผลไม่ต่างกันมากนักแต่ในส่วนของ (AGL1) pRNAi-GG: PPO2 พบ อาการไส้สีน้ำตาลลดลงเกือบ 50% ของจำนวนซ้ำทั้งหมด (ตารางที่ 7, ภาพที่ 19)

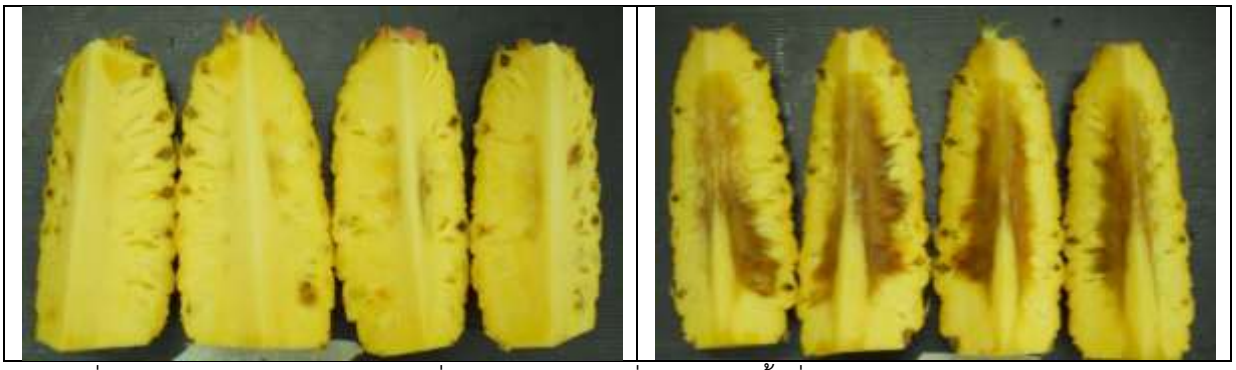
ตารางที่ 7 แสดงภาพเปรียบเทียบสับปะรด ชุดที่ 1 และ 2 ที่ได้รับการฉีด Agrobacterium pRNAi-GG: PPO2 และชุดควบคุม ที่ได้รับการฉีดน้ำกลั่นแทน

	ชุดที่ 1	
	Treat with Agrobacterium pRNAi-GG: PPO2	Control H_2O
R1		
R2		
R3		

R4		
R5		
R6		

	ชุดที่ **2**	
	Treat with Agrobacterium pRNAi-GG: PPO2	Control H_2O
R1		

R2		
R3		
R4		
R5		
R6		



ภาพที่ 19 แสดงภาพผลสับปะรดชุดที่ 1 Treatment ที่ 2 และ 4 ซ้ำที่ 4 ตัดแบ่ง 4 แฉก เปรียบเทียบการฉีด Agrobacterium pRNAi-GG: PPO2 (ซ้าย) และชุดควบคุม ที่ได้รับการฉีดน้ำกลั่นแทน (ขวา)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ปัญหาสำคัญที่เกิดกับผลสับปะรดผลสดเกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลานาน เช่นการขนส่งทางเรือหรือห้องเย็น ทำให้เกิด อาการไส้สีน้ำตาล ทำให้เกิดปัญหาเรื่องราคาและคุณภาพซึ่งต้องแข่งขันกับประเทศอื่น สับปะรดพันธุ์ตราดสีทอง มีคุณสมบัติที่ดี ทั้งเรื่องรสชาติและสีสันแต่มีปัญหาเรื่องไส้สีน้ำตาลที่เกิดขึ้นระหว่างการขนส่งรุนแรงมาก หากว่าสามารถแก้ในเรื่องอาการไส้สีน้ำตาลได้จะช่วยส่งเสริมการส่งออกให้เกษตรกรและผู้ประกอบการสามารถขยายตลาดการส่งออกและเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตร ในงานวิจัยนี้ สามารถโคลนชิ้นยีน PPO1 และ PPO2 จากสับปะรดพันธุ์ตราดสีทองแล้วตัดต่อเข้าสู่ เวคเตอร์ pRNAi-GG และ ถ่ายเวคเตอร์ที่ได้รับการตัดต่อแล้วทั้ง 2 ชนิด เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียม ชนิด AGL1 ได้ Transformant 2 ชนิดซึ่งพร้อมสำหรับใช้ถ่ายยีนเพื่อสร้างระบบ Silencing ยีน PPO1/2 คือ AGL1 PPO1_RNAi-GG และ AGL1 PPO2_RNAi-GG ซึ่งสามารถนำไปใช้ถ่ายเข้าสู่พืชได้ทันที หรือ ถ่ายเข้าสู่ผลสับปะรดเพื่อทดสอบแบบ Transient transformation จากผลการทดลองพบว่าผลสับปะรดที่ได้รับการ Inoculate แบบฉีดโดยตรงโดย AGL1 PPO2_RNAi-GG มีอาการไส้สีน้ำตาลลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ดีผลสับปะรดที่ได้รับการ Inoculate แบบฉีดโดยตรงโดย AGL1 PPO1_RNAi-GG เกิดอาการไส้สีน้ำตาลเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมโดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จึงสามารถสรุปได้ได้ว่ายีน PPO2 อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับอาการไส้สีน้ำตาลที่รุนแรงในสับปะรดพันธุ์ตราดสีทองและสามารถวิจัยและพัฒนาต่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์สับปะรดพันธุ์ตาดสีทองต่อไปได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถนำ เวคเตอร์ที่ตัดต่อได้ละ Transformant ทั้ง 2 ชนิดซึ่งพร้อมสำหรับใช้ถ่ายยีนเพื่อสร้างระบบ Silencing ยีน PPO1/2 คือ AGL1 PPO1_RNAi-GG และ AGL1 PPO2_RNAi-GG ไปใช้ถ่ายเข้าสู่พืชได้ทันที หรือถ่ายเข้าสู่ผลสับปะรดเพื่อทดสอบแบบ Transient transformation และสามารถนำข้อมูลยีน PPO2 ซึ่งมีความเป็นไปได้อย่างมากว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับอาการไส้สีน้ำตาลที่รุนแรงในสับปะรดพันธุ์ตราดสีทองและสามารถวิจัยและพัฒนาต่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์สับปะรดพันธุ์ตาดสีทองต่อไปได้เช่นการ Knockdown ยีน PPO2 โดยเทคนิค Gene editing

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่สนับสนุนทุนในการวิจัย สถาบันวิจัยพืชสวนและกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรมที่ให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือในการทดลองและปฏิบัติงาน

เอกสารอ้างอิง

APPLICATION FOR LICENCE FOR INTENTIONAL RELEASE OF A GMO INTO THE ENVIRONMENT: Application No. DIR 0028/2002

Christian W. B. Bachem1, Gert-Jan Speckmann1, Piet C. G. van der Linde, Frank T. M. Verheggen, Michelle D. Hunt, John C. Steffens & Marc Zabeau(1994). Antisense Expression of Polyphenol Oxidase Genes Inhibits Enzymatic Browning in Potato Tubers. Nature Biotechnology 12, 1101 – 1105.

Chung C.T., Suzanne L. Niemela, Roger H. Miller. (1989). One-step preparation of competent Escherichia coli: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2172.2

Clemente, E., Pastore, G.M. (1998). Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for foodtechnology. Boletim SBCTA, 32, 167-171.

Coetzer C, Corsini D, Love S, Pavek J, Tumer N. Control of enzymatic browning in potato (Solanum tuberosum L.) by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase (2001). J. Agric. Food Chem., 49 (2), pp 652–657

Lattanzio, V., Linsalata, V., Palmieri, S., Van Sumere, C.F.,1989. The beneficial effect of citric and ascorbic acid on the phenolic browning reaction in stored artichoke (Cynara scolymus L.) heads. Food Chem. 33, 93/106.

ONE 7(5): e38186. doi:10.1371/journal.pone.0038186Raimbault AK, Marie-Alphonsine PA, Horry JP, Francois-Haugrin M, Romuald K, Soler A.,2011. Polyphenol oxidase and peroxidase expression in four pineapple varieties (Ananas comosus L.) after a chilling injury.J Agric Food Chem.Jan 12;59(1):342-8

Saltveit, M.E. (2000). Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browing are alteradby heat shock. Postharvest Biol. and Techno., 21, 61-69.

Thi Bich Thuy Nguyen, Saichol Ketsa, Wouter G. van Doorn,2003.Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage.Postharvest Biology and Technology 30., 187/193.

Tomas-Barberan, F.A., Gil, M.I., Castaner, M., Artes, F.,Saltveit, M.E., 1997. Effect of selected browning inhibitors on phenolic metabolism in stem tissue of harvested lettuce. J. Agric. Food Chem. 45, 583/589.

Weller, A., Sims, C.A., Matthews, R.F., Bates, R.P.,Brecht, J.K. (1997). Browning susceptibility and changes in composition during storage of carambola slices. J. Food Science, 62, 256-260.

Yan P, Shen W, Gao X, Li X, Zhou P, et al. (2012) High-Throughput Construction of Intron-Containing Hairpin RNA Vectors for RNAi in Plants. PLoS