

การควบคุมการแสดงออกของยีนคลอโรฟิลเลสโดยโมเลกุลคลอโรฟิลเลสกลับทิศทางจากภายนอก  
ต่อคุณภาพของบรอกโคลี

นันทวัน หัตถมาศ\*

บทคัดย่อ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของระดับคลอโรฟิลล์ทั้งคลอโรฟิลล์รวม คลอโรฟิลล์เอ บี กิจกรรมของเอนไซม์คลอโรฟิลเลสเปรียบเทียบกับลักษณะทางสรีระขณะเก็บรักษา 5 ลักษณะ ได้แก่ การสูญเสีย น้ำหนัก อัตราการหายใจ การผลิตเอทิลีน การเปลี่ยนแปลงสีในรูปของค่า a b และ hue และการเปลี่ยนแปลงแคโรทีนอยด์ พบว่าอุณหภูมิขณะเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเชิงบวกต่อกิจกรรมของเอนไซม์ การสูญเสียน้ำหนัก อัตราการหายใจ การผลิตเอทิลีน การเปลี่ยนแปลงสีในรูปของค่า a และการเปลี่ยนแปลงแคโรทีนอยด์ และเปลี่ยนแปลงเชิงลบต่อการเปลี่ยนแปลงสีในรูปของค่า b hue และปริมาณคลอโรฟิลล์ การให้เอทิลีนจากภายนอกสามารถเร่งกระบวนการทั้งหมด โดยเฉพาะปริมาณคลอโรฟิลล์ และกิจกรรมของเอนไซม์คลอโรฟิลเลสให้เกิดขึ้นได้เร็วขึ้นกว่าชุดควบคุมประมาณ 2 เท่า การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการดูดซับดีเอ็นเอจากภายนอกของเนื้อเยื่อบรอกโคลี เพื่อดูความเป็นไปได้ในการสนองตอบเน้นปริมาณคลอโรฟิลล์และกิจกรรมของเอนไซม์ รวมทั้งระดับการแสดงออกของเอนไซม์คลอโรฟิลเลส เมื่อให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพลาสมิดพบว่าเนื้อเยื่อสามารถดูดซับดีเอ็นเอ 20 µg/ml เป็นระยะทาง 2 เซนติเมตร มีเสถียรภาพ 45 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR การเพิ่มขึ้นส่วนของยีนคลอโรฟิลเลสด้วยไพรเมอร์จำเพาะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 นิวคลีโอไทด์ และเมื่อนำมาต่อเข้ากับ 35S โปรโมเตอร์ จะได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอทั้งในรูป antisense และ sense เมื่อให้ดีเอ็นเอ antisense และ sense chlorophyllase แก่เนื้อเยื่อบรอกโคลีจากภายนอก พบว่า antisense chlorophyllase มีผลต่อการชะลอการเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์ กิจกรรมของเอนไซม์คลอโรฟิลเลสที่ตรวจสอบได้ และระดับการแสดงออกของยีนคลอโรฟิลเลสในรูปปริมาณ mRNA ในทางกลับกันพบว่า sense chlorophyllase สามารถเร่งการสูญเสียคลอโรฟิลล์ และกิจกรรมของเอนไซม์คลอโรฟิลเลส รวมทั้งพบระดับการแสดงออกของยีนคลอโรฟิลเลสที่เพิ่มขึ้นด้วยการให้ดีเอ็นเอจากภายนอกเพื่อศึกษาผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและสรีรวิทยาของเนื้อเยื่อบรอกโคลีในครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงความสามารถทางเทคนิคและความสะดวกรวดเร็วในการตรวจสอบการสนองตอบต่อดีเอ็นเอในรูป antisense และ sense ได้โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านการตัดแปรพันธุกรรม

\* วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว) คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 97 หน้า.

## **Control of Chlorophyllase Gene Expression by Exogenous Antisense *Chlorophyllase* Molecule on Broccoli Qualities**

Nanthawan Hadthamard \*

### **Abstract**

Changes of total chlorophyll, chlorophyll a and b and activity of chlorophyllase were studied and compared with physiological changes {weight loss, respiration rate, ethylene production, color change (a and b value and Hue angle) and carotenoid change} during storage. It was found that higher temperature increase activity of enzyme, weight loss, respiration rate, ethylene production, a value and carotenoid change and decrease b value, hue angle and chlorophyll contents. Furthermore, external ethylene could accelerate all changes especially chlorophyll content and activity of chlorophyllase to a level about 2 times faster than the control untreated ethylene. A preliminary study on exogenous DNA absorption in broccoli tissues based on the alterations of chlorophyll aspects had been carried out. It was found in the trans-DNA fragment at 20 ~g/ml that the absorption into the broccoli pedicle tissue was at distance 2 cm and was stable in the tissue at least 45 hours proven by PCR technique. The chlorophyllase DNA fragment approximate size at 300 bp was amplified by PCR using specific primers and was then downstream ligated with 35S promoter resulting in DNA constructs consisted of both sense and antisense gene orientations. Broccoli absorbed with the antisense chlorophyllase construct showed a delay of chlorophyll degradation, chlorophyllase activity and transcripts whereas, on the otherhand, broccoli containing the sense construct accelerated in chlorophyll loss, chlorophyllase activity including high levels of the mRNA, accumulation. The study of exogenous-DNA applications in broccoli on physio-chemical changer is beneficial for a rapid technique in detection of sense and antisense DNA without a genetic engineering procedure.

---

\* Master of Science (Postharvest Technology), Faculty of School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi. 97 pages.