



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 อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

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

นางสาวกัญจนา แซ่เตียว
นางสาวสุเม อรัญนารถ
นางสาวนงลักษณ์ เกรินทวงศ์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากกองทุนวิจัย สจล ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยวิธีตัดแต่งพันธุกรรม

แหล่งเงิน กองทุนวิจัย สจร

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 กลีบดอกลินมังกรพันธุ์ Pixie Bells สีเหลืองซึ่งมีการแสดงออกของยีน *4'CGT* มากที่สุด รองลงมาคือดอกสีส้ม แดง ขาว ชมพู และม่วง ตามลำดับ ได้ชิ้นส่วนยีน *4'CGT* ขนาด 313 คู่เบส จาก cDNA ของกลีบดอกลินมังกร จากนั้นศึกษาการแสดงออกของยีน *CHS*, *F3H*, *4'CGT* ด้วยเทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ศึกษาการแสดงออกของยีน *CHS*, *F3H*, *4'CGT* ในบัวหลวง อุบลชาติ หรือลินมังกร ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR พบว่าดอกบัวหลวงตัดตบงกชมีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากที่สุดในกลีบดอก และมีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากที่สุดในช่วงระยะดอกตูมขนาดเล็ก และลดลงเมื่อดอกมีการพัฒนามากขึ้น ดอกบัวหลวงพันธุ์มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* น้อย และมีปริมาณใกล้เคียงกันในทุกระยะการพัฒนาของดอก การแสดงออกของยีน *4'CGT* ในกลีบดอกลินมังกร (*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 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา 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* เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์อนุกรมตริก ด้วยวิธีการยิงอนุภาค และการใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ พบว่าวิธีการถ่ายยีนโดยการยิงอนุภาค การใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมขนาด 1100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับระยะเวลาของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซ็นติเมตร 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 Sattabangkacha 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 μM NAA and 0.5 μM TDZ for 8 weeks and a MS medium supplemented with 50 μM 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 เกรินทองค์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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 อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ผลการเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) ของลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงสีตบงกช	58
4.2	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน <i>F3H</i> ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสีตบงกชและปทุมชาติพันธุ์กริก กับฐานข้อมูลโปรตีนบน GenBank	63
4.3	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน <i>F3H</i> ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ด้านปลาย 5' กับฐานข้อมูล GenBank	67
4.4	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>F3H</i> ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ทางด้านปลาย 3' กับฐานข้อมูลโปรตีนบน GenBank	71
4.5	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>F3H</i> ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสีตบงกช และปทุมชาติพันธุ์กริก กับฐานข้อมูล GenBank	78
4.6	คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดของแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ	117
4.7	คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน เปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอจินิกแคลลัส จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนราก และความยาวราก จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ	120
4.8	ขนาดของแคลลัส จำนวนยอด และความยาวยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตรบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ	124
4.9	คะแนนการเจริญเติบโตและขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด	126
4.10	ขนาดเอ็มบริโอจินิกแคลลัส จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนใบ และความยาวใบจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร	129
4.11	การแสดงออกของยีน <i>GUS</i> แบบ transient expression ของเนื้อเยื่อส่วนยอดของบัวหลวงพันธุ์พันธุ์กริกที่ถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He	130

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.12	คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน จำนวนยอด ความยาวยอด และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วน จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก	133
4.13	จำนวนต้นบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่ชักนำได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อยอด และตายยอดจากคัพภะ โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He	137
4.14	ผลการตรวจสอบยีน <i>GUS</i> ยีน <i>NPTII</i> ยีน <i>anti-DFR</i> ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่ชักนำได้จากกาถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อยอด โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He	138
4.15	ผลการตรวจสอบยีน <i>GUS</i> ยีน <i>NPTII</i> ยีน <i>anti-DFR</i> ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่ชักนำได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อตายยอดจากคัพภะ โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He	138
4.16	ผลการตรวจสอบการแสดงออกของ ยีน <i>NPTII</i> ยีน <i>anti-DFR</i> ด้วยเทคนิค RT-PCR ที่ชักนำได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อยอด โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He	139
4.17	ประสิทธิภาพในการถ่ายยีน <i>CHS</i> แบบ antisense ด้วยวิธียิงอนุภาค เข้าสู่ชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกและบัวหลวงราชินี	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	การตัดชิ้นส่วนเริ่มต้นก่อนไปจากคัพเพาะของบัวหลวงพันธุวิศวกรรม	38
3.7	แสดงการตัดชิ้นส่วนเริ่มต้นตายอดจากคัพเพาะของบัวหลวง	39
3.8	คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากคัพเพาะของบัวหลวง	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 ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์วิศวกรรม และสัตตบงกช	55
4.3	การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์วิศวกรรม และสัตตบงกช	56
4.4	การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์วิศวกรรม และสัตตบงกช	57
4.5	ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์วิศวกรรม และบัวหลวงสัตตบงกช	59
4.6	ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ยีน <i>F3H</i> จาก cDNA ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์ โกลด์	60
4.7	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นส่วนยีน <i>F3H</i> ขนาด 82 นิวคลีโอไทด์ ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์ โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติพันธุ์วิศวกรรม	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 อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.10	ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนของยีน 5' Nested RACE <i>F3H</i> ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pTZ57R/T	66
4.11	ผลปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ยีน <i>F3H</i> ด้านปลาย 3' ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์	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' และด้านปลาย 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 ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุญทวีกร	75
4.18	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนโปรตีน <i>F3H</i> ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุญทวีกรกับพืชชนิดต่างๆ	76
4.19	การเปรียบเทียบช่วงลำดับกรดอะมิโน domain โปรตีน 162-52 ที่ <i>F3H</i> ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุญทวีกร (Lotus) กับพืชชนิดต่างๆ	77
4.20	การเปรียบเทียบช่วงลำดับกรดอะมิโนที่ domain (207-308) โปรตีน <i>F3H</i> ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุญทวีกร	77
4.21	ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโปรตีน <i>F3H</i> จากปทุมชาติสัตตบงกช ปทุมชาติบุญทวีกร และอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ กับโปรตีน <i>F3H</i> จากพืชอื่นๆ	79
4.22	ผลปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ยีนบางส่วน 4' <i>CGT</i> จาก cDNA ของดอกลิ้นมังกร	80
4.23	แผนภาพพลาสมิด pCR8-4' <i>CGT</i> ที่มีขนาด 3,130 นิวคลีโอไทด์และตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI	80
4.24	ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน 4' <i>CGT</i> ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pCR8-4' <i>CGT</i> ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI	81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (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 ในแต่ละระยะการพัฒนาดอกบัวหลวง 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 ระยะการพัฒนาดอก ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR	88
4.32	ดอกลินมังกกร	89
4.33	เปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกลินมังกกร	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	ตำแหน่งจับของไพรเมอร์ pJAintronF และไพรเมอร์ pJAintronR บริเวณ intron ของเวกเตอร์ pJAWOHL8 ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเวกเตอร์ pJA8 <i>F3H</i>	92
4.37	การตรวจสอบการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8	93
4.38	ลักษณะกลีบดอกของอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสดงช่ยพล ภายหลังจากได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 หรือเวกเตอร์ pJA8 <i>F3H</i> ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะเป็นเวลา 3 วัน	94

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.39	การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> และ <i>F3H</i> ในกลีบดอกของอุบลชาติลูกผสม PW5409 และแสดงหัยพลที่ไม่ผ่านการถ่ายโอน	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 และไพรเมอร์ R-IntronpJA8 และตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III และ <i>Xba</i> I	98
4.42	ผลการตรวจสอบพลาสมิด pJA8-4'CGT ในอะโกรแบคทีเรีย <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	99
4.43	ดอกลินินมังกรที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4'CGT ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะเป็นเวลา 3 วัน	100
4.44	ผลเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกลินินมังกรที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด 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 หลังจากการเชื่อมต่อดำเนินการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <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 บุณฑริก	106
4.52	ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน <i>CHS</i> ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวง บุณฑริก 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 ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI และ <i>Hind</i> III	108

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (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	การตรวจสอบหาบางส่วนของยีน <i>CHS</i> ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA 1302CHSA ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Sac</i> I และ <i>Bam</i> HI	111
4.59	การตรวจสอบหาบางส่วนของยีน <i>CHS</i> ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA 1302CHSA ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI และ <i>Hind</i> III	111
4.60	การตรวจสอบหาบางส่วนของยีน <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	ผลการตรวจสอบโคโลนีที่ 1 (1) และโคโลนีที่ 2 (2) ของเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่เตรียมด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-CaMV และ R-NOS เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder	114
4.64	ลักษณะแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์	116
4.65	ลักษณะเอมบริโอจินิกแคลลัส ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตรบนอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	119
4.66	ลักษณะยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตรบนอาหารแข็งเวลา 8 สัปดาห์	119
4.67	ลักษณะยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตรบนอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	123

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.68	ลักษณะแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร บนอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	125
4.69	ลักษณะยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเอมบริโอจินิกแคลลัส 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 anti-DFR 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

สารบัญภาพ (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	ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนแบบการยิงอนุภาค 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 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

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

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาระบบการสร้างรงควัตถุสีเหลืองในพืชบัวหลวง

1.2.2 เพื่อศึกษาวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง และศึกษาการแสดงออกของยีนที่ถ่ายเข้าสู่บัว

หลวง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

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

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 รงควัตถุสีเหลือง การโคลนยีน การถ่ายยีน

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนในดอกบัวหลวง ทราบวิธีการและขั้นตอนที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง ได้ต้นบัวหลวงที่ได้ทำการถ่ายยีนมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

2.1 แนวคิด ทฤษฎีหลักตามประเด็นให้ครอบคลุมเรื่องที่วิจัย

รงควัตถุ (pigment) เป็นสารที่ทำให้เกิดสีในดอกไม้ สีที่แตกต่างกันเกิดจากการสะสมรงควัตถุต่างชนิดกัน รงควัตถุที่ให้สีในดอกไม้แบ่งเป็น 3 ชนิด คือ flavonoid, carotenoid และ betalain (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) ดังนั้นการสร้างดอกบัวสีเหลืองโดยการถ่ายยีนที่ยับยั้งการแสดงออกของ anthocyanin และทำการศึกษายีนเข้าสู่พืชเพื่อศึกษาการทำงานและการแสดงออกของยีนในพืช เป็นเทคนิคที่ช่วยให้เราสามารถเข้าใจการทำงานของยีน โดยเทคนิคที่นิยมใช้ในการถ่ายยีนในปัจจุบันมีสองเทคนิคคือ การใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ และการถ่ายยีนเข้าโดยตรงโดยการยิงอนุภาค (particle bombardment) เนื้อเยื่อพืชที่ใช้ในการถ่ายยีนสามารถใช้ชิ้นส่วนของพืชได้หลายชนิด เช่น ปลายราก ยอดอ่อน ใบอ่อน ต้นอ่อน หรือแคลลัส ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของพืชแต่ละชนิดและเทคนิคที่ใช้ในการถ่ายยีน เพื่อศึกษาด้านที่มีการแสดงออกของยีนตามต้องการต่อไป

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 และพบว่ามีต้นพิทูเนียได้รับการถ่ายยีนและให้สีดอกคงที่เพียงจำนวนเล็กน้อย โดยในทางการค้าจำเป็นต้องถ่ายยีนจำนวนหลายต้นเพื่อใช้คัดเลือก phenotype และรักษาสายพันธุ์ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
3

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 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 เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ 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 ที่ได้จากไวโอลา (*Viola odorata* L.) และยีน DFR จากไอริส (*Iris x hollandica*) เข้าไป พบว่ากุหลาบดัดแปลงพันธุกรรมมีการสะสมของแอนโทไซยานิน ชนิด delphinidin และมีสีดอกที่เป็นสีม่วงมากขึ้น

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

วิลาสินี (2554) ทำการศึกษากลไกของชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก 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) ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน CHS ที่โคลนได้จาก cDNA ของกล้วยไม้ *Phalaenopsis hybrida* cv. Formosa rose โดยใช้เวกเตอร์ pBI121 ถ่ายยีน CHS เข้าสู่ต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) โดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ หลังจากทำการคัดเลือกและเพาะเลี้ยงในโรงเรือน พบการแสดงออกของ phenotypes ของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนมีดอกสีเข้มมากขึ้น มีตั้งแต่ สีชมพู ชมพูเข้ม ไปจนถึงสีชมพูแกมแดง ต่างจากดอกต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนที่มีเพียงมีสีชมพูอ่อน

นอกจากนี้ยังพบว่าต้นยาสูบบางต้นที่ได้รับการถ่ายยีน มีต้นเกสรตัวผู้ที่ผิดปกติ มีลักษณะหดสั้น 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 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

bialaphos resistance (bar) gene เป็นยีนคัดเลือก นำไปใช้ถ่ายยีนเข้าสู่ใบอ่อนของต้นหรือด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ชิ้นส่วนที่รอดจากการคัดเลือกด้วยสารภูษักนำให้เกิดรากและต้นอ่อนนำไปเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตในโรงเรือน พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *CHS* เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *CHS* ดอกมีสีน้ำเงินลดลงมาก บางดอกมีสีขาวและบางดอกมีริ้วน้ำเงินอ่อนสลับสีขาว ส่วนต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *ANS* 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) สังเกตว่าการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชไม่ว่าจะใช้วิธีการใดก็ตามหากใช้ยีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล มักจะเกิดปัญหา false positive ขึ้น คือ ชิ้นส่วนพืชบางชนิดสามารถเกิดปฏิกิริยาติดสีน้ำเงินของสารที่ใช้ทดสอบการแสดงออกของยีน *GUS* แม้ว่าจะไม่ได้รับการถ่ายยีนก็ตาม ทำให้การรายงานผลการถ่ายยีนผิดพลาดได้ นอกจากนี้การทดสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ทำให้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อตาย ไม่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงต่อได้ จึงศึกษาแนวทางการใช้ยีน *GFP* ร่วมกับยีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล โดยใช้ยีน *GFP* จากเวกเตอร์ pJET1/blunt cloning โคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pMAT21 ที่มียีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล และมียีน *isopentenyl transferase (ipt)* เป็นยีนคัดเลือก ทำการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 เป็นพาหะ ชิ้นโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายยีนเกิดยอดเป็นกระจุกยอดจากผลของยีน *ipt* และนำชิ้นส่วนไปทดสอบการแสดงออกของยีน *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 ของบัวหลวงพันธุ์ดึก 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* เข้าสู่เนื้อเยื่อแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์ดึก โดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ แคลลัสอายุ 2 เดือนที่ชักนำจากเนื้อเยื่อส่วนยอดของเอ็มบริโอ

ของบัวหลวงบุณฑริก โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่มี NAA เข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 16 สัปดาห์ นำไปใช้ในการถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 พบว่า การนำชิ้นเนื้อเยื่อไปเขย่าในอาหารที่มี *A. tumefaciens* เป็นเวลา 30 นาที และการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (co-culture) เป็นเวลา 2 วันในที่มืด มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนมากที่สุด





เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียม RNA และ cDNA

3.1.1 การเตรียมอาร์เอ็นเอ

บดกลีบดอกของอุบลชาติเซนตหลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติ บุญพริกให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว นำเนื้อเยื่อแต่ละตัวอย่างปริมาณ 1 กรัม ผสมกับ Gomez buffer (pH 7.5) 15 มิลลิลิตร (Tris base 1.5 มิลลิโมลลาร์, EDTA 50 มิลลิโมลลาร์, SDS 10 เปอร์เซ็นต์) 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)

3.1.2 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงและเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

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 และน้ำกลั่นเข้าปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทำการหยอดสารละลายทั้งหมดลงในหลุมของแผ่นเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ปล่อยให้โมเลกุลของอาร์เอ็นเอเคลื่อนที่ในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสที่แรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 45 นาที โดยมีสารละลาย 0.5x TAE buffer เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า ย้อมเจลในสารละลายเอทีเดียมโบร-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 ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, DNase I (Fermentas, USA) 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, อาร์เอ็นเอของอุบลชาติหรือปทุมชาติความเข้มข้น 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 จากอาร์เอ็นเอที่แยกสกัดได้จากกลีบดอกของอุบลชาติเซนต์ หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกชและปทุมชาติบุณชริกจากข้อที่ 3.1.3 ตามวิธีการของ Sensiscript® Reverse Transcription (Qiagen, USA) เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย 10x buffer RT ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, Oligo-dt primer 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร, Ribolock™ RNase Inhibitor (Fermentas, USA) 40 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, Sensiscript Reverse Transcriptase 1 ไมโครลิตร, อาร์เอ็นเอของอุบลชาติหรือปทุมชาติความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และ DEPC water ปริมาณ 12.5 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
10
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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) ออกแบบจากลำดับเบสอนุรักษ์ของยีน *F3H* หรือยีน *CHS* ของพืชชนิดต่างๆ ที่ได้มีการรายงานไว้ใน GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) ได้ความอนุเคราะห์จาก 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 ของกลีบดอกของบัวหลวงบุณชริกและบัวหลวงสัตตบงกช (ตามลำดับ) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CHSF_forward primer และ CHSF_reverse primer โดยเตรียมสารในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา ในหลอด PCR ไมโครทิวบ์ขนาด 200 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำกลั่น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, สารละลายบัฟเฟอร์ 10x Taq buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, สารละลาย MgCl₂ เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, สารละลาย dNTP เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, สารละลายไพรเมอร์ 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

หลังจากตรวจสอบแถบ DNA และขนาดของผลผลิต PCR ของยีน *CHS* แบบเต็มเส้นที่โคลนได้จาก genomic DNA และ cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวง สัตตบงกช ด้วยวิธี gel electrophoresis แล้ว นำ agarose gel ที่มีแถบ DNA ของยีนที่มีขนาดที่ถูกต้อง มาตัดออกเฉพาะส่วนของผลผลิต PCR ที่มีขนาดที่ต้องการ น้ำหนักไม่เกิน 0.3 กรัม ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการแยก DNA ของยีนที่โคลนได้ออกจาก agarose gel 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 กลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช 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 ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและสัตตบงกช 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 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น 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)*

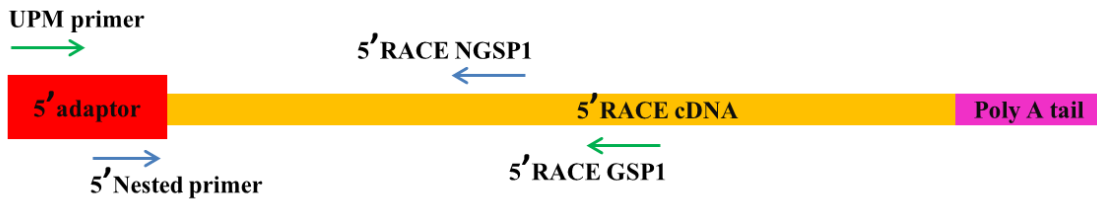
สังเคราะห์ยีนบางส่วนของ *F3H* จาก cDNA อุบลชาติเซนตล์ลูยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุญชริก ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ร่วมกับไพรเมอร์ชนิดดีเจเนเนอเรตที่จับบนบริเวณลำดับเบสอนุรักษ์ของยีน *F3H* ในอุบลชาติและปทุมชาติ (ตารางผนวกที่ 1) เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตรที่ประกอบด้วย dH₂O ปริมาตร 8 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, MgCl₂ 25 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, cDNA ของอุบลชาติหรือปทุมชาติความเข้มข้น 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 ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันให้หลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาดำเนินการด้วยเครื่อง 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 เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วนยีน *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 ของอุบลชาติเซนตล์ลูยส์โกลด์ซึ่งสังเคราะห์ตามวิธีการของ 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 ของอุบลชาติเซนตล์ลูยส์โกลด์เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH₂O ปริมาตร 32.5 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, MgCl₂ 50 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, dNTP 40 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 5'RACE cDNA ของอุบลชาติเซนตล์ลูยส์โกลด์ความเข้มข้น 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

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 ขุดชาติเซนต์หลุยส์ 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 เต็มเส้น

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 ปทุมชาติสัตตบงกชและปทุมชาติบุญทวีกริก ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ 5'RACE cDNA ของอุบลชาติเซน-หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกชหรือปทุมชาติบุญทวีกริกเป็นต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจับบริเวณ 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 ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 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 เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้าโดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 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 น้ำหนักไม่เกิน 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) ใส 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 ใสลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่พร้อมด้วย elution buffer ที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เติม elution buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงบริเวณกลางแผ่นกรองของ 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

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 ยูนิตต่อไมโครลิตร 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 การสกัดดีเอ็นเอสายผสมจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์

DH5 α

แยกสกัดดีเอ็นเอสายผสมตามวิธีการของ High-speed plasmid mini kit (Geneaid, Taiwan) โดยดูดเซลล์แบคทีเรียใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รอบต่อนาที่เป็นเวลา 1 นาที และเทสารละลายใส่ทิ้ง เติม PD1 buffer ที่เย็นปริมาณ 200 ไมโครลิตร ละลาย เซลล์ด้วยการปิเปตขึ้นลงผสมให้เข้ากัน 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 รอบต่อนาที่เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นดูดสารละลายปริมาณ 600 ไมโครลิตร ลงใน PD column ที่อยู่บน collection tube ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที่เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง เติม W1 buffer ปริมาณ 400 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที่เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง เติม wash buffer ปริมาณ 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที่เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที่เป็นเวลา 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 รอบต่อนาที่เป็นเวลา 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 ที่แสดงถึงการมีพลาสมิดมา ตรวจสอบชิ้นส่วนของยีน *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) เลือกลำดับที่ถูกต้องนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ 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 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

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 ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 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 อุดงคชาดิ หรือ ลิ่นมังกกร ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

3.4.3.1 การปรับความเข้มข้น cDNA เริ่มต้นให้เท่ากันด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง

ปรับความเข้มข้นของ cDNA จากข้อ 3.2.1 โดยการเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *18S rRNA* ซึ่งเป็นยีนที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์และมีการแสดงออกสม่ำเสมอในเนื้อเยื่อพืชด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ cDNA ของปทุมชาติ อุดงคชาดิ หรือลิ่นมังกกร ปริมาณอย่างละ 1 ไมโครลิตร เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 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 ของปทุมชาติ อุดงคชาดิ หรือลิ่นมังกกร 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* ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 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 อุดงคชาดิ หรือลิ่นมังกกร ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน CHS, F3H, 4'CGT ในปทุมชาติ อุดงคชาดิ หรือลิ่นมังกกร ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ cDNA ที่ได้จากข้อ 3.2.1 ที่ปรับความเข้มข้นให้เท่ากันแล้ว เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา semi-quantitative PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH₂O ปริมาณ 12.8 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, MgCl₂ 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 ไมโครโมลลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ reverse primer 10 ไมโครโมลลาร์ 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 CHS, F3H, 4'CGT ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

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 ตรวจสอบขนาดและความเข้มของแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

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

ศึกษาหน้าที่ของยีน *F3H* และยีน *4'CGT* ในกลีบดอกปทุมชาติ อุบลชาติ หรือลิ้นมังกร 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* ในดอกลิ้นมังกรด้วยเทคนิค 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) ของลิ้นมังกร (*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 3.3.1.1.1 เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH₂O ปริมาณ 12.5 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, MgCl₂ 25 มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10

มิลลิโมลลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, cDNA ของปทุมชาติสกัดบงกชความเข้มข้น 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 ปริมาณ 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

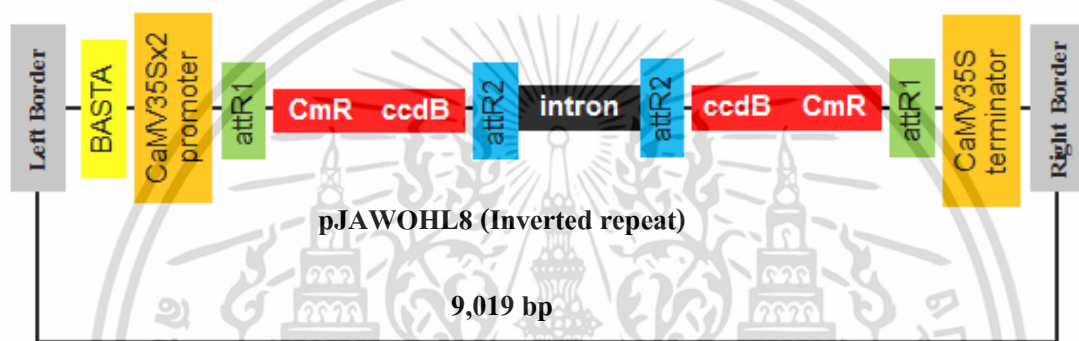
แยกสกัดดีเอ็นเอจากเจลตามวิธีการของ FavorPrep™ GEL/PCR purification mini kit (Favorgen, China) ดังข้อที่ 3.1.8 นำชิ้นส่วนของยีน F3H ขนาด 308 คู่เบส ที่ได้จากการสกัดแยกไปวัดปริมาณและคุณภาพด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงและเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นนำชิ้นส่วนของยีน F3H หรือยีน 4'CGT ขนาด 308 และ 307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

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 ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรส 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

(Geneaid, Taiwan) ดังข้อที่ 3.1.12 ตรวจสอบพลาสมิด 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 ชั่วโมงและตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส นำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ F-IntronpJA8 และ R-IntronpJA8 (ตารางผนวกที่ 1) ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอินตรอนบนพลาสมิด pJAWOHL8



ภาพที่ 3.3 โครงสร้างของพลาสมิด 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) ที่เติมสารปฏิชีวนะไรแฟมพิซินปริมาณ 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 สุกถ่ายแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาณ 50 ไมโครลิตร เก็บที่ -80 องศาเซลเซียส

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

3.5.2 การยับยั้งการแสดงออกของยีน F3H หรือยีน 4'CGT ในดอกลินมังกรแบบชั่วคราวด้วยวิธี Agro-infiltration

นำแบคทีเรียโอะโระแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ที่มีพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8F3H เข้าสู่กลีบดอกอวบขาคี และพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT เข้าสู่กลีบดอกลินมังกรเพื่อศึกษาหน้าที่และการแสดงออกของยีนโดยเปรียบเทียบจากปริมาณการแสดงออกของยีน F3H หรือ 4'CGT ระหว่างกลีบดอกที่ไม่ได้รับและได้รับพลาสมิด pJAWOHL8, pJA8F3H หรือ pJA8-4'CGT

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

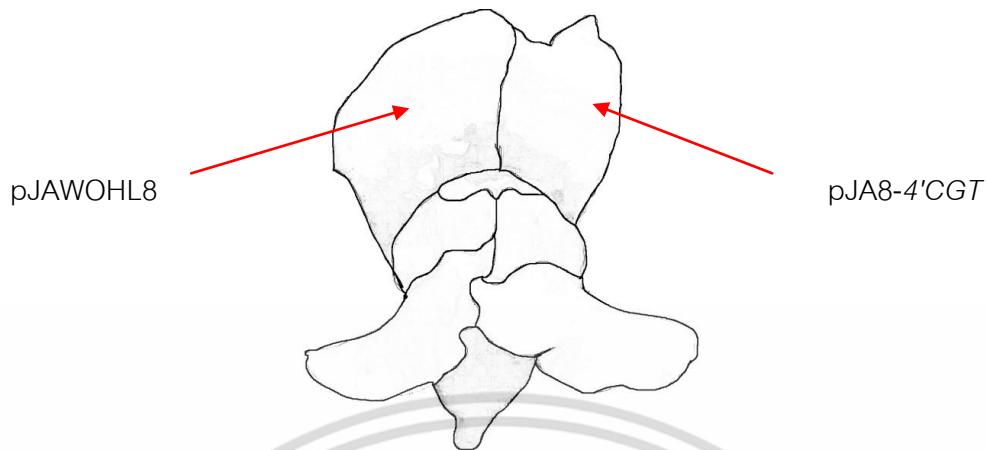
เลี้ยงแบคทีเรียโอะโระแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ที่มี พลาสมิด pJAWOHL, pJA8F3H หรือ pJA8-4'CGT ตามวิธีการของ Zottini *et al.* (2008) โดยเลี้ยงในอาหารเหลว YEP ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และโรแฟมพิซินความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้ปริมาณ 25 ไมโครลิตร เลี้ยงต่อในอาหารเหลว YEP ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และโรแฟมพิซินความเข้มข้น 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 องศาเซลเซียสในที่มีदनาน 2 ชั่วโมง แล้วฉีดเข้าสู่ด้านนอกของกลีบดอกอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสดงด้วยกระบอکیدยาขนาด 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 เข้าสู่กลีบดอกลินมังกรด้วยวิธี Agro-infiltration

นำสารแขวนลอยเซลล์อะโกรแบคทีเรีย มาปั่นตกตะกอนในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 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 อะซิโตไซริงโกน 100 มิลลิโมลลาร์ ละลายตะกอนเซลล์โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงซ้ำๆ และปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที เมื่อได้ตะกอนที่ล้างเสร็จแล้ว นำไปละลายด้วย infiltration buffer และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า 0.2 จากนั้นนำไปเลี้ยงในที่มีदनาน 2 ชั่วโมง เพื่อป้องกันไม่ให้อะซิโตไซริงโกนเสื่อมคุณสมบัติทางเคมี จากนั้นฉีดเข้าสู่กลีบดอกลินมังกรด้วยกระบอکیدยาขนาด 1 มิลลิลิตร ตามวิธีการของ Zottini *et al.* (2008) โดยใน 1 กลีบ จะแบ่งเป็นกลีบด้านซ้ายฉีดอะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pJAWOHL8 (control) และกลีบด้านขวาฉีดอะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pJA8-4'CGT (RNAi) (ภาพที่ 3.4) โดยทำการทดลองทั้งหมด 7 ดอก จากนั้นเก็บต้นลินมังกรไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน



ภาพที่ 3.4 ตำแหน่งที่ฉีดเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT

3.5.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* หรือยีน *4'CGT* ในกลีบดอกของอุบลชาติหรือลั่นทมกรภายหลังจากถ่ายยีนด้วยวิธีการ 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

บดกลีบดอกของดอกลั่นทมกรที่ไม่ผ่าน 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 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม chloroform ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร และเขย่าเป็นเวลา 15 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนที่มีอาร์เอ็นเอใส หลอดไมโคร เซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ ทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยเติม isopropanol alcohol ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ต่อ Trizol 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 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

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.สมบูรณ์ อนันตลาโกชัย 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 จากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโตโฟเรซิส 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 จากนั้นบีบสารละลายดีเอ็นเอใส่ในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน 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 ไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ หลอดใหม่ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที จึงเติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการเชื่อมต่อ โดยในปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิด (pBI121 *SacI/ BamHI*) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร Insert (pTZDFR *SacI/ BamHI*) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 10X Ligation buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร T₄ DNA Ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำไป transform โดยเลี้ยงบนอาหาร LB (streak) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน และชักนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cell (*E. coli* DH5 α) 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 เติมหาอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ 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* DH5 α 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 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 เพื่อทำให้ column แห้ง แล้วจึงย้าย FAPD column ไปใส่หลอดไมโครเซนติพีพิวจ์หลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิเมตร เติม elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ใน FAPD column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำพลาสติกหลอดผสมที่ได้มาตรวจสอบความเข้มข้นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร จากนั้นทำการทดสอบการมีอยู่ของชิ้นยีน *DFR* ในพลาสติกหลอดผสมโดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI* นำไปตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 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 พลาสมิดหลอดผสม ปริมาตร 15 ไมโครลิตร 10X tango buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* 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

3.6.2 การสร้างพลาสมิดที่มียีน *CHS* จากบัวหลวงพันธุ์บุนทริก

3.6.2.1 การสร้างพลาสมิดหลอดผสม pBICHSA

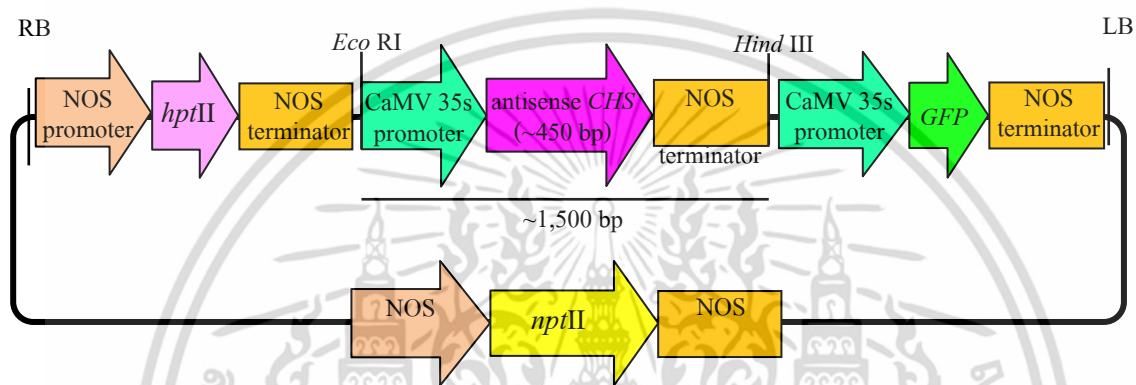
ทำการโคลนบางส่วนของยีน *CHS* จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวง บุนทริกด้วยเทคนิค PCR เพื่อนำไปใช้ถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ ที่มีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac I* (GAGCTC) อยู่บนไพรเมอร์ส่วนหน้า CHSA_forward primer และมีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam HI* (GGATCC) อยู่บนไพรเมอร์ส่วนท้าย CHSA_reverse primer นำบางส่วนของยีน *CHS* ที่ได้มาเชื่อมต่อเข้ากับ พลาสมิด pBI121 ขนาด 14,758 คู่เบส ที่มียีน *nptII* (*neomycin phosphotransferase*) เป็นยีนคัดเลือก และยีน *GUS* (α -glucuronidase) เป็นยีนรายงานผล โดยนำไปเชื่อมต่อกับตำแหน่งแทนที่ยีน *GUS* (ขนาด 1,812 คู่เบส) ในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

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, สารละลายบัฟเฟอร์ 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 จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 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 จากนั้นนำมาเชื่อมต่อเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ *T4* ligase โดยเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประกอบด้วย น้ำกลั่น ปริมาตร 8 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ 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 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 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 และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีชิ้นส่วนของพลาสมิดลูกผสมโดยเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB broth และนำไปปั่นในตู้ปั่นเชื้อแบบเขย่า 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 *nptII* 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 จากนั้นนำไปปัมที่อุณหภูมิ 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 นำไปปัมที่อุณหภูมิ 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 *nptII* และมียีนรายงานผลเป็นยีน *GFP* จากนั้นชักนำพลาสมิดให้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด ด้วยวิธี heat-shock นำแบคทีเรียที่ได้มาเกลี่ยบนอาหารคัดเลือก LB agar ที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปปัมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม โดยเลือกโคลนของ

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) นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ไปใช้ถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวงต่อไป



ภาพที่ 3.5 พลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA

3.6.3 การสร้างพลาสมิดที่มียีน 4'CGT จากดอกลิ้นมังกร

3.6.3.1 การสังเคราะห์ยีน 4'CGT ขนาด 1,374 นิวคลีโอไทด์จากดอกลิ้นมังกรด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำ cDNA ของดอกลิ้นมังกร เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน 4'CGT ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ F-BamHI-4'CGT และ R-4'CGT-Sac I (ตารางผนวกที่ 1) ที่ออกแบบจากข้อมูลยีน 4'CGT ของดอกลิ้นมังกร โดยเพิ่มบริเวณสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI ทางด้านปลาย 5' ของยีนและเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac* I ทางด้านปลาย 3' ของยีน ในปริมาตร 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 ของลิ้นมังกร 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 และเมื่อครบเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

กำหนดเวลานำไปตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 นิวคลีโอไทด์ โดยน้ำหนักเจลต้องไม่เกิน 0.4 g ใสในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 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 และน้ำกลั่นมาเชื้อ 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 ถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสม pTZ4'CGT เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat-shock ตามวิธีการของ Sambrook *et al.* (1989) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีการเกลี่ยด้วย 0.1M IPTG ปริมาณ 4 ไมโครลิตร และ X-gal ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาณ 20 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค blue/white screening นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีสีขาวไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 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 pCAMBIA2301*CHS* ที่ผ่านการดัดแปลงให้พลาสมิด pCAMBIA2301 สามารถขับเคลื่อนยีน *CHS* ด้วยโปรโมเตอร์และเทอร์มิเนเตอร์จากพลาสมิด pBI121 ตัด pCAMBIA2301*CHS* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Sac* I เพื่อแยกชิ้นส่วนของยีน *CHS* ออกจากพลาสมิด pCAMBIA2301 ตรวจสอบขนาดของพลาสมิดโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

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 คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารเหลว 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 การเตรียมเซลล์คอมพีเทนท์ของอะโกราแบคทีเรีย (*A. tumefaciens*) สายพันธุ์ EHA105

เพาะเลี้ยง *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ตามวิธีการของวิลลาดีนี ลีทวิทซ์ (2554) ที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนเซลล์อะโกราแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุญทริก โดยเลี้ยงอะโกราแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 บนอาหารแข็ง YM (Yeast extract-Malt extract) โดยการเชื้อเชื้อแบคทีเรียบนจานเพาะเลี้ยง 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 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอนเซลล์นำไปแช่บนน้ำแข็งทันที เติม glycerol ที่เจือจาง 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ผสมตะกอนให้เข้ากับสารละลายโดยการพลิกหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอน ทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นเติม glycerol ที่เจือจาง 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมตะกอนให้เข้ากับสารละลายโดยการพลิกหลอดไปมา โดยทำบนน้ำแข็งตลอดการเตรียม ตกตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอน เติม 1 M sorbitol ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมตะกอนให้เข้ากับสารละลายโดยการใช้ปิเปต

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 วิลลาซีนี ลีทีทวิทย์ (2554) เริ่มต้นโดยนำพลาสมิด pCAM4'CGT ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีอาหารเหลว YM ปริมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเซลล์คอมพีเทนท์ของอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร แล้วผสมกันอย่างเบามือ แช่บนน้ำแข็ง ทำการเชื่อมต่อเครื่อง electroporation โดยเลือกที่โหมด "Agr (*Agrobacterium*)" จากนั้นดูดเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิดขึ้นมาใส่หลอด electroporation cuvette แล้วนำใส่เครื่อง electroporation จากนั้นกดปุ่ม "Pulse" เพื่อปล่อยกระแสไฟฟ้าให้สามารถนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์อะโกรแบคทีเรีย นำเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิดแช่บนน้ำแข็ง จากนั้นเลี้ยงในอาหารเหลว YM นำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเซลล์อะโกรแบคทีเรียปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เกลี่ยเซลล์อะโกรแบคทีเรียบนอาหารแข็ง YM ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบโคโลนีด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.7 การถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง

3.7.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืชสำหรับถ่ายยีน

เตรียมชิ้นส่วนพืชสำหรับถ่ายยีนตามวิธีการของ รวีวฑู บัวทอง (2554) เริ่มต้นโดยนำเมล็ดบัวหลวงพันธุ์บุญทรียมาผ่านน้ำไหลนาน 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 ก้านใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุญทรีย

นำชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุญทรียโดยมีวิธีการตัดชิ้นส่วนก้านใบดังภาพที่ 3.6 มาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

วิธีการที่ 1 ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (control)

วิธีการที่ 2 NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ (ภักวดี 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 (มนทิรา ไชยตะญากร. 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)

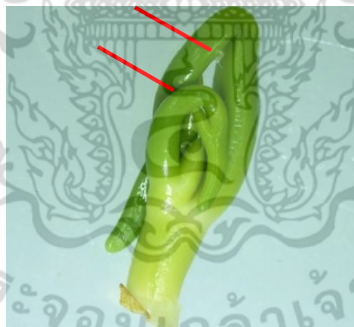
วิธีการที่ 8 picloram 4.14 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 4.64 ไมโครโมลาร์

(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 การตัดชิ้นส่วนเริ่มต้นก้านใบจากคัพพะของบัวหลวงพันธุ์ภูธรทริก (4.40X)

3.7.1.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนตา

ยอดจากคัพพะของบัวหลวงพันธุ์ภูธรทริก โดยแบ่งออกเป็น 3 การทดลองดังนี้

3.7.1.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนตา

ยอดจากคัพพะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์ภูธรทริก

นำชิ้นส่วนตายอดจากคัพพะขนาด 3 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3.7) ของบัวหลวงพันธุ์ภูธรทริกมาชักนำ การเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ และเพาะเลี้ยง

ภายใต้แสง cool white fluorescence เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวันนาน 8 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ RCBD มี 5 treatments 6 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วน 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 triacontanol 11.38 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 2.85 ไมโครโมลาร์ (Giridhar *et al.* 2004)



ภาพที่ 3.7 แสดงการตัดชิ้นส่วนเริ่มต้นตายออกจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก (4.40X)

1. การบันทึกข้อมูล

1.1 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

1.2 ขนาดของแคลลัส

1.3 จำนวนยอด

1.4 ความยาวยอด

1.5 จำนวนราก

1.6 ความยาวราก

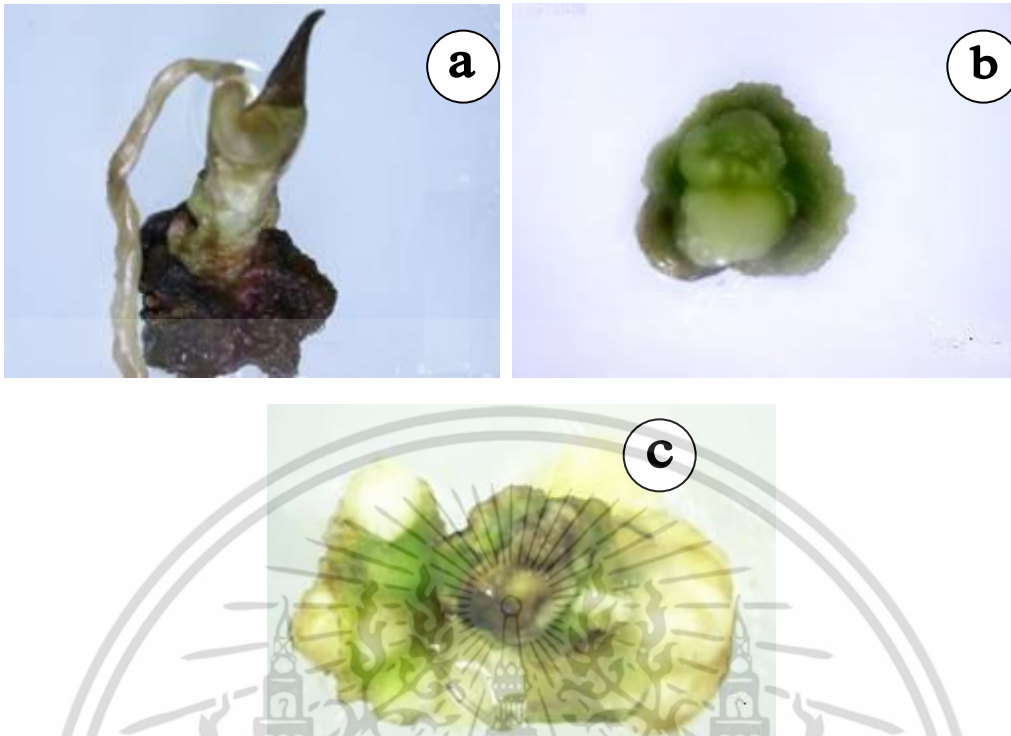
1.7 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วน โดยการให้คะแนน 3 ระดับดังนี้

คะแนน 1 ชิ้นส่วนตายหรือไม่เกิดแคลลัส (ภาพที่ 3.8a)

คะแนน 2 ชิ้นส่วนเกิดแคลลัส ลักษณะเกาะตัวกันแน่นสีเขียว (ภาพที่ 3.8b)

คะแนน 3 ชิ้นส่วนเกิดเอมบริโอจินิกแคลลัส ลักษณะเกาะตัวกันแน่นเป็นก้อนสีเขียวอ่อน

(ภาพที่ 3.8c)



ภาพที่ 3.8 ค่ะแนกการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุญทวีกร
 a แสดงการให้คะแนน 1 ค่ะแนน (2.50X) b แสดงการให้คะแนน 2 ค่ะแนน (3.50X)
 c แสดงการให้คะแนน 3 ค่ะแนน (2.85X)

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

นำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุญทวีกรมาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร 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 ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีขนาด 0.5 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 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

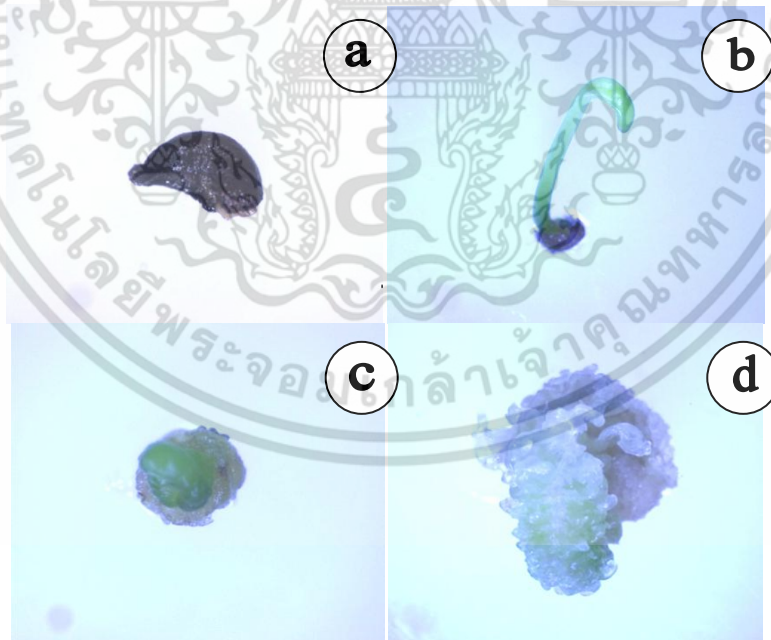
1.4 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วน โดยการให้คะแนน 4 ระดับดังนี้

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 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

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

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

4.7.1.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของ บัวหลวงพันธุ์บุญทริก

นำชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุญทริก มาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ภักดี ภักดีงาม. 2548) ที่ได้จากการทดลองที่ 1.2.1 แล้วนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุญทริก 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 จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้มาใช้เป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการถ่ายยีนเข้าสู่ยอดของบัวหลวงพันธุ์บุญทริก

1. การบันทึกข้อมูล

- 1.1 ขนาดแคลลัส
- 1.2 ความยาวยอด
- 1.3 จำนวนยอด
- 1.4 จำนวนใบ
- 1.5 ความยาวใบ

3.7.2 การถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ

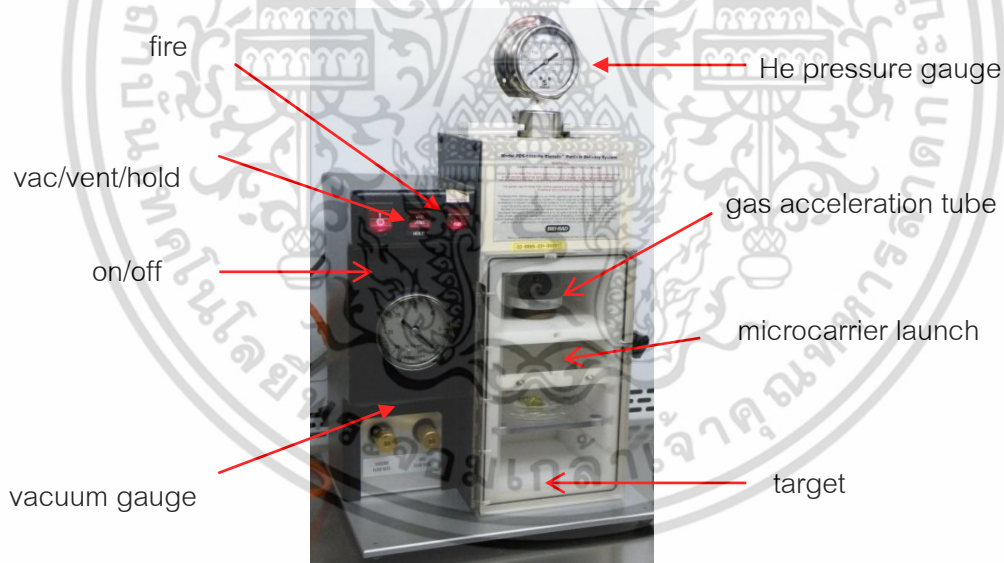
ถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ โดยดัดแปลงวิธีการของ วิชาสินี ลิทธิทรัพย์ (2554) เริ่มต้นโดยการนำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียม ที่ได้จากข้อ 3.4.1.5 เลี้ยงในอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 2 วันนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ 0.6-0.7 แล้วนำไปหมუნเหียงตกตะกอนที่ 6,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อออก เติมหอาหารเหลว MS ปริมาณ 10 มิลลิลิตร และเติมสารอะซิโตไซริงโณนความเข้มข้น 100 ไมโครโมลลาร์ จากนั้นเจือจางความเข้มข้นของเซลล์อะโกรแบคทีเรียม เป็น 1:10 ด้วยอาหารเหลว MS นำชิ้นส่วน shoot cluster แขนงาน 10 นาที ชักแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียม ส่วนเกินออกด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมอะซิโตไซริงโณนความเข้มข้น 100 ไมโครโมลลาร์ เป็นเวลา 2 วัน ในสภาพมืดเพื่อป้องกันไม่ให้อะซิโตไซริงโณนเสื่อมทางเคมีแล้วนำชิ้นส่วน shoot cluster มากำจัดเซลล์อะโกรแบคทีเรียมด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติมสารปฏิชีวนะอะม็อกซิซิลลิน ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลลาร์ ที่เติมสารปฏิชีวนะอะม็อกซิซิลลินความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้กำจัดแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียมและสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกชิ้นส่วนที่ได้รับการถ่ายยีน *NPTII* โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์

3.7.3 การถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาค

ถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาคตามวิธีการของ รวีวิฑู บัวทอง (2554) ทำการปรับสภาพ osmotic ของชิ้นส่วน shoot cluster ที่เตรียมไว้โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม mannitol 2 โมลลาร์ และ sorbitol 2 โมลลาร์ นำกระดาษกรองรูปวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5 เซนติเมตร วางไว้ด้านบนอาหาร แล้วนำชิ้นส่วนดังกล่าวจำนวน 20 ชิ้น วางบนแผ่นกระดาษกรองรูปวงกลมเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ก่อนถ่ายยีน เตรียมพลาสติก pCAM4'CGT เคลือบอนุภาคทองคำ โดยใช้อนุภาคทองคำปริมาณ 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 จากนั้นล้างด้วยน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อปริมาณ 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 นาที เพื่อให้อนุภาคทองคำมีการกระจายตัว 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 แล้วนำขึ้นมารอให้แห้ง 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

ลักษณะคว่ำลง 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 เมื่อไม่มีสภาพสุญญากาศจะสามารถเปิดฝาทู้ได้ 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 ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนแบบอะโกรแบคทีเรีย และการยิงอนุภาคมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* และ *NPTII* โดยทำปฏิกิริยาในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สว่นไวรัสสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

44
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาตร 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 นำผลผลิตที่ซอร์ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรส 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 โดยอาศัยเครื่องปั๊มสุญญากาศที่แรงดัน 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 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน

3.7.5.2.1 การเตรียม cDNA ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน

สกัดอาร์เอ็นเอจากบัวหลวงตามวิธีการของ Invitrap[®] Spin Plant RNA Mini Kit (Stratag molecular, Germany) กำจัดดีเอ็นเอปนเปื้อน และสังเคราะห์ cDNA ดังขั้นตอนในข้อ 3.2 ใช้ cDNA ใบบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนแบบอะโกราแบคทีเรียเป็นพาหะและการยิงอนุภาคเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำการถ่ายเข้าสู่บัวหลวงโดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 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, 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 ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

3.7.5.2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* และ *NPTII* ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ใช้ cDNA ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนแบบอะโกราแบคทีเรียและการยิงอนุภาคมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *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 นำผลผลิตพีซีอาร์ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

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

ทำการปรับความเข้มข้นของ cDNA เริ่มต้นที่สังเคราะห์ได้จากใบของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนของพลาสมิด pCAM4'CGT และใบบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนพลาสมิด pCAM4'CGT ให้เท่ากันโดยใช้ยีน *18s rRNA* เป็นยีนอ้างอิง เมื่อปรับความเข้มข้นของ cDNA ของแต่ละเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

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

ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH_2O ปริมาตร 12.8 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, MgCl_2 25 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, cDNA ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT หรือ cDNA ของบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร, ไพรมเมอร์ CHSF 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ ไพรมเมอร์ CHSR 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CHS* (ตารางผนวกที่ 1), ไพรมเมอร์ F3H_SenseF 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ ไพรมเมอร์ F3H_STOP 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* โดยออกแบบไพรมเมอร์ตามรายงานของ 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 dH_2O 3.5 ไมโครลิตร 2x SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix ปริมาตร 5 ไมโครลิตร cDNA ของลิ้นมังกร ความเข้มข้น 2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรมเมอร์ F-18S ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร และ ไพรมเมอร์ R-18S ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลลาร์ ปริมาตร 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

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* ของลีนมังกร 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



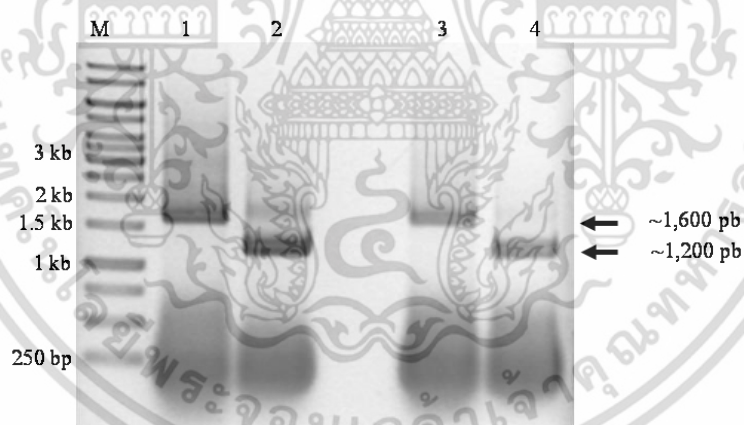
บทที่ 4

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 ที่สกัดได้จากกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์ทริกลีขาว และกลีบดอกบัวหลวงสีตัดตบงกชกลีบดอกสีชมพู 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 ของบัวหลวงพันธุ์ทริกลีและบัวหลวงสีตัดตบงกชขนาดใกล้เคียงกัน คือ ขนาดประมาณ 1,600 bp (ภาพที่ 4.1 ช่อง 1 และ 3) และได้ผลผลิต PCR ของยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ที่โคลนจาก cDNA ที่สังเคราะห์จาก RNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์ทริกลีขาว และกลีบดอกบัวหลวงสีตัดตบงกชกลีบดอกสีชมพูขนาดใกล้เคียงกัน 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 ของบัวหลวงพันธุ์ทริกลี ขนาดประมาณ 1,600 bp, (2) ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของบัวหลวงพันธุ์ทริกลี ขนาดประมาณ 1,200 bp, (3) ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของบัวหลวงสีตัดตบงกช ขนาดประมาณ 1,600 bp และ (4) ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของบัวหลวงสีตัดตบงกช ขนาดประมาณ 1,200 bp (M = 1kb DNA marker)

4.1.1.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA และ cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณทริกและบัวหลวงสัตตบงกช

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) พบว่า ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณทริกและบัวหลวงสัตตบงกช มีขนาดเท่ากัน คือ 1,599 bp และเมื่อนำนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีนด้วยโปรแกรม GENSCAN เพื่อตรวจหาตำแหน่ง exon และ intron และลำดับกรดอะมิโนที่เป็นไปได้ พบว่า ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณทริก 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 ของกลีบดอกบัวหลวงบุณทริกและบัวหลวงสัตตบงกช พบว่า มีความเหมือนกันมากกว่าร้อยละ 99 ในระดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 4.2)

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณทริกและบัวหลวงสัตตบงกช มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) พบว่า ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณทริกและบัวหลวงสัตตบงกช มีขนาดเท่ากัน คือ 1,170 bp และเมื่อนำนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีนด้วยโปรแกรม GENSCAN พบว่า ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณทริก 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 ของกลีบดอกบัวหลวงบุณทริกและบัวหลวงสัตตบงกช 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 มาเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% 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* (แอสเบอร์รี่) (accession no. AF400565) ร้อยละ 80, *Malus x domestica* (แอปเปิลกาล่า) (accession no. DQ026297) ร้อยละ 80, *Prunus persica* (ต้นพีช) (accession no. HM543568) ร้อยละ 79, *Fragaria x ananassa* (สตรอเบอร์รี่) (accession no. AB201756) ร้อยละ 79 และ *Pyrus pyrifolia* cv Yanshan Red (สาาลี) (accession no. JQ060997) ร้อยละ 79 เป็นต้น

4.1.1.3 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช กับพืชอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช มาเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก มีความเหมือนมากที่สุด กับเอนไซม์ *chalcone synthase (CHS)* ของ *N. nucifera* (accession no. ADD74169) มีความเหมือนร้อยละ 99 และลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช มีความเหมือนมากที่สุด กับเอนไซม์ *chalcone synthase (CHS)* ของ *N. nucifera* (accession no. ADD74169) มีความเหมือนร้อยละ 99 ลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA 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* (ฉัตรขึ้น) (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* (ซุมเห็ดเทศ) (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 ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* พืชอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกและบัวหลวงสัตตบงกช 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* (กีวี่) (accession no. AGV53049), *Humulus lupulus* (ต้นฮ้อป) (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* (สาหล่า) (accession no. AFH68066), *Casuarina glauca* (river oak) (accession no. Q9ZRR8), *Prunus avium* (เชอร์รี่) (accession no. ADZ54780), *Fragaria x ananassa* (สตรอเบอร์รี่) (accession no. BAE17124), *Rosa chinensis* (กุหลาบ) (accession no. AEC13058), *Glycine max* (ถั่วเหลือง) (accession no. ABB30178), *Petunia x hybrida* (พิทูเนีย) (accession no. BAM17286), *Solanum tuberosum* (มันฝรั่ง) (accession no. AEN83501), *Solanum lycopersicum* (มะเขือเทศ) (accession no. NP001234036), *Anthurium andraeanum* (ดอกหน้าวัว) (accession no. AAP20864), *Dahlia pinnata* (ดอกกรักเร่) (accession no. BAJ14516), *Gentiana triflora* (ต้นเงินเทียน) (accession no. BAE45039), *Zea mays* (ข้าวโพด) (accession no. NP001149022), *Arabidopsis thaliana* (อะราบิโดอปซิส) (accession no. AAZ23741), *Antirrhinum majus* (ต้นลิ้นมังกร) (accession no. BAE80511) และ *Phalaenopsis hybrida* (กล้วยไม้ ฟาแลนนอปซิส) (accession no. AAX54693) พบว่า ลำดับ

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



gCHSF_BUN	ATGGT GACCG	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	AGAAGTTCAA	GCGCATGTGT	180
gCHSF_SAT	180
gCHSF_BUN	<u>AAGTATCAGT</u>	<u>GTATCACTGA</u>	<u>TCACTGTCGA</u>	<u>GTCGATTGGC</u>	<u>AACCGGCAGT</u>	<u>CGATCGGAAG</u>	240
gCHSF_SATG.....	240
gCHSF_BUN	<u>ACATTGTCCC</u>	<u>TGGGTCATGG</u>	<u>CATCTGTCTA</u>	<u>TTTTGAGTGA</u>	<u>ATTGATCAAA</u>	<u>ACAAACACAG</u>	300
gCHSF_SAT	300
gCHSF_BUN	<u>ATATTGAGCT</u>	<u>TTAGCTTATT</u>	<u>TAGAGGGATT</u>	<u>TGAACTTTGA</u>	<u>AGTATGATCA</u>	<u>TATCATACAT</u>	360
gCHSF_SAT	360
gCHSF_BUN	<u>ATAGAGAGTT</u>	<u>TCTTTAGCTA</u>	<u>AAGTGTTTGA</u>	<u>ATATTAGTTC</u>	<u>ATTGTTAGAT</u>	<u>TTTTTTTTTT</u>	420
gCHSF_SAT	420
gCHSF_BUN	<u>TTCACCCAGT</u>	<u>TTTGGGTGAA</u>	<u>TTTATTGATC</u>	<u>CATGGCCAAG</u>	<u>ACAAATAGAC</u>	<u>CTGGCCAGAA</u>	480
gCHSF_SATT.....	480
gCHSF_BUN	<u>GTAGAAAGAC</u>	<u>TTTAGGAATT</u>	<u>GAGTAGACTC</u>	<u>ATCATCCGGA</u>	<u>TGACTCAACG</u>	<u>ATCCGGCTGA</u>	540
gCHSF_SAT	540
gCHSF_BUN	<u>GTAGACACA</u>	<u>TTAACCCAAC</u>	<u>TTAATTTGTT</u>	<u>TCTCTCAAGA</u>	<u>CTCTTAACAA</u>	<u>CTTTGATGTG</u>	600
gCHSF_SAT	600
gCHSF_BUN	<u>CATTTTCAGGC</u>	<u>GAGAAATCAA</u>	<u>TGATCAAGAA</u>	<u>GCGCTACATG</u>	<u>CACTTGACCG</u>	<u>AGGAGATCTT</u>	660
gCHSF_SAT	660
gCHSF_BUN	GAAGGAGAAC	CCAACATCT	GTGAGTACAT	GGCTTCTCTG	CTGGATGCTA	GACAGGACAT	720
gCHSF_SAT	720
gCHSF_BUN	GGTGGTGGTT	GAGGTGCCAA	AACTGGGCAA	GGAGGCTGCC	ACGAAGGCCA	TTAAGGAATG	780
gCHSF_SATG.....	780
gCHSF_BUN	GGGACAGCCC	AAGTCCAAGA	TCACCCACCT	TGTCTTCTGC	ACCACCAGTG	GCGTCGACAT	840
gCHSF_SAT	840
gCHSF_BUN	GCOCGGGGCT	GACTACCAGC	TCACCAAGCT	CCTCGGCCTT	CGCCCCTCG	TCAAGAGACT	900
gCHSF_SAT	900
gCHSF_BUN	CATGATGTAC	CAACAAGGAT	GCTTCGCCGG	AGGCACAGTC	CTTCGCCTGG	CCAAGGACCT	960
gCHSF_SAT	960
gCHSF_BUN	TGCAGAGAAC	AACAGAGGCG	CCCGTGTCTT	TGTCGTCTGC	TCAGAGCTCA	CTGCTGTTAC	1020
gCHSF_SAT	1020
gCHSF_BUN	CTTCCGTGGT	CCAAGTGATA	CCCACCTCGA	CAGTCTTGTA	GGCCAGGCAC	TCTTGGGGGA	1080
gCHSF_SAT	1080
gCHSF_BUN	TGGAGCAGCC	GCAGTTATTG	TGGGTGCAGA	CCCGGTGCC	GGTGTAGAAA	AGCCTTTGTT	1140
gCHSF_SAT	1140
gCHSF_BUN	TGAGTTGGTG	TCGGCAGCCC	AGACAATTCT	CCCAGACAGC	CATGGCGCCA	TTGACGGGCA	1200
gCHSF_SAT	1200
gCHSF_BUN	CCTGAGAGAG	GTTGGACTTA	CCTTCCACCT	GCTCAAGGAT	GTGCCCGGGC	TCATCTCAAA	1260
gCHSF_SAT	1260
gCHSF_BUN	GAACATCGAG	AAGAGCOTGG	TGGAGGCATT	CCAGCCTCTG	GGCATCTCCG	ACTGGAATC	1320
gCHSF_SAT	1320
gCHSF_BUN	AATTTTCTGG	ATCGCCACC	CTGGTGTCC	AGCCATCCTA	GACCAAGTGG	AAGAAAAGCT	1380
gCHSF_SAT	1380
gCHSF_BUN	GGCCCTTAAG	CCCGAGAAGC	TAAGCGCCAC	ACGACACATC	CTGACCGAGT	ATGGAAACAT	1440
gCHSF_SAT	1440
gCHSF_BUN	GTCAAGTCT	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	TTACACGAT	CGCTGCC TAG	1599		
gCHSF_SAT	A.....	1599		

ภาพที่ 4.2 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก (gCHSF_BUN) และบัวหลวงสัตตบงกช (gCHSF_SAT) ด้วยโปรแกรม ClustalW multiple alignment (ตัวอักษรที่บ แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ start codon (ATG) และ stop codon (TAG) ของยีน, ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง intron แสดงเป็นตัวอักษรขีดเส้นใต้ และเครื่องหมาย . แสดงความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่ง)

```

cCHSF_BUN ATGGTGACCG 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 ACCACCAGTG GCGTCGACAT GCCCGGGGCT 420
cCHSF_SAT ..... 420
cCHSF_BUN GACTACCAGC TCACCAAGCT CCTCGGCCTT CGCCCCTCCG TCAAGAGACT CATGATGTAC 480
cCHSF_SAT ..... 480
cCHSF_BUN CAACAAGGAT GCTTCGCCGG AGGCACAGTC CTTCGCCTGG CCAAGGACCT TGCAGAGAAC 540
cCHSF_SAT ..... 540
cCHSF_BUN AACAGAGGCG CCCGTGTCTT TGTCGTCTGC TCAGAGCTCA CTGCTGTTAC CTTCGGTGGT 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 .....T..... 720
cCHSF_BUN TCGGCAGCCC AGACAATTCT CCCAGACAGC CATGGCGCCA TTGACGGGCA CCTGAGAGAG 780
cCHSF_SAT ..... 780
cCHSF_BUN GTTGGACTTA CCTTCCACCT GCTCAAGGAT GTGCCCGGGC TCATCTCAA GAACATCGAG 840
cCHSF_SAT ..... 840
cCHSF_BUN AAGAGCCTGG TGGAGGCATT CCAGCCTCTG GGCATCTCCG ACTGGAACTC AATTTTCTGG 900
cCHSF_SAT ..... 900
cCHSF_BUN ATCGCCACC CTGGTGGTCC AGCCATCCTA GACCAAGTGG AAGAAAAGCT GGCCCTTAAG 960
cCHSF_SAT ..... 960
cCHSF_BUN CCCGAGAAGC TAAGCGCCAC ACGACACATC CTGAGCGAGT ATGGAAACAT GTCAAGTGCT 1020
cCHSF_SAT ..... 1020
cCHSF_BUN TGTGTGCTGT TCATATTGGA TGAGATGCGG AAGAAGTCGA TTGAGGATGG CCTCAAGACC 1080
cCHSF_SAT .....T..... G..... 1080
cCHSF_BUN ACTGGAGAAG GGCTCGAGTG GGGTGTGCTG TTTGGGTTTG GACCAGGGCT AACCGTTGAG 1140
cCHSF_SAT ..... 1140
cCHSF_BUN ACTGTGGTGC TTCACAGTAT CGCTGCCTAG 1170
cCHSF_SAT ..... 1170

```

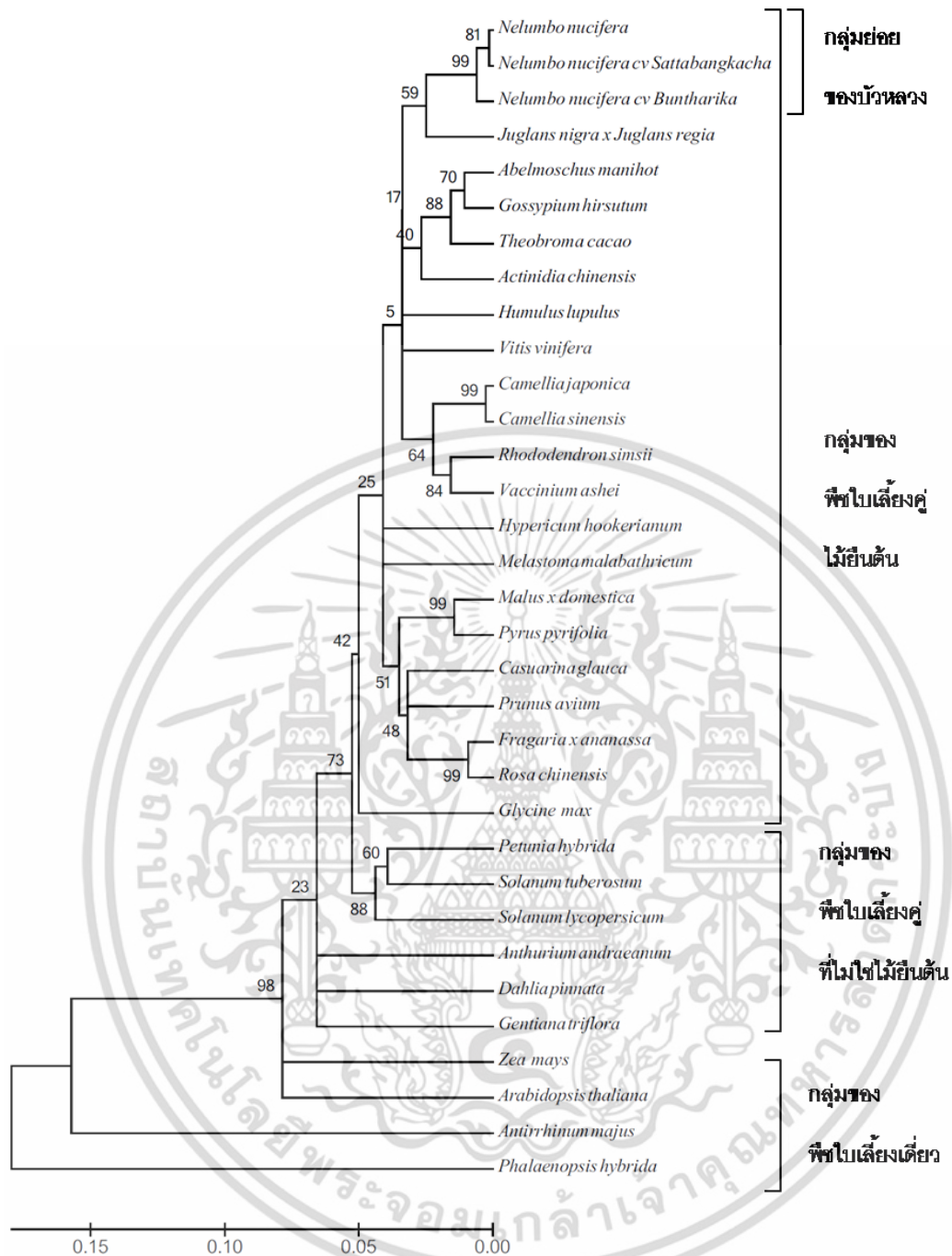
ภาพที่ 4.3 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของ กลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กรีก (*cCHSF_BUN*) และบัวหลวงตัดตบงข (*cCHSF_SAT*) ด้วย โปรแกรม ClustalW multiple alignment (ส่วนที่ขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ start codon (ATG) และ stop codon (TAG) ของยีน, เครื่องหมาย (.) 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	GISDWSIFW	300
cCHSF_SAT	300
cCHSF_BUN	IAHPGGPAIL	DQVEEKLALK	PEKLSATRHI	LSEYGNMSSA	CVLFILDEMR	KKSIEDGLKT	360
cCHSF_SATR.....	360
cCHSF_BUN	TGEGLEWGV	FGFGPGLTVE	TVVLHSIAA*	389			
cCHSF_SAT*	389			

ภาพที่ 4.4 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของ กลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กรีก (cCHSF_BUN) และบัวหลวงสีตบงกช (cCHSF_SAT) ด้วย โปรแกรม ClustalW multiple alignment (เครื่องหมาย * หมายถึง ไม่สามารถแปลเป็น กรดอะมิโนได้ 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>	กีวี่	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>	สาลี่	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>	สตอร์เบอร์รี่	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>	ดอกกรักร์	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>	อราบิดอปซิส	AAZ23741	chalcone synthase	85
<i>Antirrhinum majus</i>	ต้นลิ้นมังกร	BAE80511	chalcone synthase	86
<i>Phalaenopsis hybrida</i>	กล้วยไม้	AAX54693	chalcone synthase	85

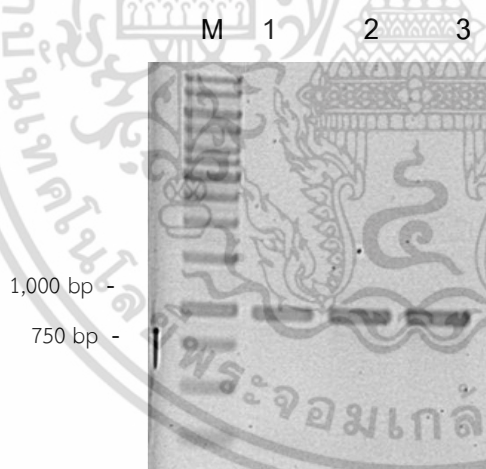


ภาพที่ 4.5 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กรีก และบัวหลวงสัตตบงกช กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) ตัวเลขบนแขนง (node) แสดงเปอร์เซ็นต์ความน่าเชื่อถือจากการคำนวณด้วย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

4.1.2 ยีน F3H

4.1.2.1 การสังเคราะห์ยีน F3H บางส่วน โดยใช้ degenerated primer

สังเคราะห์ยีน F3H ในดอกอุบลชาติเซนตหุลยส์โกลด์มีกลีบดอกสีเหลือง 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 เลือกลโคไลนีสีขาวเพื่อตรวจสอบชิ้นส่วนของยีน F3H ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pTZ57RT (pTZ-F3H) ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ผลปฏิกิริยาพีซีอาร์พบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 นิวคลีโอไทด์ จากโคไลนี pTZ-F3H จากตัวอย่างของอุบลชาติเซนตหุลยส์โกลด์ ปทุมชาติสีดตบงกชและปทุมชาติบุณทริก คัดเลือกโคลนที่ถูกต้องนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer คือ M13F และ M13R



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

4.1.2.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนบางส่วนของ F3H ในอุบล ชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุญทริก

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ายีนส่วนยีน F3H ที่โคลนได้มีขนาด 823 นิวคลีโอไทด์ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนส่วนยีน F3H ที่โคลนได้จากอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุญทริก มาเปรียบเทียบกับโปรแกรม BioEdit พบว่ามีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.7) เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนส่วนยีน F3H ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน F3H ของพืชต่างๆ ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTX พบว่ายีน F3H ที่สังเคราะห์ได้จากอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุญทริก แสดงความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน F3H ของไอริส (*Iris hollandica*) (BAD86791.1) 82 เปอร์เซ็นต์ มันเทศ (*Ipomoea batatas*) (BAA75309.1) 79 เปอร์เซ็นต์ สตรอเบอร์รี่ (*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

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
<i>F3H St. Louise Gold</i>									
<i>F3H St. Louise Gold</i>	TCCCAAGGTGGCTTACAATGACTTCAGCAACGACGTCCCCGTCTCTCCCTCGCCGGCTCGAGTCGGATCCCGGAGCCGCTCCGCCATCCGGGACGTC									
<i>F3H Satabankacha</i>									
<i>F3H Buntharik</i>									
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
<i>F3H St. Louise Gold</i>									
<i>F3H St. Louise Gold</i>	ATCGTCAAGGCCTGCGAGGAGTGGGGCTCTTCCAGGTCGTGGACCACGGGGTCGACCGGTGATCGTATCGGCGATGACCGACATGGCGAACCGCTTCT									
<i>F3H Satabankacha</i>									
<i>F3H Buntharik</i>									
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
<i>F3H St. Louise Gold</i>									
<i>F3H St. Louise Gold</i>	TCCGGCTGCGCAGGAGGAAAAGCTCCGCTTTGACATGAGTGGCGGAAAGCGGGCGGCTTCATCGTCAGCAGCCACCTGCAGGATGGCGGGTGCAAAACG									
<i>F3H Satabankacha</i>									
<i>F3H Buntharik</i>									
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
<i>F3H St. Louise Gold</i>									
<i>F3H St. Louise Gold</i>	AGTTCTGAATTATGATCAGCGCGTTTCTAATGCGAAATCCCTCCATCTGTACTTGTAGGGCGAGTCGGTGCAGGATTGGCGTGAAGATTGCGACGTTCTT									
<i>F3H Satabankacha</i>									
<i>F3H Buntharik</i>									
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
<i>F3H St. Louise Gold</i>									
<i>F3H St. Louise Gold</i>	CACTTATCCAGTGAAGGGGAGGGACTACTTTCAGGTGGCTGACGTGCCGGAGGGGTGGCCGGACGTGACGAAGAGGTACAGCGAGCAACCGATGAGACTG									
<i>F3H Satabankacha</i>									
<i>F3H Buntharik</i>									
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
<i>F3H St. Louise Gold</i>									
<i>F3H St. Louise Gold</i>	GGTGCAAGCTTCTGGCTATACTGTCAGAGGGGCTGGGGCTGACGAGGGAGGCACTGAAGGAGGCGTGCCTGGACATGGACCAGAAGTGGTGGTGAAC									
<i>F3H Satabankacha</i>									
<i>F3H Buntharik</i>									
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
<i>F3H St. Louise Gold</i>									
<i>F3H St. Louise Gold</i>	ACTACCOCGCTGCCCTAGCCGGAGGTGCTGGGGCTAAAGAGGCACACCCGCTGCGAGGCAAGTCGGGGGGTCTCCAGCCACCAAAGGACGGC									
<i>F3H Satabankacha</i>									
<i>F3H Buntharik</i>									
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
<i>F3H St. Louise Gold</i>									
<i>F3H St. Louise Gold</i>	GGAAAGACTTGGATCACCGTCCAGCCGCTCCAGGGCGCTTCGTCTTCAACCTCGGTGACCATGCCCATGTGATTCCCTCTCTCTGACAGCTTCTTGGTT									
<i>F3H Satabankacha</i>									
<i>F3H Buntharik</i>									
	810	820								
<i>F3H St. Louise Gold</i>	TGCTACTTCCTACAAGCTCTTGG									
<i>F3H Satabankacha</i>									
<i>F3H Buntharik</i>									

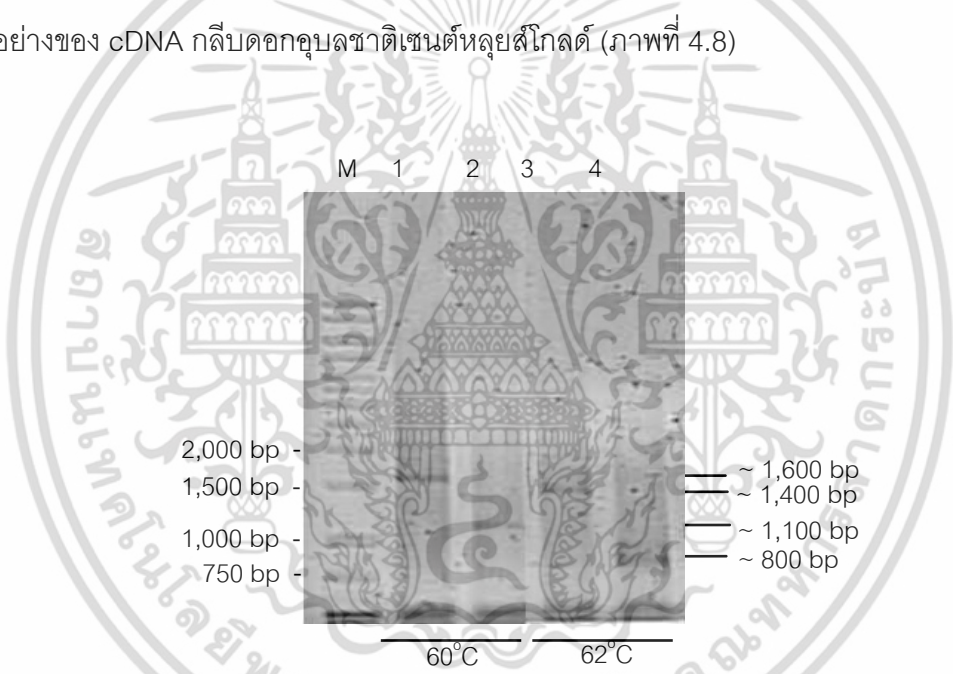
ภาพที่ 4.7 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นส่วนยีน *F3H* ขนาด 823 นิวคลีโอไทด์ ของอุบลชาติ เซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุญทริก ด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) เครื่องหมาย . แสดงความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่ง

ตารางที่ 4.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *F3H* ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสีตบงกชและปทุมชาติบุณทริก 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

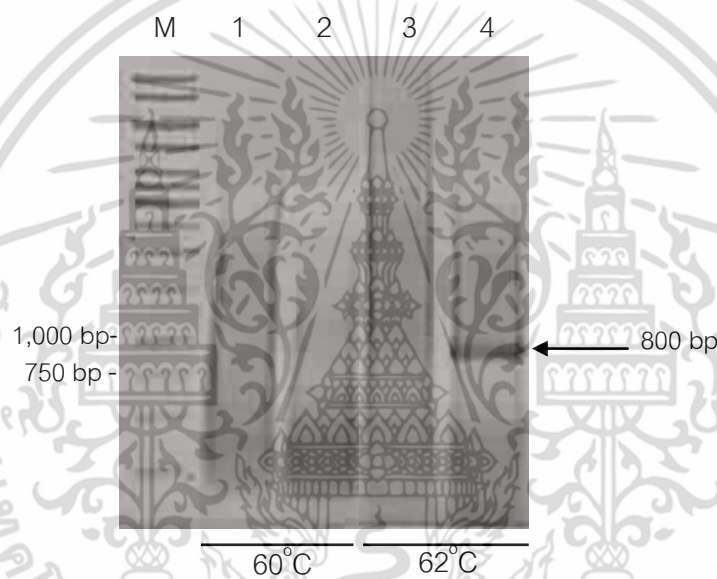
4.1.2.3 การสังเคราะห์ยีน *F3H* บริเวณด้านปลาย 5' (5'*F3H*) จาก cDNA กลีบดอกอุบลชาติเซนตูลุยส์โกลด์

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 จากอุบลชาติเซนตูลุยส์โกลด์ คู่กับไพรเมอร์ 5'RACE GSP1 ซึ่งจับบริเวณภายในยีน *F3H* ผลที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้นตอนแรก 5'RACE PCR พบขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,600 นิวคลีโอไทด์ ในตัวอย่างของ cDNA กลีบดอกอุบลชาติเซนตูลุยส์โกลด์ และขนาดประมาณ 1,100 นิวคลีโอไทด์ ในตัวอย่างของ cDNA กลีบดอกอุบลชาติเซนตูลุยส์โกลด์ เมื่อใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สำหรับขั้นตอน annealing และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอน annealing เป็น 62 องศาเซลเซียส สามารถสังเคราะห์ขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 นิวคลีโอไทด์ ในตัวอย่างของ cDNA กลีบดอกอุบลชาติเซนตูลุยส์โกลด์ และขนาดประมาณ 800 นิวคลีโอไทด์ ในตัวอย่างของ cDNA กลีบดอกอุบลชาติเซนตูลุยส์โกลด์ (ภาพที่ 4.8)



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

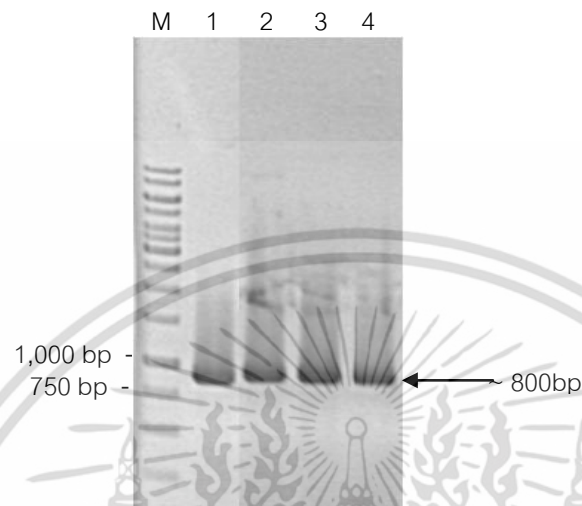
นำผลผลิตพีซีอาร์จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้นตอนแรก 5'RACE PCR มาทำการเจือจางด้วย Tricine-EDTA ด้วยอัตราส่วน 49:1 (Tricine EDTA : ผลผลิตพีซีอาร์) แล้วนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้นตอนที่ 2 คือ Nested PCR โดยในขั้นตอนนี้จะใช้ไพรเมอร์ 5'Nested ที่จับบริเวณ 5' adaptor คู่กับไพรเมอร์ 5'RACE NGSP1 ที่จับบนยีน *F3H* ด้วยอุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส สำหรับขั้นตอน annealing ผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้นตอนที่ 2 พบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 นิวคลีโอไทด์ จากผลผลิตพีซีอาร์ 5'RACE ในขั้นตอนแรกที่เจือจางด้วย Tricine EDTA ของกลีบดอกอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ เมื่อใช้อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส แต่ไม่พบชิ้นดีเอ็นเอเมื่อใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สำหรับขั้นตอน annealing และไม่พบชิ้นดีเอ็นเอจาก cDNA ของดอกลินมังกรสีเหลือง 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 ของดอกลินมังกรสีเหลือง (1, 3) และผลผลิตพีซีอาร์ 5' RACE ของดอกอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ (2, 4) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบที่อุณหภูมิ 60 และ 62 องศาเซลเซียส ในขั้นตอน annealing ของปฏิกิริยาเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (M)

สกัดแยกชิ้นดีเอ็นเอของ 5 Nested RACE *F3H* ขนาดประมาณ 800 นิวคลีโอไทด์ จากตัวอย่างของดอกอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ออกจากเจลแล้วนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pTZ57R/T เพื่อสร้างเวกเตอร์ pTZ-5 Nested RACE *F3H* แล้วถ่ายโอนเข้าแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ คัดเลือกโคโลนีสีขาวเพื่อตรวจสอบชิ้นส่วนยีน 5 Nested RACE *F3H* ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pTZ-5 Nested RACE *F3H* ผลการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์พบชิ้นดีเอ็นเอขนาดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

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* ของอูบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ 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' ที่ได้กับฐานข้อมูล 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 finlaysoniana*) (GU269859.1) 57 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3)

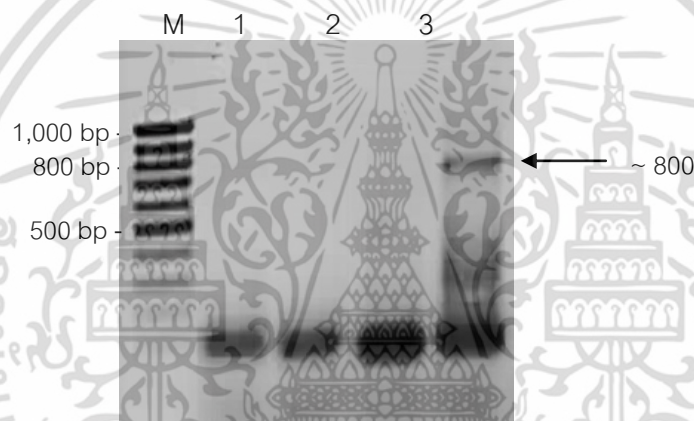
ตารางที่ 4.3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *F3H* ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ด้านปลาย 5' กับฐานข้อมูล GenBank (BLASTX)

Accession number	Plant	Gene name	Identity score (%)
	<i>Nymphaea hybrid</i> 'St.Louise Gold'	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 กลีบดอกอุบลชาติเซนตล์หุยส์โกลด์

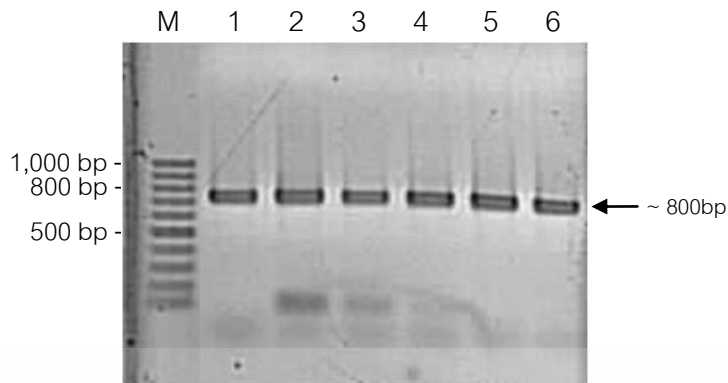
โคลนยีน *F3H* ทางด้านปลาย 3' จาก cDNA กลีบดอกเซนตล์หุยส์โกลด์ ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์คู่กับการใช้ไพรเมอร์ Oligo-dt ที่จับบนตำแหน่ง poly A tail ของสาย cDNA และไพรเมอร์ *F3H8* (ตารางผนวกที่ 1) ที่จับบนยีน *F3H* ผลปฏิกิริยาพีซีอาร์สามารถสังเคราะห์ยีนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800

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



ภาพที่ 4.11 ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ยีน *F3H* ด้านปลาย 3' ของอุบลชาติเซนตล์หุยส์โกลด์ที่อุณหภูมิ 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 คัดเลือกโคลนนี้สีขาวมาตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ผลการตรวจสอบยีนส่วนยีน *3'F3H* ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pTZ-*3'F3H* พบยีนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีขนาดเท่ากับยีนส่วนยีน *3'F3H* จำนวน 6 โคลน (ภาพที่ 4.12) คัดเลือกโคลนที่ 1, 2 และ 3 ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer คือ M13F และ M13R



ภาพที่ 4.12 ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน 3'F3H ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ 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 ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ มีความใกล้เคียงกันมากกับยีน F3H ในพืชอื่นๆ

```

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

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

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

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

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

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

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

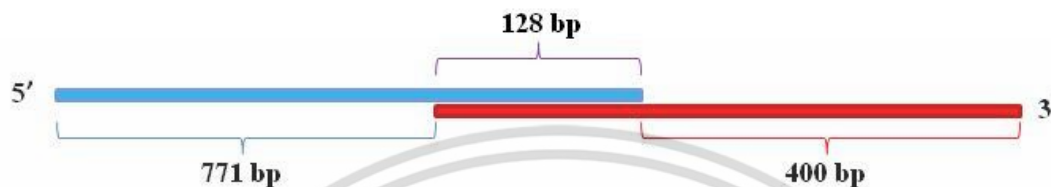
```

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

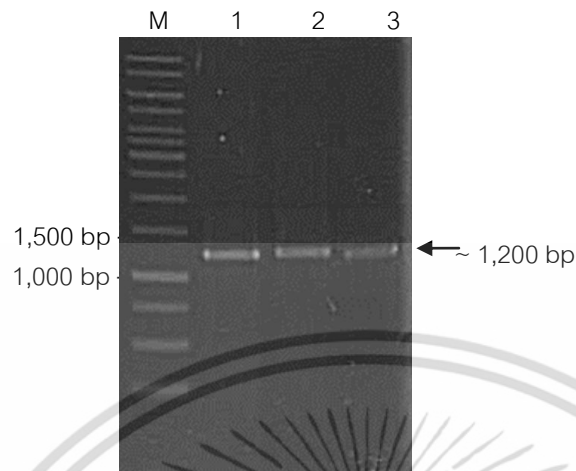
เมื่อนำข้อมูลยีน *F3H* จากทางด้านปลาย 5' และปลาย 3' ที่โคลนได้มา ประกอบกัน (contig) ด้วยโปรแกรม BioEdit ทำให้ได้ full length cDNA โดยมีช่วงที่ทับซ้อนกัน (overlap) ประมาณ 128 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 4.14) จากนั้นนำข้อมูลบริเวณ stop codon ทางด้านปลาย 3' มา ออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ยีน *F3H* เต็มเส้น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



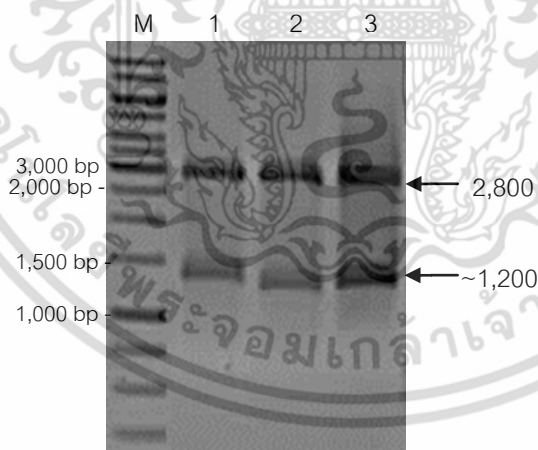
ภาพที่ 4.14 แผนภาพแสดงการรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ได้จากด้านปลาย 5' (สีน้ำเงิน) และด้านปลาย 3' (สีแดง) ของยีน *F3H* ในอุบลชาติเซนตหุลยส์โกลด์ด้วยวิธีการของ SMARTer™ RACE แสดงช่วงทับซ้อนกันของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 128 นิวคลีโอไทด์

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

ผลปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ 5'RACE cDNA ของอุบลชาติเซนตหุลยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติ เป็นดีเอ็นเอต้นแบบคู่กับไพรเมอร์ UPM ที่จับบริเวณปลาย 5' adaptor กับไพรเมอร์ F3Hstop ที่จับบริเวณรหัสหยุดของยีน *F3H* พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 นิวคลีโอไทด์ ในตัวอย่างของ 5'RACE cDNA อุบลชาติเซนตหุลยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกชและปทุมชาติปทุมชาติ เมื่อใช้อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส สำหรับขั้นตอน annealing ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ภาพที่ 4.15) จากนั้นสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pTZ57R/T เพื่อสร้างเวกเตอร์ pTZ-*F3H* full แล้วถ่ายโอนเข้าแบคทีเรีย *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 pTZ57R/T ที่มีขนาดประมาณ 2,800 นิวคลีโอไทด์ และชิ้นดีเอ็นเอของยีน *F3H* ขนาดประมาณ 1,200 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 4.16) จากนั้นนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer คือ M13F และ M13R



ภาพที่ 4.15 ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ยีน *F3H* ตามวิธีการของ SMARTer™ RACE ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 นิวคลีโอไทด์ ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ (1) ปทุมชาติสัตตบงกช (2) ปทุมชาติบุณชกริก (3) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (M)



ภาพที่ 4.16 การตรวจสอบพลาสมิด pTZ-*F3H* full ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ (1) ปทุมชาติสัตตบงกช (2) ปทุมชาติบุณชกริก (3) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Eco* RI พบชิ้นดีเอ็นเอของเวกเตอร์ pTZ57R/T ขนาดประมาณ 2,800 นิวคลีโอไทด์ และชิ้นดีเอ็นเอของยีน *F3H* ขนาดประมาณ 1,200 นิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (M)

ผลการวิเคราะห์ยีน *F3H* ในอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติ สัตตบงกช และปทุมชาติบุญชริก พบว่ายีน *F3H* มี open reading frame ขนาด 1,134 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นโปรตีนได้ขนาด 377 กรดอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *F3H* ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติ สัตตบงกช และปทุมชาติบุญชริกด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *F3H* ของอุบลชาติ และปทุมชาติ มีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.17) และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *F3H* ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุญชริกไปเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของ *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 และปทุมชาติบุญชริก กับพืชชนิดต่างๆ ที่มีรายงานบน GenBank ได้แก่ เบญจมาศ (*Dendranthema grandiflorum*) (DXU86837), ฝ้าย (*Gossypium barbadense*) (DQ912945), หงอนนกยูง (*Tecomaria capensis*) (GU587738), มกรูดดา (*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), ไอร์ริส (*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 GAGCAGAGAGTGAGAGAGATGGCACCCACACTGGTGGTGGAGTCGTCGCGGCCCTGCTCAGCCGAGACCGTTTCTCCCGACGCTGAACGAGGAGAAGA
F3H Satabankacha .....
F3H Buntharik .....
110      120      130      140      150      160      170      180      190      200

|.....|
F3H St.Louise Gold CGCTGAGGGAGTCGTTCGTGCGGACGAGGACGAGCGCCGAGAGTGGCCACACGACTTCAGCAACGACGTCCTCCCTGGCCGGCCTCGA
F3H Satabankacha .....
F3H Buntharik .....
210      220      230      240      250      260      270      280      290      300

|.....|
F3H St.Louise Gold CTCCGACGACTCCCGCGTCCGAGGTCCGGACGCCATCGTCCGGCGTGCAGGAGTGGGGGCTTCCAGGTCGTGGACCACGGCTGGACGCTCC
F3H Satabankacha .....
F3H Buntharik .....
310      320      330      340      350      360      370      380      390      400

|.....|
F3H St.Louise Gold CTGCTCCTCCATGACGGAGATGGCGGCCCTTCTTCAAGTTCGCCCCGAGGAGAAGCTCCGTTCCGACATGTCGCGGGGAAGCGCGGGGGTTCA
F3H Satabankacha .....
F3H Buntharik .....
410      420      430      440      450      460      470      480      490      500

|.....|
F3H St.Louise Gold TCGTGAGCAGCCACTGCAGGGGAGGCGGTGAAGGACTGGCGGGAGATCGTGACGTTCTTCGTAACCGTTGGCGGGAGGACTACTCCCGTGGCC
F3H Satabankacha .....
F3H Buntharik .....
510      520      530      540      550      560      570      580      590      600

|.....|
F3H St.Louise Gold GGACGTCGCCGAGGGGTGGCGCGGTGGCGGAGGATACAGCAGGAGCTGATGGCGTGGCGTGAAGCTTTGGGGGTGCTGTCGGAGGCGATGGGG
F3H Satabankacha .....
F3H Buntharik .....
610      620      630      640      650      660      670      680      690      700

|.....|
F3H St.Louise Gold CTGCGCTCGGATGCGCTCCGGATCCGTGCGGGACATGGACCAGAAGATGGTGGTGAACACTACCCCGCGTCCCGCAGCCGACCTGACCTGGGGC
F3H Satabankacha .....
F3H Buntharik .....
710      720      730      740      750      760      770      780      790      800

|.....|
F3H St.Louise Gold TGAAGCGGCACACCGACCCCGCACCATCACCTTCTGCTGCAGGACCTGGTCGGAGCCTGCAGGCCACAGGACCGCGGCAAACTGGATCACCGT
F3H Satabankacha .....
F3H Buntharik .....
810      820      830      840      850      860      870      880      890      900

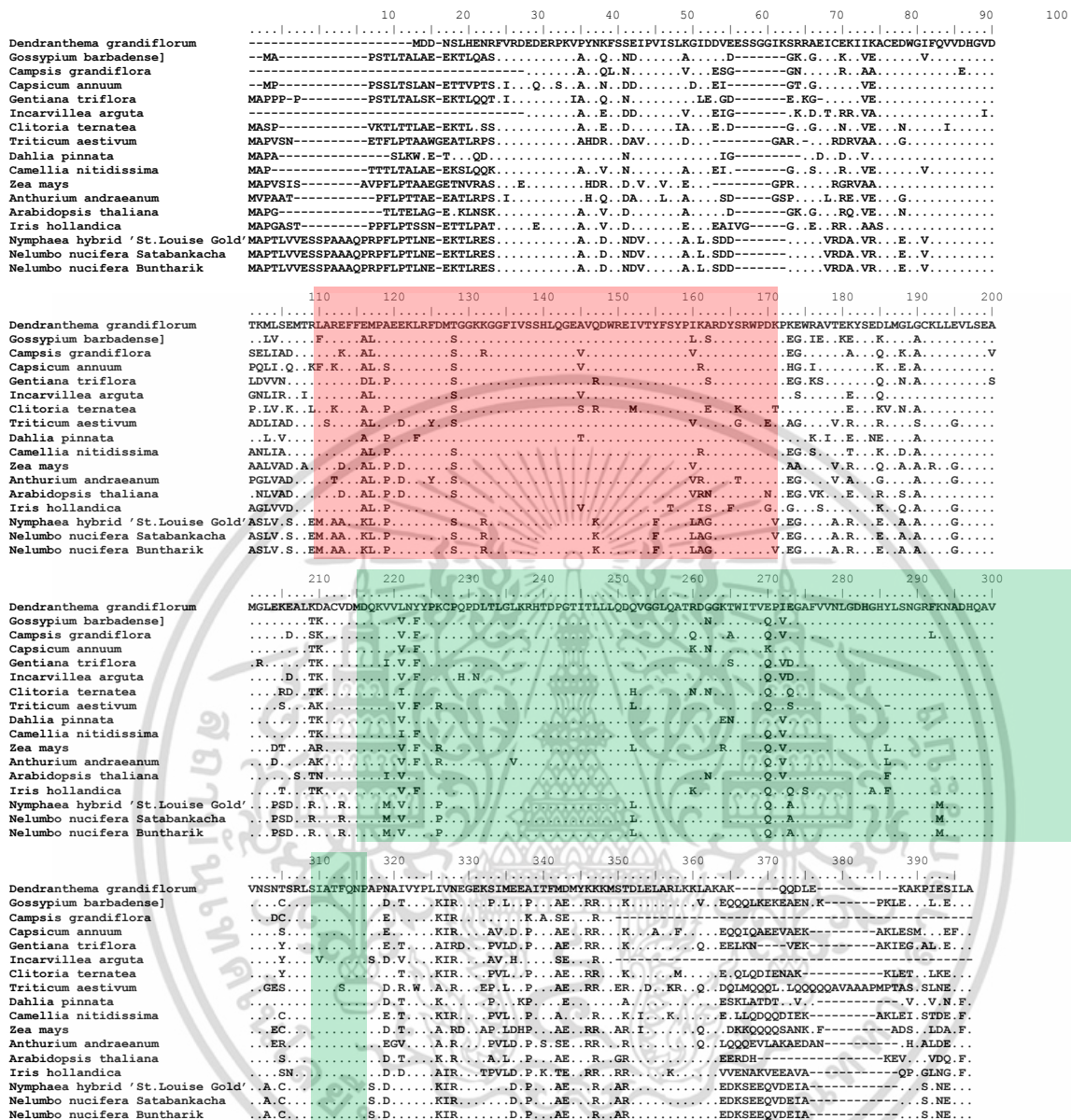
|.....|
F3H St.Louise Gold CCAGCCAATCGCCGGCCTTCGTCGTCACCTCGGCACCGCCATTACCTTAGCAATGGAAGGTTTCATGAACGGGATCACCAAGCGGTCGTC AAC
F3H Satabankacha .....
F3H Buntharik .....
910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000

|.....|
F3H St.Louise Gold GCAAATGCAGCCGCTATCGATAGCCAGTTCAGAAATCCGTCGCGGACGCCATCGTGTACCCATTGAAGATCAGAGGGAGAGAAATCGATAATGG
F3H Satabankacha .....
F3H Buntharik .....
1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090     1100

|.....|
F3H St.Louise Gold ATGAGCCCATCACCTTCGCAGAGATGTACAAGAGGAAGATGGCCAGAGACCTGGAGCTTGCCAGGCTCAAAAAGCTCGCAAGGAGGACAAAAGCGAGGA
F3H Satabankacha .....
F3H Buntharik .....
1110     1120     1130     1140     1150
|.....|stop codon
F3H St.Louise Gold GCAGGTCGACGAGATAGCCAAAGCCAAATCGATCAATGAAATCTGGCCTGA
F3H Satabankacha .....
F3H Buntharik .....

```

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



ภาพที่ 4.18 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนโปรตีน F3H ของคุณลักษณะเด่นหลายสีโกลด์ ปทุมชาติ สัตตบงกช และปทุมชาติบุณทริกกับพืชชนิดต่างๆ ที่มีรายงานบน GenBank ด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) ภายในกรอบสีเขียวแสดงช่วง (domain) ลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกับปลายทางด้าน N-terminus ของโปรตีน 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenase และกรอบสีเหลืองแสดงช่วง (domain) ลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกับโปรตีน 2-oxoglutarate (2OG)/Fe(II)-dependent oxygenase

Lotus	-NDVPVISLAGLSDSD-SRRAEVRDAIVRACEEWGVFQVVDHGVDAISLVSSMTEMAAAFF	107
<i>Ginkgo biloba</i>	TGQIPVVDMAGWEEGGARRKEIMRQVAEASEEWGMQVLNHGISDSLARLQAAGKAFF	108
<i>Camellia sinensis</i>	-VTVPVISLS-----QPHDVVDALSKACSEWGFLLITDGHVPEPSLIGRLKEVGEEFF	89
<i>Perilla frutescens</i>	-SEIPVISLARIDESG-DKRAEVCRRIVAACEDWGFQVVDHGVHMPVVEGMRRLAREFF	96
Lotus	KLPPEEK--LRFDMSSGGKRGGFIVSSHLQGEAVKDWREIVTFFSYPLAGRDRYRWPDPVPE	165
<i>Ginkgo biloba</i>	DLPIEEKEVYANDSASGKIAGYGSKLANNASQLEWEDYFHLWPTHERDMTTWPKYPS	168
<i>Camellia sinensis</i>	KLPQEEKESYANDPSSGSFEGYGTMTKNFDEKVEWIDYFHVHMPKKNLDMWPKNPS	149
<i>Perilla frutescens</i>	ALPDPHEK--LRFDMSSGGKRGGFIVSSHLQGEVVDWREIVTYFSYPITARDYRWPDPKPV	154

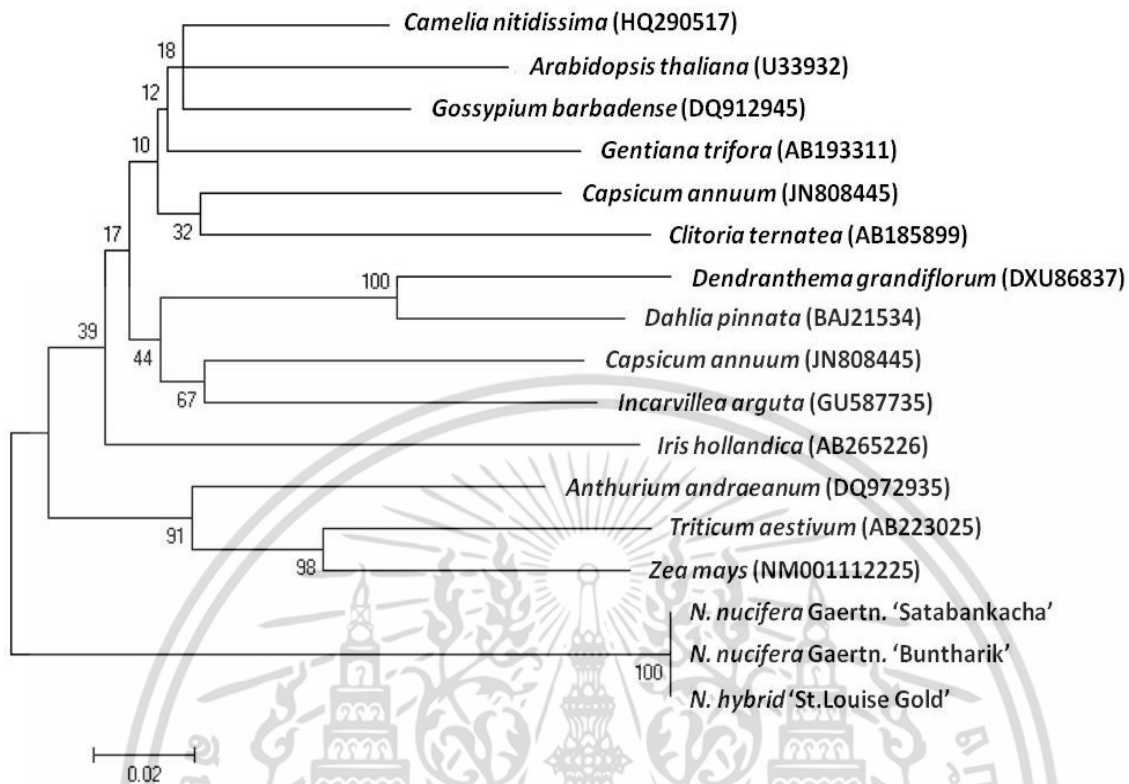
ภาพที่ 4.19 การเปรียบเทียบช่วงลำดับกรดอะมิโน (domain) ที่ 52-162 โปรตีน F3H ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์ โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุญทริก (Lotus) กับพืชชนิดต่างๆ ส่วนแวงแสดงช่วงโครงสร้าง (structure) ของโปรตีนที่อยู่ในรูปแบบเดียวกัน

Lotus	YSEELMALACKLLGVLSEAMGLPSDALRDACRMDQKMVVNYPPCPQPD	223
<i>Oryza sativa Japonica</i>	YSDSMKDLAQKLLRIVSESLNLPSPYIEEAVGEVYQNIITVSYSPCPQPD	218
<i>Arabidopsis thaliana</i>	YAEAMNTLSLKLIMELLGMSLGVERRYFKFEFFEDSDSIFRLNYPPQCKQPE	238
<i>Lactuca sativa</i>	YCNAMSRSLGIMELLGMSLGVESHFKFEFFKENDSIMRLNYPPCQKQPD	230
<i>Atropa belladonna</i>	YSVEVRKLTMRILDYICEGLGLKLYFDNELSQIQMMLTN-YYPCPDPS	209
<i>Solanum melongena</i>	YSDELRRVSKVILGMVAEGLGLEPGFFDKGLG--QRMLVN-HYBACPDPS	209
<i>Hordeum vulgare</i>	FTSQTRDVGKELLRLCEGMGIQADYFEGDLGGNVILNINHYSPCPNP	201
Lotus	LTLGLKRHTDPTITLLQLDVLVGGQLQATRDGGKTWITVQPIAGAFVNLG	273
<i>Oryza sativa Japonica</i>	LALGLQSHSDMGAITLLIQDDVGGLEVLKDG--LWIPVPSLPDGLVILA	266
<i>Arabidopsis thaliana</i>	LALGTGPHCDPTSLTILHQDQVGGLEQVEVDN--KWQSIPPNPHAFVNLG	286
<i>Lactuca sativa</i>	LTLGTGPHCDPTSLTILHQDQVGGLEVFIDN--EWRSIAPNLNTEFVNLG	278
<i>Atropa belladonna</i>	STLGSGGHYDGNLITLLQNLPGQLQLEDA--KWIAVEPIPTAFVNLG	257
<i>Solanum melongena</i>	LTLGVGGHCDPNLITIIQQEYVGLQILKDD--KWIQVEPKPNAFVNLG	256
<i>Hordeum vulgare</i>	KALGQPPHCDRNLITLLLPQAVNGLEVSYKG--DWIKVDPAPNAFVNLG	249
Lotus	DHGHYLSNGRFMNADHQAVVNANCSRLSIATFQNPSPDAIVYPLKIREGE	323
<i>Oryza sativa Japonica</i>	DQTEIITNGRYKSAVHRAIVNADRARLSVATFYDPSK-----SRKICTAP	311
<i>Arabidopsis thaliana</i>	DTFMALTNNGRYKSLHRAVVNSERERKTFAFFLCPKG-----EKVVKPP	330
<i>Lactuca sativa</i>	DTFMALSNGQYRSLHRAVVNNKIHRSKLAFFLCPKK-----DKVVSPP	322
<i>Atropa belladonna</i>	LTLKVITNEKFEFSIHRVVTNPTDRVSIATLIGPDYS-----CTIEPA	301
<i>Solanum melongena</i>	LPITVISNGKSLASVAHRVVTNTTSHRTSISGTFICPEN-----IVEPA	298
<i>Hordeum vulgare</i>	QQLEVVTNGLLKSIEHRAMTNSALARTSVATFIMPTQE-----CLIGPA	293

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

ตารางที่ 4.5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *F3H* ของอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสีดตบงกช และปทุมชาติบุญทวีกริ 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



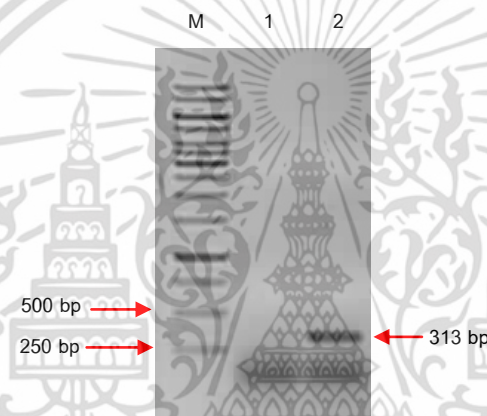
ภาพที่ 4.21 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโปรตีน F3H จากปทุมชาติสัตตบงกช (*N. nucifera* Gaertn. 'Satabankacha') ปทุมชาติบุณทรภิก (*N. nucifera* Gaertn. 'Buntharik') และอุบลชาติเซนต์หลุยส์โกลด์ (*N. hybrid* 'St.Louise Gold') กับโปรตีน F3H จากพืชอื่นๆ ที่มีรายงานบน GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA5 (Tamura *et al.*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

4.1.3 ยีน 4'CGT

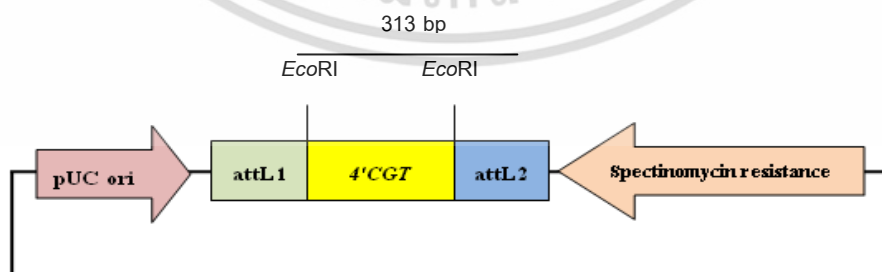
4.1.3.1 การสังเคราะห์ยีน 4'CGT บางส่วนด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

สังเคราะห์ชิ้นส่วนยีน 4'CGT จาก cDNA ของดอกลินมังกรสีเหลือง 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 ตรวจสอบโคลนนี้ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์คู่

กับไพรเมอร์ F-EcoRI-4'CGT และ R-4'CGT-SacI จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะสเปคโตรไมซิน 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 พบแถบดีเอ็นเอ ขนาด 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 ของลินมังกร (EF650015.1) ตำแหน่งที่ 336 ถึง 644 นิวคลีโอไทด์ จากนั้นทำการคัดเลือก พลาสมิด pCR8-4'CGT ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้องสำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป



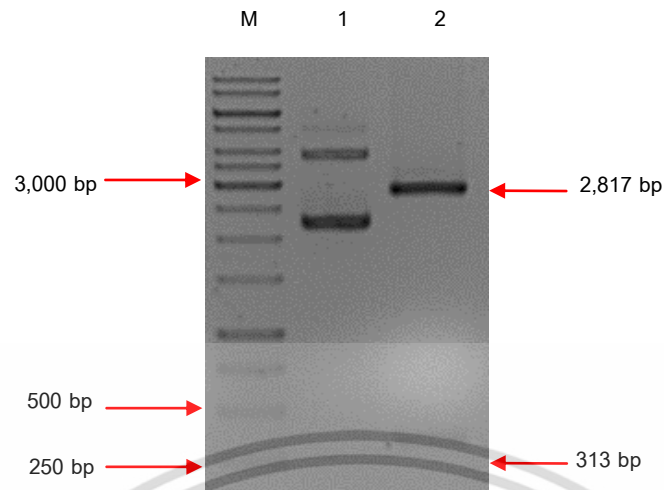
ภาพที่ 4.22 ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ยีนบางส่วน 4'CGT จาก cDNA ของดอกลินมังกร พันธุ์ Pixie Bells ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 313 นิวคลีโอไทด์ (2) เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (M) และ negative control คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ไม่ได้ใส่ cDNA ของดอกลินมังกร (1)



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
80

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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 ที่จับบริเวณตำแหน่งอนุรักษ์บนยีน 4'CGT ซึ่งออกแบบจาก ลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ของยีน 4'CGT ใน cDNA ของลีนมังกร ขนาด 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 ของลีนมังกร (EF650015.1) 100 เปอร์เซ็นต์

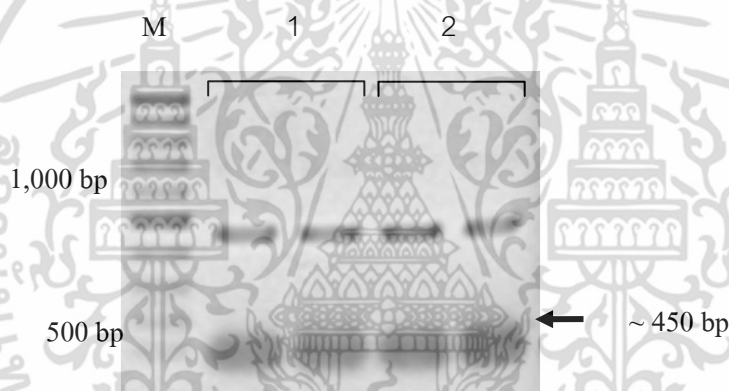
4.2 การแสดงออกของยีน *chalcone synthase* (CHS), *flavonone 3-hydroxylase* (F3H), *chalcone* และ 4'-*O-glucosyltransferase* (4'CGT)

4.2.1 การศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน CHS ในกลีบดอกบัวหลวง บุนนทริกและดอกบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

ผลการศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน CHS กับในกลีบดอกบัวหลวง บุนนทริกสีขาวยาว และบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู และปริมาณการแสดงออกของยีน CHS ในกลีบดอกบัวหลวงในช่วงระยะของการพัฒนาของดอกบัวหลวง ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

4.2.1.1 ผลการโคลนบางส่วนของยีน *CHS* จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวง บุนนทริกและบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยเทคนิค PCR

ทำการโคลนบางส่วนของยีน *CHS* จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวง บุนนทริกและบัวหลวงสัตตบงกชด้วยเทคนิค PCR โดยทำการออกแบบไพรเมอร์จากส่วนของลำดับอนุกรมที่ได้บางส่วนของยีน *CHS* ขนาดประมาณ 450 bp (ภาพที่ 4.25) จากนั้นนำผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้นำไปเชื่อมต่อกับโคลนนิ่งเวกเตอร์ pTZ57RT จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า บางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวง บุนนทริกและบัวหลวงสัตตบงกช 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 บุนนทริก ขนาดประมาณ 450 bp และ (2) cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช ขนาดประมาณ 450 bp (M = 100 bp DNA marker)

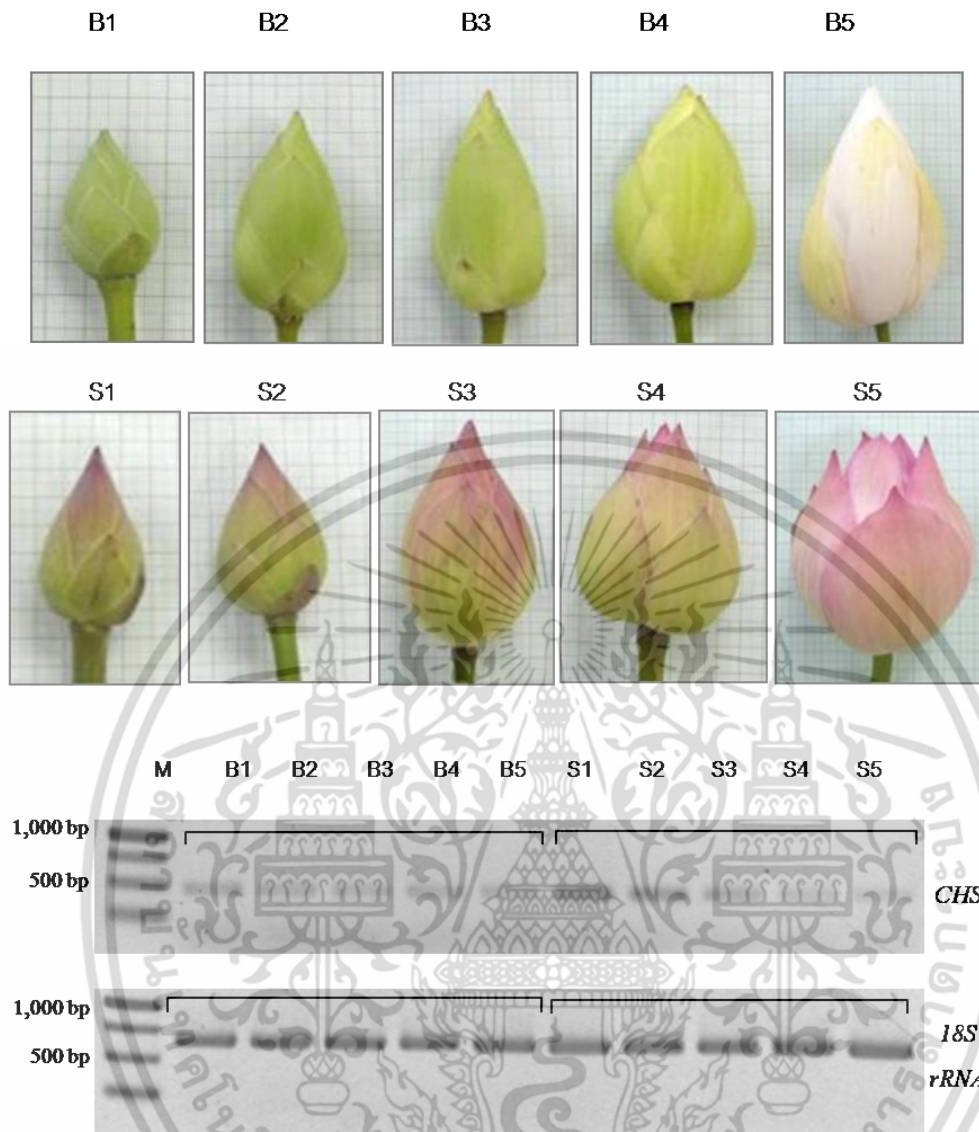
<i>CHSF_BUN</i>	ATGGTGACCG	TGGAAGACAT	CCGCAAGGCA	CAGAGGGCTG	AAGGCCCGGC	CACGGTGATG	GCCATTGGAA	70
<i>CHSA_BUN</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
<i>CHSA_SAT</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
<i>CHSF_BUN</i>	CAGCCAATCC	GCCCAACTGT	GTCGACCAGA	GCACATACCC	TGACTACTAC	TTCCGGATCA	CCAACAGCGA	140
<i>CHSA_BUN</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
<i>CHSA_SAT</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
<i>CHSF_BUN</i>	GCACAAGACA	GAGCTTAAAG	AGAAATCCAA	GCGCATGTGC	GAGAAATCGA	TGATCAAGAA	GCGCTACATG	210
<i>CHSA_BUN</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
<i>CHSA_SAT</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
<i>CHSF_BUN</i>	CACTTGACGG	AGGAAATCTT	GAAGGAGAAC	CCGAACGCCT	GTGCGTACAT	GGCGCCCTCG	CTGGATGCTA	280
<i>CHSA_BUN</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
<i>CHSA_SAT</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
<i>CHSF_BUN</i>	GACAGGACAT	GGTGGTGGTT	GAGGTGCCAA	AACTGGGCCA	GGAGGCTGCG	ACGAAGGCCA	TTAAGGAATG	350
<i>CHSA_BUN</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
<i>CHSA_SAT</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
<i>CHSF_BUN</i>	GGGACAGCCC	AAGTCCAAGA	TCACCCACCT	TGTCTTCTGC	ACCACCAGTG	GCGTCGACAT	GCCCAGGGCC	420
<i>CHSA_BUN</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
<i>CHSA_SAT</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
<i>CHSF_BUN</i>	GACTACCAGC	TCACCAAGCT	CCTCGGCTTT	CGCCCTCCG	TCAAGAGACT	CATGATGTAC	CAACAAGGAT	490
<i>CHSA_BUN</i>	-----	-----	-----	A AGAGCTCCCG	TCAAGAGACT	CATGATGTAC	CAACAAGGAT	41
<i>CHSA_SAT</i>	-----	-----	-----	A AGAGCTCCCG	TCAAGAGACT	CATGATGTAC	CAACAAGGAT	41
<i>CHSF_BUN</i>	GCTTCGCCGG	AGGCACAGTC	CTTCGCCTGG	CCAAGGACCT	TGCAGAGAAC	AACAGAGGCG	CCCGTGTCTT	560
<i>CHSA_BUN</i>	GCTTCGCCGG	AGGCACAGTC	CTTCGCCTGG	CCAAGGACCT	TGCAGAGAAC	AACAGAGGCG	CCCGTGTCTT	111
<i>CHSA_SAT</i>	GCTTCGCCGG	AGGCACAGTC	CTTCGCCTGG	CCAAGGACCT	TGCAGAGAAC	AACAGAGGCG	CCCGTGTCTT	111
<i>CHSF_BUN</i>	TGTCGTCTGC	TCAGAGCTCA	CTGCTGTAC	CTTCCGTGGC	CCAAGTGACA	CCCACCTCGA	CAGCTTTGTA	630
<i>CHSA_BUN</i>	TGTCGTCTGC	TCAGAGCTCA	CTGCTGTAC	CTTCCGTGGT	CCAAGTGATA	CCCACCTCGA	CAGCTTTGTA	181
<i>CHSA_SAT</i>	TGTCGTCTGC	TCAGAGCTCA	CTGCTGTAC	CTTCCGTGGT	CCAAGTGATA	CCCACCTCGA	CAGCTTTGTA	181
<i>CHSF_BUN</i>	GGCCAGGCAC	TCTTCGGGGA	TGGAGCAGCC	GCAGTTATTG	TGGGTGCAGA	CCCGGTGCC	GGTGTAGAAA	700
<i>CHSA_BUN</i>	GGCCAGGCAC	TCTTCGGGGA	TGGAGCAGCC	GCAGTTATTG	TGGGTGCAGA	CCCGGTGCC	GGTGTAGAAA	251
<i>CHSA_SAT</i>	GGCCAGGCAC	TCTTCGGGGA	TGGAGCAGCC	GCAGTTATTG	TGGGTGCAGA	CCCGGTGCC	GGTGTAGAAA	251
<i>CHSF_BUN</i>	AGCCTTTGTT	TGAGTTGGTG	TCGGCAGCCC	AGACAATTCT	CCCAGACAGC	CATGGCGCCA	TTGACGGGCA	770
<i>CHSA_BUN</i>	AGCCTTTGTT	TGAGTTGGTG	TCGGCAGCCC	AGACAATTCT	CCCAGACAGC	CATGGCGCCA	TTGACGGGCA	319
<i>CHSA_SAT</i>	AGCCTTTGTT	TGAGTTGGTG	TCGGCAGCCC	AGACAATTCT	CCCAGACAGC	CATGGCGCCA	TTGACGGGCA	319
<i>CHSF_BUN</i>	CCTGAGAGAG	GTTGGACTTA	CCTTCCACCT	GCTCAAGGAT	GTGCCCGGGC	TCATCTCAA	GAACATCGAG	840
<i>CHSA_BUN</i>	CCTGAGAGAG	GTTGGACTTA	CCTTCCACCT	GCTCAAGGAT	GTGCCCGGGC	TCATCTCAA	GAACATCGAG	391
<i>CHSA_SAT</i>	CCTGAGAGAG	GTTGGACTTA	CCTTCCACCT	GCTCAAGGAT	GTGCCCGGGC	TCATCTCAA	GAACATCGAG	391
<i>CHSF_BUN</i>	AAGAGCCTGG	TGGAGGCATT	CCAGCCTCTG	GGCATCTCCG	ACTGGAAGTC	AATTTTCTGG	ATGCCCCACC	910
<i>CHSA_BUN</i>	AAGAGCCTGG	TGGAGGCATT	CCAGCCTCTG	GGCATCTCCG	ACTGGAAGTC	AATTTTCTGG	GATCCTT---	458
<i>CHSA_SAT</i>	AAGAGCCTGG	TGGAGGCATT	CCAGCCTCTG	GGCATCTCCG	ACTGGAAGTC	AATTTTCTGG	GATCCTT---	458
<i>CHSF_BUN</i>	CTGGTGGTCC	AGCCATCCTA	GACCAAGTGG	AAGAAAAGCT	GGCCCTTAAG	CCCAGAGAAGC	TAAGCGCCAC	980
<i>CHSA_BUN</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	458
<i>CHSA_SAT</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	458
<i>CHSF_BUN</i>	ACGACACATC	CTGAGCGAGT	ATGGAACAT	GTCAAGTGCT	TGTCTGCTGT	TCATATTGGA	TGAGATGCGG	1050
<i>CHSA_BUN</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	458
<i>CHSA_SAT</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	458
<i>CHSF_BUN</i>	AAGAAGTCGA	TTGAGGACGG	CCTCAAGACC	ACTGGAGAAG	GGCTCGAATG	GGGTGTGCTG	TTTGGGTTTCG	1120
<i>CHSA_BUN</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	458
<i>CHSA_SAT</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	458
<i>CHSF_BUN</i>	GACCAGGGCT	AACAGTTGAG	ACTGTGGTGC	TTCACAGTAT	CGCTGCCTAG	1170		
<i>CHSA_BUN</i>	-----	-----	-----	-----	-----	458		
<i>CHSA_SAT</i>	-----	-----	-----	-----	-----	458		

ภาพที่ 4.26 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวง บุนนทริก (*CHS_BUN*) ขนาด 1,170 bp กับบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของ กลีบดอก บัวหลวงบุนนทริก (*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* ในกลีบดอกบัวหลวง ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวง บุนนาคดอกสีขาวและกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชดอกสีชมพู 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 ของกลีบดอกบัวหลวงบุนนาคในระยะเวลาที่ 1 (B1) มีความเข้มมากที่สุด เมื่อเทียบกับกลีบดอกบัวหลวงในระยะเวลาที่ 2 (B2), ระยะเวลาที่ 3 (B3), ระยะเวลาที่ 4 (B4) และ ระยะเวลาที่ 5 (B5) ที่มีความเข้มใกล้เคียงกัน ส่วนความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช ระยะเวลาที่ 1 (S1) มีความเข้มมากที่สุด และค่อยๆ ลดลงในระยะเวลาที่ 2 (S2), ระยะเวลาที่ 3 (S3), ระยะเวลาที่ 4 (S4) และ ระยะเวลาที่ 5 (S5) ตามลำดับ (ภาพที่ 4.27) ในขณะที่ความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *18S rRNA* ซึ่งเป็นยีนอ้างอิงมีความเข้มใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่า ยีน *CHS* มีปริมาณการแสดงออกมากที่สุดในช่วงระยะการพัฒนาของดอกบัวหลวงระยะเวลาที่ 1 มากที่สุด และมีปริมาณการแสดงออกลดลงในระยะเวลาที่ 2, ระยะเวลาที่ 3 และ ระยะเวลาที่ 4 ตามลำดับ และในระยะเวลาที่ 5 มีปริมาณการแสดงออกน้อยที่สุด

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



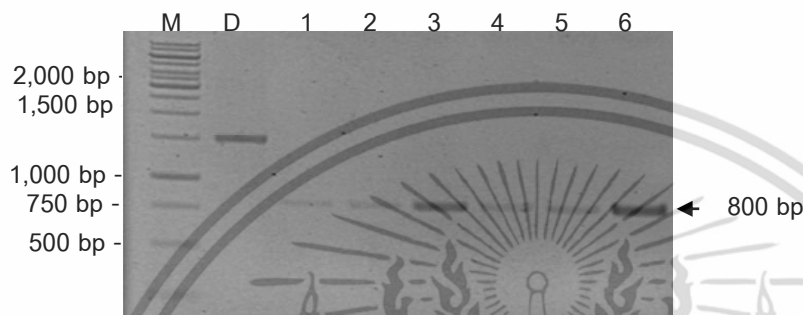
ภาพที่ 4.27 การเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* (ขนาด 458 bp) ในแต่ละระยะการพัฒนารูปของดอกบัวหลวง ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง (ขนาดประมาณ 600 bp); ดอกบัวหลวงพันธุ์กรีก (B1) ระยะที่ 1, (B2) ระยะที่ 2, (B3) ระยะที่ 3, (B4) ระยะที่ 4 และ (B5) ระยะที่ 5 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 ในกลีบดอกอุบลชาติดอกนอกเหนือจากสีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

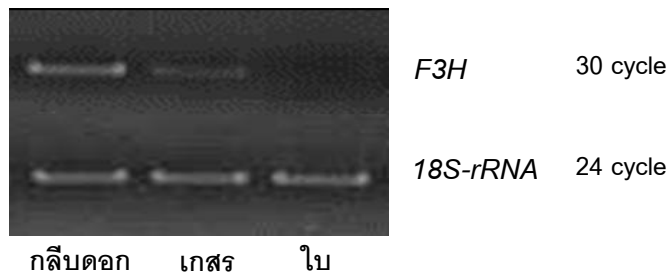
เหลือง พบการแสดงออกของยีน *F3H* ในกลีบดอกอุบลชาติทุกสีที่นำมาใช้ตรวจสอบ โดยพบขึ้นดีเอ็นเอของยีน *F3H* ขนาด 800 นิวคลีโอไทด์ จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ cDNA ของอุบลชาติฉลองขวัญซึ่งมีกลีบดอกสีม่วงเข้ม ฟ้ามุขพันธ์มีกลีบดอกสีฟ้า ปียลาภมีกลีบดอกสีชมพู แสดงชัดผลมีกลีบดอกสีชมพูอมส้ม เซนต์หลุยส์โกลด์มีกลีบดอกสีเหลือง 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) ฟ้ามุขพันธ์ (2) ปียลาภ (3) แสดงชัดผล (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)



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

4.2.2.3 การแสดงออกของยีน *F3H* ในดอกปทุมชาติสัตตบงกชและ

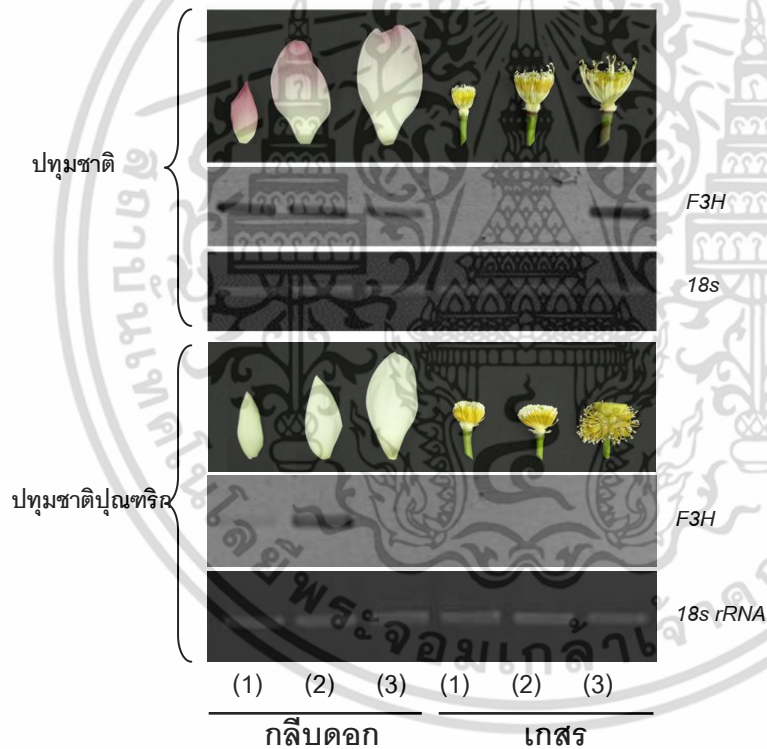
บุญทริก

ทำการเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อของ เกสร กลีบดอกของดอกปทุมชาติสัตตบงกชและบุญทริก 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* ในปทุมชาติบุญทริกพบว่า เนื้อเยื่อกลีบดอก ระยะที่ 2 มีการแสดงออกของยีน *F3H* มากที่สุด รองลงมาคือ กลีบดอกระยะที่ 1 และไม่พบการแสดงออก ในกลีบดอกระยะที่ 3 ในเนื้อเยื่อเกสรไม่พบการแสดงออกของยีน *F3H* ในทุกระยะการพัฒนาดอกซึ่งการ แสดง ออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อกลีบดอกสอดคล้องกับสีของกลีบดอกปทุมชาติบุญทริกที่มีสีชมพูอ่อนเจือ อยู่บริเวณปลายกลีบในระยะที่ 1 และชัดเจนในระยะที่ 2 จากนั้นสีชมพูจะหายไปในระยะที่ 3 ดังแสดงในภาพ ที่ 4.30



ภาพที่ 4.30 ดอกปทุมชาติสีตบงกชและบุณฑริกทั้ง 3 ระยะการพัฒนาดอก

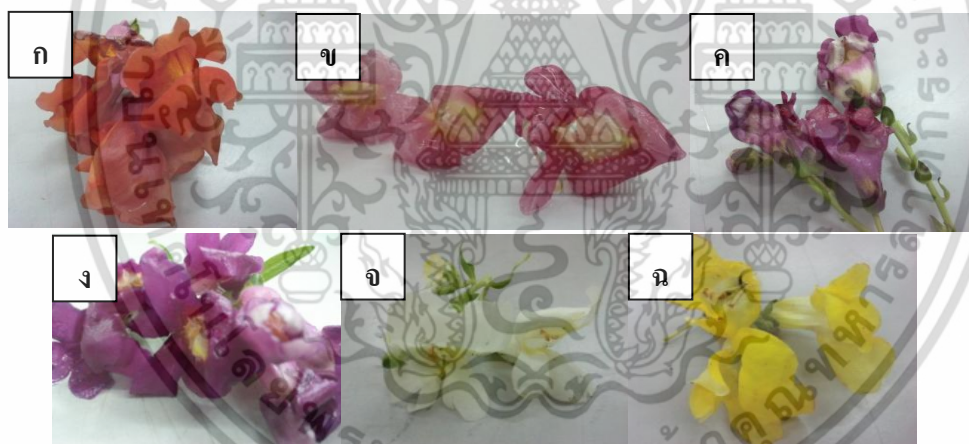


ภาพที่ 4.31 ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อกลีบดอกและเกสรของปทุมชาติสีตบงกช และปทุมชาติบุณฑริกทั้ง 3 ระยะการพัฒนาดอก ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR โดยใช้การแสดงออกของยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิงเพื่อควบคุมปริมาณ cDNA ต้นแบบ (1) การพัฒนาดอกระยะที่ 1 (2) การพัฒนาดอกระยะที่ 2 (3) การพัฒนาดอกระยะที่ 3

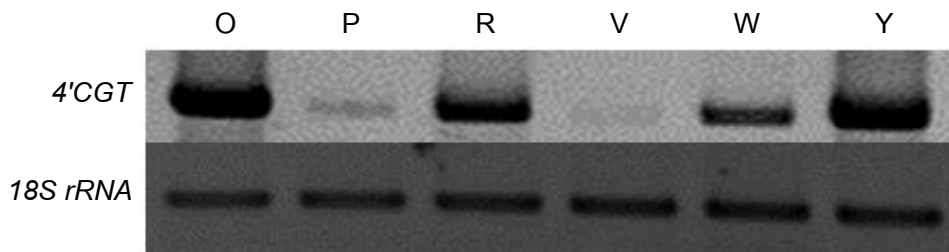
4.2.3 การแสดงออกของยีน 4'CGT

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 ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์บนเจลพบขั้วดีเอ็นเอขนาดประมาณ 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* ในกลีบดอกลินินมังกร 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)

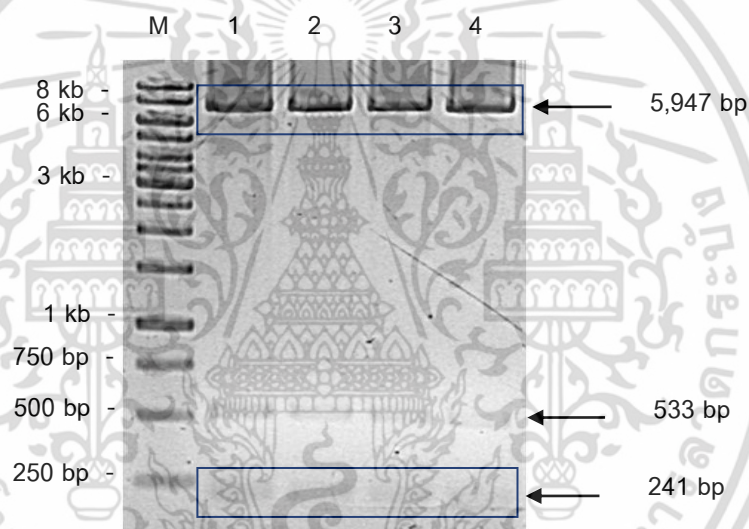
ศึกษาหน้าที่ของยีน *F3H* ในกลีบดอกอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสดงศักยภาพ โดยยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi และติดตามการเปลี่ยนแปลงของสีกลีบดอก ร่วมกับการแสดงออกของยีน *F3H* และ *CHS*

4.3.1.1 การสร้างดีเอ็นเอสายผสมรูปแบบ inverted repeat เพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi ในกลีบดอกอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสดงศักยภาพ

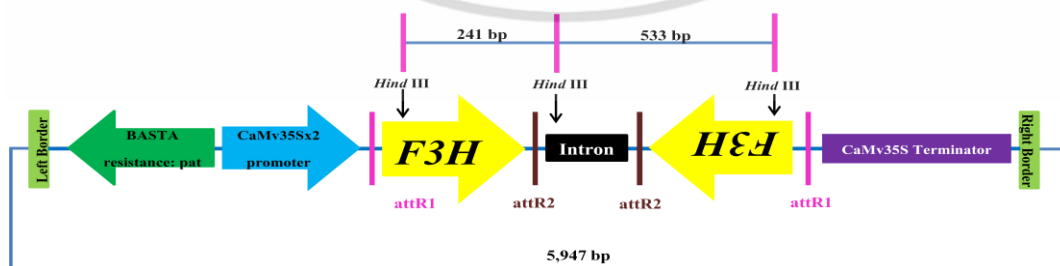
การสังเคราะห์ชิ้นส่วนยีน *F3H* จาก cDNA ของปทุมชาติสัตว์ตบงกช โดยเลือกบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 336 ถึง 644 บนสาย mRNA ของยีน *F3H* ในการออกแบบไพรเมอร์ ผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์พบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 นิวคลีโอไทด์ เมื่อใช้อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส สำหรับขั้นตอน annealing ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 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*



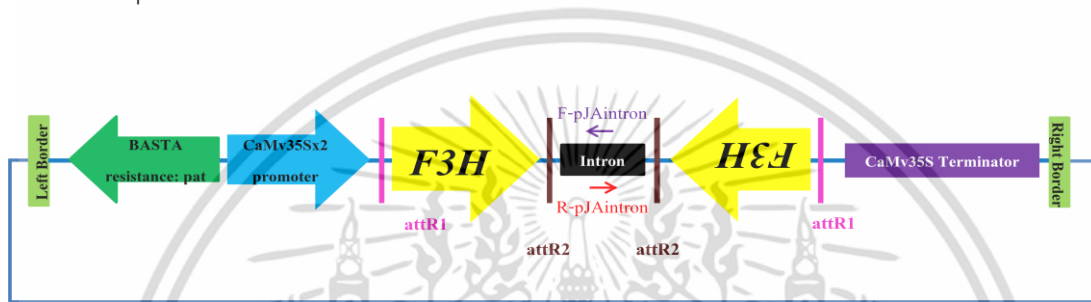
ภาพที่ 4.34 การตรวจสอบชิ้นส่วนยีน *F3H* ของปทุมชาติสกัดบงกชที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pJAWOHL8 (pJA8*F3H*) โคลนที่ 1-4 (1-4) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (M)



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

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

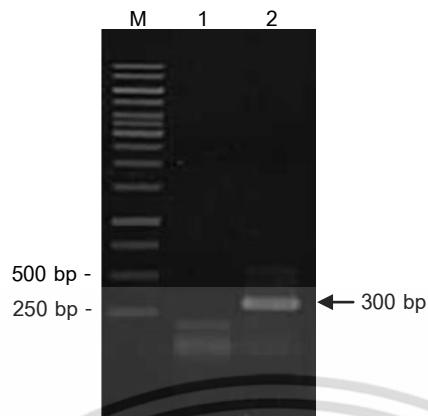
ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเวกเตอร์ pJA8*F3H* โคลนที่ 2, 3 และ 4 พบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *F3H* ในเวกเตอร์ pJA8*F3H* ทั้ง 3 โคลน เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *F3H* ของปทุมชาติสัตตบงกช ตำแหน่งที่ 336 ถึง 644 ทุกนิวคลีโอไทด์และชิ้นส่วนของยีน *F3H* อยู่บริเวณขนาดทั้ง 2 ข้าง intron ของเวกเตอร์ pJAWOHL8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

ผลปฏิกิริยาพีซีอาร์จากการใช้โคโลนีอะโกรแบคทีเรียเป็นต้นแบบ พบขึ้นดีเอ็นเอของยีน *F3H* ขนาด 300 นิวคลีโอไทด์ ในโคลนอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJA8*F3H* แต่ไม่พบขึ้นดีเอ็นเอของยีน *F3H* ในโคลนอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 ด้วยวิธีการ electroporation (ภาพที่ 4.37)



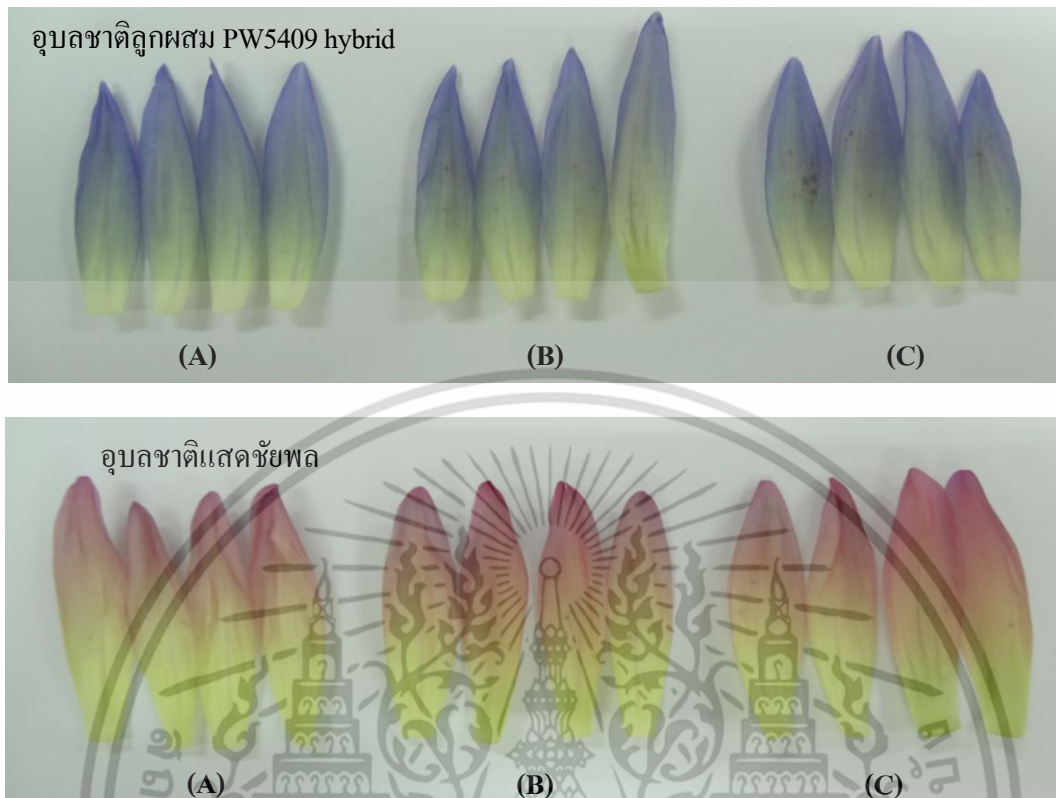
ภาพที่ 4.37 การตรวจสอบการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 (1) หรือ pJA8F3H (2) เข้าสู่โอะโกรแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 ด้วยปฏิกิริยาฟิซเซอร์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (M)

4.3.1.5 ผลการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 หรือเวกเตอร์ pJA8F3H เข้าสู่กลีบดอกอุบลชาติด้วยวิธีการ infiltration

ลักษณะกลีบดอกอุบลชาติภายหลังการถ่ายโอนเวกเตอร์

pJAWOHL8 หรือเวกเตอร์ pJA8F3H

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



ภาพที่ 4.38 ลักษณะกลีบดอกของอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสดงชัยพล ภายหลังจากได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJAWOHL8 หรือเวคเตอร์ pJA8F3H ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีอะโกรแบคทีเรียหมเป็นพาหะเป็นเวลา 3 วัน

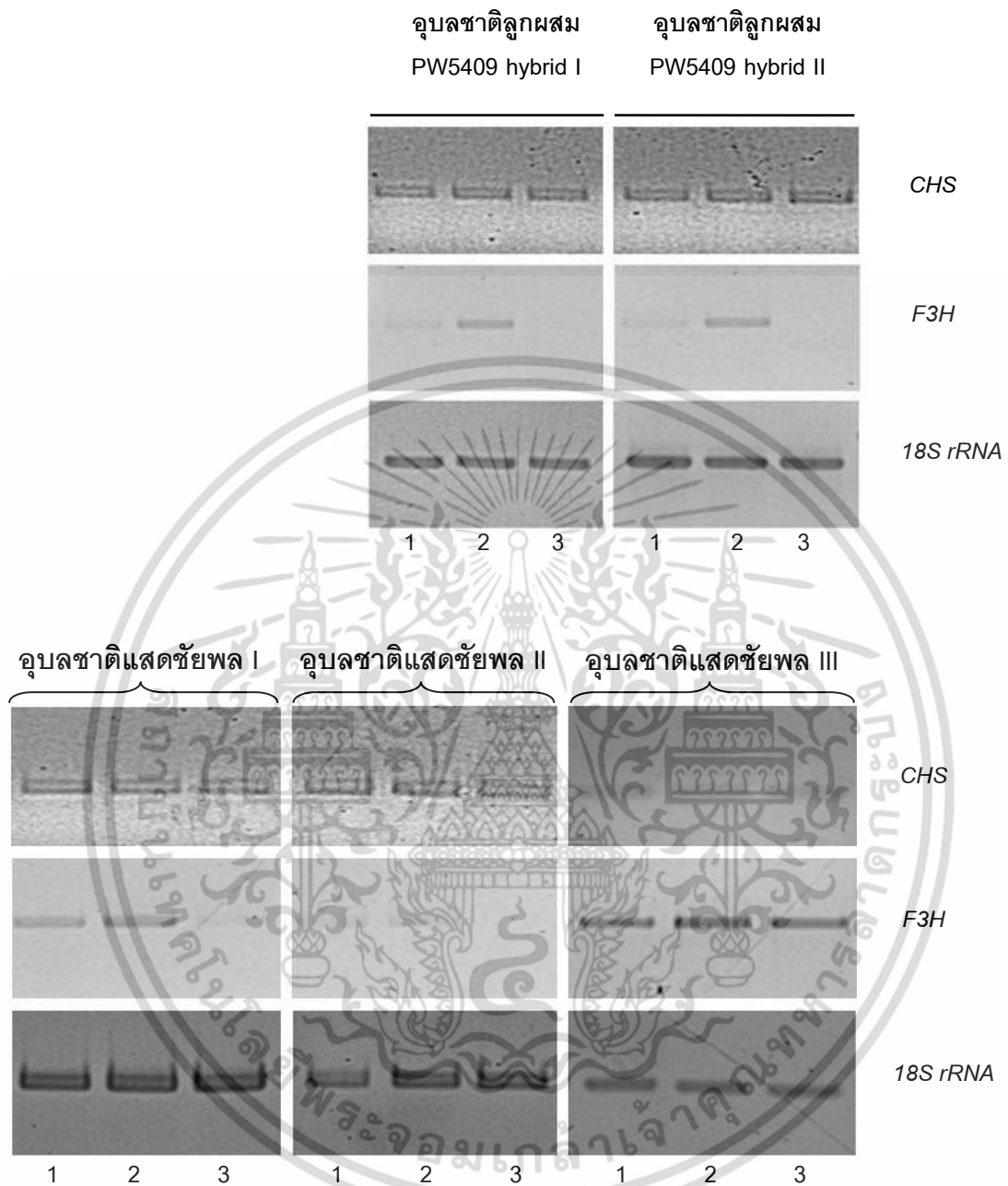
- (A) แสดงกลีบดอกอุบลชาติที่ไม่ผ่านการถ่ายโอนเวคเตอร์
- (B) แสดงกลีบดอกอุบลชาติที่ผ่านการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJAWOHL8 (negative control)
- (C) แสดงกลีบดอกอุบลชาติที่ผ่านการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJA8F3H (RNAi)

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

ปรับความเข้มข้นของ cDNA เริ่มต้น ที่ได้จากกลีบดอกของอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสดงชัยพล ที่ไม่ผ่านและผ่านการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJAWOHL8 หรือเวคเตอร์ pJA8F3H ให้เท่ากัน โดยเปรียบเทียบจากความเข้มแถบดีเอ็นเอของยีน *18S rRNA* บนเจลเป็นยีนอ้างอิง (ภาพที่ 4.39) จากนั้นนำ cDNA ที่ได้จากการปรับความเข้มข้นให้เท่ากันแล้วข้างต้น ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา semi-quantitative PCR เพื่อตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* และ *CHS* ต่อไป เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ผลจากปฏิกิริยา semi-quantitative PCR เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* โดยเปรียบเทียบจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอบนเจล จากการทดลองในดอกอุบลชาติแสดงชัดผลจำนวน 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* ของดอกอุบลชาติแสดงชัดผลดอกที่ 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* ในกลีบดอกของอุดมชาติลูกผสม PW5409 และแสดงชัยพลที่ไม่ผ่านการถ่ายโอน (1) ผ่านการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 (2) ผ่านการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJA8F3H (3) ด้วยวิธีการ infiltration ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR โดยการใช้การแสดงออกของยีน *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

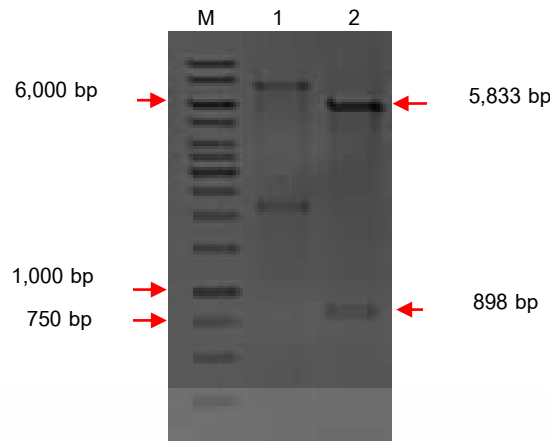
สังเคราะห์ชิ้นส่วนยีน 4'CGT จาก cDNA ของดอกลินมังกรสีเหลือง พันธุ์ Pixie Bells ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์และเชื่อมต่อกับพลาสมิด pCR8 ดังอธิบายในข้อ 4.1.3.1 เมื่อผ่านการคัดเลือกและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำไปใช้ในการถ่ายโอนเข้าสู่พลาสมิด pJAWOHL8 ด้วยปฏิกิริยา LR แล้วถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli*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

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

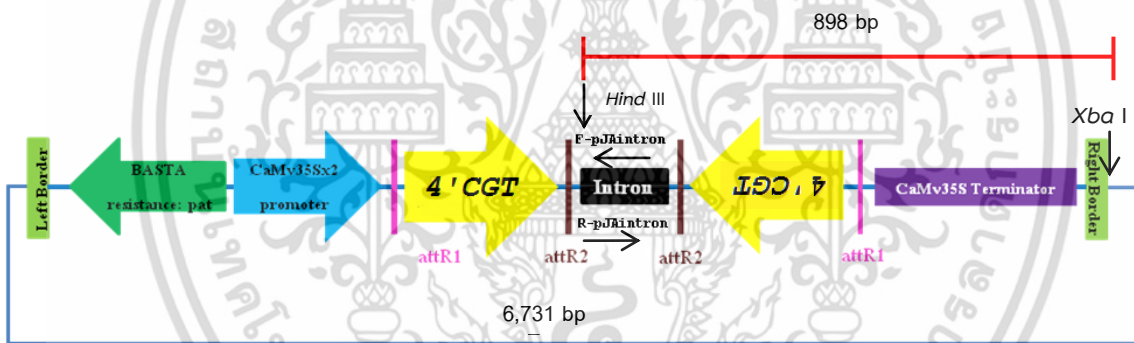
นำพลาสมิด pCR8-4'CGT มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน 4'CGT ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Xba* I พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาด 898 นิวคลีโอไทด์ และขนาด 5,833 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 4.40) ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดของเอนไซม์ *Hind* III บริเวณ intron ของพลาสมิด pJAWOHL8 1 ตำแหน่ง และการตัดของเอนไซม์ *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 ถ่ายโอนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ 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)

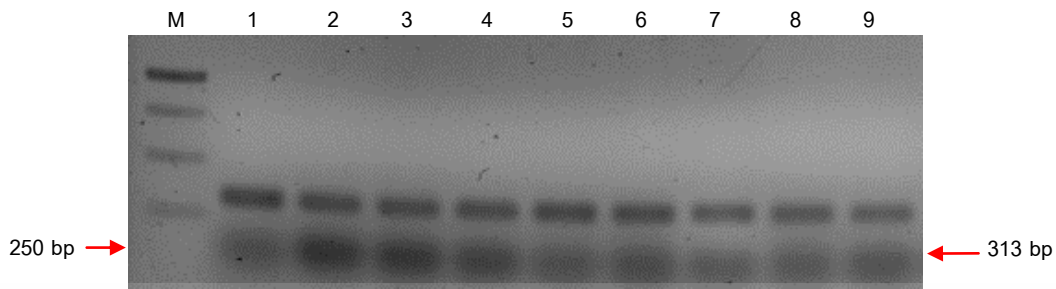


ภาพที่ 4.41 แผนภาพพลาสมิด pJA8-4'CGT แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ F-IntronpJA8 และไพรเมอร์ R-IntronpJA8 และตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Xba* I (ดัดแปลงจาก Pillman. 2009)

4.3.2.4 ผลการตรวจสอบการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4'CGT เข้าสู่โอรแบคทีเรียผสมพันธุ์ GV3101 ด้วยปฏิกริยาพีซีอาร์

เมื่อถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4'CGT เข้าสู่โอรแบคทีเรียผสมแล้ว ทำการตรวจสอบโคโลนีเดียวด้วยปฏิกริยาพีซีอาร์คู่กับไพรเมอร์ F-EcoRI-4'CGT และ R-4'CGT-SacI จากการใช้โคโลนีโอรแบคทีเรียผสมเป็นต้นแบบ พบขึ้นดีเอ็นเอขนาด 313 นิวคลีโอไทด์ จากโคโลนีที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJA8-4'CGT (ภาพที่ 4.42)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า



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

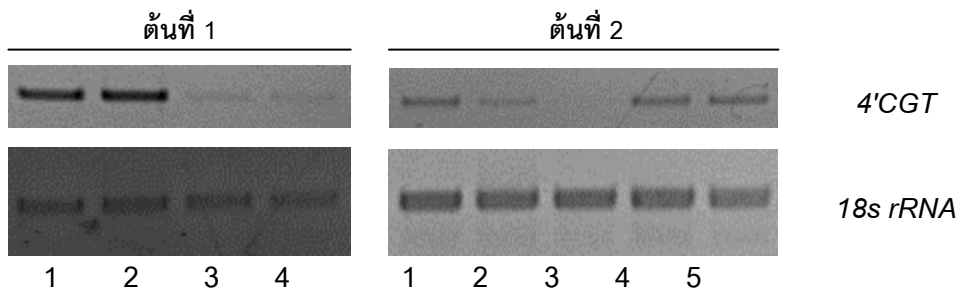
ปรับ cDNA เริ่มต้นที่ได้จากกลีบดอกของลินม้งกรที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-4'CGT ให้มีความเข้มข้นเท่ากัน โดยเปรียบเทียบจากความเข้มแถบดีเอ็นเอของยีน 18S rRNA บนเจลที่ใช้เป็นยีนอ้างอิง (ภาพที่ 4.44) จากนั้นใช้ cDNA ที่ผ่านการปรับความเข้มข้นให้เท่ากันแล้วเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา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

ผลจากปฏิกิริยา semi-quantitative PCR เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT โดยเปรียบเทียบจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอบนเจล จากการทดลองในดอกลิน

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 ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับดอกที่ถ่ายพลาสมิต pJAWOHL8 เมื่อเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ระหว่างดอกที่มีปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ลดลง กับดอกที่มีปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ไม่เปลี่ยนแปลง พบว่าดอกที่มีการแสดงออกของยีน 4'CGT ลดลงอยู่ที่ 57.14 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนดอกทั้งหมดที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิต pJA84'CGT



ภาพที่ 4.43 ดอกกลีบมังกรที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิต pJA8-4'CGT ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะเป็นเวลา 3 วัน (ขวา) เปรียบเทียบกับดอกกลีบมังกรที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิต pJA8-4'CGT (ซ้าย)



ภาพที่ 4.44 ผลเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน 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 มาตรวจสอบความเข้มข้นในเจลอะ

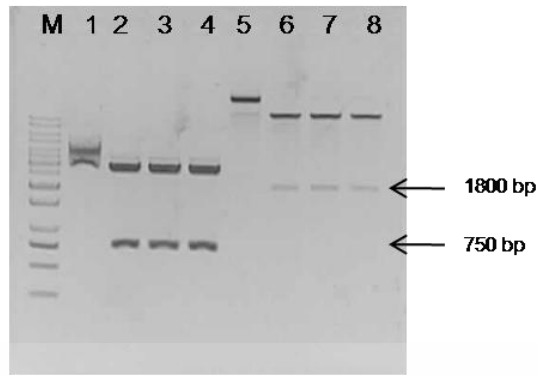
กาไรส 1 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเชื่อมต่อกัน โดยทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *BamHI* อีกครั้ง (ภาพที่ 4.46) ในช่องที่ 3 และ 4 จะพบแถบดีเอ็นเอ 2 ชั้นคือ ขนาด 750 bp และ ขนาด 11,633 bp แสดงว่าในพลาสมิด pBI121DFR มีขนาดยีน *DFR* เท่ากับที่อยู่ในพลาสมิด pTZDFR ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ โดยโครงสร้างของพลาสมิด 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*

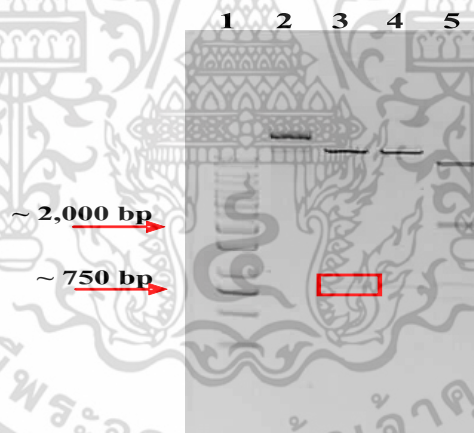
พลาสมิด pCAMBIA2301DFR ที่มีขนาด 12,383 bp ได้จากการตัดตั้งแต่ตำแหน่งของโปรโมเตอร์ *CaMV35S* จนถึงเทอร์มินเตอร์ *NOS* ที่มียีน *DFR* อยู่ จากพลาสมิด pBI121DFR มาต่อเข้าพลาสมิด pCAMBIA2301 โดยทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* (ภาพที่ 4.47) ในพลาสมิด pCAMBIA2301 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ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

การตรวจสอบพลาสมิดสายผสม pCAMBIA2301DFR โดยใช้ FlavoPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit

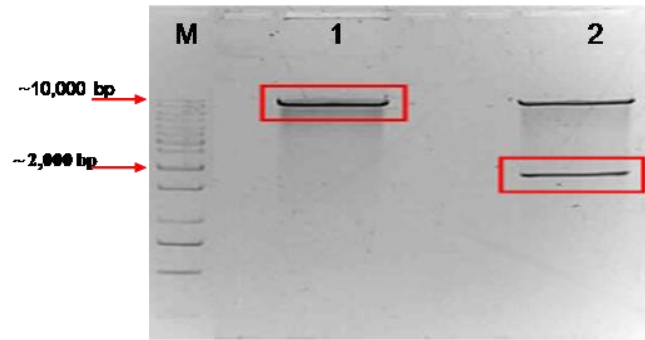
พลาสมิดสายผสม pCAMBIA2301DFR ที่สกัดได้นี้ประกอบด้วยส่วนของยีน *GUS* ขนาด ประมาณ 2,000 bp และ ยีน *DFR* ขนาด 750 bp ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *CaMV35S* และเทอร์มินเตอร์ *NOS* และยีนคัดเลือก *NPTII* ขนาด 254 bp ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *NOS* และเทอร์มินเตอร์ *PolyA* มาตรวจสอบความเข้มข้นในเจลอะกาไรส 1 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเชื่อมต่อกัน 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* และเทอร์มินเตอร์ *NOS* ที่มียีน *DFR* อยู่ตรงกลาง



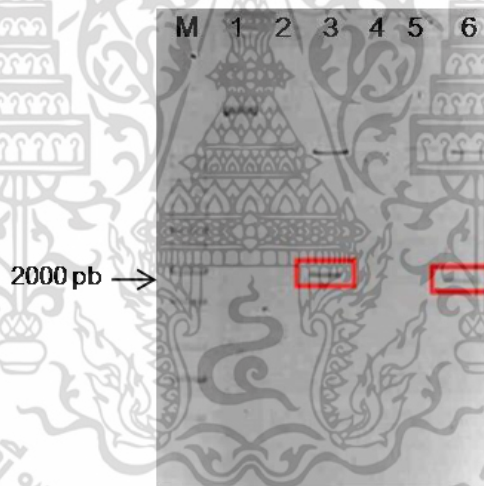
ภาพที่ 4.45 การตรวจสอบพลาสมิดด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sac*I ที่ M) ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 1 kb DNA ladder 1) พลาสมิด pTZDFR 2,3,4) พลาสมิด pTZDFR ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 750 และ 2,886 bp 5) พลาสมิด pBI121 6), 7), 8) พลาสมิด pBI121 ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ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



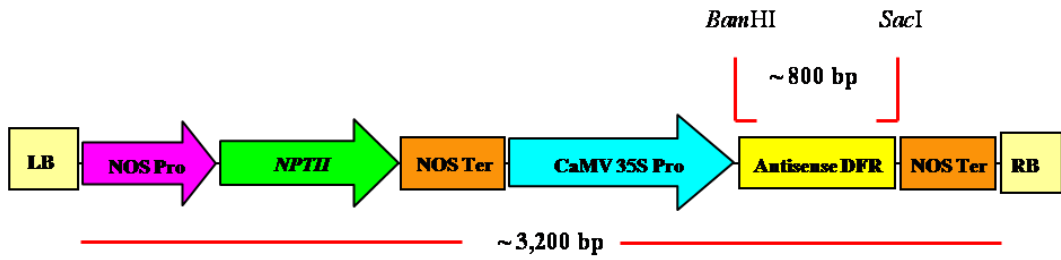
ภาพที่ 4.46 การตรวจสอบพลาสมิด pBI121DFR ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI *Sac*I *Xba*I และ *Nco*I 1) ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 1 kb DNA ladder 2) pBI121DFR 3) pBI121DFR ตัดด้วย *Sac*I และ *Bam*HI ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 750 bp และขนาด 11,633 bp 4) pBI121DFR ตัดด้วย *Xba*I ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 750 bp และ ขนาด 11,633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



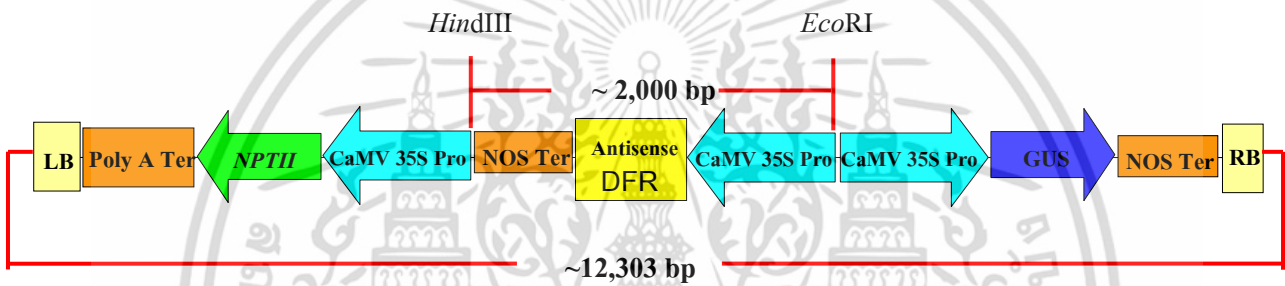
ภาพที่ 4.47 พลาสมิด pCAMBIA2301 และ pBI121DFR ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* M) 1 kb DNA ladder 1) pCAMBIA2301 ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 10,000 bp 2) pBI121DFR ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* ได้แถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 2,000 bp และ ขนาดประมาณ 10,000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

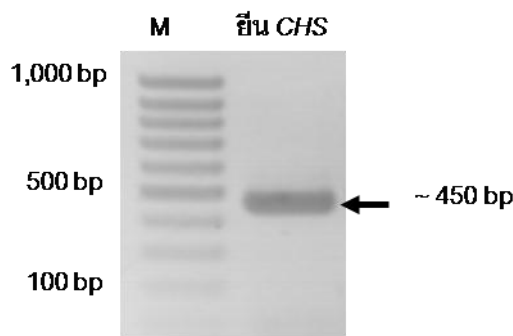


ภาพที่ 4.50 โครงสร้างพลาสมิด pCAMBIA2301DFR

4.4.2 การสร้างพลาสมิดที่มียีน *CHS* จากดอกบัวหลวงบุณฑริก

ผลการโคลนบางส่วนของยีน *CHS* จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก

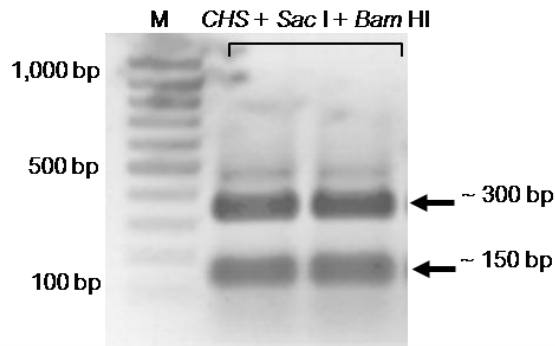
ผลการโคลนบางส่วนของยีน *CHS* จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริกด้วยเทคนิค PCR ได้ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ขนาดประมาณ 450 bp (ภาพที่ 4.51) นำผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้ ไปใช้ในการสร้างพลาสมิดลูกผสมเพื่อใช้ในการถ่ายยีนต่อไป



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

ผลการสร้างพลาสมิดลูกผสม pBICHSA

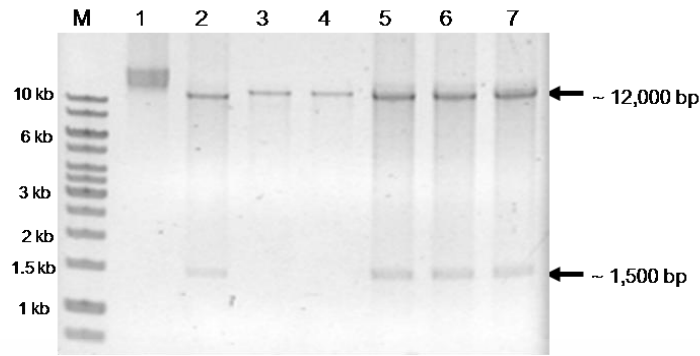
นำผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุณฑริก ขนาดประมาณ 450 bp มาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pBI121 ขนาด 14,758 bp ในตำแหน่งแทนที่ยีน *GUS* ในลักษณะกลับทิศ (anti sense) โดยเริ่มต้นจากนำผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac* I และ *Bam* HI พบว่า 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 = 1 kb DNA marker)



ภาพที่ 4.54 การตรวจสอบยีน *CHS* ในพลาสมิดลูกผสม pBICHSA ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RI และ *Hind* III; 1) คือ พลาสมิด pBI121, 2), 5), 6) และ 7) คือโคลนของพลาสมิด pBICHSA ที่มีส่วนของยีน *CHS* แบบ antisense แทรกอยู่ ได้ชิ้นส่วนของ DNA ขนาดประมาณ 1,500 bp และส่วนที่เหลือของพลาสมิด ขนาดประมาณ 12,000 bp และ 3) และ 4) คือโคลนที่ไม่มีส่วนของยีนแทรกอยู่ (M = 1kb DNA marker)

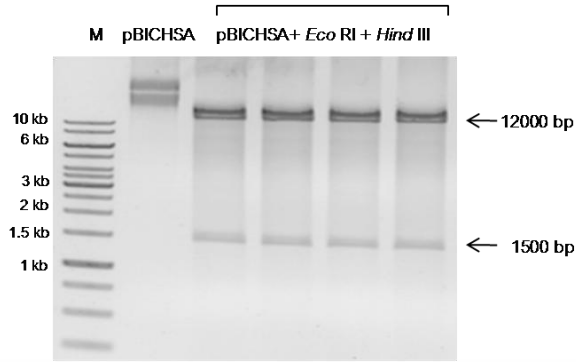


ภาพที่ 4.55 การตรวจสอบบางส่วนของยีน *CHS* ในพลาสมิด pBICHS ด้วยเทคนิค PCR; 1) คือ ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ขนาดประมาณ 450 bp ใช้เป็น PCR positive control, 2), 3), 4) และ 5) คือ โคลนที่มีส่วนของยีน *CHS* แบบ antisense แทรกระหว่าง CaMV 35s promoter และ NOS terminator จะได้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 500 bp โดยใช้คู่ไพรมอร์ CAMV_forward primer และ NOS_reverse primer และ 6) คือโคลนที่ไม่มีส่วนของยีนแทรกอยู่ (M = 100bp DNA marker)

ผลการสร้างพลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA

นำบางส่วนของยีน *CHS* แบบ anti sense ที่ถูควบคุมด้วย CaMV 35s promoter และ NOS terminator จากพลาสมิด pBICHSA ขนาดประมาณ 1,500 bp มาเชื่อมต่อเข้ากับ พลาสมิด เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

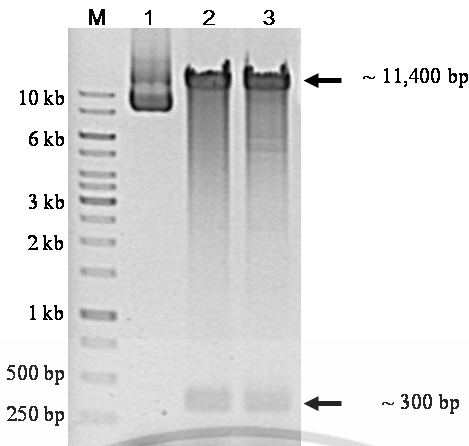
pCAMBIA1302 ขนาด 10,549 bp โดยเริ่มต้นจากนำพลาสมิดลูกผสม pBICHSA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Hind* III พบว่า ได้ชิ้นส่วนของ DNA 2 ส่วน คือ ส่วนของยีน *CHS* แบบ antisense ที่อยู่ระหว่าง CaMV 35s promoter และ NOS terminator ขนาดประมาณ 1,500 bp และส่วนของพลาสมิดที่เหลือ ขนาดประมาณ 12,000 bp (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 นำมาเชื่อมต่อเข้ากันด้วยเอนไซม์ *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* ที่แทรกอยู่ระหว่าง CaMV 35s promoter และ NOS terminator ขนาดประมาณ 500 bp และผลผลิตของยีน *GFP* ขนาดประมาณ 900 bp (ภาพที่ 4.60) เลือกโคลนที่ได้ผลดังกล่าวนำมาใช้ในการถ่ายยีนต่อไป



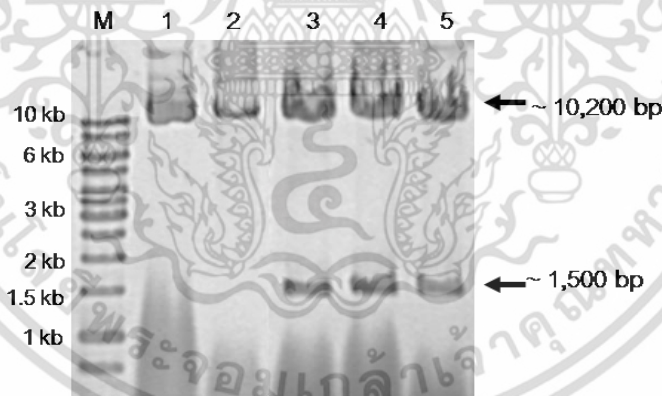
ภาพที่ 4.56 พลาสมิดลูกผสม pBICHSA (ขนาดประมาณ 13,500 bp) ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RI และ *Hind* III ได้ชิ้นส่วน DNA ที่มีส่วนของ DNA ของยีน *CHS* แบบ antisense แทรกระหว่าง CaMV 35s promoter และ NOS terminator ขนาดประมาณ 1,500 bp และส่วนที่เหลือของพลาสมิด ขนาดประมาณ 12,000 bp (M = 1kb DNA marker)



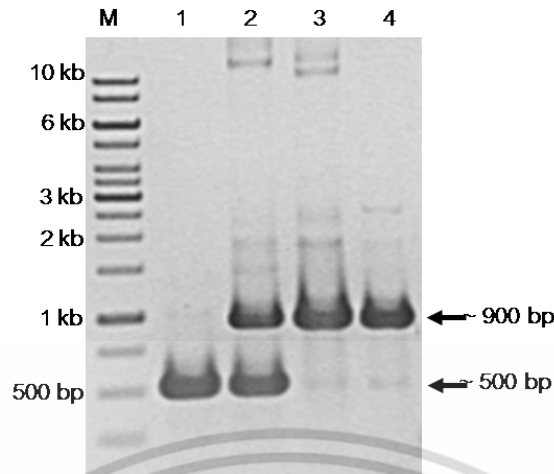
ภาพที่ 4.57 พลาสมิด pCAMBIA1302 (ขนาดประมาณ 10,500 bp) ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RI และ *Hind* III ได้ชิ้นส่วนของ DNA 1 ส่วน ขนาดประมาณ 10,500 bp (M = 1kb DNA marker)



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 ได้ขึ้นส่วนของ 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 ได้ขึ้นส่วนของ DNA ขนาดประมาณ 1,500 bp และส่วนที่เหลือของพลาสมิด ขนาดประมาณ 10,200 bp (M = 1kb DNA marker)

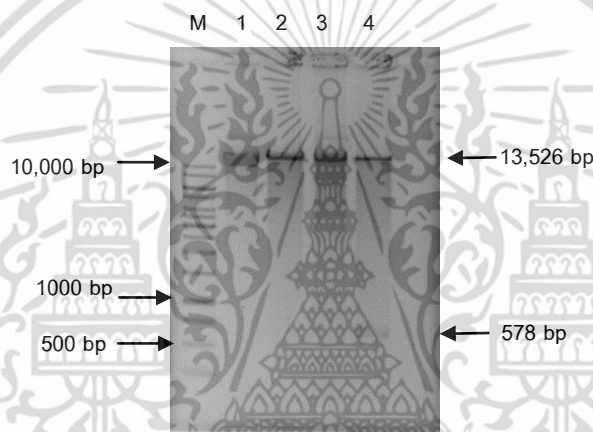


ภาพที่ 4.60 การตรวจสอบหาบางส่วนของยีน *CHS* ในพลาสมิด pCAMBIA 1302CHSA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CAMV_forward primer และ NOS_reverse primer; 1) คือ ผลผลิต PCR ของพลาสมิด pBICH5 ที่มีบางส่วนของยีน *CHS* ขนาดประมาณ 500 bp, 2) คือโคลนที่มีส่วนของยีน *CHS* และยีน *GFP* ได้ผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ขนาดประมาณ 500 bp และผลผลิตของยีน *GFP* ขนาดประมาณ 900 bp และ 3) และ 4) คือโคลนที่ไม่มีส่วนของยีน *CHS* แต่มีเฉพาะผลผลิตของยีน *GFP* ขนาดประมาณ 900 bp (M = 1kb DNA marker)

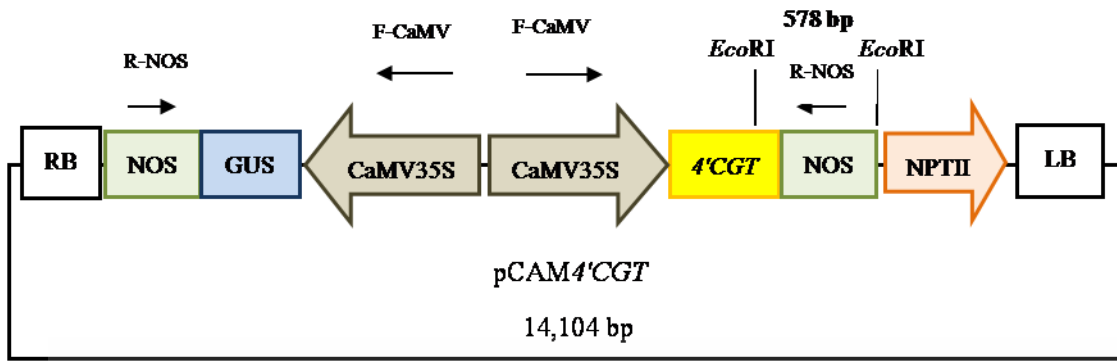
4.4.3 การสร้างและตรวจสอบดีเอ็นเอสายผสม pCAM4'CGT จากดอกลิ้นมังกร

สังเคราะห์ยีน 4'CGT จากนั้นตัดยีน 4'CGT ภายในพลาสมิด pTZ4'CGT ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Sac* I เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด 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 และบริเวณเทอร์มินเตอร์ 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* จึงนำพลาสมิดที่ผ่านการตรวจสอบถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ในลำดับต่อไป

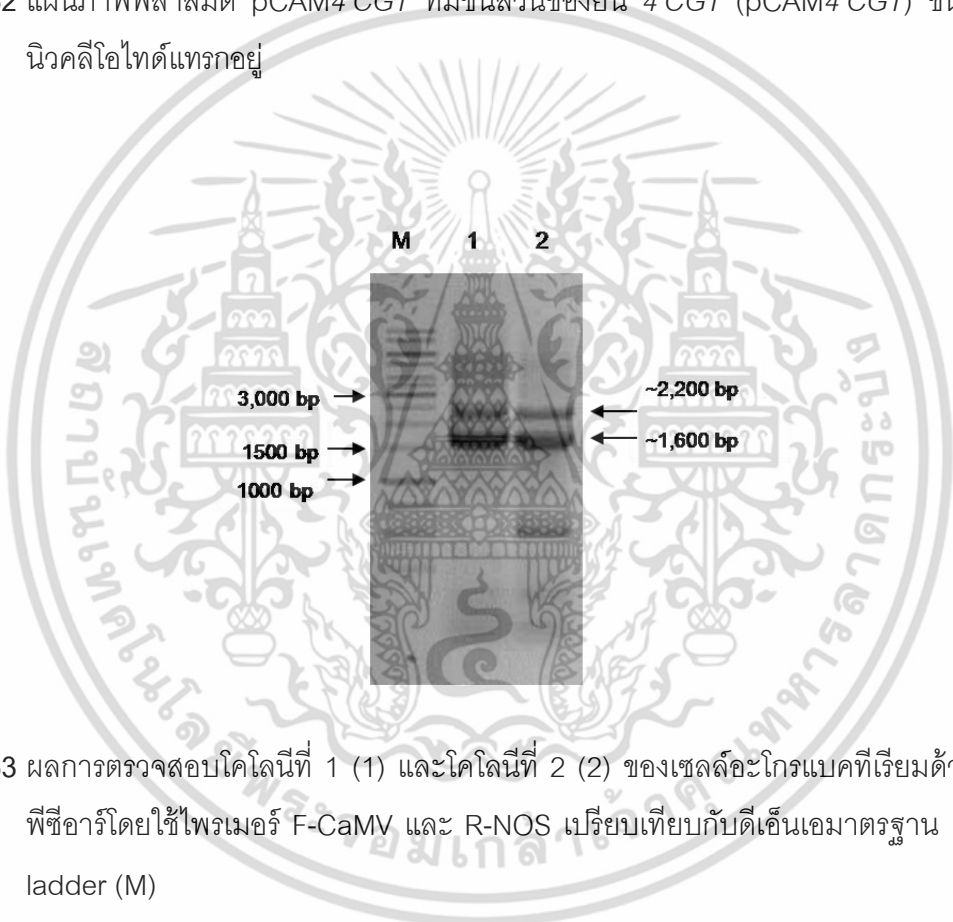
นำดีเอ็นเอสายผสม pCAM4'CGT เข้าสู่เซลล์อะโกรแบคทีเรียด้วยวิธี electroporation นำโคโลนีเดี่ยวที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหาร YM ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มาตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-CaMV และ R-NOS ที่ออกแบบจากตำแหน่งของโปรโมเตอร์ CaMV 35S และเทอร์มินเตอร์ NOS สำหรับขับเคลื่อนชิ้นยีน 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 pCAMBIA2301CHS ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (1) พลาสมิด pCAMCHS 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 ผลการตรวจสอบโคโลนีที่ 1 (1) และโคโลนีที่ 2 (2) ของเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่เริ่มด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ 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 โดยแคลลัสจะเกิดขึ้นที่บริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนมีลักษณะเป็นเม็ดละเอียดเกาะกันแน่นแยกกันได้ยาก สีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.64)

เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

ทุกสัปดาห์เปอร์เซ็นต์การเกิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (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 เปรอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 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
triacontanol 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

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

4.5.1.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนตา ยอดจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณทริก

โดยแบ่งออกเป็น 3 การทดลองดังนี้

4.5.1.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนตา ยอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณทริก โดยนำชิ้นส่วนตา ยอดจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร มาชักนำการเกิดแคลลัสอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ และเพาะเลี้ยงภายใต้แสง เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 8 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญเติบโตของแคลลัส ดังนี้

คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน

ชิ้นส่วนเกิดเป็นแคลลัสก่อนแล้วจึงเริ่มพัฒนาเป็นเอ็มบริโอจินิกแคลลัสในสัปดาห์ที่ 2 โดยแคลลัส จะเกิดขึ้นที่บริเวณฐานของชิ้นส่วนมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน สีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.65) เอ็มบริโอจินิกแคลลัส มีการเจริญเติบโตที่สุดในอาหารสูตรที่มี NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ โดยมีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติในทุกสัปดาห์ของการ ทดลอง (ตารางที่ 4.7) โดยในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 มีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตสูงที่สุด 2.33 และ 2.43 คะแนน ตามลำดับ ส่วนอาหารสูตรที่มี picloram 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 1 ไมโครโมลาร์ อาหาร สูตรที่มี 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

เปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอจินิกแคลลัส

แคลลัสเริ่มเกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง และเปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอจินิกแคลลัสมี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.7) โดยสามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจินิกแคลลัส ได้ในอาหารสูตรที่มี NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ใน สัปดาห์ที่ 4 และ 8 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอจินิกแคลลัสสูงที่สุด 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 ไมโครโม ลาร์ 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	
triacantanol 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
F-test	**	**	ns	**	**	**	
CV (%)	3.6464	51.0672	0.0002	13.7079	4.4965	0.6117	

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

¹ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี 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 มีค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดที่เกิดขึ้นสูงที่สุด 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 มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดสูงที่สุด 1.83 เซนติเมตร และการใช้ picloram 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin 1 ไมโครโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดรองลงมา 1.40 เซนติเมตร ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดสูงที่สุด 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 มีค่าเฉลี่ยจำนวนรากสูงที่สุด 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 triacontanol 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

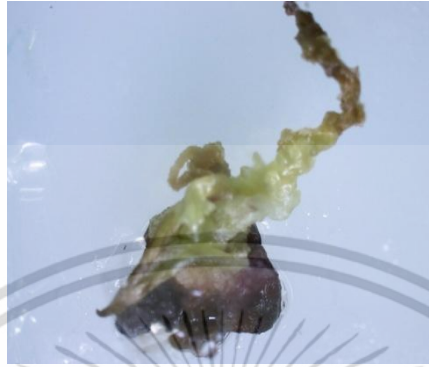
ขนาดแคลลัส

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

ความยาวยอด

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

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

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

4.5.1.2.3 ศึกษาผลของ 2,4-D และ picloram ต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุญทริก โดยนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของบัวหลวงพันธุ์บุญทริกมาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร 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

ชิ้นส่วนเริ่มเกิดแคลลัสขึ้นที่บริเวณฐานของชิ้นส่วนในสัปดาห์ที่ 2 และเพิ่มมากขึ้นจนทั่วทั้งชิ้นส่วนจนมีลักษณะเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ สีเขียวอ่อน (ภาพที่ 4.68) แคลลัสมีการเจริญเติบโตดีที่สุดในอาหารสูตรที่มี picloram ความเข้มข้น 24.8 ไมโครโมลาร์ โดยมีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกสัปดาห์ของการทดลอง (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 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (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
	27.1	2.29±0.29e	2.29±0.29e	0.26±0.02b-d
	40.7	2.49±0.36cde	2.49±0.36cde	0.33±0.07b
	54.2	2.65±0.21bcd	2.65±0.21bcd	0.31±0.01bc
	67.8	2.76±0.20bc	2.76±0.20bc	0.29±0.01bcd
	picloram	12.4	2.80±0.21bc	2.80±0.21bc
	24.8	3.66±0.21a	3.66±0.21a	0.52±0.05a
	37.2	2.96±0.07b	2.96±0.07b	0.25±0.03b-e
	49.6	2.31±0.35e	2.31±0.35e	0.17±0.02ef
	62.1	1.75±0.23f	1.75±0.23f	0.22±0.01de
F-test	**	**	**	**
CV (%)	5.3815	5.3815	14.3034	14.3034

** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

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

4.5.1.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดจากชิ้นส่วนแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

นำชิ้นส่วนตายอดจากคัพพะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก มาชักนำการเกิดแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ภักวดี ภักดีงาม. 2548) ที่ได้จากการทดลองที่ 1.2.1 แล้วนำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 40, 50 และ 60 ไมโครโมลาร์ และเพาะเลี้ยงภายใต้แสง เป็นเวลา 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 ลักษณะยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเอ็มบริโอจินิกแคลลัส บนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA 50 ไมโครโมลาร์ a คือลักษณะกลุ่มยอดเล็กๆ สีเขียวอ่อนที่เกิดขึ้น (3.33X) b คือยอดสีเขียวที่มีใบเกิดขึ้น (2.78X) เมื่อเพาะเลี้ยงไปเป็นเวลา 8 และ 12 สัปดาห์ตามลำดับ

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

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

4.5.2 ผลการถ่ายพลาสมิดที่มียีนแบบต่างๆ เข้าสู่บัวหลวง

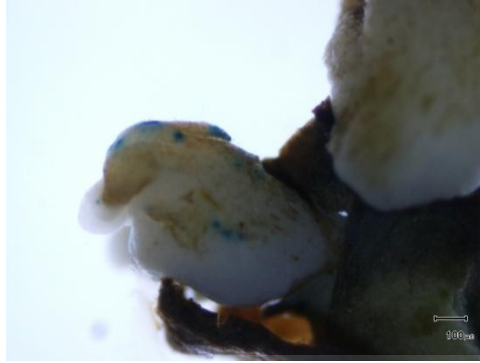
4.5.2.1 การถ่ายยีน Antisense Dihydroflavonol 4-Reductase (anti-DFR) ด้วยพลาสมิด pCAMBIA2301anti-DFR เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณชกริก โดยใช้ชิ้นส่วนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอจลินด์ แคลล์สบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

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* บนชิ้นส่วนยอดของบัวหลวงพันธุ์กริก ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ 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

จำนวนยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง (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 พบว่าจำนวนยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง ทั้งในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าที่ระยะห่าง 9 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากับคือ 4.58 ยอด ส่วนที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร ชิ้นส่วนมีจำนวนยอดรองลงมาเฉลี่ยเท่ากับคือ 3.33 ยอด

เมื่อพิจารณาผลของ Rupture disk ร่วมกับ ระยะห่างของชุดยิงกับชิ้นส่วนเป้าหมาย พบว่าจำนวนยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกสัปดาห์ของการทดลอง 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 ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การตายมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 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

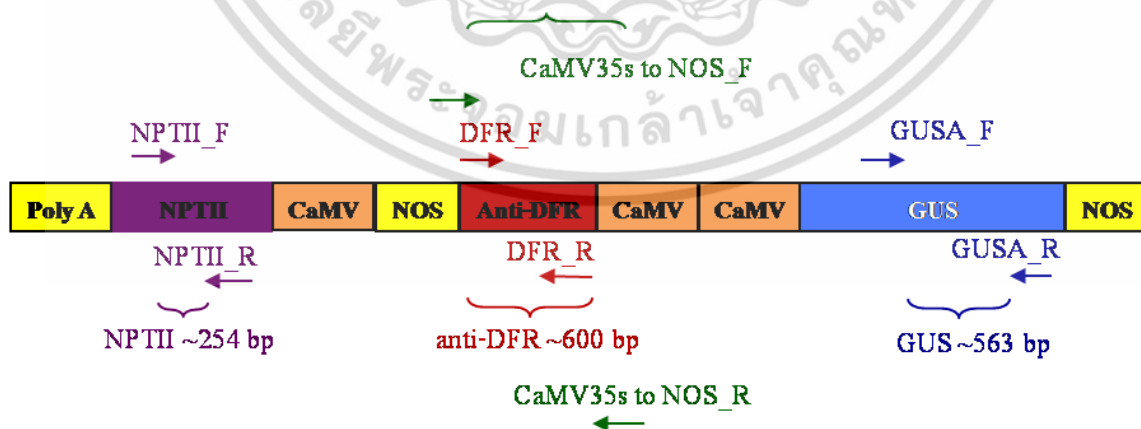
ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

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

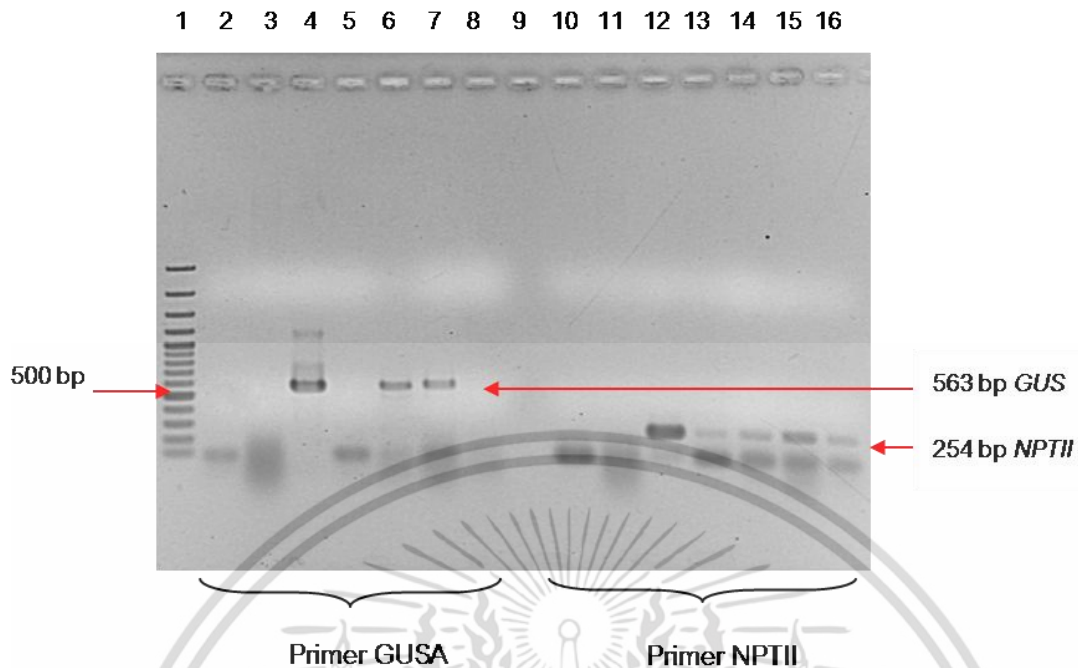
การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *NPTII* ยีน *GUS* และยีน *anti-DFR* หลังจากการถ่ายยีน ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

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)

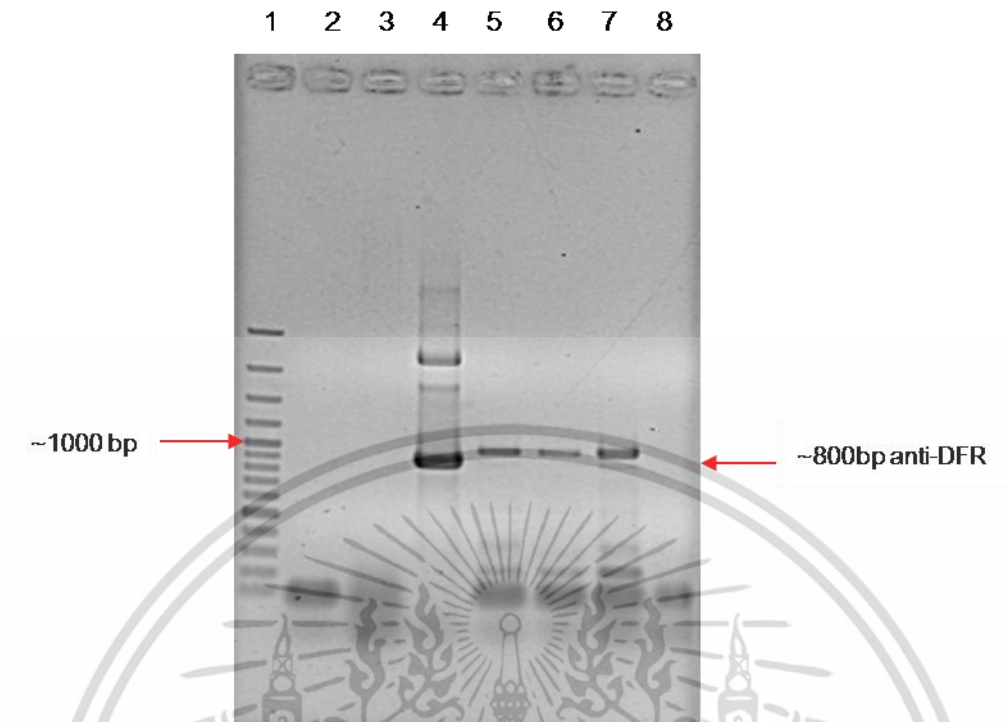


ภาพที่ 4.71 ตำแหน่งการเข้าจับของคู่ไพรเมอร์ต่างๆของยีน *NPTII* ยีน *GUS* และยีน *anti-DFR* ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์



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* เข้าสู่ชิ้นส่วนตาดอกจากคัพภะที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร จากต้นที่สามารถเจริญเป็นยอดได้บนอาหารคัดเลือก จำนวน 6 ต้น ซึ่งมาจากวิธีการถ่ายยีนที่แตกต่างกันคือ การยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 และ 9 เซนติเมตร อย่างละ 2 ต้น และการยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 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 จำนวนต้นบัวหลวงพันธุ์บูรณทริกที่ชักนำได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อยอด และตาดอกจากคัพภะ โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He

ความดันก๊าซฮีเลียม (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว)	ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย (เซนติเมตร)	จำนวนต้นที่ชักนำได้บนอาหารคัดเลือก	
		ยอด	ตาดอกจากคัพภะ
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
		ตรวจสอบ	ตรวจสอบยีน <i>GUS</i>	ตรวจสอบยีน <i>NPTII</i>
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
ถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อตายอดจากคัพพะ โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/He

ความดันก๊าซฮีเลียม (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว)/ ระยะห่างของเนื้อเยื่อ เป้าหมาย (เซนติเมตร)	จำนวนต้นที่ ตรวจสอบ	จำนวนต้นที่	จำนวนต้นที่	จำนวนต้นที่
		ตรวจสอบ	ตรวจสอบยีน <i>GUS</i>	ตรวจสอบยีน <i>NPTII</i>
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
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
138
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

complementary DNA โดยเอนไซม์ reverse transcriptase แล้วทำการเพิ่มจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาตรวจวิเคราะห์ปริมาณของดีเอ็นเอ โดยแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis ในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมีตำแหน่งการเข้าจับของ คู่มือ NPTII และ DFR

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

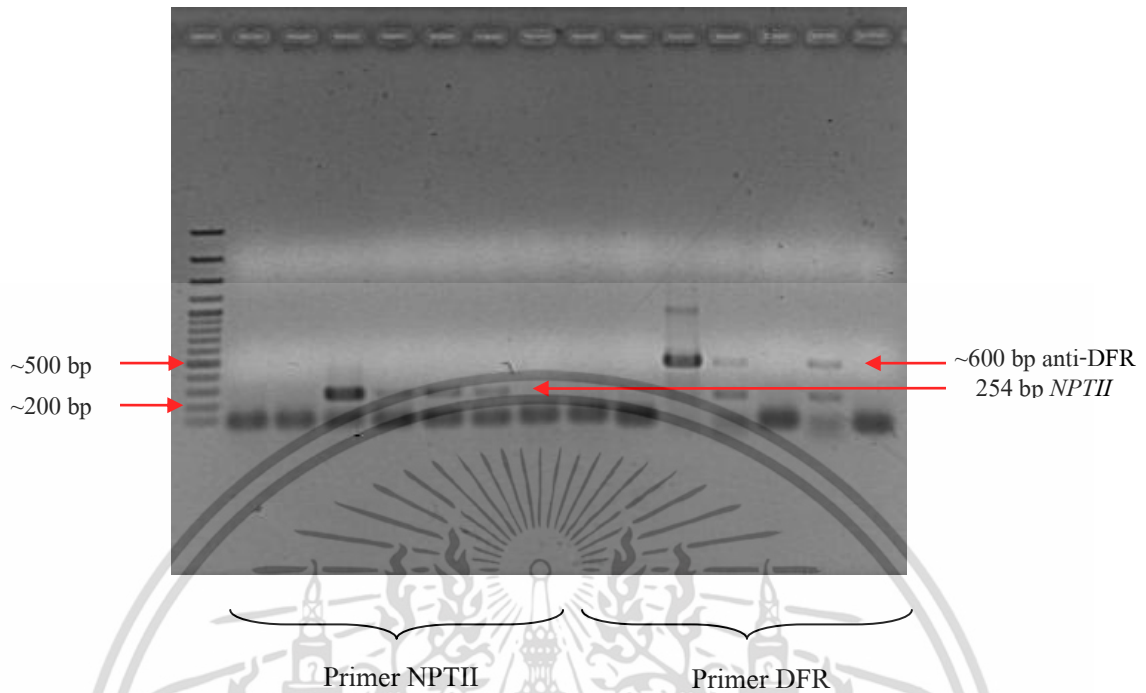
จากต้นบัวหลวงที่ได้รับการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *NPTII* ที่ได้รับการถ่ายยีนจากพลาสมิด CAMBIA2301 anti-DFR จากชิ้นส่วนยอด และสามารถนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้ทั้งสิ้น 4 ต้น พบว่าต้นที่พบการแสดงออกของยีน *NPTII* มีจำนวน 3 ต้น ส่วนต้นที่พบการแสดงออกของยีน anti-DFR จำนวน 2 ต้น โดยในจำนวนนี้มี 1 ต้นที่พบการแสดงออกเพียง 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 ที่ชักนำ ได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อยอด 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

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 ของบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงราชินี ด้วยวิธียิงอนุภาค

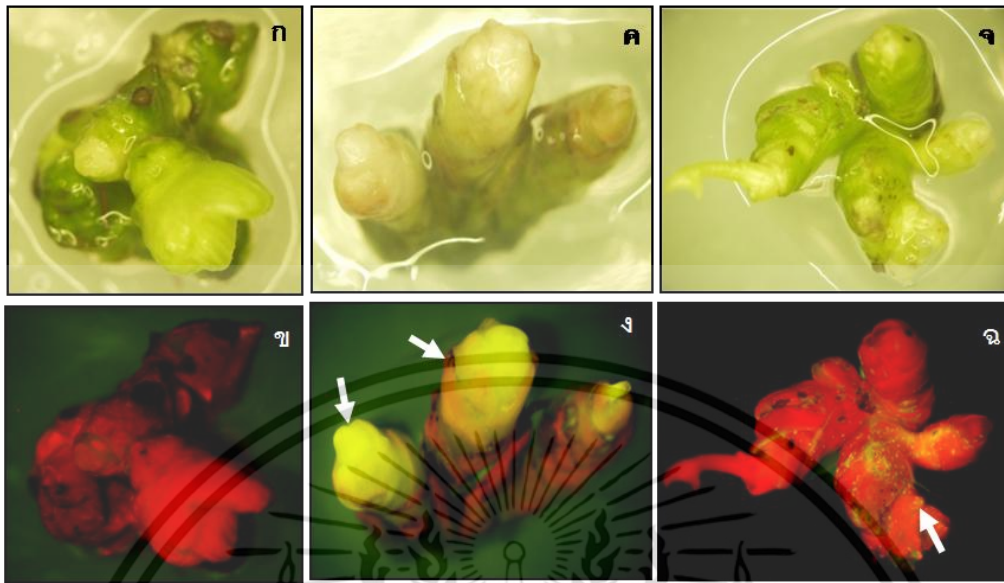
ทำการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวงพันธุ์กริกดอกสีขาวและบัวหลวงราชินีดอกสีชมพู ด้วยวิธียิงอนุภาค โดยใช้พลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA เคลือบบนอนุภาคทองคำ (gold particles) ซึ่งใช้เป็นพาหะในการถ่ายยีน และทำการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
140

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุภาค หลังจากถ่ายยีน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำไปตรวจสอบประสิทธิภาพของการถ่ายยีนจากการแสดง ออกแบบชั่วคราวของยีนรายงานผลยีน GFP ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ พบว่า มี เนื้อเยื่อ 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 และมีคะแนนประสิทธิภาพในการถ่าย ยีน เฉลี่ย 0.99 ± 0.17 คะแนน (ตารางที่ 4.17) หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อ shoot cluster ทั้งหมดไปคัดเลือก ชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือก ที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุนทรริก มีจำนวนเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหาร คัดเลือกลดลงตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก ในสัปดาห์แรก (สัปดาห์ที่ 0) มีเนื้อเยื่อที่รอด ชีวิตร้อยละ 100.00 ± 0.00 ในสัปดาห์ที่ 2 มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 100.00 ± 0.00 ในสัปดาห์ที่ 4 มี เนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 95.00 ± 3.54 ในสัปดาห์ที่ 6 มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 81.00 ± 10.84 ในสัปดาห์ ที่ 8 มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 65.00 ± 16.53 และ ในสัปดาห์ที่ 10 มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 56.00 ± 13.87 (ภาพที่ 4.76 จ) ส่วนชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงราชินี มีจำนวนเฉลี่ยของชิ้น เนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกลดลงตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกด้วยเช่นกัน โดยใน สัปดาห์แรก (สัปดาห์ที่ 0) มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 100.00 ± 0.00 ในสัปดาห์ที่ 2 มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อย ละ 100.00 ± 0.00 ในสัปดาห์ที่ 4 มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 98.00 ± 2.74 ในสัปดาห์ที่ 6 มีเนื้อเยื่อที่รอด ชีวิตร้อยละ 91.00 ± 8.94 ในสัปดาห์ที่ 8 มีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 72.00 ± 14.83 และ ในสัปดาห์ที่ 10 มี เนื้อเยื่อที่รอดชีวิตร้อยละ 61.00 ± 18.51 (ภาพที่ 4.76 ข) จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวง บุนทรริกและบัวหลวงราชินีที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก ไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร regeneration เป็น เวลา 8 สัปดาห์ พบว่า มีชิ้นเนื้อเยื่อบางส่วนไม่สามารถเจริญเติบโต และตาย มีชิ้นเนื้อเยื่อเพียงบางส่วนที่ สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหาร regeneration ชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุนทรริก ที่ สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นบัวหลวงได้ มีจำนวน 2 ต้น คือ ต้นบัวหลวงบุนทรริกหมายเลข B3/2 และ หมายเลข B5/12 (ภาพที่ 4.77) ส่วนบัวหลวงราชินี มีชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ที่สามารถเจริญเติบโตเป็น ต้นบัวหลวงได้ จำนวน 5 ต้น คือ ต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2, หมายเลข R2/1, หมายเลข R2/4, หมายเลข R2/11 และ หมายเลข R5/12 (ภาพที่ 4.78) จากนั้นนำต้นบัวหลวงบุนทรริกและบัวหลวงราชินีไป ตรวจสอบการแสดงออกของยีนรายงานผลยีน GFP ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ พบว่า ต้นบัวหลวงบุนทรริกหมายเลข B3/2 มีการเจริญเติบโตได้ดี มีการเกิดยอด รากและใบขนาดใหญ่ พบการ เรืองแสงสีเขียวของยีน GFP ที่บริเวณปลายราก แต่ไม่พบการเรืองแสงสีเขียวที่บริเวณใบและลำต้น และ ต้นบัวหลวงบุนทรริกหมายเลข B5/12 มีการเจริญเติบโตได้ดี มีการเกิดยอด รากและใบขนาดใหญ่ พบการ

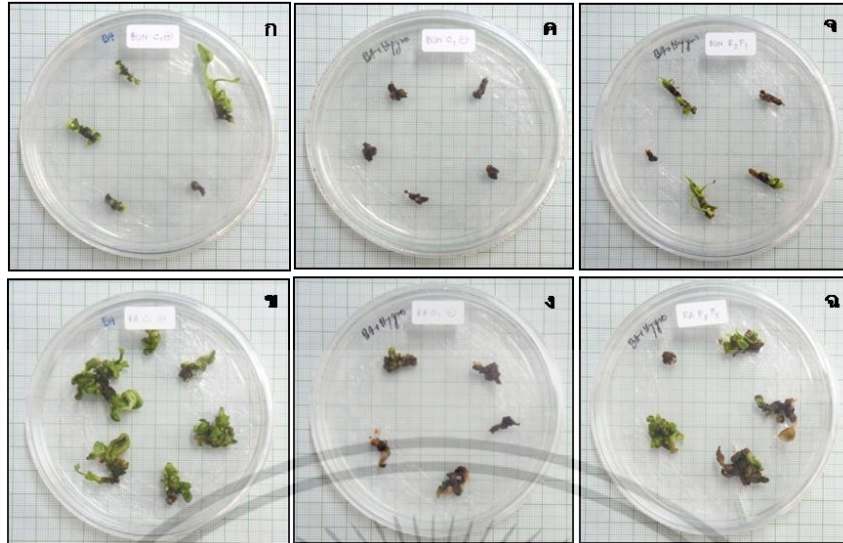
เรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* ที่บริเวณกาบใบ และบริเวณบางส่วนของราก แต่ไม่พบการเรืองแสงสีเขียวที่บริเวณใบ และลำต้น ส่วนต้นบัวหลวงราชินี พบว่า ต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2 มีใบขนาดใหญ่ 1 ใบ แต่ยอดและส่วนอื่นๆ ไม่เจริญเติบโต และตายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล-ดำ พบว่ามีจุดเรืองแสงสีเขียวจุดเล็กๆ บนใบ และใบและก้านใบบางส่วนที่ตาย 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 ในชิ้นเนื้อเยื่ออื่นๆ ที่ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหาร regeneration พบว่ามีเนื้อเยื่อบางชิ้นที่ตาย มีการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* ในยอดและใบบางส่วน เช่น ต้นบัวหลวงบุณฑริก หมายเลข B3/1 และต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/6 และหมายเลข R4/6 เป็นต้น จากนั้นตัดเนื้อเยื่อส่วนใบและลำต้นของบัวหลวงบุณฑริกหมายเลข B3/2 และหมายเลข B5/12 และตัดเนื้อเยื่อส่วนใบและลำต้นของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1 และหมายเลข R5/1 ตัดเนื้อส่วนใบของบัวหลวงราชินีหมายเลข 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) ของต้นบัวหลวงบุงนทริก 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 ของบัวหลวงบุนทรริกและบัวหลวงราชินี

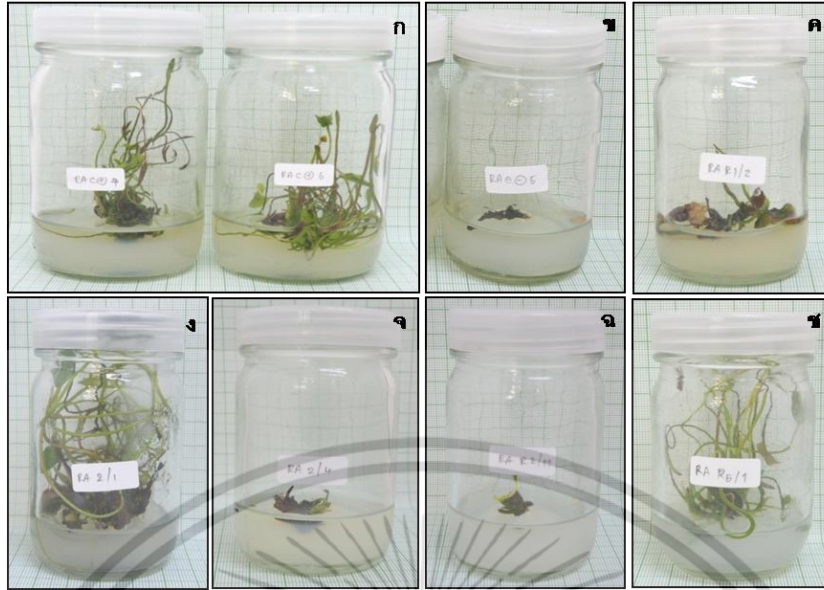
	บัวหลวงบุนทรริก	บัวหลวงราชินี
จำนวนชั้นเนื้อเยื่อที่ถ่ายยีนทั้งหมด (ชิ้น)	100	100
จำนวนชั้นเนื้อเยื่อที่พบการแสดงออกของยีน <i>GFP</i> (ชิ้น)	72	75
คะแนนการแสดงออกของยีน <i>GFP</i> (คะแนนเต็ม 5 คะแนน)	0.97±0.20	0.99±0.17
ร้อยละเฉลี่ยของชั้นเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก (ชิ้น)	56.00±13.87	61.00±18.51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



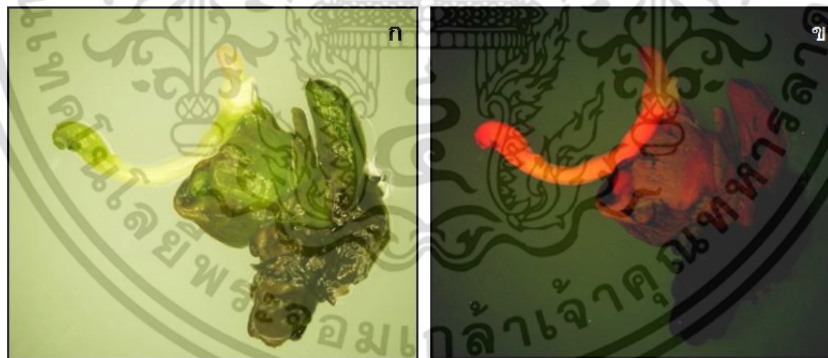
ภาพที่ 4.76 ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนหลังจากการคัดเลือกเป็นเวลา 10 สัปดาห์; (ก) ต้นบัวหลวง
 บุนนทริก และ (ข) ต้นบัวหลวงราชินีที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารปกติ, (ค) ต้น
 บัวหลวงบุนนทริก และ (ง) ต้นบัวหลวงราชินีที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร
 คัดเลือก และ (ฉ) ต้นบัวหลวงบุนนทริก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

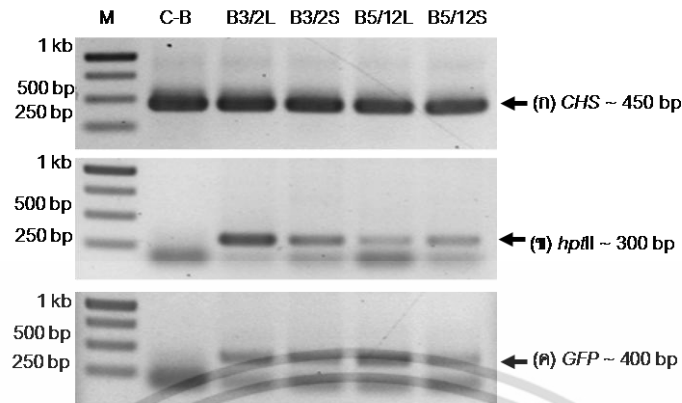


ภาพที่ 4.79 การแสดงออกของยีน *GFP* ของต้นบัวหลวงราชินี หมายเลข R2/11; ส่วนยอดและใบ (ก) ภายใต้แสงปกติ, (ข) ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ไม่พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* ที่ส่วนยอด และใบขนาดเล็กที่เกิดขึ้น ((ก) และ (ข) กำลังขยาย 12x)

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

ทำการสกัด genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กรอกหมายเลข B3/2, ใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กรอกหมายเลข B5/12, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2, ใบและลำต้นต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/4, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/11, ใบและลำต้นต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R5/1 และใบของต้นบัวหลวงพันธุ์กรอกและบัวหลวงราชินี ต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน นำมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GFP* และ ยีน *hptII* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ genomic DNA ที่สกัดจากจากใบอ่อนของต้นบัวหลวงพันธุ์กรอกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน 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 จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กรอกหมายเลข B3/2, genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กรอกหมายเลข B5/12 และ genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงพันธุ์กรอกที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน 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 จากบัวหลวงพันธุ์กรอก สามารถนำมาใช้เป็น DNA ต้นแบบในการทำ PCR ได้ แต่เมื่อใช้ไพรเมอร์ *Hygro_forward primer* และ *Hygro_reverse primer* พบว่า มีเฉพาะตัวอย่าง genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กรอกหมายเลข B3/2 และ ต้นบัวหลวงพันธุ์กรอกหมายเลข B5/12 เท่านั้นที่พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *hptII* ขนาดประมาณ 300 bp (ภาพที่ 4.80 ข) ไม่พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ในตัวอย่างของ genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงพันธุ์กรอกที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และเมื่อใช้ไพรเมอร์ *GFP_forward primer* และ *GFP_reverse primer* พบว่า มีเฉพาะตัวอย่าง genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กรอกหมายเลข B3/2 และ genomic DNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กรอกหมายเลข B5/12 เท่านั้นที่พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *GFP* ขนาดประมาณ 400 bp (ภาพที่ 4.80 ค) ไม่พบแถบ DNA ของผลผลิต PCR ในตัวอย่างของ genomic DNA จากใบของต้นบัวหลวงพันธุ์กรอกที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน แสดงว่ายีนที่ถ่ายเข้าได้เข้าไปในส่วน of genomic DNA สอดคล้องกับผลการเจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin ได้ และพบกาเรืองแสงของยีน *GFP* ในต้นบัวหลวงพันธุ์กรอกหมายเลข B3/2 และต้นบัวหลวงพันธุ์กรอกหมายเลข B5/12

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) ของต้น หมายเลข 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)ของต้น หมายเลข 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* ในต้นบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

ทำการสกัด RNA จากใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B3/2, ใบและลำต้นของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B5/12, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/4, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/11, ใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R5/1 และใบของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงราชินี ต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน จากนั้นนำ RNA ที่ได้ทำการสังเคราะห์ cDNA มาศึกษาเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *CHS* ในต้นบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense ที่อยู่บนพลาสมิด pCAMBIA1302 CHSA ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR ตามวิธีการของ ชัยวรกุล ไชยปัญญา (2555) โดยเริ่มต้นจากปรับความเข้มข้นของ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากใบอ่อนและต้นอ่อนของบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน และต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนให้เท่ากันโดยการเปรียบเทียบจากปริมาณการแสดงออกของยีน *18S rRNA* ด้วยเทคนิค PCR หลังจากเจือจางความเข้มข้นของ cDNA ให้เท่ากัน โดยให้ผลผลิต PCR ของยีน *18S rRNA* เป็น DNA อ้างอิงแล้ว นำ cDNA ที่ได้ไปใช้ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CHSA_forward primer และ CHSA_reverse primer เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *CHS* ในต้นบัวหลวงพันธุ์กริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน และต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เมื่อใช้ตัวอย่าง cDNA จากต้นบัวหลวงพันธุ์กริก พบว่า ความเข้มข้นของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของใบและลำต้นของบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B3/2 และ cDNA ของลำต้นของบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B5/12 มีความเข้มมากที่สุด และมีความเข้มใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.82) ส่วนความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของใบของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน มีความเข้มเจือจางลง และความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของใบของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B5/12 มีความเข้มน้อยที่สุด ในขณะที่ความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *18S rRNA* ซึ่งเป็นยีนอ้างอิงมีความเข้มใกล้เคียงกัน แสดงว่าใบและลำต้นของบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B3/2 และลำต้นของบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B5/12 มีระดับการแสดงออกของยีน *CHS* มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนใบของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ส่วนใบของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกหมายเลข B5/12 มีระดับการแสดงออกของยีน *CHS* ลดลงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนใบของต้นบัวหลวงพันธุ์กริกที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

เมื่อใช้ cDNA จากต้นบัวหลวงราชินี พบว่า ความเข้มข้นของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1, cDNA ของใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/11 และ cDNA ของใบของต้นบัวหลวงราชินีที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน มีความเข้มมาก เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

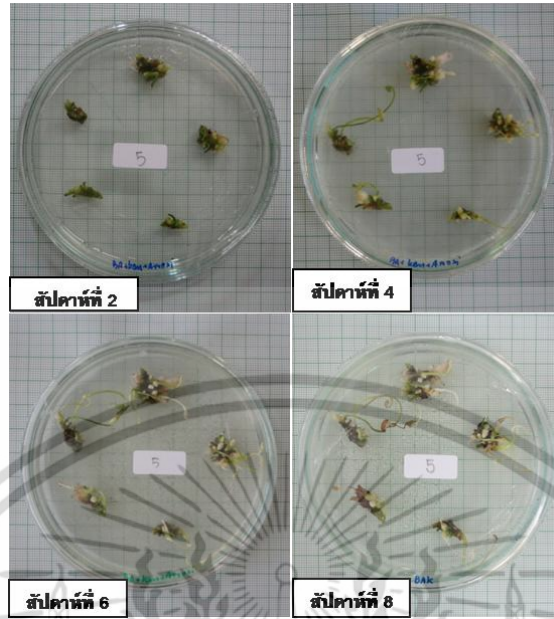
ที่สุด และมีความเข้มใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.82) ในขณะที่ความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2 และ cDNA ของใบของต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R5/1 มีความเข้มใกล้เคียงกัน และมีความเข้มน้อยกว่าผลผลิต PCR ของบางส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก 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 มีความเข้มขึ้นน้อยมาก จึงทำให้ความเข้มของแถบ DNA ของผลผลิต PCR ของยีน *18S rRNA* ที่โคลนได้ มีความเข้มขึ้นน้อยมาก 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) ของต้นบัวหลวงพันธุ์กรีกที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน, ส่วนใบ (B3/2L) และลำต้น (B3/2S) ของต้นบัวหลวงพันธุ์กรีกหมายเลข B3/2, ส่วนใบ (B5/12L) และ ลำต้น (B5/12S) ของต้นบัวหลวงพันธุ์กรีกหมายเลข 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 μ M จากนั้นเจือจางความเข้มข้นของเซลล์อะโกรแบคทีเรีย เป็น 1:10 ด้วยอาหารเหลว MS แซ่ร่วมกันเป็นเวลา 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)

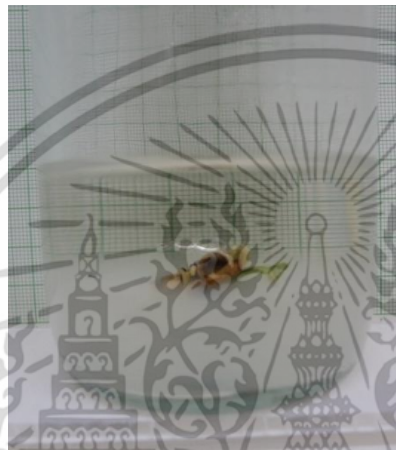


ภาพที่ 4.83 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วน shoot cluster ของบัวหลวงบนอาหารตัดเล็กลงภายหลังการถ่ายพลาสมิด pCAM4'CGT โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะครั้งที่ 4 เป็นเวลา 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์

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} โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมาเป็นพาหะครั้งที่ 1-5

		ชิ้นส่วน shoot cluster หลังการถ่ายยีนแบบอะโกรแบคทีเรียมาอายุ (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 บัวหลวง 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 ร่วมด้วยพบว่ามีส่วนที่มีการแตกยอดเพิ่มขึ้นเพียง 1 ต้น ภายใน 2 สัปดาห์ โดยมียอดเพิ่มขึ้นเพียง 1 ยอด ในขณะที่ชิ้นอื่นๆ ยอดเริ่มมีสีน้ำตาลคล้ำ และตาย (ภาพที่ 4.84)



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

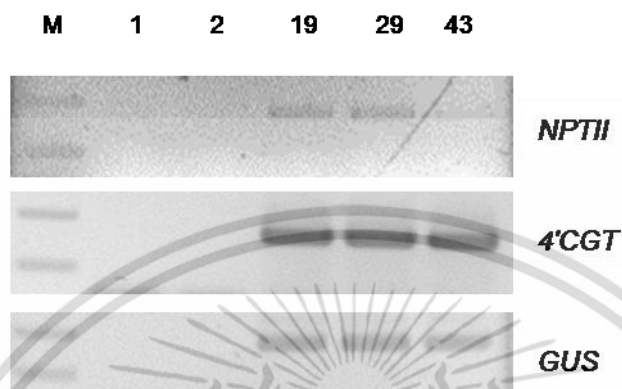
4.5.2.3.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน 4'CGT, GUS และ NPTII หลังจากการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ

หลังจากการถ่ายโอนพลาสติก pCAM4'CGT เข้าสู่ shoot cluster ของต้นบัวหลวง โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ ภายหลังจากคัดเลือก shoot cluster บนอาหาร MS ที่มีกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับอะม็อกซิซิลลินความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14 สัปดาห์ นำชิ้นส่วนใบของต้นบัวหลวงจำนวน 5 ต้น แบ่งเป็นบัวหลวงปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจำนวน 2 ต้น และบัวหลวงที่รอดชีวิตจากการเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกจำนวน 3 ต้นมาสกัดอาร์เอ็นเอ แล้วทำการสังเคราะห์ cDNA เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน 4'CGT ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-Bam HI-4'CGT และ R-4'CGT -Sac I พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 นิวคลีโอไทด์ จากบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน จำนวน 3 ต้น คือต้นที่ 19, 29 และ 43 จากทั้งหมดที่สุ่มมาตรวจสอบ 3 ต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
155

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

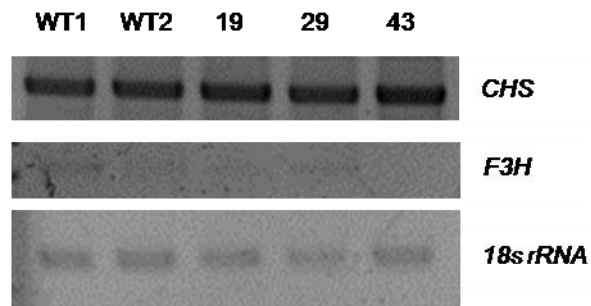
(ภาพที่ 4.85) และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* และ *NPTII* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-gusA และ R-gusA สำหรับยีน *GUS* ไพรเมอร์ F-NPTII และ R-NPTII สำหรับยีน *NPTII* พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 นิวคลีโอไทด์ สำหรับยีน *GUS* และแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ สำหรับยีน *NPTII* จากบวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน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



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

4.5.2.3.2 การติดตามปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* และยีน *F3H* ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR ในบวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด 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 จากบวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนและไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT โดยพบว่าบวหลวงที่นำมาตรวจสอบทั้ง 3 ต้น มีการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* และพบว่าระดับการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* ของต้นบวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นบวหลวงปกติ (ภาพที่ 4.86)

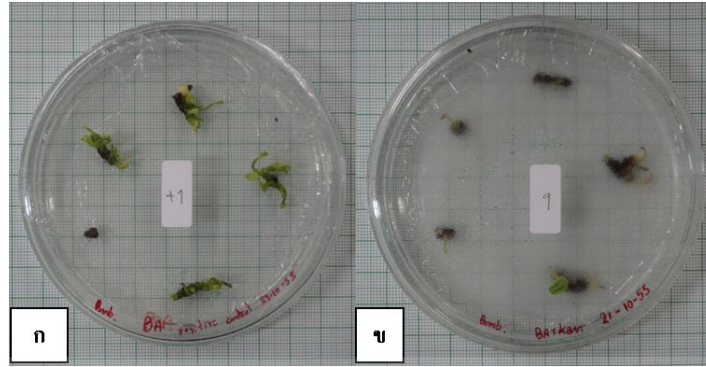


ภาพที่ 4.86 ผลเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *CHS* และยีน *F3H* ในต้นบัวหลวงที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT (ต้นที่ 19, 29 และ 43) โดยใช้อะไมบะแบคทีเรียเป็นพาหะ โดยเปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงปกติ (WT1 และ WT2) และมียีน *18s rRNA* เป็นยีนอ้างอิง

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 cluster หลังการถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาคบนอาหาร 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 โดยพบว่าการแตกยอดใหม่ในสัปดาห์ที่ 32 จำนวน 1 ยอด มีขนาด 1 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.88) จากนั้นนำต้นบั้วหลวงที่ผ่านการคัดเลือกไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน *4'CGT*, *GUS*, *NPTII*, *CHS* และ *F3H* ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

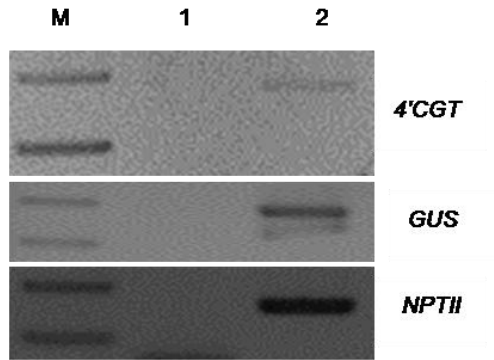


ภาพที่ 4.88 ต้นบั้วหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนแบบการยิงอนุภาค อายุ 32 สัปดาห์ (ก) และ 40 สัปดาห์ (ข) บนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์

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

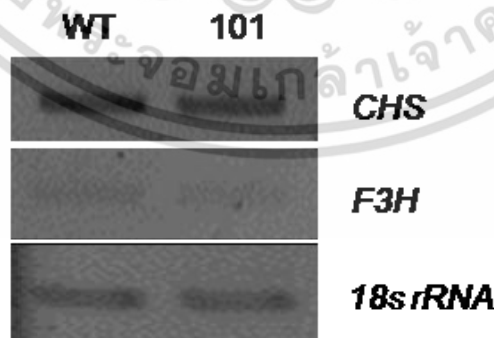
หลังจากการถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาค

ภายหลังการคัดเลือกต้นบั้วหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธี pCAM4'*CGT* บนอาหาร MS ที่มีกานามัยซินที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 16 สัปดาห์ นำชิ้นส่วนใบของต้นบั้วหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนและรอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกจำนวน 1 ต้น มาสกัดอาร์เอ็นเอแล้วทำการสังเคราะห์ cDNA เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *4'CGT* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-BamHI-4'*CGT* และ R-4'*CGT*-Sac I พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 นิวคลีโอไทด์ ในต้นบั้วหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธี 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 นำไปจากต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *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 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ 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* จากกลีบดอกบัวหลวงบุนทรริกและกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกช ด้วยเทคนิค PCR

การโคลนยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ DNA ต้นแบบเป็น genomic DNA และ cDNA ที่สกัดได้จากกลีบดอกบัวหลวงบุนทรริกสีขาวและบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู 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 ของบัวหลวงบุนทรริกและบัวหลวงสัตตบงกช ขนาดเท่ากัน คือ 1,599 คู่เบส และเมื่อนำนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีน พบว่า ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุนทรริก และบัวหลวงสัตตบงกช มีขนาดของส่วน intron และ exon เท่ากัน โดยส่วนของ exon มี 2 ชั้น ขนาด 178 คู่เบส (ตั้งแต่ตำแหน่งลำดับที่ 1 ถึง 178) และขนาด 992 คู่เบส (ตั้งแต่ตำแหน่งลำดับที่ 608 ถึง 1,599) และส่วนของ intron มี 1 ชั้น ขนาด 429 คู่เบส (ตั้งแต่ตำแหน่งลำดับที่ 179 ถึง 607) และได้ผลผลิต PCR ของยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ที่โคลนจาก cDNA ที่สังเคราะห์จาก RNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุนทรริกสีขาว และกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชกลีบดอกสีชมพูขนาดเท่ากัน คือ 1,170 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 389 กรดอะมิโน ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุนทรริก และบัวหลวงสัตตบงกช พบว่า มีความเหมือนกันมากกว่าร้อยละ 99 ในระดับนิวคลีโอไทด์ และมีความเหมือนกันร้อยละ 99 ในระดับกรดอะมิโน ในส่วนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุนทรริกและบัวหลวงสัตตบงกช พบว่า มีความเหมือนกันมากกว่าร้อยละ 99 ในระดับนิวคลีโอไทด์ และมีความเหมือนกันร้อยละ 99 ในระดับกรดอะมิโน ยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุนทรริก 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

โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบูรณทริกและบัวหลวงสัตตบงกช 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* เป็นเอนไซม์ สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoids และอีกหลายกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเอง ของพืช และการตอบสนองต่อแสง (Lo *et al.* 2002) จึงมีความอนุรักษ์สูงในระหว่างวิวัฒนาการของพืชแต่ละชนิด หากยีนมีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่สำคัญ ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์จะทำให้ พืชอาจตายได้ (Todd and Vodkin. 1996) การโคลนยีน *CHS* จาก cDNA ของกลีบดอกสีขาวของบัวหลวง บูรณทริกและกลีบดอกสีชมพูของบัวหลวงสัตตบงกช จึงเป็นการยืนยันได้ว่าการสร้าง mRNA ของยีน *CHS* ใน กลีบดอกบัวหลวงทั้งสองสี และลำดับกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้มีความเหมือนกันถึงร้อยละ 99 มีความ แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยในบางตำแหน่ง แต่กรดอะมิโนในตำแหน่งสำคัญ ยังคงเป็นชนิดเดียวกันจึงไม่มีผลต่อ การทำงานของเอนไซม์ในดอกบัวหลวงทั้งสองสี (Joseph and Joseph. 2000) ยีน *CHS* ในพืชหลายชนิด พบว่า มีการทำงานร่วมกันหลายยีน (family genes) เช่น ถั่วเหลือง (Tuteja *et al.* 2009) และถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris*) (Ryder *et al.* 1987) ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) (Lo *et al.* 2002.) เป็นต้น ในถั่ว เหลืองพบว่ามียีน *CHS* ถึง 8 ยีน กระจายอยู่บนโครโมโซมที่แตกต่างกัน แต่ละยีนมีการแสดงออกแตกต่างกัน ในแต่ละเนื้อเยื่อ เช่น เมล็ด ใบ และดอก เป็นต้น และมียีนบางส่วนมีลักษณะกลับทิศ เกิดการยับยั้งการทำงาน กันเอง ในลักษณะของ anti-sense ทำให้ดอกถั่วมีสีขาว และเมล็ดถั่วสีจางลง (Tuteja *et al.* 2009)

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบูรณทริกและบัว หลวงสัตตบงกชมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* พืชอื่น 30 ชนิด ที่ได้มีการรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank ด้วยโปรแกรม MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) โดยเลือกวิธีการคำนวณทางสถิติด้วยวิธี Minimum evolution method และใช้วิธีการสร้างแผนภูมิ ต้นไม้ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Bootstrap test โดยใช้จำนวนรอบ 500 รอบ พบว่าลำดับกรดอะมิโน ของยีน *CHS* ของบัวหลวงทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแยกตัวออกมาจากพืชในกลุ่มอื่น อยู่ ในกลุ่มย่อยเดียวกับ *N. nucifera* และอยู่ในกลุ่มใหญ่เดียวกับ กลุ่มไม้ยืนต้น ใบเลี้ยงคู่ เช่น *Theobroma cacao* (โกโก้), *Camellia sinensis* (ชาจีน) และ *Malus domestica* (แอปเปิล) เป็นต้น สอดคล้องกับ

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 ลำดับกรดอะมิโนของยีน *rbcL* ของบัวหลวง *N. lutea* (North America) และ *N. nucifera* (Asia and Australia) มีความเหมือนกันถึงร้อยละ 99.99 และอยู่ในกลุ่มของพืชดอกใบเลี้ยงคู่ (angiosperm) และกลุ่มไม้ยืนต้น (woody plant)

5.1.2 การโคลนยีน *F3H* ในปทุมชาติและอุบลชาติ

การโคลนยีน *F3H* ในอุบลชาติเซนหลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุญศรี พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *F3H* ของอุบลชาติและปทุมชาติ มีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้จากการโคลนยีน *F3H* ในอุบลชาติเซนหลุยส์โกลด์ทางด้าน 3' พบว่านิวคลีโอไทด์บริเวณหน้า poly A tail ของโคลนที่ 2 มีจำนวนมากกว่าโคลนที่ 1 และ 3 จำนวน 15 คู่เบส ทั้งนี้คาดว่าสาเหตุการสังเคราะห์ mRNA ของยีน *F3H* อาจเกิดจากการลอกทรานสคริปต์ (transcription) จากดีเอ็นเอต้นแบบบนโครโมโซมมากกว่า 1 ชุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ นงลักษณ์ เจริญวงศ์ 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 และพบจำนวนนิวคลีโอไทด์บริเวณหน้า 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) พบยีน *F3H* บนโครโมโซมของต้นแอปเปิล (*Malus domestica* Borkh. cv. Fuji) จำนวน 2 ชุด ในการโคลนยีน *F3H* ทางด้านปลาย 5' ด้วยปฏิกิริยา Nested PCR ได้ใช้ 5' RACE cDNA ของดอกลิ้นมังกรเป็นดีเอ็นเอต้นแบบควบคุมกับ 5' RACE cDNA ของอุบลชาติเซนหลุยส์โกลด์ เพื่อเป็นการยืนยันประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่ใช้ว่ามีความมีความจำเพาะกับยีน *F3H* ในอุบลชาติเซนหลุยส์โกลด์เท่านั้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *F3H* ที่โคลนได้จากอุบลชาติเซนหลุยส์โกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติบุญศรี แสดงความเหมือนับยีน *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* ในอุบลชาติและปทุมชาติมีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแยกตัวออกมาจากพืชในกลุ่มอื่นอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 4.19) ในขณะที่พบยีน *CHS* ในปทุมชาติสัตตบงกช มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ สาลี่ (*Pyrus pyrifolia*) พ룬 (*Prunus avium*) กุหลาบ (*Rosa hybrida*) และคามิเลีย (*Camelia mitidissima*) (ปฤษฎางค์ อะโน อยู่ในขณะการตีพิมพ์)

ยีน *F3H* ในปทุมชาติสัตตบงกชกลีบดอกสีชมพู ปทุมชาติบุญทริกกลีบดอกสีขาว 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 จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการที่ในปทุมชาติบุญทริกกลีบดอกสีขาวมีการแสดงออกของยีนในวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานินน้อยมีสาเหตุจากอิทธิพลของการทำงานของโปรโมเตอร์ จึงควรมีการศึกษาในส่วนของโปรโมเตอร์ยีน *F3H* ในปทุมชาติต่อไป

5.1.3 การโคลนยีน 4'CGT ในกลีบดอกลินมังกรสีต่างๆ

การโคลนยีน 4'CGT จาก cDNA ของดอกลินมังกรสีเหลือง 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 ของลินมังกรขนาด 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 ของลินมังกร (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* ในกลีบดอกบัวหลวงบุญทริกสีขาว และบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู และปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงในช่วงระยะของการพัฒนาของดอกบัวหลวงบุญทริกและบัวหลวงสัตตบงกช พบว่าดอกบัวหลวงบุญทริก มีการปริมาณแสดงออกของยีนไม่แตกต่างกันมากนักในแต่ละช่วงระยะการพัฒนาของดอกบัวหลวง ส่วนปริมาณการ

แสดงออกของยีน CHS ในดอกบัวหลวงสัตตบงกช พบว่า ในระยะที่ 1 ดอกตูมขนาดเล็ก มีปริมาณการ
แสดงออกของยีนมากที่สุด และมีปริมาณการแสดงออกลดลงในระยะที่ 2 ดอกตูมขนาดกลาง และ ระยะที่ 3
ดอกตูมขนาดใหญ่ และมีปริมาณการแสดงออกน้อยที่สุด ในระยะที่ 4 และระยะที่ 5 เมื่อดอกใกล้จะบาน เมื่อ
เปรียบเทียบการปริมาณการแสดงออกของยีน CHS ในกลีบดอกบัวหลวงบุญทริกสีขาและกลีบดอกบัวหลวง
สัตตบงกชสีชมพู พบว่า ในกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู มีปริมาณการแสดงออกของยีนมากกว่ากลีบ
ดอกบัวหลวงบุญทริกสีขา ในทุกๆ ระยะการพัฒนา จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ปริมาณการ
แสดงออกของยีน CHS ในกลีบดอกบัวหลวงมีปริมาณการแสดงออกมากที่สุดในช่วงระยะดอกตูมในช่วงแรก
จากนั้นปริมาณการแสดงออกจะลดลงเมื่อดอกมีการพัฒนามากขึ้นจนถึงช่วงระยะดอกบาน จะมีการแสดงออก
ของยีน CHS น้อยที่สุด การศึกษาการแสดงออกของยีน CHS ในกลีบดอกไม้ของพืชหลายชนิดที่มีรายงานมา
ก่อนหน้านี พบว่า รูปแบบการแสดงออกของยีน CHS ในดอกบัวหลวงบุญทริกดอกสีขาคล้ายกับในดอกลิลลี่ด
อกสีเหลืองอ่อนการศึกษาของ Nakatsuka *et al.* (2003) พบว่า ในดอกลิลลี่เอเซีย (*Lilium hybrida*) cv.
Connecticut King ดอกสีเหลืองอ่อน พบว่า มีปริมาณการแสดงออกของยีน CHS น้อย ทุกระยะการพัฒนาของ
ดอก แต่ในดอกลิลลี่สีชมพู cv. Montreux มีปริมาณการแสดงออกของยีน CHS น้อยในระยะดอกตูม และมี
ปริมาณการแสดงออกมากขึ้นเมื่อดอกบาน รูปแบบการแสดงออกของยีน CHS ในดอกบัวหลวงสัตตบงกชสี
ชมพู คล้ายกับที่รูปแบบในดอกพิทูเนีย ในการศึกษาของ To and Wang (2006) พบว่าในดอกพิทูเนียสีม่วงเข้ม
(*Petunia hybrida* cv. Ultra Blue) มีปริมาณการแสดงออกของยีน CHS มากในกลีบดอกระยะดอกตูม และ
ลดลงเมื่อดอกบาน และในการศึกษาของ Koseki *et al.* (2005) พบว่าในดอกพิทูเนียแบบ star type สีขาว-แดง
(*Petunia hybrida* cv. Red Star) กลีบดอกส่วนที่เป็นสีแดง มีปริมาณการแสดงออกของยีน CHS มากในกลีบ
ดอกระยะดอกตูม และลดลงเมื่อดอกบาน รูปแบบการแสดงออกของยีน CHS คล้ายกับการแสดงออกในกลีบ
ดอกบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพู แต่ในกลีบดอกสีขา กลับมีปริมาณการแสดงออกของยีน CHS น้อยในทุกระยะ
การพัฒนาของดอก การแสดงออกของยีนคล้ายกับในกลีบดอกบัวหลวงบุญทริกสีขา ตัวอย่างรูปแบบการ
แสดงออกของยีน CHS ของพืชอื่นที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ เช่น ในการศึกษาของ Nakatsuka *et al.* (2005a)
พบว่าในดอก gentian (*Gentiana triflora*) cv. Maciry ดอกสีน้ำเงินเข้ม มีปริมาณการแสดงออกของยีน CHS
มาก และปริมาณคงที่ในทุกระยะการพัฒนาของดอก ส่วน cv. Homoi ดอกสีขา และ cv. Polano White ดอกสี
ขาเหลืองชมพู มีปริมาณการแสดงออกของยีน CHS มากในกลีบดอกระยะดอกตูม และลดลงเมื่อดอกบาน ใน
การศึกษาของ Han *et al.* (2005) พบว่าในดอกกล้วยไม้ *Phalaenopsis hybrida* cv. Formosa rose ดอกสีชมพู
มีปริมาณการแสดงออกของยีน CHS มากในกลีบดอกระยะดอกตูม และลดลงเมื่อดอกบาน ในการศึกษาของ
จิภรณ์ และคณะ (2555) พบว่าในกล้วยไม้หวาย *Dendrobium* spp. cv. Kaosanan ดอกสีขา มีปริมาณการ
แสดงออกของยีน CHS มากในกลีบดอกระยะดอกตูม และลดลงเมื่อดอกบาน แต่ในกล้วยไม้หวาย
Dendrobium spp. cv. Red bull ดอกสีแดง มีปริมาณการแสดงออกของยีน CHS น้อยมากในระยะดอกตูม
และมีปริมาณการแสดงออกเพิ่มขึ้น เมื่อดอกเริ่มบาน ในการศึกษาของ Mato *et al.* (2000) พบว่าในดอกคาร์
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนชั่น Sim carnations (*Dianthus caryophyllus*) ดอกสีขาวและสีขาวงาช้าง มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มากในกลีบดอกระยะดอกตูม และลดลงเมื่อดอกบาน แต่ในดอกสีแดงเข้ม มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* มาก และปริมาณคงที่ในทุกระยะการพัฒนาดอก

การที่ดอกบัวหลวงมีดอกสีขาวและสีชมพูเกี่ยวข้องกับกลไกการแสดงออกของยีนหลายยีนในกระบวนการ flavonoids biosynthesis (Koseki *et al.* 2005, Ohno *et al.* 2011) ในดอกไม้หลายชนิดที่มีสีมีการสะสมสาร flavonoids มากกว่าในดอกที่มีสีขาว และพบว่ามีการแสดงออกของยีน *CHS* และยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ flavonoids biosynthesis ในดอกไม้สีขาว มีการแสดงออกของยีน *CHS* น้อยมากหรือไม่มีเลย จึงทำให้ดอกไม้ไม่มีสีหรือมีสีขาว (Koseki *et al.*, 2005, Ohno *et al.*, 2011) การเพิ่มหรือลดปริมาณ mRNA ของยีน *CHS* อาจมีผลทำให้ดอกไม้สีที่เปลี่ยนไปจากเดิมได้ (Forkmann and Martens, 2001, Nakasuka *et al.*, 2008) หรือทำให้สีของผลไม้เปลี่ยนแปลงไปได้ (Hoffmann *et al.* 2006) การแสดงออกของยีน *CHS* ในกลีบดอกบัวหลวงสีขาวที่มีปริมาณการแสดงออกของยีนน้อยกว่าในดอกบัวหลวงสีชมพู อาจเกิดจากเกิดการแสดงออกของยีน *CHS* ที่น้อย อาจเนื่องมาจากยีนมีการทำงานที่ผิดปกติจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ หรือกระบวนการยับยั้งการทำงานของยีนในธรรมชาติ (Tuteja *et al.* 2009) จึงไม่สามารถสร้าง mRNA มากพอที่จะไปสร้างเอนไซม์ *CHS* เพื่อสังเคราะห์สาร flavonoid ทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์ flavonoid หรือเกิดการสังเคราะห์ flavonoid น้อยมาก ทำให้ดอกไม้บุบงาหรือไม่มีสี

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 ฟ้าสุคนธ์กลีบดอกสีฟ้า ปิยะลาภกลีบดอกสีชมพู แสดงผลกลีบดอกสีชมพูอมส้ม เซนหลุยส์โกลด์กลีบดอกสีเหลือง 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 ดอกหรือดกกลีบดอกสีม่วง (Nakatsuka *et al.* 2005b) ดอกพริกกลีบดอกสีม่วง (Deng *et al.* 2012) ดอกยาสูบกลีบดอกสีชมพู (Nakatsuka *et al.* 2007) ดอกพิทูเนียกลีบดอกสีชมพู (Lukačič *et al.* 2000) ดอกแวมยูรากกลีบดอกสีม่วงเข้ม (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* แสดงออกมากที่สุดใ้ในเนื้อเยื่อกลีบดอก รองลงมาคือเนื้อเยื่อเกสร และแสดงออกน้อยมากในเนื้อเยื่อใบ (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) ในสตรอบิลรี่ (*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*)

ผลการศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อเกสร และกลีบดอกของปทุมชาติสัตตบงกชทั้ง 3 ระยะการพัฒนาดอกด้วยปฏิกิริยา semi-quantitative PCR โดยการเปรียบเทียบจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอบนเจล พบว่าเนื้อเยื่อกลีบดอกระยะที่ 1 ของปทุมชาติสัตตบงกชมีปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* มากที่สุด และปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* จะลดลงในกลีบดอกระยะที่ 2 และระยะที่ 3 ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* ในกลีบดอกปทุมชาติสัตตบงกชในแต่ละระยะการพัฒนาดอกสอดคล้องกับสีกลีบดอก โดยกลีบดอกระยะที่ 1 มีสีชมพูเข้มมากที่สุด รองลงมาคือ ระยะที่ 2 และระยะที่ 3 ตามลำดับ ในเนื้อเยื่อเกสรพบการแสดงออกของยีน *F3H* ในระยะที่ 3 มากที่สุด เนื่องจากเกสรในระยะที่ 3 มีการพัฒนาจากเกสรเป็นกลีบดอกและมีส่วนของสีชมพูจึงพบการแสดงออกของยีน *F3H* การแสดงออกของยีน *F3H* ในปทุมชาติบุณทริกพบว่า เนื้อเยื่อกลีบดอกระยะที่ 2 มีการแสดงออกของยีน *F3H* มากที่สุด รองลงมาคือ กลีบดอกระยะที่ 1 และไม่พบการแสดงออกในกลีบดอกระยะที่ 3 ซึ่งการแสดงออกของยีน *F3H* ในกลีบดอกสอดคล้องกับสีของกลีบดอกปทุมชาติ บุณทริกที่มีสีชมพูอ่อนเจืออยู่บริเวณปลายกลีบในระยะที่ 1 และชัดเจนในระยะที่ 2 จากนั้น สีชมพูจะหายไปในระยะที่ 3 (ภาพที่ 4.22) Nakatsuka *et al.* (2005a) ศึกษาการแสดงออกของยีนในวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานินในดอกหรีดในระยะการพัฒนาดอก 4 ระยะ คือ ระยะดอกตูมกลีบดอกไม่มีสี 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

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

5.2.3 การแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกลินมังกรสีต่างๆ

การศึกษาการแสดงออกของยีน 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 ทั้งนี้เนื่องมาจากในแต่ละสีดอกมีเอ็นที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันเช่นในดอกสีแดงหรือสีส้มเอ็นที่มีบทบาทสำคัญคือ *DFR* ซึ่ง Nakatsuka *et al.* (2007) ได้ศึกษาการผลิตดอกยาสูบสีแดงโดยยับยั้งการแสดงออกของยีน *FLS* และ *F3'H* ของดอกยาสูบสีชมพู ด้วยเทคนิค RNAi ร่วมกับการถ่ายยีน *DFR* ที่ได้จากเยอร์บีร่าเพื่อให้มีการสะสมสาร pelargonidin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแอนโทไซยานินและสามารถผลิตดอกยาสูบสีส้มได้ แสดงให้เห็นว่ายีน *DFR* มีบทบาทสำคัญในการผลิตดอกไม้ในกลุ่มดอกสีส้ม เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Tsuda *et al.* (2004) ที่ศึกษาการผลิตดอกพิทูเนียสีส้มโดยยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3'H* ด้วยเทคนิค RNAi ในดอกสีแดงที่มีการสะสมสาร cyanidin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน และเมื่อถ่ายยีน *DFR* ที่ได้จากกุหลาบเพิ่มเข้าไปพบว่าได้ดอกยาสูบสีส้ม แสดงให้เห็นว่ายีน *F3'H* มีบทบาทสำคัญในการผลิตดอกไม้ในกลุ่มดอกสีแดงรวมถึงในกลุ่มดอกสีชมพูด้วย รายงานของ Ueyama *et al.* (2002) พบว่าเมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3'5'H* ในดอกแวมมูราพันธุ์ summerwave blue ที่เป็นดอกสีม่วง ทำให้ได้ดอกแวมมูราสีชมพูอ่อนและเมื่อนำต้นแวมมูราดอกสีชมพูอ่อนมาถ่ายยีน *F3'H* ซึ่งได้ดอกแวมมูราสีชมพูเข้ม 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) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีของดอกแวมมูราจากดอกสีม่วงที่มีการสะสมสารในกลุ่มแอนโทไซยานินและให้โทนสีม่วง ภายหลังการยับยั้งยีน *DFR* ควบคู่กับการถ่ายยีน 4'CGT และ AS พบว่าดอกแวมมูรามีการเปลี่ยนแปลงจากดอกสีม่วงเป็นดอกสีเหลืองสดทั้งดอก 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 และแสดงชั่ยพล 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 และชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 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 โดยมีอะโกราแบคทีเรียเป็นพาหะในกลีบดอกของอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสดงชั่ยพล ที่เลี้ยงในโรงเรือนเป็นเวลา 3 วัน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสีกลีบดอกในทั้งกลีบดอกที่มีการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJAWOHL8 หรือเวคเตอร์ pJA8*F3H* ด้วยวิธีการ infiltration เมื่อเปรียบเทียบกับสีของกลีบดอกที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ (ภาพที่ 4.28) ทั้งนี้เนื่องจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ที่เกิดขึ้นไม่เพียงพอที่จะทำให้สีของกลีบดอกอุบลชาติทั้ง 2 พันธุ์เปลี่ยนแปลงสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nagamatsu *et al.* (2009) ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ในต้นถั่วเหลืองด้วยเทคนิค RNAi โดยการถ่ายยีนด้วยวิธีการ virus-induced gene silencing (VIGS) พบว่าต้นถั่วเหลืองที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ CMV-A1:*F3H* (RNAi) และเลี้ยงในเรือนเพาะชำไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายนอกของต้นถั่วเหลือง แต่การแสดงออกของยีน *F3H* ในใบถั่วเหลืองลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์เปล่า (control) ที่เลี้ยงในเรือนเพาะชำ และพบการเปลี่ยนแปลงของสีขนอ่อนบนฝักถั่วเหลืองเป็นบริเวณแคบๆ จากสีส้มอมน้ำตาลกลายเป็นสีส้มอมเทาในต้นถั่วเหลืองที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ CMV-A1:*F3H* (RNAi) ที่เลี้ยงในตู้ควบคุมการเจริญเติบโตภายหลังจากได้รับการถ่ายยีน และการแสดงออกของยีน *F3H* ในใบถั่วเหลืองลดลงถึง 97.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์เปล่า (control) ที่เลี้ยงในเรือนเพาะชำ

จากการศึกษาหน้าที่ของยีน *F3H* ในกลีบดอกอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสดงชั่ยพล ภายหลังจากการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNAi พบว่ากลีบดอกอุบลชาติที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJAWOHL8 (control) ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีเชื้ออะโกราแบคทีเรียเป็นพาหะ ทั้งในอุบลชาติลูกผสม PW5409 hybrid และแสดงชั่ยพล มีปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* มากที่สุด รองลงมาคือกลีบดอกอุบลชาติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และกลีบดอกที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJA8*F3H* (RNAi) มีการเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

แสดงออกน้อยมากอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบกับกลีบดอกที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 (control) ทั้งนี้ปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* ที่เพิ่มขึ้นในกลีบดอกอุบลชาติที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 เมื่อเปรียบเทียบกับกลีบดอกที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน คาดว่าเกิดจากการตอบสนองของอุบลชาติต่อความเครียดทางออสโมติก (osmotic stress) จากการที่ได้รับการฉีดอัดสารแขวนลอยเซลล์เข้าสู่ด้านล่างกลีบดอกทำให้แรงดันออสโมติกภายในเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง จากรายงานพบว่าความเครียดทางออสโมติกมีผลให้ แอนโทไซยานินมีการสะสมที่เพิ่มขึ้นในพืชหลายชนิด เช่น เซลล์อ่อน (Comier *et al.* 1990) ต้นหม่อน (Ramanjulu *et al.* 1993) รากข้าวโพด (Kaliemoorthy and Rao. 1994) ใบ *Arabidopsis* (Mita *et al.* 1997) และพบว่าต้นบ๊อบปลาร์ [(*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) พบบริเวณจุดสีน้ำเงินในเนื้อเยื่อกลีบดอกยาสูบ และพบการเรืองแสงของโปรตีน GFP ในเนื้อเยื่อเซลล์กลีบดอกพิทูเนียเมื่อนำไปตรวจสอบภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ Zottini *et al.* (2008) ได้ทำการถ่ายยีน *GFP* ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีเชื้ออะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ GV3101 เป็นพาหะในใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภายหลังจากถ่ายยีนเป็นเวลา 6 วัน พบการแสดงออกของโปรตีน GFP ในเนื้อเยื่อใบอ่อนภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ และกระจายไปทั่วบริเวณใบภายในเวลา 12 วันภายหลังจากถ่ายยีน

ในกลีบดอกอุบลชาติแสดงผลลัพธ์ที่ 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 อะโกรแบคทีเรียผสมเป็นพาหะในกลีบดอกอุบลชาติทั้ง 2 ชนิด ซึ่งการทดลองยับยั้งการแสดงออกของยีนนี้ประสบผลสำเร็จในพืชหลายชนิด เช่น Shang *et al.* (2007) ได้ทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CHS* และยีน *Rosea1* ซึ่งเป็นยีนทำหน้าที่ transcription factor ด้วยเทคนิค RNAi ในตาดอก ลินมังกรโดยวิธีการยิงอนุภาค (particle bombardment) จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร Murashige and Skoog (MS) ในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าตาดอกที่เจริญบนอาหาร MS ภายหลังจากถ่ายยีนเป็นเวลา 8 วัน เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีกลีบดอกลินมังกรจาก สีแดงเป็นสีขาว

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

ยับยั้งการแสดงออกของยีน 4'CGT ด้วยเทคนิค RNAi ภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT เข้าสู่กลีบดอกลิ้นมังกร พบว่ากลีบดอกลิ้นมังกรที่ได้รับการถ่ายโอน พลาสมิด pJA8-4'CGT ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีดอก อาจเนื่องจากยีนที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงสีดอกเป็นยีนที่ทำงานร่วมกันกับยีนอื่น (multiple genes) ในกระบวนการสังเคราะห์สารสี (Ono *et al.* 2006) ดังนั้นการยับยั้งการแสดงออกของยีน 4'CGT เพียงยีนเดียวอาจยังไม่เพียงพอต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกลิ้นมังกรที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4'CGT พบว่าดอกลิ้นมังกรที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด 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 ศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้นและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุญทริก

ผลการศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุญทริก 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 และการเกิดยอดของเอมบริโอจินิกแคลลัส 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 ภัควดี (2548) ซึ่งพบว่าชิ้นส่วนก้านใบจากคัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มี NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดไซมาติกเอมบริโอได้ดีที่สุด แต่

ใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของกุหลาบพันธุ์ลูกผสมระหว่าง Carl Red และ *Rosa canina* ในอาหารสูตร MS (1962) ที่มี NAA 1.3-26.8 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.23 ไมโครโมลาร์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจินิกแคลลัสได้ดีที่สุด (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 (คำบุญ, 2542) และยังใกล้เคียงกับการศึกษาของ Yang *et al.* (2009) ที่ศึกษาผลของ mannitol, abscisic acid (ABA) และอายุของชิ้นส่วนเริ่มต้น (ขนาด) โดยให้ชิ้นส่วนเอ็มบริโอขนาด น้อยกว่า 3 มิลลิเมตร, 4-5 มิลลิเมตร, 6-8 มิลลิเมตร และมากกว่า 8 มิลลิเมตร ที่มีผลต่อการเกิดไซมาติกเอ็มบริโอจีนีซิสและการเกิดยอดของ Chinese soybean (*Glycine max* L. Merr.) พบว่าชิ้นส่วนเอ็มบริโอที่มีขนาดน้อยกว่า 3 มิลลิเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและไซมาติกเอ็มบริโอต่ำกว่าชิ้นส่วนที่มีขนาด 4-5 มิลลิเมตร ที่สามารถชักนำให้เกิดไซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุด 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 การศึกษาการชักนำการเกิดไซมาติกเอ็มบริโอจีนีซิสของ *Alstroemeria* พบว่าแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม IAA 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 10 ไมโครโมลาร์ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม picloram 20.8 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเกิด ไซมาติกเอ็มบริโอได้ (Kim *et al.* 2006)

5.4.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดจากแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์ภูษทริก

ผลของการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดของชิ้นส่วนแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์ภูษทริก 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 ระยะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืช และระดับหรือสัดส่วนของฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดที่ใช้ในสูตรอาหาร คือถ้าสัดส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินสูงขึ้น (ไซโตไคนินมากกว่าออกซิน) จะกระตุ้นการเกิดยอด ยกเว้นในพืชบางชนิดที่ต้องการไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว แต่ถ้าสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูงขึ้น (ออกซินมากกว่าไซโตไคนิน) จะกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงพัฒนา เพื่อกำเนิตราก (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 และขึ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่ให้จำนวนจุดสีน้ำตาลสูงที่สุดคือ การยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร ซึ่งให้จำนวนจุดเฉลี่ย 26.11 จุดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ จากนั้นนำขึ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่เจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือกมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่า พบยีน *GUS* ในทุกวิธีการ เช่นเดียวกัน

เมื่อนำขึ้นส่วนยอดและตายอดจากคัพภะที่ได้รับการถ่ายยีนมาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าขึ้นส่วนยอดที่มีสภาพการถ่ายยีนโดยใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และที่ระยะห่างจากเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร มีการเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ดีที่สุด ส่วนขึ้นส่วนตายอดจากคัพภะหลังจากถ่ายยีนนำมาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ และ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าขึ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่มีสภาพการถ่ายยีนโดยใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมขนาด 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) ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดของบัวหลวงพันธุ์ภูมทริก พบว่าขึ้นส่วนยอดที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และที่ระยะห่างจากเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร ขึ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุดเช่นเดียวกัน แต่เนื้อเยื่อส่วนใหญ่ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและตายหลังจากที่เพาะเลี้ยงได้ 8 สัปดาห์ จากการทดลองนี้การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค พบว่าสามารถทำให้ประสิทธิภาพการพัฒนาเป็นยอดของขึ้นส่วนยอดและตายอดจากคัพภะภายหลังการถ่ายยีนเพียง 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 ภายหลังการคัดเลือกเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

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* และเทอร์มิเนเตอร์ *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 ทำให้เซลล์ที่อยู่ด้านบนของแคลลัส และส่วนของเนื้อเยื่อที่อยู่ด้านบนของแคลลัสไม่ได้สัมผัสกับสารคัดเลือกในความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงมีการเจริญเติบโต และแบ่งเซลล์ได้ตามปกติ (Caltin, 1990)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NPTII* และ ยีน *anti-DFR* ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *NPTII* และยีน *anti-DFR* ด้วยวิธี RT-PCR จากต้นบัวหลวงที่เกิดยอด ภายหลังจากคัดเลือกเป็นเวลา 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) จึงเป็นสภาพที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคเข้าสู่ชิ้นส่วนยอดของบัวหลวงพันธุ์บุญชริก พบการแสดงออกของยีน *NPTII* เพียงอย่างเดียว จำนวน 1 ตัวอย่าง และ ไม่พบการแสดงออกของของทั้ง 2 ยีน จำนวน 1

ตัวอย่าง ซึ่งยีน anti-DFR ที่นำมาใช้ในการถ่ายยีนครั้งนี้ได้มาจากดอกปทุมมา เนื่องจากยังไม่มีลำดับเบสของยีน DFR ในบัวหลวงพันธุ์บุญทริกจึงทำให้ไม่สามารถตรวจสอบการยับยั้งการแสดงออกของยีน anti-DFR ได้ ในการทำ RT-PCR จึงให้ผลผลิตพีซีอาร์จากยีน anti-DFR ของดอกปทุมมาที่ถ่ายเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุญทริก ไม่ใช่ยีน DFR ที่มีอยู่ในบัวหลวงพันธุ์บุญทริก จึงสรุปผลได้เพียงว่ามีการแสดงออกของยีน anti-DFR คือการถ่ายยีนประสบความสำเร็จ หากต้องการตรวจสอบการยับยั้งการแสดงออกของยีน anti-DFR ของบัวหลวงพันธุ์บุญทริก ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการออกแบบคู่ไพรเมอร์ของยีน DFR จากบัวหลวงพันธุ์บุญทริก และเทคนิคที่นำมาใช้ในการตรวจสอบเพื่อที่จะทราบปริมาณของยีน DFR ของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนต่อไป ซึ่งถ้าพบว่ายีน DFR ของบัวหลวงพันธุ์บุญทริกที่ได้รับการถ่ายยีน anti-DFR มีปริมาณลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน แสดงว่ายีน DFR มีการแสดงออกลดลง

5.4.4 ถ่ายยีน CHS แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ต้นบัวหลวงบุญทริก และบัวหลวงราชินี ด้วยวิธียิงอนุภาค

การศึกษากการแสดงออกของยีน CHS ในต้นบัวหลวงบุญทริกและบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน CHS แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ของต้นบัวหลวงบุญทริกและบัวหลวงราชินีด้วยวิธียิงอนุภาค โดยใช้พลาสมิดลูกผสม pCAMBIA1302CHSA ที่มีบางส่วนของยีน CHS แบบ antisense ขนาด 331 คู่เบสที่โคลนได้จาก cDNA ของกลีบดอกบัวหลวงบุญทริก และถูกควบคุมด้วย CaMV 35s promoter และ NOS terminator โดยมียีน GFP เป็นยีนรายงานผล และยีน hptII เป็นยีนคัดเลือก หลังจากการคัดเลือกและเพาะเลี้ยงบนอาหาร regeneration พบว่า มีชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุญทริกที่ได้รับการถ่ายยีน 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 โดยพบว่าต้นบัวหลวงบุญทริกทั้ง 2 ต้น พบการมีอยู่ของยีน GFP และ hygromycin ใน genomic DNA แต่เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน CHS ในต้นบัวหลวงบุญทริกที่ได้รับการถ่ายยีน พบว่า

ปริมาณการแสดงออกของยีน ไม่แตกต่างจากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ในต้นบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีน พบว่า ต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R2/1 พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* ที่บริเวณบางส่วนของราก และบริเวณกาบใบพบการมีอยู่ของยีน *GFP* และ hygromycin ใน genomic DNA แต่ปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ไม่ได้แตกต่างจากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เช่นเดียวกัน แต่ในต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2 และต้นหมายเลข R5/1 มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ลดลง ในต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R1/2 และต้นบัวหลวงราชินีหมายเลข R5/1พบการมีอยู่ของยีน *GFP* และยีน *hptII* ใน genomic DNA แต่ไม่พบการเรืองแสงของยีน *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* ทำให้ดอกเปลี่ยนเป็นสีขาวและบางดอกริ้วนน้ำเงินอ่อนสลับสีขาว ส่วนการยับยั้งการทำงานของยีน *anthocyanin synthase (ANS)* ทำให้ดอกลีน้ำเงินซีด ในการศึกษาของ Hoffmann *et al.* (2006) ทำการยับยั้งการทำงานของยีน *CHS* ด้วยเทคนิค *Agrobacterium*-infiltration โดยถ่ายยีน *CHS* แบบ RNAi เข้าไปในผลสตรอเบอร์รี่ พบว่า สามารถยับยั้งการทำงานของยีน *CHS* ได้ มีปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ลดลง ทำให้ผลของสตรอเบอร์รี่บริเวณที่ได้รับการถ่ายยีนมีสีเหลืองซีด 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* ในดอกกรักร์สีแดง พบว่า ดอกกรักร์เริ่มมีการแสดงออกของยีน *CHS* ลดลง ทำให้ดอกกลายเป็นสีขาวซีด มีปริมาณการแสดงออกของยีนเหมือนกับดอกกรักร์สีขาว แสดงให้เห็นว่า การที่ดอกไม่มีสีขาวอาจเกิดจากการทำงานที่ผิดปกติของยีน *CHS* ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์สาร chalcone เพื่อใช้ในการสังเคราะห์รงควัตถุอื่นๆ ในกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoid การถ่ายยีน *CHS* แบบ antisense เข้าสู่ shoot cluster ของต้นบัวหลวงราชินี สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *CHS* ในต้นบัวหลวงราชินี ได้ต้นบัวหลวงราชินี 2 ต้น ที่มีปริมาณการแสดงออกของยีนลดลง จึงอาจส่งผลให้ดอกบัวหลวงราชินีที่ได้รับการถ่ายยีนมีสีชมพูลดลง ในทางตรงข้ามการกระตุ้นการทำงานของยีน (*over expression*) ของยีน *CHS* อาจทำให้ดอกบัวหลวงสีขาว มีสีเกิดขึ้นได้ ในการศึกษาของ Han *et al.* (2005) พบว่าการถ่ายยีน *CHS* แบบเต็มเส้น เข้าสู่ต้นยาสูบสามารถกระตุ้นการทำงานของยีน *CHS* ส่งผลให้ดอกยาสูบมีสีเข้มขึ้น

จากสีปกติสีชมพู เป็นสีชมพูเข้ม 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 ต้องทำการศึกษาการบทบาทการทำงานของยีนอื่นเพิ่มเติมต่อไป 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) พบว่าอีกเมดิน ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียได้ 100 เปอร์เซ็นต์ก็ตาม ในการทดลองนี้สารปฏิชีวนะซีโฟแทคซิมที่ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียของต้นบัวหลวงถ่ายยีนได้ ซึ่งแตกต่างจากรายงานของวิลาสินี (2554) ที่ใช้สารปฏิชีวนะซีโฟแทคซิมความเข้มข้น 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

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

การถ่ายโอนยีน *4'CGT* เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์นุชกรด้วยวิธีการยิงอนุภาค สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *4'CGT* ในต้นบัวหลวงที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *pCAM4'CGT* และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* และ *CHS* พบว่ามีการแสดงออกไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดและต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *pCAM4'CGT* ในขณะที่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *4'CGT* *GUS* และ *NPTII* ได้เฉพาะในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *pCAM4'CGT* เท่านั้น เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ด้วยวิธี *GUS histochemical assay* พบการติดสีฟ้าจางที่ชิ้นส่วนใบและก้านของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *pCAM4'CGT* เพียงบางบริเวณของเนื้อเยื่อซึ่งอาจเกิดจากกิจกรรมการทำงานของยีน *GUS* ต่ำเนื่องจากเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *pCAM4'CGT* มีจำนวนยีน *GUS* น้อย ทำให้มีการผลิตเอนไซม์ β -glucuronidase ออกมาอย่างช้าๆแสดง x-gluc ได้น้อย (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* ได้เข้าไปเชื่อมต่อกันในโครโมโซมของต้นบัวหลวง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

6.1 การโคลนยีนและการแสดงออกของยีน

6.1.1 ยีน *CHS*

โคลนยีน *CHS* แบบเต็มเส้น ด้วยเทคนิค PCR จาก genomic DNA ของกลีบดอกบัวหลวงพันธุ์กรวดและบัวหลวงสัตตบงกชมีขนาดเท่ากัน 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* ในกลีบดอกบัวหลวงสัตตบงกชสีชมพูมีปริมาณการแสดงออกมากกว่าดอกบัวหลวงพันธุ์สีขาว ดอกบัวหลวงสัตตบงกชมีปริมาณการแสดงออกของยีนมากที่สุดในระยะดอกตูมขนาดเล็กและมีปริมาณลดลงเมื่อดอกพัฒนามากขึ้น แต่ดอกบัวหลวงพันธุ์กรวดมีปริมาณการแสดงออกของยีนน้อยและมีปริมาณใกล้เคียงกันในทุกระยะการพัฒนารูปของดอก

6.1.2 ยีน *F3H*

การสังเคราะห์ยีน *F3H* โดยใช้ cDNA จากเนื้อเยื่อกลีบดอกอุบลชาติพันธุ์หุ่ยสีโกลด์ ปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติพันธุ์กรวด เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยา PCR ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,134 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นโปรตีนได้ขนาด 377 กรดอะมิโน พบการแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อกลีบดอกของอุบลชาติอุบลทองขาวซึ่งมีกลีบดอกสีม่วงเข้ม ฟ้ามุขพันธุ์กลีบดอกสีฟ้า ปิยะลาภกลีบดอกสีชมพู แสดงยีนพลกลีบดอกสีชมพูอมส้ม เช่นหุ่ยสีโกลด์กลีบดอกสีเหลือง และลูกผสม PW5409 hybrid กลีบดอกสีม่วงอมเหลือง เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของอุบลชาติพันธุ์หุ่ยสีโกลด์ พบยีน *F3H* แสดงออกที่กลีบดอกมากที่สุด รองลงมาคือเกสร และแสดงออกน้อยมากในใบ การแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อกลีบดอกปทุมชาติสัตตบงกช และปทุมชาติพันธุ์กรวดใน 3 ระยะการพัฒนารูปของดอก พบว่ายีน *F3H* แสดงออกมากที่สุดในเนื้อเยื่อกลีบดอกอุบลชาติสัตตบงกชระยะที่ 1 รองลงมาคือ ระยะที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ในเนื้อเยื่อเกสรพบการแสดงออกของยีน *F3H* ในระยะที่ 3 แต่ไม่พบการแสดงออกในระยะที่ 1 และระยะที่ 2 ในปทุมชาติพันธุ์กรวดพบปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* มากที่สุดในเนื้อเยื่อกลีบดอกระยะที่ 2 รองลงมาคือระยะที่ 1 แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อกลีบดอกระยะที่ 3 และไม่พบการแสดงออกของยีน *F3H* ในเนื้อเยื่อเกสรของปทุมชาติพันธุ์กรวด ผลเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ศึกษาหน้าที่ของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi โดยการถ่ายยีนในกลีบดอกอุบลชาติ ลูกผสม PW5409 hybrid และอุบลชาติแสดงชัยพล 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 ในดอกลินมังกรสีส้ม ชมพู แดง ขาว ม่วง และ เหลือง พบว่าในดอกสีเหลืองมีปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT มากที่สุดรองลงมาคือ ส้ม แดง ขาว ชมพู และพบการแสดงออกของยีน 4'CGT น้อยที่สุดในดอกสีม่วง

ผลการศึกษาหน้าที่ของยีน 4'CGT แบบชั่วคราวด้วยเทคนิค RNAi โดยการถ่ายยีนในกลีบดอกลินมังกร พันธุ์ Pixie Bells ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 เป็นพาหะ ภายหลังจากถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วัน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสีในกลีบดอกลินมังกรทั้ง 7 ดอกที่ทำการศึกษา แต่ในกลีบดอกลินมังกรที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJAWOHL8 (control) มีปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT มากที่สุด และพบการแสดงออกของยีน 4'CGT ลดลงอย่างมากในกลีบดอกลินมังกรที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ 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 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

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

6.2.1 การถ่ายยีน DFR เข้าสู่บัวหลวงบุณฑริก

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

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของบัวหลวง พันธุ์บุณฑริก เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนเอมบริโอจินิกแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีผลต่อการเกิดยอดของชิ้นส่วนมากที่สุด โดยจำนวนยอดมากที่สุด เฉลี่ย 8.67 ยอด เอมบริโอจินิกแคลลัสมีขนาดเพิ่มขึ้นมากที่สุดเฉลี่ย 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 บุณฑริก 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 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

transformation) จึงเป็นสภาพที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคเข้าสู่ชิ้นส่วนยอดของบัวหลวงพันธุ์บุญทริก ส่วนชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะที่ให้จำนวนจุดสีน้ำเงินจากการแสดงออกของยีน *GUS* แบบชั่วคราว (transient expression) สูงที่สุดคือ การยิงด้วยก๊าซฮีเลียมขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 เซนติเมตร ซึ่งให้จำนวนจุดเฉลี่ย 26.11 จุดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ 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 และใช้อนุภาคทองคำเป็นพาหะในการถ่ายยีน การตรวจสอบประสิทธิภาพของการถ่ายยีนจากการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *GFP* ขึ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster ของบัวหลวงบุญทริก พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* จำนวน 72 ชิ้น จากทั้งหมด 100 ชิ้น มีคะแนนประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเฉลี่ย 0.97 ± 0.20 คะแนน และชิ้นเนื้อเยื่อ shoot cluster บัวหลวงราชินี พบการเรืองแสงสีเขียวของยีน *GFP* จำนวน 75 ชิ้น จากทั้งหมด 100 ชิ้น มีคะแนนประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเฉลี่ย 0.99 ± 0.17 คะแนน หลังจากการคัดเลือกมีชิ้นเนื้อเยื่อ 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* เป็นจุดเรืองแสงสีเขียวบริเวณใบ และราก 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. “การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้นและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุญทริก.” ปัญหาพิเศษปริญญาโท 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 เกรินทวงศ์, กัญญา แซ่เตียว และสุเม อรัญนารถ. 2552. “การโคลนยีน Flavanone 3-hydroxylase จากลิ้นมังกร และยีน Chalcone synthase จากอุบลชาติลิล้มลุกพันธุ์เซนต์หลุยส์.” วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 40(3) (พิเศษ): 299-302.
- เบญจวรรณ สุวรรณเนตย์, ราตรี คูหาพิทักษ์ธรรม, รุ่งนภา ดีโท, มณฑนา บุญธรรม และอรวรรณ ชัชวาล การพานิชย์. 2552. "การใช้ยีน GFP และ GUS เป็นยีนรายงานผลในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์." วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 40(2): 185 – 196.
- ปริมลภ ชูเกียรติมัน และเสริมลภ วสุวัต. 2547. บั้วประดับในประเทศไทย 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. เนชั่นบุ๊คส์ : กรุงเทพฯ.
- ภัคดี ภัคดีงาม. 2548. “การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและแสงต่อการเกิดไซมาติกเอมบริโอจีสซิสของบัวหลวงพันธุ์บุญทริก.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- มณฑิรา ไชยตะยากร. 2554. “การชักนำให้เกิดแคลลัสและไซมาติกเอมบริโอจีสซิสของบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกช” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

รังสฤษดิ์ กาวีตะ. 2540 **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : หลักการและเทคนิค**. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่
คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รวีวธู บัวทอง. 2554. “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยีน antisense *DFR* เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก
โดยวิธีการยิงอนุภาค.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทาง
การเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิภารัตน์ พิทักษ์ดำเนินธรรม, ชีระ สูตะบุตร, พิสิสวรรณ 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
หลวงพันธุ์บุณฑริก โดยใช้ อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระ
จอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2542. **พรรณไม้ในประเทศไทย**. กรุงเทพฯ: อัมรินทร์พรินต์ติ้งแอนด์พับลิชิ่ง.

สุภาภรณ์ เข้มแข็ง, 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. “Copigmentation 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. Mrireles. 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. Wiefield 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 Tricontanol 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.
- Kaliamoorthy, 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.
- Lukačič, 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. Leethaweewsup, N. Parinthawong, and S. Arunyanart. 2014. "Transformation of antisense *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* gene into scard lotus 'Buntharik' using *Agrobacterium*-mediated gene transfer." **ISHS Acta Horticulturae**. 1025: 99 – 106.
- 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.
- Tholakalabavi, 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			(10 เท่า)	
MS1	NH_4NO_3	1,650.00	16.50	100 มิลลิลิตร
MS2	KNO_3	1,900.00	19.00	100 มิลลิลิตร
MS3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	450.00	4.50	100 มิลลิลิตร
MS4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.00	3.70	100 มิลลิลิตร
MS5	KH_2PO_4	170.00	1.70	100 มิลลิลิตร
Microelements			(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 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เทใส่จานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร จานละประมาณ 25 - 30 มิลลิลิตรในตู้ปลอดเชื้อ ทิ้งให้อาหารเย็นและอุ่นแข็งตัว เก็บใส่ในถุงพลาสติกใสที่สะอาด เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

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

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

121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นรอกให้อาหารเย็นลง อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทอาหารลงในจานแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 25 มิลลิลิตรต่อจานแก้ว เมื่ออาหารแข็งตัว เก็บจานแก้วที่มีอาหารไว้ในตู้พลาสติกสะอาด เก็บอาหารไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย Luria-Bertani (LB)

1.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani agar ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

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

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

1.2.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani broth ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Tryptone	10	กรัม
Yeast-extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม

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

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

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

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

1.4 การเตรียมสารละลาย TE (Tris - EDTA) buffer

สารละลาย Tris - HCl pH 8.0 เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ 1000 ไมโครลิตร

สารละลาย EDTA pH 8.0 เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ 100 ไมโครลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 50 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 -SacI	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

1. นางสาววิลาสินี ลิขิตวิทย์	รหัส 49068904 สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร หัวข้อวิทยานิพนธ์ การถ่ายยีน Antisense ของ Dihydroflavonal 4-Reductase (DFR) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุญทริก โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. กัญจนา แซ่เตี่ยว รศ.ดร. สุเม อรัญนารถ	สำเร็จการศึกษา ปี 2554
2. นางสาววิวิธ บัวทอง	รหัส 50065810 สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยีน antisense DFR เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุญทริกโดยวิธียิงอนุภาค อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. กัญจนา แซ่เตี่ยว รศ.ดร. สุเม อรัญนารถ	สำเร็จการศึกษา ปี 2554
3. นายชัยวรกุล ไชยปัญญา	รหัส 52640908 สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร หัวข้อวิทยานิพนธ์ การโคลนยีน <i>flavanone 3-hydroxylase (F3H)</i> และการยับยั้งการแสดงออกของยีน F3H ในบัวหลวงพันธุ์บุญทริก อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. นงลักษณ์ เภรินทวงศ์	สำเร็จการศึกษา ปี 2555
4. นายวรารุณี เขื่อนมงคลการ	รหัส 52640909 สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร หัวข้อวิทยานิพนธ์ การโคลนยีน <i>chalcone 4-O-glucosyltransferase (4'CGT)</i> จาก snapdragon และการเพิ่มการสังเคราะห์เอนไซม์ 4;CGT ในบัวหลวงพันธุ์บุญทริก อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. นงลักษณ์ เภรินทวงศ์	สำเร็จการศึกษา ปี 2556
5. นายปฤษฎาภรณ์ อะโน	รหัส 520640901 สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร หัวข้อวิทยานิพนธ์ การถ่ายยีน <i>CHS (chalcone synthase)</i> เข้าสู่บัว	สำเร็จการศึกษา ปี 2557

	หลวงพันธุ์บุญทริกและปทุม อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. กัญจนา แซ่เดียว	
6. นายชาติรี กอนี่	รหัส 520640901 สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร หัวข้อวิทยานิพนธ์ การยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>flavonone 3-hydroxylase (F3H)</i> ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) ในบัวหลวงพันธุ์บุญทริก อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. กัญจนา แซ่เดียว	สำเร็จการศึกษา ปี 2558



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 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*.

รวีวรรุ บัวทอง สุเม อรัญนารถ และ กัญจนา แซ่เตียว ๒๕๕๒. การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้นและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดเอมบริโอจินิกแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุญทวีกร วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ๔๐(๓)(พิเศษ): ๓๒๗-๓๓๐.

นงลักษณ์ เภรินทวงศ์ กัญจนา แซ่เตียว และ สุเม อรัญนารถ ๒๕๕๒. การโคลนยีน *Flavanone 3-hydroxylase* จากลินินมังกรและยีน *Chalcone Synthase* จากอุบลชาติดีมลูกพันธุ์เซนต์หลุยส์ วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ๔๐(๓)(พิเศษ): ๒๙๙-๓๐๒.

วรวิมล เข้มมงคลการ กัญจนา แซ่เตียว สุเม อรัญนารถ 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 แซ่เตียว สุเม อรัญนารถ และนงลักษณ์ เภรินทวงศ์ ๒๕๕๕. การโคลนและศึกษาการแสดงออกของยีน *Flavanone 3-Hydroxylase (F3H)* ในอุบลชาติดีพันธุ์เซนต์หลุยส์โกลด์ วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร (พิเศษ) ๔๓(๑): ๘๓-๘๖.

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

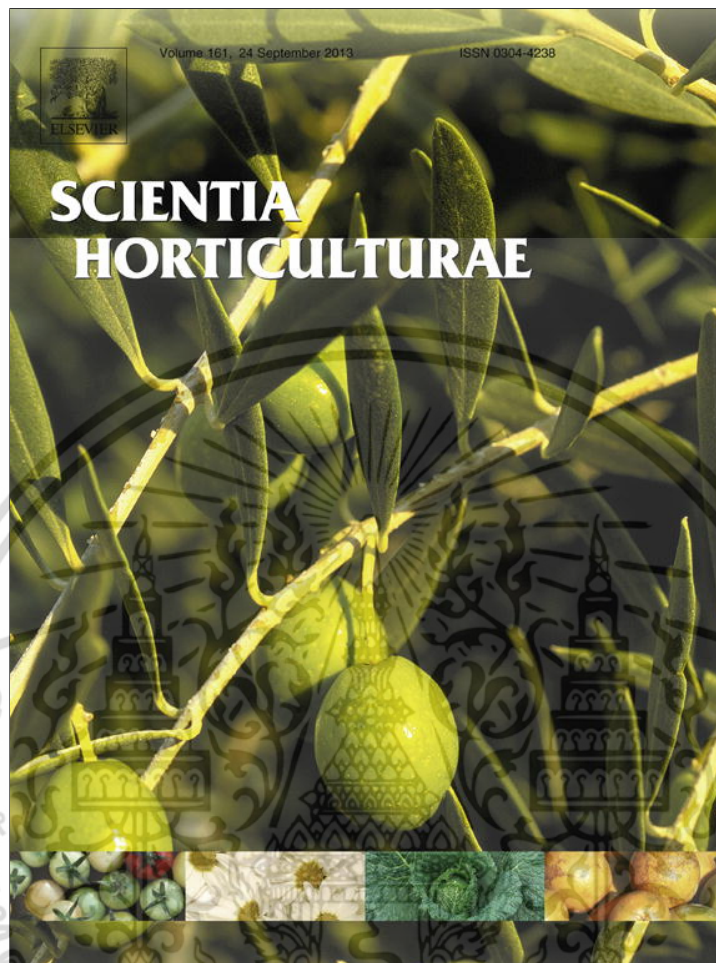
นำเสนอในงานประชุมวิชาการนานาชาติ และรอส่งวารสารระดับนานาชาติ

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
208

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Contents lists available at ScienceDirect

Scientia Horticulturae

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scihorti

Tissue culture and transformation of the antisense *DFR* gene into lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) through particle bombardment



Raveevato Buathong^a, Kanjana Saetiew^a, Salak Phansiri^b, Nonglak Parinthawong^a, Sumay Arunyanart^{a,*}

^a Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Chalongkrung Rd. Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

^b Kasetsart University Research and Development Institute, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 July 2012

Received in revised form 18 April 2013

Accepted 27 June 2013

Keywords:

Nelumbo

Flower colour

MS

Callus

Molecular breeding

ABSTRACT

The effects of explant and plant growth regulators on callus induction and plant regeneration and particle bombardment-induced transformation were examined in lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) cv. Buntharik. The apical buds from embryos (~3 mm) formed an embryogenic callus when cultured on MS medium supplemented with 40 μ M 1-naphthaleneacetic acid (NAA) and 0.5 μ M 1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-urea (TDZ) for 8 weeks. All of the embryogenic calluses were transferred to MS medium supplemented with 0, 40, 50 and 60 μ M 6-benzyladenine (BA) and the highest number of shoots was achieved in the medium supplemented with 50 μ M BA after 8 weeks of culture. The transformation of lotus using a particle bombardment device was examined with the shoot clusters from embryogenic apices. The pCAMBIA2301 anti-*DFR* plasmid contained β -glucuronidase (*GUS*) as a reporter gene, *neomycin phosphotransferase* (*NPTII*) as a selectable marker, and antisense dihydroflavonol 4-reductase (anti-*DFR*) as the gene of interest. The particle bombardment procedure with a helium gas pressure of 1100 psi and a target distance of 6 cm yielded the highest number of blue spots (4.8 spots/shoot cluster). However, stable transformations, as confirmed by polymerase chain reaction and reverse transcription polymerase chain reaction analysis, were only achieved using a helium gas pressure of 1100 psi and a target distance of 9 cm. Our work illustrates that the stable transformation of lotus is possible, and we suggest that this methodology can be used to target and modify specific characteristics of this plant.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) is an aquatic plant of economic and ornamental importance in Thailand. The seeds, young leaves, and rhizomes of this plant are eaten. It is also well known as a medicinal plant due to the use of its petals and stamen. Its flowers is closely associated with Buddhism, in which it is used as a symbol and for decorative purposes (Suvatabandhu, 1958). There are four commercial varieties of lotus available in Thailand, which have exhibited limited development through breeding programmes. The development of callus induction and regeneration protocols will provide a useful tool for the further commercial development of this plant. Although some variants have been produced through mutation induction using X-rays, gamma rays, and chemical mutagens, this approach has been unable to target specific characteristics (Arunyanart and Soontronyatara, 2002). In particular, we are

interested in obtaining a variation in the flower colour, which is limited to white and pink in Thai varieties.

Molecular breeding provides a powerful method for plant breeding because it makes it possible to target a specific plant characteristic without changing the others. Some examples relating to the flower colour are the following: *Agrobacterium*-mediated transformation through the transfer of the chalcone synthase (*CHS*) or the dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) gene in either the sense or the antisense orientation into *Torenia* (*Torenia fournieri* Lind.) (Aida et al., 2000), engineering of the flower colour in *Forsythia* through the expression of two independently transformed *DFR* and anthocyanidin synthase (*ANS*) genes of the flavonoid pathway (Rosati et al., 2003), generation of tobacco plants with various patterns in the flower colour compared with the to wild-type tobacco through the transfer of the single *CHS*, chalcone isomerase (*CHI*), and *DFR* genes into tobacco (To and Wang, 2006), and the transformation of *Melastoma malabathricum* and *Tibouchina semidecandra* with the sense and antisense *DFR* genes (Yong et al., 2009).

Dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) plays an important role in the production of anthocyanins, which contribute to the flower colour. These enzymes have very specific substrate requirements,

* Corresponding author. Tel.: +66 2 3264318; fax: +66 2 3298515.

E-mail addresses: kasumau@yahoo.com, kasumau@kmitl.ac.th (S. Arunyanart).

which result in an accumulation of distinct patterns of anthocyanins, catechins, and proanthocyanidins (Martens et al., 2002). The manipulation of these enzymes opens many possibilities for the metabolic engineering of this pathway (Forkmann and Martens, 2001) that may be of value in the generation of some useful variation in the lotus.

This work investigated the regeneration of lotus shoots from callus from a range of explants and media and optimised the transformation of shoots using particle bombardment and the *DFR* gene as a model. The aims of this study were to investigate the growth and regeneration of lotus from a range of explants and media types and to determine (1) the effect of the explant types and the plant growth regulators on the callus induction, (2) the effect of the plant growth regulators on the shoot formation in the lotus, and (3) the transformation of the antisense *DFR* gene into lotus (*N. nucifera* Gaertn.) cv. Buntharik through particle bombardment.

2. Materials and methods

2.1. Sources of explants and plant regeneration

The seeds of lotus (*N. nucifera* Gaertn.) cv. Buntharik were washed thoroughly under running water for 60 min, rinsed in 70% ethanol for 1 min, surface sterilised in 3% (v/v) NaOCl (50% Clorox plus two drops of Tween 20) for 20 min and rinsed three times in sterile distilled water. Murashige and Skoog (1962) (MS) medium supplemented with 8 g l⁻¹ agar (commercial grade) was used as the basal medium for all of the experiments. Medium were distributed into Petri dish with each Petri dish containing 20 ml of medium. The medium was adjusted to pH 5.6 before it was autoclaved at 121 °C for 20 min. The cultures were incubated at 25 ± 1 °C with a 16-h photoperiod under white fluorescent lamps and sub-cultured every 4 weeks.

Callus was initiated by culturing the explants on media containing combinations of various previously reported plant growth regulators (PGRs) through two independent experiments. In the first experiment, the callus initiation from the petioles of zygotic embryos was examined by culturing on MS medium containing the following combinations of PGRs: 40 μM NAA and 0.5 μM TDZ (Pakdeengam, 2005), 4.52 μM 2,4-D and 0.45 μM TDZ (Jheng et al., 2006), 10 μM 2,4-D and 0.5 μM BA (Arunyanart and Chaitrayagun, 2005), 9 μM 2,4-D and 0.8 μM BA (Karami et al., 2007), 18.1 μM 2,4-D and 2.22 μM BA (Lin et al., 2000), 10 μM picloram and 1 μM kinetin (Stefanello et al., 2005), 4.14 μM picloram and 4.64 μM kinetin (Kaur and Kothari, 2004), 11.27 μM dicamba and 4.14 μM picloram (Przetakiewicz et al., 2003), 11.38 μM triacontanol, and 1.1 μM BA and 2.85 μM IAA (Giridhar et al., 2004). The explant growth were scored through the following scheme: (1) explants that turned dark brown and exhibited no growth, (2) explants that formed a green compact callus, and (3) explants that formed a green embryogenic callus.

In the second experiment, the apical buds from embryos were examined by culturing on MS medium containing the following combinations of PGRs: 40 μM NAA and 0.5 μM TDZ (Pakdeengam, 2005), 10 μM picloram and 1 μM kinetin (Stefanello et al., 2005), 4.14 μM picloram and 4.64 μM kinetin (Kaur and Kothari, 2004), 11.27 μM dicamba and 4.14 μM picloram (Przetakiewicz et al., 2003), 11.38 μM triacontanol, and 1.1 μM BA and 2.85 μM IAA (Giridhar et al., 2004). A randomised complete block design with six blocks, and five explants per experimental unit was used in each experiment. The growth of the callus was recorded as the percentage of explants that formed a callus and the callus weight.

After 8 weeks of incubation, the embryogenic calluses, as in the study performed by Arunyanart and Chaitrayagun (2005), were transferred to MS medium supplemented with 0, 40, 50 or 60 μM

BA to investigate the callus regeneration. A randomised complete block design with three blocks (fifteen explants per block) and five explants per experimental unit was used, and the growth of the shoots was recorded as the shoot number, the leaf number, the shoot length, and the leaf length.

2.2. Plant and plasmid preparation

The shoot clusters that developed from the apical buds of embryos (~3.0 mm) were cultured on MS medium containing 40 μM NAA and 0.5 μM TDZ for 8 weeks for embryogenic callus induction. All of the embryogenic calluses were transferred to MS medium supplemented with 50 μM BA for 12 weeks for the regeneration of the shoot clusters and were used as plant material for transformations because the embryogenic callus is not resistant to selective medium after bombardment (data not shown). The shoot clusters were transferred to osmotic medium (MS medium containing 2 M mannitol and 2 M sorbitol) for 16 h and subsequently transferred to Petri dishes (9 cm) that were placed in the centre of a sterile round Whatman filter paper (2.5 cm diameter).

The plasmid DNA pCAMBIA2301 anti-*DFR* (Fig. 1) was used in this experiment. The pCAMBIA2301 anti-*DFR* plasmid contains the *gus* reporter gene encoding β-glucuronidase, the selectable *nptII* gene encoding neomycin phosphotransferase, and anti-*DFR* truncated to 670 bp (the *DFR* gene was cloned from *Curcuma alismatifolia* and provided by Assoc. Prof. Dr. S. Anuntalaphochai, of Chiangmai University, Thailand). The pCAMBIA2301 anti-*DFR* plasmid was isolated from *Escherichia coli* (DH5α) using an extraction mini kit (Flavogen) and precipitated onto 1.0 μm gold particles (BioRad) (Kikkert et al., 2005). Briefly, the following components were added to an Eppendorf tube (1.5 ml) containing 100 μl of gold particles (6 mg in 50% glycerol) under agitation: 5 μg plasmid DNA, 50 μl of 2.5 M CaCl₂, and 20 μl of 0.1 M spermidine. The mixture was rested on ice for 10 min before centrifugation at 13,000 rpm. The supernatant was discarded, and the pellet was re-suspended in 50 μl of 100% ethanol. For each bombardment, 10 μl of the suspended DNA-coated gold particles were pipetted and spread on the surface of a macrocarrier.

2.3. Particle bombardment

The bombardment chamber of a particle delivery system (PDS-1000/He, BioRad) was evacuated at a pressure of 28 in Hg. The experimental design, 2 × 2 factorial in randomised complete block was used, 10 explants per experimental unit. The explants were bombarded with DNA-coated gold particles discharged with different rupture disc pressures (1100 and 1350 psi, which are equivalent to 7584.23 and 9307.92 kPa, respectively) at the target distances 6 and 9 cm. Four hours after bombardment, the shoot cluster was transferred from osmotic medium to regeneration medium (MS with 50 μM BA). After 4 weeks of incubation on regeneration medium, the explants were transferred to selection medium (MS with 50 μM BA and 50 mg l⁻¹ kanamycin) for 8 weeks and sub-cultured every 2 weeks in fresh medium containing the selection agent. The surviving shoot clusters were then transferred to MS medium supplemented with 4.44 μM BA and 0.54 μM NAA (Shou et al., 2008) for shoot elongation.

2.4. GUS histochemical assay

The transient *gus* expression was tested 3 days after bombardment. The 10 pieces of samples in each treatment were incubated in a 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-D-glucuronide (X-gluc) solution for 24 h at 37 °C and were washed several times with 70% ethanol.

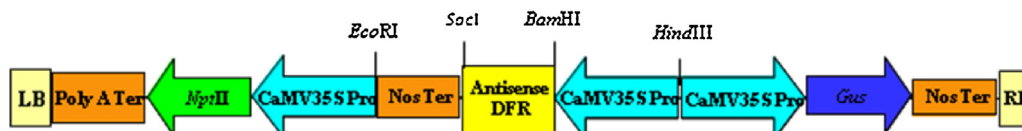


Fig. 1. T-DNA of the pCAM2301 anti-DFR plasmid construct containing *nptII*, anti-DFR, and *gus* under the control of the CaMV35S promoter.

Table 1
Effects of plant growth regulators on callus induction from apical buds in lotus after 8 weeks of culture.

Auxin and cytokinin (μM)		Score of callus growth (mean \pm S.E.) ^a	Percentage of explant forming embryogenic callus (%) (Mean \pm S.E.) ^a
40 μM NAA	0.5 μM TDZ	2.43 \pm 0.09 ^a	43.33 \pm 0.08 ^a
10 μM picloram	1 μM kinetin	1.00 \pm 0.00 ^b	0.00 \pm 0.00 ^b
4.14 μM picloram	4.64 μM kinetin	1.00 \pm 0.00 ^b	0.00 \pm 0.00 ^b
11.27 μM dicamba	4.14 μM picloram	1.00 \pm 0.00 ^b	0.00 \pm 0.00 ^b
11.38 μM triacontanol	1.1 μM BA 2.85 μM IAA	1.00 \pm 0.00 ^b	0.00 \pm 0.00 ^b
F-test		**	**
CV (%)		6.8346	60.5211

^a The values within a column followed by the same letter are not significantly different, as determined by Duncan's multiple range test.
** $P < 0.01$.

2.5. PCR analysis of putative transgenic plant

The genomic DNA was isolated from the leaf tissue of the kanamycin resistant cultures using the method described by Doyle and Doyle (1987). The presence of the *gus* gene was determined by the amplification of a 563 bp fragment of the gene using the following primer 5'ATTGATGAAACTGCTGCTGTCGGC3' and 5'ACGCGTGATACA TATCCAGCCAT3'. The primers for the amplification of a 256 bp fragment of the *nptII* gene were 5'CCATGATATTCGGCAAGCAGGCAT3' and 5'ATCCATCATGGCTGATGC AATGCG3' and the primers for the amplification of ~800 bp fragment of the anti-DFR gene were 5'AGGGATGA CGCACAATCCCACT3' and 5'TCGCAAGAC CGCAACAGGA3'. The reaction mixture contained 20 ng of genomic DNA, 0.125 mM dNTP mix, 2.5 mM MgCl₂, 1 \times Tag buffer containing (NH₄)₂SO₄, the primers, and 0.1 units of Tag DNA polymerase (Fermentas, Canada). The final volume was adjusted to 20 μl with sterile distilled water. The thermal cycles of the *gus* and *nptII* genes were the following: one cycle of 94 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, 30 cycles of 94 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, and 64 $^{\circ}\text{C}$ for 45 s, one cycle of 72 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, and one cycle of 72 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min. The thermal cycles for the anti-DFR gene were the following: one cycle of 94 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, 34 cycles of 94 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ for 45 s, and 72 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, and one cycle of 72 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min. The PCR products were electrophoresed on a 1% TAE agarose gel.

2.6. RT-PCR analysis of the stable transformation

The total RNA was extracted from the leaf tissue of the kanamycin resistant, PCR-positive plants using the method developed by Provost et al. (2007). The first-strand cDNA synthesis was performed using the SuperScript™ III First-strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) with an oligo(dt) according to the manufacturer's instructions. The expression of the *nptII* gene was determined by the amplification of a 256 bp fragment of the gene using the following primers: 5'CCATGATATTCGGCAAGCAGGCAT3' and 5'ATCCATCATGGCTGATGCAATGCG 3'. The primers for amplification of a ~450 bp fragment of the anti-DFR gene were 5'ACACGAAGTACATCCATCCGGTCA3' and 5'TTCTTGGCTGGTCATGAAGCTCT3'. The PCR conditions for the amplification of the *nptII* and anti-DFR genes included 94 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, 30 cycles of denaturation (94 $^{\circ}\text{C}$, for 1 min), annealing (64 $^{\circ}\text{C}$, for 45 s), and extension (72 $^{\circ}\text{C}$, for 1 min), and a final extension at

72 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min. The PCR products were electrophoresed on a 1% TAE agarose gel.

2.7. Statistical analysis

The cultures were observed weekly. All of the data were analysed using ANOVA and Duncan's multiple range tests with the SAS programme.

3. Results

3.1. Callus induction

After 8 weeks of culture, the apical buds from the embryo explants produced a better score of callus growth and improved formation of embryogenic callus growth compared with the petioles from the embryo explants (data not shown) on media with any combination of auxin and cytokinin. However, 43% of the callus growth obtained from the combination of NAA and TDZ was embryogenic callus, whereas the other combinations produced callus only. The apical buds from embryos cultured on medium containing 40 μM NAA and 0.5 μM TDZ exhibited the most growth (Table 1). The explants cultured on medium containing NAA and TDZ grew embryogenic callus within 4 weeks of culture, and the calluses continued to grow up to the 8th week. The growth of the callus was reduced after 8 weeks, and the callus turned brown or died within 12 weeks. The apical buds from embryo explants enlarged and formed compact white and green callus at the cut surfaces (Fig. 2a). The petioles explants from the embryos produced green friable callus, particularly at the cut surfaces (Fig. 2b).

3.2. Shoot induction

The shoot cluster was directly generated from the embryogenic calluses cultured on MS medium with 50 μM BA after 8 weeks of culture and continued to form shoot initiation. The embryogenic apices also formed the maximum number of shoots on medium containing 50 μM BA. Shoot proliferation occurred within 12 weeks of culture (Table 2 and Figs. 3a–c). The shoot clusters from these cultures were used as the target tissue for particle bombardment.

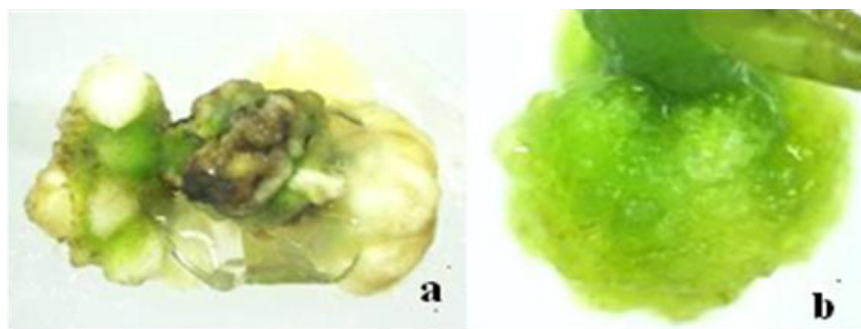


Fig. 2. Callus development from the apical buds and petiole explants from embryos cultured for 8 weeks. (a) Embryogenic callus derived from the apical buds of embryos cultured on MS medium containing 40 μM NAA and 0.5 μM TDZ. (b) Friable callus derived from the petiole explants from embryos cultured on MS medium containing 4.52 μM 2,4-D and 0.45 μM TDZ.

Table 2
Effect of BA on shoot induction from callus in lotus after 8 weeks of culture.

BA (μM)	Embryogenic callus diameter (cm) (mean ± S.E.) ^a	Shoot number (mean ± S.E.) ^a	Shoot length (cm) (mean ± S.E.) ^a	Leaf number (cm) (mean ± S.E.) ^a	Leaf length (cm) (mean ± S.E.) ^a
0	0.64 ± 0.09 ^b	1.40 ± 0.16 ^c	1.02 ± 0.09 ^a	3.22 ± 0.12	2.08 ± 0.03 ^a
40	1.19 ± 0.11 ^a	5.07 ± 0.57 ^b	0.77 ± 0.07 ^b	2.55 ± 1.12	0.69 ± 0.28 ^b
50	1.32 ± 0.10 ^a	8.67 ± 0.77 ^a	0.78 ± 0.03 ^b	4.84 ± 0.68	0.84 ± 0.08 ^b
60	0.82 ± 0.06 ^b	3.78 ± 0.70 ^b	0.63 ± 0.02 ^b	2.33 ± 0.41	0.57 ± 0.06 ^b
F-test	**	**	*	ns	**
CV (%)	17.4148	22.6594	12.5675	34.7109	35.4563

ns: non-significant.

^aThe values within a column followed by the same letter are not significantly different, as determined by Duncan's multiple range test.

*P < 0.05, **P < 0.01.



Fig. 3. Regenerating cultures of *N. nucifera* Gaertn. cv. Buntharik produced from the apical buds of embryo explants after 8–12 weeks of culture on MS medium with 50 μM BA. (a) Initiated shoot cluster (bar = 700 μm), (b) shoot regeneration (bar = 600 μm), and (c) shoot proliferation (bar = 600 μm).

3.3. Transient *gus* expression

The transient *gus* gene expression 72 h after bombardment was used as an initial indicator of the efficiency of the gene transfer. The shoot clusters exhibited blue cells typical of the transient expression of the *gus* gene. The highest *gus* expression was obtained at a pressure of 1100 psi and a target distance of 6 cm (Fig. 4). The results show that 37.1% of all of the explants were stained blue and that an average of 4.8 spots was found per explants (data not shown).

3.4. Selection of kanamycin-resistant shoots and shoot elongation

The number of kanamycin resistant shoot clusters recovered from the 12 week-old shoot clusters bombarded with the pCAMBIA2301 anti-*DFR* plasmid was determined. After selection, the shoot clusters were cultured on medium containing 50 μM BA and 50 mg l⁻¹ kanamycin for 8 weeks, it was found that the number of plants that survived was 38 of the initial 120 shoot clusters. The maximum number of shoots (16 shoots) that survived was derived from a helium gas pressure of 1100 psi and a target distance of 9 cm (Table 3). Most of the bombarded shoots clusters gradually turned brown or stopped growing, but the kanamycin-resistant



Fig. 4. Transient *gus* expression in a shoot cluster 3 days after bombardment with the PDS 1000/He device using a rupture disc pressure of 1100 psi and a target distance of 6 cm (bar = 100 μm).

การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 3
Effect of the rupture disc pressures and the flying distances on the particle bombardment-induced putative genetic transformation after 16 weeks.

Rapture disc pressure (psi)/target distance (cm)	Number of target tissues	Number of kanamycin resistant plants	Number of regenerated shoots	Number of detected shoots with the <i>gus</i> gene	Number of shoots with the <i>nptII</i> gene	Number of shoots with the anti- <i>DFR</i> gene
1100/6	30	8	5	4	5	4
1100/9	30	16	13	12	13	10
1350/6	30	5	3	3	3	3
1350/9	30	11	8	7	7	8
Total	120	38	29	26	28	21

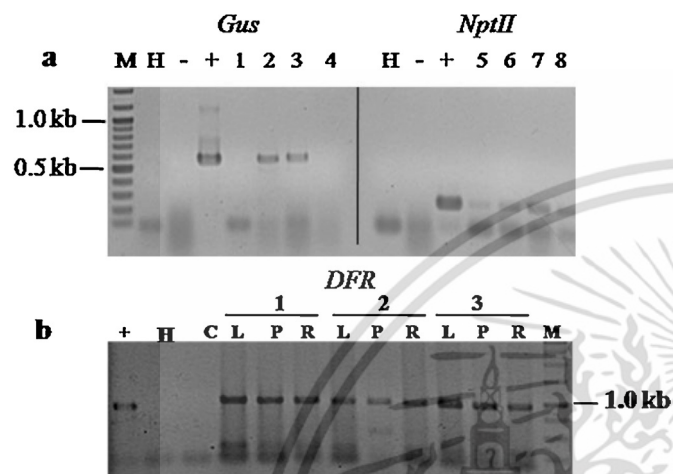


Fig. 5. PCR analysis of the transformed plant. (a) 1–4, *gus* primer; 5–8, *NptII* primer; M, 1 kb ladder; H, no template; “–”, control with no transformation; “+”, pCAMBIA2301 anti-*DFR* plasmid. (b) *DFR* gene with Camv35s and *nos* primers; C, nontransformed plant; 1–3, transformed plant number; L, leaf; P, petiole; R, rhizome; M, 1 kb ladder.

shoots proliferated on MS medium with 4.44 μ M BA and 0.54 μ M NAA within 16 weeks.

3.5. Molecular analysis

The result of the polymerase chain reaction and reverse transcription polymerase chain reaction analysis of four independent transgenic plants are shown in Figs. 5 and 6 respectively. The PCR analysis indicated that 29 transgenic plants contained the bands with the expected sizes of the *gus*, *nptII*, and anti-*DFR* genes. The highest PCR positive plant found at a pressure 1100 psi and a target distance of 9 cm were 12, 13 and 10 (Table 3). A 563 bp fragment was amplified and identified as the *gus* gene, a 256 bp fragment was amplified and identified as the *nptII* gene (Fig. 5a), and a ~800 bp fragment was amplified and identified as the anti-*DFR* gene (Fig. 5b). To confirm the data obtained from the PCR analysis, RT-PCR using the *nptII* gene and the anti-*DFR* gene was performed on the four surviving transgenic plants 8 months after bombardment. A 256 bp fragment was amplified and identified as the *nptII*

gene, and a ~450 bp fragment was amplified and identified as the anti-*DFR* gene (Table 4).

4. Discussion

4.1. Callus induction and plant regeneration

The callus induction of bud explants produced embryogenic callus growth, whereas petiole explants produced friable callus. In most dicotyledons, the addition of a low concentration of cytokinin to media containing auxin tends to increase the growth rate of embryogenic callus (George, 1996). According to our results, the apical buds from embryo explants on medium containing NAA and TDZ produced more embryogenic callus than those grown on media containing picloram, kinetin, dicamba, triacantanol, BA, or IAA. Therefore, among the different plant growth regulators tested, the combinations of NAA and TDZ were found to be superior. This result confirms earlier observations in other species (Dam et al., 2010; Prakash et al., 2001).

Cytokinins are the main factor of plant growth regulators that affect *in vitro* shoot regeneration (Shou et al., 2008). In the present experiment, shoots were successfully produced from embryogenic callus explants using MS medium supplemented with 50 μ M BA. This result confirms earlier observations in other species (Kozak and Stelmazczuk, 2009). BA is a cytokinins and is generally added to a culture medium to stimulate cell division, to induce shoot formation and axillary shoot proliferation, and to inhibit root formation. However, *Zantedeschia albomaculata* (Chang et al., 2003) produced 3.8 shoots per explant when it was cultured on medium containing 8.8 μ M BA. In addition, it was found that increase in the cytokinin concentration reduced the proliferation and stunted the growth.

4.2. Transgenic detection

The pCAMBIA2301 anti-*DFR* plasmids used in this study contained the *gus*, *nptII*, and anti-*DFR* genes were under the control of the CaMV35S promoter. The PCR and RT-PCR analysis confirmed the transformation of these genes into the lotus genome. The procedure was shown to have an effect on the transient expression of the *gus* gene at a helium gas pressure of 1100 psi and a target distance of 6 cm, as shown by the resultant number of blue spots, whereas no *gus* expression was found as a result of the other conditions. A shorter distance combined with a high pressure resulted in intense blue spots in each stem segment of carnation (Zuker et al., 1995). Franklin et al. (2007) reported that the callus induction of *Hypericum perforatum* was higher in explants hit by gold particles released from rupture disks at a pressure of 1100 psi compared with those hit by particles from rupture disks at pressures of 650 and 900 psi. These results indicate that the expression is not a good indication of a stable transformation, as was found in barley (Harwood et al., 2000). Different numbers of PCR-positive explants were achieved in the shoots of the transgenic plants. Some samples exhibited negative results for some of the genes. To select the transformations, kanamycin was added to the culture medium 4

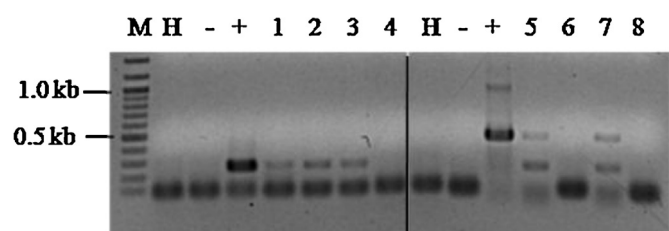


Fig. 6. RT-PCR analysis of the transformed plant using the *NptII* primer (1–4) and the *DFR* primer (5–8); M, 1 kb ladder; H, no template.

Table 4

RT-PCR analysis of the expression of the target genes after the particle bombardment-induced putative genetic transformation.

Rupture disc (psi)/target distance (cm)	Number of shoot		
	Regeneration	<i>nptII</i> gene expression	<i>Anti-DFR</i> gene expression
1100/6	–	–	–
1100/9	2	2	1
1350/6	1	0	0
1350/9	1	1	1
Total	4	3	2

“–”: no regeneration.

weeks after bombardment. Under these conditions, some of the putative transformations were non-transgenic. Some explants also most likely escaped the kanamycin selection medium, as observed by Witrzens et al. (1998) and Kuvshinov et al. (1999). However, the explants appeared dead when immediately selected after bombardment (data not show). PCR analysis was used for the detection of the transgenic genes 12 months after the growth of the transgenic plants. Three parts of each plant, (the leaves, petioles, and rhizomes), were shown to have the *DFR* gene by PCR, and this result was confirmed by RT-PCR. Furthermore, the PCR amplification of the anti-*DFR* gene resulted in bands that were higher than expected (~800 bp, Fig. 5b). This finding suggests possible rearrangements in the promoter or in the coding region of the gene (Kohli et al., 1996).

The gene expression was detected by RT-PCR. It was found that 3 of the four putative transgenic plants were positive for *nptII* and that 2 of the putative transgenic plants were positive for *DFR*. However, the *DFR* gene was not found in the non-transgenic plant. The expression of a truncated anti-*DFR* gene was not differentiated by the RT-PCR technique using the specific set of primers used in this study. We assumed that a deleted version could have been detected with any other set of primers because the *DFR* primers that we used were designed from *C. alismatifolia* and are therefore specific primer. As a result, the expression of this gene appeared to be the result of gene transformation. However, the floral-specific regulation system in lotus has not yet been studied.

We conclude that this work demonstrated the successful transformation of lotus (*N. nucifera* Gaertn.) cv. Buntharik through particle bombardment. We will design more effective strategies for the engineering of lotus by developing a better understanding of the mechanisms involves in this process. A detail molecular and expression analysis is required to determine the integration of genes. Additionally, further chemical and biological understandings of the flower colour, the flavonoid pathway, and the specific promoters for the flower target should make the modification of the flower colour more feasible.

Acknowledgements

This research was partially supported by King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang and the Centre of Excellence on Agricultural Biotechnology, Science and Technology Postgraduate Education and Research Development Office, office of Higher Education Commission, Ministry of Education (AG-BIO/PERDO-CHE).

References

- Aida, R., Kishimoto, S., Tanaka, Y., Shibata, M., 2000. Modification of flower colour in *Torenia fournieri* Lindl. by genetic transformation. *Plant Sci.* 153 (1), 33–42.
- Arunyanart, S., Soontronyatara, S., 2002. Mutation induction by γ and X-ray irradiation in tissue cultured lotus. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 70, 119–122.
- Arunyanart, S., Chaitrayagun, M., 2005. Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). *Sci. Hort.* 105, 411–420.
- Chang, H.S., Chakrabarty, D., Hahn, E.J., Paek, K.Y., 2003. Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 39 (2), 129–134.
- Dam, A., Paul, S., Bandyopadhyay, 2010. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Limonium sinensis* (Girard) Kuntze. *Sci. Hort.* 126, 253–260.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11–15.
- Forkmann, G., Martens, S., 2001. Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 155–160.
- Franklin, G., Oliveira, M., Dias, A.C.P., 2007. Production of transgenic *Hypericum perforatum* plant via particle bombardment-mediated transformation of novel organogenic cell suspension culture. *Plant Sci.* 1993–1203.
- George, E.F., 1996. *Plant Propagation by Tissue Culture. Part 2. In Practice. Exegetics Ltd., Great Britain.*
- Giridhar, P., Indu, E.P., Ravishankar, G.A., Chandrasekar, A., 2004. Influence of triacantanol on somatic embryogenesis in *Coffea Arabica* L. and *Coffea Canephora* P. EX FR. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 40, 200–203.
- Harwood, W.A., Ross, S.M., Cilento, P., Snape, J.W., 2000. The effect of DNA/gold particle preparation technique and particle bombardment device on the transformation of barley (*Hordeum vulgare*). *Euphytica* 111, 67–76.
- Jheng, F.Y., Do, Y.Y., Liauh, Y.W., Chung, J.P., Huang, P.L., 2006. Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *oncidium* (Gower Ramsey) by adjusting carbohydrate sources. *Plant Sci.* 170, 1133–1140.
- Karami, O., Deljou, A., Pour, A.M., 2007. Repetitive somatic embryogenesis in carnation on picloram supplemented media. *Plant Growth Regul.* 51, 33–39.
- Kaur, P., Kothari, S.L., 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 Tiss. Organ Cult.* 77, 73–79.
- Kikkert, J.R., Vidal, J.R., Reisch, B.I., 2005. Strable transformation of plant cells by particle bombardment/biolistic. *From Methods in molecular biology. Transgenic Plants: Methods and Protocols*, vol. 286, pp. 61–78.
- Kohli, A., Gahakwa, D., Vain, P., Laurie, D.A., Christou, P., 1996. Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. *Planta* 208, 88–97.
- Kozak, D., Stelmaszczyk, M., 2009. The effect of benzyladenine on shoot regeneration *in vitro* of *Zantedeschia aethiopia* 'Green Goddess'. *Horticulture* 19 (1), 14–18.
- Kuvshinov, V., Koivu, K., Kanerva, A., Pehu, E., 1999. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of greenhouse-grown *Brassica rapa* ssp oleifera. *Plant Cell Rep.* 18, 773–777.
- Lin, H.S., Van der Toorn, C., Raemakers, K.J.J.M., Visser, R.G.F., De Jeu, M.J., Jacobsen, E., 2000. Development of a plant regeneration system based on friable embryogenic callus in the ornamental alstroemeria. *Plant Cell Rep.* 19, 529–534.
- Martens, S., Teeri, T., Forkmann, G., 2002. Heterologous expression of dihydroflavonol 4-reductases from various plants. *FEBS Lett.* 531, 453–458.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 (3), 473–497.
- Pakdeengam, P., 2005. Effect of Plant Growth Regulators and Light on Somatic Embryo-genesis of Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) cv. Buntharik. Master Thesis of King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.
- Prakash, E., Khan, S.V., Meru, E., Rao, K.R., 2001. Somatic embryogenesis in *Pimpinella tirupatiensis* Bal. and Subr., an endangered medicinal plant of Tirumala hills. *Curr. Sci.* 81 (9), 1239–1242.
- Provost, G.L., Herrera, R., Paiva, J.A., Chaumeil, P., Salin, F., Plomion, C., 2007. A micromethod for high throughput RNA extraction in forest trees. *Biol. Res.* 40, 291–297.
- Przetakiewicz, A., Orczyk, W., Nadolska-Orczyk, A., 2003. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 73, 245–256.
- Rosati, C., Simoneau, P., Treutter, D., Poupard, P., Cadots, Y., Cadic, A., Duroni, M., 2003. Engineering of flower color in forsythia by expression of two independently-transformed dihydroflavonol 4-reductase and anthocyanidin synthase genes of flavonoid pathway. *Mol. Breed.* 12, 197–208.
- Shou, S.Y., Miao, L.X., Zai, W.S., Huang, X.Z., Guo, D.P., 2008. Factors influencing shoot multiplication of lotus (*Nelumbo nucifera*). *Biol. Plant.* 52 (3), 529–532.
- Stefanello, S., Dal Vesco, L.L., Ducroquet, J.P.H.J., Nodari, R.O., Guerra, M.P., 2005. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg.). *Sci. Hort.* 105, 117–126.
- Suvatbandhu, K., 1958. On Nymphaeaceae of Thailand. *Nat. Hist. Bull.* 17, 11–15.

To, K.Y., Wang, C.K., 2006. *Molecular breeding of flower colour*. Ornamental and Plant Biotechnology, vol. 1. Global Science Books, UK Floriculture, pp. 300–310.

Witzens, B., Brettell, R.I.S., Murray, F.R., McElroy, D., Li, Z., Dennis, E.S., 1998. Comparison of three selectable marker genes for transformation of wheat by microprojectile bombardment. *Aust. J. Plant Physiol.* 25, 39–44.

Yong, W., Abdullah, J.O., Mahmood, M., 2009. *Agrobacterium-mediated transformation of Melastoma malabathricum and Tibouchina semidecandra with sense and antisense dihydroflavonol 4-reductase (DFR) genes*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 96, 59–67.

Zuker, A., Chang, P.L., Ahroni, A., Cheach, K., Woodson, W.R., Bressan, R.A., Watad, A.A., Hasegawa, P.M., Vainstein, A., 1995. Transformation of carnation by microprojectile bombardment. *Sci. Hort.* 64, 177–185.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Transformation of Antisense Dihydroflavonal 4-Reductase (*DFR*) into Sacred Lotus 'Buntharik' Using *Agrobacterium*-Mediated Gene Transfer

K. Saetiew, W. Leethaweep, N. Parinthawong and S. Arunyanart
Faculty of Agricultural Technology
King Mongkut's Institute of Technology Lat Krabang
Bangkok
Thailand

Keywords: kanamycin, cefotaxime, neomycin phosphotransferase, binary vectors

Abstract

Transformation of antisense dihydroflavonal 4-reductase (*DFR*) into 'Buntharik' sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) using *Agrobacterium*-mediated gene transfer was experimented. The *A. tumefaciens* strain EHA105 harbored two binary vectors. The pCAMBIA2301anti-*DFR* plasmid contained neomycin phosphotransferase (*NPTII*) as a selectable marker gene, the antisense *DFR* as an inserted gene and the β -glucuronidase gene (*GUS*) as a reporter gene. The pBI121anti-*DFR* plasmid contained *NPTII* gene and the antisense *DFR*. Two-months-old calli regenerated from apical buds were used as plant materials. The plant materials were soaked in the *Agrobacterium* suspension for 10 or 30 min. The calli were co-cultivated for two days in the darkness. Treated calli were selected on solid MS medium containing 50 mg L⁻¹ kanamycin and 250 mg L⁻¹ cefotaxime. The calli were transferred to the same medium every two weeks for eight weeks. The survived calli regenerated shoots on MS medium containing a combination of 0.54 μ M NAA and 4.44 μ M BA. Both plasmids gave the best callus growth, maximum callus size and the survival percentage when soaked for 10 min. *GUS* bioassay was used to verify the presence of *GUS* gene in petioles and leaves of transgenic plants. It was found that petioles and leaves of transformants which were transformed with pCAMBIA2301anti-*DFR* by soaking for 30 min showed the highest percentage of blue spots on explants. Of all 14 PCR positive clones, 5 clones showed *GUS* gene, 11 clones contained *NPTII* gene and 6 clones had *DFR* gene.

INTRODUCTION

Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) is a south-east Asian aquatic edible plant known for the delicate beauty of its flowers. The flowers are considered sacred by buddhists and are used for decorative purposes. It is of obvious economic importance in Thailand because of its use as an ornamental plant in water gardens and also popular as a cut flower that generates income in rural areas (La-ongsri et al., 2009) However, they exhibit a narrow range of colors and shapes. There are six commercial cultivars of lotus. There are only 2 colors, white and pink (Lakhakul, 1992) available in Thailand which have had limited development through breeding programs. There is considerable potential for improvement of this plant through the use of tissue culture and work on micropropagation (Arunyanart, 1998), mutagenesis (Arunyanart and Soontronyatara, 2002) and somatic embryogenesis induction (Arunyanart and Chaitrayagun, 2005).

Flavonoids are the major secondary metabolites in most plants and anthocyanin is one of the members, which contributes to red, blue, and orange color in flowers and fruits (Cook and Samman, 1996). The genes coding for enzymes in the flavonoid biosynthesis pathway have also been cloned in some plant species. Dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) gene is a gene in anthocyanin biosynthesis, which led to novel or increased flower pigment. The expression of *DFR* gene can provide useful information for genetic transformation programs aimed at changing flower color by inducing anthocyanin synthesis in petals (Rosati et al., 1997). The *DFR* gene has been cloned by degenerate PCR in gerbera, *Forsythia*, *Cymbidium* and onions (Sunggil et al., 2004). Therefore, *DFR*

gene might change the petal color in lotus.

Efficient plant regeneration systems to gene transfer methods are the major requisites for development of lotus transgenic plants. To overcome this limitation, we have focused on using different plasmids and periods of co-incubation of *Agrobacterium* to optimize conditions for efficient delivery of *Agrobacterium* T-DNA harboring kanamycin resistance (*NPTII*) gene as the selectable marker gene and the anti-DFR gene.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Growth Condition

'Buntharik' lotus seeds were washed under running tap water for 60 min, then rinsed in 70% ethanol for 1 min, then 50% Clorox (3% sodium hypochlorite) for 20 min and finally rinsed three times in sterile distilled water. The apical bud from embryo was used as explants (Fig. 1a). The explants were cultured on MS medium containing a combination of 40 μ M NAA and 0.5 μ M TDZ for 16 weeks in order to produce callus. The callus was maintained on the same medium.

When needed, shoots were regenerated from callus cultured on MS medium containing of 0.54 μ M NAA and 4.44 μ M BA. The cultures were incubated in the culture room maintained at 25 \pm 2°C under cool white light for 16-hour photoperiod.

Vectors and Bacterial Strain

The DFR fragment (600 bp) was cloned from *Curcuma alismatifolia*. The DFR fragment was ligated into the pBI121 binary vector by replacing the GUS gene in antisense orientation, driven by CaMV 35S promoter and nopaline syntase (NOS) terminator adjacent to left border. The pBI121 anti-DFR contained the kanamycin resistance (*NPTII*) gene driven by CaMV 35S promoter and NOS terminator (Fig. 1). The fragment of CaMV 35S-anti-DFR-NOS terminator from pBI121anti-DFR was cut and ligated into pCAMBIA 2301 at *EcoRI* and *HindIII* site in order to generate another binary vector. The pCAMBIA2301-anti DFR contained the *NPTII* gene driven by CaMV35S promoter and Poly A-terminator and the *GUS* gene driven by CaMV35S promoter and NOS-terminator (Fig. 2). The plant vectors were mobilized into *A. tumefaciens* strain EHA105 by electroporation (Gene Pulser, BioRad, USA) and used for co-cultivation and genetic transformation.

Transformation and Plant Regeneration

Two-month-old callus was used for transformation. *Agrobacterium* were grown on orbital shaker at 180 rpm at 28°C for 16 h. Explants were cut into pieces and soaked in suspension of *A. tumefaciens* strain EHA105 carried pCAMBIA2301anti-DFR or pBI121anti-DFR at the concentration of about 0.6-0.7 OD₆₀₀ for the soaking time was 10 or 30 min, while 100 μ M acetosyringone was in the *Agrobacterium* suspension. After co-incubation, explants were cultured on MS medium containing 100 μ M acetosyringone in darkness for two days. Explants were washed in MS medium containing 500 mg L⁻¹ cefotaxime for 5 min, three times. Explants were cultured on MS medium containing with 0.54 μ M NAA, 4.44 μ M BA and 250 mg L⁻¹ cefotaxime for *Agrobacterium* elimination and 50 mg L⁻¹ kanamycin for selection. The explants were transferred to the same medium every two weeks for 16 weeks. The putative transgenic explants were cultured on MS medium.

DNA Extraction and PCR Analysis

Extraction of total genomic DNA was carried out by grinding 100-200 mg of leaf tissue in liquid nitrogen and using cetyl trimethyl-ammonium bromide (CTAB) as extraction method (Doyle and Doyle, 1990). Putative transformants that survived from kanamycin selection were confirmed by PCR. The 254 bp fragment of *NPTII* gene was amplified by using primers F; 5'-CCATGATATTCGGCAAGCAGGCAT-3' and R; 5'-ATCCATCATGGCTGATGCAAT GCG-3'. The 563 bp fragment of *GUS* gene was

amplified by using primers F; 5'-ATTGATGAAACTGCTGCTG TCGGC-3' and R; 5'-ACGCGGTGATACATATCCAGCCAT-3'. For detection of the antisense-DFR, the fragment of 800 bp was amplified by using primers located on CaMV35S region (F; 5-AGGGATGACGCACAATCCCACT-3') and NOS region (R; 5'-TCGCAAGACCG GCAA CAGGA-3'). The thermal cycles of *NPTII* and *GUS* primers were: 1-cycle of 94°C for 5 min, and followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, 64°C for 45 s and 72°C for 1 min, and a final cycle of 72°C for 10 min. The thermal cycle for detection of the antisense *DFR* were used the same condition except anneal step, used 60°C for 45 s. The amplified products were separated by electrophoresis on 0.8% agarose gel and visualized with ethidium bromide.

Beta-Glucuronidase (GUS) Assay

Stable expression of GUS was detected in leaf and petiole of plants regenerated from the *Agrobacterium* infected explants. The leaf and petiole of putative transformants were immersed in freshly prepared X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronidase) solution and were incubated overnight at 37°C. The staining solution was removed at the following day, and plant tissue was discolored using ethanol.

RESULTS AND DISCUSSION

Plant Regeneration from Callus

The apical bud from embryo was used as explant for callus regeneration (Fig. 3a) (data not shown). They were cultured on MS medium containing a combination of 40 μ M NAA and 0.5 μ M TDZ. Callus was regenerated from cut surface of explants. The callus was green and friable with an average size of 1.84 cm² within eight weeks (Fig. 3b). Pakdeengam (2005) found that the petioles from embryos of 'Buntharik' lotus formed somatic embryo when cultured on MS medium supplemented with 40 μ M NAA and 0.5 μ M TDZ under 16-h photoperiods cool for 12 weeks. Arunyanart and Chaitrayagun (2005) reported that bud from rhizome of 'Sattabonkot' lotus cultured on MS medium containing 4 μ M 2,4-D and 1 μ M BA gave the best callus induction. For somatic embryogenesis, the best induction was found on MS medium supplemented with 6 μ M 2,4-D and 1 μ M BA after 12 weeks when transferred to a medium with 2 μ M 2,4-D and 0.5 μ M BA somatic embryo regeneration. In this case the explants, apical bud and petioles from embryo, produced best callus when cultured on MS medium containing 40 μ M NAA and 0.5 μ M TDZ. However in this experiment, when the transformed callus was transferred to MS medium supplemented with 0.54 μ M NAA and 4.44 μ M BA (Shou et al., 2008), somatic embryo regenerated between new leaves within 16 weeks (Fig. 3c). The somatic embryogenesis induction was achieved when callus produced from MS medium containing 40 μ M NAA and 0.5 μ M TDZ were subculture to MS medium supplemented with 0.54 μ M NAA and 4.44 μ M BA. Shoots and root developments were found when tissue were transferred to liquid on solid MS medium (Fig. 3d and e).

Co-Inoculation Condition

The incubation duration and plasmid types decreased callus survival percentage in the first 4 weeks. At 16 weeks, the callus co-incubated for 10 min showed higher survival percentage of callus (9.33%) than that co-incubated for 30 min (5.99%) (Table 1). This result confirmed the observation of Chakrabarty et al. (2002) that lowering bacterial density and preculturing of explant in callus induction medium helped improve transformation frequency. The callus transformed with pBI121anti-DFR by co-incubation for 10 or 30 min gave similar callus size of 1.2 cm², while the callus transformed with pCAMBIA2301anti-DFR by co-incubated for 10 or 30 min gave callus size of 1.09 and 0.8 cm² respectively (Table 2). The co-incubation time affected survival of explant as well as on transformation efficiency. Lowless infection time was best for survival of explant but it showed less GUS expression on soybean (Zia et al., 2010).

PCR Analysis of Transgenic Plant

The genomic DNA was isolated from leaf of putative transgenic lotus. A total of 45 explants co-cultivated with each plasmid showed 7 surviving explants. The PCR analysis was carried out to amplify the 254 bp fragment of *NPTII* (Fig. 4a), 800 bp fragment of *DFR* (Fig. 4b), and 563 bp fragment of *GUS* (Fig. 4c). Of 7 putative transgenic lines transformed with pCAMBIA2301 anti-*DFR* plasmid, 5 lines were positive for *nptII*, 4 lines were positive for *DFR* and 5 lines were positive for *GUS*. While 6 out of 7 putative transgenic lines transformed with pBI121 anti-*DFR* showed PCR positive when using primer for *NPTII*, and 2 lines when using *DFR* primers (Table 3). We also compared the effect of two different plasmids on the transformation efficiency. The pCAMBIA2301 anti-*DFR* carry T-DNA (7400 bp) was more effective than pBI121 anti-*DFR* (3200 bp), producing PCR *DFR* gene four lines.

The *Agrobacterium* inoculation period of either 10 or 30 min showed expression of *GUS* at 48 and 51.19%, respectively (Fig. 5). In this case, we use absorbance of OD 0.6-0.7 for different inoculation times found close *GUS* expression efficiency. Although Dobhal et al. (2010) reported the transformation efficiency of *Agrobacterium* into tobacco, the absorbance of OD 0.3 with infection time of 30 min was found to be the most suitable for transformation in tobacco and showed that the presence of the blue spot in the transient expression was 28.3%.

CONCLUSION

Our result suggested that the best of co-inoculation conditions for 'Buntharik' lotus callus was 10 min, for both plasmids. The highest number of stable transgenic plants were obtained when the pCAMBIA2301 anti-*DFR* plasmid was used.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Assoc. Prof. Dr. Somboon Anuntarpochai for cloning *DFR* gene for us. This work was supported by King Mongkut's Institute of Technology Lat Krabang.

Literature Cited

- Arunyanart, S. 1998. In vitro culture of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). Proc, Symp. Jpn. Soc. Hort. Sci. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 67 (Suppl.):257.
- Arunyanart, S. and Chaitrayagun, M. 2005. Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). Sci. Hort. 105:411-420.
- Arunyanart, S. and Soontronyatara, S. 2002. Mutation induction by γ and X-ray irradiation in tissue cultured lotus. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 70:119-122.
- Chakrabarty, R., Viswakarma, N., Bhat, S.R., Kirti, P.B., Singh, B.D. and Chopra, V.L. 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation of cauliflower: optimization of protocol and development of Bt-transgenic cauliflower. J. Biosci. 27:495-502.
- Cook, N.C. and Samman, S. 1996. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary source. The Journal of Nutritional Biochemistry 7(2):66-76.
- Dobhal, S., Pandey, D., Kumar, A. and Agrawal, S. 2010. Studies on plant regeneration and transformation efficiency of *Agrobacterium* mediated transformation using neomycin phosphotransferase II (*nptII*) and glucuronidase (*GUS*) as a reporter gene. Afr. J. Biotechnol. 9:6853-6859.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus 12:13-15.
- Lakhakul, K. 1992. Bua: the Queen of Water Plants. Dansuttha Printing Press, Bangkok (in Thai).
- La-onsri, W., Trisonthi, C. and Balslev, H. 2009. Management and use of *Nelumbo nucifera* Gaertn in Thai wetland. Wet. Eco Managemt. 17:279-289.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Pakdeengam, P. 2005. Effect of plant regulator and light on somatic embryogenesis of

- lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) cv. Buntarik. M.S. thesis in horticulture, King Mongkut's Institute of Technology Lat Krabang, Bangkok.
- Rosati, C., Cadic, A., Duron, M., Renou, J. and Simoneau, P. 1997. Molecular cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene in flower organs of *Forsythia × intermedia*. Plant Mol. Biol. 35:303-311.
- Shou, S.Y., Miao, L.X., Zai, W.S., Huang, X.Z. and Gou, D.P. 2008. Factors influencing shoot multiplication of lotus (*Nelumbo nucifera*). Biol. Plant. 52:529-532.
- Song, G., Honda, H. and Yamaguchi, K. 2004. Effect *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) from stem explants using a two-step kanamycin-hygromycin selection method. In Vitro Cell Dev. Biol. 40:359-365.
- Sunggil, K., Marla, L.B., Sunghun, P., Kil-Sun, Y. and Leonard, M.P. 2004. Inactivation of *DFR* (Dihydroflavonol 4-reductase) gene transcription results in blockage of anthocyanin production in yellow onions (*Allium cepa*). Mol. Breed. 14:253-263.
- Zia, M., Rizvi, Z.F., Rehman, R. and Chandhary, M.F. 2010. *Agrobacterium* mediated transformation of soybean (*Glycine max* L.): some conditions standardization. Pak. J. Bot. 42:2269-2279.

Tables

Table 1. Survival percentage of transformed 'Buntarik' lotus callus at different time on selective medium with 50 mg L⁻¹ kanamycin for 8 weeks before transfer to MS medium with 0.54 μM NAA and 4.44 μM BA.

Treatment	Age (weeks)			
	4	8	12	16
Plasmid				
pCAMBIA2301antiDFR	99.33a	65.99	18.66	7.33
pBI121antiDFR	95.33b	61.99	19.99	7.99
F-test	*	ns	ns	ns
Incubation time				
1:10 (10 min)	99.33a	66.66	19.33	9.33
1:10 (30 min)	95.33b	61.33	19.33	5.99
F-test	*	ns	ns	ns
pCAMBIA2301antiDFR				
1:10 (10 min)	100.00	70.66	19.99	9.33
1:10 (30 min)	98.66	61.33	17.33	5.33
pBI121antiDFR				
1:10 (10 min)	98.66	62.66	18.66	9.33
1:10 (30 min)	91.99	61.33	21.33	6.66
F-test	ns	ns	ns	ns
CV	3.59	17.66	22.25	21.86

Values within a column followed by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test at P<0.05; ns: non-significant; * significant at P<0.05.

Table 2. Callus size of 'Buntarik' lotus at different time after transformation.

Treatment	Age (weeks)				
	4	8	12	16	
Plasmid					
pCAMBIA2301antiDFR	0.80	0.99	0.80	0.94	
pBI121antiDFR	0.83	1.08	0.93	1.20	
F-test	ns	ns	ns	ns	
Incubation time					
1:10 (10 min)	0.80	1.03	0.81	1.14	
1:10 (30 min)	0.83	1.04	0.93	1.00	
F-test	ns	ns	ns	ns	
pCAMBIA2301antiDFR	1:10 (10 min)	0.80	0.99	0.75	1.09
	1:10 (30 min)	0.80	1.00	0.86	0.80
pBI121antiDFR	1:10 (10 min)	0.81	1.08	0.87	1.20
	1:10 (30 min)	0.85	1.09	0.99	1.20
F-test	ns	ns	ns	ns	
CV	11.64	9.31	34.14	40.47	

Values within a column followed by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test at $P < 0.05$; ns: non-significant.

Table 3. Transformation efficiency of 2 plasmids to 'Buntarik' lotus.

Plasmid	No. of explants co-cultivated	No. of surviving explants	No. of PCR positives		
			GUS	NPTII	DFR
pCAMBIA2301antiDFR	45	7	5	5	4
pBI121antiDFR	45	7	-	6	2

Figures



Fig. 1. Schematic representation of the T-DNA of pBI121antiDFR containing the antisense *DFR* gene and *NPTII* gene. RB/LB represent right and left T-DNA border sequences.

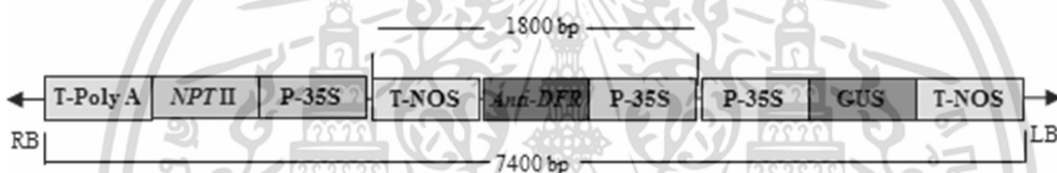


Fig. 2. Schematic representation of the T-DNA of pCAMBIA2301antiDFR containing the, *NPTII* gene, antisense *DFR* gene and *GUS* gene. RB/LB represent right and left T-DNA border sequences.

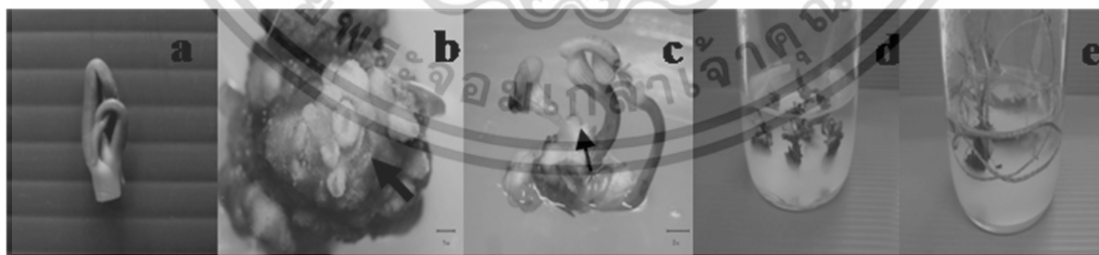


Fig. 3. ‘Buntarik’ lotus (a) Apical bud from embryo; (b) Callus from apical bud on MS medium with 40 μM NAA and 0.5 μM TDZ for 8 weeks. (c) Somatic embryo from callus on MS medium with 0.54 μM NAA and 4.44 μM BA. for 16 weeks. (d, e) Shoot and root development in liquid on solid MS medium.

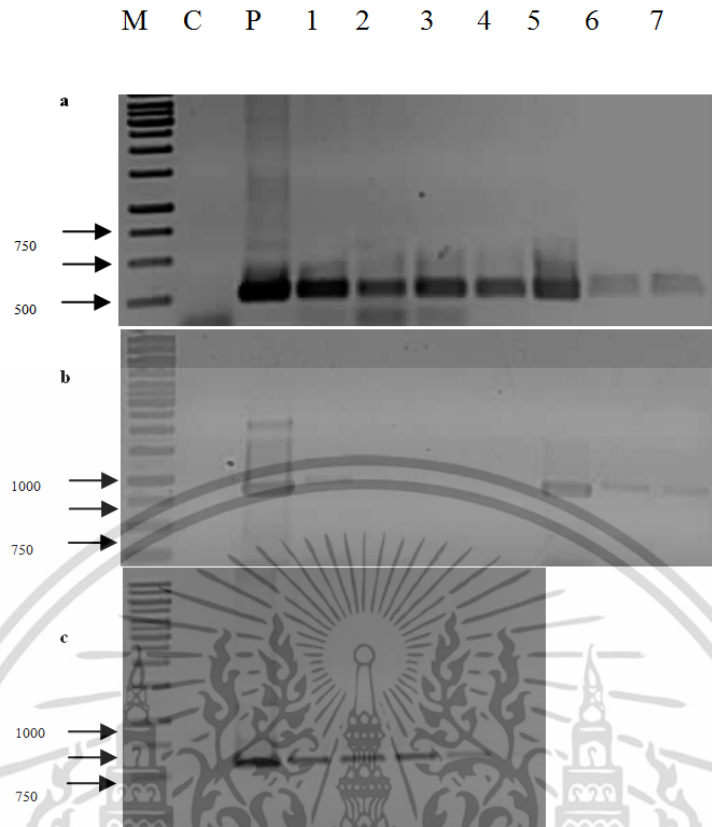


Fig. 4. PCR detection of *NPTII*, *anti-DFR* and *GUS* gene in transgenic lotus plants. (a) *NPTII* (254 bp); (b) *anti-DFR* (800 bp); (c) *GUS* (563 bp). M, Marker DNA 1 kb ladder; C, control wild-type plant; P, plasmid pCAMBIA2301anti-DFR; 1-4, transgenic plant transformed with pCAMBIA2301anti-DFR; 5, plasmid pBI121anti-DFR; 6-7, transgenic plants transformed with pBI121anti DFR.

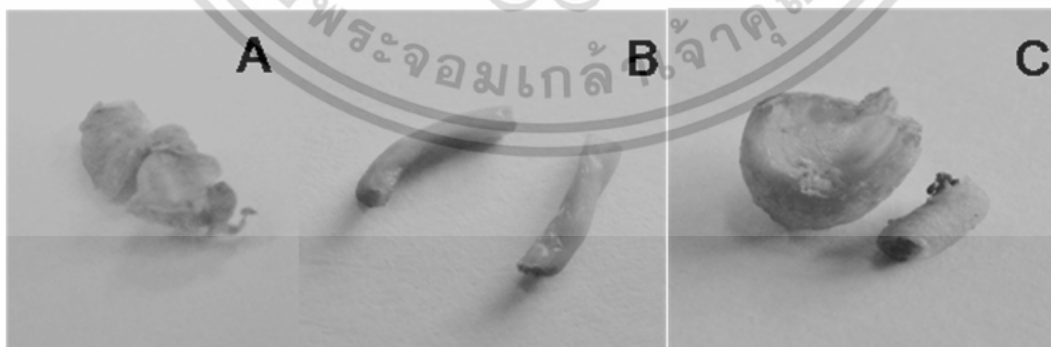


Fig. 5. GUS expression in transformed with pCAMBIA2301-anti DFR to 'Buntarik' lotus tissue (a) non transform leaf; (b) the petiole; (c) leaf and petiole.



Chiang Mai J. Sci. 2016; 43(X) : 1-11
<http://epg.science.cmu.ac.th/ejournal/>
Contributed Paper

Isolation and Expression Analysis of the Flavanone 3-Hydroxylase Genes in Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.), Waterlily (*Nymphaea* sp.) and Transient Silencing in Waterlily

Chaivarakun Chaipanya [a], Kanjana Saetiew [a] and Sumay Arunyanart [a] and Nonglak Parinthawong*[a]

[a] Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.

*Author for correspondence; e-mail: nonglak.pa@kmitl.ac.th

Received: 2 September 2014

Accepted: 9 November 2015

ABSTRACT

Flavanone 3-hydroxylase (F3H) converts flavanones from dihydroflavonols, which leads to production of flavonoid compounds via the anthocyanin biosynthesis pathway in plants. In this study, the *F3H* gene was isolated from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) cv. Buntharik (white petal lotus), cv. Satabankacha (pink petal lotus), and waterlily (*Nymphaea* sp.) var. St. Louis Gold by reverse transcription PCR (RT-PCR). The open reading frames (ORF) of three cultivars' genes were 1,134 bp in length, encoding a predicted protein of 377 amino acids. Their nucleotide sequences were identical, and the amino acid sequence shared high homology to F3H from different plant species. Expression of *F3H* was specifically regulated in petals and stamens, while less expression was found in leaf tissue of waterlily variety St. Louis Gold. The correlation of *F3H* expression according to specific colouration was performed in waterlily. The *F3H* gene was more highly expressed in decreasing order of red, purplish blue, and yellow petals when compared using semi quantitative PCR (sqPCR). Gene regulation according to flowering stage and pigmentation was determined in lotus. The *F3H* expression was slightly diminished in petals of cultivar Satabankacha at the fully-opening stage, whereas it was detected in the cultivar Buntharik only when white petals were tinted with pink. An RNAi gene-silencing vector, pJA8*F3H*, encoding a hairpin *F3H* RNA, was introduced to waterlily petals using the *Agrobacterium* infiltration method, and the *F3H* expression was analysed at 1 and 3 days post infiltration (dpi) by sqPCR. The results showed that the *F3H* expression was down-regulated at 3 dpi in flowers tested of the red petal variety and purplish blue petal variety compared to controls. The results confirmed that pJA8*F3H* is efficient and could be used as a transformation vector to transiently suppress *F3H* expression in waterlily or lotus.

Keywords: Anthocyanin, Flavanone 3-hydroxylase (*F3H*), *Nelumbo*, *Nymphaea*, RNAi

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. INTRODUCTION

Flavonoids accumulate in all higher plants. They are important to plants, as they are involved in many biological processes. It is known that flavonoids play roles in signalling between plants and microbes, pollen development, and protection from UV light, and they act as defence molecules against pathogens. Some flavonoid pigments provide an array of colours, which, therefore, attracts pollinators and seed dispersers, facilitating reproduction [1]. These secondary metabolites have been divided into different categories of structure including flavones, flavonols, isoflavones, flavanones, chalcones, aurones, proanthocyanidins, and anthocyanins, among others [2]. The flavonoid biosynthetic pathway is part of the phenylpropanoid pathway with the flavonoid precursors phenylalanine, from the shikimate pathway, and malonyl-CoA, which is derived from citrate produced by the tricarboxylic acid (TCA) cycle [3]. Studies on different mutants affecting flavonoid synthesis have been established, and genes encoding flavonoid biosynthetic enzymes have been cloned in a variety of plant species such as petunia, maize, snapdragon (*Antirrhinum majus*), and *Arabidopsis* [4].

The flavonoid pathway starts with the formation of the C₁₅ backbone or chalcones by chalcone synthase (CHS), which are further converted to a range of other flavonoids by chalcone isomerase (CHI), flavanone 3-hydroxylase (F3H), flavonoid 3-O-hydroxylase (F32H), dihydroflavonol 4-reductase (DFR), and anthocyanidin synthase (ANS) [3]. The most prominent class of products is the anthocyanins, providing colour to petals. Mutation of genes involved in the flavonoid biosynthetic pathway resulted in changes of petal colour in many ornamental flowering plants, such as *Gentiana triflora* [5], *Nicotiana tabacum* [6], *Dianthus caryophyllus* cv. Eilat [7],

and *Torenia hybrid* [8] by disruption of *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3252H*, and *DFR* expressions, respectively. A cDNA for *F3H* was first isolated from *Antirrhinum majus* (snapdragon) [9]. The gene functions at an early step of the flavonoid pathway and codes for the enzyme that catalyses the formation of dihydroflavonols from flavanones and provides precursors for many classes of flavonoid compounds. Therefore, this enzyme is essential in the flavonoid pathway. Disruption or down-regulation of *F3H* expression resulted in the decrease of flavonoid content and change of petal colour [10-13].

Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) is grown widely in Thailand, as it is a symbolic in Buddhism. However, there are only two natural colours of lotus flowers available—white and pink. Therefore, generation of a new colour line using a conventional breeding program is rather impossible. To modify flower colour, an understanding of the function of genes in the flavonoid pathway is essential. Waterlily (*Nymphaea* sp.) has diverse petal colours including white, yellow, pink, and red to dark purple; by exploiting this, waterlily was used as a tool to monitor changes in flavonoid biosynthetic pathway modifications. Therefore, the goal of the research was to down-regulate the expression of *F3H* gene in lotus and waterlily. Here, we report the characterisation of the *F3H* genes in lotus and waterlily. Expression analysis using sqPCR suggested that *F3H* was transcribed in various flower stages and petal colours. In addition, *F3H* was transiently silenced using RNAi, and its level of expression is described.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant Materials

The waterlily lines used in this study,

Nymphaea sp. var. St. Louis Gold, var. Royal Red, var. Teri Dunn, and var. Lueang Garnjana, were obtained from germplasm of Dr. Sermlap Wasuwat and Primlap Chukiatman Wasuwat. Two cultivars of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) including Satabankacha and Buntharik, whose petals are pink and white, respectively, were obtained from ponds at King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang. Plant material was harvested, immediately frozen in liquid nitrogen, and ground to a powder under liquid nitrogen with a mortar and pestle. For RNA isolation, the petals, stamens, and leaves were harvested separately.

2.2 Isolation of DNA, RNA and cDNA Synthesis

Petals were collected for genomic DNA preparation using DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA). Petals, stamens, and leaves of lotus were extracted for total RNA using a modified Gomez-Gomez method [14], while InviTrap® (Invitex, Germany) was used to isolate total RNA from the small amount of transient transformed petals of waterlily. First strand cDNA was synthesised from 1 µg of DNase-treated total RNA and 0.5 µL RevertAid reverse transcriptase (Fermentas, USA). Full-length cDNA was synthesised from 1 µg total RNA according to the manufacturer protocol of the SMARTer™ RACE cDNA amplification kit (Clontech, Canada).

2.3 Cloning and Sequencing of The *F3H* Gene

The cDNA derived from SMARTer™ RACE was used as a template for nested-PCR in combination with the following primers: the UPM primer, which located at the 52-adaptor region, and gene-specific primer, 52 RACE GSP1. The PCR products were

diluted and subjected to the second PCR reaction using 52 nested and 52 RACE NGSP1 primers in order to obtain the 52-gene region. The 32-region was created using an oligo-dT primer and a gene-specific F3H8 primer. The sequences of all primers used are listed in Table 1, and the PCR reactions were conducted according to the manufacturers' protocols. The 52- and 32- fragments obtained were cloned into the pTZ57R/T cloning vector (Thermo Scientific, USA) and sequenced. Gene-specific oligonucleotide primers were designed (F3H stop) and used together with the UPM primer located at the 52-adaptor region in PCR to synthesise a full-length *F3H* gene. In order to analyse the *F3H* gene structure, the genomic DNA was used as template in the PCR reaction where primer F3H SenseF and F3H stop were present. The obtained nucleotide sequence of F3H gene were analysed by Freeware program BioEdit [15], BLASTN (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), and the phylogenetic tree was generated using MEGA5 program [16].

2.4 Constructions of pJA8*F3H*

A 308-bp gene fragment was synthesised using F3H SenseF and F3H SenseR as oligonucleotide primers for PCR. The fragment was cloned into pCR8 (Invitrogen, USA) and then introduced into pJAWOHL8 using the Gateway system (Invitrogen, USA). The pJAWOHL8, an RNAi binary silencing vector, carries ampicillin and Basta resistance genes as bacterial and plant selective markers, respectively. After construction, the obtained pJA8*F3H* plasmid was then introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 and used for transient silencing assays in waterlily petals.

Table 1. Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5' → 3')
UPM primer	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C
52RACE GSP1	ATC CAC GTC TTG CCG CCG TCC CTG GTG G
52RACE NGSP1	ACC AGG TCC TGC AGC AGC AGG GTG ATG G
F3H8	CCT GGA CAT GGA CCA GAA G
F3H stop	TCA GGC CAG AAT TTC ATT GA
F3H SenseF	GAG AAG CTC CGG TTC GAC AT
F3H SenseR	TAG TTC ACC ACC ATC TTC TGG
F3H14F	GGA GAT CGT GAC GTT CTT CT
F3H10R	GGA TTC TGG AAC GTG GCT A
CHSF	AAG AGC TCC CGT CAA GAG ACT CA
CHSR	AAG GAT CCC AGA AAA TTG AGT TC
18-SF	GGC TCG AAG ACG ATC AGA TAC CG
18-SR	GTA CAA AGG GCA GGG ACG TAG TCA A

2.5 *Agrobacterium*-mediated Transformation

As recommended in Zottini *et al.* [17], *A. tumefaciens* strain GV3101, harbouring the plasmid pJAWOHL8 or pJA8*F3H*, was grown for 24 h in yeast extract phosphate (YEP) medium containing 100 and 25 µg/mL of ampicillin and rifampicin, respectively. Cells were pelleted and re-suspended in infiltration buffer (50 mM MES, 2 mM Na₂PO₄, 0.5% glucose, 100 mM acetosyringone, pH 5.6). Flowers of waterlily at four days after above water level were kept at high humidity condition overnight and infiltrated with *Agrobacterium* cells (OD₆₀₀ = 0.2) using 1 mL syringe. Three petals were infiltrated with pJA8*F3H* and another three petals with pJAWOHL8. Infiltrated and non-infiltrated petals were observed for changes and harvested at 1 and 3 days (dpi) after *Agrobacterium* infiltration for RNA isolation and gene expression analysis.

2.6 Gene Expression Analysis Using sqPCR

Expression of *F3H* and *CHS* (located upstream of *F3H*) was studied using a sqPCR

technique with a combination of F3H14F and F3H10R primers for *F3H* or CHSF and CHSR primers for *CHS* gene analyses. The PCR was conducted with the following procedure: 94°C for 5min; 24-30 cycles of 94°C for 45s; 58°C for 45s; 72°C for 50s; and a final extension step at 72°C for 10min. The PCR products of 308 or 453 bp of *F3H* or *CHS*, respectively, were separated on 1% (w/v) agarose gels, stained with ethidium bromide, and visualised. The 18S rRNA was used as an endogenous control gene with primer pair 18-SF and 18-SR, resulting in a fragment of 600 bp. Sequences of oligonucleotide primers are listed in Table 1.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Cloning and Sequence Analysis of The *F3H* Gene

Complementary DNAs of the *F3H* gene from three cultivars, including one waterlily (variety St. Louis) and two lotus cultivars (Satabankacha and Buntharik), were cloned and sequenced. The cDNA sequences obtained from the three species were submitted to GenBank (www.ncbi.nlm.

nih.gov), and the accession numbers are KC151961, KC151962, and KC151963 for *Nymphaea* sp. var. St. Louis Gold, *Nelumbo nucifera* cv. Satabankacha, and *N. nucifera* cv. Buntharik, respectively. The freeware program BioEdit [15] was used to analyse their ORFs and sequence similarity. The *F3H* gene sequences obtained from all species consist of an ORF with 1,134 nucleotides, which encoded for 377 amino acids, and the translated sequences were identical. At least 2 introns were found when the sequence of cDNA and genomic DNA were aligned. Similar results were obtained from analysing five independent clones of each cultivar. The nucleotide and amino acid sequences of *F3H* were input into the BLASTN program, revealing high similarity to the *F3H* genes from other plant species including *Camellia nitidissima* (HQ290517), *Anthurium andraeanum*

(DQ972935), and *Gentiana triflora* (AB193311), with identity scores of 76, 73, and 69%, respectively (data not shown). This similarity analysis confirmed that this gene is commonly synthesised in plant genera, as many *F3H* genes from different species were obtained.

The amino acid sequences were aligned against the *F3H* proteins from other plant species using BioEdit, and phylogenetic trees were generated using the MEGA5 program [16] with 1,000 bootstrap replicates. The ORFs of both lotus cultivars (Satabankacha and Buntharik) and waterlily variety St. Louis Gold have identical amino-acid sequences. This precluded the grouping of *F3H* of lotus and waterlily into the same branch of evolution (Figure 1). The results supported the fact that *F3H* is a common regulating protein of high homology in plants [18, 19].

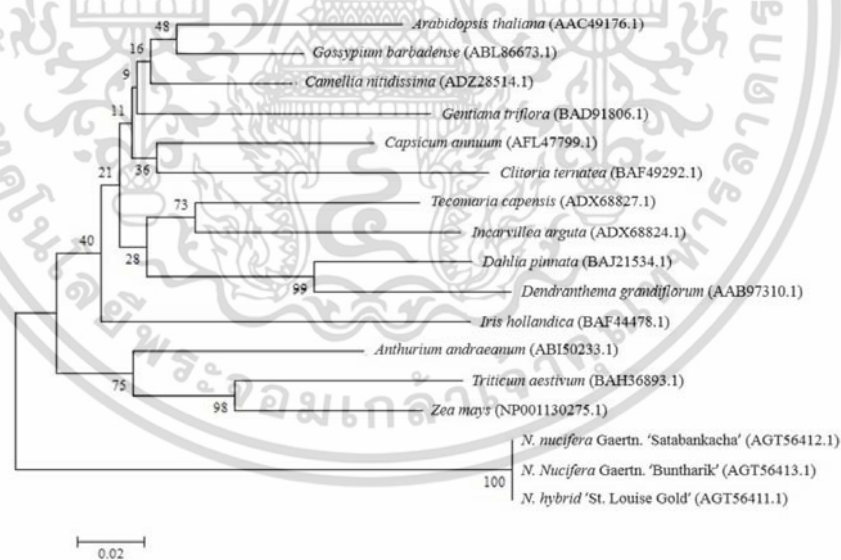


Figure 1. Genetic relationship of some known *F3H* proteins among plant species. The bars represent evolutionary distance. The reliability of the tree was checked by bootstrap analysis with 1,000 replicates.

3.2 Expression Study of The *F3H* Gene in Lotus and Waterlily

Gene expression can be used to predict levels of protein or enzymes being translated

by the gene. The *F3H* expression in different waterlily tissue was compared using sqPCR. The results could explain the specific regulation and necessity of *F3H* in this plant.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

In general, colour pigments that accumulate in flowers are derived from anthocyanins via the flavonoid biosynthetic pathway, and they support many biological functions like pollen development and protecting flowers against UV radiation [20]. The pigment found in leaves, on the other hand, is chlorophyll, which is generated by a different biosynthetic pathway. The three tissue types studied included petals, stamens, and leaves. In the St. Louis Gold variety, there was a marked yellow colour in both petals and

stamens. The results clearly showed a different expression among the three tissues, as shown in Figure 2a. The *F3H* gene is expressed abundantly in petals and stamens, while it was undetectable in leaf tissue. This finding supports the idea that this flavonoid gene is expressed only in the tissue where it is involved in an observed biological function [21]. Similarly, studies in *Gentiana triflora* and *Paeonia lactiflora* also have shown the expression of *F3H* in flowers but not in leaves [22, 23].

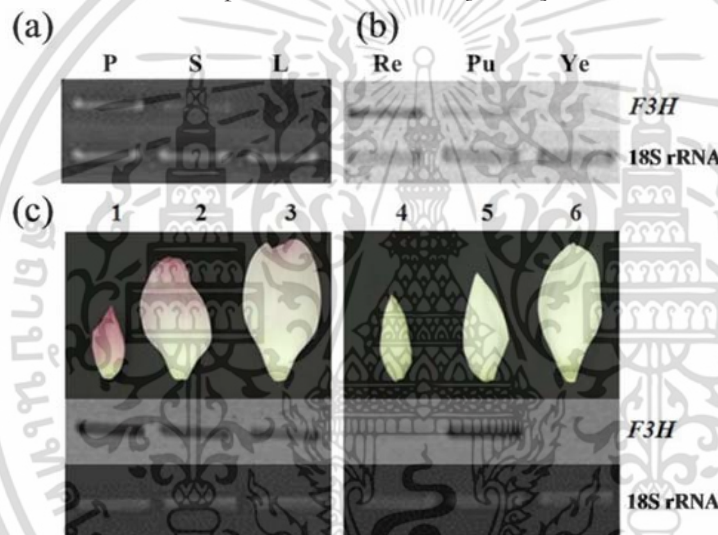


Figure 2. Relative transcription levels of *F3H* were determined by semi-quantitative PCR in (a) different tissue organs of waterlily (P: petal, S: stamen, L: leaf), (b) different coloured petals (Re: red petal, variety Royal Red; Pu: purplish blue petal, variety Teri Dunn; Ye: yellow petal, variety Lueang Garnjana) of waterlily, and (c) different flower stages of lotus cv. Satabankacha (1-3) or Buntharik (4-6), including the closed (1 and 4), half-opening (2 and 5), and fully-opening (3 and 6) flower stages. Expression of 18S rRNA was used as a control.

It has been shown that *F3H* is a key regulator for the flavonoid biosynthesis pathway [24] and plays a role in accumulation of anthocyanin pigments in the vacuole [25]. The *F3H* gene was found to be expressed in petals of different colour of flora, such as the purple petal colour of *Gentiana triflora* [26], purple petals of *Capsicum annuum* [27], pink petals of *Nicotiana tabacum* [28], pink petals of *Petunia hybrida* [29], and orange petals of

Dianthus caryophyllus [7]. To analyse the colour-dependent regulation of *F3H* in different colours of waterlily petals, three petal colours were collected and subjected to sqPCR. Using 18S rRNA as an equal-amount control of cDNA template for PCR reactions, *F3H* expression levels could be compared among red (variety Royal Red), purplish blue (Teri Dunn), and yellow (Lueang Garnjana) petals. The *F3H* gene was expressed more highly in

red, purplish blue, and yellow petals, in descending order (Figure 2b). This could be explained by the finding that anthocyanins are responsible for orange, pink, red, purple, and blue colouration [30]. Anthocyanins could also contribute to yellow colouration [30]; however, this pigment type can be derived from a different pathway that leads to aurone production, in the case of *Antirrhinum majus* [31]. Investigations in soybean have shown that the F3H enzyme was able to compete for the naringenin substrate with isoflavone synthase or IFS [32]. In this case, both anthocyanin and aurone shared an early step of the biosynthetic pathway, and F3H might compete with 42CGT for substrate from CHS through CHI, therefore, expression levels in pink and purple petals were higher than those in the yellow petals of waterlily.

Marked changes in lotus petal colour were observed during flowering. Consequently, lotus flowering was grouped into closed, half-opening, and fully-opening stages according to the colour change in the petals. The cultivar Satabankacha is a pink-petal lotus, however, the pink colour was found to fade away at the last stage of flowering. Expression of *F3H* in Satabankacha was almost unchanged during the first two stages, and it slightly declined when the flower was fully opened (Figure 2c). A similar expression pattern was reported in petals of *Gentiana triflora* cv. Maciry (blue-flower cultivar), where *F3H* expression increased during flower development, especially when the gentian flowers were dark purple at the fully-opening stage and decreased with maturation of the flower [22]. Zhao *et al.* [23] grouped *PIF3H* from *Paeonia lactiflora* as a member of flavonoid genes that gradually decreased with the development of flowers. Investigations in azalea (*Rhododendron pulchrum* cv. Oomurasaki) petals showed a different expression pattern. Azalea *F3H* was expressed only at the closed-

bud stage and decreased rapidly during flower development, suggesting that *F3H* is necessary for anthocyanin synthesis and that other genes later in the pathway controlled the pigmentation [33]. Buntharik lotus, whose petals are white, was found to be tinted with pink at the petal tips only at the closed and the half-opening stage, and the colour disappeared when the flower was fully opened. Expression of *F3H* was low during the closed stage, but it enhanced to a clearly detectable level at the half-opening stage (Figure 2d). The expression pattern of *F3H* in cultivar Buntharik confirmed the correlation between regulation of *F3H* and anthocyanin pigmentation of lotus flowers.

3.3 Transient Silencing of The *F3H* Gene in Flowers of Waterlily

The F3H protein has been identified as a key enzyme in the flavonoid pathway. The enzyme catalyses the formation of dihydroflavonoids from flavanones. Dihydroflavanones are precursors used by many enzymes for production of flavonoid compounds. Stable and transient silencing of *F3H* resulted in colour changes in many plants, such as carnation [7], petunia [34], and strawberry [35]. A functional study of *F3H* in response to flower colour in lotus using a transformation system is impractical due to the long time span needed to generate transgenic plants that reach flowering. *Agrobacterium* infiltration is, therefore, an effective, alternative method that has been successfully used for introducing the β -glucuronidase (*GUS*) gene into snapdragon (*Antirrhinum majus*) [36] and rose petals [37]. To investigate the function of *F3H* in lotus petals, an RNAi-mediated silencing construct was generated using Gateway technology. A fragment of *F3H* was cloned into a Gateway-compatible plant expression vector pJAWOHL8, and the pJA8*F3H* plasmid was

obtained and introduced into lotus petals using the *Agrobacterium* infiltration method. The vector produced an RNAi-mediated silencing construct after transcription and initiated interference of *F3H* expression in the target cell. To exclude any unexpected environmental factors, the transient expression was set up in the same waterlily flower where three petals were infiltrated with pJA8*F3H* and three other petals for pJAWOHL8 as controls. The infiltrated and non-infiltrated petals were observed for any changes and were harvested at 1 and 3 dpi. The experiment was done in 3 replicates (flowers) of each colour and the results were shown in Figure 3. Semi-quantitative PCR was conducted to analyse changes in expression levels using 18S rRNA as a cDNA control amount. Changes in *F3H* expression were barely detected at 1 dpi, but the expression was found to drastically decrease

at 3 dpi of variety Royal Red. A similar result was observed in the experiment on variety Teri Dunn while unchanged expression level was detected in variety Lueang Garnjana. Post transcription gene silencing (PTGS) of the *F3H* gene has been performed in rich-pigment flowers of plants including carnation (*Dianthus caryophyllus*) [7] and petunia (*Petunia hybrida*) [34] and of fruits like strawberry [35]. Stable transformation using *Agrobacterium*-mediated methods resulted in modification of *F3H* expression, pigment alteration, and flavonoid production [7, 35]. Changes in *CHS* expression were undetectable, although the *F3H* level decreased (Figure 3). It has been clearly shown by immunoblotting in *Arabidopsis tt6*, where *F3H* was mutated and resulted in a null *F3H* enzyme production, that the *CHS* enzyme production was not affected [38].

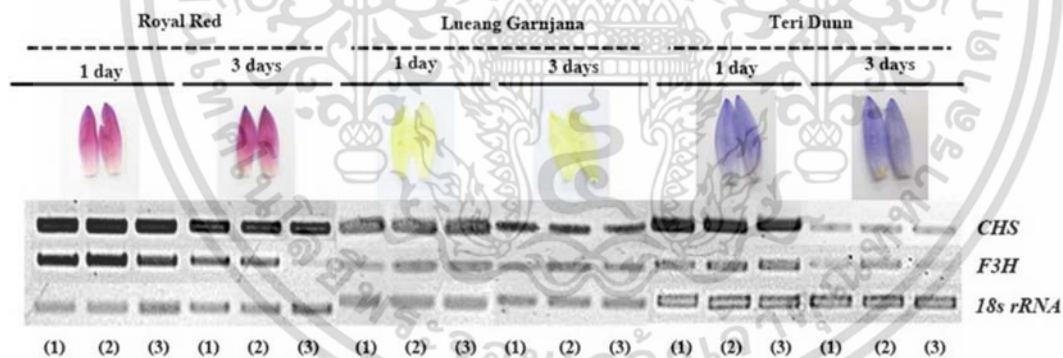


Figure 3. Transient silencing of the lotus *F3H* gene was carried out in waterlily petals by *Agrobacterium* infiltration. Transcription levels of *F3H* and *CHS* were compared by semi-quantitative PCR among non-infiltrated petals (1), petals infiltrated with pJAWOHL8 (2), and pJA8*F3H* (3) at 1 and 3 days post infiltration. Three varieties of waterlily were used: Royal Red, Lueang Garnjana, and Teri Dunn. Expression of 18S rRNA was used as a control.

In the experiment described here, the change in petal colour of *Agrobacterium*-infiltration lines could not be observed at 3 dpi. Nonetheless, the experiment involving transient silencing was carried out in mature waterlily flowers whose pigmentation

processes were completed. Therefore, suppression of a gene that is involved in an early step of the pathway, such as *F3H*, did not affect production of flavonoids and caused no visible phenotype. However, the PTGS is successfully activated, as *F3H*

expression is suppressed in petal tissue of waterlily, as shown by sqPCR. The results confirmed that pJA8F3H could be used as a transient transformation vector to suppress F3H expression in waterlily and lotus.

4. CONCLUSIONS

Flavanone 3-hydroxylase (F3H) genes isolated from *Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. Buntharik and cv. Satabankacha as well as *Nymphaea* sp. var. St. Louis Gold were identical at the nucleotide level and shared high homology at the amino acid level to F3H from different plant species. Expression of F3H was specifically regulated in petals and stamens, but less was found in leaves of waterlily. The F3H gene was more highly expressed in red, purplish blue, and yellow petals, in descending order, when comparing its expression according to colouration in waterlily using the sqPCR technique. The F3H expression was found to relate to flowering stage; its expression was slightly diminished in petals of cultivar Satabankacha (pink petal lotus) at the fully-opening stage, while it was detected in cultivar Buntharik only when white petals were tinted with pink. Silencing of F3H expression using the *Agrobacterium*-infiltration method and sqPCR technique was conducted in waterlily. The F3H expression was down-regulated at 3 dpi in red petal and purplish blue petal variety compared to controls. The results demonstrated that an RNAi gene-silencing vector, pJA8F3H, encoding a hairpin F3H RNA, was efficient at suppressing F3H expression in waterlily and could be used as a transient transformation vector.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Sebastian Schornack (The Sainsbury Laboratory Norwich, UK) for providing the pJAWOHL8 vector. We also

gratefully acknowledge Antony Buchala (University of Fribourg, Switzerland) for his critical reading of the manuscript. This research was partially supported by King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang and the Centre of Excellence on Agricultural Biotechnology, Science, and Technology Postgraduate Education and Research Development Office, office of Higher Education Commission, Ministry of Education (AG-BIO/PERDO-CHE).

REFERENCES

- [1] Iwashina T., *Biol. Sci. Space*, 2003; **17**: 24-44. DOI 10.2187/bss.17.24.
- [2] Iwashina T., *J. Plant Res.*, 2000; **113**: 287-299. DOI 10.1007/PL00013940.
- [3] Andersen Ø.M. and Markham K.R., *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*, CRC, Taylor & Francis, Boca Raton, FL, 2006.
- [4] Holton T.A. and Cornish E.C., *Plant Cell*, 1995; **7**: 1071-1083. DOI 10.1105/tpc.7.7.1071.
- [5] Nakatsuka T., Mishibaa K.I., Abe Y., Kubota A., Kakizaki Y., Yamamura S. and Nishihara M., *Plant Biotechnol.*, 2008; **25**: 61-68. DOI 10.5511/plantbiotechnology.25.61.
- [6] Nishihara M., Nakatsuka T. and Yamamura S., *FEBS Lett*, 2005; **579**: 6074-6078. DOI 10.1016/j.febslet.2005.09.073.
- [7] Zuker A., Tzfira T., Ben-Meir H., Ovadis M., Shklarman E., Itzhaki H., Forkmann G., Martens S., Neta-Sharir I., Weiss, D. and Vainstein A., *Mol. Breed.*, 2002; **9**: 33-41. DOI 10.1023/A:1019204531262.
- [8] Aida R., Kishimoto S., Tanaka Y. and Shibata M., *Plant Sci.*, 2000; **153**: 33-42. DOI 10.1016/S0168-9452(99)00239-3.

- [9] Martin C., Prescott A., Mackay S., Bartlett J. and Vrijlandt E., *Plant J.*, 1991; **1**: 37-49. DOI 10.1111/j.1365-313X.1991.00037.x.
- [10] Britsch L., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1990; **276**: 348-354. DOI 10.1016/0003-9861(90)90731-D.
- [11] Peer W.A., Brown D.E., Tague B.W., Muday G.K., Taiz L. and Murphy A.S., *Plant Physiol.*, 2001; **126**: 536-548. DOI 10.1104/pp.126.2.536.
- [12] Singh Z. and Whale S.K., *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 2007; **132**: 20-28.
- [13] Flachowsky H., Halbwirth H., Treutter D., Richter K., Hanke M.V., Szankowski I., Gosch C., Stich K. and Fischer T.C., *Plant Physiol. Biochem.*, 2012; **51**: 18-25. DOI 10.1016/j.plaphy.2011.10.004.
- [14] Lopez-Gomez R. and Gomez-Lim M.A., 1992; **27**: 440-442.
- [15] Hall T.A., *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 1999; **41**: 95-98. DOI 10.1021/bk-1999-0734.ch008.
- [16] Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. and Kumar S., *Mol. Biol. Evol.*, 2011; **28**: 2731-2739. DOI 10.1093/molbev/msr121.
- [17] Zottini M., Barizza E., Costa A., Formentin E., Ruberti C., Carimi F. and Lo Schiavo F., *Plant Cell Rep.*, 2008; **27**: 845-853. DOI 10.1007/s00299-008-0510-4.
- [18] Britsch L., Dedio J., Saedler H. and Forkmann G., *Eur. J. Biochem.*, 1993; **217**: 745-754. DOI 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18301.x.
- [19] Tanner G., Condensed Tannins; In Davies, K.M., ed., *Plant Pigments and their Manipulation*, Sheffield Academic Press, Sheffield, 2004.
- [20] Shirley B.W., *Trends Plant Sci.*, 1996; **1**: 377-382. DOI 10.1016/S1360-1385(96)80312-8.
- [21] Himi E., Maekawa M. and Noda K., *Int. J. Plant Genomics*, 2011; DOI 10.1155/2011/369460. DOI 10.1155/2011/369460.
- [22] Nakatsuka T., Nishihara M., Mishiba K. and Yamamura S., *Plant Sci.*, 2005; **168**: 1309-1318. DOI 10.1016/j.plantsci.2005.01.009.
- [23] Zhao D., Tao J., Han C. and Ge J., *Mol. Biol. Rep.*, 2012; **39**: 11263-11275. DOI 10.1007/s11033-012-2036-7.
- [24] Owens D.K., Crosby K.C., Runac J., Howard B.A. and Winkel B.S., *Plant Physiol. Biochem.*, 2008; **46**: 833-843. DOI 10.1016/j.plaphy.2008.06.004.
- [25] Ageorges A., Fernandez L., Vialet S., Merdinoglu D., Terrier N. and Romieu C., *Plant Sci.*, 2006; **170**: 372-383. DOI 10.1016/j.plantsci.2005.09.007.
- [26] Nakatsuka T., Nishihara M., Mishiba K. and Yamamura S., *Plant Sci.*, 2005; **169**: 949-958. DOI 10.1016/j.plantsci.2005.06.013.
- [27] Deng M.H., Wen J.F., Huo J.L., Zhu H.S., Dai X.Z., Zhang Z.Q., Zhou H. and Zou X.X., *Afr. J. Biotechnol.*, 2012; **11**: 2389-2397. DOI 10.5897/AJB11.3205.
- [28] Nakatsuka T., Abe Y., Kakizaki Y., Yamamura S. and Nishihara M., *Plant Cell Rep.*, 2007; **26**: 1951-1959. DOI 10.1007/s00299-007-0401-0.
- [29] Lukacin R., Urbanke C., Groning I. and Matern U., *FEBS Lett.*, 2000; **467**: 353-358. DOI 10.1016/S0014-5793(00)01116-9.
- [30] Forkmann G., *Plant Breeding*, 1991; **106**: 1-26. DOI 10.1111/j.1439-0523.1991.tb00474.x.
- [31] Ono E., Fukuchi-Mizutani M., Nakamura N., Fukui Y., Yonekura-Sakakibara K., Yamaguchi M., Nakayama T., Tanaka T., Kusumi T. and Tanaka Y., *P. Natl. Acad.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Sci. USA*, 2006; **103**: 11075-11080. DOI 10.1073/pnas.0604246103.
- [32] Yu O., Shi J., Hession A.O., Maxwell C.A., McGonigle B. and Odell J.T., *Phytochemistry*, 2003; **63**: 753-763. DOI 10.1016/S0031-9422(03)00345-5.
- [33] Nakatsuka A., Mizuta D., Kii Y., Miyajima I. and Kobayashi N., *Sci. Hort.*, 2008; **118**: 314-320. DOI 10.1016/j.scienta.2008.06.016.
- [34] Tsuda S., Fukui Y., Nakamura N., Katsumoto Y., Yonekura-Sakakibara K., Fukuchi-Mizutani M., Ohira K., Ueyama Y., Ohkawa H., Holton T.A., Kusumi T. and Tanaka Y., *Plant Biotechnol.*, 2004; **21**: 377-386. DOI 10.5511/plantbiotechnology.21.377.
- [35] Jiang F., Wang J.Y., Jia H.F., Jia W.S., Wang H.Q. and Xiao M., *J. Plant Growth Regul.*, 2013; **32**: 182-190. DOI 10.1007/s00344-012-9289-1.
- [36] Shang Y., Schwinn K., Bennett M., Hunter D., Waugh T., Pathirana N., Brummell D., Jameson P. and Davies K., *Plant Methods*, 2007; **3**: 1-12. DOI 10.1186/1746-4811-3-1.
- [37] Yasmin A. and Debener T., *Plant Cell Tiss. Org.*, 2010; **102**: 245-250. DOI 10.1007/s11240-010-9728-2.
- [38] Pelletier M., Burbulis I. and Winkel-Shirley B., *Plant Mol. Biol.*, 1999; **40**: 45-54. DOI 10.1023/A:1026414301100.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น และปัจจัยแสง ที่มีต่อการเกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์อุษทรก และการทดสอบความเข้มข้นสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีน
Effect of Explant Types and Light on Callus and Antibiotic Kanamycin Resistance Detection of Lotus (Nelumbo nucifera Gaertn.)

วิลาลินี ลีทวีทรัพย์¹ สุเม อรัญนารต^{1,2} และ กัญจนา แซ่เตียว^{1,2}

Wilasinee Leethaweewsup¹ Sumay Aranyanart^{1,2} and Kanjana Saetiew^{1,2}

¹สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

¹ Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520

²ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

² Department of Horticulture Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์อุษทรก ภายใต้ปัจจัยแสง สีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) โดยใช้ชิ้นส่วนตาชอดจากเอ็มบริโอ และก้านใบจากเอ็มบริโอ เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 16 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนตาชอด และชิ้นส่วนก้านใบ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ใกล้เคียงกัน โดยชิ้นส่วนตาชอดจากเอ็มบริโอมีคะแนนการเจริญเติบโตแคลลัสสูงสุด คือ 3.80 คะแนน โดยแคลลัสมีลักษณะเกาะกันหลวมๆ มีสีเขียว ช้ำน้ำ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาชอด และชิ้นส่วนก้านใบ ภายใต้แสงสีแดง (red light) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงในแสงสีขาว (white light) ชิ้นส่วนก้านใบจะมีขนาดที่เพิ่มขึ้นมากกว่าชิ้นส่วนตาชอด

การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin สำหรับใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง โดยนำชิ้นส่วนตาชอดจากเอ็มบริโอ และเอ็มบริโอ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin เข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนตาชอดจากเอ็มบริโอที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่ทำให้ชิ้นส่วนตาชอดจากเอ็มบริโอ มีสีน้ำตาลทั้งหมด ชิ้นส่วนเอ็มบริโอทั้งชิ้นนั้น ยังสามารถอยู่รอดได้ในทุกความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ทดสอบ

ABSTRACT

Effect of explant types and light on callus growth of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) cv. Buntharik were studied. The apical buds and petioles from embryo were cultured on Murashige and Skoog (1962) medium containing a combination of 40 μM NAA (α -Naphthaleneacetic acid) and 0.5 μM TDZ (Thidiazuron) under 16 hours of white light for 16 weeks. It was found that all explants produced callus. The callus induction was produced from both apical buds and petioles. The callus was friable and green and the highest score of callus growth was 3.80. The both explants cultured under red light also showed the same result as the white light.

The kanamycin concentration was tested for selection of transgenic plant. The apical buds from embryo and embryos cultured on MS medium supplemented with 0, 50, 100, 200 and 300 mg/l kanamycin for 8 weeks. The explants were removed to new selective medium every 2 weeks. It was found that 50 mg/l kanamycin was the lowest concentration which the apical buds could not grow. However, the embryo could grow in all selective medium.

Keyword: apical buds, petioles, embryo, kanamycin, lotus

E-mail address: sss_dear@hotmail.com

คำนำ

บัวหลวงเป็นพืชสกุลหนึ่งที่รู้จักกันเป็นอย่างดีทั้งในประเทศไทย ประเทศในเขตร้อน เขตอบอุ่น และเขตหนาว นอกจากจะนำดอกมาใช้ประโยชน์แล้ว ส่วนอื่นๆยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ด้วย เนื่องจากเป็นพืชที่ปลูกง่าย และขึ้นได้ดีทั่วไป จึงพบว่ามีทั้งที่ขึ้นเองตามธรรมชาติ และที่มีผู้นำมาปลูกเพื่อเป็นไม้ประดับตามบ้านในกระถาง บ่อ หรือ ทุ่งน้ำ ตลอดจนปลูกเป็นจำนวนมากที่เรียกว่า นาบัว เพื่อเป็นการค้าโดยตัดดอก หรือเก็บเมล็ดขาย ปัจจุบันสมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทยได้จัดบัวหลวงเป็นพืชสมุนไพรอีกชนิดหนึ่ง (วาสนา มิตรานนท์. 2527) บัวหลวงพันธุ์นุญชริก (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) เป็นบัวหลวงสายพันธุ์หนึ่งที่มีดอกสีขาวขนาดใหญ่ ปลายกลีบมีสีชมพูเรื่อยๆ ดอกรา ดอกตูมเป็นรูปไข่ปลายเรียว (เสริมลาภ วสุวัต. 2537) เป็นบัวหลวงพันธุ์หนึ่งที่นิยมนำมาใช้งาน แต่บัวหลวงมักมีปัญหาในการใช้ประโยชน์ได้น้อยวัน (จินตนา ไทยลิมทอง และ ลาวัลย์ สุขมนตรี. 2536) กลีบดอกจะเหี่ยว และร่วงเร็ว (สายชล เกตุษา. 2531; บุญเกื้อ ทหาราช. 2537) รูปทรงของดอกและสีมีให้เลือกจำกัด (จารีย์ หอยทอง. เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต)

2519) จึงควรปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงให้มีคุณภาพดี (วิจัย ภูมิปัญญาานิช.2543)

จากสภาพปัญหาที่กล่าวมาจึงได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นหนึ่งในเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ได้ เนื่องจาก แคลลัสสามารถนำไปใช้ในการผลิตโปรโตพลาสต์ การผลิตสารทุติยภูมิ การผลิตพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด และการผลิตพืชทนทานหรือพืชต้านทานได้ (ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538; รังสฤษฎ์ กาวิต๊ะ. 2541) อีกทั้งแคลลัสเป็นเนื้อเยื่อที่เหมาะสม สำหรับนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ โดยการถ่ายยีนต่อไปในอนาคต แต่การชักนำให้เกิดแคลลัสมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่างจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการชักนำแคลลัสเพื่อที่จะได้แคลลัสไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงบัวหลวงพันธุ์นุญชริกต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปัจจัยแสง และชิ้นส่วนที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสบัวหลวงพันธุ์นุญชริก

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เพื่อทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง

อุปกรณ์และวิธีการ

พอกฆ่าเชื้อเมล็ดบัวด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที คลอโรกด์ 50 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับทวิน 20 2 หยด นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อ 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที จากนั้นทำการตัดชิ้นส่วนตายอด และชิ้นส่วนก้านใบจากเอมบริโอ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Murashige and Skoog (1962) ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้ปัจจัยแสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 16 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ 2x2 factorial in CRD ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ปัจจัย 1 แสงสีที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) ปัจจัย 2 ชิ้นส่วนที่นำมาทดสอบ ได้แก่ ตายอด และก้านใบจากเอมบริโอ บันทึกผล ทำการวัดการเจริญเติบโต และขนาดของชิ้นส่วน ทุกสัปดาห์ และการทดลองที่ 2 ทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่เหมาะสมในการใช้เป็นสารคัดเลือกสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง โดยใช้ชิ้นส่วนตายอดจากเอมบริโอ และเอมบริโอ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Murashige and Skoog (1962) ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin เข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการวัดการเจริญเติบโต และขนาดของชิ้นส่วน ทุกสัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 5 วิธีการ วิธีการละ 3 ซ้ำๆ ละ 6 ชิ้น

การทดลองที่ 1 บันทึกผลการเจริญเติบโตเป็นเวลา 16 สัปดาห์ โดยการให้คะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสคือคะแนน 1 ชิ้นส่วนตาย คะแนน 2 ชิ้นส่วนมีสีเหลือง ขาวหรือน้ำตาล แสดงอาการเริ่มตาย คะแนน 3 ชิ้นส่วนคงสภาพเดิม มีสีเขียวอ่อน คะแนน 4 ชิ้นส่วนที่มีแคลลัสเกิดขึ้น แคลลัสมีลักษณะเป็นเม็ดละเอียดเกาะกันแน่นสีเขียวเข้ม คะแนน 5 ชิ้นส่วนมีแคลลัสเกิดขึ้น และ

มีลักษณะที่เจริญเป็นยอด และการทดลองที่ 2 ทำการทดลองโดยใช้ 2 ชิ้นส่วน คือ ตายอดจากเอมบริโอ และเอมบริโอ บันทึกผลการเจริญเติบโตเป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยการบันทึกเปอร์เซ็นต์การตาย และขนาด

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 ศึกษาชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

การเจริญเติบโตแคลลัส ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light)

จากการศึกษาการเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนตายอด และก้านใบจากเอมบริโอ ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) โดยนำชิ้นส่วนทั้ง 2 ชนิด มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ พบว่า ทุกๆ สัปดาห์คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนทั้ง 2 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) และพบว่า ชิ้นส่วนจากเอมบริโอ ทั้ง 2 ชนิด สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ โดยชิ้นส่วนก้านใบจะมีคะแนนเฉลี่ยการเจริญเติบโตมีแนวโน้มที่เจริญดีกว่าในส่วนของตายอด เมื่อเลี้ยงในสภาพแสงสีแดง (red light) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของภักดีภักดีงาม (2547) ทดลองศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต และแสงต่อการเกิดโชมาทิคเอมบริโอจินิกซิสของบัวหลวงพันธุ์บุณทริก โดยนำชิ้นส่วนตายอด และก้านใบจากเอมบริโอ และตาจากไหล มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสง cool white fluorescent พบว่า ทุกชิ้นส่วนสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยชิ้นส่วนตายอด และก้านใบจากเอมบริโอ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และสูตรอาหารดังกล่าวยังสามารถชักนำให้เกิดโชมาทิคเอมบริโอจินิกซิสได้ดีที่สุด และจะดีมากขึ้นเมื่อลดสูตรอาหาร

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การประชุมวิชาการการนำเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 1

สำนักบริหารวิชาการ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

28 สิงหาคม 2551

ครึ่งหนึ่ง และเพาะเลี้ยงร่วมกับแสงสีแดง (red light) และ จิตเกษม เทียงจิตต์ (2545) ทดลองศึกษาผลของชิ้นส่วน เริ่มต้น และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำ แคลลัสบัวหลวงพันธุคุณกริช โดยใช้ เอ็มบริโออ่อน ตา ไหล และตาไหลจากเอ็มบริโอ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร แข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.25 ไมโครโมลาร์ พบว่า ชิ้นส่วนตาไหลจาก เอ็มบริโอมีคะแนนการเจริญของแคลลัสดีที่สุด

ขนาดแคลลัสภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light)

การเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนตายอด และก้านใบ จากเอ็มบริโอ ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) โดยนำชิ้นส่วนตายอด และ ชิ้นส่วนก้านใบ เลี้ยงในสูตรอาหารและสารควบคุมการ เจริญเติบโตดังที่กล่าวมา เมื่อพิจารณาผลของขนาดการ เจริญเติบโตพบว่า ภายใต้แสงสีขาว (white light) และ ภายใต้แสงสีแดง (red light) ขนาดการเจริญเติบโตของ ชิ้นส่วนทั้ง 2 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ (ตารางที่ 2) โดยเมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยขนาด ของแคลลัสของชิ้นส่วนทั้งสอง พบว่า ในทุกๆสัปดาห์ ขนาดของแคลลัสจะเพิ่มขึ้น และขนาดชิ้นส่วนก้านใบจะ ขยายขนาดใหญ่ขึ้นกว่าชิ้นส่วนตายอด

ตารางที่ 1 การเจริญเติบโตแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้านใบจากเอ็มบริโอ บนอาหาร สูตร MS ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light)

แสง	ชิ้นส่วน	การเจริญเติบโตแคลลัส (คะแนน)							
		อายุ (สัปดาห์)							
		2	4	6	8	10	12	14	16
แสงสีขาว (White light)	ตายอด	3.00±0.00	2.86±0.13	2.73±0.17	2.60±0.23	2.86±0.26	3.40±0.34	3.40±0.30	3.80±0.23
	ก้านใบ	3.00±0.11	3.00±0.00	2.80±3.14	2.60±0.00	2.66±0.13	3.15±0.18	3.20±0.20	3.20±0.20
แสงสีแดง (red light)	ตายอด	2.86±0.13	2.86±0.13	2.86±0.13	2.80±0.20	2.41±0.41	2.25±0.52	2.00±0.50	1.58±0.36
	ก้านใบ	3.00±0.11	2.93±0.06	2.73±0.13	3.00±0.00	2.93±0.06	2.93±0.48	3.13±0.59	2.93±0.46
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV%		6.15	5.93	8.03	9.62	16.44	23.88	25.30	20.02

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 2 ขนาดของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงส่วนของตายอด และก้านใบจากเอ็มบริโอ บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ ภายใต้แสงสีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light)

แสง	ชิ้นส่วน	ขนาดของแคลลัส (ตารางเซนติเมตร)							
		อายุ (สัปดาห์)							
		2	4	6	8	10	12	14	16
แสงสีขาว (White light)	ตายอด	0.20±0.01	0.36±0.02	0.49±0.03	0.55±0.06	0.81±0.09	1.06±0.12	1.42±0.17	1.84±0.23
	ก้านใบ	0.26±0.01	0.50±0.00	0.69±0.01	0.70±0.01	1.11±0.11	1.70±0.18	2.04±0.19	2.34±0.21
แสงสีแดง (red light)	ตายอด	0.33±0.10	0.37±0.05	0.52±0.08	0.80±0.15	0.79±0.17	1.00±0.27	1.05±0.17	0.82±0.16
	ก้านใบ	0.32±0.03	0.54±0.03	0.72±0.06	0.85±0.05	1.10±0.15	1.32±0.16	1.30±0.30	1.61±0.36
F-test		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV%		33.34	12.94	16.19	23.34	25.22	26.63	25.96	26.81

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นใด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2 ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ใช้ในการเป็นสารคัดเลือกรับ การเจริญเติบโต และขนาดของชิ้นส่วนตายออกจากเอ็มบริโอ บนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ใช้ในการเป็นสารคัดเลือกรับ ในชิ้นส่วนตายออกจากเอ็มบริโอ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin เข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ในอาหารคัดเลือกรับทุกวิธีการ จะมีเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้นในทุกสัปดาห์ โดยในสัปดาห์ที่ 1 ชิ้นส่วนตายออก ในอาหารคัดเลือกรับมีลักษณะที่คล้ายกัน คือ ชิ้นส่วนยังมีสีเขียวอ่อน (ตารางที่ 3) โดยมีคะแนนการเจริญเติบโต ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การตายคือ 0.00 เปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 ชิ้นส่วนตายออก ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin (control) ลักษณะชิ้นส่วนยังมีสีเขียว แต่ในอาหารคัดเลือกรับที่ความเข้มข้นต่างๆ ชิ้นส่วนมีลักษณะที่เริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง โดยจะมีเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้นในทั้ง 2 สัปดาห์ ในสัปดาห์ที่ 4 ถึงสัปดาห์ที่ 6 ชิ้นส่วนตายออกที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin (control) มีลักษณะชิ้นส่วนเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล และในอาหารคัดเลือกรับความเข้มข้นอื่นๆ มีลักษณะชิ้นส่วนเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีขาว จนกระทั่งในสัปดาห์ที่ 8 และในสัปดาห์ที่ 8 นี้พบว่า มีเพียง ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรของ kanamycin ที่มีความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด ที่ทำให้ชิ้นส่วนตายออกมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลปนเหลืองทุกชิ้นส่วน และไม่สามารถเจริญเติบโตได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายเป็น 72.27 เปอร์เซ็นต์ และทุกสัปดาห์ที่กล่าวมาไม่มีการเกิดเป็นแคลลัส เมื่อพิจารณาจากสีของชิ้นส่วนที่เปลี่ยนไป โดยดูจากคะแนนการเจริญเติบโต (เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วน) จะเห็นได้ชัดกว่า ดังภาพที่ 1 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Supak et al. (2005) ทดลองศึกษาการถ่ายยีนในปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พังก์ โดยใช้ส่วนของ

retarded shoots พบว่าสามารถคัดเลือกรับชิ้นส่วนที่ต้านทานต่อ kanamycin ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และในการทดลองของชฎานิศ ศรีนิภา ดล (2550) ทดลองศึกษาความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin ของเนื้อเยื่อปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า kanamycin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ทำให้ชิ้นส่วนปทุมมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งหมด และในการทดลองของประวีณา ภูมิรัตน์รุ่งโรจน์ และคณะ (2546) ทดลองศึกษาเบื้องต้นในการส่งถ่ายยีนสู่กล้วยไม้เอื้องเงิน โดย *Agrobacterium tumefaciens* พบว่า kanamycin ความเข้มข้น 150 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของโพรโทคอร์รัม และต้นอ่อนเอื้องเงินได้ตามลำดับ และ ในการทดลองของ รงรอง หอมหวล และคณะ (2543) ทดสอบเบญจมาศพันธุ์ดอกสีเหลือง เมื่อนำข้อมาเลี้ยงในอาหารที่มี kanamycin ที่ระดับความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500 ppm พบว่าในทุกระดับความเข้มข้นสามารถทำให้ข้อมเบญจมาศตายได้ และในการทดลองของ รงรอง หอมหวล (2541) ทดลองการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสชนิด embryogenic callus ที่เจริญมาจากใบของกุหลาบ (*Rosa hybrida*) พันธุ์ Carl Red โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* (A281/pBI121) เป็นพาหะ ซึ่งเชื้อ A281/pBI121 มี GUS gene เป็น marker gene และมี kanamycin เป็น antibiotic resistant gene (NPTII gene) จากการทดลองพบว่าสามารถคัดเลือกรับแคลลัสที่ต้านทานต่อ kanamycin ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนแคลลัสทั้งหมด

การเจริญเติบโต และขนาดของชิ้นส่วนเอ็มบริโอ บนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ใช้ในการเป็นสารคัดเลือกรับ ในชิ้นส่วนเอ็มบริโอ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin เข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ในทุกสัปดาห์การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้เพื่อการค้าหรือการเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์ได้ หากมีข้อสงสัยประการใด กรุณาติดต่อสำนักบริหารวิชาการ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โทร. 0-2616-0000

การประชุมวิชาการการนำเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 1

สำนักบริหารวิชาการ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

28 สิงหาคม 2551

เจริญเติบโตจะลดลงทุกสัปดาห์ และมีความแตกต่างกัน
 ยิ่งทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 2, 3 และ 4 (ตารางที่ 5) แต่
 เอมบริโอยังสามารถอยู่รอดได้ในทุกความเข้มข้นของ
 สารปฏิชีวนะ kanamycin และพัฒนาไปเป็นต้น และ
 ยอดของบัวที่เกิดขึ้นใหม่ จะมีสีชมพู และขาว ในแต่ละ
 ความเข้มข้น และชิ้นส่วนมีขนาดเพิ่มขึ้นในทุกสัปดาห์
 และในทุกความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ (ตารางที่ 6)
 แต่เมื่อพิจารณาจากคะแนนการเจริญเติบโตที่คิดเป็น
 เปอร์เซ็นต์การตาย จะเห็นว่าในความเข้มข้นของสาร
 ปฏิชีวนะ kanamycin ที่ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
 จะทำให้การเจริญเติบโตลดลงมากกว่าในความเข้มข้น
 อื่นๆ และที่ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin
 ที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้ยอดของบัวมีสีขาวซีด
 ต่างจากความเข้มข้นอื่นในการทดลอง ที่ยอดบัวจะมีสี

ชมพูปนเขียว ลักษณะของต้นในแต่ละความเข้มข้นแสดง
 ในภาพที่ 2 ซึ่งสาเหตุที่ทำให้ชิ้นส่วนเอมบริโอไม่ตายนั้น
 อาจเนื่องมาจากชิ้นส่วนมีขนาดใหญ่เกินไป ทำให้ความ
 เข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ใส่ลงไปได้ผลไม่
 ดีเช่นเดียวกับงานทดลองของ วันเพ็ญ ศรีทองชัย (2546)
 ในขั้นตอนการคัดเลือก embryogenic callus ของแตงกวา
 พันธุ์เจ็ดใบ คัดเลือกในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ
 kanamycin ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วน
 จะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีขาวซีด ยุบตัวเป็นก้อน
 เหนียว และตาย คิดเป็นเปอร์เซ็นต์คือ 21 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง
 สูตรอาหารคัดเลือกที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิดจะ
 แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืชนั้นๆ และ
 ชิ้นส่วน

ตารางที่ 3 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตายออกจากเอมบริโอ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม สารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ kanamycin (mg/l)	เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วน/อายุ (สัปดาห์) ^{1/}							
	1	2	3	4	5	6	7	8
control	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00 ^c	17.80±2.20 ^b	22.27±2.26 ^c	23.33±8.81 ^b	24.47±15.57 ^b	28.47±15.21 ^b
50	0.00±0.00	17.80±2.22	27.80±6.17 ^b	50.06±1.90 ^a	54.47±0.14 ^a	54.47±2.93 ^a	61.13±1.13 ^a	72.27±4.82 ^a
100	0.00±0.00	23.33±8.81	37.80±2.20 ^{ab}	47.80±4.02 ^a	51.13±0.29 ^{ab}	52.27±1.13 ^a	54.47±2.93 ^a	54.47±2.93 ^{ab}
200	0.00±0.00	22.26±2.26	35.60±2.20 ^{ab}	41.13±1.13 ^a	41.13±0.05 ^b	42.27±3.97 ^a	44.47±4.46 ^{ab}	45.60±4.02 ^{ab}
300	0.00±0.00	17.80±11.75	40.00±0.00 ^a	41.20±2.94 ^a	41.80±0.14 ^b	42.26±4.82 ^a	42.27±2.26 ^{ab}	48.93±5.87 ^{ab}
CV%	0.00	71.69	18.97	23.29	27.33	29.13	29.06	26.88

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่อักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4 ขนาดของชิ้นส่วนตายออกจากเอมบริโอ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม สารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ kanamycin (mg/l)	ขนาดตายออกจากเอมบริโอ (ตารางเซนติเมตร)/อายุ (สัปดาห์) ^{1/}							
	1	2	3	4	5	6	7	8
control	0.21±0.00 ^b	0.21±0.00 ^b	0.62±0.07 ^a	1.03±0.13 ^a	1.11±0.14 ^a	1.20±0.14 ^a	1.32±0.14 ^a	1.53±0.14 ^a
50	0.21±0.00 ^b	0.21±0.00 ^b	0.32±0.00 ^b	0.39±0.00 ^b	0.51±0.04 ^b	0.59±0.00 ^b	0.59±0.00 ^b	0.58±0.00 ^b
100	0.32±0.00 ^a	0.32±0.00 ^a	0.39±0.00 ^b	0.45±0.02 ^b	0.40±0.00 ^b	0.38±0.01 ^b	0.38±0.01 ^b	0.36±0.01 ^b
200	0.34±0.01 ^a	0.34±0.01 ^a	0.38±0.01 ^b	0.38±0.01 ^b	0.47±0.02 ^b	0.48±0.02 ^b	0.48±0.02 ^b	0.47±0.03 ^b
300	0.34±0.01 ^a	0.34±0.01 ^a	0.37±0.01 ^b	0.39±0.02 ^b	0.41±0.04 ^b	0.52±0.07 ^b	0.48±0.06 ^b	0.43±0.08 ^b
CV%	7.13	7.13	13.61	21.05	21.12	20.43	19.04	19.62

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่อักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การประชุมวิชาการการนำเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 1

สำนักบริหารวิชาการ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

28 สิงหาคม 2551

ตารางที่ 5 คะแนนการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนอมบริโอ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม สารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นต่างๆ

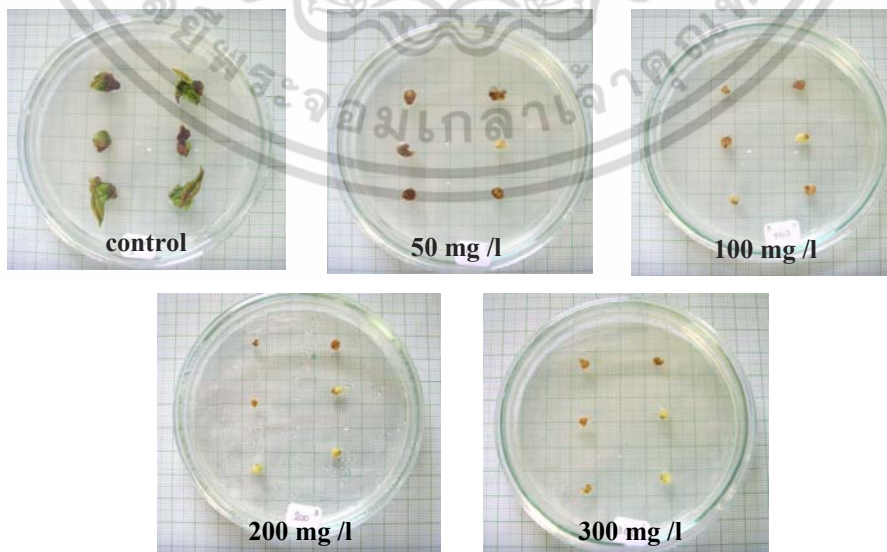
ความเข้มข้นของ kanamycin (mg/l)	เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วน/อายุ (สัปดาห์) ^{1/}							
	1	2	3	4	5	6	7	8
control	0.00±0.00	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^b	6.66±0.33 ^b	20.00±0.00 ^b	20.00±0.00 ^b	20.00±0.00 ^b
50	0.00±0.00	20.00±0.00 ^b	20.00±0.00 ^b	40.00±0.00 ^a	40.00±0.00 ^a	40.00±0.00 ^a	40.00±0.00 ^a	40.00±0.00 ^a
100	0.00±0.00	20.00±0.00 ^c	20.00±0.00 ^{ab}	40.00±0.00 ^a	40.00±0.00 ^a	40.00±0.00 ^a	40.00±0.00 ^a	40.00±0.00 ^a
200	0.00±0.00	20.00±0.00 ^d	20.00±0.00 ^{ab}	26.66±6.66 ^a	26.66±6.66 ^a	26.66±6.66 ^{ab}	26.66±6.66 ^{ab}	26.66±6.66 ^{ab}
300	0.00±0.00	20.00±0.00 ^a	20.00±0.00 ^a	26.66±6.66 ^a	26.66±6.66 ^a	26.66±6.66 ^{ab}	26.66±6.66 ^{ab}	26.66±6.66 ^{ab}
CV%	0.00	0.00	0.00	27.38	31.94	23.81	23.81	23.81

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่อักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 6 ขนาดของชิ้นส่วนอมบริโอ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม สารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ kanamycin (mg/l)	ขนาดอมบริโอ (ตารางเซนติเมตร) /อายุ (สัปดาห์) ^{1/}							
	1	2	3	4	5	6	7	8
control	1.12±0.00 ^b	1.12±0.00 ^b	1.19±0.02 ^a	1.39±0.02 ^b	1.59±0.01 ^a	1.63±0.01 ^a	1.67±0.02 ^a	1.71±0.01 ^a
50	1.12±0.00 ^b	1.12±0.00 ^b	1.16±0.01 ^a	1.18±0.01 ^b	1.20±0.01 ^b	1.25±0.02 ^b	1.27±0.02 ^b	1.32±0.01 ^b
100	1.16±0.01 ^a	1.15±0.00 ^a	1.17±0.00 ^a	1.20±0.00 ^b	1.21±0.00 ^b	1.24±0.00 ^b	1.27±0.01 ^b	1.29±0.01 ^b
200	1.16±0.01 ^a	1.16±0.01 ^a	1.18±0.01 ^a	1.20±0.00 ^b	1.23±0.01 ^b	1.26±0.01 ^b	1.30±0.01 ^b	1.32±0.01 ^b
300	1.16±0.01 ^a	1.16±0.00 ^a	1.17±0.00 ^a	1.19±0.00 ^b	2.21±0.01 ^b	1.24±0.01 ^b	1.26±0.01 ^b	1.28±0.01 ^b
CV%	1.33	1.12	1.90	1.99	1.66	2.45	2.57	1.97

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่อักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 1 การเจริญของชิ้นส่วนตายออกจากอมบริโอของบัวหลวงพันธุ์ นุชทริกที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่

เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 7 สัปดาห์ ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 การเจริญของชิ้นส่วนเอ็มบริโอของบัวหลวงพันธุ์มณฑกรที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 7 สัปดาห์

สรุป

การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์มณฑกร ภายใต้ปัจจัยแสงสี สีขาว (white light) และแสงสีแดง (red light) โดยใช้ชิ้นส่วนตายอด และก้านใบจากเอ็มบริโอเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น โดยนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) ที่เติม NAA 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 16 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนตายอด และชิ้นส่วนก้านใบ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ใกล้เคียงกัน โดยแคลลัสมีลักษณะเกาะกันหลวมๆ มีสีเขียว ฉ่ำน้ำ

การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ kanamycin สำหรับใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์มณฑกร โดยนำชิ้นส่วนตายอดจากเอ็มบริโอ และเอ็มบริโอ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin พบว่าสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถทำให้ชิ้นส่วนตายอดไม่สามารถอยู่รอดได้ แต่ในชิ้นส่วนเอ็มบริโอทั้งชิ้นนั้น ยังสามารถอยู่รอดได้ในทุกความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

จาริย์ หอยทอง. 2519. “การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวบางชนิดในประเทศไทย.”
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์

ปริญญาโท บัณฑิตวิทยาลัย ภาควิชาชีววิทยา สาขาพฤกษศาสตร์. มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

จิตเกษม เทียงจิตต์. 2545. “การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัส

บัวหลวงพันธุ์มณฑกร.” ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยี การเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.

จินตนา ไทยลุ่มทอง และ ลาวัลย์ สุรมนตรี. 2536. “การใช้ซิลเวอร์ไนโอซัลเฟตก่อนเก็บเกี่ยวเพื่อยืดอายุการปักแกลงของดอกบัวหลวงพันธุ์มณฑกร.” ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชญานิศ ศิริินภาดล. 2550. “การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin ของเนื้อเยื่อปทุมมาในสภาพปลอดเชื้อ”. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

บุญเกื้อ หาราชชัย. 2537. “การเปรียบเทียบสูตรสารละลายปักแกลงเพื่อยืดอายุการใช้งานของดอกบัว.” ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

ประสาศตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พรินต์ติ้งเฮาส์.

ประวีณา มณีรัตนรุ่งโรจน์ สุมนทิพย์ บุญนาค และปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์. 2546. การศึกษาเบื้องต้นในการส่งถ่ายยีนสู่กล้วยไม้เอื้องเงินโดย *Agrobacterium tumefaciens*. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 3 หน้า.

ภัทวดี ภัคดิ้งาม. 2547. “การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต และแสงต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอจากริโซมของบัวหลวงพันธุ์บุษราคัม.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.

รณรงค์ หอมหวล. 2541. เทคนิคการถ่ายยีนในกุหลาบ. ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

รณรงค์ หอมหวล เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์ และอัญชลี รวีโรจน์วิบูลย์. 2543. การสร้างระบบ plant regeneration ที่มีประสิทธิภาพในเบญจมาศเพื่อการถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium* : รายงานผลการวิจัยประจำปี 2543. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รังสฤษฎ์ กาวีดี. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2546. การพัฒนาพันธุ์แตงกวาและแตงร้านต้านทานไวรัสจุดวงแหวนมะละกอโดยเทคนิคการถ่ายยีน. สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช.

วาสนา มิตรานนท์. 2527. “การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสกุลบัวหลวง (*Nelumbo Adans.*) ในประเทศไทย.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

วิชัย ภูมิปัญญาวานิช. 2543. “การเพาะเลี้ยงลำพะยะของบัวหลวง 2 ชนิด.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สายชล เกตุยา. 2531. เทคโนโลยีการเก็บเกี่ยวของดอกไม้. กรุงเทพมหานคร: บพิธการพิมพ์.

เสริมลาภ วสุวัต. 2537. บัวไม้ดอกไม้ประดับ. กรุงเทพฯ: อมรินทร์พรินต์ติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Physiol Plant*. 15: 473-497.

Supuk. M, N. Topoonyanont, T. Handa, M. Sanguansermisri and S. Anuntalabhochai. 2005. Genetic transformation of *Curcuma alismatifolia* Gagnep. using retarded shoots. Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai. 50200

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสร้าง DNA สายผสมของยีน chalcone 4'-O-glucosyltransferase จาก snapdragon
(*Antirrhinum majus*) เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนด้วยเทคนิค RNA interference
Construction of Recombinant DNA of Chalcone 4'-O-Glucosyltransferase from Snapdragon
(*Antirrhinum majus*) for Studying Gene Function with RNA Interference

วรฤทธิ เลื่อนมงคลการ^{1,2} กัญจนนา แซ่เตียว¹ สุเม อรัญนารถ¹ และนงลักษณ์ เกรรินทร์วงศ์¹
Auemongkolgam, W.^{1,2}, Saetiew, K.¹, Arunyanart, S.¹ and Parinthawong, N.¹

Abstract

Chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT) gene is an important enzyme in biosynthesis of aurone. The 4'CGT gene was synthesized from cDNA of yellow snapdragon flower (*Antirrhinum majus*). Using specific primers designed from database in Genbank in RT-PCR technique. The gene size is 1,374 bp. Expression of 4'CGT gene in different petal colors was studied. It was found that the highest expression of 4'CGT gene was in yellow, orange, red, white, pink and violet flower, respectively. The 4'CGT gene was cloned to sequence and selected fragment of 313 bp was inserted into pJAWOHL8 using Gateway technology for gene silencing. Cell suspension of *Agrobacterium tumefaciens* carried pJAWOHL8 or pJA84'CGT was Agro-infiltrated into petals of *A. majus* using needleless syringe. The change of petal's color could not be observed in any experiments but the level of 4'CGT gene expression was found to down-regulated via 50% of flowers used in experiment.

Keywords: Gateway technology, *Agrobacterium*-mediated transformation, gene silencing

บทคัดย่อ

ยีน chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT) เป็นยีนที่สำคัญในวิถีชีวสังเคราะห์สารสีกลุ่มออโรน จึงได้สังเคราะห์ยีน 4'CGT จาก cDNA ของลีนม้งกรดอกสีเหลือง (*Antirrhinum majus*) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจงโดยใช้ข้อมูลในธนาคารยีน ได้ยีนขนาด 1,374 คู่เบส การแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกสีต่างๆ พบว่ากลีบดอกสีเหลืองมีการแสดงออกของยีน 4'CGT มากที่สุด รองลงมาคือดอกสีส้ม แดง ขาว ชมพู และม่วง ตามลำดับ จากนั้นโคลนยีน 4'CGT ที่สังเคราะห์ได้เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วเลือกบริเวณของยีน 4'CGT ขนาด 313 คู่เบส โคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pJAWOHL8 ด้วยเทคโนโลยี Gateway เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน นำสารแขวนลอยเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่มีเวกเตอร์ pJAWOHL8 หรือ pJA84'CGT ฉีดเข้าสู่กลีบดอกลีนม้งกรสีเหลือง ผลการถ่ายยีนไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอกในทุกการทดลอง แต่ระดับการแสดงออกของยีน 4'CGT ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนดอกที่ถ่ายยีน

คำสำคัญ: เทคโนโลยีเกตเวย์, การถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย, การยับยั้งการแสดงออกของยีน

คำนำ

สีของดอกไม้ที่เกิดจากสารสีในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีโทนสีที่ค่อนข้างกว้าง ตั้งแต่สีเหลืองอ่อนๆ จนถึงสีส้ม สีแดง สีม่วง และ สีน้ำเงิน (Tanaka *et al.*, 1998) การเปลี่ยนแปลงวิถีชีวสังเคราะห์ของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยวิธีตัดแต่งพันธุกรรมได้ถูกนำมาใช้ในการเปลี่ยนสีของดอกไม้หลายชนิด (Nakamura *et al.*, 2006) สำหรับวิถีชีวสังเคราะห์สีเหลือง พบว่า เอนไซม์ chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ aureusidin synthase (AS) ในการสังเคราะห์ออโรน ซึ่งให้โทนสีเหลืองในกลีบดอกลีนม้งกร (Ono *et al.*, 2006) การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้าง DNA สายผสม โดยอาศัยเทคโนโลยี Gateway (Karimi *et al.*, 2002) ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน 4'CGT เพื่อตรวจสอบการทำงานของยีน 4'CGT แบบชั่วคราวในดอกลีนม้งกร

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

² Department of plant production technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520 Thailand

³ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

⁴ Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

ไม่สงวนลิขสิทธิ์ในการเผยแพร่บทความนี้ในวารสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียม RNA และ cDNA

ทำการสกัด RNA จากกลีบดอกลินมังกร (*Antirrhinum majus*) พันธุ์ Pixie Bells (สีเหลือง สีชมพู สีม่วง และ สีขาว) และ พันธุ์ Cameo (สีส้มและสีแดง) ด้วยวิธีของ Trizol (Invitrogen, USA) จากนั้นเตรียม cDNA โดยใช้ RevertAid™ Reverse Transcriptase (Fermentas, China) ที่ความเข้มข้น RNA 3 µg/µl สูดทำย่นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สูดทำย่นหยุดปฏิกิริยาที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ในแต่ละกลีบดอกลินมังกร ออกแบบจากข้อมูลในธนาคารยีน (accession number EF650015) โดยใช้ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ 5' - C GGA TCC ATG GGA GAA GAA TAC AAG AAA AC - 3' และรีเวอร์สไพรเมอร์ 5'- TC GAG CTC TTA ACG AGT GAC CGA GTT GAT GAA -3' ซึ่งทำให้ได้ DNA ผลผลิตขนาด 1,374 คู่เบส โดยใน 20 ไมโครลิตร ของปฏิกิริยา PCR มี 1X buffer (NH₄)₂SO₄, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, 0.5 µM ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ 4'CGT, 0.5 µM รีเวอร์สไพรเมอร์ 4'CGT, 10 ng DNA template (cDNA ของกลีบดอกลินมังกร) และ 1U *Taq* polymerase โดยมีขั้นตอนดังนี้ 1) denaturing 94 องศาเซลเซียส 5 นาที, 2) denaturing 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 3) annealing 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 4) extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 5) final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2) ถึง 4) จำนวน 40 รอบ และเมื่อครบกำหนดเวลานำไปตรวจสอบขนาดชิ้นส่วน DNA โดยวิธี agarose gel electrophoresis

ออกแบบไพรเมอร์ยีน 4'CGT จากข้อมูลในธนาคารยีน (accession number EF650015) เพื่อทำ PCR สังเคราะห์ยีน 4'CGT บางส่วน โดยใช้ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ 5' - TGG GTG GAA TTC TGT TCT TG - 3' และรีเวอร์สไพรเมอร์ 5' - TCG GAT CCT TAA CGA GTG ACC GAG TTG ATG AA - 3' ได้ DNA ขนาด 313 คู่เบส ทำปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการสังเคราะห์ยีน 4'CGT และใช้จำนวนรอบของปฏิกิริยา 27 รอบ

สังเคราะห์ยีน 18S โดยใช้ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ 5' - GGC TCG AAG ACG ATC AGA TAC CG - 3' และ รีเวอร์สไพรเมอร์ 5' - GTA CAA AGG GCA GGG ACG TAG TCA A -3' ที่ออกแบบจากข้อมูลในธนาคารยีน ซึ่งทำให้ได้ DNA ผลผลิตขนาด 600 คู่เบส เพื่อใช้เปรียบเทียบความเข้มข้นของ cDNA ปฏิกิริยา PCR ทำตามการสังเคราะห์ยีน 4'CGT และใช้จำนวนรอบของปฏิกิริยา 27 รอบ

การสร้างพลาสมิดสายผสมและการถ่ายโอน DNA เข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens*

เชื่อมต่อยีนบางส่วนของ 4'CGT ขนาด 313 คู่เบส ที่ได้จากการทำ PCR เข้าสู่เวกเตอร์ pCR8 (Invitrogen, USA) โดยปฏิกิริยาของการเชื่อมต่อ DNA สายผสมใน 6 ไมโครลิตร ประกอบด้วยผลผลิต PCR 4 ไมโครลิตร salt solution 1 ไมโครลิตร และ เวกเตอร์ pCR8 1 ไมโครลิตร ผสมทั้งหมดให้เข้ากันอย่างเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นถ่ายโอน DNA สายผสมเข้าสู่ *E. coli* (DH5α) ด้วยวิธี heat-shock และเลี้ยงเซลล์บนอาหารแข็ง LB (10 g/L trypton, 5 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract, 15 g/L agar) ที่มียาปฏิชีวนะสเปคตินิโนมายซิน 100 µg/ml ตรวจสอบโคลนนิ่งด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ยีน 4'CGT ขนาด 313 คู่เบส จากนั้นเลือกโคลนที่คาดว่าได้รับพลาสมิด pCR8 ที่มี 4'CGT แทรกอยู่ (pCR84'CGT) เลี้ยงในอาหารเหลว LB Broth (10 g/L trypton, 5 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract) ที่มีสเปคตินิโนมายซิน ความเข้มข้น 100 µg/ml บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เหย้าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที นาน 16 ชั่วโมง สกัดแยกพลาสมิด ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในธนาคารยีน

ถ่ายโอนยีน 4'CGT เข้าสู่เวกเตอร์ pJAWOHL8 ด้วยปฏิกิริยา LR (Invitrogen, USA) โดยใน 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิด pCR84'CGT ปริมาณ 150 นาโนกรัม pJAWOHL8 ปริมาณ 150 นาโนกรัม และ LR clonase 2 ไมโครลิตร ผสมทั้งหมดให้เข้ากันแล้วบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และ ถ่ายโอน DNA เข้าสู่ *E.coli* (DH5α) ด้วยวิธี heat-shock จากนั้นตรวจสอบชิ้นส่วนของยีน 4'CGT ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pJAWOHL8 (pJA84'CGT) โดยการใช้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Xba* I จากนั้นถ่ายโอนพลาสมิด pJA84'CGT เข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ GV3101 ด้วยวิธี electroporation ตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดด้วยเทคนิค PCR

การศึกษาการแสดงออกของแบบชั่วคราว (transient expression) ของยีน

ถ่ายโอน DNA สายผสมของ pJAWOHL8 หรือ pJA84'CGT เข้าทางกลีบดอกของลินมังกร พันธุ์ Dragano สีเหลือง ตามวิธีของ Zottini *et al.*, (2008) จำนวน 2 ดอก และตรวจสอบปริมาณการแสดงออกด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR ภายหลังการถ่ายโอนเวกเตอร์เป็นเวลา 3 วัน

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เมื่อนำยีน 4'CGT ที่สังเคราะห์จากดอกสีต่างๆ มาเปรียบเทียบกับปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT พบยีนขนาด 1,374 คู่เบส และมีการแสดงออกมากที่สุดในดอกสีเหลือง ส้ม แดง ขาว ชมพู และม่วง ตามลำดับ (Fig. 1) เนื่องจากยีน 4'CGT อยู่ในกลุ่มออโรนและให้โทนสีเหลืองในกลีบดอกลินมังกร (Ono *et al.*, 2006) ดังนั้นระดับการแสดงออกของยีน 4'CGT จึงพบได้มากที่สุดในดอกสีเหลือง

ภายหลังจากการทำ Agro-infiltration เพื่อถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 หรือ pJA84'CGT เข้าสู่กลีบดอก เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน 4'CGT ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR พบว่าปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ของดอกจากต้นที่ 1 ที่ได้รับเวกเตอร์ pJA84'CGT ไม่แตกต่างจากดอกที่ได้รับเวกเตอร์ pJAWOHL8 แต่ในดอกจากต้นที่ 2 ที่ได้รับเวกเตอร์ pJA84'CGT มีปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ลดลงเมื่อเทียบกับดอกที่ได้รับเวกเตอร์ pJAWOHL8 โดยทั้ง 2 ดอก สามารถตรวจพบยีน 4'CGT ที่อยู่ในเวกเตอร์ pJA84'CGT (Fig. 2) อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบลักษณะทาง phenotype พบว่าสีดอกไม่เปลี่ยนแปลง อาจเนื่องจากยีนที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงสีดอกเป็นยีนที่ทำงานร่วมกันกับยีนอื่นจำนวนมาก (multiple gene) ในกระบวนการสังเคราะห์สารสี (Ono *et al.*, 2006) ดังนั้นการยับยั้งการแสดงออกของยีน 4'CGT เพียงยีนเดียวอาจยังไม่เพียงพอต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทาง phenotype และสำหรับดอกที่ 1 ที่ไม่เกิดผลยับยั้งการแสดงออกของยีน อาจเกิดจากการรบกวนบริเวณ attL ในเทคโนโลยี gateway ต่อการเกิดโครงสร้าง hairpin RNA ภายในเซลล์พืช (Helliwell and Waterhouse, 2003)

สรุปผล

สังเคราะห์ยีน 4'CGT โดยใช้ข้อมูลจากธนาคารยีนในการออกแบบไพรเมอร์ ได้ยีนขนาด 1,374 คู่เบส ผลศึกษาการแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกลินมังกรสีต่างๆ พบว่ายีน 4'CGT มีการแสดงออกมากที่สุดในดอกสีเหลือง ส้ม ส้มแดง สีขาว สีชมพูและสีม่วง ตามลำดับ เมื่อคัดเลือกบริเวณของยีน 4'CGT ขนาด 313 คู่เบส โคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pJAWOHL8 โดยใช้เทคโนโลยี Gateway เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน 4'CGT ด้วยเทคนิค RNAi ร่วมกับเทคนิค Agro-infiltration พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทาง phenotype แต่พบว่าปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ที่ตรวจสอบโดยเทคนิค semi-quantitative PCR ลดลงในอัตราส่วน 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนดอกที่ถ่ายยีน

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) และกองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ภายใต้โครงการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยวิธีตัดแต่งพันธุกรรม

เอกสารอ้างอิง

- Helliwell C. and P. Waterhouse. 2003. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. Academic Press 30 (4): 289-295.
- Karimi, M., D. Inzé and A. Depicker. 2002. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Trends Plant Science 7 (5): 193-195.
- Nakamura N., M. F. Mizutani, K. Miyazaki, K. Suzuki, 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 (1): 13-17.
- Ono, E., M. Fukuchi-Mizutani, N. Nakamura, Y. Fukai, K. Yonekura-Sakkibara, M. Yamaguchi, T. Nakayama, T. Kusumi and Y. Tanaka. 2006. Yellow flowers generated by expression of the aurones biosynthetic pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences 103 (29): 11075-11080.
- Tanaka, Y., S. Tsuda and T. Kusumi. 1998. Metabolic engineering to modified flower color. Plant and Cell Physiology 39 (11): 1119-1126.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zottini, M., E. Barizza, A. Costa, E. Formentin, C. Ruberti, F. Carimi and F. L. Schiavo. 2008. Agro-infiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells. *Plant Cell Reports* 27 (5): 845-853.

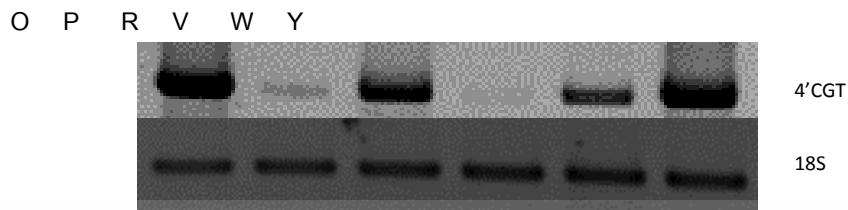


Figure 1 Expression analysis of 4'CGT using semi-quantitative PCR from various color flowers of snapdragon. (O: orange, P: pink, R: red, V: violet, W: white, Y

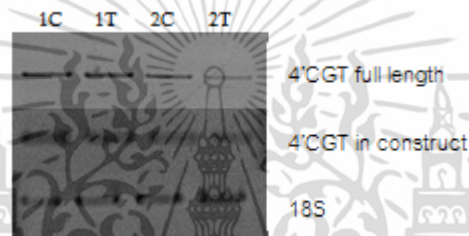


Figure 2 Semi-quantitative PCR analysis using primers for full length 4'CGT (4'CGT full length), 313 bp fragments inserted in pJA84'CGT (4'CGT in construct) construct and reference gene (18S) of flowers 1 and 2 contained pJAWOHL8 (1C, 2C) or pJA84'CGT (1T, 2T).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การโคลนและศึกษาการแสดงออกของยีน Flavanone 3-Hydroxylase (F3H) ในอุบลชาติพันธุ์เซนต์หลุยส์โกลด์ Cloning and Expression Study of Flavanone 3-Hydroxylase (F3H) Gene in Tropical Waterlily cv. St. Louise Gold

ชัยวรกุล ไชยปัญญา^{1,2} กัญจนา แซ่เตียว¹ สุเม อริญานต์¹ และนงลักษณ์ เกรินทวงศ์¹
Chaipanya, C.^{1,2}, Saetiew, K.¹, Arunyanart, S.¹ and Parinthawong, N.¹

Abstract

The flavanone 3-hydroxylase (F3H) gene has been reported to synthesize a key enzyme involved in anthocyanin production in many plant species. Using of degenerated primers based on conserved regions of F3H available from GenBank, gene walking and Polymerase Chain Reaction (PCR) techniques, full length cDNA of F3H gene with 1,131 nucleotides which encodes for 377 amino acids was obtained from tropical waterlily cv. St. Louise Gold (*Nymphaea* hybrid 'St. Louise Gold'). The amino acid sequence showed 78% similarity to the F3H gene of *Vitis vinifera* and *Gossypium hirsutum*. Semi-quantitative PCR analysis showed that the expression of F3H gene was more abundant in petals than anthers and leaves, respectively.

Keywords : anthocyanin, semi-quantitative PCR

บทคัดย่อ

ยีน flavanone 3-hydroxylase (F3H) ถูกโคลนจาก cDNA ของอุบลชาติพันธุ์เซนต์หลุยส์โกลด์ (*Nymphaea* hybrid 'St. Louise Gold') ยีนนี้ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน F3H ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตสารสีในกลุ่ม anthocyanin ในพืช โดยใช้ degenerated primer ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของพืชชนิดต่างๆ ที่ได้มีการศึกษาแล้ว ร่วมกับเทคนิค gene walking และ Polymerase Chain Reaction (PCR) ยีน F3H ที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 1,131 คู่เบส แปลรหัสให้โปรตีนที่มีขนาด 377 กรดอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับของกรดอะมิโนพบว่ามี ความเหมือนกับยีน F3H ในองุ่น (*Vitis vinifera*) และฝ้าย (*Gossypium hirsutum*) 78 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาการแสดงออกของยีน F3H ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR พบว่ายีน F3H มีการแสดงออกมากที่สุดในกลีบดอก เกสร และใบตามลำดับ

คำสำคัญ : แอนโทไซยานิน, semi-quantitative PCR

บทนำ

สีของดอกไม้เป็นลักษณะที่ดึงดูดที่สุดของไม้ดอกและเป็นปัจจัยหลักในการกำหนดมูลค่าของดอกไม้ ดังนั้นการพัฒนาสีของไม้ดอกจึงเป็นเป้าหมายหลักในการปรับปรุงพันธุ์ แต่เนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการผสมข้ามมีข้อจำกัดของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสีที่มีอยู่ในพืชแต่ละชนิด ทำให้ไม่สามารถพัฒนาไม้ดอกเศรษฐกิจหลายชนิดให้มีสีตามที่ต้องการด้วยวิธีการผสมข้าม (คำรพ, 2553) บัวเป็นไม้ตัดดอกสำคัญชนิดหนึ่งของไทย (ปริมาณ และเสริมลาภ, 2549) สีของดอกไม้แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารสี (pigment) เช่น กลุ่มเบตาเลน (betalain) กลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid) และกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ซึ่งเป็นสารกลุ่มหลักที่ให้สีแก่พืช มีโทนสีกว้างตั้งแต่สีเหลืองอ่อน จนถึงแดง ม่วง และน้ำเงิน เช่น แอนโทไซยานิน (มณฑินี, 2550) โดยยีน F3H (flavanone 3-hydroxylase) เป็นยีนสำคัญในวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ซึ่งให้สีในดอกไม้ต่างๆ (Qwens *et al.*, 2008) ปทุมชาติเป็นอีกพืชหนึ่งที่มีข้อจำกัดในการผสมข้าม เพื่อให้ได้ดอกไม้ที่มีสีหลากหลาย โดยสังเกตได้จากปทุมชาติในประเทศไทยมีเพียง 2 สี เท่านั้น คือ สีขาว และสีชมพู (ปริมาณ และเสริมลาภ, 2549) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ได้โคลนยีน F3H ในอุบลชาติพันธุ์เซนต์หลุยส์โกลด์ (*N. hybrid* 'St. Louise Gold') ดอกสีเหลืองเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน F3H ในส่วนต่างๆ ของอุบลชาติพันธุ์เซนต์หลุยส์โกลด์ ซึ่งอาจใช้เป็นเครื่องมือในการเปลี่ยนแปลงวิถีสังเคราะห์ของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ด้วยวิธีการทางพันธุวิศวกรรมต่อไป

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

¹ Department of plant production technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10502, Thailand ² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

² Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียม RNA

เตรียมเนื้อเยื่อเกสร กลีบดอก หรือใบของอุบลชาติพันธุ์เซนต์หลุยส์โกลด์ 1 กรัม บดละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวและสกัดแยก RNA ตามวิธีการของ Lopez-Gomez and Gomez-Lim (1992) ละลายตะกอนด้วย DEPC-dH₂O นำไปวัดปริมาณและคุณภาพ RNA ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เก็บ RNA ที่เหลือที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การโคลนยีน F3H

โคลนยีน F3H โดยใช้ degenerated primer ที่ออกแบบจากลำดับเบสของยีนในพืชชนิดต่างๆ ที่ได้มีการรายงานไว้ใน GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ใช้ข้อมูลจากการวิเคราะห์ผลโดยโปรแกรม multiple alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) สังเคราะห์ cDNA ของกลีบดอกอุบลชาติพันธุ์เซนต์หลุยส์โกลด์ โดยใช้ RNA ปริมาณ 2 µg สำหรับปฏิกิริยา Reverse transcription ตามวิธีการของ SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Canada)

สังเคราะห์บางส่วนของยีน F3H จาก cDNA ของอุบลชาติพันธุ์เซนต์หลุยส์โกลด์ โดยใช้ cDNA ปริมาณ 1 µl สำหรับปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 µl ที่ประกอบด้วย dH₂O 9.5 µl, 10x Taq buffer 2 µl, 25 mM MgCl₂ 2 µl, 10 mM dNTP 1 µl, 10 µM forward primer (5'- GTC CVA AGG TKG CYT AYA AYG -3') 2 µl, 10 µM reverse primer (5'- CYT TGC TCA TCT TCY TCY TGT AC -3') 2 µl และ 5 U Taq DNA polymerase 0.5 µl (Fermentas, USA) ทำปฏิกิริยาในเครื่อง PCR (Biometra, Germany) 1 รอบที่อุณหภูมิ 94 °C 5 นาที, 35 รอบที่ 94 °C 45 วินาที, 58 °C 45 วินาที, 72 °C 50 วินาที และ 1 รอบที่ 72 °C 10 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีการ gel electrophoresis สกัด DNA ออกจากเจลตามวิธีการของ FavorPrep™ GEL/PCR purification mini kit (Favorgen, China) เชื่อมต่อ DNA เข้ากับเวกเตอร์ pTZ57/RT (Fermentas, USA) แล้วถ่ายโอนเข้าแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ตรวจสอบโคลนที่มี DNA สายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Bam HI และ Eco RI คัดเลือกโคลนที่ถูกต้องนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

สังเคราะห์ยีนด้าน 5' และ 3' จาก cDNA ของกลีบดอกอุบลชาติพันธุ์เซนต์หลุยส์โกลด์ ตามวิธีการของ SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Canada) โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ด้าน 5' คือ GSP1 primer (5'- ATC CAC GTC TTG CCG CCG TCC CTG GTG G -3') คู่กับ UPM primer (5'- CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C -3') และด้าน 3' คือ Oligo-dt primer คู่กับ F3H8 primer (5'- CCT GGA CAT GGA CCA GAA G -3') ตรวจสอบผลผลิต PCR โคลนยีนและตรวจสอบ DNA สายผสมตามวิธีการข้างต้น คัดเลือกโคลนที่ถูกต้องนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมข้อมูลของสาย DNA ทั้งสายโดยโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank

การศึกษาการแสดงออกของยีน F3H ในส่วนต่างๆ ของอุบลชาติพันธุ์เซนต์หลุยส์โกลด์ด้วยวิธีการ semi-quantitative PCR

สังเคราะห์ cDNA จาก RNA ที่แยกสกัดได้จากเกสร กลีบดอก หรือใบของอุบลชาติพันธุ์เซนต์หลุยส์โกลด์ปริมาณอย่างละ 1 µg ตามวิธีการของ Sensiscript® Reverse Transcription (Qiagen, USA)

ปรับความเข้มข้นของ cDNA เกสร กลีบดอก และใบของอุบลชาติพันธุ์เซนต์หลุยส์โกลด์ให้เท่ากัน ด้วยปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 20 µl ประกอบด้วย dH₂O 12.5 µl, 10x Taq buffer 2 µl, 25 mM MgCl₂ 2 µl, 10 mM dNTP 1 µl, 10 µM 18-SF primer (5'- GGC TCG AAG ACG ATC AGA TAC CG -3') 0.5 µl, 10 µM 18-SR primer (5'- GTA CAA AGG GCA GGG ACG TAG TCA A -3') 0.5 µl, cDNA 1 µl และ 5 U Taq DNA polymerase 0.5 µl ทำปฏิกิริยาในเครื่อง PCR 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 °C 5 นาที, 24 รอบที่ 94 °C 45 วินาที, 58 °C 45 วินาที, 72 °C 50 วินาที และ 1 รอบที่ 72 °C 10 นาที เปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน 18S rRNA จากความเข้มข้นของแถบ DNA บนเจลภายหลังการทำ gel electrophoresis ใช้ cDNA ของเกสร กลีบดอก และใบของอุบลชาติพันธุ์เซนต์หลุยส์โกลด์ ที่ปรับความเข้มข้นให้เท่ากันแล้วเป็น DNA ต้นแบบในการทำ semi-quantitative PCR ปริมาตร 20 µl ที่ประกอบด้วย dH₂O 12.5 µl, 10x Taq buffer 2 µl, 25 mM MgCl₂ 2 µl, 10 mM dNTP 1 µl, 10 µM F3H SenseF primer (5'- GAG AAG CTC CGG TTC GAC AT -3') 0.5 µl, 10 µM F3H stop primer (5'- TCA GGC CAG AAT TTC ATT GA -3') 0.5 µl, cDNA 1 µl และ 5 U Taq DNA polymerase 0.5 µl ทำปฏิกิริยาในเครื่อง PCR 1 รอบที่อุณหภูมิ 94 °C 5 นาที, 28 รอบที่ 94 °C 45 วินาที, 58 °C 45 วินาที, 72 °C 50 วินาที และ 1 รอบที่ 72 °C 10 นาที เปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน F3H จากความเข้มข้นบนเจล ด้วยวิธีการ gel electrophoresis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การสังเคราะห์ยีน F3H โดยการใช้ cDNA จากกลีบดอกสีเหลืองของอุบลชาติพันธุ์เซนต์หลุยส์โกลด์เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในการทำปฏิกิริยา PCR ได้ชิ้น DNA ขนาด 1,131 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 1) แพลลท์สเป็นโปรตีนได้ขนาด 377 กรดอะมิโน (ภาพที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับของกรดอะมิโนพบว่ามีความเหมือนกับยีน F3H ในองุ่น (*Vitis vinifera*) และฝ้าย (*Gossypium hirsutum*) 78 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่ายีนที่โคลนได้คือ ยีน F3H และมีบริเวณอนุรักษ์บนสายโปรตีนเหมือนกันกับองุ่นและฝ้าย

ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน F3H ระหว่างกลีบดอก เกสร และใบของอุบลชาติพันธุ์เซนต์หลุยส์โกลด์ ด้วยวิธีการ semi-quantitative PCR พบว่ายีน F3H แสดงออกมากที่สุดในกลีบดอก รองลงมาคือเกสร และแสดงออกน้อยมากในใบ (Figure 2) เนื่องจากฟลาโวนอยด์เป็นสารสีที่กระตุ้นให้แมลงเข้าผสมเกสร (Nakatsuka *et al.*, 2005) ดังนั้นยีน F3H จึงมีการแสดงออกในส่วนของกลีบดอกและเกสรมากกว่าใบ ผลการทดลองสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน F3H ในพืชชนิดต่างๆ เช่น ในต้นทรีด (*Gentiana triflora*) พบการแสดงออกของยีน F3H ในกลีบดอกแต่แทบไม่พบการแสดงออกในใบ (Nakatsuka *et al.*, 2005) และในแอปเปิ้ลพันธุ์ Fuji (*Malus domestica* Borkh. cv. Fuji) พบการแสดงออกของยีน F3H ในส่วนของผลมากที่สุด รองลงมาคือเปลือกผล ราก ต้นกล้า และตาดอกตามลำดับ แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน F3H ในใบ (Kim *et al.*, 2003)

สรุป

การสังเคราะห์ยีน F3H โดยใช้ cDNA อุบลชาติพันธุ์เซนต์หลุยส์โกลด์เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยา PCR ได้ชิ้น DNA ขนาด 1,131 นิวคลีโอไทด์ แพลลท์สเป็นโปรตีนได้ขนาด 377 กรดอะมิโน ซึ่งแสดงออกที่กลีบดอกมากที่สุด และแสดงออกน้อยมากในใบ

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจาก ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (AG-BIO/PERDO-CHE)

เอกสารอ้างอิง

- คำพร รัตนสุด. 2553. วิศวะกรรมเมแทบอลิซึมของสีดอกไม้. ว.วิทย์. มข. 38(2): 171-181.
- ปริมลลา ชูเกียรติมั่น และเสริมลลา วสุวัต. 2549. บัวประดับในประเทศไทย 2. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์เนชั่นบุ๊คส์. กรุงเทพฯ. 165 น.
- มณฑินี ธีวาร์ภย์. 2550. การผลิตไม้ดอกสีเหลืองโดยการเปลี่ยนวิถีการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 25: 95-102.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41: 95-98. [Online]. Available: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>. 1 มิถุนายน 2554.
- 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 Sci.* 165: 403-413.
- Lopez-Gomez, R. and Gomez-Lim, M.A. 1992. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Hort Sci.* 27: 440-442.
- Nakatsuka, T., M. Nishihara, K. Mishiba and S. Yamamura. 2005. Temporal expression of flavonoid biosynthesis related genes regulates flower pigmentation in gentian plants. *Plant Sci.* 168: 1309-1318.
- 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 Physiol Biochem.* 46: 833-843.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ATGGCACCAACACTGGTGGTGGAGTCGTCGCCGGCCGCTGCTCAGCCGAGACCGTTTCTGCCGACGCTGAAC
 GAGGAGAAGACGCTGAGGGAGTCGTTCTGTCGAGACGAGGACGAGCGGCCGAAGGTGGCTACAACGACTT
 CAGCAACGACGTCCCCGTCATCTCCCTGGCCGGCCTCGACTCCGACGACTCCCGCCGTGCCGAGGTCCGGGA
 CGCCATCGTCCGGGCGTGCAGGAGTGGGGGGTCTTCCAGGTCGTGGACCACGGCGTGGACGCCCTCCCTCG
 TCTCCTCCATGACGGAGATGGCGGCCGCTTCTTCAAGTTGCCCCCGAGGAGAAGCTCCGGTTCGACATGTC
 CGGCGGGAAGCGCGGGGGTTCATCGTGAAGCAGCCACCTGCAGGGGAGGCGGTGAAGGACTGGCGGGAG
 ATCGTGACGTTCTTCTCGTACCCGTTGGCGGGGAGGACTACTCCCGGTGGCCGGACGTCGCCGAGGGGTGG
 CGCGCGGTGGCGGAGAGGTACAGCGAGGAGCTGATGGCGCTGGCGTGAAGCTTTTGGGGGTGCTGTCCGA
 GGCGATGGGGCTGCCGTCGGATGCGCTCCGGGATGCGTGCCGGGACATGGACCAGAAGATGGTGGTGAAC
 ACTACCCGCCGTGCCGCGAGCCGGACCTGACCCTGGGGTGAAGCGGCACACCCGACCCCGGCACCATCACC
 CTTCTGCTGCAGGACCTGGTCCGAGGCCTGCAGGCCACCAGGGACGGCGGCAAAACGTGGATCACCGTCCAG
 CCAATCGCCGGCGCCTTCGTCGTCACCTCGGCGACCAGGCCATTACCTTAGCAATGGAAGGTTTCATGAACG
 CGGATCACCAGCGGTTCGTCACCGCAAACCTGCAGCCGCTATCGATAGCCACGTTCCAGAATCCGTCCCGGA
 CGCCATCGTGTACCCATTGAAGATCAGAGAGGGAGAGAAATCGATAATGGATGAGCCCATCACCTTCGAGAG
 ATGTACAAGAGGAAGATGGCCAGAGACCTGGAGCTTCCAGGCTCAAAAAGCTCGCCAAGGAGGACAAAAGC
 GAGGAGCAGGTCGACGAGATAGCCAAAGCCAAAT1CGATCAATGAAATTCTGGCCTGA

Figure 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน F3H ในอุบลชาติพันธุ์เซินหลุยส์โกลด์

MAPTLVWESSPAAAQPRPFLPTLNEEKTLRESFVRDEDERPKVAYNDFSNDVVPVISLAGLSDSSRRRAEVRDAIVRACEE
 WGVFQVDHGVDAASLVSSMTEMAAAFFKLPPEEKLRFDMSGGKRGGFVSSHLQGEAVKDWREIVTFFSYPLAGRDYS
 RWPDPVPEGWRAVAERYSEELMALACKLLGVLSEAMGLPSDALRDACRMDQKMMVNYPPCPQPDLLGLKRHTDP
 GTITLLLQDLVGGQLQATRDGGKTWITVQPIAGAFVNVNLGDHGHYLSNGRFMNADHQAVVNANCSRLSIATFQNPSPDAI
 VYPLKIREGEKSIMDEPITFAEMYKRKMARDLELARKLAKEDKSEEQVDEIAKAKSINEILA

Figure 2 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน F3H ในอุบลชาติพันธุ์เซินหลุยส์โกลด์

Table 1 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน F3H ของอุบลชาติพันธุ์เซินหลุยส์โกลด์กับฐานข้อมูล GenBank

Accession number	Plant	Gene name	%Identity score
EF192467.1	<i>Vitis vinifera</i>	flavanone 3-hydroxylase (F3H) gene	78
ABM64799.1	<i>Gossypium hirsutum</i>	flavanone 3-hydroxylase (F3H) gene	78

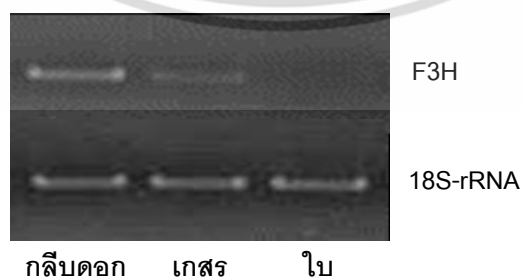


Figure 3 การแสดงออกของยีน F3H ในเกสร กลีบดอก และใบ ของอุบลชาติพันธุ์เซินหลุยส์โกลด์ โดยการใช้การแสดงออกของยีน 18S rRNA เป็นยีนอ้างอิงเพื่อควบคุมปริมาณ cDNA ต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา PCR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัญญาเลขที่ KREF025102

โครงการ การปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยวิธีตัดแต่งพันธุกรรม

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

รายงานสรุปการเงิน

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย ผู้รับทุน ภัฏจันฑา แซ่เตี่ยว

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2554 ถึงวันที่ 31 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
ดอกเบี้ยว รวมปีที่ 1	5,276.96	31 ธันวาคม 2552
ดอกเบี้ยว รวมปีที่ 2	3,532.67	25 ธันวาคม 2553
ดอกเบี้ยว รวมปีที่ 3	5,595.62	25 ธันวาคม 2554
ดอกเบี้ยว รวมปีที่ 4	6,396.34	25 ธันวาคม 2555
ดอกเบี้ยว รวมปีที่ 5	6,043.39	25 ธันวาคม 2556
ดอกเบี้ยว รวมปีที่ 6	1,728.95	25 ธันวาคม 2557
ดอกเบี้ยว รวมปีที่ 7	147.40	25 มิถุนายน 2558
รวม	2,883,721.38	① 31 กรกฎาคม 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา 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

.....
 ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

.....
 ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 211
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้