

การถ่ายยีน *chalcone synthase (CHS)* แบบ antisense เข้าสู่บัวหลวง
(*Nelumbo nucifera* Gaertn.) ด้วยวิธียิงอนุภาค

TRANSFORMATION OF ANTISENSE *CHALCONE SYNTHASE (CHS)* GENE
TO LOTUS (*NELUMBO NUCIFERA* GAERTN.) BY PARTICLE
BOMBARDMENT



เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 132341
วัน,เดือน,ปี..... 17 ก.ค. 2557

b. 1261959x
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2557

KMITL-2014-AG-M-101-164

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การถ่ายยีน *chalcone synthase (CHS)* แบบ antisense เข้าสู่บัวหลวง
(*Nelumbo nucifera* Gaertn.) ด้วยวิธียิงอนุภาค

TRANSFORMATION OF ANTISENSE *CHALCONE SYNTHASE (CHS)* GENE
TO LOTUS (*NELUMBO NUCIFERA* GAERTN.) BY PARTICLE
BOMBARDMENT



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2557

KMITL-2014-AG-M-101-164

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**TRANSFORMATION OF ANTISENSE *CHALCONE SYNTHASE (CHS)* GENE
TO LOTUS (*NELUMBO NUCIFERA GAERTN.*) BY PARTICLE
BOMBARDMENT**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2014

KMITL-2014-AG-M-101-164

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2014

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการใช้งานภายในเท่านั้น เมื่อผู้ใช้ได้เข้าไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การถ่ายยีน *Chalcone synthase (CHS)* แบบ antisense เข้าสู่บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) ด้วยวิธียิงอนุภาค
Transformation of antisense *Chalcone Synthase (CHS)* Gene to Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) by Particle Bombardment

นักศึกษา นายปฤษฎางค์ อะโน
รหัสประจำตัว 52640901
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.กัญญา แซ่เตียว
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ดร.นงลักษณ์ เกรินทวงศ์	นางกมล เมฆทนต์
รศ.ดร.สุเม อธิษฐานารถ	ดร.กัญญา แซ่เตียว
ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์	ดร.กัญญา แซ่เตียว
ผศ.ดร.มณฑินี ชีรารักษ์	ดร.กัญญา แซ่เตียว
ผศ.ดร.กัญญา แซ่เตียว	ดร.กัญญา แซ่เตียว

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 19 พฤษภาคม 2557

สถานที่สอบ ห้องประชุม 1 (ชั้น 1 อาคารนูนาค L)

คณบดีรับรองแล้ว



(รองศาสตราจารย์ศักดิ์ชัย ชูโชติ)

คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาวันที่ 19 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2557
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การถ่ายยีน <i>chalcone synthase (CHS)</i> แบบ antisense เข้าสู่บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.) ด้วยวิธียิงอนุภาค
นักศึกษา	นายปฤษฎางค์ อะโน
รหัสประจำตัว	52640901
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ.ศ.	2557
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.กัญจนา แซ่เตียว

บทคัดย่อ

เอนไซม์ *chalcone synthase (CHS)* เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoids ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีในดอกไม้ ยีน *chalcone synthase (CHS)* สามารถโคลนได้จาก genomic DNA และ cDNA ที่สกัดได้จากกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากข้อมูลในธนาคารยีน (GenBank) ได้ยีน *CHS* แบบเต็มเส้นที่โคลนจาก genomic DNA และ cDNA มีขนาด 1,599 คู่เบส และ 1,170 คู่เบส ตามลำดับ สามารถแปลรหัสได้เป็น 389 กรดอะมิโน นำยีน *CHS* ที่ได้มาใช้ในการถ่ายยีนและนำไปศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในแต่ละระยะการพัฒนาดอกบัวหลวงพันธุ์กริกสีขาวย และดอกบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่า มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากที่สุดในกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช ดอกบัวหลวงสัตตบงกชมีปริมาณการแสดงออกของยีนมากที่สุดในช่วงระยะดอกตูมขนาดเล็ก และลดลงเมื่อดอกมีการพัฒนามากขึ้น ดอกบัวหลวงพันธุ์กริกมีปริมาณการแสดงออกของยีนน้อย และมีปริมาณใกล้เคียงกันในทุกระยะการพัฒนาดอก

การชักนำเนื้อเยื่อ shoot cluster จากส่วนยอดของเอ็มบริโอของเมล็ดบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงราชินีเพื่อใช้ถ่ายยีน โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ได้ shoot cluster ที่มีลักษณะเป็นชิ้นเนื้อเยื่อที่มีกระจุกยอด เกิดขึ้นจากปลายยอดเดิมและจากบริเวณตาข้าง ยอดที่เกิดขึ้นใหม่มีกาบสีเขียวอ่อนห่อหุ้มไว้ และมีใบอ่อนขนาดเล็กสีเขียวเกิดขึ้นจากกระจุกยอด ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ hygromycin เพื่อใช้คัดเลือก shoot cluster ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า

สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และทำให้ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีตายได้ทั้งหมดใน 8 สัปดาห์

การถ่ายยีนบางส่วนของยีน *CHS* แบบ antisense ขนาด 331 คู่เบส ที่โคลนจาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก ที่อยู่บนพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA ที่ถูกควบคุมด้วย CaMV 35s promoter และ NOS terminator โดยมียีน *hygromycin phosphotransferase (hptII)* เป็นยีนคัดเลือก และมียีน *green fluorescent protein (GFP)* เป็นยีนรายงานผล ถ่ายยีนเข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีด้วยวิธียิงอนุภาค โดยใช้ระยะยิง 9 เซนติเมตร ใช้แก๊สฮีเลียม (He) ความดัน 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และใช้พาหะเป็นอนุภาคทองคำขนาด 1 ไมโครเมตร ตรวจสอบการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *GFP* พบว่า มีเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริก มีจุดสีเขียวเรืองแสงของยีน *GFP* ร้อยละ 72 มีคะแนนประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเฉลี่ย 0.97 ± 0.20 คะแนน และบัวหลวงราชินีมีจุดสีเขียวเรืองแสงของยีน *GFP* ร้อยละ 75 มีคะแนนประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเฉลี่ย 0.99 ± 0.17 คะแนน หลังจากการคัดเลือก มีบัวหลวงบุณฑริกรอดชีวิตจำนวน 2 ต้น ทั้ง 2 ต้น พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* และตรวจพบการมีอยู่ของยีน *GFP* และยีน *hptII* ใน genomic DNA ด้วยเทคนิค PCR และมีต้นบัวหลวงราชินีรอดชีวิตจำนวน 5 ต้น พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* จำนวน 3 ต้น และตรวจพบการมีอยู่ของยีน *GFP* และยีน *hptII* ใน genomic DNA ด้วยเทคนิค PCR จำนวน 3 ต้น เมื่อตรวจสอบปริมาณแสดงออกของยีน *CHS* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่า ต้นบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน 2 ต้น มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ลดลงแต่บัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีนต้นอื่น มีปริมาณการแสดงออกไม่ต่างจากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

Thesis Title	Transformation of antisense <i>chalcone synthase (CHS)</i> gene to lotus (<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.) by particle bombardment.
Student	Prissadang Ano
Student ID.	52640901
Degree	Master of Science
Program	Agricultural Biotechnology
Year	2014
Thesis Advisor	Asst. Prof. Kanjana Saeteaw

ABSTRACT

Chalcone synthase (CHS) enzyme is a key enzyme in flavonoids biosynthesis pathway. The *chalcone synthase (CHS)* genes were cloned from genomic DNA and cDNA from the petals of 'Buntharik' white lotus and 'Sattabangkacha' pink lotus by PCR technique using a specific primers of *CHS* genes designed from the GenBank database. The *CHS* genes cloned from the genomic DNA and cDNA were 1,599 bp. and 1,170 bp respectively. The translated amino acids were 389 residuals. Semi-quantitative RT-PCR analysis revealed that the highest *CHS* gene expression was found in early budding stage of pink lotus and was reduced in later stages. Whereas, the expression in Buntharik lotus was low in all stages of the lotus development.

Shoot tips from the embryos of Buntharik and Rachinee lotus were used to induced shoot clusters by cultivation on a MS medium supplemented with 40 μ M NAA and 0.5 μ M TDZ for 8 weeks and a MS medium supplemented with 50 μ M BA for 8 weeks. New shoots of shoot clusters were generated from old shoot tip and nodes. New shoots were covered by green sheaths and had some green small leaves. The concentration of hygromycin in the selection medium 15 mg/l. was able to eliminate both lotus shoot clusters in 8 weeks.

An antisense *CHS* gene (331 bp) from the cDNA of Buntharik lotus was used to construct a plant transformation vector; pCAMBIA1302CHSA. The antisense *CHS* gene in a vector was controlled by CaMV 35s promoter and NOS terminator. *Green fluorescent protein (GFP)* gene was used as a reporter gene and *hygromycin phosphotransferase (hptII)* gene was used as a selectable gene. The vector construct was transformed into Buntharik and Rachinee

shoot clusters by particle bombardment at the condition of 9 cm. target distance, Helium gas

pressure 1,100 psi and gold particles size 1.0 μm . After 1 week of transformation, 72% of Buntharik transformants displayed the green spots of *GFP* and had a transformation efficiency score of 0.97 ± 0.20 points. Whereas, 75% of Rachinee transformants displayed the green spots of *GFP* and had a transformation efficiency score of 0.99 ± 0.17 points. After transformants selection and regeneration, 2 transformants of Buntharik shoot clusters showed the *GFP* green spots and existence of *GFP* gene and *hptII* gene in the genomic DNA amplified by PCR technique. Whereas, in the Rachinee transformants, only 3 of 5 showed the *GFP* green spots and *GFP* gene and *hptII* gene amplification. After *CHS* gene expression analyses by semi-quantitative RT-PCR, 2 transformed Rachinee shoot clusters presented the reduction of *CHS* gene expression. Whereas the rest of transformants shoot clusters had no effect.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา **IV**ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.กัญญา แซ่เตียว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำแนะนำ และให้แนวทางแก้ไขปัญหา ในเรื่องการทดลองและเรื่องส่วนตัว จนทำให้สามารถ แก้ไขปัญหาในการทดลอง และสามารถดำเนินการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. สุเมธ ธีรธรรม ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์ ผศ.ดร.มณฑินี ธีรารักษ์ และ ดร. นงลักษณ์ เกรินทวงศ์ ที่กรุณาให้ความรู้ตลอดจนคำแนะนำระหว่างการทำวิทยานิพนธ์จน สำเร็จได้เป็นอย่างดี และกรุณาสละเวลามาเป็นผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ เรืออากาศเอกหญิง ปริมลภ (วสุวัต) ชูเกียรติมัน และ ดร. เสริมลาภ วสุวัต ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างและให้ความรู้เกี่ยวกับบัวหลวง เพื่อใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร ที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้ต่างๆ ให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณอาจารย์ และเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อ อุปกรณ์และสถานที่ในการถ่ายยีนและการทำวิจัย

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ช่วยเหลือในการเตรียม อุปกรณ์ในการทดลอง และช่วยเหลือห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ขอขอบคุณเพื่อนๆ และน้องๆ ในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร และ น้องๆ ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพืชสวนที่คอยช่วยเหลือในการเตรียมสารเคมีและ อุปกรณ์ ตลอดจนคอยให้กำลังใจ และคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการ การอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) และกองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ภายใต้โครงการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยวิธีตัดแต่ง พันธุกรรม และทุนสนับสนุนทำเล่มวิทยานิพนธ์จากบัณฑิตศึกษาวิทยาลัย

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกเรื่องๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ปฤษฎางค์ อะโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	XII
สารบัญภาพ.....	XIV
รายการคำย่อและสัญลักษณ์.....	XVII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
1.3 สมมุติฐานของการศึกษา.....	2
1.4 ขอบเขตการศึกษา.....	2
1.5 ขั้นตอนของการศึกษา.....	3
1.6 สถานที่ดำเนินงาน.....	3
1.7 ระยะเวลาดำเนินการ.....	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวหลวง.....	4
2.2 ลักษณะประจำพันธุ์ของบัวหลวงพันธุ์ลูกเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.....	6
2.3 ลักษณะประจำพันธุ์ของบัวหลวงราชินี.....	7
2.4 รงควัตถุในดอกไม้.....	8
2.5 บทบาทของยีน chalcone synthase (CHS).....	9
2.6 การถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช.....	10
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	12
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	15
3.1 อุปกรณ์และวัสดุการวิจัย.....	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	19
3.2.1 การชักนำให้เกิด shoot cluster ของบัวหลวงบุณทริกและบัวหลวงราชินี.....	19
3.2.2 การศึกษาระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารคัดเลือก shoot cluster ของบัวหลวง ที่ได้รับการถ่ายยีน.....	20
3.2.3 การโคลนยีน <i>CHS</i> จากกลีบดอกบัวหลวงบุณทริกและกลีบดอกบัวหลวง สกัดบงกช ด้วยเทคนิค PCR.....	22
3.2.3.1 การสกัด genomic DNA จากกลีบดอกบัวหลวง.....	22
3.2.3.2 การสกัด RNA จากกลีบดอกบัวหลวงบุณทริกและ บัวหลวงสกัดบงกช.....	23
3.2.3.3 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ DNA และ RNA ด้วยการดูดกลืนแสง และเทคนิค gel electrophoresis.....	24
3.2.3.4 การกำจัด DNA ที่ปนเปื้อนออกจาก RNA ด้วยเอนไซม์ DNase I.....	25
3.2.3.5 การสังเคราะห์ cDNA จาก RNA ด้วยชุดสังเคราะห์ RevertAid first strand cDNA synthesis.....	25
3.2.3.6 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีน <i>CHS</i> แบบเต็มเส้น.....	26
3.2.3.7 การโคลนยีน <i>CHS</i> แบบเต็มเส้นจาก genomic DNA และ cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณทริกและบัวหลวงสกัดบงกช ด้วยเทคนิค PCR.....	26
3.2.3.8 การแยก DNA ออกจาก agarose gel และทำให้บริสุทธิ์.....	27
3.2.3.9 การเชื่อมต่อยีน <i>CHS</i> เข้ากับโคลนนิ่งเวกเตอร์ pTZ57R/T.....	28
3.2.3.10 การชักนำพลาสมิดเวกเตอร์ เข้าสู่ <i>E. coli</i> DH5 α ด้วยวิธี heat shock.....	28
3.2.3.11 การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด.....	29
3.2.3.12 การตรวจสอบพลาสมิดถูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	30
3.2.3.13 การตรวจสอบพลาสมิดถูกผสมด้วยเทคนิค PCR.....	30
3.2.3.14 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของยีน <i>CHS</i>	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.4 การศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> ในกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก และดอกบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR.....	31
3.2.4.1 การเก็บตัวอย่างดอกบัวหลวงหลวงบุณฑริกและดอกบัวหลวง.....	31
3.2.4.2 การสกัด RNA จากกลีบดอกบัวหลวง.....	31
3.2.4.3 การสังเคราะห์ cDNA จาก RNA ของกลีบดอกบัวหลวง.....	33
3.2.4.4 การโคลนบางส่วนของยีน <i>CHS</i> จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวง.....	33
3.2.4.5 การศึกษาปริมาณของการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> ในกลีบดอกบัวหลวง ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR.....	34
3.2.5 การถ่ายยีน <i>CHS</i> แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ต้นบัวหลวงบุณฑริก และบัวหลวงราชินี ด้วยวิธียิงอนุภาค.....	35
3.2.5.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม pBICHSA.....	35
3.2.5.2 การสร้างพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA.....	36
3.2.5.3 การถ่ายยีน <i>CHS</i> แบบ antisense เข้าสู่เนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี ด้วยวิธียิงอนุภาค.....	39
3.2.5.4 การตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนจากการแสดงออก แบบชั่วคราวของยีน <i>GFP</i>	41
3.2.5.5 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>GFP</i> และยีน <i>hptII</i> ด้วยเทคนิค PCR.....	42
3.2.5.5 การศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> ในต้นบัวหลวง ที่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR.....	42
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	44
4.1 ผลการชักนำให้เกิด shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี.....	44
4.1.1 การเปลี่ยนแปลงของขนาดและน้ำหนักของชิ้นเนื้อเยื่อ.....	44
4.1.2 การเกิดยอดและใบของชิ้นเนื้อเยื่อ.....	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 ผลการศึกษาหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ hygromycin เพื่อใช้คัดเลือก shoot cluster ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน.....	49
4.2.1 คะแนนความสมบูรณ์ของของขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก.....	49
4.2.2 ร้อยละของขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก.....	51
4.2.3 จำนวนยอดและจำนวนใบของขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก.....	52
4.3 ผลการศึกษาการโคลนยีน <i>CHS</i> แบบเต็มเส้นจาก genomic DNA และ cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยเทคนิค PCR.....	64
4.3.1 ผลการโคลนยีน <i>CHS</i> แบบเต็มเส้นจาก genomic DNA และ cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและหลวงสัตตบงกช.....	64
4.3.2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก genomic DNA และ cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช.....	65
4.3.3 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>CHS</i> แบบเต็มเส้น ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช กับพืชอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank.....	66
4.3.4 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>CHS</i> แบบเต็มเส้น ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช กับพืชอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank.....	67
4.3.5 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช กับลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>CHS</i> พืชอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank.....	68

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.4 การศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> ในกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก และดอกบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR.....	74
4.4.1 ผลการโคลนบางส่วนของยีน <i>CHS</i> จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยเทคนิค PCR.....	74
4.4.2 ผลการศึกษาปริมาณของการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> ในกลีบดอกบัวหลวง ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR.....	76
4.5 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> ในต้นบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี ที่ได้รับการถ่ายยีน <i>CHS</i> แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวงด้วยวิธียิงอนุภาค	78
4.5.1 ผลการโคลนบางส่วนของยีน <i>CHS</i> จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก	78
4.5.2 ผลการสร้างพลาสมิดลูกผสม pBICHSA.....	78
4.5.3 ผลการสร้างพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA.....	81
4.5.4 ผลการถ่ายยีน <i>CHS</i> แบบ antisense ที่อยู่บนพลาสมิด pCAMBIA1302CHSA เข้าสู่เนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี ด้วยวิธียิงอนุภาค.....	84
4.5.5 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>GFP</i> และยีน <i>hptII</i> ใน genomic DNA ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR.....	96
4.5.6 ผลการศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> ในต้นบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR.....	99
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง.....	101
5.1 การศึกษาการชักนำให้เกิด shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี...101	
5.2 การศึกษาระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารคัดเลือก shoot cluster ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน.....	102
5.3 การศึกษาการโคลนยีน <i>CHS</i> จากกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยเทคนิค PCR.....	103

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.4 การศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน CHS ในกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก และดอกบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR.....	105
5.5 การศึกษาการถ่ายยีน CHS แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ต้นบัวหลวงบุณฑริก และบัวหลวงราชินี ด้วยวิธียิงอนุภาค.....	107
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	110
บรรณานุกรม.....	112
ภาคผนวก 1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี.....	129
ภาคผนวก 1.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS.....	120
ภาคผนวก 1.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย Luria-Bertani (LB).....	122
ภาคผนวก 1.3 การเตรียมบัฟเฟอร์ CTAB ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร.....	122
ภาคผนวก 1.4 การเตรียมสารละลาย TE (Tris - EDTA) buffer.....	123
ภาคผนวก 1.5 การเตรียมสารละลาย TAE (Tris acetate EDTA) buffer.....	123
ภาคผนวก 2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	124
ภาคผนวก 2.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	125
ประวัติผู้เขียน.....	126

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ขนาดเฉลี่ยของซึ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิด shoot cluster เป็นเวลา 16 สัปดาห์.....	47
4.2 น้ำหนักเฉลี่ยของซึ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิด shoot cluster เป็นเวลา 16 สัปดาห์.....	47
4.3 การเกิดยอดของซึ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิด shoot cluster เป็นเวลา 16 สัปดาห์.....	48
4.4 การเกิดใบของซึ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิด shoot cluster เป็นเวลา 16 สัปดาห์.....	48
4.5 คะแนนความสมบูรณ์ของซึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสาร hygromycin เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	56
4.6 คะแนนความสมบูรณ์ของซึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสาร hygromycin เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	57
4.7 ร้อยละโดยเฉลี่ยของซึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริก ที่รอดบนอาหารคัดเลือกที่มีสาร hygromycin เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	58
4.8 ร้อยละโดยเฉลี่ยของซึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินี ที่รอดบนอาหารคัดเลือกที่มีสาร hygromycin เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	59
4.9 จำนวนยอดเฉลี่ยของซึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริก ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสาร hygromycin เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	60
4.10 จำนวนยอดเฉลี่ยของซึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินี ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสาร hygromycin เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	61
4.11 จำนวนใบเฉลี่ยของซึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริก ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสาร hygromycin เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	62
4.12 จำนวนใบเฉลี่ยของซึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินี ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสาร hygromycin เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	63
4.13 ผลการเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) ของลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช กับลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>CHS</i> ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX.....	72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.14 จำนวนของ shoot cluster ของบัวหลวงบุณชกริกที่ได้รับการถ่ายยีน <i>CHS</i> แบบ antisense ที่อยู่รอดบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 10 สัปดาห์.....	86
4.15 จำนวนของ shoot cluster ของบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน <i>CHS</i> แบบ antisense ที่อยู่รอดบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 10 สัปดาห์.....	86
4.16 ประสิทธิภาพในการถ่ายยีน <i>CHS</i> แบบ antisense ด้วยวิธียิงอนุภาค เข้าสู่ชั้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณชกริกและบัวหลวงราชินี.....	88



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 บัวหลวงในประเทศไทย.....	5
2.2 แผนผังของกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoids.....	10
3.1 เมล็ดบัวหลวงอายุประมาณ 4 สัปดาห์.....	20
3.2 เอมบริโอของเมล็ดบัวหลวงบunchริก.....	20
3.3 เกณฑ์การให้คะแนนความสมบูรณ์ของชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวง.....	21
3.4 ดอกบัวหลวงบunchริกในระยะต่างๆ.....	32
3.5 ดอกบัวหลวงตัดตบงกชในระยะต่างๆ.....	32
3.6 พลาสมิด pBI121.....	38
3.7 พลาสมิดลูกผสม pBICHSA.....	38
3.8 พลาสมิด pCAMBIA1302.....	38
3.9 พลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA.....	38
3.10 เกณฑ์การให้คะแนนประสิทธิภาพในการถ่ายยีน จากร้อยละของพื้นที่สีเขียว เรืองแสงของยีน <i>GFP</i> บนชิ้นเนื้อเยื่อ.....	41
4.1 ชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงอายุ 8 สัปดาห์ และชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงอายุ 16 สัปดาห์.....	46
4.2 ชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบunchริก ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin ความเข้มข้นระดับต่างๆ ในสัปดาห์ที่ 8.....	54
4.3 ชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินี ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin ความเข้มข้นระดับต่างๆ ในสัปดาห์ที่ 8.....	55
4.4 ผลผลิต PCR ของยีน <i>CHS</i> แบบเต็มเส้น.....	64
4.5 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงบunchริก และบัวหลวงตัดตบงกช ด้วยโปรแกรม ClustalW multiple alignment.....	69
4.6 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบunchริก และบัวหลวงตัดตบงกช ด้วยโปรแกรม ClustalW multiple alignment.....	70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.7 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุญฑริก และบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยโปรแกรม ClustalW multiple alignment.....	71
4.8 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุญฑริก (<i>N. nucifera</i> cv. Buntharik) และบัวหลวงสัตตบงกช (<i>N. nucifera</i> cv. Satabangkacha) กับลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>CHS</i> ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA5.....	73
4.9 ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน <i>CHS</i>	74
4.10 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุญฑริก ขนาด 1,170 คู่เบส กับบางส่วนของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอก บัวหลวงบุญฑริก และบัวหลวงสัตตบงกช ขนาด 458 คู่เบส.....	75
4.11 การเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> (458 คู่เบส) ในแต่ละระยะการพัฒนาของดอก บัวหลวง ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR.....	77
4.12 ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุญฑริก.....	78
4.13 ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุญฑริก ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Sac</i> I และ <i>Bam</i> HI.....	79
4.14 พลาสมิด pBI121 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Sac</i> I และ <i>Bam</i> HI.....	79
4.15 การตรวจสอบยีน <i>CHS</i> ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pBICHSA ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI และ <i>Hind</i> III.....	80
4.16 การตรวจสอบบางส่วนของยีน <i>CHS</i> ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pBICHS ด้วยเทคนิค PCR.....	80
4.17 พลาสมิดลูกผสม pBICHSA ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI และ <i>Hind</i> III.....	82
4.18 พลาสมิด pCAMBIA1302 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI และ <i>Hind</i> III.....	82
4.19 การตรวจสอบหาบางส่วนของยีน <i>CHS</i> ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Sac</i> I และ <i>Bam</i> HI.....	83
4.20 การตรวจสอบหาบางส่วนของยีน <i>CHS</i> ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI และ <i>Hind</i> III.....	83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์อื่นใด

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.21 การตรวจสอบหาบางส่วนของยีน <i>CHS</i> ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CAMV_forward primer และ NOS_reverse primer.....	84
4.22 การแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน <i>GFP</i> ของต้นบัวหลวงบุนทรริก หลังจากการถ่ายยีน.....	87
4.23 การแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน <i>GFP</i> (ลูกศร) ของต้นบัวหลวงราชินี หลังจากการถ่ายยีน.....	87
4.24 ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนหลังจากการคัดเลือกเป็นเวลา 10 สัปดาห์.....	88
4.25 ต้นบัวหลวงบุนทรริกที่ได้รับการถ่ายยีน.....	89
4.26 ต้นบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน.....	89
4.27 การแสดงออกของยีน <i>GFP</i> ของต้นบัวหลวงบุนทรริกหมายเลข B3/2.....	90
4.28 การแสดงออกของยีน <i>GFP</i> ของต้นบัวหลวงบุนทรริกหมายเลข B5/12.....	91
4.29 การแสดงออกของยีน <i>GFP</i> ของต้นบัวหลวงราชินี หมายเลข R2/1.....	92
4.30 การแสดงออกของยีน <i>GFP</i> ของต้นบัวหลวงราชินี หมายเลข R1/2.....	93
4.31 การแสดงออกของยีน <i>GFP</i> ของต้นบัวหลวงราชินี หมายเลข R2/11.....	93
4.32 การแสดงออกของยีน <i>GFP</i> ของต้นบัวหลวงราชินี หมายเลข R2/4.....	94
4.33 การแสดงออกของยีน <i>GFP</i> ของต้นบัวหลวงราชินี หมายเลข R5/1.....	94
4.34 การแสดงออกของยีน <i>GFP</i> ของต้นบัวหลวงบุนทรริกหมายเลข B3/1.....	95
4.35 การแสดงออกของยีน <i>GFP</i> ของต้นบัวหลวงราชินี ที่ได้รับการถ่ายยีน ที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก แต่ไม่เจริญเติบโตบนอาหาร regeneration.....	95
4.36 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>GFP</i> และยีน <i>hptII</i> ใน genomic DNA ของต้นบัวหลวงบุนทรริกที่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค PCR.....	98
4.37 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>GFP</i> และยีน <i>hptII</i> ใน genomic DNA ของต้นบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน <i>CHS</i> ด้วยเทคนิค PCR.....	98
4.38 การศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> ในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR.....	100

รายการคำย่อและสัญลักษณ์

bp	=	คู่เบส (base pair)
kb	=	กิโลคู่เบส (kilobase base pair)
cm.	=	เซนติเมตร
mm.	=	มิลลิเมตร
g.	=	กรัม
RNA	=	Ribonucleic acid
cDNA	=	Complementary deoxyribonucleic acid
rRNA	=	Ribosomal ribonucleic acid
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
PCR	=	Polymerase chain reaction
α	=	alpha
β	=	beta
RT-PCR	=	Reverse transcription polymerase chain reaction
NAA	=	1-Napthalene acetic acid
TDZ	=	Thiadiazuron
BA	=	6-Benzyladenine
HCl	=	Hydrochloric acid
NaOH	=	Sodium hydroxide

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง เกษตรกรส่วนใหญ่ปลูกบัวหลวงเพื่อจำหน่ายดอกบัว มีความต้องการทางตลาดสูง โดยเฉพาะวันสำคัญทางพระพุทธศาสนา และบางส่วนปลูกเพื่อจำหน่ายเมล็ด ไหลบัว และใบบัว บัวหลวงที่ปลูกในประเทศไทยเป็นบัวหลวงในเขตร้อน (*N. nucifera* Gaertn.) มีดอกสีชมพูและดอกสีขาว แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มบัวหลวงดอกซ้อน ดอกมีกลีบซ้อนมาก กลีบอัดกันแน่น นิยมปลูกเพื่อตัดดอกจำหน่าย ได้แก่ บัวหลวงสัตตบุษย์ดอกสีขาว และบัวหลวงสัตตบงกชดอกสีชมพู ส่วนอีกกลุ่มคือ กลุ่มบัวหลวงดอกไม่ซ้อน ดอกมีกลีบไม่ซ้อน ทำให้ดอกบานได้เต็มที่ เกสรผสมติดเมล็ดมาก นิยมปลูกเพื่อเก็บเมล็ดนำไปทำอาหารและขนมหวาน ได้แก่ บัวหลวงบุณทริกดอกสีขาว และบัวหลวงปทุมดอกสีชมพู (เสริมลาภ วสุวัต, 2538)

สีของดอกไม้เกิดจากการสะสมรงควัตถุในกลีบดอก โดยเฉพาะรงควัตถุหลักเป็นสารในกลุ่ม flavonoids ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ให้สีหลากหลายสีในดอกไม้ ตั้งแต่ ไม่มีสีหรือสีขาว สีเหลืองอ่อน สีชมพู สีแดง สีม่วง และสีน้ำเงิน (Tanaka *et al.* 2005; To and Wang, 2006) ถูกสังเคราะห์จากการทำงานร่วมกันของยีนและเอนไซม์หลายชนิด ในกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoid (Forkmann and Martens, 2001; Winkel-Shirley, 2001) รงควัตถุหลักในกลีบดอกบัวกลุ่มอุบลชาติลุ่มลูกและบัวหลวง อยู่ในกลุ่มของสาร flavonoids เช่นเดียวกับดอกไม้ทั่วไป (Zhu *et al.*, 2012) การใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการศึกษาการทำงาน และดัดแปลงกระบวนการทำงานของยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoid ทำให้ได้ดอกไม้สีใหม่ที่ไม่พบในธรรมชาติ (Winke – Shirley, 2001; Forkmann and Martens, 2001) เช่น ดอกคาร์เนชัน สีชมพูอมม่วงและสีน้ำเงิน (Mol *et al.* 1999) ดอกพิทูเนียสีเหลือง (Davies *et al.* 1998) และสีส้ม (Tsuda *et al.* 2004) ดอกแวมยูราสีเหลือง (Ono *et al.* 2006) ดอกกุหลาบสีน้ำเงิน (Katsumoto *et al.* 2007) เป็นต้น

การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมดัดแปลงกระบวนการทำงานของยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoid จึงเป็นทางหนึ่งในการพัฒนาสายพันธุ์บัวหลวงให้มีสีที่ไม่พบในธรรมชาติได้ เนื่องจากข้อจำกัดด้านความหลากหลายของพันธุ์ที่มีดอกสีเพียงสองสี คือ ดอกสีชมพูและดอกสีขาวเท่านั้น ทำให้การผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศไม่สามารถใช้ปรับปรุงพันธุ์ให้มีดอกสีใหม่เกิดขึ้นได้ ในการศึกษาดอกไม้หลายชนิดที่มีดอกสีขาว เช่น ดอกพิทูเนียแบบ star-type สีขาว-แดง (Koseki *et al.* 2005) ดอกแวมยูราสีขาว (Nakamura *et al.* 2007) และดอก

รักเร่แบบ star-type (Ohno *et al.* 2011) พบว่า ไม่มีการสะสมสาร flavonoid และไม่มีการแสดงออกของยีน *chalcone synthase (CHS)* หรือมีการแสดงออกน้อยมากเมื่อเทียบกับในดอกอื่นที่มีสี ยีน *CHS* เป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ *chalcone synthase (CHS, EC 2.3.1.74)* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญเอนไซม์หนึ่ง ในกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoid (Joseph and Joseph. 2000) ปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* จึงมีผลต่อการสังเคราะห์สาร flavonoids ในกลีบดอกไม้

เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาการทำงานของยีน *CHS* ที่เกี่ยวข้องกับกาเกิดสีของดอกบัวหลวงมาก่อน ในการศึกษาจึงมุ่งเน้นศึกษาการแสดงออกของยีน *CHS* ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีในกลีบดอกบัวหลวงสีขาว และสีชมพู เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการดัดแปลงการทำงานของยีนในการสังเคราะห์สาร flavonoid เพื่อปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงให้มีดอกบัวหลวงสีใหม่ที่สวยงามและหลายหลายเพิ่มมากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อโคลนยีน *CHS* จากกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงสัตตบงกช และสร้างพลาสมิดเพื่อนำไปใช้ในการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense

1.2.2 เพื่อศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงระหว่างการพัฒนาของดอกบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงสัตตบงกช

1.2.3 เพื่อศึกษาผลการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงราชินี ด้วยวิธียิงอนุภาค (particle bombardment) และปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในต้นบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน

1.3 สมมุติฐานของการศึกษา

ศึกษาการแสดงออกของยีน และโคลนยีน *CHS* เพื่อใช้ถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงราชินี สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *CHS* จะทำให้มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ลดลง

1.4 ขอบเขตการศึกษา

โคลนยีน *CHS* จากกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริกดอกสีขาวและบัวหลวงสัตตบงกชดอกสีชมพู เพื่อใช้ศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวง และใช้ในการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงราชินีด้วยวิธียิงอนุภาค ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในบัวหลวงต้นพันธุ์กริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense เปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ขั้นตอนของการศึกษา

1.5.1 ชักนำให้เกิด shoot cluster จากส่วนยอดของเอ็มบริโอของเมล็ดบัวหลวงบุณฑริก และบัวหลวงราชินี เพื่อใช้ในการถ่ายยีน

1.5.2 หาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ hygromycin เพื่อใช้เป็นสารคัดเลือก shoot cluster ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน

1.5.3 โคลนยีน *CHS* จาก genomic DNA และ cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช

1.5.4 ศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงในระหว่างการพัฒนาของดอกบัวหลวงบุณฑริกสีขาวและบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู

1.5.5 สร้างพลาสมิดเพื่อใช้ในการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense และถ่ายยีนเข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี ด้วยวิธียิงอนุภาค

1.5.6 ตรวจสอบผลการถ่ายยีน การมีอยู่ของยีนคัดเลือกและยีนรายงานผลในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน

1.5.7 ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในต้นบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน

1.6 สถานที่ดำเนินงาน

1.6.1 ห้องปฏิบัติการกลาง โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

1.6.2 ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สาขาพืชสวน ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

1.6.3 เก็บตัวอย่างเมล็ดและดอกบัวหลวง จากแปลงทดลอง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.7 ระยะเวลาดำเนินการ

เริ่มต้นการทดลอง กันยายน พ.ศ. 2552

สิ้นสุดการทดลอง มีนาคม พ.ศ. 2557

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวหลวง

บัวหลวงเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ *Nelumboceae* เป็นวงศ์ของพืชน้ำ มีอายุหลายปี พืชในวงศ์นี้ในปัจจุบันพบเพียง 1 สกุล คือ *Nelumbo* มีสมาชิกอยู่ 2 สปีชีส์ คือ บัวหลวงอเมริกัน (*Nelumbo lutea* Pers.) และบัวหลวงเอเชีย (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) (เสริมลาภ วสุวัต, 2538) บัวหลวงมีการจำแนกตามหลักพฤกษศาสตร์ ตามฐานข้อมูลของ NCBI taxonomy database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=4432>) ดังนี้

Kingdom	<i>Plantae</i>
Phylum	<i>Streptophyta</i>
Class	<i>Magnoliophyta (Angiosperm)</i>
Subclass	<i>Eudicotyledons</i>
Order	<i>Proteales</i>
Family	<i>Nelumboceae</i>
Genus	<i>Nelumbo</i>
Species	<i>Nelumbo nucifera</i>

บัวหลวงที่พบในประเทศไทย สามารถจำแนกพันธุ์ออกเป็นกลุ่มย่อยตามแหล่งกำเนิดได้ 3 กลุ่ม (ปริมลาภ ชูเกียรติมัน และเสริมลาภ วสุวัต, 2548) ได้แก่

2.1.1 บัวหลวงพันธุ์ที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย มี 4 พันธุ์ ได้แก่

2.1.1.1 บัวหลวงบุณฑริก (*N. nucifera* cv. Buntharik) (ภาพที่ 2.1 ก)

ชื่อสามัญ: Hindu lotus

ชื่ออื่น: บุณฑริก, แหลมขาว

ลักษณะดอก: ดอกตูมรูปไข่ปลายเรียว ดอกสีขาว กลีบดอกไม่ซ้อน

2.1.1.2 บัวหลวงปทุม (*N. nucifera* cv. Phatma) (ภาพที่ 2.1 ข)

ชื่อสามัญ: Sacred lotus, East Indian lotus

ชื่ออื่น: ปัทมา แหลมแดง

ลักษณะดอก: ดอกตูมรูปไข่ปลายเรียว ดอกสีชมพู กลีบดอกไม่ซ้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1.3 บัวหลวงสัตตบุษย์ (*N. nucifera* cv. Sattabusaya) (ภาพที่ 2.1 ค)

ชื่อสามัญ: Magnolia Lotus, Album Plenum

ชื่ออื่น: นัทรขาว, ป้อมขาว

ลักษณะดอก: ดอกตูมรูปไข่ป้อม ดอกสีขาว กลีบดอกซ้อน

2.1.1.4 บัวหลวงสัตตบงกช (*N. nucifera* cv. Sattabangkacha) (ภาพที่ 2.1 ง)

ชื่อสามัญ: Double Red Lotus, Roseum Plenum

ชื่ออื่น: นัทรแดง, ป้อมแดง

ลักษณะดอก: ดอกตูมรูปไข่ป้อม ดอกสีชมพู กลีบดอกซ้อน

2.1.2 บัวหลวงที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์จากพันธุ์ดั้งเดิมในประเทศไทย มี 1 พันธุ์ คือ

บัวหลวงราชินี (*N. nucifera* cv. Rachinee) (ภาพที่ 2.1 จ) เป็นบัวหลวงที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์จากบัวหลวงปทุม มีดอกสีชมพู กลีบดอกไม่ซ้อน ดอกและใบมีขนาดใหญ่ สูงจากพื้นน้ำ 1-2 เมตร (ปริมาตร ชูเกียรติมัน และเสริมลาภ วสุวัต. 2549)

2.1.3 บัวหลวงสายพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ มี 2 พันธุ์ คือ

2.1.3.1 บัวหลวงปักกิ่ง (*N. nucifera* var. Pekinese) เป็นบัวหลวงที่นำเข้ามาจากประเทศจีน มีดอกขนาดเล็ก กลีบดอกไม่ซ้อน มี 3 สี คือ สีขาว สีชมพู และสีแดง มีชื่ออื่น คือ บัวเข็มจีน, บัวเข็มแดง (ปริมาตร ชูเกียรติมัน และเสริมลาภ วสุวัต. 2548)

2.1.3.2 บัวหลวงอเมริกัน (*N. lutea* Pers.) (ภาพที่ 2.1 ฉ) เป็นบัวหลวงในทวีปอเมริกาเหนือ มีชื่อสามัญว่า Yellow lotus หรือ American lotus มีดอกสีเหลือง กลีบดอกไม่ซ้อน เจริญเติบโตในเขตอบอุ่น นำเข้ามาเพื่อการศึกษา (ปริมาตร ชูเกียรติมัน และเสริมลาภ วสุวัต. 2549)



ภาพที่ 2.1 บัวหลวงในประเทศไทย (ก) บัวหลวงบุนทริก (ข) บัวหลวงปทุม (ค) บัวหลวงสัตตบุษย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ชมเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า (ง) บัวหลวงสัตตบงกช (จ) บัวหลวงราชินี และ (ฉ) บัวหลวงอเมริกัน

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ลักษณะประจำพันธุ์ของบัวหลวงบุณฑริก (เสริมลาภ วสุวัต. 2538)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. Buntharik

ชื่อสามัญ: Hindu lotus

ชื่ออื่น: บุนฑริก แหลมขาว บัวหลวงขาว

ลักษณะทั่วไป:

- ลำต้น** ลำต้นเป็นชนิดลำต้นใต้ดิน ขอบปล้องรูปทรงกระบอก ตรงข้อมีตาให้กำเนิดใบและดอก น้ำยาสีขาวขุ่น
- ราก** รากเป็นแบบรากฝอย รากงอกออกจากบริเวณข้อของลำต้น รากอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
- ใบ** ใบเป็นใบเดี่ยว งอกออกจากข้อของลำต้น ก้านใบมีหนามขนาดเล็ก ก้านใบแข็งตั้งตรงชูใบเหนือผิวน้ำ 30 - 50 เซนติเมตร ก้านใบติดกับตัวใบตรงกลางทางด้านล่าง ใบมีรูปร่างเกือบกลม (sub-orbicular) เป็นแบบ petal leaf ขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่นเล็กน้อย ผิวใบด้านบนเป็นสีเขียวเข้ม ด้านล่างสีเขียวอ่อนกว่า เส้นใบแตกออกจากจุดกึ่งกลางใบ แบบ palmately netted venation ใบเมื่อโตเต็มที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 30 - 40 เซนติเมตร
- ดอก** ดอกเป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ สีขาว สมบูรณ์เพศ เกิดจากข้อปล้องของลำต้นใต้ดิน ก้านดอกชูดอกส่งพื้นเหนือน้ำ ก้านดอกแข็ง มีหนามขนาดเล็ก ขณะดอกตูมมีลักษณะเป็นรูปทรงไข่ปลายเรียว กลีบเลี้ยงมีสีเขียวอ่อนเขียวและร่วงง่าย เมื่อบานเต็มที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 13 - 18.5 เซนติเมตร กลีบดอกมีสีขาว โคนกลีบดอกมีสีเขียวอ่อน เรียงสับหว่างกันสองชั้น มี 12 - 14 กลีบ เรียงเป็นชั้นประมาณ 8 ชั้น มีเกสรตัวผู้ 90 - 117 อัน ก้านเกสรตัวผู้เรียวยาวเล็ก อับละอองเรณูมีสีเขียวสด เกสรตัวเมียมีลักษณะเป็นกรวยหงาย สีเหลือง มีรังไข่ฝังอยู่ส่วนบนของฐานรอง ยอดเกสรสีเหลือง เมื่อจากดอกบาน 2 - 3 วัน เกสรตัวเมียจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว ในหนึ่งดอกจะมียอดเกสรตัวเมียประมาณ 15 - 20 อัน อยู่กระจายตัว ไม่ติดกัน ภายในมีรังไข่แต่ละอันมีไข่หนึ่งอัน
- ผล** เป็นผลกลุ่ม (aggregate fruit) เรียกว่า ฝัก ประกอบด้วยผลย่อยหลายผล ประมาณ 6 - 18 ผล ผลที่สมบูรณ์มีลักษณะอ้วนกลม ผลอ่อนมีสีเขียว เนื้อเยื่อด้านในสีขาว มีเนื้อผลน้อยและบาง เมื่อผลมีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนสีเป็นสีดำ และแข็ง ผลเป็นแบบ Nut หรือเรียกว่า เมล็ดบัว
- เมล็ด** เมล็ดมีเปลือกหุ้มสีขาว ภายในมีใบเลี้ยงหนาอ่อนนุ่ม สีขาวนวล 2 ใบ เมื่ออายุมากขึ้นเนื้อจะสะสมแป้งมากขึ้นและแข็ง ไม่มี endosperm เอมบริโอมีสีเขียวเข้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ลักษณะประจำพันธุ์ของบัวหลวงราชินี (ปริมลาก ชูเกียรติมัน และเสริมลาก วสุวัต. 2549)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. Rachinee

ชื่อสามัญ: Rachinee Lotus

ชื่ออื่น: บัวหลวงพระราชินี

ลักษณะทั่วไป:

ประวัติ สมเด็จพระนางเจ้าพระบรมราชินีนาถทรงรับสั่งให้เจ้าหน้าที่ไปเก็บต้นพันธุ์บัวหลวงที่พระองค์ทรงโปรดจากจังหวัดราชบุรี นำไปปลูกอนุรักษ์ที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทอง จังหวัดนราธิวาส เมื่อปี พ.ศ. 2545 จากนั้นในปี พ.ศ. 2546 ชมรมกลุ่มผู้รักบัว นำโดย ดร. เสริมลาก วสุวัต ได้ขอพระบรมราชานุญาตเก็บต้นพันธุ์บัวหลวงราชินีหนึ่งชุด จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทอง มาปลูกที่ปางอุบล

กรุงเทพฯ เพื่อการศึกษาและขยายพันธุ์เผยแพร่ให้ประชาชนทั่วไปได้นำไปปลูกเพื่อร่วมกันอนุรักษ์ จากการศึกษาของ ดร. เสริมลาก ได้ให้ข้อสังเกตว่า บัวหลวงราชินี น่าจะเกิดจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติของบัวหลวงปทุม เนื่องจากมีลักษณะทั่วไปคล้ายบัวหลวงปทุม แต่มีดอกและใบขนาดใหญ่กว่าและสูงกว่ามาก

ลำต้น ลำต้นเป็นชนิดลำต้นใต้ดิน ขั้วปลีอึ่งรูปทรงกระบอก ตรงข้อมีตาให้กำเนิดใบและดอก นำอย่างสีเขียวขุ่น

ราก รากเป็นแบบรากฝอย รากงอกออกจากบริเวณข้อของลำต้น รากอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ใบ เป็นใบเดี่ยว งอกออกจากข้อของลำต้น ก้านใบมีหนามขนาดเล็ก ก้านใบแข็งตั้งตรงชูใบเหนือผิวน้ำ 50 - 100 เซนติเมตร ก้านใบติดกับตัวใบตรงกลางทางด้านล่าง ใบมีรูปร่างเกือบกลม (sub-orbicular) เป็นแบบ petal leaf ขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่นเล็กน้อย ผิวน้ำใบด้านบนเป็นสีเขียวเข้ม ด้านล่างสีเขียวอ่อนกว่า เส้นใบแตกออกจากจุดกึ่งกลางใบ แบบ palmately netted venation ใบเมื่อโตเต็มที่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 50 - 60 ขอบใบด้านบนจะเว้าลง

ดอก ดอกเป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ สีชมพู สมบูรณ์เพศ ดอกเกิดจากบริเวณข้อปลีอึ่งของลำต้นใต้ดินคู่กับใบ ก้านดอกแข็ง มีหนามสั้นขนาดเล็ก ช่อดอกชูดอกส่งพื้นสูงเหนือผิวน้ำ 1 - 1.5 เมตร ขณะดอกตูมมีลักษณะเป็นรูปทรงไข่ปลายเรียว กลีบเลี้ยงมีสีเขียวอ่อนและร่วงง่าย กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีลักษณะคล้ายกัน แยกความแตกต่างยาก เมื่อบานเต็มที่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 25 - 30 เซนติเมตร กลีบดอกโค้งป้องตรงกลาง กลีบดอกมีสีชมพู ส่วนที่เป็นปลายแหลมของปลายกลีบดอกมีสีชมพูเข้ม โคนกลีบดอกมีชมพูจางลง จนถึงโคนกลีบมีสีขาว เรียงสลับ

อัน เกสรตัวผู้เรียวยาวเล็ก มีสีเหลือง เกสรตัวเมียมีลักษณะเป็นกรวยหงาย สีเหลือง มีรังไข่ฝังอยู่ส่วนบนของฐานรอง ยอดเกสรกลมแบนสีเหลือง เมื่อจากดอกบาน 2 – 3 วัน เกสรตัวเมียจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว ในหนึ่งดอกจะมียอดเกสรตัวเมียประมาณ 25 – 30 อัน อยู่กระจายตัว ไม่ติดกัน ภายในมีรังไข่แต่ละอันจะมีไข่หนึ่งอัน ก้านดอกมีสีเขียว

ผล เป็นผลกลุ่ม (aggregate fruit) เรียกว่า ฝัก ประกอบด้วยผลย่อยหลายผล ประมาณ 8 – 20 ผล ผลที่สมบูรณ์มีลักษณะรูปทรงไข่ รียาว ผลอ่อนมีสีเขียว เนื้อเยื่อด้านในสีขาว มีเนื้อผลน้อยและบาง เมื่อผลมีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนสีเป็นสีดำ และแข็ง ผลเป็นแบบ Nut หรือเรียกว่า เมล็ดบัว

เมล็ด เมล็ดมีเปลือกหุ้มสีขาว ภายในมีใบเลี้ยงหนาอ่อนนุ่ม สีขาวนวล 2 ใบ เมื่ออายุมากขึ้นเนื้อจะสะสมแข็งมากขึ้นและแข็ง ไม่มี endosperm เอมบริโอยาวเรียวยาว มีสีเขียวเข้ม

2.4 รงควัตถุในดอกไม้

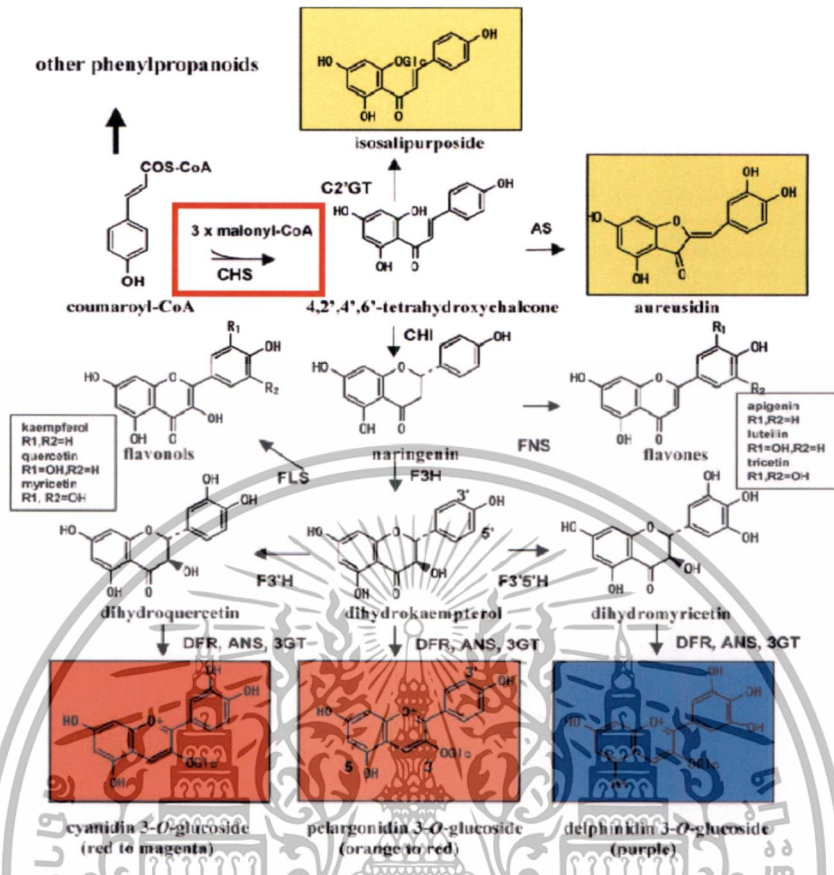
รงควัตถุ (pigment) เป็นสารที่ทำให้เกิดสีในดอกไม้ สีที่แตกต่างกันเกิดจากการสะสมต่างชนิดกัน รงควัตถุที่ให้สีในดอกไม้แบ่งเป็น 3 ชนิด คือ flavonoid, carotenoid และ belain (To and Wang, 2006) สารที่เป็นรงควัตถุในกลีบดอกไม้ที่สำคัญมี 2 สารคือ สารในกลุ่ม carotenoid ให้สีในโทนสีเหลือง สีส้ม และสีแดง (Winkel – Shirley, 2001; To and Wang, 2006) และสารในกลุ่ม flavonoid เป็นรงควัตถุหลักที่สำคัญ ให้สีดอกไม้ในโทนสีที่กว้างและหลายหลาย ได้แก่ สีเหลือง สีส้ม สีแดง สีชมพู สีม่วง และสีน้ำเงิน (Mol *et al.* 1999; Winke – Shirley, 2001; Forkmann and Martens, 2001; Tanaka *et al.* 2005; To and Wang, 2006) สารในกลุ่ม flavonoid ถูกสร้างจากกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoid โดยแบ่งสารออกเป็นกลุ่มหลัก 9 กลุ่มตามโครงสร้างของสาร คือ chalcone, aurone, isosalipurposide, isoflavonoid, flavone, flavonol, flavonoid, anthocyanin และ condensed tannin (proanthocyanin) สาร flavonoid ที่เป็นรงควัตถุหลักที่มีสีในกลีบดอกไม้ ได้แก่ สาร chalcone และ isosalipurposide ให้สีเหลือง สาร aurone ให้สีเหลืองเข้ม สาร anthocyanins เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่ให้สีตั้งแต่สีชมพู สีแดง สีม่วง สีน้ำเงิน (Winkel – Shirley, 2001; Forkmann and Martens, 2001; Tanaka *et al.* 2005) ในกลีบดอกบัวอุบลชาติ พบว่า มีการสะสมสาร flavonoids ที่ทำให้เกิดสีของดอกไม้ เช่นเดียวกับดอกไม้ของพืชทั่วไป (Zhu *et al.* 2012)

2.5 บทบาทของยีน *chalcone synthase (CHS)*

กระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoid (ภาพที่ 2.2) มีเอนไซม์ที่สำคัญ คือ เอนไซม์ chalcone synthase (CHS, EC 2.3.1.74) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์สาร chalcone (4,2',4',6'-tetrahydroxychalcone) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoids (Joseph and Joseph. 2000) การสังเคราะห์สาร chalcone เริ่มต้นจากสาร *p*-cumaroyl-CoA 1 โมเลกุล ถูกเอนไซม์ chalcone synthase นำไปทำปฏิกิริยากับกับ malonyl-CoA 3 โมเลกุล เกิดเป็นสาร chalcone 1 โมเลกุล จากนั้นสาร chalcone ที่ได้จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการอื่นต่อไป ในกระบวนการสังเคราะห์สาร aurone สาร chalcone จะถูกเอนไซม์ aureusidin synthase (AS) เปลี่ยนเป็นสาร aurone ที่มีสีเหลืองเข้ม และสาร chalcone จะถูกเอนไซม์ tetrahydroxychalcone 2'-O-glucosyltransferase (C2'GT) เปลี่ยนเป็นสาร isosalipurposide ที่มีสีเหลือง ในกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoids ชนิดอื่นๆ สาร chalcone จะถูกเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) เปลี่ยนเป็นสาร naringenin อย่างรวดเร็ว จากนั้นสาร naringenin จะถูกเอนไซม์อื่นที่เกี่ยวข้องของหลายเอนไซม์สังเคราะห์เป็นสารกลุ่ม anthocyanins ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (end product) ที่เป็นสารรงควัตถุที่มีสี ได้แก่ cyanidin 3-O-glucoside มีสีแดงถึงแดงเข้ม, paragonidin 3-O-glucoside มีสีส้มถึงแดง และ delphinidin 3-O-glucoside มีน้ำเงินเข้มถึงสีม่วง (Winkel – Shirley. 2001; Tanaka *et al.* 2005; To and Wang. 2006)

ยีน *chalcone synthase (CHS)* เป็นยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ chalcone synthase มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อหลายส่วนของพืชที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร flavonoids ทั้งในส่วนที่มีสีและส่วนไม่มีสีหรือมีสีขาว เช่น ในดอกไม้สีขาว พบว่า มีการสะสมสาร flavonoids ที่ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาของมนุษย์ได้ แต่ตาของแมลงสามารถมองเห็นได้ในแสง UV สาร flavonoids จึงมีบทบาทสำคัญในการการล่อแมลงให้มาผสมเกสรดอกไม้ (Matsubara *et al.* 2012) และเป็นสาร antioxidant ที่สำคัญที่ช่วยป้องกันอันตรายจากแสง Ultraviolet (UV) ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพืช โดยเฉพาะส่วนของเนื้อเยื่ออ่อนหรือยังไม่พัฒนาเต็มที่ เช่น ยอดอ่อน ดอก ใบอ่อน และรากอ่อนที่เกิดใหม่จะมีสีเข้มกว่าส่วนที่พัฒนาแล้ว (Ryder *et al.* 1987) นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีน *CHS* มากที่เนื้อเยื่อบริเวณเปลือกและเนื้อของผลไม้ที่มีสี เช่น มะเขือเทศ (Bovy *et al.* 2002) แอปเปิ้ล (Kim *et al.* 2003) สตรอเบอร์รี่ (Hoffmann *et al.* 2006) และลิ้นจี่ (Wei *et al.* 2011) มีส่วนในกระบวนการสร้างเกสรตัวผู้และสร้างเมล็ด (Dao *et al.* 2011) และยีน *CHS* เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสาร condensed tannin ซึ่งช่วยต่อต้านการรุกรานโดยเชื้อราและแบคทีเรีย ของเนื้อเยื่อผิวหนังนอกของพืช เช่น เปลือกหุ้มเมล็ดถั่วเหลือง (Tuteja *et al.* 2009) การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับยีน *CHS* ในบัวหลวงยังมีไม่มากนัก มีเพียงแต่การศึกษาของ Yu *et al.* (2009) ที่สามารถโคลนยีน *CHS* ของบัวหลวง (*N. nucifera*) จาก cDNA ที่สกัดจากใบอ่อน ขนาด 1,170 คู่เบส สามารถถอดรหัสได้ 389 กรดอะมิโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 แผนผังของกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoids (Tanaka *et al.* 2005) โดยมีเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) เป็นเอนไซม์สำคัญ (ในกรอบสีแดง)

2.6 การถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช

การถ่ายยีนเข้าสู่พืชเพื่อศึกษาการทำงานและการแสดงออกของยีนในพืช เป็นเทคนิคที่ช่วยให้เราสามารถเข้าใจการทำงานของยีน และนำไปสู่วิธีการดัดแปลงพันธุกรรมพืชเพื่อให้ได้พืชตามที่ต้องการ (วรารักษ์ ภูตะสุน. 2551) เช่น พืชที่สามารถสร้างสารสำคัญทางยาในปริมาณสูง เพื่อเพิ่มผลผลิตของพืชกสิกรรม การสร้างพืชที่มีความทนต่อโรค แมลง สภาพแวดล้อม และสารกำจัดศัตรูพืช (Mello-Farias and Chaves. 2008) และการสร้างพืชที่มีดอกสีสวยงามและแปลกแตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม (Mol *et al.* 1999; Winke – Shirley. 2001; Forkmann and Martens. 2001) เทคนิคที่นิยมใช้ในการถ่ายยีนในปัจจุบันมีสองเทคนิคคือ การใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ และการถ่ายยีนเข้าโดยตรงโดยการยิงอนุภาค (particle bombardment) เนื้อเยื่อพืชที่ใช้ในการถ่ายยีนสามารถใช้ชิ้นส่วนของพืชได้หลายชนิด เช่น ปลายราก ยอดอ่อน ใบอ่อน ดินอ่อน หรือแคลลัส ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของพืชแต่ละชนิดและเทคนิคที่ใช้ในการถ่ายยีน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นเทคนิคสำคัญในการถ่ายยีน ในการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับการถ่ายยีนและชักนำให้เนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนให้เจริญเติบโตเป็นต้น (วรารักษ์ ภูตะสุน. 2551) การใช้พาหะ *Agrobacterium* เป็นการถ่ายยีนไม่ผ่านการคัดเลือก ดังนั้น อาจทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชโดยที่ *Agrobacterium* จะเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชผ่านทางบาดแผลหรือช่องเปิด และอาศัยกลไกทางชีวภาพของ *Agrobacterium* นำยีนเข้าไปแทรกใน genomic DNA ของพืช ยีนที่ถูกถ่ายเข้าพืชจะมีจำนวนชุดของยีนเพียงหนึ่งชุด หรือมีจำนวนช้าน้อย แต่ในพืชบางชนิด เช่น ไม้ยืนต้น พบว่าการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนต่ำมาก เนื่องจากเมื่อเกิดบาดแผล พืชจะสร้างชั้นเนื้อเยื่อตายมาปิดบาดแผลเพื่อป้องกันตัวเอง ทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนลดลง (Hansen and Wrigth, 1999) การถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* จึงเหมาะสำหรับเนื้อเยื่ออ่อน เช่น รากอ่อน ยอดอ่อน โปรโตคอร์รัม หรือเอ็มบริโอเจเนติกเซลล์มากกว่าเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ (Ribas *et al.* 2011) ส่วนการถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาคเป็นการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชโดยตรง พลาสมิดหรือยีนที่ต้องการจะถ่ายถูกเคลือบบนอนุภาคขนาดเล็ก เช่น อนุภาคทองคำ หรืออนุภาคทองคำขาว และนำเข้าไปในเนื้อเยื่อโดยอาศัยแรงดันจากก๊าซฮีเลียม (He) หรือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) หรือกระแสไฟฟ้า สามารถใช้ถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชได้ทุกชนิด ขึ้นอยู่กับแรงดันของก๊าซที่ใช้และความแข็งแรงของเนื้อเยื่อพืช การถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาคเป็นการถ่ายยีนแบบสุ่ม ยีนอาจไม่เข้าไปที่ genomic DNA ทำให้ไม่เกิดการถ่ายถอดเมื่อเกิดการแบ่งเซลล์ เกิดการแสดงออกเพียงชั่วคราว (transient expression) หรือเกิดพืชที่มีลักษณะ chimera และยีนที่ถ่ายเข้าไปอาจเกิดการแตกหักและเสียหายได้ ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่ไม่สมบูรณ์ ตามที่ต้องการ (Hansen and Wrigth, 1999)

เนื้อเยื่อพืชที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนมากที่สุด คือ เอ็มบริโอเจเนติกเซลล์ (Mello-Farias and Chaves, 2008; Ribas *et al.* 2011) การชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนติกเซลล์ทำได้โดยการควบคุมสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซินและไซโตไคนิน ในพืชหลายชนิดยังไม่สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนติกเซลล์ได้ เนื่องจากพืชแต่ละชนิดและเนื้อเยื่อแต่ละส่วนตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างกัน (นันทนา อังกินันท์, 2549) เนื้อเยื่อที่ประสบความสำเร็จมากในการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนติกเซลล์ได้แก่ ส่วนยอดของเอ็มบริโอ ใบเลี้ยงใบอ่อน รากอ่อน ลำต้นส่วนเหนือใบเลี้ยง และลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง (รังสฤษฎ์ กาวีตะ, 2540) ในบัวหลวงสามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนติกเซลล์ (Arunyanart and Chaitrayagun, 2005) จึงยังไม่ได้นำไปใช้ในการถ่ายยีน เนื้อเยื่อที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนของบัวหลวงคือ เนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณชกริ สามารถใช้ถ่ายยีนโดยใช้วิธียิงอนุภาคได้ (Buathong *et al.* 2013) และเซลล์ที่ชักนำจากส่วนยอดของเอ็มบริโอบัวหลวงบุณชกริสามารถถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ (Saeitew *et al.* 2014)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จิตเกษม เทียงจิตต์ (2545) ทำการศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้นและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในบัวหลวงพันธุ์มณฑริก พบว่า การใช้ชิ้นส่วนยอดของเอมบริโอเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าการใช้เอมบริโอทั้งชิ้น ชิ้นส่วนยอดของเอมบริโอมีคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มี NAA เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.25 ไมโครโมลาร์

วิลาสินี ลีทวีทรัพย์ (2550) ทำการศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์มณฑริก ใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเป็นตายอดและก้านใบจากเอมบริโอเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มีสาร NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสาร TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็น 16 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนตายอดมีการเจริญเติบโตของแคลลัสสูงที่สุด แคลลัสที่ได้ มีลักษณะเกาะกันหลวมๆ สีเขียวฉ่ำน้ำ และตายอดสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นได้ ชิ้นส่วนก้านใบสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นได้

Han *et al.* (2005) ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกล้วยไม้ *Phalaenopsis hybrida* cv. Formosa rose โดยใช้เวกเตอร์ pBI121 ถ่ายยีน *CHS* เข้าสู่ต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) โดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ หลังจากทำการคัดเลือกและเพาะเลี้ยงในโรงเรือน พบการแสดงออกของ phenotypes ของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนมีดอกสีเข้มมากขึ้น มีตั้งแต่ สีชมพู ชมพูเข้ม ไปจนถึงสีชมพูแกมแดง ต่างจากดอกต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนที่มีเพียงสีชมพูอ่อน นอกจากนี้ยังพบว่าต้นยาสูบบางต้นที่ได้รับการถ่ายยีน มีต้นเกสรตัวผู้ที่ผิดปกติ มีลักษณะหดสั้น และไม่เจริญเติบโต

To and Wang. (2006) ทำการศึกษาระดับการทำงาน (over expression) ของเอนไซม์ *CHS* โดยทำการโคลนยีน *CHS* จาก cDNA ของดอกพิทูเนียสีม่วงเข้ม (*Peunia hybrid* cv. Ultra Blue) โดยใช้เวกเตอร์ pBI121 ถ่ายยีน *CHS* และ *CHI* เข้าสู่ต้นยาสูบ (*N. tabacum* var. W38) โดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ ได้ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนจำนวน 7 ต้น พบว่า มีต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *CHS* 3 ต้น มีดอกสีชมพูเหมือนกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และมีต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน 4 ต้น มีดอกสีขาว

Nakatsuka *et al.* (2007) ทำการศึกษาการสร้างดอกไม้ที่มีสีแดงโดยการตัดแปลงยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoid 2 ยีน คือ ยับยั้งการทำงานของยีน *F3'H* ด้วยเทคนิค RNAi โดยยีน *F3'H* จากต้นยาสูบ (*N. tabacum*) ร่วมกับระดับการทำงานของยีน *DFR* ที่โคลนจากต้นเยอบีรา (*Gerbera hybrida*) เพื่อทำให้เกิดการสร้างสาร pelargonidin ที่มีสีแดง-ส้มมากขึ้น ทำการสร้างเวกเตอร์สำหรับการถ่ายยีนโดยใช้ binary vector pEB ที่มียีน *F3'Hir* และยีน *GhDFR* ที่ถูกควบคุมโดย CaMV35s promoter ถ่ายยีนเข้าสู่ต้นด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *F3'Hir* เพียงยีนเดียวดอกมีสีชมพูจางกว่าส่วนต้นยาสูบที่

ไม่ได้รับการถ่ายยีน ส่วนต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *F3'5'Hir* และ *GhDFR* พร้อมกัน พบว่า ดอกมีสีที่หลากหลาย ตั้งแต่สีชมพูอ่อนไปจนถึงสีแดงส้ม

Yee *et al.* (2008) ทำการศึกษาการวิธีการถ่ายยีน *GFP*, *CHS* และ *hptII* เข้าสู่ชิ้นส่วน protocorm like body (PLB) ของกล้วยไม้ *Oncidium Sharry Baby* ด้วยวิธียิงอนุภาคโดยใช้เวกเตอร์ร่วมกันสองเวกเตอร์ คือ เวกเตอร์ pSM-CHS มียีนเป้าหมายเป็นยีน antisense *CHS* และยีนคัดเลือกเป็นยีน *hygromycin phosphotransferase (hptII)* และเวกเตอร์ p35S มียีนคัดเลือกเป็นยีน *ampicillin resistance (amp)* และยีนรายงานผลเป็นยีน *GFP* นำเวกเตอร์ทั้งสองอัตรา 1:1 ถ่ายเข้าสู่ชิ้น PLB พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการใช้สารปฏิชีวนะ hygromycin ในการคัดเลือกชิ้น PLB ที่ได้รับการถ่ายยีน คือ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุของชิ้น PLB ที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีน คือ 4 สัปดาห์ และ ขนาดประมาณ 5 – 6 มิลลิเมตร มีอัตราการรอดในอาหารคัดเลือกมากที่สุด ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อนำชิ้น PLB ที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ นำไปสกัด DNA และตรวจสอบการมีอยู่ของยีน โดยใช้เทคนิค PCR จากตัวอย่าง PLB ทั้งหมด 137 ชิ้น ตรวจพบชิ้น PLB ที่มียีน antisense *CHS* ร้อยละ 11 ตรวจพบยีน *GFP* ร้อยละ 28 และตรวจพบยีน *hptII* ร้อยละ 61

Nakatsuka *et al.* (2008) ทำการศึกษาการยับยั้งการแสดงออก (suppression) ของยีน *CHS*, *ANS* และ *F3'5'H* ในต้นหรือดอกลีน้ำเงินเข้ม (*Gentiana hybrida cv. Albireo*) โดยใช้เทคนิค RNAi mediated gene silencing โดยใช้ชิ้นส่วนของยีนขนาดประมาณ 500 bp ในเวกเตอร์ binary vector pSMAB704 ที่มี *bialaphos resistance (bar)* gene เป็นยีนคัดเลือก นำไปใส่ถ่ายยีนเข้าสู่ใบอ่อนของต้นหรือดอกลีด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ชิ้นส่วนที่รอดจากการคัดเลือกด้วยสารถูกชักนำให้เกิดรากและต้นอ่อน นำไปเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตในโรงเรือน พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *CHS*ir เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *CHS* ดอกมีสีน้ำเงินลดลงมาก บางดอกมีสีขาวและบางดอกมีริ้วน้ำเงินอ่อนสลับสีขาว ส่วนต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *ANS*ir เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *ANS* พบว่าส่วนใหญ่ดอกมีสีน้ำเงินอ่อน (pale-blue) ส่วนต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *F3'5'Hir* เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3'5'H* พบว่า ดอกมีสีชมพูอมม่วง ไปจนถึงสีแดงอมม่วง

เบญจวรรณ และคณะ (2552) ทำการศึกษาการใช้ยีน *green fluorescent protein (GFP)* gene และ *β -glucuronidase (GUS)* gene เป็นยีนรายงานผลในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ ปอมปาด้ว (*Dendrobium orchid cv. Pompadour*) สังเกตว่าการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชไม่ว่าจะใช้วิธีการใดก็ตาม หากใช้ยีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล มักจะเกิดปัญหา false positive ขึ้น คือ ชิ้นส่วนพืชบางชนิดสามารถเกิดปฏิกิริยาคัดสีน้ำเงินของสารที่ใช้ทดสอบการแสดงออกของยีน *GUS* แม้ว่าจะไม่ได้รับการถ่ายยีนก็ตาม ทำให้การรายงานผลการถ่ายยีนผิดพลาดได้ นอกจากนี้การทดสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ทำให้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อตาย ไม่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงต่อได้ จึงศึกษา

เอกสารแนวทางการใช้ยีน *GFP* ร่วมกับยีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล โดยใช้ยีน *GFP* จากเวกเตอร์การค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pJET1/blunt cloning โคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pMAT21 ที่มียีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล และมียีน *isopentenyl transferase (ipt)* เป็นยีนคัดเลือก ทำการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 เป็นพาหะ ชี้นโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายยีนเกิดยอดเป็นกระจุกยอดจากผลของยีน *ipt* และนำชิ้นส่วนไปทดสอบการแสดงออกของยีน *GFP* และยีน *GUS* พบว่า เนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนมีการแสดงออกของยีน *GFP* และยีน *GUS* โดยเฉพาะส่วนของปลายกระจุกยอดมีการแสดงออกอย่างชัดเจน การใช้ยีน *GFP* และยีน *GUS* ร่วมกันเป็นยีนรายงานผลในการถ่ายยีน สามารถช่วยคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

Buathong *et al.* (2013) ทำการศึกษาการถ่ายยีน antisense *DFR* เข้าสู่เนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริก ด้วยวิธียิงอนุภาค พบว่า เนื้อเยื่อส่วนยอดของเอ็มบริโอสามารถชักนำให้เกิด shoot cluster ได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มี NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ และเพาะเลี้ยงต่อบนบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ และการใช้แรงดันของแก๊สฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และระยะยิง 9 เซนติเมตร มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่ shoot cluster มากที่สุด

Saetiew *et al.* (2014) ทำการศึกษาการถ่ายยีน antisense *DFR* เข้าสู่เนื้อเยื่อแคลลัสของบัวหลวงบุณฑริก โดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ แคลลัสอายุ 2 เดือนที่ชักนำจากเนื้อเยื่อส่วนยอดของเอ็มบริโอของบัวหลวงบุณฑริก โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มี NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็น 16 สัปดาห์ นำไปใช้ในการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 พบว่า การนำชิ้นเนื้อเยื่อไปแช่ในอาหารที่มี *A. tumefaciens* เป็นเวลา 30 นาที และการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (co-culture) เป็นเวลา 2 วันในที่มีด มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนมากที่สุด

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และวัสดุการวิจัย

3.1.1 พืชทดลอง

3.1.1.1 บัวหลวงตัดตบงกช (*N. nucifera* cv. Sattabangkacha)

3.1.1.2 บัวหลวงบุณชาริก (*N. nucifera* cv. Buntharik)

3.1.1.3 บัวหลวงราชินี (*N. nucifera* cv. Rachinee)

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α

3.1.3 พลาสมิดทดลอง

3.1.7.1 pTZ57R/T (Fermentas, USA)

3.1.7.2 pBII21

3.1.7.3 pCAMBIA1302

3.1.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.1.4.1 1 kb DNA Ladder (Fermentas, USA)

3.1.4.2 100 bp DNA Ladder (Fermentas, USA)

3.1.5 สารเคมี

3.1.5.1 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS (Murashige and Skoog, 1962) (ภาคผนวก 1.1)

3.1.5.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก 1.2)

3.1.5.3 สารปฏิชีวนะ

1. Ampicillin

2. Kanamycin

3. Hygromycin

3.1.5.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

1. NAA (1-Napthalene acetic acid)

2. TDZ (1-Phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-urea; Thiadiazuron)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. BA (6-Benzyladenine)

3.1.5.5 สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดบัวหลวง

1. สารละลายเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร
2. สารละลายคลอโรกซ์ (Clorox) 50 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร มีโซเดียมไฮ

โปคลอไรต์ (NaOCl) 2.63 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร

3. สาร Tween-20 (Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate)
4. น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

3.1.5.6 เอนไซม์ และเอนไซม์ตัดจำเพาะ

1. เอนไซม์ *DNase I*, RNase-free (Fermentas, USA)
2. เอนไซม์ *RNase A* (Fermentas, USA)
3. เอนไซม์ Ribolock™ RNase Inhibitor (Fermentas, USA)
4. เอนไซม์ RevertAid Reverse Transcriptase (Fermentas, USA)
5. เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA)
6. เอนไซม์ *T4* DNA ligase (Fermentas, USA)
7. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III (Fermentas, USA)
8. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI (Fermentas, USA)
9. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI (Fermentas, USA)
10. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac* I (Fermentas, USA)

3.1.5.7 สารละลายบัฟเฟอร์ CTAB (Doyle and Doyle, 1987) (ภาคผนวก 1.3)

3.1.5.8 ชุดสกัด RNA InviTrap® spin plant RNA mini kit (Stratec molecular,

Germany)

3.1.5.9 ชุดสังเคราะห์ cDNA ของบัวหลวง RevertAid first strand cDNA synthesis

kit (Fermentas, USA)

3.1.5.10 ชุดสกัดพลาสมิด High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan)

3.1.5.11 ชุดสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR (Fermentas, USA)

3.1.5.12 ชุดสกัดแยก DNA ออกจาก Agarose gel แบบสำเร็จรูป FavorPrep™

GEL/PCR purification mini kit (Favorgen, China)

3.1.3.13 Agarose gel สำหรับทำ gel electrophoresis

3.1.3.14 Ethidium bromide

3.1.3.15 Isopropyl-β-D-1-Thiogalactoside (IPTG)

3.1.3.16 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranoside (X-gal)

3.1.3.17 Chloroform

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.3.18 Absolute ethanol
- 3.1.3.19 Ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt (EDTA)
- 3.1.3.20 Glycerol
- 3.1.3.21 Isoamyl alcohol
- 3.1.3.22 Isopropanol
- 3.1.3.23 Sodium hydroxide
- 3.1.3.24 Tris (hydroxymethyl) aminomethane
- 3.1.3.25 Potassium acetate
- 3.1.3.26 Phenol
- 3.1.3.27 Hydrochloric acid
- 3.1.3.28 Sodium phosphate
- 3.1.3.29 Sodium dodecyl sulfate (SDS)

3.1.6 อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

- 3.1.6.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)
- 3.1.6.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าตนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius, BSA2202S-CW, Germany)
- 3.1.6.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าตนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, BP221S, Germany)
- 3.1.6.4 เครื่องถ่ายภาพเจล (Syngene, Genegenius, Japan)
- 3.1.6.5 เครื่องปั่นละลายสารและให้ความร้อน (Wisestir, MSH-20A, Korea)
- 3.1.6.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (Eppendorf, Model 5418, USA)
- 3.1.6.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Jouan, CR3i, France)
- 3.1.6.8 เครื่อง PCR (Biometra, T1 thermocycler, Germany)
- 3.1.6.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Eppendorf, Model 6132, Germany)
- 3.1.6.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Schott, CG 842, Germany)
- 3.1.6.11 ชุดอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (BioRad, PAC200, USA)
- 3.1.6.12 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Mettler, SV-1422, Germany)
- 3.1.6.13 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Sanden Intercool, SNH0303D11A, Thailand)
- 3.1.6.14 ตู้แช่แข็ง -85 องศาเซลเซียส (Jouan, VXE380, Czech Republic)
- 3.1.6.15 ตู้บ่มเชื้อ (Mettler, BE-400, Germany)
- 3.1.6.16 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Stuart, SI500, UK)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.6.17 ตู้อบ (Jouan, Innovens-118EU2, France)

3.1.6.18 แผ่นกรองเชื้อ 0.22 ไมโครเมตร (Sartorius stedim biotech, Minisart, Germany)

3.1.6.19 ไมโครปีเปต (Labnet, USA)

3.1.6.20 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Tomy, ES-315, Japan)

3.1.6.21 กล้องจุลทรรศน์ แบบ stereo microscope ที่ติดตั้งอุปกรณ์กำเนิดแสงฟลูออเรสเซนซ์ และตัวกรองแสงสำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GFP* (Olympus, SZX12, USA)

3.1.6.22 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Growth chamber) ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 3 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดไฟ cool white 16 ชั่วโมงต่อวัน

3.1.6.23 เครื่องมือสำหรับย้ายชิ้นเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ปากคีบ และมีดผ่าตัด ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ขวดใส่แอลกอฮอล์ จานแก้ว และกระดาษสำหรับซับของเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

3.1.6.24 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ กระจกตวง บีกเกอร์ ปีเปต แท่งแก้วคนสาร จานแก้ว กรวย ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดรูปหม้อ ขวดวัดปริมาตร ขวด Duran ขนาด 100 มิลลิลิตร 250 มิลลิลิตร 500 มิลลิลิตร และ 1,000 มิลลิลิตร

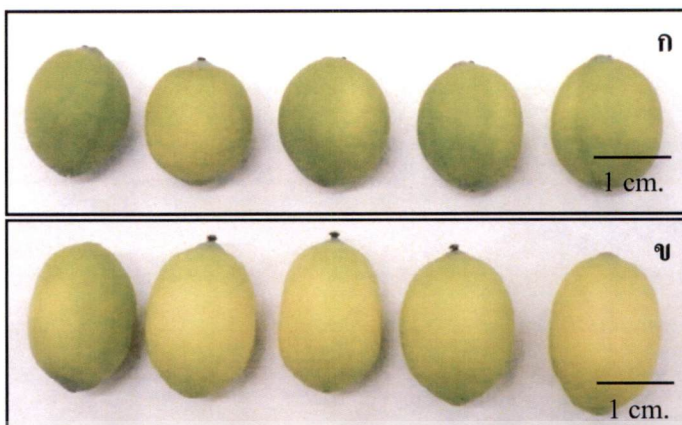
3.1.6.25 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ปากกา ดินสอ ไม้บรรทัด สมุดบันทึก ปากกาสำหรับเขียนบนจานแก้ว กล้องถ่ายภาพ พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ พลาสติกใสสำหรับรัดปิดจานแก้ว ถุงพลาสติก ยางรัด และนาฬิกาจับเวลา

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

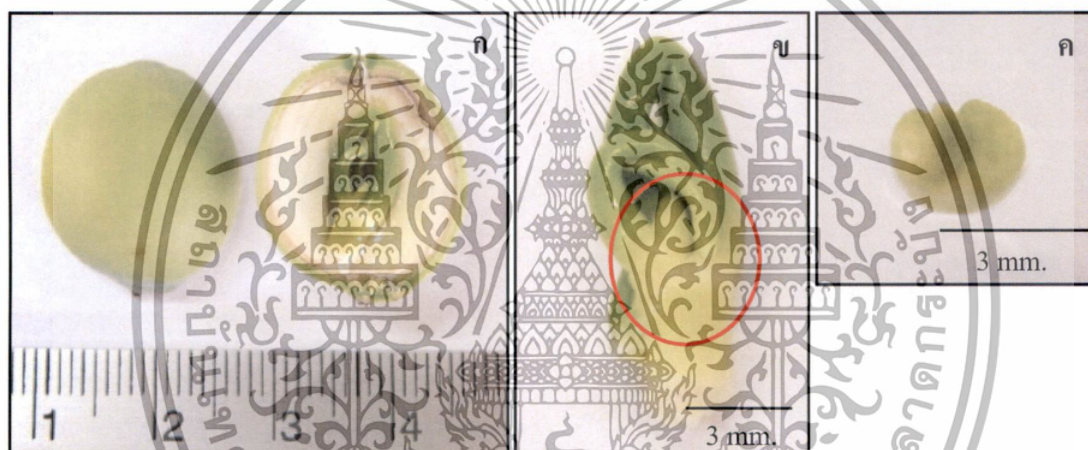
3.2.1 การชักนำให้เกิด shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี

ทำการทดลองชักนำให้เกิด shoot cluster จากส่วนยอดของเอมบริโอของเมล็ดบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี เพื่อศึกษาผลของพันธุ์บัวหลวงที่มีต่อการเกิด shoot cluster โดยเก็บตัวอย่างเมล็ดบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีอายุประมาณ 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 3.1) มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดบัวหลวง ตามวิธีการของ จิตเกษม เทียงจิตต์ (2545) โดยนำเมล็ดบัวหลวงมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด และผ่านน้ำไหลเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำฟอกฆ่าเชื้อ ด้วยสารละลายเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เขย่าอย่างแรงนาน 2 นาที ต่อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสาร Tween-20 ลงไป 2 - 3 หยด (ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร) เขย่าอย่างแรงนาน 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เขย่าอย่างแรงนาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 ครั้ง หรือจนกว่าไม่มีฟองของสารละลายคลอโรกซ์ จากนั้นนำเมล็ดบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ผ่าเมล็ดและตัดแยกส่วนของเอมบริโอออกมาจากเมล็ด (ภาพที่ 3.2 ก) ตัดส่วนใบอ่อนด้านข้างออกทั้งสองใบ และตัดส่วนลำต้นเหนือใบเลี้ยงออก ให้เหลือเฉพาะส่วนของยอดของเอมบริโอ (ภาพที่ 3.2 ข) ขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3.2 ค) นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อชักนำให้เกิด shoot cluster ตามวิธีการของ Buathonga *et al.* (2013) โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ (ภาคผนวก 1.1) เพื่อชักนำให้เกิด shoot cluster เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยวางชิ้นเนื้อเยื่อบนอาหารจำนวน 5 ชิ้นต่อจานแก้ว เพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ ประมาณ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์

ทำการทดลองโดยมีพันธุ์ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีเป็น treatment ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ใช้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อชนิดซ้ำละ 20 ชิ้น โดยบันทึกผลการเจริญเติบโตของชิ้นเนื้อเยื่อจากขนาด จำนวนยอดและจำนวนใบของชิ้นเนื้อเยื่อ บันทึกผลการทดลองทุก 2 สัปดาห์ และนำหนักชิ้นเนื้อเยื่อ บันทึกผลการทดลองทุก 4 สัปดาห์ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 17.0 โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีทางสถิติ Independent-Sample T-test ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 3.1 เมล็ดบัวหลวงอายุประมาณ 4 สัปดาห์; (ก) บัวหลวงบุญทรริก และ (ข) บัวหลวงราชินี (bar = 1 เซนติเมตร)



ภาพที่ 3.2 เอ็มบริโอของเมล็ดบัวหลวงบุญทรริก; (ก) ภายในเมล็ดบัวหลวงบุญทรริก, (ข) ชิ้นส่วนยอดของเอ็มบริโอ (ในวงกลม) และ (ค) ชิ้นส่วนยอดของเอ็มบริโอที่ตัดส่วนของใบและต้นออกแล้ว (ข., ค. bar = 3 มิลลิเมตร)

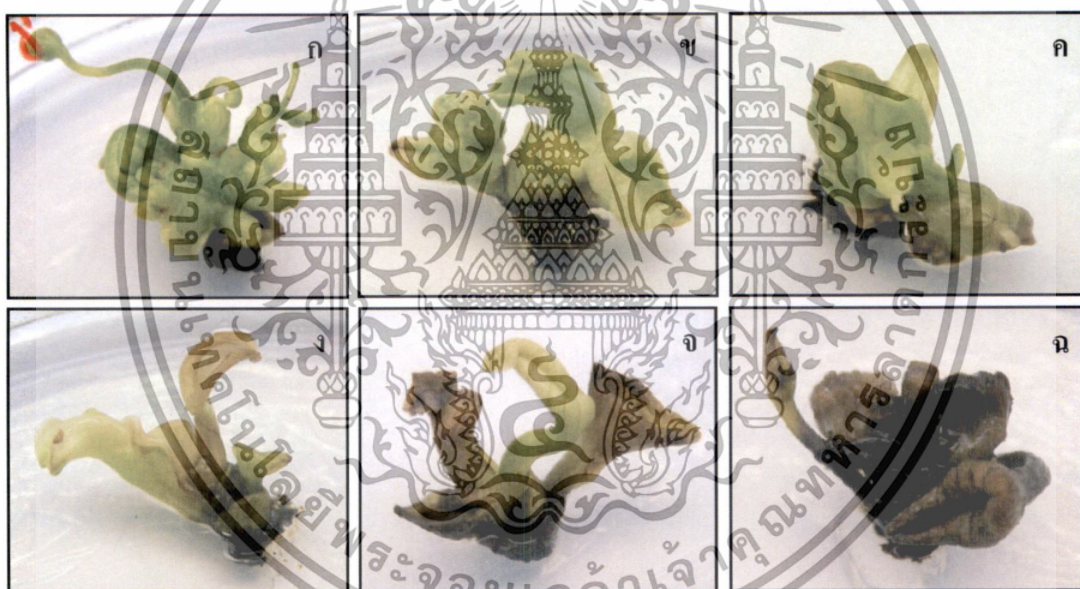
3.2.2 การศึกษาระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารคัดเลือก shoot cluster ของบัวหลวงได้รับการถ่ายยีน

ทำการทดลองเพาะเลี้ยง shoot cluster ของบัวหลวงบุญทรริกและบัวหลวงราชินีบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin ในระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อศึกษาหา ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้คัดเลือก shoot cluster ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน โดยใช้อาหารคัดเลือกเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin ให้มีความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร นำชิ้นส่วน shoot cluster ของบัวหลวงบุญทรริกและบัวหลวงราชินี อายุประมาณ 16 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยวางชิ้นเนื้อเยื่อบนอาหารจำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในงานวิจัยของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยผู้ยืมใช้เห็นชอบว่าจะสงวนรักษา ค่า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5 ชื่นต่อจานแก้ว เพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ ประมาณ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์

ทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) โดยมี treatment เป็นระดับความเข้มข้นของสาร hygromycin ในอาหารคัดเลือกเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ shoot cluster ของบัวหลวง บุณทริกและบัวหลวงราชินี ซ้ำละ 10 ชื่น ทำการบันทึกผลทุกสัปดาห์ บันทึกการเปลี่ยนแปลงของ ชื่นเนื้อเยื่อ คະแนนความสมบูรณ์ของชื่นเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 3.3) จำนวนชื่นส่วนที่ตาย บันทึกการเจริญเติบโตของชื่นเนื้อเยื่อจากจำนวนยอดและจำนวนใบของชื่นเนื้อเยื่อ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 17.0 โดยใช้วิธี analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีทางสถิติ Duncan's Multiple Range Test ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์



ภาพที่ 3.3 เกณฑ์การให้คะแนนความสมบูรณ์ของชื่นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวง

- | | |
|-------------|---|
| (ก) 6 คະแนน | เนื้อเยื่อสมบูรณ์ สามารถเจริญเติบโตได้ปกติ มีสีเขียวทั้งชื่น |
| (ข) 5 คະแนน | เนื้อเยื่อส่วนใหญ่มีสีเขียว มีสีเหลืองหรือน้ำตาลเล็กน้อยบางส่วน |
| (ค) 4 คະแนน | เนื้อเยื่อส่วนใหญ่มีสีเขียว มีบางส่วนตายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือน้ำตาล |
| (ง) 3 คະแนน | เนื้อเยื่อมากกว่าครึ่งชื่นตาย เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มีสีเขียวบางส่วน |
| (จ) 2 คະแนน | เนื้อเยื่อส่วนใหญ่ตายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มีส่วนที่มีสีเขียวเล็กน้อย |
| (ฉ) 1 คະแนน | เนื้อเยื่อตายทั้งชื่น เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หรือสีดำทั้งชื่น |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การโคลนยีน *CHS* จากกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยเทคนิค PCR

ทำการโคลนยีน *CHS* จาก genomic DNA และ cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกสีขาว และกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชกลีบดอกสีชมพู ด้วยเทคนิค PCR เพื่อนำไปใช้ในการสร้างพลาสมิดในการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense และใช้ศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวง

3.2.3.1 การสกัด genomic DNA จากกลีบดอกบัวหลวง

เก็บตัวอย่างดอกบัวหลวงบุณฑริกดอกสีขาว และบัวหลวงสัตตบงกชดอกสีชมพู ในช่วงเช้าก่อนดอกบาน ทำการสกัด genomic DNA ตามวิธีการของ Doyle and Doyle (1987) โดยนำกลีบดอกบัวหลวงที่มีสีขาวและกลีบดอกสีชมพูทั้งกลีบดอก นำมาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว และ โกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำกลีบดอกบัวหลวงที่บดละเอียดแล้วประมาณ 0.5 กรัม เติมสารละลายบัฟเฟอร์ CTAB (ภาคผนวก 1.3) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงไปในโกร่งและผสมสารละลายบัฟเฟอร์ให้เข้ากันกับตัวอย่าง ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำบ่มใน water bath อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ระหว่างที่บ่มใน water bath นำหลอดไมโครเซนทริฟิวส์มาผสมให้เข้ากันด้วยการกลับลอดไปมาเบาๆ 10 ครั้ง ทุก 10 นาที เมื่อบ่มครบ 1 ชั่วโมงแล้ว เติม สารละลาย chloroform - isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงไปในหลอด เขย่าให้เข้ากัน โดยการกลับลอดไปมาเบาๆ 10 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน โดยใช้ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนของสารละลายที่แยกชั้นหลังจากการปั่นเหวี่ยงแล้ว ประมาณ 350 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ใหม่ จากนั้นเติมสารละลาย potassium acetate ความเข้มข้น 7.5 โมลาร์ ที่แช่เย็น ปริมาตร 0.08 เท่าของสารละลาย (ประมาณ 28 ไมโครลิตร) และสาร iso-propanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 0.54 เท่าของสารละลาย (ประมาณ 204 ไมโครลิตร) ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน โดยการกลับลอดไปมาเบาๆ 10 ครั้ง จากนั้นนำหลอดไปบ่มในตู้เย็นเพื่อตกตะกอน DNA เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบ 16 ชั่วโมงนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน DNA โดยใช้ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที DNA ที่สกัดได้จะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ ใช้ไมโครปิเปตค่อยๆ ดูดสารละลายออกจากนั้นล้างตะกอน DNA ด้วยสารละลายเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่เย็น ปริมาตร 700 ไมโครลิตร กลับลอดไปมาเบาๆ 10 ครั้ง เพื่อล้างตะกอน DNA จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายออกด้วยไมโครปิเปต จากนั้นล้างตะกอน DNA อีกครั้งด้วย สารละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่เย็น ปริมาตร 700 ไมโครลิตร กลับลอดไปมาเบาๆ 10 ครั้ง เพื่อล้างตะกอน DNA จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายออกด้วยไมโครปิเปต นำตะกอน DNA ที่ได้ไปอบให้แห้งที่ อุณหภูมิ 55 องศา

เซลล์พืช ประมาณ 10 นาที หรือจนกว่าตะกอน DNA จะแห้ง เมื่อตะกอน DNA แห้งแล้ว ละลายตะกอน DNA ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก 1.4) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ให้ตะกอน DNA ละลาย จากนั้นกำจัด RNA โดยเติมเอนไซม์ RNase A (Fermentas, USA) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำ genomic DNA ที่สกัดได้มาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง และเทคนิค gel electrophoresis ตามวิธีการในข้อ 3.2.3.3 เก็บรักษา genomic DNA ที่สกัดได้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.3.2 การสกัด RNA จากกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช

เก็บตัวอย่างกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกชในช่วงเช้าก่อนดอกบาน ใช้กรรไกรสะอาดตัดกลีบดอกบัวหลวงเฉพาะส่วนปลายกลีบดอกที่เป็นสีขาวสำหรับดอกบัวหลวงบุณฑริก และปลายกลีบดอกสีชมพูสำหรับดอกบัวหลวงสัตตบงกช นำมาบดให้ละเอียดทันทีด้วยไนโตรเจนเหลวและโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อและการกำจัดเอนไซม์ RNase แล้วนำตัวอย่างที่บดละเอียดมาสกัด RNA ด้วยชุดสกัด InviTrap® spin plant RNA mini kit (Stratec molecular, Germany) ทำการสกัด RNA ตามวิธีการที่ระบุในคู่มือ โดยใช้ตัวอย่างที่บดละเอียดแล้ว ปริมาณ 0.1 กรัม ละลายกับสารละลาย DCT lysis solution ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่ลงในชุดตัวกรอง prefilter ที่ใส่ในหลอด receiver ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนใสมากรองซ้ำด้วยชุดตัวกรองใหม่อีกครั้ง จากนั้นเติมสาร absolute ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงในส่วนใสที่ผ่านการกรอง ผสมให้เข้ากันด้วยการดูดปิเปตขึ้นลง ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายปริมาตร 800 ไมโครลิตรใส่ลงในชุดตัวกรอง RNA binding RTA spin filter จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารส่วนที่ผ่านการกรองทิ้งไปจากนั้นนำสารละลายที่เหลือใส่ลงในชุดตัวกรอง RNA binding RTA spin filter ที่ใส่ในหลอด receiver ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารส่วนที่ผ่านการกรองทิ้ง RNA ที่สกัดแยกมาได้จะอยู่ในชุดตัวกรอง จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ R1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงในชุดตัวกรอง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารส่วนที่ผ่านการกรองทิ้ง จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ R2 ปริมาตร 700 ไมโครลิตรลงในชุดตัวกรอง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารส่วนที่ผ่านการกรองทิ้ง จากนั้นนำชุดตัวกรองไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 นาที เพื่อกำจัดแอลกอฮอล์ที่หลงเหลือในชุดตัวกรอง วางชุดตัวกรองที่อุณหภูมิห้องให้แห้ง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นย้ายชุดตัวกรองใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟิวส์ใหม่ที่ได้รับจากเอนไซม์ RNase ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำละลายบัฟเฟอร์ elution ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในตัวกรองของชุดตัวกรอง ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ RNA ละลายออกจากตัวกรอง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำส่วนใสที่ผ่านตัวกรองที่มี RNA ละลายอยู่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ไปแช่เย็นในน้ำแข็งเพื่อลดอุณหภูมิทันที นำ RNA ที่สกัดได้ไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำ RNA ที่สกัดได้บางส่วนไปตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ RNA ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง และเทคนิค gel electrophoresis ตามวิธีการในข้อ 3.2.3.3

3.2.3.3 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ DNA และ RNA ด้วยการดูดกลืนแสง และเทคนิค gel electrophoresis

วัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA และ RNA ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ทำการเจือจางสารละลาย DNA และ RNA ที่สกัดได้ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 50 โดยใช้สารละลาย DNA และ RNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 98 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{230} , A_{260} และ A_{280}) DNA ที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{260} ต่อ A_{280} (A_{260}/A_{280} ratio) อยู่ในช่วง 1.8 - 2.0 และ RNA ที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{260} ต่อ A_{280} อยู่ในช่วงใกล้เคียงกับ 2.0 (Sambrook *et al.* 1989) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาหาปริมาณ DNA และ RNA จากสมการ

ปริมาณ DNA (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) = ค่า A_{260} x 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x อัตราการเจือจาง

ปริมาณ RNA (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) = ค่า A_{260} x 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x อัตราการเจือจาง

จากนั้นตรวจสอบคุณภาพ และการปนเปื้อนของ DNA และ RNA ด้วยเทคนิค gel electrophoresis ทำการเตรียม agarose gel เข้มข้น 0.8% โดยมวลต่อปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5x TAE (ภาคผนวก 1.5) อุณหภูมิ agarose gel ละลาย เติมน้ำในถาดรอง ตั้งทิ้งไว้ที่ให้ gel คงตัว 1 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่น agarose gel พร้อมถาดรองใส่ลงใน chamber ของเครื่อง electrophoresis ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5x TAE เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า จากนั้นนำสารละลาย DNA ที่สกัดได้ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย loading dye เข้มข้น 6x ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปตแล้วใส่สารละลายทั้งหมดลงในหลุมของ agarose gel และใส่สารละลาย DNA มาตรฐาน 1kb (Fermentas, USA) เข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เป็นตัวชี้วัด (marker) ขนาดของ DNA และ RNA ใช้แรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ให้ DNA เคลื่อนที่ใน agarose gel เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำ gel มาย้อมสี DNA และ RNA ด้วยสารละลายเอกซารีนเป็นเอกซารีนที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที นำ agarose gel ไปตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator

3.2.3.4 การกำจัด DNA ที่ปนเปื้อนออกจาก RNA ด้วยเอนไซม์ DNase I

นำ RNA ที่สกัดได้จากกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและสัตตบงกชมากำจัด DNA ที่ปนเปื้อน ด้วยเอนไซม์ DNase I โดยเตรียมสารในการทำปฏิกิริยากำจัด DNA ทั้งหมด ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 200 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายบัฟเฟอร์ DNase I เข้มข้น 10x ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, สารละลาย Ribolock™ RNase Inhibitor (Fermentas, USA) เข้มข้น 1 ยูนิต ต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเอนไซม์ DNase I (Fermentas, USA) เข้มข้น 1 ยูนิต ต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย RNA ที่สกัดได้ลงไปให้มีปริมาณ RNA ประมาณ 1 ไมโครกรัม และปรับปริมาตรให้ครบ 10 ไมโครลิตรด้วย DEPC- water ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้เอนไซม์ DNase I ทำงานย่อย DNA ที่ปนเปื้อนเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNase I นำสารละลาย RNA ที่ผ่านการกำจัด DNA แล้ว ไปเก็บในตู้เย็น อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.2.3.5 การสังเคราะห์ cDNA จาก RNA ด้วยชุดสังเคราะห์ RevertAid first strand cDNA synthesis

ทำการสังเคราะห์ cDNA จาก RNA ที่สกัดได้จากกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยชุดสังเคราะห์ RevertAid first strand cDNA synthesis kit (Fermentas, USA) ทำการสังเคราะห์ cDNA โดยเตรียมสารในการทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ cDNA ใน ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยาในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 200 ไมโครลิตร โดยใช้ RNA เริ่มต้น ปริมาตร 1 ไมโครกรัม ผสมกับ nuclease-free water ให้ได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติมส่วนผสม อื่นลงไปประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 5x RT ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, สารละลาย dNTP เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, สารละลายไพรมอร์ oligo-dT₁₈ เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, สารละลาย Ribolock™ RNase Inhibitor (Fermentas, USA) เข้มข้น 20 ยูนิตต่อ ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ RevertAid reverse transcriptase (Fermentas, USA) เข้มข้น 200 ยูนิต ต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันด้วยปิเปต จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ให้เอนไซม์ reverse transcriptase ทำการสังเคราะห์ cDNA เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดการทำงานของเอนไซม์โดยบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้เก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3.6 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีน *CHS* แบบเต็มเส้น

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีน *CHS* แบบเต็มเส้น โดยออกแบบจากยีน *CHSF* ที่โคลนจาก cDNA ของ *N. nucifera* (accession no. FJ999632) (Yu *et al.* 2009) ได้ไพรเมอร์ *CHSF_forward primer* และ *CHSF_reverse primer* (ภาคผนวก 2.1) นำไปใช้โคลนยีน *CHS* แบบเต็มเส้นจาก genomic DNA และ cDNA ที่สกัดได้จากกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและตัดตบงกช ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) คาดว่าจะได้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส และ 1,200 คู่เบสตามลำดับ

3.2.3.7 การโคลนยีน *CHS* แบบเต็มเส้นจาก genomic DNA และ cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงตัดตบงกช ด้วยเทคนิค PCR

โคลนยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส จาก genomic DNA และขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส จาก cDNA ของกลีบดอกของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงตัดตบงกช (ตามลำดับ) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *CHSF forward primer* และ *CHSF_reverse primer* โดยเตรียมสารในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา ในหลอด PCR ไมโครทิวขนาด 200 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำกลั่น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, สารละลายบัฟเฟอร์ 10x *Taq* buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, สารละลาย $MgCl_2$ เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, สารละลาย dNTP เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, สารละลายไพรเมอร์ *CHSF_forward primer* เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, สารละลายไพรเมอร์ *CHSF_reverse primer* เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, สารละลาย genomic DNA เจือจาง ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร หรือสารละลาย cDNA เจือจาง ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ความเข้มข้นประมาณ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) เข้มข้น 5 ยูนิต ต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยปิเปต จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบการทำปฏิกิริยาดังนี้ ขั้นตอน pre-denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการทำ PCR โดยเริ่มจากขั้น denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ขั้น annealing ใช้อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ขั้น extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส สำหรับ genomic DNA ใช้เวลา 2 นาที และสำหรับ cDNA ใช้เวลา 1 นาที จากนั้นให้ทำปฏิกิริยาซ้ำจำนวน 35 รอบ และขั้นตอนสุดท้าย complete extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำผลผลิต PCR ที่ได้บางส่วนไปตรวจสอบผลการโคลนยีนด้วยเทคนิค gel electrophoresis เก็บผลผลิต PCR ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3.8 การแยก DNA ออกจาก agarose gel และทำให้บริสุทธิ์

หลังจากตรวจสอบแถบ DNA และขนาดของผลผลิต PCR ของยีน CHS แบบเต็มเส้นที่โคลนได้จาก genomic DNA และ cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบลูมทริกและบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยวิธี gel electrophoresis แล้ว นำ agarose gel ที่มีแถบ DNA ของยีนที่มีขนาดที่ถูกต้อง มาตัดออกเฉพาะส่วนของผลผลิต PCR ที่มีขนาดที่ต้องการ น้ำหนักไม่เกิน 0.3 กรัม ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการแยก DNA ของยีนที่โคลนได้ออกจาก agarose gel และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป FavorPrep™ GEL/PCR purification mini kit (Favorgen, China) ทำการแยก DNA และทำให้บริสุทธิ์ โดยเริ่มจาก เติมน้ำบัฟเฟอร์ FADF ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ ที่มีชิ้นส่วนของ agarose gel ที่ตัดไว้ นำไปอุ่นให้ agarose gel ละลายด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าจะละลายหมด ขณะละลาย agarose gel ให้กลับหลอดไปมาเบาๆ ทุก 3 นาที เมื่อ agarose gel ละลายแล้วให้ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมด ปริมาตรประมาณ 800 ไมโครลิตร ใส่ลงใน FADF column ที่อยู่บน collection tube ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนสารละลายด้านล่างที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนสารละลายด้านล่างที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ W1 ที่เติมสาร absoluted ethanol แล้ว ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ DNA ตกตะกอนในหลอด FADF column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนสารละลายด้านล่างที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ column แห้ง จากนั้นย้าย column ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีพร้อม เพื่อให้ column แห้งสนิท จากนั้นเติม elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่อุ่นไว้ล่วงหน้าที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ใส่ลงบริเวณกลางตัวกรองของ FADF column ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ให้ DNA ละลายออกจากตัวกรอง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที DNA ของผลผลิต PCR ที่แยกได้จะลงไปหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ นำไปตรวจสอบปริมาณของ DNA ที่แยกได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง และตรวจสอบความถูกต้องของขนาดของ DNA ที่แยกได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis จากนั้นนำ DNA ของยีนที่แยกได้ไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.3.9 การเชื่อมต่อยีน *CHS* เข้ากับโคลนนิ่งเวกเตอร์ pTZ57R/T

นำผลผลิต PCR ของยีน *CHS* ที่โคลนจาก genomic DNA และ cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช ที่ผ่านการแยกขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาเชื่อมต่อกับโคลนนิ่งเวกเตอร์ เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้ โดยเลือกใช้โคลนนิ่งเวกเตอร์เป็นพลาสมิด pTZ57R/T (Fermentas, USA) และใช้เอนไซม์ *T4* ligase (Fermentas, USA) เชื่อมต่อ DNA เข้ากับ พลาสมิด ทำการเชื่อมต่อ DNA เข้ากับพลาสมิด โดยเตรียมสารในการทำปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 200 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำกลั่นปริมาตร 11 ไมโครลิตร, สารละลาย บัฟเฟอร์ 10x ligation ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, พลาสมิด pTZ57R/T เข้มข้น 155 นาโนกรัมต่อ ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, สารละลาย DNA ของยีน *CHS* เข้มข้นประมาณ 100 นาโนกรัมต่อ ไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ *T4* DNA ligase เข้มข้น 10 ยูนิต ต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยปิเปต จากนั้นนำไปป่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ได้พลาสมิดลูกผสมของพลาสมิด pTZ57R/T กับ ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA และ cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวง

3.2.3.10 การชักนำพลาสมิดเวกเตอร์ เข้าสู่ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock

นำ พลาสมิดลูกผสมของยีน *CHS* ที่ถูกเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pTZ57R/T แล้ว ถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด ด้วยวิธี heat-shock ตามวิธีการของ Sambrook *et al.* (1989) โดยเริ่มจากนำ competent cell แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 ไมโครลิตรมาละลายโดยการแช่ใน ถังน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมพลาสมิดลูกผสม ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ด้วยปิเปต แช่ในถังน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปป่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นนำไปแช่ในถังน้ำแข็งทันทีเพื่อลดอุณหภูมิ เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth (ภาคผนวก 1.2) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปป่มในตู้ป่มเชื้อแบบเขย่า โดยใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นให้เชื้อฟื้นตัว จากนั้นนำเชื้อที่ เลี้ยงในอาหารเหลวไปเกลี่ยบนอาหารคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar (ภาคผนวก 1.2) ที่มีสาร ปฏิชีวนะ ampicillin เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้วิธีการคัดเลือกแบบ blue/white colonies screening โดยใช้สารละลาย IPTG-X-gal ซึ่ง ประกอบด้วยสารละลาย isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG) เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารคัดเลือกก่อน นำไปเลี้ยงเชื้อ 30 นาที นำจานเลี้ยงเชื้อไปป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้น คัดเลือกโคโลนีสีขาวไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่มีสารปฏิชีวนะ ampicillin เข้มข้น 100

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า โดยใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเติบโตในอาหารเหลว นำเชื้อที่ได้ไปสกัดพลาสมิดและตรวจสอบการมีอยู่ของชิ้นส่วนของยีน *CHS* ในพลาสมิดลูกผสมต่อไป

3.2.3.11 การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด

สกัดพลาสมิดลูกผสมที่อยู่ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่ได้จากข้อ 3.2.3.10 ด้วยชุดสกัดพลาสมิด High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan) เพื่อนำไปตรวจสอบการมีอยู่ของชิ้นส่วนของยีนและส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้ทำการสกัดพลาสมิด โดยเริ่มจากนำอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเซนทริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ใช้ปิเปตดูดสารละลายใสทิ้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ PD1 ที่เข้มข้น ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ PD2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา 10 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ PD3 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันทีโดยการกลับหลอดไปมา 10 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเศษเซลล์ ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนสารละลายใสปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงในหลอด PD column ที่ติดตั้งอยู่บนหลอด collection tube ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายส่วนเกินที่อยู่ในหลอด collection tube ด้านล่างทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายส่วนเกินที่อยู่ในหลอด collection tube ด้านล่างทิ้ง จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายส่วนเกินที่อยู่ในหลอด collection tube ด้านล่างทิ้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ column แห้งจากนั้นย้าย PD column ที่มีพลาสมิดใส่ลงในหลอดเซนทริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ ตั้งทิ้งไว้ให้ column แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ elution ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบริเวณกลางตัวกรองของ PD column ตั้งทิ้งไว้ให้พลาสมิด ละลายออกจากตัวกรอง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที พลาสมิดสายผสมจะตกลงหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่รองรับด้านล่าง จากนั้นนำไปตรวจสอบปริมาณของ พลาสมิดที่สกัดได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง และตรวจสอบความถูกต้องของขนาดพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis เก็บพลาสมิดลูกผสมในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพียงการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3.12 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตรวจสอบการมีอยู่ของชิ้นส่วนยีน *CHS* ที่โคลนได้ ในพลาสมิดลูกผสมของยีน *CHS* กับพลาสมิด pTZ57R/T ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba* I และ *Hind* III โดยเตรียมสารในการทำปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา ในหลอดเซนทริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประกอบด้วยน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร, สารละลายบัฟเฟอร์ 10x Tango ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, สารละลายพลาสมิดลูกผสมที่ต้องการตรวจสอบ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba* I (Fermentas, USA) เข้มข้น 10 ยูนิต ต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III (Fermentas, USA) เข้มข้น 10 ยูนิต ต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วน DNA ของยีน *CHS* ในพลาสมิด ด้วยเทคนิค gel electrophoresis

3.2.3.13 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมด้วยเทคนิค PCR

ตรวจสอบการมีอยู่ของชิ้นส่วนยีน *CHS* ที่โคลนได้ ในพลาสมิดลูกผสมของยีน *CHS* กับพลาสมิด pTZ57R/T ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CHSF_forward primer และ CHSF_reverse primer ทำโดยเตรียมสารและทำปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการในข้อ 3.2.3.7 จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดของผลผลิต PCR ของยีน *CHS* ในพลาสมิด ด้วยเทคนิค gel electrophoresis คัดเลือกโคลนที่ถูกต้องของพลาสมิดลูกผสม จำนวน 3 โคลน นำพลาสมิดลูกผสมของยีนไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer คือ M13F และ M13R

3.2.3.14 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของยีน *CHS*

วิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) เปรียบเทียบความเหมือนของยีนที่โคลนได้จากบัวหลวงทั้งสองพันธุ์ด้วยวิธี ClustalW multiple alignment วิเคราะห์โครงสร้างของยีนด้วยโปรแกรม GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) เพื่อตรวจหาตำแหน่ง exon และ intron และลำดับกรดอะมิโนที่เป็นไปได้ ตรวจสอบหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้ จาก cDNA และ genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช กับยีน *CHS* ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GenBank ของเว็บไซต์ NCBI ด้วยโปรแกรม Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และตรวจสอบหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%identity) ของลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Blastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

3.2.4 การศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก และดอกบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

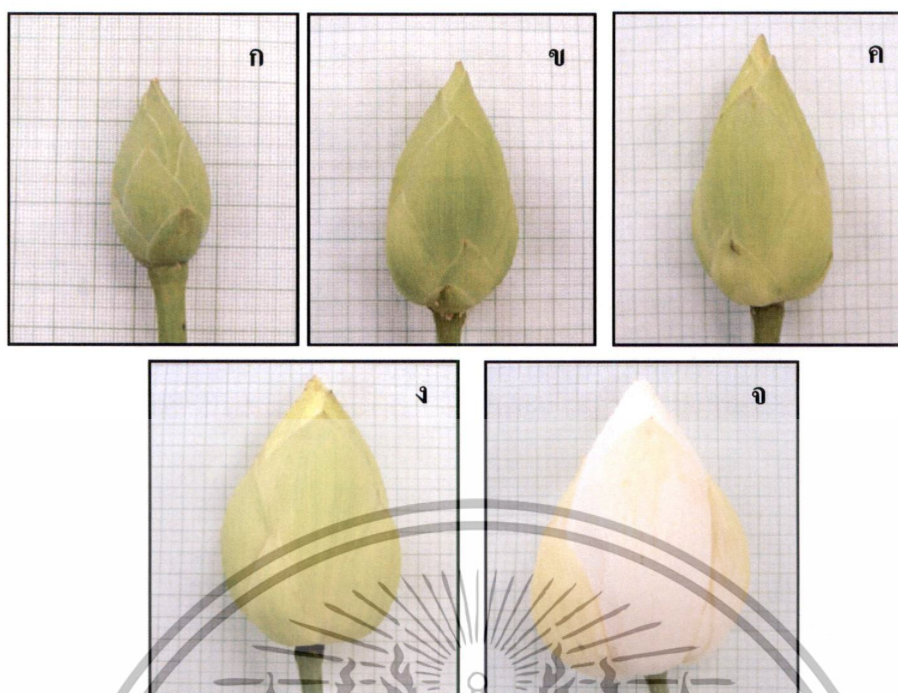
ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวง ในแต่ละระยะของการพัฒนาของดอกบัวหลวงบุณฑริกดอกสีขาว และบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพูด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

3.2.4.1 การเก็บตัวอย่างดอกบัวหลวงหลวงบุณฑริกและดอกบัวหลวง

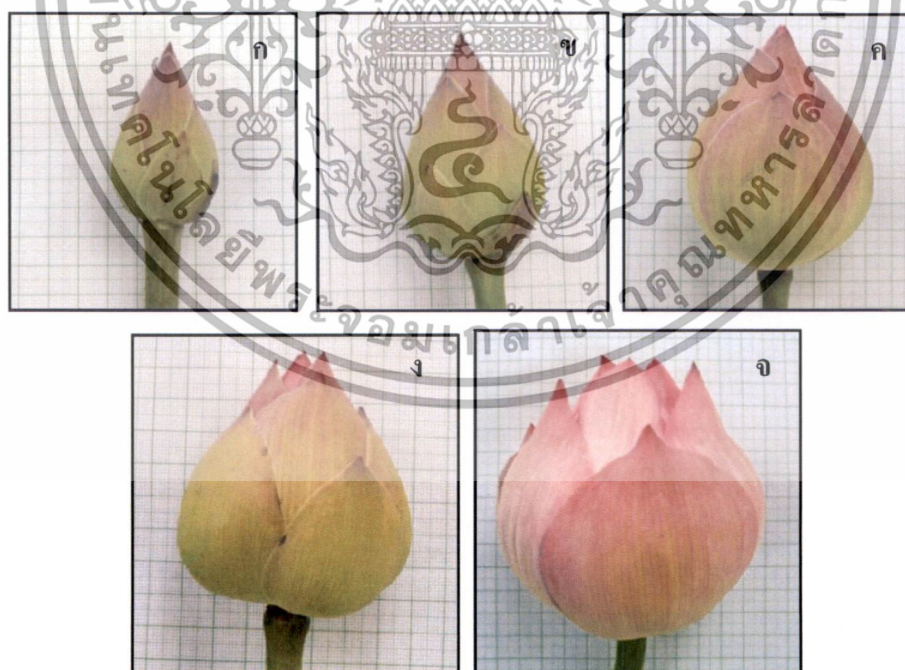
เก็บตัวอย่างดอกบัวหลวงในแต่ละระยะของการพัฒนาของบัวหลวงบุณฑริกดอกสีขาว (ภาพที่ 3.4) และบัวหลวงสัตตบงกชดอกสีชมพู (ภาพที่ 3.5) แบ่งระยะการพัฒนาของดอกบัวเป็น 5 ระยะ ได้แก่ ระยะที่ 1 ดอกตูมขนาดเล็ก มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 3 เซนติเมตร มีสีเขียว สีของกลีบดอกไม่ชัดเจน ระยะที่ 2 ดอกตูมขนาดกลาง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 - 5 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงภายนอกมีสีเขียว กลีบดอกภายในเริ่มมีสีเห็นชัดเจนมากขึ้น และสีเขียวลดลง ระยะที่ 3 ดอกตูมขนาดใหญ่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 - 7 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงภายนอกมีสีเขียว กลีบเลี้ยงยังไม่เปิดออก กลีบดอกภายในมีสีเข้มมากขึ้น และไม่มีสีเขียว ระยะที่ 4 ดอกตูมก่อนดอกบาน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 - 10 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงภายนอกมีสีเขียว กลีบเลี้ยงบางส่วนแห้งและหลุดไป กลีบดอกภายในมีสีเข้ม กลีบดอกเริ่มคลายตัว ระยะที่ 5 ดอกบานวันแรก มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 10 เซนติเมตร กลีบดอกภายในมีสีเข้ม กลีบดอกคลายตัว และเริ่มบานออก ทำการเก็บตัวอย่างกลีบดอกหลวงบุณฑริกและดอกบัวหลวงสัตตบงกชในระยะต่างๆ ในช่วงเช้า ก่อนดอกบาน ใช้กรรไกรสะอาดตัดแยกเฉพาะส่วนของกลีบดอกสีขาวของบัวหลวงบุณฑริก และกลีบดอกสีชมพูของบัวหลวงสัตตบงกช นำมาแช่เย็นด้วยไนโตรเจนเหลวทันที และเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส

3.2.4.2 การสกัด RNA จากกลีบดอกบัวหลวง

นำตัวอย่างกลีบดอกบัวหลวง เฉพาะส่วนของกลีบดอกสีขาวและกลีบดอกสีชมพู มาสกัด RNA ด้วยชุดสกัด InviTrap® spin plant RNA mini kit (Stratec molecular, Germany) โดยนำมาบดละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว และกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อและกำจัดเอนไซม์ RNase แล้ว ใช้ตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วปริมาณ 0.1 กรัม ทำการสกัด RNA ตามวิธีการในข้อที่ 3.2.3.2 จากนั้น นำ RNA ที่สกัดได้ไปตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ RNA ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง และเทคนิค gel electrophoresis เก็บรักษา RNA ที่สกัดได้ในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 3.4 ดอกบัวหลวงบุณชาติกริในระยะต่างๆ; (ก) ระยะที่ 1 ดอกตูมขนาดเล็ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 3 เซนติเมตร (ข) ระยะที่ 2 ดอกตูมขนาดกลาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 - 5 เซนติเมตร (ค) ดอกตูมขนาดใหญ่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 - 7 เซนติเมตร (ง) ระยะที่ 4 ดอกตูมก่อนดอกบาน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 - 10 เซนติเมตร และ (จ) ระยะที่ 5 ดอกบานวันแรก



ภาพที่ 3.5 ดอกบัวหลวงสัตตบงกชในระยะต่างๆ; (ก) ระยะที่ 1 ดอกตูมขนาดเล็ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 3 เซนติเมตร (ข) ระยะที่ 2 ดอกตูมขนาดกลาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 - 5 เซนติเมตร (ค) ดอกตูมขนาดใหญ่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 - 7 เซนติเมตร (ง) ระยะที่ 4 ดอกตูมก่อนดอกบาน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 - 10 เซนติเมตร และ (จ) ระยะที่ 5 ดอกบานวันแรก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สงวนไว้สำหรับใช้ในการเรียนการสอนเพื่อจุดประสงค์เฉพาะเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4.3 การสังเคราะห์ cDNA จาก RNA ของกลีบดอกบัวหลวง

นำ RNA ที่สกัดได้จากกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช ในระยะต่างๆ มากำจัด DNA ที่ปนเปื้อนโดยใช้เอนไซม์ *DNase I* ตามวิธีการในข้อ 3.2.3.4 และทำการสังเคราะห์ cDNA จาก RNA ที่ผ่านการกำจัด DNA ที่ปนเปื้อนแล้ว ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase ตามวิธีการในข้อที่ 3.2.3.5 เก็บ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกชไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.4.4 การโคลนบางส่วนของยีน *CHS* จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวง

ทำการโคลนบางส่วนของยีน *CHS* จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช ในระยะที่ 5 ด้วยเทคนิค PCR เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช และใช้สร้างพลาสมิดเพื่อใช้ถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense โดยทำการออกแบบไพรเมอร์จากส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ โดยใช้ข้อมูลพันธุกรรมลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ไพรเมอร์ คือ CHSA_forward primer และ CHSA_reverse primer (ภาคผนวก 2.1) นำไปใช้โคลนบางส่วนของยีน *CHS* ขนาดประมาณ 450 คู่เบส จาก cDNA ที่สกัดได้จากกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและสัตตบงกช ด้วยเทคนิค PCR เตรียมสารในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา ในหลอด PCR ไมโครทิวป์ขนาด 200 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำกลั่น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, สารละลายบัฟเฟอร์ 10x *Taq* buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, สารละลาย $MgCl_2$ เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, สารละลาย dNTP เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, สารละลายไพรเมอร์ CHSA_forward primer เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, สารละลายไพรเมอร์ CHSA_reverse primer เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, สารละลาย cDNA เจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 50 เท่า ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) เข้มข้น 5 ยูนิต ต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยปิเปต จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบการทำปฏิกิริยาดังนี้ ขั้นตอน pre-denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการทำ PCR โดยเริ่มจากขั้น denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ขั้น annealing ใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ขั้น extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ให้ทำปฏิกิริยาซ้ำจำนวน 35 รอบ และขั้นตอนสุดท้าย complete extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดบางส่วนของยีน *CHS* ด้วยเทคนิค gel electrophoresis จากนั้นตัดชิ้นส่วนของ agarose gel ที่มีชิ้นส่วนยีน นำมาสกัด DNA ออกจาก gel และนำไปเชื่อมต่อกับโคลนนิ่งเวกเตอร์ pTZ57R/T เพื่อส่งไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้พลาสมิดลูกผสมพลาสมิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับบริการเชิงงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pTZCHSABUN ที่มีบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงมณฑลชวชริก และโคลนนิ่งเวกเตอร์ pZT57R/T คัดเลือกโคลนจำนวน 3 โคลน ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer คือ M13F และ M13R

3.2.4.5 การศึกษาปริมาณของการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวง ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงในแต่ละระยะของการพัฒนาของดอกบัวหลวงมณฑลชวชริกดอกสีขาว และบัวหลวงสีดตบงกชดอกสีชมพู ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ตามวิธีการของ ชัยวรกุล ไชยปัญญา (2555) โดยนำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากกลีบดอกบัวหลวงมณฑลชวชริกและบัวหลวงสีดตบงกช ในระยะที่ 1 ถึง ระยะที่ 5 มาปรับความเข้มข้นของ cDNA ที่สังเคราะห์ให้เท่ากันโดยการเปรียบเทียบจากปริมาณการแสดงออกของยีน *18S rRNA* ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกสม่ำเสมอในเนื้อเยื่อพืชด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 18s_forward primer และ 18s_reverse primer (ภาคผนวก 2.1) และใช้ cDNA เป็น DNA ต้นแบบในการทำปฏิกิริยา โดยเตรียมสารในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา ในหลอด PCR ไมโครทิวบ์ขนาด 200 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำกลั่น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, สารละลายบัฟเฟอร์ 10x *Taq* buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, สารละลาย MgCl₂ เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, สารละลาย dNTP เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, สารละลายไพรเมอร์ 18s_forward primer เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, สารละลายไพรเมอร์ 18s_reverse primer เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, สารละลาย cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 5 ยูนิต ต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยปิเปต จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบการทำปฏิกิริยาดังนี้ ขั้นตอน pre-denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการทำ PCR โดยเริ่มจากขั้น denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ขั้น annealing ใช้อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ขั้น extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ให้ทำปฏิกิริยาซ้ำจำนวน 25 รอบ และขั้นตอนสุดท้าย complete extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดและความเข้มของแถบ DNA ของยีน *18S rRNA* ด้วยเทคนิค gel electrophoresis จากนั้นเจือจาง cDNA ของบัวหลวงด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยเปรียบเทียบจากความเข้มของแถบ DNA ของยีน *18S rRNA* ทำปฏิกิริยา PCR ซ้ำโดยใช้ cDNA ที่ปรับความเข้มข้นแล้ว ให้มีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *18S rRNA* ที่มีความเข้มของแถบ DNA เท่ากัน หลังจากปรับความเข้มข้นของ cDNA ให้เท่ากันโดยใช้ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *18S rRNA* เป็น DNA อ้างอิงแล้ว นำ cDNA ที่ได้ไปใช้ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CHSA forward primer และ CHSA reverse primer เพื่อเปรียบเทียบ

ไมโครลิตร ชิ้นส่วนของยีน *CHS* เข้มข้นประมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และเอนไซม์ *T4* ligase เข้มข้น 10 ยูนิต ต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ได้พลาสมิดลูกผสม pBICHSA (ภาพที่ 3.7) ขนาดประมาณ 13,400 คู่เบส จากนั้นชักนำพลาสมิดลูกผสมให้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด ด้วยวิธี heat-shock นำแบคทีเรียที่ได้มาเกลี่ยบนอาหารคัดเลือก LB agar ที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนของพลาสมิดลูกผสมโดยเลือกโคลนของแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB broth และนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า โดยใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปสกัดพลาสมิด ด้วยชุดสกัดพลาสมิด และตรวจสอบความถูกต้องของยีน *CHS* ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pBICHSA ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Hind* III และตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยไพรเมอร์ CHSA_forward primer และ CHSA_reverse primer จากนั้นตรวจสอบการกลับทิศ (antisense) ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่อยู่บนพลาสมิด pBICHS โดยนำไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

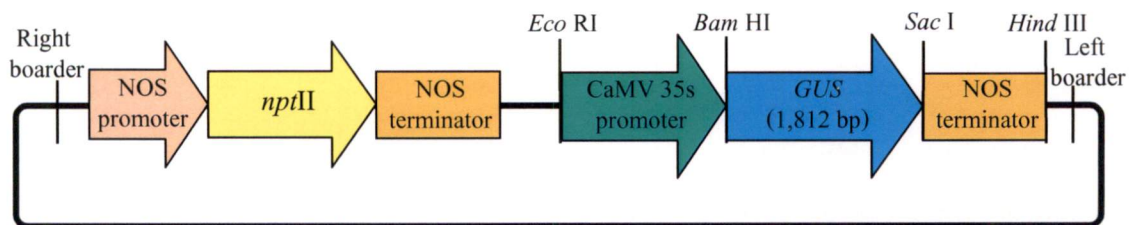
3.2.5.2 การสร้างพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA

นำบางส่วนของยีน *CHS* แบบ antisense ที่อยู่บนพลาสมิด pBICHSA มาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pCAMBIA1302 (ภาพที่ 3.8) ขนาด 10,549 คู่เบส ที่มียีนคัดเลือกในพืชเป็นยีน *hptII* (*hygromycin phosphotransferase*) มียีนคัดเลือกในแบคทีเรียเป็นยีน *npII* และมียีนรายงานผลเป็นยีน *GFP* (*mGFP5*; *modified green fluorescent protein 5*) โดยเชื่อมต่อกับในตำแหน่ง multiple cloning site (pUC19) ในตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Hind* III โดยเริ่มต้นจากนำพลาสมิดลูกผสม pBICHSA และพลาสมิด pCAMBIA1302 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (Fermentas, USA) และ *Hind* III (Fermentas, USA) เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประกอบด้วย น้ำกลั่น ปริมาตร 9 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ 10x Tango ปริมาตร 4 ไมโครลิตร สารละลายพลาสมิดเข้มข้น ประมาณ 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI เข้มข้น 10 ยูนิต ต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III เข้มข้น 10 ยูนิต ต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแยกขนาดของชิ้นส่วน DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิค gel electrophoresis จากนั้นตัดชิ้นส่วน agarose gel ที่มีชิ้นส่วนของยีน *CHS* ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส และส่วนของพลาสมิด pCAMBIA1302 ขนาดประมาณ 10,500 คู่เบส

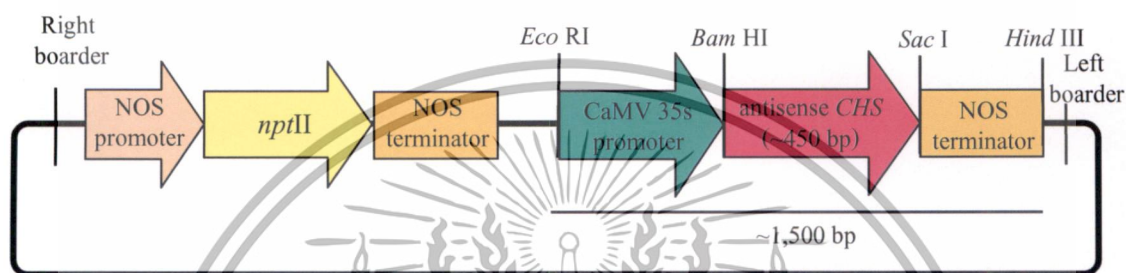
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำมาแยก DNA ออกจาก agarose gel และทำให้บริสุทธิ์และตรวจสอบคุณภาพของชิ้นส่วน DNA ที่แยกออกมาได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงและตรวจสอบขนาดของ DNA ที่แยกออกมาได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis จากนั้นนำมาเชื่อมต่อเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ *T4 ligase* โดยเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประกอบด้วย น้ำกลั่น ปริมาตร 8 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ 10x ligation buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ชิ้นส่วนพลาสมิด pCAMBIA1302 เข้มข้นประมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ชิ้นส่วน DNA ของยีน *CHS* เข้มข้นประมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และเอนไซม์ *T4 ligase* เข้มข้น 10 ยูนิต ต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ได้พลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA (ภาพที่ 3.9) ขนาดประมาณ 11,700 คู่เบส ที่มีบางส่วนของยีน *CHS* แบบ antisense ขนาด 458 คู่เบส ที่ถูกควบคุมด้วย CaMV 35s promoter และ NOS terminator โดยมียีนคัดเลือกในพืชเป็นยีน *hptII* มียีนคัดเลือกในแบคทีเรียเป็นยีน *npII* และมียีนรายงานผลเป็นยีน *GFP* จากนั้นชักนำพลาสมิดให้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดด้วยวิธี heat-shock นำแบคทีเรียที่ได้มาเกลี่ยบนอาหารคัดเลือก LB agar ที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม โดยเลือกโคลนของแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB broth และนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า โดยใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปสกัดพลาสมิด ด้วยชุดสกัดพลาสมิด และตรวจสอบความถูกต้องของยีน *CHS* ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco RI* และ *Hind III* และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac I* และ *Bam HI* และตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CAMV_forward primer และ NOS_reverse primer (ภาคผนวก 2.1) นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ไปใช้ถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวงต่อไป



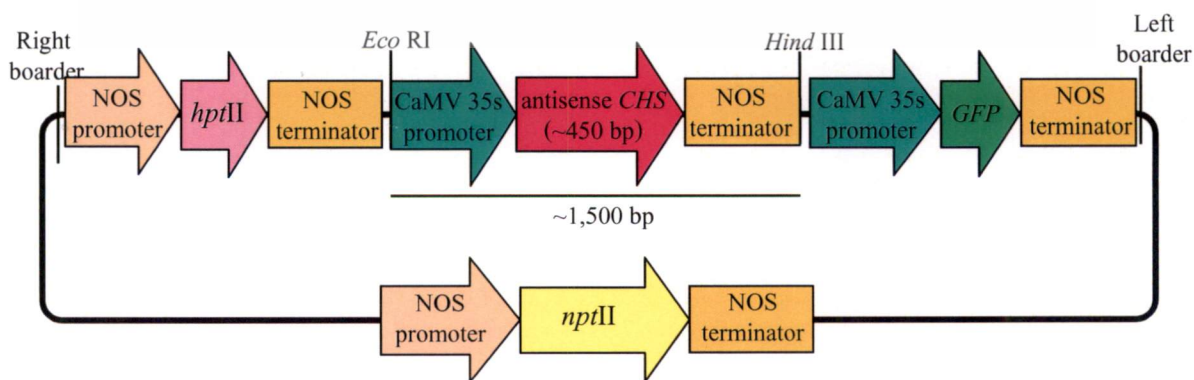
ภาพที่ 3.6 พลาสมิด pBI121



ภาพที่ 3.7 พลาสมิดลูกผสม pBICHSA



ภาพที่ 3.8 พลาสมิด pCAMBIA1302



ภาพที่ 3.9 พลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งมอบให้สำหรับโครงการวิจัยเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5.3 การถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense เข้าสู่เนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี ด้วยวิธียิงอนุภาค

นำพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA ที่มียีน *CHS* แบบ antisense มาเคลือบลงบนผิวของอนุภาคทองคำ เพื่อนำไปใช้ในการถ่ายยีน ตามวิธีการในคู่มือของเครื่องยิงอนุภาค Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad, USA) โดยเริ่มจากการทำความสะอาดอนุภาคทองคำ โดยใช้อนุภาคทองคำ ขนาด 1 ไมโครเมตร (Bio-Rad, USA) ปริมาณ 60 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ absolute ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง และล้างอนุภาคทองคำซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง และล้างอนุภาคทองคำซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำละลาย glycerol เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จะได้สารละลายอนุภาคทองคำ เข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แบ่งสารละลายอนุภาคทองคำใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำอนุภาคทองคำที่เตรียมไว้มาเคลือบด้วยพลาสมิด pCAMBIA1302CHSA โดยเริ่มจากนำอนุภาคทองคำในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ มาเขย่าด้วยเครื่อง vortex ให้อนุภาคทองคำกระจายตัว เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมพลาสมิด pCAMBIA1302CHSA ปริมาณ 5 ไมโครกรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นเติมน้ำละลาย CaCl_2 เข้มข้น 2.5 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลาย spermidine free-base เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (Sigma-Aldrich, USA) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นนำไปแช่ในถังน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที ให้ หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดส่วนทิ้งแล้วเติมน้ำละลายเอทานอล เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการเขย่าเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดส่วนทิ้งแล้วเติมน้ำละลาย absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการเขย่าเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นดูดส่วนทิ้งแล้วเติมน้ำละลาย absolute ethanol ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการเขย่าเบาๆ จะได้อนุภาคทองคำที่ถูกล้อมด้วยพลาสมิด pCAMBIA1302CHSA สำหรับนำไปใช้ในการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค นำอนุภาคทองคำที่ได้ไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส

นำชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีไปปรับสภาพแรงดัน osmotic pressure ก่อนการถ่ายยีน โดยตัดแต่งชิ้นส่วนให้มีขนาดประมาณชิ้นละ 3-5 ยอด และตัดใบออกให้หมด นำชิ้นเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารปรับสภาพ โดยใช้สารเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่สามารถนำออกจำหน่ายหรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ผ่านการพิจารณาจากเจ้าของลิขสิทธิ์อาจก่อให้เกิดความเสียหายทางกฎหมายได้

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อเยื่อแบบ MS ที่มีสาร manitol เข้มข้น 2 โมลาร์ และสาร sorbitol เข้มข้น 2 โมลาร์ นำกระดาศกรองรูปวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร วางตรงกลางจานแก้วบนอาหารปรับสภาพ นำชิ้นส่วน shoot cluster มาวางบนแผ่นกระดาศกรอง จำนวน 20 ชิ้นต่อจานแก้ว ปรับสภาพชิ้นเนื้อเยื่อก่อนนำไปถ่ายยีน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวง บลูมทริก และบัวหลวงราชินี ไปถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค และใช้อุณหภูมิของลำเป็นพาหะถ่ายยีน โดยเริ่มจากทำความสะอาดตู้ปลอดเชื้อด้วยแสง UV เป็นเวลา 30 นาที และเช็ดทำความสะอาดเครื่องยิงอนุภาคด้วยสารละลายเอทานอล เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ทำความสะอาดชิ้นส่วนตัวกลาง (macrocarrier) แผ่นกั้นความดัน (rupture disk) และแผ่นตระแกรงกั้น (stopping screen) นำอนุภาคของลำที่เคลือบพลาสติกแล้ว มาเขย่าให้อนุภาคของลำกระจายตัวด้วยเครื่อง vortex นำสารละลายอนุภาคของลำปริมาตร 10 ไมโครลิตร เคลือบบนชิ้น macrocarrier ประกอบส่วนต่างๆ เข้ากับเครื่อง โดยเลือกใช้ แผ่น rupture disk ขนาดแรงดัน 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ใช้ระยะยิง 9 เซนติเมตร จากนั้นนำเนื้อเยื่อ shoot cluster ที่อยู่บนอาหารปรับสภาพ วางในเครื่อง เปิดเครื่องและเปิดวาล์วถังแก๊สฮีเลียม (He) ให้มีแรงดันประมาณ 200 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นปรับความดันในเครื่องให้มีความดันประมาณ 26 - 28 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และทำการยิงอนุภาคของลำไปยังชิ้นเนื้อเยื่อโดยใช้ความดัน 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นปล่อยให้ชิ้นเนื้อเยื่อพักฟื้นตัวหลังจากการยิงอนุภาคบนอาหารปรับสภาพ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร regeneration medium ที่เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงนำไปคัดเลือกบนอาหารคัดเลือกอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ และสารปฏิชีวนะ hygromycin เป็นเวลา 10 สัปดาห์ โดยใช้ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin เริ่มต้นจาก 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 1 - 2 จากนั้นในสัปดาห์ที่ 3 - 4 ย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เพิ่มความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin เป็น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 3 - 4 ใช้อาหารคัดเลือกที่มีความเข้มข้นเป็น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 5 - 6 ใช้อาหารคัดเลือกที่มีความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และในสัปดาห์ที่ 7 - 10 ใช้อาหารคัดเลือกที่มีความเข้มข้นเป็น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร วางชิ้นเนื้อเยื่อบนอาหารจำนวน 5 ชิ้นต่อจานแก้วเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ ประมาณ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

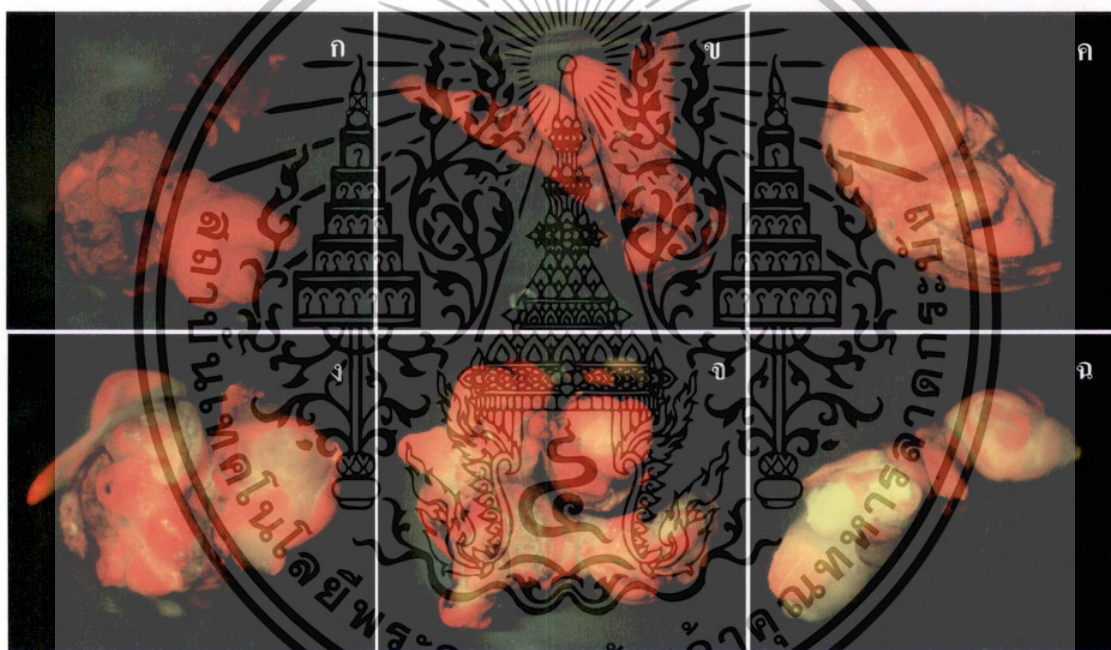
ทำการทดลองถ่ายยีนจำนวน 5 ซ้ำ ใช้ชิ้นส่วน shoot cluster ซ้ำละ 20 ชิ้น หลังจากถ่ายยีน 1 สัปดาห์ ตรวจสอบชิ้นเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของยีน *GFP* ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบทึบจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก และการเปลี่ยนแปลงของชิ้นเนื้อเยื่อ ทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการถ่ายยีน และตรวจสอบการมีอยู่ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีน *GFP* และยีน *hptII* ในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค PCR และปริมาณการ แสดงออกของยีน *CHS* ในต้นที่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

3.2.5.4 การตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนจากการแสดงออกแบบชั่วคราว ของยีน *GFP*

ตรวจสอบประสิทธิภาพของการถ่ายยีนจากการแสดงออกแบบชั่วคราว ของยีน *GFP* โดยนำเนื้อเยื่อ shoot cluster หลังจากถ่ายยีน 1 สัปดาห์ มาตรวจสอบการแสดงออก ของยีน *GFP* ด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบ stereo microscope (Olympus, SZX12, USA) ที่ติดตั้ง อุปกรณ์กำเนิดแสงฟลูออเรสเซนซ์ และตัวกรองแสงสำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GFP* ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ ให้คะแนนประสิทธิภาพในการถ่ายยีนตามเกณฑ์ในภาพที่ 3.10



ภาพที่ 3.10 เกณฑ์การให้คะแนนประสิทธิภาพในการถ่ายยีน จากร้อยละของพื้นที่สีเขียวเรืองแสง ของยีน *GFP* บนชิ้นเนื้อเยื่อ

- (ก) 0 คะแนน ไม่พบพื้นที่สีเขียวเรืองแสงของยีน *GFP*
- (ข) 1 คะแนน มีพื้นที่สีเขียวเรืองแสง น้อยกว่าร้อยละ 20
- (ค) 2 คะแนน มีพื้นที่สีเขียวเรืองแสง ร้อยละ 20 - 40
- (ง) 3 คะแนน มีพื้นที่สีเขียวเรืองแสง ร้อยละ 40 - 60
- (จ) 4 คะแนน มีพื้นที่สีเขียวเรืองแสง ร้อยละ 60 - 80
- (ฉ) 5 คะแนน มีพื้นที่สีเขียวเรืองแสง มากกว่าร้อยละ 80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5.5 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GFP* และยีน *hptII* ด้วยเทคนิค PCR

สกัด genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงบุณชกริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน และต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน นำมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GFP* และ ยีน *hptII* ใน genomic DNA ของต้นบัวหลวงบุณชกริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR โดยตรวจสอบยีน *GFP* โดยใช้ไพรเมอร์ GFP_forward primer และ GFP_reverse primer และตรวจสอบยีน *hptII* ใช้ไพรเมอร์ Hygro_forward primer และ Hygro_reverse primer (ภาคผนวก 2.1) เตรียมสารในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา ในหลอด PCR ไมโครทิวป์ขนาด 200 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำกลั่น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ 10x *Taq* buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร สารละลาย MgCl₂ เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร สารละลาย dNTP เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สารละลายไพรเมอร์ forward primer เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สารละลายไพรเมอร์ reverse primer เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สารละลาย genomic DNA เจือจางอัตราส่วน 1 ต่อ 10 เท่า ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วย ปิंपัด จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบการทำปฏิกิริยาดังนี้ ขั้นตอน pre-denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการทำ PCR โดยเริ่มจากขั้น denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ขั้น annealing ใช้อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส สำหรับไพรเมอร์ GFP_forward primer และ GFP_reverse primer และใช้อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียสสำหรับไพรเมอร์ Hygro_forward primer และ Hygro_reverse primer เป็นเวลา 45 วินาที ขั้น extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ให้ทำปฏิกิริยาซ้ำจำนวน 35 รอบ และขั้นตอนสุดท้าย complete extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปตรวจสอบแถบ DNA ของยีน *GFP* และ ยีน *hptII* ด้วยเทคนิค gel electrophoresis ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GFP* และ ยีน *hptII* ใน genomic DNA โดยเปรียบเทียบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ที่ใช้ พลาสมิด pCAMBIA1302CHSA กับ genomic DNA ของต้นบัวหลวงบุณชกริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน และต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

3.2.5.5 การศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

สกัด RNA จากใบและลำต้นของบัวหลวงบุณชกริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน และต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยชุดสกัด RNA จากนั้นนำไปสังเคราะห์เป็น cDNA นำ cDNA ที่ได้มาศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในต้นของบัวหลวงบุณชกริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR ตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ว่าลิขสิทธิ์ที่เจ้าของเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการของ ชัยวรกุล ไชยปัญญา (2555) โดยเริ่มต้นจากปรับความเข้มข้นของ cDNA ให้เท่ากันโดยการเปรียบเทียบจากปริมาณการแสดงออกของยีน *18S rRNA* ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดและความเข้มของแถบ DNA ของยีน *18S rRNA* ด้วยเทคนิค gel electrophoresis จากนั้นเจือจาง cDNA ของบัวหลวงด้วยน้ำกลั่น โดยเปรียบเทียบจากความเข้มของแถบ DNA ของยีน *18S rRNA* ทำปฏิกิริยา PCR ซ้ำโดยใช้ cDNA ที่ปรับความเข้มข้นแล้ว ให้มีผลผลิต PCR ของยีน *18S rRNA* ที่มีความเข้มของแถบ DNA เท่ากัน หลังจากปรับความเข้มข้นของ cDNA ให้เท่ากันแล้ว นำ cDNA ที่ได้ไปใช้ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของบางส่วนของยีน *CHS* คือ ไพรเมอร์ CHSA_forward primer และ CHSA_reverse primer เปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในต้นบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน และต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน จากความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ที่ใช้ต้นแบบ cDNA จากต้นบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน และต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการชักนำให้เกิด shoot cluster ของบัวหลวงบุณทริกและบัวหลวงราชินี

ผลการชักนำให้เกิด shoot cluster จากส่วนยอดของเอมบริโอบัวหลวงบุณทริกและบัวหลวงราชินีโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ รวมเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

4.1.1 การเปลี่ยนแปลงของขนาดและน้ำหนักของชิ้นเนื้อเยื่อ

หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดของเอมบริโอบัวหลวงบุณทริกและบัวหลวงราชินีบนอาหารชักนำให้เกิด shoot cluster เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นเนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโต มีขนาดเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง (ตารางที่ 4.1) โดยในช่วง 6 สัปดาห์แรก ชิ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงราชินีมีขนาดใหญ่กว่าชิ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงบุณทริกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ชิ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงบุณทริกมีขนาดเริ่มต้นประมาณ 0.3 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 2 มีขนาดเฉลี่ย 0.49 ± 0.09 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 4 มีขนาดเฉลี่ย 0.55 ± 0.09 เซนติเมตร และในสัปดาห์ที่ 6 มีขนาดเฉลี่ย 0.64 ± 0.10 เซนติเมตร ส่วนชิ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงราชินี มีขนาดเริ่มต้นประมาณ 0.3 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 2 มีขนาดเฉลี่ย 0.50 ± 0.07 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 4 มีขนาดเฉลี่ย 0.58 ± 0.07 เซนติเมตร และในสัปดาห์ที่ 6 มีขนาดเฉลี่ย 0.70 ± 0.08 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 8 ชิ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงราชินีมีขนาดใหญ่กว่าบัวหลวงบุณทริกเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ชิ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงบุณทริกมีขนาดเฉลี่ย 0.68 ± 0.10 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.1 ก) และบัวหลวงราชินีมีขนาดเฉลี่ย 0.70 ± 0.08 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.1 ข) ในสัปดาห์ที่ 10 ถึงสัปดาห์ที่ 16 ชิ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงราชินีมีขนาดเฉลี่ยมากกว่าบัวหลวงบุณทริกเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.1) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ชิ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงบุณทริกในสัปดาห์ที่ 10 มีขนาดเฉลี่ย 0.69 ± 0.09 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 12 มีขนาดเฉลี่ย 0.70 ± 0.08 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 14 มีขนาดเฉลี่ย 0.70 ± 0.08 เซนติเมตร และในสัปดาห์ที่ 16 มีขนาดเฉลี่ย 0.70 ± 0.08 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.1 ค) ชิ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงราชินีในสัปดาห์ที่ 10 มีขนาดเฉลี่ย 0.72 ± 0.09 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 12 มีขนาดเฉลี่ย 0.73 ± 0.08 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 14 มีขนาดเฉลี่ย 0.76 ± 0.08 เซนติเมตร และในสัปดาห์ที่ 16 มีขนาดเฉลี่ย 0.76 ± 0.08 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.1 ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

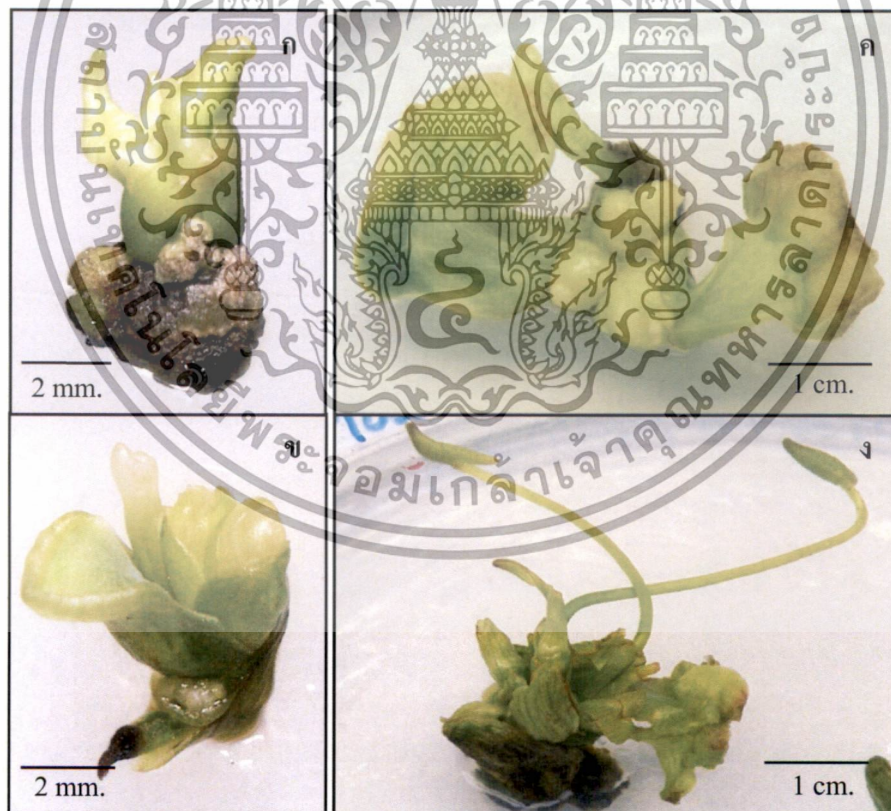
ในส่วนการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของชิ้นเนื้อเยื่อของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิด shoot cluster เป็นเวลา 16 สัปดาห์ (ตารางที่ 4.2) พบว่า ในสัปดาห์ที่ 4 ชิ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงราชินีมีน้ำหนักเฉลี่ยมากกว่าบัวหลวงบุณฑริกเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ชิ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงบุณฑริกมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.0757 ± 0.0226 กรัม และบัวหลวงราชินีมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.0924 ± 0.0447 กรัม ในสัปดาห์ที่ 8 ชิ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงราชินีมีน้ำหนักเฉลี่ยมากกว่าบัวหลวงบุณฑริกอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ชิ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงบุณฑริกมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.1252 ± 0.0436 กรัม และบัวหลวงราชินีมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.1714 ± 0.0621 กรัม ในสัปดาห์ที่ 12 ชิ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงราชินีมีน้ำหนักเฉลี่ยมากกว่าบัวหลวงบุณฑริกอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ชิ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงบุณฑริกมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.1897 ± 0.0684 กรัม และบัวหลวงราชินีมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.2515 ± 0.1204 กรัม และในสัปดาห์ที่ 16 ชิ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงราชินีมีน้ำหนักเฉลี่ยมากกว่าบัวหลวงบุณฑริกอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ชิ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงบุณฑริกมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.2767 ± 0.1360 กรัม และบัวหลวงราชินีมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.3286 ± 0.1853 กรัม

4.1.2 การเกิดยอดและใบของชิ้นเนื้อเยื่อ

ผลการเกิดยอดของชิ้นเนื้อเยื่อของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิด shoot cluster เป็นเวลา 16 สัปดาห์ (ตารางที่ 4.3) พบว่า ในสัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 10 ชิ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงทั้งสองพันธุ์ยังไม่เกิดยอดใหม่ แต่ยอดมีการเจริญเติบโต มีขนาดใหญ่ขึ้น มีจำนวนยอดเฉลี่ย 1 ยอดต่อชิ้น ยอดใหม่ของชิ้นเนื้อเยื่อเริ่มเกิดขึ้นตั้งแต่สัปดาห์ที่ 12 และมียอดเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง ในสัปดาห์ที่ 12 ถึงสัปดาห์ที่ 16 บัวหลวงบุณฑริกมีจำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าบัวหลวงราชินีอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 12 เนื้อเยื่อบัวหลวงบุณฑริกมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.07 ± 0.25 ยอดต่อชิ้น และบัวหลวงราชินีมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.02 ± 0.15 ยอดต่อชิ้น ในสัปดาห์ที่ 14 ชิ้นเนื้อเยื่อบัวหลวงบุณฑริกมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.47 ± 0.81 ยอดต่อชิ้น และบัวหลวงราชินีมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.28 ± 0.76 ยอดต่อชิ้น และในสัปดาห์ที่ 16 เนื้อเยื่อบัวหลวงบุณฑริกมีจำนวนยอดเฉลี่ย 2.20 ± 1.78 ยอดต่อชิ้น และบัวหลวงราชินีมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.57 ± 1.38 ยอดต่อชิ้น ยอดใหม่ของ shoot cluster ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นกระจุกยอดประกอบด้วยยอดอ่อน 2 - 3 ยอด (ภาพที่ 4.1 ค) มีกาบสีเขียวอ่อนห่อหุ้มไว้ กระจุกยอดเกิดจากส่วนยอดเดิม และบางส่วนเกิดจากตายอดด้านข้างกาบใบ

ในส่วนของการเกิดใบเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิด shoot cluster เป็นเวลา 16 สัปดาห์ (ตารางที่ 4.4) พบว่า ใน 4 สัปดาห์แรก เนื้อเยื่อบัวหลวงทั้งสองพันธุ์ยังไม่เกิดใบขึ้น เริ่มมีใบอ่อนสีเขียวเกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 6 และชิ้นเนื้อเยื่อมีจำนวนใบเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง ในสัปดาห์ที่ 6 ถึงเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัปดาห์ที่ 8 ชี้นเนื้อเยื่อบัวหลวงราชินีมีจำนวนใบเฉลี่ยมากกว่าบัวหลวงบุณฑริกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 6 บัวหลวงบุณฑริกมีจำนวนใบเฉลี่ย 0.01 ± 0.07 ใบต่อช่อก และบัวหลวงราชินีมีจำนวนใบเฉลี่ย 0.06 ± 0.26 ใบต่อช่อก ในสัปดาห์ที่ 8 บัวหลวงบุณฑริกมีจำนวนใบเฉลี่ย 0.17 ± 0.43 ใบต่อช่อก และบัวหลวงราชินีมีจำนวนใบเฉลี่ย 0.45 ± 0.70 ใบต่อช่อก ในสัปดาห์ที่ 10 ถึงสัปดาห์ที่ 16 ชี้นเนื้อเยื่อบัวหลวงบุณฑริกมีจำนวนใบเฉลี่ยมากกว่าบัวหลวงราชินีเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ในสัปดาห์ที่ 10 บัวหลวงบุณฑริกมีจำนวนใบเฉลี่ย 1.61 ± 0.86 ใบต่อช่อก และบัวหลวงราชินีมีจำนวนใบเฉลี่ย 1.30 ± 0.85 ใบต่อช่อก ในสัปดาห์ที่ 12 บัวหลวงบุณฑริกมีจำนวนใบเฉลี่ย 2.26 ± 0.86 ใบต่อช่อก และบัวหลวงราชินีมีจำนวนใบเฉลี่ย 1.71 ± 0.95 ใบต่อช่อก ในสัปดาห์ที่ 14 บัวหลวงบุณฑริกมีจำนวนใบเฉลี่ย 2.42 ± 0.81 ใบต่อช่อก และบัวหลวงราชินีมีจำนวนใบเฉลี่ย 2.06 ± 1.10 ใบต่อช่อก และในสัปดาห์ที่ 16 บัวหลวงบุณฑริกมีจำนวนใบเฉลี่ย 3.14 ± 1.39 ใบต่อช่อก และบัวหลวงราชินีมีจำนวนใบเฉลี่ย 2.74 ± 2.41 ใบต่อช่อก ใบของบัวหลวงราชินีมีขนาดใหญ่กว่าบัวหลวงบุณฑริกเล็กน้อย เมื่อใบของบัวหลวงราชินีอายุมากขึ้นจะมีจุดสีชมพูบริเวณริมขอบใบ (ภาพที่ 4.1 ง)



ภาพที่ 4.1 ชี้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงอายุ 8 สัปดาห์; (ก) บัวหลวงบุณฑริก และ (ข) บัวหลวงราชินี และชี้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงอายุ 16 สัปดาห์; (ค) บัวหลวงบุณฑริก และ (ง) บัวหลวงราชินี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ขนาดเฉลี่ยของซึนเนื้อเยื่อบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิด shoot cluster เป็นเวลา 16 สัปดาห์

บัวหลวง	ขนาดเฉลี่ยของซึนเนื้อเยื่อ (เซนติเมตร) ในสัปดาห์ที่							
	MS+NAA+TDZ ¹				MS + BA ²			
	2	4	6	8	10	12	14	16
บุณฑริก	0.49±0.09	0.55±0.09	0.64±0.10	0.68±0.10	0.69±0.09	0.70±0.09	0.70±0.08	0.70±0.08
ราชินี	0.50±0.07	0.58±0.07	0.70±0.08	0.70±0.08	0.72±0.09	0.73±0.08	0.76±0.08	0.76±0.08
T-test	*	**	**	ns	ns	ns	ns	ns
%CV	15.80	15.10	14.70	14.21	12.92	12.09	12.39	11.95

* มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

¹อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มี NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์

²อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มี BA เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์

ตารางที่ 4.2 น้ำหนักเฉลี่ยของซึนเนื้อเยื่อบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิด shoot cluster เป็นเวลา 16 สัปดาห์

บัวหลวง	น้ำหนักเฉลี่ยของซึนเนื้อเยื่อ (กรัม) ในสัปดาห์ที่			
	MS+NAA+TDZ ¹		MS + BA ²	
	4	8	12	16
บุณฑริก	0.0757±0.0226	0.1252±0.0436	0.1897±0.0684	0.2767±0.1360
ราชินี	0.0924±0.0447	0.1714±0.0621	0.2515±0.1204	0.3286±0.1853
T-test	ns	**	**	**
%CV	40.12	38.89	45.12	46.67

** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

¹อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมสาร NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์

²อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมสาร BA เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การเกิดยอดของซันเนื้อเยื่อบัวหลวงบุนทรริกและบัวหลวงราชินีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิด shoot cluster เป็นเวลา 16 สัปดาห์

บัวหลวง	จำนวนยอดโดยเฉลี่ยของซันเนื้อเยื่อ (ยอด) ในสัปดาห์ที่							
	MS+NAA+TDZ ¹				MS + BA ²			
	2	4	6	8	10	12	14	16
บุนทรริก	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.07±0.25	1.47±0.81	2.20±1.78
ราชินี	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.02±0.15	1.28±0.76	1.57±1.38
T-test	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	*
%CV	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	19.90	49.86	35.20

* มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

¹อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมสาร NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์

²อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมสาร BA เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์

ตารางที่ 4.4 การเกิดใบของซันเนื้อเยื่อบัวหลวงบุนทรริกและบัวหลวงราชินีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิด shoot cluster เป็นเวลา 16 สัปดาห์

บัวหลวง	จำนวนใบเฉลี่ยของซันเนื้อเยื่อ (ใบ) ในสัปดาห์ที่							
	MS+NAA+TDZ ¹				MS + BA ²			
	2	4	6	8	10	12	14	16
บุนทรริก	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.07	0.17±0.43	1.61±0.86	2.26±0.86	2.42±0.81	3.14±1.39
ราชินี	0.00±0.00	0.00±0.00	0.06±0.26	0.45±0.70	1.30±0.85	1.71±0.95	2.06±1.10	2.74±2.41
T-test	ns	ns	**	**	ns	ns	ns	ns
%CV	0.00	0.00	11.44	40.41	39.75	47.83	43.70	49.68

** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

¹อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมสาร NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์

²อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมสาร BA เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ hygromycin เพื่อใช้คัดเลือก shoot cluster ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน

ผลการศึกษาหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร hygromycin สำหรับใช้เป็นสารคัดคัดเลือก shoot cluster ของบัวหลวงพันธุ์ทรูติกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน โดยเฉพาะเลี้ยงชิ้นส่วน shoot cluster ของบัวหลวงพันธุ์ทรูติกและบัวหลวงราชินี บนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin เข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

4.2.1 คะแนนความสมบูรณ์ของของชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก

หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงพันธุ์ทรูติก บนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin เข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวง ที่ระดับความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.2 ก) มีคะแนนความสมบูรณ์ 6.00 ± 0.00 คะแนน ทุกสัปดาห์ ส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกความเข้มข้นอื่น มีคะแนนความสมบูรณ์ลดลงตามความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin (ตารางที่ 4.5) โดยพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.2 ข) ชิ้นเนื้อเยื่อเริ่มมีคะแนนความสมบูรณ์ลดลงในสัปดาห์ที่ 2 คะแนนความสมบูรณ์ของชิ้นเนื้อเยื่อลดลงตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ในสัปดาห์ที่ 8 ชิ้นเนื้อเยื่อมีคะแนนความสมบูรณ์ 2.00 ± 1.11 คะแนน ชิ้นเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ตาย แต่มีบางชิ้นที่รอดชีวิต มีคะแนนความสมบูรณ์มากกว่า 1.00 ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.2 ค) ชิ้นเนื้อเยื่อเริ่มมีคะแนนความสมบูรณ์ลดลงในสัปดาห์ที่ 1 คะแนนความสมบูรณ์ของชิ้นเนื้อเยื่อลดลงตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ในสัปดาห์ที่ 8 ชิ้นเนื้อเยื่อมีคะแนนความสมบูรณ์ 1.53 ± 0.23 คะแนน ชิ้นเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ตาย แต่มีบางชิ้นที่รอดชีวิต ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถกำจัดชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงพันธุ์ทรูติกได้ใน 8 สัปดาห์ แต่สามารถทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโตได้ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า (ภาพที่ 4.2 ง) ชิ้นเนื้อเยื่อเริ่มมีคะแนนความสมบูรณ์ลดลงในสัปดาห์ที่ 1 คะแนนความสมบูรณ์ของชิ้นเนื้อเยื่อลดลงตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ในสัปดาห์ที่ 8 ชิ้นเนื้อเยื่อมีคะแนนความสมบูรณ์ 1.00 ± 0.00 คะแนน ชิ้นเนื้อเยื่อตายทั้งหมด ดังนั้นที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงเหมาะสำหรับคัดเลือกรากบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน สามารถกำจัดชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้ใน 8 สัปดาห์ แต่ที่ระดับความเข้มข้น 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.2 จ และ ฉ) ทำให้เนื้อเยื่อ shoot cluster ทั้งหมดตาย มีคะแนนความสมบูรณ์ 1.00 ± 0.00 คะแนน ในสัปดาห์ที่ 7 และสัปดาห์ที่ 6 ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเข้มข้นมากเกินไป ทำให้เนื้อเยื่อตายอย่างรวดเร็ว จึงไม่เหมาะสำหรับนำไปใช้คัดเลือกรากบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ่ายยีน ชี้นเนื้อเยื่อบัวหลวงบุงนุทริกที่ตาย ในระยะแรกมีลักษณะใบอ่อนและยอดอ่อน เปลี่ยนเป็น สีเหลืองซีด ขอบใบบางส่วนแห้งตาย เป็นสีน้ำตาล จากนั้นเนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และเมื่อ ชี้นเนื้อเยื่อตาย ชี้นเนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ

ในส่วนของเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินี ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร คัดเลือก ที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin เข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ชี้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวง ที่ระดับความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพ ที่ 4.3 ก) มีคะแนนความสมบูรณ์ 6.00 ± 0.00 คะแนน ทุกสัปดาห์ ส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร คัดเลือกความเข้มข้นอื่น มีคะแนนความสมบูรณ์ลดลงตามความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin (ตารางที่ 4.6) โดยพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.3 ข) ชี้น เนื้อเยื่อเริ่มมีคะแนนความสมบูรณ์ลดลงในสัปดาห์ที่ 1 คะแนนความสมบูรณ์ของชี้นเนื้อเยื่อลดลง ตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ในสัปดาห์ที่ 8 ชี้นเนื้อเยื่อมีคะแนนความสมบูรณ์ 1.93 ± 0.95 คะแนน ชี้นเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ตาย แต่มีบางชี้นที่รอดชีวิต มีคะแนนความสมบูรณ์มากกว่า 1.00 ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.3 ค) ชี้นเนื้อเยื่อเริ่มมีคะแนนความสมบูรณ์ ลดลงในสัปดาห์ที่ 1 คะแนนความสมบูรณ์ของชี้นเนื้อเยื่อลดลงตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร คัดเลือก ในสัปดาห์ที่ 8 ชี้นเนื้อเยื่อมีคะแนนความสมบูรณ์ 1.33 ± 0.12 คะแนน ชี้นเนื้อเยื่อตายเกือบ ทั้งหมด แต่มีบางชี้นที่รอดชีวิต ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถกำจัด ชี้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินีได้ ใน 8 สัปดาห์ แต่สามารถทำให้ชี้นเนื้อเยื่อหยุดการ เจริญเติบโตได้ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า (ภาพที่ 4.3 ง) ชี้นเนื้อเยื่อเริ่มมี คะแนนความสมบูรณ์ลดลงในสัปดาห์ที่ 1 คะแนนความสมบูรณ์ของชี้นเนื้อเยื่อลดลงตามระยะเวลา ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ในสัปดาห์ที่ 8 ชี้นเนื้อเยื่อมีคะแนนความสมบูรณ์ 1.00 ± 0.00 คะแนน ชี้นเนื้อเยื่อตายทั้งหมด ดังนั้นที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงเหมาะสำหรับคัดเลือกต้น บัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน สามารถกำจัดชี้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่าย ยีนได้ใน 8 สัปดาห์ แต่ที่ระดับความเข้มข้น 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.3 จ และ ฉ) ทำ ใ้เนื้อเยื่อ shoot cluster ทั้งหมดตาย มีคะแนนความสมบูรณ์ 1.00 ± 0.00 คะแนน ในสัปดาห์ที่ 7 และสัปดาห์ที่ 5 ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเข้มข้นมาก เกินไป ทำให้เนื้อเยื่อตายอย่างรวดเร็ว จึงไม่เหมาะสำหรับนำไปใช้คัดเลือกต้นบัวหลวงที่ได้รับการ ถ่ายยีน ชี้นเนื้อเยื่อบัวหลวงราชินีที่ตาย ในระยะแรกมีลักษณะใบอ่อนและยอดอ่อน เปลี่ยนเป็นสี เหลืองซีด ขอบใบบางส่วนแห้งตาย เป็นสีน้ำตาล จากนั้นเนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และเมื่อชี้น เนื้อเยื่อตาย ชี้นเนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ

4.2.2 ร้อยละของขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก

เมื่อเพาะเลี้ยงขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin เข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อัตราการรอดชีวิตของ shoot cluster ของบัวหลวงบนอาหารคัดเลือกตามความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin ที่เพิ่มขึ้น และอัตราการรอดชีวิตลดลงตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก (ตารางที่ 4.7) ที่ระดับความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.2 ก) ขึ้นเนื้อเยื่อทั้งหมดรอดชีวิต และมีการเจริญเติบโตปกติ ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นเนื้อเยื่อเริ่มตายในสัปดาห์ที่ 5 มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 93.33 ± 11.55 และในสัปดาห์ที่ 8 พบว่า มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 40.00 ± 40.00 (ภาพที่ 4.2 ข) ที่ระดับความเข้มข้นนี้ ไม่สามารถกำจัดขึ้นเนื้อเยื่อได้ทั้งหมดใน 8 สัปดาห์ ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นเนื้อเยื่อเริ่มตาย ในสัปดาห์ที่ 4 โดยมีอัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือร้อยละ 93.33 ± 11.55 และในสัปดาห์ที่ 8 พบว่า มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 40.00 ± 0.00 (ภาพที่ 4.2 ค) ที่ระดับความเข้มข้นนี้ ไม่สามารถกำจัดขึ้นเนื้อเยื่อได้ทั้งหมดใน 8 สัปดาห์ ที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นเนื้อเยื่อเริ่มตาย ในสัปดาห์ที่ 3 โดยมีอัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือร้อยละ 93.33 ± 11.55 และ ขึ้นเนื้อเยื่อตายทั้งหมดในสัปดาห์ที่ 8 (ภาพที่ 4.2 ง) ที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นเนื้อเยื่อเริ่มตาย ในสัปดาห์ที่ 3 โดยมีอัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือร้อยละ 80.00 ± 0.00 และขึ้นเนื้อเยื่อตายทั้งหมด ในสัปดาห์ที่ 7 และที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นเนื้อเยื่อเริ่มตาย ในสัปดาห์ที่ 2 โดยมีอัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือร้อยละ 93.33 ± 11.55 และขึ้นเนื้อเยื่อตายทั้งหมด ในสัปดาห์ที่ 6

เมื่อเพาะเลี้ยงขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินีบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin เข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อัตราการรอดชีวิตของ shoot cluster ของบัวหลวงราชินีลดลงตามความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin ที่เพิ่มขึ้น และอัตราการรอดชีวิตลดลงตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก (ตารางที่ 4.8) ที่ระดับความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นเนื้อเยื่อทั้งหมดรอดชีวิต และมีการเจริญเติบโตปกติ (ภาพที่ 4.3 ก) ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นเนื้อเยื่อเริ่มตาย ในสัปดาห์ที่ 2 โดยมีอัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือร้อยละ 93.33 ± 11.55 และในสัปดาห์ที่ 8 พบว่า มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 46.67 ± 30.55 (ภาพที่ 4.3 ข) ที่ระดับความเข้มข้นนี้ ไม่สามารถกำจัดขึ้นเนื้อเยื่อได้ทั้งหมดใน 8 สัปดาห์ ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นเนื้อเยื่อเริ่มตาย ในสัปดาห์ที่ 3 โดยมีอัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือร้อยละ 86.67 ± 23.09 และในสัปดาห์ที่ 8 พบว่า มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 26.67 ± 11.55 (ภาพที่ 4.3 ค) ที่ระดับความเข้มข้นนี้ ไม่สามารถกำจัดขึ้นเนื้อเยื่อได้ทั้งหมดใน 8 สัปดาห์ ที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นเนื้อเยื่อเริ่มตาย ในสัปดาห์ที่ 3 โดยมีอัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือร้อยละ 80.00 ± 34.64 และ ขึ้นเนื้อเยื่อตายทั้งหมดในสัปดาห์ที่ 8 (ภาพที่ 4.3 ง) ที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นเนื้อเยื่อเริ่มตาย ในสัปดาห์ที่

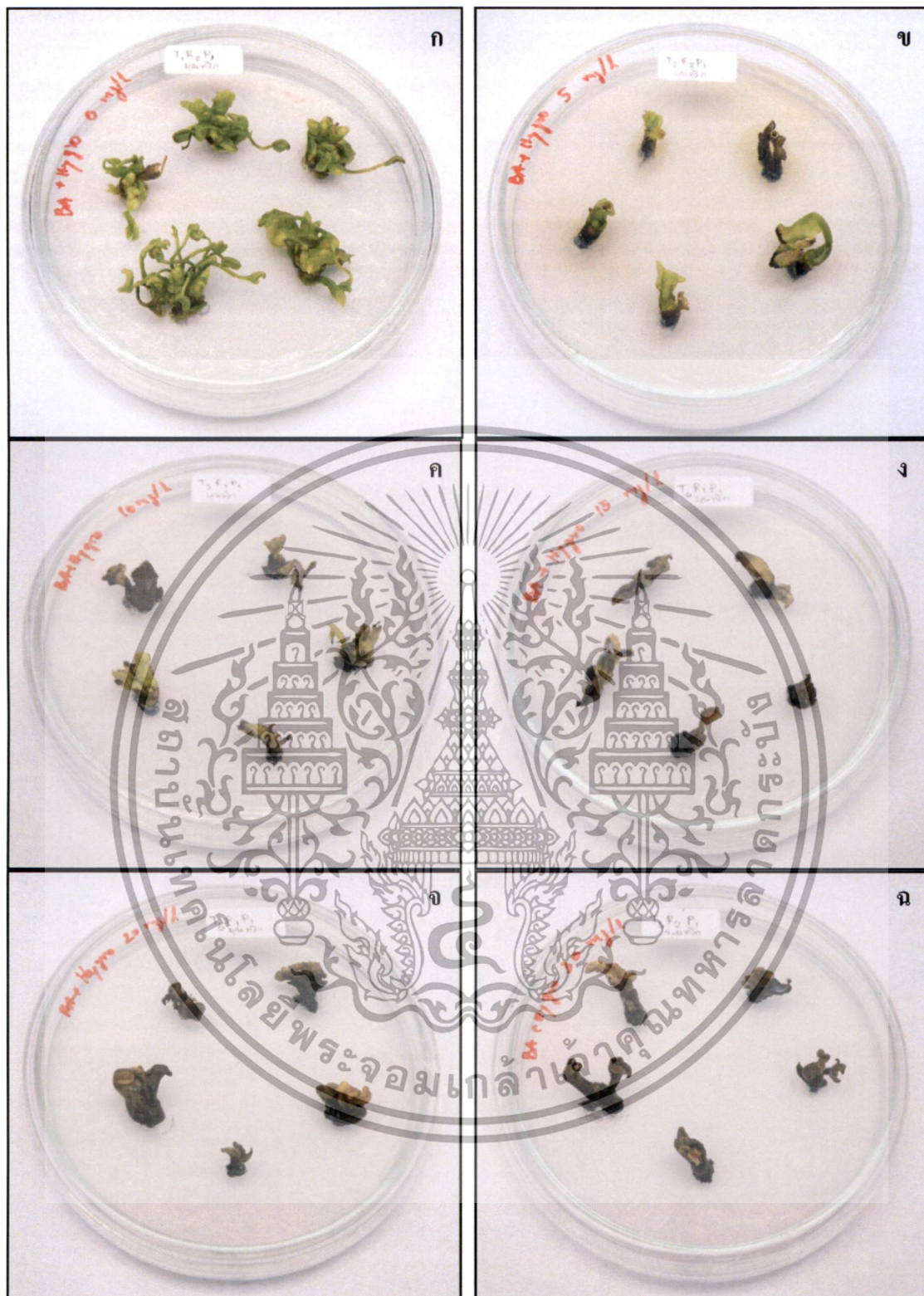
2 โดยมีอัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือร้อยละ 73.33 ± 30.55 และขึ้นเนื้อเยื่อตายทั้งหมด ในสัปดาห์ที่ 7 และที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นเนื้อเยื่อเริ่มตาย ในสัปดาห์ที่ 2 โดยมีอัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือร้อยละ 53.33 ± 11.55 และขึ้นเนื้อเยื่อตายทั้งหมด ในสัปดาห์ที่ 5

4.2.3 จำนวนยอดและจำนวนใบของขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก

เมื่อเพาะเลี้ยงขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin เข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster มีการเจริญเติบโตปกติ มียอดใหม่และใบใหม่เกิดขึ้นในแต่ละสัปดาห์ และในสัปดาห์ที่ 8 มีจำนวนยอดสูงที่สุด 9.47 ± 3.52 ยอดต่อขึ้นเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 4.9) และมีใบเฉลี่ยสูงที่สุด 9.20 ± 1.93 ใบต่อขึ้นเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 4.11) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster มีการเจริญเติบโตเกิดยอดใหม่และใบใหม่ ในสัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 3 จากนั้น ขึ้นเนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโต และค่อยๆ ตายลงในสัปดาห์ที่ 4 ทำให้มีจำนวนใบและยอดลดลง โดยมีจำนวนยอดมากที่สุด 1.33 ± 0.23 ยอดต่อขึ้นเนื้อเยื่อ และจำนวนใบมากที่สุด 3.07 ± 0.46 ใบต่อขึ้นเนื้อเยื่อ ในสัปดาห์ที่ 3 และที่ 4 ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster มีการเจริญเติบโตเกิดยอดใหม่และใบใหม่ ในสัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 2 จากนั้น ขึ้นเนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโต และค่อยๆ ตายลงในสัปดาห์ที่ 4 ทำให้มีจำนวนใบและยอดลดลง โดยมีจำนวนยอดมากที่สุด 1.67 ± 0.31 ยอดต่อขึ้นเนื้อเยื่อ และจำนวนใบมากที่สุด 2.80 ± 0.53 ใบต่อขึ้นเนื้อเยื่อ ในสัปดาห์ที่ 2 และที่ 3 ที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster มีการเจริญเติบโตเกิดยอดใหม่และใบใหม่ ในสัปดาห์ที่ 1 จากนั้น ขึ้นเนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโต และค่อยๆ ตายลง ขึ้นเนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโต ในสัปดาห์ที่ 2 ทำให้มีจำนวนใบและยอดลดลง โดยมีจำนวนยอดมากที่สุด 1.47 ± 0.42 ยอดต่อขึ้นเนื้อเยื่อ และจำนวนใบมากที่สุด 3.13 ± 0.12 ใบต่อขึ้นเนื้อเยื่อ ในสัปดาห์ที่ 1 และที่ 2 และขึ้นเนื้อเยื่อตายทั้งหมด ในสัปดาห์ที่ 8 ที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster มีการเจริญเติบโตเกิดยอดใหม่และใบใหม่ ในสัปดาห์ที่ 1 จากนั้น ขึ้นเนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโต และค่อยๆ ตายลง ขึ้นเนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโต ในสัปดาห์ที่ 2 ทำให้มีจำนวนใบและยอดลดลง โดยมีจำนวนยอดมากที่สุด 1.62 ± 0.04 ยอดต่อขึ้นเนื้อเยื่อ และจำนวนใบมากที่สุด 2.40 ± 0.20 ใบต่อขึ้นเนื้อเยื่อ ในสัปดาห์ที่ 1 และที่ 2 และขึ้นเนื้อเยื่อตายทั้งหมด ในสัปดาห์ที่ 7 และที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster มีการเจริญเติบโตเกิดยอดใหม่และใบใหม่ ในสัปดาห์ที่ 1 จากนั้น ขึ้นเนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโต และค่อยๆ ตายลง ขึ้นเนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโตในสัปดาห์ที่ 2 ทำให้มีจำนวนใบและยอดลดลง โดยมีจำนวนยอดมากที่สุด

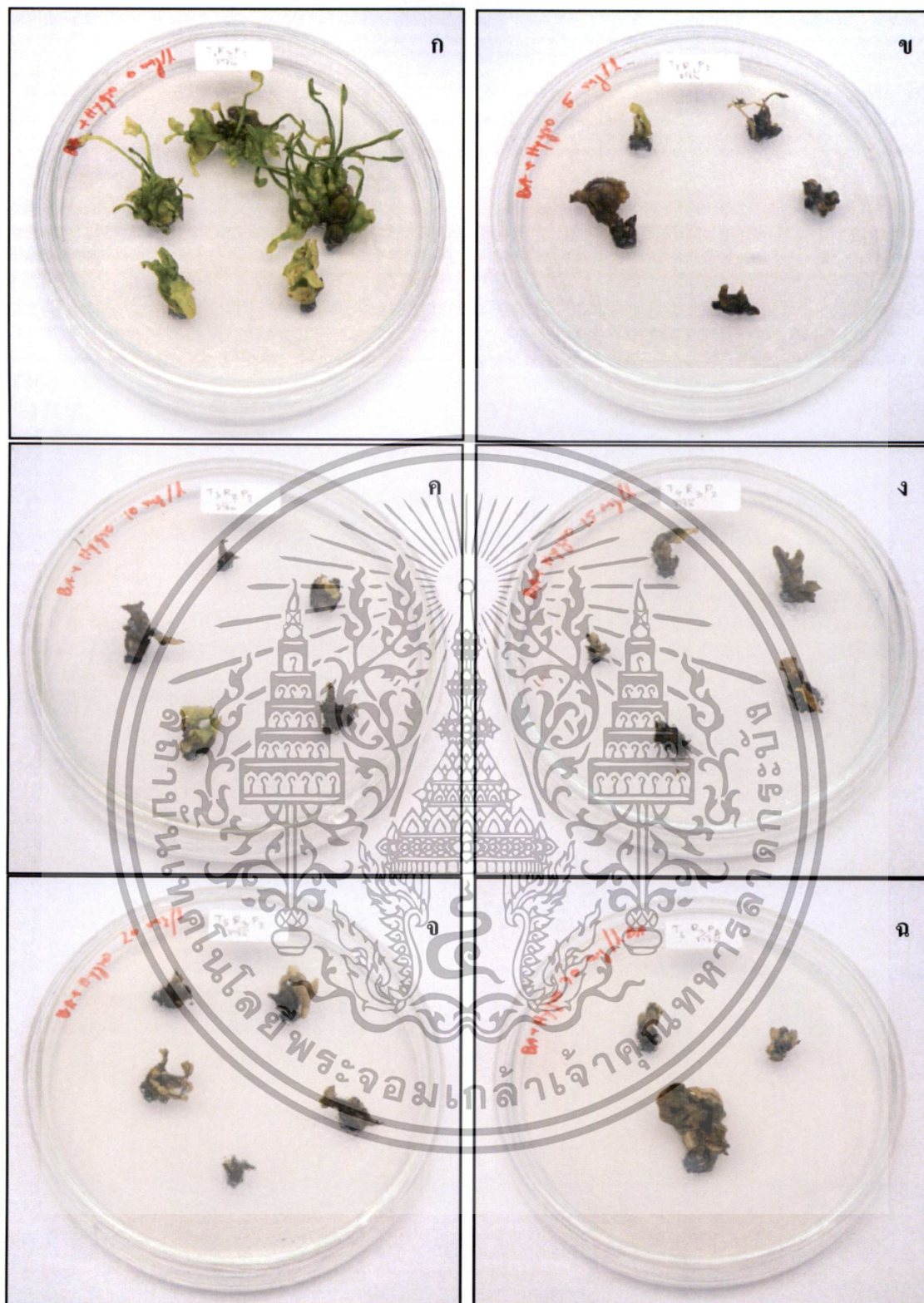
1.33±0.12 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และจำนวนใบมากที่สุด 2.93±0.31 ใบต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ในสัปดาห์ที่ 1 และที่ 2 และชิ้นเนื้อเยื่อตายทั้งหมด ในสัปดาห์ที่ 6

ในส่วนของชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินี พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster มีการเจริญเติบโตปกติ มียอดใหม่และใบใหม่เกิดขึ้นในแต่ละสัปดาห์ และในสัปดาห์ที่ 8 มีจำนวนยอดสูงที่สุด 7.13±1.51 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 4.10) และมีใบเฉลี่ยสูงที่สุด 10.27±2.20 ใบต่อชิ้นเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 4.12) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster มีการเจริญเติบโตเกิดยอดใหม่และใบใหม่ในสัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 2 จากนั้น ชิ้นเนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโต และค่อยๆ ตายลงในสัปดาห์ที่ 3 ทำให้มีจำนวนใบและยอดลดลง โดยมีจำนวนยอดมากที่สุด 2.00±0.53 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และจำนวนใบมากที่สุด 2.33±0.12 ใบต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ในสัปดาห์ที่ 2 ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster มีการเจริญเติบโตเกิดยอดใหม่และใบใหม่ ในสัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 2 จากนั้น ชิ้นเนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโต และค่อยๆ ตายลงในสัปดาห์ที่ 3 ทำให้มีจำนวนใบและยอดลดลง โดยมีจำนวนยอดมากที่สุด 1.80±0.20 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และจำนวนใบมากที่สุด 2.80±0.35 ใบต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ในสัปดาห์ที่ 2 ที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster มีการเจริญเติบโตเกิดยอดใหม่และใบใหม่ ในสัปดาห์ที่ 1 จากนั้นชิ้นเนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโตและค่อยๆ ตายลง ชิ้นเนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโต ในสัปดาห์ที่ 2 ทำให้มีจำนวนใบและยอดลดลง โดยมีจำนวนยอดมากที่สุด 2.07±0.70 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และจำนวนใบมากที่สุด 2.40±0.87 ใบต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ในสัปดาห์ที่ 2 และชิ้นเนื้อเยื่อตายทั้งหมด ในสัปดาห์ที่ 8 ที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster มีการเจริญเติบโตเกิดยอดใหม่และใบใหม่ ในสัปดาห์ที่ 1 จากนั้นชิ้นเนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโตและค่อยๆ ตายลง ชิ้นเนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโตในสัปดาห์ที่ 2 ทำให้มีจำนวนใบและยอดลดลง โดยมีจำนวนยอดมากที่สุด 1.73±0.12 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และจำนวนใบมากที่สุด 2.13±0.23 ใบต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ในสัปดาห์ที่ 1 และชิ้นเนื้อเยื่อตายทั้งหมด ในสัปดาห์ที่ 7 และที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ไม่มีการเจริญเติบโต ไม่มียอดใหม่และใบใหม่เกิดขึ้น ชิ้นเนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโตและค่อยๆ ตายลง ตั้งแต่ในสัปดาห์ที่ 2 ทำให้มีจำนวนใบและยอดลดลง โดยมีจำนวนยอดมากที่สุด 1.80±0.20 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และจำนวนใบมากที่สุด 2.13±0.31 ใบต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ในสัปดาห์ที่ 1 และชิ้นเนื้อเยื่อตายทั้งหมด ในสัปดาห์ที่ 5



ภาพที่ 4.2 ชี้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงมูตรกริก ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin ความเข้มข้นระดับต่างๆ ในสัปดาห์ ที่ 8 ; (ก) 0 มิลลิกรัมต่อลิตร, (ข) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร, (ค) 10 มิลลิกรัมต่อลิตร, (ง) 15 มิลลิกรัมต่อลิตร, (จ) 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และ (ฉ) 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 ชี้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin ความเข้มข้นระดับต่างๆ ในสัปดาห์ ที่ 8; (ก) 0 มิลลิกรัมต่อลิตร, (ข) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร, (ค) 10 มิลลิกรัมต่อลิตร, (ง) 15 มิลลิกรัมต่อลิตร, (จ) 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และ (ฉ) 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 คะแนนความสมบูรณ์ของช่อดอก shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริก ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสาร hygromycin เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ hygromycin (มิลลิกรัมต่อลิตร)	คะแนนความสมบูรณ์ของช่อดอก shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริก ในสัปดาห์ที่									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
0	6.00±0.00	6.00±0.00 ^a	6.00±0.00 ^a	6.00±0.00 ^a	6.00±0.00 ^a	6.00±0.00 ^a	6.00±0.00 ^a	6.00±0.00 ^a	6.00±0.00 ^a	6.00±0.00 ^a
5	6.00±0.00	6.00±0.00 ^a	5.53±0.23 ^{ab}	5.20±0.20 ^b	4.93±0.50 ^a	3.93±0.64 ^b	2.93±0.83 ^b	2.20±1.20 ^b	2.00±1.11 ^b	
10	6.00±0.00	5.73±0.31 ^a	5.07±0.46 ^{bc}	4.33±0.29 ^c	3.53±0.70 ^b	2.67±0.64 ^c	1.73±0.31 ^c	1.60±0.35 ^{bc}	1.53±0.23 ^{bc}	
15	6.00±0.00	5.60±0.20 ^{ab}	4.53±0.31 ^{cd}	3.47±0.42 ^d	2.53±0.64 ^c	2.20±0.53 ^c	1.47±0.12 ^{cd}	1.27±0.23 ^{bc}	1.00±0.00 ^c	
20	6.00±0.00	5.51±0.25 ^{ab}	4.44±0.14 ^d	3.13±0.23 ^{dc}	2.07±0.23 ^c	1.33±0.23 ^d	1.07±0.12 ^{cd}	1.00±0.00 ^c	1.00±0.00 ^c	
30	6.00±0.00	5.13±0.46 ^b	4.27±0.42 ^d	2.87±0.23 ^c	1.93±0.12 ^c	1.27±0.12 ^d	1.00±0.00 ^d	1.00±0.00 ^c	1.00±0.00 ^c	
F-Test	ns	*	*	**	**	**	**	**	**	
%CV	0.00	3.42	6.97	7.62	23.18	29.98	36.62	39.16	40.76	

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

* มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 4.6 คะแนนความสมบูรณ์ของชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสาร hygromycin เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ hygromycin (มิลลิกรัมต่อลิตร)	คะแนนความสมบูรณ์ของชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินี ในสัปดาห์ที่									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
0	6.00±0.00	6.00±0.00 ^a	6.00±0.00 ^a	6.00±0.00 ^a	6.00±0.00 ^a	6.00±0.00 ^a	6.00±0.00 ^a	6.00±0.00 ^a	6.00±0.00 ^a	6.00±0.00 ^a
5	6.00±0.00	5.73±0.31 ^a	5.20±0.20 ^{ab}	4.87±0.12 ^{ab}	4.13±0.42 ^b	2.87±1.17 ^b	2.27±1.36 ^b	1.93±0.95 ^b	1.93±0.95 ^b	1.93±0.95 ^b
10	6.00±0.00	5.40±0.20 ^{ab}	4.53±0.31 ^b	3.73±0.70 ^{bc}	2.80±0.53 ^c	2.20±0.35 ^{bc}	1.53±0.31 ^{bc}	1.40±0.20 ^{bc}	1.33±0.12 ^{bc}	1.33±0.12 ^{bc}
15	6.00±0.00	5.53±0.46 ^a	4.27±0.61 ^b	3.20±0.92 ^c	2.40±0.60 ^{cd}	1.60±0.20 ^{cd}	1.13±0.12 ^c	1.07±0.12 ^c	1.00±0.00 ^c	1.00±0.00 ^c
20	6.00±0.00	4.91±0.50 ^b	2.96±1.04 ^c	2.02±0.92 ^d	1.73±0.64 ^{do}	1.27±0.31 ^{cd}	1.20±0.20 ^{bc}	1.00±0.00 ^c	1.00±0.00 ^c	1.00±0.00 ^c
30	6.00±0.00	4.27±0.23 ^c	2.07±0.31 ^c	1.27±0.00 ^d	1.20±0.35 ^c	1.00±0.00 ^d	1.00±0.00 ^c	1.00±0.00 ^c	1.00±0.00 ^c	1.00±0.00 ^c
F-Test	ns	**	**	**	**	**	**	**	**	**
%CV	0.00	6.28	18.84	27.61	28.93	34.30	38.95	40.48	41.08	41.08

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

* มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 4.7 ร้อยละโดยเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณทริก ที่รอดบนอาหารคัดเลือกที่มีสาร hygromycin เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ hygromycin (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละโดยเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณทริก ที่รอดบนอาหารคัดเลือก ในสัปดาห์ที่									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
0	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
5	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	93.33±11.55 ^a	80.00±20.00 ^a	46.67±41.63 ^b	40.00±40.00 ^b	
10	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00 ^a	93.33±11.55 ^{ab}	86.67±11.55 ^a	60.00±20.00 ^{ab}	46.67±11.55 ^b	40.00±0.00 ^b	
15	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	93.33±11.55 ^a	80.00±0.00 ^{ab}	80.00±0.00 ^a	40.00±20.00 ^b	20.00±20.00 ^{bc}	0.00±0.00 ^c	
20	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	80.00±0.00 ^b	73.33±11.55 ^{ab}	26.67±11.55 ^b	6.67±11.55 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	
30	100.00±0.00	100.00±0.00	93.33±11.55	93.33±11.55 ^a	66.67±30.55 ^b	13.33±11.55 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	
F-Test	ns	ns	ns	*	*	**	**	**	**	
%CV	0.00	0.00	4.67	9.76	11.24	35.35	59.99	78.39	91.85	

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

* มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 4.8 ร้อยละ โดยเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินี ที่รอดบนอาหารคัดเลือกที่มีสาร hygromycin เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ hygromycin (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละโดยเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของหลวงราชินี ที่รอดบนอาหารคัดเลือก ในสัปดาห์ที่									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
0	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
5	100.00±0.00	100.00±0.00	93.33±11.55 ^a	93.33±11.55 ^a	80.00±0.00 ^{ab}	60.00±20.00 ^{ab}	46.67±30.55 ^b	46.67±30.55 ^b	46.67±30.55 ^b	46.67±30.55 ^b
10	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00 ^a	86.67±23.09 ^{ab}	60.00±20.00 ^{ab}	60.00±20.00 ^{ab}	26.67±11.55 ^{bc}	26.67±11.55 ^b	26.67±11.55 ^b	26.67±11.55 ^b
15	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00 ^a	80.00±34.64 ^{ab}	53.33±23.09 ^{abc}	20.00±20.00 ^{bc}	6.67±11.55 ^{cd}	6.67±11.55 ^c	6.67±11.55 ^c	0.00±0.00 ^c
20	100.00±0.00	100.00±0.00	73.33±30.55 ^{ab}	53.33±46.19 ^{ab}	33.33±30.55 ^{bc}	26.67±30.55 ^c	20.00±20.00 ^{bc}	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
30	100.00±0.00	100.00±0.00	53.33±11.55 ^b	26.67±30.55 ^b	20.00±34.64 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
F-Test	ns	ns	*	*	*	**	**	**	**	**
%CV	0.00	0.00	13.87	36.96	43.31	59.68	69.84	82.25	88.19	

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

* มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 4.9 จำนวนยอดเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณชกริก ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสาร hygromycin เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ hygromycin (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณชกริก ในสัปดาห์ที่									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
0	1.40±0.00	2.07±0.31 ^a	3.20±0.80 ^a	4.73±1.10 ^a	5.33±1.36 ^a	5.87±1.72 ^a	6.80±2.23 ^a	8.60±2.95 ^a	9.47±3.52 ^a	
5	1.13±0.12	1.27±0.31 ^b	1.27±0.31 ^b	1.33±0.23 ^b	1.33±0.23 ^b	1.33±0.23 ^b	1.13±0.42 ^b	0.67±0.58 ^b	0.47±0.50 ^b	
10	1.20±0.20	1.60±0.35 ^{ab}	1.67±0.31 ^b	1.67±0.31 ^b	1.60±0.31 ^b	1.60±0.35 ^b	1.13±0.23 ^b	0.87±0.23 ^b	0.80±0.20 ^b	
15	1.13±0.12	1.47±0.42 ^b	1.47±0.42 ^b	1.33±0.42 ^b	1.33±0.42 ^b	1.07±0.23 ^b	0.60±0.35 ^b	0.27±0.23 ^b	0.00±0.00 ^b	
20	1.33±0.31	1.62±0.04 ^{ab}	1.62±0.04 ^b	1.38±0.04 ^b	1.38±0.12 ^b	1.27±0.12 ^b	0.13±0.23 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	
30	1.13±0.12	1.33±0.12 ^b	1.33±0.12 ^b	1.33±0.12 ^b	1.33±0.12 ^b	1.27±0.12 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	
F-Test	ns	ns	**	**	**	**	**	**	**	
%CV	14.73	23.09	24.35	23.25	23.72	32.73	42.14	52.57	57.70	

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

* มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 4.10 จำนวนยอดเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินี ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสาร hygromycin เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ hygromycin (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินี ในสัปดาห์ที่								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
0	1.73±0.64	2.07±0.61	2.67±0.76 ^a	3.13±1.03 ^a	3.73±0.90 ^a	4.73±1.33 ^a	5.60±1.59 ^a	6.47±2.95 ^a	7.13±1.51 ^a
5	1.80±0.53	2.00±0.53	1.80±0.87 ^{ab}	1.87±0.76 ^{abc}	1.87±0.76 ^b	1.67±0.70 ^b	1.40±0.35 ^b	1.33±0.42 ^b	1.13±0.42 ^b
10	1.60±0.20	1.80±0.20	1.80±0.20 ^{ab}	1.47±0.76 ^{abc}	0.87±0.50 ^{bcd}	0.87±0.50 ^{bc}	0.27±0.12 ^c	0.27±0.12 ^c	0.27±0.12 ^c
15	1.73±0.42	2.07±0.70	2.07±0.70 ^{ab}	1.73±0.70 ^{abc}	1.40±0.87 ^{bc}	0.47±0.31 ^c	0.07±0.12 ^c	0.07±0.12 ^c	0.00±0.00 ^c
20	1.47±0.12	1.73±0.12	1.20±0.35 ^{bc}	0.84±0.74 ^{bc}	0.40±0.40 ^{cd}	0.33±0.42 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
30	1.80±0.20	1.80±0.20	0.73±0.42 ^c	0.27±0.31 ^c	0.20±0.35 ^d	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
F-Test	ns	ns	*	*	**	**	**	**	**
%CV	21.19	21.30	15.26	23.75	27.45	34.25	41.70	46.68	49.22

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

* มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 4.11 จำนวนใบเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริก ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสาร hygromycin เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ hygromycin (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนใบเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริก ในสัปดาห์ที่								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
0	2.67±0.12	3.47±0.31 ^a	4.27±0.58 ^a	5.07±1.14 ^a	6.07±1.72 ^a	6.93±1.81 ^a	7.06±1.78 ^a	8.73±1.55 ^a	9.20±1.93 ^a
5	2.73±0.31	2.87±0.31 ^{ab}	2.93±0.23 ^{bc}	3.07±0.46 ^b	3.07±0.46 ^b	2.87±0.70 ^b	2.40±0.69 ^b	1.53±1.41 ^b	1.33±1.40 ^b
10	2.60±0.87	2.80±0.53 ^b	2.80±0.53 ^{bc}	2.80±0.53 ^b	2.60±0.53 ^b	2.47±0.70 ^b	1.80±0.87 ^b	1.33±0.76 ^b	1.07±0.31 ^{bc}
15	2.53±0.50	3.00±0.20 ^{ab}	3.13±0.12 ^b	3.07±0.12 ^b	2.67±0.31 ^b	2.67±0.31 ^b	1.33±0.61 ^b	0.67±0.61 ^{bc}	0.00±0.00 ^c
20	2.33±0.23	2.40±0.20 ^b	2.40±0.20 ^c	2.20±0.40 ^b	2.00±0.53 ^b	0.60±0.00 ^c	0.20±0.35 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
30	2.60±0.35	2.93±0.31 ^{ab}	2.93±0.31 ^{bc}	2.93±0.31 ^b	2.47±0.61 ^b	0.80±0.53 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
F-Test	ns	*	**	**	**	**	**	**	**
%CV	15.91	14.62	21.74	11.71	17.00	29.37	40.44	49.23	54.09

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

* มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 4.12 จำนวนใบเฉลี่ยของชั้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินี ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสาร hygromycin เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ hygromycin (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนใบเฉลี่ยของชั้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินี ในสัปดาห์ที่									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
0	2.40±0.35	3.13±0.31 ^a	3.93±0.31 ^a	5.00±0.40 ^a	5.73±1.72 ^a	6.67±0.23 ^a	8.27±0.81 ^a	9.47±1.75 ^a	10.27±2.20 ^a	
5	2.13±0.31	2.33±0.12 ^b	2.20±0.20 ^b	2.27±0.12 ^b	2.13±0.12 ^b	1.33±0.76 ^{bc}	1.20±0.92 ^b	1.13±0.95 ^b	1.13±0.95 ^b	
10	2.40±0.35	2.67±0.12 ^{ab}	2.80±0.35 ^b	2.40±0.92 ^b	1.93±0.81 ^b	1.93±0.80 ^b	0.73±0.42 ^{bc}	0.73±0.42 ^{bc}	0.73±0.42 ^{bc}	
15	2.07±0.31	2.40±0.87 ^{ab}	2.40±0.87 ^b	2.07±1.22 ^b	2.07±1.22 ^b	0.87±0.50 ^{cd}	0.13±0.23 ^{cd}	0.13±0.23 ^c	0.00±0.00 ^c	
20	1.87±0.31	2.13±0.23 ^b	2.13±0.23 ^b	1.73±0.23 ^b	1.60±0.00 ^b	0.47±0.31 ^{dc}	0.13±0.23 ^{cd}	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	
30	2.07±0.23	2.13±0.31 ^b	1.13±0.23 ^c	0.67±0.70 ^c	0.47±0.81 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	
F-Test	ns	*	**	**	**	**	**	**	**	
%CV	15.11	20.23	13.75	22.35	26.51	37.93	50.10	54.75	57.78	

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

* มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

4.3 ผลการศึกษาการโคลนยีน *CHS* แบบเต็มเส้นจาก genomic DNA และ cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยเทคนิค PCR

ผลการโคลนยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ DNA ต้นแบบเป็น genomic DNA และ cDNA ที่สกัดได้จากกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกสีขาวและกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู ได้ผลการศึกษา ดังนี้

4.3.1 ผลการโคลนยีน *CHS* แบบเต็มเส้นจาก genomic DNA และ cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและหลวงสัตตบงกช

โคลนยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ DNA ต้นแบบเป็น genomic DNA และ cDNA ที่สกัดได้จากกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกสีขาว และกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช กลีบดอกสีชมพู และใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากยีน *CHSF* ที่โคลนจาก cDNA ของ *Nelumbo nucifera* (accession no. FJ999632) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ *CHSF*_forward primer และ *CHSF*_reverse primer ได้ผลผลิต PCR ของยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ที่โคลนจาก genomic DNA ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกชขนาดใกล้เคียงกัน คือ ขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส (ภาพที่ 4.4 ก และ ค) และได้ผลผลิต PCR ของยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ที่โคลนจาก cDNA ที่สังเคราะห์จาก RNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกสีขาว และกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชกลีบดอกสีชมพูขนาดใกล้เคียงกัน คือ ขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส (ภาพที่ 4.4 ข และ ง)



ภาพที่ 4.4 ผลผลิต PCR ของยีน *CHS* แบบเต็มเส้น; (ก) ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของบัวหลวงบุณฑริก ขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส, (ข) ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของบัวหลวงบุณฑริก ขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส, (ค) ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของบัวหลวงสัตตบงกช ขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส และ (ง) ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของบัวหลวงสัตตบงกช ขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส (M = 1 kb DNA marker) ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA และ cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) พบว่า ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช มีขนาดเท่ากัน คือ 1,599 คู่เบส และเมื่อนำนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีนด้วยโปรแกรม GENSCAN เพื่อตรวจหาตำแหน่ง exon และ intron และลำดับกรดอะมิโนที่เป็นไปได้ พบว่า ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก มีส่วนของ exon 2 ขึ้น ขนาด 178 คู่เบส (ตั้งแต่ตำแหน่งลำดับที่ 1 ถึง 178) และ 992 คู่เบส (ตั้งแต่ตำแหน่งลำดับที่ 608 ถึง 1,599) และมีส่วนของ intron 1 ขึ้น ขนาด 429 คู่เบส (ตั้งแต่ตำแหน่งลำดับที่ 179 ถึง 607) มีส่วนที่เป็นรหัสของกรดอะมิโนขนาด 1,167 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 389 กรดอะมิโน ส่วนยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช มีส่วนของ exon 2 ขึ้น ขนาด 178 คู่ (ตั้งแต่ตำแหน่งลำดับที่ 1 ถึง 178) และ 992 คู่เบส (ตั้งแต่ตำแหน่งลำดับที่ 608 ถึง 1,599) และมีส่วนของ intron 1 ขึ้น ขนาด 429 คู่เบส (ตั้งแต่ตำแหน่งลำดับที่ 179 ถึง 607) มีส่วนที่เป็นรหัสของกรดอะมิโนขนาด 1,167 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 389 กรดอะมิโน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนของยีนด้วยวิธี ClustalW multiple alignment พบว่า ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช พบว่า มีความเหมือนกันมากกว่าร้อยละ 99 ในระดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 4.5)

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช มาวิเคราะห์ด้วย โปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) พบว่า ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช มีขนาดเท่ากัน คือ 1,170 คู่เบส และเมื่อนำนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีนด้วยโปรแกรม GENSCAN พบว่า ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก มีส่วนของยีน *CHS* ขนาด 1,170 คู่เบส มีส่วนที่เป็นรหัสของกรดอะมิโนขนาด 1,167 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 389 กรดอะมิโน ส่วนยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช มีส่วนของยีน *CHS* ขนาด 1,170 คู่เบส มีส่วนที่เป็นรหัสของกรดอะมิโนขนาด 1,167 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 389 กรดอะมิโน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนของยีนด้วยวิธี ClustalW multiple alignment พบว่า ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช พบว่า มีความเหมือนกันมากกว่าร้อยละ 99 ในระดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 4.6) และมีความเหมือนกันร้อยละ 99 ในระดับกรดอะมิโน (ภาพที่ 4.7)

4.3.3 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* แบบเต็ม เส้น ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช กับพืช อื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช มาเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) กับยีน *CHS* ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank ด้วยโปรแกรม Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่า ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก มีความเหมือนมากที่สุด กับยีน *chalcone synthase (CHSB)* ของ *N. nucifera* (accession no. FJ999628) มีความเหมือนร้อยละ 98 และยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช มีความเหมือนมากที่สุด กับยีน *chalcone synthase (CHSD)* ของ *N. nucifera* (accession no. FJ999630) มีความเหมือนร้อยละ 98

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงทั้งสองชนิดกับยีน *CHS* ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank พบว่า มีความเหมือนกันประมาณร้อยละ 79 - 83 ตัวอย่างเช่น *Juglans nigra x Juglans regia* (วอลนัท) (accession no. X94995) ร้อยละ 83, *Casuarina glauca* (swamp oak) (accession no. AB694902) ร้อยละ 82, *Vaccinium ashei* (บลูเบอร์รี่) (accession no. AB694902) ร้อยละ 82, *Vitis vinifera* cv. Deying 84-1 (องุ่นทำไวน์) (accession no. JF808008) ร้อยละ 82, *Rhododendron simsii* (กุหลาบพันปี) (accession no. AJ413277) ร้อยละ 82, *Theobroma cacao* (โกโก้) (accession no. XM007034380) ร้อยละ 82, *Lonicera japonica* (สายน้ำผึ้ง) (accession no. JQ627646) ร้อยละ 82, *Camellia japonica* (ดอกคามิเลียญี่ปุ่น) (accession no. AB512766) ร้อยละ 80, *Camellia sinensis* cv. Longjing43 (ชาจีน) (accession no. KC357705) ร้อยละ 80, *Gossypium hirsutum* (ฝ้าย) (accession no. JF795275) ร้อยละ 80, *Actinidia chinensis* (กีวี) (accession no. KF157394) ร้อยละ 80, *Rosa chinensis* cv. Xing-xing-hei (กุหลาบพันธุ์จีน) (accession no. HQ423171) ร้อยละ 80, *Humulus lupulus* (ต้นฮอป) (accession no. AM263200) ร้อยละ 80, *Prunus avium* (เชอร์รี่) (accession no. GU990524) ร้อยละ 80, *Anthurium andraeanum* (ดอกหน้าวัว) (accession no. AY232492) ร้อยละ 80, *Rubus idaeus* (แรสเบอร์รี่) (accession no. AF400565) ร้อยละ 80, *Malus x domestica* (แอปเปิลกาลี) (accession no. DQ026297) ร้อยละ 80, *Prunus persica* (ต้นพีช) (accession no. HM543568) ร้อยละ 79, *Fragaria x ananassa* (สตรอเบอร์รี่) (accession no. AB201756) ร้อยละ 79 และ *Pyrus pyrifolia* cv Yanshan Red (สาเก) (accession no. JQ060997) ร้อยละ 79 เป็นต้น

4.3.4 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* แบบเต็มเส้นที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช กับพืชอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช มาเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก มีความเหมือนมากที่สุด กับเอนไซม์ *chalcone synthase (CHS)* ของ *N. nucifera* (accession no. ADD74169) มีความเหมือนร้อยละ 99 และลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช มีความเหมือนมากที่สุด กับเอนไซม์ *chalcone synthase (CHS)* ของ *N. nucifera* (accession no. ADD74169) มีความเหมือนร้อยละ 99 ลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงทั้งสองชนิด มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank ประมาณร้อยละ 95 - 86 (ตารางที่ 4.13) ตัวอย่างเช่น *Juglans nigra x Juglans regia* (วอลนัท) (accession no. CAA64452) ร้อยละ 95, *Gossypium hirsutum* (ฝ้าย) (accession no. ABS52573) ร้อยละ 93, *Theobroma cacao* (โกโก้) (accession no. XP007034442) ร้อยละ 93, *Abelmoschus manihot* (ปอแก้ว) (accession no. ACE60221) ร้อยละ 93, *Camellia sinensis* (ชาจีน) (accession no. P48386) ร้อยละ 93, *Camellia japonica* (ดอกคามิเลียญี่ปุ่น) (accession no. BAI66465) ร้อยละ 93, *Actinidia chinensis* (กีวี) (accession no. AGV53049) ร้อยละ 93, *Rhododendron simsii* (กุหลาบพันปี) (accession no. CAC88858) ร้อยละ 93, *Vitis vinifera* (องุ่นทำไวน์) (accession no. AEP17003) ร้อยละ 92, *Clitoria ternatea* (อัญชัน) (accession no. BAF49290) ร้อยละ 92, *Morus notabilis* (ต้นหม่อน) (accession no. EXB76929) ร้อยละ 91, *Prunus avium* (เชอร์รี่) (accession no. ADZ54780) ร้อยละ 91, *Malus domestica* (แอปเปิล) (accession no. AAY45748) ร้อยละ 91, *Senna alata* (ชุมเห็ดเทศ) (accession no. AAM00231) ร้อยละ 91, *Lonicera japonica* (สายน้ำผึ้ง) (accession no. AFJ44312) ร้อยละ 91, *Vaccinium ashei* (บลูเบอร์รี่) (accession no. BAO58433) ร้อยละ 91, *Hypericum hookerianum* (ต้นบัวทอง) (accession no. ABM63466) ร้อยละ 90, *Fragaria x ananassa* (สตรอเบอร์รี่) (accession no. BAE17124) ร้อยละ 90, *Humulus lupulus* (ต้นฮอป) (accession no. CAK19318) ร้อยละ 90, *Pyrus pyrifolia* (สาเก) (accession no. AFH68066) ร้อยละ 90, *Rosa chinensis* (กุหลาบ) (accession no. AEC13058) ร้อยละ 90, *Petunia x hybrida* (พิทูเนีย) (accession no. BAM17286) ร้อยละ 90, *Solanum lycopersicum* (มะเขือเทศ) (accession no. NP001234036) ร้อยละ 89 และ *Melastoma malabathricum* (ต้นโคลงเคลง) (accession no. NP001234036) ร้อยละ 89 เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการของมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.5 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* พี่อื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* พี่อื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank ด้วยโปรแกรม MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) โดยเลือกวิธีการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี Minimum evolution method และใช้วิธีการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Bootstrap test โดยใช้จำนวนรอบ 500 รอบ โดยเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* พี่อื่น ได้แก่ *N. nucifera* (accession no. ADD74169), *Juglans nigra* x *Juglans regia* (วอลนัท) (accession no. CAA64452), *Abelmoschus manihot* (ปอแก้ว) (accession no. ACE60221), *Gossypium hirsutum* (ฝ้าย) (accession no. ABS52573), *Theobroma cacao* (โกโก้) (accession no. XP0070344 42), *Actinidia chinensis* (กีวี) (accession no. AGV53049), *Humulus lupulus* (ต้นฮ็อปป) (accession no. CAK19318), *Vitis vinifera* (องุ่นทำไวน์) (accession no. AEP17003), *Camellia japonica* (ดอกคามิเลียญี่ปุ่น) (accession no. BAI66465), *Camellia sinensis* (ชาจีน) (accession no. P48386), *Rhododendron simsii* (กุหลาบพันปี) (accession no. CAC88858), *Vaccinium ashei* (บลูเบอร์รี่) (accession no. BAO58433), *Hypericum hookerianum* (ต้นบัวทอง) (accession no. ABM63466), *Melastoma malabathricum* (ต้นโคลงเคลง) (accession no. NP001234036), *Malus domestica* (แอปเปิล) (accession no. AAY45748), *Pyrus pyrifolia* (สาละ) (accession no. AFH68066), *Casuarina glauca* (river oak) (accession no. Q9ZRR8), *Prunus avium* (เชอร์รี่) (accession no. ADZ54780), *Fragaria x ananassa* (สตรอเบอร์รี่) (accession no. BAE17124), *Rosa chinensis* (กุหลาบ) (accession no. AEC13058), *Glycine max* (ถั่วเหลือง) (accession no. ABB30178), *Petunia x hybrida* (พิทูเนีย) (accession no. BAM17286), *Solanum tuberosum* (มันฝรั่ง) (accession no. AEN83501), *Solanum lycopersicum* (มะเขือเทศ) (accession no. NP001234036), *Anthurium andraeanum* (ดอกหน้าวัว) (accession no. AAP20864), *Dahlia pinnata* (ดอกกรักเร่) (accession no. BAJ14516), *Gentiana triflora* (ต้นเงินเทียน) (accession no. BAE45039), *Zea mays* (ข้าวโพด) (accession no. NP001149022), *Arabidopsis thaliana* (อะราบิโดอปซิส) (accession no. AAZ23741), *Antirrhinum majus* (ต้นถิ่นมังกร) (accession no. BAE80511) และ *Phalaenopsis hybrida* (กล้วยไม้ ฟาแลนนอปซิส) (accession no. AAX54693) พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ของบัวหลวงทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแยกตัวออกมาจากพืชในกลุ่มอื่น อยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกับ *N. nucifera* (ภาพที่ 4.8) และอยู่ในกลุ่มใหญ่เดียวกับ กลุ่มไม้ยืนต้น ใบเลี้ยงคู่ เช่น *Theobroma cacao* (โกโก้), *Camellia sinensis* (ชาจีน) และ *Malus domestica* (แอปเปิล) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

gCHSF_BUN	ATGGTGACCG	TGGAAGACAT	CCGCAAGGCA	CAGAGGGCTG	AAGGCCCGGC	CACGGTGATG	60
gCHSF_SAT	60
gCHSF_BUN	GCCATTGGAA	CAGCCAATCC	GCCCAACTGT	GTCGACCAGA	GCACATACCC	CGACTACTAC	120
gCHSF_SAT	120
gCHSF_BUN	TTCCGGATCA	CCAACAGCGA	GCACAAGACA	GAGCTCAAAG	AGAAGTCAA	GCGCATGTGT	180
gCHSF_SAT	180
gCHSF_BUN	AAGTATCAGT	GTATCACTGA	TCACTGTCSA	GTCGATTGGC	AACCGGCAGT	CGATCGGAAG	240
gCHSF_SATG.....	240
gCHSF_BUN	ACATTGTCCC	TGGGTCATGG	CATCTGTCTA	TTTGTAGTGA	ATTGATCAAA	ACAAACACAG	300
gCHSF_SAT	300
gCHSF_BUN	ATATTGAGCT	TTAGCTTATT	TAGAGGGATT	TGAAC TTGA	AGTATGATCA	TATCATACAT	360
gCHSF_SAT	360
gCHSF_BUN	ATAGAGAGTT	TCTTTAGCTA	AAGTGTTTGA	ATATTAGTTC	ATTGTTAGAT	TTTTTTTTTT	420
gCHSF_SAT	420
gCHSF_BUN	TTACCCAGT	TTTGGGTGAA	TTTATTGATC	CATGGCCAAG	ACAAATAGAC	CTGGCCAGAA	480
gCHSF_SATT.....	480
gCHSF_BUN	GTAGAAAGAC	TTTAGGAATT	GAGTAGACTC	ATCATCCGGA	TGACTCAACG	ATCCGGCTGA	540
gCHSF_SAT	540
gCHSF_BUN	GTTAGACACA	TTAACCCAAC	TTAATTTGTT	TCTCTCAAGA	CTCTTAACAA	CTTTGATGTG	600
gCHSF_SAT	600
gCHSF_BUN	CATTTCAGGC	GAGAAATCAA	TGATCAAGAA	GCGCTACATG	CACTTGACCG	AGGAGATCTT	660
gCHSF_SAT	660
gCHSF_BUN	GAAGGAGAAC	CCAAACATCT	GTGAGTACAT	GGCTTCCTCG	CTGGATGCTA	GACAGGACAT	720
gCHSF_SAT	720
gCHSF_BUN	GGTGGTGGTT	GAGGTGCCAA	AACTGGGCAA	GGAGGCTGCC	ACGAAGGCCA	TTAAGGAATG	780
gCHSF_SATG.....	780
gCHSF_BUN	GGGACAGCCC	AAGTCCAAGA	TCACCCACCT	TGCTTCTGTC	ACCACCAGTG	GCGTCGACAT	840
gCHSF_SAT	840
gCHSF_BUN	GCCCCGGGCT	GACTACCAGC	TCACCAAGCT	CCTCGGCCCT	CGCCCCCTCG	TCAAGAGACT	900
gCHSF_SAT	900
gCHSF_BUN	CATGATGTAC	CAACAAGGAT	GCTTCGCCGG	AGGCACAGTC	CTTCGCCTGG	CCAAGGACCT	960
gCHSF_SAT	960
gCHSF_BUN	TGCAGAGAAC	AACAGAGGCG	CCCGTGCCTT	TGTCGTCTGC	TCAGAGCTCA	CTGCTGTTAC	1020
gCHSF_SAT	1020
gCHSF_BUN	CTTCCGTGGT	CCAAGTGATA	CCCACCTCGA	CAGTCTGTGA	GGCCAGGCAC	TCTTCGGGGA	1080
gCHSF_SAT	1080
gCHSF_BUN	TGGAGCAGCC	GCAGTTATTC	TGGGTGCAGA	CCCGTGCCTC	GGTGTAGAAA	AGCCTTTGTT	1140
gCHSF_SAT	1140
gCHSF_BUN	TGAGTTGGTG	TCGGCAGCCC	AGACAATTCT	CCCAGACAGC	CATGGCGCCA	TTGACGGGCA	1200
gCHSF_SAT	1200
gCHSF_BUN	CCTGAGAGAG	GTTGGACTTA	CCTTCCACCT	GCTCAAGGAT	GTGCCCGGGC	TCATCTCAAA	1260
gCHSF_SAT	1260
gCHSF_BUN	GAACATCGAG	AAGAGCCTGG	TGGAGGCATT	CCAGCCTCTG	GGCATCTCCG	ACTGGAATC	1320
gCHSF_SAT	1320
gCHSF_BUN	AATTTTCTGG	ATCGCCACC	CTGGTGGTCC	AGCCATCCTA	GACCAAGTGG	AAGAAAAGCT	1380
gCHSF_SAT	1380
gCHSF_BUN	GGCCCTAAG	CCCAGAAAGC	TAAGGCCAC	ACGACACATC	CTGAGCGAGT	ATGGAAACAT	1440
gCHSF_SAT	1440
gCHSF_BUN	GTCAAGTGCT	TGTGTGCTGT	TCATATTGGA	TGAGATGCGG	AAGAAGTCGA	TTGAGGATGG	1500
gCHSF_SAT	1500
gCHSF_BUN	CCTCAAGACC	ACTGGAGAAG	GGCTCGAGTG	GGGTGTGCTG	TTTGGGTTTG	GACCAGGGCT	1560
gCHSF_SAT	1560
gCHSF_BUN	CACCGTTGAG	ACTGTGGTGC	TTCACAGTAT	CGCTGCCTAG	1599		
gCHSF_SAT	A.....	1599		

ภาพที่ 4.5 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก (gCHSF_BUN) และบัวหลวงสัตตบงกช (gCHSF_SAT) ด้วยโปรแกรม ClustalW multiple alignment (ตัวอักษรที่บ แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ start codon (ATG) และ stop codon (TAG) ของยีน, ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง intron แสดงเป็น

ตัวอักษรขีดเส้นใต้ และเครื่องหมาย * แสดงความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่ง) การค้นคว้า
 ไม่ว่าการณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cCHSF_BUN	<u>ATGGTGACCG</u>	TGGAAGACAT	CCGCAAGGCA	CAGAGGGCTG	AAGGCCCGGC	CACGGTGATG	60
cCHSF_SAT	60
cCHSF_BUN	GCCATGGAA	CAGCCAATCC	GCCCAACTGT	GTCGACCAGA	GCACATACCC	CGACTACTAC	120
cCHSF_SAT	120
cCHSF_BUN	TTCCGGATCA	CCAACAGCGA	GCACAAGACA	GAGCTCAAAG	AGAAGTTCAA	GCGCATGTGC	180
cCHSF_SAT	180
cCHSF_BUN	GAGAAATCAA	TGATCAAGAA	GCGCTACATG	CACTTGACCG	AGGAGATCTT	GAAGGAGAAC	240
cCHSF_SAT	240
cCHSF_BUN	CCAAACATCT	GTGAGTACAT	GGCTTCCTCG	CTGGATGCTA	GACAGGACAT	GGTGGTGGTT	300
cCHSF_SAT	300
cCHSF_BUN	GAGGTGCCAA	AACTGGGCAA	GGAGGCTGCG	ACGAAGGCCA	TTAAGGAATG	GGGACAGCCC	360
cCHSF_SAT	360
cCHSF_BUN	AAGTCCAAGA	TCACCCACCT	TGTCTTCTGC	ACCACCAGTG	GCGTCGACAT	GCCCGGGGCT	420
cCHSF_SAT	420
cCHSF_BUN	GACTACCAGC	TCACCAAGCT	CCTCGGCCTT	CGCCCCTCCG	TCAAGAGACT	CATGATGTAC	480
cCHSF_SAT	480
cCHSF_BUN	CAACAAGGAT	GCTTCGCCGG	AGGCACAGTC	CTTCGCCTGG	CCAAGGACCT	TGCAGAGAAC	540
cCHSF_SAT	540
cCHSF_BUN	AACAGAGGCG	CCCCTGTCC	TGTCGTCTGC	TCAGAGCTCA	CTGCTGTTAC	CTTCCGTGGT	600
cCHSF_SAT	600
cCHSF_BUN	CCAAGTGATA	CCCACCTCGA	CAGTCTTGTA	GGCCAGGCAC	TCTTCGGGGA	TGGAGCAGCC	660
cCHSF_SAT	660
cCHSF_BUN	GCAGTTATTG	TGGGTGCAGA	CCCGGTGCC	GGTGTAGAAA	AGCCTTTGTT	TGAGTTGGTG	720
cCHSF_SATT.....	720
cCHSF_BUN	TCGGCAGCCC	AGACAATTCT	CCCAGACAGC	CATGGCGCCA	TTGACGGGCA	CCTGAGAGAG	780
cCHSF_SAT	780
cCHSF_BUN	GTTGGACTTA	CCTTCCACCT	GCTCAAGGAT	GTGCCCGGGC	TCATCTCAA	GAACATCGAG	840
cCHSF_SAT	840
cCHSF_BUN	AAGAGCCTGG	TGGAGGCATT	CCAGCCTCTG	GGCATCTCCG	ACTGGAATC	AATTTTCTGG	900
cCHSF_SAT	900
cCHSF_BUN	ATCGCCACC	CTGGTGGTCC	AGCCATCCTA	GACCAAGTGG	AAGAAAAGCT	GGCCCTTAAG	960
cCHSF_SAT	960
cCHSF_BUN	CCCGAGAAGC	TAAGCGCCAC	ACGACACATC	CTGAGCGACT	ATGGAAACAT	GTCAAGTGCT	1020
cCHSF_SAT	1020
cCHSF_BUN	TGTGTGCTGT	TCATATTGGA	TGAGATGCGG	AAGAAGTCGA	TTGAGGATGG	CCTCAAGACC	1080
cCHSF_SATT.....	G.....	1080
cCHSF_BUN	ACTGGAGAAG	GGCTCGAGTG	GGGTGTGCTG	TTTGGGTTTG	GACCAGGGCT	AACCCTTGAG	1140
cCHSF_SAT	1140
cCHSF_BUN	ACTGTGGTGC	TTCACAGTAT	CGTGCCTAG	1170			
cCHSF_SAT	1170			

ภาพที่ 4.6 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงนุชนทริก (cCHSF_BUN) และบัวหลวงสัตตบงกช (cCHSF_SAT) ด้วยโปรแกรม ClustalW multiple alignment (ส่วนที่ขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ start codon (ATG) และ stop codon (TAG) ของยีน, เครื่องหมาย (.) แสดงความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่ง)

cCHSF_BUN	MVTVEDIRKA	QRAEGPATVM	AIGTANPPNC	VDQSTYPDYY	FRITNSEHKT	ELKEKFKRMC	60
cCHSF_SAT	60
cCHSF_BUN	EKSMIKKRYM	HLTEEILKEN	PNICEYMASS	LDARQDMVVV	EVPKLGKEAA	TKAIKEWQGP	120
cCHSF_SAT	120
cCHSF_BUN	KSKITHLVFC	TTSGVDMPGA	DYQLTKLLGL	RPSVKRLMMY	QQGCFAGGTV	LRLAKDLAEN	180
cCHSF_SAT	180
cCHSF_BUN	NRGARVLVVC	SELTAVTFRG	PSDTHLDSLIV	GQALFGDGAA	AVIVGADPVP	GVEKPLFELV	240
cCHSF_SAT	240
cCHSF_BUN	SAAQTILPDS	HGAIDGHLRE	VGLTFHLLKD	VPGLISKNIE	KSLVEAFQPL	GISDWNISIFW	300
cCHSF_SAT	300
cCHSF_BUN	IAHPGGPAIL	DQVEEKLALK	PEKLSATRHI	LSEYGNMSSA	CVLFILDEMR	KKSIEDGLKT	360
cCHSF_SATR.....	360
cCHSF_BUN	TGEGLEWGVV	FGFGPGLTVE	TVVLHSIAA*	389			
cCHSF_SAT*	389			

ภาพที่ 4.7 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพุทธทริก (*cCHSF_BUN*) และบัวหลวงสัตตบงกช (*cCHSF_SAT*) ด้วยโปรแกรม ClustalW multiple alignment (เครื่องหมาย * หมายถึง ไม่สามารถแปลเป็นกรดอะมิโนได้ เนื่องจากเป็น stop codon)

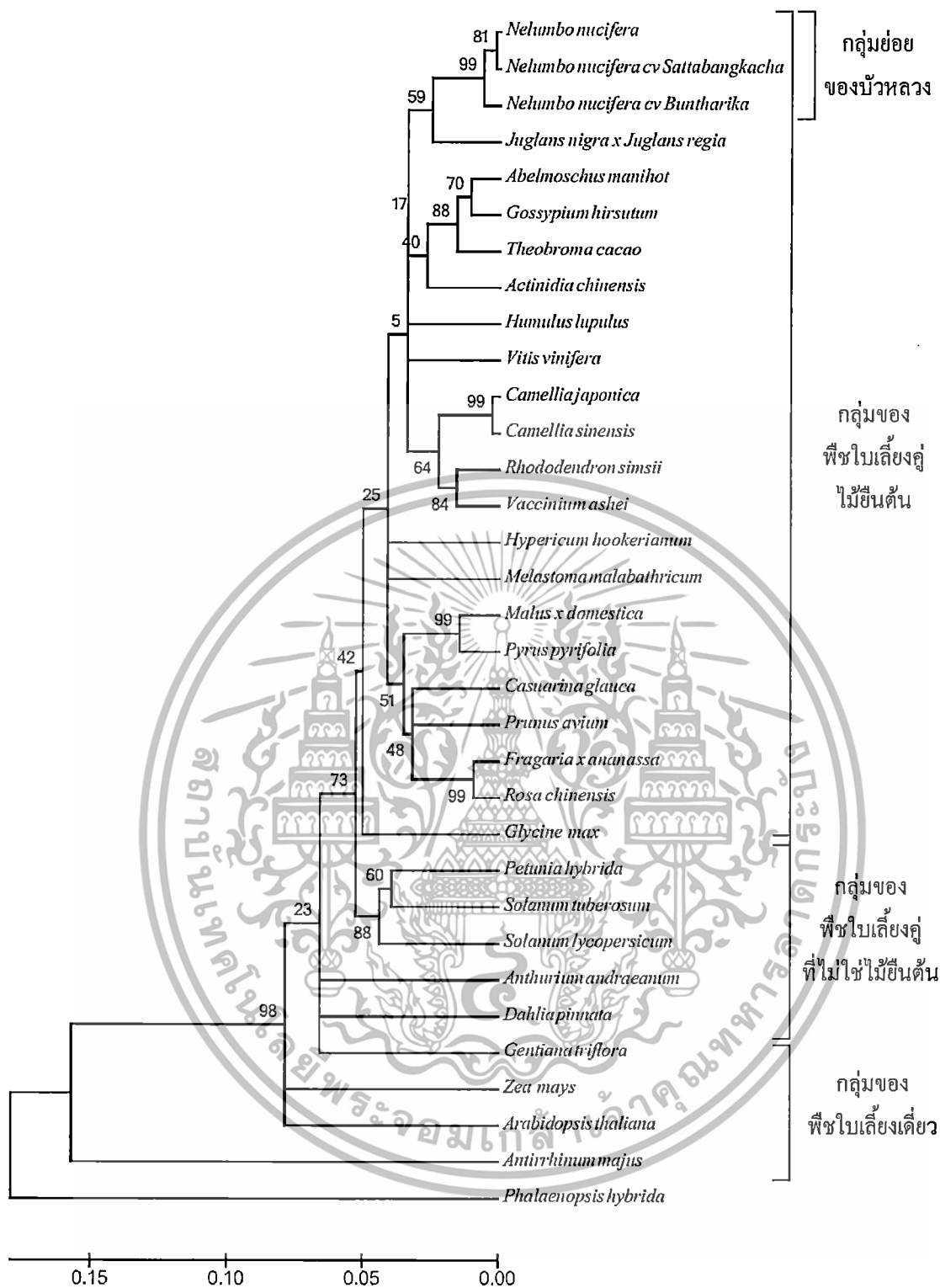


ตารางที่ 4.13 ผลการเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) ของลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX

พืช	ชื่อสามัญ	Accession no.	Enzyme name	% identity
<i>N. nucifera</i> cv. Buntharik		-	<i>chalcone synthase</i>	-
<i>N. nucifera</i> cv. Sattabangkacha		-	<i>chalcone synthase</i>	99
<i>N. nucifera</i>	บัวหลวง	ADD74169	<i>chalcone synthase</i>	98
<i>Juglans nigra x Juglans regia</i>	วอลนัท	CAA64452	<i>naringenin-chalcone synthase</i>	95
<i>Abelmoschus manihot</i>	ปอแก้ว	ACE60221	<i>chalcone synthase</i>	93
<i>Gossypium hirsutum</i>	ฝ้าย	ABS52573	<i>chalcone synthase</i>	94
<i>Theobroma cacao</i>	โกโก้	XP007034442	<i>chalcone and stilbene synthase</i>	93
<i>Actinidia chinensis</i>	กีวี	AGV53049	<i>chalcone synthase</i>	93
<i>Humulus lupulus</i>	ต้นฮ้อป	CAK19318	<i>naringenin-chalcone synthase</i>	90
<i>Vitis vinifera</i>	องุ่นทำไวน์	AEP17003	<i>chalcone synthase</i>	92
<i>Camellia sinensis</i>	ชาจีน	P48386	<i>naringenin-chalcone synthase 1</i>	93
<i>Rhododendron simsii</i>	กุหลาบพันปี	CAC88858	<i>chalcone synthase</i>	93
<i>Vaccinium ashei</i>	บลูเบอร์รี่	BAO58433	<i>chalcone synthase</i>	91
<i>Melastoma malabathricum</i>	ต้นบัวทอง	AGW24283	<i>chalcone synthase</i>	89
<i>Malus domestica</i>	แอปเปิล	AAV45748	<i>chalcone synthase</i>	91
<i>Pyrus pyrifolia</i>	สาเก	AFH68066	<i>chalcone synthase</i>	90
<i>Casuarina glauca</i>	River oak	Q9ZRR8	<i>chalcone synthase</i>	93
<i>Prunus avium</i>	เชอร์รี่	ADZ54780	<i>naringenin-chalcone synthase</i>	91
<i>Fragaria x ananassa</i>	สตอร์เบอร์รี่	BAE17124	<i>chalcone synthase</i>	90
<i>Rosa chinensis</i>	กุหลาบ	AEC13058	<i>chalcone synthase</i>	90
<i>Glycine max</i>	ถั่วเหลือง	ABB30178	<i>chalcone synthase 1</i>	90
<i>Petunia x hybrida</i>	พิทูเนีย	BAM17286	<i>chalcone synthase</i>	90
<i>Solanum lycopersicum</i>	มะเขือเทศ	NP001234036	<i>chalcone synthase 2</i>	89
<i>Solanum tuberosum</i>	มันฝรั่ง	AEN83501	<i>chalcone synthase</i>	89
<i>Anthurium andraeanum</i>	ดอกหน้าวัว	AAP20864	<i>chalcone synthase</i>	90
<i>Dahlia pinnata</i>	ดอกกรักร์	BAJ14516	<i>chalcone synthase</i>	89
<i>Gentiana triflora</i>	ต้นเจียนเทียน	BAE45039	<i>chalcone synthase</i>	88
<i>Zea mays</i>	ข้าวโพด	NP001149022	<i>chalcone synthase</i>	86
<i>Arabidopsis thaliana</i>	อร่าบิโดปซิส	AAZ23741	<i>chalcone synthase</i>	85
<i>Antirrhinum majus</i>	ต้นลิ้นมังกร	BAE80511	<i>chalcone synthase</i>	86
<i>Phalaenopsis hybrida</i>	กล้วยไม้	AAX54693	<i>chalcone synthase</i>	85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์ชุนทริก (*N. nucifera* cv. Buntharik) และบัวหลวงสัตตบงกช (*N. nucifera* cv. Satabangkacha) กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) ตัวเลขบนแขนง (node) แสดงเปอร์เซ็นต์ความน่าเชื่อถือจากการคำนวณด้วย Bootstrap test จำนวน 500 รอบ (สเกลแสดงระยะห่างทางพันธุกรรม 0.05 แสดงการแทนที่ของกรดอะมิโน 5 เปอร์เซ็นต์)

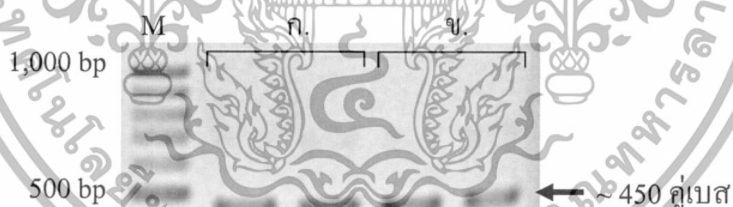
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์และดอกบัวหลวงตัดตบงกช ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

ผลการศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* กับในกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์สีขาและบัวหลวงตัดตบงกชสีชมพู และปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงในช่วงระยะของการพัฒนาของดอกบัวหลวง ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

4.4.1 ผลการโคลนบางส่วนของยีน *CHS* จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์และบัวหลวงตัดตบงกช ด้วยเทคนิค PCR

ทำการโคลนบางส่วนของยีน *CHS* จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์และบัวหลวงตัดตบงกชด้วยเทคนิค PCR โดยทำการออกแบบไพรเมอร์จากส่วนของลำดับอนุรักษ์ได้บางส่วนของยีน *CHS* ขนาดประมาณ 450 คู่เบส (ภาพที่ 4.9) จากนั้นนำผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้นำไปเชื่อมต่อกับโคลนนิ่งเวกเตอร์ pTZ57R/T จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า บางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์และบัวหลวงตัดตบงกช มีขนาดเท่ากัน คือ 458 คู่เบส (ภาพที่ 4.10) บางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้นำไปใช้ในการสร้างพลาสมิดในการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense และใช้ศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวง



ภาพที่ 4.9 ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก; (ก.) cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์ ขนาดประมาณ 450 คู่เบส และ (ข.) cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงตัดตบงกช ขนาดประมาณ 450 คู่เบส (M = 100 bp DNA marker)

CHSF_BUN	ATGGTGACCG	TGGAAGACAT	CCGCAAGGCA	CAGAGGGCTG	AAGGCCCGGC	CACGGTGATG	GCCATTGGAA	70
CHSA_BUN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
CHSA_SAT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
CHSF_BUN	CAGCCAATCC	GCCCAACTGT	GTGACACCAGA	GCACATACCC	TGACTACTAC	TCCCGGATCA	CCAACAGCGA	140
CHSA_BUN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
CHSA_SAT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
CHSF_BUN	GCACAAGACA	GAGCTTAAAG	AGAAATCCAA	GCGCATGTGC	GAGAAATCGA	TGATCAAGAA	GCGCTACATG	210
CHSA_BUN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
CHSA_SAT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
CHSF_BUN	CACTTGACGG	AGGAAATCTT	GAAGGAGAAC	CCGAACGCCT	GTGCGTACAT	GGCGCCCTCG	CTGGATGCTA	280
CHSA_BUN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
CHSA_SAT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
CHSF_BUN	GACAGGACAT	GGTGGTGGTT	GAGGTGCCAA	AACTGGGCAA	GGAGGCTGCG	ACGAGGCCA	TTAAGGAATG	350
CHSA_BUN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
CHSA_SAT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
CHSF_BUN	GGGACAGCCC	AAGTCCAAGA	TCACCCACCT	TGTCTTCTGC	ACCACCAGTG	GCGTCGACAT	GCCCAGGGCC	420
CHSA_BUN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
CHSA_SAT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
CHSF_BUN	GACTACCAGC	TCACCAAGCT	CCTCGGCCTT	CGCCCTCCG	TCAAGAGACT	CATGATGTAC	CAACAAGGAT	490
CHSA_BUN	-----	-----	-----	A AGAGCTCCCG	TCAAGAGACT	CATGATGTAC	CAACAAGGAT	41
CHSA_SAT	-----	-----	-----	A AGAGCTCCCG	TCAAGAGACT	CATGATGTAC	CAACAAGGAT	41
CHSF_BUN	GCTTCGCCGG	AGGCACAGTC	CTTCGCCTGG	CCAAGGACCT	TGCAGAGAAC	AACAGAGGCG	CCCGTGTCTT	560
CHSA_BUN	GCTTCGCCGG	AGGCACAGTC	CTTCGCCTGG	CCAAGGACCT	TGCAGAGAAC	AACAGAGGCG	CCCGTGTCTT	111
CHSA_SAT	GCTTCGCCGG	AGGCACAGTC	CTTCGCCTGG	CCAAGGACCT	TGCAGAGAAC	AACAGAGGCG	CCCGTGTCTT	111
CHSF_BUN	TGTCGTCTGC	TCAGAGCTCA	CTGCTGTTAC	CTTCGGTGGC	CCAAGTGACA	CCCACCTCGA	CAGCCTTGTA	630
CHSA_BUN	TGTCGTCTGC	TCAGAGCTCA	CTGCTGTTAC	CTTCGGTGGT	CCAAGTGATA	CCCACCTCGA	CAGCCTTGTA	181
CHSA_SAT	TGTCGTCTGC	TCAGAGCTCA	CTGCTGTTAC	CTTCGGTGGT	CCAAGTGATA	CCCACCTCGA	CAGCCTTGTA	181
CHSF_BUN	GGCCAGGCAC	TCTTCGGGGA	TGGAGCAGCC	GCAGTTATTG	TGGGTGCAGA	CCCGGTGCCC	GGTGTAGAAA	700
CHSA_BUN	GGCCAGGCAC	TCTTCGGGGA	TGGAGCAGCC	GCAGTTATTG	TGGGTGCAGA	CCCGGTGCCC	GGTGTAGAAA	251
CHSA_SAT	GGCCAGGCAC	TCTTCGGGGA	TGGAGCAGCC	GCAGTTATTG	TGGGTGCAGA	CCCGGTGCCC	GGTGTAGAAA	251
CHSF_BUN	AGCCTTTGTT	TGAGTTGGTG	TCGGCAGCCC	AGACAATTCT	CCCAGACAGC	CATGGGCGCA	TTGACGGGCA	770
CHSA_BUN	AGCCTTTGTT	TGAGTTGGTG	TCGGCAGCCC	AGACAATTCT	CCCAGACAGC	CATGGGCGCA	TTGACGGGCA	319
CHSA_SAT	AGCCTTTGTT	TGAGTTGGTG	TCGGCAGCCC	AGACAATTCT	CCCAGACAGC	CATGGGCGCA	TTGACGGGCA	319
CHSF_BUN	CCTGAGACAG	GTTCGACTTA	CCTTCCACCT	GCTCAAGGAT	GTGCCCGGGC	TCATCTOAAA	GAACATCGAG	840
CHSA_BUN	CCTGAGACAG	GTTCGACTTA	CCTTCCACCT	GCTCAAGGAT	GTGCCCGGGC	TCATCTOAAA	GAACATCGAG	391
CHSA_SAT	CCTGAGACAG	GTTCGACTTA	CCTTCCACCT	GCTCAAGGAT	GTGCCCGGGC	TCATCTOAAA	GAACATCGAG	391
CHSF_BUN	AAGAGCCTGG	TGGAGGCATT	CCAGCCTCTG	GGCATCTCCG	ACTGGAATC	AATTTTCTGG	ATCGCCGACC	910
CHSA_BUN	AAGAGCCTGG	TGGAGGCATT	CCAGCCTCTG	GGCATCTCCG	ACTGGAATC	AATTTTCTGG	GATCCTT---	458
CHSA_SAT	AAGAGCCTGG	TGGAGGCATT	CCAGCCTCTG	GGCATCTCCG	ACTGGAATC	AATTTTCTGG	GATCCTT---	458
CHSF_BUN	CTGGTGGTCC	AGCOATCCTA	GACCAAGTGG	AAGAAAAGCT	GGCCCTTAAG	CCCGAGAAGC	TAAGCGCCAC	980
CHSA_BUN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	458
CHSA_SAT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	458
CHSF_BUN	ACGACACATC	CTGAGCGAGT	ATGCAAAAGT	GTCAGTGGT	TGTTGTCTCT	TCATATTGGA	TGAGATCGGG	1050
CHSA_BUN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	458
CHSA_SAT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	458
CHSF_BUN	AAGAAGTCGA	TTGAGACCG	CCTCAAGACC	ACTGAGAAAG	GGCTCGAATG	GGGTGTCTG	TTTGGTTTCG	1120
CHSA_BUN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	458
CHSA_SAT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	458
CHSF_BUN	GACCAGGGCT	AACAGTTGAG	ACTGTGGTGC	TTCACAGTAT	GCOTGCCTAG	1170		
CHSA_BUN	-----	-----	-----	-----	-----	458		
CHSA_SAT	-----	-----	-----	-----	-----	458		

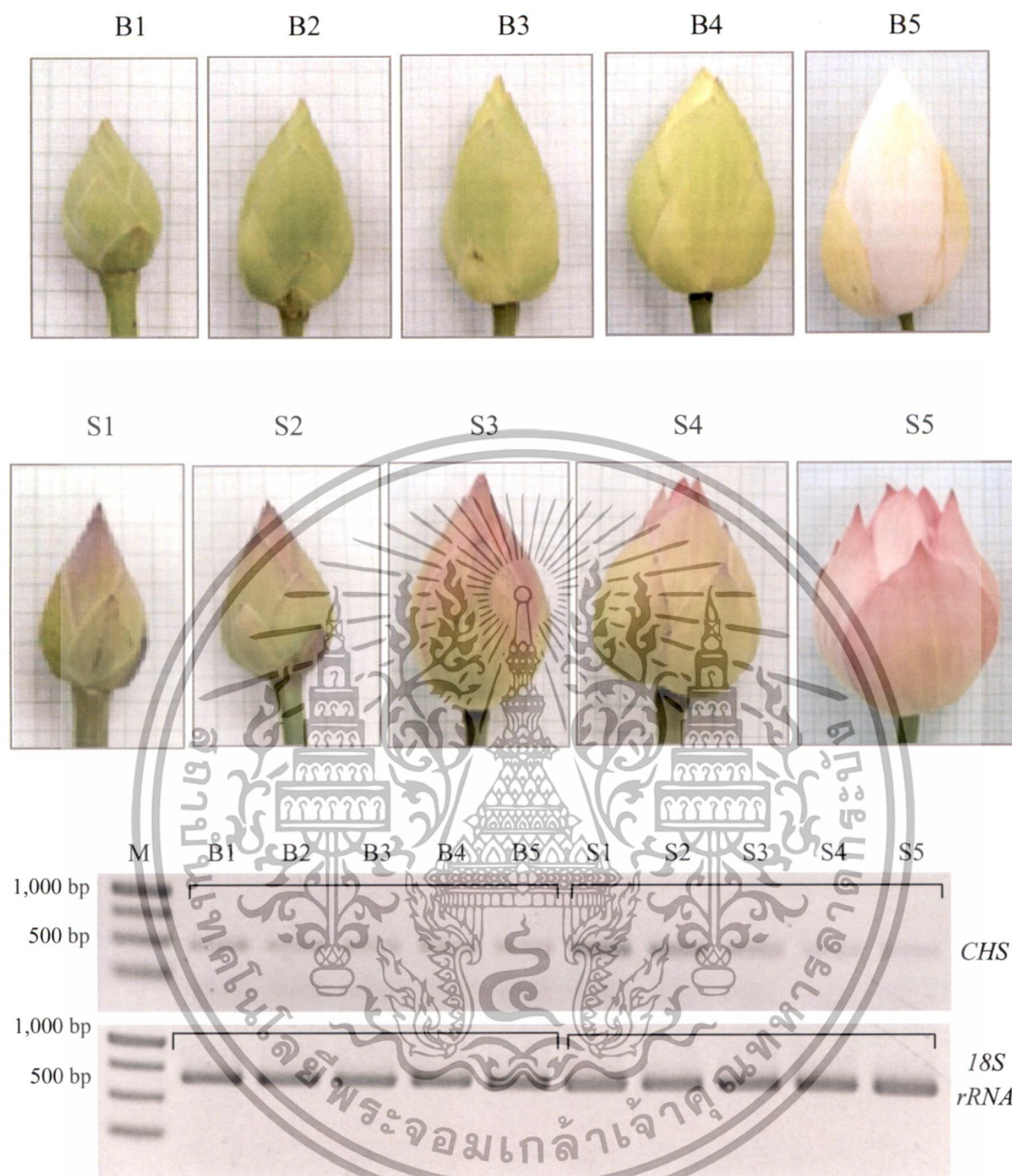
ภาพที่ 4.10 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงมณฑริก (*CHS_BUN*) ขนาด 1,170 คู่เบส กับบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงมณฑริก (*CHSA_BUN*) และบัวหลวงสัตตบงกช (*CHSA_SAT*) ขนาด 458 คู่เบส (ส่วนที่ขีดเส้นใต้ คือ ไพรเมอร์ส่วนต้น *CHSA_forward primer* และไพรเมอร์ส่วนท้าย *CHSA_reverse primer* และแถบสีเทาแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ผลการศึกษาปริมาณของการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวง ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กรีก ดอกสีขาวและกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชดอกสีชมพู ในแต่ละช่วงระยะของการพัฒนาของดอกบัวหลวง ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR ตามวิธีการของ ซัยวรกุล ไชยปัญญา (2556) โดยเริ่มต้นจากปรับความเข้มข้นของ cDNA ให้เท่ากัน โดยการเปรียบเทียบจากปริมาณการแสดงออกของยีน *18S rRNA* ซึ่งเป็นยีนอ้างอิง ด้วยเทคนิค PCR นำ cDNA ที่ได้ไปใช้ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CHSA_forward primer และ CHSA_reverse primer พบว่า ความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กรีกในระยะเวลาที่ 1 (B1) มีความเข้มมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลีบดอกบัวหลวงในระยะเวลาที่ 2 (B2), ระยะเวลาที่ 3 (B3), ระยะเวลาที่ 4 (B4) และ ระยะเวลาที่ 5 (B5) ที่มีความเข้มใกล้เคียงกัน ส่วนความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช ระยะเวลาที่ 1 (S1) มีความเข้มมากที่สุด และค่อยๆ ลดลงในระยะเวลาที่ 2 (S2), ระยะเวลาที่ 3 (S3), ระยะเวลาที่ 4 (S4) และ ระยะเวลาที่ 5 (S5) ตามลำดับ (ภาพที่ 4.11) ในขณะที่ความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *18S rRNA* ซึ่งเป็นยีนอ้างอิงมีความเข้มใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่า ยีน *CHS* มีปริมาณการแสดงออกมากที่สุดในช่วงระยะการพัฒนาของดอกบัวหลวงระยะเวลาที่ 1 มากที่สุด และมีปริมาณการแสดงออกลดลงในระยะเวลาที่ 2, ระยะเวลาที่ 3 และ ระยะเวลาที่ 4 ตามลำดับ และในระยะเวลาที่ 5 มีปริมาณการแสดงออกน้อยที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กรีกสีขาวและบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู พบว่า ความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชมีความเข้มมากกว่าแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กรีก โดยเฉพาะในระยะเวลาที่ 1, ระยะเวลาที่ 2 และระยะเวลาที่ 3 มีความเข้มมากกว่าอย่างชัดเจน ส่วนในระยะเวลาที่ 4 และระยะเวลาที่ 5 มีความเข้มใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่า กลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากกว่ากลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กรีกสีขาว



ภาพที่ 4.11 การเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* (ขนาด 458 คู่เบส) ในแต่ละระยะการพัฒนาคอกบัวหลวง ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง (ขนาดประมาณ 600 คู่เบส); คอกบัวหลวงมณฑริก (B1) ระยะที่ 1, (B2) ระยะที่ 2, (B3) ระยะที่ 3, (B4) ระยะที่ 4 และ (B5) ระยะที่ 5 และคอกบัวหลวงสัตตบงกช (S1) ระยะที่ 1, (S2) ระยะที่ 2, (S3) ระยะที่ 3, (S4) ระยะที่ 4 และ (S5) ระยะที่ 5 (M = 1 kbp DNA marker)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *CHS* ในต้นบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงราชินี ที่ได้รับการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวงด้วยวิธียิงอนุภาค

ผลการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงราชินีด้วยวิธียิงอนุภาค

4.5.1 ผลการโคลนบางส่วนของยีน *CHS* จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริก

ผลการโคลนบางส่วนของยีน *CHS* จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริก ด้วยเทคนิค PCR ได้ผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ขนาดประมาณ 450 คู่เบส (ภาพที่ 4.12) นำผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้ ไปใช้ในการสร้างพลาสมิดลูกผสมเพื่อใช้ในการถ่ายยีนต่อไป



ภาพที่ 4.12 ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริก ขนาดประมาณ 450 คู่เบส (M = 100 bp DNA marker).

4.5.2 ผลการสร้างพลาสมิดลูกผสม pBICHSA

นำผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริก ขนาดประมาณ 450 คู่เบส ในข้อที่ 4.51 มาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pBI121 ขนาด 14,758 คู่เบส ในตำแหน่งแทนที่ยีน *GUS* ในลักษณะกลับทิศ (anti sense) โดยเริ่มต้นจากนำผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac* I และ *Bam* HI พบว่า ผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ตัดถูกเอนไซม์ตัดจำเพาะตัดออกเป็น 2 ส่วน ขนาดประมาณ 300 คู่เบส และขนาดประมาณ 150 คู่เบส (ภาพที่ 4.13) เลือกชิ้นส่วนของบางส่วนของยีน *CHS* ขนาดประมาณ 300 คู่เบส มาใช้ในการถ่ายยีน และเมื่อนำพลาสมิด pBI121 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac* I และ *Bam* HI พบว่า พลาสมิด pBI121 ถูกตัดออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนของยีน *GUS* ขนาดประมาณ 2,000 คู่เบส และส่วนของพลาสมิดที่เหลือขนาดประมาณ 12,000 คู่เบส (ภาพที่ 4.14) จากนั้นนำชิ้นส่วนของบางส่วนของยีน *CHS* และบางส่วนของพลาสมิด pBI121 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac* I และ *Bam* HI มาเชื่อมต่อเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ *T4* ligase ได้พลาสมิดลูก

เอกลำต้นอื่นแต่ให้ผลผลิตสูงและให้ผลผลิตที่เพียงพอต่อการบริโภคและใช้ประโยชน์ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

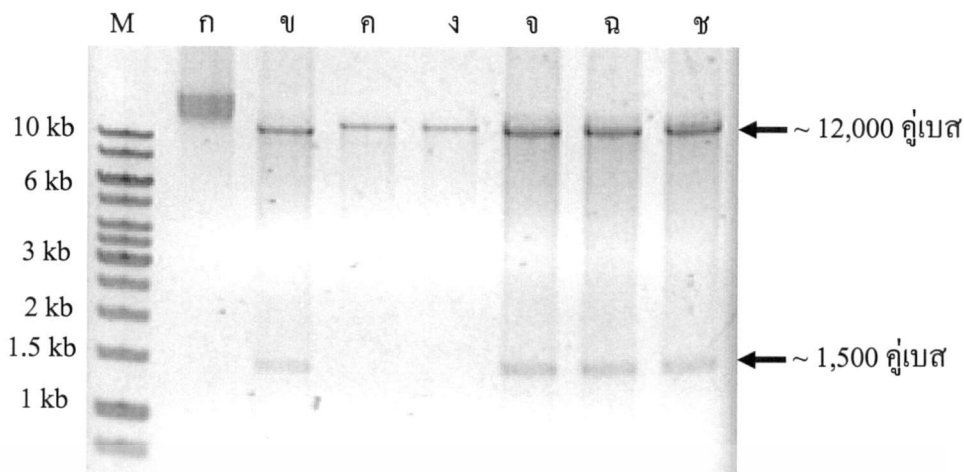
ผสม pBICHSA ขนาดประมาณ 13,500 คู่เบส จากนั้นตรวจสอบหาส่วนของบางส่วนของยีน *CHS* ที่แทรกบนพลาสมิดลูกผสม pBICHSA ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์มีตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Hind* III (ภาพที่ 4.15) และเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CAMV_forward primer และ NOS_reverse primer ได้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 500 คู่เบส (ภาพที่ 4.16) เลือกโคลนที่ได้ผล นำไปตรวจสอบการกลับทิศของบางส่วนของยีน *CHS* ที่อยู่บนพลาสมิด pBICHSA ด้วยการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เลือกโคลนมีบางส่วนของยีน *CHS* ขนาด 331 คู่เบส แทรกอยู่ระหว่างส่วนของ CaMV 35s promoter และ NOS terminator ของ พลาสมิด pBICHSA ในลักษณะกลับทิศ นำไปใช้ในการสร้างพลาสมิดลูกผสมเพื่อใช้ในการถ่ายยีน



ภาพที่ 4.13 ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวง นุณฑกริก ถูกตัดด้วยเอนไซม์มีตัดจำเพาะ *Sac* I และ *Bam* HI ได้ชิ้นส่วนของ DNA ขนาดประมาณ 300 คู่เบส และขนาดประมาณ 150 คู่เบส (M = 100 bp DNA marker)

ภาพที่ 4.14 พลาสมิด pBI121 ถูกตัดด้วยเอนไซม์มีตัดจำเพาะ *Sac* I และ *Bam* HI แยกออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนของยีน *GUS* ขนาดประมาณ 2,000 คู่เบส และส่วนของพลาสมิดที่เหลือ ขนาดประมาณ 12,000 คู่เบส (M = 1 kb DNA marker)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.15 การตรวจสอบยีน *CHS* ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pBICHSA ด้วยการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Hind* III; (ก) คือ พลาสมิด pBI121 ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, (ข), (จ), (ฉ) และ (ช) คือ โคลนของพลาสมิด pBICHSA ที่มีส่วนของยีน *CHS* แบบ antisense แทรกอยู่ ได้ชิ้นส่วนของ DNA ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส และส่วนที่เหลือของพลาสมิด ขนาดประมาณ 12,000 คู่เบส และ (ค) และ (ง) คือ โคลนที่ไม่มีส่วนของยีนยีนแทรกอยู่ (M = 1kb DNA marker)

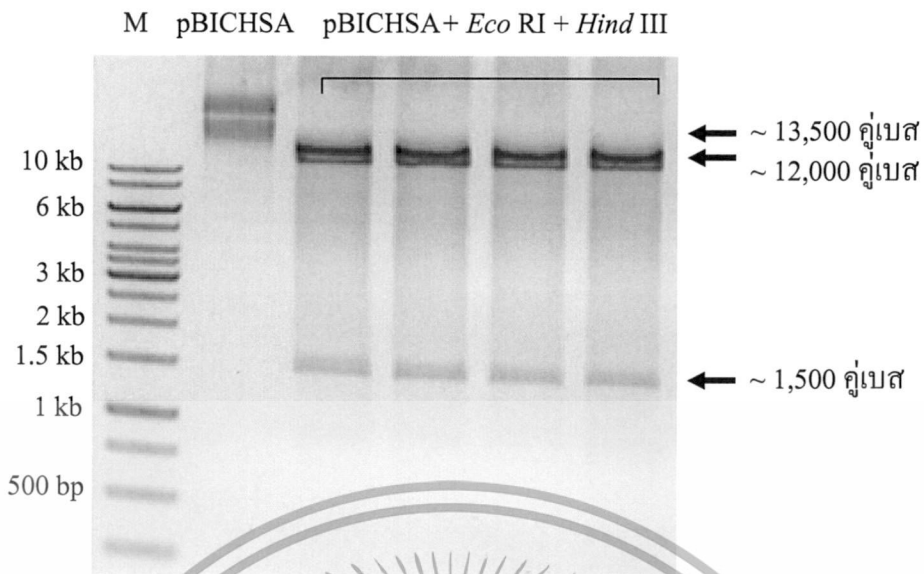


ภาพที่ 4.16 การตรวจสอบบางส่วนของยีน *CHS* ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pBICHS ด้วยเทคนิค PCR; (ก) คือ ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ขนาดประมาณ 450 คู่เบส ใช้เป็น PCR positive control, (ข), (ค), (ง) และ (จ) คือ โคลนที่มีส่วนของยีน *CHS* แบบ antisense แทรก ระหว่าง CaMV 35s promoter และ NOS terminator จะได้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 500 คู่เบส โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CAMV_forward primer และ NOS_reverse primer และ (ฉ) คือ โคลนที่ไม่มีส่วนของยีนยีนแทรกอยู่ (M = 1kb DNA marker)

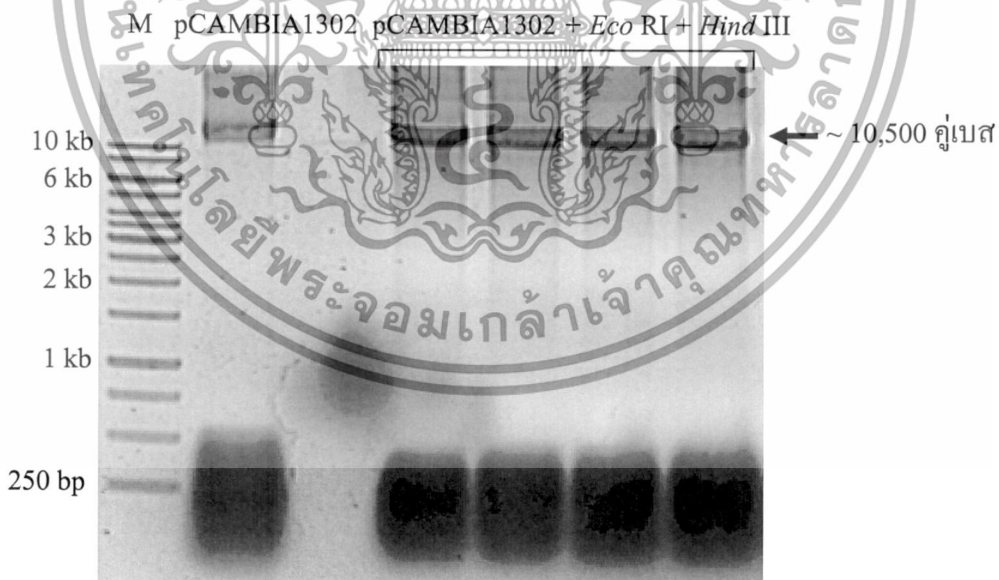
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.3 ผลการสร้างพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA

นำบางส่วนของยีน *CHS* แบบ anti sense ที่ถูกควบคุมด้วย CaMV 35s promoter และ NOS terminator จากพลาสมิด pBICHSA ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส มาเชื่อมต่อเข้ากับ พลาสมิด pCAMBIA1302 ขนาด 10,549 คู่เบส โดยเริ่มต้นจากนำพลาสมิดลูกผสม pBICHSA มาตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Hind* III พบว่า ได้ชิ้นส่วนของ DNA 2 ส่วน คือ ส่วนของยีน *CHS* แบบ antisense ที่อยู่ระหว่าง CaMV 35s promoter และ NOS terminator ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส และส่วนของพลาสมิดที่เหลือ ขนาดประมาณ 12,000 คู่เบส (ภาพที่ 4.17) และเมื่อนำพลาสมิด pCAMBIA1302 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Hind* III พบว่าได้ชิ้นส่วนของ DNA 1 ส่วน ขนาดประมาณ 10,500 คู่เบส (ภาพที่ 4.18) จากนั้นตัดชิ้นส่วน agarose gel ที่มีชิ้นส่วน DNA ของยีน *CHS* และ CaMV 35s promoter และ NOS terminator ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส และส่วนของพลาสมิด pCAMBIA1302 ขนาดประมาณ 10,500 คู่เบส นำมาแยก DNA ออกจาก agarose gel และทำให้บริสุทธิ์ นำมาเชื่อมต่อเข้ากันด้วยเอนไซม์ *T4* ligase ได้พลาสมิดลูกผสมใหม่ที่มีบางส่วนของยีน *CHS* แบบ antisense ที่ถูกควบคุมด้วย CaMV 35s promoter และ NOS terminator บนพลาสมิด pCAMBIA1302 คือ พลาสมิด pCAMBIA1302CHSA ขนาดประมาณ 11,700 คู่เบส จากนั้นชักนำพลาสมิดลูกผสมให้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดด้วยวิธี heat-shock จากนั้นสุ่มเลือกโคลนของแบคทีเรียมาตรวจสอบหาบางส่วนของยีน *CHS* ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pCAM BIA1302CHSA ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่า เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac* I และ *Bam* HI โคลนที่พลาสมิดมีชิ้นส่วนของยีน *CHS* ได้ชิ้นส่วนของยีน 2 ส่วน ขนาดประมาณ 300 คู่เบส และขนาดประมาณ 11,400 คู่เบส (ภาพที่ 4.19) และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Hind* III โคลนที่พลาสมิดมีชิ้นส่วนของยีน *CHS* แบบ antisense ที่ถูกควบคุมด้วย CaMV 35s promoter และ NOS terminator ได้ชิ้นส่วนของยีน 2 ส่วน ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส และขนาดประมาณ 10,200 คู่เบส (ภาพที่ 4.20) และเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CAMV_forward primer และ NOS_reverse primer จะต้องได้ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่แทรกระหว่าง CaMV 35s promoter และ NOS terminator ขนาดประมาณ 500 คู่เบส และผลผลิตของยีน *GFP* ขนาดประมาณ 900 คู่เบส (ภาพที่ 4.21) เลือกโคลนที่ได้ผลดังกล่าวนำมาใช้ในการถ่ายยีนต่อไป

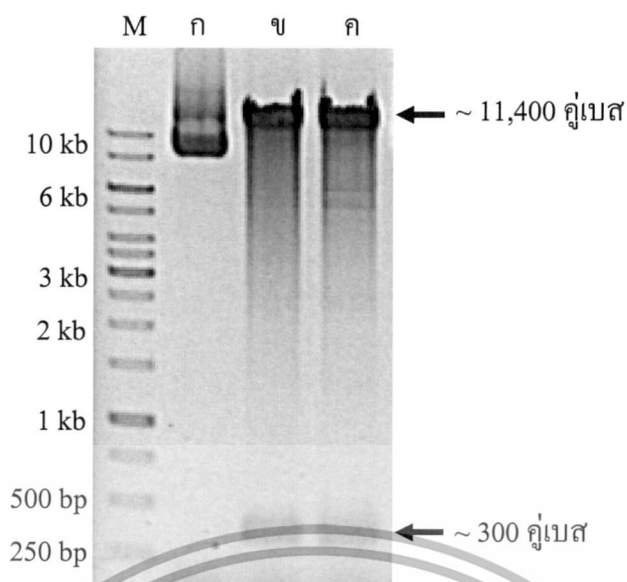


ภาพที่ 4.17 พลาสมิดถูกผสม pBICHSA (ขนาดประมาณ 13,500 คู่เบส) ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Hind* III ได้ชิ้นส่วน DNA ที่มีส่วนของ DNA ของยีน *CHS* แบบ antisense แทรกระหว่าง CaMV 35s promoter และ NOS terminator ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส และส่วนที่เหลือของพลาสมิด ขนาดประมาณ 12,000 คู่เบส (M = 1kb DNA marker)

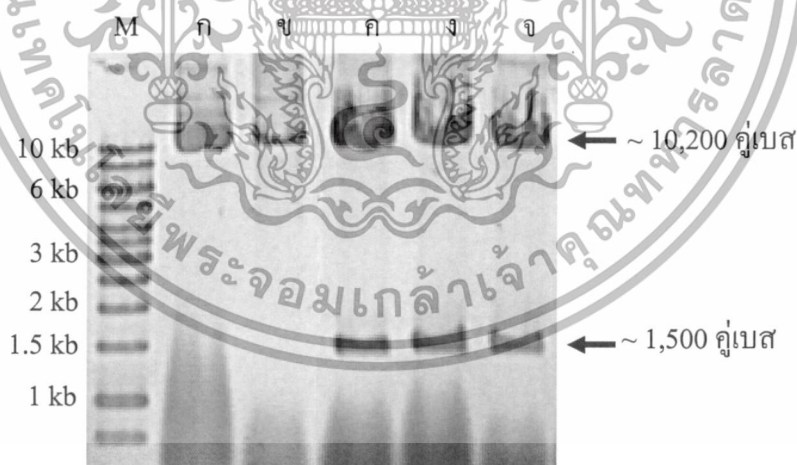


ภาพที่ 4.18 พลาสมิด pCAMBIA1302 (ขนาดประมาณ 10,500 คู่เบส) ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Hind* III ได้ชิ้นส่วนของ DNA 1 ส่วน ขนาดประมาณ 10,500 คู่เบส (M = 1kb DNA marker)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

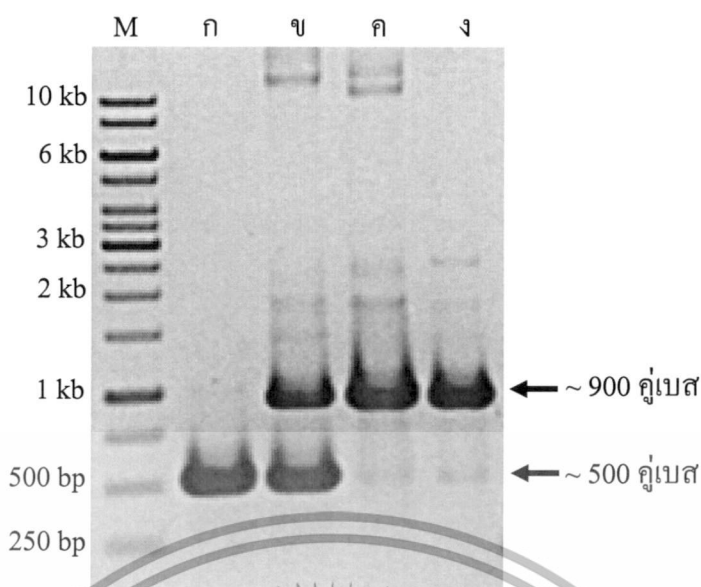


ภาพที่ 4.19 การตรวจสอบหาบางส่วนของยีน *CHS* ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA 1302CHSA ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac* I และ *Bam* HI; (ก) คือ พลาสมิดที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, (ข) และ (ค) คือ โคลนที่มีส่วนของยีน *CHS* แทรกอยู่ในพลาสมิด pCAMBIA 1302CHSA ได้ชิ้นส่วนของ DNA ขนาดประมาณ 300 คู่เบส และส่วนที่เหลือของพลาสมิดขนาดประมาณ 11,400 คู่เบส (M = 1kb DNA marker)



ภาพที่ 4.20 การตรวจสอบหาบางส่วนของยีน *CHS* ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA 1302CHSA ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Hind* III; (ก) คือ พลาสมิดที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, (ข) คือ โคลนที่ไม่มีส่วนของยีนแทรกอยู่ และ (ค), (ง) และ (จ) คือ โคลนที่มีส่วนของยีน *CHS* แทรกอยู่ ได้ชิ้นส่วนของ DNA ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส และส่วนที่เหลือของพลาสมิด ขนาดประมาณ 10,200 คู่เบส (M = 1kb DNA marker)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.21 การตรวจสอบหาบางส่วนของยีน *CHS* ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA 1302CHSA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CAMV_forward primer และ NOS_reverse primer; (ก) คือ ผลผลิต PCR ของพลาสมิด pBICHS ที่มีบางส่วนของยีน *CHS* ขนาดประมาณ 500 คู่เบส, (ข) คือ โคลนที่มีส่วนของยีน *CHS* และยีน *GFP* ได้ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ขนาดประมาณ 500 คู่เบส และผลผลิตของยีน *GFP* ขนาดประมาณ 900 คู่เบส และ (ค) และ (ง) คือ โคลนที่ไม่มีส่วนของยีน *CHS* แทรกอยู่ มีเฉพาะผลผลิตของยีน *GFP* ขนาดประมาณ 900 คู่เบส (M = 1 kb DNA marker)

4.5.4 ผลการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense ที่อยู่บนพลาสมิด pCAMBIA1302 CHSA เข้าสู่เนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี ด้วยวิธียิงอนุภาค

ทำการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกดอกสีขาวและบัวหลวงราชินีดอกสีชมพู ด้วยวิธียิงอนุภาค โดยใช้พลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA เคลือบบนอนุภาคทองคำ (gold particles) ซึ่งใช้เป็นพาหะในการถ่ายยีน และทำการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค หลังจากถ่ายยีน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำไปตรวจสอบประสิทธิภาพของการถ่ายยีนจากการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีนรายงานผลยีน *GFP* ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ พบว่า มีเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริก จำนวน 72 ชิ้น พบจุดสีเขียวเรืองแสง (green spot) ของยีน *GFP* (ภาพที่ 4.22) จากชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมด จำนวน 100 ชิ้น มีคะแนนประสิทธิภาพในการถ่ายยีน เฉลี่ย 0.97 ± 0.20 คะแนน (ตารางที่ 4.16) ส่วนบัวหลวงราชินี มีเนื้อเยื่อ shoot cluster จำนวน 75 ชิ้น ที่พบจุดสีเขียวเรืองแสง (green spot) ของยีน *GFP* (ภาพที่ 4.23) จากชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมด จำนวน 100 ชิ้น และมีคะแนนประสิทธิภาพในการถ่ายยีน เฉลี่ย 0.99 ± 0.17 คะแนน (ตารางที่ 4.16) หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อ shoot cluster ทั้งหมดไปเอกซเรย์เป็นเอกซเรย์ที่สแกนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คัดเลือก ชี้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือก ที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า ชี้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุนทรริก มีจำนวนเฉลี่ยของชี้นเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกลดลงตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก (ตารางที่ 4.14) ในสัปดาห์แรก (สัปดาห์ที่ 0) มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 100.00+0.00 ในสัปดาห์ที่ 2 มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 100.00+0.00 ในสัปดาห์ที่ 4 มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 95.00+3.54 ในสัปดาห์ที่ 6 มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 81.00+10.84 ในสัปดาห์ที่ 8 มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 65.00+16.53 และในสัปดาห์ที่ 10 มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 56.00+13.87 (ภาพที่ 4.24 จ) ส่วนชี้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินี มีจำนวนเฉลี่ยของชี้นเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกลดลงตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกด้วยเช่นกัน (ตารางที่ 4.15) โดยในสัปดาห์แรก (สัปดาห์ที่ 0) มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 100.00+0.00 ในสัปดาห์ที่ 2 มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 100.00+0.00 ในสัปดาห์ที่ 4 มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 98.00+2.74 ในสัปดาห์ที่ 6 มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 91.00+8.94 ในสัปดาห์ที่ 8 มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 72.00+14.83 และในสัปดาห์ที่ 10 มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 61.00+18.51 (ภาพที่ 4.24 ข) จากนั้นนำชี้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุนทรริกและบัวหลวงราชินีที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก ไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร regeneration เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า มีชี้นเนื้อเยื่อบางส่วนไม่สามารถเจริญเติบโต และตาย มีชี้นเนื้อเยื่อเพียงบางส่วนที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหาร regeneration ชี้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุนทรริก ที่สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นบัวหลวงได้ มีจำนวน 2 ต้น คือ ต้นบัวหลวงบุนทรริก หมายเลข B3/2 และหมายเลข B5/12 (ภาพที่ 4.25) ส่วนบัวหลวงราชินี มีชี้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ที่สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นบัวหลวงได้ จำนวน 5 ต้น คือ ต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2, หมายเลข R2/1, หมายเลข R2/4, หมายเลข R2/11 และ หมายเลข R5/12 (ภาพที่ 4.26) จากนั้นนำต้นบัวหลวงบุนทรริกและบัวหลวงราชินีไปตรวจสอบการแสดงออกของยีนรายงานผลยีน *GFP* ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ พบว่า ต้นบัวหลวงบุนทรริกหมายเลข B3/2 (ภาพที่ 4.27) มีการเจริญเติบโตได้ดี มีการเกิดยอด รากและใบขนาดใหญ่ พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* ที่บริเวณปลายราก แต่ไม่พบการเรืองแสงสีเขียวที่บริเวณใบและลำต้น และต้นบัวหลวงบุนทรริกหมายเลข B5/12 (ภาพที่ 4.28) มีการเจริญเติบโตได้ดี มีการเกิดยอด รากและใบขนาดใหญ่ พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* ที่บริเวณกาบใบ และบริเวณบางส่วนของราก แต่ไม่พบการเรืองแสงสีเขียวที่บริเวณใบ และลำต้น ส่วนต้นบัวหลวงราชินี พบว่า ต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2 (ภาพที่ 4.30) มีใบขนาดใหญ่ 1 ใบ แต่ยอดและส่วนอื่นๆ ไม่เจริญเติบโต และตายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ พบว่า มีจุดเรืองแสงสีเขียวจุดเล็กๆ บนใบ และใบและก้านใบบางส่วนที่ตาย มีการเรืองแสงสีเขียว แต่ไม่พบการเรืองแสงที่เนื้อเยื่อส่วนยอดและลำต้น ต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1 (ภาพที่ 4.29) มีการเจริญเติบโตได้ดี มีการเกิดยอด รากและใบขนาดใหญ่ พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* ที่บริเวณบางส่วนของราก และบริเวณกาบใบ แต่ไม่พบการเรืองแสงสีเขียวที่บริเวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อคุณผู้ใดเห็นประโยชน์หรือเห็นว่าการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบ และลำต้น ต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/4 (ภาพที่ 4.31) มีใบเจริญเติบโตขึ้น 1 ใบ มีขนาดใหญ่ แต่เนื้อเยื่อส่วนอื่นไม่เจริญเติบโต และมีบางส่วนตาย พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* เป็นจุดขนาดใหญ่ที่ใบ และยอดบางยอดที่ตาย ต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/11 (ภาพที่ 4.32) มียอดและใบขนาดเล็กเกิดขึ้น แต่ไม่พบการเรืองแสงของยีน *GFP* และ หมายเลข 5/12 (ภาพที่ 4.33) มีการเจริญเติบโตได้ดี มีการเกิดยอด รากและใบขนาดใหญ่ แต่ไม่พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* ในส่วนที่เจริญเติบโต พบการเรืองแสงสีเขียวเฉพาะในส่วนของยอดและใบที่ตาย ในชั้นเนื้อเยื่ออื่นๆ ที่ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหาร regeneration พบว่า มีเนื้อเยื่อบางชิ้นที่ตาย มีการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* ในยอดและใบบางส่วน เช่น ต้นบัวหลวงบุณฑริกหมายเลข B3/1 (ภาพที่ 4.34) และต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/6 และหมายเลข R4/6 (ภาพที่ 4.35) เป็นต้น จากนั้นตัดเนื้อเยื่อส่วนใบและลำต้นของบัวหลวงบุณฑริกหมายเลข B3/2 และหมายเลข B5/12 และตัดเนื้อเยื่อส่วนใบและลำต้นของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1 และหมายเลข R5/1 ตัดเนื้อเยื่อใบของบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2, R2/4 และหมายเลข R2/11 นำไปสกัด genomic DNA เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GFP* และยีน *hptII* ในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน และสกัด RNA และสังเคราะห์ cDNA เพื่อนำใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *CHS* ต่อไป

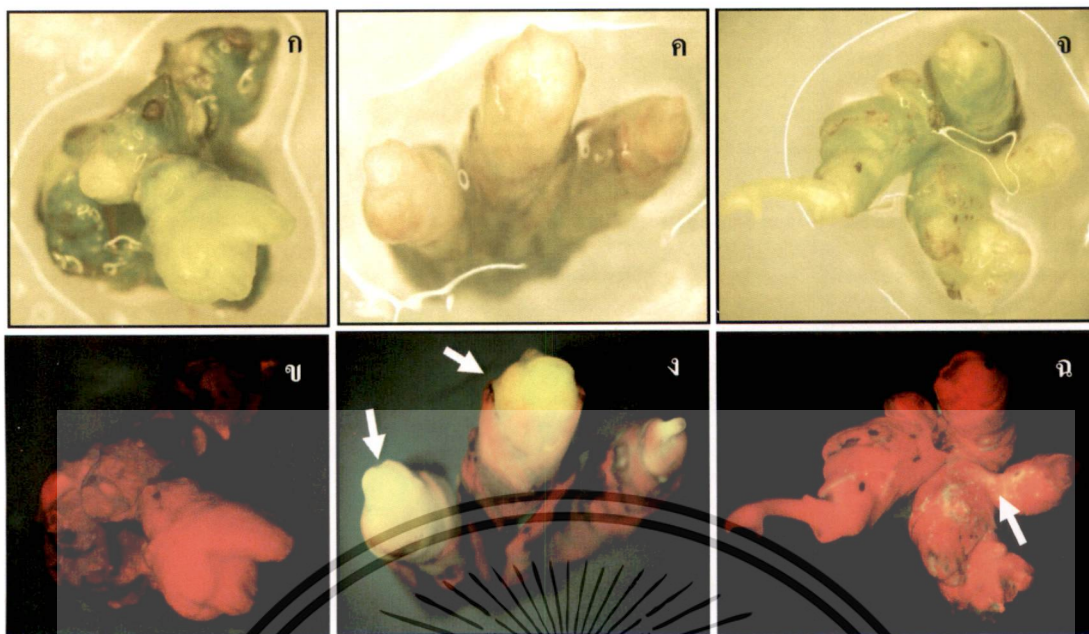
ตารางที่ 4.14 จำนวนของ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกที่ได้รับการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense ที่อยู่รอดบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 10 สัปดาห์

	จำนวนของ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกที่รอดบนอาหารคัดเลือกในสัปดาห์ที่					
	0	2	4	6	8	10
จำนวนขึ้น	20.00±0.00	20.00±0.00	19.00±0.71	16.20±2.17	13.00±3.32	11.20±2.77
ร้อยละ	100.00±0.00	100.00±0.00	95.00±3.54	81.00±10.84	65.00±16.53	56.00±13.87

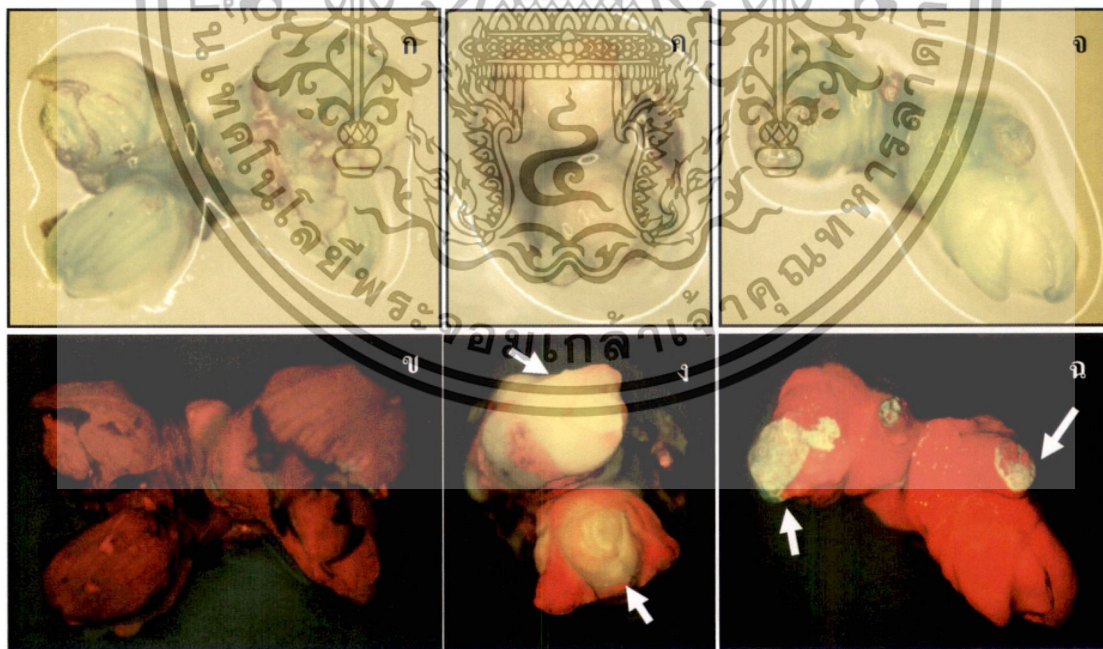
ตารางที่ 4.15 จำนวนของ shoot cluster ของบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense ที่อยู่รอดบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 10 สัปดาห์

	จำนวนของ shoot cluster ของบัวหลวงราชินีที่รอดบนอาหารคัดเลือกในสัปดาห์ที่					
	0	2	4	6	8	10
จำนวนขึ้น	20.00±0.00	20.00±0.00	19.60±0.55	18.20±1.79	14.40±2.97	12.20±3.70
ร้อยละ	100.00±0.00	100.00±0.00	98.00±2.74	91.00±8.94	72.00±14.83	61.00±18.51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.22 การแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *GFP* (ลูกศร) ของต้นบัวหลวงบุนทรริก หลังจากการถ่ายยีน; ต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ก) ภายใต้แสงปกติ, (ข) ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์, ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน (ค) และ (จ) ภายใต้แสงปกติ, (ง) และ (ฉ) ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ ((ก), (ข), (ค) และ (ง) กำลังขยาย 12x, (จ) และ (ฉ) กำลังขยาย 7x)

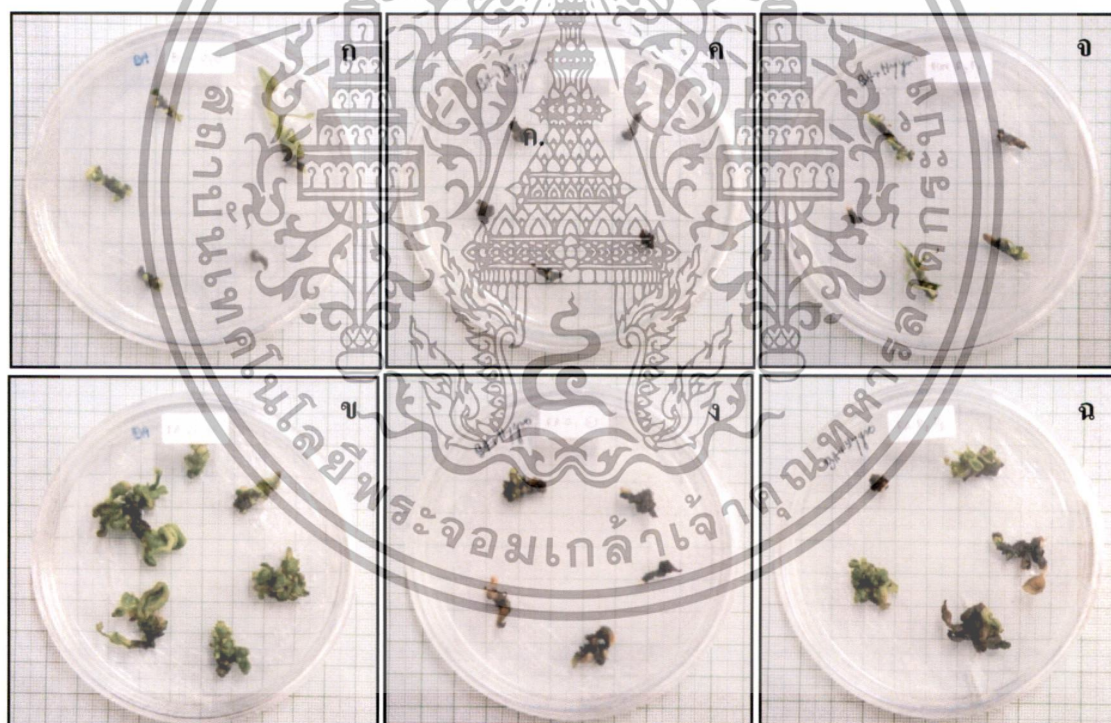


ภาพที่ 4.23 การแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *GFP* (ลูกศร) ของต้นบัวหลวงราชินี หลังจากการถ่ายยีน; ต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ก.) ภายใต้แสงปกติ, (ข.) ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์, ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน (ค.) และ (จ.) ภายใต้แสงปกติ, (ง.) และ (ฉ.) ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ ((ก.), (ข.), (ค.) และ (ฉ.) กำลังขยาย 7x, (ค.) และ (ง.) กำลังขยาย 12x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 ประสิทธิภาพในการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense ด้วยวิธียิงอนุภาค เข้าสู่ชั้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี

	บัวหลวงบุณฑริก	บัวหลวงราชินี
จำนวนชั้นเนื้อเยื่อที่ถ่ายยีนทั้งหมด (ชิ้น)	100	100
จำนวนชั้นเนื้อเยื่อที่พบการแสดงออกของยีน <i>GFP</i> (ชิ้น)	72	75
คะแนนการแสดงออกของยีน <i>GFP</i> (คะแนนเต็ม 5 คะแนน)	0.97±0.20	0.99±0.17
ร้อยละโดยเฉลี่ยของชั้นเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหารกีดเลือก (ชิ้น)	56.00+13.87	61.00+18.51
จำนวนชั้นเนื้อเยื่อที่เจริญเติบโตบนอาหาร regeneration (ชิ้น)	2	5
จำนวนชั้นเนื้อเยื่อที่พบการแสดงออกของยีน <i>GFP</i> (ชิ้น)	2	3



ภาพที่ 4.24 ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนหลังจากการคัดเลือกเป็นเวลา 10 สัปดาห์; (ก) ต้นบัวหลวงบุณฑริก และ (ข) ต้นบัวหลวงราชินีที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารปกติ, (ค) ต้นบัวหลวงบุณฑริก และ (ง) ต้นบัวหลวงราชินีที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก และ (ฉ) ต้นบัวหลวงบุณฑริก และ (จ) ต้นบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.25 ต้นบัวหลวงบุงตริกที่ได้รับการถ่ายยีน; (ก) ต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และ (ข) ต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก และ (ค) ต้นบัวหลวงบุงตริกที่ได้รับการถ่ายยีนที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก หมายเลข B3/2 และหมายเลข B5/12



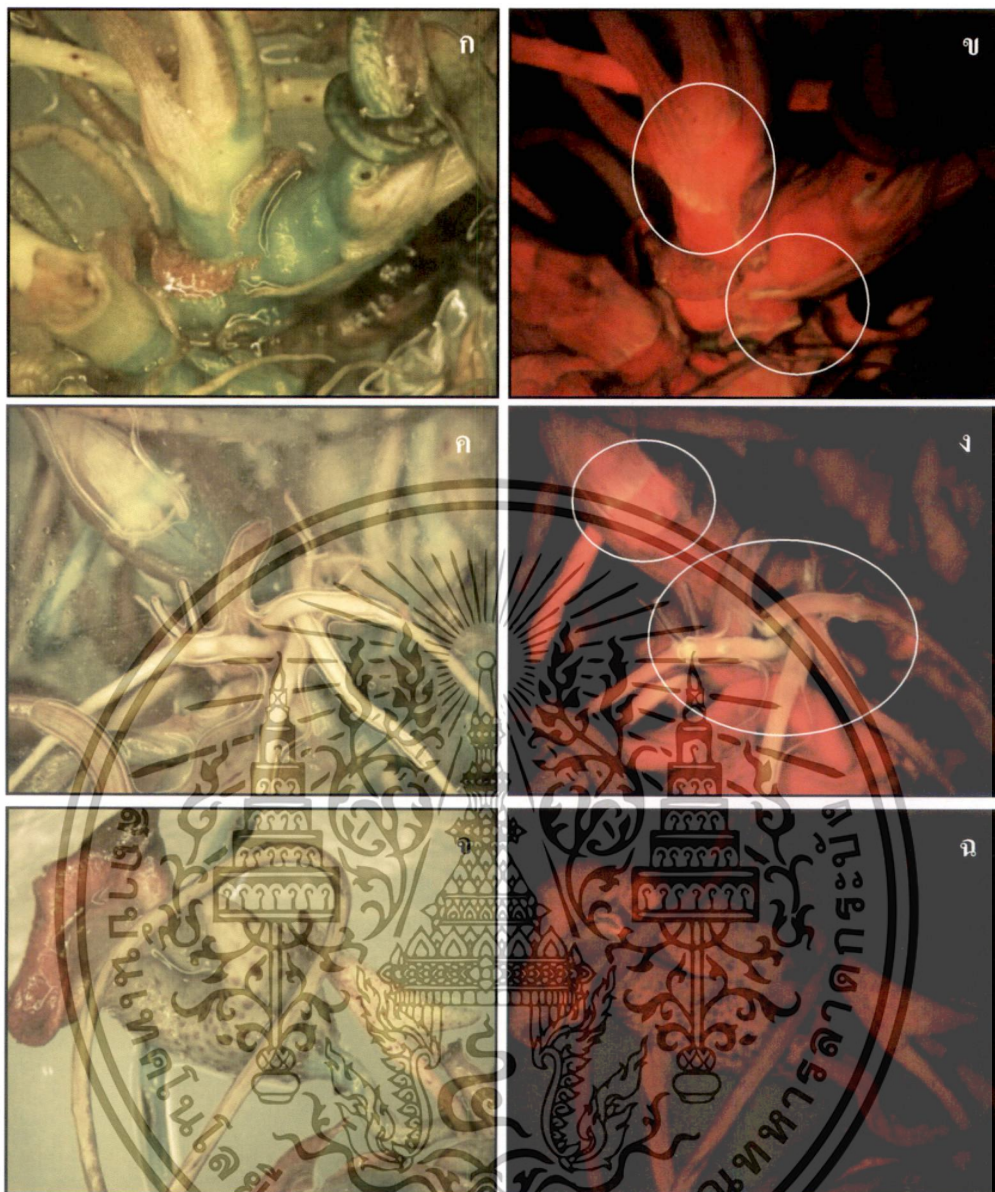
ภาพที่ 4.26 ต้นบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน; (ก) ต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, (ข) ต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก, ต้นบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีนและรอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก (ค) หมายเลข R1/2, (ง) หมายเลข R2/1, (จ) หมายเลข R2/4, (ฉ) หมายเลข R2/11 และ (ช) หมายเลข 5-12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



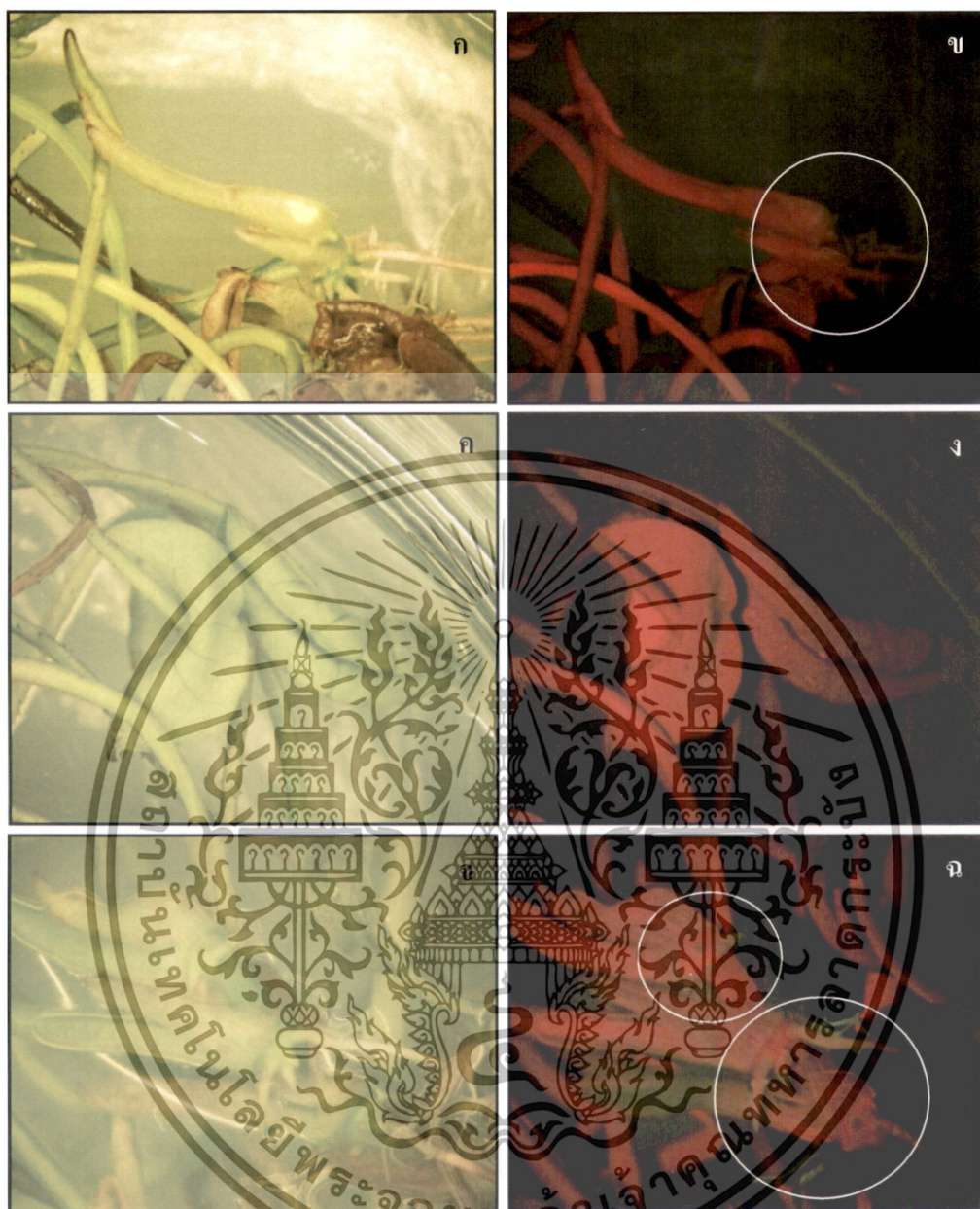
ภาพที่ 4.27 การแสดงออกของยีน *GFP* ของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B3/2; ส่วนยอดและก้านใบ (ก) ภายใต้แสงปกติ, (ข) ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์, ส่วนลำต้นและราก (ค) ภายใต้แสงปกติ (ง) ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* บริเวณปลายราก (ในวงกลม) และส่วนใบ (จ) ภายใต้แสงปกติ, (ฉ) ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ ไม่พบการเรืองแสงสีเขียว ((ก), (ข), (ฉ) และ (ฉ) กำลังขยาย 7x, (ค) และ (ง) กำลังขยาย 10x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



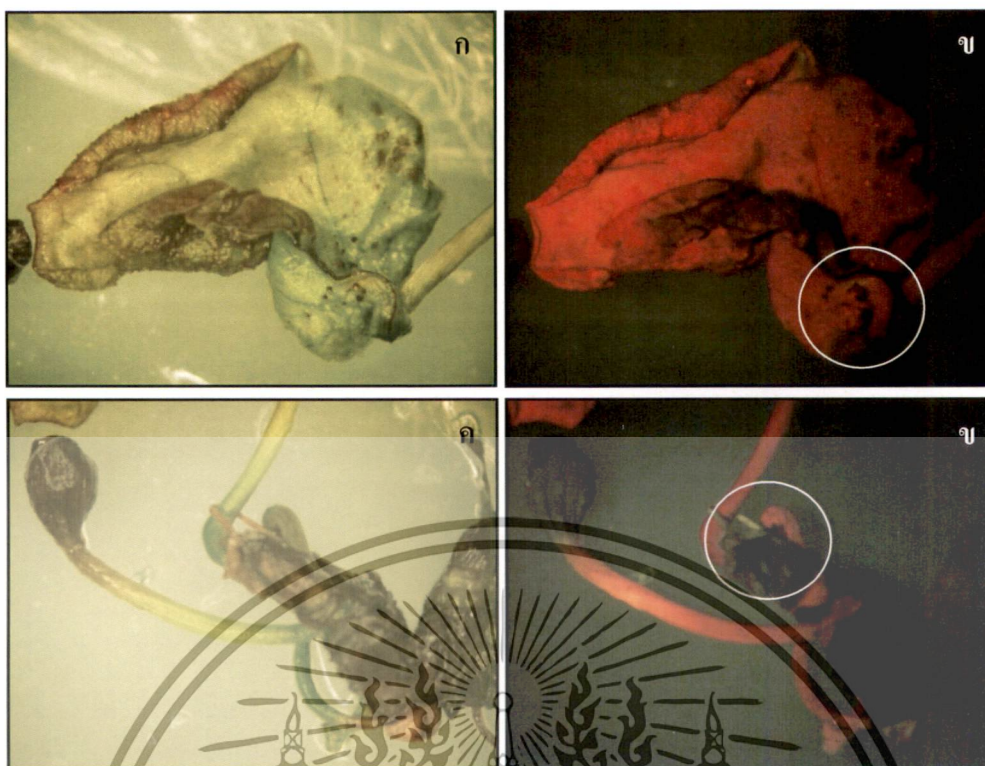
ภาพที่ 4.28 การแสดงออกของยีน *GFP* ของต้นข้าวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B5/12; ส่วนยอดและก้านใบ (ก) ภายใต้แสงปกติ, (ข) ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* บริเวณก้านใบ (ในวงกลม), ส่วนลำต้นและราก (ค) ภายใต้แสงปกติ (ง) ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* บริเวณก้านใบ และราก (ในวงกลม) และส่วนใบ (จ) ภายใต้แสงปกติ (ฉ) ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ ไม่พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* ((ก), (ข), (จ) และ (ฉ) กำลังขยาย 10x, (ค) และ (ง) กำลังขยาย 7x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

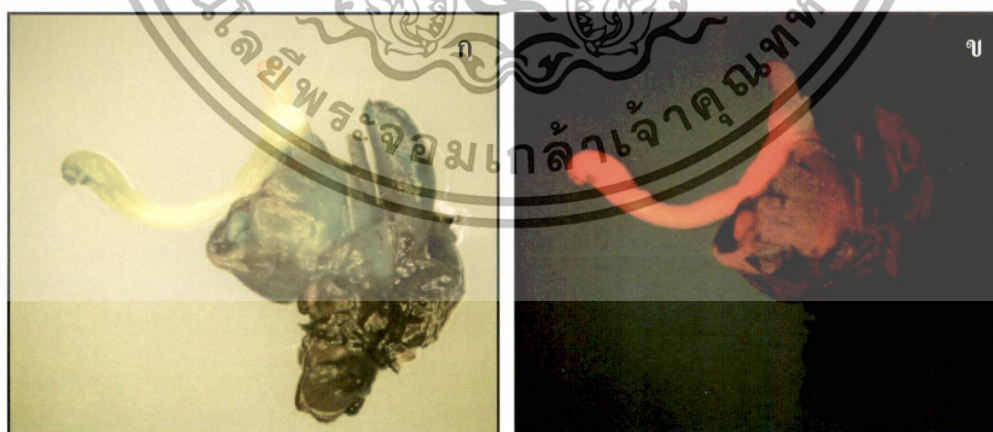


ภาพที่ 4.29 การแสดงออกของยีน *GFP* ของต้นข้าวหลวงราชินี หมายเลข R2/1; ส่วนยอดและก้านใบ (ก) ภายใต้แสงปกติ, (ข) ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* ที่ส่วนราก (ในวงกลม), ส่วนใบ (ค) ภายใต้แสงปกติ (ง) ภายใต้ฟลูออเรสเซนต์ ไม่พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* และส่วนลำต้นและราก (จ) ภายใต้แสงปกติ (ฉ) ภายใต้ฟลูออเรสเซนต์ พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* บริเวณก้านใบ และราก (ในวงกลม) ((ก), (ข), (ค) และ (ง) กำลังขยาย 7x, (จ) และ (ฉ), กำลังขยาย 10x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

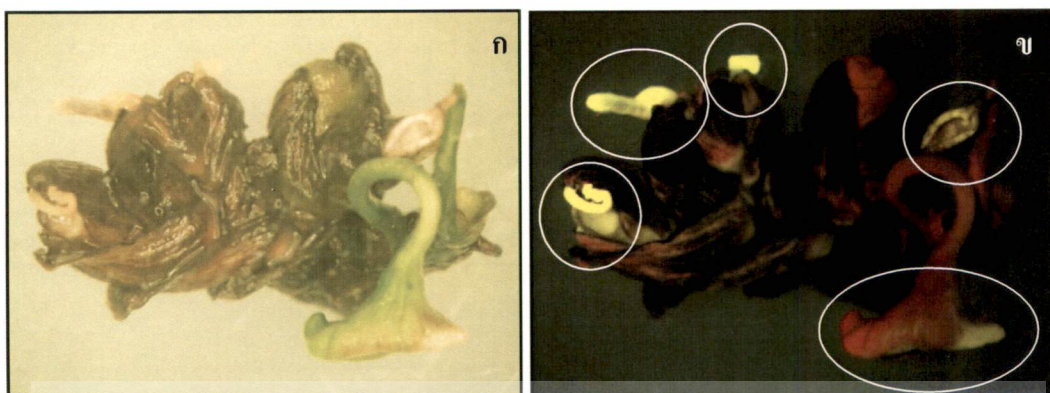


ภาพที่ 4.30 การแสดงออกของยีน *GFP* ของต้นบัวหลวงราชินี หมายเลข R1/2; ส่วนใบ (ก) ภายใต้งแสงปกติ, (ข) ภายใต้งแสงฟลูออเรสเซนซ์ พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* บริเวณใบ (ในวงกลม) และส่วนยอดและก้านใบ (ค) ภายใต้งแสงปกติ (ง) ภายใต้งแสงฟลูออเรสเซนซ์ พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* บริเวณยอดที่ตาย (ในวงกลม) ((ก), (ข), (ค) และ (ง) กำลังขยาย 7x)



ภาพที่ 4.31 การแสดงออกของยีน *GFP* ของต้นบัวหลวงราชินี หมายเลข R2/11; ส่วนยอดและใบ (ก) ภายใต้งแสงปกติ, (ข) ภายใต้งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ไม่พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* ที่ส่วนยอด และใบขนาดเล็กที่เกิดขึ้น ((ก) และ (ข) กำลังขยาย 12x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

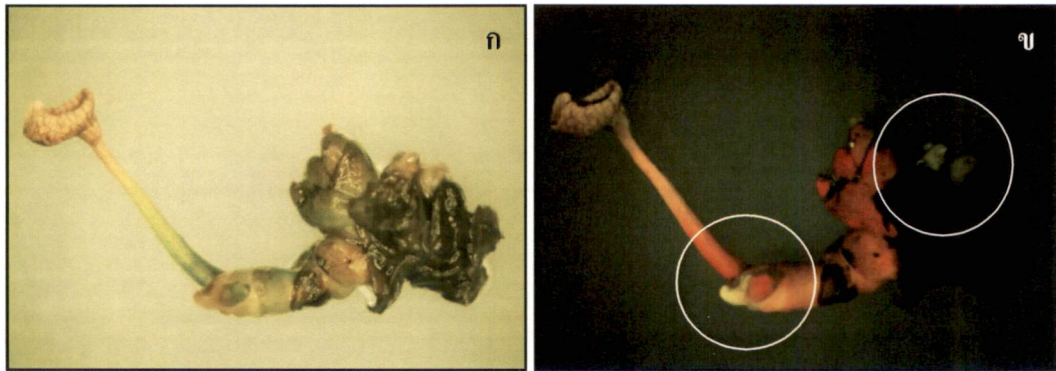


ภาพที่ 4.32 การแสดงออกของยีน *GFP* ของต้นข้าวหลวงราชินี หมายเลข R2/4; ส่วนยอดและใบ (ก) ภายใต้แสงปกติ, (ข) ภายใต้ฟลูออเรสเซนต์ พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* ในบางส่วนของใบ (ในวงกลม) ในเนื้อเยื่อส่วนที่ตาย พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* บริเวณส่วนยอด และใบ บางส่วน (ในวงกลม) ((ก) และ (ข) กำลังขยาย 7x)



ภาพที่ 4.33 การแสดงออกของยีน *GFP* ของต้นข้าวหลวงราชินี หมายเลข R5/1; ส่วนยอด ลำต้น ราก และใบ (ก) ภายใต้แสงปกติ, (ข) ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ที่ส่วนยอด ลำต้น ราก และใบ ไม่พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* แต่พบที่ส่วนใบที่ตายแล้ว (ในวงกลม), ส่วนใบที่เกิดใหม่ (ค) ภายใต้แสงปกติ (ง) ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ไม่พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* ((ก.), (ข.),

เอกส (ค.) และ (ง) กำลังขยาย 7x) ได้รับความรู้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.34 การแสดงออกของยีน *GFP* ของต้นบัวหลวงพันธุ์กรมหลวงราชบุรีดิเรกฤทธิ์หมายเลข B3/1 ที่ได้รับการถ่ายยีนที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก แต่ไม่เจริญเติบโตบนอาหาร regeneration; (ก) ภายใตแสงปกติ (ข) ภายใตแสงฟลูออเรสเซนซ์ พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* บริเวณยอดที่ตาย (ในวงกลม) ((ก) และ (ข) กำลังขยาย 7x)



ภาพที่ 4.35 การแสดงออกของยีน *GFP* ของต้นบัวหลวงราชินี ที่ได้รับการถ่ายยีนที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก แต่ไม่เจริญเติบโตบนอาหาร regeneration; ต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/6 (ก) ภายใตแสงปกติ (ข) ภายใตแสงฟลูออเรสเซนซ์ พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* บริเวณยอดที่ตายและใบที่ตาย (ในวงกลม) และ ต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R4/6 (ค) ภายใตแสงปกติ (ด) ภายใตแสงฟลูออเรสเซนซ์ พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* บริเวณยอดที่ตายและใบที่ตาย (ในวงกลม) ((ก) และ (ข.) กำลังขยาย 7x, (ค) และ (ง) กำลังขยาย 10x)

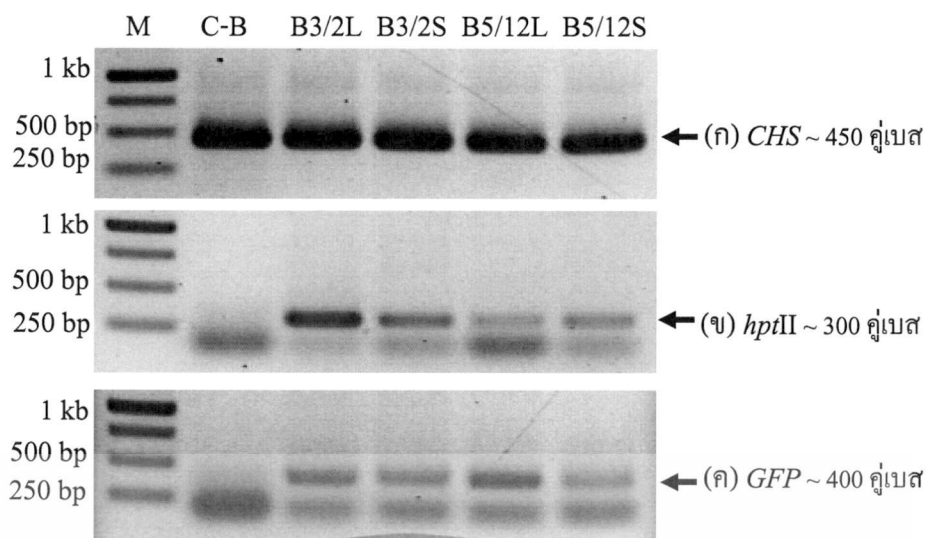
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.5 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GFP* และยีน *hptII* ใน genomic DNA ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR

ทำการสกัด genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กรีนหมายเลข B3/2, ใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กรีนหมายเลข B5/12, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2, ใบและลำต้นต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/4, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/11, ใบและลำต้นต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R5/1 และใบของต้นบัวหลวงพันธุ์กรีนและบัวหลวงราชินี ต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน นำมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GFP* และ ยีน *hptII* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ genomic DNA ที่สกัดจากจากใบอ่อนของต้นบัวหลวงพันธุ์กรีนและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน และต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 เท่า และใช้พลาสมิด pCAMBIA1302CHSA ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 50 เท่า เป็น DNA ต้นแบบ ในปฏิกิริยา PCR และทำการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GFP* ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ *GFP_forward primer* และ *GFP_reverse primer* และตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *hptII* ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ *Hygro_forward primer* และ *Hygro_reverse primer* และใช้ยีน *CHS* เป็นยีนอ้างอิงในการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนใน genomic DNA โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ *CHS_forward primer* และ *CHS_reverse primer* พบว่า เมื่อนำ genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กรีนหมายเลข B3/2, genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กรีนหมายเลข B5/12 และ genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงพันธุ์กรีนที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *CHS_forward primer* และ *CHS_reverse primer* พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 450 คู่เบส ของยีน *CHS* ในทุกตัวอย่าง (ภาพที่ 4.36 ก) แสดงว่าตัวอย่าง genomic DNA ของทุกตัวอย่าง genomic DNA จากบัวหลวงพันธุ์กรีน สามารถนำมาใช้เป็น DNA ต้นแบบในการทำ PCR ได้ แต่เมื่อใช้ไพรเมอร์ *Hygro_forward primer* และ *Hygro_reverse primer* พบว่า มีเฉพาะตัวอย่าง genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กรีนหมายเลข B3/2 และ ต้นบัวหลวงพันธุ์กรีนหมายเลข B5/12 เท่านั้นที่พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *hptII* ขนาดประมาณ 300 คู่เบส (ภาพที่ 4.36 ข) ไม่พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ในตัวอย่างของ genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงพันธุ์กรีนที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และเมื่อใช้ไพรเมอร์ *GFP_forward primer* และ *GFP_reverse primer* พบว่า มีเฉพาะตัวอย่าง genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กรีนหมายเลข B3/2 และ genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กรีนหมายเลข B5/12 เท่านั้นที่พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *GFP* ขนาดประมาณ 400 คู่เบส (ภาพที่ 4.36 ค) ไม่พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ในตัวอย่างของ genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงพันธุ์กรีนที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน แสดงว่ายีนที่ถ่ายเข้าได้เข้าไปในส่วน of genomic DNA สอดคล้องกับผลการเจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin ได้ และพบกาเรืองแสงของยีน *GFP* ในต้นบัวหลวงพันธุ์กรีนหมายเลข B3/2 และต้นบัวหลวงพันธุ์กรีนหมายเลข B5/12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำ genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2, genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1, genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/4, genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/11, genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R5/1 และ genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงราชินีที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *CHS*_forward primer และ *CHS*_reverse primer พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *CHS* ขนาดประมาณ 450 คู่เบส ในทุกตัวอย่าง (ภาพที่ 4.37 ก) แสดงว่าตัวอย่าง genomic DNA ของทุกตัวอย่างจากบัวหลวงราชินีสามารถนำมาใช้เป็น DNA ต้นแบบในการทำ PCR ได้ แต่เมื่อใช้ไพรเมอร์ *Hygro*_forward primer และ *Hygro*_reverse primer พบว่ามีเฉพาะตัวอย่าง genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2, genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1, genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/4 และ genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R5/1 เท่านั้นที่พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *hptII* ขนาดประมาณ 300 คู่เบส (ภาพที่ 4.37 ข) ไม่พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ในตัวอย่างของ genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/11 และ genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงราชินีที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และเมื่อใช้ไพรเมอร์ *GFP*_forward primer และ *GFP*_reverse primer พบว่ามีเฉพาะตัวอย่าง genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2, genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/11 และ genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R5/1 เท่านั้นที่พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *GFP* ขนาดประมาณ 400 คู่เบส (ภาพที่ 4.37 ค) พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *GFP* แบบเจือจางจากตัวอย่าง genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1 และ genomic DNA จากลำต้นของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R5/1 และ ไม่พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ในตัวอย่างของ genomic DNA ลำต้นของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1, genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/4 และ genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงราชินีที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน



ภาพที่ 4.36 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GFP* และยีน *hptII* ใน genomic DNA ของต้นบัวหลวงชนิดที่รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค PCR; (ก.) ยีน *CHS* ยีนอ้างอิง, (ข.) ยีน *hptII* และ (ค.) ยีน *GFP*; (C-B) ต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, ใบ (B3/2L) และ ลำต้น (B3/2S) ของต้นหมายเลข B3/2 และ ใบ (B5/12L) และ ลำต้น (B5/12S) ของต้นหมายเลข B5/12 (M = 1kb DNA marker)



ภาพที่ 4.37 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GFP* และยีน *hptII* ใน genomic DNA ของต้นบัวหลวงราชินีที่รับการถ่ายยีน *CHS* ด้วยเทคนิค PCR; (ก.) ยีน *CHS* ยีนอ้างอิง, (ข.) ยีน *hptII* และ (ค.) ยีน *GFP*; (C-R) ใบของต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, ใบ (R1/2L) ของต้นหมายเลข R1/2, ส่วนใบ (R2/1L) และ ลำต้น (R2/1S) ของต้นหมายเลข R2/1, ใบ (R2/4L) ของต้นหมายเลข R2/4, ใบ (R2/11L) ของต้นหมายเลข R2/11 และ ใบ (R5/1L) และ ลำต้น (R5/1S) ของต้นหมายเลข R5/1

(C- = negative control (dH₂O), C+ = positive control (pCAMBIA1302CHSA) และ M = 1kb DNA marker)

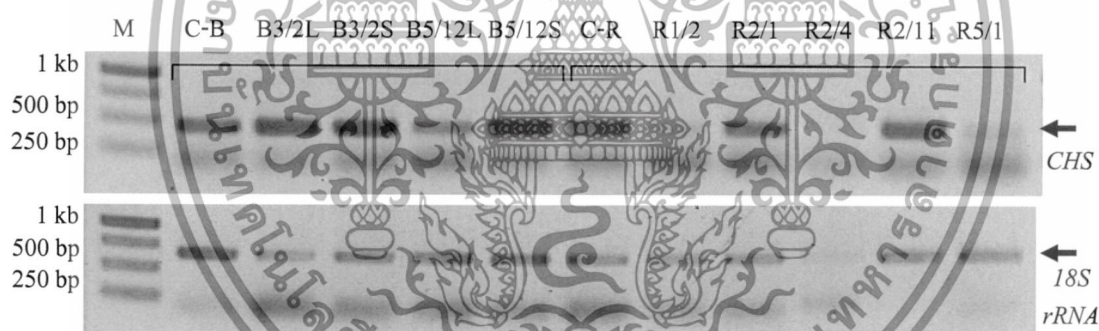
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.6 ผลการศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในต้นบัวหลวงพันธุ์และบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

ทำการสกัด RNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์หมายเลข B3/2, ใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์หมายเลข B5/12, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/4, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/11, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R5/1 และใบของต้นบัวหลวงพันธุ์และบัวหลวงราชินี ต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน จากนั้นนำ RNA ที่ได้ทำการสังเคราะห์ cDNA นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาศึกษาเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *CHS* ในต้นบัวหลวงพันธุ์และบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense ที่อยู่บนพลาสมิด pCAMBIA1302 CHSA ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR ตามวิธีการของ ชัยวรกุล ไชยปัญญา (2555) โดยเริ่มต้นจากปรับความเข้มข้นของ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากใบอ่อนและต้นอ่อนของบัวหลวงพันธุ์และบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน และต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนให้เท่ากันโดยการเปรียบเทียบจากปริมาณการแสดงออกของยีน *18S rRNA* ด้วยเทคนิค PCR หลังจากเจือจางความเข้มข้นของ cDNA ให้เท่ากัน โดยใช้ผลผลิต PCR ของยีน *18S rRNA* เป็น DNA อ้างอิงแล้ว นำ cDNA ที่ได้ไปใช้ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CHSA_forward primer และ CHSA_reverse primer เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *CHS* ในต้นบัวหลวงพันธุ์และบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน และต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เมื่อใช้ตัวอย่าง cDNA จากต้นบัวหลวงพันธุ์ พบว่า ความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์หมายเลข B3/2 และ cDNA ของลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์หมายเลข B5/12 มีความเข้มมากที่สุด และมีความเข้มใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.38) ส่วนความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของใบของต้นบัวหลวงพันธุ์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน มีความเข้มเจือจางลง และความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของใบของต้นบัวหลวงพันธุ์หมายเลข B5/12 มีความเข้มน้อยที่สุดในขณะที่ความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *18S rRNA* ซึ่งเป็นยีนอ้างอิงมีความเข้มใกล้เคียงกัน แสดงว่าใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์หมายเลข B3/2 และลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์หมายเลข B5/12 มีระดับการแสดงออกของยีน *CHS* มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนใบของต้นบัวหลวงพันธุ์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ส่วนใบของต้นบัวหลวงพันธุ์หมายเลข B5/12 มีระดับการแสดงออกของยีน *CHS* ลดลงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนใบของต้นบัวหลวงพันธุ์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

เมื่อใช้ cDNA จากจากต้นบัวหลวงราชินี พบว่า ความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1, cDNA ของใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/11 และ cDNA ของใบของต้นบัวหลวงราชินีที่ไม่ได้รับการ

ถ่ายยีน มีความเข้มมากที่สุด และมีความเข้มใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.38) ในขณะที่ความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของใบของต้นบัวหลวงราชินี หมายเลข R1/2 และ cDNA ของใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R5/1 มีความเข้มใกล้เคียงกัน และมีความเข้มน้อยกว่าผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของใบของต้นบัวหลวงราชินีที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ในขณะที่ความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *18S rRNA* ซึ่งเป็นยีนอ้างอิงมีความเข้มใกล้เคียงกัน แสดงว่า ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/11 และ ใบของต้นบัวหลวงราชินีที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนใบ มีระดับการแสดงออกของยีน *CHS* ในระดับใกล้เคียงกัน ส่วนใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2 และใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R5/1 มีระดับการแสดงออกของยีน *CHS* ลดลง เมื่อเทียบกับใบของต้นบัวหลวงราชินีที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนใบ ส่วน cDNA ของใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข 2/4 มีความเข้มขึ้นน้อยมาก จึงทำให้ความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *18S rRNA* ที่โคลนได้ มีความเข้มน้อยมาก เมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่น และเมื่อนำ cDNA ไปทำ PCR จึงทำให้ไม่สามารถมองเห็นแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *CHS* ได้



ภาพที่ 4.38 การศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* (458 คู่เบส) ในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง (ประมาณ 600 คู่เบส); ส่วนใบ (C-B) ของต้นบัวหลวงพันธุ์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, ส่วนใบ (B3/2L) และลำต้น (B3/2S) ของต้นบัวหลวงพันธุ์หมายเลข B3/2, ส่วนใบ (B5/12L) และ ลำต้น (B5/12S) ของต้นบัวหลวงพันธุ์หมายเลข B5/12, ส่วนใบ (C-R) ของต้นบัวหลวงราชินีที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, ส่วนใบ (R1/2) ของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2, ส่วนใบ (R2/1) ของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1, ส่วนใบ (R2/4) ของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/4, ส่วนใบ (R2/11) ของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/11 และ ส่วนใบ (R5/1) ของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R5/1 (M = 1 kb DNA marker)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การศึกษาการชักนำให้เกิด shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี

ผลศึกษาการชักนำให้เกิด shoot cluster จากส่วนยอดของเอ็มบริโอของเมล็ดบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ชี้นส่วนตายอดของเอ็มบริโอเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็น shoot cluster ที่มีลักษณะเป็นกระจุกยอด 2 - 3 ยอด ซึ่งเกิดจากยอดเดิมของเอ็มบริโอ บางส่วนเกิดจากตาข้างของเอ็มบริโอ ยอดอ่อนที่เกิดขึ้นใหม่มีกาบสีเขียวอ่อนห่อหุ้มไว้ และมีใบอ่อนขนาดเล็กสีเขียวเกิดขึ้นจากส่วนของกระจุกยอด เนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงทั้งสองชนิดมีลักษณะคล้ายกัน แต่ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริก เกิดกระจุกยอดและใบมากกว่าบัวหลวงราชินี แต่บัวหลวงราชินีมีใบขนาดใหญ่กว่าและมีน้ำหนักมากกว่า สอดคล้องกับลักษณะทางสรีระวิทยาของบัวหลวงราชินีที่มีใบและต้นขนาดใหญ่กว่าบัวหลวงบุณฑริก แต่บัวหลวงมีไหลและใบดกกว่าบัวหลวงราชินี ราชินี (ปริมลาภ ชูเกียรติมั่น และเสริมลาภ วสุวัต, 2548) ในการศึกษาของ Buathonga *et al.* (2013) สามารถชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อ shoot cluster จากส่วนยอดของเอ็มบริโอของบัวหลวงบุณฑริกเพื่อนำไปใช้ในการถ่ายยีนวิธียิงอนุภาคได้ ได้ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนที่มีความเสถียร แต่ยังไม่มียางานการชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินี และยังไม่มียางานการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อบัวหลวงราชินีมาก่อน ในการศึกษาี้เลือกใช้บัวหลวงบุณฑริก เป็นตัวแทนของดอกบัวหลวงสีขาว และใช้บัวหลวงสัตตบงกชเป็นตัวแทนของบัวหลวงสีชมพู ในการศึกษาการโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนในกลีบดอก แต่ในการถ่ายยีนเลือกใช้บัวหลวงบุณฑริกเป็นตัวแทนของบัวหลวงสีขาว และใช้บัวหลวงราชินีเป็นตัวแทนของบัวหลวงสีชมพู เนื่องจากบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี เป็นบัวหลวงดอกไม่ซ้อน จึงติดเมล็ดมากกว่า บัวหลวงสัตตบงกชและบัวหลวงสัตตบุษย์ (ปริมลาภ ชูเกียรติมั่น และเสริมลาภ วสุวัต, 2548) เมล็ดมีจำนวนมากเพียงพอในการชักนำให้เกิด shoot cluster เพื่อใช้ในการถ่ายยีน เนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงทั้งสองชนิดจะนำไปเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการถ่ายยีนด้วยวิธียิงอนุภาคต่อไป

5.2 การศึกษาระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารคัดเลือก shoot cluster ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน

สารปฏิชีวนะ hygromycin เป็นสารที่นิยมใช้ในการคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการคัดเลือกสูง สารปฏิชีวนะ hygromycin มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช สามารถยับยั้งสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์พืชได้ (Bakker E.P. 1992) โดยสารปฏิชีวนะ hygromycin จะเข้าไปจับกับหน่วยย่อยของไรโบโซม ทำให้รูปร่างของไรโบโซมเปลี่ยนไป ไม่สามารถจับกับ mRNA ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ (Maria *et al.* 2008) เมื่อใช้ระดับความเข้มข้นสูงจะทำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการตายอย่างรวดเร็ว โดยเนื้อเยื่อจะมีอาการเหลืองซีดและตายไปเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ แต่ถ้าใช้ระดับความเข้มข้นต่ำ จะทำให้พืชหยุดเจริญเติบโต หยุดการแบ่งเซลล์ และค่อยๆ ตายไปอย่างช้าๆ (Meng *et al.* 2007) สารปฏิชีวนะ hygromycin เป็นสารคัดเลือกต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีนที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าสารคัดเลือกอื่นที่นิยมใช้ เช่น การใช้สารปฏิชีวนะ kanamycin จะใช้ความเข้มข้นสูง และระยะเวลาในการคัดเลือกยาวนาน (Angenon *et al.* 1994) ส่วนการใช้สารคัดเลือกสาร phosphinothricin พบว่า มีต้นพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนรอดจากการคัดเลือกสูง (Todd and Tague. 2001) และสาร bialaphose เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกสูงและราคาไม่สูง แต่มีผลกระทบต่อเจริญเติบโตของพืชสูง จึงไม่เหมาะสมสำหรับพืชบางชนิดที่ไวต่อสารเคมี (Angenon *et al.* 1994) ในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงของ Sactiew *et al.* (2014) และ Buathonga *et al.* (2013) ได้ใช้สารคัดเลือกเป็นสารปฏิชีวนะ kanamycin เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ระยะเวลาคัดเลือกนาน 16 สัปดาห์ ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้เวกเตอร์ pCAMBIA1302 ที่ใช้เป็นแกนกลางในการสร้างเวกเตอร์เพื่อใช้ในการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense มียีน *GFP* เป็นยีนรายงานผล และมียีน *hptII* เป็นยีนคัดเลือก แต่เนื่องจากยังไม่มียีนการทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารคัดเลือก hygromycin ในบัวหลวงมาก่อน จึงต้องทดสอบหาความเข้มข้นของสาร hygromycin ในอาหารคัดเลือก ที่เหมาะสมสำหรับใช้คัดเลือกต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน โดยเลือกใช้ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยง shoot cluster ของบัวหลวงทั้งสองชนิดบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีได้ แต่ไม่สามารถทำให้ตายได้ทั้งหมด ที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีได้ และทำให้ shoot cluster ตายได้ทั้งหมด แต่ที่ระดับความเข้มข้น 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ shoot cluster ของบัวหลวงตายอย่างรวดเร็ว ใน 5 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์ และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีได้ใน 2 สัปดาห์ ในการทดลองนี้จึงเลือกใช้สาร hygromycin ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตรใช้ในการคัดเลือกต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน การใช้สารคัดเลือกสารปฏิชีวนะ hygromycin เป็นในพืชอื่น พบว่าใช้

ไม่ว่าการณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 2 - 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ และความไวต่อสาร hygromycin ของพืชแต่ละชนิด เช่น ยอดอ่อนของต้นปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) ใช้ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (Parveez *et al.* 1996) โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ (*Dendrobium hybrid*) ใช้ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ (Men *et al.* 2003) ยอดอ่อนของกล้วย Pisang Rastali (AAB) (*Musa sp.*) ใช้ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (Sreeramanan *et al.* 2006) แคลลัสของฝ้าย (*Gossypium hirsutum* L.) ใช้ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร (Meng *et al.* 2007) เป็นต้น ในพืชบางชนิดไวต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin การใช้สารคัดเลือกความเข้มข้นสูงตั้งแต่เริ่มต้นการคัดเลือกอาจทำให้ต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีนและต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนตายได้ทั้งหมด การคัดเลือกโดยค่อยๆ ปรับระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin เพิ่มขึ้นจนถึงความเข้มข้นที่ใช้คัดเลือก จะมีโอกาสประสบความสำเร็จสูงกว่าการใช้ระดับความเข้มข้นการใช้สารคัดเลือกความเข้มข้นสูงตั้งแต่เริ่มต้นการคัดเลือก (Torregrosa *et al.* 2000; Ribas *et al.* 2011) เช่น ในองุ่นพันธุ์ลูกผสม 110 Richter rootstock (*Vitis berlandieri* × *Vitis rupestris*) ใช้ความเข้มข้น 4 ระดับในการคัดเลือก คือ 1 - 4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพิ่มระดับความเข้มข้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการคัดเลือก รวม 8 สัปดาห์ (Torregrosa *et al.* 2000) และในเอมบริโอเจเนติกแคลลัสของกาแฟอาราบิก้า (*Coffea arabica*) ใช้ความเข้มข้น 2 ระดับในการคัดเลือก ระยะเวลาแรกใช้ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 อาทิตย์ และระยะที่ 2 ใช้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 อาทิตย์ (Ribas *et al.* 2011)

5.3 การศึกษาการโคลนยีน CHS จากกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยเทคนิค PCR

ผลการโคลนยีน CHS แบบเต็มเส้น ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ DNA ต้นแบบเป็น genomic DNA และ cDNA ที่สกัดได้จากกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกสีขาวและบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู และใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากยีน CHSF ที่โคลนจาก cDNA ของ *Nelumbo nucifera* (accession no. FJ999632) ไพรเมอร์ CHSF_forward primer และ CHSF_reverse primer ได้ผลิต PCR ของยีน CHS แบบเต็มเส้น ที่โคลนจาก genomic DNA ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกชขนาดเท่ากัน คือ 1,599 คู่เบส และเมื่อนำนิวคลีโอไทด์ของยีน CHS ที่โคลนได้จาก genomic DNA มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีน พบว่า ยีน CHS ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช มีขนาดของส่วน intron และ exon เท่ากัน โดยส่วนของ exon มี 2 ชิ้น ขนาด 178 คู่เบส (ตั้งแต่ตำแหน่งลำดับที่ 1 ถึง 178) และขนาด 992 คู่เบส (ตั้งแต่ตำแหน่งลำดับที่ 608 ถึง 1,599) และส่วนของ intron มี 1 ชิ้น ขนาด 429 คู่เบส (ตั้งแต่ตำแหน่งลำดับที่ 179 ถึง 607) และได้ผลิต PCR ของยีน CHS แบบเต็มเส้น ที่โคลนจาก cDNA ที่สังเคราะห์จาก RNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกสีขาว และกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชกลีบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อคุณเห็นหน้าไปขอขงเอกสารนี้ การค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดอกสีชมพูขนาดเท่ากัน คือ 1,170 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 389 กรดอะมิโน ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช พบว่า มีความเหมือนกันมากกว่าร้อยละ 99 ในระดับนิวคลีโอไทด์ และมีความเหมือนกันร้อยละ 99 ในระดับกรดอะมิโน ในส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช พบว่า มีความเหมือนกันมากกว่าร้อยละ 99 ในระดับนิวคลีโอไทด์ และมีความเหมือนกันร้อยละ 99 ในระดับกรดอะมิโน ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก มีความเหมือนมากที่สุด กับยีน *chalcone synthase (CHSB)* ของ *N. nucifera* (accession no. FJ999628) มีความเหมือนร้อยละ 98 และยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช มีความเหมือนมากที่สุด กับยีน *chalcone synthase (CHSD)* ของ *N. nucifera* (accession no. FJ999630) มีความเหมือนร้อยละ 98 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงทั้งสองชนิดกับยีน *CHS* ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความเหมือนกันประมาณร้อยละ 79 - 83 ลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช มีความเหมือนมากที่สุด กับเอนไซม์ *chalcone synthase (CHS)* ของ *N. nucifera* (accession no. ADD74169) มีความเหมือนร้อยละ 99 และลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช มีความเหมือนมากที่สุด กับเอนไซม์ *chalcone synthase (CHS)* ของ *N. nucifera* (accession no. ADD74169) มีความเหมือนร้อยละ 99 ลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงทั้งสองชนิดมีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GenBank ประมาณร้อยละ 95 - 88 ยีน *CHS* เป็นยีนที่มีความอนุรักษ์สูง เนื่องจากเป็นยีนที่สำคัญในพืช ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนมีความอนุรักษ์สูง โดยเฉพาะตำแหน่งของ active site ของเอนไซม์ *chalcone synthase* (Suh *et al.* 2000; Deng *et al.* 2012) เนื่องจากเอนไซม์ *chalcone synthase* เป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoids และอีกหลายกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเองของพืช และการตอบสนองต่อแสง (Lo *et al.* 2002) จึงมีความอนุรักษ์สูงในระหว่างวิวัฒนาการของพืชแต่ละชนิด หากยีนมีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่สำคัญ ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์จะทำให้พืชอาจตายได้ (Todd and Vodkin, 1996) การโคลนยีน *CHS* จาก cDNA ของกลีบดอกสีขาวของบัวหลวงบุณฑริกและกลีบดอกสีชมพูของบัวหลวงสัตตบงกช จึงเป็นการยืนยันได้ว่ามีการสร้าง mRNA ของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงทั้งสองสี และลำดับกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้มีความเหมือนกันถึงร้อยละ 99 มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยในบางตำแหน่ง แต่กรดอะมิโนในตำแหน่งสำคัญ ยังคงเป็นชนิดเดียวกันจึงไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในดอกบัวหลวงทั้งสองสี (Joseph and Joseph, 2000) ยีน *CHS* ในพืชหลายชนิด พบว่า มีการทำงานร่วมกันหลายยีน (family genes) เช่น ถั่วเหลือง (Tuteja *et al.* 2009) และ ถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris*) (Ryder *et al.* 1987) ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) (Lo *et al.* 2002.) เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้น ในถั่วเหลืองพบว่ามียีน *CHS* ถึง 8 ยีน กระจายอยู่บนโครโมโซมที่แตกต่างกัน แต่ละยีนมีการแสดงออกแตกต่างกันในแต่ละเนื้อเยื่อ เช่น เมล็ด ใบ และดอก เป็นต้น และมียีนบางส่วนมีลักษณะกลับทิศ เกิดการยับยั้งการทำงานกันเอง ในลักษณะของ anti-sense ทำให้ดอกถั่วมีสีขาว และเมล็ดถั่วสีจางลง (Tuteja *et al.* 2009)

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก และบัวหลวงสัตตบงกชมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* พี่ชอื่น 30 ชนิด ที่ได้มีการรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank ด้วยโปรแกรม MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) โดยเลือกวิธีการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี Minimum evolution method และใช้วิธีการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Bootstrap test โดยใช้จำนวนรอบ 500 รอบ พบว่าลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ของบัวหลวงทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแยกตัวออกมาจากพืชในกลุ่มอื่น อยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกับ *N. nucifera* และอยู่ในกลุ่มใหญ่เดียวกับกลุ่มไม้ยืนต้น ใบเลี้ยงคู่ เช่น *Theobroma cacao* (โกโก้), *Camellia sinensis* (ชาจีน) และ *Malus domestica* (แอปเปิล) เป็นต้น สอดคล้องกับรายงานของ Les *et al.* (1991) ที่ใช้ ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *rbcL* ที่อยู่บนคลอโรพลาสต์จีโนม โดยใช้วิธีการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี gene maximum-likelihood topologies ใช้วิธีการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Bootstrap test โดยใช้จำนวนรอบ 1,000 รอบ พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของยีน *rbcL* ของบัวหลวง *N. lutea* (North America) และ *N. nucifera* (Asia and Australia) มีความเหมือนกันถึงร้อยละ 99.99 และอยู่ในกลุ่มของพืชดอกใบเลี้ยงคู่ (angiosperm) และกลุ่มไม้ยืนต้น (woody plant)

5.4 การศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก และดอกบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

การศึกษาค่าความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกสีขาว และบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู และปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงในช่วงระยะของการพัฒนาของดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช พบว่า ดอกบัวหลวงบุณฑริก มีการปริมาณการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างกันมากนักในแต่ละช่วงระยะการพัฒนาของดอกบัวหลวง ส่วนปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในดอกบัวหลวงสัตตบงกช พบว่า ในระยะที่ 1 ดอกตูมขนาดเล็ก มีปริมาณการแสดงออกของยีนมากที่สุด และมีปริมาณการแสดงออกลดลงในระยะที่ 2 ดอกตูมขนาดกลาง และ ระยะที่ 3 ดอกตูมขนาดใหญ่ และมีปริมาณการแสดงออกน้อยที่สุด ในระยะที่ 4 และระยะที่ 5 เมื่อดอกใกล้จะบาน เมื่อเปรียบเทียบการปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกสีขาวและกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู พบว่า ในกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู มีปริมาณการแสดงออกของยีนมากกว่ากลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกสีขาว ในทุกๆ ระยะการพัฒนา จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงมีปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในเท่านั้น เมื่ออยู่ใต้เห็น ใบเขียวจะเขียนตามการคำ
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแสดงออกมากที่สุดในช่วงระยะดอกตูมในช่วงแรก จากนั้นปริมาณการแสดงออกจะลดลงเมื่อดอกมีการพัฒนามากขึ้นจนถึงช่วงระยะดอกบาน จะมีการแสดงออกของยีน *CHS* น้อยที่สุด การศึกษาการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกไม้ของพืชหลายชนิดที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ พบว่า รูปแบบการแสดงออกของยีน *CHS* ในดอกบัวหลวงบุณทริกดอกสีขาวคล้ายกับในดอกกลีตีดอกสีเหลืองอ่อน การศึกษาของ Nakatsuka *et al.* (2003) พบว่า ในดอกกลีตีดอกสีเหลืองอ่อน (*Lilium hybrida*) cv. Connecticut King ดอกสีเหลืองอ่อน พบว่า มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* น้อย ทูกระยะการพัฒนาดอก แต่ในดอกกลีตีดอกสีชมพู cv. Montreux มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* น้อยในระยะดอกตูม และมีปริมาณการแสดงออกมากขึ้นเมื่อดอกบาน รูปแบบการแสดงออกของยีน *CHS* ในดอกบัวหลวงตัดตบงกชสีชมพู คล้ายกับที่รูปแบบในดอกพิทูเนีย ในการศึกษาของ To and Wang (2006) พบว่า ในดอกพิทูเนียสีม่วงเข้ม (*Petunia hybrida* cv. Ultra Blue) มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากในกลีบดอกระยะดอกตูม และลดลงเมื่อดอกบาน และในการศึกษาของ Koseki *et al.* (2005) พบว่า ในดอกพิทูเนียแบบ star type สีขาว-แดง (*Petunia hybrida* cv. Red Star) กลีบดอกส่วนที่เป็นสีแดง มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากในกลีบดอกระยะดอกตูม และลดลงเมื่อดอกบาน รูปแบบการแสดงออกของยีน *CHS* คล้ายกับการแสดงออกในกลีบดอกบัวหลวงตัดตบงกชสีชมพู แต่ในกลีบดอกสีขาว กลับมีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* น้อยในทุกระยะการพัฒนาดอก การแสดงออกของยีนคล้ายกับในกลีบดอกบัวหลวงบุณทริกสีขาว ตัวอย่างรูปแบบการแสดงออกของยีน *CHS* ของพืชอื่นที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ เช่น ในการศึกษาของ Nakatsuka *et al.* (2005) พบว่า ในดอก gentian (*Gentiana triflora*) cv. Maciry ดอกสีน้ำเงินเข้ม มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มาก และปริมาณคงที่ในทุกระยะการพัฒนาดอก ส่วน cv. Homoi ดอกสีขาว และ cv. Polano White ดอกสีขาวเหลืองชมพู มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากในกลีบดอกระยะดอกตูม และลดลงเมื่อดอกบาน ในการศึกษาของ Han *et al.* (2005) พบว่า ในดอกกล้วยไม้ *Phalaenopsis hybrida* cv. Formosa rose ดอกสีชมพู มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากในกลีบดอกระยะดอกตูม และลดลงเมื่อดอกบาน ในการศึกษาของ วิจารณ์ และคณะ (2555) พบว่า ในกล้วยไม้หวาย *Dendrobium* spp. cv. Kaosaman ดอกสีขาว มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากในกลีบดอกระยะดอกตูม และลดลงเมื่อดอกบาน แต่ในกล้วยไม้หวาย *Dendrobium* spp. cv. Red bull ดอกสีแดง มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* น้อยมากในระยะดอกตูม และมีปริมาณการแสดงออกเพิ่มขึ้น เมื่อดอกเริ่มบาน ในการศึกษาของ Mato *et al.* (2000) พบว่า ในดอกคาร์เนชั่น Sim carnations (*Dianthus caryophyllus*) ดอกสีขาวและสีขาวข้าง มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากในกลีบดอกระยะดอกตูม และลดลงเมื่อดอกบาน แต่ในดอกสีแดงเข้ม มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มาก และปริมาณคงที่ในทุกระยะการพัฒนาดอก

การที่ดอกบัวหลวงมีดอกสีขาวและสีชมพูเกี่ยวข้องกับแสดงออกของยีนหลายยีนในกระบวนการ flavonoids biosynthesis (Koseki *et al.* 2005, Ohno *et al.* 2011) ในดอกไม้หลายชนิดที่มีสี มีการสะสมสาร flavonoids มากกว่าในดอกที่มีสีขาว และพบว่าการแสดงออกของยีน *CHS* และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ flavonoids biosynthesis ในดอกไม้สีขาว มีการแสดงออกของยีน *CHS* น้อยมากหรือไม่มีเลย จึงทำให้ดอกไม้ไม่มีสีหรือมีสีขาว (Koseki et al., 2005, Ohno et al., 2011) การเพิ่มหรือลดปริมาณ mRNA ของยีน *CHS* อาจมีผลทำให้ดอกไม้มีสีที่เปลี่ยนไปจากเดิมได้ (Forkmann & Martens, 2001, Nakasuka et al., 2008) หรือทำให้สีของผลไม้เปลี่ยนแปลงไปได้ (Hoffmann et al. 2006) การแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงสีขาวที่มีปริมาณการแสดงออกของยีนน้อยกว่าในดอกบัวหลวงสีชมพู อาจเกิดจากเกิดการแสดงออกของยีน *CHS* ที่น้อย อาจเนื่องมาจากยีนมีการทำงานที่ผิดปกติจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ หรือกระบวนการยับยั้งการทำงานของยีนในธรรมชาติ (Tuteja et al. 2009) จึงไม่สามารถสร้าง mRNA มากพอที่จะไปสร้างเอนไซม์ *CHS* เพื่อสังเคราะห์สาร flavonoid ทำให้ไม่เกิดการสร้างสาร flavonoid หรือเกิดการสร้างสาร flavonoid น้อยมาก ทำให้ดอกบัวหลวงสีขาวไม่มีสี

5.5 การศึกษาการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ต้นบัวหลวงพันธุ์กริก และบัวหลวงราชินี ด้วยวิธียิงอนุภาค

การศึกษาการแสดงออกของยีน *CHS* ในต้นบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงราชินี ด้วยวิธียิงอนุภาค โดยใช้พลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA ที่มีบางส่วนของยีน *CHS* แบบ antisense ขนาด 331 คู่เบสที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริก และถูกควบคุมด้วย CaMV 35s promoter และ NOS terminator โดยมียีน *GFP* เป็นยีนรายงานผล และยีน *hptII* เป็นยีนคัดเลือก หลังจากการคัดเลือก และเพาะเลี้ยงบนอาหาร regeneration พบว่ามีชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงพันธุ์กริกที่ได้รับการถ่ายยีน สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหาร regeneration จำนวน 2 ต้น ทั้ง 2 ต้น พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* ที่บริเวณปลายราก และกาบใบ การเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* ในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนพบเฉพาะที่บริเวณรากและกาบใบ แต่ไม่พบในส่วนของใบและลำต้น สอดคล้องกับการทดลองของ Heidi et al. (2001) ที่พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* เฉพาะส่วนของรากและกาบใบอ่อนที่ไม่มีสีเขียว ในต้นข้าวสาลีที่ได้รับการถ่ายยีน เนื่องจากการแสดงออกของยีน *GFP* ในส่วนเนื้อเยื่อที่มีสีเขียวจะถูกคลอโรฟิลล์บดบังและดูดกลืนแสงสีน้ำเงินของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ใช้กระตุ้นให้เกิดการเรืองแสง ทำให้ไม่สามารถมองเห็นการเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จึงสามารถมองเห็นได้เฉพาะในเนื้อเยื่อที่มีคลอโรฟิลล์ น้อย หรือไม่มีคลอโรฟิลล์ เช่น ที่บริเวณราก กลีบดอก เมล็ด ต้นอ่อน แคลลัส หรือละอองเรณู (van der Geest and Petolino. 1998; Heidi et al. 2001) การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GFP* และยีน *hptII* ใน genomic DNA ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค PCR ช่วยยืนยันผลการถ่ายยีน โดยพบว่า ต้นบัวหลวงพันธุ์กริกทั้ง 2 ต้น พบการมีอยู่ของยีน *GFP* และ hygromycin ใน genomic DNA แต่เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในต้นบัวหลวง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่หรือใช้เพื่อการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บุณฑริกที่ได้รับการถ่ายยีน พบว่า ปริมาณการแสดงออกของยีน ไม่แตกต่างจากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ในต้นบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน พบว่า ต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1 พบการเรียงแสงสีเขียวของยีน *GFP* ที่บริเวณบางส่วนของราก และบริเวณกาบใบพบการมีอยู่ของยีน *GFP* และ hygromycin ใน genomic DNA แต่ปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ไม่ได้แตกต่างจากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เช่นเดียวกัน แต่ในต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2 และต้นหมายเลข R5/1 มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ลดลง ในต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2 และต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R5/1พบการมีอยู่ของยีน *GFP* และยีน *hptII* ใน genomic DNA แต่ไม่พบการเรียงแสงของยีน *GFP* การถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาคเป็นการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชโดยตรง เป็นการถ่ายยีนแบบสุ่ม ยีนอาจไม่เข้าไปที่ genomic DNA ทำให้ไม่เกิดการถ่ายยีนเมื่อเกิดการแบ่งเซลล์ เกิดการแสดงออกเพียงชั่วคราว หรือถ่ายยีนเข้าไปในบางส่วนของเนื้อเยื่อพืช เกิดพืชที่มีลักษณะ chimera และยีนที่ถ่ายเข้าไปอาจเกิดการแตกหักและเสียหายได้ ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่ไม่สมบูรณ์ ตามที่ต้องการ (Hansen and Wriqth, 1999)

ในการศึกษาของ Nakatsuka *et al.* (2008) ทำการยับยั้งการทำงานของยีนในกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoid ในต้นหรีดดอกสีน้ำเงินเข้ม (*Gentian hybrida* cv. Albireo) ด้วยเทคนิค RNAi mediated gene silencing พบว่า การยับยั้งการทำงานของยีน *CHS* ทำให้ดอกเปลี่ยนเป็นสีขาว และบางดอกมีริ้วน้ำเงินอ่อนสลับสีขาว ส่วนการยับยั้งการทำงานของยีน *anthocyanin synthase (ANS)* ทำให้ดอกมีสีน้ำเงินซีด ในการศึกษาของ Hoffmann *et al.* (2006) ทำการยับยั้งการทำงานของยีน *CHS* ด้วยเทคนิค *Agrobacterium*-infiltration โดยถ่ายยีน *CHS* แบบ RNAi เข้าไปในผลสตรอบอรี่ พบว่า สามารถยับยั้งการทำงานของยีน *CHS* ได้ มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ลดลง ทำให้ผลของสตรอบอรี่บริเวณที่ได้รับการถ่ายยีนมีสีเหลืองซีด การศึกษาของ Nakamura *et al.* (2007) พบว่า การยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNAi มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของยีน *CHS* ในดอกทอเรนเนีย (*Torenia hybrida*) มากกว่าเทคนิค antisense การศึกษาของ Ohno *et al.* (2011) ทำการถ่ายยีน *CHS* แบบ RNAi เข้าไปยับยั้งการทำงานของยีน *CHS* ในดอกรักเร่สีแดง พบว่า ดอกรักเร่มีการแสดงออกของยีน *CHS* ลดลงทำให้ดอกกลายเป็นสีขาวซีด มีปริมาณการแสดงออกของยีนเหมือนกับดอกรักเร่สีขาว แสดงให้เห็นว่า การที่ดอกไม่มีสีขาวอาจเกิดจากการทำงานที่ผิดปกติของยีน *CHS* ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์สาร chalcone เพื่อใช้ในการสังเคราะห์รงควัตถุอื่นๆ ในกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoid การถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ของต้นบัวหลวงราชินี สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *CHS* ในต้นบัวหลวงราชินี ได้ต้นบัวหลวงราชินี 2 ต้น ที่มีปริมาณการแสดงออกของยีนลดลง จึงอาจส่งผลให้ดอกบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีนมีสีชมพูลดลง ในทางตรงข้ามการกระตุ้นการทำงานของยีน (*over expression*) ของยีน *CHS* อาจทำให้ดอกบัวหลวงสีขาว มีสีเกิดขึ้นได้ ในการศึกษาของ Han *et al.* (2005) พบว่าการถ่ายยีน *CHS* แบบเต็มเส้น เข้าสู่ต้นยาสูบสามารถกระตุ้นการทำงานของยีน *CHS*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการแข่งขันเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาติให้นำไปเผยแพร่ขึ้นต้นการคำ
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่งผลให้ดอกยาสูบมีสีเข้มขึ้น จากสีปกติสีชมพู เป็นสีชมพูเข้ม บางต้นมีสีชมพูอมแดง แต่ในการศึกษาของ To and Wang. (2006) พบว่า การถ่ายยีน *CHS* แบบเต็มเส้นเพียงยีนเดียว ไม่เพียงพอในการทำให้สีของดอกยาสูบเข้มขึ้น และมีบางส่วนให้ผลตรงข้ามดอกยาสูบกลายเป็นสีขาว

ในการศึกษานี้ ทำการตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในใบและต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน เนื้อเยื่อแต่ละส่วนมีรูปแบบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน ใบของบัวหลวงมีการแสดงออกของยีนแตกต่างจากในส่วนของกลีบดอก เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ชัดเจน ต้องนำต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนไปปลูกและนำดอกบัวหลวงมาศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง และปริมาณของสาร flavonoid ที่สะสมในกลีบดอกบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนเพิ่มเติม การศึกษาการแสดง ออกของยีน *CHS* เพียงยีนเดียวในบัวหลวงยังไม่เพียงพอต่อการหาข้อสรุปบทบาทของยีน *CHS* ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีของดอกบัวหลวง ยังมียีนอีกหลายยีนในกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoid ต้องทำการศึกษาการบทบาทการทำงานของยีนอื่นเพิ่มเติมต่อไป เพื่อนำความรู้ที่ได้มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ดอกบัวหลวงให้มีสีใหม่เกิดขึ้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

ชักนำให้เกิด shoot cluster จากส่วนยอดของเอ็มบริโอของเมล็ดบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีเพื่อใช้ถ่ายยีน โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิด shoot cluster เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ได้ขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี มีกระจุกยอด เกิดขึ้นจากปลายยอดเดิมและจากบริเวณตาข้าง ยอดที่เกิดขึ้นใหม่มีกาบสีเขียวอ่อนห่อหุ้มไว้ และมีใบอ่อนขนาดเล็กสีเขียวเกิดขึ้นจากกระจุกยอด ขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริก มียอดและใบมากกว่าบัวหลวงราชินี แต่มีน้ำหนักเบาว่าบัวหลวงราชินีเล็กน้อย ระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin เพิ่มขึ้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับที่เหมาะสมในการคัดเลือก shoot cluster ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และทำให้ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีตายได้ทั้งหมดใน 8 สัปดาห์

โคลนยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ด้วยเทคนิค PCR จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกชมีขนาดเท่ากัน คือ 1,599 คู่เบส ประกอบด้วยส่วน exon 2 ขึ้นขนาด 178 คู่เบส และ 992 คู่เบส และมีส่วน intron ขนาด 429 คู่เบส มีส่วนที่เป็นรหัสของกรดอะมิโนขนาด 1,170 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 389 กรดอะมิโน ส่วนยีน *CHS* ที่โคลนจาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงทั้ง 2 ชนิด มีขนาดเท่ากัน คือ 1,170 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 389 กรดอะมิโน มีความเหมือนกันร้อยละ 99 ในระดับนิวคลีโอไทด์ และมีความเหมือนกันร้อยละ 99 ในระดับกรดอะมิโน และการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพูมีปริมาณการแสดงออกมากกว่าดอกบัวหลวงบุณฑริกสีขาว ดอกบัวหลวงสัตตบงกชมีปริมาณการแสดงออกของยีนมากที่สุดในระยะดอกตูมขนาดเล็กและมีปริมาณลดลงเมื่อดอกพัฒนามากขึ้น แต่ดอกบัวหลวงบุณฑริกมีปริมาณการแสดงออกของยีนน้อยและมีปริมาณใกล้เคียงกันในทุกระยะการพัฒนาดอก

ถ่ายยีนบางส่วนของยีน *CHS* แบบ antisense ขนาด 331 คู่เบส ที่โคลนจาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก ที่อยู่บนพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA เข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีด้วยวิธีการยิงอนุภาค โดยใช้ระยะยิง 9 เซนติเมตร ใช้แก๊สฮีเลียม ความดัน 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และใช้อินนุภาคทองคำเป็นพาหะในการถ่ายยีน การตรวจสอบประสิทธิภาพของการถ่ายยีนจากการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *GFP* ขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริก พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* จำนวน 72 ขึ้น จากทั้งหมด 100 ขึ้น มีคะแนนประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเฉลี่ย 0.97 ± 0.20 คะแนน และขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster บัวหลวง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ราชินี พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* จำนวน 75 ชี้น จากทั้งหมด 100 ชี้น มีคะแนนประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเฉลี่ย 0.99 ± 0.17 คะแนน หลังจากการคัดเลือกมีชี้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุนนฤทธิ์รอดชีวิต จำนวน 2 ต้น และบัวหลวงราชินีมีจำนวน 5 ต้น เมื่อตรวจการแสดงออกของยีน *GPF* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการมีอยู่ของยีน *GPF* และยีน *hptII* ด้วยเทคนิค PCR พบว่า ต้นบัวหลวงบุนนฤทธิ์ทั้ง 2 ต้น พบการเรืองแสงสีเขียวยีน *GFP* ที่บริเวณรากและกาบใบ และพบการมีอยู่ของยีน *GPF* และยีน *hptII* ส่วนบัวหลวงราชินีจำนวน 3 ต้น มีการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* เป็นจุดเรืองแสงสีเขียวบริเวณใบ และราก และมีจำนวน 3 ต้นพบการมีอยู่ของยีน และพบการมีอยู่ของยีน *GPF* และยีน *hptII* ต้นบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีนมีการแสดงออกของยีน *CHS* ลดลง จำนวน 2 ต้น แต่ต้นบัวหลวงบุนนฤทธิ์และต้นบัวหลวงราชินีที่เหลือ 3 ต้น มีปริมาณการแสดงออกของยีนใกล้เคียงกับบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- จิตเกษม เทียงจิตต์. 2545. "การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลัสบัวหลวงพันธุ์บุนทรริก." ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ชัยวรกุล ไชยปัญญา. 2555. "การโคลนยีน flavanone 3-hydroxylase (F3H) จากปทุมชาติ (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) และอุบลชาติ (*Nymphaea* spp.) และการสร้างดีเอ็นเอสายผสมเพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน F3H ด้วยเทคนิค RNA interference." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตมหาวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นันทนา อังกินันท์. 2549. ฮอริโมนพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- เบญจวรรณ สุวรรณเนตย์, ราตรี คุหาพิทักษ์ธรรม, รุ่งนภา ตีโต, มัณฑนา บุญธรรม และอรวรรณ ชัชวาลการพานิชย์. 2552. "การใช้ยีน *GFP* และ *GUS* เป็นยีนรายงานผลในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ป้อมปาดัวร์." วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 40(2): 185 – 196.
- ปริมลาก ชูเกียรติมัน และ เสริมลาก วสุวัต. 2548. บัวประดับในประเทศไทย 1. พิมพ์ครั้งที่ 2 เนชั่นบุ๊ค. กรุงเทพฯ.
- ปริมลาก ชูเกียรติมัน และ เสริมลาก วสุวัต. 2549. บัวประดับในประเทศไทย 2. พิมพ์ครั้งที่ 1 เนชั่นบุ๊ค. กรุงเทพฯ.
- รังสฤษฎ์ กาวีตะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลักการและเทคนิค. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- วรภรณ์ ภูตะสุน. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร: แนวทางการศึกษาเพื่อเพิ่มผลผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. โรงพิมพ์ขอนแก่นพิมพ์พัฒนา. ขอนแก่น.
- วิภารัตน์ พิทักษ์ด้านธรรม, ชีระ สุตะบุตร, พิสุวรรณ เจียมสมบัติ และเจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์. 2555. "การศึกษาทางชีวโมเลกุลของยีน *chalcone synthase* ในกล้วยไม้ *Dendrobium Kaosanan* และ *Dendrobium Red bull*." วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 43(1): 103 – 110.
- วิลานี ลีทวีทรัพย์. 2550. "การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น และปัจจัยแสงที่มีต่อการเกิดแคลัสของบัวหลวงพันธุ์บุนทรริกและการทดสอบความเข้มข้นสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีน." ปัญหาพิเศษปริญญาโท คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เสริมลาภ วสุวัต. 2538. บัว : ไม้ดอกไม้ประดับ. พิมพ์ครั้งที่ 3. อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ.

Angenon, G., W. Dillen and M. V. Montagu. 1994. "Antibiotic resistance markers for plant transformation." **Plant Molecular Biology**. 1: 1 – 13.

Arunyanart, S. and M. Chaitrayagun. 2005. "Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)." **Scientia Horticulturae**. 105: 411 – 420.

Bakker, P. Evert. 1992. "Aminoglycoside and aminocyclitol antibiotics: hygromycin B is an atypical bactericidal compound that exerts effects on cells of *Escherichia coli* characteristics for bacteriostatic aminocyclitols." **Journal of the Society for General Microbiology**. 138 (3): 563-569.

Bovy, A., R. de Vos, M. Kemper, E. Schijlen, M. A. Pertejo, S. Muir, G. Collins, S. Robinson, M. Verhoeyen, S. Hughes, C. Santos-Buelga and A. van Tunen. 2002. "High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes *LC* and *CI*." **Plant Cell Report**. 14: 2509 – 2526.

Buathonga, R., K. Saetiewa, S. Phansirib, N. Parinthawonga and S. Arunyanarta. 2013. "Tissue culture and transformation of the antisense *DFR* gene into lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) through particle bombardment." **Scientia Horticulturae**. 161: 216 – 222.

Chen, P., C. Wang, S. Soong and K. To. 2003. "Complete sequence of binary vector pB1121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants." **Molecular Breeding**. 11: 287 – 293.

Dao, T. T. H., H. J. M. Linthorst and R. Verpoorte. 2011. "*Chalcone synthase* and its functions in plant resistance." **Phytochemistry Reviews**. 10: 397 – 412.

Davies, K. M., S. J. Bloor, G. B. Spiller and S. C. Deroles. 1998. "Production of yellow colour in flowers: redirection of flavonoid biosynthesis in *Petunia*." **Plant Journal**. 13: 259 – 266.

Deng, M., J. Wen, J. Huo, H. Zhu, X. Dai, Z. Zhang, H. Zhou and X. Zou. 2012. "Cloning and characterization of two novel purple pepper genes (*CHS* and *F3H*)" **African Journal of Biotechnology**. 11(9): 2389 – 2397.

Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue." **Phytochemical Bulletin**. 19: 11 – 15.

Dugardeyn, J. and D. van der Straeten. 2008. "Ethylene: Fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation." **Plant Science**. 175: 59 – 70.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Forkmann, G. and S. Martens. 2001. "Metabolic engineering and applications of flavonoids." **Journal of Biotechnology**. 12: 155 – 160.
- Hall, T.A. 1999. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." **Nucleic Acids Symposium Series**. 41: 95 – 98.
- Han, Y., F. Ming, J. Wang, M. Ye and D. Shen. 2005. "A novel chalcone synthase gene from *Phalaenopsis* orchid that alters floral morphology in transgenic tobacco plants." **Plant Molecular Biology Reporter**. 23: 193a - 193m.
- Hanssen, G. and M. Wright. 1999. "Recent advances in the transformation of plants." **Trends in Plant Science**. 4: 226 – 231.
- Heidi, F. K., A. R. Carlson and G. K. Menon. 2001. "Routine utilization of green fluorescent protein as a visual selectable marker for cereal transformation." **In Vitro Cellular and Developmental Biology**. 37(2): 120 – 126.
- Hoffmann, T., G. Kalinowski and W. Schwab. 2006. "RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*) by agro-infiltration: a rapid assay for gene function analysis." **The Plant Journal**. 48: 818 – 826.
- Joseph, M. J. and P. N. Joseph. 2000. "Mechanism of *chalcone synthase*; pKa of the catalytic cysteine and the role of the conserved histidine in a plant *polyketide synthase*." **The Journal of Biological Chemistry**. 275(50, 15); 39640 – 39646.
- Katsumoto, Y. M. Mizutani, Y. Fukui, F. Brugliera, T. Holton, M. Karan, N. Nakamura, K. Yonekura-Sakakibara, J. Togami, A. Pigeaire, G. Q. Tao, N. Nehra, C. Y. Lu, B. Dyson, S. Tsuda, T. Ashikari, T. Kusumi, J. Mason and Y. Tanaka. 2007. "Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin." **Plant Cell Physiology**. 48: 1589 – 1600.
- Kim, S. H., J. R. Lee, S. T. Hong, Y. Keun Y., G. An and S. R. Kim. 2003. "Molecular cloning and analysis of anthocyanin biosynthesis genes preferentially expressed in apple skin." **Plant Science**. 165: 403 – 413.
- Koseki, M., K. Goto, C. Masuta and A. Kanazawa. 2005. "The star-type color pattern in *Petunia hybrida* 'Red Star' flowers is induced by sequence-specific degradation of *chalcone synthase* RNA." **Plant Cell Physiology**. 46(11): 1879 – 1883.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Les., H. D., K. G. Denise and F. W. Charles. 1991. "Molecular evolutionary history of ancient aquatic angiosperms." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 88: 10119 – 10123.
- Lo, C., R. C. Coolbaugh and R. L. Nicholson. 2002. "Molecular characterization and *in silico* expression analysis of a chalcone synthase gene family in *Sorghum bicolor*" **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 61(3): 179 – 188.
- Maria, A. B., S. Shoji, K. Fredrick and J. H. D. Cate. 2008. "Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis RNA" **RNA Society**. 14: 1590 – 1599.
- Mato, M., T. Onozaki, Y. Ozeki, D. Higeta, Y. Itoh, Y. Yoshimoto, H. Ikeda, H. Yoshida and M. Shibata. 2000. "Flavonoid biosynthesis in white-flowered Sim carnations (*Dianthus caryophyllus*)." **Scientia Horticulturae**. 84(3–4): 333 – 347.
- Matsubara, K., S. Kei, M. Koizumi, H. Kodama and T. Ando. 2012. "RNA silencing in white petunia flowers creates pigmentation patterns invisible to the human eye." **Journal of Plant Physiology**. 169(9): 920 – 923.
- Mello-Farias, P. C. and A. L. S. Chaves. 2008. "Advanced in *Agrobacterium*-mediated plant transformation with emphasis on soybean." **Science and Agricultural**. 65(1): 95 – 106.
- Men, S., X. Ming, Y. Wang, R. Liu, C. Wei and Y. Li. 2003. "Genetic transformation of two species of orchid by biolistic bombardment." **Plant Cell Report**. 21: 592 – 598.
- Meng, Z. H., A. H. Liang and W. C. Yang. 2007. "Effects of hygromycin on cotton cultures and its application in *Agrobacterium*-mediated cotton transformation." **In Vitro Cellular and Developmental Biology.(Plant)**. 43:111 – 118.
- Mol, J., E. Cornish, J. Mason and R. Koes. 1999. "Novel coloured flowers." **Current Opinion in Biotechnology**. 10: 198 – 201.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture." **Plant Physiology**. 15: 473 – 497.
- Nakamura, N., M. Fukuchi-Mizutani, K. Miyazaki, K. Suzuki and Y. Tanaka. 2007. "RNAi suppression of the anthocyanidin synthase gene in *Torenia hybrida* yields white flowers with higher frequency and better stability than antisense and sense suppression." **Plant Cell Report**. 26: 1951 – 1959.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nakatsuka, A., Y. Izumi and M. Yamagishi. 2003. "Spatial and temporal expression of *chalcone synthase* and *dihydroflavonol 4-reductase* genes in the Asiatic hybrid lily." **Plant Science**. 165(4): 759 – 767.

Nakatsuka, T., K. Mishiba, Y. Abe, A. Kubota, Y. Kakizaki, S. Yamamura and M. Nishihara. 2008. "Flower color modification of gentian plants by RNAi-mediated gene silencing." **Plant Biotechnology**. 25: 61 – 68.

Nakatsuka, T., M. Nishihara, K. Mishiba and S. Yamamura. 2005. "Two different mutations are involved in the formation of white-flowered gentian plants." **Plant Science**. 169: 949 – 958.

Ohno, S., M. Hosokawa, M. Kojima, Y. Kitamura, A. Hoshino, F. Tatsuzawa, M. Doi and S. Yazawa. 2011. "Simultaneous post-transcriptional gene silencing of two different chalcone synthase genes resulting in pure white flowers in the octoploid dahlia." **Planta** 34(5): 945-958.

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." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 103 (29): 11075 – 11080.

Parveez, G. K. A., M. K. U. Chowdhury and N. M. Saleh. 1996. "Determination of minimal inhibitory concentration of selection agents for oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. transformation." **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**. 4: 219 – 228.

Ribas, A. F., E. Dechamp, A. Champion, B. Bertrand, M. C. Combes, J. L. Verdeil, F. Lapeyre, P. Lashermes and H. Etienne. 2011. "Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures." **Plant biology**. 11: 92

Ryder, T. B., S. A. Hedrick, J. N. Bell, X. W. Liang, S. D. Clouse and C. J. Lamb. 1987. "Organization and differential activation of a gene family encoding the plant defense enzyme chalcone synthase in *Phaseolus vulgaris*." **Molecular Genetic**. 210(2): 219 – 33.

Saetiew, K., W. Leethaweewsup, N. Parinthawong, and S. Arunyanart. 2014. "Transformation of

antisense *dihydroflavonol 4-reductase* (*DFR*) gene into scard lotus 'Buntharik' using *Agrobacterium*-mediated gene transfer." **ISHS Acta Horticulturae**. 1025: 99 – 106.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. **Molecular cloning: A laboratory manual**. Volume 1, 2 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY., USA.
- Sreeramanan, S., M. Maziah, M. P. Abdullah, N. M. Rosli and R. Xavier. 2006. "Potential Selectable Marker for Genetic Transformation in Banana." **Biotechnology**. 5: 189–197.
- Suh, D. Y., K. Fukuma, J. Kagami, Y. Yamazaki, M. Shibuya, Y. Ebizuka and U. Sankawa. 2000. "Identification of amino acid residues important in the cyclization reactions of *chalcone* and *stilbene synthases*." **Biochemistry Journal**. 350: 229–235.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods." **Molecular Biology and Evolution**. 28(10): 2731–2739.
- Tanaka, Y., Y. Katsumoto, F. Brugliera and M. John. 2005. "Genetic engineering in floriculture." **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 80: 1–24.
- To, K. Y. and C. K. Wang. 2006. "Molecular Breeding of Flower Color." **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology**. 1: 300–310.
- Todd, J. J. and L. O. Vodkin. 1996. "Duplications that suppress and deletions that restore expression from a *chalcone synthase* multigene family." **Plant Cell**. 8: 687–699.
- Todd, R. and W. B. Tague. 2000. "*Phosphomannose isomerase*: a versatile selectable marker for *Arabidopsis thaliana* germ-line transformation." **Plant Molecular Biology Report**. 19: 307–319.
- Torregrosa, L. G. Lopez and A. Bouquet. 2000. "Antibiotic sensitivity of grapevine: a comparison between the effect of hygromycin and kanamycin on shoot development of transgenic 110 Richter rootstock (*Vitis berlandieri* × *Vitis rupestris*)." **South African Journal for Enology and Viticulture**. 21(1): 32–39.
- Tsuda, S., Y. Fukui, N. Nakamura, Y. Katsumoto, K. Yonekura-Sakakibara, M. Fukuchi-Mizutani, K. Ohira, Y. Ueyama, H. Ohkawa, T. A. Holton, T. Kusumi and Y. Tanaka. 2004. "Flower color modification of *Petunia Hybrid* commercial varieties by metabolic engineering." **Plant Biotechnology** 21: 377–386.
- Tuteja, J. H., Z. Gracia, K. Varala, M. Hudson and L. O. Vodkin. 2009. "Endogenous, tissue-specific short interfering RNAs silence the chalcone synthase gene family in *Glycine max* seed coats." **Plant Cell Report**. 21: 3063–3077.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- van der Geest, A. H. M. and J. F. Petolino. 1998. "Expression of a *modified green fluorescent protein* gene in transgenic maize plants and progeny." **Plant Cell Reports**. 17(10): 760 – 764.
- Wang, C. K., P. Y. Chen, H. M. Wang and K. Y. To. 2006. "Co-suppression of tobacco *chalcone synthase* using *Petunia chalcone synthase* construct results in white flowers." **Botanical Studies**. 47: 71 – 82.
- Wei, Y. Z., F. C. Hu, G. B. Hu, X. J. Li, X. M. Huang and H. C. Wang. 2011. "Differential expression of anthocyanin biosynthetic genes in relation to anthocyanin accumulation in the pericarp of *Litchi Chinensis* Sonn." **PLoS ONE**. 6(4): e19455.
- Winkel – Shirley, B. 2001. "Flavonoid biosynthesis; A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology." **Plant Physiology**. 126: 485 – 493.
- Yee, N., J. O. Abdullah, M. Mahmood and N. Basiron. 2008. "Co-transfer of *gfp*, *CHS* and *hptII* genes into *Oncidium Sharry Baby* PLB using the biolistic gun." **African Journal of Biotechnology** .7(15): 2605 – 2617.
- Yu, A. Q., C. C. Dong, G. L. Li, and Z.L. Hu. 2009. "Molecular cloning, sequencing and analysis of *chalcone synthase* gene family based on *Nelumbo nucifera* (lotus)." Submitted Key Lab of the Ministry of Education for Plant Developmental Biology, College of Life Science, Wuhan University, Wuhan, Hubei, China.
- Zhu, M., X. Zheng, Q. Shu, H. Li, P. Zhong, H. Zhang, Y. Xu, L. Wang and L. Wang. 2012. "Relationship between the composition of flavonoids and flower colors variation in tropical water lily (*Nymphaea*) cultivars." **PLoS ONE**. 7: e34335.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962.)

1.1.1 การเตรียม Stock solution ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเตรียม Stock solution ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS โดยเตรียมส่วนของ Macroelements (MS1-MS5) ให้มีความเข้มข้น 10 เท่า ของความเข้มข้นที่ต้องการใช้ และส่วนของ Microelements (MS6-MS8) ให้มีความเข้มข้น 100 เท่า ดังตารางด้านล่าง

MS	สารเคมี	ความเข้มข้น (mg/L)	ความเข้มข้นของ stock solution (g/L)	ปริมาตรของ stock solution
Macroelements			(100 เท่า)	
MS1	NH_4NO_3	1,650.00	16.50	100 มิลลิลิตร
MS2	KNO_3	1,900.00	19.00	100 มิลลิลิตร
MS3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	450.00	4.50	100 มิลลิลิตร
MS4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.00	3.70	100 มิลลิลิตร
MS5	KH_2PO_4	170.00	1.70	100 มิลลิลิตร
Microelements			(10 เท่า)	
MS6	$\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	86.0	8.60	10 มิลลิลิตร
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	2.23	
	H_3BO_3	6.2	0.62	
	KI	0.83	0.083	
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.025	
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.0025	
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.0025	
Microelements			(10 เท่า)	
MS7	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.30	3.73	10 มิลลิลิตร
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85	2.785	
Organic nutrients			(10 เท่า)	
MS8	Myo-inositol	100.0	10.0	10 มิลลิลิตร
MS8	Nicotinic acid	0.5	0.05	
	Pyridoxine.HCl	0.5	0.05	
	Thiamine.HCl	0.1	0.01	
	Glycine	2.0	0.2	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS

ตวง Stock solution ส่วนของ Macroelements (MS1 - MS5) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ ส่วนของ Microelements (MS6 - MS8) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปให้มีปริมาตร ประมาณ 800 มิลลิลิตร เติมน้ำตาล sucrose ลงไป 30 กรัม ใช้แท่งแก้วคนจนละลายหมด ปรับ pH ให้มีค่าประมาณ 5.5 - 5.7 ด้วยสารละลาย NaOH 1 นอร์มอล และสารละลาย HCl 1 นอร์มอล ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เติม agarose agar ลงไป 8 กรัมต่อลิตร นำอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เทใส่จานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร จานละประมาณ 25 - 30 มิลลิลิตรในตู้ปลอดเชื้อ ทิ้งให้อาหารเย็นและอุ่นแข็งตัว เก็บใส่ในถุงพลาสติกใสที่สะอาด เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.1.3 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์

ตวง Stock solution ส่วนของ Macroelements (MS1 - MS5) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ ส่วนของ Microelements (MS6 - MS8) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 1,000 ไมโครโมลาร์ ลงไป 40 มิลลิลิตร และ TDZ เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ลงไป 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำตาล sucrose 30 กรัม คนให้ละลาย แล้วปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 5.5 - 5.7 ด้วย NaOH เข้มข้น 1 โมลาร์ ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เติม agarose agar 8 กรัมต่อลิตร แบ่งใส่ขวดขนาด 1 ลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นรอให้อาหารเย็นลง อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทอาหารลงในจานแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 25 มิลลิลิตรต่อจานแก้ว เมื่ออาหารแข็งตัว เก็บจานแก้วที่มีอาหารไว้ในถุงพลาสติกสะอาด เก็บอาหารไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.1.4 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์

ตวง Stock solution ส่วนของ Macroelements (MS1 - MS5) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ ส่วนของ Microelements (MS6 - MS8) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 1,000 ไมโครโมลาร์ ลงไป 50 มิลลิลิตร เติมน้ำตาล sucrose 30 กรัม คนให้ละลาย แล้วปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 5.5 - 5.7 ด้วย NaOH เข้มข้น 1 โมลาร์ ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เติม agarose agar 8 กรัมต่อลิตร แบ่งใส่ขวดขนาด 1 ลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ โดยใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นรอให้อาหารเย็นลง อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทอาหารลงในจานแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 25 มิลลิลิตรต่อจานแก้ว เมื่ออาหารแข็งตัว เก็บจานแก้วที่มีอาหารไว้ในถุงพลาสติกสะอาด เก็บอาหารไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย Luria-Bertani (LB)

1.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani agar ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Tryptone	10	กรัม
Yeast-extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani broth ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Tryptone	10	กรัม
Yeast-extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 การเตรียมบัฟเฟอร์ CTAB ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร (Doyle and Doyle, 1987)

สารละลาย Tris buffer pH 8.0	เข้มข้น 1 โมลาร์	100 มิลลิลิตร
สารละลาย NaCl	เข้มข้น 5 โมลาร์	280 มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA	เข้มข้น 0.5 โมลาร์	40 มิลลิลิตร
สาร CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)		20 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เมื่อนำบัฟเฟอร์ไปใช้สกัด DNA ให้เติมสาร polyvinylpyrrolidone มวลโมเลกุล 40,000 (PVP-40) 4 กรัม และสาร β -mercaptoethanol 500 ไมโครลิตร ต่อปริมาตรสารละลายบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้)

1.4 การเตรียมสารละลาย TE (Tris - EDTA) buffer

สารละลาย Tris - HCl pH 8.0 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ 1000 ไมโครลิตร

สารละลาย EDTA pH 8.0 เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ 100 ไมโครลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิตรนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

1.5 การเตรียมสารละลาย TAE (Tris acetate EDTA) buffer

1.5.1 การเตรียมสารละลาย 50X TAE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Tris-base	242	กรัม
Acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	700	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันและปรับปริมาตรของสารละลายให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที Acetic acid เป็นกรดเข้มข้น ควรใส่ถุงมือกันกรด และเตรียมภายในตู้ดูดควัน

1.5.2 การเตรียมสารละลาย 0.5X TAE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ตวงสารละลาย 50x TAE buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อยีน	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' - 3')	ขนาดของ ผลผลิต PCR
<i>CHS</i> แบบเต็มเส้น	CHSF_forward	AGGATCCATGGTGACCGTGG	1,170 คู่เบส
	CHSF_reverse	AGAGCTCGCATCTCTCTCTAGGC	(cDNA)
	CHSF_forward	AGGATCCATGGTGACCGTGG	1,599 คู่เบส
	CHSF_reverse	AGAGCTCGCATCTCTCTCTAGGC	(genomic DNA)
<i>CHS</i> แบบบางส่วน	CHSA_forward	AAGAGCTCCCGTCAAGAGACTCA	458 คู่เบส
	CHSA_reverse	AAGGATCCCAGAAAATTGAGTTC	(cDNA)
<i>18S rRNA</i>	18S_forward	GGCTCGAAGACGATCAGATACCG	600 คู่เบส
	18S_reverse	GTACAAAGGGCAGGGACGTAGTCAA	
<i>hptII</i>	Hygro_forward	ATTGACCGATTCCTTGCGGT	300 คู่เบส
	Hygro_reverse	GAGGGCGTGGATATGTCCTG	
<i>GFP</i>	GFP_forward	GGAGAGGGTGAAGGTGATGC	400 คู่เบส
	GFP_reverse	TGCCGTTCTTTTGCTTGTCG	
CaMV promoter	CAMV_forward	AGACCCTTCCTCTATATAAG	-
NOS terminator	NOS_reverse	CGTTTGATCCTATTTAATAG	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นายปฤษฎางค์ อะโน
วัน เดือน ปีเกิด	18 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2525
ที่อยู่ปัจจุบัน	1/104 ถนนอังสิตา หมู่ 5 ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2546 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ทุนวิจัยที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ภายใต้โครงการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยวิธีตัดแต่งพันธุกรรม ทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)
ผลงานทางวิชาการ	ปฤษฎางค์ อะโน, สุเมธ อรัญนารถ, นงลักษณ์ เกรินทวงศ์ และกัญญา แซ่เตียว. "การโคลนยีน <i>chalcone synthase (CHS)</i> จากกลีบดอกบัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.) และอุบลชาติส้มลูก (<i>Nymphaea</i> spp.)." วารสารเกษตรนเรศวร ปีที่ 15 ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม - มิถุนายน 2556.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้