



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยวิธีตัดแต่งพันธุกรรม

Improvement of Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) through Gene Transformation

นางสาวกัญญา แซ่เตียว

นางสาวสุเม อรัญนารถ

นางสาวนงลักษณ์ เกรินทวงศ์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากกองทุนวิจัย สจล ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยวิธีตัดแต่งพันธุกรรม
Improvement of Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) through Gene
Transformation

นางสาวกัญญา แซ่เตี่ยว
นางสาวสุเม อริญารถ
นางสาวนงลักษณ์ เกรินทวงศ์

1283046X

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากกองทุนวิจัย สจล ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยวิธีตัดแต่งพันธุกรรม

แหล่งเงิน กองทุนวิจัย สจล

ประจำปีงบประมาณ 2553 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 2987000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 5 ปี ตั้งแต่ มกราคม 2553 ถึง ธันวาคม 2558

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด

นางสาวกัญญา แซ่เตียว คณะเทคโนโลยีการเกษตร

นางสาวสุเม อรัญนารถ คณะเทคโนโลยีการเกษตร

นางสาวนงลักษณ์ เภรินทวงศ์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร

บทคัดย่อ

การปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยวิธีการตัดแต่งพันธุกรรม โดยการโคลนยีน *chalcone synthase* (*CHS*) จาก genomic DNA และ cDNA ที่สกัดจากกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์ และบัวหลวงตัดตบงกช ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากข้อมูลในธนาคารยีน (GenBank) ได้ยีน *CHS* แบบเต็มเส้นที่โคลนจาก genomic DNA และ cDNA มีขนาด 1,599 คู่เบส และ 1,170 คู่เบส ตามลำดับ ยีน *flavonone 3-hydroxylase* (*F3H*) โคลนจาก cDNA ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์ โกลด์ (*Nymphaea hybrid* 'St. Louise Gold') บัวหลวงตัดตบงกช และพันธุ์ ยีน *F3H* ที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 1,134 คู่เบส แปรรหัสให้โปรตีนที่มีขนาด 377 กรดอะมิโน และโคลนยีน *chalcone 4'-O-glucosyltransferase* (*4'CGT*) จากบัวหลวงพันธุ์ และ กลีบดอกลิ้นมังกรพันธุ์ Pixie Bells สีเหลืองซึ่งมีการแสดงออกของยีน *4'CGT* มากที่สุด รองลงมาคือดอกสีส้ม แดง ขาว ชมพู และม่วง ตามลำดับ ได้ชิ้นส่วนยีน *4'CGT* ขนาด 313 คู่เบส จาก cDNA ของกลีบดอกลิ้นมังกร จากนั้นศึกษาการแสดงออกของยีน *CHS*, *F3H*, *4'CGT* ด้วยเทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ศึกษาการแสดงออกของยีน *CHS*, *F3H*, *4'CGT* ในบัวหลวง อุบลชาติ หรือลิ้นมังกร ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR พบว่าดอกบัวหลวงตัดตบงกชมีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากที่สุดในกลีบดอก และมีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากที่สุดในช่วงระยะดอกตูมขนาดเล็ก และลดลงเมื่อดอกมีการพัฒนามากขึ้น ดอกบัวหลวงพันธุ์มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* น้อย และมีปริมาณใกล้เคียงกันในทุกระยะการพัฒนาของดอก การแสดงออกของยีน *4'CGT* ในกลีบดอกลิ้นมังกร (*Antirrhinum majus*) สีต่างๆ ประกอบด้วย สีส้ม สีชมพู สีแดง สีม่วง สีขาวและสีเหลือง พบว่าดอกสีเหลืองมีการแสดงออกของยีน *4'CGT* มากที่สุด รองลงมาคือดอกสีส้ม แดง ขาว ชมพู และม่วง ตามลำดับ ส่วนยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของดอกบัวอุบลชาติพบว่า มีการแสดงออกมากที่สุดในเนื้อเยื่อกลีบดอก เกสร และใบ ตามลำดับ และตรวจพบการแสดงออกของยีน *F3H* ในกลีบดอกอุบลชาติสีม่วง ฟ้า ชมพู เหลือง และชมพูอมส้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับชักนำเนื้อเยื่อ shoot cluster จากส่วนปลายยอดของเอ็มบริโอของเมล็ดบัวหลวงเพื่อใช้ถ่ายยีน พบว่าปลายยอดของเอ็มบริโอเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ได้ shoot cluster ที่มีลักษณะเป็นชิ้นเนื้อเยื่อที่มีกระจุกยอด เกิดขึ้นจากปลายยอดเดิมและจากบริเวณตาข้าง ยอดที่เกิดขึ้นใหม่มีกาบสีเขียวอ่อนห่อหุ้มไว้ และมีใบอ่อนขนาดเล็กสีเขียวเกิดขึ้นจากกระจุกยอด และเมื่อถ่ายยีน antisense *DFR*, antisense *CHS* เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ด้วยวิธีการยิงอนุภาค และการใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ พบว่าวิธีการถ่ายยีนโดยการยิงอนุภาค การใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมขนาด 1100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร ให้ผลการถ่ายยีนแบบถาวรดีที่สุด และยืนยันผลด้วยเทคนิค RT-PCR



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Improvement of Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) through Gene Transformation

Researcher: Miss Kanjana Saetiew
Miss Sumay Arunyanart
Miss Nongluk Parinthawong

Department : Plant Production Technology

Faculty: Agricultural Technology

ABSTRACT

Lotus improvement was used gene transformation. *Chalcone synthase (CHS)* gene was clone from genomic DNA and cDNA of Buntharik and Satabankacha 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. Full length cDNA of flavanone 3-hydroxylase (*F3H*) gene was cloned from tropically waterlily cv. St. Louise Gold (*Nymphaea* hybrid St. "Louise Gold"), Satabankacha and Buntharik lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). Using degenerate primers based on conserved regions of *F3H* available from GenBank, gene working and polymerase chain reaction (PCR) technique, the *F3H* with ORF of 1,134 nucleotides which encodes for 377 amino acids was obtained. The fragment of 313 bp of *4'CGT* gene was cloned from cDNA of snapdragon var. Pixie Bells. Gene expression analysis using reverse transcription PCR (RT-PCR) technique were conducted in order to analyze expression of *CHS*, *F3H* and *4CGT* in lotus, waterlilies and snapdragon. Semi-quantitative RT-PCR analysis of Satabankacha revealed that highest *CHS* gene expression was found in early budding stage and was reduced in later stages. Whereas, the expression in Buntharik lotus was low in all stage of the lotus development. Expression study of the *4'CGT* gene in various color of snapdragon flower (*Antirrhinum majus*) was conducted using gene specific primers designed from database in GenBank. The highest expressed of *4'CGT* gene was found in yellow, orange, red, white, pink and violet flower, respectively. Gene expression analysis in different tissue of waterlily showed that expression of *F3H* was more abundant in petals than anthers and leaves and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

the present of F3H mRNA was detected in all petals with different colors of waterlily including purple, blue pink, yellow and pinkish orange.

Shoot tips from the embryos of 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 transformation of lotus Buntharik by particle bombardment device model Biolistic[®] PDS-1000/He Particle Delivery System (BioRad) was optimized. Stable transformation of particle bombardment procedure demonstrated that the helium gas pressure of 1,100 psi and the target distance of 9 cm were confirmed by polymerase chain reaction and reverse transcription polymerase chain reaction techniques.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะเทคโนโลยีการเกษตรสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง หน่วยงานต้นสังกัดของคณะผู้วิจัย ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือในการทำวิจัย และทุนสนับสนุนนักศึกษาผู้ช่วยวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากกองทุนวิจัย สจล ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553



นางสาวกัญญา แซ่เตียว
นางสาวสุเม อรัญนารถ
นางสาวนงลักษณ์ เภรินทวงศ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

| | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย | I |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | III |
| กิตติกรรมประกาศ | V |
| สารบัญ | VII |
| สารบัญตาราง | VIII |
| สารบัญภาพ | X |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย | 1 |
| 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย | 1 |
| 1.4 วิธีการดำเนินการวิจัย | 2 |
| 1.5 สมมุติฐานงานวิจัย | 2 |
| 1.6 กรอบแนวความคิดในการวิจัย | 2 |
| 1.7 คำสำคัญของการวิจัย | 2 |
| 1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 2 |
| บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 3 |
| 2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง | 3 |
| 2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 3 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย | 9 |
| บทที่ 4 ผลการวิจัย | 49 |
| บทที่ 5 วิจารณ์ผลการวิจัย | 163 |
| บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย | 183 |
| บทที่ 7 บรรณานุกรม | 187 |
| ภาคผนวก | |
| ภาคผนวก 1 การเตรียมสาร | 199 |
| ภาคผนวก 2 ผลงาน | 205 |
| ภาคผนวก 3 <u>สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินโครงการวิจัย</u> | 209 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|---|------|
| 4.1 | ผลการเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) ของลำดับกรดอะมิโนของ ยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวง สัตตบงกช | 58 |
| 4.2 | ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน <i>F3H</i> ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุม ชาติสัตตบงกชและปทุมชาติบุณฑริก กับฐานข้อมูลโปรตีนบน GenBank | 63 |
| 4.3 | ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน <i>F3H</i> ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ด้าน ปลาย 5' กับฐานข้อมูล GenBank | 67 |
| 4.4 | ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>F3H</i> ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ทางด้านปลาย 3' กับฐานข้อมูลโปรตีนบน GenBank | 71 |
| 4.5 | ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>F3H</i> ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุม ชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุณฑริก กับฐานข้อมูล GenBank | 78 |
| 4.6 | คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน เพอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุม การเจริญเติบโตชนิดต่างๆ | 117 |
| 4.7 | คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน เพอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอจินิกแคลลัส จำนวน ยอด ความยาวยอด จำนวนราก และความยาวราก จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตา ยอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการ เจริญเติบโตชนิดต่างๆ | 120 |
| 4.8 | ขนาดของแคลลัส จำนวนยอด และความยาวยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตา ยอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตรบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการ เจริญเติบโตชนิดต่างๆ | 124 |
| 4.9 | คะแนนการเจริญเติบโตและขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญ ปลายยอด | 126 |
| 4.10 | ขนาดเอ็มบริโอจินิกแคลลัส จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนใบ และความยาวใบ จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร | 129 |
| 4.11 | การแสดงออกของยีน <i>GUS</i> แบบ transient expression ของเนื้อเยื่อส่วนยอดของบัว หลวงพันธุ์บุณฑริกที่ถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He | 130 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|---|------|
| 4.12 | คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน จำนวนยอด ความยาวยอด และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วน จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก | 133 |
| 4.13 | จำนวนต้นบัวหลวงพันธุ์คุณทริภิกษุที่ชักนำได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อยอด และตายยอดจากคัพภะ โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He | 137 |
| 4.14 | ผลการตรวจสอบยีน <i>GUS</i> ยีน <i>NPTII</i> ยีน anti-DFR ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่ชักนำได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อยอด โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He | 138 |
| 4.15 | ผลการตรวจสอบยีน <i>GUS</i> ยีน <i>NPTII</i> ยีน anti-DFR ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่ชักนำได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อตายยอดจากคัพภะ โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He | 138 |
| 4.16 | ผลการตรวจสอบการแสดงออกของ ยีน <i>NPTII</i> ยีน anti-DFR ด้วยเทคนิค RT-PCR ที่ชักนำได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อยอด โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He | 139 |
| 4.17 | ประสิทธิภาพในการถ่ายยีน <i>CHS</i> แบบ antisense ด้วยวิธียิงอนุภาค เข้าสู่ชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงพันธุ์คุณทริภิกษุและบัวหลวงราชินี | 144 |
| 4.18 | จำนวนยอดเฉลี่ย ขนาดของ shoot cluster เฉลี่ย จำนวน shoot cluster ที่รอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตบนอาหาร | 154 |
| 4.19 | จำนวนยอดเฉลี่ยขนาดของ shoot cluster เฉลี่ยจำนวน shoot cluster ที่รอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาคบนอาหาร | 159 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 3.1 | ตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์บริเวณปลาย 5' adaptor (UPM primer) | 15 |
| 3.2 | ตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์ที่จับบนบริเวณ poly A tail (Oligo-dt primer) | 15 |
| 3.3 | โครงสร้างของพลาสมิด pJAWOHL8 | 25 |
| 3.4 | ตำแหน่งที่ฉีดเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT | 28 |
| 3.5 | พลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA | 34 |
| 3.6 | การตัดชิ้นส่วนเริ่มต้นก่อนไปจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก | 38 |
| 3.7 | แสดงการตัดชิ้นส่วนเริ่มต้นตายอดจากคัพภะของบัวหลวง | 39 |
| 3.8 | คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะของบัวหลวง | 40 |
| 3.9 | คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนเยื่อเยื่อเจริญปลายยอดของบัวหลวง | 41 |
| 3.10 | ส่วนประกอบต่างๆ ของเครื่องยิงอนุภาครุ่น PDS 1000/He | 44 |
| 4.1 | ผลผลิต PCR ของยีน <i>CHS</i> แบบเต็มเส้น | 49 |
| 4.2 | การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก และสัตตบงกช | 55 |
| 4.3 | การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก และสัตตบงกช | 56 |
| 4.4 | การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก และสัตตบงกช | 57 |
| 4.5 | ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก และบัวหลวงสัตตบงกช | 59 |
| 4.6 | ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ยีน <i>F3H</i> จาก cDNA ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์ โกลด์ | 60 |
| 4.7 | ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นส่วนยีน <i>F3H</i> ขนาด 82 นิวคลีโอไทด์ ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุณฑริก | 62 |
| 4.8 | ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้นตอน 5'RACE PCR ในการสังเคราะห์ยีน <i>F3H</i> ด้านปลาย 5' | 64 |
| 4.9 | ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้นตอนที่ 2 หรือ Nested PCR ในการสังเคราะห์ยีน <i>F3H</i> ด้านปลาย 5' ด้วยวิธี SMARTer™ RACE จากการใช้ผลผลิตพีซีอาร์ 5' RACE ของดอกลิ้นมังกร | 65 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 4.10 | ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนของยีน 5' Nested RACE <i>F3H</i> ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์ โกลด์ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pTZ57RT | 66 |
| 4.11 | ผลปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ยีน <i>F3H</i> ด้านปลาย 3' ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์ โกลด์ | 68 |
| 4.12 | ผลการตรวจสอบยีน 3' <i>F3H</i> ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ที่แทรกในเวกเตอร์ pTZ- 3' <i>F3H</i> | 69 |
| 4.13 | การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 3' <i>F3H</i> ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ | 70 |
| 4.14 | แผนภาพแสดงการรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ได้จากด้านปลาย 5' และ ด้านปลาย 3' ของยีน <i>F3H</i> ในอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ด้วยวิธีการของ SMARTer™ RACE | 72 |
| 4.15 | ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ยีน <i>F3H</i> ตามวิธีการของ SMARTer™ RACE | 73 |
| 4.16 | การตรวจสอบพลาสมิด pTZ- <i>F3H</i> full ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ | 73 |
| 4.17 | การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>F3H</i> ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุม ชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุญทวีกร | 75 |
| 4.18 | การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนโปรตีน <i>F3H</i> ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุม ชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุญทวีกรกับพืชชนิดต่างๆ | 76 |
| 4.19 | การเปรียบเทียบช่วงลำดับกรดอะมิโน domain โปรตีน 162-52 ที่ <i>F3H</i> ของอุบลชาติ เซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุญทวีกร (Lotus) กับพืชชนิดต่างๆ | 77 |
| 4.20 | การเปรียบเทียบช่วงลำดับกรดอะมิโนใน domain (207-308) โปรตีน <i>F3H</i> ของอุบลชาติ เซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุญทวีกร | 77 |
| 4.21 | ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโปรตีน <i>F3H</i> จากปทุมชาติสัตตบงกช ปทุมชาติ บุญทวีกร และอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ กับโปรตีน <i>F3H</i> จากพืชอื่นๆ | 79 |
| 4.22 | ผลปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ยีนบางส่วน 4'CGT จาก cDNA ของดอกลิ้น มังกร | 80 |
| 4.23 | แผนภาพพลาสมิด pCR8-4'CGT ที่มีขนาด 3,130 นิวคลีโอไทด์และตำแหน่ง ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI | 80 |
| 4.24 | ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน 4'CGT ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pCR8-4'CGT ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI | 81 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 4.25 | ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก; (1) cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริก | 82 |
| 4.26 | การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริก (<i>CHS_BUN</i>) ขนาด 1,170 คู่เบส กับบางส่วนของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริก (<i>CHSA_BUN</i>) และบัวหลวงสัตตบงกช | 83 |
| 4.27 | การเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> ขนาด 458 คู่เบส ในแต่ละระยะการพัฒนาของดอกบัวหลวง ด้วยเทคนิค -quantitative RT-PCR | 85 |
| 4.28 | การแสดงออกของยีน <i>F3H</i> ในกลีบดอกอุบลชาติสีต่างๆ ด้วยเทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) | 86 |
| 4.29 | ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน <i>F3H</i> ในเกสร กลีบดอก และใบ ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR | 87 |
| 4.30 | ดอกปทุมชาติสัตตบงกชและพันธุ์กริกทั้ง 3 ระยะของการพัฒนาดอก | 88 |
| 4.31 | ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน <i>F3H</i> ในเนื้อเยื่อกลีบดอกและเกสรของปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติพันธุ์กริกทั้ง 3 ระยะการพัฒนาของดอก ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR | 88 |
| 4.32 | ดอกลิ้นมังกร | 89 |
| 4.33 | เปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกลิ้นมังกร | 90 |
| 4.34 | การตรวจสอบชิ้นส่วนยีน <i>F3H</i> ของปทุมชาติสัตตบงกชที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pJAWOHL8 | 91 |
| 4.35 | แผนภาพเวกเตอร์ pJA8 <i>F3H</i> และตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III | 91 |
| 4.36 | ตำแหน่งจับของไพรมอร์ pJAintronF และไพรมอร์ pJAintronR บริเวณ intron ของเวกเตอร์ pJAWOHL8 ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเวกเตอร์ pJA8 <i>F3H</i> | 92 |
| 4.37 | การตรวจสอบการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 | 93 |
| 4.38 | ลักษณะกลีบดอกของอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสดงชีพล ภายหลังจากได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 หรือเวกเตอร์ pJA8 <i>F3H</i> ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะเป็นเวลา 3 วัน | 94 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 4.39 | การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> และ <i>F3H</i> ในกลีบดอกของอุบลชาติ ลูกผสม PW5409 และแสดงผลลัพธ์ไม่ผ่านการถ่ายโอน | 96 |
| 4.40 | ผลการตรวจสอบพลาสมิด pJA84'CGT ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III และ <i>Xba</i> I เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน | 98 |
| 4.41 | แผนภาพพลาสมิด pJA8-4'CGT แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ F-IntronpJA8 และ ไพรเมอร์ R-IntronpJA8 และตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III และ <i>Xba</i> I | 98 |
| 4.42 | ผลการตรวจสอบพลาสมิด pJA8-4'CGT ในอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 | 99 |
| 4.43 | ดอกลิน้มังกรที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4'CGT ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีอะ โกรแบคทีเรียเป็นพาหะเป็นเวลา 3 วัน | 100 |
| 4.44 | ผลเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกลิน้มังกรที่ผ่านการถ่ายโอน พลาสมิด pJAWOHL8 | 101 |
| 4.45 | การตรวจสอบพลาสมิดด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Sac</i> I | 103 |
| 4.46 | การตรวจสอบพลาสมิด pBI121DFR ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI <i>Sac</i> I <i>Xba</i> I และ <i>Nco</i> I | 103 |
| 4.47 | พลาสมิด pCAMBIA2301 และ pBI121DFR ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ <i>Eco</i> RI และ <i>Hind</i> III | 104 |
| 4.48 | พลาสมิด pCAMBIA2301DFR หลังจากการเชื่อมต่อด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI และ <i>Hind</i> III | 104 |
| 4.49 | โครงสร้างพลาสมิด pBI121DFR | 105 |
| 4.50 | โครงสร้างพลาสมิด pCAMBIA2301DFR | 105 |
| 4.51 | ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวง บุญทวี | 106 |
| 4.52 | ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวง บุญทวี ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Sac</i> I และ <i>Bam</i> HI | 107 |
| 4.53 | พลาสมิด pBI121 ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Sac</i> I และ <i>Bam</i> HI | 107 |
| 4.54 | การตรวจสอบยีน <i>CHS</i> ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pBICHSA ด้วยการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI และ <i>Hind</i> III | 108 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 4.55 | การตรวจสอบบางส่วนของยีน <i>CHS</i> ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pBICHS ด้วยเทคนิค PCR | 108 |
| 4.56 | พลาสมิดลูกผสม pBICHS ขนาดประมาณ 13,500 bp ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI และ <i>Hind</i> III | 110 |
| 4.57 | พลาสมิด pCAMBIA1302 ขนาดประมาณ 10,500 bp ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Eco</i> RI และ <i>Hind</i> III | 110 |
| 4.58 | การตรวจสอบบางส่วนของยีน <i>CHS</i> ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA 1302CHSA ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Sac</i> I และ <i>Bam</i> HI | 111 |
| 4.59 | การตรวจสอบบางส่วนของยีน <i>CHS</i> ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA 1302CHSA ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI และ <i>Hind</i> III | 111 |
| 4.60 | การตรวจสอบบางส่วนของยีน <i>CHS</i> ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA 1302CHSA ด้วยเทคนิค PCR | 112 |
| 4.61 | ผลการตรวจสอบยีน 4'CGT ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pCAM4'CGT ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI | 113 |
| 4.62 | แผนภาพพลาสมิด pCAM4'CGT ที่มีชิ้นส่วนของยีน 4'CGT (pCAM4'CGT) ขนาด 1,374 นิวคลีโอไทด์ | 114 |
| 4.63 | ผลการตรวจสอบโคลินี่ที่ 1 (1) และโคลินี่ที่ 2 (2) ของเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่เตรียมด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-CaMV และ R-NOS เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder | 114 |
| 4.64 | ลักษณะแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบจากคัพพะบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ | 116 |
| 4.65 | ลักษณะเอมบริโอจินิกแคลลัส ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพพะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตรบนอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ | 119 |
| 4.66 | ลักษณะยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพพะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตรบนอาหารแข็งเวลา 8 สัปดาห์ | 119 |
| 4.67 | ลักษณะยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพพะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ | 123 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 4.68 | ลักษณะแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ | 125 |
| 4.69 | ลักษณะยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเอ็มบริโอจลินคแคลลัส บนอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ | 128 |
| 4.70 | การแสดงออกของยีน <i>GUS</i> บนชิ้นส่วนยอดของบัวหลวงบุนทรริก ที่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He ตรวจสอบด้วยวิธี <i>GUS</i> histochemical assay ภายหลังจากการถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วัน | 131 |
| 4.71 | ตำแหน่งการเข้าจับของคูไพรเมอร์ต่างๆของยีน <i>NPTII</i> ยีน <i>GUS</i> และยีน <i>anti-DFR</i> ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ | 134 |
| 4.72 | ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ <i>GUS</i> และไพรเมอร์ <i>NPTII</i> | 135 |
| 4.73 | ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ <i>CaMV35S</i> และ <i>NOS</i> | 136 |
| 4.74 | ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ <i>NPTII</i> และไพรเมอร์ <i>DFR</i> | 140 |
| 4.75 | การแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน <i>GFP</i> (ลูกศร) ของต้นบัวหลวงบุนทรริก หลังจากการถ่ายยีน ต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน | 143 |
| 4.76 | ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนหลังจากการคัดเลือกเป็นเวลา 10 สัปดาห์ | 145 |
| 4.77 | ต้นบัวหลวงบุนทรริกที่ได้รับการถ่ายยีน | 145 |
| 4.78 | ต้นบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน | 146 |
| 4.79 | การแสดงออกของยีน <i>GFP</i> ของต้นบัวหลวงราชินี หมายเลข R2/11 | 146 |
| 4.80 | ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>GFP</i> และยีน <i>hptII</i> ใน genomic DNA ของต้นบัวหลวงบุนทรริกที่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค PCR | 149 |
| 4.81 | ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>GFP</i> และยีน <i>hptII</i> ใน genomic DNA ของต้นบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน <i>CHS</i> ด้วยเทคนิค PCR | 149 |
| 4.82 | การศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> ในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR | 151 |
| 4.83 | การเจริญเติบโตของชิ้นส่วน shoot cluster ของบัวหลวงบนอาหารคัดเลือกภายหลังจากการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย | 153 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 4.84 | shoot cluster ของบัวหลวงบนอาหารชักนำสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ภายหลังจากถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT | 155 |
| 4.85 | ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน 4'CGT, GUS และ NPTII ด้วยเทคนิค RT-PCR ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ | 156 |
| 4.86 | ผลเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน CHS และยีน F3H ในต้นบัวหลวงที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT (ต้นที่ 19, 29 และ 43) โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ | 157 |
| 4.87 | การเจริญเติบโตของshoot cluster ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT แบบการยิงอนุภาค | 158 |
| 4.88 | ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนยีนแบบการยิงอนุภาค อายุ 32 สัปดาห์ | 160 |
| 4.89 | ผลการสังเคราะห์ยีน 4'CGT, GUS และ NPTII ด้วยเทคนิค RT-PCR จาก cDNA ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT ด้วยวิธีการยิงอนุภาค | 161 |
| 4.90 | ผลเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน CHS และยีน F3H ในต้นบัวหลวงที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT ด้วยวิธีการยิงอนุภาค | 161 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) หรือปทุมชาติ เป็นไม้ตัดดอกที่มีรูปทรงสวยงาม และกำลังได้รับความนิยมจากเกษตรกรเป็นอย่างมาก ดังจะเห็นได้จากการมีพื้นที่ปลูกบัวหลวงเชิงการค้าทั่วประเทศไทย นอกจากนี้เป็นไม้ตัดดอกแล้ว บัวหลวงยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางยาได้ด้วย เช่น เกสรตัวผู้เป็นยาหอมบำรุงหัวใจ บำรุงประสาท ชูกำลัง ดีบัวมีสารอัลคาลอยด์ช่วยขยายหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงหัวใจ เมล็ดบัวช่วยบำรุงครรภ์ บำรุงกำลัง ยางจากก้านใบและดอกแก้ท้องเดิน รากบัวต้มแก้กระหายน้ำ แก้เสมหะ บัวหลวงเป็นพืชน้ำอายุหลายปี อยู่ในวงศ์ Nymphaeaceae (สุชาติ, 2542) มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย เปอร์เซียตะวันออกเฉียงเหนือ จีน ทิเบต และอาจพบได้ในรัฐฮาวาย ซึ่งในประเทศไทยมีบัวหลวงเพียงชนิดเดียว มี 4 สายพันธุ์ คือ บุนนาค ปทุม สัตตบงกช และ สัตตบุษย์ ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีเพียง 2 สี เท่านั้นคือสีขาว และสีชมพู นอกจากนี้ยังมีรูปทรงดอกเพียง 2 แบบเท่านั้น (ปริมลภ และ เสริมลภ 2547) ทำให้ไม่สามารถพัฒนาสายพันธุ์บัวหลวงให้มีดอกสีเหลืองด้วยวิธีการผสมพันธุ์ได้ (conventional breeding) ดังนั้นการเลือกใช้เทคโนโลยีชีวภาพจึงเป็นแนวทางที่ช่วยในการตัดต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารในกลุ่ม flavonoid ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในการสร้างรงควัตถุสีเหลืองของพืชหลายชนิด (Nakayama *et al.* 2000) เข้าสู่บัวหลวง เพื่อบังคับให้บัวหลวงสร้างรงควัตถุสีเหลือง และเนื่องจากประเทศไทยยังไม่มีรายงานการศึกษากระบวนการสร้าง flavonoid หรือ anthocyanin pathway ในพืชตระกูลบัวหลวงมาก่อน งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษากระบวนการดังกล่าว เพื่อสร้างบัวหลวงสายพันธุ์สีเหลืองด้วยวิธีการตัดแต่งพันธุกรรม

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษากระบวนการสังเคราะห์รงควัตถุสีเหลืองในพืชบัวหลวง

1.2.2 เพื่อศึกษาวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง และศึกษาการแสดงออกของยีนที่ถ่ายเข้าสู่บัวหลวง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การตัดต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารในกลุ่ม flavonoid ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในการสร้างรงควัตถุสีเหลืองของพืช เข้าสู่บัวหลวง เพื่อบังคับให้บัวหลวงสร้างรงควัตถุสีเหลือง ศึกษากระบวนการสร้าง flavonoid หรือ anthocyanin pathway ในพืชตระกูลบัวหลวง งานวิจัยนี้ศึกษากระบวนการดังกล่าว เพื่อสร้างบัวหลวงสายพันธุ์สีเหลืองด้วยวิธีการตัดแต่งพันธุกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาก็เท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา¹ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

โคลนยีน *chalcone synthase (CHS)*, *flavonone 3-hydroxylase (F3H)*, และ *chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT)* จากดอกของบัวหลวง และพืชชนิดอื่น จากนั้นศึกษาการแสดงออกของยีน *CHS*, *F3H*, *4'CGT* ในปทุมชาติ อุบลชาติ และดอกลิ้นมังกรด้วยเทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ทำการเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS*, *F3H*, *4'CGT* ในปทุมชาติ อุบลชาติ หรือลิ้นมังกร ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR และ ศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* และยีน *4'CGT* ในกลีบดอกปทุมชาติ อุบลชาติ หรือลิ้นมังกร และทำการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงโดยใช้อะโกรแบคทีเรียและเครื่องยิงอนุภาค

1.5 สมมุติฐานงานวิจัย

ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสี และทำการโคลนยีน *CHS*, *F3H*, *4'CGT* ถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง เพื่อเพิ่มหรือยับยั้งการแสดงออกของยีนดังกล่าว และทำการศึกษาการแสดงออกของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน

1.6 กรอบแนวความคิดในการวิจัย

โคลนยีน *CHS*, *F3H*, *4'CGT* จากบัวหลวง บัวอุบลชาติที่มีดอกสีเหลือง และยีน *4'CGT* จากดอกลิ้นมังกรสีเหลือง เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนดังกล่าว ในกลีบดอกบัวหลวง และใช้สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงโดยวิธียิงอนุภาค และการใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ จากนั้นตรวจสอบการมีอยู่ของยีนที่ถ่ายเข้าไป และศึกษาการแสดงออกของยีนในต้นบัวหลวงที่ทำการถ่ายยีนเข้าไป

1.7 คำสำคัญของการวิจัย

บัวหลวง รงค์วัดตุลีเหลือง การโคลนยีน การถ่ายยีน

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนในดอกบัวหลวง ทราบวิธีการและขั้นตอนที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายเข้าสู่บัวหลวง ได้ต้นบัวหลวงที่ได้ทำการถ่ายยีนมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

2.1 แนวคิด ทฤษฎีหลักตามประเด็นให้ครอบคลุมเรื่องที่วิจัย

รงควัตถุ (pigment) เป็นสารที่ทำให้เกิดสีในดอกไม้ สีที่แตกต่างกันเกิดจากการสะสมรงควัตถุต่างชนิดกัน รงควัตถุที่ให้สีในดอกไม้แบ่งเป็น 3 ชนิด คือ flavonoid, carotenoid และ belalain (To and Wang. 2006) สารที่เป็นรงควัตถุในกลีบดอกไม้ที่สำคัญมี 2 สารคือ สารในกลุ่ม carotenoid ให้สีในโทนสีเหลือง สีส้ม และสีแดง และสารในกลุ่ม flavonoid เป็นรงควัตถุหลักที่สำคัญ ให้สีดอกไม้ในโทนสีที่กว้างและหลายหลายได้แก่ สีเหลือง สีส้ม สีแดง สีชมพู สีม่วง และสีน้ำเงิน (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 (Forkmann and Martens. 2001; Tanaka et al. 2008) ดังนั้นการสร้างดอกไม้สีเหลืองโดยการถ่ายยีนที่ยับยั้งการแสดงออกของ anthocyanin และทำการศึกษาถ่ายยีนเข้าสู่พืชเพื่อศึกษาการทำงานและการแสดงออกของยีนในพืช เป็นเทคนิคที่ช่วยทำให้เราสามารถเข้าใจการทำงานของยีน โดยเทคนิคที่นิยมใช้ในการถ่ายยีนในปัจจุบันมีสองเทคนิคคือ การใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ และการถ่ายยีนเข้าโดยตรงโดยการยิงอนุภาค (particle bombardment) เนื้อเยื่อพืชที่ใช้ในการถ่ายยีนสามารถใช้ชิ้นส่วนของพืชได้หลายชนิด เช่น ปลายราก ยอดอ่อน ใบอ่อน ต้นอ่อน หรือแคลลัส ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของพืชแต่ละชนิดและเทคนิคที่ใช้ในการถ่ายยีนเพื่อศึกษาต้นที่มีการแสดงออกของยีนตามต้องการต่อไป

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

Tsuda et al. (2004) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีดอกพิทูเนีย (*Petunia hybrida*) โดยยับยั้งการแสดงออกยีน *CHS* ของ *P. hybrida* พบว่าดอกพิทูเนียเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีขาว และเมื่อยับยั้งการแสดงออกยีน *F3'H* ของ *P. hybrida* ร่วมกับการเติมยีน *DFR* ที่ได้จากกุหลาบ พบว่าดอกพิทูเนียเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีส้ม และพบว่ามิดันพิทูเนียได้รับการถ่ายยีนและให้สีดอกคงที่เพียงจำนวนเล็กน้อย โดยในทางการค้าจำเป็นต้องถ่ายยีนจำนวนหลายต้นเพื่อใช้คัดเลือก phenotype และรักษาสายพันธุ์ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา³ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Davies *et al.* (2006) สังเคราะห์ยีนในกลุ่มออโรน คือ aureusidin synthase (AS) และ aureusidin 7-O-glucosyltransferase (A7GT) ที่ได้จากยีน AS ที่มีการเติมหมู่กลูโคส เป็นยีนที่ให้โหนดสีเหลืองในพืชหลายๆ ชนิด โดยทำการศึกษาในลินินมังกร (*Antirrhinum majus*) และศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี northern RNA analysis พบยีน AS แสดงออกเฉพาะในกลีบดอกและไม่พบในใบ ในช่วงการพัฒนาของดอกใน 7 ระยะ พบว่าปริมาณ AS และ A7GT เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ โดยพบปริมาณของยีน AS มากกว่า A7GT เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบสารออโรนมากที่สุดในดอกสีเหลือง รองลงมาคือดอกสีเหลืองอ่อน ส่วนดอกสีขาวไม่พบสารออโรน

Katsumoto *et al.* (2007) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอกกุหลาบ ซึ่งเป็นดอกไม้ที่ไม่พบการสะสมของแอนโทไซยานินชนิดที่เป็นอนุพันธ์ของ delphinidin จึงทำให้ดอกกุหลาบไม่มีสีน้ำเงินหรือสีม่วง เมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน DFR ในกุหลาบสายพันธุ์ที่มีสีแดง ชมพูและส้ม ซึ่งมีการสะสมของแอนโทไซยานิน ชนิด cyanidin และ pelargonidin และเติมยีน F3'5'H ที่ได้จากไวโอเลตา (*Viola odorata* L.) และยีน DFR จากไอริส (*Iris x hollandica*) เข้าไป พบว่ากุหลาบดัดแปลงพันธุกรรมมีการสะสมของแอนโทไซยานิน ชนิด delphinidin และมีสีดอกที่เป็นสีม่วงมากขึ้น

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

วิลาสินี (2554) ทำการศึกษามลของชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุญทริก ใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเป็นตายอดและก้านใบจากเอมบริโอ เพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มีสาร NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสาร TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนตายอดมีการเจริญเติบโตของแคลลัสสูงที่สุด แคลลัสที่ได้ มีลักษณะเกาะกันหลวมๆ สีเขียวฉ่ำน้ำ และตายอดสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นได้ ชิ้นส่วนก้านใบสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นได้

Han *et al.* (2005) ทำการศึกษากการแสดงออกของยีน 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 ต่างจากดอกต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนที่มีเพียงมีสีชมพูอ่อน

นอกจากนั้นยังพบว่าต้นยาสูบบางต้นที่ได้รับการถ่ายยีน มีต้นเกสรตัวผู้ที่ผิดปกติ มีลักษณะหูดสั้น และไม่เจริญเติบโต

To and Wang. (2006) ศึกษาการกระตุ้นการทำงาน (over expression) ของเอนไซม์ *CHS* โดยทำการโคลนยีน *CHS* จาก cDNA ของดอกพิททูเนียสีม่วงเข้ม (*Petunia 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) ศึกษาการสร้างดอกไม้ที่มีสีแดงโดยการดัดแปลงยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoid 2 ยีน คือ ยับยั้งการทำงานของยีน *F3'H* ด้วยเทคนิค RNAi โดยยีน *F3'H* จากต้นยาสูบ (*N. tabacum*) ร่วมกับกระตุ้นการทำงานของยีน *DFR* ที่โคลนจากต้นเยอบีรา (*Gerbera hybrida*) เพื่อทำให้เกิดการสร้างสาร pelargonidin ที่มีสีแดง-ส้ม มากขึ้น ทำการสร้างเวกเตอร์สำหรับการถ่ายยีนโดยใช้ binary vector pEB ที่มียีน *F3'Hir* และยีน *GhDFR* ที่ถูกควบคุมโดย CaMV35s promoter ถ่ายยีนเข้าสู่ต้นด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *F3'Hir* เพียงยีนเดียวดอกมีสีชมพูจางกว่าส่วนต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ส่วนต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *F3'Hir* และ *GhDFR* ร่วมกัน พบว่า ดอกมีสีที่หลากหลาย ตั้งแต่สีชมพูอ่อนไปจนถึงสีแดงส้ม

Yee et al. (2008) ศึกษาการวิธีการถ่ายยีน *GFP*, *CHS* และ *hptII* เข้าสู่ชิ้นส่วน protocorm like body (PLB) ของกล้วยไม้ *Oncidium Sharry Baby* ด้วยใช้วิธียิงอนุภาคโดยใช้เวกเตอร์ร่วมกันสองเวกเตอร์ 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) ศึกษาการยับยั้งการแสดงออก (suppression) ของยีน *CHS*, *ANS* และ *F3'5'H* ในต้นหรือดอกสีน้ำเงินเข้ม (*Gentian hybrida* cv. Albireo) โดยใช้เทคนิค RNAi mediated gene silencing โดยใช้ชิ้นส่วนของยีนขนาดประมาณ 500 bp ในเวกเตอร์ binary vector pSMAB704 ที่มีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา⁵ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bialaphos resistance (bar) gene เป็นยีนคัดเลือก นำไปให้ถ่ายยีนเข้าสู่ใบอ่อนของต้นหรือตัดด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ขึ้นส่วนที่รอดจากการคัดเลือกด้วยสารถูกชักนำให้เกิดรากและต้นอ่อนนำไปเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตในโรงเรือน พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *CHSir* เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *CHS* ดอกมีสีน้ำเงินลดลงมาก บางดอกมีสีขาวและบางดอกมีริ้วน้ำเงินอ่อนสลับสีขาว ส่วนต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *ANSir* เพื่อให้ยับยั้งการแสดงออกของยีน *ANS* พบว่า ส่วนใหญ่ดอกมีสีน้ำเงินอ่อน (pale-blue) ส่วนต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *F3'5'Hir* เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3'5'H* พบว่า ดอกมีสีชมพูอมม่วง ไปจนถึงสีแดงอมม่วง

เบญจวรรณ และคณะ (2552) ศึกษาการใช้ยีน *green fluorescent protein (GFP) gene* และ *β -glucuronidase (GUS) gene* เป็นยีนรายงานผลในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ (*Dendrobium orchid* cv. Pompadour) สังเกตว่าการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชไม่ว่าจะใช้วิธีการใดก็ตาม หากใช้ยีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล มักจะเกิดปัญหา false positive ขึ้น คือ ขึ้นส่วนที่ช่อบางชนิดสามารถเกิดปฏิกิริยาติดสีน้ำเงินของสารที่ใช้ทดสอบการแสดงออกของยีน *GUS* แม้ว่าจะไม่ได้รับการถ่ายยีนก็ตาม ทำให้การรายงานผลการถ่ายยีนผิดพลาดได้ นอกจากนี้การทดสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ทำให้ขึ้นส่วนของเนื้อเยื่อตาย ไม่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงต่อได้ จึงศึกษาแนวทางการใช้ยีน *GFP* ร่วมกับยีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล โดยให้ยีน *GFP* จากเวกเตอร์ pJET1/blunt cloning โคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pMAT21 ที่มียีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล และมียีน *isopentenyl transferase (ipt)* เป็นยีนคัดเลือก ทำการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 เป็นพาหะ ขึ้นโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายยีนเกิดยอดเป็นกระจุกยอดจากผลของยีน *ipt* และนำขึ้นส่วนไปทดสอบการแสดงออกของยีน *GFP* และยีน *GUS* พบว่า เนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนมีการแสดงออกของยีน *GFP* และยีน *GUS* โดยเฉพาะส่วนของปลายกระจุกยอดมีการแสดงออกอย่างชัดเจน การใช้ยีน *GFP* และยีน *GUS* ร่วมกันเป็นยีนรายงานผลในการถ่ายยีน สามารถช่วยคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

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

Saetiew *et al.* (2014) ศึกษาการถ่ายยีน antisense *DFR* เข้าสู่เนื้อเยื่อแคลลัสของบัวหลวงชนิดทริก โดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ แคลลัสอายุ 2 เดือนที่ชักนำจากเนื้อเยื่อส่วนยอดของเอ็มบริโอเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของบัวหลวงบุณทริก โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มี NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 16 สัปดาห์ นำไปใช้ในการถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 พบว่า การนำชิ้นเนื้อเยื่อไปแช่ในอาหารที่มี *A. tumefaciens* เป็นเวลา 30 นาที และการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (co-culture) เป็นเวลา 2 วันในที่มีด มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนมากที่สุด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา⁷ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียม RNA และ cDNA

3.1.1 การเตรียมอาร์เอ็นเอ

บดกลีบดอกของอุบลชาติเขนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสีตตบงกช และปทุมชาติบุณทริกให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว นำเนื้อเยื่อแต่ละตัวอย่างปริมาณ 1 กรัม ผสมกับ Gomez buffer (pH 7.5) 15 มิลลิลิตร (Tris base 1.5 มิลลิโมลลาร์, EDTA 50 มิลลิโมลลาร์, SDS10เปอร์เซ็นต์) ในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร เติม polyvinylpyrrolidone (PVP) ปริมาณ 0.5 กรัม และ β -mercaptoethanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม 5 M potassium acetate ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และ absolute ethanol ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใสในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม phenol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใสในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร และเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใสในหลอดไอคริดจ์ (oakridge) ขนาด 50 มิลลิลิตร วัดปริมาตรแล้วเติม lithium chloride 6 โมลลาร์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3 โมลลาร์ ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดไปมา และนำสารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้งแล้วเติม lithium chloride เข้มข้น 3 โมลลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเพื่อละลายตะกอน นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเทสารละลายด้านบนทิ้งแล้วคว่ำหลอดไอคริดจ์บนกระดาษทิชชู ทิ้งไว้ให้ตะกอนแห้งประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม diethyl pyrocarbonate treated water (DEPC water) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเพื่อละลายตะกอน และดูดใสในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม absolute ethanol ที่เย็นปริมาตร 962.5 ไมโครลิตร และ potassium acetate เข้มข้น 5 โมลลาร์ ปริมาตร 35 ไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วคว่ำหลอดบนกระดาษทิชชู เพื่อให้ตะกอนแห้ง เติม DEPC water ปริมาตร 30 ไมโครลิตรเพื่อละลายตะกอนอาร์เอ็นเอจากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงจาก Lopez-Gomez and Gomez-Lim, 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา⁹ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง และเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

วัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{230} , A_{260} และ A_{280}) โดยเจือจางอาร์เอ็นเอที่สัดส่วน 1:100 (DEPC-dH₂O ปริมาตร 99 ไมโครลิตร และอาร์เอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร) อาร์เอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า A_{260}/A_{280} เข้าใกล้ 2.0 (Sambrook *et al.* 1989) นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้มาหาปริมาณอาร์เอ็นเอจากสมการ

$$\text{ปริมาณอาร์เอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)} = A_{260} \times 40 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \times \text{อัตราเจือจาง}$$

จากนั้นนำอาร์เอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 10x loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และนำกลิ่นฆ่าเชื้อปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทำการหยอดสารละลายทั้งหมดลงในหลุมของแผ่นเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ปล่อยให้โมเลกุลของอาร์เอ็นเอเคลื่อนที่ในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสที่แรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 45 นาที โดยมีสารละลาย 0.5x TAE buffer เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า ย้อมเจลในสารละลายเอทริเดียมโบร-มายด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบแถบและขนาดของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง UV transilluminator

3.1.3 การกำจัดดีเอ็นเอออกจากอาร์เอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ DNase I

นำอาร์เอ็นเอของอุบลชาติ และปทุมชาติที่สกัดได้จากข้อ 3.1.1 มากำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนโดยใช้เอนไซม์ DNase I เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x DNase I buffer ที่มี MgCl₂ 1 ไมโครลิตร, Ribolock™ RNase Inhibitor (Fermentas, USA) 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, DNase I (Fermentas, USA) 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, อาร์เอ็นเอของอุบลชาติ หรือปทุมชาติความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร และ DEPC water 6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) 50 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เก็บอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.1.4 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) จากอาร์เอ็นเอโดยเอนไซม์ reverse transcriptase

สังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอที่แยกสกัดได้จากกลีบดอกของอุบลชาติชนิด หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสีตบงกชและปทุมชาติบุณฑริกจากข้อที่ 3.1.3 ตามวิธีการของ Sensiscript® Reverse Transcription (Qiagen, USA) เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย 10x buffer RT ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, Oligo-dt primer 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, Ribolock™ RNase Inhibitor (Fermentas, USA) 40 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, Sensiscript Reverse Transcriptase 1 ไมโครลิตร, อาร์เอ็นเอของอุบลชาติหรือปทุมชาติความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ DEPC water ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เก็บอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ไม่วารณี่ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ 10 ้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที และที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เก็บ cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การโคลนยีน *chalcone synthase (CHS)*, *flavonone 3-hydroxylase (F3H)*, และ *chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT)*

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน *chalcone synthase (CHS)*, *flavonone 3-hydroxylase (F3H)*, และ *chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT)* ไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนยีน *F3H* และยีน *CHS* เป็นชนิดดีเจเนอเรต (degenerated primer) ออกแบบจากลำดับเบสอนุกรมของยีน *F3H* หรือยีน *CHS* ของพืชชนิดต่างๆ ที่ได้มีการรายงานไว้ใน GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.ยศพล ผลาผล มหาวิทยาลัยบูรพาวิทยาเขตจันทบุรี ในขณะที่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ยีน *4'CGT* เป็นชนิดจำเพาะ (gene specific primer) ซึ่งไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการสังเคราะห์ยีน *CHS*, *F3H*, *4'CGT* แสดงในตารางผนวกที่ 1

3.2.1 การโคลนยีน *chalcone synthase (CHS)*

3.2.1.1 การสังเคราะห์ยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase chain reaction)

โคลนยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส จาก genomic DNA และขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส จาก cDNA ของกลีบดอกของบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงสัตตบงกช (ตามลำดับ) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CHSF_forward primer และ CHSF_reverse primer โดยเตรียมสารในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา ในหลอด PCR ไมโครทิวปขนาด 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 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 หรือ สารละลาย cDNA เจือจางปริมาตร 2 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (Fermentas, USA) เข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร 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 นำ ผลผลิต PCR ที่ได้บางส่วนไปตรวจสอบผลการโคลนยีนด้วยเทคนิค gel electrophoresis เก็บผลผลิต PCR ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ไม่วารณี่ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากตรวจสอบแถบ DNA และขนาดของผลผลิต PCR ของยีน *CHS* แบบเต็มเส้นที่โคลนได้จาก genomic DNA และ cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวง สัตตบงกช ด้วยวิธี gel electrophoresis แล้ว นำ agarose gel ที่มีแถบ DNA ของยีนที่มีขนาดที่ต้องการ มาตัดออกเฉพาะส่วนของผลผลิต PCR ที่มีขนาดที่ต้องการ น้ำหนักไม่เกิน 0.3 กรัม ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการแยก DNA ของยีนที่โคลนได้ออกจาก agarose gel และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด สำเร็จรูป FavorPrep™ GEL/PCR purification mini kit (Favorgen, China) นำ ไปตรวจสอบปริมาณของ DNA ที่แยกได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง และตรวจสอบความถูกต้องของขนาดของ DNA ที่แยกได้ด้วย เทคนิค gel electrophoresis จากนั้นนำ DNA ของยีนที่แยกได้ไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.1.2 การเชื่อมต่อยีน *CHS* เข้ากับโคลนนิ่งเวกเตอร์ pTZ57R/T

นำผลผลิต PCR ของยีน *CHS* ที่โคลนจาก genomic DNA และ cDNA ของ กลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงสัตตบงกช 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 ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 200 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำกลั่นปริมาตร 11 ไมโครลิตร, สารละลายบัฟเฟอร์ 10x ligation ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, พลาสมิด pTZ57R/T เข้มข้น 155 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, สารละลาย DNA ของยีน *CHS* เข้มข้นประมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ *T4* DNA ligase เข้มข้น 10 ยูนิต ต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยปิเปต จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ได้พลาสมิดลูกผสมของพลาสมิด pTZ57R/T กับ ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA และ cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริกและสัตตบงกช จากนั้นนำ พลาสมิดลูกผสม ของยีน *CHS* ที่ถูกเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pTZ57R/T แล้ว ถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat shock และสกัดพลาสมิดลูกผสมที่อยู่ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่ได้ด้วยชุด สกัดพลาสมิด High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan) เพื่อนำไปตรวจสอบการมีอยู่ของ ชิ้นส่วนของยีนและสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้ ต่อมา ตรวจสอบการมีอยู่ ของชิ้นส่วนยีน *CHS* ที่โคลนได้ ในพลาสมิดลูกผสมของยีน *CHS* กับพลาสมิด pTZ57R/T ด้วยการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba* I และ *Hind* III โดยเตรียมสารในการทำปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา และการตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบการมีอยู่ของชิ้นส่วนยีน *CHS* ที่โคลนได้ ในพลาสมิดลูกผสมของยีน *CHS* กับพลาสมิด pTZ57R/T ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CHSF_ forward primer และ CHSF_reverse primer ทำโดยเตรียมสารและทำปฏิกิริยา PCR จากนั้นนำผลผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

PCR ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดของผลผลิต PCR ของยีน *CHS* ในพลาสมิด ด้วยเทคนิค gel electrophoresis คัดเลือกโคลนที่ถูกต้องของพลาสมิดลูกผสม จำนวน 3 โคลน นำพลาสมิดลูกผสมของยีนไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer คือ M13F และ M13R

3.2.2 การโคลนยีน *flavonone 3-hydroxylase (F3H)*

สังเคราะห์ยีนบางส่วนของ *F3H* จาก cDNA อูบลชาติเซนตล์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุณฑริก ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ร่วมกับไพรเมอร์ชนิดดีเจเนอเรตที่จับบนบริเวณลำดับเบสอนุรักษ์ของยีน *F3H* ในอูบลชาติและปทุมชาติ (ตารางผนวกที่ 1) เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตรที่ประกอบด้วย dH_2O ปริมาณ 8 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, MgCl_2 25 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, cDNA ของอูบลชาติหรือปทุมชาติความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, *Taq* polymerase (Fermentas, USA) 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, *F3H* forward primer เข้มข้น 10 ไมโครโมลลาร์ 2 ไมโครลิตร และ *F3H* reverse primer เข้มข้น 10 ไมโครโมลลาร์ (ตารางผนวกที่ 1) 2 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง พีซีอาร์โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 2) denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 4) extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ และ 5) post-extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน *F3H* นำมาออกแบบไพรเมอร์ชนิดจำเพาะต่อยีน *F3H* เพื่อใช้สำหรับการสังเคราะห์ยีน *F3H* แบบเต็มเส้นด้วย SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit ดังนี้

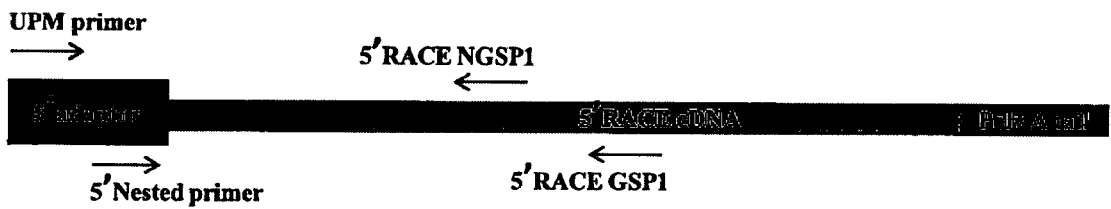
3.2.2.1 การสังเคราะห์ยีน *F3H* ทางด้านปลาย 5'

สังเคราะห์ยีน *F3H* ทางด้านปลาย 5' (5'*F3H*) จาก 5'RACE cDNA ของอูบลชาติเซนตล์หลุยส์โกลด์ซึ่งสังเคราะห์ตามวิธีการของ SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Canada) ด้วยเทคนิค Nested พีซีอาร์ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มี 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรก 5'RACE พีซีอาร์ ใช้ไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจับบริเวณ 5' adaptor คือ UPM primer (SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit) ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจับในบริเวณยีน *F3H* คือ 5'RACE GSP1 primer ดังแสดงในภาพ 3.1 โดยใช้ 5'RACE cDNA ของอูบลชาติเซนตล์หลุยส์โกลด์เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH_2O ปริมาตร 32.5 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, MgCl_2 50 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, dNTP 40 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 5'RACE cDNA ของอูบลชาติเซนตล์หลุยส์โกลด์ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, *Taq* DNA Platinum (Qiagen, USA) 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10x UPM primer 5 ไมโครลิตรและ 5'RACE GSP1 primer 10 ไมโครโมลลาร์ (ตารางผนวกที่ 1) ปริมาตร 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์ ชนิดตั้งค่าได้หลายอุณหภูมิโดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 2) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ทำขั้นตอนที่ 1-2 จำนวน 4 รอบ 3) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ทำขั้นตอนที่ 3-5 จำนวน 4 รอบ 6) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 7) ที่อุณหภูมิระหว่าง 50-66 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 8) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ทำขั้นตอนที่ 6-8 จำนวน 30 รอบ และ 9) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบขนาด ดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิค อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยาพีซีอาร์จากขั้นตอนแรกที่เหลือมา เจือจางด้วย tricine EDTA ด้วยอัตราส่วน tricine EDTA : ผลผลิตพีซีอาร์ (49:1) แล้วนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้นตอนที่ 2 ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบ Nested พีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ที่จับในบริเวณ 5' adaptor คือ 5' Nested primer ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจับในบริเวณยีน *F3H* คือ 5'RACE NGSP1 primer (ภาพที่ 3.1) เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH₂O 37.8 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาณ 5 ไมโครลิตร, MgCl₂ 50 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 40 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, ผลผลิตพีซีอาร์ 5'RACE *F3H* ที่เจือจางใน tricine EDTA ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, *Taq* DNA Platinum (Qiagen, USA) 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร, 5' Nested primer 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และ 5'RACE NGSP1 primer 10 ไมโครโมลลาร์ (ตารางผนวกที่ 1) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์ชนิดตั้งค่าได้หลายอุณหภูมิโดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 2) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ทำขั้นตอนที่ 1-2 จำนวน 4 รอบ 3) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ทำขั้นตอนที่ 3-5 จำนวน 4 รอบ 6) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 7) ที่อุณหภูมิระหว่าง 50-66 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 8) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ทำขั้นตอนที่ 6-8 จำนวน 30 รอบ และ 9) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ ของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)



ภาพที่ 3.1 ตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์บริเวณปลาย 5' adaptor (UPM primer) คู่กับไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจับในบริเวณยีน *F3H* (5'RACE GSP1 primer) และไพรเมอร์ที่จับในบริเวณ 5'adaptor (5' Nested primer) ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจับในบริเวณยีน *F3H* (5'RACE NGSP1 primer) ในการสังเคราะห์ยีน *F3H* ปลายด้าน 5' ด้วยปฏิกิริยา Nested พีซีอาร์

3.2.2.2 การสังเคราะห์ยีน *F3H* ทางด้านปลาย 3'

สังเคราะห์ยีน *F3H* ทางด้านปลาย 3' (3'*F3H*) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จับบนบริเวณ poly A tail คือ Oligo-dt primer ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจับในบริเวณยีน *F3H* คือ F3H8 primer (ภาพที่ 3.2) เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH₂O ปริมาณ 9.5 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, MgCl₂ 25 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, cDNA อุบลชาติเซนต์หลุยส์ โกลด์ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร F3H8 primer 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร และ Oligo-dt primer 10 ไมโครโมลลาร์ (ตารางผนวกที่ 1) ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)



ภาพที่ 3.2 ตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์ที่จับบนบริเวณ poly A tail (Oligo-dt primer) ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจับในบริเวณยีน *F3H* (F3H8 primer) ในการสังเคราะห์ยีน *F3H* ปลายด้าน 3' ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.2.2.3 การสังเคราะห์ยีน *F3H* เติมเส้น

หาบริเวณรหัสเริ่ม (start codon) และรหัสหยุด (stop codon) จากข้อมูลของยีน *F3H* ทางด้านปลาย 5' และ 3' โดยใช้โปรแกรม GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) จากนั้นออกแบบไพรเมอร์บริเวณ stop codon เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ยีน *F3H* ในอุบลชาติเซน-หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกชและปทุมชาติบุญทริก ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ 5'RACE cDNA ของอุบลชาติเซน-หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกชหรือปทุมชาติบุญทริกเป็นต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจับบริเวณ 5'adaptor คือ UPM primer เพื่อสังเคราะห์ยีน *F3H* และส่วนของ 5' Untranslated Region (5' UTR) ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจับในบริเวณ stop codon ของยีน *F3H* คือ F3H stop primer ทำปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH₂O ปริมาณ 9.5 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, MgCl₂ 25 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, cDNA 5'RACE อุบลชาติเซน-หลุยส์โกลด์ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, 10x UPM primer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร และ F3H stop primer 10 ไมโครโมลลาร์ (ตารางภาคผนวกที่ 1) ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 32 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจขนาดดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

3.2.3 ยีน *chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT)*

สังเคราะห์ยีน *4'CGT* จาก cDNA ของกลีบดอกลิ้นมังกรสีเหลือง โดยเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O ปริมาณ 12.8 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, MgCl₂ 25 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, cDNA ของกลีบดอกลิ้นมังกรความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร, F-Bam HI-*4'CGT* 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ R-*4'CGT*-Sac I 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 2) denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 4) extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ และ 5) post-extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3.2.3.1 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10x loading dye ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาณ 7 ไมโครลิตร แล้วหยอดสารละลายทั้งหมดลงในหลุมของแผ่นเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ปล่อยให้โมเลกุลของดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสที่แรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 45 นาที โดยมีสารละลาย 0.5x TAE buffer เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้าโดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอ มาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA) ย้อมเจลในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบแถบและขนาดของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV transilluminator ทำการแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์

3.2.3.2 การแยกดีเอ็นเอจากเจลและทำให้บริสุทธิ์

ตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ นำหนักไม่เกิน 0.4 กรัม ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของ FavorPrep™ GEL/PCR purification mini kit (Favorgen, China) เริ่มจากใส่บัฟเฟอร์ FADF buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมด (พลิกหลอดให้เจลละลายทุกๆ 3 นาที) เมื่อเจลละลายแล้วให้ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 10 นาที) ดูดใส่ FADF column ที่อยู่บน collection tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทส่วนสารละลายด้านล่างทิ้ง หลังจากนั้นเติม wash buffer ปริมาณ 750 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทส่วนสารละลายด้านล่างทิ้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ column แห้ง จากนั้นย้าย column ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่พร้อมกับอุ่น elution buffer ที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เติม elution buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงบริเวณกึ่งกลางแผ่นกรองของ FADF column ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เพื่อชะดีเอ็นเอลงหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.3.3 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยการวัดค่า ดูดกลืนแสงและเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำดีเอ็นเอบริสุทธิ์ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{230} , A_{260} และ A_{280}) โดยเจือจางดีเอ็นเอที่สัดส่วน 1:100 (ดีเอ็นเอปริมาณ 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาณ 99 ไมโครลิตร) ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า A_{260}/A_{280} เข้าใกล้หรืออยู่ระหว่าง 1.8-2.0 (Sambrook et al. 1989) นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้มาหาปริมาณดีเอ็นเอจากสมการ

ปริมาณดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) = $A_{260} \times 50$ ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร \times อัตราการเจือจาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำดีเอ็นเอบริสุทธิ์ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10x loading dye ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาณ 7 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตรวจสอบโดยเทคนิค อะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA) ย้อมเจลใน สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบแถบและขนาดของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV transilluminator

3.2.3.4 การสร้างดีเอ็นเอสายผสมระหว่างยีนที่สังเคราะห์ได้กับพลาสมิด

pTZ57R/T

นำดีเอ็นเอบริสุทธิ์ของแต่ละยีนเชื่อมต่อกับพลาสมิด pTZ57R/T (Fermentas, USA) ด้วยเอนไซม์ T4 ligase (Fermentas, USA) เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O ปริมาณ 13 ไมโครลิตร, 10x ligation buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, เวกเตอร์ pTZ57R/T ความเข้มข้น 155 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอของยีน ปริมาณ 400 นาโนกรัม และ T4 DNA ligase 10 หน่วยต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ผสมทั้งหมดให้เข้ากันอย่างเบาในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 ชั่วโมง

3.2.3.5 การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์

DH5 α

ถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat-shock ตามวิธีการของ Sambrook *et al.* (1989) เริ่มจากนำ competent cell แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α มาตั้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมดีเอ็นเอสายผสม ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ตั้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที เมื่อครบเวลาวางบนน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที เติมหาอาหารเหลว LB (Luria-Bertani broth) ปริมาณ 400 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ไปเกลี่ยบนอาหารแข็งคัดเลือก LB (Luria-Bertani agar) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG) ปริมาณ 4 ไมโครลิตร และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) 0.1 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารสำหรับการคัดเลือกด้วยเทคนิค blue/white screening บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีสีขาวไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 ชั่วโมง

3.2.3.6 การสกัดแยกดีเอ็นเอสายผสมจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์

DH5 α

แยกสกัดดีเอ็นเอสายผสมตามวิธีการของ High-speed plasmid mini kit (Geneaid, Taiwan) โดยดูดเซลล์แบคทีเรียใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ 18 ห้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที และเทสารละลายใส่ทิ้ง เติม PD1 buffer ที่เย็นปริมาณ 200 ไมโครลิตร ละลายเซลล์ด้วยการปิเปตขึ้นลงผสมให้เข้ากัน เติม PD2 buffer ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และพลิกหลอดไปมา 10 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที จากนั้นเติม PD3 buffer ปริมาณ 300 ไมโครลิตร และพลิกหลอดทันที 10 ครั้ง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นดูดสารละลายปริมาณ 600 ไมโครลิตร ลงใน PD column ที่อยู่บน collection tube ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง เติม W1 buffer ปริมาณ 400 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง เติม wash buffer ปริมาณ 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ column แห้งแล้วย้าย column ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่พร้อมกับอุ้ง elution buffer ที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เติม elution buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงบริเวณกลาง filter ของ FADF column ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เพื่อชะดีเอ็นเอสายผสมลงหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บดีเอ็นเอสายผสมที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3 การตรวจสอบพลาสมิด pTZ-CHS, pTZ-F3H, pTZ4'CGT

3.3.1 ตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำโคโลนีสีขาวของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่แสดงถึงการมีพลาสมิดมาตรวจสอบชิ้นส่วนของยีน *CHS*, *F3H*, *4'CGT* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยเตรียมปฏิกิริยา ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O ปริมาณ 10 ไมโครลิตร, 10x Taq buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, MgCl₂ 25 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, Taq polymerase (Fermentas, USA) 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, F3H forward primer 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร และ F3H reverse primer 10 ไมโครโมลลาร์ (ตารางผนวกที่ 1) ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์ตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 2) denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 4) extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ 5) post-extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบขนาด ดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA) เลือกโคลนที่ถูกต้องนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer คือ M13F และ M13R

3.3.2 การตรวจสอบพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตรวจสอบพลาสมิดแต่ละชนิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH₂O, 10x Enzyme buffer 2-4 ไมโครลิตร, พลาสมิดความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Fermentas, USA) 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณชนิดละ 2 unit

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 28 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

3.4.3 การเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *chalcone synthase (CHS)*, *flavonone 3-hydroxylase (F3H)*, *chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT)* ในปทุมชาติ อุบลชาติ หรือลิ้นมังกร ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

3.4.3.1 การปรับความเข้มข้น cDNA เริ่มต้นให้เท่ากันด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง

ปรับความเข้มข้นของ cDNA จากข้อ 3.2.1 โดยการเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *18S rRNA* ซึ่งเป็นยีนที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์และมีการแสดงออกสม่ำเสมอในเนื้อเยื่อพืชด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ cDNA ของปทุมชาติ อุบลชาติ หรือลิ้นมังกร ปริมาณอย่างละ 1 ไมโครลิตร เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH_2O ปริมาณ 12.8 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, MgCl_2 25 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, cDNA ของปทุมชาติ อุบลชาติ หรือลิ้นมังกร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร, 18-SF primer 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ 18-SR primer 10 ไมโครโมลลาร์ (ตารางผนวกที่ 1) ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันดีในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์ โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 24 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบขนาดและความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *18S rRNA* ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

3.4.3.2 เปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน ยีน *chalcone synthase (CHS)*, *flavonone 3-hydroxylase (F3H)*, *chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT)* ในปทุมชาติ อุบลชาติ หรือลิ้นมังกร ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน CHS, F3H, 4'CGT ในปทุมชาติ อุบลชาติ หรือลิ้นมังกร ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ cDNA ที่ได้จากข้อ 3.2.1 ที่ปรับความเข้มข้นให้เท่ากันแล้ว เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา semi-quantitative PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH_2O ปริมาณ 12.8 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, MgCl_2 25 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, cDNA ของปทุมชาติ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร, forward primer 10 ไมโคร

โมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ reverse primer 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดในหลอด 200 ไมโครลิตร ให้เข้ากันดีแล้วนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบขนาดและความเข้มของแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

3.5 การยับยั้งการแสดงออกของยีน *flavonone 3-hydroxylase (F3H)* และยีน *chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT)* ในกลีบดอกปทุมชาติ อุบลชาติ หรือลีนมั่งกร

ศึกษาหน้าที่ของยีน *F3H* และยีน *4'CGT* ในกลีบดอกปทุมชาติ อุบลชาติ หรือลีนมั่งกร โดยการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* หรือยีน *4'CGT* ด้วยเทคนิค antisense suppression (antisense) หรือ RNA interference (RNAi) และติดตามการเปลี่ยนแปลงของสีกลีบดอกร่วมกับการแสดงออกของยีน *F3H* และยีน *4'CGT*

3.5.1 การยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ในอุบลชาติ และยีน *4'CGT* ในดอกลีนมั่งกรด้วยเทคนิค RNAi

3.5.1.1 การเตรียมดีเอ็นเอสายผสมรูปแบบ inverted repeat

3.5.1.1.1 การออกแบบไพรเมอร์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *F3H* ในปทุมชาติ สัตตบงกชขนาด 1,131 คู่เบส มาออกแบบไพรเมอร์สำหรับการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน *F3H* ขนาด 308 คู่เบส คือ F3H SenseF primer (ตารางผนวกที่ 1) และ F3H SenseR primer (ตารางผนวกที่ 1) ซึ่งอยู่บนตำแหน่งที่ 336 ถึง 644 ของสาย mRNA ของยีน *F3H*

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนยีน *4'CGT* คือ F-EcoRI-*4'CGT* และ R-*4'CGT*-BamHI ออกแบบจากลำดับเบสของยีน *4'CGT* (Accession number EF650015.1) ของลีนมั่งกร (*A. majus*) ที่รายงานใน GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยเลือกบริเวณตำแหน่ง 1,067-1,374 นิวคลีโอไทด์

3.5.1.1.2 การสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน *F3H* และ *4'CGT* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

สังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน *F3H* ขนาด 308 คู่เบส จาก cDNA ที่สังเคราะห์จากกลีบดอกปทุมชาติสัตตบงกชเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากข้อ 3.5.1.1.1 เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH₂O ปริมาณ 12.5 ไมโครลิตร, 10x Taq buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, MgCl₂ 25 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และห้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, cDNA ของปทุมชาติสกัดตบงกชความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (Fermentas, USA) 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร, F3H SenseF primer 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ F3H SenseR primer 10 ไมโครโมลลาร์ (ตารางผนวกที่ 1) ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดในหลอดให้เข้ากันดีในหลอด ขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์ โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

ทำการสังเคราะห์ยีน 4'CGT โดยใช้ cDNA เป็นต้นแบบ ใน ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O ปริมาณ 12.8 ไมโครลิตร, 10x Taq buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, MgCl₂ 25 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร , cDNA ของลิ้นมังกร ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (Fermentas, USA) ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร, ไพรมเมอร์ F-Eco RI-4'CGT 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ ไพรมเมอร์ R-4'CGT-Bam HI 10 ไมโครโมลลาร์ (ตารางผนวกที่ 1) ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 38 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และเมื่อครบกำหนดเวลา นำไปตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.5.1.1.3 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอสายผสมระหว่างชิ้นส่วนยีน F3H หรือ 4'CGT กับพลาสมิด pCR8

แยกสกัดดีเอ็นเอจากเจลตามวิธีการของ FavorPrep™ GEL/PCR purification mini kit (Favorgen, China) ดังข้อที่ 3.1.8 นำชิ้นส่วนของยีน F3H ขนาด 308 คู่เบส ที่ได้จากการสกัดแยกไปวัดปริมาณและคุณภาพด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงและเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นนำชิ้นส่วนของยีน F3H หรือยีน 4'CGT ขนาด 308 และ 307 คู่เบส ตามลำดับ เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pCR8 (Invitrogen, USA) โดยเตรียมปฏิกิริยาของการเชื่อมต่อในปริมาตร 6 ไมโครลิตร ประกอบด้วย salt solution ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, เวกเตอร์ pCR8 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และชิ้นส่วนยีน F3H หรือยีน 4'CGT ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมทั้งหมดให้เข้ากันอย่างเบาในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที

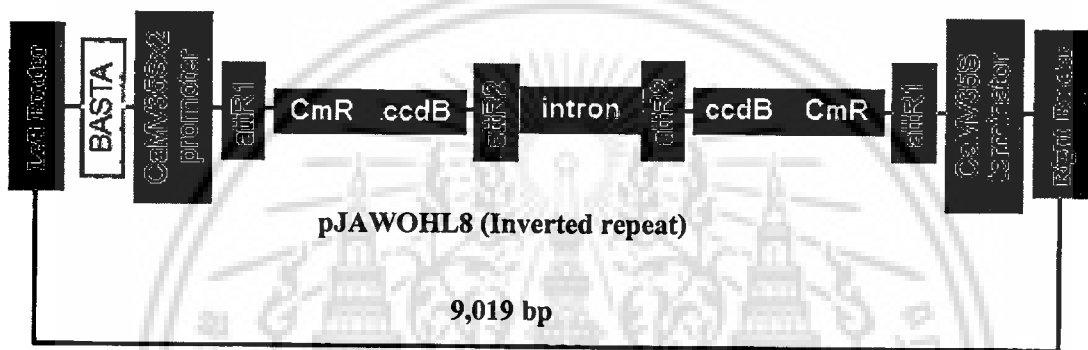
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 23 และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำเวกเตอร์ pCR8 ที่มียีน *F3H* หรือ *4'CGT* แทรกอยู่ (pCR8-*F3H*, pCR8-*4'CGT*) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat-shock ตามวิธีการของ Sambrook *et al.* (1989) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที แช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที และเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะสเปคตินอไมซิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะสเปคตินอไมซินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดแยก พลาสมิดตามวิธีการของ High-Speed Plasmid Mini Kit (geneaid, Taiwan) ดังข้อที่ 3.1.12 นำพลาสมิด pCR8-*F3H* หรือ pCR8-*4'CGT* ตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O ปริมาณ 12.8 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, MgCl₂ 25 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, เวกเตอร์ pCR8-*F3H* หรือ pCR8-*4'CGT* ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร, *F3H* SenseF primer 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ *F3H* SenseR primer 10 ไมโครโมลลาร์ (ตารางผนวกที่ 1) ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดในหลอดให้เข้ากันดีในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง พีซีอาร์โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

3.5.1.1.4 การสร้างดีเอ็นเอสายผสม pJA8*F3H* หรือ pJA8-*4'CGT*

เชื่อมต่อยีนบางส่วนของ *F3H* หรือ *4'CGT* เข้ากับพลาสมิด pJAWOHL8 (ภาพที่ 3.3 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Sebastian Schornack, The Sainsbury Laboratory UK) ซึ่งเป็นพลาสมิดสำหรับการสร้างรูปแบบ inverted repeat ด้วยปฏิกิริยา LR (Invitrogen, USA) ทำปฏิกิริยาในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยพลาสมิด pCR8-*F3H* หรือ pCR8-*4'CGT* ปริมาณ 150 นาโนกรัม พลาสมิด pJAWOHL8 ปริมาณ 150 นาโนกรัม และเอนไซม์ LR clonase ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมทั้งหมดให้เข้ากันแล้วบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นใส่ส่วนผสม ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยวิธี heat-shock ตามวิธีการของ Sambrook *et al.* (1989) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดแยกพลาสมิดตามวิธีการของ High-Speed Plasmid Mini Kit เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ 24 องศาอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Geneaid, Taiwan) ดังข้อที่ 3.1.12 ตรวจสอบพลาสติก pJA8-F3H หรือ pJA8-4'CGT ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Hind III สำหรับ pJA8-F3H หรือเอนไซม์ Hind III ร่วมกับ Xba I สำหรับ pJA8-4'CGT เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O ปริมาณ 16.6 หรือ 16.8 ไมโครลิตร, 10x Tango buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, pJA8-F3H หรือ pJA8-4'CGT ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และ 10 ยูนิตต่อไมโครลิตรเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดละ 0.2 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันดีในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 ชั่วโมงและตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส นำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ F-IntronpJA8 และ R-IntronpJA8 (ตารางผนวกที่ 1) ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอินตรอนบนพลาสติก pJAWOHL8



ภาพที่ 3.3 โครงสร้างของพลาสติก pJAWOHL8

3.5.1.2 การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) สายพันธุ์ GV3101 (ดัดแปลงจากวิธีการของ Sambrook *et al.* 1989)

เตรียมเซลล์คอมพีเทนท์ โดยเลี้ยงแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรีย (*A. tumefaciens*) สายพันธุ์ GV3101 ในอาหารเหลว yeast extract phosphate (YEP) ที่เติมสารปฏิชีวนะไโรแฟมพิซินปริมาณ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารแขวนลอยเซลล์ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว LB ปริมาณ 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ระหว่าง 0.5-0.8 นำเซลล์ที่ได้มาปั่นตกตะกอนที่ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดของเหลวใสด้านบนทิ้ง ละลายตะกอนด้วย glycerol ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง ละลายตะกอนด้วย glycerol ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 1.25 มิลลิลิตร สูดถ่ายแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาณ 50 ไมโครลิตร เก็บที่ -80 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL, pJA8F3H หรือ pJA8-4'CGT เข้าสู่โกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ด้วยวิธี electroporation เริ่มจากนำพลาสมิด pJAWOHL, pJA8F3H หรือ pJA8-4'CGT ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมหอาหารเหลว YEP Broth ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และเติม competent cell ของโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างเบาแล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง ดูดสารแขวนลอยเซลล์ที่เตรียมไว้ข้างต้นใส่ลงใน electroporation cuvette ที่เย็นและนำ electroporation cuvette ใส่ลงในเครื่อง electroporation โดยปล่อยให้กระแสไฟฟ้าผ่านสารแขวนลอยเซลล์ จากนั้นดูดสารแขวนลอยเซลล์ออกจาก electroporation cuvette ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดอาหารออกปริมาณ 950 ไมโครลิตร แล้วละลายตะกอนด้วยการใช้ปิเปตดูดขึ้นลงซ้ำๆ จากนั้นแบ่งไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไรแฟมพิซินความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาณ 10, 25 และ 50 ไมโครลิตร ต่อจานเลี้ยงเชื้อ นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวไปตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์และเทคนิคอะการอสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

3.5.2 การยับยั้งการแสดงออกของยีน F3H หรือยีน 4'CGT ในดอกลินมังกรแบบชั่วคราวด้วยวิธี Agro-infiltration

นำแบคทีเรียโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ที่มีพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8F3H เข้าสู่กลีบดอกอุบลชาติ และพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT เข้าสู่กลีบดอกลินมังกรเพื่อศึกษาหน้าที่และการแสดงออกของยีนโดยเปรียบเทียบจากปริมาณการแสดงออกของยีน F3H หรือ 4'CGT ระหว่างกลีบดอกที่ไม่ได้รับและได้รับพลาสมิด pJAWOHL8, pJA8F3H หรือ pJA8-4'CGT

3.5.2.1 การเตรียมแบคทีเรียโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ที่มีพลาสมิด pJAWOHL8, pJA8F3H หรือ pJA8-4'CGT

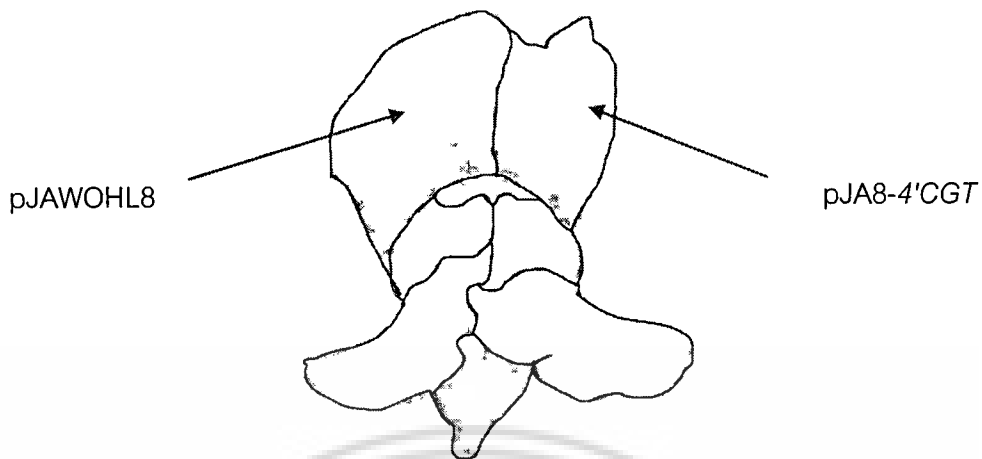
เลี้ยงแบคทีเรียโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ที่มี พลาสมิด pJAWOHL, pJA8F3H หรือ pJA8-4'CGT ตามวิธีการของ Zottini *et al.* (2008) โดยเลี้ยงในอาหารเหลว YEP ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไรแฟมพิซินความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้ปริมาณ 25 ไมโครลิตร เลี้ยงต่อในอาหารเหลว YEP ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไรแฟมพิซินความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.2.2 การนำเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8F3H เข้าสู่กลีบดอกอุบลชาติด้วยวิธี Agro-infiltration

นำเชื้ออะโกรแบคทีเรีย จากข้อที่ 3.3.2.1 มาปั่นเหวี่ยงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเทส่วนใส ด้านบนทิ้ง ล้างตะกอน 2 ครั้ง ด้วยสารละลาย infiltration buffer ที่ประกอบด้วย MES (pH 5.6) 50 มิลลิโมลลาร์, Na_3PO_4 2 มิลลิโมลลาร์, glucose 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ acetosyringone 100 มิลลิโมลลาร์ โดยเติม infiltration buffer ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ละลายตะกอนเซลล์โดยการดูดด้วยปิเปตขึ้นลงซ้ำๆ และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 นาที เมื่อได้ตะกอนที่ล้างเสร็จแล้ว นำไปละลายด้วย infiltration buffer และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยเซลล์ให้ได้ค่า 0.2 จากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในที่มีดนาน 2 ชั่วโมง แล้วฉีดเข้าสู่ด้านนอกของกลีบดอกอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสดงผลด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการ infiltration ในดอกสดบนต้นอุบลชาติซึ่งใน 1 ดอก จะทำการถ่ายยีนจำนวน 2 กลีบ คือ กลีบที่ถ่ายโอนของเวกเตอร์ pJAWOHL8 (control) และกลีบที่ถ่ายโอนของเวกเตอร์ pJA8F3H (RNAi) ทำการเก็บตัวอย่างกลีบดอกอุบลชาติหลังจากทำการถ่ายยีนด้วยวิธีการ infiltration แล้ว 3 วัน

3.5.2.3 การนำเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT เข้าสู่กลีบดอกลินม้งกรด้วยวิธี Agro-infiltration

นำสารแขวนลอยเซลล์อะโกรแบคทีเรีย มาปั่นตกตะกอนในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเทส่วนใส ด้านบนทิ้ง ล้างตะกอน 2 ครั้ง ด้วยสารละลาย infiltration buffer ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย MES (pH 5.6) 50 มิลลิโมลลาร์, sodium phosphate (Na_3PO_4) 2 มิลลิโมลลาร์, glucose 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ อะซิโตไซริงโคน 100 มิลลิโมลลาร์ ละลายตะกอนเซลล์โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงซ้ำๆ และปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที เมื่อได้ตะกอนที่ล้างเสร็จแล้ว นำไปละลายด้วย infiltration buffer และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า 0.2 จากนั้นนำไปเลี้ยงในที่มีด นาน 2 ชั่วโมง เพื่อป้องกันไม่ให้อะซิโตไซริงโคนเสื่อมคุณสมบัติทางเคมี จากนั้นฉีดเข้าสู่กลีบดอกลินม้งกรด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ตามวิธีการของ Zottini *et al.* (2008) โดยใน 1 กลีบ จะแบ่งเป็นกลีบด้านซ้ายฉีดอะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pJAWOHL8 (control) และกลีบด้านขวาฉีดอะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pJA8-4'CGT (RNAi) (ภาพที่ 3.4) โดยทำการทดลองทั้งหมด 7 ดอก จากนั้นเก็บต้นลินม้งกรไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน



ภาพที่ 3.4 ตำแหน่งที่ฉีดเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT

3.5.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* หรือยีน *4'CGT* ในกลีบดอกของอุบลชาติหรือลั่นมังกกรภายหลังการถ่ายยีนด้วยวิธีการ infiltration โดยวิธีการ semi-quantitative PCR

3.5.3.1 การเตรียม cDNA

บดกลีบดอกของบัวอุบลชาติที่ไม่ผ่าน และผ่านการถ่ายโอนของเวกเตอร์ pJAWOHL8 หรือเวกเตอร์ pJA8*F3H* ด้วยไนโตรเจนเหลว ทำการสกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีการของ Invitrap® Spin Plant RNA Mini Kit (Stratec molecular, Germany) กำจัด DNA ปนเปื้อน และสังเคราะห์ cDNA ดังขั้นตอนในข้อ 3.1.4

บดกลีบดอกของดอกลั่นมังกกรที่ไม่ผ่าน และผ่านการถ่ายโอนของเวกเตอร์ pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT ปริมาณ 100 มิลลิกรัม ต่อ Trizol (Invitrogen, USA) 1 มิลลิลิตร สกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีการของ Trizol reagent (Invitrogen, USA) ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม chloroform ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร และเขย่าเป็นเวลา 15 วินาที ปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนที่มีอาร์เอ็นเอใส่หลอดไมโคร เซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ ทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยเติม isopropanol alcohol ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ต่อ Trizol 1 มิลลิลิตร ปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายทิ้งแล้วเติม ethanol 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที สุดท้ายทำให้ตะกอนแห้งและเติม DEPC-dH₂O เพื่อละลายตะกอน กำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNase I และสังเคราะห์ cDNA ดังขั้นตอนในข้อที่

3.1.3-3.1.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.3.2 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H* หรือยีน *4'CGT* ในกลีบดอกอุบลชาติหรือลินมังกร ระหว่างกลีบที่ได้รับและไม่ได้รับพลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-4'CGT

ปรับปริมาณ cDNA เริ่มต้นของกลีบดอกลินมังกรที่ได้รับ พลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-4'CGT ให้เท่ากันโดยใช้ยีน 18s rRNA เป็นยีนอ้างอิง เมื่อสามารถปรับความเข้มข้น cDNA ของแต่ละตัวอย่างให้เท่ากันแล้ว ใช้ cDNA ดังกล่าวเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *4'CGT* ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR ดังขั้นตอนในข้อ 3.2.3.2

3.6 การเตรียมดีเอ็นเอสายผสมสำหรับถ่ายยีนเข้าบัวหลวง

ศึกษาการถ่ายยีน antisense *DFR*, antisense *CHS*, และ *4'CGT* ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยการยับยั้งการแสดงออกของยีน *DFR* และ *CHS* เพิ่มปริมาณการแสดงออกของยีน *4'CGT* ด้วยวิธีการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะหรือเครื่องยิงอนุภาค

3.6.1 การสร้างพลาสมิดที่มียีน *DFR* จากปทุมมา

3.6.1.1 การสร้างพลาสมิดสายผสม pBI121DFR

พลาสมิด pTZDFR ขนาด 3,636 คู่เบส โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.สมบุญ อนันตลาโภชัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งมียีน *DFR* ที่ได้มาจากดอกปทุมมาอยู่ นำพลาสมิด pTZDFR ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI* (Fermentas[®]) เพื่อแยกชิ้นส่วนของยีน *DFR* ขนาดประมาณ 750 คู่เบสออกจากพลาสมิด นำยีนที่ได้โคลนเข้าพลาสมิด pBI121 ขนาด 14,758 คู่เบส ในตำแหน่งแทนที่ยีน *GUS* ซึ่งถูกตัดแยกออกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI* เช่นเดียวกัน โดยในปฏิกริยามีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยพลาสมิดลูกผสม ปริมาตร 10 ไมโครลิตร 10X tango buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI* ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 0.5X TAE buffer ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต จากนั้นตัดชิ้นเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 คู่เบสของยีน *DFR* นำไปสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล และทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIA quick gel extraction kit (QIAGEN) โดยตัดเจลครอบแถบของผลการตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* และ *BamHI* ตามขนาดที่ต้องการ (ในทั้ง 2 พลาสมิดคือ pTZDFR และ pBI121) ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมด จึงเติม Isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5-10 นาที จากนั้นเปิดสารละลายดีเอ็นเอใส่ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ซึ่งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ใน spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีก 1 รอบ จากนั้นจึงทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที จึงย้าย spin column ไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ หลอดใหม่ ที่ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที จึงเติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการเชื่อมต่อ โดยในปฏิกริยามีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิด (pBI121 *SacI*/*Bam*HI) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร Insert (pTZDFR *SacI*/*Bam*HI) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 10X Ligation buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร T₄ DNA Ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซ้ำคืน จากนั้นนำไป transform โดยเลี้ยงบนอาหาร LB (streak) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำคืน และชักนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cell (*E. coli* DH5α) ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al.* 1989) โดยนำ competent cell ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่เก็บในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำมาละลายโดยแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมพลาสมิด pBI121DFR ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน competent cell ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลง แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว โดยการแช่ลงในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เติมหอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ LB 900 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง 850 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ปิเปตดูดขึ้นลง เพื่อละลายตะกอนเซลล์ นำเชื้อที่ได้ไปเกลี่ย (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (อาหารคัดเลือก) โดยดูดเชื้อในปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อจานเพาะเลี้ยง นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

3.6.1.2 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม

สุ่มเลือกโคโลนีของ *E. coli* DH5α ที่สามารถเติบโตบนอาหารคัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดพลาสมิด โดยใช้ FlavoPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Flavogen™) โดยดูดอาหารเหลวที่มีเชื้อ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนของอาหารด้านบนทิ้ง เติม FAPD1 buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นเติม FAPD2 buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา 5 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที เพื่อย่อยเซลล์ จากนั้นเติม FAPD3 buffer ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมา 5 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวด้านบน ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เอกลสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตร ใส่ใน FAPD column ที่รองรับด้วย collection tube ขนาด 2 มิลลิเมตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ที่เติม W1 buffer ลงใน FAPD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ที่ จากนั้นเติม wash buffer ลงใน FAPD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube ที่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ column แห้ง แล้วจึงย้าย FAPD column ไปใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์หลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิเมตร เติม elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ใน FAPD column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำพลาสติกลูกผสมที่ได้มาตรวจสอบความเข้มข้นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร จากนั้นทำการทดสอบการมีอยู่ของซิงค์ในพลาสติกลูกผสมโดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI* นำไปตรวจสอบขนาดของซิงค์เอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 0.5X TAE buffer ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที

3.6.1.3 การสร้างพลาสมิดสายผสม pCAMBIA2301DFR

นำพลาสมิด pBI121DFR ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* (Fermentas®) เพื่อแยกชิ้นส่วนของยีน *DFR* ที่มีส่วนของ CaMV35S promoter และ NOS terminator ขนาดประมาณ 2,000 คู่เบส ออกจากพลาสมิด นำชิ้นส่วนของยีน *DFR* ที่ได้เชื่อมต่อกับพลาสมิด pCAMBIA2301 ขนาด 11,623 คู่เบส ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* เช่นเดียวกัน โดยในปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดลูกผสม ปริมาตร 15 ไมโครลิตร 10X tango buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 0.5X TAE buffer ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที

3.6.2 การสร้างพลาสมิดที่มียีน *CHS* จากบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

3.6.2.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม pBICHSA

ทำการโคลนบางส่วนของยีน *CHS* จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกด้วยเทคนิค PCR เพื่อนำไปใช้ถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ ที่มีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* (GAGCTC) อยู่บนไพรเมอร์ส่วนหน้า CHSA_forward primer และมีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* (GGATCC) อยู่บนไพรเมอร์ส่วนท้าย CHSA_reverse primer นำบางส่วนของยีน *CHS* ที่ได้มาเชื่อมต่อเข้ากับ พลาสมิด pBI121 ขนาด 14,758 คู่เบส ที่มียีน *nptII* (*neomycin phosphotransferase*) เป็นยีนคัดเลือก และยีน *GUS* (α -glucuronidase) เป็นยีนรายงานผล โดยนำไปเชื่อมต่อในตำแหน่งแทนที่ยีน *GUS* (ขนาด 1,812 คู่เบส) ในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่ไปยังเว็บไซต์อื่น กรุณาแจ้งผู้จัดทำเอกสารทุกครั้ง

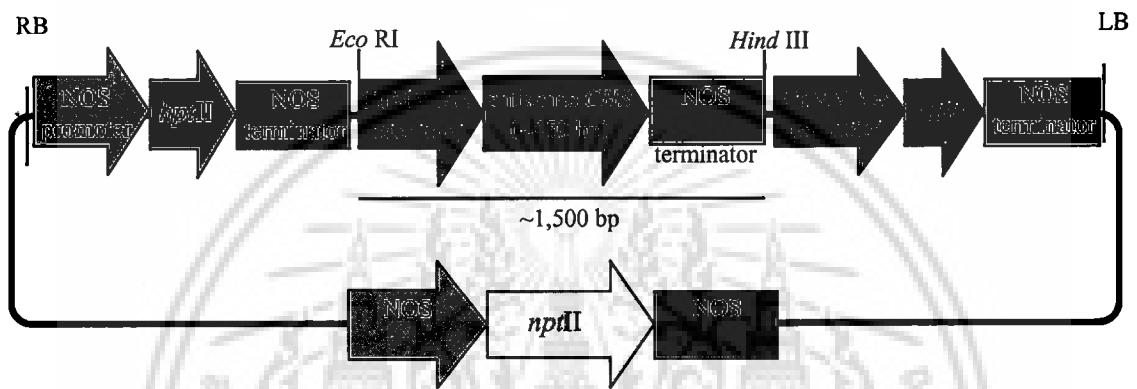
ลักษณะกลับทิศ (antisense) โดยเริ่มต้นจากนำผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* และพลาสมิด pBI121 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac* I (Fermentas, USA) และ *Bam* HI (Fermentas, USA) เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประกอบด้วย น้ำกลั่น ปริมาตร 9 ไมโครลิตร, สารละลายบัพเฟอร์ 10x Tango ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, สารละลายพลาสมิดเข้มข้น ประมาณ 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac* I เข้มข้น 10 ยูนิต ต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI เข้มข้น 10 ยูนิต ต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นนำไปปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแยกขนาดของชิ้นส่วน DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิค gel electrophoresis จากนั้นตัดชิ้นส่วน agarose gel ที่มีชิ้นส่วนของบางส่วนของยีน *CHS* ขนาดประมาณ 450 คู่เบส และส่วนของพลาสมิด pBI121 ที่ถูกตัดเอาส่วนของยีน *GUS* ออก ขนาดประมาณ 12,900 คู่เบส นำมาแยก DNA ออกจาก agarose gel และทำให้บริสุทธิ์ และตรวจสอบคุณภาพของชิ้นส่วน DNA ที่แยกออกมาได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงและตรวจสอบขนาดของ DNA ที่แยกออกมาได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis จากนั้นนำมาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ *T4* ligase โดยเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประกอบด้วย น้ำกลั่น ปริมาตร 8 ไมโครลิตร สารละลายบัพเฟอร์ 10x ligation buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ชิ้นส่วน พลาสมิด pBI121 เข้มข้น ประมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ชิ้นส่วนของยีน *CHS* เข้มข้นประมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และเอนไซม์ *T4* ligase เข้มข้น 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำไปปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 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 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร และนำไปปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนของพลาสมิดลูกผสมโดยเลือกโคลนของแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB broth และนำไปปฏิกิริยาในตู้ป่นเชื้อแบบเขย่า โดยใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปสกัด พลาสมิด ด้วยชุด สกัดพลาสมิด และตรวจสอบความถูกต้องของยีน *CHS* ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pBICHSA ด้วยการ ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Hind* III และตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยไพรเมอร์ CHSA_forward primer และ CHSA_reverse primer จากนั้นตรวจสอบการกลับทิศ (antisense) ของ บางส่วนของยีน *CHS* ที่อยู่บนพลาสมิด pBICHS โดยนำไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3.6.2.2 การสร้างพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA

นำบางส่วนของยีน *CHS* แบบ antisense ที่อยู่บนพลาสมิด pBICHSA มาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pCAMBIA1302 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 จากนั้นนำไปป่มที่อุณหภูมิ 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 นำมาแยก DNA ออกจาก agarose gel และทำให้บริสุทธิ์และตรวจสอบคุณภาพของชิ้นส่วน DNA ที่แยกออกมาได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงและตรวจสอบขนาดของ DNA ที่แยกออกมาได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis จากนั้นนำมาเชื่อมต่อเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ *T4* ligase โดยเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 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 นำไปป่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ได้พลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA (ภาพที่ 3.5) 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 เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด ด้วยวิธี heat-shock นำแบคทีเรียที่ได้มาเกลี่ยบนอาหารคัดเลือก LB agar ที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม โดยเลือกโคลนของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ 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) นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ไปถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวงต่อไป



ภาพที่ 3.5 พลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA

3.6.3 การสร้างพลาสมิดที่มียีน 4'CGT จากดอกลินม้งกร

3.6.3.1 การสังเคราะห์ยีน 4'CGT ขนาด 1,374 นิวคลีโอไทด์จากดอกลินม้งกรด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำ cDNA ของดอกลินม้งกร เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน 4'CGT ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ F-BamHI-4'CGT และ R-4'CGT-Sac I (ตารางผนวกที่ 1) ที่ออกแบบจากข้อมูลยีน 4'CGT ของดอกลินม้งกร โดยเพิ่มบริเวณสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI ทางด้านปลาย 5' ของยีนและเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac* I ทางด้านปลาย 3' ของยีน ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH_2O ปริมาณ 12.8 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, MgCl_2 25 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, cDNA ของลินม้งกร ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตรปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร, F-Bam HI-4'CGT 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ R-4'CGT -*Sac* I 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และเมื่อครบ

กำหนดเวลานำไปตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 นิวคลีโอไทด์ โดยนำหนักเจลต้องไม่เกิน 0.4 g ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร สกัดดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของ FavorPrep™ GEL/PCR purification mini kit (Favorgen, Taiwan) ดังข้อที่ 3.1.8 นำดีเอ็นเอไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{230} A_{260} A_{280}) โดยเจือจางดีเอ็นเอที่สกัดส่วน 1 ต่อ 100 (ดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร และ dH_2O 99 ไมโครลิตร) นำดีเอ็นเอ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10x loading dye ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 7 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตรวจสอบโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, China)

3.6.3.2 การสร้างดีเอ็นเอสายผสมระหว่างยีน 4'CGT กับพลาสมิด pTZ57R/T (pTZ4'CGT)

นำยีน 4'CGT ขนาด 1,374 นิวคลีโอไทด์ เชื่อมต่อกับพลาสมิด pTZ57R/T (Fermentas, USA) ในอัตราส่วนผลผลิตพีซีอาร์ ความเข้มข้น 150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 3 ไมโครลิตร ต่อพลาสมิด pTZ57R/T ความเข้มข้น 55 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ด้วยเอนไซม์ T4 ligase (Fermentas, USA) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ถ่ายยีนดีเอ็นเอสายผสม pTZ4'CGT เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat-shock ตามวิธีการของ Sambrook et al. (1989) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีการเกลี่ยด้วย 0.1M IPTG ปริมาณ 4 ไมโครลิตร และ X-gal ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาณ 20 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค blue/white screening นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีสีขาวไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอสายผสมตามวิธีการของ High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan) ดังข้อที่ 3.1.12 และนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์ M13F และ M13R (ตารางผนวกที่ 1)

3.6.3.3 การสร้างดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2301 ที่มียีน 4'CGT (pCAM4'CGT)

พลาสมิด pCAMBIA2301 เป็นพลาสมิดที่มียีนรายงานผลคือ *GUS* และมียีนคัดเลือกคือ *NPTII* เริ่มต้นโดยนำพลาสมิด pTZ4'CGT ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Sac* I เพื่อแยกบริเวณของยีน 4'CGT ขนาดประมาณ 1,374 นิวคลีโอไทด์ ออกจากพลาสมิด pTZ57R/T และพลาสมิด pCAMBIA2301CHS ที่ผ่านการดัดแปลงให้พลาสมิด pCAMBIA2301 สามารถขับเคลื่อนชิ้นยีน *CHS* ด้วยโปรโมเตอร์และเทอร์มินเตอร์จากพลาสมิด pBI121 ตัด pCAMBIA2301CHS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Sac* I เพื่อแยกชิ้นส่วนของยีน *CHS* ออกจากพลาสมิด pCAMBIA2301 ตรวจสอบขนาดของพลาสมิดโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb

DNA ladder จากนั้นเชื่อมต่อยีน 4'CGT เข้าสู่พลาสมิด pCAMBIA2301 เพื่อแทนที่ยีน *CHS* ด้วยเอนไซม์ T4 ligase โดยในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O ปริมาณ 5 ไมโครลิตร 10x ligation buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ขึ้นยีน 4'CGT ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Sac* I ความเข้มข้น 12 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 9 ไมโครลิตร พลาสมิด pCAMBIA2301 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Sac* I ที่ไม่มียีน *CHS* ความเข้มข้น 15 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ T4 ligase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat-shock ตามวิธีการของ Sambrook *et al.* (1989) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที และเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดียวไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอสายผสมตามวิธีการของ High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan) ดังข้อที่ 3.1.12 และตรวจสอบ พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI

3.6.4 การเตรียมเซลล์คอมพิเทนท์ของอะโกราแบคทีเรีย (*A. tumefaciens*) สายพันธุ์ EHA105

เพาะเลี้ยง *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ตามวิธีการของวิลลาซีนี ลีทวีย์ทซ์ (2554) ที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนเซลล์อะโกราแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์ บุณฑริก โดยเลี้ยงอะโกราแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 บนอาหารแข็ง YM (Yeast extract-Malt extract) โดยการเทียบเชื้อแบคทีเรียบนจานเพาะเลี้ยง บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเลือก 1 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว YM ปริมาณ 5 มิลลิลิตร (starter) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นดูดจากหลอด starter ปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาใส่ขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ปริมาณ 150 มิลลิลิตร เลี้ยงจนได้สารแขวนลอยเซลล์ที่มีความหนาแน่น $5-10 \times 10^7$ cell/ml หรือวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ระหว่าง 0.6-0.7 ย้ายเชื้อจากขวดเดิมมาใส่หลอดที่ผ่านการฆ่าเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอนเซลล์นำไปแช่บนน้ำแข็งทันที เติม glycerol ที่เจือจาง 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ผสมตะกอนให้เข้ากับสารละลายโดยการพลิกหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอน ทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นเติม glycerol ที่เจือจาง 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมตะกอนให้เข้ากับสารละลายโดยการพลิกหลอดไปมา โดยทำบนน้ำแข็งตลอดการเตรียม ตกตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอน เติม 1 M sorbitol ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมตะกอนให้เข้ากับสารละลายโดยใช้ปิเปต

ดูดขึ้นลง แล้วแบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.6.5 การถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย (*A. tumefaciens*) สายพันธุ์ EHA105

ถ่ายโอนพลาสมิด pCAMBIA1302CHSA หรือ pCAM4'CGT เข้าสู่เซลล์อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ด้วยวิธี electroporation ตามวิธีการของ วิลลาดีนี ลิทวีทซ์ (2554) เริ่มต้นโดยนำพลาสมิด pCAM4'CGT ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีอาหารเหลว YM ปริมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเซลล์คอมพีเทนท์ของอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร แล้วผสมกันอย่างเบามือ แขนบนน้ำแข็ง ทำการเซ็ตเครื่อง electroporation โดยเลือกที่โหมด "Agr (*Agrobacterium*)" จากนั้นดูดเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิดขึ้นมาใส่หลอด electroporation cuvette แล้วนำใส่เครื่อง electroporation จากนั้นกดปุ่ม "Pulse" เพื่อปล่อยกระแสไฟฟ้าให้สามารถนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์อะโกรแบคทีเรีย นำเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิดแขวนน้ำแข็ง จากนั้นเลี้ยงในอาหารเหลว YM นำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเซลล์อะโกรแบคทีเรียบนเหยือกที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เกลี่ยเซลล์อะโกรแบคทีเรียบนอาหารแข็ง YM ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบโคโลนีด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.7 การถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง

3.7.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืชสำหรับถ่ายยีน

เตรียมชิ้นส่วนพืชสำหรับถ่ายยีนตามวิธีการของ รวีรัฐ บัวทอง (2554) เริ่มต้นโดยนำเมล็ดบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาผ่านน้ำไหลนาน 1 ชั่วโมง แล้วทำการฟอกด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที จากนั้นฟอกด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 20 0.1 มิลลิลิตร เขย่านาน 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตัดชิ้นส่วนของคัพภะบริเวณตายอด เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 40 ไมโครโมลลาร์ และ Thidiazuron (TDZ) 0.5 ไมโครโมลลาร์ เป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นย้ายชิ้นส่วนลงในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลลาร์ เป็นเวลา 2 เดือน (Buathong et al 2013.) เพื่อชักนำให้เกิด shoot cluster ก่อนนำมาถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรียอะโกรแบคทีเรีย และเครื่องยิงอนุภาค

3.7.1.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วน ก้านใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

นำชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยมีวิธีการตัดชิ้นส่วนก้านใบดังภาพที่ 3.6 มาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเอกซอร์นนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโตต่างๆ และเพาะเลี้ยงภายใต้แสง cool white fluorescence เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันนาน 12 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design (RCBD) มี 10 treatments 6 ซ้ำๆ ซ้ำละ 5 ชั้นส่วนต่อ treatment อาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ มีดังนี้

วิธีการที่ 1 ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (control)

วิธีการที่ 2 NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ (ภักดี ภักดีงาม. 2548)

วิธีการที่ 3 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.45 ไมโครโมลาร์ (Jheng *et al.* 2006)

วิธีการที่ 4 2,4-D 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 0.5 ไมโครโมลาร์ (มนตรีพร ไชยตะยากร. 2545)

วิธีการที่ 5 2,4-D 9 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 0.8 ไมโครโมลาร์ (Karami *et al.* 2006)

วิธีการที่ 6 2,4-D 18.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 2.22 ไมโครโมลาร์ (Lin *et al.* 2000)

วิธีการที่ 7 picloram 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 1 ไมโครโมลาร์ (Stefanello *et al.* 2005)

วิธีการที่ 8 picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 4.64 ไมโครโมลาร์

(Kaur and Kothari 2004)

วิธีการที่ 9 dicamba 11.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ picloram 4.14 ไมโครโมลาร์

(Przetakiewicz *et al.* 2003)

วิธีการที่ 10 triacontanol 11.38 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.85 ไมโครโมลาร์ (Giridhar *et al.* 2004)



ภาพที่ 3.6 การตัดชิ้นส่วนเริ่มต้นก่อนไปจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (4.40X)

3.7.1.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนตา

ยอดจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยแบ่งออกเป็น 3 การทดลองดังนี้

3.7.1.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนตา

ยอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

นำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะขนาด 3 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3.7) ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาชักนำ การเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ และเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และห้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายใต้แสง cool white fluorescence เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันนาน 8 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ RCBD มี 5 treatments 6 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชื้นส่วน อาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ มีดังนี้

วิธีการที่ 1 NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ (ภักดี ภักดีงาม. 2548)

วิธีการที่ 2 picloram 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 1 ไมโครโมลาร์ (Stefanello *et al.* 2005)

วิธีการที่ 3 picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 4.64 ไมโครโมลาร์ (Kaur and Kothari 2004)

วิธีการที่ 4 dicamba 11.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ (Przetakiewicz *et al.* 2003)

วิธีการที่ 5 triacantanol 11.38 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.85 ไมโครโมลาร์ (Giridhar *et al.* 2004)



ภาพที่ 3.7 แสดงการตัดชิ้นส่วนเริ่มต้นตายออกจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์มณฑริก (4.40X)

1. การบันทึกข้อมูล

1.1 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

1.2 ขนาดของแคลลัส

1.3 จำนวนยอด

1.4 ความยาวยอด

1.5 จำนวนราก

1.6 ความยาวราก

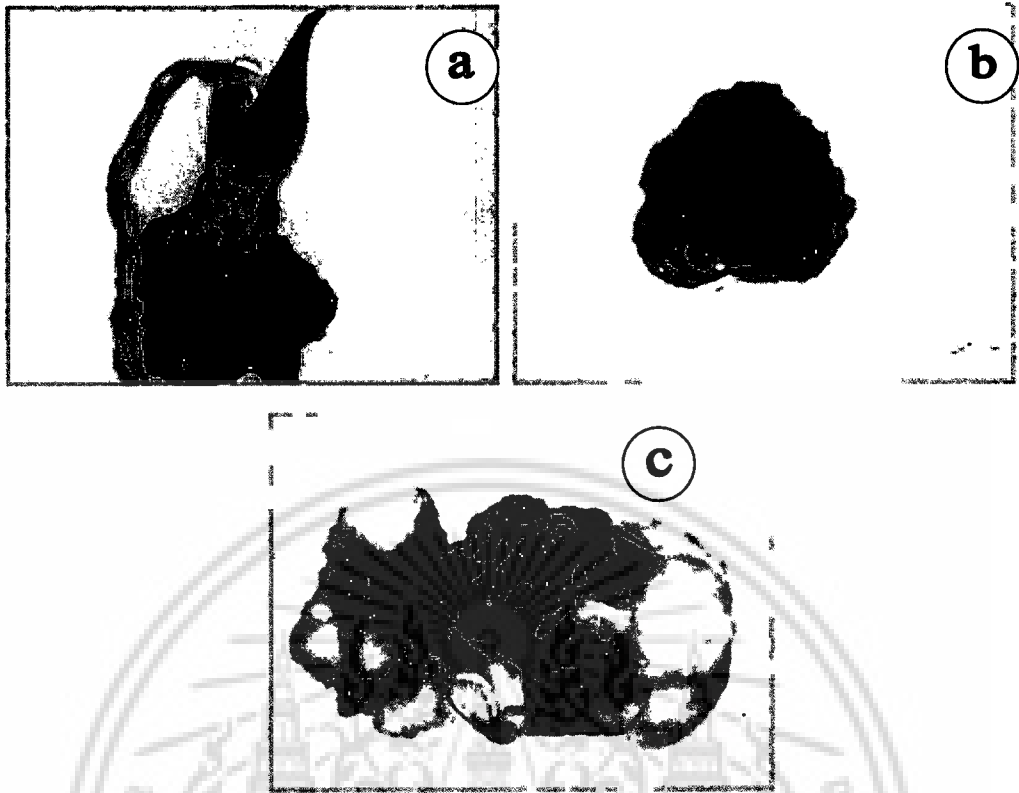
1.7 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วน โดยการให้คะแนน 3 ระดับดังนี้

คะแนน 1 ชิ้นส่วนตายหรือไม่เกิดแคลลัส (ภาพที่ 3.8a)

คะแนน 2 ชิ้นส่วนเกิดแคลลัส ลักษณะเกาะตัวกันแน่นสีเขียว (ภาพที่ 3.8b)

คะแนน 3 ชิ้นส่วนเกิดเอมบริโอจินิกแคลลัส ลักษณะเกาะตัวกันแน่นเป็นก้อนสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 3.8c)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.8 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
 a แสดงการให้คะแนน 1 คะแนน (2.50X) b แสดงการให้คะแนน 2 คะแนน (3.50X)
 c แสดงการให้คะแนน 3 คะแนน (2.85X)

3.7.1.2.2 ศึกษาผลของ 2,4-D และ picloram ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

นำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 13.5, 27.1, 40.7, 54.2 และ 67.8 ไมโครโมลาร์และ picloram ที่ระดับความเข้มข้น 12.4, 24.8, 37.2, 49.6 และ 62.1 ไมโครโมลาร์ และเพาะเลี้ยงภายใต้แสง cool white fluorescence เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันนาน 8 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ RCBD มี 11 treatments 5 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วน

1. การบันทึกข้อมูล
 - 1.1 ขนาดของแคลลัส
 - 1.2 จำนวนยอด
 - 1.3 ความยาวยอด

3.7.1.2.3 ศึกษาผลของ 2,4-D และ picloram ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์นุญทริก

นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์นุญทริกมาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 13.5, 27.1, 40.7, 54.2 และ 67.8 ไมโครโมลาร์และ picloram ที่ระดับความเข้มข้น 12.4, 24.8, 37.2, 49.6 และ 62.1 ไมโครโมลาร์และเพาะเลี้ยงภายใต้แสง cool white fluorescence เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันนาน 8 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ RCBD มี 11 treatments 2 ซ้ำ ซ้ำละ 25 ชิ้นส่วน

1. การบันทึกข้อมูล

1.1 ขนาดของแคลลัส

1.2 จำนวนยอด

1.3 ความยาวยอด

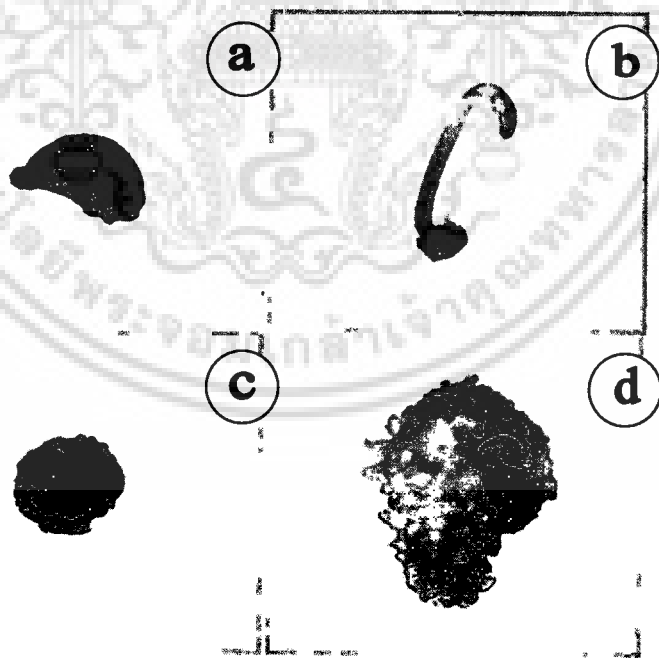
1.4 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วน โดยการให้คะแนน 4 ระดับดังนี้

คะแนน 1 ชิ้นส่วนตาย (ภาพที่ 3.9a)

คะแนน 2 ชิ้นส่วนเกิดยอดสีเขียว (ภาพที่ 3.9b)

คะแนน 3 ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสเกาะตัวกันแน่นสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 3.9c)

คะแนน 4 ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ สีขาวปนเขียว (ภาพที่ 3.9d)



ภาพที่ 3.9 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของบัวหลวงพันธุ์นุญทริก

a แสดงการให้คะแนน 1 คะแนน (3.6X) b แสดงการให้คะแนน 2 คะแนน (3.5X)

c แสดงการให้คะแนน 3 คะแนน (3X) d แสดงการให้คะแนน 4 คะแนน (3.9X)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7.1.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของ บั้วหลวงพันธุ์บุณฑริก

นำชิ้นส่วนตายออกจากคัพเพาะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบั้วหลวงพันธุ์บุณฑริก มาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ภักดิ์ ภักดีงาม, 2548) ที่ได้จากการทดลองที่ 1.2.1 แล้วนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของบั้วหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 40, 50 และ 60 ไมโครโมลาร์ โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD มี 4 treatment 15 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ชิ้นส่วน และเพาะเลี้ยงภายใต้แสง cool white fluorescence เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันนาน 8 สัปดาห์ จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้มาใช้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการถ่ายยีนเข้าสู่ยอดของบั้วหลวงพันธุ์บุณฑริก

1. การบันทึกข้อมูล

1.1 ขนาดแคลลัส

1.2 ความยาวยอด

1.3 จำนวนยอด

1.4 จำนวนใบ

1.5 ความยาวใบ

3.7.2 การถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ

ถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ โดยดัดแปลงวิธีการของ วิลลาสินี ลีทวีทรัพย์ (2554) เริ่มต้นโดยการนำโคโคไนด์เดี่ยวของแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรีย ที่ได้จากข้อ 3.4.1.5 เลี้ยงในอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 2 วันนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ 0.6-0.7 แล้วนำไปหมუნเหียงตกตะกอนที่ 6,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อออก เดิมอาหารเหลว MS ปริมาณ 10 มิลลิลิตร และเติมสารอะซิโตไซริงโณนความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ จากนั้นเจือจางความเข้มข้นของเซลล์อะโกรแบคทีเรีย เป็น 1:10 ด้วยอาหารเหลว MS นำชิ้นส่วน shoot cluster เช่นาน 10 นาที ซับแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรีย ส่วนเกินออกด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมอะซิโตไซริงโณนความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 วัน ในสภาพมืดเพื่อป้องกันไม่ให้อะซิโตไซริงโณนเสื่อมทางเคมีแล้วนำชิ้นส่วน shoot cluster มากำจัดเซลล์อะโกรแบคทีเรียด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติมสารปฏิชีวนะอะม็อกซิซิลลิน ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ที่เติมสารปฏิชีวนะอะม็อกซิซิลลินความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้กำจัดแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียและสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกชิ้นส่วนที่ได้รับการถ่ายยีน *NPTII* โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.3 การถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาค

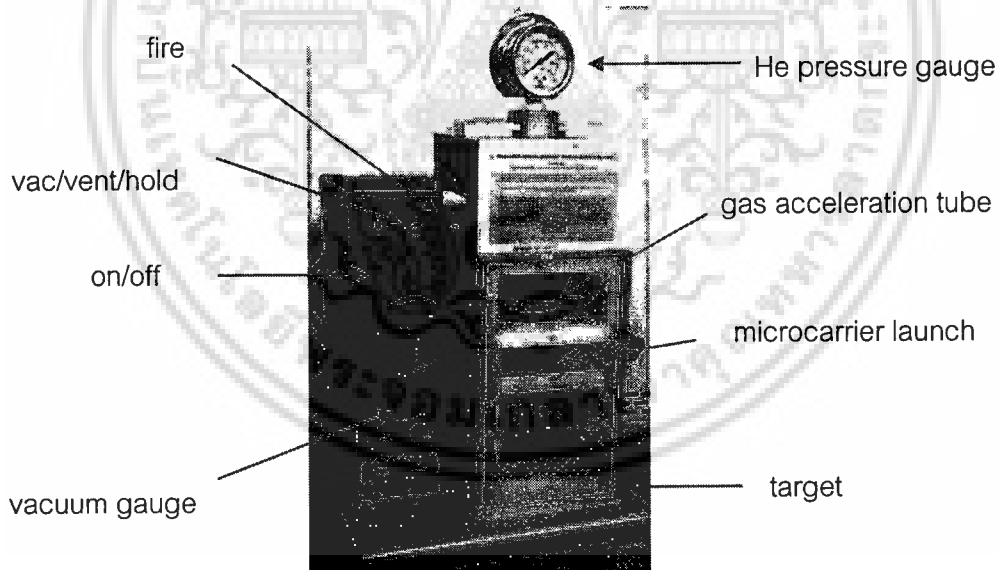
ถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาคตามวิธีการของ รวีรัฐ บัวทอง (2554) ทำการปรับสภาพ osmotic ของชิ้นส่วน shoot cluster ที่เตรียมไว้โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม mannitol 2 โมลลาร์ และ sorbitol 2 โมลลาร์ นำกระดาษกรองรูปร่างกลมเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5 เซนติเมตร วางไว้ด้านบนอาหาร แล้วนำชิ้นส่วนดังกล่าวจำนวน 20 ชิ้น วางบนแผ่นกระดาษกรองรูปร่างกลมเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ก่อนถ่ายยีน เตรียมพลาสติก pCAM4'CGT เคลือบอนุภาคทองคำ โดยใช้อนุภาคทองคำ ปริมาณ 60 มิลลิกรัม ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วล้างด้วย ethanol 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 2 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้อนุภาคทองคำตกตะกอน แล้วดูด ethanol ที่ทำซ้ำขั้นตอนการล้างด้วย ethanol 99 เปอร์เซ็นต์จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำที่หนึ่งฆ่าเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร โดยการเขย่าให้ทองคำกระจายตัวในน้ำ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ตกตะกอนแล้วดูดน้ำใส่ทิ้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากนั้นเติม glycerol เจือจาง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ หลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เตรียมพลาสติกดีเอ็นเอเคลือบอนุภาคทองคำโดยการนำอนุภาคทองคำที่เตรียมไว้มาเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 2 นาทีเพื่อให้อนุภาคทองคำมีการกระจายตัว หลังจากนั้นเติมพลาสติกดีเอ็นเอปริมาณ 5 ไมโครกรัม ผสมให้เข้ากันแล้วเติม แคลเซียมคลอไรด์ 2.5 โมลลาร์ ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม spermidine free base (Sigma-Aldrich, USA) 0.1 โมลลาร์ ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที โดยเขย่าหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์เบาๆ เป็นระยะๆ หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดน้ำใส่ทิ้งแล้วเติม ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบาๆ ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดน้ำใส่ทิ้งแล้วเติม ethanol 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ผสมโดยการเขย่าเบาๆ ให้เป็นเนื้อเดียวกันจะได้อนุภาคทองคำที่เคลือบด้วยพลาสติกดีเอ็นเอเพื่อนำไปใช้ในการถ่ายยีน

ยิงอนุภาคทองคำเคลือบพลาสติกดีเอ็นเอด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS 1000/He (BioRad, USA) ดังแสดงในภาพที่ 3.10 โดยการฉีดทำความสะอาดตู้ยิงด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ นำ microcarriers และ plastic insertion tool ไปนึ่งฆ่าเชื้อ แช่แผ่นกันความดันแก๊ส (rupture disk) ใน isopropanol แล้วนำชิ้นมารอให้แห้ง จากนั้นใส่แผ่นกันความดันแก๊สตามขนาดความดันที่ต้องการลงใน holder ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยการทดลองนี้เลือกใช้ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว แล้วนำเข้าประกบกับเครื่องตรงส่วนปลายของ gas acceleration tube ภายในตู้ยิง ประกอบ microcarriers ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วซึ่งเป็นแผ่นพลาสติกสีเหลืองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 cm เข้ากับ holder ใช้ปิเปตหยดอนุภาคทองคำที่เคลือบด้วยดีเอ็นเอแล้ว ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงตรงกลางแผ่น microcarriers รอให้แห้งพอประมาณ ใช้ปากคีบหยิบตะแกรงลวด (stopping screen) มาวางบน microcarriers launch assembly ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำ macrocarriers ที่แห้งแล้วมาวางบน macrocarriers holder ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะคร่าวๆ ปิดฝา macrocarriers launch assembly แล้วนำไปวางในเครื่องยิงอนุภาค นำจานเพาะเลี้ยงที่มีเนื้อเยื่อเป้าหมายวางบนชั้นวาง (petri dish holder) ให้อยู่ในระดับที่ห่างจากเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ 9 เซนติเมตร หมุนปุ่มปรับความดันแก๊สให้เกิน 200 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เปิด main switch บนส่วนควบคุมข้างตู้ยิง กดปุ่ม vac (vacuum) เพื่อให้ภายในตู้ยิงเป็นสุญญากาศจนถึงระดับ 26-28 นิ้วปรอท โดยให้สังเกตจาก vacuum gauge กดปุ่มเดิมไปที่ hold สังเกตว่าไฟสีแดงจะติดที่ปุ่ม fire ที่อยู่ข้างๆ จึงกดปุ่ม fire ค้างไว้ ระหว่างนี้ให้สังเกต He pressure gauge ให้ได้แรงดันที่ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และจะได้ยินเสียงดังคล้ายเกิดการระเบิดภายในตู้ยิงจึงปล่อยมือจากปุ่ม fire กดปุ่ม vac ไปที่ vent เพื่อปล่อยอากาศเข้าไปภายในตู้ยิง เมื่อไม่มีสภาพสุญญากาศจะสามารถเปิดฝาตู้ได้ ปิดฝาจานเพาะเลี้ยงและนำจานเพาะเลี้ยงที่มีเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ถูกยิงแล้วออกมา นำเนื้อเยื่อที่ผ่านการถ่ายยีนแล้วมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลลาร์ เพื่อปรับสภาพ osmotic ของเซลล์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลลาร์ ร่วมกับสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 16 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์



ภาพที่ 3.10 ส่วนประกอบต่างๆ ของเครื่องยิงอนุภาครุ่น PDS 1000/He (BioRad, USA)

3.7.4 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ใช้ genomic DNA ใบบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนแบบอะโกรแบคทีเรีย และการยิงอนุภาคมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* และ *NPTII* โดยทำปฏิกิริยาไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 44 อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O ปริมาณ 12.8 ไมโครลิตร, 10x Taq buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, MgCl₂ 25 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, cDNA ของบัวหลวง ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (Fermentas, USA) ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร, ไพรมเมอร์ F-gusA 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ ไพรมเมอร์ R-gusA 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GUS โดยออกแบบไพรมเมอร์ตามรายงานของ Hajian *et al.* (2011) และ ไพรมเมอร์ F-NPTII 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ ไพรมเมอร์ R-NPTII 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน NPTII โดยออกแบบไพรมเมอร์ตามรายงานของ Faize *et al.* (2010) (ตารางผนวกที่ 1) ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันดีในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องโดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำผลผลิตที่ซีอาร์ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

3.7.5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน

3.7.5.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน GUS ด้วยวิธี GUS

histochemical assay

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน GUS ด้วยวิธี GUS histochemical assay นำใบของพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีน GUS มาแช่ในสารละลาย X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide) ซึ่งเป็นซับสเตรตของเอนไซม์ β-glucuronidase โดยอาศัยเครื่องบ่มสุญญากาศที่แรงดัน 300 มิลลิบาร์ ตามวิธีการของ Matsumoto *et al.* (2009) เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กำจัดคลอโรฟิลล์ด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ นำมาตรวจสอบการแสดงออกของ GUS โดยการสังเกตจากการเกิดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนพืชภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป

3.7.5.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

3.7.5.2.1 การเตรียม cDNA ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

สกัดอาร์เอ็นเอจากบัวหลวงตามวิธีการของ Invitrap[®] Spin Plant RNA Mini Kit (Stratag molecular, Germany) กำจัดดีเอ็นเอปนเปื้อน และสังเคราะห์ cDNA ดังขั้นตอนในข้อ 3.2 ใช้ cDNA ใบบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนยีนแบบอะโกราเบคทีเรียเป็นพาหะและการยิงอนุภาคเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำการถ่ายเข้าสู่บัวหลวงโดยทำปฏิกิริยาในปริมาณ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O ปริมาณ 12.8 ไมโครลิตร, 10x Taq buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, MgCl₂ 25 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, cDNA ของบัวหลวง ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 45 และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Fermentas, USA) ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตรปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร, F-Bam HI-4'CGT 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ R-4'CGT –Sac I 10 ไมโครโมลลาร์ (ตารางผนวกที่ 1) ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันดีในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์ โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

3.7.5.2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* และ *NPTII* ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ใช้ cDNA ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนแบบอะโกรแบคทีเรียมและการยิงอนุภาคมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* และ *NPTII* โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O ปริมาณ 12.8 ไมโครลิตร, 10x Taq buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, MgCl₂ 25 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, cDNA ของบัวหลวง ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (Fermentas, USA) ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตรปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร, ไพรมเมอร์ F-gusA 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ ไพรมเมอร์ R-gusA 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* โดยออกแบบไพรมเมอร์ตามรายงานของ Hajian *et al.* (2011) และ ไพรมเมอร์ F-NPTII 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ ไพรมเมอร์ R-NPTII 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NPTII* โดยออกแบบไพรมเมอร์ตามรายงานของ Faize *et al.* (2010) (ตารางผนวกที่ 1) ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันดีในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

3.7.5.2.3 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนแบบอะโกรแบคทีเรียมและการยิงอนุภาคโดยวิธีการ semi-quantitative PCR

ทำการปรับความเข้มข้นของ cDNA เริ่มต้นที่สังเคราะห์ได้จากใบของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนของพลาสมิด pCAM4'CGT และใบบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนพลาสมิด pCAM4'CGT ให้เท่ากันโดยใช้ยีน *18s rRNA* เป็นยีนอ้างอิง เมื่อปรับความเข้มข้นของ cDNA ของแต่
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละตัวอย่างให้เท่ากันแล้วใช้ cDNA ดังกล่าวเป็นต้นแบบในการตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* และ *CHS* ด้วยวิธีการ semi-quantitative PCR

ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O ปริมาณ 12.8 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, MgCl₂ 25 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, cDNA ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT* หรือ cDNA ของบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT* ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร, โพรเมอร์ CHSF 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ โพรเมอร์ CHSR 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CHS* (ตารางผนวกที่ 1), โพรเมอร์ F3H_SenseF 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ โพรเมอร์ F3H_STOP 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* โดยออกแบบโพรเมอร์ตามรายงานของ ชัยวรกุล ไชยปัญญา. (2555) (ตารางผนวกที่ 1) ผสมสารให้เข้ากันในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์ โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

3.7.5.2.4 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *CHS*, *4'CGT*, *F3H*, *GUS* และ *NPTII* ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนแบบอะโกรแบคทีเรียและการยิงอนุภาค โดยเทคนิค real-time PCR

ปรับปริมาณ cDNA เริ่มต้นของชิ้นส่วนพีซีอาร์ที่ได้รับหรือไม่ได้รับพลาสมิด pCAM4'*CGT* 8 ให้เท่ากันโดยใช้ยีน 18s rRNA เป็นยีนอ้างอิง โดยเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O 3.5 ไมโครลิตร 2x SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix ปริมาณ 5 ไมโครลิตร cDNA ของลินมังกร ความเข้มข้น 2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร โพรเมอร์ F-18S ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.25 ไมโครลิตร และโพรเมอร์ R-18S ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.25 ไมโครลิตร โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เมื่อสามารถปรับความเข้มข้น cDNA ของแต่ละตัวอย่างให้เท่ากันแล้ว ใช้ cDNA ดังกล่าวเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาการแสดงออกของยีน *CHS*, *4'CGT*, *F3H*, *GUS* และ *NPTII* โดยเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH_2O ปริมาณ 3.5 ไมโครลิตร 2xSsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix ปริมาณ 5 ไมโครลิตร cDNA ของลิ้นมังกร ความเข้มข้น 2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ไพร์เมอร์ F-*CHS*, R-*CHS* (สำหรับยีน *CHS*) ไพร์เมอร์ F-*4'CGT*, R-*4'CGT* (สำหรับยีน *4'CGT*) ไพร์เมอร์ F-*F3H*, R-*F3H* (สำหรับยีน *F3H*) ไพร์เมอร์ F-*GUS*, R-*GUS* (สำหรับยีน *GUS*) และไพร์เมอร์ F-*NPTII*, R-*NPTII* (สำหรับยีน *NPTII*) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลลาร์ ชนิดละ 0.25 ไมโครลิตร โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 45 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

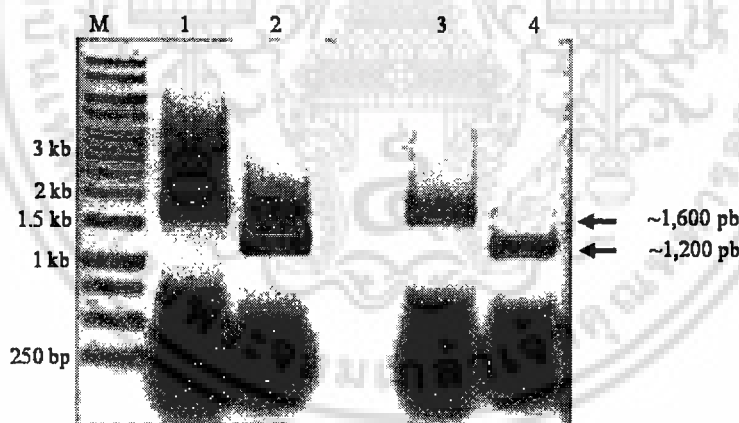
บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การโคลนยีน *chalcone synthase (CHS)*, *flavonone 3-hydroxylase (F3H)*, *chalcone* และ *4'-O-glucosyltransferase (4'CGT)*

4.1.1 ยีน *CHS*

โคลนยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ DNA ต้นแบบเป็น genomic DNA และ cDNA ที่สกัดได้จากกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์ทริกสีขาวยุคแรก และกลีบดอกบัวหลวงสีดตบงกชกลีบดอกสีชมพู 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 ของบัวหลวงพันธุ์ทริกและบัวหลวงสีดตบงกชขนาดใกล้เคียงกัน คือ ขนาดประมาณ 1,600 bp (ภาพที่ 4.1 ช่อง 1 และ 3) และได้ผลผลิต PCR ของยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ที่โคลนจาก cDNA ที่สังเคราะห์จาก RNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์ทริกสีขาวยุคแรก และกลีบดอกบัวหลวงสีดตบงกชกลีบดอกสีชมพูขนาดใกล้เคียงกัน คือ ขนาดประมาณ 1,200 bp (ภาพที่ 4.1 ช่อง 2 และ 4)



ภาพที่ 4.1 ผลผลิต PCR ของยีน *CHS* แบบเต็มเส้น; (1) ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของบัวหลวงพันธุ์ทริก ขนาดประมาณ 1,600 bp, (2) ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของบัวหลวงพันธุ์ทริก ขนาดประมาณ 1,200 bp, (3) ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของบัวหลวงสีดตบงกช ขนาดประมาณ 1,600 bp และ (4) ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของบัวหลวงสีดตบงกช ขนาดประมาณ 1,200 bp (M = 1kb DNA marker)

4.1.1.1 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 bp 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 bp (ตั้งแต่ตำแหน่งลำดับที่ 1 ถึง 178) และ 992 bp (ตั้งแต่ตำแหน่งลำดับที่ 608 ถึง 1,599) และมีส่วนของ intron 1 ขึ้น ขนาด 429 bp (ตั้งแต่ตำแหน่งลำดับที่ 179 ถึง 607) มีส่วนที่เป็นรหัสของกรดอะมิโนขนาด 1,167 bp สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 389 กรดอะมิโน ส่วนยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช มีส่วนของ exon 2 ขึ้น ขนาด 178 bp (ตั้งแต่ตำแหน่งลำดับที่ 1 ถึง 178) และ 992 bp (ตั้งแต่ตำแหน่งลำดับที่ 608 ถึง 1,599) และมีส่วนของ intron 1 ขึ้น ขนาด 429 bp (ตั้งแต่ตำแหน่งลำดับที่ 179 ถึง 607) มีส่วนที่เป็นรหัสของกรดอะมิโนขนาด 1,167 bp สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 389 กรดอะมิโน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนของยีนด้วยวิธี ClustalW multiple alignment พบว่า ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช พบว่า มีความเหมือนกันมากกว่าร้อยละ 99 ในระดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 4.2)

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) พบว่า ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช มีขนาดเท่ากัน คือ 1,170 bp และเมื่อนำนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีนด้วยโปรแกรม GENSCAN พบว่า ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก มีส่วนของยีน *CHS* ขนาด 1,170 bp มีส่วนที่เป็นรหัสของกรดอะมิโนขนาด 1,167 bp สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 389 กรดอะมิโน ส่วนยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช มีส่วนของยีน *CHS* ขนาด 1,170 bp มีส่วนที่เป็นรหัสของกรดอะมิโนขนาด 1,167 bp สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 389 กรดอะมิโน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนของยีนด้วยวิธี ClustalW multiple alignment พบว่า ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช พบว่า มีความเหมือนกันมากกว่าร้อยละ 99 ในระดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 4.3) และมีความเหมือนกันร้อยละ 99 ในระดับกรดอะมิโน (ภาพที่ 4.4)

4.1.1.2 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช กับพืชอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช มาเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) กับยีน *CHS* ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GenBank 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 GenBank 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* (ต้นฮ็อปป) (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* (แอปเปิลกาล่า) (accession no. DQ026297) ร้อยละ 80, *Prunus persica* (ต้นท้อ) (accession no. HM543568) ร้อยละ 79, *Fragaria x ananassa* (สตรอเบอร์รี่) (accession no. AB201756) ร้อยละ 79 และ *Pyrus pyrifolia* cv Yanshan Red (สาละ) (accession no. JQ060997) ร้อยละ 79 เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 51 และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.1.3 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช กับพืชอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช มาเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% 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 ของกลีบดอกบัวหลวงทั้งสองชนิดมีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GenBank ประมาณร้อยละ 95 - 86 (ตารางที่ 4.1) 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* (ฉัตรจีน) (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* (สตรอว์เบอร์รี่) (accession no. BAE17124) ร้อยละ 90, *Humulus lupulus* (ต้นฮอป) (accession no. CAK19318) ร้อยละ 90, *Pyrus pyrifolia* (สาหล่า) (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

4.1.1.4 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงนุทริกและบัวหลวงสัตตบงกช กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* พืชอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงนุทริกและบัวหลวงสัตตบงกช กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* พืชอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank ด้วยโปรแกรม MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) โดยเลือกวิธีการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี Minimum evolution method และใช้วิธีการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Bootstrap test โดยใช้จำนวนรอบ 500 รอบ โดยเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* พืชอื่น 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* (ต้นฮ็อป) (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* (ดอกกรักรู่) (accession no. BAJ14516), *Gentiana triflora* (ต้นเงินเทียน) (accession no. BAE45039), *Zea mays* (ข้าวโพด) (accession no. NP001149022), *Arabidopsis thaliana* (อะราบิโดอปซิส) (accession no. AAZ23741), *Antirrhinum majus* (ต้นลิ้นมังกร) (accession no. BAE80511) และ *Phalaenopsis hybrida* (กล้วยไม้ ฟาแลนนอปซิส) (accession no. AAX54693) พบว่า ลำดับเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดอะมิโนของยีน CHS ของบัวหลวงทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแยกตัวออกมาจากพืชในกลุ่มอื่น อยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกับ *N. nucifera* (ภาพที่ 4.5) และอยู่ในกลุ่มใหญ่เดียวกับ กลุ่มไม้ยืนต้น ใบเลี้ยงคู่ เช่น *Theobroma cacao* (โกโก้), *Camellia sinensis* (ชาจีน) และ *Malus domestica* (แอปเปิล) เป็นต้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และห้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | | | | | |
|-----------|-------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| 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 | TCACTGTCGA | GTCGATTGGC | AACCGGCAGT | CGATCGGAAG | 240 |
| gCHSF_SAT | | | | | |G..... | 240 |
| gCHSF_BUN | ACATTGTCCC | TGGGTCAATG | CATCTGTCTA | TTTTGAGTGA | ATTGATCAAA | ACAAACACAG | 300 |
| gCHSF_SAT | | | | | | | 300 |
| gCHSF_BUN | ATATTGAGCT | TTAGCTTATT | TAGAGGGATT | TGAAC TTGA | AGTATGATCA | TATCATA CAT | 360 |
| gCHSF_SAT | | | | | | | 360 |
| gCHSF_BUN | ATAGAGAGTT | TCTTTAGCTA | AAGTGT TGA | ATATTAGTTC | ATTGTTAGAT | TTTTTTTTTTT | 420 |
| gCHSF_SAT | | | | | | | 420 |
| gCHSF_BUN | TTCACCCAGT | TTTGGGTGAA | TTTATTGATC | CATGGCCAAG | ACAAATAGAC | CTGGCCAGAA | 480 |
| gCHSF_SAT |T..... | | | | | | 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 | CATTTTCAGGC | 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_SAT | | | |G..... | | | 780 |
| gCHSF_BUN | GGGACAGCCC | AAGTCCAAGA | TCACCCACCT | TGCTCTCTGC | ACCACCAGTG | GCGTCGACAT | 840 |
| gCHSF_SAT | | | | | | | 840 |
| gCHSF_BUN | GCCC GGGCT | GACTACCAGC | TCACCAAGCT | CCTCGGCCTT | CGCCCTCCG | TCAAGAGACT | 900 |
| gCHSF_SAT | | | | | | | 900 |
| gCHSF_BUN | CATGATGTAC | CAACAAGGAT | GCTTCGCCGG | AGGCACAGTC | CTTCGCCTGG | CCAAGGACCT | 960 |
| gCHSF_SAT | | | | | | | 960 |
| gCHSF_BUN | TGCAGAGAAC | AACAGAGGCG | CCCGTGCCT | TGTCGTCTGC | TCAGAGCTCA | CTGCTGTTAC | 1020 |
| gCHSF_SAT | | | | | | | 1020 |
| gCHSF_BUN | CTTCCGTGGT | CCAAGTGATA | CCCACCTCGA | CAGTCTTGTA | GGCCAGGCAC | TCTTCGGGGA | 1080 |
| gCHSF_SAT | | | | | | | 1080 |
| gCHSF_BUN | TGGAGCAGCC | GCAGTTATTG | TGGGTGCAGA | CCCGGTGCC | GGTGTAGAAA | AGCCTTTGTT | 1140 |
| gCHSF_SAT | | | | | | | 1140 |
| gCHSF_BUN | TGAGTTGGTG | TCGGCAGCCC | AGACAATTCT | CCCAGACAGC | CATGGGCCA | TTGACGGGCA | 1200 |
| gCHSF_SAT | | | | | | | 1200 |
| gCHSF_BUN | CCTGAGAGAG | GTTGGACTTA | CCTTCCACCT | GCTCAAGGAT | GTGCCCGGGC | TCATCTCAAA | 1260 |
| gCHSF_SAT | | | | | | | 1260 |
| gCHSF_BUN | GAACATCGAG | AAGAGCCTGG | TGGAGGCATT | CCAGCCTCTG | GGCATCTCCG | ACTGGA ACTC | 1320 |
| gCHSF_SAT | | | | | | | 1320 |
| gCHSF_BUN | AATTTTCTGG | ATCGCCACCC | CTGGTGGTCC | AGCCATCCTA | GACCAAGTGG | AAGAAAAGCT | 1380 |
| gCHSF_SAT | | | | | | | 1380 |
| gCHSF_BUN | GGCCCTTAAG | CCCGAGAAGC | 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 4.2 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CHS ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริก (gCHSF_BUN) และบัวหลวงสัตตบงกช (gCHSF_SAT) ด้วยโปรแกรม ClustalW multiple alignment (ตัวอักษรที่บ แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ start codon (ATG) และ stop codon (TAG) ของยีน, ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง intron แสดงเป็นตัวอักษรขีดเส้นใต้ และเครื่องหมาย . แสดงความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | | | | | |
|-----------|-------------------|------------|--------------------|------------|------------|-------------|------|
| cCHSF_BUN | <u>ATGGTGACCG</u> | TGGAAGACAT | CCGCAAGGCA | CAGAGGGCTG | AAGGCCCGGC | CACGGTGATG | 60 |
| cCHSF_SAT | | | | | | | 60 |
| cCHSF_BUN | GCCATTGGAA | 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 | ACCACCAAGT | GCGTCGACAT | GCCCCGGGCT | 420 |
| cCHSF_SAT | | | | | | | 420 |
| cCHSF_BUN | GACTACCAGC | TCACCAAGCT | CCTCGGCCTT | CGCCCCCTCC | TCAAGAGACT | CATGATGTAC | 480 |
| cCHSF_SAT | | | | | | | 480 |
| cCHSF_BUN | CAACAAGGAT | GCTTCGCCCG | AGGCACAGTC | CTTCGCCTGG | CCAAGGACCT | TGCAGAGAAC | 540 |
| cCHSF_SAT | | | | | | | 540 |
| cCHSF_BUN | AACAGAGCGC | CCCGTGTCTT | TGTCGTCTGC | TCAGAGCTCA | CTGCTGTTAC | CTTCCGTGGT | 600 |
| cCHSF_SAT | | | | | | | 600 |
| cCHSF_BUN | CCAAGTGATA | CCCACCTCGA | CAGTCTTGTA | GGCCAGGCAC | TCTTCGGGGA | TGGAGCAGCC | 660 |
| cCHSF_SAT | | | | | | | 660 |
| cCHSF_BUN | GCAGTTATTG | TGGGTGCAGA | CCCGGTGCCC | GGTGTAGAAA | AGCCTTTGTT | TGAGTTGGTG | 720 |
| cCHSF_SAT | | | | | | | 720 |
| cCHSF_BUN | TCGGCAGCCC | AGACAATTCT | CCCAGACAGC | CATGGCGCCA | TTGACGGGCA | CCTGAGAGAG | 780 |
| cCHSF_SAT | | | | | | | 780 |
| cCHSF_BUN | GTTGGACTTA | CCTTCCACCT | GCTCAAGGAT | GTGCCCGGGC | TCATCTCAAA | GAACATCGAG | 840 |
| cCHSF_SAT | | | | | | | 840 |
| cCHSF_BUN | AAGAGCCTGG | TGGAGGCATT | CCAGCCTCTG | GGCATCTCCG | ACTGGAATC | AATTTTCTGG | 900 |
| cCHSF_SAT | | | | | | | 900 |
| cCHSF_BUN | ATCGCCCACC | CTGGTGGTCC | AGCCATCCTA | GACCAAGTGG | AAGAAAAGCT | GGCCCTTAAG | 960 |
| cCHSF_SAT | | | | | | | 960 |
| cCHSF_BUN | CCCGAGAAGC | TAAGCGCCAC | ACGACACATC | CTGAGCGAGT | ATGGAAACAT | GTC AAGTGCT | 1020 |
| cCHSF_SAT | | | | | | | 1020 |
| cCHSF_BUN | TGTGTGCTGT | TCATATTGGA | TGAGATGCGG | AAGAAGTCGA | TTGAGGATGG | CCTCAAGACC | 1080 |
| cCHSF_SAT | | | | | | | 1080 |
| cCHSF_BUN | ACTGGAGAAG | GGCTCGAGTG | GGGTGTGCTG | TTGGGTTTG | GACCAGGGCT | AACCGTTGAG | 1140 |
| cCHSF_SAT | | | | | | | 1140 |
| cCHSF_BUN | ACTGTGGTGC | TTCACAGTAT | CGCTGCC <u>TAG</u> | 1170 | | | |
| cCHSF_SAT | | | | 1170 | | | |

ภาพที่ 4.3 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของ กลีบดอกบัวหลวงมุนทริก (*cCHSF_BUN*) และบัวหลวงสัตตบงกช (*cCHSF_SAT*) ด้วย โปรแกรม ClustalW multiple alignment (ส่วนที่ขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ start codon (ATG) และ stop codon (TAG) ของยีน, เครื่องหมาย (.) แสดงความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่ง)

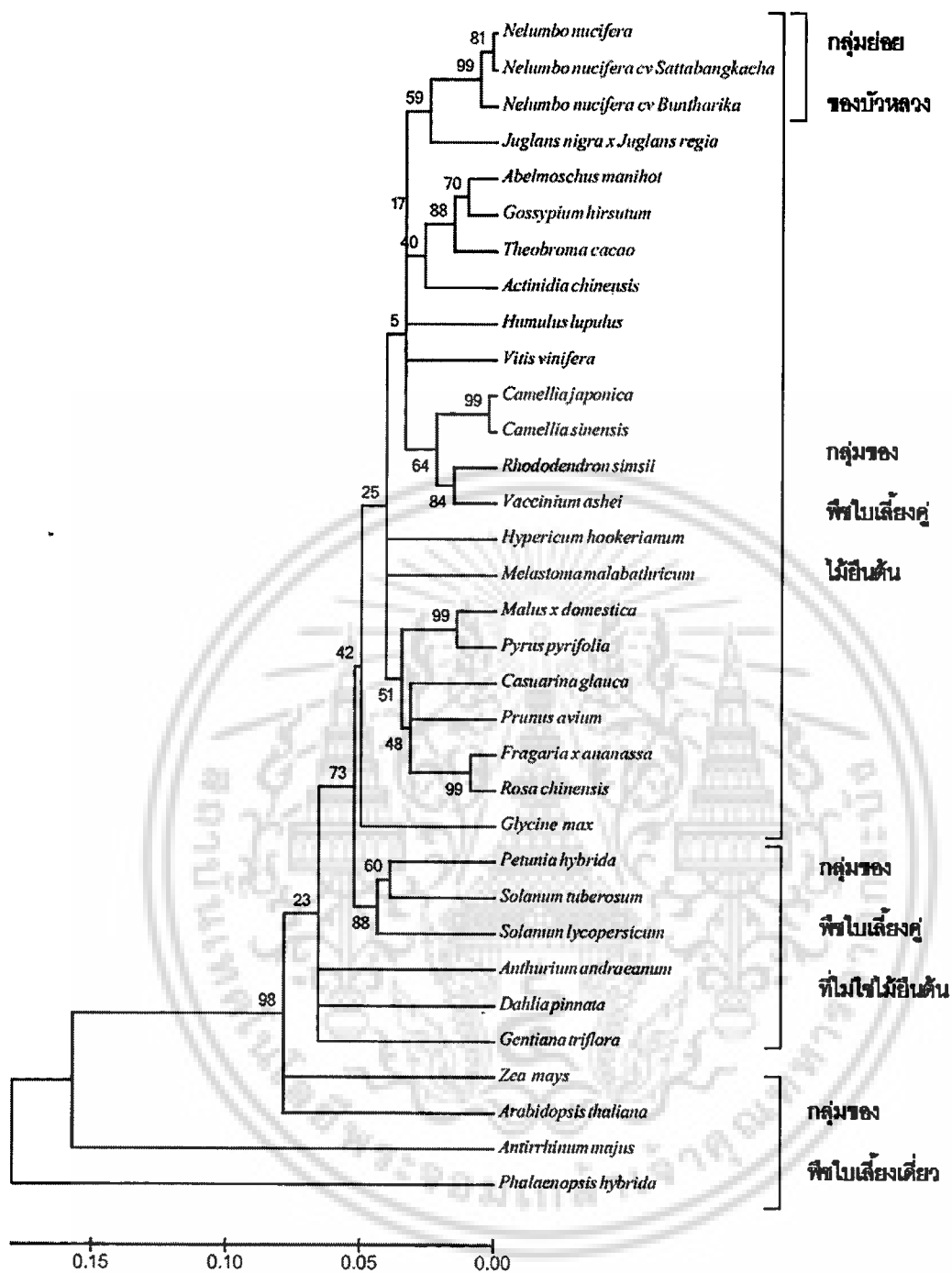
| | | | | | | | |
|-----------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| cCHSF_BUN | MVTVEDIRKA | QRAEGPATVM | AIGTANPPNC | VDQSTYPDYY | FRITNSEHKT | ELKEKFKRMC | 60 |
| cCHSF_SAT | | | | | | | 60 |
| cCHSF_BUN | EKSMIKKRYM | HLTEEILKEN | PNICEYMASS | LDARQDMVVV | EVPKLGKEAA | TKAIKEWGQP | 120 |
| cCHSF_SAT | | | | | | | 120 |
| cCHSF_BUN | KSKITHLVFC | TTSGVDMPGA | DYQLTKLLGL | RPSVKRLMMY | QQGCFAGGTV | LRLAKDLAEN | 180 |
| cCHSF_SAT | | | | | | | 180 |
| cCHSF_BUN | NRGARVLVVC | SELTAVTFRG | PSDTHLDSL | GQALFGDGAA | AVIVGADPVP | GVEKPLFELV | 240 |
| cCHSF_SAT | | | | | | | 240 |
| cCHSF_BUN | SAAQTILPDS | HGAIDGHLRE | VGLTFHLLKD | VPGLISKNIE | KSLVEAFQPL | GISDWNSIFW | 300 |
| cCHSF_SAT | | | | | | | 300 |
| cCHSF_BUN | IAHPGGPAIL | DQVEEKLALK | PEKLSATRHI | LSEYGMSSA | CVLFILDEMR | KKSIEDGLKT | 360 |
| cCHSF_SAT | | |R..... | | | | 360 |
| cCHSF_BUN | TGEGLEWGV | FGFGPGLTVE | TVVLHSIAA* | 389 | | | |
| cCHSF_SAT | | |* | 389 | | | |

ภาพที่ 4.4 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก (cCHSF_BUN) และบัวหลวงสัตตบงกช (cCHSF_SAT) ด้วยโปรแกรม ClustalW multiple alignment (เครื่องหมาย * หมายถึง ไม่สามารถแปลเป็นกรดอะมิโนได้ เนื่องจากเป็น stop codon)



ตารางที่ 4.1 ผลการเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) ของลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงสัตตบงกช กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX

| พืช | ชื่อสามัญ | Accession no. | Enzyme name | % identity |
|---|--------------|---------------|--------------------------------|------------|
| <i>N. nucifera</i> cv. Buntharik | | - | chalcone synthase | - |
| <i>N. nucifera</i> cv. Sattabangkacha | | - | chalcone synthase | 99 |
| <i>N. nucifera</i> | บัวหลวง | ADD74169 | chalcone synthase | 98 |
| <i>Juglans nigra</i> x <i>Juglans regia</i> | วอลนัท | CAA64452 | naringenin-chalcone synthase | 95 |
| <i>Abelmoschus manihot</i> | ปอแก้ว | ACE60221 | chalcone synthase | 93 |
| <i>Gossypium hirsutum</i> | ฝ้าย | ABS52573 | chalcone synthase | 94 |
| <i>Theobroma cacao</i> | โกโก้ | XP007034442 | chalcone and stilbene synthase | 93 |
| <i>Actinidia chinensis</i> | กีวี | AGV53049 | chalcone synthase | 93 |
| <i>Humulus lupulus</i> | ต้นฮ้อป | CAK19318 | naringenin-chalcone synthase | 90 |
| <i>Vitis vinifera</i> | องุ่นทำไวน์ | AEP17003 | chalcone synthase | 92 |
| <i>Camellia sinensis</i> | ชาจีน | P48386 | naringenin-chalcone synthase 1 | 93 |
| <i>Rhododendron simsii</i> | กุหลาบพันปี | CAC88858 | chalcone synthase | 93 |
| <i>Vaccinium ashei</i> | บลูเบอร์รี่ | BAO58433 | chalcone synthase | 91 |
| <i>Melastoma malabathricum</i> | ต้นบัวทอง | AGW24283 | chalcone synthase | 89 |
| <i>Malus domestica</i> | แอปเปิล | AAV45748 | chalcone synthase | 91 |
| <i>Pyrus pyrifolia</i> | สาเล่ | AFH68066 | chalcone synthase | 90 |
| <i>Casuarina glauca</i> | River oak | Q9ZRR8 | chalcone synthase | 93 |
| <i>Prunus avium</i> | เชอร์รี่ | ADZ54780 | naringenin-chalcone synthase | 91 |
| <i>Fragaria x ananassa</i> | สตรอเบอร์รี่ | BAE17124 | chalcone synthase | 90 |
| <i>Rosa chinensis</i> | กุหลาบ | AEC13058 | chalcone synthase | 90 |
| <i>Glycine max</i> | ถั่วเหลือง | ABB30178 | chalcone synthase1 | 90 |
| <i>Petunia x hybrida</i> | พิทูเนีย | BAM17286 | chalcone synthase | 90 |
| <i>Solanum lycopersicum</i> | มะเขือเทศ | NP001234036 | chalcone synthase 2 | 89 |
| <i>Solanum tuberosum</i> | มันฝรั่ง | AEN83501 | chalcone synthase | 89 |
| <i>Anthurium andraeanum</i> | ดอกหน้าวัว | AAP20864 | chalcone synthase | 90 |
| <i>Dahlia pinnata</i> | ดอกกรรเก | BAJ14516 | chalcone synthase | 89 |
| <i>Gentiana triflora</i> | ต้นเงินเทียน | BAE45039 | chalcone synthase | 88 |
| <i>Zea mays</i> | ข้าวโพด | NP001149022 | chalcone synthase | 86 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | อราบิโดปซิส | AAZ23741 | chalcone synthase | 85 |
| <i>Antirrhinum majus</i> | ต้นลิ้นมังกร | BAE80511 | chalcone synthase | 86 |
| <i>Phalaenopsis hybrida</i> | กล้วยไม้ | AAX54693 | chalcone synthase | 85 |



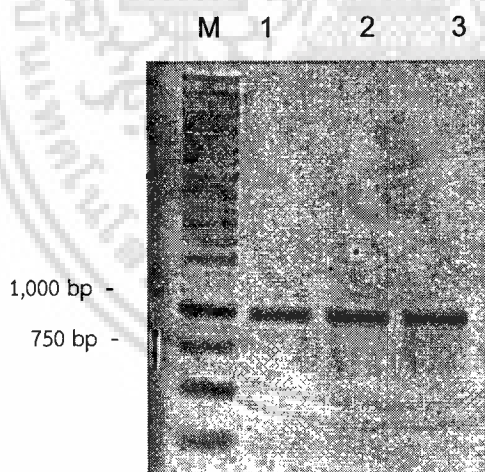
ภาพที่ 4.5 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของยีน CHS ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก และบัวหลวงสัตตบงกช กับลำดับกรดอะมิโนของยีน CHS ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA5 (Tamura et al. 2011) ตัวเลขบนแขนง (node) แสดงเปอร์เซ็นต์ความน่าเชื่อถือจากการคำนวณด้วย Bootstrap test จำนวน 500 รอบ (สเกลแสดงระยะห่างทางพันธุกรรม 0.05 แสดงการแทนที่ของกรดอะมิโน 5 เปอร์เซ็นต์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ยีน *F3H*

4.1.2.1 การสังเคราะห์ยีน *F3H* บางส่วน โดยใช้ degenerated primer

สังเคราะห์ยีน *F3H* ในดอกอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์มีกลีบดอกสีเหลือง ปทุมชาติสีดตบงกช กลีบดอกสีชมพู และปทุมชาติบุณทริกกลีบดอกสีขาว เพื่อศึกษาความแตกต่างและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *F3H* ระหว่างปทุมชาติสีต่างๆ และระหว่างปทุมชาติกับอุบลชาติ ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์คู่กับ degenerated primer คือ *F3H* Forward primer และ *F3H* Reverse primer (ตารางผนวกที่ 1) ที่จับบริเวณตำแหน่งอนุรักษ์บนยีน *F3H* ซึ่งออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ของยีน *F3H* ในพืชต่างๆ ผลที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด ประมาณ 900 นิวคลีโอไทด์ เมื่อใช้อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เท่านั้นสำหรับขั้นตอน annealing ในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (ภาพที่ 4.6) จากนั้นสกัดแยกผลผลิตพีซีอาร์ออกจากเจลเพื่อนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pTZ57RT แล้วถ่ายโอนเข้าแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ เลือกโคลนีสีขาวเพื่อตรวจสอบชิ้นส่วนของยีน *F3H* ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pTZ57RT (pTZ-*F3H*) ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ผลปฏิกิริยาพีซีอาร์พบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 นิวคลีโอไทด์ จากโคลน pTZ-*F3H* จากตัวอย่างของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสีดตบงกชและปทุมชาติบุณทริก คัดเลือกโคลนที่ถูกต้องนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer คือ M13F และ M13R



ภาพที่ 4.6 ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ยีน *F3H* จาก cDNA ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ (1) ปทุมชาติสีดตบงกช (2) ปทุมชาติบุณทริก (3) ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (M)

4.1.2.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนบางส่วนของ *F3H* ในอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุณฑริก

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ายีน *F3H* ที่โคลนได้มีขนาด 823 นิวคลีโอไทด์ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *F3H* ที่โคลนได้จากอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุณฑริก มาเปรียบเทียบกับโปรแกรม BioEdit พบว่ามีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.7) เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *F3H* ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *F3H* ของพืชต่างๆ ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTX พบว่ายีน *F3H* ที่สังเคราะห์ได้จากอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุณฑริก แสดงความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *F3H* ของไอริส (*Iris hollandica*) (BAD86791.1) 82 เปอร์เซ็นต์ มันเทศ (*Ipomoea batatas*) (BAA75309.1) 79 เปอร์เซ็นต์ สตรอเบอรี่ (*Fragaria ananassa*) (AAU04791.1) 75 เปอร์เซ็นต์ สมอจีน (*Canarium album*) (AEO36935.1) 73 เปอร์เซ็นต์ ฝ้าย (*Gossypium hirsutum*) (ABM64799.1) 71 เปอร์เซ็นต์ และหรีด (*Gentiana triflora*) (BAD91807.1) 71 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

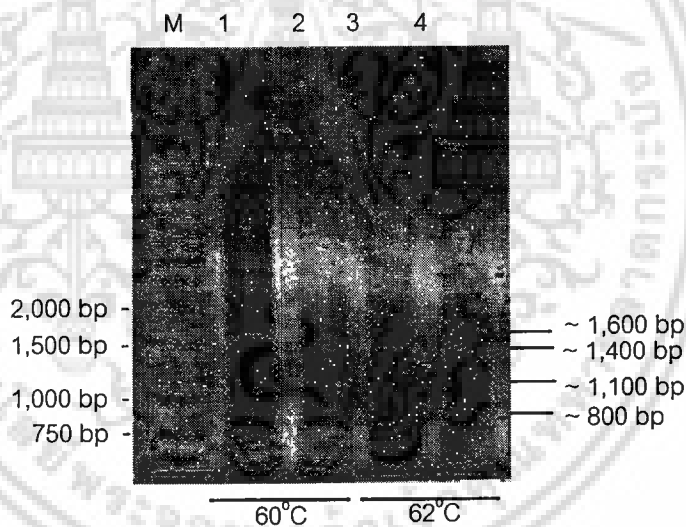


ตารางที่ 4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *F3H* ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสีตัดบงกชและปทุมชาติบุญทริก กับฐานข้อมูล โปรตีนบน GenBank (BLASTX)

| Accession number | Plant | Gene name | %Identity score |
|------------------|--|---|-----------------|
| | <i>Nelumbo nucifera</i> Geartn. 'Satabankacha' | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 100 |
| | <i>Nelumbo nucifera</i> Geartn. 'Buntharik' | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 100 |
| | <i>Nymphaea hybrid</i> 'St.Louise Gold' | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 100 |
| BAD86791.1 | <i>Iris hollandica</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 82 |
| BAA75309.1 | <i>Ipomoea batatas</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 79 |
| AAU04791.1 | <i>Fragaria ananassa</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 75 |
| AEO36935.1 | <i>Canarium album</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 73 |
| ABM64799.1 | <i>Gossypium hirsutum</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 71 |
| BAD91807.1 | <i>Gentiana triflora</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 71 |

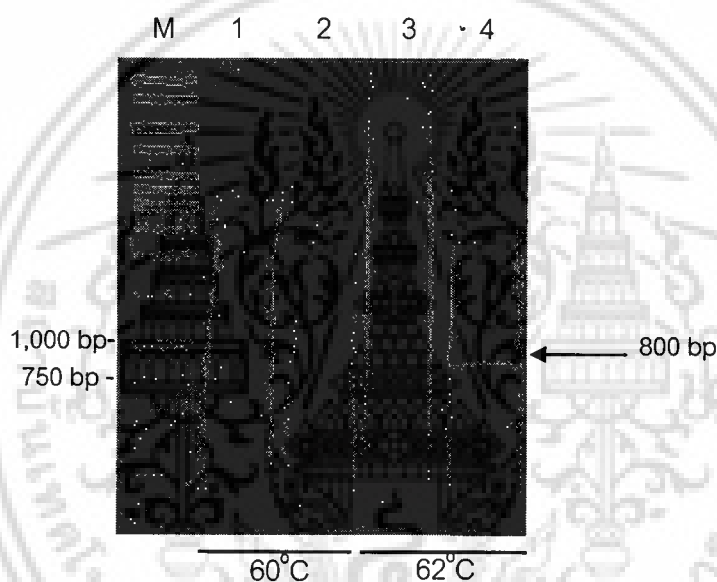
4.1.2.3 การสังเคราะห์ยีน *F3H* บริเวณด้านปลาย 5' (5'*F3H*) จาก cDNA กลีบดอกอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์

ผลจากการสังเคราะห์ยีน *F3H* ทางด้านปลาย 5' ตามวิธีการของ SMARTer™ RACE ด้วยปฏิกิริยา Nested PCR ซึ่งเป็นปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มี 2 ขั้นตอน และใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ขั้นตอนแรก 5'RACE PCR ใช้ไพรเมอร์ 10X UPM ซึ่งจับบริเวณปลายของ 5' adaptor ของสาย 5' RACE cDNA จากอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ คู่กับไพรเมอร์ 5'RACE GSP1 ซึ่งจับบริเวณภายในยีน *F3H* ผลที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้นตอนแรก 5'RACE PCR พบขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,600 นิวคลีโอไทด์ ในตัวอย่างของ cDNA กลีบดอกกลีบม้งกรสีเหลือง และขนาดประมาณ 1,100 นิวคลีโอไทด์ ในตัวอย่างของ cDNA กลีบดอกอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ เมื่อใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สำหรับขั้นตอน annealing และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอน annealing เป็น 62 องศาเซลเซียส สามารถสังเคราะห์ขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 นิวคลีโอไทด์ ในตัวอย่างของ cDNA กลีบดอกกลีบม้งกรสีเหลือง และขนาดประมาณ 800 นิวคลีโอไทด์ ในตัวอย่างของ cDNA กลีบดอกอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ (ภาพที่ 4.8)



ภาพที่ 4.8 ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้นตอน 5'RACE PCR ในการสังเคราะห์ยีน *F3H* ด้านปลาย 5' เมื่อใช้ cDNA ของดอกกลีบม้งกรสีเหลือง (1 และ 3) ดอกอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ (2 และ 4) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบที่อุณหภูมิ 60 และ 62 องศาเซลเซียส ในขั้นตอน annealing ของปฏิกิริยาเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (M)

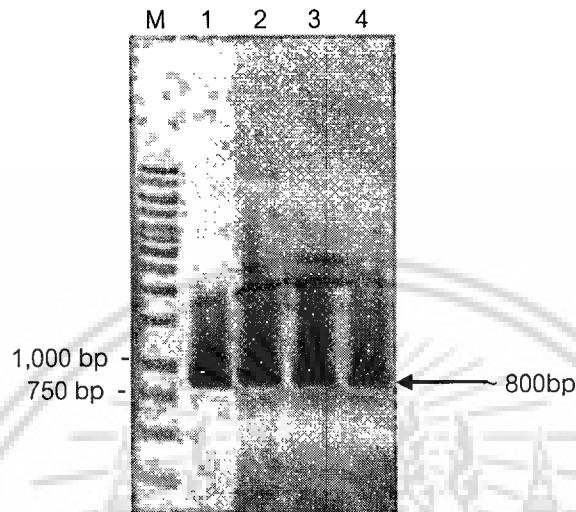
นำผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้นตอนแรก 5'RACE PCR มาทำการเจือจางด้วย Tricine-EDTA ด้วยอัตราส่วน 49:1 (Tricine EDTA : ผลผลิตพีซีอาร์) แล้วนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้นตอนที่ 2 คือ Nested PCR โดยในขั้นตอนนี้จะใช้ไพรเมอร์ 5'Nested ที่จับบริเวณ 5' adaptor คู่กับไพรเมอร์ 5'RACE NGSP1 ที่จับบนยีน *F3H* ด้วยอุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส สำหรับขั้นตอน annealing ผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้นตอนที่ 2 พบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 นิวคลีโอไทด์ จากผลผลิตพีซีอาร์ 5'RACE ในขั้นตอนแรกที่เจือจางด้วย Tricine EDTA ของกลีบดอกอุบลชาติเซนตหุลย์สโกลด์ เมื่อใช้อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส แต่ไม่พบชิ้นดีเอ็นเอเมื่อใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สำหรับขั้นตอน annealing และไม่พบชิ้นดีเอ็นเอจาก cDNA ของดอกกลีบม้งกรสีเหลือง ในทั้งอุณหภูมิ 60 และ 62 องศาเซลเซียสสำหรับขั้นตอน annealing (ภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4.9 ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้นตอนที่ 2 หรือ Nested PCR ในการสังเคราะห์ยีน *F3H* ด้านปลาย 5' ด้วยวิธีการของ SMARTer™ RACE จากการใช้ผลผลิตพีซีอาร์ 5' RACE ของดอกกลีบม้งกรสีเหลือง (1, 3) และผลผลิตพีซีอาร์ 5' RACE ของดอกอุบลชาติเซนตหุลย์สโกลด์ (2, 4) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบที่อุณหภูมิ 60 และ 62 องศาเซลเซียส ในขั้นตอน annealing ของปฏิกิริยาเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (M)

สกัดแยกชิ้นดีเอ็นเอของ 5 Nested RACE *F3H* ขนาดประมาณ 800 นิวคลีโอไทด์ จากตัวอย่างของดอกอุบลชาติเซนตหุลย์สโกลด์ออกจากเจลแล้วนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pTZ57/RT เพื่อสร้างเวกเตอร์ pTZ-5 Nested RACE *F3H* แล้วถ่ายโอนเข้าแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ คัดเลือกโคโลนีสีขาวเพื่อตรวจสอบชิ้นส่วนยีน 5 Nested RACE *F3H* ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pTZ-5 Nested RACE *F3H* ผลการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประมาณ 800 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 5 Nested RACE *F3H* จำนวน 4 โคลน (ภาพที่ 4.10) คัดเลือก pTZ-5 Nested RACE *F3H* โคลนที่ 1 ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer คือ M13F และ M13R



ภาพที่ 4.10 ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนของยีน 5' Nested RACE *F3H* ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pTZ57R/T (pTZ-5 Nested RACE *F3H*) โคลนที่ 1-4 (1-4) ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (M)

จากการคัดเลือกและวิเคราะห์ pTZ-5Nested RACE *F3H* พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *F3H* จำนวน 740 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *F3H* ด้านปลาย 5' ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับยีน *F3H* ของฝ้าย (*Gossypium hirsutum*) (ABM64799.1) 77 เปอร์เซ็นต์ หน้าวัว (*Anthurium andraeanum*) (ABI50233.1) 73 เปอร์เซ็นต์ อะโวคาโด (*Persea Americana*) (ACQ99190.1) 73 เปอร์เซ็นต์ ชมพู่มะเหมี่ยว (*Syzygium malaccense*) (GU233759.1) 72 เปอร์เซ็นต์ และกล้วยไม้ดิน (*Bromheadia finlaysonian*) (GU269859.1) 57 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3)

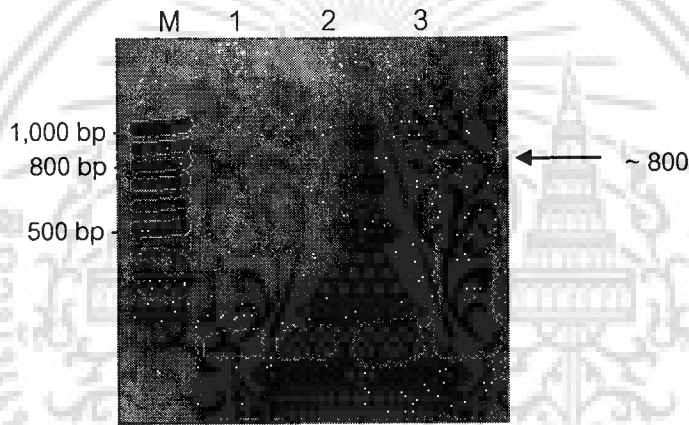
ตารางที่ 4.3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *F3H* ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ด้านปลาย 5' กับฐานข้อมูล GenBank (BLASTX)

| Accession number | Plant | Gene name | Identity score (%) |
|------------------|---|---|--------------------|
| | <i>Nymphaea hybrid 'St.Louise Gold'</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 100 |
| ABM64799.1 | <i>Gossypium hirsutum</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 77 |
| ABI50233.1 | <i>Anthurium andraeanum</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 73 |
| ACQ99190.1 | <i>Persea americana</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 73 |
| GU233759.1 | <i>Syzygium malaccense</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 72 |
| GU269859.1 | <i>Bromheadia finlaysoniana</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 57 |

4.1.2.4 การสังเคราะห์ยีน *F3H* บริเวณด้านปลาย 3' (*3'F3H*) จาก cDNA กลีบดอกอุบลชาติเขนตฺหุลยส์โกลด์

โคลนยีน *F3H* ทางด้านปลาย 3' จาก cDNA กลีบดอกเขนตฺหุลยส์โกลด์ ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์คู่กับการใช้ไพรเมอร์ Oligo-dt ที่จับบนตำแหน่ง poly A tail ของสาย cDNA และไพรเมอร์ *F3H8* (ตารางผนวกที่ 1) ที่จับบนยีน *F3H* ผลปฏิกิริยาพีซีอาร์สามารถสังเคราะห์ยีนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800

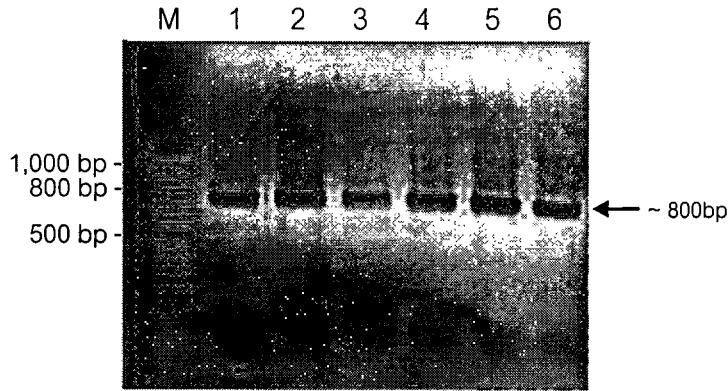
นิวคลีโอไทด์ จาก cDNA ของกลีบดอกอุบลชาติเขนตฺหุลยส์โกลด์ เมื่อใช้อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส ในขณะที่การใช้อุณหภูมิ 55, 58 และ 60 องศาเซลเซียส สำหรับขั้นตอน annealing ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ไม่พบยีนดีเอ็นเอ (ภาพที่ 4.11)



ภาพที่ 4.11 ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ยีน *F3H* ด้านปลาย 3' ของอุบลชาติเขนตฺหุลยส์โกลด์ที่อุณหภูมิ 55 (1), 58 (2), 60 (3) และ 62 องศาเซลเซียส (4) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (M)

จากนั้นสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลเพื่อนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์

pTZ57RT เพื่อสร้างเวกเตอร์ pTZ-*3'F3H* แล้วถ่ายโอนเข้าแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณยีนดีเอ็นเอ คัดเลือกโคโลนีสีขาวมาตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ผลการตรวจสอบยีนส่วนยีน *3'F3H* ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pTZ-*3'F3H* พบยีนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีขนาดเท่ากับยีนส่วนยีน *3'F3H* จำนวน 6 โคลน (ภาพที่ 4.12) คัดเลือกโคลนที่ 1, 2 และ 3 สังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer คือ M13F และ M13R



ภาพที่ 4.12 ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน 3'F3H ของอุบลชาติเซนตูลุยส์โกลด์ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pTZ-3'F3H โคลนที่ 1-6 (1-6) ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (M)

จากการคัดเลือกและวิเคราะห์ pTZ-3'F3H จำนวน 3 โคลน พบว่าข้อมูลของชิ้นส่วนยีน 3'F3H มีจำนวน 629 นิวคลีโอไทด์ พบนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน 3 ตำแหน่ง โคลนที่ 2 มีจำนวนนิวคลีโอไทด์บริเวณหน้า poly A tail มากกว่าโคลนที่ 1 และ 3 จำนวน 15 นิวคลีโอไทด์ และพบรหัสหยุด (stop codon) คือ TGA ในตำแหน่งที่ 463 ของทั้ง 3 โคลน (ภาพที่ 4.13) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน F3H ด้านปลาย 3' ที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับยีน F3H ของพิทูเนีย (*Petunia hybrid*) (AAC49929.1) 89 เปอร์เซ็นต์ พริก (*Capsicum annuum*) (ACN60402.1) 88 เปอร์เซ็นต์ ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) (BAF96938.1) 87 เปอร์เซ็นต์ หน้าวัว (*Anthurium andraeanum*) (DQ972935.1) 82 เปอร์เซ็นต์ และข้าวโพด (*Zea mays*) (NM 001112225.1) 81 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4) บ่งบอกว่ายีน F3H ของอุบลชาติเซนตูลุยส์โกลด์ มีความใกล้เคียงกันมากกับยีน F3H ในพืชอื่นๆ

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3'F3H1 CTGACCCCTGGGGCTGAAGCGGCACACCGGACCCCGGCACCATCACCCCTTCTGCTGCTCAGGACCTGGTCGGAGGCCTGCAGGCCACCAGGGACGGCGCAAAA
3'F3H2 .....
3'F3H3 .....

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3'F3H1 CGTGGATCACCGTCCAGCCAATCGCCGGCGCCTTCGTGCTCAACCTCGGCGACCACGGCCATTACCTTAGCAATGGAAGTTTCATGAACCGGATCACCA
3'F3H2 .....C.....G.....
3'F3H3 .....

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3'F3H1 AGCGGTCGTCAACGCAAACCTGCAGCCGCCTATCGATAGCCACGTTCCAGAATCCGTCGCGGAGCCATCGTGTACCCATTGAAGATCAGAGAGGGAGAG
3'F3H2 .....
3'F3H3 .....

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3'F3H1 AAATCGATAATGGATGAGCCCATCACCTTCGCAGAGATGTACAAGAGGAAGATGGCCAGAGACCTGGAGCTTGCCAGGCTCAAAAAGCTGCCAAGGAGG
3'F3H2 .....
3'F3H3 .....

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3'F3H1 ACAAAGCGAGGAGCAGGTCGACGAGATAGCCAAAGCCAAATCGATCAATGAAATCTGGCCTGAGCTGAAAGCAGTTGTCGAAAGTAGTTCTCTACTTA
3'F3H2 .....
3'F3H3 .....

      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3'F3H1 GTTCCATAAATTCAGCAACACGTGATGCCACTTCTGAATTCACCTTCCACATCAAGTTGTTCACTGAGGTGTTTTTTGGTTTTTCTA-----
3'F3H2 .....C.....TCGTTGCTT
3'F3H3 -----

      610     620
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3'F3H1 -----AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
3'F3H2 GGCTGT.....
3'F3H3 -----

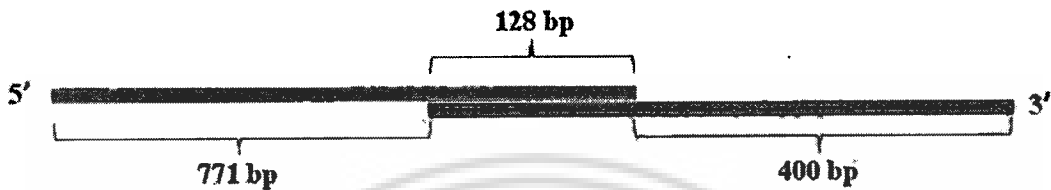
```

ภาพที่ 4.13 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 3'F3H ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ โคลนที่ 1 (3'F3H1), 2 (3'F3H2) และ 3 (3'F3H3) ด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) รหัสหยุด คือ IGA เครื่องหมาย . แสดงความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่ง

ตารางที่ 4.4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *F3H* ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ทางด้านปลาย 3' กับฐานข้อมูลโปรตีนบน GenBank

| Accession number | Plant | Gene name | Identity score (%) |
|------------------|---|---|--------------------|
| | <i>Nymphaea hybrid</i> 'St.Louise Gold' | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 100 |
| AAC49929.1 | <i>Petunia hybrida</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 89 |
| ACN60402.1 | <i>Capsicum annuum</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 88 |
| BAF96938.1 | <i>Nicotiana tabacum</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 87 |
| DQ972935.1 | <i>Anthurium andraeanum</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 82 |
| NM 001112225.1 | <i>Zea mays</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 81 |

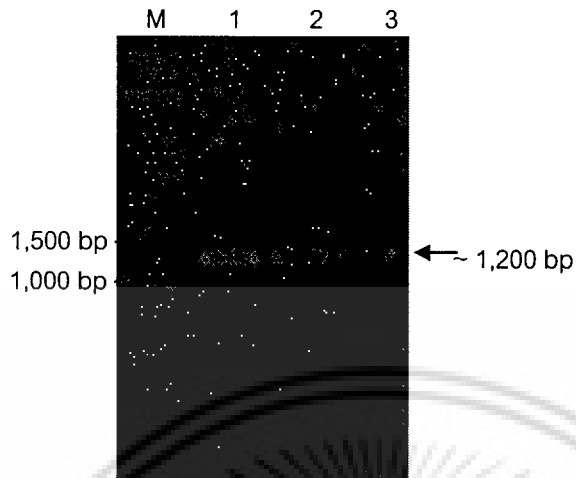
เมื่อนำข้อมูลยีน *F3H* จากทางด้านปลาย 5' และปลาย 3' ที่โคลนได้มา ประกอบกัน (contig) ด้วยโปรแกรม BioEdit ทำให้ได้ full length cDNA โดยมีช่วงที่ทับซ้อนกัน (overlap) ประมาณ 128 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 4.14) จากนั้นนำข้อมูลบริเวณ stop codon ทางด้านปลาย 3' มา ออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ยีน *F3H* เต็มเส้น (full length)



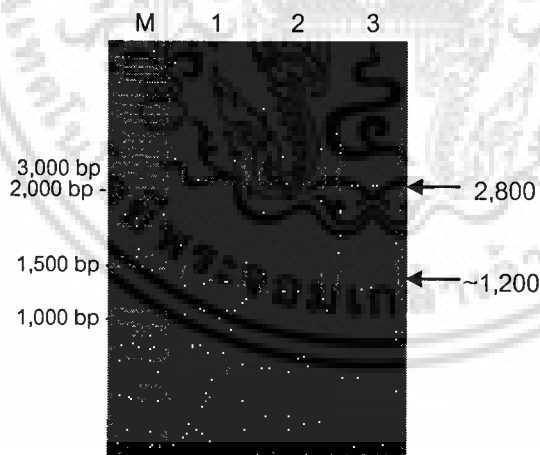
ภาพที่ 4.14 แผนภาพแสดงการรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ได้จากด้านปลาย 5' (สีน้ำเงิน) และ ด้านปลาย 3' (สีแดง) ของยีน *F3H* ในอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ด้วยวิธีการของ SMARTer™ RACE แสดงช่วงทับซ้อนกันของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 128 นิวคลีโอไทด์

4.1.2.5 การสังเคราะห์ยีน *F3H* เต็มเส้น (full length) จาก 5'RACE cDNA ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ และปทุมชาติ

ผลปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ 5'RACE cDNA ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และบุญทริก เป็นดีเอ็นเอต้นแบบคู่กับไพรเมอร์ UPM ที่จับบริเวณปลาย 5' adaptor กับ ไพรเมอร์ F3Hstop ที่จับบริเวณรหัสหยุดของยีน *F3H* พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 นิวคลีโอไทด์ ในตัวอย่างของ 5'RACE cDNA อุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกชและปทุมชาติบุญทริก เมื่อใช้ อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส สำหรับขั้นตอน annealing ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ภาพที่ 4.15) จากนั้นสกัดแยก ดีเอ็นเอออกจากเจลนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pTZ57RT เพื่อสร้างเวกเตอร์ pTZ-*F3H* full แล้วถ่ายโอนเข้า แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ เลือกสกัดพลาสมิดจากโคลนที่มีโคโลนีสีขาว แล้วตรวจสอบ ชิ้นส่วนยีน *F3H* ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pTZ-*F3H* full ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Eco* RI ผลการตัดพบชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น คือ ชิ้นดีเอ็นเอของเวกเตอร์ pTZ57RT ที่มีขนาดประมาณ 2,800 นิวคลีโอไทด์ และชิ้นดีเอ็นเอของยีน *F3H* ขนาดประมาณ 1,200 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 4.16) จากนั้นนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer คือ M13F และ M13R



ภาพที่ 4.15 ผลของปฏิกิริยาที่ซีอาร์ไอในการสังเคราะห์ยีน *F3H* ตามวิธีการของ SMARTer™ RACE ได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 นิวคลีโอไทด์ ของอุบลชาติเชนดท์หลุยส์โกลด์ (1) ปทุมชาติสัตตบงกช (2) ปทุมชาติบุญทริก (3) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (M)



ภาพที่ 4.16 การตรวจสอบพลาสมิด pTZ-*F3H* full ของอุบลชาติเชนดท์หลุยส์โกลด์ (1) ปทุมชาติสัตตบงกช (2) ปทุมชาติบุญทริก (3) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Eco* RI พบขึ้นดีเอ็นเอของเวกเตอร์ pTZ57RT ขนาดประมาณ 2,800 นิวคลีโอไทด์ และขึ้นดีเอ็นเอของยีน *F3H* ขนาดประมาณ 1,200 นิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (M)

ผลการวิเคราะห์ยีน *F3H* ในอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติ สัตตบงกช และปทุมชาติบุญทริก พบว่ายีน *F3H* มี open reading frame ขนาด 1,134 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นโปรตีนได้ขนาด 377 กรดอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *F3H* ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติ สัตตบงกช และปทุมชาติบุญทริกด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *F3H* ของอุบลชาติ และปทุมชาติ มีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.17) และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *F3H* ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุญทริกไปเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของ *F3H* ในพืชชนิดอื่นๆ ด้วยโปรแกรม BioEdit พบช่วงอนุรักษ์ที่แสดงความเหมือนกับพืชอื่นๆ ในช่วงลำดับกรดอะมิโน (domain) ที่ 52 ถึง 162 และช่วงกรดอะมิโนที่ 207 ถึง 308 (ภาพที่ 4.18) โดยลำดับกรดอะมิโนที่ 52-162 มีความเหมือนกับ domain ปลายทางด้าน N-terminus ของเอนไซม์ 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenase ซึ่ง domain นี้ยังพบในเอนไซม์ anthocyanidin synthase ในอะราบิโดปซิส (*Arabidopsis thaliana*) (1GP5 A) เอนไซม์ flavanone 3-hydroxylase ในงาช้างม่อน (*Perilla frutescens*) (gi75276801) เอนไซม์ anthocyanidin synthase ในแปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) (gi184186927) และเอนไซม์ flavonol synthase ในชา (*Camellia sinensis*) (gi76786311) (ภาพที่ 4.19) และช่วงลำดับกรดอะมิโนที่ 207-308 มีความเหมือนกับ domain เอนไซม์ 2-oxoglutarate (2OG)/Fe(II)-dependent oxygenase ซึ่ง domain นี้ยังพบในเอนไซม์ 2'-deoxymugineic-acid 2'-dioxygenase ในข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) (gi269969449) เอนไซม์ Hyoscyamine 6 beta-hydroxylase ในราตรีมฤตยู (*Atropa belladonna*) (gi75315330) เอนไซม์ Dioxygenase ในมะเขือม่วง (*Solanum melongena*) (gi75282600) เอนไซม์ Gibberellin 20 oxidase 3 ใน อะราบิโดปซิส (*Arabidopsis thaliana*) (gi60390168) เอนไซม์ Gibberellin 20-oxidase ในผักกาดหอม (*Lactuca sativa*) (gi75315999) เอนไซม์ Putative anthocyanidin synthase ในข้าว (*Oryza sativa Japonica*) (gi75315326) (ภาพที่ 4.20) (Marchler-Bauer et al. 2011) จากการเปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน *F3H* ที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับยีน *F3H* ของชา (*Camellia nitidissima*) (ADZ28514.1) 76 เปอร์เซ็นต์ หน้าวัว (*Anthurium andraeanum*) (ABI50233.1) 73 เปอร์เซ็นต์ และหรีด (*Gentiana triflora*) (BAD91806.1) 69 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.5) ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโปรตีน *F3H* ในอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุญทริก กับพืชชนิดต่างๆ ที่มีรายงานบน GenBank ได้แก่ เบญจมาศ (*Dendranthema grandiflorum*) (DXU86837), ฝ้าย (*Gossypium barbadense*) (DQ912945), หงอนนกยูง (*Tecomaria capensis*) (GU587738), มธรรดา (*Campis grandiflora*) (GU587737), พริก (*Capsicum annuum*) (JN808445), ดอกหรีด (*Gentiana triflora*) (AB193311), คาร์มีเลีย (*Camelia nitidissima*) (HQ290517), ฮิมาลายันกล็อกซิเนีย (*Incarvillea arguta*) (GU587735), อัญชัน (*Clitoria ternatea*) (AB185899), ข้าวโพด (*Zea mays*) (NM001112225), หน้าวัว (*Anthurium andraeanum*) (DQ972935), อะราบิโดปซิส (*Arabidopsis thaliana*) (U33932), ไอร์ลิส (*Iris hollandica*) (AB265226) ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) (AB223025) และ รักเร่ (*Dahlia pinnata*) (BAJ21534) พบว่าโปรตีน *F3H* ของอุบลชาติและปทุมชาติมีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแยกตัวออกมาจากพืชในกลุ่มอื่นอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 4.21)

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
|.....|
start codon
F3H St.Louise Gold GAGCAGAGAGTGAAGAGATGGCACCAACACTGGTGGTGGAGTCGTCGCGGCCGCTGCTCAGCCGAGACCGTTTCTGCCGACGCTGAACGAGGAGAAGA
F3H Satabankacha
F3H Buntharik
110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
|.....|
F3H St.Louise Gold CGCTGAGGGAGTCGTTGCGGAGACGAGGACGAGCGGCCGAAGTGGCTACAACGACTTCAGCAACGACGTCGCCGTCATCTCCCTGGCCGCTCGA
F3H Satabankacha
F3H Buntharik
210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
|.....|
F3H St.Louise Gold CTCCGACGACTCCCGCGTCCCGAGGTCGCGGACGCCATCGTCCGGGCTGCGAGGAGTGGGGGCTTCCAGGTCGTCGACCCACGGCTGGACGCTCC
F3H Satabankacha
F3H Buntharik
310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
|.....|
F3H St.Louise Gold CTGCTCTCCTCCATGACGGAGATGGCGGCCCTTCTCAAGTGGCCCCGAGGAGAAGCTCCGGTTCGACATGTCGCGCGGAAGCGCGGGGGTCA
F3H Satabankacha
F3H Buntharik
410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
|.....|
F3H St.Louise Gold TCCTGAGCAGCCACTGCAGGGGAGGGGTTGAAGGACTGGCGGAGATCGTGACGTTCTTCGTCACCGCTGGCGGGGAGGACTACTCCCGTGGCC
F3H Satabankacha
F3H Buntharik
510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
|.....|
F3H St.Louise Gold GGACGTCGCCGAGGGTGGCGCGGTTGCGGAGAGGTACAGCGGAGAGCTGATGGCGCTGGCGTGAAGCTTTGGGGTGTGTCGGAGGGGATGGGG
F3H Satabankacha
F3H Buntharik
610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
|.....|
F3H St.Louise Gold CTGCCGTCGGATGCGGTCGCGGATGGTGGCGGGACATGGACCAGAAGATGGTGGTGAAGTACTACCCGCGTCCCGCAGCGCGGACCTGACCTGGGGC
F3H Satabankacha
F3H Buntharik
710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
|.....|
F3H St.Louise Gold TGAAGCGCACACCGACCCCGCCACCATCACCTTCTGCTGAGGACCTGGTGGAGGCTGCAGGCCACCGAGGCGCGGCAAAACGTTGGATCACCGT
F3H Satabankacha
F3H Buntharik
810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
|.....|
F3H St.Louise Gold CCAGCCAATCGCGCGCTTCGTCGTCACCTCGCGGACCGGCCATTACCTTAGCAATGGAAGTTTCATGAACGCGGATCACCAAGCGGTCTCAAC
F3H Satabankacha
F3H Buntharik
910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000
|.....|
F3H St.Louise Gold GCAAATGCGAGCCGCTATCGATAGCCACGTTCCAGAAATCCGTCGCGGACGCCATCGTGTACCCATTGAAGATCAGAGAGGGAGAGAAATCGATAATGG
F3H Satabankacha
F3H Buntharik
1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090     1100
|.....|
F3H St.Louise Gold ATGAGCCCATCACCTTCGCGAGAGATGTACAAGAGGAGATGGCCAGAGACCTGGAGCTTGCCAGGCTCAAAAAGCTCGCCAAGGAGGACAAAAGCGGAGGA
F3H Satabankacha
F3H Buntharik
1110     1120     1130     1140     1150
|.....|
F3H St.Louise Gold GCAGGTCGACGAGATAGCCAAGCCAAATCGATCAATGAAATTCGGCTGA stop codon
F3H Satabankacha
F3H Buntharik

```

ภาพที่ 4.17 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน F3H ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ (F3H St.Louise Gold) ปทุมชาติสัตตบงกช (F3H Satabankacha) และปทุมชาติบุณทริก (F3H Buntharik) ด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) เครื่องหมาย . แสดงความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่ง

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
Dendranthema grandiflorum .....MDD-NSLHKNRIVDEDEKPKVYKNTFSSEIPVISLKGIDVVESSGGIKSRRAEICEKIIKACEDWGIQVVDHGV
Gossypium barbadense] --MA-----PSTLTALAE-EKTLQAS.....A.Q.ND.....A.D-----GK.G..K.VE.....V
Campsia grandiflora .....A.....A.QL.N.....V.ESG-----GN.....R.AA.....E
Capsicum annuum .....MP-----PSSLTSLAN-ETTVPIS.I.....Q.S.A.N.DD.....D.EI-----GT.G.....VE
Gentiana triflora .....MAPPP-P-----PSTLTALSK-EKTLQOT.I.....IA.Q.N.....LE.GD-----E.KG.....VE
Incarvillea arguta .....A.....A.E.DD.....V.EIG-----K.D.T.RR.VA.....I
Clitoria ternatea] MASP-----VKTLTTLAE-EKTL.SS.....A.E.D.....IA.E.D-----G.G..N.VE.....N.I
Triticum aestivum .....MAPVN-----ETFLPTAANGKATLRPS.....AHDR.DAV.....D-----GAR.....RDKVAA.....G
Dahlia pinnata] MAPA-----SLKW.E-T..QD.....A.V.N.....A.EI-----G.S..R.VE.....V
Camellia nitidissima] MAPA-----PSTLTALAE-EKSLQOK.....A.V.N.....A.EI-----G.S..R.VE.....V
Zea mays] MAPVSI-----AVPFLPTAARGETNVRAS.....E.....HDR.D.V.V.E.....GPR.....RGRVAA
Arabidopsis thaliana] MVAAT-----PFLPTLAE-EATLRPS.I.....H.Q.DA.....L.A.SD-----GEP.....L.RE.VE.....G
Iris hollandica] MAPG-----VLTETLAG-E.KIKSK.....A.V.D.....A.D-----GK.G..RQ.VE.....N
Nymphaea hybrid 'St.Louise Gold' MHPGAST-----PPFLPTSSN-EETLPA.....E.....A.V.D.....E.EAIVG-----G.E.RR.AAS
Nelumbo nucifera Satabankacha] MPTLVVSESSPAAQPRPFLPTLNE-EKTLRES.....A.D.NDV.....A.L.SDD-----VRDA.VR.....E.V
Nelumbo nucifera Buntharik] MPTLVVSESSPAAQPRPFLPTLNE-EKTLRES.....A.D.NDV.....A.L.SDD-----VRDA.VR.....E.V

```

```

.....180.....190.....200
Dendranthema grandiflorum .....TFGLSEMTF.....PKKWRVATEKYSIEDIMGLCKLEVLSEA
Gossypium barbadense] ..LV.....EG.IE..KE..K..A.....
Campsia grandiflora .....SELIAD.....EG.....A.Q.K.A.....V
Capsicum annuum .....PQLI.Q.N.....HG.I.....K.E.A.....
Gentiana triflora .....LDVNR.....EG.KS.....Q.N.A.....S
Incarvillea arguta] GNLR..I.....S.....E.Q.....
Clitoria ternatea] P.LV.K.I.....E.KV.N.A.....
Triticum aestivum .....ADLIAD.....AG.....V.R.R.....S.G
Dahlia pinnata] ..L.V.....K.I..E.NE.....A
Camellia nitidissima] ANLIA.....EG.S..T..K.D.A.....
Zea mays] AALVAD.A.....AA.....V.R.Q.A.A.R.G
Arabidopsis thaliana] PGLVAD.....EG.....V.A.G.A.A.G.....
Iris hollandica] NLVAD.....EG.VK.....E.R.S.A.....
Nymphaea hybrid 'St.Louise Gold' ASLV.S.....G.S.....K.Q.A.....G
Nelumbo nucifera Satabankacha] ASLV.S.....EG.....A.R.E.A.A.....G
Nelumbo nucifera Buntharik] ASLV.S.....EG.....A.R.E.A.A.....G

```

```

.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300
Dendranthema grandiflorum .....MGLKRAKNDACVD.....
Gossypium barbadense] .....TK.....
Campsia grandiflora .....D.SK.....
Capsicum annuum .....TK.....
Gentiana triflora .....R.....
Incarvillea arguta] .....D.TK.....
Clitoria ternatea] .....RD.TK.....
Triticum aestivum .....S..AK.....
Dahlia pinnata] .....TK.....
Camellia nitidissima] .....TK.....
Zea mays] .....DT..AR.....
Arabidopsis thaliana] .....D..AK.....
Iris hollandica] .....S.TN.....
Nymphaea hybrid 'St.Louise Gold' .....PSD..R..R.....
Nelumbo nucifera Satabankacha] .....PSD..R..R.....
Nelumbo nucifera Buntharik] .....PSD..R..R.....

```

```

.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390
Dendranthema grandiflorum .....VMSNSRL.....
Gossypium barbadense] .....C.....D.T..KIR...P.L.P..AE..RR..K.....V.EQQQLKKEAEN.K-----PKLE..L.E..
Campsia grandiflora] .....DC.....E.....KIR.....K.A.SE..R.....
Capsicum annuum .....S.....E.....KIR.....AV.D.P..AE..RR..K..A.F.....FOQIQAEVAK-----AKLESM..EF..
Gentiana triflora] .....Y.....E.T.....ATRD..PVL.D.P..AE..RR..K.....Q..KELKN-----VEK-----AKIEG.AL.E..
Incarvillea arguta] .....X.....S.D.V..KIR.....AV.H.....SE..R.....
Clitoria ternatea] .....Y.....T.....KIR.....PVL..P..AE..RR..K.....M.....E.QLQDIENAK-----KLET..LKE...
Triticum aestivum] .....GES.....D.R.W.A.R..EP.L.P..AE..RR..ER..D..KR..Q..DQLMQQL.LQQQQQVAAAMPPTAS.SLNE
Dahlia pinnata] .....E.T.....K.....P..K.P..E.....A.....A.....ESKLATDT..V.....V.V.N.F.
Camellia nitidissima] .....C.....E.T.....KIR.....PVL..P..A.....R..K.I..K.....E.LLQDDIEK-----AKLEI.STDE.F
Zea mays] .....EC.....D.T.....A.RD..AP.LDHP..AE..RR..AR.I.....Q..DKKQQQVANK.F-----ADS..LDA.F.
Arabidopsis thaliana] .....S.....EGV.....A.R..AP.LDHP..AE..RR..R.....Q..LQQQEVAKARDAN-----H.ALDE.F.
Iris hollandica] .....SN.....D.D.....AIR.....TPVLD.P.K.TE..RR..RR.....K.....VVENAKVEAVA-----QP.GLNG.F.
Nymphaea hybrid 'St.Louise Gold' .....A.C.....S.D.....KIR.....D.P..AE..R..AR.....EDKSEQVDEIA-----S.ME...
Nelumbo nucifera Satabankacha] .....A.C.....S.D.....KIR.....D.P..AE..R..AR.....EDKSEQVDEIA-----S.ME...
Nelumbo nucifera Buntharik] .....A.C.....S.D.....KIR.....D.P..AE..R..AR.....EDKSEQVDEIA-----S.ME...

```

ภาพที่ 4.18 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนโปรตีน F3H ของอุบลชาติเซนตัสลูยส์โกลด์ ปทุมชาติ สัตตบงกช และปทุมชาติบุณฑริกกับพืชชนิดต่างๆ ที่มีรายงานบน GenBank ด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) ภายในกรอบสี่เหลี่ยมสีแดงแสดงช่วง (domain) ลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกับปลายทางด้าน N-terminus ของโปรตีน 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenase และกรอบสี่เหลี่ยมสีเขียวแสดงช่วง (domain) ลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกับโปรตีน 2-oxoglutarate (2OG)/Fe(II)-dependent oxygenase

```

Lotus -NDVPVISLAGLSDSD-SRRRAEVPDAIFRACEEWGVFOVVDHGVDASLVSSMTEMAAAFE 107
Ginkgo biloba TGQIPVVDMAGWEEGGEARKEINROVAEAYELWCVMOVLNHGISDLSIARLQAAGKAF 108
Camellia sinensis -VTVPVISLS-----QPHUVVDALSKACSEWGFLLITDHGVPEPSLIGRLKEVGEET 89
Perilla frutescens -SETPVISLARIDESG-DKRAEVCRRIVAACEDNGTFOVVDHCVHPMVVEGMPRLAREFE 96

Lotus KLPPEEK--LRFDMSCGKRGGFIVSSHLQGEAVKDWREIVTFPSYPLAGRDYSRWPDPVE 165
Ginkgo biloba DLPIEEKEVYANDSASGKLAGYGSKLANNASGQLEWEDYYPHLLWPOTHERDMTTWPKYPS 168
Camellia sinensis KLPQEEKESVANDPSSGSTEYGYTKMTKNFDEKVENIDYFHYVMHPPKLNLDMWPKNPS 149
Perilla frutescens ALPDHEK--LRFDMSCGKRGGFIVSSHLQGEVVDWREIVTFPSYPIITARDYSRWPDPKV 154

```

ภาพที่ 4.19 การเปรียบเทียบช่วงลำดับกรดอะมิโน (domain) ที่ 52-162 โปรตีน F3H ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์ โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุณฑริก (Lotus) กับพืชชนิดต่างๆ ส่วนแเงาแสดงช่วงโครงสร้าง (structure) ของโปรตีนที่อยู่ในรูปแบบเดียวกัน

```

Lotus YSEELMALACKLLGVLSEAMGLPSDALRDACRDMQPMWVNYEPCPQPD 223
Oryza sativa Japonica YSDSMKDLAQKLLRIVSESLNLPSPSYIEEAVGEVQMITVSYSGPCPQPD 218
Arabidopsis thaliana YAEAMNTLSLKLIMELGMSLGVERRYFKEFFEDSTSEERLNYYEPCQKQE 238
Lactuca sativa YCNAMSRLSLGIMELGMSLGVESHFKEFFKENDSINPLNYYEPCQKPD 230
Atropa belladonna YSVEVRKLTMRILDYICEGLGLKLYFDNELSQIMMLTFNYYEPCPDPS 209
Solanum melongena YSDELRRVSKVILGMVAEGLGLEPGFFDKGLG--QRMLVN--HYEACPDPS 209
Hordeum vulgare FTSQTRDVGKELLRLLCCEGMGIQADYFEGDLSGGNVILNINHYEPCPNPD 201

Lotus LTLLEKTHIDPETITLLEQDIYVGLAATDGGKTIWVQPIAGAFVNVNG 273
Oryza sativa Japonica LWLGLQSPKDMGATLILLQDDYGGTEWLRDQ--LWIDYPSLPGILVILA 266
Arabidopsis thaliana LKGRFAPKQDENHETLLEQDDVGGGLVWVDN--KWQSTLPPNPHAFVNVNIG 286
Lactuca sativa LTLKGTENADPTLWTFHTDQVGGLEWTFDN--EWRSTAPNLKTFVNVNIG 278
Atropa belladonna STEGSGGHWGDMVITLILQDNHPLUQGLTQDA--KWIAYEPIPLAFVNVNG 257
Solanum melongena LTLGVTGGEDEPILITLITQEEVYGLGLKLD--KWIQVEPKPNAFVNVNSG 256
Hordeum vulgare KALRGEFHTCERNLITLILLGAVNGLVYSKQ--DWIKVDPAPNAFVNVNFG 249

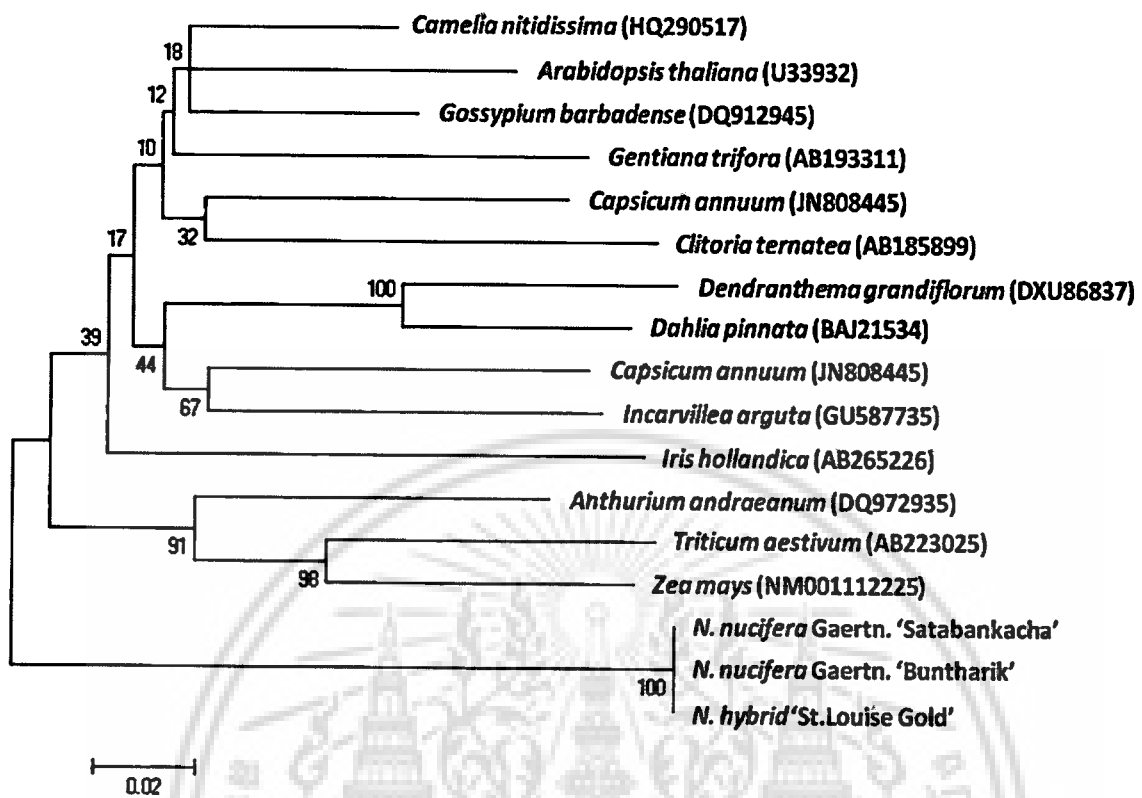
Lotus DHGNYLNGRFNHEHDAVYVWANCFLSTAFFQNESPDIVYPLKIREGE 323
Oryza sativa Japonica DQTNLITNCRKSAVVRATWADRARLGVATFYDPSK-----SRKICTAP 311
Arabidopsis thaliana DTFMAYTILNRYTSCLRHAYVNSERERKTFATFLQKQ-----EKVVKPP 330
Lactuca sativa DTFMALERQYVQSLHRAYVWNIERRSLAEFLQKQ-----DKVVSPP 322
Atropa belladonna LTLVHTLHKEFGSLHRYVTNPTLDVYSTARTAGEEDYS-----CTIEPA 301
Solanum melongena LPIVYVIGKGLASVAHRVYVITLHSTVSGDFFICHEN-----IVEPA 298
Hordeum vulgare QQLVAVENGLLSEHRAMTNSALARTSWATFIMTQE-----CLIGPA 293

```

ภาพที่ 4.20 การเปรียบเทียบช่วงลำดับกรดอะมิโน (domain) ที่ 207-308 โปรตีน F3H ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์ โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุณฑริก (Lotus) กับพืชชนิดต่างๆ ส่วนแเงาแสดงช่วงโครงสร้าง (structure) ของโปรตีนที่อยู่ในรูปแบบเดียวกัน

ตารางที่ 4.5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *F3H* ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสีดตบงกช และปทุมชาติบุณฑริก กับฐานข้อมูล GenBank

| Accession number | Plant | Gene name | %Identity score |
|------------------|--|---|-----------------|
| | <i>Nelumbo nucifera</i> Geartn. 'Satabankacha' | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 100 |
| | <i>Nelumbo nucifera</i> Geartn. 'Buntharik' | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 100 |
| | <i>Nymphaea hybrid</i> 'St.Louise Gold' | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 100 |
| ADZ28514.1 | <i>Camellia nitidissima</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 76 |
| ABI50233.1 | <i>Anthurium andraeanum</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 73 |
| BAD91806.1 | <i>Gentiana triflora</i> | flavanone 3-hydroxylase (<i>F3H</i>) gene | 69 |



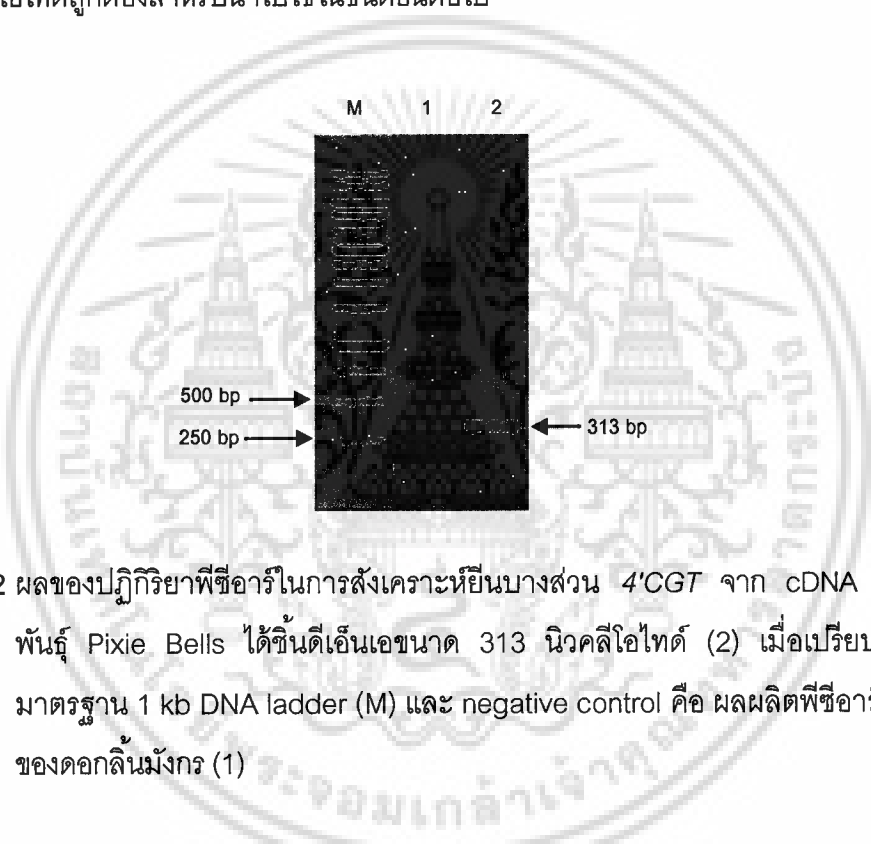
ภาพที่ 4.21 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโปรตีน F3H จากปทุมชาติสัตตบงกช (*N. nucifera* Gaertn. 'Satabankacha') ปทุมชาติบุญทริก (*N. nucifera* Gaertn. 'Buntharik') และอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ (*N. hybrid* 'St.Louise Gold') กับโปรตีน F3H จากพืชอื่นๆ ที่มีรายงานบน GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA5 (Tamura et al. 2011) ตัวเลขบนแขนง (node) แสดงเปอร์เซ็นต์ความน่าเชื่อถือจากการคำนวณด้วย Bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ สเกล (scale) แสดงระยะห่างทางพันธุกรรม (0.02 แสดงการแทนที่ของกรดอะมิโน 2 เปอร์เซ็นต์)

4.1.3 ยีน 4'CGT

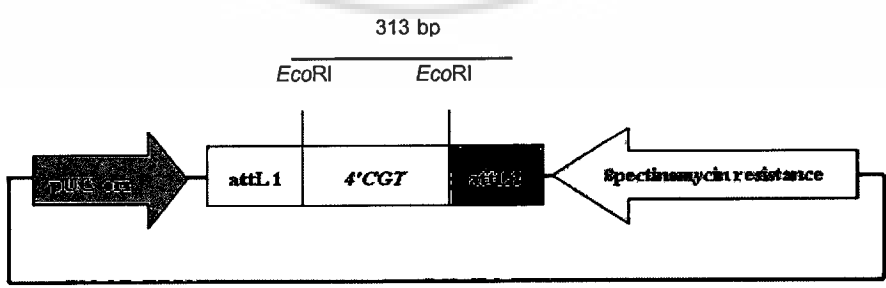
4.1.3.1 การสังเคราะห์ยีน 4'CGT บางส่วนด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

สังเคราะห์ชิ้นส่วนยีน 4'CGT จาก cDNA ของดอกลินมั่งกรสีเหลือง พันธุ์ Pixie Bells โดยออกแบบไพรเมอร์สำหรับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1,062 ถึง 1,374 บนสาย mRNA ของยีน 4'CGT ผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์พบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 4.22) เมื่อใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สำหรับขั้นตอน annealing ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์เชื่อมต่อกับพลาสมิด pCR8 เพื่อสร้างพลาสมิด pCR8-4'CGT (ภาพที่ 4.23) แล้วถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat-shock เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ตรวจสอบโคโลนีด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์คู่

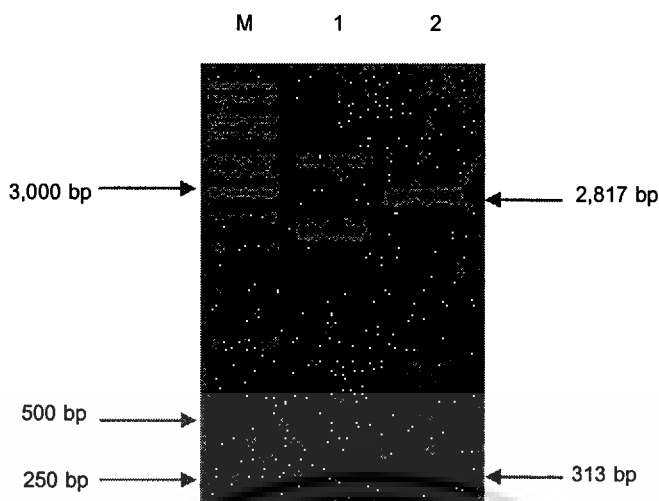
กับไพรเมอร์ F-EcoRI-4'CGT และ R-4'CGT-SacI จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะสเปคตินอไมซิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นสกัดพลาสมิดเพื่อตรวจสอบชิ้นส่วนยีน 4'CGT ขนาดประมาณ 300 นิวคลีโอไทด์ ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pCR8-4'CGT ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI พบแถบดีเอ็นเอขนาด 2,817 นิวคลีโอไทด์ ที่เป็นขนาดของพลาสมิด pCR8 และ 313 นิวคลีโอไทด์ ที่เป็นยีน 4'CGT บางส่วน (ภาพที่ 4.24) นำส่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 4'CGT จำนวน 313 นิวคลีโอไทด์ ในพลาสมิด pCR8-4'CGT เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 4'CGT ของลินมังก (EF650015.1) ตำแหน่งที่ 336 ถึง 644 นิวคลีโอไทด์ จากนั้นทำการคัดเลือก พลาสมิด pCR8-4'CGT ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้องสำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 4.22 ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ยีนบางส่วน 4'CGT จาก cDNA ของดอกลินมังก พันธุ์ Pixie Bells ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 313 นิวคลีโอไทด์ (2) เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (M) และ negative control คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ไม่ได้ใส่ cDNA ของดอกลินมังก (1)



ภาพที่ 4.23 แผนภาพพลาสมิด pCR8-4'CGT ที่มีขนาด 3,130 นิวคลีโอไทด์และตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI



ภาพที่ 4.24 ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน 4'CGT ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pCR8-4'CGT ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI (2) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (M) พลาสมิด pCR8-4'CGT ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (1)

4.1.3.2 การสังเคราะห์ยีน 4'CGT แบบเต็มเส้น

สังเคราะห์ยีน 4'CGT ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์คู่กับไพรเมอร์ F-BamHI-4'CGT และ R-4'CGT-SacI ที่จับบริเวณตำแหน่งอนุรักษนิยมยีน 4'CGT ซึ่งออกแบบจาก ลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษนิยมของยีน 4'CGT ใน cDNA ของลิ้นมังกร ขนาด 1,374 นิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์เชื่อมต่อกับพลาสมิด pTZ57R/T เพื่อสร้างพลาสมิด pTZ4'CGT แล้วถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat-shock เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ คัดเลือกโคโลนีที่ได้นำส่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 4'CGT ในพลาสมิด pTZ4'CGT เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 4'CGT ของลิ้นมังกร (EF650015.1) 100 เปอร์เซ็นต์

4.2 การแสดงออกของยีน *chalcone synthase (CHS)*, *flavonone 3-hydroxylase (F3H)*, *chalcone* และ *4'-O-glucosyltransferase (4'CGT)*

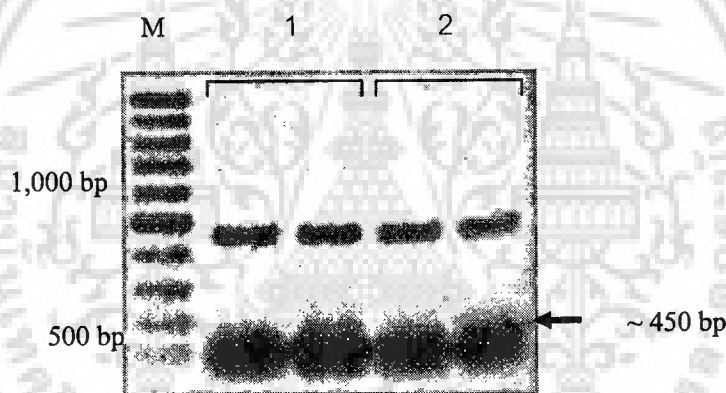
4.2.1 การศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวง หนุ่ยชริกและดอกบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

ผลการศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* กับในกลีบดอกบัวหลวงหนุ่ยชริกสีขาว และบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู และปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงในช่วงระยะของการพัฒนาของดอกบัวหลวง ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 81 และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1.1 ผลการโคลนบางส่วนของยีน *CHS* จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวง บุนทรริกและบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยเทคนิค PCR

ทำการโคลนบางส่วนของยีน *CHS* จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวง บุนทรริกและบัวหลวงสัตตบงกชด้วยเทคนิค PCR โดยทำการออกแบบไพรเมอร์จากส่วนของลำดับอนุกรมยีน *CHS* ขนาดประมาณ 450 bp (ภาพที่ 4.25) จากนั้นนำผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้นำไปเชื่อมต่อกับโคลนนิ่งเวกเตอร์ pTZ57/RT จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า บางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวง บุนทรริกและบัวหลวงสัตตบงกช มีขนาดเท่ากัน คือ 458 bp (ภาพที่ 4.26) บางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้นำไปใช้ในการสร้างพลาสมิดในการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense และใช้ศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวง



ภาพที่ 4.25 ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก; (1) cDNA ของกลีบดอกบัวหลวง บุนทรริก ขนาดประมาณ 450 bp และ (2) cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช ขนาดประมาณ 450 bp (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 | GTCGACCAGA | GCACATACCC | TGACTACTAC | TTCCGGATCA | 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 | ACGAAGGCCA | TTAAGGAATG | 350 |
| CHSA_BUN | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 1 |
| CHSA_SAT | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 1 |
| CHSF_BUN | GGGACAGCCC | AAGTCCAAGA | TCACCCACCT | TGCTTCTGTC | ACCACCAGTG | GCGTCGACAT | GCCCGGGGCC | 420 |
| CHSA_BUN | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 1 |
| CHSA_SAT | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 1 |
| CHSF_BUN | GACTACCAGC | TCACCAAGCT | CCTCGGCCT | CGG | TCAAGAGACT | CATGATGTAC | CAACAAGGAT | 490 |
| CHSA_BUN | ----- | ----- | ----- | A | AGAGCTCCCG | TCAAGAGACT | CATGATGTAC | 41 |
| CHSA_SAT | ----- | ----- | ----- | A | AGAGCTCCCG | TCAAGAGACT | CATGATGTAC | 41 |
| CHSF_BUN | GCTTCGCCGG | AGGCACAGTC | CTTCGCCTGG | CCAAGGACCT | TGCAGAGAAC | AACAGAGGCG | CCCGTGTCTT | 560 |
| CHSA_BUN | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 111 |
| CHSA_SAT | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 111 |
| CHSF_BUN | TGTCGTCTGC | TCAGAGCTCA | CTGCTGTTAC | CTTCCGTGGC | CCAAGTGACA | CCCACCTCGA | CAGCTTTGTA | 630 |
| CHSA_BUN | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 181 |
| CHSA_SAT | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 181 |
| CHSF_BUN | GGCCAGGCAC | TCTTCGGGGA | TGGAGCAGCC | GCAGTTATTG | TGGGTGCAGA | CCCGGTGCC | GGTGTAGAAA | 700 |
| CHSA_BUN | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 251 |
| CHSA_SAT | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 251 |
| CHSF_BUN | AGCCTTTGTT | TGAGTTGGTG | TCGGCAGCCC | AGACAATTCT | CCCAGACAGC | CATGGCGCCA | TTGACGGGCA | 770 |
| CHSA_BUN | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 319 |
| CHSA_SAT | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 319 |
| CHSF_BUN | CCTGAGAGAG | GTTGGACTTA | CCTTCCACCT | GCTCAAGGAT | GTGCCCGGGC | TCATCTCAA | GAACATCGAG | 840 |
| CHSA_BUN | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 391 |
| CHSA_SAT | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 391 |
| CHSF_BUN | AAGAGCCTGG | TGGAGGCATT | CCAGCCTCTG | GGCATCTCCG | ACTGGAATC | AATTTTCTGG | ACC | 910 |
| CHSA_BUN | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 458 |
| CHSA_SAT | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 458 |
| CHSF_BUN | CTGGTGGTCC | AGCCATCCTA | GACCAAGTGG | AAGAAAAGCT | GGCCCTTAAG | CCCGAGAAGC | TAAGCGCCAC | 980 |
| CHSA_BUN | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 458 |
| CHSA_SAT | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 458 |
| CHSF_BUN | ACGACACATC | CTGAGCGAGT | ATGGAAACAT | GTC AAGTGCT | TGTGTGCTGT | TCATATTGGA | TGAGATGCGG | 1050 |
| CHSA_BUN | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 458 |
| CHSA_SAT | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 458 |
| CHSF_BUN | AAGAAGTCGA | TTGAGGACGG | CCTCAAGACC | ACTGGAGAAG | GGCTCGAATG | GGGTGTGCTG | TTTGGGTTCG | 1120 |
| CHSA_BUN | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 458 |
| CHSA_SAT | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 458 |
| CHSF_BUN | GACCAGGGCT | AACAGTTGAG | ACTGTGGTGC | TTCACAGTAT | CGCTGCCTAG | 1170 | | |
| CHSA_BUN | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 458 | | |
| CHSA_SAT | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 458 | | |

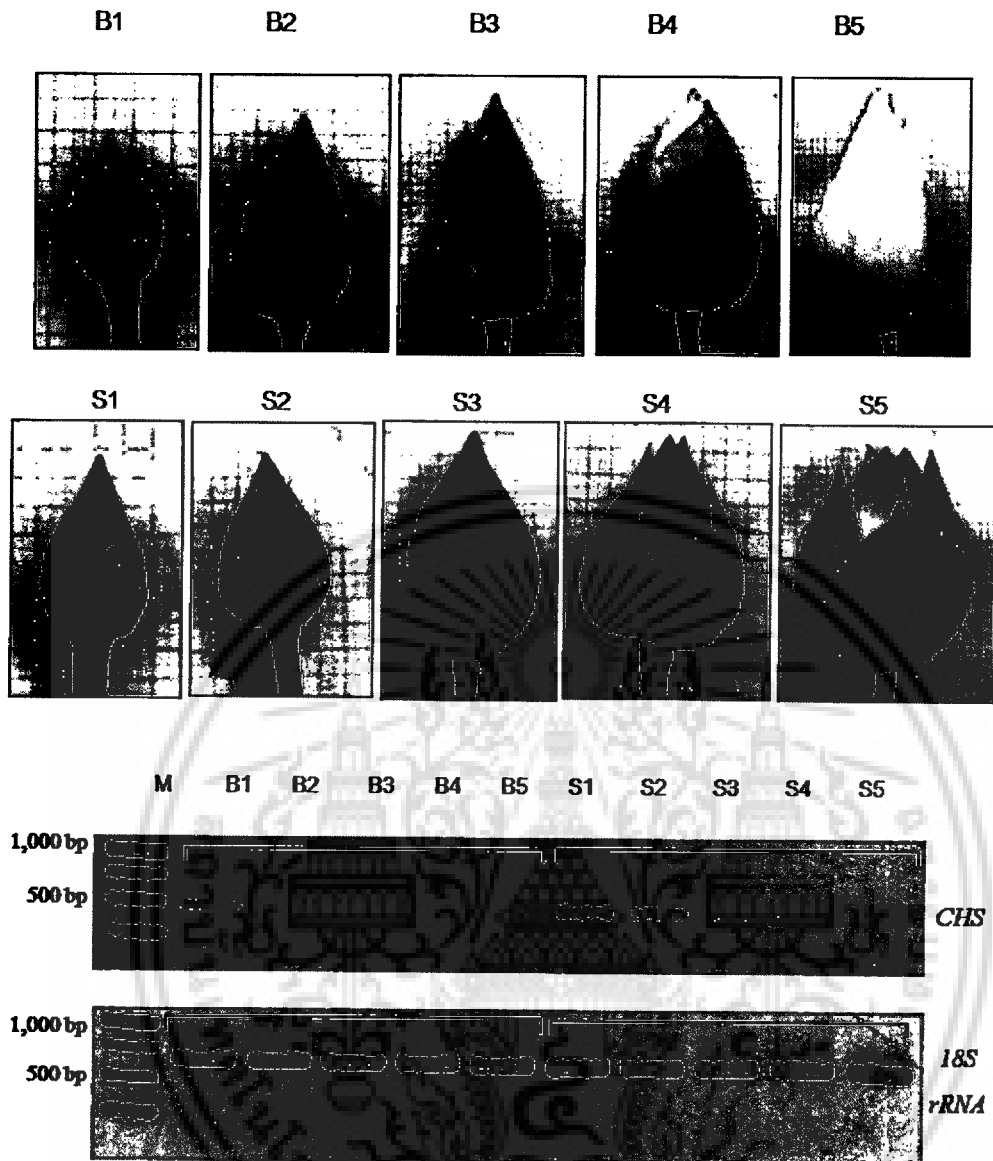
ภาพที่ 4.26 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวง
 บุณฑริก (*CHS_BUN*) ขนาด 1,170 bp กับบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของ
 กลีบดอก บัวหลวงบุณฑริก (*CHSA_BUN*) และบัวหลวงสัตตบงกช (*CHSA_SAT*) ขนาด 458
 bp (ส่วนที่ขีดเส้นใต้ คือ ไพรเมอร์ส่วนต้น *CHSA_forward primer* และไพรเมอร์ส่วนท้าย
CHSA_reverse primer และแถบสีเทาแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน)

4.2.1.2 ผลการศึกษาปริมาณของการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบ

ดอกบัวหลวง ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวง บุนนทริกดอกสีขาวและกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชดอกสีชมพู ในแต่ละช่วงระยะของการพัฒนาของดอกบัวหลวง ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR ตามวิธีการของ ชัยวรกุล ไชยปัญญา (2556) โดยเริ่มต้นจากปรับความเข้มข้นของ cDNA ให้เท่ากันโดยการเปรียบเทียบจากปริมาณการแสดงออกของยีน *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 ของกลีบดอกบัวหลวงบุนนทริกในระยะที่ 1 (B1) มีความเข้มมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลีบดอกบัวหลวงในระยะที่ 2 (B2), ระยะที่ 3 (B3), ระยะที่ 4 (B4) และ ระยะที่ 5 (B5) ที่มีความเข้มใกล้เคียงกัน ส่วนความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช ระยะที่ 1 (S1) มีความเข้มมากที่สุด และค่อยๆ ลดลงในระยะที่ 2 (S2), ระยะที่ 3 (S3), ระยะที่ 4 (S4) และ ระยะที่ 5 (S5) ตามลำดับ (ภาพที่ 4.27) ในขณะที่ความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *18S rRNA* ซึ่งเป็นยีนอ้างอิงมีความเข้มใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่า ยีน *CHS* มีปริมาณการแสดงออกมากที่สุดในช่วงระยะการพัฒนาของดอกบัวหลวงระยะที่ 1 มากที่สุด และมีปริมาณการแสดงออกลดลงในระยะที่ 2, ระยะที่ 3 และ ระยะที่ 4 ตามลำดับ และในระยะที่ 5 มีปริมาณการแสดงออกน้อยที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุนนทริกสีขาวและบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู พบว่า ความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชมีความเข้มมากกว่าแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุนนทริก โดยเฉพาะในระยะที่ 1, ระยะที่ 2 และระยะที่ 3 มีความเข้มมากกว่าอย่างชัดเจน ส่วนในระยะที่ 4 และระยะที่ 5 มีความเข้มใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่า กลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากกว่ากลีบดอกบัวหลวงบุนนทริกสีขาว



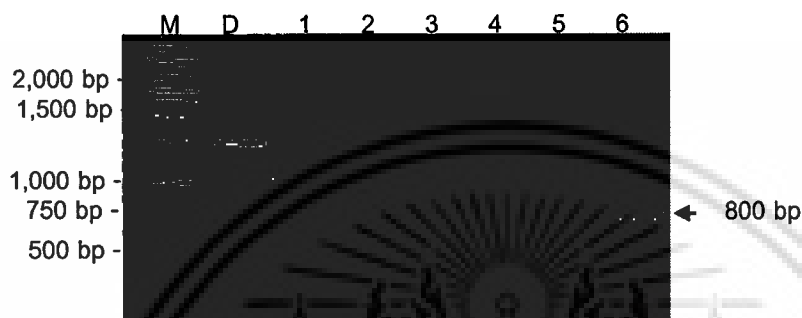
ภาพที่ 4.27 การเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* (ขนาด 458 bp) ในแต่ละระยะการพัฒนารูปของดอกบัวหลวง ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง (ขนาดประมาณ 600 bp); ดอกบัวหลวงบุณฑริก (B1) ระยะที่ 1, (B2) ระยะที่ 2, (B3) ระยะที่ 3, (B4) ระยะที่ 4 และ (B5) ระยะที่ 5 และดอกบัวหลวงสัตตบงกช (S1) ระยะที่ 1, (S2) ระยะที่ 2, (S3) ระยะที่ 3, (S4) ระยะที่ 4 และ (S5) ระยะที่ 5 (M = 1 kp DNA marker)

4.2.2 การแสดงออกของยีน *F3H*

4.2.2.1 การแสดงออกของยีน *F3H* ในกลีบดอกอุบลชาติสีต่างๆ

จากการคัดเลือกตัวแทนอุบลชาติจากกลุ่มสีต่างๆ เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *F3H* กับการเกิดสีต่างๆ ในกลีบดอกอุบลชาตินอกเหนือจากสีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ขออนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

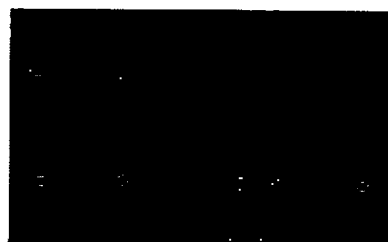
เหลือง พบการแสดงออกของยีน *F3H* ในกลีบดอกอุบลชาติทุกสีที่นำมาใช้ตรวจสอบ โดยพบขึ้นดีเอ็นเอของยีน *F3H* ขนาด 800 นิวคลีโอไทด์ จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ cDNA ของอุบลชาติฉลองขวัญซึ่งมีกลีบดอกสีม่วงเข้ม ฟ้าสุคนธ์มีกลีบดอกสีฟ้า ปียลาภมีกลีบดอกสีชมพู แสดชัยพลมีกลีบดอกสีชมพูอมส้ม เซนต์หลุยส์โกลด์มีกลีบดอกสีเหลือง และลูกผสม PW5409 hybrid มีกลีบดอกสีม่วงอมเหลือง เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (ภาพที่ 4.28)



ภาพที่ 4.28 การแสดงออกของยีน *F3H* ในกลีบดอกอุบลชาติสีต่างๆ ด้วยเทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) จากการใช้ดีเอ็นเออุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ (D) cDNA ของอุบลชาติฉลองขวัญ (1) ฟ้าสุคนธ์ (2) ปียลาภ (3) แสดชัยพล (4) เซนต์หลุยส์โกลด์ (5) และลูกผสม PW5409 hybrid (6) เป็นต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (M)

4.2.2.2 การแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อต่างชนิดของอุบลชาติ

ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่สนใจ จำเป็นต้องคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออก สม่ำเสมอในเนื้อเยื่อพืชที่สนใจ หรือ housekeeping gene เพื่อใช้เป็นยีนอ้างอิงสำหรับปริมาณ cDNA เริ่มต้นที่ใช้เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา semi-quantitative พีซีอาร์ ซึ่งในการทดลองนี้เลือกใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง เมื่อสามารถปรับปริมาณ cDNA ของแต่ละตัวอย่างให้เท่ากันสำหรับการทำ semi-quantitative PCR จึงทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อเกสร กลีบดอก และใบของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ผลการเปรียบเทียบจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอบนเจลพบว่ายีน *F3H* ในอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์มีการแสดงออกที่เนื้อเยื่อของกลีบดอกมากที่สุด รองลงมาคือเกสรและมีการแสดงออกที่น้อยมากในเนื้อเยื่อใบ (ภาพที่ 4.29)



F3H 30 cycle

18S-rRNA 24 cycle

กลีบดอก เกสร ใบ

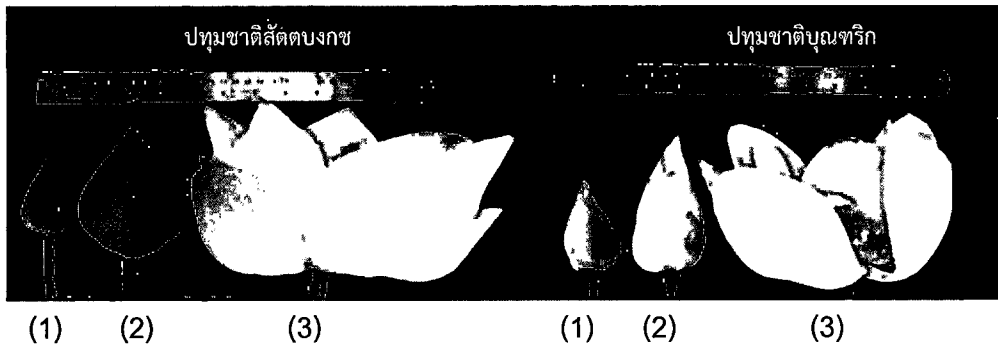
ภาพที่ 4.29 ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H* ในเกสร กลีบดอก และใบ ของอุบลชาติเซนต์ หลุยส์โกลด์ ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR โดยใช้การแสดงออกของยีน *18S rRNA* เป็น ยีนอ้างอิงเพื่อควบคุมปริมาณ cDNA ต้นแบบ

4.2.2.3 การแสดงออกของยีน *F3H* ในดอกปทุมชาติสัตตบงกชและ

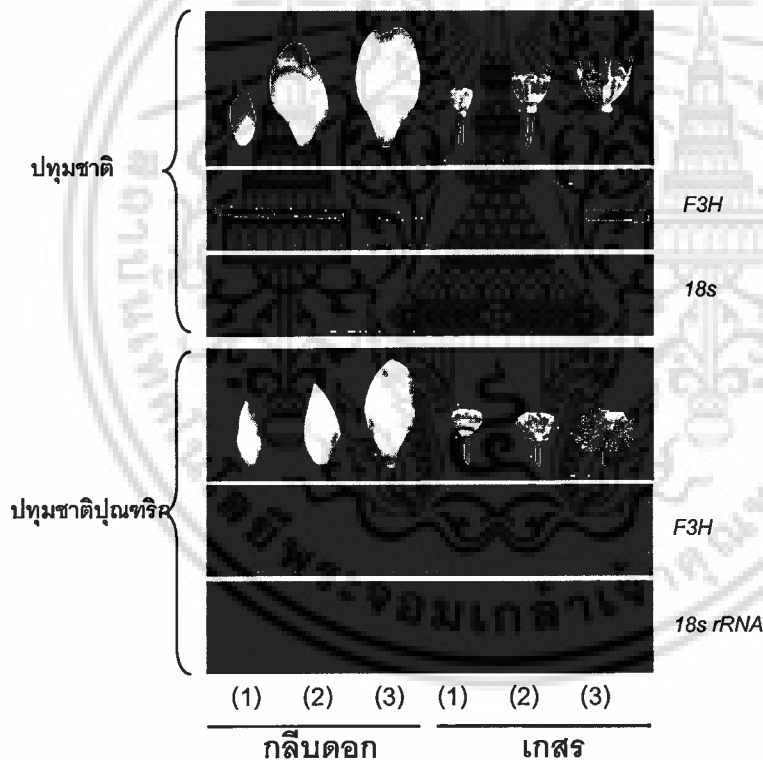
บุณฑริก

ทำการเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อของ เกสร กลีบดอกของดอกปทุมชาติสัตตบงกชและบุณฑริก ในระยะการพัฒนาดอก 3 ระยะ คือ ตุม (ระยะที่ 1) แยมบาน (ระยะที่ 2) และบาน (ระยะที่ 3) (ภาพที่ 4.30) ด้วยปฏิกิริยา semi-quantitative PCR เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสีของกลีบดอกที่เปลี่ยนแปลงตามระยะการพัฒนาดอกกับปริมาณการ แสดงออกของยีน *F3H* พบว่าในกลีบดอกระยะที่ 1 ของปทุมชาติสัตตบงกชมีการแสดงออกของยีน *F3H* มาก ที่สุด รองลงคือระยะที่ 2 และระยะที่ 3 ตามลำดับ ในเนื้อเยื่อเกสรระยะที่ 1 และระยะที่ 2 ไม่พบการ แสดงออกของยีน *F3H* แต่พบการแสดงออกในเนื้อเยื่อเกสรระยะที่ 3 ทั้งนี้ปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* ในกลีบดอกปทุมชาติสัตตบงกชในแต่ละระยะการพัฒนาดอกสอดคล้องกับสีกลีบดอก โดยกลีบ ดอกระยะที่ 1 มีความเข้มสีมากที่สุด รองลงมาคือระยะที่ 2 และระยะที่ 3 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.31)

การแสดงออกของยีน *F3H* ในปทุมชาติบุณฑริกพบว่า เนื้อเยื่อกลีบดอก ระยะที่ 2 มีการแสดงออกของยีน *F3H* มากที่สุด รองลงมาคือ กลีบดอกระยะที่ 1 และไม่พบการแสดงออก ในกลีบดอกระยะที่ 3 ในเนื้อเยื่อเกสรไม่พบการแสดงออกของยีน *F3H* ในทุกระยะการพัฒนาดอกซึ่งการ แสดง ออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อกลีบดอกสอดคล้องกับสีของกลีบดอกปทุมชาติบุณฑริกที่มีสีชมพูอ่อนเจือ อยู่บริเวณปลายกลีบในระยะที่ 1 และชัดเจนในระยะที่ 2 จากนั้นสีชมพูจะหายไปในระยะที่ 3 ดังแสดงในภาพ ที่ 4.30



ภาพที่ 4.30 ดอกปทุมชาติสีตัดบงกชและบุณชริกทั้ง 3 ระยะการพัฒนารูปของดอก

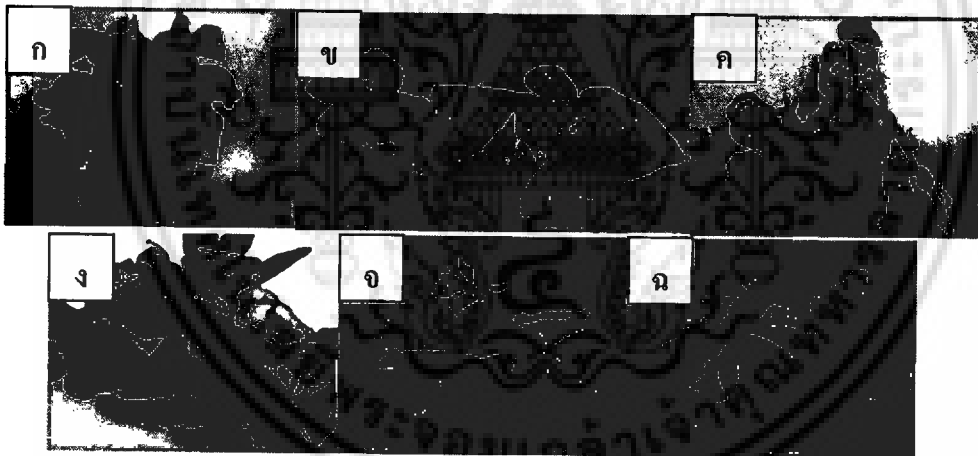


ภาพที่ 4.31 ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อกลีบดอกและเกสรของปทุมชาติสีตัดบงกช และปทุมชาติบุณชริกทั้ง 3 ระยะการพัฒนารูปของดอก ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR โดยใช้การแสดงออกของยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิงเพื่อควบคุมปริมาณ cDNA ต้นแบบ (1) การพัฒนาของดอกระยะที่ 1 (2) การพัฒนาของดอกระยะที่ 2 (3) การพัฒนาของดอกระยะที่ 3

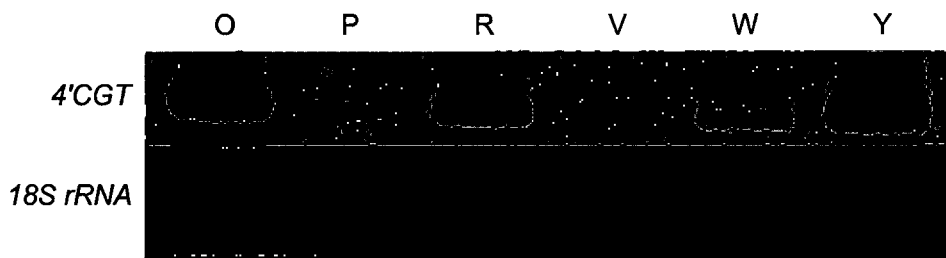
4.2.3 การแสดงออกของยีน 4'CGT

4.2.3.1 การแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกลินินมังกรสีต่างๆ ด้วย ปฏิกิริยาพีซีอาร์

โดยศึกษาในกลีบดอกลินินมังกรพันธุ์ Pixie Bells ดอกสีเหลือง สีชมพู สีม่วง และ สีขาว และ พันธุ์ Cameo ดอกสีส้มและสีแดง (ภาพที่ 4.32) ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่สนใจ จำเป็นต้องคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกสม่ำเสมอในเนื้อเยื่อพืช (housekeeping gene) เป็นยีนอ้างอิงในการปรับปริมาณ cDNA เริ่มต้นที่ใช้เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา semi-quantitative PCR ให้เท่ากันซึ่งในการทดลองนี้เลือกใช้ยีน 18s rRNA เป็นยีนอ้างอิง เมื่อสามารถปรับปริมาณ cDNA ของแต่ละตัวอย่างให้เท่ากันสำหรับการทำ semi-quantitative PCR แล้วจึงทำการศึกษาการแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกของลินินมังกรสีต่างๆ ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์บนเจลพบขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 bp ในตัวอย่าง cDNA จากทุกสีดอกและเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ในแต่ละสีดอกพบว่าดอกสีเหลืองมีปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT โดยมีความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอมากที่สุด รองลงมาคือสีส้ม สีแดง สีขาว สีชมพู และสีม่วง (ภาพที่ 4.33)



ภาพที่ 4.32 ดอกลินินมังกร สีส้ม (ก) สีชมพู (ข) สีแดง (ค) สีม่วง (ง) สีขาว (จ) สีเหลือง (ฉ) ที่ใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 4.33 เปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกลินม้งกร สีส้ม (O) สีชมพู (P) สีแดง (R) สีม่วง (V) สีขาว (W) และสีเหลือง (Y) ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR โดยใช้ยีน 18S rRNA เป็นยีนอ้างอิง

4.3 ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* และยีน 4'CGT

4.3.1 ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi)

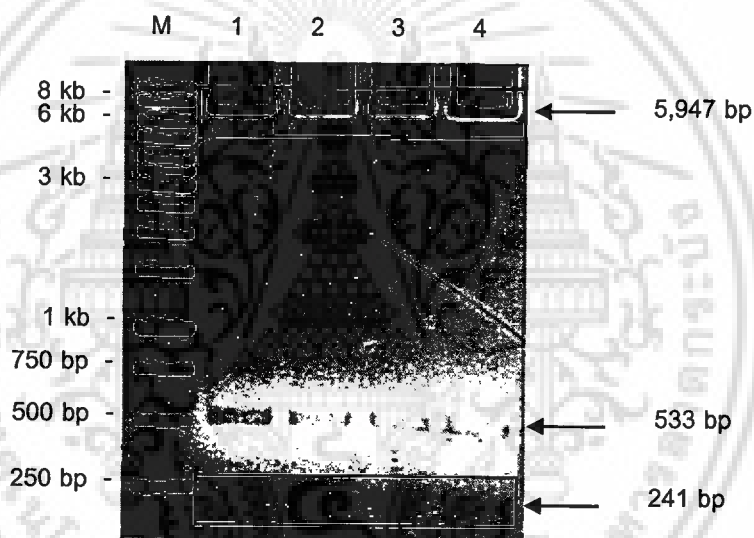
ศึกษาหน้าที่ของยีน *F3H* ในกลีบดอกอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสดงผลลัพธ์ โดยยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi และติดตามการเปลี่ยนแปลงของสีกลีบดอก ร่วมกับการแสดงออกของยีน *F3H* และ *CHS*

4.3.1.1 การสร้างดีเอ็นเอสายผสมรูปแบบ inverted repeat เพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi ในกลีบดอกอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสดงผลลัพธ์

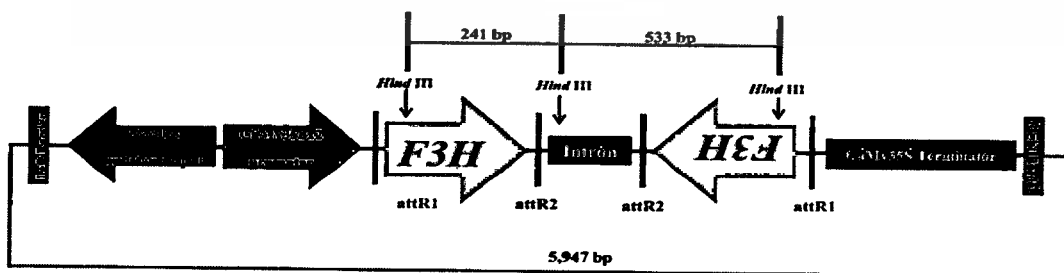
การสังเคราะห์ชิ้นส่วนยีน *F3H* จาก cDNA ของปทุมชาติลำดับต้นๆ โดยเลือกบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 336 ถึง 644 บนสาย mRNA ของยีน *F3H* ในการออกแบบไพรเมอร์ ผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์พบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 นิวคลีโอไทด์ เมื่อใช้อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส สำหรับขั้นตอน annealing ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นทำการแยกสกัดแถบดีเอ็นเอออกจากเจลเพื่อนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pCR8 แล้วถ่ายโอนเข้าแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ตรวจสอบชิ้นส่วนยีน *F3H* ขนาดประมาณ 300 นิวคลีโอไทด์ ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pCR8 (pCR8-*F3H*) ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์พบชิ้นส่วนของยีน *F3H* ขนาด 300 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder จากนั้นทำการถ่ายโอนชิ้นส่วนยีน *F3H* ในเวกเตอร์ pCR8-*F3H* เข้าสู่เวกเตอร์ pJAWOHL8 (pJA8*F3H*) ด้วยปฏิกิริยา LR โดยเวกเตอร์ pJAWOHL8 เป็นเวกเตอร์ที่สามารถสร้างอาร์เอ็นเอรูปแบบ inverted repeat ซึ่งเมื่อทำการถ่ายโอนยีน *F3H* เข้าสู่พืช pJA8*F3H* จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi ยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ในพืช

4.3.1.2 การตรวจสอบการถ่ายโอนชิ้นส่วนยีน *F3H* ในเวกเตอร์ pCR8-*F3H* เข้าสู่เวกเตอร์ pJAWOHL8 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III

ผลจากการตรวจสอบการถ่ายโอนชิ้นส่วนยีน *F3H* จากเวกเตอร์ pCR8-*F3H* เข้าสู่เวกเตอร์ pJAWOHL8 (pJA8*F3H*) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3 ชิ้น ขนาด 5947 นิวคลีโอไทด์, ขนาด 533 นิวคลีโอไทด์ และขนาด 241 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 4.34) โดยชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นได้เกิดจากการตัดของเอนไซม์ *Hind* III บริเวณภายในยีน *F3H* สาย sense 1 ตำแหน่ง สาย antisense 1 ตำแหน่ง และบริเวณ intron ของเวกเตอร์ pJAWOHL8 1 ตำแหน่ง (ภาพที่ 4.35) จากนั้นนำเวกเตอร์ pJA8*F3H* โคลนที่ 2, 3 และ 4 ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์ F-pJAintron และ R-pJAintron ที่ออกแบบจากลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ intron บนเวกเตอร์ pJAWOHL8 (ภาพที่ 4.36) เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์และทิศทางของชิ้นส่วนยีน *F3H* ในเวกเตอร์ pJA8*F3H*



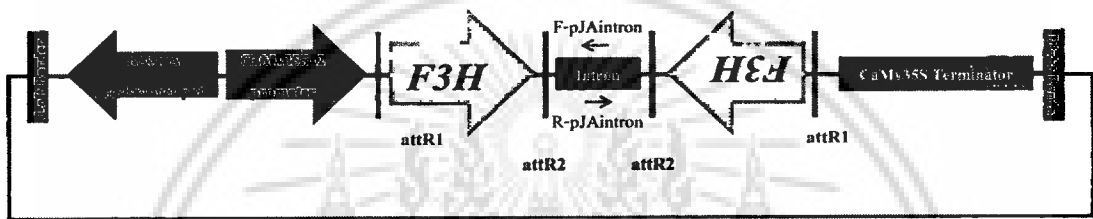
ภาพที่ 4.34 การตรวจสอบชิ้นส่วนยีน *F3H* ของปทุมชาติสัตว์บกขั้วที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pJAWOHL8 (pJA8*F3H*) โคลนที่ 1-4 (1-4) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (M)



ภาพที่ 4.35 แผนภาพเวกเตอร์ pJA8*F3H* และตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III (ดัดแปลงจาก Pillman, 2009)

4.3.1.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *F3H* ของปทุมชาติ สัตตบงกช ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pJAWOHL8 (pJA8*F3H*)

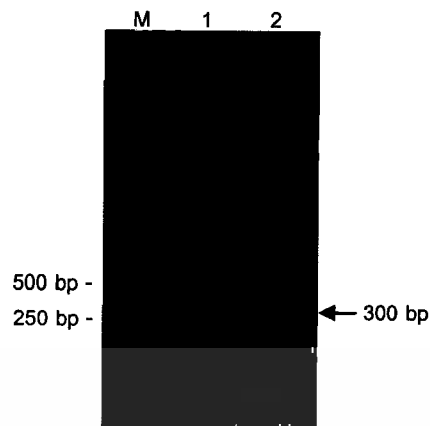
ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเวกเตอร์ pJA8*F3H* โคลนที่ 2, 3 และ 4 พบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *F3H* ในเวกเตอร์ pJA8*F3H* ทั้ง 3 โคลน เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *F3H* ของปทุมชาติสัตตบงกช ตำแหน่งที่ 336 ถึง 644 ทุกนิวคลีโอไทด์และชิ้นส่วนของยีน *F3H* อยู่บริเวณขนาดทั้ง 2 ข้าง intron ของเวกเตอร์ pJAWOHL8 ในทิศทาง sense และ antisense (ภาพที่ 4.36) จากนั้นคัดเลือกเวกเตอร์ pJA8*F3H* โคลนที่ 2 ถ่ายโอนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ด้วยวิธีการ electroporation ต่อไป



ภาพที่ 4.36 ตำแหน่งจับของไพรเมอร์ pJAintronF และไพรเมอร์ pJAintronR บริเวณ intron ของเวกเตอร์ pJAWOHL8 ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเวกเตอร์ pJA8*F3H* (ดัดแปลงจาก Pillman, 2009)

4.3.1.4 ผลการตรวจสอบการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJA8*F3H* หรือ pJAWOHL8 เข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ GV3101 ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

ผลปฏิกิริยาพีซีอาร์จากการใช้โคลนีอะโกรแบคทีเรียเป็นต้นแบบ พบชิ้นดีเอ็นเอของยีน *F3H* ขนาด 300 นิวคลีโอไทด์ ในโคลนีอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJA8*F3H* แต่ไม่พบชิ้นดีเอ็นเอของยีน *F3H* ในโคลนีอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 ด้วยวิธีการ electroporation (ภาพที่ 4.37)



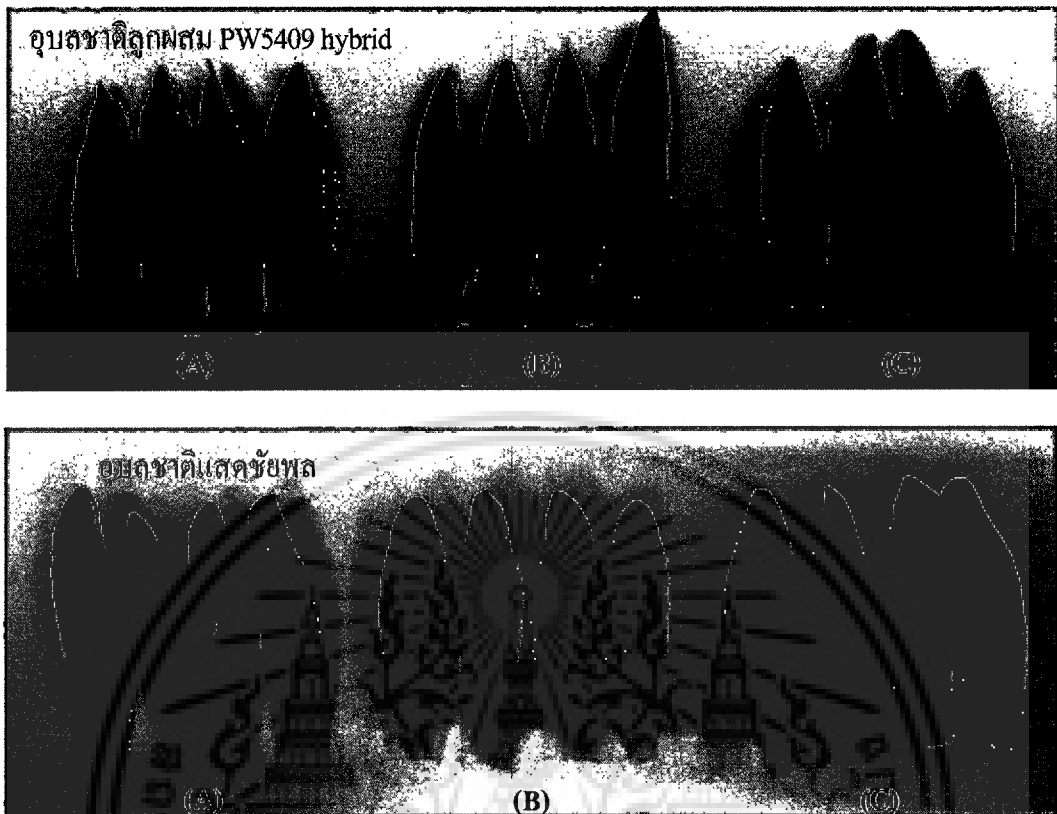
ภาพที่ 4.37 การตรวจสอบการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 (1) หรือ pJA8F3H (2) เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (M)

4.3.1.5 ผลการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 หรือเวกเตอร์ pJA8F3H เข้าสู่กลีบดอกอุบลชาติด้วยวิธีการ infiltration

ลักษณะกลีบดอกอุบลชาติภายหลังการถ่ายโอนเวกเตอร์

pJAWOHL8 หรือเวกเตอร์ pJA8F3H

หลังจากการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 หรือเวกเตอร์ pJA8F3H ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะในกลีบดอกของอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสดงช่พลงเป็นเวลา 3 วัน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสีในทั้งกลีบดอกที่มีการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 หรือเวกเตอร์ pJA8F3H เมื่อเปรียบเทียบกับกลีบดอกที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ (ภาพที่ 4.38) จากนั้นนำกลีบดอกอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสดงช่พลงที่ได้รับและไม่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 หรือเวกเตอร์ pJA8F3H ไปตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* และยีน *CHS* ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR



ภาพที่ 4.38 ลักษณะกลีบดอกของอวบชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสงชัยพล ภายหลังจากได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 หรือเวกเตอร์ pJA8F3H ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะเป็นเวลา 3 วัน

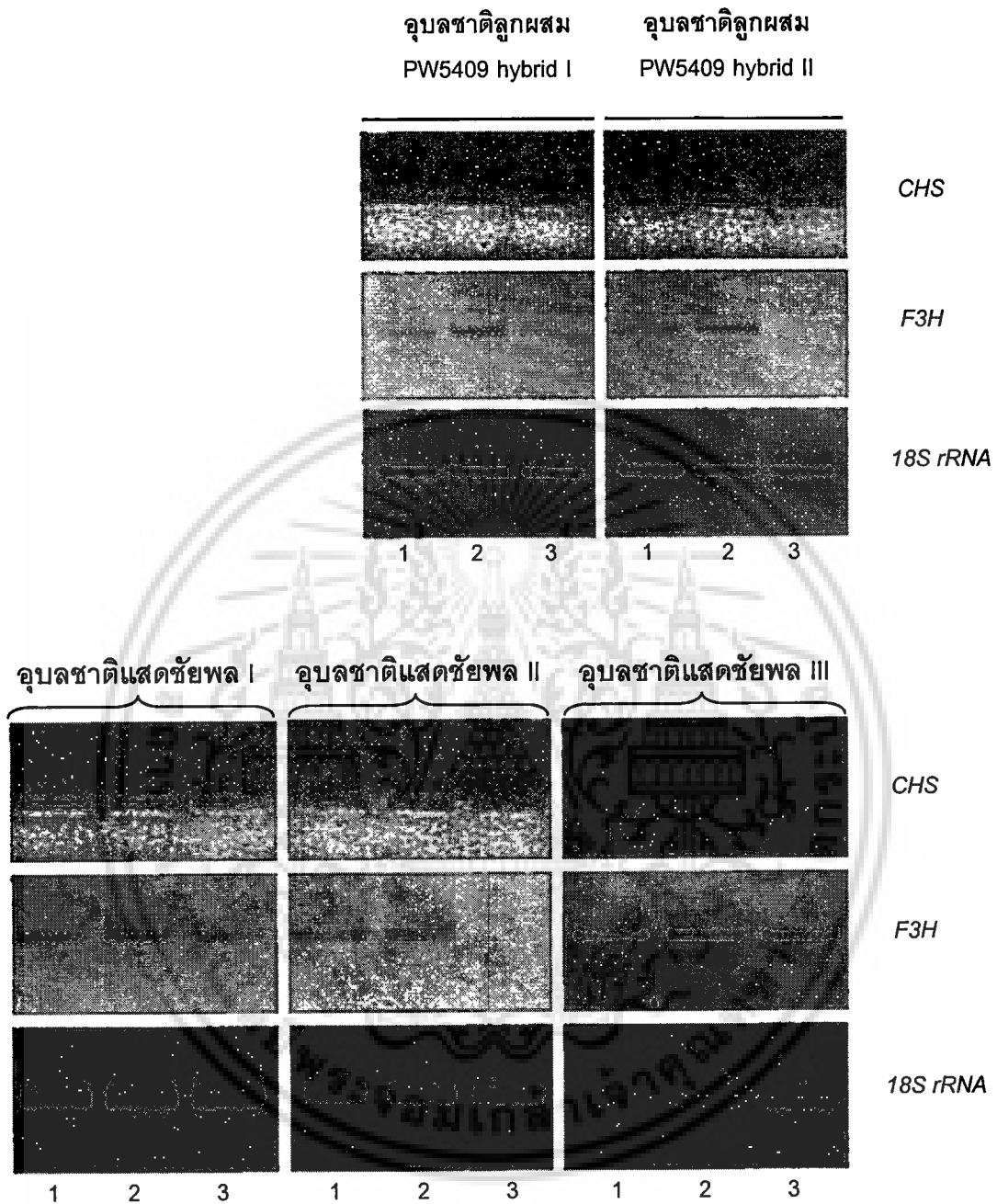
- (A) แสดงกลีบดอกอวบชาติที่ไม่ผ่านการถ่ายโอนเวกเตอร์
- (B) แสดงกลีบดอกอวบชาติที่ผ่านการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 (negative control)
- (C) แสดงกลีบดอกอวบชาติที่ผ่านการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJA8F3H (RNAi)

การติดตามปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* และยีน *CHS* ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

ปรับความเข้มข้นของ cDNA เริ่มต้น ที่ได้จากกลีบดอกของอวบชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสงชัยพล ที่ไม่ผ่านและผ่านการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 หรือเวกเตอร์ pJA8F3H ให้เท่ากัน โดยเปรียบเทียบจากความเข้มแถบดีเอ็นเอของยีน *18S rRNA* บนเจลเป็นยีนอ้างอิง (ภาพที่ 4.39) จากนั้นนำ cDNA ที่ได้จากการปรับความเข้มข้นให้เท่ากันแล้วข้างต้น ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา semi-quantitative PCR เพื่อตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* และ *CHS* ต่อไป

ผลจากปฏิกิริยา semi-quantitative PCR เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* โดยเปรียบเทียบจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอบนเจล จากการทดลองในดอกอุบลชาติแสดงซัยพลจำนวน 3 ดอก กลีบดอกอุบลชาติของดอกที่ 1 และ 2 ที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 (control) ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีเชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ มีปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* มากที่สุด แต่การแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อกลีบดอกอุบลชาติที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJA8*F3H* ลดลงอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบกับกลีบดอกที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 (control) ในขณะที่การแสดงออกของยีน *F3H* ของดอกอุบลชาติแสดงซัยพลดอกที่ 3 ลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น การทดลองในดอกอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid พบปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อกลีบดอกอุบลชาติที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 (control) และไม่พบการแสดงออกในเนื้อเยื่อกลีบดอกที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJA8*F3H*

เมื่อติดตามการแสดงออกของยีน *CHS* ในเนื้อเยื่อกลีบดอกอุบลชาติทั้งที่ไม่ได้ รับและได้รับการถ่ายโอน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในเนื้อเยื่อกลีบดอกของอุบลชาติทั้ง 2 ชนิด (ภาพที่ 4.39)



ภาพที่ 4.39 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* ในกลีบดอกของอุบลชาติลูกผสม PW5409 และแสดงชัยพลที่ไม่ผ่านการถ่ายโอน (1) ผ่านการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 (2) ผ่านการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJA8F3H (3) ด้วยวิธีการ infiltration ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR โดยให้การแสดงออกของยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิงเพื่อควบคุมปริมาณ cDNA ต้นแบบ

4.3.2 ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน 4'CGT ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi)

ศึกษาหน้าที่ของยีน 4'CGT ในกลีบดอกลินมังกรพันธุ์ Pixie Bells โดยยับยั้งการแสดงออกของยีน 4'CGT ด้วยเทคนิค RNAi และติดตามการเปลี่ยนแปลงของสีกลีบดอกร่วมกับการแสดงออกของยีน 4'CGT

4.3.2.1 การสร้างดีเอ็นเอสายผสมรูปแบบ inverted repeat เพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi ในกลีบดอกลินมังกรพันธุ์ Pixie Bells

สังเคราะห์ชิ้นส่วนยีน 4'CGT จาก cDNA ของดอกลินมังกรสีเหลือง พันธุ์ Pixie Bells ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์และเชื่อมต่อกับพลาสมิด pCR8 ดังอธิบายในข้อ 4.1.3.1 เมื่อผ่านการคัดเลือกและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำไปใช้ในการถ่ายโอนเข้าสู่พลาสมิด pJAWOHL8 ด้วยปฏิกิริยา LR แล้วถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat-shock เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอ

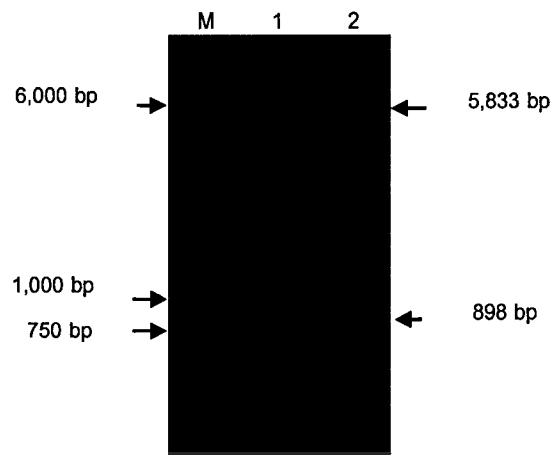
4.3.2.2 การตรวจสอบการถ่ายโอนชิ้นส่วนยีน 4'CGT ในพลาสมิด pCR8-4'CGT เข้าสู่พลาสมิด pJAWOHL8 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิด pCR8-4'CGT มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน 4'CGT ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Xba* I พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาด 898 นิวคลีโอไทด์ และขนาด 5,833

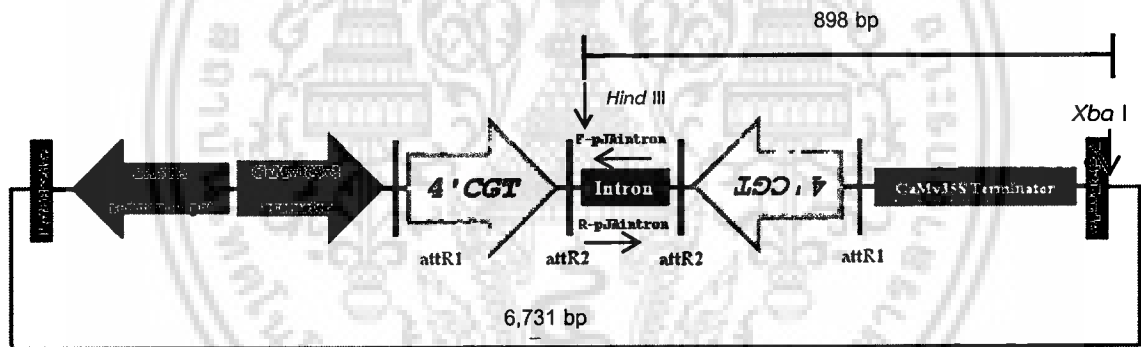
นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 4.40) ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดของเอนไซม์ *Hind* III บริเวณ intron ของพลาสมิด pJAWOHL8 1 ตำแหน่ง และการตัดของเอนไซม์ *Xba* I บนตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 3,798 ของพลาสมิด pJAWOHL8 จากนั้นนำพลาสมิด pJA8-4'CGT ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

4.3.2.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 4'CGT ของกลีบดอกลินมังกรพันธุ์ Pixie Bells ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pJAWOHL8 (pJA8-4'CGT)

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pJA8-4'CGT ด้วยไพรเมอร์ F-IntronpJA8 และ R-IntronpJA8 ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ intron บนพลาสมิด pJAWOHL8 เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์และทิศทางของชิ้นส่วนยีน 4'CGT ในพลาสมิด pJA8-4'CGT พบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 4'CGT ในพลาสมิด pJA8-4'CGT เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 4'CGT ของลินมังกร ตำแหน่งที่ 1,062 ถึง 1,374 (EF650015.1) และพบว่าชิ้นส่วนของยีน 4'CGT อยู่ขนาดทั้ง 2 ข้างของ intron ในพลาสมิด pJA8-4'CGT ในทิศทาง sense และ antisense (ภาพที่ 4.41) จากนั้นนำพลาสมิด pJA8-4'CGT ถ่ายโอนเข้าสู่โกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ด้วยวิธีการ electroporation



ภาพที่ 4.40 ผลการตรวจสอบพลาสมิด pJA8'CGT (2) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Xba* I เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (M) และพลาสมิด pJAWOHL8 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Xba* I (1)

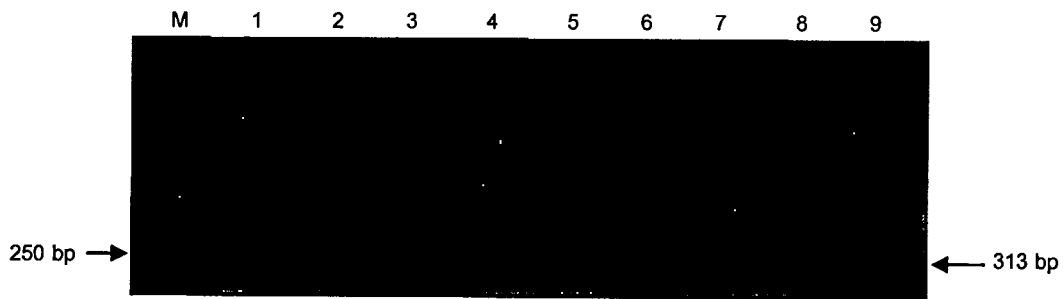


ภาพที่ 4.41 แผนภาพพลาสมิด pJA8-4'CGT แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ F-IntronpJA8 และไพรเมอร์ R-IntronpJA8 และตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Xba* I (ดัดแปลงจาก Pillman, 2009)

4.3.2.4 ผลการตรวจสอบการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4'CGT เข้าสู่โกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

เมื่อถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4'CGT เข้าสู่โกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 แล้ว ทำการตรวจสอบโคโลนีเดียวด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์คู่กับไพรเมอร์ F-EcoRI-4'CGT และ R-4'CGT-SacI จากการใช้โคโลนีโอะโกรแบคทีเรียเป็นต้นแบบ พบขึ้นดีเอ็นเอขนาด 313 นิวคลีโอไทด์ จากโคโลนีที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJA8-4'CGT (ภาพที่ 4.42)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.42 ผลการตรวจสอบพลาสมิด pJA8-4'CGT ในอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 จำนวน 9 โคโลนี (1-9) ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ร่วมกับไพรเมอร์ F-EcoRI-4'CGT และ R-4'CGT-SacI เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (M)

4.3.2.5 ผลการถ่ายโอนพลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-4'CGT เข้าสู่กลีบดอกลินม้งกรด้วยวิธีการ Agro-infiltration

ลักษณะกลีบดอกลินม้งกรภายหลังการถ่ายโอนพลาสมิด

pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT

หลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-4'CGT เข้าสู่กลีบดอกลินม้งกรพันธุ์ Pixie Bells ดอกสีเหลือง นาน 3 วัน ด้วยวิธีการ infiltration จำนวน 2 ต้น โดยต้นที่ 1 ถ่ายโอน 3 ดอก ต้นที่ 2 ถ่ายโอน 4 ดอก ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสีในกลีบดอกที่ได้รับพลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-4'CGT เมื่อเปรียบเทียบกับกลีบดอกปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด (ภาพที่ 4.43) จากนั้นนำกลีบดอกลินม้งกรที่ไม่ได้รับและได้รับพลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-4'CGT ไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน 4'CGT ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

การติดตามปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

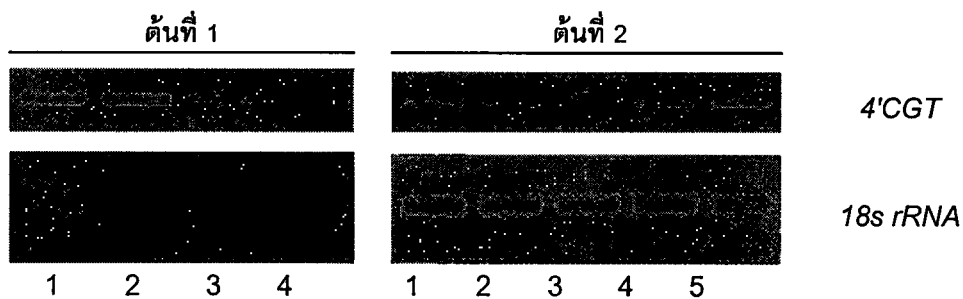
ปรับ cDNA เริ่มต้นที่ได้จากกลีบดอกของลินม้งกรที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-4'CGT ให้มีความเข้มข้นเท่ากัน โดยเปรียบเทียบจากความเข้มแถบดีเอ็นเอของยีน 18S rRNA บนเจลที่ใช้เป็นยีนอ้างอิง (ภาพที่ 4.44) จากนั้นใช้ cDNA ที่ผ่านการปรับความเข้มข้นให้เท่ากันแล้วเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา semi-quantitative PCR เพื่อตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT

ผลจากปฏิกิริยา semi-quantitative PCR เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT โดยเปรียบเทียบจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอบนเจล จากการทดลองในดอกลินเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มังกรพันธุ์ Pixie Bells ดอกสีเหลืองจำนวน 2 ต้น ต้นที่ 1 ทำการถ่ายโอน 3 ดอก ต้นที่ 2 ทำการถ่ายโอน 4 ดอก พบว่าในต้นที่ 1 มีจำนวน 1 ดอก ที่มีปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT มากที่สุดในกลีบดอกได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 (control) ด้วยวิธีการ infiltration แต่การแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกกลีบมังกรที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJA8-4'CGT ลดลงอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบกับกลีบดอกที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 (control) การทดลองในต้นที่ 2 จำนวน 4 ดอก พบว่ามีปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ลดลงจำนวน 2 ดอก ในขณะที่อีก 2 ดอก มีระดับการแสดงออกของยีน 4'CGT ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับดอกที่ถ่ายพลาสมิด pJAWOHL8 เมื่อเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ระหว่างดอกที่มีปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ลดลง กับดอกที่มีปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ไม่เปลี่ยนแปลง พบว่าดอกที่มีการแสดงออกของยีน 4'CGT ลดลงอยู่ที่ 57.14 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนดอกทั้งหมดที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA84'CGT



ภาพที่ 4.43 ดอกกลีบมังกรที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4'CGT ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีอะไโรแบคทีเรียเป็นพาหะเป็นเวลา 3 วัน (ขวา) เปรียบเทียบกับดอกกลีบมังกรที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4'CGT (ซ้าย)



ภาพที่ 4.44 ผลเปรียบเทียบการแสดงผลของยีน 4'CGT ในกลีบดอกลินินมังกรที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pJAWOHL8 (1) และกลีบดอกที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4'CGT (2-4 สำหรับต้นที่ 1, 2-5 สำหรับต้นที่ 2) และมียีน 18s rRNA เป็นยีนอ้างอิง

4.4 การเตรียมดีเอ็นเอสายผสมสำหรับถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง

4.4.1. การสร้างพลาสมิดที่มียีน DFR จากปทุมมา

การสร้างพลาสมิดสายผสม pBI121DFR ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI*

พลาสมิด pBI121DFR ที่มีขนาด 13,696 bp ได้จากการตัดยีน DFR ที่อยู่ในพลาสมิด pTZDFR มาต่อเข้าพลาสมิด pBI121 โดยทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI* (ภาพที่ 4.45) จะพบแถบดีเอ็นเอ 2 ชั้น คือ ขนาด 2,886 bp และขนาดประมาณ 750 bp ซึ่งเป็นส่วนของยีน DFR (ช่องที่ 1-4) ในพลาสมิด pTZDFR และในช่องที่ 6-8 เป็นการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI* เช่นเดียวกัน ในพลาสมิด pBI121 จะพบแถบดีเอ็นเอ 2 ชั้น คือ ขนาดประมาณ 10,000 bp และอีก 1 ชั้นจะแยกเอาส่วนของยีน GUS ขนาด 1,812 bp ออกจากพลาสมิด pBI121 เพื่อรอการเชื่อมต่อดำเนินการที่ถูกต้อง โดยตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

การตรวจสอบพลาสมิดสายผสม pBI121DFR โดยใช้ FlavoPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit

พลาสมิดสายผสม pBI121DFR ที่สกัดได้นี้ประกอบด้วยส่วนของยีน DFR ขนาด 750 bp ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ CaMV35S และเทอร์มิเนเตอร์ NOS และยีนคัดเลือก NPTII ขนาด 254 bp ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ NOS และเทอร์มิเนเตอร์ NOS มาตรวจสอบความเข้มข้นในเจลอะกาโรส เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

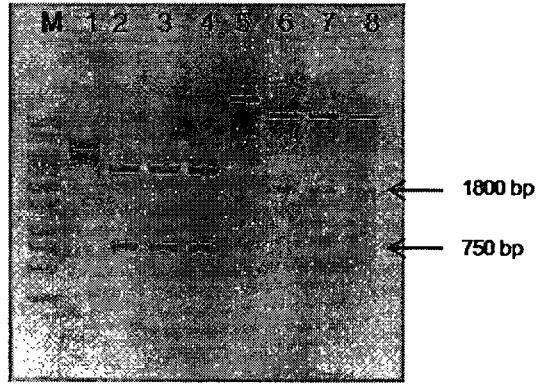
กาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเชื่อมต่อ โดยทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI* อีกครั้ง (ภาพที่ 4.46) ในช่องที่ 3 และ 4 จะพบแถบดีเอ็นเอ 2 ชั้นคือ ขนาด 750 bp และ ขนาด 11,633 bp แสดงว่า ในพลาสมิด pBI121DFR มีขนาดยีน *DFR* เท่ากับที่อยู่ในพลาสมิด pTZDFR ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ โดยโครงสร้างของพลาสมิด pBI121DFR และในช่องที่ 5 พบแถบดีเอ็นเอ 4 ชั้นคือ ขนาดประมาณ 700 bp ขนาดประมาณ 800 bp ขนาดประมาณ 2,000 bp และขนาด 9,633 bp

การสร้างพลาสมิดสายผสม pCAMBIA2301DFR ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII*

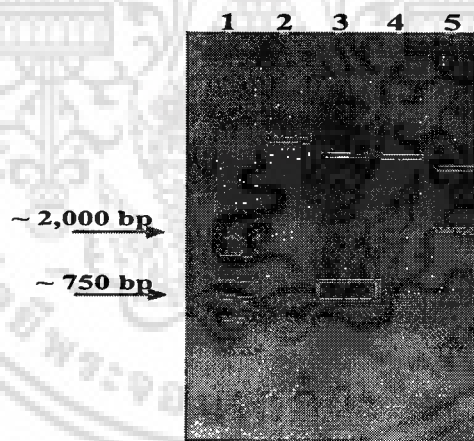
พลาสมิด pCAMBIA2301DFR ที่มีขนาด 12,383 bp ได้จากการตัดตั้งแต่ตำแหน่งของโปรโมเตอร์ CaMV35S จนถึงเทอร์มิเนเตอร์ NOS ที่มียีน *DFR* อยู่ จากพลาสมิด pBI121DFR มาต่อเข้าพลาสมิด pCAMBIA2301 โดยทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* (ภาพที่ 4.47) ในพลาสมิด pCAMBIA2301 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จะพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 10,000 bp และชั้นที่เป็นตำแหน่งของ multiple cloning site ซึ่งมีขนาดเล็กมากจนหลุดออกไป และในพลาสมิด pBI121DFR จะพบแถบดีเอ็นเอ 2 ชั้น คือ ขนาดประมาณ 2,000 bp และขนาดประมาณ 10,000 bp จากการตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

การตรวจสอบพลาสมิดสายผสม pCAMBIA2301DFR โดยใช้ FlavoPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit

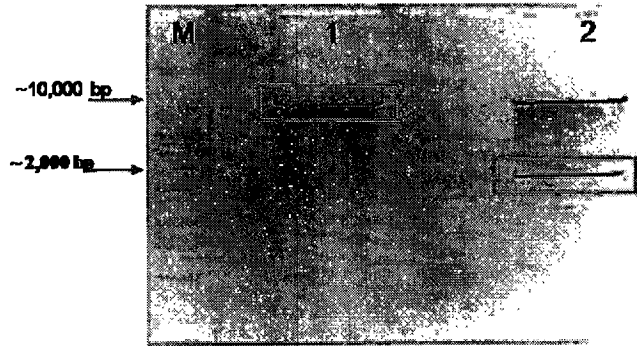
พลาสมิดสายผสม pCAMBIA2301DFR ที่สกัดได้นี้ประกอบด้วยส่วนของยีน *GUS* ขนาด ประมาณ 2,000 bp และ ยีน *DFR* ขนาด 750 bp ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ CaMV35S และ เทอร์มิเนเตอร์ NOS และยีนคัดเลือก *NPTII* ขนาด 254 bp ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ NOS และเทอร์มิเนเตอร์ PolyA มาตรวจสอบความเข้มข้นในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเชื่อมต่อ โดยทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* อีกครั้ง (ภาพที่ 4.48) พบว่ามีเพียงช่องที่ 3 และ 6 ที่พบแถบดีเอ็นเอ 2 ชั้นคือ ขนาดประมาณ 2,000 bp และขนาดประมาณ 10,000 bp แสดงว่าในพลาสมิด pCAMBIA2301DFR ได้รับยีนที่ตรงกับพลาสมิด pBI121DFR (ภาพที่ 4.49) ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ โดยโครงสร้างของพลาสมิด pCAMBIA2301DFR (ภาพที่ 4.50) โดยมีตั้งแต่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ CaMV35S และ เทอร์มิเนเตอร์ NOS ที่มียีน *DFR* อยู่ตรงกลาง



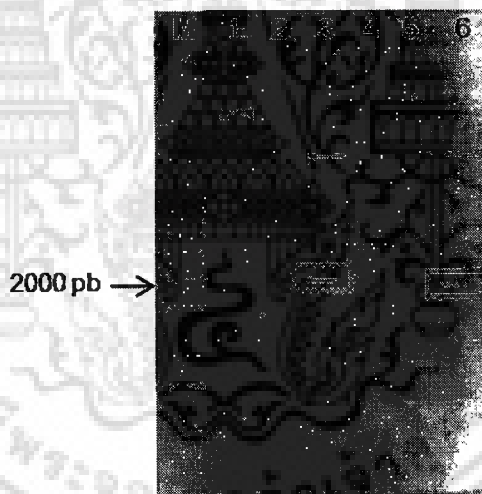
ภาพที่ 4.45 การตรวจสอบพลาสมิดด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I ที่ M) ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 1 kb DNA ladder 1) พลาสมิด pTZDFR 2,3,4) พลาสมิด pTZDFR ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 750 และ 2,886 bp 5) พลาสมิด pBI121 6), 7), 8) พลาสมิด pBI121 ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 1,812 และขนาด 10,000 bp



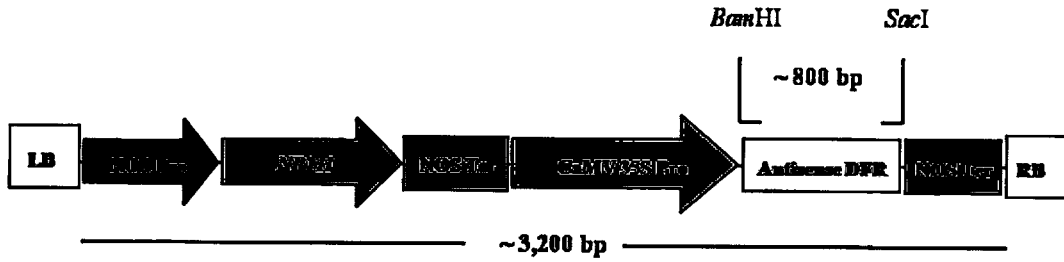
ภาพที่ 4.46 การตรวจสอบพลาสมิด pBI121DFR ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI *Sac*I *Xba*I และ *Nco*I 1) ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 1 kb DNA ladder 2) pBI121DFR 3) pBI121DFR ตัดด้วย *Sac*I และ *Bam*HI ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 750 bp และ ขนาด 11,633 bp 4) pBI121DFR ตัดด้วย *Xba*I ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 750 bp และ ขนาด 11,633 bp 5) pBI121DFR ตัดด้วย *Nco*I ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 700 bp ขนาดประมาณ 800 bp ขนาด 2,000 bp และขนาด 9,633 bp



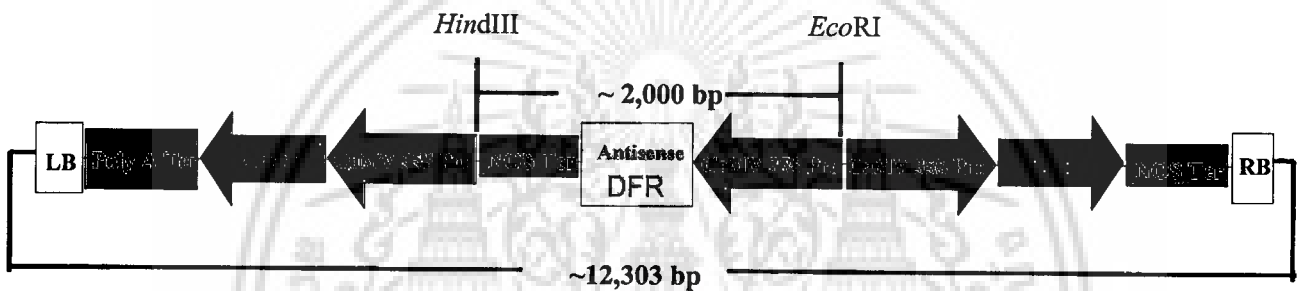
ภาพที่ 4.47 พลาสมิด pCAMBIA2301 และ pBI121DFR ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* M) 1 kb DNA ladder 1) pCAMBIA2301 ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 10,000 bp 2) pBI121DFR ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 2,000 bp และ ขนาดประมาณ 10,000 bp



ภาพที่ 4.48 พลาสมิด pCAMBIA2301DFR หลังจากการเชื่อมต่อดำเนินการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* M) 1 kb DNA ladder 1) pCAMBIA2301DFR 2 และ 5) pCAMBIA2301DFR ตัดด้วย *EcoRI* และ *HindIII* ได้ดีเอ็นเอประมาณ 10,000 bp 4) pCAMBIA2301DFR ตัดด้วย *EcoRI* และ *HindIII* ไม่พบแถบดีเอ็นเอ 3 และ 6) pCAMBIA2301DFR ตัดด้วย *EcoRI* และ *HindIII* ได้ดีเอ็นเอประมาณ 2,000 bp และขนาดประมาณ 10,000 bp



ภาพที่ 4.49 โครงสร้างพลาสมิด pBI121DFR

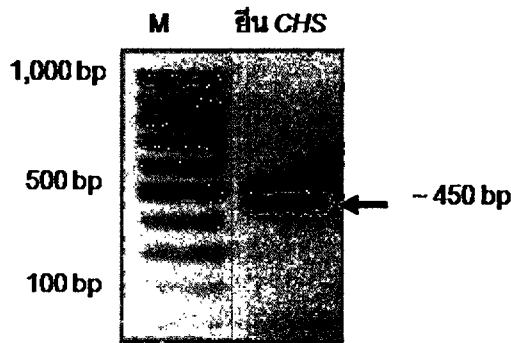


ภาพที่ 4.50 โครงสร้างพลาสมิด pCAMBIA2301DFR

4.4.2 การสร้างพลาสมิดที่มียีน CHS จากดอกบัวหลวงบุณฑริก

ผลการโคลนบางส่วนของยีน CHS จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก

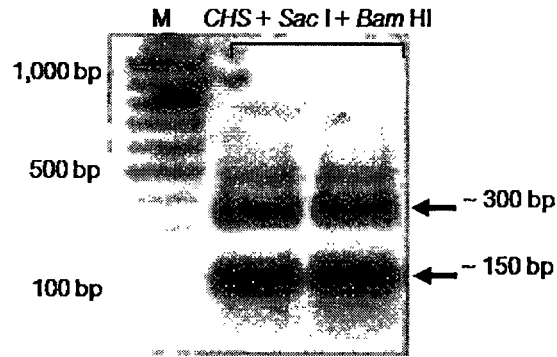
ผลการโคลนบางส่วนของยีน CHS จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกด้วยเทคนิค PCR ได้ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน CHS ขนาดประมาณ 450 bp (ภาพที่ 4.51) นำผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน CHS ที่โคลนได้ ไปใช้ในการสร้างพลาสมิดลูกผสมเพื่อใช้ในการถ่ายยีนต่อไป



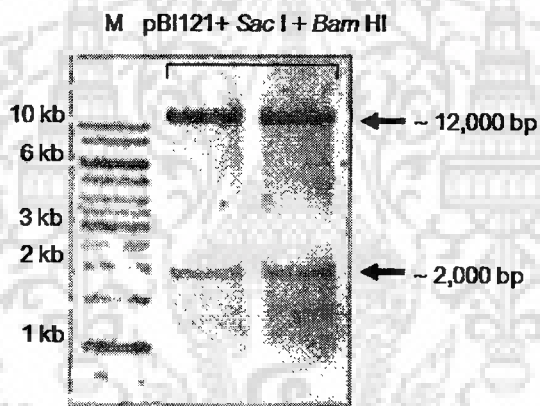
ภาพที่ 4.51 ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริก ขนาดประมาณ 450 bp, M = 100 bp DNA marker

ผลการสร้างพลาสมิดลูกผสม pBICHSA

นำผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริก ขนาดประมาณ 450 bp มาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pBI121 ขนาด 14,758 bp ในตำแหน่งแทนที่ยีน *GUS* ในลักษณะกลับทิศ (anti sense) โดยเริ่มต้นจากนำผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac* I และ *Bam* HI พบว่า ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ถูกเอนไซม์ตัดจำเพาะตัดออกเป็น 2 ส่วน ขนาดประมาณ 300 bp และขนาดประมาณ 150 bp (ภาพที่ 4.52) เลือกชิ้นส่วนของบางส่วนของยีน *CHS* ขนาดประมาณ 300 bp มาใช้ในการถ่ายยีน และเมื่อนำพลาสมิด pBI121 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac* I และ *Bam* HI พบว่า พลาสมิด pBI121 ถูกตัดออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนของยีน *GUS* ขนาดประมาณ 2,000 bp และส่วนของพลาสมิดที่เหลือขนาดประมาณ 12,000 bp (ภาพที่ 4.53) จากนั้นนำชิ้นส่วนของบางส่วนของยีน *CHS* และบางส่วนของพลาสมิด pBI121 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac* I และ *Bam* HI มาเชื่อมต่อเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ *T4* ligase ได้พลาสมิดลูกผสม pBICHSA ขนาดประมาณ 13,500 bp จากนั้นตรวจสอบหาส่วนของบางส่วนของยีน *CHS* ที่แทรกบนพลาสมิดลูกผสม pBICHSA ขนาดประมาณ 1,500 bp ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Hind* III (ภาพที่ 4.54) และเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CAMV_forward primer และ NOS_reverse primer ได้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 500 bp (ภาพที่ 4.55) เลือกโคลนที่ได้ผล นำไปตรวจสอบการกลับทิศของบางส่วนของยีน *CHS* ที่อยู่บนพลาสมิด pBICHSA ด้วยการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เลือกโคลนมีบางส่วนของยีน *CHS* ขนาด 331 bp แทรกอยู่ระหว่างส่วนของ CaMV 35s promoter และ NOS terminator ของ พลาสมิด pBICHSA ในลักษณะกลับทิศ นำไปใช้ในการสร้างพลาสมิดลูกผสมเพื่อใช้ในการถ่ายยีน

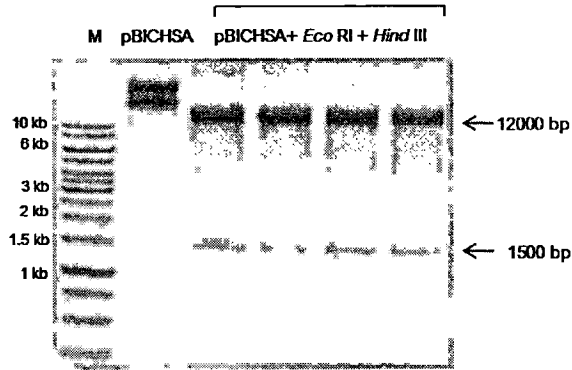


ภาพที่ 4.52 ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริก ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac I* และ *Bam HI* ได้ชิ้นส่วนของ DNA ขนาดประมาณ 300 bp และขนาดประมาณ 150 bp (M = 100 bp DNA marker)



ภาพที่ 4.53 พลาสมิด pBI121 ตัดด้วยเอนไซม์ *Sac I* และ *Bam HI* แยกออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนของยีน *GUS* ขนาดประมาณ 2,000 bp และส่วนของพลาสมิดที่เหลือ ขนาดประมาณ 12,000 bp (M = 1kb DNA marker)

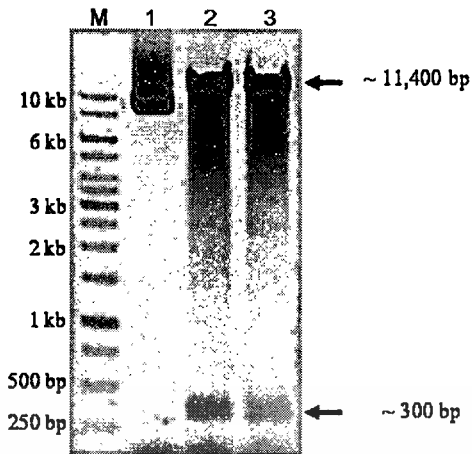
pCAMBIA1302 ขนาด 10,549 bp โดยเริ่มต้นจากนำพลาสมิดลูกผสม pBICHSA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Hind* III พบว่า ได้ชิ้นส่วนของ DNA 2 ส่วน คือ ส่วนของยีน *CHS* แบบ antisense ที่อยู่ระหว่าง CaMV 35s promoter และ NOS terminator ขนาดประมาณ 1,500 bp และส่วนของพลาสมิดที่เหลือ ขนาดประมาณ 12,000 bp (ภาพที่ 4.56) และเมื่อนำพลาสมิด pCAMBIA1302 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Hind* III พบว่า ได้ชิ้นส่วนของ DNA 1 ส่วน ขนาดประมาณ 10,500 bp (ภาพที่ 4.57) จากนั้นตัดชิ้นส่วน agarose gel ที่มีชิ้นส่วน DNA ของยีน *CHS* และ CaMV 35s promoter และ NOS terminator ขนาดประมาณ 1,500 bp และส่วนของพลาสมิด pCAMBIA1302 ขนาดประมาณ 10,500 bp นำมาแยก DNA ออกจาก agarose gel และทำให้บริสุทธิ์ นำมาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ T4 ligase ได้พลาสมิดลูกผสมใหม่ที่มีบางส่วนของยีน *CHS* แบบ antisense ที่ถูกควบคุมด้วย CaMV 35s promoter และ NOS terminator บนพลาสมิด pCAMBIA1302 คือ พลาสมิด pCAMBIA1302CHSA ขนาดประมาณ 11,700 bp จากนั้นชักนำพลาสมิดลูกผสมให้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด ด้วยวิธี heat-shock จากนั้นสุ่มเลือกโคลนของแบคทีเรียมาตรวจสอบหาบางส่วนของยีน *CHS* ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pCAM BIA1302CHSA ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่า เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac* I และ *Bam* HI โคลนที่พลาสมิดมีชิ้นส่วนของยีน *CHS* ได้ชิ้นส่วนของยีน 2 ส่วน ขนาดประมาณ 300 bp และขนาดประมาณ 11,400 bp (ภาพที่ 4.58) และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Hind* III โคลนที่พลาสมิดมีชิ้นส่วนของยีน *CHS* แบบ antisense ที่ถูกควบคุมด้วย CaMV 35s promoter และ NOS terminator ได้ชิ้นส่วนของยีน 2 ส่วน ขนาดประมาณ 1,500 bp และขนาดประมาณ 10,200 bp (ภาพที่ 4.59) และเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CAMV_forward primer และ NOS_reverse primer จะต้องได้ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่แทรกระหว่าง CaMV 35s promoter และ NOS terminator ขนาดประมาณ 500 bp และผลผลิตของยีน *GFP* ขนาดประมาณ 900 bp (ภาพที่ 4.60) เลือกโคลนที่ได้ผลดังกล่าวนำมาใช้ในการถ่ายยีนต่อไป



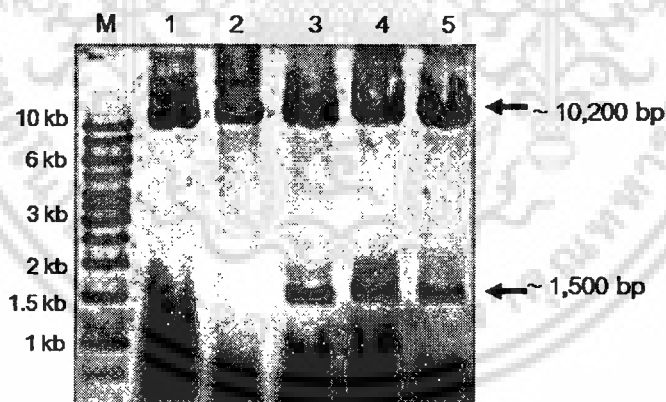
ภาพที่ 4.56 พลาสมิดลูกผสม pBICHSA (ขนาดประมาณ 13,500 bp) ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RI และ *Hind* III ได้ชิ้นส่วน DNA ที่มีส่วนของ DNA ของยีน *CHS* แบบ antisense แทรกระหว่าง CaMV 35s promoter และ NOS terminator ขนาดประมาณ 1,500 bp และส่วนที่เหลือของพลาสมิด ขนาดประมาณ 12,000 bp (M = 1kb DNA marker)



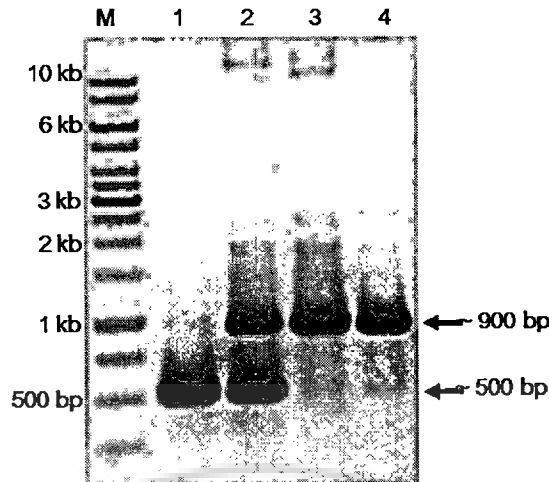
ภาพที่ 4.57 พลาสมิด pCAMBIA1302 (ขนาดประมาณ 10,500 bp) ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RI และ *Hind* III ได้ชิ้นส่วนของ DNA 1 ส่วน ขนาดประมาณ 10,500 bp (M = 1kb DNA marker)



ภาพที่ 4.58 การตรวจสอบหาบางส่วนของยีน *CHS* ในพลาสมิด pCAMBIA 1302CHSA ตัดด้วยเอนไซม์ *Sac* I และ *Bam* HI; 1) คือ พลาสมิดที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, 2) และ 3) คือโคลนที่มีส่วนของยีน *CHS* แทรกอยู่ในพลาสมิด pCAMBIA 1302CHSA ได้ชิ้นส่วนของ DNA ขนาดประมาณ 300 bp และส่วนที่เหลือของพลาสมิดขนาดประมาณ 11,400 bp (M = 1kb DNA marker)



ภาพที่ 4.59 การตรวจสอบหาบางส่วนของยีน *CHS* ในพลาสมิด pCAMBIA 1302CHSA ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RI และ *Hind* III; 1) คือ พลาสมิดที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, 2) คือโคลนที่ไม่มีส่วนของยีนแทรกอยู่ และ (3), 4) และ 5) คือโคลนที่มีส่วนของยีน *CHS* แทรกอยู่ ได้ชิ้นส่วนของ DNA ขนาดประมาณ 1,500 bp และส่วนที่เหลือของพลาสมิด ขนาดประมาณ 10,200 bp (M = 1kb DNA marker)

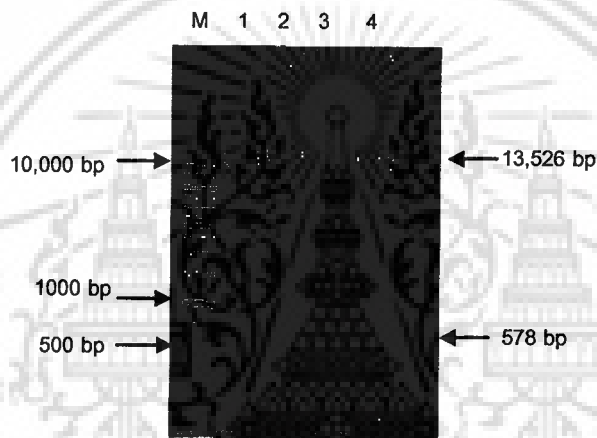


ภาพที่ 4.60 การตรวจสอบหาบางส่วนของยีน *CHS* ในพลาสมิด pCAMBIA 1302CHSA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CAMV_forward primer และ NOS_reverse primer; 1) คือ ผลผลิต PCR ของพลาสมิด pBICHS ที่มีบางส่วนของยีน *CHS* ขนาดประมาณ 500 bp, 2) คือโคลนที่มีส่วนของยีน *CHS* และยีน *GFP* ได้ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ขนาดประมาณ 500 bp และผลผลิตของยีน *GFP* ขนาดประมาณ 900 bp และ 3) และ 4) คือโคลนที่ไม่มีส่วนของยีน *CHS* แทรกอยู่ มีเฉพาะผลผลิตของยีน *GFP* ขนาดประมาณ 900 bp (M = 1kb DNA marker)

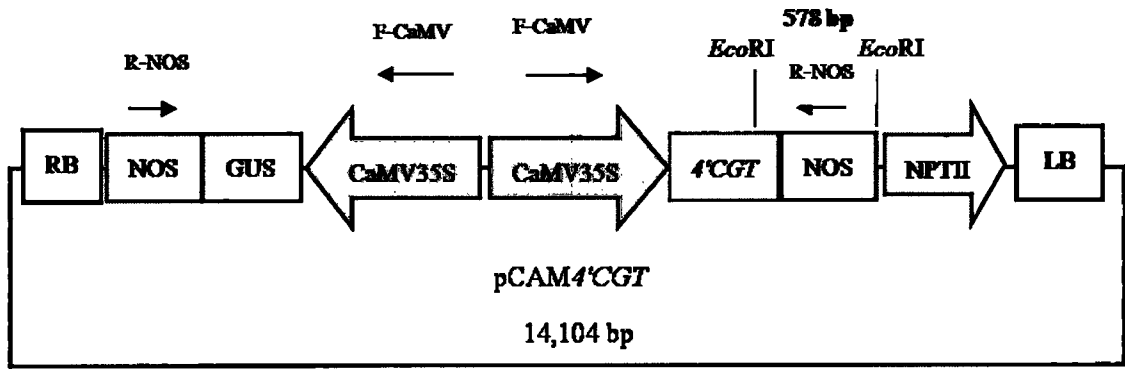
4.4.3 การสร้างและตรวจสอบดีเอ็นเอสายผสม pCAM4'CGT จากดอกลินมังกร

สังเคราะห์ยีน 4'CGT จากนั้นตัดยีน 4'CGT ภายในพลาสมิด pTZ4'CGT ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Sac* I เพื่อนำไปเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pCAMBIA2301CHS ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Sac* I เพื่อแยกชิ้นยีน *CHS* ขนาด 322 bp ออกจากพลาสมิด จากนั้นถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat-shock เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอสายผสม pCAM4'CGT ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณภายในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α มาสกัดพลาสมิดเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI พบแถบดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาดประมาณ 578 bp โดยตัดในยีน 4'CGT และบริเวณเทอร์มิเนเตอร์ และ 13,526 bp ในขณะที่การตัด pCAMBIA2301CHS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI ได้แถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวมีขนาดประมาณ 13,050 bp (ภาพที่ 4.61) ผลการตรวจสอบแสดงว่าชิ้นส่วนของยีน *CHS* ได้ถูกตัดออกจากพลาสมิด pCAMBIA2301 และมียีน 4'CGT เชื่อมต่อกับพลาสมิด pCAMBIA2301 (ภาพที่ 4.62) แทนที่ยีน *CHS* จึงนำพลาสมิดที่ผ่านการตรวจสอบถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์อะโกราแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ในลำดับต่อไป

นำดีเอ็นเอสายผสม pCAM4'CGT เข้าสู่เซลล์อะโกรแบคทีเรียด้วยวิธี electroporation นำโคโลนีเดี่ยวที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหาร YM ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มาตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-CaMV และ R-NOS ที่ออกแบบจากตำแหน่งของโปรโมเตอร์ CaMV 35S และเทอร์มินเตอร์ NOS สำหรับขับเคลื่อนยีน 4'CGT และยีน GUS ภายหลังการตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ มีขนาดประมาณ 2,200 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นขนาดของยีน GUS และขนาดประมาณ 1,600 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นขนาดของยีน 4'CGT ที่มีส่วนของตำแหน่งโปรโมเตอร์ CaMV 35S และเทอร์มินเตอร์ NOS เพิ่มเข้ามาอีก 134 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 4.63)



ภาพที่ 4.61 ผลการตรวจสอบยีน 4'CGT ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pCAM4'CGT ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI (4) เปรียบเทียบกับพลาสมิด pCAM4'CGT ที่ไม่ได้ตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ (3) พลาสมิด pCAMBIA2301*CHS* ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (1) พลาสมิด pCAM*CHS* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI (2) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (M)



ภาพที่ 4.62 แผนภาพพลาสมิด pCAM4'CGT ที่มีชิ้นส่วนของยีน 4'CGT (pCAM4'CGT) ขนาด 1,374 นิวคลีโอไทด์แทรกอยู่



ภาพที่ 4.63 ผลการตรวจสอบโคลนนิ่งที่ 1 (1) และโคลนนิ่งที่ 2 (2) ของเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่เตรียมด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-CaMV และ R-NOS เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (M)

4.5 การถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง

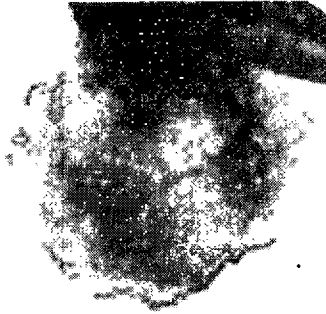
4.5.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืชสำหรับการถ่ายยีน

4.5.1.1 ศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้นและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ ตามวิธีการทดลองนาน 12 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญเติบโตดังนี้ พบคะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนก้านใบที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสสูงที่สุดทุกสัปดาห์ของการทดลอง โดยในสัปดาห์ที่ 4 แคลลัสมีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด 2.43 คะแนน ในอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ ในสัปดาห์ที่ 8 แคลลัสมีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็น 2.50 คะแนน และพบว่าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 12 คะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยแคลลัสจะเกิดขึ้นที่บริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนมีลักษณะเป็นเม็ดละเอียดเกาะกันแน่นแยกกันได้ง่าย สีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.64)

เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

ทุกสัปดาห์เปอร์เซ็นต์การเกิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.6) และชิ้นส่วนก้านใบที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากันโดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 90 เปอร์เซ็นต์ จากการสังเกตพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมีค่าคงที่ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 ถึงสัปดาห์ที่ 12 ชิ้นส่วนก้านใบที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (control) และอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม dicamba ความเข้มข้น 11.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ picloram ความเข้มข้น 4.14 ไมโครโมลาร์ ไม่เกิดแคลลัส



ภาพที่ 4.64 ลักษณะแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ (5.00X) เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ขนาดแคลลัส

ค่าเฉลี่ยของขนาดแคลลัสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.6) โดยในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า การใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ มีขนาดแคลลัสมากที่สุดเฉลี่ย 1.15 เซนติเมตร ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 และ 12 พบว่า การใช้ NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ทำให้แคลลัสมีขนาดมากที่สุดเฉลี่ย 1.20 และ 1.27 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ มีขนาดแคลลัสรองลงมาเฉลี่ย 1.17 เซนติเมตร และการใช้ dicamba ความเข้มข้น 11.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ picloram ความเข้มข้น 4.14 ไมโครโมลาร์ มีขนาดแคลลัสน้อยที่สุดเฉลี่ย 1.00 เซนติเมตร

ตารางที่ 4.6 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ

| ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (ไมโครโมลาร์) | | | คะแนนการเจริญเติบโต±S.E. ¹ | | | เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส±S.E. ¹ | | | ขนาดแคลลัส (เซนติเมตร)±S.E. ¹ | | |
|--|---------------|----------|---------------------------------------|-------------|--------------|--|---------------|---------------|--|--------------|--------------|
| | | | อายุ (สัปดาห์) | | | อายุ (สัปดาห์) | | | อายุ (สัปดาห์) | | |
| | | | 4 | 8 | 12 | 4 | 8 | 12 | 4 | 8 | 12 |
| Control | | | 1.00±0.00 d | 1.00±0.00 c | 1.00±0.00 b | 0.00±0.00 d | 0.00±0.00 d | 0.00±0.00 d | 1.00±0.00 c | 1.00±0.00 d | 1.00±0.00 d |
| NAA 40 | TDZ 0.5 | | 2.17±0.12 ab | 2.13±0.28 b | 1.13±0.11 a | 90.00±6.72 a | 90.00±6.72 a | 90.00±6.72 a | 1.12±0.03 ab | 1.20±0.03 a | 1.27±0.04 a |
| 2,4-D 4.52 | TDZ 0.45 | | 2.43±0.18 a | 2.50±0.15 a | 1.10±0.11 ab | 90.00±6.72 a | 90.00±6.72 a | 90.00±6.72 a | 1.15±0.02 a | 1.17±0.02 a | 1.17±0.04 b |
| 2,4-D 10 | BA 0.5 | | 1.03±0.03 d | 1.00±0.00 c | 1.00±0.00 b | 3.33±3.27 d | 3.33±3.27 d | 3.33±3.27 d | 1.01±0.01 c | 1.01±0.01 d | 1.01±0.01 d |
| 2,4-D 9 | BA 0.8 | | 1.50±0.27 c | 1.03±0.03 c | 1.00±0.00 b | 30.00±9.83 c | 30.00±9.83 c | 30.00±9.83 c | 1.03±0.01 c | 1.03±0.01 d | 1.03±0.01 cd |
| 2,4-D 18.1 | BA 2.22 | | 1.77±0.18 bc | 1.03±0.14 c | 1.00±0.00 b | 53.33±8.29 b | 53.33±8.29 b | 53.33±8.29 b | 1.08±0.01 b | 1.08±0.01 bc | 1.08±0.01 c |
| picloram 10 | kinetin 1 | | 1.10±0.11 d | 1.00±0.00 c | 1.00±0.00 b | 6.67±4.14 d | 6.67±4.14 d | 6.67±4.14 d | 1.01±0.01 c | 1.01±0.01 d | 1.01±0.01 d |
| picloram 4.14 | kinetin 4.64 | | 1.77±0.15 bc | 1.00±0.00 c | 1.00±0.00 b | 46.67±7.89 bc | 46.67±7.89 bc | 46.67±7.89 bc | 1.09±0.02 b | 1.09±0.06 b | 1.09±0.02 c |
| dicamba 11.27 | picloram 4.14 | | 1.00±0.00 d | 1.00±0.00 c | 1.00±0.00 b | 0.00±0.00 d | 0.00±0.00 d | 0.00±0.00 d | 1.00±0.00 c | 1.00±0.00 d | 1.00±0.00 d |
| triacotanol 11.38 | BA 1.1 | IAA 2.85 | 1.53±0.20 c | 1.00±0.00 c | 1.00±0.00 b | 26.67±9.27 c | 26.67±9.27 c | 26.67±9.27 c | 1.03±0.01 c | 1.04±0.02 cd | 1.03±0.01 cd |
| F-test | | | ** | ** | * | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| CV (%) | | | 21.7472 | 19.3515 | 7.3416 | 48.1159 | 48.1159 | 48.1159 | 3.6429 | 3.6122 | 4.8084 |

*มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

¹ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแต่ละต้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4.5.1.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนตาดอกจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

โดยแบ่งออกเป็น 3 การทดลองดังนี้

4.5.1.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนตาดอกจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำชิ้นส่วนตาดอกจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร มาชักนำการเกิดแคลลัสอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ และเพาะเลี้ยงภายใต้แสง เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 8 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญเติบโตของแคลลัสดังนี้

คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน

ชิ้นส่วนเกิดเป็นแคลลัสก่อนแล้วจึงเริ่มพัฒนาเป็นเอมบริโอจินิกแคลลัสในสัปดาห์ที่ 2 โดยแคลลัสจะเกิดขึ้นที่บริเวณฐานของชิ้นส่วนมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน สีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.65) เอมบริโอจินิกแคลลัสมีการเจริญเติบโตดีที่สุดในอาหารสูตรที่มี NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ โดยมีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติในทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.7) โดยในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 มีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด 2.33 และ 2.43 คะแนน ตามลำดับ ส่วนอาหารสูตรที่มี picloram 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 1 ไมโครโมลาร์ อาหารสูตรที่มี picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 4.64 ไมโครโมลาร์ อาหารสูตรที่มี dicamba 11.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ และอาหารสูตรที่มี triacontanol 11.38 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.85 ไมโครโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตเท่ากันคือ 1 คะแนน

เปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริโอจินิกแคลลัส

แคลลัสเริ่มเกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง และเปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริโอจินิกแคลลัสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.7) โดยสามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอจินิกแคลลัสได้ในอาหารสูตรที่มี NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริโอจินิกแคลลัสสูงที่สุด 36.67 และ 43.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนอาหารสูตรที่มี picloram 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 1 ไมโครโมลาร์ อาหารสูตรที่มี picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 4.64 ไมโครโมลาร์ อาหารสูตรที่มี dicamba 11.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ และอาหารสูตรที่มี triacontanol 11.38 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA

1.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.85 ไมโครโมลาร์ พบว่าไม่เกิดเอมบริโอจินิกแคลลัส แต่มีการเจริญเติบโตขึ้นเป็นยอดสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.66)



ภาพที่ 4.65 ลักษณะเอมบริโอจินิกแคลลัส ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ (2.85X) เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ภาพที่ 4.66 แสดงลักษณะยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 4.64 ไมโครโมลาร์ (3.29X) เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ตารางที่ 4.7 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน เปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริโอจินิกแคลลัส จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนราก และความยาวราก จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

| ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (ไมโครโมลาร์) | คะแนนการเจริญเติบโต±S.E. ¹ | เปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริโอจินิกแคลลัส±S.E. ¹ | จำนวนยอด±S.E. ¹ | ความยาวยอด (เซนติเมตร)±±S.E. ¹ | จำนวนราก±S.E. ¹ | ความยาวราก (เซนติเมตร)±±S.E. ¹ | | |
|---|---------------------------------------|---|----------------------------|---|----------------------------|---|-------------|-------------|
| NAA 40 | TDZ 0.5 | 2.33±0.06 a | 36.67±0.06 a | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 c | 0.00±0.00 b | | |
| picloram 10 | kinetin 1 | 1.00±0.00 b | 0.00±0.00 b | 1.00±0.00 | 1.40±0.03 b | 0.00±0.00 b | | |
| picloram 4.14 | kinetin 4.64 | 1.00±0.00 b | 0.00±0.00 b | 1.00±0.00 | 1.36±0.02 b | 0.00±0.00 b | | |
| dicamba 11.27 | picloram 4.14 | 1.00±0.00 b | 0.00±0.00 b | 1.00±0.00 | 1.35±0.02 b | 0.00±0.00 b | | |
| triacontanol 11.38 | BA 1.1 | IAA 2.85 | 1.00±0.00 b | 0.00±0.00 b | 1.00±0.00 | 1.83±0.15 a | 0.33±0.04 a | 0.04±0.01 a |
| F-test | ** | ** | ns | ** | ** | ** | | |
| CV (%) | 3.6464 | 51.0672 | 0.0002 | 13.7079 | 4.4965 | 0.6117 | | |

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

¹ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จำนวนยอด

ในสัปดาห์ที่ 4 จำนวนยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.7) โดยในสัปดาห์ที่ 4 มีจำนวนยอดในอาหารสูตรที่มี NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ อาหารสูตรที่มี picloram 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 1 ไมโครโมลาร์ อาหารสูตรที่มี picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 4.64 ไมโครโมลาร์ อาหารสูตรที่มี dicamba 11.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ และอาหารสูตรที่มี triacontanol 11.38 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.85 ไมโครโมลาร์ เท่ากันคือ 1 ยอด และในสัปดาห์ที่ 8 มีค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดที่เกิดขึ้นสูงสุด 2.43 ยอด ในอาหารสูตรที่มี triacontanol 11.38 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.85 ไมโครโมลาร์

ความยาวยอด

ความยาวยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.8) โดยในทุกสัปดาห์ของการทดลองพบว่าการใช้ triacontanol 11.38 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.85 ไมโครโมลาร์ ทำให้ขึ้นส่วนมีความยาวยอดเพิ่มขึ้นมากที่สุด ในสัปดาห์ที่ 4 มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดสูงสุด 1.83 เซนติเมตร และการใช้ picloram 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 1 ไมโครโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดรองลงมา 1.40 เซนติเมตร ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดสูงสุด 2.92 เซนติเมตร และการใช้ dicamba 11.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดรองลงมา 1.57 เซนติเมตร

จำนวนราก

จำนวนรากมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.9) โดยในทุกสัปดาห์ของการทดลองพบว่าการใช้ triacontanol 11.38 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.85 ไมโครโมลาร์ ทำให้ขึ้นส่วนมีรากเกิดขึ้น โดยเริ่มเกิดรากขึ้นในสัปดาห์ที่ 3 ของการทดลอง ในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 มีค่าเฉลี่ยจำนวนรากสูงสุด 0.33 และ 3.70 ราก ตามลำดับ ส่วนในอาหารสูตรที่มี NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ picloram 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 1 ไมโครโมลาร์ อาหารสูตรที่มี picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 4.64 ไมโครโมลาร์ และอาหารสูตรที่มี dicamba 11.27 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ พบว่าไม่มีรากเกิดขึ้น

ความยาวราก

จากการนำขึ้นส่วนตาดอกจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าความยาวรากมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.10) โดยในทุกสัปดาห์ของการทดลองพบว่าการใช้ triaccontanol 11.38 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.85 ไมโครโมลาร์ ทำให้ขึ้นส่วนมีความยาวรากเพิ่มขึ้น และในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 มีค่าเฉลี่ยความยาวรากสูงที่สุด 0.04 และ 0.20 เซนติเมตร ตามลำดับ

4.5.1.2.2 ศึกษาผลของ 2,4-D และ picloram ต่อการเกิดแคลลัสจากขึ้นส่วนตาดอกจากคัพภะ ที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำขึ้นส่วนตาดอกจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 13.5, 27.1, 40.7, 54.2 และ 67.8 ไมโครโมลาร์ และ picloram ที่ระดับความเข้มข้น 12.4, 24.8, 37.2, 49.6 และ 62.1 ไมโครโมลาร์ และเพาะเลี้ยงภายใต้แสง เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันนาน 8 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญเติบโตดังนี้

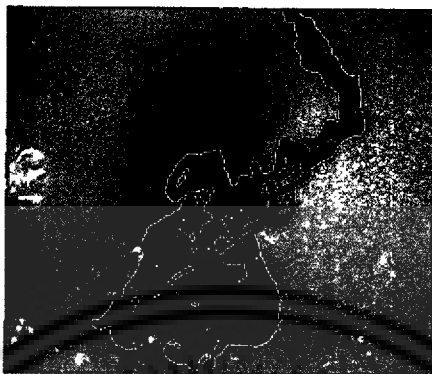
ขนาดแคลลัส

ค่าเฉลี่ยของขนาดแคลลัส มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.8) โดยทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่า การใช้ picloram ความเข้มข้น 12.4 ไมโครโมลาร์ มีขนาดแคลลัสมากที่สุดเฉลี่ย 0.78 และ 0.84 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการใช้ picloram ความเข้มข้น 24.8 ไมโครโมลาร์ มีขนาดแคลลัสรองลงมาเฉลี่ย 0.7 และ 0.72 เซนติเมตร ตามลำดับ และการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 67.8 ไมโครโมลาร์ มีขนาดแคลลัสน้อยที่สุดเฉลี่ย 0.31 และ 0.36 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยแคลลัสจะเริ่มเกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 ที่บริเวณรอยตัดที่ส่วนฐานของขึ้นส่วนมีลักษณะเป็นเม็ดเกาะกันแน่นจากนั้นจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเหลืองแต่ส่วนยอดที่เป็นสีเขียวในสัปดาห์ที่ 8 (ภาพที่ 4.67)

จำนวนยอด

พบว่าทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 จำนวนยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.4) โดยทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 มีจำนวนยอดในอาหารสูตรที่มี 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 13.5, 27.1, 40.7, 54.2 และ 67.8 ไมโครโมลาร์ และ picloram ที่ระดับความเข้มข้น 12.4, 24.8, 37.2, 49.6 และ 62.1 ไมโครโมลาร์ เท่ากันคือ 1 ยอด ซึ่งมีความคงที่ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนยอด และมี

ค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดที่เกิดขึ้นสูงสุด 1.6 ยอด ในอาหารอาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต



ภาพที่ 4.67 ลักษณะยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม picloram 12.4 ไมโครโมลาร์ (2.56X) เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ความยาวยอด

ความยาวยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.8) โดยในทุกสัปดาห์ของการทดลองพบว่าการใช้ picloram ความเข้มข้น 37.2 ไมโครโมลาร์ ทำให้ชิ้นส่วนมีความยาวยอดเพิ่มขึ้นมากที่สุด ในสัปดาห์ที่ 4 มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดสูงสุด 1.40 เซนติเมตร และการใช้ picloram ความเข้มข้น 24.8 ไมโครโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดรองลงมา 1.37 เซนติเมตร ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดสูงสุด 1.51 เซนติเมตร และอาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดรองลงมา 1.44 เซนติเมตร

ตารางที่ 4.8 ขนาดของแคลลัส จำนวนยอด และความยาวยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ ในสัปดาห์ที่ 8

| ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (ไมโครโมลาร์) | ขนาดแคลลัส (เซนติเมตร)±S.E. ¹ | จำนวนยอด±S.E. ¹ | ความยาวยอด (เซนติเมตร)±S.E. ¹ |
|---|--|----------------------------|--|
| Control | 0.63±0.02cd | 1.60±0.18a | 1.44±0.07ab |
| 2,4-D | 13.5 | 0.62±0.03d | 1.00±0.00b |
| | 27.1 | 0.52±0.03e | 1.00±0.00b |
| | 40.7 | 0.44±0.01f | 1.00±0.00b |
| | 54.2 | 0.44±0.04f | 1.00±0.00b |
| | 67.8 | 0.36±0.03g | 1.00±0.00b |
| | picloram | 12.4 | 0.84±0.01a |
| | 24.8 | 0.72±0.02b | 1.00±0.00b |
| | 37.2 | 0.62±0.02d | 1.00±0.00b |
| | 49.6 | 0.70±0.02bc | 1.00±0.00b |
| | 62.1 | 0.66±0.03bcd | 1.00±0.00b |
| F-test | ** | ** | ** |
| CV (%) | 9.3076 | 11.6315 | 11.4235 |

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4.5.1.2.3 ศึกษาผลของ 2,4-D และ picloram ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 13.5, 27.1, 40.7, 54.2 และ 67.8 ไมโครโมลาร์ และ picloram ที่ระดับความเข้มข้น 12.4,

24.8, 37.2, 49.6 และ 62.1 ไมโครโมลาร์ และเพาะเลี้ยงภายใต้แสง เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันนาน 8 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญเติบโตดังนี้

คะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัส

ชิ้นส่วนเริ่มเกิดแคลลัสขึ้นที่บริเวณฐานของชิ้นส่วนในในสัปดาห์ที่ 2 และเพิ่มมากขึ้นจนทั่วทั้งชิ้นส่วนจนมีลักษณะเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ สีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.68) แคลลัสมีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดในอาหารสูตรที่มี picloram ความเข้มข้น 24.8 ไมโครโมลาร์ โดยมีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติในทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.9) โดยทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 มีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุดเท่ากันคือ 3.66 คะแนน ส่วนอาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต มีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตต่ำที่สุด 1.43 คะแนน โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นจะเป็นสีเขียวจนถึงสัปดาห์ที่ 6 จากนั้นจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย

ขนาดแคลลัส

ค่าเฉลี่ยของขนาดแคลลัส มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.9) จากการสังเกต พบว่าขนาดแคลลัสมีความคงที่ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขนาดขึ้นอีก โดยทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่า การใช้ picloram ความเข้มข้น 24.8 ไมโครโมลาร์ มีขนาดแคลลัสมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.52 เซนติเมตร ส่วนการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 40.7 ไมโครโมลาร์ มีขนาดแคลลัสรองลงมาเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.33 เซนติเมตร และอาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต มีขนาดแคลลัสน้อยที่สุดเฉลี่ยเท่ากันคือ 0.09 เซนติเมตร



ภาพที่ 4.68 ลักษณะแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม picloram 24.8 ไมโครโมลาร์ (3.9X) เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ตารางที่ 4.9 คะแนนการเจริญเติบโตและขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร บนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ

| ความเข้มข้นของสารควบคุม การเจริญเติบโต (ไมโครโมลาร์) | | คะแนนการเจริญเติบโต±S.E. ¹ | | ขนาดแคลลัส (เซนติเมตร)±S.E. ¹ | | |
|--|----------|---------------------------------------|--------------|--|--------------|--------------|
| | | อายุ (สัปดาห์) | | อายุ (สัปดาห์) | | |
| | | 4 | 8 | 4 | 8 | |
| Control | | 1.43±0.40g | 1.43±0.40g | 0.09±0.01f | 0.09±0.01f | |
| 2,4-D | 13.5 | 2.44±0.21de | 2.44±0.21de | 0.22±0.06de | 0.22±0.06de | |
| | 27.1 | 2.29±0.29e | 2.29±0.29e | 0.26±0.02b-d | 0.26±0.02b-d | |
| | 40.7 | 2.49±0.36cde | 2.49±0.36cde | 0.33±0.07b | 0.33±0.07b | |
| | 54.2 | 2.65±0.21bcd | 2.65±0.21bcd | 0.31±0.01bc | 0.31±0.01bc | |
| | 67.8 | 2.76±0.20bc | 2.76±0.20bc | 0.29±0.01bcd | 0.29±0.01bcd | |
| | picloram | 12.4 | 2.80±0.21bc | 2.80±0.21bc | 0.23±0.01cd | 0.23±0.01cd |
| | | 24.8 | 3.66±0.21a | 3.66±0.21a | 0.52±0.05a | 0.52±0.05a |
| | | 37.2 | 2.96±0.07b | 2.96±0.07b | 0.25±0.03b-e | 0.25±0.03b-e |
| | | 49.6 | 2.31±0.35e | 2.31±0.35e | 0.17±0.02ef | 0.17±0.02ef |
| | 62.1 | 1.75±0.23f | 1.75±0.23f | 0.22±0.01de | 0.22±0.01de | |
| F-test | | ** | ** | ** | ** | |
| CV (%) | | 5.3815 | 5.3815 | 14.3034 | 14.3034 | |

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

¹ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4.5.1.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดจากชิ้นส่วนแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

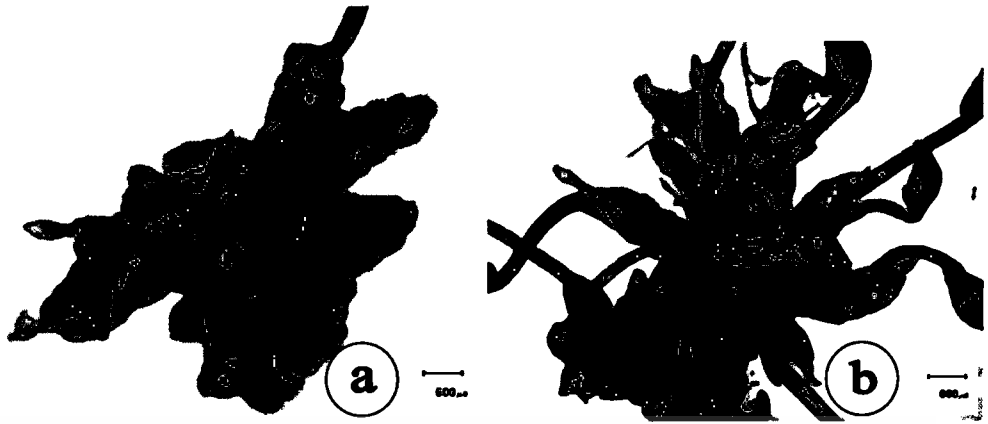
นำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก มาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ภักดิ์ ภักดีงาม, 2548) ที่ได้จากการทดลองที่ 1.2.1 แล้วนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 40, 50 และ 60 ไมโครโมลาร์ และเพาะเลี้ยงภายใต้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันนาน 8 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญเติบโตดังนี้

ขนาดเอมบริโอจินิกแคลลัส

เริ่มเกิดเอมบริโอจินิกแคลลัสขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง แล้วจึงเริ่มพัฒนาเป็นยอด พบว่าค่าเฉลี่ยของขนาดเอมบริโอจินิกแคลลัสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสัปดาห์ที่ 4 (ตารางที่ 4.6) โดยพบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีขนาดเอมบริโอจินิกแคลลัสมากที่สุดเฉลี่ย 1.19 เซนติเมตร ส่วนการใช้ BA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ มีขนาดเอมบริโอจินิกแคลลัสรองลงมาเฉลี่ย 0.81 เซนติเมตร ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าค่าเฉลี่ยของขนาดเอมบริโอจินิกแคลลัสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยพบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีขนาดเอมบริโอจินิกแคลลัสมากที่สุดเฉลี่ย 1.32 เซนติเมตร ส่วนการใช้ BA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ มีขนาดเอมบริโอจินิกแคลลัสรองลงมาเฉลี่ย 1.19 เซนติเมตร

จำนวนยอด

จำนวนยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสัปดาห์ที่ 4 (ตารางที่ 4.6) โดยพบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ย 4.33 ยอด ส่วนการใช้ BA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ย 4 ยอด ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าจำนวนยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยพบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ย 8.67 ยอด ส่วนการใช้ BA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ย 5.07 ยอด โดยเริ่มเกิดยอดขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง ซึ่งยอดที่เกิดขึ้นจะเริ่มมีลักษณะเป็นกลุ่มยอดเล็กๆ จำนวนมากสีเขียวอ่อน และมีการพัฒนาเป็นยอดสีเขียวที่มีใบเกิดขึ้น (ภาพที่ 4.69)



ภาพที่ 4.69 ลักษณะยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเอมบริโอจินิกแคลลัส บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA 50 ไมโครโมลาร์ a คือลักษณะกลุ่มยอดเล็กๆ สีเขียวอ่อนที่เกิดขึ้น (3.33X) b คือยอดสีเขียวที่มีใบเกิดขึ้น (2.78X) เมื่อเพาะเลี้ยงไปเป็นเวลา 8 และ 12 สัปดาห์ ตามลำดับ

ความยาวยอด

ค่าเฉลี่ยของความยาวยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.10) โดยทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าการใช้ อาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต มีความยาวยอดมากที่สุดเฉลี่ย 0.96 และ 1.02 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการใช้ BA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ มีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ย 0.58 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 4 ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ย 0.78 เซนติเมตร

จำนวนใบ

ค่าเฉลี่ยของจำนวนใบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.10) โดยในสัปดาห์ที่ 4 พบว่าการใช้อาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต มีจำนวนใบมากที่สุดเฉลี่ย 3.67 ใบ ส่วนการใช้ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนใบรองลงมาเฉลี่ย 3.22 ใบ ในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนใบมากที่สุดเฉลี่ย 4.84 ใบ ส่วนการใช้อาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตมีจำนวนใบรองลงมาเฉลี่ย 3.22 ใบ

ความยาวใบ

ค่าเฉลี่ยของความยาวใบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.10) โดยทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าการใช้อาหารสูตร MS (1962) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต มีความยาวใบมากที่สุดเฉลี่ย 1.49 และ 2.08 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการใช้ BA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ มีความยาวใบรองลงมาเฉลี่ย 0.57 เซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 4 ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าการใช้ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีความยาวใบรองลงมาเฉลี่ย 0.84 เซนติเมตร

ตารางที่ 4.10 ขนาดเอมบริโอจินิกแคลลัส จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนใบ และความยาวใบ จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ

| ความเข้มข้นของ BA (ไมโครโมลาร์) | ขนาดเอมบริโอจินิก แคลลัส (เซนติเมตร)±S.E. ¹ | จำนวนยอด ±S.E. ¹ | ความยาวยอด (เซนติเมตร)± S.E. ¹ | จำนวนใบ ±S.E. | ความยาวใบ (เซนติเมตร)±S.E. ¹ |
|------------------------------------|--|--------------------------------|---|------------------|--|
| 0 | 0.64±0.09b | 1.40±0.16c | 1.02±0.09a | 3.22±0.12 | 2.08±0.03a |
| 40 | 1.19±0.11a | 5.07±0.57b | 0.77±0.07b | 2.55±1.12 | 0.69±0.28b |
| 50 | 1.32±0.10a | 8.67±0.77a | 0.78±0.03b | 4.84±0.68 | 0.84±0.08b |
| 60 | 0.82±0.06b | 3.78±0.70b | 0.63±0.02b | 2.33±0.41 | 0.57±0.06b |
| F-test | ** | ** | * | ns | ** |
| CV (%) | 17.4148 | 22.6594 | 12.5675 | 34.7109 | 35.4563 |

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

¹ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแต่ละสัปดาห์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4.5.2 ผลการถ่ายพลาสมิดที่มียีนแบบต่างๆ เข้าสู่บัวหลวง

4.5.2.1 การถ่ายยีน Antisense Dihydroflavonol 4-Reductase (anti-DFR) ด้วยพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณชกริก โดยใช้ชิ้นส่วนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอจีนิค แคลลัสบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

การตรวจสอบต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธี Gus histochemical assay แบบ Transient expression

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน GUS แบบชั่วคราว (transient expression) เป็นการวัดประสิทธิภาพการถ่ายยีนเบื้องต้น ทำตามข้อ 3.4.6.1 ทำการตรวจสอบหลังจากการถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วัน โดยนับจำนวนจุดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ถูกยิงด้วยอนุภาคทองคำที่เคลือบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ pCAMBIA2301anti-DFR พบว่าสภาพการถ่ายยีนที่ทำให้จำนวนจุดสีน้ำเงินมากที่สุดในการถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนยอดคือ การใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมที่ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร โดยมีค่าการแสดงออกของยีน GUS แบบ transient expression เฉลี่ย 4.8 จุดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และมีเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนยอดที่เกิดจุดสีน้ำเงิน 35.71 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในสภาพอื่นๆ พบว่าไม่มีการติดสีน้ำเงินของชิ้นส่วน (ตารางที่ 4.11 และภาพที่ 4.70)

ตารางที่ 4.11 การแสดงออกของยีน GUS แบบ transient expression ของเนื้อเยื่อส่วนยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณชกริกที่ถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He

| แรงดันก๊าซฮีเลียม (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) | ระยะห่างของเนื้อเยื่อ (เซนติเมตร) | เปอร์เซ็นต์ของจำนวนชิ้นที่เกิดจุดสีน้ำเงิน | จำนวนจุดสีน้ำเงินเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน |
|---------------------------------------|-----------------------------------|--|------------------------------------|
| 1,100 | 6 | 37.1 | 4.8 |
| | 9 | 0 | 0 |
| 1,350 | 6 | 0 | 0 |
| | 9 | 0 | 0 |



ภาพที่ 4.70 การแสดงออกของยีน *GUS* บนชิ้นส่วนยอดของบัวหลวงบุณชริก ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วย เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He ตรวจสอบด้วยวิธี *GUS* histochemical assay ภายหลังจากการถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วัน

หลังจากการถ่ายยีนจึงย้ายชิ้นส่วนมาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นนำต้นที่รอดจากการเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ (Shou *et al.* 2008) โดยเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญเติบโตดังนี้

จำนวนยอด

จำนวนยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.12) ทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากับคือ 4.33 ยอด ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ยเท่ากับคือ 3.58 ยอด

เมื่อพิจารณาผลของระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าจำนวนยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากับคือ 4.58 ยอด ส่วนที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ยเท่ากับคือ 3.33 ยอด

เมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk ร่วมกับ ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าจำนวนยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากับคือ 4.83 ยอด ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ยเท่ากับคือ 4.33 ยอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ความยาวยอด

ความยาวยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4.12) ทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชั้นส่วนมีความยาวยอดมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากับคือ 0.53 เซนติเมตร ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชั้นส่วนมีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ยเท่ากับคือ 0.39 เซนติเมตร

เมื่อพิจารณาผลของระยะห่างของชุดยิงกับชั้นส่วนเป้าหมาย พบว่าความยาวยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชั้นส่วนมีความยาวยอดมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากับคือ 0.50 เซนติเมตร ส่วนที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชั้นส่วนมีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ยเท่ากับคือ 0.42 เซนติเมตร

และเมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk ร่วมกับ ระยะห่างของชุดยิงกับชั้นส่วนเป้าหมาย พบว่าความยาวยอด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร มีความยาวยอดมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากับคือ 0.54 เซนติเมตร ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 6 เซนติเมตร มีความยาวยอดรองลงมาเฉลี่ยเท่ากับคือ 0.52 เซนติเมตร

เปอร์เซ็นต์การตายของชั้นส่วนบนอาหารคัดเลือก

เปอร์เซ็นต์การตายของชั้นส่วนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ (ตารางที่ 4.12) ในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชั้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การตายมากที่สุดเฉลี่ย 30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ชั้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การตายรองลงมาเฉลี่ย 28.33 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาผลของระยะห่างของชุดยิงกับชั้นส่วนเป้าหมาย พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของชั้นส่วนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชั้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การตายมากที่สุดเฉลี่ย 30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชั้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การตายรองลงมาเฉลี่ย 28.33 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk ร่วมกับ ระยะห่างของชุดยิงกับชั้นส่วนเป้าหมาย พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของชั้นส่วนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยชั้นส่วนจะเริ่มหยุดการเจริญเติบโตหลังจากสัปดาห์ที่ 3 ของการทดลอง และเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 9 เซนติเมตร และการใช้ Rupture

disk ขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การตายมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากับคือ 33.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ Rupture disk ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับ ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การตายรองลงมาเฉลี่ย 26.67 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.12 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน จำนวนยอด ความยาวยอด และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วน จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 0.54 ไมโครโมลาร์ สัปดาห์ที่ 16

| Treatment | คะแนนการเจริญเติบโต±S.E. ¹ | จำนวนยอด±S.E. | ความยาวยอด (เซนติเมตร)±S.E. | เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต±S.E. |
|--|---------------------------------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Rupture disk 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) | - 1.65±0.07 | 6.48±0.65 | 0.64±0.26 | 56.67±23.14 |
| Rupture disk 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) | 1.25±0.05 | 5.43±0.22 | 0.44±0.18 | 45.00±18.37 |
| F-test | ns | ns | ns | ns |
| ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย | | | | |
| 6 เซนติเมตร (cm) | 1.17±0.05b | 5.17±0.11 | 0.49±0.20 | 38.33±15.65 |
| 9 เซนติเมตร (cm) | 1.73±0.07a | 6.75±0.11 | 0.59±0.24 | 63.33±25.85 |
| F-test | * | ns | ns | ns |
| Rupture disk 1,100 psi | | | | |
| ระยะห่าง 6 cm | 1.43±0.09 | 6.10±0.83 | 0.65±0.22 | 50.00±10.00 |
| ระยะห่าง 9 cm | 1.87±0.33 | 6.87±0.39 | 0.62±0.05 | 63.33±20.28 |
| Rupture disk 1,350 psi | | | | |
| ระยะห่าง 6 cm | 0.90±0.06 | 4.23±0.79 | 0.33±0.04 | 26.67±6.67 |
| ระยะห่าง 9 cm | 1.60±0.12 | 6.63±0.33 | 0.55±0.05 | 63.33±6.67 |
| F-test | ns | ns | ns | ns |
| CV (%) | 22.8444 | 21.0386 | 37.9292 | 42.364 |

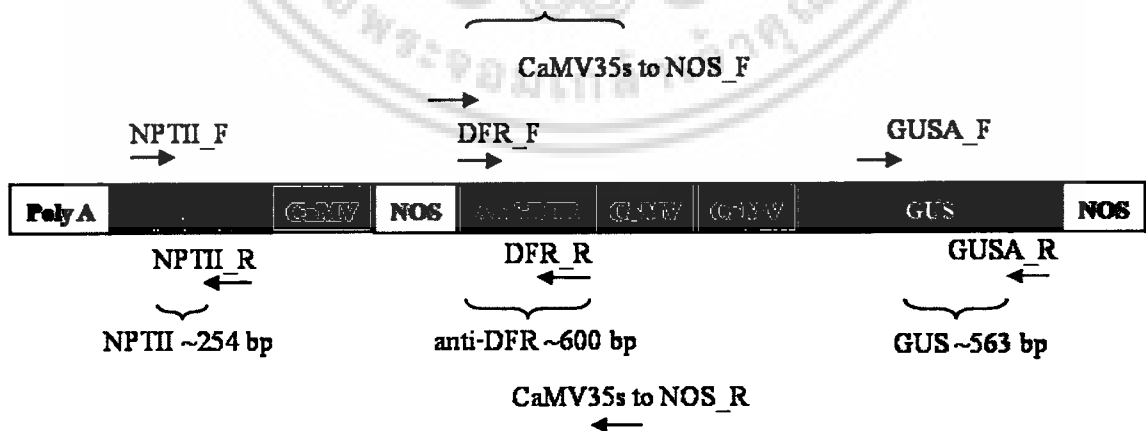
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

¹ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

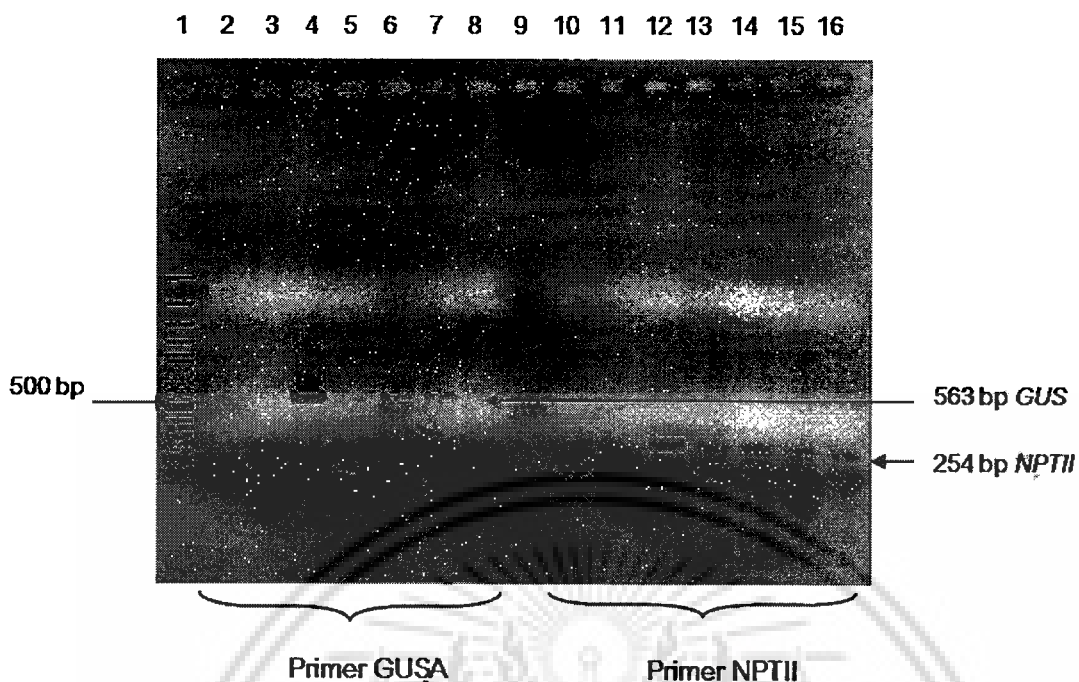
การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *NPTII* ยีน *GUS* และยีน *anti-DFR* หลังจากการถ่ายยีน ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

หลังจากการถ่ายยีน antisense Dihydroflavonol 4-Reductase (*anti-DFR*) โดยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He โดยมีพลาสมิดทดสอบคือ พลาสมิด pCAMBIA2301*anti-DFR* โดยผ่านการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ kanamycin แล้ว นำต้นบัวหลวงที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารคัดเลือก และต้นบัวหลวงปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *NPTII* ยีน *GUS* และยีน *anti-DFR* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาและอุณหภูมิของปฏิกิริยาตามรายละเอียดในข้อ 3.4.6.2.2 โดยมีตำแหน่งการจับของคู่ไพรเมอร์ของทั้ง 3 ยีน ดังแสดงในภาพที่ 4.71 จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis ในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ จากผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *NPTII* ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *NPTII* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 254 bp ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pCAMBIA2301*anti-DFR* จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *GUS* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 563 bp ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pCAMBIA2301*anti-DFR* (ภาพที่ 4.72)

จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *anti-DFR* ตั้งแต่บริเวณโปรโมเตอร์ *CaMV35S* และเทอร์มินเตอร์ *NOS* ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *anti-DFR* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 bp ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pCAMBIA2301*anti-DFR* (ภาพที่ 4.73)

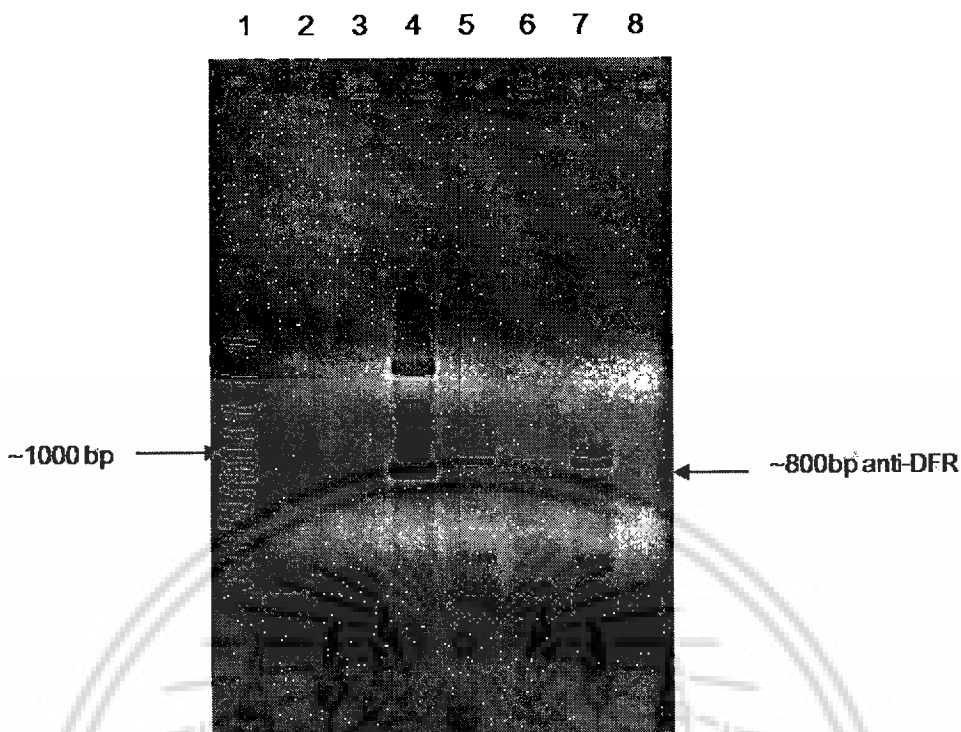


ภาพที่ 4.71 ตำแหน่งการเข้าจับของคู่ไพรเมอร์ต่างๆของยีน *NPTII* ยีน *GUS* และยีน *anti-DFR* ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์



ภาพที่ 4.72 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ *GUS* และไพรเมอร์ *NPTII*

- ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder
- ช่องที่ 2 Negative control dH₂O
- ช่องที่ 3 Negative control ดีเอ็นเอจากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน
- ช่องที่ 4 Positive control ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA2301DFR
- ช่องที่ 5-8 ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนโดยพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR
- ช่องที่ 10 Negative control dH₂O
- ช่องที่ 11 Negative control ดีเอ็นเอจากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน
- ช่องที่ 12 Positive control ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA2301DFR
- ช่องที่ 13-16 ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนโดยพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR



ภาพที่ 4.73 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ CaMV35S และ NOS

- ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder
- ช่องที่ 2 Negative control dH₂O
- ช่องที่ 3 Negative control ดีเอ็นเอจากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน
- ช่องที่ 4 Positive control ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR
- ช่องที่ 5-8 ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนโดยพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR

จากการตรวจสอบต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจากพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin นำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ จากชิ้นส่วนยอด มีจำนวนทั้งสิ้น 29 ต้น จากทั้งหมด 38 ต้น ที่ชักนำได้บนอาหารคัดเลือก (ตารางที่ 4.13) จากนั้นนำยอดที่เกิดขึ้นบนอาหารคัดเลือกมาทำการตรวจสอบ จำนวน 44 โคลน (1 โคลน มาจาก 1 ยอด) พบว่าต้นที่พบการมีอยู่ของยีน *GUS* มีจำนวน 32 โคลน จากทั้งหมด 26 ต้น (ตารางที่ 4.14) ส่วนต้นที่พบการมีอยู่ของยีน *NPTII* มีจำนวน 34 โคลน จากทั้งหมด 28 ต้น ส่วนต้นที่พบการมีอยู่ของยีน anti-DFR จำนวน 31 โคลน จากทั้งหมด 21 ต้น โดยในจำนวนนี้มี 3 โคลน ที่พบ 1 ยีน คือ ยีน *NPTII* จำนวน 2 โคลน และยีน anti-DFR จำนวน 1 โคลน และมีจำนวน 2 โคลนที่พบการมีอยู่ของยีน

2 ยีน คือยีน *GUS* และ *NPTII* ส่วนต้นที่พบการมีอยู่ของยีนทั้ง 3 ยีน คือยีน *GUS* ยีน *NPTII* และยีน anti-DFR มีจำนวน 30 โคลน จากทั้งหมด 24 ต้น และมีต้นที่ไม่พบทั้ง 3 ยีน จำนวน 10 โคลน

จากการตรวจสอบต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจากพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR เข้าสู่ชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร จากต้นที่สามารถเจริญเป็นยอดได้บนอาหารคัดเลือก จำนวน 6 ต้น ซึ่งมาจากวิธีการถ่ายยีนที่แตกต่างกันคือ การยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 และ 9 เซนติเมตร อย่างละ 2 ต้น และ การยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร จำนวน 2 ต้น เมื่อนำทั้ง 6 ต้นมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* และยีน anti-DFR ด้วยวิธีพีซีอาร์ พบทั้ง 3 ยีน ในทั้งหมด 6 ต้น (ตารางที่ 4.15)

ตารางที่ 4.13 จำนวนต้นบัวหลวงพันธุ์บูรพทริกที่ชักนำได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อยอด และตายอดจากคัพภะ โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He

| ความดันก๊าซฮีเลียม (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) | ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย (เซนติเมตร) | จำนวนต้นที่ชักนำได้บนอาหารคัดเลือก | |
|---|--|------------------------------------|---------------|
| | | ยอด | ตายอดจากคัพภะ |
| 1,100 | 6 | 8 | 2 |
| | 9 | 16 | 2 |
| 1,350 | 6 | 5 | 0 |
| | 9 | 11 | 2 |
| รวม | | 38 | 6 |

ตารางที่ 4.14 ผลการตรวจสอบยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน anti-DFR ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่ชักนำได้ จากกา
ถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อยอด โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He

| ความดันก๊าซฮีเลียม (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว)/ ระยะห่างของเนื้อเยื่อ เป้าหมาย (เซนติเมตร) | จำนวนต้นที่ ตรวจสอบ | จำนวนต้นที่ | จำนวนต้นที่ | จำนวนต้นที่ |
|---|------------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| | | ตรวจสอบยีน <i>GUS</i> | ตรวจสอบยีน <i>NPTII</i> | จำนวนต้นที่ตรวจพบ ยีน anti-DFR |
| 1,100/6 | 5 | 4 | 5 | 4 |
| 1,100/9 | 13 | 12 | 13 | 10 |
| 1,350/6 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 1,350/9 | 8 | 7 | 7 | 8 |
| รวม | 29 | 26 | 28 | 21 |

ตารางที่ 4.15 ผลการตรวจสอบยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน anti-DFR ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่ชักนำได้จากการ
ถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อตายอดจากคัพภะ โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He

| ความดันก๊าซฮีเลียม (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว)/ ระยะห่างของเนื้อเยื่อ เป้าหมาย (เซนติเมตร) | จำนวนต้นที่ ตรวจสอบ | จำนวนต้นที่ | จำนวนต้นที่ | จำนวนต้นที่ |
|---|------------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| | | ตรวจสอบยีน <i>GUS</i> | ตรวจสอบยีน <i>NPTII</i> | จำนวนต้นที่ตรวจพบ ยีน anti-DFR |
| 1,100/6 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 1,100/9 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 1,350/6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1,350/9 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| รวม | 6 | 6 | 6 | 6 |

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NPTII* และยีน anti-DFR ด้วยวิธี Reversr transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

หลังจากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน anti-DFR และยีน *NPTII* ด้วยวิธีพีซีอาร์แล้ว เพื่อเป็นการ
ยืนยันการแสดงออกของยีน anti-DFR จึงทำการตรวจสอบด้วยการใช้เทคนิค RT-PCR โดยการสกัด อาร์
เอ็นเอของบัวหลวงในต้นที่ได้รับการถ่ายยีน และไม่ได้รับการถ่ายยีน แล้วอาศัยการเปลี่ยน mRNA เป็น
เอกสารีนเป็นเอกสารีนที่สังวนเวส หรือการสังวนเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออยู่ภายใต้เงื่อนไขไปเซบระไฮเซนด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และห้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

complementary DNA โดยเอนไซม์ reverse transcriptase แล้วทำการเพิ่มจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการทำให้ซ้ำ หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาตรวจวิเคราะห์ปริมาณของดีเอ็นเอ โดยแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis ในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมีตำแหน่งการเข้าจับของ คุ้ไพโรเมอร์ NPTII และ DFR

จากผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NPTII* ด้วยชุดไพโรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *NPTII* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 254 bp ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน anti-DFR ด้วยชุดไพโรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน anti-DFR พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 bp ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR (ภาพที่ 4.74)

จากต้นบัวหลวงที่ได้รับการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *NPTII* ที่ได้รับการถ่ายยีนจากพลาสมิด CAMBIA2301 anti-DFR จากชิ้นส่วนยอด และสามารถนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้ทั้งสิ้น 4 ต้น พบว่าต้นที่พบการแสดงออกของยีน *NPTII* มีจำนวน 3 ต้น ส่วนต้นที่พบการแสดงออกของยีน anti-DFR จำนวน 2 ต้น โดยในจำนวนนี้มี 1 ต้นที่พบการแสดงออกเพียง 1 ยีน คือยีน *NPTII* และมีจำนวน 2 ต้นที่พบการแสดงออกของยีน 2 ยีน คือยีน *NPTII* และยีน anti-DFR และมีต้นที่ไม่มีการแสดงออกของยีนเลย จำนวน 1 ต้น โดยสรุปเป็นตารางผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NPTII* และยีน anti-DFR ด้วยวิธี RT-PCR ดังตารางที่ 4.16

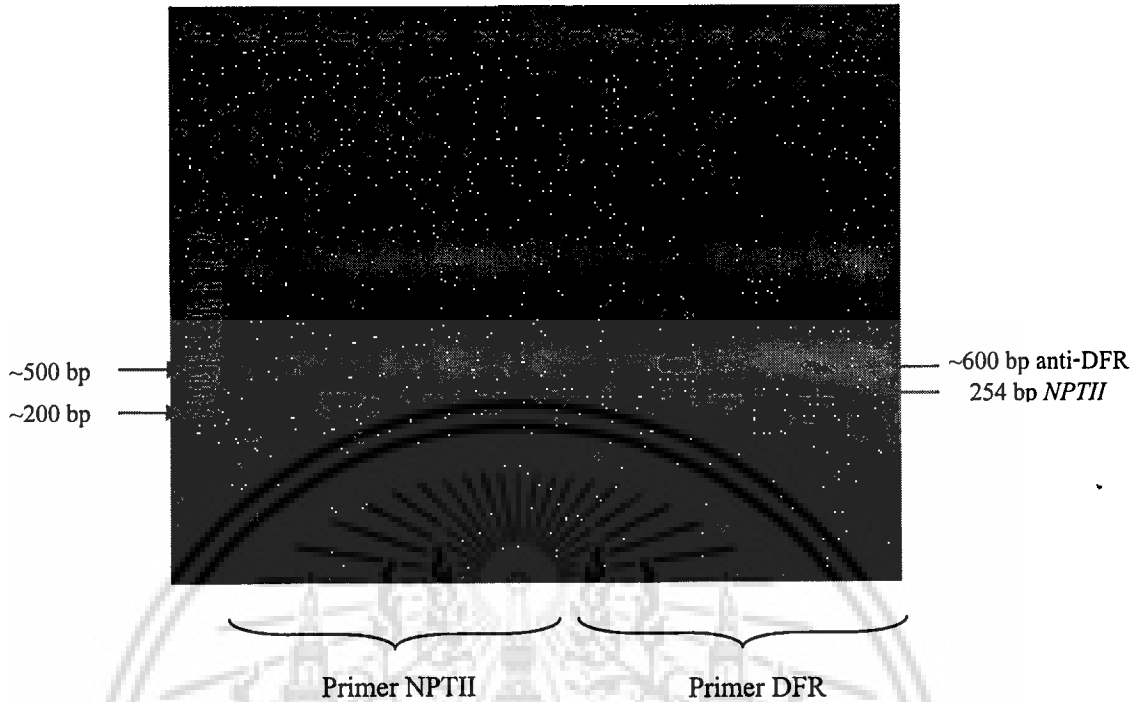
ตารางที่ 4.16 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของ ยีน *NPTII* ยีน anti-DFR ด้วยเทคนิค RT-PCR ที่ชักนำได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อยอด โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He

| ความดันก๊าซฮีเลียม (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว)/ ระยะห่างของเนื้อเยื่อ เป้าหมาย (เซนติเมตร) | จำนวนต้นที่ ตรวจสอบ | จำนวนต้นที่ตรวจพบ ยีน <i>NPTII</i> | จำนวนต้นที่ตรวจพบ ยีน anti-DFR |
|---|------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| 1,100/6 | - | - | - |
| 1,100/9 | 2 | 2 | 1 |
| 1,350/6 | 1 | 0 | 0 |
| 1,350/9 | 1 | 1 | 1 |
| รวม | 4 | 3 | 2 |

-ไม่ได้ตรวจสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



ภาพที่ 4.74 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ NPTII และไพรเมอร์ DFR

- ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp DNA Ladder
- ช่องที่ 2 Negative control dH₂O
- ช่องที่ 3 Negative control ดีเอ็นเอจากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน
- ช่องที่ 4 Positive control ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR
- ช่องที่ 5-8 ต้นบัวหลวงที่มีการแสดงออกของยีน *NPTII*
- ช่องที่ 9 Negative control dH₂O
- ช่องที่ 10 Negative control ดีเอ็นเอจากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน
- ช่องที่ 11 Positive control ดีเอ็นเอจากพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR
- ช่องที่ 12-15 ต้นบัวหลวงที่มีการแสดงออกของยีน anti-DFR

4.5.2.2 การถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense ที่อยู่บนพลาสมิด pCAMBIA1302 CHSA

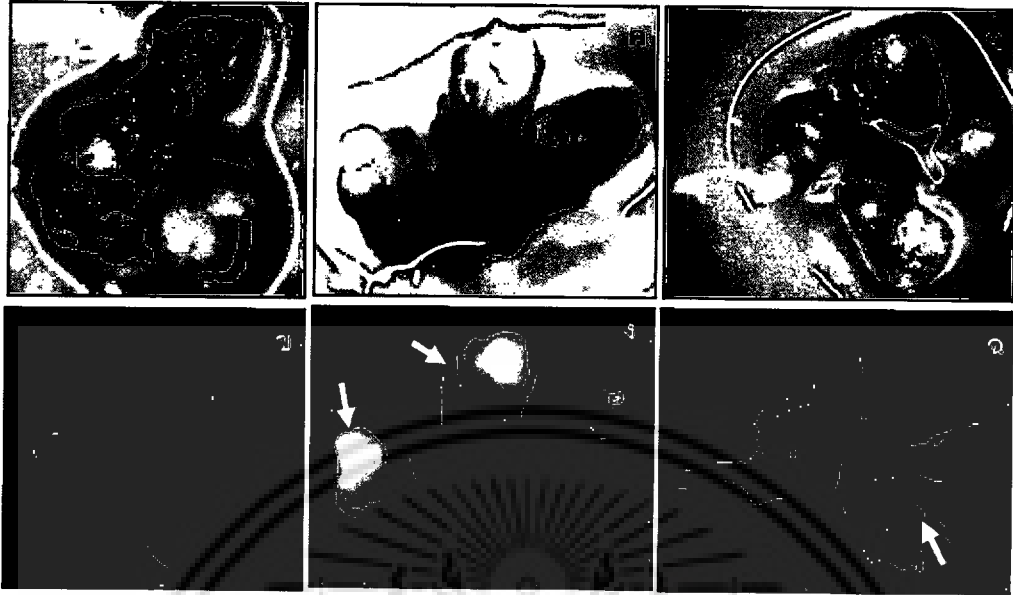
เข้าสู่เนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงพันธุ์กรีนและบัวหลวงราชินี ด้วยวิธียิงอนุภาค

ทำการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวงพันธุ์กรีนดอกสีขาวและบัวหลวงราชินีดอกสีชมพู ด้วยวิธียิงอนุภาค โดยใช้พลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA เคลือบบนอนุภาคทองคำ (gold particles) ซึ่งใช้เป็นพาหะในการถ่ายยีน และทำการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุภาค หลังจากถ่ายยีน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำไปตรวจสอบประสิทธิภาพของการถ่ายยีนจากการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีนรายงานผลยีน GFP ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ พบว่า มีเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุนทรริก จำนวน 72 ชิ้น พบจุดสีเขียวเรืองแสง (green spot) ของยีน GFP (ภาพที่ 4.75) จากชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมด จำนวน 100 ชิ้น มีคะแนนประสิทธิภาพในการถ่ายยีน เฉลี่ย 0.97 ± 0.20 คะแนน ส่วนบัวหลวงราชินี มีเนื้อเยื่อ shoot cluster จำนวน 75 ชิ้น ที่พบจุดสีเขียวเรืองแสง (green spot) ของยีน GFP จากชิ้นเนื้อเยื่อทั้งหมด จำนวน 100 ชิ้น และมีคะแนนประสิทธิภาพในการถ่ายยีน เฉลี่ย 0.99 ± 0.17 คะแนน (ตารางที่ 4.17) หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อ shoot cluster ทั้งหมดไปคัดเลือกชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือก ที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุนทรริก มีจำนวนเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกลดลงตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก 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 และ ในสัปดาห์ที่ 10 มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 56.00 ± 13.87 (ภาพที่ 4.76 จ) ส่วนชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินี มีจำนวนเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกลดลงตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกด้วยเช่นกัน 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 และ ในสัปดาห์ที่ 10 มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 61.00 ± 18.51 (ภาพที่ 4.76 ข) จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุนทรริกและบัวหลวงราชินีที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก ไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร regeneration เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า มีชิ้นเนื้อเยื่อบางส่วนไม่สามารถเจริญเติบโต และตาย มีชิ้นเนื้อเยื่อเพียงบางส่วนที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหาร regeneration ชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุนทรริกที่สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นบัวหลวงได้ มีจำนวน 2 ต้น คือ ต้นบัวหลวงบุนทรริกหมายเลข B3/2 และหมายเลข B5/12 (ภาพที่ 4.77) ส่วนบัวหลวงราชินี มีชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ที่สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นบัวหลวงได้ จำนวน 5 ต้น คือ ต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2, หมายเลข R2/1, หมายเลข R2/4, หมายเลข R2/11 และ หมายเลข R5/12 (ภาพที่ 4.78) จากนั้นนำต้นบัวหลวงบุนทรริกและบัวหลวงราชินีไปตรวจสอบการแสดงออกของยีนรายงานผลยีน GFP ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ พบว่า ต้นบัวหลวงบุนทรริกหมายเลข B3/2 มีการเจริญเติบโตได้ดี มีการเกิดยอด รากและใบขนาดใหญ่ พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน GFP ที่บริเวณปลายราก แต่ไม่พบการเรืองแสงสีเขียวที่บริเวณใบและลำต้น และต้นบัวหลวงบุนทรริกหมายเลข B5/12 มีการเจริญเติบโตได้ดี มีการเกิดยอด รากและใบขนาดใหญ่ พบการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

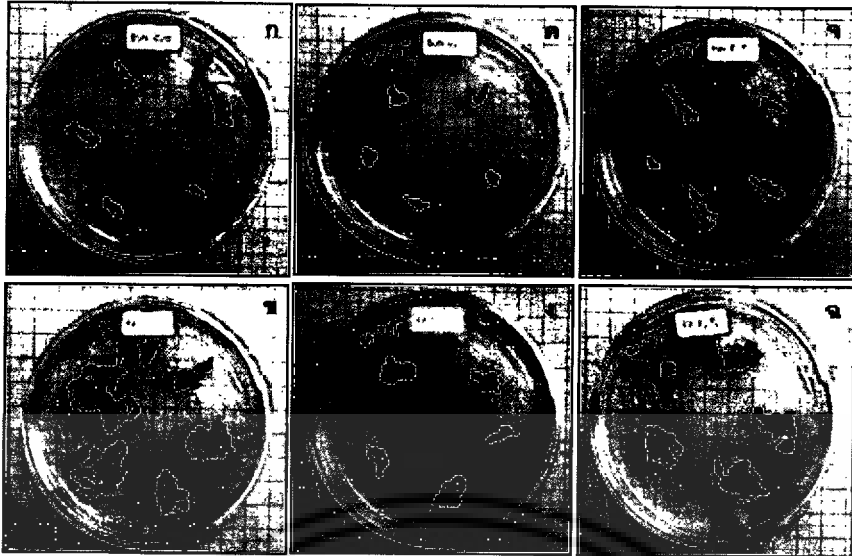
เรืองแสงสีเขียวของยีน GFP ที่บริเวณกาบใบ และบริเวณบางส่วนของราก แต่ไม่พบการเรืองแสงสีเขียวที่บริเวณใบ และลำต้น ส่วนต้นบัวหลวงราชินี พบว่า ต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2 มีใบขนาดใหญ่ 1 ใบ แต่ยอดและส่วนอื่นๆ ไม่เจริญเติบโต และตายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล-ดำ พบว่า มีจุดเรืองแสงสีเขียวจุดเล็กๆ บนใบ และใบและก้านใบบางส่วนที่ตาย มีการเรืองแสงสีเขียว แต่ไม่พบการเรืองแสงที่เนื้อเยื่อส่วนยอดและลำต้น ต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1 มีการเจริญเติบโตได้ดี มีการเกิดยอด รากและใบขนาดใหญ่ พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน GFP ที่บริเวณบางส่วนของราก และบริเวณกาบใบ แต่ไม่พบการเรืองแสงสีเขียวที่บริเวณใบ และลำต้น ต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/4 (ภาพที่ 4.79) มีใบเจริญเติบโตขึ้น 1 ใบ มีขนาดใหญ่ แต่เนื้อเยื่อส่วนอื่นไม่เจริญเติบโต และมีบางส่วนตาย พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน GFP เป็นจุดขนาดใหญ่ที่ใบ และยอดบางยอดที่ตาย ต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/11 มียอดและใบขนาดเล็กเกิดขึ้น แต่ไม่พบการเรืองแสงของยีน GFP และ หมายเลข 5/12 มีการเจริญเติบโตได้ดี มีการเกิดยอด รากและใบขนาดใหญ่ แต่ไม่พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน GFP ในส่วนที่เจริญเติบโต พบการเรืองแสงสีเขียวเฉพาะในส่วนของยอดและใบที่ตาย ในชั้นเนื้อเยื่ออื่นๆ ที่ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหาร regeneration พบว่ามีเนื้อเยื่อบางชั้นที่ตาย มีการเรืองแสงสีเขียวของยีน GFP ในยอดและใบบางส่วน เช่น ต้นบัวหลวงบุญทริก หมายเลข B3/1 และต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/6 และหมายเลข R4/6 เป็นต้น จากนั้นตัดเนื้อเยื่อส่วนใบและลำต้นของบัวหลวงบุญทริกหมายเลข B3/2 และหมายเลข B5/12 และตัดเนื้อเยื่อส่วนใบและลำต้นของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1 และหมายเลข R5/1 ตัดเนื้อเยื่อส่วนใบของบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2, R2/4 และหมายเลข R2/11 นำไปสกัด genomic DNA เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน GFP และยีน *hptII* ในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน และสกัด RNA และสังเคราะห์ cDNA เพื่อนำใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *CHS* ต่อไป



ภาพที่ 4.75 การแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน GFP (ลูกศร) ของต้นบัวหลวงพันธุ์ทรานส์เจนิก หลังจากการถ่ายยีน; ต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ก) ภายใต้แสงปกติ, (ข) ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์, ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน (ค) และ (จ.) ภายใต้แสงปกติ, (ง) และ (ฉ) ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ((ก), (ข), (ค) และ (ง) กำลังขยาย 12x, (จ) และ (ฉ) กำลังขยาย 7x)

ตารางที่ 4.17 ประสิทธิภาพในการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense ด้วยวิธียิงอนุภาค เข้าสู่ชั้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี

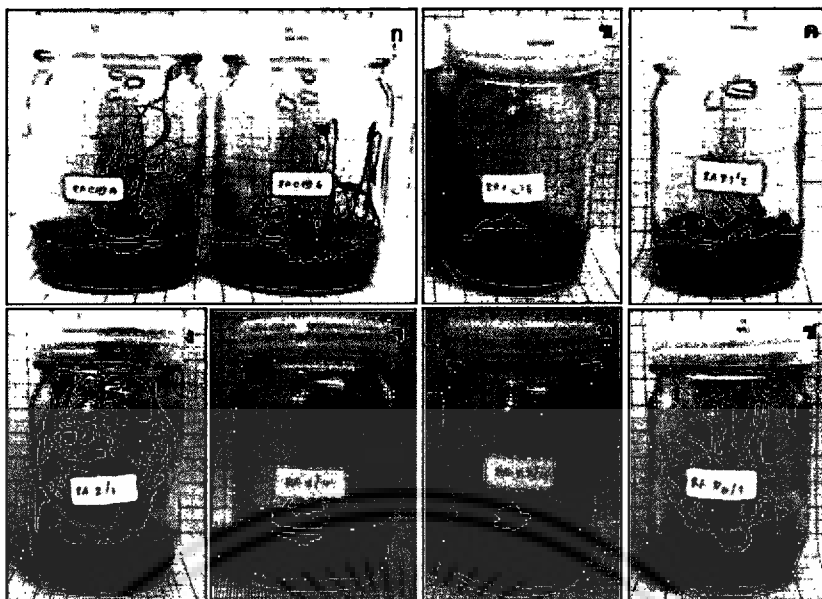
| | บัวหลวงบุณฑริก | บัวหลวงราชินี |
|--|----------------|---------------|
| จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่ถ่ายยีนทั้งหมด (ชิ้น) | 100 | 100 |
| จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่พบการแสดงออกของยีน <i>GFP</i> (ชิ้น) | 72 | 75 |
| คะแนนการแสดงออกของยีน <i>GFP</i> (คะแนนเต็ม 5 คะแนน) | 0.97±0.20 | 0.99±0.17 |
| ร้อยละเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก (ชิ้น) | 56.00±13.87 | 61.00±18.51 |
| จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่เจริญเติบโตบนอาหาร regeneration (ชิ้น) | 2 | 5 |
| จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่พบการแสดงออกของยีน <i>GFP</i> (ชิ้น) | 2 | 3 |



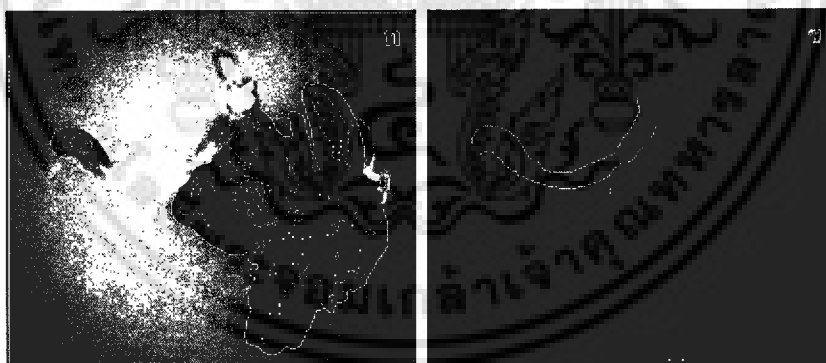
ภาพที่ 4.76 ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนหลังจากการคัดเลือกเป็นเวลา 10 สัปดาห์; (ก) ต้นบัวหลวง
 บุนนทริก และ (ข) ต้นบัวหลวงราชินีที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารปกติ, (ค) ต้น
 บัวหลวงบุนนทริก และ (ง) ต้นบัวหลวงราชินีที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร
 คัดเลือก และ (ฉ) ต้นบัวหลวงบุนนทริก และ (จ) ต้นบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีนที่
 เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก



ภาพที่ 4.77 ต้นบัวหลวงบุนนทริกที่ได้รับการถ่ายยีน; (ก) ต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และ (ข) ต้น
 ควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก และ (ค) ต้นบัวหลวงบุนนทริก
 ที่ได้รับการถ่ายยีนที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก หมายเลข B3/2 และหมายเลข B5/12



ภาพที่ 4.78 ต้นบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน; (ก) ต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, (ข) ต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก, ต้นบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน และรอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก (ค) หมายเลข R1/2, (ง) หมายเลข R2/1, (จ) หมายเลข R2/4, (ฉ) หมายเลข R2/11 และ (ช) หมายเลข 5-12



ภาพที่ 4.79 การแสดงออกของยีน *GFP* ของต้นบัวหลวงราชินี หมายเลข R2/11; ส่วนยอดและใบ (ก) ภายใต้แสงปกติ, (ข) ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ ไม่พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* ที่ส่วนยอด และใบขนาดเล็กที่เกิดขึ้น ((ก) และ (ข) กำลังขยาย 12x)

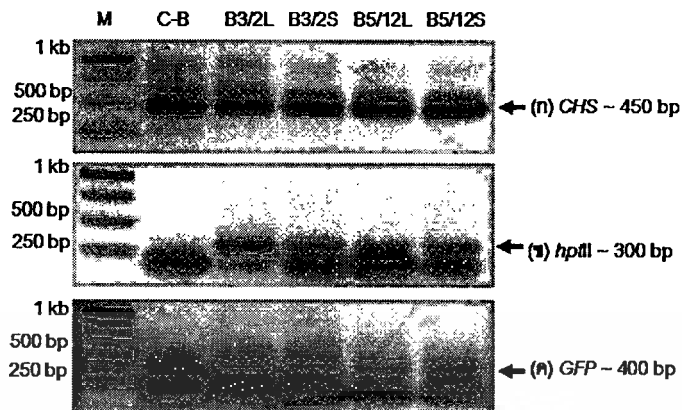
4.5.2.2.1 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GFP* และยีน *hptII* ใน genomic DNA ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR

ทำการสกัด genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B3/2, ใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B5/12, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2, ใบและลำต้นต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/4, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/11, ใบและลำต้นต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R5/1 และใบของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงราชินี ต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน นำมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GFP* และ ยีน *hptII* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ genomic DNA ที่สกัดจากจากใบอ่อนของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน 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 จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B3/2, genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B5/12 และ genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *CHS_forward primer* และ *CHS_reverse primer* พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 450 bp ของยีน *CHS* ในทุกตัวอย่าง (ภาพที่ 4.80 ก) แสดงว่าตัวอย่าง genomic DNA ของทุกตัวอย่าง genomic DNA จากบัวหลวงพันธุ์กริก สามารถนำมาใช้เป็น DNA ต้นแบบในการทำ PCR ได้ แต่เมื่อใช้ไพรเมอร์ *Hygro_forward primer* และ *Hygro_reverse primer* พบว่า มีเฉพาะตัวอย่าง genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B3/2 และ ต้นบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B5/12 เท่านั้นที่พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *hptII* ขนาดประมาณ 300 bp (ภาพที่ 4.80 ข) ไม่พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ในตัวอย่างของ genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และเมื่อใช้ไพรเมอร์ *GFP_forward primer* และ *GFP_reverse primer* พบว่า มีเฉพาะตัวอย่าง genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B3/2 และ genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B5/12 เท่านั้นที่พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *GFP* ขนาดประมาณ 400 bp (ภาพที่ 4.80 ค) ไม่พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ในตัวอย่างของ genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน แสดงว่ายีนที่ถ่ายเข้าได้เข้าไปในส่วน of genomic DNA สอดคล้องกับผลการเจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin ได้ และพบกาเรืองแสงของยีน *GFP* ในต้นบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B3/2 และต้นบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B5/12

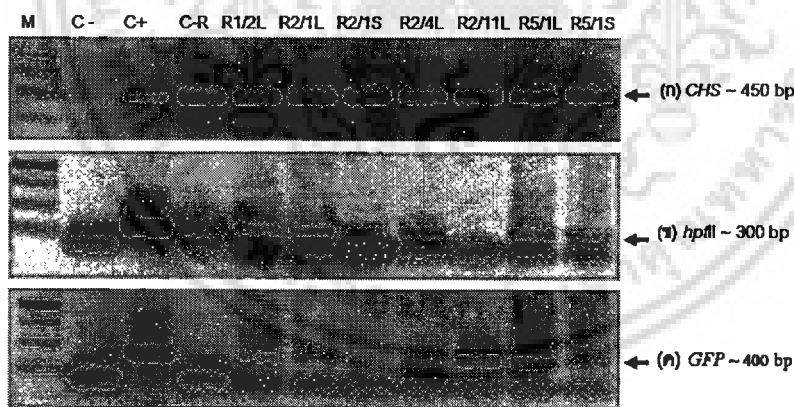
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 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 bp ในทุกตัวอย่าง (ภาพที่ 4.81 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 bp (ภาพที่ 4.81 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 bp (ภาพที่ 4.81 ค) พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *GFP* แบบเจือจางจากตัวอย่าง genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1 และ genomic DNA จากลำต้นของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R5/1 และไม่พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ในตัวอย่างของ genomic DNA ลำต้นของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1, genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/4 และ genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงราชินีที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน



ภาพที่ 4.80 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GFP* และยีน *hptII* ใน genomic DNA ของต้นบวบหลวง บุณฑริกที่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค PCR; (ก.) ยีน *CHS* ยีนอ้างอิง, (ข.) ยีน *hptII* และ (ค.) ยีน *GFP*; (C-B) ต้นบวบหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, 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)



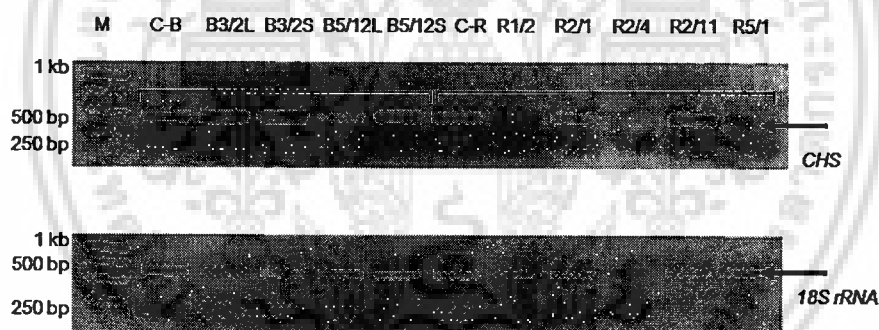
ภาพที่ 4.81 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GFP* และยีน *hptII* ใน genomic DNA ของต้นบวบหลวงราชินี ที่ได้รับการถ่ายยีน *CHS* ด้วยเทคนิค PCR; (ก.) ยีน *CHS* ยีนอ้างอิง, (ข.) ยีน *hptII* และ (ค.) ยีน *GFP*; (C-R) ใบของต้นบวบหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, ใบ (R1/2L) ของต้นหมายเลข R1/2, ส่วนใบ(R2/1L) และ ลำต้น (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)

4.5.2.2.2 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 มาศึกษาเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน CHS ในต้นบัวหลวงพันธุ์และบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน CHS แบบ antisense ที่อยู่บนพลาสมิด pCAMBIA1302 CHSA ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR ตามวิธีการของ ซัยวรกุล 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 ความเข้มข้นของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน CHS ที่โคลนได้จาก cDNA ของใบและลำต้นของบัวหลวงพันธุ์หมายเลข B3/2 และ cDNA ของลำต้นของบัวหลวงพันธุ์หมายเลข B5/12 มีความเข้มมากที่สุด และมีความเข้มใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.82) ส่วนความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน CHS ที่โคลนได้จาก cDNA ของใบของต้นบัวหลวงพันธุ์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน มีความเข้มเจือจางลง และความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน CHS ที่โคลนได้จาก cDNA ของใบของต้นบัวหลวงพันธุ์หมายเลข B5/12 มีความเข้มน้อยที่สุด ในขณะที่ความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน 18S rRNA ซึ่งเป็นยีนอ้างอิงมีความเข้มใกล้เคียงกัน แสดงว่าใบและลำต้นของบัวหลวงพันธุ์หมายเลข B3/2 และลำต้นของบัวหลวงพันธุ์หมายเลข B5/12 มีระดับการแสดงออกของยีน CHS มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนใบของต้นบัวหลวงพันธุ์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ส่วนใบของต้นบัวหลวงพันธุ์หมายเลข B5/12 มีระดับการแสดงออกของยีน CHS ลดลงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนใบของต้นบัวหลวงพันธุ์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

เมื่อใช้ cDNA จากต้นบัวหลวงราชินี พบว่า ความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน CHS ที่โคลนได้จาก cDNA ของใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1, cDNA ของใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/11 และ cDNA ของใบของต้นบัวหลวงราชินีที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน มีความเข้มมาก

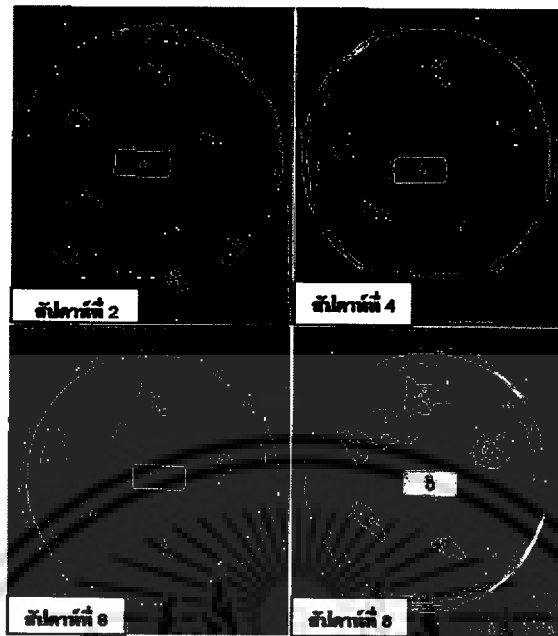
ที่สุด และมีความเข้มใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.82) ในขณะที่ความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2 และ cDNA ของใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R5/1 มีความเข้มใกล้เคียงกัน และมีความเข้มน้อยกว่าผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก 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 มีความเข้มข้นน้อยมาก จึงทำให้ความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *18S rRNA* ที่โคลนได้ มีความเข้มข้นน้อยมาก เมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่น และเมื่อนำ cDNA ไปทำ PCR จึงทำให้ไม่สามารถมองเห็นแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *CHS* ได้



ภาพที่ 4.82 การศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* (458 bp) ในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง (ประมาณ 600 bp); ส่วนใบ (C-B) ของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกที่ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, ส่วนใบ (B3/2L) และลำต้น (B3/2S) ของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B3/2, ส่วนใบ (B5/12L) และ ลำต้น (B5/12S) ของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข 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)

4.5.2.3 การถ่ายยีน 4'CGT โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ

พลาสมิด pCAM4'CGT ได้ถูกถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวง โดยนำ shoot cluster เลี้ยงร่วมกับเซลล์อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM4'CGT ในอาหารเหลว MS ที่มีสารอะซิโตไซริงโคนความเข้มข้น 100 μM จากนั้นเจือจางความเข้มข้นของเซลล์อะโกรแบคทีเรีย เป็น 1:10 ด้วยอาหารเหลว MS แช่ร่วมกันเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นย้าย shoot cluster ลงบนอาหารแข็ง MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และอะม็อกซิซิลลิน 300 มิลลิกรัมต่อลิตร shoot cluster ของบัวหลวงที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 442 ต้น แบ่งเป็นครั้งที่ 1 จำนวน 100 ต้น ครั้งที่ 2 จำนวน 100 ต้น ครั้งที่ 3 จำนวน 95 ต้น ครั้งที่ 4 จำนวน 63 ต้น และครั้งที่ 5 จำนวน 84 ต้น โดยครั้งที่ 1-3 ไม่พบต้นบัวหลวงที่รอดชีวิต ส่วนครั้งที่ 4 พบต้นบัวหลวงที่รอดชีวิตโดยติดตามการเจริญเติบโตทุก 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 4.83) พบว่า shoot cluster ของบัวหลวงสามารถพัฒนาเป็นยอดใหม่เพิ่มขึ้นจนถึงสัปดาห์ที่ 12 โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 5 ยอด โดยหลังจากสัปดาห์ที่ 12 ขนาดยอดเฉลี่ยมีแนวโน้มลดลงและเมื่อ shoot cluster มีอายุ 14 สัปดาห์ พบว่าจำนวนยอดเฉลี่ยได้ลดลงเหลือ 2.52 ยอด เนื่องจากขึ้นส่วนตายหรือยอดตาย เมื่อศึกษาขนาดขึ้นส่วนเฉลี่ยพบว่าขึ้นส่วน shoot cluster มีขนาดเพิ่มมากขึ้นจนถึงสัปดาห์ที่ 12 มีขนาดเฉลี่ย 1.49 เซนติเมตร โดยหลังจากสัปดาห์ที่ 12 การเจริญเติบโตมีแนวโน้มลดลงเหลือ 1.34 เซนติเมตร และเมื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ shoot cluster หลังจากการถ่ายยีน พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 ถึง 6 shoot cluster มีอัตราการรอดชีวิตที่ 96.82 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นในสัปดาห์ที่ 8, 10, 12 และ 14 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 88.88, 82.53, 44.44 และ 36.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดย shoot cluster ที่ตายจะมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเข้มทั่วขึ้นส่วน (ตารางที่ 4.18)



ภาพที่ 4.83 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วน shoot cluster ของบัวหลวงบนอาหารคัดเลือกภายหลังจากการถ่ายพลาสמיד pCAM4'CGT โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะครั้งที่ 4 เป็นเวลา 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์

ตารางที่ 4.18 จำนวนยอดเฉลี่ย ขนาดของ shoot cluster เฉลี่ย จำนวน shoot cluster ที่รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตบนอาหาร MS ที่มี BA 50 ไมโครโมลาร์ร่วมกับสารปฏิชีวนะ กานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และอะม็อกซิซิลลิน 300 มิลลิกรัมต่อลิตรหลังการถ่ายพลาสมิด pCAM4'CGT โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะครั้งที่ 1-5

| | | ชิ้นส่วน shoot cluster หลังการถ่ายยีนแบบอะโกรแบคทีเรียอายุ (สัปดาห์) | | |
|------------|--|--|---------------------|---------------------|
| | | 4 | 8 | 12 |
| ครั้งที่ 1 | จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด) | 2.45 (± 1.21) | 2.74 (± 1.46) | 2.73 (± 1.48) |
| | ขนาดของ shoot cluster เฉลี่ย (ซ.ม.) | 1.03 (± 0.27) | 1.11 (± 0.32) | 1.12 (± 0.33) |
| | จำนวน shoot cluster ที่รอดชีวิต(ชิ้น) | 60 | 54 | 52 |
| | เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต | 60 | 54 | 52 |
| ครั้งที่ 2 | จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด) | 2.44 (± 1.25) | 2.67 (± 1.36) | 2.66 (± 1.38) |
| | ขนาดของ shoot cluster เฉลี่ย (เซนติเมตร) | 1.06 (± 0.26) | 1.12 (± 0.30) | 1.12 (± 0.31) |
| | จำนวน shoot cluster ที่รอดชีวิต(ชิ้น) | 59 | 52 | 50 |
| | เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต | 59 | 52 | 50 |
| ครั้งที่ 3 | จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด) | 2.52 (± 1.13) | 2 (± 0.83) | 2.04 (± 1.09) |
| | ขนาดของ shoot cluster เฉลี่ย(ซ.ม.) | 0.81 (± 0.23) | 0.93 (± 0.34) | 1.01 (± 0.46) |
| | จำนวน shoot cluster ที่รอดชีวิต(ชิ้น) | 95 | 52 | 21 |
| | เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต | 100 | 54.73 | 22.10 |
| ครั้งที่ 4 | จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด) | 3.63 (± 1.46) | 5.01 (± 2.38) | 5.00 (± 2.13) |
| | ขนาดของ shoot cluster เฉลี่ย(ซ.ม.) | 1.15 (± 0.31) | 1.47 (± 0.44) | 1.49 (± 0.45) |
| | จำนวน shoot cluster ที่รอดชีวิต(ชิ้น) | 61 | 56 | 28 |
| | เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต | 96.82 | 88.88 | 44.44 |
| ครั้งที่ 5 | จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด) | 3.94 (± 1.64) | 3.90 (± 1.63) | 6.58 (± 1.23) |
| | ขนาดของ shoot cluster เฉลี่ย(ซ.ม.) | 1.13 (± 0.40) | 1.12 (± 0.43) | 1.12 (± 0.41) |
| | จำนวน shoot cluster ที่รอดชีวิต(ชิ้น) | 69 | 52 | 41 |
| | เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต | 82.14 | 61.90 | 48.80 |

การเจริญเติบโตของ shoot cluster บั้วหลวง ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะกานามัยซินบนอาหารชักนำสูตร MS นำ shoot cluster ที่รอดชีวิตจากการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน จำนวน 23 ชิ้น มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มี BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์โดยเติมอาหารเหลว MS ร่วมด้วยพบว่ามีชิ้นส่วนที่มีการแตกยอดเพิ่มขึ้นเพียง 1 ต้น ภายใน 2 สัปดาห์ โดยมียอดเพิ่มขึ้นเพียง 1 ยอด ในขณะที่ชิ้นอื่นๆ ยอดเริ่มมีสีน้ำตาลคล้ำ และตาย (ภาพที่ 4.84)

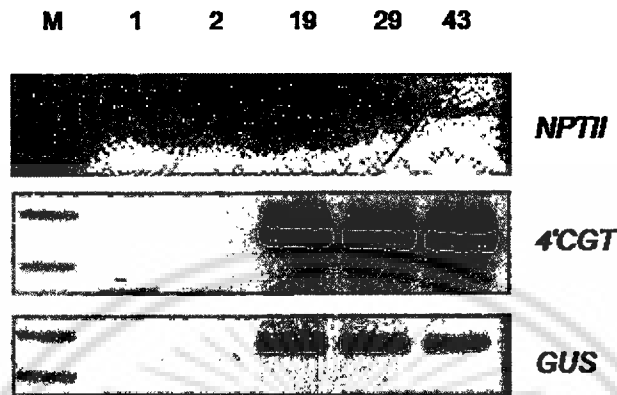


ภาพที่ 4.84 shoot cluster ของบั้วหลวงบนอาหารชักนำสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ภายหลังจากถ่ายโอน พลาสมิด pCAM4'CGT โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ อายุ 16 สัปดาห์

4.5.2.3.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน 4'CGT, GUS และ NPTII หลังจากการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ

หลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT เข้าสู่ shoot cluster ของต้นบั้วหลวง โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ ภายหลังจากคัดเลือก shoot cluster บนอาหาร MS ที่มีกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับอะม็อกซิซิลลินความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14 สัปดาห์ นำชิ้นส่วนใบของต้นบั้วหลวงจำนวน 5 ต้น แบ่งเป็นบั้วหลวงปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจำนวน 2 ต้น และบั้วหลวงที่รอดชีวิตจากการเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกจำนวน 3 ต้นมาสกัดอาร์เอ็นเอ แล้วทำการสังเคราะห์ cDNA เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน 4'CGT ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-Bam HI-4'CGT และ R-4'CGT -Sac I พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 นิวคลีโอไทด์ จากบั้วหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน จำนวน 3 ต้น คือต้นที่ 19, 29 และ 43 จากทั้งหมดที่สุ่มมาตรวจสอบ 3 ต้น เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ภาพที่ 4.85) และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* และ *NPTII* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-gusA และ R-gusA สำหรับยีน *GUS* ไพรเมอร์ F-NPTII และ R-NPTII สำหรับยีน *NPTII* พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 นิวคลีโอไทด์ สำหรับยีน *GUS* และแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ สำหรับยีน *NPTII* จากบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ทั้ง 3 ต้นที่สุ่มมาตรวจสอบ






ภาพที่ 4.85 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *4'CGT*, *GUS* และ *NPTII* ด้วยเทคนิค RT-PCR ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ (19, 29 และ 43) เปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงปกติ (1 และ 2) เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kbDNA ladder (M)

4.5.2.3.2 การติดตามปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* และยีน *F3H* ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT

ตรวจสอบการแสดงออกยีน *CHS* และ *F3H* เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ภายหลังการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT เข้าสู่ shoot cluster นำใบมาสกัดอาร์เอ็นเอและสังเคราะห์ cDNA เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาและอุณหภูมิตามข้อที่ 3.2.3.4.3 ปรับปริมาณความเข้มข้นของ cDNA เริ่มต้นด้วยยีน *18s rRNA* ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CHS* ด้วยไพรเมอร์ CHSF และไพรเมอร์ CHSR และการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยไพรเมอร์ F3H_SenseF และไพรเมอร์ F3H_STOP จากบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนและไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT โดยพบว่าบัวหลวงที่นำมาตรวจสอบทั้ง 3 ต้น มีการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* และพบว่าระดับการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงปกติ (ภาพที่ 4.86)

WT1 WT2 19 29 43

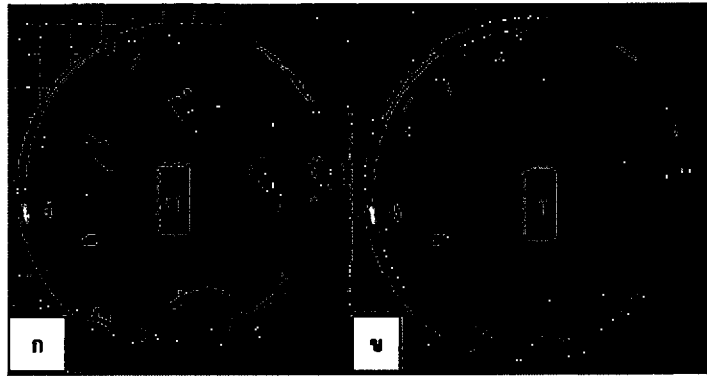
| | |
|---|-----------------|
|  | CHS |
|  | F3H |
|  | 18s rRNA |

ภาพที่ 4.86 ผลเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *CHS* และยีน *F3H* ในต้นบัวหลวงที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT (ต้นที่ 19, 29 และ 43) โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ โดยเปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงปกติ (WT1 และ WT2) และมียีน *18s rRNA* เป็นยีนอ้างอิง

4.5.2.4 การเจริญเติบโตของ shoot cluster ที่ถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาค และการตรวจสอบการแสดงออกของยีน 4'CGT, *CHS*, *F3H*, *GUS* และ *NPTII*

4.5.2.4.1 การคัดเลือก shoot cluster ของบัวหลวงบนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน

ใช้ shoot cluster ของบัวหลวงในการทดลองทั้งหมด 274 ต้น แบ่งเป็นครั้งที่ 1 จำนวน 110 ต้น ครั้งที่ 2 จำนวน 82 ต้น และครั้งที่ 3 จำนวน 82 ต้น และติดตามการเจริญเติบโตทุก 2 สัปดาห์พบว่าในการถ่ายยีนครั้งที่ 1 เมื่อเพาะเลี้ยง shoot cluster ของบัวหลวงบนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ยอดของ shoot cluster ไม่สามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินส่งผลให้ shoot cluster ของบัวหลวงไม่มีการเจริญเติบโตและเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลซึ่งมีจำนวนยอดเฉลี่ยลดลงจาก 2.78 ยอด เหลือ 1.58 ยอด ในสัปดาห์ที่ 16 (ภาพที่ 4.87) เมื่อศึกษาขนาดชิ้นส่วนเฉลี่ยพบว่าชิ้นส่วน shoot cluster มีขนาดเพิ่มขึ้นโดยสัปดาห์ที่ 6 มีขนาดชิ้นส่วนเฉลี่ย 1.17 เซนติเมตรและขนาดของชิ้นส่วนเฉลี่ยลดลงเหลือ 1.13 เซนติเมตรในสัปดาห์ที่ 8 และในสัปดาห์ที่ 16 พบว่าขนาดชิ้นส่วนเฉลี่ยอยู่ที่ 0.46 เซนติเมตร เมื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วน shoot cluster หลังจากการถ่ายยีน พบว่าชิ้นส่วนมีอัตราการรอดชีวิตลดลง โดยในสัปดาห์ที่ 16 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 35.45 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.19) ส่วนการถ่ายยีนครั้งที่ 2 ไม่พบต้นที่รอดชีวิต ในขณะที่ครั้งที่ 3 ต้นบัวหลวงยังไม่มีการเจริญเติบโตของใบเพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน



ภาพที่ 4.87 การเจริญเติบโตของshoot cluster ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT แบบการยิงอนุภาคครั้งที่ 1 (ข) และ shoot cluster ของบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT (ก)



ตารางที่ 4.19 จำนวนยอดเฉลี่ยขนาดของshoot cluster เฉลี่ยจำนวน shoot cluster ที่รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ shoot clusterหลังการถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาคบนอาหาร MS และ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ร่วมกับกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

| | | ชิ้นส่วน shoot cluster หลังการถ่ายยีนแบบการยิงอนุภาค อายุ (สัปดาห์) | | | | | | | |
|------------|--|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 |
| ครั้งที่ 1 | จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด) | 2.78 (±1.49) | 2.45 (±1.20) | 2.8 (±1.46) | 2.77 (±1.41) | 2.74 (±1.39) | 2.72 (±1.42) | 2.65 (±1.41) | 1.58 (±1.04) |
| | ขนาดของ shoot cluster เฉลี่ย (ซ.ม.) | 0.99 (±0.31) | 1.05 (±0.27) | 1.17 (±0.30) | 1.13 (±0.32) | 1.12 (±0.32) | 1.12 (±0.33) | 1.12 (±0.33) | 0.46 (±0.36) |
| | จำนวน shoot cluster ที่รอดชีวิต (ชิ้น) | 71 | 65 | 63 | 59 | 58 | 57 | 57 | 31 |
| | เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต | 63.63 | 60 | 56.36 | 53.63 | 51.88 | 52.72 | 52.72 | 35.45 |
| ครั้งที่ 2 | จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด) | 2.88 (±1.50) | 2.35 (±1.22) | 2.35 (±1.22) | 2 (±1.18) | 2.14 (±1.19) | 2.14 (±1.19) | 2.14 (±1.19) | 2.14 (±1.19) |
| | ขนาดของshoot cluster เฉลี่ย (ซ.ม.) | 0.73 (±0.31) | 0.83 (±0.22) | 0.83 (±0.22) | 0.84 (±0.26) | 0.92 (±0.31) | 0.92 (±0.31) | 0.92 (±0.31) | 0.92 (±0.31) |
| | จำนวน shoot cluster ที่รอดชีวิต (ชิ้น) | 45 | 39 | 39 | 34 | 34 | 34 | 34 | 34 |
| | เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต | 54.87 | 47.56 | 47.56 | 41.46 | 41.46 | 41.46 | 41.46 | 41.46 |
| ครั้งที่ 3 | จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด) | 2.90 (±1.51) | 2.41 (±1.33) | 2.57 (±1.45) | 2.89 (±1.47) | 3.03 (±1.40) | 3.03 (±1.42) | 3 (±1.46) | 2.92 (±1.51) |
| | ขนาดของshoot cluster เฉลี่ย (ซ.ม.) | 0.74 (±0.29) | 0.83 (±0.23) | 0.86 (±0.24) | 0.9 (±0.24) | 0.97 (±0.25) | 1.03 (±0.24) | 1.07 (±0.27) | 1.03 (±0.26) |
| | จำนวน shoot cluster ที่รอดชีวิต (ชิ้น) | 44 | 39 | 33 | 29 | 26 | 26 | 26 | 26 |
| | เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต | 53.65 | 47.56 | 40.24 | 35.36 | 31.70 | 31.70 | 31.70 | 31.70 |

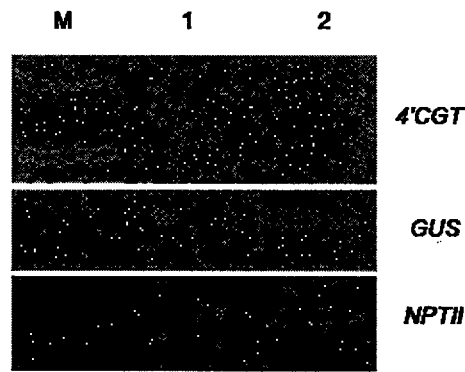
การเจริญเติบโตของ shoot cluster บั้วหลวงบนอาหารชักนำสูตร MS นำต้นที่รอดจากการคัดเลือกจำนวน 9 ชิ้น มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์และมีการเติมอาหารเหลว MS โดยเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ พบว่ามีต้นบั้วหลวงที่สามารถรอดชีวิตได้หลังจากเลี้ยงบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน จำนวน 9 ต้น โดยในจำนวน 9 ต้น มีเพียงต้นเดียวที่มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง โดยพบว่ามีกาแตกยอดใหม่ในสัปดาห์ที่ 32 จำนวน 1 ยอด มีขนาด 1 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.88) จากนั้นนำต้นบั้วหลวงที่ผ่านการคัดเลือกไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน *4'CGT*, *GUS*, *NPTII*, *CHS* และ *F3H* ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR



ภาพที่ 4.88 ต้นบั้วหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนแบบการยิงอนุภาค อายุ 32 สัปดาห์ (ก) และ 40 สัปดาห์ (ข) บนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์

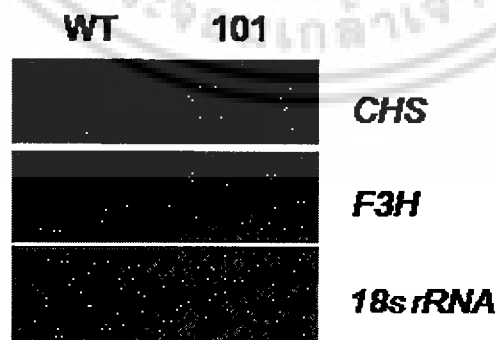
4.5.2.4.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *4'CGT*, *GUS* และ *NPTII* หลังจากการถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาค

ภายหลังจากการคัดเลือกต้นบั้วหลวงที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pCAM4'*CGT* บนอาหาร MS ที่มีกานามัยซินที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 16 สัปดาห์ นำชิ้นส่วนใบของต้นบั้วหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนและรอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกจำนวน 1 ต้น มาสกัดอาร์เอ็นเอแล้วทำการสังเคราะห์ cDNA เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *4'CGT* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-Bam HI-4'*CGT* และ R-4'*CGT*-Sac I พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 นิวคลีโอไทด์ ในต้นบั้วหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนพลาสมิด pCAM4'*CGT* (ภาพที่ 4.46) และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-*gusA* และ R-*gusA* สำหรับยีน *GUS* พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 นิวคลีโอไทด์ และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NPTII* โดยใช้ไพรเมอร์ F-*NPTII* และ R-*NPTII* สำหรับยีน *NPTII* พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ ในขณะที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ cDNA จากต้นบั้วหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่ 4.89)



ภาพที่ 4.89 ผลการสังเคราะห์ยีน *4'CGT*, *GUS* และ *NPTII* ด้วยเทคนิค RT-PCR จาก cDNA ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT ด้วยวิธีการยิงอนุภาคครั้งที่ 1 (2) และต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT (1) โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (M)

การติดตามปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* และยีน *F3H* ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR ศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* ภายหลังจากถ่ายโอน พลาสมิด pCAM4'CGT เข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวง นำใบจากต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT ด้วยวิธีการยิงอนุภาคมาสกัดอาร์เอ็นเอและทำการสังเคราะห์ cDNA เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ยีน *18s rRNA* เป็นยีนอ้างอิงผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์พบการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* ในตัวอย่าง cDNA จากบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนและไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT โดยการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* นั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอน พลาสมิด pCAM4'CGT (ภาพที่ 4.90)



ภาพที่ 4.90 ผลเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *CHS* และยีน *F3H* ในต้นบัวหลวงที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT (ต้นที่ 101) ด้วยวิธีการยิงอนุภาค โดยเปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงปกติ (WT) และยีน *18s rRNA*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 การโคลนยีน *chalcone synthase (CHS)*, *flavonone 3-hydroxylase (F3H)*, และ *chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT)*

5.1.1 การโคลนยีน *CHS* จากกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยเทคนิค PCR

การโคลนยีน *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* ได้ผลผลิต PCR ของยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ที่โคลนจาก genomic DNA ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช ขนาดเท่ากัน คือ 1,599 คู่เบส และเมื่อนำนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีน พบว่า ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก และบัวหลวงสัตตบงกช 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) และได้ผลผลิต PCR ของยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ที่โคลนจาก cDNA ที่สังเคราะห์จาก RNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกสีขาว และกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชกลีบดอกสีชมพูขนาดเท่ากัน คือ 1,170 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 389 กรดอะมิโน ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก และบัวหลวงสัตตบงกช 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 เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงทั้งสองชนิดกับยีน *CHS* ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความเหมือนกันประมาณร้อยละ 79 - 83 ลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช มีความเหมือนมากที่สุด กับ เอนไซม์ *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 จึงเป็นการยืนยันได้ว่าการสร้าง mRNA ของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงทั้งสองสี และลำดับกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้มีความเหมือนกันถึงร้อยละ 99 มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยในบางตำแหน่ง แต่กรดอะมิโนในตำแหน่งสำคัญ ยังคงเป็นชนิดเดียวกันจึงไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในดอกบัวหลวงทั้งสองสี (Joseph and Joseph. 2000) ยีน *CHS* ในพืชหลายชนิดพบว่า มีการทำงานร่วมกันหลายยีน (family genes) เช่น ถั่วเหลือง (Tuteja *et al.* 2009) และถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris*) (Ryder *et al.* 1987) ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) (Lo *et al.* 2002.) เป็นต้น 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 ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกชมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* พืชอื่น 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* และอยู่ในกลุ่มใหญ่เดียวกับ กลุ่มไม้ยืนต้น ใบเลี้ยงคู่ เช่น *Theobroma cacao* (โกโก้), *Camellia sinensis* (ชาจีน) และ *Malus domestica* (แอปเปิล) เป็นต้น สอดคล้องกับเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 164 องค์อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานของ Les et al. (1991) ที่ใช้ ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *rbcL* ที่อยู่บนคลอโรพลาสต์จีโนม โดยใช้วิธีการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี gene maximum-likelihood topologies ใช้วิธีการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Bootstrap test โดยใช้จำนวนรอบ 1,000 รอบ พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของ ยีน *rbcL* ของบัวหลวง *N. lutea* (North America) และ *N. nucifera* (Asia and Australia) มีความเหมือนกัน ถึงร้อยละ 99.99 และอยู่ในกลุ่มของพืชดอกใบเลี้ยงคู่ (angiosperm) และกลุ่มไม้ยืนต้น (woody plant)

5.1.2 การโคลนยีน *F3H* ในปทุมชาติและอุบลชาติ

การโคลนยีน *F3H* ในอุบลชาติเซนหลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติ บุนนทริก พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *F3H* ของอุบลชาติและปทุมชาติ มีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้จากการโคลนยีน *F3H* ในอุบลชาติเซนหลุยส์โกลด์ทางด้าน 3' พบว่านิวคลีโอไทด์บริเวณ หน้า poly A tail ของโคลนที่ 2 มีจำนวนมากกว่าโคลนที่ 1 และ 3 จำนวน 15 คู่เบส ทั้งนี้คาดว่า การสังเคราะห์ mRNA ของยีน *F3H* อาจเกิดจากการลอกรหัส (transcription) จากดีเอ็นเอต้นแบบบนโครโมโซมมากกว่า 1 ชุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ นางลักษณ์ เกรินทวงศ์ และคณะ (2552) ที่แสดงผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีการ Southern blot และพบว่ามียีน *F3H* ของอุบลชาติเซนหลุยส์โกลด์บนโครโมโซมมากกว่า 1 ชุด Nakatsuka et al. (2005a) ศึกษาจำนวนชุดของยีนในวิถีสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์บนโครโมโซมของดอกหรีดด้วยวิธีการ Southern blot พบยีน *ANS* และ *F3'5'H* จำนวน 4 ชุด ยีน *FLII* (flavones synthase II) จำนวน 2 ชุด ยีน *F3H* จำนวน 3 ชุดบนโครโมโซม และสามารถโคลนยีน *F3H* ได้ 2 ชุด คือ *GtF3H1* ขนาด 1,454 คู่เบส และ *GtF3H2* ขนาด 1,382 คู่เบส โดยยีน *GtF3H1* และยีน *GtF3H2* มีความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์จำนวน 11 ตำแหน่ง แต่พบว่ามีเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้นที่ส่งผลให้ลำดับของกรดอะมิโนมีความแตกต่างกัน และพบ จำนวนนิวคลีโอไทด์บริเวณหน้า poly A tail ของยีน *GtF3H1* มีจำนวนมากกว่ายีน *GtF3H2* จำนวน 72 คู่เบส Nishihara et al. (2005) พบยีน *CHS* บนโครโมโซมของต้นยาสูบ (*N. tabacum*) จำนวน 3 ชุด Han et al. (2010) พบยีน *F3'H* บนโครโมโซมแอปเปิล (*Malus domestica*) จำนวน 3 ชุด และ Kim et al. (2003) พบ ยีน *F3H* บนโครโมโซมของต้นแอปเปิล (*Malus domestica* Borkh. cv. Fuji) จำนวน 2 ชุด ในการโคลนยีน *F3H* ทางด้านปลาย 5' ด้วยปฏิกิริยา Nested PCR ได้ใช้ 5' RACE cDNA ของดอกลิ้นมังกรเป็นดีเอ็นเอ ต้นแบบควบคู่กับ 5' RACE cDNA ของอุบลชาติเซนหลุยส์โกลด์ เพื่อเป็นการยืนยันประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่ใช้ว่ามีความจำเพาะกับยีน *F3H* ในอุบลชาติเซนหลุยส์โกลด์เท่านั้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *F3H* ที่โคลนได้จากอุบลชาติเซนหลุยส์โกลด์ ปทุมชาติ สัตตบงกช และปทุมชาติบุนนทริก แสดงความเหมือนกับยีน *F3H* ในชา (*Camellia nitidissima*) (ADZ28514.1) 76 เปอร์เซ็นต์ หน้าวัว (*Anthurium andraeanum*) (ABI50233.1) 73 เปอร์เซ็นต์ และหรีด (*Gentiana triflora*) (BAD91806.1) 69 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4) และพบโปรตีน *F3H* ในอุบลชาติและปทุม ชาติมีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแยกตัวออกมาจากพืชในกลุ่มอื่นอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 4.19) ในขณะที่พบ ยีน *CHS* ในปทุมชาติสัตตบงกช มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ สาลี่ (*Pyrus pyrifolia*) พ룬 (*Prunus avium*) กุหลาบ (*Rosa hybrida*) และคามิลเลีย (*Camellia nitidissima*) (ปฤษฎางค์ อะโน อยู่ในขณะการตีพิมพ์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 165 และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีน *F3H* ในปทุมชาติสัตตบงกชกลีบดอกสีชมพู ปทุมชาติบุณฑริกกลีบดอกสีขาว และอุบล-ชาติเซนต์หลุยส์โกลด์กลีบดอกสีเหลือง มีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้ว่าสีของกลีบดอกปทุมชาติและอุบลชาติมีความแตกต่างกันทั้งนี้อาจเกิดจากยีนมีการแสดงออกแตกต่างกัน ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยมีหลายสาเหตุที่เกี่ยวข้อง เช่น โปรโมเตอร์ (promoter) เป็นบริเวณเริ่มต้นของกระบวนการถอดรหัส ทรานสคริปชันแฟคเตอร์ (transcription factor) เป็นตัวส่งเสริมการถอดรหัส การจัดเก็บดีเอ็นเอ (gene packaging and structure) ที่อาจเกิดการขดตัวอย่างแน่นของสายดีเอ็นเอบริเวณยีนบนโครโมโซมทำให้ transcription factors ไม่สามารถเข้าถึงบริเวณยีนได้ และการเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอ (DNA methylation) โดยการเติมหมู่เมทิลจะมีผลขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ RNA polymerase ทำให้การแสดงออกของยีนลดลง (Latchman 1995) ทั้งนี้การโคลนยีน *F3H* จากปทุมชาติและอุบลชาติไม่สามารถโคลนในส่วนโปรโมเตอร์ของยีนได้ จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการที่ในปทุมชาติบุณฑริกกลีบดอกสีขาวมีการแสดงออกของยีนในวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานินน้อยมีสาเหตุจากอิทธิพลของการทำงานของโปรโมเตอร์ จึงควรมีการศึกษาในส่วนโปรโมเตอร์ยีน *F3H* ในปทุมชาติต่อไป

5.1.3 การโคลนยีน 4'CGT ในกลีบดอกลินม้งกรสีต่างๆ

การโคลนยีน 4'CGT จาก cDNA ของดอกลินม้งกรสีเหลือง พันธุ์ Pixie Bells โดยออกแบบไพรเมอร์สำหรับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1,062 ถึง 1,374 บนสาย mRNA ของยีน 4'CGT ผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 นิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์เชื่อมต่อกับพลาสมิด pCR8 เพื่อสร้างพลาสมิด pCR8-4'CGT นำส่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 4'CGT จำนวน 313 นิวคลีโอไทด์ และโคลนยีน 4'CGT แบบเต็มเส้นด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์คู่กับไพรเมอร์ F-BamHI-4'CGT และ R-4'CGT-SacI ที่จับบริเวณตำแหน่งอนุรักษ์บนยีน 4'CGT ซึ่งออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ของยีน 4'CGT ใน cDNA ของลินม้งกรขนาด 1,374 นิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์เชื่อมต่อกับพลาสมิด pTZ57R/T เพื่อสร้างพลาสมิด pTZ4'CGT แล้วถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat-shock เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ คัดเลือกโคโลนีที่ได้ นำส่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 4'CGT ในพลาสมิด pTZ4'CGT เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 4'CGT ของลินม้งกร (EF650015.1) 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาศึกษาการแสดงออกของยีนต่อไป

5.2 การแสดงออกของยีน *chalcone synthase (CHS)*, *flavonone 3-hydroxylase (F3H)*, และ *chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT)*

5.2.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน *CHS*

การศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกสีขาว และบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู และปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงในช่วงระยะของการพัฒนาของดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช พบว่าดอกบัวหลวงบุณฑริก มีการปริมาณแสดงออกของยีนไม่แตกต่างกันมากนักในแต่ละช่วงระยะการพัฒนาของดอกบัวหลวง ส่วนปริมาณการออกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงออกของยีน *CHS* ในดอกบัวหลวงสัตตบงกช พบว่า ในระยะที่ 1 ดอกตูมขนาดเล็ก มีปริมาณการแสดงออกของยีนมากที่สุด และมีปริมาณการแสดงออกลดลงในระยะที่ 2 ดอกตูมขนาดกลาง และ ระยะที่ 3 ดอกตูมขนาดใหญ่ และมีปริมาณการแสดงออกน้อยที่สุด ในระยะที่ 4 และระยะที่ 5 เมื่อดอกใกล้จะบาน เมื่อเปรียบเทียบการปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกสีขาวยและกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู พบว่า ในกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู มีปริมาณการแสดงออกของยีนมากกว่ากลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกสีขาว ในทุกๆ ระยะการพัฒนา จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงมีปริมาณการแสดงออกมากที่สุดในช่วงระยะดอกตูมในช่วงแรก จากนั้นปริมาณการแสดงออกจะลดลงเมื่อดอกมีการพัฒนามากขึ้นจนถึงช่วงระยะดอกบาน จะมีการแสดงออกของยีน *CHS* น้อยที่สุด การศึกษาการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกไม้ของพืชหลายชนิดที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ พบว่า รูปแบบการแสดงออกของยีน *CHS* ในดอกบัวหลวงบุณฑริกดอกสีขาวคล้ายกับในดอกลิลลี่ดอกสีเหลืองอ่อนการศึกษาของ Nakatsuka *et al.* (2003) พบว่า ในดอกลิลลี่เอเซีย (*Lilium hybrida*) cv. Connecticut King ดอกสีเหลืองอ่อน พบว่า มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* น้อย ทุกระยะการพัฒนาของดอก แต่ในดอกลิลลี่สีชมพู cv. Montreux มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* น้อยในระยะดอกตูม และมีปริมาณการแสดงออกมากขึ้นเมื่อดอกบาน รูปแบบการแสดงออกของยีน *CHS* ในดอกบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู คล้ายกับที่รูปแบบในดอกพิทูเนีย ในการศึกษาของ To and Wang (2006) พบว่าในดอกพิทูเนียสีม่วงเข้ม (*Petunia hybrida* cv. Ultra Blue) มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากในกลีบดอกระยะดอกตูม และลดลงเมื่อดอกบาน และในการศึกษาของ Koseki *et al.* (2005) พบว่าในดอกพิทูเนียแบบ star type สีขาว-แดง (*Petunia hybrida* cv. Red Star) กลีบดอกส่วนที่เป็นสีแดง มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากในกลีบดอกระยะดอกตูม และลดลงเมื่อดอกบาน รูปแบบการแสดงออกของยีน *CHS* คล้ายกับการแสดงออกในกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู แต่ในกลีบดอกสีขาว กลับมีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* น้อยในทุกระยะการพัฒนาของดอก การแสดงออกของยีนคล้ายกับในกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกสีขาว ตัวอย่างรูปแบบการแสดงออกของยีน *CHS* ของพืชอื่นที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ เช่น ในการศึกษาของ Nakatsuka *et al.* (2005a) พบว่าในดอก gentian (*Gentiana triflora*) cv. Maciry ดอกสีน้ำเงินเข้ม มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มาก และปริมาณคงที่ในทุกระยะการพัฒนาของดอก ส่วน cv. Homoi ดอกสีขาว และ cv. Polano White ดอกสีขาวเหลืองชมพู มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากในกลีบดอกระยะดอกตูม และลดลงเมื่อดอกบาน ในการศึกษาของ Han *et al.* (2005) พบว่าในดอกกล้วยไม้ *Phalaenopsis hybrida* cv. Formosa rose ดอกสีชมพู มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากในกลีบดอกระยะดอกตูม และลดลงเมื่อดอกบาน ในการศึกษาของ วิภารัตน์ และคณะ (2555) พบว่าในกล้วยไม้หวาย *Dendrobium* spp. cv. Kaosanan ดอกสีขาว มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากในกลีบดอกระยะดอกตูม และลดลงเมื่อดอกบาน แต่ในกล้วยไม้หวาย *Dendrobium* spp. cv. Red bull ดอกสีแดง มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* น้อยมากในระยะดอกตูม และมีปริมาณการแสดงออกเพิ่มขึ้น เมื่อดอกเริ่มบาน ในการศึกษาของ Mato *et al.* (2000) พบว่าในดอกคาร์

เช่น Sim carnations (*Dianthus caryophyllus*) ดอกสีขาวและสีขาวยาวข้าง มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากในกลีบดอกกระยะดอกตูม และลดลงเมื่อดอกบาน แต่ในดอกสีแดงเข้ม มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มาก และปริมาณคงที่ในทุกระยะการพัฒนาดอก

การที่ดอกบัวหลวงมีดอกสีขาวและสีชมพูเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนหลายยีนในกระบวนการ flavonoids biosynthesis (Koseki *et al.* 2005, Ohno *et al.* 2011) ในดอกไม้หลายชนิดที่มีสีมีการสะสมสาร flavonoids มากกว่าในดอกไม้สีขาว และพบว่ามีแสดงออกของยีน *CHS* และยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ flavonoids biosynthesis ในดอกไม้สีขาว มีการแสดงออกของยีน *CHS* น้อยมากหรือไม่มีเลย จึงทำให้ดอกไม้ไม่มีสีหรือมีสีขาว (Koseki *et al.*, 2005, Ohno *et al.*, 2011) การเพิ่มหรือลดปริมาณ mRNA ของยีน *CHS* อาจมีผลทำให้ดอกไม้มีสีที่เปลี่ยนไปจากเดิมได้ (Forkmann and Martens, 2001, Nakasuka *et al.*, 2008) หรือทำให้สีของผลไม้เปลี่ยนแปลงไปได้ (Hoffmann *et al.* 2006) การแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงสีขาวที่มีปริมาณการแสดงออกของยีนน้อยกว่าในดอกบัวหลวงสีชมพู อาจเกิดจากเกิดจากการแสดงออกของยีน *CHS* ที่น้อย อาจเนื่องมาจากยีนมีการทำงานที่ผิดปกติจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ หรือกระบวนการยับยั้งการทำงานของยีนในธรรมชาติ (Tuteja *et al.* 2009) จึงไม่สามารถสร้าง mRNA มากพอที่จะไปสร้างเอนไซม์ *CHS* เพื่อสังเคราะห์สาร flavonoid ทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์ flavonoid หรือเกิดการสังเคราะห์ flavonoid น้อยมาก ทำให้ดอกบัวหลวงสีขาวไม่มีสี

5.2.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน *F3H*

5.2.2.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน *F3H* ในกลีบดอกอุบลชาติสีต่างๆ ด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

จากการคัดเลือกตัวแทนอุบลชาติจากกลุ่มสีต่างๆ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *F3H* กับสีของกลีบดอก พบการแสดงออกของยีน *F3H* ในกลีบดอกอุบลชาติฉลองขวัญซึ่งมีกลีบดอกสีม่วงเข้ม ฟ้ามุขพันธุ์กลีบดอกสีฟ้า ปิยะลาภกลีบดอกสีชมพู แสดชัยพลกลีบดอกสีชมพูอมส้ม เชนหลุยส์โกลด์กลีบดอกสีเหลือง และลูกผสม PW5409 hybrid กลีบดอกสีม่วงอมเหลือง ทั้งนี้ (Zhu *et al.* 2012) พบว่าสีในกลีบดอกอุบลชาติและปทุมชาติ เป็นสีในกลุ่มของแอนโทไซยานิน ซึ่งยีน *F3H* เป็นยีนที่มีความสำคัญในวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Qwens *et al.* 2008) และมีบทบาทในการสะสมของแอนโทไซยานินในแวคิวโอล (Ageorges *et al.* 2006) จึงมีการแสดงออกในกลีบดอกของอุบลชาติสีต่างๆ นอกจากนี้ยังมีรายงานพบการแสดงออกของยีน *F3H* ในกลีบดอกไม้หลายชนิด เช่น ดอกหรือดกลีบดอกสีม่วง (Nakatsuka *et al.* 2005b) ดอกพริกกลีบดอกสีม่วง (Deng *et al.* 2012) ดอกยาสูบกลีบดอกสีชมพู (Nakatsuka *et al.* 2007) ดอกพิทูเนียกลีบดอกสีชมพู (Lukačič *et al.* 2000) ดอกแวมมูรากลีบดอกสีม่วงเข้ม (Aida *et al.* 2000a) และดอกคาร์เนชั่นกลีบดอกสีส้ม (Zuker *et al.* 2002)

5.2.2.2 การศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* ในปทุมชาติและอุบลชาติด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H* ระหว่างกลีบดอก เกสร และใบของอุบลชาติพันธุ์เซนหลุยส์โกลด์ ด้วยวิธีการ semi-quantitative PCR พบว่ายีน *F3H* แสดงออกมากที่สุดในเรื่องเยือกีบดอก รองลงมาคือเนื้อเยื่อเกสร และแสดงออกน้อยมากในเรื่องเยื่อใบ (ภาพที่ 4.20) เนื่องจาก ฟลาโวนอยด์เป็นรงควัตถุที่ให้สีเหลืองในกลีบดอกไม้และเป็นสัญญาณกระตุ้นให้แมลงเข้าผสมเกสร(Nakatsuka *et al.* 2005a) ดังนั้นยีน *F3H* จึงมีการแสดงออกในส่วนของกลีบดอกและเกสรมากกว่าใบ ผลการทดลองสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *F3H* ในพืชชนิดต่างๆ เช่น ในดอกหรีด (*Gentiana triflora*) พบการแสดงออกของยีน *F3H* ในกลีบดอกแต่แทบไม่พบการแสดงออกในใบ (Nakatsuka *et al.* 2005a) ในสตรอเบอร์รี่ (*Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis* f. *patagonica*) พบการแสดงออกของยีน *F3H* มากในไหล ราก ผล และดอกตามลำดับ แต่ในใบมีการแสดงออกน้อยมาก (Salvatierra *et al.* 2010) และในแอปเปิ้ลพันธุ์ Fuji (*Malus domestica* Borkh. cv. Fuji) พบการแสดงออกของยีน *F3H* ในส่วนของผลมากที่สุด รองลงมาคือเปลือกผล ราก ต้นกล้า และตาดอกตามลำดับ และไม่พบการแสดงออกของยีน *F3H* ในใบ (Kim *et al.* 2003) แต่ Shen *et al.* (2006) พบการแสดงออกของยีน *F3H* มากในใบของต้นแปะก๊วย (*Ginkgo biloba*)

ผลการศึกษากำหนดปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อเกสร และกลีบดอกของปทุมชาติสี่ตบงกชทั้ง 3 ระยะการพัฒนาดอกด้วยปฏิกิริยา semi-quantitative PCR โดยการเปรียบเทียบจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอบนเจล พบว่าเนื้อเยื่อกลีบดอกระยะที่ 1 ของปทุมชาติสี่ตบงกชมีปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* มากที่สุด และปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* จะลดลงในกลีบดอกระยะที่ 2 และระยะที่ 3 ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* ในกลีบดอกปทุมชาติสี่ตบงกชในแต่ละระยะการพัฒนาดอกสอดคล้องกับสีกลีบดอก โดยกลีบดอกระยะที่ 1 มีสีชมพูเข้มมากที่สุด รองลงมาคือ ระยะที่ 2 และระยะที่ 3 ตามลำดับ ในเนื้อเยื่อเกสรพบการแสดงออกของยีน *F3H* ในระยะที่ 3 มากที่สุด เนื่องจากเกสรในระยะที่ 3 มีการพัฒนาจากเกสรเป็นกลีบดอกและมีส่วนของสีชมพูจึงพบการแสดงออกของยีน *F3H* การแสดงออกของยีน *F3H* ในปทุมชาติชนิดอื่นๆพบว่า เนื้อเยื่อกลีบดอกระยะที่ 2 มีการแสดงออกของยีน *F3H* มากที่สุด รองลงมาคือ กลีบดอกระยะที่ 1 และไม่พบการแสดงออกในกลีบดอกระยะที่ 3 ซึ่งการแสดงออกของยีน *F3H* ในกลีบดอกสอดคล้องกับสีของกลีบดอกปทุมชาติ ชนิดอื่นๆที่มีสีชมพูอ่อนเจืออยู่บริเวณปลายกลีบในระยะที่ 1 และชัดเจนในระยะที่ 2 จากนั้น สีชมพูจะหายไปในระยะที่ 3 (ภาพที่ 4.22) Nakatsuka *et al.* (2005a) ศึกษาการแสดงออกของยีนในวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานินในดอกหรีดในระยะการพัฒนาดอก 4 ระยะ คือ ระยะดอกตูมกลีบดอกไม้ไม่มีสี ความยาวของดอกน้อยกว่า 30 มิลลิเมตร ระยะดอกตูมกลีบดอกสีม่วงอ่อน ความยาวของดอก 30-40 เซนติเมตร ระยะดอกตูมกลีบดอกสีม่วง ความยาวของดอก 40-50 เซนติเมตร และระยะดอกบานเต็มที่กลีบดอกสีม่วง พบยีน *F3H* แสดงออกของในดอกหรีดในระยะที่ 1 เพียงเล็กน้อยเท่านั้น การแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในระยะที่ 2 และแสดงออกมากที่สุดในระยะที่ 3 จากนั้นการแสดงออกลดลงในระยะที่ 4 และพบว่าสอดคล้องกับปริมาณแอนโทไซยานินในกลีบดอกโดยพบว่าปริมาณแอนโทไซยานินในกลีบดอกหรีดจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ระยะที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 169 และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และจะมากที่สุดในระยะที่ 3 และลดลงในระยะที่ 4 และ Castellarin *et al.* (2007) พบว่าเมื่อปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* เพิ่มขึ้นมีผลให้การสะสมของแอนโทไซยานินในผลองุ่นเพิ่มขึ้น

5.2.3 การแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกลินมังกรสีต่างๆ

การศึกษากการแสดงออกของยีน 4'CGT ในดอกลินมังกรพันธุ์ Pixie Bells ดอกสีเหลือง สีชมพู สีม่วง และ สีขาว และ พันธุ์ Cameo ดอกสีส้มและแดงด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) พบว่าดอกลินมังกรแต่ละสีที่นำมาศึกษามีระดับการแสดงออกของยีน 4'CGT ที่แตกต่างกัน โดยพบว่าในดอกสีเหลืองมีปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT มากที่สุด รองลงมาคือดอกสี ส้ม แดง ขาว ชมพู และพบการแสดงออกน้อยที่สุดในดอกสีม่วง ทั้งนี้เนื่องมาจากในแต่ละสีดอกมีเอ็นทีควบคุมการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันเช่นในดอกสีแดงหรือสีส้มยีนที่มีบทบาทสำคัญคือ *DFR* ซึ่ง Nakatsuka *et al.* (2007) ได้ศึกษากการผลิตดอกยาสูบสีแดงโดยยับยั้งการแสดงออกของยีน *FLS* และ *F3'H* ของดอกยาสูบสีชมพู ด้วยเทคนิค RNAi ร่วมกับการถ่ายยีน *DFR* ที่ได้จากเยอร์บีร่าเพื่อให้มีการสะสมสาร pelargonidin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแอนโทไซยานินและสามารถผลิตดอกยาสูบสีส้มได้ แสดงให้เห็นว่ายีน *DFR* มีบทบาทสำคัญในการผลิตดอกไม้ในกลุ่มดอกสีส้ม เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Tsuda *et al.* (2004) ที่ศึกษากการผลิตดอกพิทูเนียสีส้มโดยยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3'H* ด้วยเทคนิค RNAi ในดอกสีแดงที่มีการสะสมสาร cyanidin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน และเมื่อถ่ายยีน *DFR* ที่ได้จากกุหลาบเพิ่มเข้าไปพบว่าได้ดอกยาสูบสีส้ม แสดงให้เห็นว่ายีน *F3'H* มีบทบาทสำคัญในการผลิตดอกไม้ในกลุ่มดอกสีแดงรวมถึงในกลุ่มดอกสีชมพูด้วย รายงานของ Ueyama *et al.* (2002) พบว่าเมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3'5'H* ในดอกแวมมยุราพันธุ์ summerwave blue ที่เป็นดอกสีม่วง ทำให้ได้ดอกแวมมยุราสีชมพูอ่อนและเมื่อนำต้นแวมมยุราดอกสีชมพูอ่อนมาถ่ายยีน *F3'H* ซึ่งได้ดอกแวมมยุราสีชมพูเข้ม สำหรับดอกสีม่วงเป็นดอกที่มีการสะสมแอนโทไซยานินชนิด delphinidin ที่เป็นผลผลิตจากยีน *F3'5'H* โดย Katsumoto *et al.* (2007) พบว่าการถ่ายยีน *F3'5'H* จาก viola คู่กับการยับยั้งยีน *DFR* ในดอกกุหลาบสามารถทำให้ดอกกุหลาบมีการผลิตสาร delphinidin มากขึ้นและมีสีดอกกุหลาบที่เปลี่ยนไปทางสีม่วงมากขึ้น ส่วนในดอกสีขาวพบว่ายีน *CHS* นั้นมีบทบาทสำคัญโดยมีรายงานของ Van Der Krol *et al.* (1990) ที่รายงานผลการยับยั้งยีน *CHS* ในดอกยาสูบจากเดิมที่เป็นดอกสีชมพูและเมื่อยับยั้งยีน *CHS* ด้วยเทคนิค antisense สามารถทำให้เกิดดอกยาสูบสีขาวได้ แสดงให้เห็นว่ายีน *CHS* มีบทบาทสำคัญที่ทำให้ดอกไม้เป็นสีขาวได้ ในขณะที่ยีน 4'CGT มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สารในกลุ่มออโรนที่ให้โทนสีเหลืองในกลีบดอกลินมังกร ซึ่ง Ono *et al.* (2006) ได้ศึกษากการเปลี่ยนแปลงสีของดอกแวมมยุราจากดอกสีม่วงที่มีการสะสมสารในกลุ่มแอนโทไซยานินและให้โทนสีม่วง ภายหลังจากการยับยั้งยีน *DFR* ควบคู่กับการถ่ายยีน 4'CGT และ AS พบว่าดอกแวมมยุรามีการเปลี่ยนแปลงจากดอกสีม่วงเป็นดอกสีเหลืองสดทั้งดอก ดังนั้นระดับการแสดงออกของยีน 4'CGT จึงมีผลต่อการสังเคราะห์สารสีภายในเซลล์ จากการทดลองสามารถพบระดับการแสดงออกของยีน 4'CGT ได้มากที่สุด ในดอกสีเหลือง

5.3 ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* และยีน *4'CGT* ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi)

5.3.1 การแสดงออกของยีน *F3H* ในกลีบดอกอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสดงช่ยพล ภายหลังจากการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi)

การเลือกบริเวณ mRNA เป้าหมายในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi ได้เลือกบริเวณตำแหน่งอนุรักษ์ของยีน *F3H* ในตำแหน่งที่ 336-644 เพื่อให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ในชุดอื่นบนโครโมโซมของปทุมชาติสัตตบงกชด้วยเนื่องจาก นางลักษณ์ เภรินทวงศ์ และคณะ (2552) รายงานว่า จำนวนชุดของยีน *F3H* ในปทุมชาติสัตตบงกชมีมากกว่า 1 ชุด และขึ้นส่วนดีเอ็นเอ เป้าหมายที่ใช้มีขนาด 308 นิวคลีโอไทด์ ทั้งนี้ Heilersig *et al.* (2006) รายงานว่าการใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เป้าหมายขนาดประมาณ 150 นิวคลีโอไทด์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNAi มีประสิทธิภาพดีกว่าชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500-600 นิวคลีโอไทด์ และ Fukusaki *et al.* (2004) การเลือกบริเวณ ORF ของยีนเป็น mRNA เป้าหมายให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ดีกว่าการเลือกบริเวณ 3' UTR

จากการสังเกตสีของกลีบดอกอุบลชาติภายหลังจากการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJAWOHL8 หรือเวคเตอร์ pJA8*F3H* ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะในกลีบดอกของอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสดงช่ยพล ที่เลี้ยงในที่โล่งแจ้งเป็นเวลา 3 วัน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสีกลีบดอกในทั้งกลีบดอกที่มีการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJAWOHL8 หรือเวคเตอร์ pJA8*F3H* ด้วยวิธีการ infiltration เมื่อเปรียบเทียบกับสีของกลีบดอกที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ (ภาพที่ 4.28) ทั้งนี้เนื่องจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ที่เกิดขึ้นไม่เพียงพอที่จะทำให้สีของกลีบดอกอุบลชาติทั้ง 2 พันธุ์เปลี่ยนแปลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nagamatsu *et al.* (2009) ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3'H* ในต้นถั่วเหลืองด้วยเทคนิค RNAi โดยการถ่ายยีนด้วยวิธีการ virus-induced gene silencing (VIGS) พบว่าต้นถั่วเหลืองที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ CMV-A1:*F3'H* (RNAi) และเลี้ยงในเรือนเพาะชำไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายนอกของต้นถั่วเหลือง แต่การแสดงออกของยีน *F3'H* ในใบถั่วเหลืองลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์เปล่า (control) ที่เลี้ยงในเรือนเพาะชำ และพบการเปลี่ยนแปลงของสีขนอ่อนบนฝักถั่วเหลืองเป็นบริเวณแคบๆ จากสีส้มอมน้ำตาลกลายเป็นสีส้มอมเทาในต้นถั่วเหลืองที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ CMV-A1:*F3'H* (RNAi) ที่เลี้ยงในตู้ควบคุมการเจริญเติบโตภายหลังจากได้รับการถ่ายยีน และการแสดงออกของยีน *F3'H* ในใบถั่วเหลืองลดลงถึง 97.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์เปล่า (control) ที่เลี้ยงในเรือนเพาะชำ

จากการศึกษาหน้าที่ของยีน *F3H* ในกลีบดอกอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสดงช่ยพล ภายหลังจากการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNAi พบว่ากลีบดอกอุบลชาติที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJAWOHL8 (control) ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีเชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ ทั้งในอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสดงช่ยพล มีปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* มากที่สุด รองลงมาคือกลีบดอกอุบลชาติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และกลีบดอกที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJA8*F3H* (RNAi) มีการ

แสดงออกน้อยมากอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบกับกลีบดอกที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 (control) ทั้งนี้ปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* ที่เพิ่มขึ้นในกลีบดอกอุบลชาติที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 เมื่อเปรียบเทียบกับกลีบดอกที่ไม่ได้รับการถ่ายโอน คาดว่าเกิดจากการตอบสนองของอุบลชาติต่อความเครียดทางออสโมติก (osmotic stress) จากการที่ได้รับการฉีดอัดสารแขวนลอยเซลล์เข้าสู่ด้านล่างกลีบดอกทำให้แรงดันออสโมติกภายในเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง จากรายงานพบว่าความเครียดทางออสโมติกมีผลให้ แอนโทไซยานินมีการสะสมที่เพิ่มขึ้นในพืชหลายชนิด เช่น เซลล์องุ่น (Comier *et al.* 1990) ต้นหม่อน (Ramanjulu *et al.* 1993) รากข้าวโพด (Kaliamoorthy and Rao. 1994) ใบ *Arabidopsis* (Mita *et al.* 1997) และพบว่าต้นป๊อปเปลาร์ [(*Populus deltoides* (Marsh) Bartr, var. *occidentalis* (Rydb.))] มีการแสดงออกของยีนในวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นเนื่องจากความเครียดทางออสโมติก (Tholakalabavi *et al.* 1997) ถึงแม้ว่าวิธีการ infiltration จะทำให้เกิดความเครียดทางออสโมติกในพืชแต่พบว่าเป็นวิธีการที่ให้ผลดีในการศึกษาการแสดงออกของยีนในพืชหลายชนิด Shang *et al.* (2007) ได้ถ่ายยีน *GUS* และ *GFP* ลงในกลีบดอกยาสูบและกลีบดอกพิทูเนียตามลำดับ ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีเชื้ออะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ LBA4404 เป็นพาหะ ภายหลังจากถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วัน พบการแสดงออกของยีน *GUS* ในกลีบดอกยาสูบเมื่อตรวจสอบด้วยสารละลาย 5-bromo-4-chloro -3-indolyl glucuronide (X-Gluc) พบบริเวณจุดสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อกลีบดอกยาสูบ และพบการเรืองแสงของโปรตีน *GFP* ในเนื้อเยื่อเซลล์กลีบดอกพิทูเนียเมื่อนำไปตรวจสอบภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ Zottini *et al.* (2008) ได้ทำการถ่ายยีน *GFP* ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีเชื้ออะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ GV3101 เป็นพาหะในใบองุ่นที่เพาะเลี้ยงในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภายหลังจากถ่ายยีนเป็นเวลา 6 วัน พบการแสดงออกของโปรตีน *GFP* ในเนื้อเยื่อใบองุ่นภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ และกระจายไปที่บริเวณใบภายในเวลา 12 วันภายหลังจากถ่ายยีน

ในกลีบดอกอุบลชาติแสดงยีนต้นที่ 3 แสดงผลยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* น้อยมากในกลีบดอกที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJA8*F3H* ทั้งนี้อาจเกิดจากการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ไม่สมบูรณ์ Nishihara *et al.* (2005) ทดลองยับยั้งการแสดงออกของยีน *CHI* ด้วยเทคนิค RNAi ในต้นยาสูบ 7 ต้น พบต้นที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *CHI* ไม่สมบูรณ์จำนวน 2 ต้น

การแสดงออกของยีน *F3H* ลดลงอย่างเห็นได้ชัดในกลีบดอกที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJA8*F3H* (RNAi) เมื่อเปรียบเทียบกับกลีบดอกที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 (control) ทั้งนี้เกิดจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยกระบวนการ RNAi จากการถ่ายยีนด้วยวิธีการ infiltration โดยมี อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะในกลีบดอกอุบลชาติทั้ง 2 ชนิด ซึ่งการทดลองยับยั้งการแสดงออกของยีนนี้ประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด เช่น Shang *et al.* (2007) ได้ทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CHS* และยีน *Rosea1* ซึ่งเป็นยีนทำหน้าที่ transcription factor ด้วยเทคนิค RNAi ในตาดอก ลิน่มังกรโดยวิธีการยิงอนุภาค (particle bombardment) จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร Murashige and Skoog (MS) ในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าตาดอกที่เจริญบนอาหาร MS ภายหลังจากถ่ายยีนเป็นเวลา 8 วัน เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีกลีบดอกลิน่มังกรจาก สีแดงเป็นสีขาว

5.3.2 การยับยั้งการแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกลินินมังกรสีเหลืองพันธุ์ Pixie Bells ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi)

ยับยั้งการแสดงออกของยีน 4'CGT ด้วยเทคนิค RNAi ภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT เข้าสู่กลีบดอกลินินมังกร พบว่ากลีบดอกลินินมังกรที่ได้รับการถ่ายโอน พลาสมิด pJA8-4'CGT ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีดอก อาจเนื่องจากยีนที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงสีดอกเป็นยีนที่ทำงานร่วมกันกับยีนอื่น (multiple genes) ในกระบวนการสังเคราะห์สารสี (Ono *et al.* 2006) ดังนั้นการยับยั้งการแสดงออกของยีน 4'CGT เพียงยีนเดียวอาจยังไม่เพียงพอต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกลินินมังกรที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4'CGT พบว่าดอกลินินมังกรที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4'CGT จำนวน 3 ดอก จากทั้งหมด 7 ดอก ไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน 4'CGT ทั้งนี้อาจเกิดจากการรบกวนบริเวณ attL ระหว่างทำปฏิกิริยา LR และมีผลต่อการเกิดโครงสร้าง hairpin RNA ภายในเซลล์พืช (Helliwell and Waterhouse. 2003)

5.4 การถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง

5.4.1 ศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้นและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

ผลการศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะ ชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร และชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าส่วนชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด มีคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด ซึ่งมีลักษณะสอดคล้องกับการศึกษาการเจริญเติบโต และการเกิดยอดของเอมบริโอจีนิกแคลลัส ของกล้วยไม้ *Oncidium* (Gower Ramsey) (Jheng *et al.* 2006) พบว่าชิ้นส่วนปลายยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2 MS (1962) ที่เติม 2,4-D 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.45 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดแคลลัสได้

ชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยแคลลัสสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด มีขนาดและคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยแคลลัสจะมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน สีขาว ซึ่งมีลักษณะตรงข้ามกับการศึกษาของ ภควดี (2548) ซึ่งพบว่าชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดไซมาติกเอมบริโอได้ดีที่สุด แต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของกุหลาบพันธุ์ลูกผสมระหว่าง Carl Red และ *Rosa canina* ในอาหารสูตร MS (1962) ที่มี NAA 1.3-26.8 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.23 ไมโครโมลาร์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดอิมบริโอจินิกแคลลัสได้ดีที่สุด (Visessuwan *et al.* 1997) และสอดคล้องกับการศึกษาของจิตเกษม (2545) ที่พบว่าชิ้นส่วนยอดจากคัพภะมีคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.25 ไมโครโมลาร์ และสอดคล้องกับการศึกษาของ วิลาสิณี (2550) ที่พบว่าชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ มีคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสสูงที่สุด พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะนาน 4 สัปดาห์ชิ้นส่วนจะสร้างแคลลัสขึ้นที่บริเวณรอยตัด เนื่องจากบริเวณรอยตัดมีการตอบสนองต่อสารต่างๆได้ก่อนบริเวณอื่น และมีการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ดีกว่าเซลล์ข้างใน (คำณูญ, 2542) และยังใกล้เคียงกับการศึกษาของ Yang *et al.* (2009) ที่ศึกษาผลของ mannitol, abscisic acid (ABA) และอายุของชิ้นส่วนเริ่มต้น (ขนาด) โดยใช้ชิ้นส่วนอิมบริโอขนาด น้อยกว่า 3 มิลลิเมตร, 4-5 มิลลิเมตร, 6-8 มิลลิเมตร และมากกว่า 8 มิลลิเมตร ที่มีผลต่อการเกิดไซมาติกอิมบริโอจินิกซิสและการเกิดยอดของ Chinese soybean (*Glycine max* L. Merr.) พบว่าชิ้นส่วนอิมบริโอที่มีขนาดน้อยกว่า 3 มิลลิเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและไซมาติกอิมบริโอต่ำกว่าชิ้นส่วนที่มีขนาด 4-5 มิลลิเมตร ที่สามารถชักนำให้เกิดไซมาติกอิมบริโอได้ดีที่สุด บนอาหารสูตร MS (1962) ที่มี mannitol 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ ABA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม ขนาดของเนื้อเยื่อที่เล็กที่สุดที่มีประสิทธิภาพ เป็นสิ่งที่ควรพิจารณา เนื่องจากเนื้อเยื่อเจริญที่มีขนาดเล็กเกินไปอาจโตช้า และไม่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเท่าเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่ (รังสฤษดิ์, 2540)

ส่วนชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร นั้น สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี picloram 24.8 ไมโครโมลาร์ โดยมีขนาดและคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยแคลลัสจะเกิดขึ้นที่บริเวณรอยตัดของชิ้นส่วน และมีลักษณะเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ สีเขียวอ่อนซึ่งแคลลัสที่เกิดขึ้นจะเป็นสีเขียวจนถึงสัปดาห์ที่ 6 จากนั้นจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย ซึ่งมีลักษณะตรงข้ามกับ การศึกษาการชักนำการเกิดไซมาติกอิมบริโอจินิกซิสของ *Alstroemeria* พบว่าแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม IAA 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 10 ไมโครโมลาร์ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม picloram 20.8 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเกิด ไซมาติกอิมบริโอได้ (Kim *et al.* 2006)

5.4.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดจากแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุญทริก

ผลของการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดของชิ้นส่วนแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุญทริก โดยนำชิ้นส่วนแคลลัสที่ได้มาจากการเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความ

เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ พบว่าชิ้นส่วนแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ โดยมีขนาดแคลลัสและจำนวนยอดสูงที่สุด และสอดคล้องกับการศึกษาผลของ BA ต่อการชักนำการเกิดยอดของ *Zantedeschia aethiopica* (Green Goddess) (Kozak and Stelmaszczuk, 2009) พบว่าชิ้นส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดยอด (axillary shoots) ได้มากที่สุด ซึ่ง BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ที่นิยมใช้มากในการแก้ไข apical dominance ของหน่อข้าง และในการเพิ่มจำนวนยอด พืชส่วนมากเปลี่ยนแปลงพัฒนาเป็นอวัยวะถ้าได้รับฮอร์โมน 2 กลุ่มคือ ออกซิน และไซโตไคนิน ทั้งนี้ผันแปรขึ้นกับชนิดพืช ระยะเวลาเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืช และระดับหรือสัดส่วนของฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดที่ใช้ในสูตรอาหาร คือถ้าสัดส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินสูงขึ้น (ไซโตไคนินมากกว่าออกซิน) จะกระตุ้นการเกิดยอด ยกเว้นในพืชบางชนิดที่ต้องการไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว แต่ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูงขึ้น (ออกซินมากกว่าไซโตไคนิน) จะกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเพื่อกำเนิद्रาก (รังสฤษดิ์, 2540)

5.4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีน Antisense Dihydroflavonol 4-Reductase (anti-DFR) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

ผลของการศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้น และวิธีการที่เหมาะสม ต่อการถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He ที่มีพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR ในชิ้นส่วนยอดและตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร โดยชิ้นส่วนยอดได้จากการนำชิ้นส่วนแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* แบบชั่วคราว (transient expression) โดยวิธี *GUS* histochemical assay พบว่า ชิ้นส่วนยอดที่ให้จำนวนจุดสีน้ำเงินสูงที่สุดคือ การยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร ซึ่งให้จำนวนจุดเฉลี่ย 4.8 จุดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ส่วนการยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร และการยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,350 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 และ 9 เซนติเมตร ไม่เกิดจุดสีน้ำเงินจากการแสดงออกของยีน *GUS* แบบชั่วคราว จากนั้นนำชิ้นส่วนยอดที่เจริญเติบโตได้หลังจากเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 8 สัปดาห์มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ด้วยวิธีพีซีอาร์ กลับพบว่า พบยีน *GUS* ในทุกวิธีการ ซึ่งไม่ตรงกับผลการตรวจสอบด้วยวิธี *GUS* histochemical assay ทั้งนี้เนื่องจากชิ้นส่วนที่นำมาทดสอบด้วยวิธี *GUS* histochemical assay มีจำนวนน้อย จึงมีโอกาสให้ชิ้นส่วนที่นำมาทดสอบนั้นจะเป็นชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ส่วนการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* แบบชั่วคราว (transient expression) โดยวิธี *GUS* histochemical assay ของชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ขนาด 3 มิลลิเมตร พบว่า มีจุดสีน้ำตาลเกิดขึ้นในทุกวิธีการทดลอง และขึ้นส่วนตายออกจากคัพภะที่ให้จำนวนจุดสีน้ำตาลสูงที่สุดคือ การยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร ซึ่งให้จำนวนจุดเฉลี่ย 26.11 จุดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ จากนั้นนำขึ้นส่วนตายออกจากคัพภะที่เจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือกมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่า พบยีน *GUS* ในทุกวิธีการ เช่นเดียวกัน

เมื่อนำขึ้นส่วนยอดและตายออกจากคัพภะที่ได้รับการถ่ายยีนมาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าขึ้นส่วนยอดที่มีสภาพการถ่ายยีนโดยใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และที่ระยะห่างจากเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร มีการเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ดีที่สุด ส่วนขึ้นส่วนตายออกจากคัพภะหลังจากถ่ายยีนนำมาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ และ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าขึ้นส่วนตายออกจากคัพภะที่มีสภาพการถ่ายยีนโดยใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และที่ระยะห่างจากเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร มีการเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ดีที่สุด จากนั้นนำต้นที่รอดจากการเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลวบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ (Shou *et al.* 2008) ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดของบัวหลวงพันธุ์นุชกริก พบว่าขึ้นส่วนยอดที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และที่ระยะห่างจากเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร ขึ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุดเช่นเดียวกัน แต่เนื้อเยื่อส่วนใหญ่ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและตายหลังจากที่เพาะเลี้ยงได้ 8 สัปดาห์ จากการทดลองนี้การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค พบว่าสามารถทำให้ประสิทธิภาพการพัฒนาเป็นยอดของขึ้นส่วนยอดและตายออกจากคัพภะภายหลังการถ่ายยีนเพียง 31.67 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ข้อมูลดังกล่าวได้มาจากการนำจำนวนขึ้นส่วนที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้คูณหนึ่งร้อยและหารด้วยจำนวนขึ้นส่วนที่ใช้ทั้งหมด) ซึ่งนับว่าน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ ที่มีผลสำเร็จต่อการถ่ายยีน เช่น ขนาดและชนิดของอนุภาค ระดับของ stopping screen ระยะของ gap width เป็นต้น (กิริยา, 2547) นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพในการคัดเลือกการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะจะเพิ่มขึ้น เมื่อนำขึ้นส่วนที่ได้รับการถ่ายยีนมาเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเป็นระยะเวลาหนึ่งก่อนที่จะนำมาเลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะเพื่อลดการตายของขึ้นส่วนที่ยังมีขนาดเล็ก (Gondo *et al.* 2009)

ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* ยีน anti-DFR ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *NPTII* ยีน *GUS* และยีน anti-DFR ด้วยวิธีพีซีอาร์ จากต้นบัวหลวงที่เกิดยอด ภายหลังการคัดเลือกเอกสารเป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์เพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตเห็นใบเขียวประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 176 อังอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และนำมาชักนำให้เกิดยอดบนอาหารที่ไม่มีสารคัดเลือกเป็นเวลา 16 สัปดาห์ จากผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *NPTII* ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *NPTII* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 254 คู่เบส จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *GUS* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 563 คู่เบส และจากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *anti-DFR* ตั้งแต่บริเวณโปรโมเตอร์ *CaMV35S* และเทอร์มินเตอร์ *NOS* ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *anti-DFR* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 คู่เบส ซึ่งพบการมีอยู่ของยีน *NPTII* เพียงอย่างเดียว จำนวน 2 ตัวอย่าง พบการมีอยู่ของยีน *anti-DFR* เพียงอย่างเดียว จำนวน 1 ตัวอย่าง พบการมีอยู่ของยีน *NPTII* และยีน *anti-DFR* แต่ไม่พบการมีอยู่ของยีน *GUS* จำนวน 2 ตัวอย่าง อาจเนื่องจากการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคอาจทำให้บางส่วนของยีนขาดออกจากกัน ส่งผลให้ไม่มีบริเวณลำดับเบสที่ไพรเมอร์ของยีนนั้นสามารถเข้าไปจับ จึงไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ และพบตัวอย่างที่ไม่พบยีน *NPTII* แต่เซลล์มีชีวิตรอดบนอาหารคัดเลือกและสามารถพัฒนาเป็นต้นได้นั้น อาจเนื่องจากมีบางเซลล์ในชิ้นส่วนแคลลัส ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนแต่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ เนื่องจากแคลลัสประกอบด้วยเซลล์หลายชั้น และเมื่อนำมาคัดเลือกบนอาหารแข็ง ที่มีสารปฏิชีวนะ *kanamycin* จะมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารได้บางส่วน ซึ่งจะได้รับสาร *kanamycin* เต็มที่ แต่เนื้อเยื่อส่วนที่อยู่เหนือขึ้นไปซึ่งไม่สัมผัสกับอาหารโดยตรง จะได้รับสารปฏิชีวนะ *kanamycin* โดยการเคลื่อนย้ายขึ้นไปไม่ใช่การสัมผัสโดยตรง และความเข้มข้นของ *kanamycin* ที่เคลื่อนย้ายเข้าไปในเนื้อเยื่ออาจมีการเจือจางลง ทำให้เซลล์ที่อยู่ด้านในของแคลลัส และส่วนของเนื้อเยื่อที่อยู่ด้านบนของแคลลัสไม่ได้สัมผัสกับสารคัดเลือกในความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงมีการเจริญเติบโต และแบ่งเซลล์ได้ตามปกติ (Caltin, 1990)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NPTII* และ ยีน *anti-DFR* ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *NPTII* และยีน *anti-DFR* ด้วยวิธี RT-PCR จากต้นบัวหลวงที่เกิดยอด ภายหลังจากการคัดเลือกเป็นเวลา 8 สัปดาห์ และนำมาชักนำให้เกิดยอดบนอาหารที่ไม่มีสารคัดเลือกเป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 254 คู่เบส ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด *pCAMBIA2301anti-DFR* จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *anti-DFR* ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *anti-DFR* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 คู่เบส ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากพีซีอาร์ของพลาสมิด *pCAMBIA2301 anti-DFR* พบว่าการยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร พบการแสดงออกของทั้ง 2 ยีน คือยีน *NPTII* และยีน *anti-DFR* จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยเป็นการให้ผลการถ่ายยีนแบบถาวรได้ (stable transformation) จึงเป็นสภาพที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคเข้าสู่ชิ้นส่วนยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก พบการแสดงออกของยีน *NPTII* เพียงอย่างเดียว จำนวน 1 ตัวอย่าง และ ไม่พบการแสดงออกของของทั้ง 2 ยีน จำนวน 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 177 และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่าง ซึ่งยีน anti-DFR ที่นำมาใช้ในการถ่ายยีนครั้งนี้ได้มาจากดอกปทุมมา เนื่องจากยังไม่มีลำดับเบสของยีน DFR ในบัวหลวงพันธุ์นุชทริกจึงทำให้ไม่สามารถตรวจสอบการยับยั้งการแสดงออกของยีน anti-DFR ได้ ในการทำ RT-PCR จึงให้ผลผลิตพีซีอาร์จากยีน anti-DFR ของดอกปทุมมาที่ถ่ายเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์นุชทริก ไม่ใช่ยีน DFR ที่มีอยู่ในบัวหลวงพันธุ์นุชทริก จึงสรุปผลได้เพียงว่ามีการแสดงออกของยีน anti-DFR คือการถ่ายยีนประสบความสำเร็จ หากต้องการตรวจสอบการยับยั้งการแสดงออกของยีน anti-DFR ของบัวหลวงพันธุ์นุชทริก ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการออกแบบคู่ไพรเมอร์ของยีน DFR จากบัวหลวงพันธุ์นุชทริก และเทคนิคที่นำมาใช้ในการตรวจสอบเพื่อที่จะทราบปริมาณของยีน DFR ของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนต่อไป ซึ่งถ้าพบว่ายีน DFR ของบัวหลวงพันธุ์นุชทริกที่ได้รับการถ่ายยีน anti-DFR มีปริมาณลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน แสดงว่ายีน DFR มีการแสดงออกลดลง

5.4.4 ถ่ายยีน CHS แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ต้นบัวหลวงนุชทริก และบัวหลวงราชินี ด้วยวิธียิงอนุภาค

การศึกษากการแสดงออกของยีน CHS ในต้นบัวหลวงนุชทริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน CHS แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ของต้นบัวหลวงนุชทริกและบัวหลวงราชินีด้วยวิธียิงอนุภาค โดยใช้พลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA ที่มีบางส่วนของยีน CHS แบบ antisense ขนาด 331 คู่เบสที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงนุชทริก และถูกควบคุมด้วย CaMV 35s promoter และ NOS terminator โดยมียีน GFP เป็นยีนรายงานผล และยีน hptII เป็นยีนคัดเลือก หลังจากการคัดเลือกและเพาะเลี้ยงบนอาหาร regeneration พบว่า มีชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงนุชทริกที่ได้รับการถ่ายยีน สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหาร regeneration จำนวน 2 ต้น ทั้ง 2 ต้น พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน GFP ที่บริเวณปลายราก และกาบใบ การเรืองแสงสีเขียวของยีน GFP ในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนพบเฉพาะที่บริเวณรากและกาบใบ แต่ไม่พบในส่วนของใบและลำต้น สอดคล้องกับการทดลองของ Heidi *et al.* (2001) ที่พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน GFP เฉพาะส่วนของราก และกาบใบอ่อนที่ไม่มีสีเขียว ในต้นข้าวสาลีที่ได้รับการถ่ายยีน เนื่องจากการแสดงออกของยีน GFP ในส่วนเนื้อเยื่อที่มีสีเขียวจะถูกคลอโรฟิลล์บดบังและดูดกลืนแสงสีน้ำเงินของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ใช้กระตุ้นให้เกิดการเรืองแสง ทำให้ไม่สามารถมองเห็นการเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จึงสามารถมองเห็นได้เฉพาะในเนื้อเยื่อที่มีคลอโรฟิลล์น้อย 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 โดยพบว่าต้นบัวหลวงนุชทริกทั้ง 2 ต้น พบการมีอยู่ของยีน GFP และ hygromycin ใน genomic DNA แต่เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน CHS ในต้นบัวหลวงนุชทริกที่ได้รับการถ่ายยีน พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 178 อังอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 R5/1 พบการมีอยู่ของยีน GFP และยีน *hptII* ใน genomic DNA แต่ไม่พบการเรียงแสงของยีน GFP การถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาคเป็นการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชโดยตรง เป็นการถ่ายยีนแบบสุ่ม ยีนอาจไม่เข้าไปที่ genomic DNA ทำให้ไม่เกิดการถ่ายยีนเมื่อเกิดการแบ่งเซลล์ เกิดการแสดงออกเพียงชั่วคราว หรือถ่ายยีนเข้าไปในบางส่วนของเนื้อเยื่อพืช เกิดพืชที่มีลักษณะ chimera และยีนที่ถ่ายเข้าไปอาจเกิดการแตกหักและเสียหายได้ ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่ไม่สมบูรณ์ ตามที่ต้องการ (Hansen and Wrigth, 1999)

ในการศึกษาของ Nakatsuka *et al.* (2008) ทำการยับยั้งการทำงานของยีนในกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoid ในต้นหรือดอกลีน้ำเงินเข้ม (*Gentian hybrida* cv. Albireo) ด้วยเทคนิค RNAi mediated gene silencing พบว่า การยับยั้งการทำงานของยีน CHS ทำให้ดอกเปลี่ยนเป็นสีขาวและบางดอกริมรั้วน้ำเงินอ่อนสลบสีขาว ส่วนการยับยั้งการทำงานของยีน *anthocyanin synthase* (ANS) ทำให้ดอกริมรั้วน้ำเงินซีด ในการศึกษาของ Hoffmann *et al.* (2006) ทำการยับยั้งการทำงานของยีน CHS ด้วยเทคนิค *Agrobacterium*-infiltration โดยถ่ายยีน CHS แบบ RNAi เข้าไปในผลสตรอเบอร์รี่ พบว่า สามารถยับยั้งการทำงานของยีน CHS ได้ มีปริมาณการแสดงออกของยีน CHS ลดลง ทำให้ผลของสตรอเบอร์รี่บริเวณที่ได้รับ การถ่ายยีนมีสีเหลืองซีด การศึกษาของ Nakamura *et al.* (2006) พบว่า การยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNAi มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของยีน CHS ในดอกทอเรนเนีย (*Torenia hybrida*) มากกว่าเทคนิค antisense การศึกษาของ Ohno *et al.* (2011) ทำการถ่ายยีน CHS แบบ RNAi เข้าไปยับยั้งการทำงานของยีน CHS ในดอกกรักรั้วสีแดง พบว่า ดอกกรักรั้วมีการแสดงออกของยีน CHS ลดลง ทำให้ดอกกลายเป็นสีขาวซีด มีปริมาณการแสดงออกของยีนเหมือนกับดอกกรักรั้วสีขาว แสดงให้เห็นว่า การที่ดอกไม้มีสีขาวอาจเกิดจากการทำงานที่ผิดปกติของยีน 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 ส่งผลให้ดอกยาสูบมีสีเข้มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากสปีปคิตีซิมพู เป็นสปีซิมพูเข้ม บางต้นมีสีชมพูอมแดง แต่ในการศึกษาของ To and Wang. (2006) พบว่า การถ่ายยีน *CHS* แบบเต็มเส้นเพียงยีนเดียว ไม่เพียงพอในการทำให้สีของดอกยาสูบเข้มขึ้น และมีบางส่วนให้ผลตรงข้ามดอกยาสูบกลายเป็นสีขาว

ในการศึกษานี้ ทำการตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในใบและต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน เนื้อเยื่อแต่ละส่วนมีรูปแบบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน ใบของบัวหลวงมีการแสดงออกของยีนแตกต่างจากในส่วนของกลีบดอก เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ชัดเจนต้องนำต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนไปปลูกและนำดอกบัวหลวงมาศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง และปริมาณของสาร flavonoid ที่สะสมในกลีบดอกบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนเพิ่มเติมการศึกษาการแสดง ออกของยีน *CHS* เพียงยีนเดียวในบัวหลวงยังไม่เพียงพอต่อการหาข้อสรุปบทบาทของยีน *CHS* ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีของดอกบัวหลวง ยังมียีนอีกหลายยีนในกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoid ต้องทำการศึกษาการ บทบาทการทำงานของยีนอื่นเพิ่มเติมต่อไป เพื่อนำความรู้ที่ได้มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ดอกบัวหลวงให้มีสีใหม่เกิดขึ้น

5.4.5 การแสดงออกของยีน 4'CGT ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ภายหลังจากถ่ายยีน 4'CGT โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะและการยิงอนุภาค

การถ่ายโอนยีน 4'CGT เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะโดยคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และอะม็อกซิซิลลิน ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีนได้เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR แต่พบการปนเปื้อนของเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ขึ้นพืชแม้ว่าตามรายงานของ สุภาภรณ์ และคณะ (2547) พบว่าอ็อกเมนดิน ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียได้ 100 เปอร์เซ็นต์ก็ตาม ในการทดลองนี้สารปฏิชีวนะซีฟิแทคซิมที่ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียของต้นบัวหลวงถ่ายยีนได้ ซึ่งแตกต่างจากรายงานของวิลาสินี (2554) ที่ใช้สารปฏิชีวนะซีฟิแทคซิมความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 และพบว่าชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 15.55 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเพียง 2 ต้นที่พบเจอยีน *DFR GUS* และ *NPTII* ในขณะที่ต้นบัวหลวงหยุดการเจริญเติบโต ไม่มีการสร้างใบใหม่จึงไม่สามารถนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ด้วยวิธี GUS histochemical assay ได้ ทั้งนี้ต้นบัวหลวงถูกเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินเป็นเวลานานเกินไป อาจมีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งส่งผลความเป็นพิษต่อเซลล์จึงทำให้เซลล์พืชไม่มีการเพิ่มจำนวน (Miki and Mchuge. 2004) และอาจมีผลให้อัตราการพัฒนาเป็นยอดของชิ้นพืชลดลงได้ โดยที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งการเกิดยอดลดลงกว่าครึ่งหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ control ที่ไม่ได้ใส่สารปฏิชีวนะ (Ling et al. 1998) นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการคัดเลือกต้นถ่ายยีนที่ต้านทานต่อสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ปฏิชีวนะ จะเพิ่มมากขึ้นหากนำชิ้นส่วนที่ได้รับการถ่ายยีนมาเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารปฏิชีวนะเป็นระยะเวลาหนึ่งก่อนที่จะนำมาเลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะเพื่อลดการตายของชิ้นส่วนที่ยังมีขนาดเล็ก (Gondo et al. 2009) เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน 4'CGT ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนโพลัสไมด์ pCAM4'CGT และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน F3H และ CHS ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR พบว่าต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับและที่ได้รับการถ่ายยีนโพลัสไมด์ pCAM4'CGT มีการแสดงออกของยีน F3H และ CHS ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ยีน 4'CGT GUS และ NPTII นั้นสามารถตรวจพบได้เฉพาะในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนโพลัสไมด์ pCAM4'CGT เท่านั้น โดยในงานวิจัยของ Ono et al. (2006) ได้ถ่ายยีน 4'CGT แบบ overexpression เข้าสู่ดอกแวมมูราพบว่าองค์ประกอบฟลาโวนอยด์เช่น แอนโทไซยานินและฟลาโวนซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่ต้องอาศัยยีน F3H ในการสังเคราะห์นั้นยังคงมีการแสดงออกปกติซึ่งไม่แตกต่างกับดอกแวมมูราที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน 4'CGT

การถ่ายยีน 4'CGT เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์มณฑริกด้วยวิธีการยิงอนุภาค สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน 4'CGT ในต้นบัวหลวงที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีนโพลัสไมด์ pCAM4'CGT และตรวจสอบการแสดงออกของยีน F3H และ CHS พบว่ามีการแสดงออกไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนโพลัสไมด์และต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนโพลัสไมด์ pCAM4'CGT ในขณะที่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน 4'CGT GUS และ NPTII ได้เฉพาะในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนโพลัสไมด์ pCAM4'CGT เท่านั้น เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน GUS ด้วยวิธี GUS histochemical assay พบการติดสีฟ้าจางที่ชิ้นส่วนใบและก้านของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนโพลัสไมด์ pCAM4'CGT เพียงบางบริเวณของเนื้อเยื่อซึ่งอาจเกิดจากกิจกรรมการทำงานของยีน GUS ต่ำเนื่องจากเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนโพลัสไมด์ pCAM4'CGT มีจำนวนยีน GUS น้อย ทำให้มีการผลิตเอนไซม์ β -glucuronidase ออกมาอย่างช้าๆและระดับ x-gluc ได้ต่ำ (Gago et al. 2011)

เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน 4'CGT ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,500 นิวคลีโอไทด์ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ Bam HI และ Eco RI โดยตำแหน่งของ Bam HI ตัดบริเวณของยีน 4'CGT และอาจจะมีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ Bam HI หรือ Eco RI ภายในโครโมโซมของบัวหลวงทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4,000 นิวคลีโอไทด์ การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน GUS พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,000 นิวคลีโอไทด์ โดยมีตำแหน่งของ Bam HI ตัดบริเวณของยีน 4'CGT และอีกตำแหน่งอาจจะมีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ Bam HI หรือ Eco RI อยู่ภายในโครโมโซมของบัวหลวง ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,000 นิวคลีโอไทด์ แสดงให้เห็นว่าทั้งยีน 4'CGT และ GUS ได้เข้าไปเชื่อมต่อกันภายในโครโมโซมของต้นบัวหลวง

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

6.1 การโคลนยีนและการแสดงออกของยีน

6.1.1 ยีน *CHS*

โคลนยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ด้วยเทคนิค PCR จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกชมีขนาดเท่ากัน คือ 1,599 คู่เบส ประกอบด้วยส่วน exon 2 ขึ้น ขนาด 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

6.1.2 ยีน *F3H*

การสังเคราะห์ยีน *F3H* โดยใช้ cDNA จากเนื้อเยื่อกลีบดอกอุบลชาติเซนตหลุยส์โกลด์ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุณฑริก เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยา PCR ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,134 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นโปรตีนได้ขนาด 377 กรดอะมิโน พบการแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อกลีบดอกของอุบลชาติฉลองขวัญซึ่งมีกลีบดอกสีม่วงเข้ม ฟ้ามุขพันธุ์กลีบดอกสีฟ้า ปิยะลาภกลีบดอกสีชมพู แสดงขั้วพลกลีบดอกสีชมพูอมส้ม เซนหลุยส์โกลด์กลีบดอกสีเหลือง และลูกผสม PW5409 hybrid กลีบดอกสีม่วงอมเหลือง เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของอุบลชาติพันธุ์เซนตหลุยส์โกลด์ พบยีน *F3H* แสดงออกที่กลีบดอกมากที่สุด รองลงมาคือเกสร และแสดงออกน้อยมากในใบ การแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อกลีบดอกปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุณฑริกใน 3 ระยะการพัฒนาดอก พบว่ายีน *F3H* แสดงออกมากที่สุดในเนื้อเยื่อกลีบดอกอุบลชาติสัตตบงกชระยะที่ 1 รองลงมาคือ ระยะที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ในเนื้อเยื่อเกสรพบการแสดงออกของยีน *F3H* ในระยะที่ 3 แต่ไม่พบการแสดงออกในระยะที่ 1 และระยะที่ 2 ในปทุมชาติบุณฑริกพบปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* มากที่สุดในเนื้อเยื่อกลีบดอกระยะที่ 2 รองลงมาคือระยะที่ 1 แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อกลีบดอกระยะที่ 3 และไม่พบการแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อเกสรของปทุมชาติบุณฑริก ผลเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้

ศึกษาหน้าที่ของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi โดยการถ่ายยีนในกลีบดอกอุบลชาติ ลูกผสม PW5409 hybrid และอุบลชาติแสดงช่ยพล ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ ภายหลังจากถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วัน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสีในกลีบดอกอุบลชาติทั้ง 2 ชนิด แต่ในกลีบดอกอุบลชาติที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJAWOHL8 (control) มีปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* มากที่สุด แต่การแสดงออกของยีน *F3H* ลดลงอย่างมากในเนื้อเยื่อกลีบดอกอุบลชาติที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJA8*F3H* เมื่อเปรียบเทียบกับกลีบดอกที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJAWOHL8 (control) ในอุบลชาติทั้ง 2 ชนิด ในขณะที่การแสดงออกของยีน *CHS* ในเนื้อเยื่อกลีบดอกอุบลชาติทั้งที่ไม่ได้รับและได้รับการถ่ายยีน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในเนื้อเยื่อกลีบดอกของอุบลชาติทั้ง 2 ชนิด

6.1.3 ยีน 4'CGT

การตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ในดอกลิ้นมังกรสีส้ม ชมพู แดง ขาว ม่วง และ เหลือง พบว่าในดอกสีเหลืองมีปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT มากที่สุดรองลงมาคือ ส้ม แดง ขาว ชมพู และพบการแสดงออกของยีน 4'CGT น้อยที่สุดในดอกสีม่วง

ผลการศึกษาหน้าที่ของยีน 4'CGT แบบชั่วคราวด้วยเทคนิค RNAi โดยการถ่ายยีนในกลีบดอกลิ้นมังกร พันธุ์ Pixie Bells ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 เป็นพาหะ ภายหลังจากถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วัน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสีในกลีบดอกลิ้นมังกรทั้ง 7 ดอกที่ทำการศึกษา แต่ในกลีบดอกลิ้นมังกรที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJAWOHL8 (control) มีปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT มากที่สุด และพบการแสดงออกของยีน 4'CGT ลดลงอย่างมากในกลีบดอกลิ้นมังกรที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJA84'CGT จำนวน 4 ดอก ในขณะที่อีก 3 ดอก ปริมาณการแสดงออกไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยเปรียบเทียบกับกลีบดอกที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJAWOHL8 (control)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน 4'CGT ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะและใช้เครื่องยิงอนุภาค พบว่าทั้ง 2 วิธีสามารถให้ต้นที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก จำนวน 3 และ 1 ต้น ตามลำดับ โดยต้นบัวหลวงที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคมีการแสดงออกของยีน 4'CGT, *GUS* และ *NPTII* เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ส่วนปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* ในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน 4'CGT พบว่าปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* ไม่แตกต่างจากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เมื่อนำใบและก้านใบมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ด้วยวิธี *GUS* histochemical assay สามารถตรวจพบสีน้ำเงินบริเวณก้านใบและใบในบางบริเวณ ขณะที่การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน 4'CGT และ *GUS* ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization พบว่าสามารถตรวจพบยีน 4'CGT และ *GUS* ที่แทรกอยู่ภายในโครโมโซมของบัวหลวงได้

6.2 การถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง

ชักนำให้เกิด shoot cluster จากส่วนยอดของเอมบริโอของเมล็ดบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินีเพื่อใช้ถ่ายยีน โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิด shoot cluster เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ได้ขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงราชินี มีกระจุกยอด เกิดขึ้นจากปลายยอดเดิม ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 184 อย่างอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และจากบริเวณตาข้าง ยอดที่เกิดขึ้นใหม่มีกาบสีเขียวอ่อนห่อหุ้มไว้ และมีใบอ่อนขนาดเล็กสีเขียวเกิดขึ้น จากกระจุกยอด ขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุนทรริก มียอดและใบมากกว่าบัวหลวงราชินี แต่มี น้ำหนักเบากว่าบัวหลวงราชินีเล็กน้อย ระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin เข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับที่เหมาะสมในการคัดเลือก shoot cluster ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และทำให้ shoot cluster ของบัวหลวงบุนทรริกและบัวหลวงราชินีตายได้ ทั้งหมดใน 8 สัปดาห์

6.2.1 การถ่ายยีน DFR เข้าสู่บัวหลวงบุนทรริก

จากการศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้น และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของ ชิ้นส่วนก้านใบ ชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร และชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มี ขนาด 0.5 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุนทรริก เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสมีการเจริญเติบโต ดีที่สุด จากชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ในอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม NAA ความ เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจินิก แคลลัสได้ 43.33 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตสูงสุด 2.43 คะแนน

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของบัวหลวง พันธุ์บุนทรริก เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนเอ็มบริโอจินิกแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีผลต่อการเกิดยอดของชิ้นส่วนมากที่สุด โดยจำนวนยอดมากที่สุด เฉลี่ย 8.67 ยอด เอ็มบริโอจินิกแคลลัสมีขนาดเพิ่มขึ้นมากที่สุดเฉลี่ย 1.19 เซนติเมตร และมีจำนวนใบมาก ที่สุดเฉลี่ย 4.84 ใบ ส่วนการใช้อาหาร MS (1962) ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต มีผลต่อการเพิ่มความ ยาวยอดและความยาวใบมากที่สุดเฉลี่ย 1.02 และ 2.08 เซนติเมตร ตามลำดับ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีน Antisense Dihydroflavonol 4- Reductase (anti-DFR) เข้าสู่ชิ้นส่วนยอดและตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์ บุนทรริก ด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He (BioRad) พบว่าชิ้นส่วนยอดที่ให้จำนวนจุดสีน้ำเงิน จากการแสดงออกของยีน *GUS* แบบชั่วคราว (transient expression) คือ การยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร ซึ่งให้จำนวนจุดเฉลี่ย 4.8 จุดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และมีโคลนที่ตรวจพบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* และยีน anti-DFR ด้วยเทคนิค พีซีอาร์จำนวน 4 โคลน ส่วนการยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของ เนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร ไม่เกิดจุดสีน้ำเงินจากการแสดงออกของยีน *GUS* แบบชั่วคราว แต่มีโคลน ที่ตรวจพบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* และยีน anti-DFR ด้วยเทคนิคพีซีอาร์จำนวน 10 โคลน และ เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NPTII* และยีน anti-DFR ด้วยเทคนิค RT-PCR มีโคลนที่ตรวจพบการ แสดงออกของยีน *NPTII* และยีน anti-DFR จำนวน 1 โคลน โดยให้ผลการถ่ายยีนแบบถาวรได้ (stable

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์

transformation) จึงเป็นสภาพที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคเข้าสู่ชั้นส่วนยอดของบัวหลวงพันธุ์บุญทริก ส่วนชั้นส่วนตายอดจากคัพภะที่ให้จำนวนจุดสีน้ำเงินจากการแสดงออกของยีน *GUS* แบบชั่วคราว (transient expression) สูงที่สุดคือ การยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร ซึ่งให้จำนวนจุดเฉลี่ย 26.11 จุดต่อชั้นเนื้อเยื่อ และมีโคลนที่ตรวจพบการมีอยู่ของยีน *GUS* ยีน *NPTII* และยีน anti-DFR ด้วยเทคนิคพีซีอาร์จำนวน 2 โคลน

6.2.2 การถ่ายยีน *CHS* เข้าสู่บัวหลวงบุญทริก

ถ่ายยีนบางส่วนของยีน *CHS* แบบ antisense ขนาด 331 คู่เบส ที่โคลนจาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุญทริก ที่อยู่บนพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA เข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวงบุญทริกและบัวหลวงราชินีด้วยวิธีการยิงอนุภาค โดยใช้ระยะยิง 9 เซนติเมตร ใช้แก๊สฮีเลียมความดัน 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และใช้อุณหภูมิของค้ำเป็นพาหะในการถ่ายยีน การตรวจสอบประสิทธิภาพของการถ่ายยีนจากการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *GFP* ขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุญทริก พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* จำนวน 72 ขึ้น จากทั้งหมด 100 ขึ้น มีคะแนนประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเฉลี่ย 0.97 ± 0.20 คะแนน และขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster บัวหลวงราชินี พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* จำนวน 75 ขึ้น จากทั้งหมด 100 ขึ้น มีคะแนนประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเฉลี่ย 0.99 ± 0.17 คะแนน หลังจากการคัดเลือกมีขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุญทริกรอดชีวิตจำนวน 2 ต้น และบัวหลวงราชินีมีจำนวน 5 ต้น เมื่อตรวจการแสดงออกของยีน *GFP* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* ที่บริเวณรากและกาบใบ และการมีอยู่ของยีน *GFP* และยีน *hptII* ด้วยเทคนิค PCR พบว่า ต้นบัวหลวงบุญทริกทั้ง 2 ต้น และพบการมีอยู่ของยีน *GFP* และยีน *hptII* ส่วนบัวหลวงราชินีจำนวน 3 ต้น มีการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* เป็นจุดเรืองแสงสีเขียวบริเวณใบและราก และมีจำนวน 3 ต้น และพบการมีอยู่ของยีน *GFP* และยีน *hptII* ต้นบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีนมีการแสดงออกของยีน *CHS* ลดลง จำนวน 2 ต้น แต่ต้นบัวหลวงบุญทริกและต้นบัวหลวงราชินีที่เหลือ 3 ต้น มีปริมาณการแสดงออกของยีนใกล้เคียงกับบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

บทที่ 7

บรรณานุกรม

- กิริยา สังข์ทองวิเศษ .2547. "ระบบการถ่ายยีนที่เหมาะสมสำหรับถั่ว *Stylosanthes hamata* พันธุ์ Verano." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- คำณูญ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- จิตเกษม เทียงจิตต์. 2545. "การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้นและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ชัยวรกุล ไชยปัญญา. 2555. "การโคลนยีน flavanone 3-hydroxylase (F3H) จากปทุมชาติ (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) และอุบลชาติ (*Nymphaea* spp.) และการสร้างดีเอ็นเอสายผสมเพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน F3H ด้วยเทคนิค RNA interference." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นงลักษณ์ เภรินทวงศ์, กัญจนา แซ่เตียว และสุเม อรัญนารถ. 2552. "การโคลนยีน Flavanone 3-hydroxylase จากลิ้นมังกร และยีน Chalcone synthase จากอุบลชาติล้มลุกพันธุ์เซนต์หลุยส์." วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 40(3) (พิเศษ): 299-302.
- เบญจวรรณ สุวรรณเนตย์, ราตรี คุณาพิทักษ์ธรรม, รุ่งนภา ตีโต, มณฑนา บุญธรรม และอรวรรณ ชัชวาล การพานิชย์. 2552. "การใช้ยีน GFP และ GUS เป็นยีนรายงานผลในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์." วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 40(2): 185 – 196.
- ปริมลภา ชูเกียรติมั่น และเสริมลภา วสุวัต. 2547. บัวประดับในประเทศไทย 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. เนชั่นบุ๊คส์ : กรุงเทพฯ.
- ภักวดี ภักดีงาม. 2548. "การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและแสงต่อการเกิดไซมาติกเอมบริโอจินิกซ์ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- มณฑิรา ไชยตะยาจอร์. 2554. "การนำเข้าให้เกิดแคลลัสและไซมาติกเอมบริโอจินิกซ์ของบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกช" วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

รังสฤษดิ์ กาวิตะ. 2540 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : หลักการและเทคนิค. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่
คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รวีวธู บัวทอง. 2554. "การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยีน antisense *DFR* เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุญทริก
โดยวิธีการยิงอนุภาค." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทาง
การเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิภารัตน์ พิทักษ์ด้านธรรม, ชีระ สุตตะบุตร, พิสิพรรณ เจียมสมบัติ และเจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์. 2555.
"การศึกษาทางชีวโมเลกุลของยีน *chalcone synthase* ในกล้วยไม้ *Dendrobium Kaosanan* และ
Dendrobium Red bull." วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 43(1): 103 – 110.

วิลาสินี ลีทวีทรัพย์. 2554. "การถ่ายยีน Antisense ของ Dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) เข้าสู่บัว
หลวงพันธุ์บุญทริก โดยใช้ อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระ
จอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุชาติ ศรีเพ็ญ. 2542. พรรณไม้ในในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: อัมรินทร์พรินติ้งแอนด์พับลิชิ่ง.

สุภาภรณ์ เขียมแข่ง, ปัทมา สีน้าเงิน และอรุวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์. 2547. "ผลของสารปฏิชีวนะ
Timetin และ Augmentin ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Agrobacterium tumefaciens* ในการ
ถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ." ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่
42. กรุงเทพฯ : คณะเกษตร.

Ageorges, A., L. Fernandez, S. Vialet, D. Merdinoglu, N. Terrier and C. Romieu. 2006. "Four
specific isogenes of the anthocyanin metabolic pathway are systematically co-expressed with
the red colour of grape berries." *Plant Science*. 170: 372-383.

Aida, R., K. Yoshida, T. Kondoc, S. Kishimotoa and M. Shibataa. 2000b. "Copolymerization gives
bluer flowers on transgenic torenia plants with the antisense dihydroflavonol-4-reductase
gene." *Plant Science*. 160: 49-56.

Aida, R., S. Kishimoto, Y. Tanaka and M. Shibata. 2000a. "Modification of flower color in torenia
(*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation." *Plant Science*. 153: 33-42.

Buathong, 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.

Caltin, D.W. 1990. "The effect of antibiotics on the inhibition of induction and plant regeneration
from cotyledons of sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) *Plant Cell Report*. 9: 285-288.

- Castellarin, S.D., M.A. Matthews, G.D. Gaspero and G.A. Gambetta. 2007. "Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries." *Planta*. 227: 101-112.
- Cavalcanti, R.N., D.T. Santos and M.A.A. Mrirelles. 2011. "Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanin in model and food systems-an overview." *Food Research International*. 44: 499-509.
- Cormier, F., H.A. Crevier and C.B. Do. 1990. "Effects of sucrose concentration on the accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension." *Canadian Journal of Botany*. 68: 1822-1825.
- Davies, K. 2004. *Plant Pigment and their Manipulation*. Oxford : Blackwell publishing Ltd. Deng, M.H., J.F. Wen, J.L. Huo, H.S. Zhu, X.Z. Dai, Z.Q. Zhang, H. Zhou and X.X. Zou. 2012. "Cloning and characterization of two novel purple pepper genes (CHS and F3H)." *African Journal of Biotechnology*. 11: 2389-2397.
- Davies, K.M., G.B. Marshall, J.M. Bradley, K.E. Schwinn, S.J. Bloor, C.S. Wiefeld and C.R. Martin. 2006. "Characterisation of aurone biosynthesis in *Antirrhinum majus*." *Physiologia Plantarum*. 128: 593-603.
- 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.
- Faize, M., L. Faize and L. Burgos. 2010. "Using quantitative real-time PCR to detect chimeras in transgenic tobacco and apricot and to monitor their dissociation." *BMC Biotechnology*. 10(53).
- Forkmann, G. and S. Martens. 2001. "Metabolic engineering and applications of flavonoids." *Journal of Biotechnology*. 12: 155 – 160.
- Fukusaki, E.I., K. Kawasaki, S.I. Kajiyama, C.I. Ana, K. Suzuki, Y. Tanaka, A. Kobayashi. 2004. "Flower color modulations of *Torenia hybrida* by downregulation of chalcone synthase genes with RNA interference." *Journal of Biotechnology*. 111: 229-240.
- Gago, J., J. Grima-Pettenati, P.P. Gallego. 2011. "Vascular-specific expression of GUS and GFP reporter genes in transgenic grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Albariño) conferred by the *EgCCR promoter* of *Eucalyptus gunnii*." *Plant Physiology and Biochemistry*. 49 (4): 413-419.

- Giridhar, P., E.P. Indu, G.A. Ravishankar, and A. Ghandrasekar. 2004. "Influence of Tricentanol on somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* P. EX FR. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 40: 200-203.
- Gondo T., J. Matsumoto, S. Tsuruta, M. Yoshida, A. Kawakami, F. Terami, M. Ebina, T. Yamada, R. Akashi. 2009. "Particle inflow gun-mediated transformation of multiple-shoot clumps in rhodes grass (*Chloris gayana*)." *Journal Plant Physiology*. 166(4): 435-441.
- Hajian, B., K.Piri, S.Nazeri and H. Ofoghi. 2011. "*Agrobacterium*-mediated transfer of β -glucuronidase gene (*gusA*) to water mint (*Mentha aquatica* L.)." *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(5): 842-847.
- 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: 193 – 194.
- Han, Y., S. Vimolmangkang, R.E. Soria-Guerra, S. Rosales-Mendoza, D. Zheng, A.V. Lygin and S.S. Korban. 2010. "Ectopic expression of apple F3'H genes contributes to anthocyanin accumulation in the arabidopsis tt7 mutant grown under nitrogen stress." *Plant Physiology*. 153: 806-820.
- Hansen, 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.
- Heilersig, H.J., A. Loonen, M. Bergervoet, A.M. Wolters and R.G. Visser. 2006. "Post-transcriptional gene silencing of GBSSI in potato: effects of size and sequence of the inverted repeats." *Plant Molecular Biology*. 60(5): 647-62.
- Helliwell, C. and P. Waterhouse. 2003. "Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants." *Academic Press*. 30 (4): 289-295.
- 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.

- Jheng, F.Y., Y.Y. Do, Y.W. Liauh, J.P. Chung and P.L. Huang. 2006. "Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of oncidium (Gower Ramsey) by Adjusting Carbohydrate Sources." *Plant Science*. 170: 1133-1140.
- 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.
- Kaliemoorthy, S. and Rao A. 1994. "Effect of salinity on anthocyanin accumulation in the root of maize." *Indian Journal of Plant Physiology*. 37: 169-170.
- Katsumoto, Y., M.Fukuchi-Mizutani, Y. Fukui, F. Brugliera, T.A. Holton, M. Karan, N. Nakamura, K. Yonekura-Sakakibara, J. Togami, A. Pigeaire, G.Q. Tao, N.S. Nehra, C.Y. Lu, B.K. Dyson, S. Tsuda, T. Ashikari, T. Kusumi, J.G. Mason and Y. Tanaka. 2007. "Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin." *Plant and Cell Physiology*. 48(11): 1589-1600.
- Kaur, P. and S.L. Kothari. 2004. "In vitro culture of Kodo Millet : Influence of 2,4-D and Picloram in Combination with kinetin on callus initiation and regeneration." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 77: 73-79.
- Kim, S.H., J.R. Lee, S.T. Hong, Y.K. Yoo, 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.
- Kim, J.B., C.J.J.M. Raemakers, E. Jacobsen and R.G.F. Visser. 2006. "Efficient somatic embryogenesis in *Alstroemeria*." *Plant Cell and Organ Culture*. 86(2): 233-238.
- 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.
- Kozak, D. and M. Stelmaszczuk. 2009. "The effect of benzyladenine on shoot regeneration *in vitro* of *Zantedeschia aethiopica* 'Green Goddess'." *Horticultura*. 19(1): 14-18.
- Latchman, D. 1995. *Gene Regulation A eukaryotic perspective*. 2nd ed. London : Chapman & Hall.
- 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.

- Lin, H.S., C. Van der Toorn, K.J.J.M. Raemakers, R.G.F. Visser, M.J. De Jeu and E. Jacobsen. 2000. "Development of plant regeneration system based on friable embryogenic callus in the ornamental *Alstromeria*." **Plant Cell Reports**. 19: 529-534.
- Ling, H.Q., D. Kriseleit and M.W. Ganai. 1998. "Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)." **Plant Cell Reports**. 17 : 843-847.
- 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.
- Lukačín, R., C. Urbanke, I. Gröning, U. Matern. 2000. "The monomeric polypeptide comprises the functional flavanone 3 β -hydroxylase from *Petunia hybrida*." **FEBS Letters**. 467: 353-358.
- 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.
- Miki B. and S. McHugh. 2004. "Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety." **Journal Biotechnology**. 107(3): 193-232.
- Mita, S., N. Murano, M. Akaike and K. Nakamura. 1997. "Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars." **Plant Journal**. 11: 841-851.
- Nagamatsu, A., C. Masuta, H. Matsuura, K. Kitamura, J. Abe and A. Kanazawa. 2009. "Down regulation of flavonoid 3'-hydroxylase gene expression by virus-induced gene silencing in soybean reveals the presence of a threshold mRNA level associated with pigmentation in pubescence." **Journal of Plant Physiology**. 166: 32-39.
- 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. 2006. "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 Biotechnology**. 23: 13-17.

- Nakatsuka, T., K.I. 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. 2005a. "Temporal expression of flavonoid biosynthesis-related genes regulates flower pigmentation in gentian plants." **Plant Science**. 168: 1309-1318.
- Nakatsuka, T., M. Nishihara, K. Mishiba¹ and S. Yamamura. 2005b. "Two different mutations are involved in the formation of white-flowered gentian plants." **Plant Science**. 169: 949-958.
- Nakatsuka, T., Y. Abe, Y. Kakizaki, S. Yamamura and M. Nishihara. 2007. "Production of red-flowered plants by genetic engineering of multiple flavonoid biosynthetic genes." **Plant Cell Report**. 26: 1951-1959.
- Nakayama. T., K. Yonekura-Sakakibara, T. Sato, S. Kikuchi, Y. Fukui, M. Fukuchi-Mizutani, T. Ueda, M. Nakao, Y. Tanaka, T. Kusumi and T. Nishino. 2000. "Aureusidin synthase : a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration." **Science**. 290(5490): 1163-6.
- Nishihara, M., T. Nakatsuka and S. Yamamura. 2005. "Flavonoid components and flowercolor change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene." **FEBS Letters**. 579: 6074-6078.
- Ogita, S., H. Uefuji, Y. Yamaguchi, N. Koizumi and H. Sano. 2003. "Producing decaffeinated coffee plants." **Nature**. 423: 823.
- 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.
- Okinaka, Y., Y. Shimada, R. N. Shimada, M. Ohbayashi, S. Kiyokawa, Y. Kikuchi. 2003. "Selective accumulation of delphinidin derivatives in tobacco using a putative flavonoid 3',5'-hydroxylase cDNA from *Campanula medium*." **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. 67(1) : 161-165.
- Ono, E., M. Fukuchi-Mizutani, N. Nakamura, Y. Fukui, K. Yonekura-Sakakibara, M. Yamaguchi, T. Nakayama, T. Tanaka, T. Kusumi and Y. Tanaka. 2006. "Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway." **Plant Biology**. 103: 11075-11080.

- Park, J.S., J.B. Kim, B.S. Hahn, K.H. Kim, S.H. Ha, J.B. Kim and Y.H. Kim. 2004. "EST analysis of genes involved in secondary metabolism in *Camellia sinensis* (tea), using suppression subtractive hybridization." **Plant Science**. 166: 953-961.
- Patel, J.M. 2008. "A review of potential health benefits of flavonoids." **Lethbridge Undergraduate Research Journal**. 3: 1718-8482.
- Patton, A.J. 2000. "Gateway Cloning Technology." [Online]. available :
www.bio.davidson.edu/courses/Molbio/MolStudents/spring2000/patton/gateway
- Pillman, K. 2009. "Transcription factors involved in cold response in plants." Thesis School of Agriculture, Food and Wine Discipline of Plant and Pest Science The University of Adelaide.
- Przetakiewicz, A., Orczyk, W. and A. Nadolska-Orczyk. 2003. "The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale." **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 73: 245-256.
- Qwens, D.K., K.C. Crosby, J. Runac, B.A. Howard and B.S.J. Winkel. 2008. "Biochemical and genetic characterization of *Arabidopsis* flavanone 3'-hydroxylase." **Plant Physiology and Biochemistry**. 46: 833-843.
- Ramanjulu, S., K. Veeranjanyulu and C. Sudhakar. 1993. "Physiological changes induced by NaCl in Mulberry Var. Mysore Local." **Indian Journal of Plant Physiology**. 360: 273-275.
- 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. Leethaweesup, 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.
- Salvatierra, A., P. Pimentel, M.A. Moya-Leon, P.D.S. Caligari and R. Herrera. 2010. "Comparison of transcriptional profiles of flavonoid genes and anthocyanin contents during fruit development of two botanical forms of *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis*." **Phytochemistry**. 71: 1839-1847.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed. New York : Cold spring harbor laboratory.

- Shang, Y., K.E. Schwinn, M.J. Bennett, D.A. Hunter, T.L. Waugh, N.N. Pathirana, D.A. Brummell, P.E. Jameson and K.M Davies. 2007. "Methods for transient assay of gene function in floral tissues." *Plant Methods*. 3: 1. [Online]. Available: <http://www.biomedcentral.com/1746-4811/3/1>. 1/6/53.
- Shen, G., Y. Pang, W. Wu, Z. Deng, L. Zhao, Y. Cao, X. Sun and K. Tang. 2006. "Cloning and characterization of a flavanone 3-hydroxylase gene from *Ginkgo biloba*." *Bioscience Reports*. 26: 19-29.
- Shou, S.Y., L.X. Miao, W.S. Zai, X.Z. Huang and D.P. Guo. 2008. "Factors influencing shoot multiplication of lotus (*Nelumbo nucifera*.)" *Biologia Plantarum*. 52(3): 529-532.
- 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.
- Stefanello, S. Dol Vesco, L.L., Ducroquet, J.P.H.J., Nodari, R.O. and Guerra, M.P. 2005. "Somatic embryogenesis from floral tissues of Feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg.)" *Scientia Horticulturae*. 105: 117-126.
- 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., N. Sasaki and A. Ohmiya. 2008. "Biosynthesis of plant pigment: Anthocyanin, betalains and carotenoids." *The Plant Journal*. 54: 733-749.
- Tholalakabavi, A., J.J. Zwiazek and T.A. Thorpe. 1997. "Osmotically-stressed poplar cell cultures: anthocyanin accumulation, deaminase activity, and solute composition." *Journal of Plant Physiology*. 151: 489-496.
- 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.
- 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 hybrida* 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.
- Ueyama Y., K. Suzuki, M. Fukuchi-Mizutani, Y. Fukui, K. Miyazaki, H. Ohkawa, T. Kusumi, Y. Tanaka. 2002. "Molecular and biochemical characterization of torenia flavonoid 3'-hydroxylase and flavone synthase II and modification of flower color by modulating the expression of these genes." **Plant Science**. 163 : 253–263.
- 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.
- Van Der Krol A.R., L.A. Mur, M. Beld, J.N. Mol, A.R. Stuitje. 1990. "Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression." **Plant Cell**. 2(4) : 291-299.
- Visessuwan, R., Kawai, T and Mii, M. 1997. "Plant regeneration system from leaf segment culture through embryogenic callus formation of *Rosa Hybrida* and *R. canina*." **Breeding Science**. 47 : 217-222.
- Yang C., T. Zhao, D. Yu and J. Gai. 2009. "Somatic embryogenesis and plant regeneration in Chinese soybean (*Glycine max* L. Merr.) impacts of mannitol, abscisic acid and explants age." **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**. 45 : 180-188.
- Yee, N., J. O. Abdullah¹, 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.
- 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.
- Zottini, M., E. Barizza, A. Costa, E. Formentin, C. Ruberti, F. Carimi and F.L. Schiavo. 2008. "Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells." **Plant Cell**. 27: 845-853.

Zuker, A., T. Tzfira, H. Ben-Meir, M. Ovadis, E. Shklarman, H. Itzhaki, G. Forkmann, S. Martens, I. Neta-Sharir, D. Weiss and A. Vainstein. 2002. "Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene." **Molecular Breeding**. 9: 33-41.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 1
การเตรียมสาร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 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 | | | (10เท่า) | |
| 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 | | | (100 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 | | | (100 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 | | | (100 เท่า) | |
| MS8 | Myo-inositol | 100.0 | 10.0 | 10 มิลลิลิตร |
| | Nicotinic acid | 0.5 | 0.05 | |
| | Pyridoxine.HCl | 0.5 | 0.05 | |
| | Thiamine.HCl | 0.1 | 0.01 | |
| | Glycine | 2.0 | 0.2 | |

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 และ สารละลาย HCl 1 นอร์มอล ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เติม agarose agar ลงไป 8 กรัมต่อลิตร นำอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว 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 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย หม้อนึ่งความดันไอน้ำ โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นรอให้อาหารเย็นลง อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทอาหารลงในจานแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้ว ประมาณ 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 ปรับ ปริมาตรเป็น 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 เทอาหารลงในจานแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้ว ประมาณ 25 มิลลิลิตรต่อจานแก้ว เมื่ออาหารแข็งตัว เก็บจานแก้วที่มีอาหารไว้ในถุงพลาสติกสะอาด เก็บอาหารไว้ที่อุณหภูมิห้อง

121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นรอกให้อาหารเย็นลง 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 เมื่อจะนำบัฟเฟอร์ไปใช้สกัด 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 มิลลิลิตรนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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 เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ตารางภาคผนวกที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีน

| ไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' 3') |
|---------------|--|
| 18-SF | CCA TGA TAT TCG GCA AGC AGG CAT |
| 18-SR | ATC CAT CAT GGC TGA TGC AAT GCG |
| Oligo-dt | TTT TTT TTT TTT TTT TTT |
| F-BamHI-4'CGT | CGG ATC CAT GGG AGA AGA ATA CAA GAA AAC |
| F-EcoRI-4'CGT | TGG GTG GAA TTC TGT TCT TG |
| R-4'CGT -Sacl | TCG AGC TCT TAA CGA GTG ACC GAG TTG ATG AA |
| CHSF | GAG AAG CTC CGG TTC GAC AT |
| CHSR | TAG TTC ACC ACC ATC TTC TGG |
| F3H SenseF | GAG AAG CTC CGG TTC GAC AT |
| F3H stop | TCA GGC CAG AAT TTC ATT GA |
| F-NPTII | GGC TCG AAG ACG ATC AGA TAC CG |
| R-NPTII | GTA CAA AGG GCA GGG ACG TAG TCA A |
| F-gusA | ATT GAT GAA ACT GCT GCT GTC GGC |
| R-gusA | ACG CGG TGA TAC ATA TCC AGC CAT |
| F-CaMV | AGG GAT GAC GCA CAA TCC CAC T |
| R-NOS | TCG CAA GAC CGG CAA CAG GA |
| F-IntronpJA8 | GGG TCA ACG GTT TCA AAG AGA G |
| R-IntronpJA8 | CTC TCT TTG AAA CCG TTG ACC C |

ภาคผนวก 2

ผลงาน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายชื่อนักศึกษาในโครงการ การปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยวิธีตัดแต่งพันธุกรรม

| | | |
|--------------------------------------|--|--|
| <p>1. นางสาววิลาสินี ลีทวีทรัพย์</p> | <p>รหัส 49068904 สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร หัวข้อวิทยานิพนธ์ การถ่ายยีน Antisense ของ Dihydroflavonal 4-Reductase (DFR) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. กัญจนา แซ่เดี่ยว รศ.ดร. สุเม อรัญนารถ</p> | <p>สำเร็จการศึกษา ปี 2554</p> |
| <p>2. นางสาวรวีวรุ บัวทอง</p> | <p>รหัส 50065810 สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยีน antisense DFR เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยวิธียิงอนุภาค อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. กัญจนา แซ่เดี่ยว รศ.ดร. สุเม อรัญนารถ</p> | <p>สำเร็จการศึกษา ปี 2554</p> |
| <p>3. นายชัยวรกุล ไชยปัญญา</p> | <p>รหัส 52640908 สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร หัวข้อวิทยานิพนธ์ การโคลนยีน <i>flavanone 3-hydroxylase (F3H)</i> และการยับยั้งการแสดงออกของยีน F3H ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. นงลักษณ์ เภรินทวงศ์</p> | <p>สำเร็จการศึกษา ปี 2555</p> |
| <p>4. นายวรารุฒิ เอื้อมงคลการ</p> | <p>รหัส 52640909 สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร หัวข้อวิทยานิพนธ์ การโคลนยีน <i>chalcone 4-O-glucosyltransferase (4'CGT)</i> จาก snapdragon และการเพิ่มการสังเคราะห์เอนไซม์ 4'CGT ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. นงลักษณ์ เภรินทวงศ์</p> | <p>สำเร็จการศึกษา ปี 2556</p> |
| <p>5. นายปฤษฎางค์ อะโน</p> | <p>รหัส 520640901 สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร หัวข้อวิทยานิพนธ์ การถ่ายยีน <i>CHS (chalcone synthase)</i> เข้าสู่บัว</p> | <p>สำเร็จการศึกษา ปี 2557</p> |

| | | |
|-------------------|---|---------------------------|
| | หลวงพันธุ์บุณฑริกและปทุม อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. กัญจนา แซ่เตียว | |
| 6. นายชาติรี กอนี | รหัส 520640901 สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร หัวข้อวิทยานิพนธ์ การยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>flavonone 3-hydroxylase (F3H)</i> ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. กัญจนา แซ่เตียว | สำเร็จการศึกษา ปี 2558 |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อ ²⁰⁷ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยที่ตีพิมพ์

Buathong, R., Saetiew, K., Phansiri, S., Parinthawong, N., and Arunyanart, S. 2013. Tissue culture and transformation of the antisense DFR gene into lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) through particle bombardment. *Scientia Horticulturae*. 161: 216-222.

Saetiew, K., Leethaweewsup, W., Parinthawong, N., and Arunyanart, S. 2014. Transformation of antisense dihydroflavonol 4-reductase (DFR) into sacred lotus 'Buntharik' using *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Acta Hort*. 1025: 99-106.

Chaipanya, C., Saetiew, K., Arunyanart, S. and Arunyanart, S. (in press). Isolation and expression analysis of the flavanone 3-hydroxylase genes in lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) and waterlily (*Nymphaea* sp.). *Chiang Mai Journal of Science*.

รวีวรุฒ บัวทอง สุเม อรัญนารต และ กัญจนา แซ่เตี่ยว ๒๕๕๒. การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้นและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดเอมบริโอจินิกแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุญทวีกร วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ๔๐(๓)(พิเศษ): ๓๒๗-๓๓๐.

นงลักษณ์ เภรินทวงศ์ กัญจนา แซ่เตี่ยว และ สุเม อรัญนารต ๒๕๕๒. การโคลนนิ่ง *Flavanone 3-hydroxylase* จากลิ้นมังกรและยีน *Chalcone Synthase* จากอุบลชาติดีล้มลุกพันธุ์เซนต์หลุยส์ วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ๔๐(๓)(พิเศษ): ๒๙๙-๓๐๒.

วรวิมล เอี่ยมมงคล กัญจนา แซ่เตี่ยว สุเม อรัญนารต และนงลักษณ์ เภรินทวงศ์ ๒๕๕๕. การสร้าง DNA สายผสมของยีน *chalcone 4'-O-glucosyltransferase* จาก snapdragon (*Antirrhinum majus*) เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนด้วยเทคนิค RNA interference วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร (พิเศษ) ๔๓(๑): ๒๑๕-๒๑๘.

ชัยวรกุล ไชยปัญญา กัญจนา แซ่เตี่ยว สุเม อรัญนารต และนงลักษณ์ เภรินทวงศ์ ๒๕๕๕. การโคลนและศึกษาการแสดงออกของยีน *Flavanone 3-Hydroxylase (F3H)* ในอุบลชาติดีพันธุ์เซนต์หลุยส์โกลด์ วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร (พิเศษ) ๔๓(๑): ๘๓-๘๖.

ชาติรี กอนี สุเม อรัญนารต นงลักษณ์ เภรินทวงศ์ และกัญจนา แซ่เตี่ยว ๒๕๕๙. การถ่ายยีน *flavanone 3-hydroxylase (F3H)* ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุญทวีกร (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค วารสารเกษตรพระจอมเกล้า ๓๔(๒) อยู่ระหว่างตีพิมพ์

นำเสนอในงานประชุมวิชาการนานาชาติ และรอส่งวารสารระดับนานาชาติ

Saetiew, K., Ano, P., Parinthawong, N., and Arunyanart, S. 2016. Transformation of antisense *chalcone synthase (CHS)* gene into lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) by particle bombardment



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัญญาเลขที่ KREF025102

โครงการ การปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยวิธีตัดแต่งพันธุกรรม

Improvement of Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) through Gene Transformation

รายงานสรุปการเงิน

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย ผู้รับทุน กัญจนา แซ่เตียว

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2554 ถึงวันที่ 1 กรกฎาคม 2559

| หมวดค่าใช้จ่าย | รายงาน สะสมจาก รายงานครั้ง ก่อน | ค่าใช้จ่ายงวด ปัจจุบัน | รวมรายจ่าย สะสมถึงปัจจุบัน | งบประมาณ รวมทั้งโครงการ | คงเหลือ (หรือเกิน) |
|--------------------------|--|---------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| 1. ค่าตอบแทน | 340,000.00 | 200,000.00 | 540,000.00 | 540,000.00 | - |
| 2. ค่าจ้าง | 125,742.21 | 274,625.00 | 400,367.21 | 402,000.00 | |
| 3. ค่าวัสดุ | 535,117.24 | 1,324,491.00 | 1,859,608.24 | 1,860,000.00 | |
| 4. ค่าใช้สอย+ค่าทำรายงาน | 4,018.00 | 79,210.00 | 83,228.00 | 85,000.00 | |
| 5. ค่าครุภัณฑ์ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6. ค่าซ่อมแซมครุภัณฑ์ | 0 | 0 | 0 | 100,000.00 | 100,000.00 |
| รวม | 1,004,877.45 | 1,878,326.00 | 2,883,203.45 | 2,987,000.00 | 103,796.55 |

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

| งวดเงินที่ได้รับ | จำนวนเงินที่ได้รับ(บาท) | เมื่อ (ระบุนวัน เดือน ปี) |
|---------------------|-------------------------|---------------------------|
| งวดที่ 1 | 999,000.00 | 9 มิถุนายน 2551 |
| งวดที่ 2 | 994,000.00 | 7 พฤษภาคม 2553 |
| งวดที่ 3 | 862,000.00 | 16 กรกฎาคม 2555 |
| ดอกเบี้ย รวมปีที่ 1 | 5,276.96 | 31 ธันวาคม 2552 |
| ดอกเบี้ย รวมปีที่ 2 | 3,532.67 | 25 ธันวาคม 2553 |
| ดอกเบี้ย รวมปีที่ 3 | 5,595.62 | 25 ธันวาคม 2554 |
| ดอกเบี้ย รวมปีที่ 4 | 6,396.34 | 25 ธันวาคม 2555 |
| ดอกเบี้ย รวมปีที่ 5 | 6,043.39 | 25 ธันวาคม 2556 |
| ดอกเบี้ย รวมปีที่ 6 | 1,728.95 | 25 ธันวาคม 2557 |
| ดอกเบี้ย รวมปีที่ 7 | 147.40 | 25 มิถุนายน 2558 |
| รวม | 2,883,721.38 | ① : 1 กรกฎาคม 2559 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| งวดที่ | จำนวนเงินที่จ่าย (บาท) | |
|----------|------------------------|---|
| งวดที่ 1 | 668,855.47 | |
| งวดที่ 2 | 336,021.98 | |
| งวดที่ 3 | 1,873,326.00 | |
| รวม | 2,883,203.45 | ② |

จำนวนเงินคงเหลือ ① - ② 517.93 บาท

น. น. น.

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

น. น. น.

ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อที่ 211 และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้