

การยับยั้งการแสดงออกของยีน *flavanone 3-hydroxylase (F3H)*  
ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) ในบัวหลวงพันธุ์บุนทรภัก  
(*Nelumbo nucifera* Geartn.)

RNAI-MEDIATED SILENCING OF THE *FLAVANONE 3-HYDROXYLASE*  
GENE IN LOTUS (*NELUMBO NUCIFERA* GEARTN.) CV. BUNTHARIK



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2558

KMITL-2015-AG-M-101-205

การยับยั้งการแสดงออกของยีน *flavanone 3-hydroxylase (F3H)*  
ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) ในบัวหลวงพันธุ์บุนทรภิก  
(*Nelumbo nucifera* Geartn.)

**RNAi-MEDIATED SILENCING OF THE *FLAVANONE 3-HYDROXYLASE*  
GENE IN LOTUS (*NELUMBO NUCIFERA* GEARTN.) CV. BUNTHARIK**



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร  
คณะเทคโนโลยีการเกษตร  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ. 2558

KMITL-2015-AG-M-101-205

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การยับยั้งการแสดงออกของยีน *flavanone 3-hydroxylase (F3H)*  
ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก  
(*Nelumbo nucifera* Geartn.)

**RNAi-MEDIATED SILENCING OF THE *FLAVANONE 3-HYDROXYLASE*  
GENE IN LOTUS (*NELUMBO NUCIFERA* GEARTN.) CV. BUNTHARIK**



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร  
คณะเทคโนโลยีการเกษตร  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ. 2558

**KMITL-2015-AG-M-101-205**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**RNAi-MEDIATED SILENCING OF THE *FLAVANONE 3-HYDROXYLASE*  
GENE IN LOTUS (*NELUMBO NUCIFERA* GEARTN.) CV. BUNTHARIK**



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

**2015**

**KMITL-2015-AG-M-101-205**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**COPYRIGHT 2015**

**FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อเผยแพร่เห็นไปะประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะเทคโนโลยีการเกษตร  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การยั้งยั้งการแสดงออกของยีน *flavanone 3-hydroxylase (F3H)* ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก  
RNAi-Mediated Silencing of the *Flavanone-3-Hydroxylase* Gene in Lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn.) cv. Buntharik

นักศึกษา นายชาติ กอนี  
รหัสประจำตัว 55640801  
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.กัญญา แซ่เตียว  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.ลำแพน	ขวัญพูล	
รศ.ดร.สุเม	อรุณนารถ	
ดร.นงลักษณ์	เกรินทวงศ์	
ผศ.ดร.กัญญา	จิระเจริญรัตน์	
ผศ.ดร.กัญญา	แซ่เตียว	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน/เดือน/ปีที่สอบ 4 ธันวาคม 2558

สถานที่สอบ ห้องประชุมคณะเทคโนโลยีการเกษตร (ชั้น 1 ตึกบุนนาค L)

ฉบับนี้รับรองแล้ว

มณฑล เหมะณี

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณฑล แก่นมณี)

คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร

วันที่ 29 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้ท่านไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>flavanone 3-hydroxylase (F3H)</i> ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) ในบัวหลวงพันธุ์มุกชริก ( <i>Nelumbo mucifera</i> Geartn.)
นักศึกษา	ชาตรี กอนี
รหัสประจำตัว	55640801
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ.ศ.	2558
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.กัญญา แซ่เตียว

### บทคัดย่อ

*Flavanone 3-hydroxylase (F3H)* เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เกี่ยวข้องกับการเกิดสีของดอกไม้ การยับยั้งการแสดงออกของยีน *flavanone 3-hydroxylase (F3H)* ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) ในบัวหลวงพันธุ์มุกชริก (*Nelumbo mucifera* Geartn.) ซึ่งมีผลไปขัดขวางการสังเคราะห์สารกลุ่มแอนโทไซยานินภายหลังการถ่ายยีน ในพลาสมิด pJA8F3H มียีนคัดเลือกในพืชคือ *phosphinothricin acetyl transferase (bar gene)* ซึ่งต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช basta (glufosinate amonium) การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช basta คือความเข้มข้นที่ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุด ที่ทำให้ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์มุกชริกตายทั้งหมดภายในสัปดาห์ที่ 8 และพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ใช้กำจัดอะโกรแบคทีเรีย คือที่ระดับ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

การถ่ายยีน *F3H* เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์มุกชริก เมื่อใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ พบว่าชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงไม่สามารถพัฒนา และตายลงในที่สุด ส่วนการถ่ายโอนยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค ได้ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวง 5 ต้น ที่มีความสมบูรณ์และสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ในอาหารคัดเลือกภายหลังการถ่ายยีน เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H bar* และ *CHS* โดยวิธี RT-PCR พบว่าการแสดงออกของยีน *F3H* โดยทำการตรวจสอบ พบว่าเกิดแถบ DNA ขนาดประมาณ 300 คู่เบส ในบัวหลวงต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดมีการแสดงออกที่ลดลง การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *bar* ซึ่งเป็นยีนคัดเลือกในพืชพบว่าเกิดแถบ DNA ขนาดประมาณ 430 คู่เบส ในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดพบการแสดงออก 1 ต้น จากจำนวนต้นทั้งหมด 5 ต้น และการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CHS* พบทั้งต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับและต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เกิดแถบ DNA ขนาดประมาณ 450 คู่เบสทั้งหมด และมีความเข้มของแถบ DNA ไม่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H bar* และ *CHS* ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยดูจากค่าการเพิ่มปริมาณขึ้นกับจำนวนรอบ (Crossing point; Cp) การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H* พบการแสดงออกของยีน *F3H* ในต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีการแสดงออกที่ลดลง จากค่า Cp ที่เพิ่มขึ้น การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *bar* พบเฉพาะต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด และการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *CHS* ต้นที่ไม่ได้รับ และต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนมีค่า Cp ที่ใกล้เคียงกัน

ผลการคำนวณค่าการแสดงออกของยีน *F3H* (Relative gene expression) ในต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด 5 ต้น ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 (ห่างกัน 10 เดือน) มีค่าการแสดงออกของยีน 0.0496 เท่า และ 0.466 เท่า ตามลำดับ พบว่าการยับยั้งการแสดงของยีนลดลงเมื่อต้นถูกเลี้ยงเป็นเวลานาน การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยวิธี RT-PCR และ Real-time PCR ให้ผลไปในแนวทางเดียวกัน คือต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดมีการแสดงออกของยีน *F3H* ลดลงจึงสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Thesis Title</b>	RNAi-Mediated Silencing of the <i>Flavanone 3-Hydroxylase</i> Gene in Lotus ( <i>Nelumbo nucifera</i> Geartn.) cv. Buntharik
<b>Student</b>	Chatree Konee
<b>Student ID.</b>	55640801
<b>Degree</b>	Master of Science
<b>Program</b>	Agricultural Biotechnology
<b>Year</b>	2015
<b>Thesis Advisor</b>	Assist. Prof. Dr. Kanjana Saetiew

## ABSTRACT

The *favanone 3-hydroxylase* (*F3H*) gene is a key enzyme in anthocyanin biosynthesis pathway. The silencing of *F3H* expression were transformed into Buntharik lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn.) by particle bombardment and agrobacterium transformation. RNA interference of the *F3H* gene has been reported to inhibit the synthesis anthocyanin. The plasmid pJA8*F3H* contained inverted repeats of *F3H* fragments, *bar* gene as a selectable marker in plants which this gene is resistant to basta (glufosinate amonium). The basta concentration was tested for lotus transgenic selection. Basta at 10 mg/l was the lowest concentration that could eliminate all multiple shoots. The augmentin concentration was tested for eliminate agrobacterium. It was found that the multiple shoot showed the least concentration at 500 mg/l augmentin.

The transformation of lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn.) cv. Buntharik by agrobacterium was obtained the multiple shoot of lotus in which they could not regenerate and died. However, the transformation of particle bombardment was obtained the multiple shoots of lotus they could developed when they were cultured on MS (1962) medium containing basta as a selectable marker. The comparison of gene expression analysis using reverse transcription PCR (RT-PCR) techniques was shown 300 bp fragment of *F3H* gene to decrease in transgenic lotus compared with non transformation (control). The expression of *bar* gene was found in 1 of 5 of transgenic lotus but not found in control. The *CHS* gene expression was found that there was no different between transgenic and control.

The comparison of gene expression by Real time PCR techniques was obtained by the increasing gene from number of cycles (crossing point; Cp) *F3H* gene expression analysis

showed that expression of *F3H* decrease in transgenic lotus when compare with the control. The *bar* gene expression was found only in transgenic lotus. The *CHS* gene expression also showed no different expression between transgenic and non transgenic control.

On the first and the second test (which were 10 months different period) 5 transgenic lotus of the relative expression *F3H* gene was detected with 0.0496 and 0.466 times respectively. The inhibit of gene expression decreased when they were cultured for long time. The expression *F3H* gene was detected by RT-PCR and Real time PCR resulted in consistent for decrease in transgenic lotus compared with non transgenic lotus ( control) which were able to inhibit the expression *F3H* gene.



## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาและครอบครัวของข้าพเจ้า ที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกเรื่องๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.กัญญา แซ่เตียว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำแนะนำ และให้แนวทางแก้ไขปัญหาในเรื่องการทดลอง จนทำให้สามารถแก้ไขปัญหาในการทดลองและสามารถดำเนินการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. สุเมธ ธีรธรรม ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์ ผศ.ดร.ลำแพน ขวัญพูล และดร.นงลักษณ์ เกรินทวงศ์ ที่กรุณาให้ความรู้ตลอดจนคำแนะนำระหว่างการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จได้เป็นอย่างดี และกรุณาสละเวลามาเป็นผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร ที่ได้ให้วิชาความรู้ต่างๆ ให้กับข้าพเจ้า ขอขอบคุณ คุณสุนิสา บุญใช้ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ช่วยเหลือในการเตรียมอุปกรณ์ในการทดลอง และช่วยดูแลห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ขอขอบคุณ คุณปฤษฎางค์ อะโน คุณวรวิทย์ เอี่ยมมงคล คุณชัชวกรกุล ไชยปัญญา คุณวสันต์ แสงอินทร์ และพี่ๆ น้องๆ ในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร ที่ได้คำแนะนำและช่วยเหลือข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา

สุดท้ายนี้วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) และกองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ภายใต้โครงการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยวิธีตัดแต่งพันธุกรรม

ชาตรี กอนี

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	XIII
สารบัญตารางภาคผนวก.....	XV
สารบัญภาพ.....	XVI
รายการคำย่อและสัญลักษณ์.....	XIX
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สถานที่ดำเนินงาน.....	2
1.4 สมมุติฐานของการศึกษา.....	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
1.6 ระยะเวลาการดำเนินการ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวหลวง.....	4
2.2 วิธีของการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน.....	5
2.3 การยับยั้งการทำงานของ mRNA โดย RNA interference (RNAi).....	7
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายยีนโดยเทคนิค RNA interference (RNAi).....	8
2.5 เวกเตอร์ pJA8F3H.....	9
2.6 การถ่ายฝากยีนในพืช.....	9
2.7 การคัดเลือกและการตรวจสอบการแสดงออกของยีน.....	11
2.7.1 การคัดเลือกใช้โดยสารปฏิชีวนะ ampicillin.....	11
2.7.2 การคัดเลือกบนอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืช basta.....	11
2.7.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี RT-PCR.....	11
2.7.4 การตรวจการแสดงออกของยีนโดยวิธี Real time PCR.....	11
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายยีนเข้าสู่พืช.....	12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	16
3.1 อุปกรณ์และวัสดุการวิจัย.....	16
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	19
3.2.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืช.....	19
3.2.2 การทดสอบสารคัดเลือกละสารปฏิชีวนะ.....	19
3.2.3 การเตรียมพลาสมิด pJA8F3H และการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง.....	20
3.2.3.1 การเตรียม competent cell ของเชื้อ <i>E.coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ .....	20
3.2.3.2 การถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าสู่ competent cell ของเชื้อ <i>E.coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ .....	21
3.2.3.3 การตรวจสอบพลาสมิด pJA8F3H ของเชื้อ <i>E.coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ โดยวิธี โคลนีนีพีซีอาร์ (colony polymerase chain reaction).....	22
3.2.3.4 การตรวจสอบพลาสมิด pJA8F3H ของเชื้อ <i>E.coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ โดยชุดสกัดพลาสมิด (High-speed plasmid mini kit) .....	22
3.2.3.5 การตรวจสอบพลาสมิด pJA8F3H ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III.....	23
3.2.3.6 การเตรียม competent cell ของอะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ GV3101.....	24
3.2.3.7 การถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าอะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ GV3101 ด้วยวิธี electroporation.....	24
3.2.3.8 การตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิด pJA8F3H ในอะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ GV3101 โดยวิธี โคลนีนีพีซีอาร์ (colony polymerase chain reaction).....	25
3.2.3.9 การถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ GV3101 เป็นพาหะ.....	25
3.2.3.10 การถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค .....	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตเห็นาเบเซบระยะขนดานการค้ำ  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต่อVII ำงอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.3.11 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>F3H</i> ในบัวหลวงพันธุ์ บุณฑริกภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด.....	28
3.2.3.12 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน <i>F3H bar</i> และ <i>CHS</i> ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด <i>pJA8F3H</i> ด้วยวิธี RT-PCR.....	30
3.2.3.13 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน <i>18S rRNA F3H</i> และ <i>CHS</i> ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกภายหลังจากการถ่ายโอน พลาสมิด <i>pJA8F3H</i> ด้วยเทคนิค Real time PCR.....	31
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	33
4.1 ผลการชักนำให้เกิด multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริก.....	33
4.2 ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช basta ใช้ คัดเลือกชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน.....	33
4.2.1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วน multiple shoot ที่รอดชีวิตบนอาหาร คัดเลือก MS ที่มีสารกำจัดวัชพืช basta ความเข้มข้นต่างๆ.....	34
4.2.2 จำนวนยอดของชิ้นส่วน multiple shoot ที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก MS ที่มีสารกำจัดวัชพืช basta ความเข้มข้นต่างๆ.....	34
4.2.3 จำนวนใบของชิ้นส่วน multiple shoot ที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก MS ที่มีสารกำจัดวัชพืช basta ความเข้มข้นต่างๆ.....	35
4.3 ผลการศึกษาหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ใช้กำจัดอะโกราแบคทีเรียของบัวหลวงภายหลังจากการถ่ายยีน.....	41
4.3.1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วน multiple shoot บนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะ augmentin ความเข้มข้นต่างๆ .....	41
4.3.2 เปอร์เซ็นต์ปนเปื้อน ของชิ้นส่วน multiple shoot บนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะ augmentin ความเข้มข้นต่างๆ .....	42
4.3.3 จำนวนยอดของชิ้นส่วน multiple shoot บนอาหาร MS ที่มีสาร ปฏิชีวนะ augmentin ความเข้มข้นต่างๆ .....	43
4.4 ผลของการเพิ่มปริมาณพลาสมิด <i>pJA8F3H</i> เพื่อใช้ในการถ่ายยีน.....	49

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4.1 ผลการตรวจสอบพลาสมิด pJA8F3H ของเชื้อ <i>E.coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ โดยวิธี โคลโลนีพีซีอาร์ (colony polymerase chain reaction).....	49
4.4.2 การตรวจสอบพลาสมิด pJA8F3H ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	49
4.4.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิด pJA8F3H ในอะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ GV3101 โดยวิธี โคลโลนีพีซีอาร์ .....	50
4.5 การถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวง.....	51
4.5.1 การถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ.....	52
4.5.1.1 ผลของการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย ครั้งที่ 1.....	52
4.5.1.2 ผลของการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย ครั้งที่ 2.....	52
4.5.1.3 ผลของการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย ครั้งที่ 3.....	53
4.5.2 การถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle gun bombardment).....	55
4.6 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>F3H bar</i> และ <i>CHS</i> ในบัวหลวงพันธุ์มูลนิธิภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H โดยวิธี RT-PCR.....	58
4.6.1 ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน <i>F3H</i> ( <i>flavanone 3-hydroxylase</i> )... ..	58
4.6.2 ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน <i>bar</i> ( <i>phosphinothricin acetyl transferrase</i> ).....	59
4.6.3 ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> ( <i>chalcone synthase</i> ).....	60
4.7 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>18S rRNA F3H bar</i> และ <i>CHS</i> ในบัวหลวงพันธุ์มูลนิธิภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H ด้วยเทคนิค Real time PCR.....	61
4.7.1 ผลการเตรียม Standard Curve ของยีน <i>18S rRNA F3H</i> และ <i>CHS</i> .....	61
4.7.1.1 ผลการเตรียม Standard Curve ของยีน <i>F3H</i> .....	62
4.7.1.2 ผลการเตรียม Standard Curve ของยีน <i>18S rRNA</i> .....	63
4.7.1.3 ผลการเตรียม Standard Curve ของยีน <i>CHS</i> .....	64

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.7.2 ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน <i>18S rRNA</i> <i>F3H bar</i> และ <i>CHS</i> ด้วยเทคนิค Real time PCR ภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด.....	66
4.7.2.1 ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน <i>18S rRNA</i> ด้วยเทคนิค Real time PCR .....	66
4.7.2.2 ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน <i>F3H</i> ด้วยเทคนิค Real time PCR.....	69
4.7.2.3 ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน <i>bar</i> ด้วยเทคนิค Real time PCR .....	71
4.7.2.4 ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> ด้วยเทคนิค Real time PCR .....	73
4.7.3 ผลการคำนวณค่าการแสดงออกของยีน <i>F3H</i> (Relative gene expression) โดยใช้ยีน <i>18S rRNA</i> เป็นยีนอ้างอิง ด้วยเทคนิค Real time PCR .....	75
4.7.3.1 ผลการคำนวณค่าการแสดงออกของยีน <i>F3H</i> ครั้งที่ 1.....	76
4.7.3.2 ผลการคำนวณค่าการแสดงออกของยีน <i>F3H</i> ครั้งที่ 2.....	77
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง.....	78
5.1 การศึกษาหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช <i>basta</i> เพื่อใช้ ในการคัดเลือก ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน.....	78
5.2 การศึกษาหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ <i>augmentin</i> ที่ใช้ในการกำจัดอะ โกรแบคทีเรีย เพื่อใช้คัดเลือก multiple shoot ของ บัวหลวงภายหลังการถ่ายยีน.....	79
5.3 การถ่ายโอนพลาสมิด <i>pJA8F3H</i> เข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวง โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค และอะ โกรแบคทีเรียเป็นพาหะ.....	80
5.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>F3H bar</i> และ <i>CHS</i> ในบัวหลวงพันธุ์ บุญทริกภายหลังการถ่ายโอนพลาสมิด <i>pJA8F3H</i> โดยวิธี RT-PCR.....	81
5.5 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน <i>F3H bar</i> และ <i>CHS</i> และผลการ คำนวณค่าการแสดงออกของยีน <i>F3H</i> (Relative gene expression) ด้วยเทคนิค Real time PCR .....	83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	84
บรรณานุกรม.....	85
ภาคผนวก 1.....	91
1.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร Murashige and Skoog. 1962.....	92
1.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB).....	93
1.3 การเตรียมสารเคมีสำหรับการเตรียมคอมพิวเตอร์เซลล์ .....	93
1.4 การเตรียมบัฟเฟอร์ CTAB (Doyle and Doyle. 1987).....	94
1.5 การเตรียมสารละลาย TE buffer (Tris-EDTA) .....	94
1.6 การเตรียมสารละลาย TAE buffer (Tris acetate EDTA) .....	94
1.7 การเตรียม 10X loading buffer .....	95
1.8 การเตรียม Ethidium bromide .....	95
1.9 การเตรียม 100 mM Acetosyringone .....	95
1.10 การเตรียม 20 % Glucose.....	95
1.11 การเตรียม 1 M Sorbitol.....	96
1.12 การเตรียม 1U/ $\mu$ l Ribolock RNase Inhibiter.....	96
1.13 การเตรียม Alkaline lysis solution สำหรับสกัดพลาสมิด.....	96
ภาคผนวก 2 .....	98
2.1 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	99
ภาคผนวก 3 .....	100
3.1 Amplification curves ของบิวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยใช้ ไพรมเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน <i>F3H</i> ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ cDNA ต่อจำนวนรอบ (Cycles) ของปฏิกิริยา Real time PCR.....	101
3.2 Amplification curves ของบิวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยใช้ไพรมเมอร์ ที่มีความจำเพาะกับยีน <i>18S rRNA</i> ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ cDNA ต่อจำนวนรอบ (Cycles) ของปฏิกิริยา Real time PCR.....	101

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3	Amplification curves ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยใช้ ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน <i>CHS</i> ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ cDNA ต่อจำนวนรอบ (Cycles) ของปฏิกิริยา Real time PCR.....	101
3.4	เปรียบเทียบค่าการแสดงของยีน <i>F3H</i> ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก จำนวน ทั้งหมด 5 ต้น โดยใช้ <i>18S rRNA</i> เป็นยีนอ้างอิง (ครั้งที่ 1).....	102
3.5	เปรียบเทียบค่าการแสดงของยีน <i>F3H</i> ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก จำนวน ทั้งหมด 5 ต้น โดยใช้ <i>18S rRNA</i> เป็นยีนอ้างอิง (ครั้งที่ 2).....	103
	ประวัติผู้เขียน.....	104

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และตั้งชื่ออ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR และ Real time RCR เพื่อตรวจสอบการ แสดงออกของยีน <i>F3H</i> , <i>bar</i> และ <i>CHS</i> .....	31
4.1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วน multiple shoot ที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก MS ที่มีสารกำจัดวัชพืช basta ความเข้มข้นต่างๆ.....	38
4.2 จำนวนยอดของชิ้นส่วน multiple shoot ที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก MS ที่มีสารกำจัดวัชพืช basta ความเข้มข้นต่างๆ.....	39
4.3 จำนวนใบของชิ้นส่วน multiple shoot ที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก MS ที่มีสารกำจัดวัชพืช basta ความเข้มข้นต่างๆ.....	40
4.4 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วน multiple shoot บนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะ augmentin ความเข้มข้นต่างๆ.....	45
4.5 เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของชิ้นส่วน multiple shoot บนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะ augmentin ความเข้มข้นต่างๆ.....	46
4.6 จำนวนยอดเฉลี่ยของชิ้นส่วน multiple shoot บนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะ augmentin ความเข้มข้นต่างๆ.....	47
4.7 จำนวนยอด และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ multiple shoot หลังการ ถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ บนอาหารคัดเลือก MS และ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ basta 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ augmentin 500 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	54
4.8 จำนวนยอด เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และจำนวนต้นที่รอดชีวิตของ multiple shoot หลังการถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาคบนอาหารคัดเลือก MS และ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ basta 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร .....	56
4.9 จำนวนรอบ Crossing point (Cp) ปฏิกิริยาที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน <i>F3H</i> ในบิวทลงพ่นรูปอนุภาคโดยใช้ไพรมเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ cDNA ดังนี้ 1/10x, 1/100x, 1/1,000x และ 1/10,000x.....	62
4.10 จำนวนรอบ Crossing point (Cp) ปฏิกิริยาที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน <i>18S rRNA</i> ในบิวทลงพ่นรูปอนุภาคโดยใช้ไพรมเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ cDNA ดังนี้ 1/10x, 1/100x และ 1/1,000x .....	64

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.11 จำนวนรอบ Crossing point (Cp) ปฏิบัติการที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> ในบัวหลวงพันธุ์มณฑริก โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ cDNA ดังนี้ 1/10x, 1/100x, 1/1,000x และ 1/10,000x.....	65
4.12 จำนวนรอบ Crossing point (Cp) ปฏิบัติการที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน <i>18S rRNA</i> ในบัวหลวงพันธุ์มณฑริก โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน <i>18S rRNA</i> เป็นยีนอ้างอิง ทำการตรวจสอบ ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 .....	67
4.13 จำนวนรอบ Crossing point (Cp) ปฏิบัติการที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน <i>F3H</i> ในบัวหลวงพันธุ์มณฑริก โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ทำการตรวจสอบ ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2.....	70
4.14 จำนวนรอบ Crossing point (Cp) ปฏิบัติการที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน <i>bar</i> ในบัวหลวงพันธุ์มณฑริก โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ทำการตรวจสอบ ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 .....	73
4.15 จำนวนรอบ Crossing point (Cp) ปฏิบัติการที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> ในบัวหลวงพันธุ์มณฑริก โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ทำการตรวจสอบ ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 .....	75

# สารบัญภาคผนวก

ตารางที่	หน้า
1.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962.).....	92
2.1 โพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR และ Real time PCR เพื่อตรวจสอบ การแสดงออกของยีน <i>F3H bar</i> และ <i>CHS</i> .....	99
3.1 Amplification curves ของบัวหลวงพันธุ์มณฑริกโดยใช้ โพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน <i>F3H</i> ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ cDNA ต่อจำนวนรอบ (Cycles) ของปฏิกิริยา Real time PCR.....	101
3.2 Amplification curves ของบัวหลวงพันธุ์มณฑริกโดยใช้ โพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน <i>18S rRNA</i> ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ cDNA ต่อจำนวนรอบ (Cycles) ของปฏิกิริยา Real time PCR.....	101
3.3 Amplification curves ของบัวหลวงพันธุ์มณฑริกโดยใช้ โพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน <i>CHS</i> ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ cDNA ต่อจำนวนรอบ (Cycles) ของปฏิกิริยา Real time PCR.....	101
3.4 เปรียบเทียบค่าการแสดงของยีน <i>F3H</i> ของบัวหลวงพันธุ์มณฑริก จำนวนทั้งหมด 5 ต้น โดยใช้ <i>18S rRNA</i> เป็นยีนอ้างอิง (ครั้งที่ 1).....	102
3.5 เปรียบเทียบค่าการแสดงของยีน <i>F3H</i> ของบัวหลวงพันธุ์มณฑริก จำนวนทั้งหมด 5 ต้น โดยใช้ <i>18S rRNA</i> เป็นยีนอ้างอิง (ครั้งที่ 2).....	103

# สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ลักษณะดอกของบัว.....	5
2.2 วิธีของการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน.....	6
2.3 การทำงานของ dicer และ RISC ในการยับยั้งกระบวนการถอดรหัส.....	7
2.4 แผนภาพเวกเตอร์ pJA8F3H ที่มีความยาว 6720 bp.....	9
3.1 การชักนำให้เกิด multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก.....	19
4.1 ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก.....	33
4.2 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ในการทดสอบระดับความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช basta ใช้เป็นสารคัดเลือก.....	37
4.3 การปนเปื้อนในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก ในการทดสอบระดับ ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ใช้กำจัดอะโกรแบคทีเรีย.....	48
4.4 การตรวจสอบพลาสมิด pJA8F3H ของเชื้อ <i>E.coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ โดยวิธี โคโลนีพีซีอาร์ (colony polymerase chain reaction).....	49
4.5 การตรวจสอบพลาสมิด pJA8F3H ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III.....	50
4.6 แผนภาพเวกเตอร์ pJA8F3H และตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III .....	50
4.7 การตรวจสอบพลาสมิด pJA8F3H ของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ GV3101 โดยวิธีโคโลนีพีซีอาร์.....	51
4.8 บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกหลังการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H โดย ใช้เครื่องยิงอนุภาค ที่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ และพร้อมนำมาตรวจสอบ การแสดงออกของยีน .....	57
4.9 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน <i>F3H</i> ด้วยวิธี RT-PCR.....	59
4.10 การแสดงออกของยีน <i>bar</i> ด้วยวิธี RT-PCR.....	60
4.11 การแสดงออกของยีน <i>CHS</i> ด้วยวิธี RT-PCR.....	61
4.12 Standard curves แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ cDNA ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับค่า Crossing point (Cp) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน <i>F3H</i> .....	63
4.13 Standard curves แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ cDNA ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับค่า Crossing point (Cp) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน <i>18S rRNA</i> .....	64

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.14 Standard curves แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ cDNA ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับ ค่า Crossing point (Cp) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน <i>CHS</i> .....	65
4.15 Amplification Curve (ครั้งที่ 1) ที่แสดงความสัมพันธ์ในการเพิ่ม ปริมาณของยีน <i>18S rRNA</i> เป็นยีนอ้างอิงกับจำนวนรอบ Crossing point (Cp) ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก .....	68
4.16 Amplification Curve (ครั้งที่ 2) ที่แสดงความสัมพันธ์ในการเพิ่ม ปริมาณของยีน <i>18S rRNA</i> เป็นยีนอ้างอิงกับจำนวนรอบ Crossing point (Cp) ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก.....	68
4.17 Amplification Curve (ครั้งที่ 1) ที่แสดงความสัมพันธ์ในการ เพิ่มปริมาณของยีน <i>F3H</i> กับจำนวนรอบ Crossing point (Cp) ใน บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก.....	69
4.18 Amplification Curve (ครั้งที่ 2) ที่แสดงความสัมพันธ์ในการ เพิ่มปริมาณของยีน <i>F3H</i> กับจำนวนรอบ Crossing point (Cp) ใน บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก.....	71
4.19 Amplification Curve (ครั้งที่ 1) ที่แสดงความสัมพันธ์ในการ เพิ่มปริมาณของยีน <i>bar</i> กับจำนวนรอบ Crossing point (Cp) ใน บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก.....	72
4.20 Amplification Curve (ครั้งที่ 2) ที่แสดงความสัมพันธ์ใน การเพิ่มปริมาณของยีน <i>bar</i> กับจำนวนรอบ Crossing point (Cp) ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก.....	72
4.21 Amplification Curve (ครั้งที่ 1) ที่แสดงความสัมพันธ์ใน การเพิ่มปริมาณของยีน <i>CHS</i> กับจำนวนรอบ Crossing point (Cp) ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก.....	74
4.22 Amplification Curve (ครั้งที่ 2) ที่แสดงความสัมพันธ์ใน การเพิ่มปริมาณของยีน <i>CHS</i> กับจำนวนรอบ Crossing point (Cp) ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก.....	74

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.23 ค่าการแสดงออกของยีน <i>F3H</i> (Relative gene expression) โดยใช้ยีน <i>18S rRNA</i> เป็นยีนอ้างอิง (ครั้งที่ 1).....	76
4.24 ค่าการแสดงออกของยีน <i>F3H</i> (Relative gene expression) โดยใช้ยีน <i>18S rRNA</i> เป็นยีนอ้างอิง (ครั้งที่ 2).....	77



## รายการคำย่อและสัญลักษณ์

bp	=	base pair
kb	=	kilobase pair
RNAi	=	RNA interference
RNA	=	Ribonucleic acid
cDNA	=	Complementary deoxyribonucleic acid
rRNA	=	ribosomal Ribonucleic acid
mRNA	=	messenger Ribonucleic acid
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
PCR	=	Polymerase chain reaction
$\alpha$	=	alpha
$\beta$	=	beta
RT-PCR	=	Reverse transcription polymerase chain reaction
MS	=	Murashige and Skoog (1962)
LB	=	Luria-Bertani agar
NAA	=	1-Napthalene acetic acid
TDZ	=	Thiadiazuron
BA	=	6-Benzyladenine
HCl	=	Hydrochloric acid
NaOH	=	Sodium hydroxide

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในบรรดาดอกไม้ที่มีคุณค่า เป็นที่นิยมในทุกภูมิภาคของโลก เชื่อว่าทุกคนต้องนึกถึง “บัว เป็นราชินีแห่งไม้น้ำ” ด้วยในอดีตกาลหลายพันปีมาแล้ว ปรากฏว่า บัว เป็นดอกไม้ศักดิ์สิทธิ์ ใช้บูชาเทพเจ้าของอียิปต์ในสมัยโบราณ ทางพุทธศาสนา ดอกไม้ที่ใช้บูชาพระ พุทธศาสนิกชนก็นึกถึง ดอกบัวหลวงก่อนดอกไม้อื่น (คณิตา เลอะกุล. 2535) บัวหลวงเป็นไม้น้ำประเภทล้มลุก อายุหลายปี น้ำยางขาวเมื่อถูกอากาศจะเป็นเส้นใย เหนียวและไหลอยู่ใต้ดินโคลน ก้านใบยาวและแข็งชูขึ้นเหนือระดับผิวน้ำ ลักษณะใบค่อนข้างกลม และเป็นคลื่นเล็กน้อย แผ่นใบเรียบ สีเขียวและมีนวลเคลือบ ดอกเป็นดอกเดี่ยว กลีบดอกร่วงเร็ว ฐานรองดอกเป็นรูปกรวย (สุรเชษฐ จิตตะวิกุล และ ปัญญา โพธิ์จิตร์รัตน์. 2535)

ในทางพฤกษศาสตร์ สามารถจำแนกบัวหลวงได้เป็น 2 สปีชีส์ คือ *Nelumbo nucifera* Gaertn. ประเทศไทยเรียกว่า บัวหลวง หรือว่า ปทุมชาติ ให้ดอกสีขาวและสีชมพู และ *Nelumbo lutea* Pers. มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาเหนือ บัวชนิดนี้ออกดอกได้เฉพาะเขตอากาศหนาว (เสริมลาภ วสุวัต. 2547) ลักษณะดอกคล้ายกับบัวหลวงของไทย แต่ดอกมีสีเหลืองอ่อน เคยมีผู้พยายามนำเข้ามาปลูกในเมืองไทย แต่ไม่สามารถออกดอก (คณิตา เลอะกุล. 2535) จะเห็นได้ว่าบัวหลวงในประเทศไทยมีอยู่ด้วยกันเพียง 2 สีเท่านั้น ซึ่งต่างจากบัวอุบลชาติดอกจะมีสีส้มหลายสี และชูดอกอันสวยงามขึ้นมาทำให้บรรยากาศมองดูแล้วสดชื่น จากความสวยงาม และสีสันของดอกบัวอุบลชาติดังกล่าว จึงทำให้ต้องแสวงหาแนวทางการใช้เทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาทำการดัดแปลงพันธุกรรมของบัวหลวงให้มีสีส้มที่หลากหลาย โดยควบคุมการผลิตสารสีในกลุ่มของแอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นสารสีกลุ่มที่สำคัญแก่พืช

งานวิจัยนี้ทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน *flavanone 3-hydroxylase (F3H)* ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) ในบัวหลวงพันธุ์บุษกริก เพื่อมีผลไปยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซม์ *flavanone 3-hydroxylase* ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตสารสีของบัวหลวง เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ของบัวหลวงให้มีสีส้มที่หลากหลายมากขึ้น

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช basta (glufosinate amonium) และสารปฏิชีวนะ augmentin (โดยมีสารออกฤทธิ์คือ amoxicillin) ที่เหมาะสมกับการใช้เป็นสารคัดเลือก และสารกำจัดอะโกรแบคทีเรียในบัวหลวงพันธุ์มณฑริก

1.2.2 เพื่อถ่ายยีน *flavanone 3-hydroxylase (F3H)* เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์มณฑริก โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค และอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ

1.2.3 เพื่อศึกษาผลการแสดงออกของยีน *F3H bar* และ *CHS* ภายหลังจากการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์มณฑริก

1.2.4 เพื่อศึกษาผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi ในบัวหลวงพันธุ์มณฑริก

## 1.3 สถานที่ดำเนินงาน

1.3.1 ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลักสูตรพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

1.3.2 ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

1.3.2 ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม

## 1.4 สมมุติฐานของการศึกษา

ศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน *flavanone 3-hydroxylase (F3H)* ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) ซึ่งเป็นยีนที่สำคัญในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน โดยทำการถ่ายยีน *F3H* เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์มณฑริก โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค และอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ ซึ่งมีผลไปยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* และจึงมีความเป็นไปได้ที่จะมีปริมาณการแสดงออกของยีนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม

## 1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบผลของความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช basta (glufosinate amonium) และสารปฏิชีวนะ augmentin ที่เหมาะสมในการใช้เป็นสารคัดเลือก และสารกำจัดอะโกรแบคทีเรียในบัวหลวงพันธุ์มณฑริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5.2 ทราบผลของการถ่ายยีน *flavanone 3-hydroxylase (F3H)* ในบัวหลวงพันธุ์บุญทริก โดยวิธีการยิงอนุภาค และใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ

1.5.3 ทราบผลของการแสดงออกของยีน *F3H bar* และ *CHS* ภายหลังจากถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุญทริก

1.5.4 ทราบผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi ในบัวหลวงพันธุ์บุญทริก

## 1.6 ระยะเวลาการดำเนินการ

เริ่มต้นการทดลอง เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2555

สิ้นสุดการทดลอง เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2558



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวหลวง

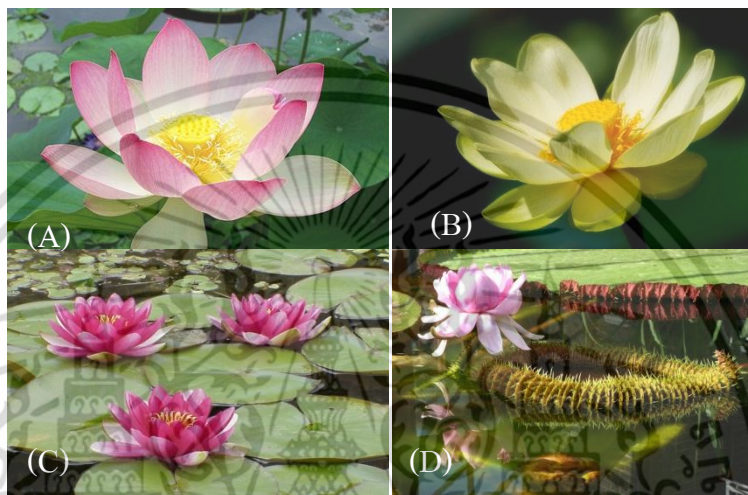
บัวหลวงเป็นพืชสกุลหนึ่งที่อยู่กันเป็นอย่างดีในประเทศไทย ในเขตร้อน เขตอบอุ่น และเขตหนาว นอกจากจะนำดอกมาใช้ประโยชน์แล้ว ส่วนอื่นๆ เช่น ใบบัว ไหล และเหง้า ยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อีกด้วย (วิเศษฐ คำสุวรรณ. 2535) เนื่องจากบัวหลวงเป็นพืชที่ปลูกง่ายและขึ้นโดยทั่วไป จึงพบว่ามีทั้งที่ขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือปลูกขึ้นเป็นไม้ประดับตามบ้านในกระถาง บ่อ หรือคูน้ำ ถ้าปลูกเป็นจำนวนมากจะเรียกว่านาบัว เพื่อเก็บดอกหรือเมล็ดเป็นการค้า และได้จัดบัวหลวงเป็นพืชสมุนไพรอีกชนิดหนึ่ง ปัจจุบันบัวที่นิยมปลูกเป็นไม้ประดับมี 3 สกุล คือ *Nelumbo*, *Nymphaea*, และ *Victoria* (เสริมลาภ วสุวัต. 2547) โดยมีรายละเอียดดังนี้คือ

2.1.1 บัวหลวงเป็นพืชอยู่ในวงศ์ Nelumboaceae สกุล *Nelumbo* บัวหลวงแบ่งออกเป็น 2 สปีชีส์ คือ *Nelumbo lutea* Pers. และ *Nelumbo nucifera* Gaertn. ลักษณะทั่วไป เป็นไม้ไหลเหนือน้ำอายุหลายปี ลำต้นมีทั้งเป็นเหง้าใต้ดิน และเป็นไหลเหนือดินใต้น้ำ ใบเดี่ยว รูปไข่ค่อนข้างกลม แผ่นใบเรียบ สีเขียวมีนวลเคลือบ ก้านใบกลมเรียวยาวแข็งส่งใบให้เจริญขึ้นเหนือผิวน้ำ มีหนามภายใน ก้านใบมียางใส ดอก เป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ก้านดอกสีเขียว มีกลีบเลี้ยง 4-5 กลีบ มีทั้งดอกเดี่ยวและดอกซ้อน ผล เป็นแบบผลกลุ่มประกอบด้วยผลย่อยรูปกลมรีจำนวนมากอยู่ภายใน ฝักบัวรูปกรวย ในผลย่อยมีเมล็ดอ่อน (เสริมลาภ วสุวัต. 2547) ส่วนสกุล *Nelumbo lutea* Pers. มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาเหนือ ลักษณะดอกคล้ายกับบัวหลวงของไทย แต่ดอกมีสีเหลืองอ่อนขนาด 6-10 นิ้ว ดอกจะชูขึ้น 3 ฟุต จากผิวน้ำ ใบมีสีน้ำเงินอมเขียว และกว้าง 1-2 ฟุต ผลย่อยลักษณะค่อนข้างกลมเคยมีผู้พยายามนำเข้ามาปลูกในเมืองไทย แต่ไม่สามารถปลูกเลี้ยงจนกระทั่งออกดอกได้ (คณิตา เลขะกุล. 2535)

2.1.2 วงศ์ Nymphaeaceae บัวอุบลชาติ สกุล *Nymphaea* ชื่อสามัญภาษาสากล คือ water lily มีชื่อเรียกทั่วไปว่า “อุบลชาติ” หรือ “บัวสาย” เป็นบัวก้านอ่อนส่งใบลอยผิวน้ำ ได้แก่ บัวฝรั่ง บัวผันบัวเพื่อน บัวจงกลณี บัวนางแก้ว บัวยักษ์ออสเตรเลีย และบัวสาย (เสริมลาภ วสุวัต. 2547) ลำต้นเป็นลำต้นใต้ดินมีลักษณะเป็นหัวหรือเหง้า ใบเกิดจากลำต้นใต้ดิน มีก้านใบ (petiole) ยาวส่งใบขึ้นมาเจริญที่ผิวน้ำ ใบมีลักษณะกลมหรือรูปไข่ ส่วนดอกเป็นดอกเดี่ยวมีก้านดอก ส่งดอกเจริญขึ้นมาที่ผิวน้ำ บัวอุบลชาติมีทั้งดอกบานกลางวัน และบานกลางคืน บางพันธุ์มีกลิ่นหอม ดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 4 กลีบ แต่จะมีจำนวนกลีบดอกจำนวนแตกต่างกันไป (สุรเชษฐ จิตตะวิกุล และ ปัญญา โพธิ์จิตร์ตัน. 2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 สกุล *Victoria* มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ บัววิกตอเรียเป็นบัวที่ใหญ่ที่สุดในโลก โดยทั่วไปเรียกกันว่า “บัวกระดิ่ง” บัวชนิดนี้ไม่สามารถนำมาปลูกในภาชนะที่มีพื้นที่จำกัดได้ เพราะใบมีขนาดใหญ่มาก เป็นใบเดี่ยว ขอบใบตั้งตรง ใบที่มีอายุน้อยจะมีสีแดงคล้ำ แต่พอใบแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ผิวใบด้านล่างมีหนาม ดอกเป็นดอกเดี่ยวมีขนาดใหญ่ มีกลิ่นหอม กลีบเลี้ยงและกลีบดอกด้านนอกมีหนาม ดอกมีกลีบเลี้ยง 4 กลีบ และมีกลีบดอกจำนวนมาก บัวในสกุลนี้ นำเข้ามาปลูกในประเทศไทยนานแล้ว (สุรเชษฐ จิตตะวิกุล และ ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์. 2535)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะดอกของบัวหลวงสีกลีบโลกวันออก (A), บัวหลวงสีกลีบโลกตะวันตก (B), บัวสาย (C) และบัววิกตอเรีย (D) ที่มา (www.water-lily.com)

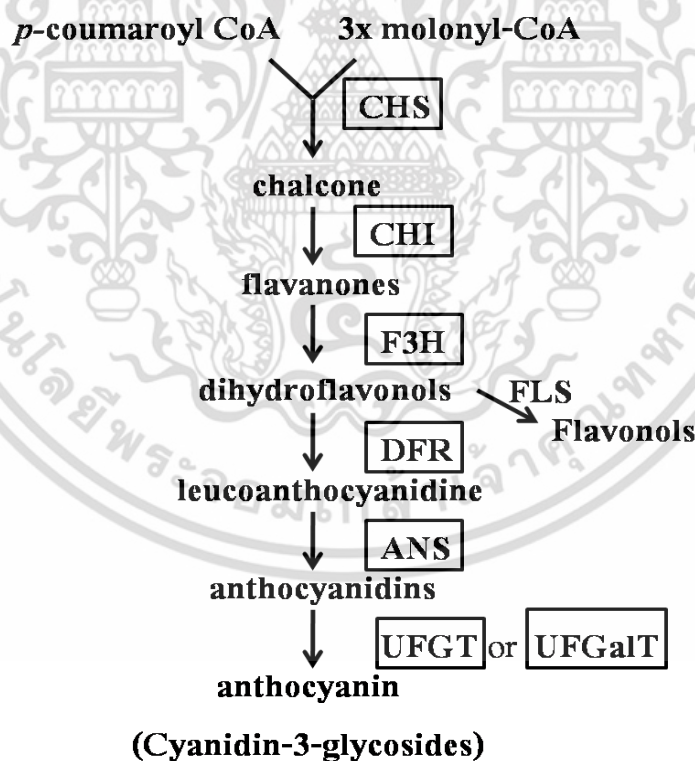
## 2.2 วิธีของการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

สีของดอกไม้เกิดขึ้นเนื่องจากการสะสมสารสีที่แตกต่างกัน เช่น คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และแอนโทไซยานิน สารในกลุ่มแอนโทไซยานินเป็นสารสีที่ให้สีแดง สีม่วง และสีน้ำเงิน (พรชนก ดันประคู่ และพัฒนา ศรีฟ้า. 2555) แอนโทไซยานิน เป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ จัดเป็นกลุ่มฟลาโวนอยด์ เป็นสารสีตามธรรมชาติ โดยสีของแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนไปตามภาวะกรด-ด่าง (กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2553) สารในกลุ่มแอนโทไซยานิน มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด แต่มีอยู่ 6 ชนิดที่พบบ่อย ได้แก่ เพลาโกนินิดิน (pelargonidin), ไซยานินิดิน (cyanidin), เดลฟินิดิน (delphinidin), พีโอนินิดิน (peonidin), เพทูนิดิน (petunidin) และ มอลวิดิดิน (malvidin) (นิสารัตน์ ศิริวัฒน์เมธานนท์. 2556)

แอนโทไซยานินประกอบด้วยส่วนของอะไกลโคน (aglycone) น้ำตาล และหมู่เอซิล (acyl group) แอนโทไซยานินมีด้วยกันหลายชนิด แต่ทุกชนิดมีโครงสร้างหลักเป็นสารชนิดเดียวกันที่เรียกว่า แอนโทไซยานินิดิน (anthocyanidins) มีคาร์บอน 15 อะตอมอยู่ภายในโมเลกุล โครงสร้างแบบ C6-C3-C6 ซึ่งเป็น ไกลโคไซด์ (glycoside) ของ 2-phenylbenzopyrylium หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

flavylium cation การแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซี (OH) และหมู่เมทอกซี (OCH<sub>3</sub>) ของ flavylium ring จะทำให้เกิดสีของแอนโทไซยานินดังกล่าวคือ การเพิ่มจำนวนหมู่ไฮดรอกซีจะทำให้เกิดสีฟ้า (blue shade) ส่วนการเพิ่มจำนวนหมู่เมทอกซีจะทำให้เกิดสีแดง (red shade) (กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2553) วิธีของการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน มีสารตั้งต้นมาจาก กรดอะมิโน Phenylalanine ถูกเปลี่ยนเป็น *p*-coumaroyl CoA และทำปฏิกิริยากับ molonyl-CoA โดยเอนไซม์ *phenylalanine ammonia-lyase* (PAL) และ *cinnamic acid 4-hydrolase* (C4H) ตามลำดับ (Andre *et al.* 2009) หลังจากนั้นเอนไซม์ *chalcone synthase* (CHS) เปลี่ยนจาก *p*-coumaroyl CoA เป็น chalcone (Naringenin Chalcone) และเอนไซม์ *chalcone isomerase* (CHI) ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนไอโซเมอร์จาก chalcone เป็น flavanones (Naringenin) จากนั้นเอนไซม์ *flavanone 3-hydroxylase* (F3H) เปลี่ยน flavanones ได้เป็น dihydroflavonols ต่อมาเอนไซม์ *dihydroflavono 4-reductase* (DFR) เปลี่ยน dihydroflavonols เป็น leucoanthocyanidine จากนั้นเอนไซม์ *anthocyanidin synthase* (ANS) และ *UDP glucose-flavonoid 3-O-glucosyltransferase* (UFGT) ได้เป็น anthocyanidins และ anthocyanin ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2.2 (Kim *et al.* 2003)



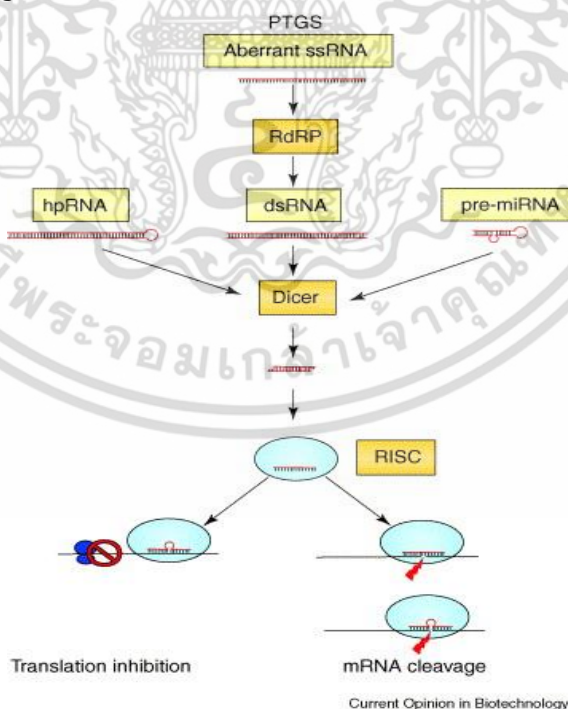
ภาพที่ 2.2 วิธีของการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (ที่มา Kim *et al.* 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 การยับยั้งการทำงานของ mRNA โดย RNA interference (RNAi)

สิ่งมีชีวิตพวกยูแคริโอตไม่ว่าจะเป็น พืช หรือสัตว์ จะมีชั้น RNA ขนาดเล็กที่สามารถยับยั้งการทำงานของ mRNA ได้ ชั้น RNA ขนาดเล็กเหล่านี้จะไปจับกับ mRNA เป้าหมาย และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน หรือทำให้เกิดการทำลายสาย mRNA ซึ่งเป็นการระงับการแสดงออกของยีน ในการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยกระบวนการที่กล่าวมานั้น มีความสำคัญต่อการพัฒนาของสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นกลไกที่จะควบคุมการแพร่กระจายของไวรัสโดยเฉพาะในพืช (พัชริ บุญศิริ และคณะ. 2551)

กลไกการควบคุมการแสดงออกของ RNAi เริ่มต้นจากชั้น RNA ขนาดเล็กซึ่งสามารถจับคู่เบสภายในสายและทำให้เกิด โครงสร้างรูปแบบ hairpin หรือ double strand RNA (ds RNA) เมื่อ double strand RNA เข้าไปอยู่ในเซลล์ (พัชริ บุญศิริ และคณะ. 2551) จะถูกตัดด้วย ribonuclease (RNase) ที่เป็น dicer ได้เป็น small interference RNA (siRNA) มีลักษณะเป็น RNA สายคู่สั้นๆ ยาวประมาณ 25 คู่เบส และ siRNA จะจับอยู่กับ โปรตีนเชิงซ้อน ได้เป็น RNA induced silencing complex (RISC) หลังจากนั้น RISC จะแยกสาย siRNA แล้วพาสาย antisense ของ siRNA ไปจับกับ โมเลกุลของ mRNA เป้าหมายที่มีคู่สายเข้าคู่กัน ได้เป็น ds RNA ขึ้นมาอีกครั้งหนึ่ง แล้วเกิดการกระตุ้นการทำงานของ RNase เข้ามาทำหน้าที่เป็น dicer ตัดสาย mRNA หากแปลรหัสเป็นโปรตีนได้ก็จะทำให้ได้โปรตีนที่ไม่สมบูรณ์และไม่สามารถทำหน้าที่ได้ จึงเรียกระบวนการยับยั้งนี้ว่า gene silencing (ตรีทิพย์ รัตนวรรษ. 2552) ดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 การทำงานของ dicer และ RISC ในการยับยั้งกระบวนการถอดรหัสและการแปลรหัส

โดยชั้น RNA ขนาดเล็กๆ (ที่มา Kusaba. 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการแสดงออกของยีนในรูปแบบ RNAi

Fukusaki *et al.* (2004) ได้ทำการทดลองเปลี่ยนสีของดอกแวมยูรา โดยใช้เทคนิค RNAi กับยีน *chalcone synthase (CHS)* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีของการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน โดยใช้ mRNA ของยีน *CHS* ในลักษณะ RNAi เป็นยีนเป้าหมาย ผลปรากฏว่าดอกแวมยูรา เปลี่ยนจากดอกสีม่วงเข้มเป็นดอกสีขาว และพบว่าเทคนิค RNAi มีประโยชน์อย่างมากสำหรับการปรับปรุงสีของดอกไม้ที่สำคัญในเชิงพาณิชย์

Nishihara *et al.* (2005) ได้ทำการสังเคราะห์ cDNA ของยีน *chalcone isomerase (CHI)* ที่แยกได้จากกลีบดอกของต้นยาสูบ โดยทำการถ่ายยีน *CHI* ในรูปแบบของ RNAi เพื่อที่จะไประงับ หรือเปลี่ยนวิถีของการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ ผลปรากฏว่าเกิดการสะสมของซาโคลปริมาณสูงมากที่ละอองเกสรเมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม ผลของการระงับการทำงานของยีน *CHI* ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของดอกแวมยูรา

Ono *et al.* (2006) ได้ทำการทดลองถ่ายยีนในกลุ่มออโรน (aurone) คือ ยีน *aurone synthase (AS)* ซึ่งให้สีเหลืองแก่ดอกแวมยูราสีม่วง (*Torenia hybrida*) พบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอก ต่อมาได้ถ่ายยีน *4'-O-glucosyl transferase (4'CGT)* ร่วมกับยีน *AS* พบว่าที่เกสรของดอกแวมยูราเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ต่อมาได้ทำการถ่ายยีน *4'CGT* และยีน *AS* ร่วมด้วยการยับยั้งการแสดงออกของยีน *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* ด้วยเทคนิค RNAi ผลคือดอกแวมยูรา เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

Miyawaki *et al.* (2012) ได้ทำการทดลองโดยใช้เทคนิค *Agrobacterium-mediated RNAi (AmRNAi)* ใช้พลาสมิด *pBI-GFP-FaF3H* และ *pBI-CHS* ฉีดเข้าไปในสตอเบอร์รี่พันธุ์ *Fragaria ananassa (Fa)* ภายหลังการเก็บเกี่ยว เพื่อดูการแสดงออกของยีน *Fa-Chalcone synthase (Fa-CHS)*, *Fa-chalcone isomerase (Fa-CHI)* และ *Fa-flavonoid 3-mydroxylase (Fa-F3H)* ผลการทดลองปรากฏว่า *Fa-F3H* ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ anthocyanin ในทางกลับกัน *Fa-CHS* มีผลต่อการลดลงของ anthocyanin เมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม แสดงว่า *CHS* มีผลโดยตรงต่อการสะสมของ anthocyanin ในสตอเบอร์รี่ สรุปได้ว่าเทคนิค RNAi สามารถที่จะอธิบายหน้าที่การแสดงออกของยีนได้

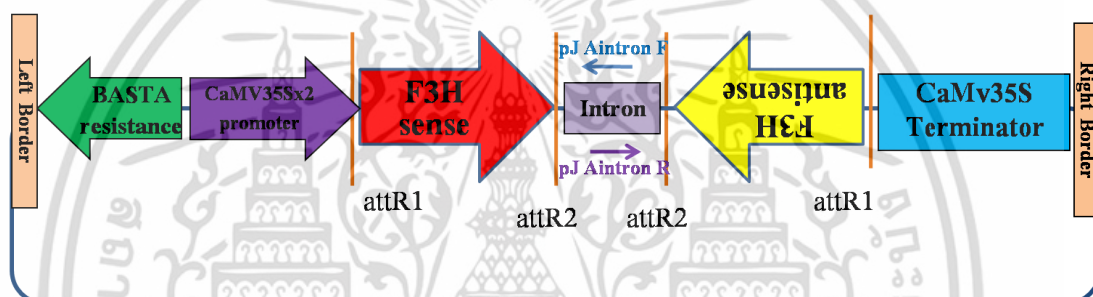
Jiang *et al.* (2013) ทำการศึกษาโครงสร้าง RNAi gene-silencing vector ที่มียีน *F3H* RNAi vector ฉีดเข้าไปในผลของสตอเบอร์รี่ภายหลังจากการปฏิสนธิ 14 วัน จากนั้นทำการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR และ northern blot assays ผลการทดลองได้แสดงว่า *F3H* gene มีการแสดงออกลดลงประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับพลาสมิด และผลของการวิเคราะห์ HPLC-MS แสดงให้เห็นว่าปริมาณแอนโทไซยานินมีระดับที่ลดลง และปริมาณ flavonol ก็มีระดับที่ลดลงเช่นกัน ซึ่งบ่งบอกได้ว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi เป็นเทคนิคที่

### มีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5 เวกเตอร์ pJA8F3H

เป็นการถ่ายโอนชิ้นส่วนยีน *F3H* เข้าสู่เวกเตอร์ pJAWOHL8 ด้วยปฏิกิริยา LR recombination reaction (ชัยวรกุล ไชยปัญญา, 2555) ได้เป็นเวกเตอร์ pJA8F3H (ดังภาพที่ 2.4) ที่สามารถสร้าง RNA รูปแบบ inverted repeat ในเวกเตอร์ pJA8F3H ที่ถูกควบคุมด้วย CaMV 35s promoter และ CaMV 35s terminator มียีนคัดเลือกในพืชคือ *phosphinothricin acetyl transferrase* (*bar* gene) ซึ่งต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช basta (glufosinate amonium) และมียีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ ampicillin (*ampicilline resistance gene, AmpR*) ซึ่งเป็นยีนคัดเลือกในแบคทีเรีย เมื่อทำการถ่ายโอนยีน *F3H* เข้าสู่พืช จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi ยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ในพืช โดยทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมของยีน *F3H* มีผลไปขัดขวางการสังเคราะห์สารกลุ่มแอนโทไซยานิน



ภาพที่ 2.4 แผนภาพเวกเตอร์ pJA8F3H ที่มีความยาว 6720 bp (ที่มา ชัยวรกุล ไชยปัญญา, 2555)

## 2.6 การถ่ายฝากยีนในพืช (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2536)

การถ่ายฝากยีนในพืชทำได้สำเร็จแล้วในพืชหลายชนิด เนื่องจากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งใช้รองรับการฝากถ่ายยีนมีความก้าวหน้ามาก สามารถเลี้ยงส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ใบ ราก ลำต้น กิ่ง ดอก อับละอองเกสร จนถึงกลุ่มเซลล์ และ โปรโตพลาสต์ จึงเกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ เทคนิคการฝากถ่ายยีนในพืชมีหลายวิธีดังนี้

### 2.6.1 การถ่ายผ่านโปรโตพลาสต์ (protoplast gene transfer)

การถ่ายยีนจะผ่านทางโปรโตพลาสต์ แล้วนำมาบ่มกับสารละลาย DNA ที่เตรียมไว้ นิยมใส่สารละลาย polyethylene glycol (PEG) จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของโปรโตพลาสต์อ่อนลง จึงมีโอกาสดที่ DNA จากภายนอกจะเข้าไปในเซลล์ได้มากขึ้น นอกจากนี้อาจใช้สารละลาย PEG ร่วมกับใช้ความร้อนระยะสั้นๆ โดยนำโปรโตพลาสต์ที่อยู่ในสารละลาย DNA และ PEG มาใส่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงย้ายมาใส่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 10 นาที (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2536)

### 2.6.2 การถ่ายฝากยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation)

Electroporation เป็นวิธีที่ใช้ให้เกิดช่องขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์โดยใช้กระแสไฟฟ้า นำมาประยุกต์ใช้ในการถ่ายฝากยีนในพืช กระแสไฟฟ้าที่ใช้มี 2 ระบบ คือ ระบบใช้ความแรงของไฟฟ้าต่ำ ระยะเวลาสั้น (long pulse) และระบบที่ใช้ความแรงของกระแสไฟฟ้าสูงกว่า แต่ใช้เวลานาน (short pulse) ทั้งนี้ขนาดกระแสไฟฟ้าที่ใช้ และระยะเวลาขึ้นอยู่กับขนาดของโปรโตพลาสต์ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2536)

### 2.6.3 การถ่ายฝากยีนโดยใช้เข็มฉีดยา (microinjection)

เป็นวิธีการฉีด DNA เข้าไปในเซลล์ซึ่งในพืชทำได้ยากกว่าสัตว์ เนื่องจากพืชมีแวคิวโอล ซึ่งเป็นที่เก็บสะสมเอนไซม์และสารพิษหลายชนิด การฉีดต้องระมัดระวังไม่ให้ถูกแวคิวโอลแตก เพราะจะทำให้เซลล์ตาย บางครั้งพบว่านิวเคลียสซ่อนอยู่หลังแวคิวโอล ทำให้ไม่สามารถฉีด DNA เข้าไปได้ วิธีแก้คือ เลือกเซลล์ที่มีนิวเคลียสอยู่ริมขอบเซลล์ในทิศทางของเข็มที่ฉีด อีกทางหนึ่งคือ ทำให้เซลล์เกาะติดอยู่กับที่เพื่อสะดวกในการฉีด (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2536)

### 2.6.4 การถ่ายฝากยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle gun bombardment)

วิธีนี้อาศัยหลักการใช้แรงดันจากก๊าซฮีเลียมในสภาพสูญญากาศ โดยใช้ออนุภาคทั้งสเต็มหรือทองคำขนาดเล็ก ประมาณ 1-4 ไมครอน เคลือบด้วย DNA ที่เราต้องการถ่ายเข้าเซลล์แล้วใส่ลงในเครื่อง โดยปล่อยแรงดันจากก๊าซฮีเลียมในภาวะสูญญากาศ โดย DNA เข้าสู่เซลล์ด้วยความเร็วประมาณ 1,400 ฟุตต่อวินาที อนุภาคที่ใช้จะแทรกผ่านผนังเซลล์เข้าไปภายใน และพา DNA เข้าไปด้วย วิธีนี้ใช้ได้กับเซลล์ที่มีผนังเซลล์โดยไม่ต้องทำเป็นโปรโตพลาสต์ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2536)

### 2.6.5 การถ่ายฝากยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย (Agrobacterium mediated gene transfer)

อะโกรแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถเข้าไปในต้นพืชได้ผ่านบริเวณที่มีบาดแผล ทำให้พืชเป็นปุ่มปม (tumour) เมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณนั้นมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สามารถคงสภาพเช่นเดิมได้ คือ เจริญเติบโตได้รวดเร็วแม้ว่าจะกำจัดแบคทีเรียออกแล้วก็ตาม แต่จะไม่พัฒนาเป็นเนื้อเยื่อที่สมบูรณ์ได้ กลไกการส่งถ่ายยีนโดยรวม กระบวนการส่งถ่ายกระตุ้นโดยสารประกอบ phenolic จากพืช คือ acetosyringone (AS) ซึ่งพืชปลดปล่อยออกมาเนื่องจากเกิดบาดแผล และการส่งถ่ายจะควบคุมโดย chromosomal virulence (chv) genes ซึ่งอยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรีย และ virulence region (vir gene) บนพลาสมิด Ti โดย T-DNA จะถูกตัดโดยเอนไซม์ซึ่งเป็นผลผลิตของยีน vir D ที่ขอบเขตทั้งสองข้าง แล้วจึงส่งถ่าย T-DNA เข้าสู่เซลล์พืช (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2536) ทิศทางการส่งถ่ายจะเริ่มจากขอบเขตทางด้านขวา Right Border (RB) เป็นส่วนที่จำเป็นมากสำหรับการส่ง T-DNA ส่วนขอบเขตทางด้านซ้าย Left Border (LB) ทำหน้าที่เป็น

ตัวกำหนดปลายของชิ้น DNA ที่จะส่งเท่านั้น (Lee and Gelvin. 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการเขียนเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.7 การคัดเลือกและการตรวจสอบการแสดงออกของยีน

### 2.7.1 การคัดเลือกโดยสารปฏิชีวนะ ampicillin

ในเวกเตอร์ pJA8F3H ที่ถูกควบคุมด้วย CaMV 35s promoter และ CaMV 35s terminator (ซัยวรกุล ไชยปัญญา. 2555) มียีนคัดเลือก *ampicilline resistance gene (AmpR)* เป็นยีนคัดเลือกที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ ampicillin ซึ่งเมื่อทำการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าสู่เชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al.* 1989) และ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ GV3101 ด้วยวิธี electroporation นำเชื้อที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YEP (Yeas Extract Phosphate Agar) ส่วนเชื้อ *E.coli* ให้เลี้ยงบนอาหาร LB (Luria-Bertani agar) แล้วเติมสารปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โคโลนีของเชื้อ *Agrobacterium* และ เชื้อ *E.coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H ก็จะสามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ Ampicillin ซึ่งเป็นการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่มีพลาสมิดเบื้องต้น (หัตยา การิวงศ์. 2548)

### 2.7.2 การคัดเลือกบนอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืช basta

เวกเตอร์ pJA8F3H มียีนคัดเลือกในพืชคือ *phosphinothricin acetyl transferrase (bar gene)* ซึ่งต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช basta (glufosinate amonium) ได้จากแบคทีเรีย *Streptomyces hygroscopicus* (Daud *et al.* 2009) โดยใช้อะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ GV3101 ที่มีพลาสมิด pJA8F3H เป็นพาหะในการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าไปในชิ้นส่วน multiple shoot บัวหลวง นำเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายโอนยีน เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ และ basta 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่ง basta เป็นสารกำจัดวัชพืช ใช้เป็นสารสำหรับคัดเลือกชิ้นส่วนบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด

### 2.7.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี RT-PCR เป็นวิธีหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการค้นหายีนที่แสดงออกแตกต่างกันในระดับ RNA เพื่อใช้จัดจำแนกและแยกยีนที่แสดงออกภายใต้สภาพที่หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นในเนื้อเยื่อที่ต่างกัน หรือภายใต้สภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง ด้วยวิธีการสกัด RNA ที่มีการแสดงออกในส่วนต่างๆ ส่วนของพืช และทำการตรวจสอบคุณภาพของ RNA จากนั้นทำ reverse transcription จาก mRNA ให้เป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase (หัตยา การิวงศ์. 2548) หลังจากนั้นออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีน *F3H*, *CHS* และ *bar* แล้วตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี PCR ต่อไป

### 2.7.4 การตรวจการแสดงออกของยีนโดยวิธี Real time PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) จัดเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิก

จากตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ ที่มีความไวสูง และวิธีทำสะดวกไม่ยุ่งยาก ทำให้มีการใช้กันอย่างเอาจริงเอาจังมากขึ้นเรื่อยๆ สำหรับการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ โดยเฉพาะในสาขาชีววิทยา การแพทย์ และเกษตรกรรม อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัดอยู่บ้าง เช่น ต้องการเครื่องมือที่ราคาแพง การปนเปื้อนของ DNA ที่ไม่เกี่ยวข้องอาจทำให้เกิดผลบวกลวงได้ และต้องอาศัยความรู้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสม

แพร่หลาย (วีระพงษ์ ลูติดานนท์ และนิภาภรณ์ แสนคุณท้าว, 2551) แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่สามารถหาปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้นในระยะเวลาต่างๆ ได้ แต่เป็นการวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้ในระยะเวลาสุดท้ายเท่านั้น ปัจจุบันมีเครื่องมือที่ได้รับการพัฒนา เรียกว่า Real time PCR เป็นการวิเคราะห์ด้านคุณภาพและด้านปริมาณ (ตรีทิพย์ รัตนวรชัย, 2552) เนื่องจากวิธี Real time PCR สามารถตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนของ DNA เป้าหมาย (target DNA) ได้ในขณะที่ปฏิกิริยายังดำเนินการอยู่ แต่วิธี PCR ธรรมดาหลังจากปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนและต้องนำมาตรวจสอบ DNA เป้าหมาย ด้วยวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis เพื่อแยกขนาดของผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานที่ทราบขนาดที่แน่นอน จึงทำให้ต้องใช้เวลานานขึ้น (วงศ์ขวัญ จิตนุพงษ์ และคณะ, 2555)

เทคนิค Real time PCR เกิดจากการพัฒนาเทคโนโลยีในการตรวจหา PCR product ในสารละลายโดยใช้สารเรืองแสง (fluorescence reporters) โดยการพัฒนาเครื่อง Real time thermocycler โดยเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของ PCR product และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดจาก PCR product ในหลอดปฏิกิริยา การที่เราสามารถตรวจวัด PCR product ได้ เกิดจากการทำให้ PCR product สามารถเกิดสัญญาณการเรืองแสงได้ ซึ่งมีวิธีการคือ การใช้ SYBR Green I Dye เป็นสารเรืองแสง (Fluorochrome) ประเภทหนึ่งที่สามารถกระตุ้นการเข้าจับกับ minor groove ของ DNA สายคู่ เมื่อ SYBR Green I เกาะกับ DNA สายคู่ และถูกกระตุ้น ด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต จะมีการคายพลังงานออกมาในรูปของแสงในช่วงคลื่น ( $\lambda$ ) ยาวขึ้น สามารถตรวจจับได้ด้วยตัวรับสัญญาณแสงที่ติดตั้งอยู่กับเครื่อง Real time thermocycler (วีระพงษ์ ลูติดานนท์ และนิภาภรณ์ แสนคุณท้าว, 2551)

## 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายยีนเข้าสู่พืช

วิลาลินี ลิทวิททรัพย์ (2554) ศึกษาการถ่ายยีน antisense *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* โดยใช้อะโกรแบคทีเรีย *สายพันธุ์ EHA105* เข้าสู่แคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุญทริก พบว่าการถ่ายยีนโดยพลาสมิด pCAMBIA 2301 DFR ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาบ่มร่วมกับเชื้อ ที่ทำให้แคลลัสมีความเจริญเติบโตดีที่สุด คือ 1:10 แช่นาน 10 นาที มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 9.33 เปอร์เซ็นต์

รวีรัฐ บัวทอง (2554) ได้ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสม ต่อการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัส ของบัวหลวงพันธุ์บุญทริก เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม Benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีผลต่อการเกิดยอดของชิ้นส่วนมากที่สุดเฉลี่ย 8.67 ยอด และมีจำนวนใบมากที่สุดเฉลี่ย 4.84 ใบ

Buathong *et al.* (2013) ได้ทำการถ่ายยีน antisense *DFR* เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุญทริก

โดยวิธีการยิงอนุภาค ใช้พลาสมิด pCAMBIA2301anti-*DFR* โดยมียื่นรายงานผล คือยีน *GUS* และเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีนคัดเลือก คือ *neomycin phosphotransferase (nptII)* นำมาตรวจสอบการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *GUS* เมื่อผ่านไป 72 ชั่วโมง หลังการยิงด้วยเครื่องยิงอนุภาค กลุ่มของยอดมีเซลล์ที่เป็นสีน้ำเงิน ซึ่งเป็นการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *GUS* มีการแสดงออกของ *GUS* มากที่สุด ที่แรงดัน 1100 psi และ ระยะยิง 6 เซนติเมตร ซึ่งให้จำนวนจุดเฉลี่ย 4.8 จุด ต่อหนึ่งชิ้นส่วนเริ่มต้น และมีโคลนที่ตรวจพบการมีอยู่ของยีน *GUS*, *nptII* และ *anti-DFR* ด้วยเทคนิค PCR จำนวน 4 โคลน ส่วน ที่แรงดัน 1100 psi และระยะยิง 9 เซนติเมตร ไม่เกิดจุดสีน้ำเงินจากการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน *GUS* แต่มีโคลนที่ตรวจพบการมีอยู่ของยีน *GUS*, *nptII* และ *anti-DFR* ด้วยเทคนิค PCR จำนวน 10 โคลน และเมื่อนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี RT-PCR มีโคลนที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน *nptII* และ *anti-DFR* จำนวน 1 โคลน โดยให้ผลการถ่ายยีนแบบถาวรได้ จึงเป็นสภาพที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคเข้าสู่ชิ้นส่วนยอดของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

Jeknic *et al.* (1999) ทำการถ่าย โอนพลาสมิด pCAMBIA 1201 ที่มียีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล และมียีน *hygromycin (hptII)* เป็นยีนคัดเลือก จากนั้นทำการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นไอริส (*Iris germanica* L.) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 และ EHA105 เป็นพาหะ หลังจากนั้น 6 เดือน พบว่ามีการแสดงออกของยีน *GUS* และ *hptII* มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ของต้นที่ถ่ายยีน นำมาตรวจสอบยีนเป้าหมายเข้าไปใน nuclear genome โดย Southern blot analysis โดยใช้ <sup>32</sup>P-labelled *GUS* และ *hptII* เป็นยีนเป้าหมาย พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดมียีนทั้ง 2 ชนิดอยู่เมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม ซึ่งพบว่าการถ่ายยีน โดยใช้ *Agrobacterium* เป็นพาหะ ในดอกไอริส เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ และสามารถปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกในอนาคต

Christey *et al.* (1999) ทำการถ่ายโอนพลาสมิด pMOA4 ประกอบด้วย 1 ยีน คือ NOS-bar -pAg7 ซึ่งต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช basta เข้าไปในกะหล่ำปลี (*Brassica oleracea* var.) และผักกาดขาว (*Brassica napus* var.) โดยใช้ *Agrobacterium rhizogenes* เป็นพาหะ หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูก ทำการทดสอบโดยตัดใบมาเลี้ยงในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืช basta ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 88 เปอร์เซ็นต์

Lohar *et al.* (2001) ได้ทำการถ่ายโอนพลาสมิด pTAB10 ซึ่งต้านทานต่อยีน *Phosphinothricin acetyl transferase (basta)* เข้าไปในต้นถั่ว *Lotus japonicas* โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 เป็นพาหะ ทดสอบ โดยวิธี PCR ที่ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีน *bar* พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเกิดแถบ DNA เป้าหมายที่มีความยาว 310 คู่เบส นำมาคัดเลือกในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืช basta ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีเพียง 14 เปอร์เซ็นต์ ของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนไม่เจริญบนอาหารคัดเลือก และนำมาทดสอบโดยเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสเปรย์สารกำจัดวัชพืช basta พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดสามารถทนต่อสารกำจัดวัชพืช basta ได้ที่ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม

Hua-Zhang *et al.* (2005) ทำการทดลองถ่ายโอนพลาสมิด pDBA121 เข้าไปในต้นหญ้า (*Festuca arundinacea* Schreb.) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ โดยที่พลาสมิด pDBA121 มียีน *hygromycin phosphotransferase (hptII)* และ *phosphinothricin acetyl transferase (bar gene)* เป็นสารคัดเลือก ร่วมกับการใช้ acetosyringone (ACS) 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขั้นตอนของการบ่มในที่มีด หลังจากนั้นนำต้นที่ได้รับการถ่ายยีน มาทดสอบในอาหารคัดเลือกที่เติมสารกำจัดวัชพืช basta ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน โดยวิธี PCR และ Southern blot hybridization ร่วมด้วยการสเปรย์ basta ลงบนต้นที่ได้รับการถ่ายยีน พบว่าสามารถทนต่อสารกำจัดวัชพืช basta ได้ถึง 925 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม

Tan *et al.* (2005) ได้ทำการทดลองถ่ายโอนพลาสมิด pBI221 มียีน *GUS* เป็นยีนคัดเลือก และ p25S-*bar* vector มียีน *bar* ซึ่งต้านทานต่อ *phosphinothricin acetyl transferase* เป็นยีนคัดเลือก เข้าไปในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (*Dunaliella salina*) โดยใช้วิธีการยิงอนุภาคเป็นตัวพา ยีนเป้าหมาย ใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมที่ 1000, 900 และ 450 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ซึ่งพบว่าที่แรงดัน 450 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว สามารถนำยีนเป้าหมายเข้าไปได้ดีที่สุด ทำการทดสอบยีน *GUS* และ basta สามารถต้านทานได้ที่ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในต้นที่ได้รับการถ่ายยีน จากนั้นทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน โดยวิธี PCR และ Southern blot hybridization พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดพบยีนเป้าหมายที่มีความยาว 430 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม

Sreeramanan *et al.* (2006) ได้ทำการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช basta ใช้เป็นสารคัดเลือกในกล้วย (Pisang Rastali AAB) โดยเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่เติม BAP 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารเหลว MS ที่เติม BAP 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และแบ่งความเข้มข้นของ basta เป็น 6 ระดับ คือ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองปรากฏว่าสารคัดเลือก basta ที่ระดับความเข้มข้น 15-20 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เป็นสารคัดเลือกในอาหารแข็ง MS ดีที่สุด

Kadir *et al.* (2007) ได้ทำการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการกำจัดอะโกรแบคทีเรีย และสารกำจัดวัชพืช basta ในเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน โดยปรับระดับความเข้มข้นของสารตั้งแต่ 10-2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสารคัดเลือก basta และสารปฏิชีวนะ hygromycin ใช้ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ดีที่สุด ส่วนสารปฏิชีวนะ paromomycin และ geneticin G-418 ใช้ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนสารปฏิชีวนะ kanamycin พบว่ามีประสิทธิภาพต่ำ ยับยั้งได้เพียง 15 เปอร์เซ็นต์

ในระดับความเข้มข้นที่ 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้การหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเอกสารถือเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คัดเลือก และสารปฏิชีวนะในการกำจัดอะโกรแบคทีเรียที่เหมาะสมกับต้นปาล์มน้ำมันเพื่อเป็นแนวทางในการถ่ายยีนเข้าสู่ปาล์มน้ำมันในอนาคต

Malabadi and Nataraja. (2007) ได้ทำการทดลองถ่ายโอนพลาสมิด pAHC25 มียีน *bar* เป็นยีนคัดเลือก และมียีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล เข้าสู่ต้นสน (*Pinus wallichiana*) โดยวิธีการยิงอนุภาค เข้าสู่ embryogenic ของต้นสน ผลการทดลองพบว่า เมื่อนำไปทดสอบกับยีนรายงานผล *GUS* โดยใช้ 0.3 เปอร์เซ็นต์ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -glucuronide (X-glcA) พบมากถึง 39 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบ PCR กับยีน *bar* พบมากถึง 52 เปอร์เซ็นต์ ในต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดพบเกิดแถบ DNA ของยีนเป้าหมายที่มีความยาว 340 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม ดังนั้นการถ่ายยีนโดยวิธีการยิงอนุภาคประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ต้นสน และมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในพืชที่ได้รับการคัดเลือกมียีนเป้าหมายและมีการแสดงออกของยีน

Kutty *et al.* (2011) ได้ทำการถ่ายโอนพลาสมิด pCAMbar โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ ในยาสูบ (*Nicotiana tabacum* cv. TAPM 26) เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการกำจัด *Agrobacterium* โดยใช้สารปฏิชีวนะ carbenicillin และ basta ซึ่งเป็นสารคัดเลือกในพืช ผลปรากฏว่า carbenicillin ใช้ที่ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ล้างหลังจากการบ่มในที่มืดเพื่อกำจัด *Agrobacterium* และใช้ basta ที่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสารคัดเลือกในพืช โดยจะให้จำนวนยอดเฉลี่ย  $7.00 \pm 3.3$  ยอดต่อต้น

# บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 อุปกรณ์และวัสดุการวิจัย

#### 3.1.1 พืชทดลอง

3.1.1.1 บัวหลวงพันธุ์มณฑลทริภุชเวศ (Nelumbo nucifera cv. Buntharik)

#### 3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$

3.1.2.2 เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ GV3101

#### 3.1.3 สารเคมี

3.1.3.1 ชุดสังเคราะห์ cDNA ของบัวหลวง RevertAid first strand cDNA synthesis kit (Fermentas, USA)

3.1.3.2 เอนไซม์ DNase I, RNase-free (Fermentas, USA)

3.1.3.3 เอนไซม์ RevertAid Reverse Transcriptase (Fermentas, USA)

3.1.3.4 เอนไซม์ Ribolock™ RNase Inhibitor (Fermentas, USA)

3.1.3.5 เอนไซม์ RNase A (Fermentas, USA)

3.1.3.6 เอนไซม์ Taq DNA polymerase (Fermentas, USA)

3.1.3.7 เอนไซม์ T4 DNA ligase (Fermentas, USA)

3.1.3.8 เอนไซม์ตัดจำเพาะ Hind III (Fermentas, USA)

3.1.3.9 ชุดสกัด RNA InviTrap® spin plant RNA mini kit (Stratec molecular, Germany)

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

3.1.3.11 ชุดสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR (Fermentas, USA)

3.1.3.12 absolute ethyl alcohol (Merck, Germany)

3.1.3.13 agar, bacteriological grade for culture media (Criterion, USA)

3.1.3.14 agarose gel (Vivantis, Malaysia)

3.1.3.15 benzylaminopurine (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.3.16 bromophenol blue (Ajax Finechem, Australia)

3.1.3.17 calcium chloride (Ajax Finechem, Australia)

3.1.3.18 chloroform (Merck, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.3.19 ethidium bromide (Vivantis, Malaysia)
- 3.1.3.20 ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA, Univar, Australia)
- 3.1.3.21 glycerol (APS Finechem, Australia)
- 3.1.3.22 isoamyl alcohol (Merck, Germany)
- 3.1.3.23 isopropyl alcohol (Merck, Germany)
- 3.1.3.24 mannitol (Univar, Australia)
- 3.1.3.25 1-naphthaleneacetic acid (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.3.26 peptone powder (Merck, Germany)
- 3.1.3.27 phenol (Merck, Germany)
- 3.1.3.28 potassium hydroxide (Carlo Erba Reagenti S.P.A., Italy)
- 3.1.3.29 potassium acetate (Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.3.30 sodium chloride (Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.3.31 sodium dodecyl sulfate (Bio Basic Inc., USA)
- 3.1.3.32 spermidine free base (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.3.33 SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA)
- 3.1.3.34 sucrose (Bio Basic Inc., USA)
- 3.1.3.35 Thiadiazuron (1-Phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-urea;TDZ)(Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.3.36 Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Bio Basic Inc., USA)
- 3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ**
  - 3.1.4.1 Luria-Bertani agar
  - 3.1.4.2 Luria-Bertani broth
  - 3.1.4.3 yeast extract phosphate agar
  - 3.1.4.4 yeast extract phosphate broth
- 3.1.5 สารปฏิชีวนะ**
  - 3.1.5.1 ampicillin (Bio Basic, Canada)
  - 3.1.5.2 basta (glufosinate amonium) (Sigma-Aldrich, USA)
  - 3.1.5.3 rifampicin(Sigma-Aldrich, USA)
  - 3.1.5.4 kanamycin (Sigma-Aldrich, USA)
  - 3.1.5.5 augmentin (GlaxoSmithKline)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.1.6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.1.6.1 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

3.1.6.2 100 bp DNA ladder (Fermentas, USA)

### 3.1.7 พลาสมิด

3.1.7.1 pJA8F3H (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ชัยวรกุล ไชยปัญญา. 2555)

### 3.1.8 อุปกรณ์

3.1.8.1 เครื่องแก้วและบีกเกอร์ขนาดต่างๆ (Pyrex, Germany)

3.1.8.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าสนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius, BSA2202S-CW, Germany)

3.1.8.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าสนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, BP221S, Germany)

3.1.8.4 เครื่องถ่ายภาพเจล (Syngene, Genegenius, Japan)

3.1.8.5 เครื่องปั่นสารและให้ความร้อน (Wisestir, MSH-20A, Korea)

3.1.8.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบธรรมดา (Eppendorf, Model 5418, USA)

3.1.8.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Jouan, CR3i, France)

3.1.8.8 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Biometra, T1 thermocycler, Germany)

3.1.8.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Eppendorf, Model 6132, Germany)

3.1.8.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Schott, CG 842, Germany)

3.1.8.11 ชุดอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Biorad, PAC200, USA)

3.1.8.12 ตู้ปลอดเชื้อ (Vision, VS-1400LSN, Korea)

3.1.8.13 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Sanden Intercool, SNH0303D11A, Thailand)

3.1.8.14 ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (Jouan, VXE380, Czech Republic)

3.1.8.15 ตู้บ่มเชื้อ (Mettler, BE-400, Germany)

3.1.8.16 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Stuart, SI500, UK)

3.1.8.17 ตู้อบเครื่องแก้ว (Jouan, Innovens-118EU2, France)

3.1.8.18 นาฬิกาจับเวลา (Presto, Model 0421301, China)

3.1.8.19 แผ่นกรองเชื้อ 0.22 ไมโครเมตร (Sartorius stedim biotech, Germany)

3.1.8.20 ไมโครปิเปต (Labnet, USA)

3.1.8.21 ไมโครเวฟ (LG, MS-2343LQ, Thailand)

3.1.8.22 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Tomy, ES-315, Japan)

3.1.8.23 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Mettler, SV-1422, Germany)

3.1.8.24 เครื่อง Real time PCR (Bio-Rad CFX Manager 3.0)

3.1.8.24 เครื่องยิงอนุภาครุ่น PDS 1000/He (BioRad, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

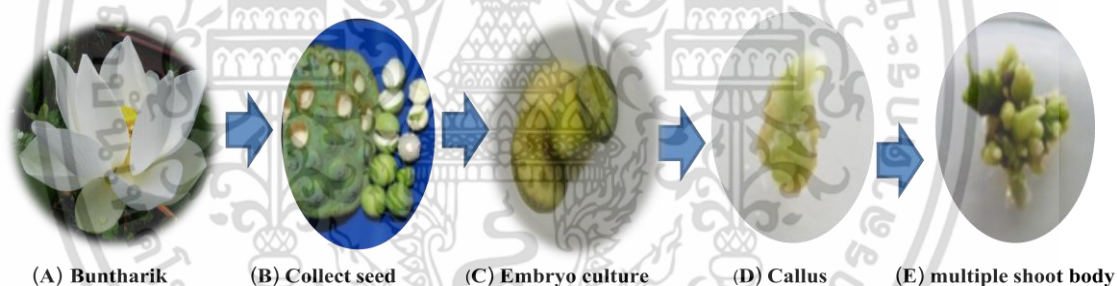
#### 3.2.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืช

##### 3.2.1.1 การฟอกฆ่าเชื้อ

เก็บเมล็ดบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่มีความสมบูรณ์นำมาล้างน้ำให้สะอาด โดยใช้น้ำยาล้างจาน จากนั้นให้น้ำไหลผ่านเป็นเวลา 30 นาที นำเมล็ดบัวมาฟอกด้วย alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ ตามด้วย Clorox 50 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 2 หยด เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที 3 ครั้ง

##### 3.2.1.2 การชักนำให้เกิดยอด

นำเมล็ดบัวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดเอาชิ้นส่วนตายออกจากกัพละให้มีขนาด 3 มิลลิเมตร จากนั้นเลี้ยงบนอาหาร MS (1962) (Murashige and Skoog, 1962) ร่วมกับ TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ และ NAA 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 เดือน เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส จากนั้นย้ายลงในอาหาร MS (1962) ร่วมกับ BA 50 ไมโครโมลาร์ โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อชักนำให้เกิดยอด (รวิวิฐ บัวทอง, 2554) เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของบัวหลวง ให้ได้ชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีน



ภาพที่ 3.1 การชักนำให้เกิด multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (A) ดอกบัวหลวง, (B) เมล็ดบัวหลวง, (C) เอ็มบริโอ, (D) แคลลัส, และ (E) ต้นอ่อนบัว

#### 3.2.2 การทดสอบสารคัดเลือกและสารปฏิชีวนะ

ในเวกเตอร์ pJA8F3H มียีนคัดเลือกในพืชคือ *phosphinothricin acetyl transferrase* (*bar* gene) ซึ่งต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช basta (*glufosinate ammonium*) ที่ได้จากแบคทีเรีย *Streptomyces hygroscopicus* (Daud *et al.* 2009) ซึ่งเมื่อทำการถ่ายโอนยีน *F3H* เข้าสู่พืช โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ และใช้เครื่องยิงอนุภาค ซึ่งจะนำพลาสมิด pJA8F3H เข้าไปในส่วนของ multiple shoot ของบัวหลวง และจะไปกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi ยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ในบัวหลวง โดยทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมของยีน *F3H* มีผลไปขัดขวางการสังเคราะห์ สารกลุ่มแอนโทไซยานิน โดยแบ่งการทดลองออกดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**การทดลองที่ 1** ศึกษาความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช basta (glufosinate amonium) ที่เป็นสารคัดเลือกในพืช

ทำการศึกษาความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช basta ซึ่งใช้เป็นสารคัดเลือกภายหลังการถ่ายยีน โดยวางแผนการทดลองเป็นแบบ CRD (completely randomized designs) แบ่งออกเป็น 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ซีนส่วน โดยนำซินส่วนตาดออกจากเอ็มบริโอบัวหลวงพันธุ์บุนทริก มาทำการเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS (1962) ที่เติมสารกำจัดวัชพืช basta (มีสารออกฤทธิ์ 99.1%) ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ ดังนี้ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการบันทึกผลการทดลองได้แก่ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต จำนวนยอดต่อซินส่วน และจำนวนใบต่อซินส่วน บันทึกผลการทดลอง 8 สัปดาห์ และเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์

**การทดลองที่ 2** การศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ augmentin (amoxicillin) ที่ใช้ในการกำจัดอะโกรแบคทีเรีย

ทำการศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ augmentin ที่เหมาะสมในการกำจัดอะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ GV3101 ทำการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่ซินส่วนของบัวหลวงในอะโกรแบคทีเรีย คือ 1:10 นาน 10 นาที (วิลาสินี ลีทวีทรัพย์, 2554) โดยวางแผนการทดลองเป็นแบบ CRD (completely randomized designs) แบ่งออกเป็น 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ซีนส่วน นำซินส่วนตาดออกจากเอ็มบริโอบัวหลวงพันธุ์บุนทริก มาทำการเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS (1962) ที่เติมสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ ดังนี้ 0, 100, 200, 300, 400, และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการบันทึกผลการทดลองได้แก่ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน และจำนวนยอดเฉลี่ยต่อซิน บันทึกผลการทดลอง 8 สัปดาห์ และเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์

### 3.2.3 การเตรียมพลาสมิด pJA8F3H และการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง

เทคนิคในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชปฏิบัติได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดและเนื้อเยื่อของพืชที่นำมาใช้ในการส่งถ่ายยีน ซึ่งการถ่ายยีน *flavanone 3-hydroxylase (F3H)* ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุนทริก ซึ่งจะทำการทดลองใช้ 2 วิธีการในการถ่ายโอนพลาสมิด คือ การใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ และการถ่ายโอนยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค

#### 3.2.3.1 การเตรียม competent cell ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$

โดยทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria-Bertani agar) นำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  มาเลี้ยงบนอาหาร LB agar ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมา 1 โคโลนี นำมาเลี้ยงบนอาหาร LB broth ปริมาณ 5 มิลลิลิตร (starter) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อมา 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร LB

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์เพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้โดยไม่ผิดเงื่อนไขใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

broth 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่มีค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.4-0.6 แล้วจึงนำเชื้อที่วัดค่าได้ย้ายลงมาในหลอดไมโครเซนติฟิวซ์ ขนาด 50 มิลลิลิตร แช่หลอดทดลองทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที คูดสารละลายส่วนใสด้านบนออกทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย  $\text{CaCl}_2$  50 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วเติมสารละลาย  $\text{CaCl}_2$  50 มิลลิโมลาร์ จนครบปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองมาแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที คูดสารละลายส่วนใสด้านบนออกทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย  $\text{CaCl}_2$  50 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วเติมสารละลาย  $\text{CaCl}_2$  50 มิลลิโมลาร์ จนครบปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองมาแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายส่วนใสออก นำกลีเซอรอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมกับ  $\text{CaCl}_2$  50 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 800 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงผสมให้เข้ากันแบ่ง competent cell ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวซ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 50 ไมโครลิตร นำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวก่อนแล้วเก็บไว้ที่ตู้ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นแบ่งเชื้อที่ได้มาทดสอบ ในอาหาร LB agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร, ampicillin 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหาร LB agar ที่ไม่ใส่สารปฏิชีวนะเพื่อเป็นการทดสอบ competent cell จะสามารถเจริญขึ้นได้ในอาหาร LB agar ที่ไม่ใส่สารปฏิชีวนะเท่านั้น

### 3.2.3.2 การถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าสู่ competent cell ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$

นำ competent cell ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  นำมาถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al.* 1989) นำ competent cell มา 100 ไมโครลิตร ที่เก็บในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำมาแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที เติมหด้วยพลาสมิดที่มีความเข้มข้นประมาณ 100-300 นาโนกรัม ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยการแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติมหอาหาร LB broth 600 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที คูดอาหารส่วนใสออก 400 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลง ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำเชื้อที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่มีสารปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (เป็นอาหารคัดเลือก) นำเชื้อมาปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อ 1 งานเพาะเลี้ยง แล้วนำเชื้อมาเกลี่ยให้ทั่วงานเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง competent cell ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H ก็จะสามารถเจริญขึ้นได้ในอาหาร LB broth ที่มีสารปฏิชีวนะ ampicillin

### 3.2.3.3 การตรวจสอบพลาสมิด pJA8F3H ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ โดยวิธี โคลนีนีพียูอาร์ (colony polymerase chain reaction)

นำโคลนินีพียูอาร์ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่ขึ้นบนอาหารคัดเลือกมาตรวจสอบด้วย ปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH<sub>2</sub>O ปริมาณ 12.8 ไมโครลิตร, 10x Taq buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร (Fermentas, USA), MgCl<sub>2</sub> 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร (Fermentas, USA), primer F3H sense F 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร, primer F3H sense R 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร (ตารางที่ 3.1) และ 5 U Taq DNA polymerase ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร (Fermentas, USA) แล้วใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ไปแตะบนโคลนินีพียูอาร์ของเชื้อ *E. coli* ที่ถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H แคว้งลงในหลอด PCR ที่เตรียมไว้ ทำปฏิกิริยาในเครื่อง PCR (Biometra, Germany) pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ, denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที, annealing 58 องศาเซลเซียส 45 วินาที, extension 72 องศาเซลเซียส 50 วินาที 35 รอบ และ complete extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีการ gel electrophoresis โดยใช้ผลผลิต PCR ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X loading dye ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ครบ 5 ไมโครลิตร ใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 0.5X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

### 3.2.3.4 การสกัดพลาสมิด pJA8F3H ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ โดยชุดสกัดพลาสมิด (High-speed plasmid mini kit)

นำโคลนินีพียูอาร์ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่ผ่านการตรวจสอบพลาสมิดโดยวิธี โคลนีนีพียูอาร์แล้ว โดยทำการคัดเลือกเชื้อมา 1 โคลนินี นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth (Luria-Bertani broth) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (เป็นอาหารคัดเลือก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดแยกพลาสมิดตามวิธีของ High-speed plasmid mini kit (Geneaid, Taiwan) คุณเซลล์ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่เลี้ยงไว้ลงในหลอดไมโครเซนติพิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทอาหารที่เป็นส่วนใสด้านบนทิ้ง เหลือแต่ตะกอนเซลล์ เติมน้ำ PD1 buffer ที่เย็น ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงผสมให้เข้ากัน แล้วใช้เครื่องเขย่า แล้วเติมน้ำ PD2 buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมา 10 ครั้ง ห้ามใช้เครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที จากนั้นเติมน้ำ PD3 buffer ปริมาณ 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับ

หลุดไปมา 10 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที คูณสารละลายส่วนในปริมาณ 600 ไมโครลิตร ใส่ลงใน PD column ที่ตั้งอยู่ใน collection tube ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายที่อยู่ใน collection tube ทิ้งเติมด้วย W1 buffer ปริมาณ 400 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายที่อยู่ใน collection tube ทิ้งเติมด้วย wash buffer ปริมาณ 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ PD column แห้ง ทำการย้าย PD column ลงในหลอดไมโครเซนติพีพิจ์หลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิเมตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พร้อมกับอุ่น elution buffer เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม elution buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร โดยการหยดลงไปตรงกลางของ PD column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้พลาสมิดที่ติดอยู่กับ PD column ลงมาในหลอดไมโครเซนติพีพิจ์ที่อยู่ด้านล่าง แล้วทำการเก็บพลาสมิด DNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบพลาสมิด pJA8F3H นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่มีค่าความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดยใช้อัตราส่วนน้ำกลั่นต่อพลาสมิด 100:1 ไมโครลิตร และทำการตรวจสอบด้วยวิธีการ gel electrophoresis โดยใช้พลาสมิด pJA8F3H ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X loading dye ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ครบ 5 ไมโครลิตร เตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 0.5X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

### 3.2.3.5 การตรวจสอบพลาสมิด pJA8F3H ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ทำการตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิด pJA8F3H ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III (Fermentas, USA) ปฏิกริยา 10 ไมโครลิตร ประกอบได้ด้วย dH<sub>2</sub>O 7.8 ไมโครลิตร, 10X buffer R (Fermentas, USA) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, พลาสมิด pJA8F3H ความเข้มข้น ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และ *Hind* III ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอด PCR ขนาด 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธีการ gel electrophoresis นำพลาสมิด pJA8F3H ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X loading dye ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ครบ 5 ไมโครลิตร เตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 0.5X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

### 3.2.3.6 การเตรียม competent cell ของอะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) สายพันธุ์ GV3101

การเตรียม competent cell ของอะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) สายพันธุ์ GV3101 ทำตามวิธีของ (Lin, 1995) โดยทำการเกลี่ยเชื้อบนจานเพาะเลี้ยงบนอาหาร YEP (Yeast Extract Phosphate Agar) ปริมาณ 25 มิลลิตรต่อจานเพาะเลี้ยง บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเลือกมา 1 โคลนนี้ มาเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิตรที่มีอาหาร YEP broth 5 มิลลิตร (starter) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นดูดจากหลอดที่เป็น starter มา 1 มิลลิตร เลี้ยงในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิตร ที่มีอาหาร YEP broth 100 มิลลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ช่วงความยาวแสง 600 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.6-0.7 จากนั้นทำการแบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง นำมาแช่ในน้ำแข็งทันที เดิมกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ลงไปปริมาณ 10 มิลลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วเดิมกลีเซอรอลจนครบ 50 มิลลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสที่เป็นอาหารด้านบนทิ้ง นำมาแช่ในน้ำแข็งทันที จากนั้นเดิมกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 10 มิลลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วเดิมกลีเซอรอลจนครบ 50 มิลลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง นำมาแช่ในน้ำแข็งทันที จากนั้นละลายตะกอนด้วย Sorbitol ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 500 ไมโครลิตร แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์หลอดขนาด 1.5 มิลลิตรใส่หลอดละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวก่อนเก็บในตู้ -80 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบ competent cell โดยทำการเกลี่ยบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร YEP ปริมาณ 25 มิลลิตรต่อจานเพาะเลี้ยง ที่เติมสารปฏิชีวนะ rifampicin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

### 3.2.3.7 การถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าอะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) สายพันธุ์ GV3101 ด้วยวิธี electroporation

นำพลาสมิด pJA8F3H ที่ผ่านการตรวจสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว ปริมาณ 1 ไมโครกรัม (ปฏิบัติงานบนน้ำแข็งตลอดเวลา) ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ YEP ปริมาณ 1 มิลลิตร พร้อมด้วย competent cell ของอะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ GV3101 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงผสมให้เข้ากันเบาๆ แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นทำการเตรียมเครื่อง electroporation โดยเลือกโหมด “Agr” ทำการดูด

ตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่ใน electroporation cuvette แล้วนำไปใส่เครื่อง electroporation กดปุ่ม Pulse เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตเห็นใบเซอร์เวอชันด้านการศึกษา ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านตัวอย่าง เสร็จแล้วย้ายมาใส่หลอดไมโครเซนติพีพิจ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ YEP ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที คูดสารละลายส่วนใสด้านบนออก 850 ไมโครลิตร แล้วละลายตะกอนโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ นำไปเกลี่ยบนจานเพาะเลี้ยงบนอาหาร YEP ปริมาณ 25 มิลลิลิตรต่อจานเพาะเลี้ยง ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะ rifampicin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง อะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ GV3101 ที่มีพลาสมิด pJA8F3H จะสามารถขึ้นได้ในอาหารที่สารปฏิชีวนะ ampicillin

### 3.2.3.8 การตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิด pJA8F3H ในอะโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium tumefaciens*) สายพันธุ์ GV3101 โดยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์ (colony polymerase chain reaction)

ภายหลังจากถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าในอะโกรแบคทีเรียม แล้วเกลี่ยบนอาหาร YEP ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารคัดเลือก จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ เพื่อทดสอบการมีอยู่ของพลาสมิด pJA8F3H โดยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์ เตรียมปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH<sub>2</sub>O ปริมาณ 12.8 ไมโครลิตร, 10x Taq buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร (Fermentas, USA), MgCl<sub>2</sub> 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, primer F3H sense F 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร, primer F3H sense R 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร (ตารางที่ 3.1) และ 5 U Taq DNA polymerase ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร (Fermentas, USA) แล้วใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ไปแตะบนโคโลนีของอะโกรแบคทีเรียมที่ถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H แกว่งลงในหลอด PCR ที่เตรียมไว้ ทำปฏิกิริยาในเครื่อง PCR (Biometra, Germany) pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ, denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที, annealing 58 องศาเซลเซียส 45 วินาที, extension 72 องศาเซลเซียส 50 วินาที 35 รอบ และ complete extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีการ gel electrophoresis โดยใช้โคลนนิ่งพีซีอาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X loading dye ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ครบ 5 ไมโครลิตร ใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 0.5X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

### 3.2.3.9 การถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ GV3101 เป็นพาหะ

นำเมล็ดบัวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดเอาชิ้นส่วนตาออกจากคัพพะให้มีขนาด 3 มิลลิเมตร จากนั้นเกลี่ยบนอาหาร MS (1962) ที่เติม TDZ 0.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 เดือน เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส จากนั้นย้ายลงในอาหาร MS (1962)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการวิจัยเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่ไปยังเว็บไซต์อื่นโดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย  
ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เติม BA 50 ไมโครโมลาร์ โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อชักนำให้เกิดยอด ตามวิธีของ (รวิรัฐ บัวทอง, 2554) ทำการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ GV3101 เป็นพาหะ บ่มเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ผ่านการตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิด pJA8F3H เลือกมา 1 โคโลนี มาเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร YEP broth 5 มิลลิลิตร (starter) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นดูดจากหลอดที่เป็น starter มา 1 มิลลิลิตร เลี้ยงในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร YEP broth 100 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวแสง 600 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.6-0.7 นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อออก จากนั้นเติมอาหาร MS (1962) ให้ความเข้มข้นของอะโกรแบคทีเรีย คือ 1:10 (วิลาสินี สิทธิทรัพย์, 2554) ที่มี acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ นำชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวง พันธุ์บุณชกริกจำนวน 5 ชิ้นส่วนต่อจานเพาะเลี้ยง จำนวน 12 จานเพาะเลี้ยงรวมชิ้นส่วนทั้งหมด 60 ชิ้นส่วน มาแช่เป็นเวลา 10 นาที นำมาจับด้วยกระดาษซับ นำมาวางบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS (1962) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เก็บในที่มืดเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นล้างด้วยอาหารเหลว MS (1962) ที่เติม augmentin ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ล้าง 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที โดยใช้กระดาษซับ ซับให้แห้งทุกครั้ง ย้ายเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม BA 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ basta 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ augmentin 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกำจัดอะโกรแบคทีเรีย ส่วน basta เป็นสารกำจัดวัชพืชซึ่งเป็นยีนคัดเลือกในพืช ใช้ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด ทำการบันทึกผลการทดลองได้แก่ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้น บันทึกผลการทดลอง 16 สัปดาห์ และเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์

**3.2.3.10 การถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (Buathong *et al.* 2013)**

#### 3.2.3.10.1 การปรับสภาพ osmotic ของชิ้นส่วน multiple shoot

นำชิ้นส่วนบัวหลวงที่เลี้ยงในอาหาร MS (1962) ร่วมกับ BA 50 ไมโครโมลาร์ โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อชักนำให้เกิดยอด มาทำการปรับสภาพ osmotic โดยการย้ายลงในอาหารเพาะเลี้ยง MS (1962) ที่เติม mannitol และ sorbitol ที่ความเข้มข้นอย่างละ 2 โมลาร์ ตัดกระดาษกรองรูปวงกลมให้มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร แล้วนำไปวางบนอาหารที่เตรียมไว้ จากนั้นนำชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวง

มาวางจำนวน 21 ชิ้นต่อจานเพาะเลี้ยง บนกระดาษกรอง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ไม่เกิน 24 ชั่วโมง เป็นการปรับสภาพก่อนถ่ายยีน

### 3.2.3.10.2 การเตรียมอนุภาคทองคำ

ทำความสะอาดอนุภาคทองคำก่อนการนำไปเคลือบด้วยพลาสติคเริ่มต้นจากการล้างอนุภาคทองขนาด 1 ไมโครเมตร มา 60 มิลลิกรัม (Bio-Rad, USA) ไล่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ล้างอนุภาคทองคำด้วย absolute ethanol ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำมาผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่า เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้อนุภาคทองคำเกิดการตกตะกอน จากนั้นใช้ปิเปตดูดส่วนของ absolute ethanol ออกโดยจะทำการล้างอนุภาคทองคำด้วย absolute ethanol 3 ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ทำการเขย่า เพื่อให้อนุภาคทองกระจายตัวในน้ำกลั่น นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้อนุภาคทองคำตกตะกอน จากนั้นใช้ปิเปตดูดในส่วนของน้ำกลั่นออก ทำการล้างอนุภาคทองคำด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เสร็จแล้วเติมกลีเซอรอล ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไปใช้ปิเปตดูดขึ้นลงผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ในตู้ที่มีอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.2.3.10.3 การเตรียมพลาสติค pJA8F3H เคลือบอนุภาคทองคำ

โดยเริ่มจากอนุภาคทองคำที่เตรียมไว้ นำมาใส่เครื่องเขย่า เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้อนุภาคทองคำกระจายตัว จากนั้นเติมพลาสติค pJA8F3H ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องเขย่า จากนั้นเติม  $\text{CaCl}_2$  ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงผสมให้เข้ากัน เติม spermidine free base (Sigma Aldrich, USA) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 10 นาที โดยทำการเขย่าหลอดไมโครเซนติฟิวจ์เบาๆ เป็นระยะ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดน้ำส่วนใสทิ้ง เติมน้ำด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบาๆ หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดน้ำส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม absolute ethanol 50 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงผสมให้เข้ากันเบาๆ ให้เป็นเนื้อเดียวกัน

### 3.2.3.10.4 การถ่ายโอนพลาสติค pJA8F3H เข้าสู่บัวหลวงโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment)

นำจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์บุษกริกจำนวน 21 ชิ้นส่วนต่อหนึ่งจานเพาะเลี้ยง จำนวน 5 จานเพาะเลี้ยงรวมชิ้นส่วนทั้งหมด 105 ชิ้นส่วน ของบัวหลวงที่ผ่านการปรับความดัน osmotic แล้วไปทำการถ่ายโอนพลาสติค

ด้วยเครื่องยิงอนุภาค ทำความสะอาดอุปกรณ์ที่ใช้ในการยิงคือ macrocarriers และ rupture disc ให้เอกสารนี้เป็นเอกสารทรัพย์สินทางปัญญาหรือเป็นการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่เอกสารนี้เป็นการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แช่ด้วย isopropanol แล้วผึ่งให้แห้ง ส่วน stopping screen ทำความสะอาดโดยการนั่งฆ่าเชื้อ จากนั้น นำอนุภาคทองคำที่ผ่านการเคลือบด้วยพลาสมิด แล้วมาเขย่าเพื่อให้อนุภาคทองคำกระจายตัว หลังจากนั้นคูดอนุภาคทองคำมา 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกลางแผ่น macrocarriers ที่เตรียมไว้ ทิ้งให้อนุภาคทองคำแห้งประมาณ 2 นาที จากนั้นทำการส่งถ่ายยีนสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวง โดยเลือกใช้แผ่น rupture disc ขนาดแรงดันของก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ใช้ระยะยิง 9 เซนติเมตร (Buathong *et al.* 2013) ซึ่งก๊าซฮีเลียมจะดัน rupture disc ให้แตกออก จากนั้นแรงดันจะ ตกกระทบ macrocarrier ตกกระทบแผ่น stopping screen ซึ่งจากแรงดันสูงจะทำให้ microcarrier เคลื่อนที่เข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงอย่างรวดเร็ว และพา DNA จาก microcarrier เข้า เชื่อมกับ DNA ของชิ้นส่วนเป้าหมาย หลังจากนั้นปล่อยให้ชิ้นส่วนของบัวหลวงที่ผ่านการถ่าย โอนพลาสมิดอยู่บนอาหารปรับความดัน osmotic ประมาณ 1-2 ชั่วโมง จากนั้นย้ายชิ้นส่วนบัวหลวง ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS (1992) ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อเป็นการพักฟื้นก่อนนำชิ้นส่วนบัวหลวงที่ผ่านการถ่าย โอนพลาสมิดย้ายลงในอาหาร คัดเลือกสูตร MS (1962) ร่วมกับ BA 50 ไมโครโมลาร์ และ basta 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการ บันทึกรผลการทดลองได้แก่ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้น บันทึกรผลการ ทดลอง 16 สัปดาห์ และเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์

### 3.2.3.11 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* ในบัวหลวงพันธุ์บุญทริก ภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด

#### 3.2.3.11.1 การเตรียม RNA ของบัวหลวงตามวิธีของ Invitrap Spin Plant RNA Mini Kit (Stratag molecular, Germany)

ทำการสกัด RNA เริ่มด้วยนำตัวอย่างบัวหลวงที่รอดชีวิตบน อาหารคัดเลือก และตัวอย่างบัวหลวงที่ไม่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิดเป็นต้นควบคุม นำมาบดด้วย ไนโตรเจนเหลวให้ได้ตัวอย่างประมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม lysis solution RP ปริมาณ 900 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตผสมให้เข้ากัน นำไป เขย่าโดยใช้เครื่องเขย่า เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที คูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ลงใน Prefilter column ที่ตั้งอยู่บน Receiver tube หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นให้เปลี่ยน Prefilter column อันใหม่ นำไปตั้งบน Receiver tube อันใหม่แล้วคูดสารละลายที่อยู่ใน Receiver tube ใส่ใน Prefilter column อันใหม่ที่เตรียมไว้ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เอา Prefilter column ทิ้งไปแล้วเติม absolute ethanol ที่เย็นลงไป ใน Receiver tube ปริมาณ 500 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ปิเปตคูดขึ้นลงผสมให้เข้ากัน คูดสารละลายที่ได้ 500 ไมโครลิตร หยดลงใน RTA Spin Filter ที่ตั้งอยู่บน RTA Receiver tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่อยู่ใน RTA Receiver tube ที่ตั้ง เอกสารนี้เป็นเอกสารทูลงทุนเวสท์หรือบริการเชิงงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่เชิงงานด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นเติม wash buffer R1 ที่เย็น ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ลงไป นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่อยู่ใน RTA Receiver tube ทิ้งจากนั้นเติม wash buffer R2 ที่เย็น ปริมาณ 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่อยู่ใน RTA Receiver tube ทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทิ้ง RTA Receiver tube แล้วย้าย RTA Spin Filter มาตั้งอยู่บนหลอด elution tube จากนั้นเติม elution buffer R ปริมาณ 30 ไมโครลิตร บ่มที่วุ้นที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทิ้ง RTA Spin Filter

นำ RNA ไปตรวจสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่  $A_{230}$ ,  $A_{260}$  และ  $A_{280}$  โดย RNA บริสุทธิ์  $A_{260}/A_{280}$  ค่าจะเข้าใกล้ 2 โดยใช้อัตราส่วน น้ำ diethyl pyrocarbonate (DEPC) ต่อ RNA 100:1 ไมโครลิตร และทำการตรวจสอบด้วยวิธีการ gel electrophoresis โดยใช้ RNA ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X loading dye ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ครบ 5 ไมโครลิตร เตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 0.5X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA) เก็บ RNA ที่เหลือไว้ในตู้ -80 องศาเซลเซียส

### 3.2.3.11.2 การทำให้ RNA บริสุทธิ์ โดยกำจัด DNA ออกด้วยเอนไซม์ DNase I

นำ RNA ของบัวหลวงที่สกัดได้ที่ผ่านการตรวจสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง และทำการตรวจสอบด้วยวิธีการ gel electrophoresis มาทำการกำจัด DNA ออกจาก RNA ด้วยเอนไซม์ DNase I เตรียมปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร น้ำ DEPC ปริมาณ 12 ไมโครลิตร, 10X buffer DNase I ที่มี  $MgCl_2$  ปริมาณ 2 ไมโครลิตร (Fermentas, USA), 1 ยูนิต Ribolack RNase Inhibitor ปริมาณ 2 ไมโครลิตร (Fermentas, USA), 1 ยูนิต DNase I ปริมาณ 2 ไมโครลิตร (Fermentas, USA) และ RNA ของบัวหลวงที่สกัดได้ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงผสมให้เข้ากัน ในหลอดไมโครเซนติฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม ethylene diaminetetra acetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

นำ RNA ที่ผ่านการกำจัด DNA ออกโดยเอนไซม์ DNase I ไปตรวจสอบการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่  $A_{230}$ ,  $A_{260}$  และ  $A_{280}$  โดย RNA บริสุทธิ์  $A_{260}/A_{280}$  ค่าจะเข้าใกล้ 2 โดยใช้อัตราส่วนน้ำ DEPC ต่อ RNA 100:1 ไมโครลิตร และทำการตรวจสอบด้วยวิธีการ gel electrophoresis โดยใช้ RNA ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X loading dye ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 5 ไมโครลิตร เตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ใน

สารละลาย 0.5X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA) เก็บ RNA ที่เหลือไว้ในตู้ -80 องศาเซลเซียส

### 3.2.3.11.3 การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA (complementary DNA) โดยใช้ เอนไซม์ reverse transcriptase

นำ RNA ของบัวหลวงที่ผ่านการวัดค่าการดูดกลืนแสง และ ผ่านทำการตรวจสอบด้วยวิธีการ gel electrophoresis นำมาทำการสังเคราะห์เป็น cDNA โดยทำตามวิธี ของ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, USA) โดยการเตรียม ปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ดังนี้ น้ำ DEPC ปริมาณ 11.5 ไมโครลิตร, 5X buffer RT ปริมาณ 4 ไมโครลิตร (Fermentas, USA), dNTP 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร (Fermentas, USA), oligo- dT primer 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร (Fermentas, USA), Ribolock 40 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร (Fermentas, USA), Revert Aid reverse transcriptase 200 ยูนิตต่อ ไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร (Fermentas, USA) และ RNA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อ ไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ใช้เปิดดูชิ้นลงผสมให้เข้ากันในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายมาบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บ cDNA ไว้ในตู้ -20 องศาเซลเซียส

### 3.2.3.12 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H bar* และ *CHS* ในบัวหลวง พันธุ์บุณฑริกภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* ด้วยวิธี RT-PCR

ภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แล้วต้องตรวจสอบการแสดงออกของยีน นำ cDNA มาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H*, *CHS* และ *bar* โดยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เริ่มจากนำ cDNA ของ บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* และบัวหลวงที่ไม่ได้ผ่านการถ่ายโอน พลาสมิดมาปรับความเข้มข้นของ cDNA เริ่มต้นให้เท่ากัน โดยใช้ *18S rRNA* เป็นตัวเปรียบเทียบ การแสดงออก และนำไปตรวจสอบด้วยวิธีการ gel electrophoresis เตรียมปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH<sub>2</sub>O ปริมาณ 12.8 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffe ปริมาณ 2 ไมโครลิตร (Fermentas, USA), MgCl<sub>2</sub> 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร (Fermentas, USA), primer 18S rRNA\_forward 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร, primer 18S rRNA\_reverse 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร (ตารางที่ 3.1) cDNA template ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และ 5 U *Taq* DNA polymerase ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร (Fermentas, USA) ทำ ปฏิกิริยาในเครื่อง PCR (Biometra, Germany) pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ, denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที, annealing 58 องศาเซลเซียส 45 วินาที, extension 72 องศาเซลเซียส 50 วินาที 35 รอบ และ complete extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ

ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีการ gel electrophoresis นำ DNA ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาณ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปเผยแพร่เรียนด้านการศึกษา ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X loading dye ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ครบ 5 ไมโครลิตร โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 0.5X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA) หลังจากนั้นทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนจนครบทุกไพรเมอร์ดังมีลำดับเบสแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR และ Real time PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H bar* และ *CHS*

ชื่อยีน	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' - 3')	ขนาดของ ผลผลิต PCR
<i>18S rRNA</i>	18S_forward	GGCTCGAAGACGATCAGATACCG	600 คู่เบส
	18S_reverse	GTACAAAGGGCAGGGACGTAGTCAA	
<i>F3H</i>	F3H Sense F	GAGAAGCTCCGGTTCGACAT	300 คู่เบส
	F3H Sense R	TAGTTCACCACCATCTTCTGG	
<i>bar</i>	bar_forward	TTGACCGTGCTTGTCTCGAT	430 คู่เบส
	bar_reverse	AAGGCGGGAAACGACAATCT	
<i>CHS</i>	CHSA_forward	AAGAGCTCCCGTCAAGAGACTCA	458 คู่เบส
	CHSA_reverse	AAGGATCCCAGAAAATTGAGTTC	

3.2.3.13 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *18S rRNA F3H bar* และ *CHS* ในบัวหลวงพันธุ์บุญทรึกภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* ด้วยเทคนิค Real time PCR ภายหลังจากการสกัด RNA ตามวิธีของ Invitrap spin plant RNA mini kit เริ่มด้วยนำตัวอย่างบัวหลวงที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* และตัวอย่างบัวหลวงที่ไม่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิดเป็นต้นควบคุม นำมาทำการสังเคราะห์เป็น cDNA โดยทำตามวิธีของ Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, USA) นำ cDNA ที่ได้มาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *18S rRNA F3H* และ *CHS* ในบัวหลวงพันธุ์บุญทรึกภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* ด้วยเทคนิค Real time PCR ที่มีความจำเพาะต่อยีน *18S rRNA F3H* และ *CHS*

#### 3.2.3.13.1 การเตรียม Standard Curve

นำ cDNA ของบัวหลวง ที่สกัดได้มาเจือจาง ให้มีความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 1/10, 1/100, 1/1,000 และ 1/10,000 และทำทั้งหมด 3 ยีน คือยีน *18S rRNA, F3H* และ *CHS* โดยที่ 1 คู่ไพรเมอร์ ทำ 3 ซ้ำ ทำปฏิกิริยา Real time PCR ใช้เครื่อง Bio-Rad CFX Manager 3 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยแต่ละปฏิกิริยามีปริมาณ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยน้ำยา SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA. Cat. No.172-5260) ปริมาณ 10 ไมโครลิตร, Forward-primer และ Reverse-primer 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร, dH<sub>2</sub>O ปริมาณ 5 ไมโครลิตร, cDNA template ปริมาณ 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอด PCR (Bio-Red, USA. Cat. No. 113492) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส 1 นาที, denaturation 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที, annealing 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 39 รอบ, Melt Curve 65-95 องศาเซลเซียส, cool 5 องศาเซลเซียส 5 วินาที เมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์จึงคำนวณค่า Crossing point (Cp) และกราฟ Amplification curves ที่ตรวจวัดสัญญาณได้ด้วย Software ของเครื่อง Bio-Rad CFX Manager 3.0

### 3.2.3.13.2 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *18S rRNA F3H bar* และ *CHS* ด้วยเทคนิค Real time RCR

ภายหลังการทำ Standard Curve แล้วทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *18S rRNA* ก่อนซึ่งใช้เป็นยีนอ้างอิง แล้วจึงทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H bar* และ *CHS* โดยที่ 1 คู่ไพรเมอร์ ทำ 3 ซ้ำ ทำปฏิกิริยา Real time RCR ใช้เครื่อง Bio-Rad CFX Manager 3.0 โดยแต่ละปฏิกิริยามีปริมาณ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยน้ำยา SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Bio-Red, USA. Cat. No. 172-5260) ปริมาณ 10 ไมโครลิตร, Forward-primer และ Reverse-primer 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร, dH<sub>2</sub>O ปริมาณ 5 ไมโครลิตร, cDNA template ปริมาณ 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอด PCR (Bio-Red, USA. Cat. No. 113492) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส 1 นาที, denaturation 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที, annealing 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 39 รอบ, Melt Curve 65-95 องศาเซลเซียส, cool 5 องศาเซลเซียส 5 วินาที เมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์จึงคำนวณค่า Crossing point (Cp) และกราฟ Amplification curves ที่ตรวจวัดสัญญาณได้ด้วย Software ของเครื่อง Bio-Rad CFX Manager 3.0 แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณหาการแสดงออกของยีน (Relative gene expression) ตามวิธีของ Livak and Schmittgen. (2001) การแสดงออกของยีนเป้าหมาย =  $2^{-\Delta\Delta C_p}$

$$\Delta C_{p1} = C_p (\text{Target A}^- \text{-treated}) - C_p (\text{Ref B}^- \text{-treated})$$

$$\Delta C_{p2} = C_p (\text{Target A}^- \text{-control}) - C_p (\text{Ref B}^- \text{-control})$$

$$\Delta\Delta C_p = \Delta C_{p1} (\text{treated}) - \Delta C_{p2} (\text{control})$$

$$\text{Normalized target gene expression level} = 2^{-\Delta\Delta C_p}$$

$C_p (\text{Target A}^- \text{-treated})$  = จำนวนรอบของยีนเป้าหมาย ต้นถ่ายยีน

$C_p (\text{Ref B}^- \text{-treated})$  = จำนวนรอบของยีนอ้างอิง ต้นถ่ายยีน

$C_p (\text{Target A}^- \text{-control})$  = จำนวนรอบของยีนเป้าหมาย ต้นควบคุม

$C_p (\text{Ref B}^- \text{-control})$  = จำนวนรอบของยีนอ้างอิง ต้นควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการชักนำให้เกิด multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

ผลการชักนำให้เกิด multiple shoot จากส่วนยอดของเอ็มบริโอบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ภาพที่ 4.1A) และเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เพื่อชักนำให้เกิดยอดรวมเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ (ภาพที่ 4.1B,C) หลังจากนั้นนำชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกมาทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช basta (glufosinate amonium) เพื่อใช้เป็นสารคัดเลือก และศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ใช้กำจัดอะโครแบคทีเรีย หลังจากการถ่ายโอนพลาสติก



ภาพที่ 4.1 ชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกอายุ 1 สัปดาห์ (A), ชิ้นส่วน shoot cluster ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกอายุ 12 สัปดาห์ (B) และชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก อายุ 16 สัปดาห์ (C)

#### 4.2 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช basta (glufosinate amonium) เพื่อใช้ในการคัดเลือกชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน

ผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช basta (glufosinate amonium) เพื่อใช้ในการคัดเลือก ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่ได้รับการถ่ายยีน โดยทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ และสารกำจัดวัชพืช basta ที่มีความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.2) ทำการบันทึกผลการทดลอง ได้แก่ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต จำนวนยอดเฉลี่ย และจำนวนใบเฉลี่ย บันทึกผลการทดลอง 8 สัปดาห์ และเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2.1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วน multiple shoot ที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก MS ที่มีสารกำจัดวัชพืช basta ความเข้มข้นต่างๆ

ภายหลังจากทำการทดลองนำชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุญฤทธิ์ที่เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกความเข้มข้นต่างๆ พบว่า multiple shoot ของบัวหลวงบุญฤทธิ์หยุดการเจริญเติบโต และตายลงในที่สุด และความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช basta ที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.1) พบว่าในสัปดาห์ที่ 1, 2 และ 3 ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุญฤทธิ์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ

ผลของความเข้มข้นที่ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Control) ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุญฤทธิ์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตทั้งหมด คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเจริญเติบโตเป็นปกติ ส่วนความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุญฤทธิ์ เริ่มตายบนอาหารคัดเลือกในสัปดาห์ที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตคิดเป็น  $93.33 \pm 6.66$  เปอร์เซ็นต์ และพบว่าในสัปดาห์ที่ 8 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต  $77.33 \pm 17.32$  เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นที่ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุญฤทธิ์ เริ่มตายบนอาหารคัดเลือกในสัปดาห์ที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตคิดเป็น  $93.33 \pm 6.66$  เปอร์เซ็นต์ และพบว่าในสัปดาห์ที่ 8 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 0.00 เปอร์เซ็นต์ ผลของความเข้มข้นที่ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุญฤทธิ์ เริ่มตายบนอาหารคัดเลือกในสัปดาห์ที่ 4 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตคิดเป็น  $73.33 \pm 6.66$  เปอร์เซ็นต์ และพบว่าในสัปดาห์ที่ 8 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 0.00 เปอร์เซ็นต์ ผลของความเข้มข้นที่ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุญฤทธิ์ เริ่มตายบนอาหารคัดเลือกในสัปดาห์ที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตคิดเป็น  $86.66 \pm 6.66$  เปอร์เซ็นต์ และพบว่าในสัปดาห์ที่ 8 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 0.00 เปอร์เซ็นต์ และผลของความเข้มข้นที่ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุญฤทธิ์ เริ่มตายบนอาหารคัดเลือกในสัปดาห์ที่ 4 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตคิดเป็น  $73.33 \pm 6.66$  เปอร์เซ็นต์ และพบว่าในสัปดาห์ที่ 8 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 0.00 เปอร์เซ็นต์ สรุปผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช basta ที่ความเข้มข้นน้อยสุดที่ทำให้ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุญฤทธิ์ตายทั้งหมดภายในสัปดาห์ที่ 8 คือที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

#### 4.2.2 จำนวนยอดของชิ้นส่วน multiple shoot ที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก MS ที่มีสารกำจัดวัชพืช basta ความเข้มข้นต่างๆ

ภายหลังจากทำการทดลองนำชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุญฤทธิ์ มาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสารกำจัดวัชพืช basta ที่มีความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า จำนวนยอดของบัวหลวงบุญฤทธิ์จะหยุดการเจริญเติบโตลง และค่อยๆ ตายลงตามระยะเวลา และความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช basta ที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.2)

พบว่าในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 ชั้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริก มีจำนวนยอดไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ

ผลของความเข้มข้นที่ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Control) ชั้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริก มีการเจริญเติบโตเป็นปกติ และมีการเกิดยอดเพิ่มขึ้นในแต่ละสัปดาห์ ในสัปดาห์ที่ 8 มีจำนวนยอดมากที่สุด คือ  $11.93 \pm 0.69$  ยอดต่อชั้นส่วน ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริก พบว่าในสัปดาห์ที่ 3 มีจำนวนยอด คือ  $3.80 \pm 0.23$  ยอดต่อชั้นส่วน จากนั้นจำนวนยอดจะลดลง จนกระทั่งสัปดาห์ที่ 7 และ 8 มีจำนวนยอด  $1.33 \pm 0.24$  และ  $1.43 \pm 0.23$  ยอดต่อชั้นส่วน ตามลำดับ ต่อมาที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริก พบว่าในสัปดาห์ที่ 5 มีจำนวนยอด คือ  $2.63 \pm 0.78$  ยอดต่อชั้นส่วน จากนั้นจำนวนยอดจะลดลง จนกระทั่งสัปดาห์ที่ 7 และ 8 มีจำนวนยอด  $1.33 \pm 0.32$  และ  $0.00$  ยอดต่อชั้นส่วน ตามลำดับ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช basta ที่ความเข้มข้นน้อยสุดที่ทำให้ชั้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริกไม่มีการเจริญทางด้านจำนวนยอด คือที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้น 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งชั้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริก พบว่าในสัปดาห์ที่ 3 มีจำนวนยอด คือ  $2.33 \pm 0.13$ ,  $2.76 \pm 0.56$  และ  $3.10 \pm 0.97$  ยอดต่อชั้นส่วน ตามลำดับ จากนั้นจำนวนยอดจะลดลง จนกระทั่งสัปดาห์ที่ 7 มีจำนวนยอด  $1.00 \pm 0.57$ ,  $1.00 \pm 0.00$  และ  $1.33 \pm 0.87$  ยอดต่อชั้นส่วน ตามลำดับ และในสัปดาห์ที่ 8 ไม่มีการเจริญทางยอดที่ความเข้มข้น 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร

#### 4.2.3 จำนวนใบของชั้นส่วน multiple shoot ที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก MS ที่มีสารกำจัดวัชพืช basta ความเข้มข้นต่างๆ

ภายหลังจากทำการทดลองนำชั้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริก มาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสารกำจัดวัชพืช basta ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า จำนวนใบ multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริกจะหยุดการเจริญเติบโต และค่อยๆ มีจำนวนใบลดลงตามระยะเวลา และความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช basta ที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.3) พบว่าในสัปดาห์ที่ 1-3 ชั้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริก มีจำนวนใบไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ในทุกความเข้มข้น

ผลของความเข้มข้นที่ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Control) ชั้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริก มีการเจริญเติบโตเป็นปกติ และมีการเกิดใบเพิ่มขึ้นมากในแต่ละสัปดาห์ ในสัปดาห์ที่ 8 มีจำนวนใบมากที่สุด คือ  $10.60 \pm 0.46$  ใบต่อชั้นส่วน ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริก พบว่าในสัปดาห์ที่ 5 มีจำนวนใบ คือ  $3.33 \pm 1.20$  ใบต่อชั้นส่วน จากนั้นจำนวนใบจะลดลง จนกระทั่งสัปดาห์ที่ 8 มีจำนวนใบน้อยที่สุด  $1.13 \pm 0.13$  ใบต่อชั้นส่วน ความเข้มข้นที่ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ชั้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริก พบว่า

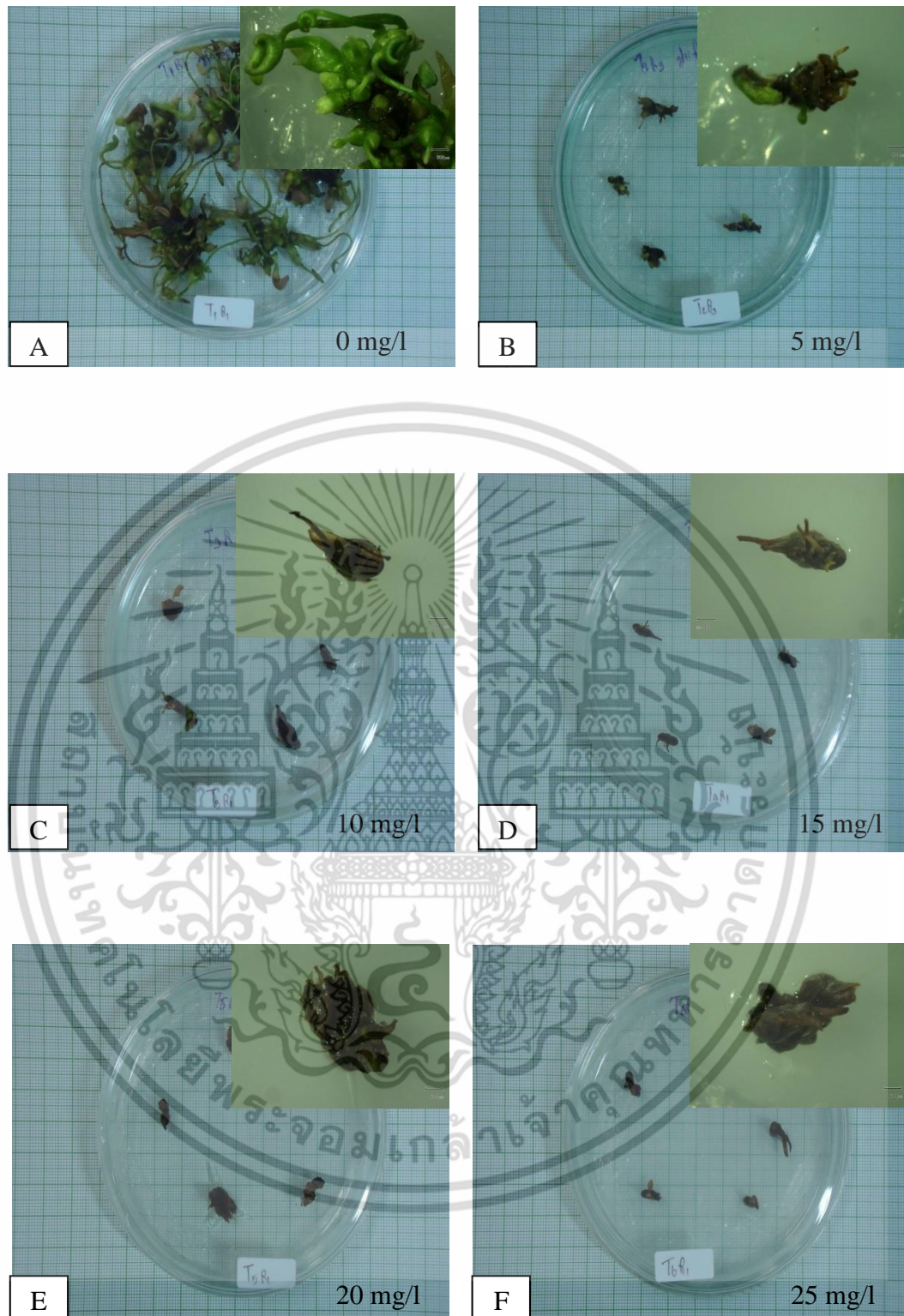
ในสัปดาห์ที่ 4 มีจำนวนใบมากที่สุด คือ  $1.80 \pm 0.90$  ใบต่อชั้นส่วน จากนั้นจำนวนใบจะลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จนกระทั่งสัปดาห์ที่ 7 และ 8 มีจำนวนใบน้อยที่สุด  $1.33 \pm 0.32$  และ  $0.00$  ใบต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช basta ที่ความเข้มข้นน้อยสุดที่ทำให้ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริกไม่มีการเจริญทางด้านจำนวนใบ คือที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้น 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริก พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 มีจำนวนใบมากที่สุด คือ  $1.30 \pm 0.20$ ,  $1.90 \pm 0.50$  และ  $2.00 \pm 0.50$  ใบต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ จากนั้นจำนวนใบจะลดลง จนกระทั่งสัปดาห์ที่ 7 มีจำนวนใบน้อยที่สุด  $1.00 \pm 0.00$ ,  $1.00 \pm 0.00$  และ  $0.00$  ใบต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ และในสัปดาห์ที่ 8 ที่ 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนใบ  $0.00$  ใบต่อชิ้นส่วน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 บัวหลวงพันธุ์บุณชกริก ในการทดสอบระดับความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช basta ใช้เป็นสารคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (A), 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (B), 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (C), 15 มิลลิกรัมต่อลิตร (D), 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (E) และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร (F), อายุ 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วน multiple shoot ที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก MS ที่มีสารกำจัดวัชพืช basta ความเข้มข้นต่างๆ

basta (mg/l)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต/อายุ (สัปดาห์)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
control	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a
5	100±0.00	100±0.00	93.33±6.66	93.33±6.66ab	80.00±11.54a	80.00±11.54a	77.33±17.32a	77.33±17.32b
10	100±0.00	100±0.00	93.33±6.66	80.00±0.00abc	46.66±13.33b	33.33±6.66b	26.66±6.66b	0.00±0.00c
15	100±0.00	100±0.00	100±0.00	73.33±6.66bc	53.33±13.33b	26.66±17.32b	6.66±6.66b	0.00±0.00c
20	100±0.00	100±0.00	86.66±6.66	66.66±13.33bc	46.66±13.33b	20.00±11.54b	6.66±6.66b	0.00±0.00c
25	100±0.00	100±0.00	100±0.00	73.33±6.66c	53.33±13.33b	26.66±13.33b	13.33±6.66b	0.00±0.00c
F-test	ns	ns	ns	*	*	*	**	**
%CV	0.00	0.00	9.98	15.37	32.44	41.86	41.38	43.17

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan 's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ, \* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, \*\* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางที่ 4.2 จำนวนยอดของชิ้นส่วน multiple shoot ที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก MS ที่มีสารกำจัดวัชพืช basta ความเข้มข้นต่างๆ

basta (mg/l)	จำนวนยอด/อายุ (สัปดาห์)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
control	3.66±0.69	4.46±0.40	5.53±0.17a	6.06±0.43a	7.80±0.64a	10.13±0.75a	11.00±0.69a	11.93±0.69a
5	3.46±0.76	3.46±0.40	3.80±0.23b	2.86±0.32b	2.63±0.63b	1.56±0.34b	1.33±0.23b	1.43±0.23b
10	2.40±0.23	2.46±0.28	2.03±0.26c	2.63±0.78b	1.76±0.23c	1.50±0.28b	1.33±0.32b	0.00±0.00c
15	3.33±0.17	2.93±0.17	2.33±0.13c	2.13±0.06bc	1.90±0.20b	1.10±0.09b	1.00±0.57b	0.00±0.00c
20	3.06±0.23	3.06±0.17	2.76±0.56bc	1.73±0.35c	1.76±0.39b	1.00±0.00b	1.00±0.00b	0.00±0.00c
25	3.86±0.95	3.73±0.97	3.10±0.97bc	2.06±0.40b	2.06±0.57b	1.83±0.92b	1.33±0.87b	0.00±0.00c
F-test	ns	ns	**	**	**	**	**	**
%CV	31.45	24.45	23.02	20.82	31.57	31.71	36.10	23.30

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan 's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ, \*\* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4.3 จำนวนใบของชิ้นส่วน multiple shoot ที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก MS ที่มีสารกำจัดวัชพืช basta ความเข้มข้นต่างๆ

basta (mg/l)	จำนวนใบ/อายุ (สัปดาห์)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
control	2.53±0.32	2.87±0.17	3.66±0.28	4.00±0.11a	6.26±0.40a	7.86±0.40a	9.13±0.17a	10.60±0.46a
5	2.90±0.66	3.80±0.46	3.76±0.66	2.83±0.40b	3.33±1.20b	2.06±0.29b	1.50±0.28b	1.13±0.13b
10	2.56±0.23	2.93±0.17	2.60±0.41	1.80±0.90bc	1.43±0.86bc	1.33±0.66bc	1.33±0.32b	0.00±0.00c
15	2.46±0.13	2.66±0.06	2.06±0.47	1.30±0.20c	1.80±0.34bc	1.00±0.00cd	1.00±0.00b	0.00±0.00c
20	3.00±0.41	3.20±0.00	2.03±0.51	1.96±0.50bc	1.66±0.32b	1.00±0.00cd	1.00±0.00b	0.00±0.00c
25	3.16±0.28	3.33±0.23	2.03±0.43	2.00±0.50bc	1.26±0.26c	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
F-test	ns	ns	ns	**	**	**	**	**
%CV	24.23	13.11	31.03	26.47	43.96	26.69	22.70	17.38

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan 's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ, \*\* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

### 4.3 ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ใช้ในการกำจัดอะโครแบคทีเรียม ของบัวหลวงภายหลังการถ่ายยีน

ผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ใช้ในการกำจัดอะโครแบคทีเรียม ของบัวหลวงภายหลังการถ่ายยีน ในการกำจัดอะโครแบคทีเรียม สายพันธุ์ GV3101 ทำการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H โดยใช้อะโครแบคทีเรียมเป็นพาหะ ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่ชิ้นส่วนของบัวหลวงในอะโครแบคทีเรียมต่ออาหาร MS (1962) 1:10 นาน 10 นาที (วิลาสินี ลีทวีทรัพย์, 2554) ทำการเลี้ยงในอาหาร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ และสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ ดังนี้ 0, 100, 200, 300, 400, และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการบันทึกผลการทดลอง ได้แก่ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน และจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้น บันทึกผลการทดลอง 8 สัปดาห์ และเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์

#### 4.3.1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วน multiple shoot บนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะ augmentin ความเข้มข้นต่างๆ

ภายหลังจากทำการทดลองนำชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์กริก มาเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ ดังนี้ 0, 100, 200, 300, 400, และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์กริก พบว่าจะหยุดการเจริญเติบโต และค่อยๆ ตายลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น แต่มีอัตราการตายที่น้อยลงตามความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ augmentin ที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.4) ผลของความเข้มข้นที่ 0-500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในสัปดาห์ที่ 1-5 ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์กริก มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ

ผลของความเข้มข้นที่ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Control) ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์กริก มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในสัปดาห์ที่ 1-3 คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เริ่มตายบนอาหารคัดเลือกในสัปดาห์ที่ 4 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตคิดเป็น  $95.00 \pm 5.00$  เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งพบว่าในสัปดาห์ที่ 8 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยที่สุดคือ  $35.00 \pm 5.00$  เปอร์เซ็นต์ ต่อมาผลของความเข้มข้นที่ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์กริก เริ่มตายบนอาหารคัดเลือกในสัปดาห์ที่ 4 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตคิดเป็น  $90.00 \pm 10.00$  เปอร์เซ็นต์ และพบว่าในสัปดาห์ที่ 8 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต  $45.00 \pm 9.350$  เปอร์เซ็นต์ ต่อมาผลของความเข้มข้นที่ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์กริก เริ่มตายบนอาหารคัดเลือกในสัปดาห์ที่ 4 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตคิดเป็น  $90.00 \pm 5.50$  เปอร์เซ็นต์ และพบว่าในสัปดาห์ที่ 8 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต  $55.00 \pm 5.00$  เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้นที่ 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์กริก มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในสัปดาห์ที่ 1-6 คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ผลของความเข้มข้นที่

300 มิลลิกรัมต่อลิตร เริ่มตายบนอาหารคัดเลือกในสัปดาห์ที่ 7 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตคิดเป็น  $80.00 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ และพบว่าในสัปดาห์ที่ 8 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต  $70.00 \pm 5.50$  เปอร์เซ็นต์ ผลของความเข้มข้นที่ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริก เริ่มตายบนอาหารคัดเลือกในสัปดาห์ที่ 7 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตคิดเป็น  $85.00 \pm 5.00$  เปอร์เซ็นต์ และพบว่าในสัปดาห์ที่ 8 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต  $75.00 \pm 5.00$  เปอร์เซ็นต์ และผลของความเข้มข้นที่ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริกมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในสัปดาห์ที่ 1-7 คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เริ่มตายในสัปดาห์ที่ 8 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตคิดเป็น  $90.00 \pm 5.50$  เปอร์เซ็นต์ สรุปผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ augmentin พบว่าในสัปดาห์ที่ 8 ที่ความเข้มข้นน้อยสุดที่ทำให้ขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริก จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยที่สุด คือความเข้มข้นที่ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต  $35.00 \pm 5.00$  เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะตรงข้ามกันกับที่ความเข้มข้นมากที่สุดที่ทำให้ขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริกจะมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุด คือความเข้มข้นที่ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต  $90.00 \pm 5.50$  เปอร์เซ็นต์

#### 4.3.2 เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของขึ้นส่วน multiple shoot บนอาหาร MS ที่มีสาร

##### ปฏิชีวนะ augmentin ความเข้มข้นต่างๆ

ภายหลังจากทำการทดลองนำขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริก มาเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ ดังนี้ 0, 100, 200, 300, 400, และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริกจะหยุดการเจริญเติบโตลดลง และค่อยๆ ปนเปื้อนมากขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น แต่ถ้าความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ augmentin ที่สูงขึ้นจะมีอัตราการปนเปื้อนที่น้อยลง (ตารางที่ 4.5) ผลของความเข้มข้น 300, 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 ขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริก มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนคิดเป็น 0 เปอร์เซ็นต์

ผลของความเข้มข้นที่ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Control) ขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริก มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนในสัปดาห์ที่ 1 คิดเป็น  $90.00 \pm 2.75$  เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนมากขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งพบว่าในสัปดาห์ที่ 2-8 มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนมากที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลของความเข้มข้นที่ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริก ในสัปดาห์ที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนคิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนมากขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยพบการปนเปื้อน 100 เปอร์เซ็นต์ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 เป็นต้นไป ผลของความเข้มข้นที่ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณชกริก ในสัปดาห์ที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนคิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนมากขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งพบว่าในสัปดาห์ที่ 4-8 มีเปอร์เซ็นต์ การปนเปื้อนมากที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้นที่ 300, 400

และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริก มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนในสัปดาห์ที่ 1, 2 คิดเป็น 0.00 เปอร์เซ็นต์ ผลของความเข้มข้นที่ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เริ่มปนเปื้อนบนอาหารคัดเลือกในสัปดาห์ที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนคิดเป็น  $10.00 \pm 2.75$  เปอร์เซ็นต์ และพบว่าในสัปดาห์ที่ 7 และ 8 มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน 100 เปอร์เซ็นต์ ผลของความเข้มข้นที่ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริก เริ่มปนเปื้อนบนอาหารคัดเลือกในสัปดาห์ที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนคิดเป็น  $5.00 \pm 2.50$  เปอร์เซ็นต์ และพบว่าในสัปดาห์ที่ 8 มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน  $80.00 \pm 5.75$  เปอร์เซ็นต์ และผลของความเข้มข้นที่ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริก ไม่มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนในสัปดาห์ที่ 1, 2 และ 3 เริ่มปนเปื้อนบนอาหารคัดเลือกในสัปดาห์ที่ 4 มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน คิดเป็น  $10.00 \pm 5.00$  เปอร์เซ็นต์ และพบว่าในสัปดาห์ที่ 8 มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน  $75.00 \pm 4.75$  เปอร์เซ็นต์ สรุปผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ augmentin พบว่าในสัปดาห์ที่ 8 ที่ความเข้มข้นน้อยสุดที่ทำให้ขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริกจะมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนมากที่สุด คือความเข้มข้นที่ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะตรงข้ามกับที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น ที่ทำให้ขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริกมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนน้อยที่สุด คือความเข้มข้นที่ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน  $75.00 \pm 4.75$  เปอร์เซ็นต์

#### 4.3.3 จำนวนยอดเฉลี่ยของขึ้นส่วน multiple shoot บนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะ augmentin ความเข้มข้นต่างๆ

ภายหลังจากทำการทดลองนำขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริก มาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ ดังนี้ 0, 100, 200, 300, 400, และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า จำนวนยอดเฉลี่ย multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริกในระยะแรกจะหยุดการเจริญเติบโต และค่อยๆ มีจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.6) ผลของความเข้มข้น 0-500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในสัปดาห์ที่ 1 ขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริก และทุกความเข้มข้น มีจำนวนยอดเฉลี่ยของ multiple shoot ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ

ผลของความเข้มข้นที่ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Control) ขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริก ในสัปดาห์ที่ 1 มีจำนวนยอดเฉลี่ย คือ  $1.45 \pm 0.12$  ยอดต่อขึ้นส่วน และมีจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ในสัปดาห์ที่ 8 มีจำนวนยอดเฉลี่ย คือ  $2.25 \pm 0.32$  ยอดต่อขึ้นส่วน ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริก พบว่าในสัปดาห์ที่ 1 มีจำนวนยอด คือ  $1.40 \pm 0.14$  ยอดต่อขึ้นส่วน จากนั้นจำนวนยอดจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนกระทั่งสัปดาห์ที่ 8 มีจำนวนยอด  $2.66 \pm 0.23$  ยอดต่อขึ้นส่วน ต่อมาความเข้มข้นที่ 200 มิลลิกรัม

ต่อลิตร ขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริก พบว่าในสัปดาห์ที่ 1 มีจำนวนยอด คือ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$1.45 \pm 0.15$  ยอดต่อชิ้นส่วน จากนั้นจำนวนยอดจะเพิ่มขึ้น จนกระทั่งสัปดาห์ที่ 8 มีจำนวนยอด  $2.71 \pm 0.10$  ยอดต่อชิ้นส่วน ที่ความเข้มข้น 300, 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริก พบว่าในสัปดาห์ที่ 1 มีจำนวนยอด คือ  $1.70 \pm 0.17$ ,  $1.60 \pm 0.08$  และ  $1.45 \pm 0.05$  ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ จากนั้นจำนวนยอดจะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งสัปดาห์ที่ 8 มีจำนวนยอด  $3.39 \pm 0.24$ ,  $3.12 \pm 0.12$  และ  $2.86 \pm 0.15$  ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ สรุปผลการศึกษาค้นคว้าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ augmentin พบว่าในสัปดาห์ที่ 1 จำนวนยอดเฉลี่ย multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริกทุกความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และพบว่าในสัปดาห์ที่ 6 ถึงสัปดาห์ที่ 8 จำนวนยอดเฉลี่ย multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริกจะมีจำนวนยอดเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ augmentin ที่สูงขึ้น ในทางกลับกันความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะต่ำจะมีจำนวนยอดที่น้อยกว่าความเข้มข้นสูงๆ ทั้งนี้เป็นเพราะความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ต่ำทำให้เชื้อของอะโกรแบคทีเรียมเข้าทำลาย ทำให้ multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริกไม่ค่อยเจริญเติบโต และตายลงในที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วน multiple shoot บนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะ augmentin ความเข้มข้นต่างๆ

augmentin (mg/l)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต/อายุ (สัปดาห์)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
control	100±0.00	100±0.00	100±0.00	95.00±5.00	85.00±5.00	75.00±10.00b	45.00±5.00e	35.00±5.00e
100	100±0.00	100±0.00	100±0.00	90.00±10.00	75.00±9.50	65.00±8.00b	50.00±10.00de	45.00±9.50de
200	100±0.00	100±0.00	100±0.00	90.00±5.50	85.00±9.50	75.00±5.00b	65.00±5.00cd	55.00±5.00cd
300	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00a	80.00±0.00bc	70.00±5.50bc
400	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00a	85.00±5.00ab	75.00±5.00ab
500	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00a	100±0.00a	90.00±5.50a
F-test	ns	ns	ns	ns	ns	**	**	**
%CV	0	0	0	10.27	19.57	15.77	15.24	20.22

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan 's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ;\*\* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของชิ้นส่วน multiple shoot บนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะ augmentin ความเข้มข้นต่างๆ

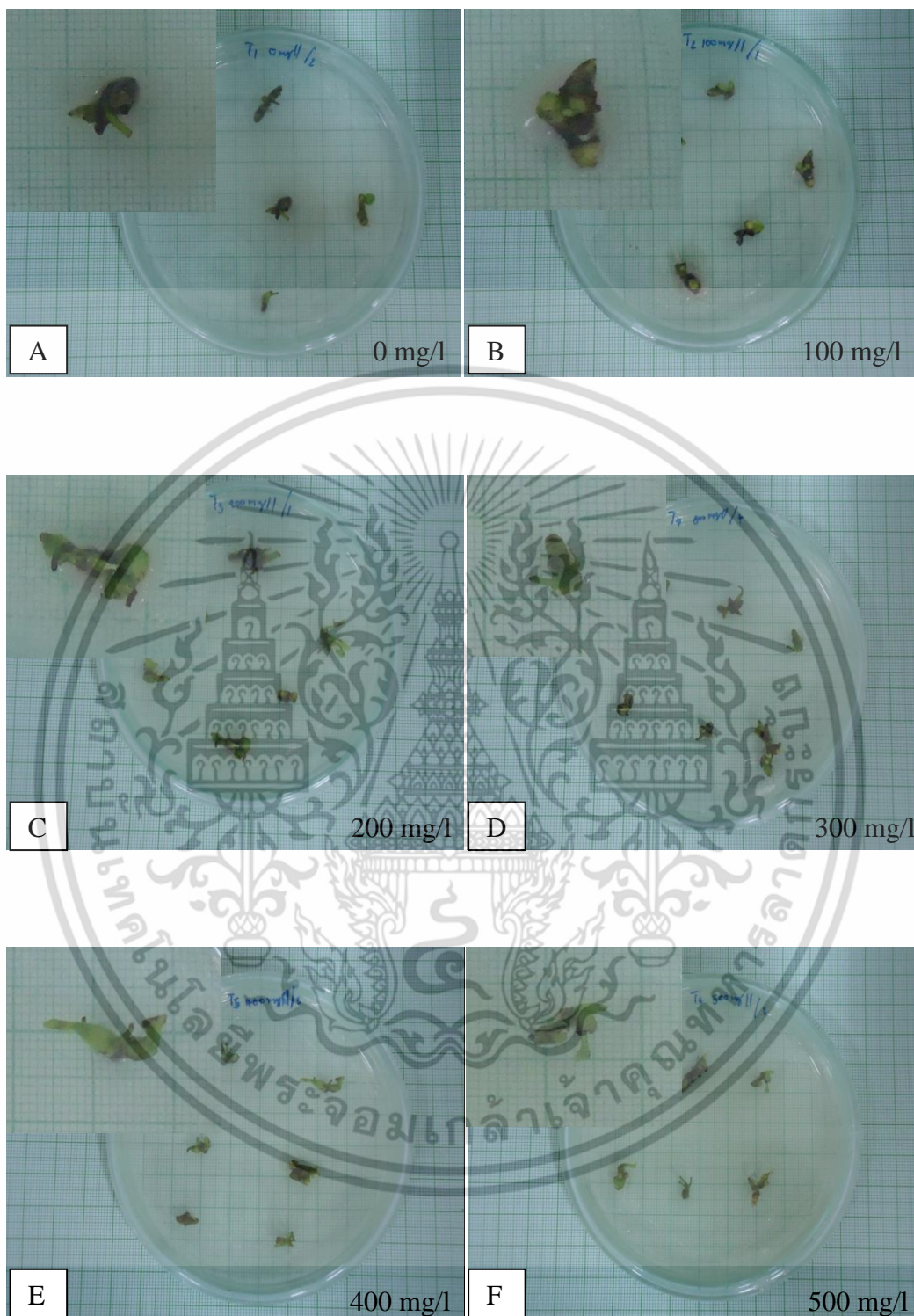
augmentin (mg/l)	เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน /อายุ (สัปดาห์)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
control	90.00±2.75a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
100	20.00±0.00b	60.00±4.00b	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
200	10.00±0.00c	20.00±0.00c	50.00±2.75b	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
300	0.00±0.00d	0.00±0.00d	10.00±2.75c	70.00±9.50ab	85.00±7.50ab	95.00±2.50a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
400	0.00±0.00d	0.00±0.00d	5.00±2.50c	40.00±12.00bc	50.00±14.25bc	50.00±14.25b	65.00±10.25b	80.00±5.75b
500	0.00±0.00d	0.00±0.00d	0.00±0.00c	10.00±5.00c	35.00±10.25c	35.00±10.25b	55.00±4.75b	75.00±4.75b
F-test	**	**	**	**	*	**	**	*
%CV	33.33	22.22	17.69	38.09	40.14	36.56	21.41	13.24

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan 's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% \* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, \*\* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางที่ 4.6 จำนวนยอดเฉลี่ยของชิ้นส่วน multiple shoot บนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะ augmentin ความเข้มข้นต่างๆ

augmentin (mg/l)	จำนวนยอดเฉลี่ย/อายุ (สัปดาห์)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
control	1.45±0.12	1.55±0.22c	1.80±0.26b	1.75±0.29	1.62±0.23	1.46±0.16d	2.00±0.40b	2.25±0.32c
100	1.40±0.14	1.60±0.21bc	1.60±0.21b	1.70±0.23	1.62±0.23	1.93±0.60bc	2.41±0.25b	2.66±0.23bc
200	1.45±0.15	1.50±0.20c	1.60±0.24b	1.88±0.25	2.30±0.36	2.04±0.13abc	2.43±0.17b	2.71±0.10bc
300	1.70±0.17	2.10±0.19ab	2.52±0.24a	2.33±0.17	2.45±0.22	2.45±0.22a	3.54±0.40a	3.39±0.24a
400	1.60±0.08	2.45±0.50a	2.50±0.50a	2.10±0.12	2.00±0.11	2.35±0.50ab	2.82±0.15ab	3.12±0.12ab
500	1.45±0.05	1.45±0.09c	1.60±0.08b	1.70±0.19	1.65±0.15	1.87±0.17cd	2.40±0.80b	2.86±0.15abc
F-test	ns	**	**	ns	ns	**	**	*
%CV	16.90	19.91	20.85	24.70	22.34	14.27	21.16	14.98

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan 's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ, \* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ, \*\* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง



ภาพที่ 4.3 การปนเปื้อนในบิวหลวงพันธุ์บุณฑริก อายุ 8 สัปดาห์ ในการทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ใช้กำจัดอะโกราแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (A), 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (B), 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (C), 300 มิลลิกรัมต่อลิตร (D), 400 มิลลิกรัมต่อลิตร (E) และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (F)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4 ผลของการเพิ่มปริมาณพลาสมิด pJA8F3H เพื่อใช้ในการถ่ายยีน

##### 4.4.1 ผลการตรวจสอบพลาสมิด pJA8F3H ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ โดยวิธี โคลินีพีซีอาร์ (colony polymerase chain reaction)

ภายหลังการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al.* 1989) เข้าสู่เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  จากนั้นนำโคลินีพีซีอาร์ของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญบนอาหาร คัดเลือกมาตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 20 ไมโครลิตร โดยใช้ไพรเมอร์ F3H sense F, F3H sense R นำไปตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis ใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 1Kb DNA ladder ซึ่งจะได้อแถบ DNA ขนาดประมาณ 300 คู่เบส แสดงว่าในเซลล์ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  มีพลาสมิด pJA8F3H อยู่ภายใน (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 การตรวจสอบพลาสมิด pJA8F3H ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  โดยวิธี โคลินีพีซีอาร์ (colony polymerase chain reaction) เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 1Kb DNA ladder

ช่องที่ 1 DNA มาตรฐานชนิด 1Kb DNA ladder

ช่องที่ 2 Positive control พลาสมิด pJA8F3H

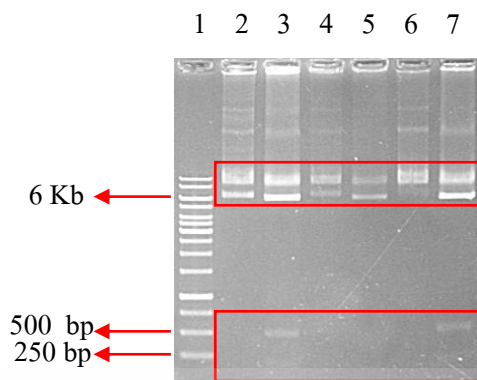
ช่องที่ 3 Negative control dH<sub>2</sub>O

ช่องที่ 4-13 Colony PCR ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$

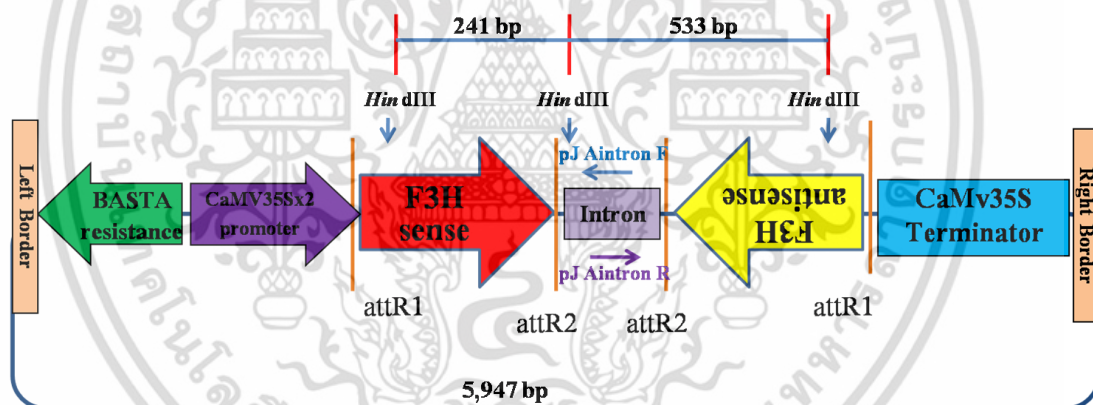
##### 4.4.2 การตรวจสอบพลาสมิด pJA8F3H ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ภายหลังทำการตรวจสอบพลาสมิด pJA8F3H ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  โดยวิธี โคลินีพีซีอาร์ เลือกโคลินีพีซีอาร์ที่มีอยู่ของพลาสมิด pJA8F3H ทำการสกัดพลาสมิดโดยชุดสกัด พลาสมิด High-speed plasmid mini kit (Geneaid, Taiwan) แล้วนำมาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัด จำเพาะ Hind III (Fermentas, USA) ปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร นำไปตรวจสอบ โดยวิธี gel electrophoresis ใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 1Kb DNA ladder ซึ่งพลาสมิด pJA8F3H มีความยาวทั้งหมด 6,721 คู่เบส เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้ชิ้น DNA 3 ชิ้น ขนาด 5,947, 533 และขนาด 241 คู่เบส (ภาพที่ 4.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 การตรวจสอบพลาสมิด pJA8F3H ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 1Kb DNA ladder  
 ช่องที่ 1 DNA มาตรฐานชนิด 1Kb DNA ladder  
 ช่องที่ 2, 4, 6 พลาสมิด pJA8F3H ได้แถบ DNA ขนาด 6,721 คู่เบส  
 ช่องที่ 3, 5, 7 พลาสมิด pJA8F3H ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ได้แถบขึ้น DNA 3 ชั้น ขนาด 5947, 533 และขนาด 241 คู่เบส

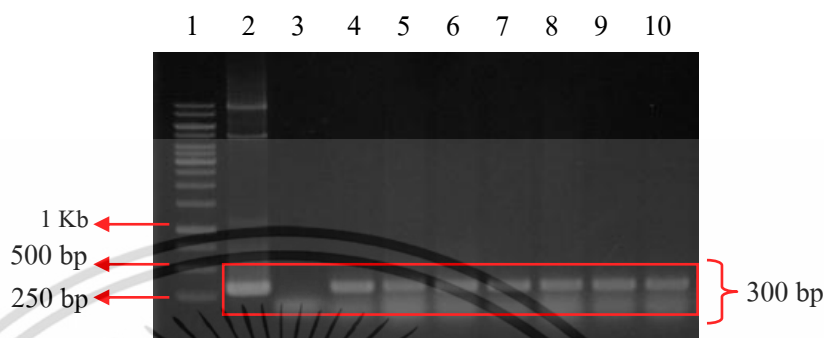


ภาพที่ 4.6 แผนภาพเวกเตอร์ pJA8F3H และตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III (ที่มา ชัยวรกุล ไชยปัญญา. 2555)

#### 4.4.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิด pJA8F3H ในอะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) สายพันธุ์ GV3101 โดยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์

ภายหลังจากการนำพลาสมิด pJA8F3H ที่ผ่านการตรวจสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ นำพลาสมิดที่ได้มาทำการถ่ายโอนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) สายพันธุ์ GV3101 ด้วยวิธี electroporation แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ เพื่อทดสอบการมีอยู่ของพลาสมิด pJA8F3H โดยวิธีโคลนนิ่งพีซีอาร์ เตรียมปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 20 ไมโครลิตร โดยใช้ไพรเมอร์ F3H sense F, F3H sense R นำไปตรวจสอบโดยวิธี gel เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

electrophoresis ใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 1Kb DNA ladder ซึ่งจะได้แถบ DNA ขนาดประมาณ 300 คู่เบส แสดงว่าในเซลล์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมีพลาสมิด pJA8F3H อยู่ใน



ภาพที่ 4.7 การตรวจสอบพลาสมิด pJA8F3H ของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) สายพันธุ์ GV3101 โดยวิธี โคลนีพีซีอาร์ (colony polymerase chain reaction) เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 1Kb DNA ladder  
 ช่องที่ 1 DNA มาตรฐานชนิด 1Kb DNA ladder  
 ช่องที่ 2 Positive control พลาสมิด pJA8F3H  
 ช่องที่ 3 Negative control dH<sub>2</sub>O  
 ช่องที่ 4-10 Colony PCR ของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ GV3101

#### 4.5 ผลการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวง

ในเวกเตอร์ pJA8F3H เป็นเวกเตอร์ที่สามารถสร้าง RNA รูปแบบ inverted repeat ในเวกเตอร์ pJA8F3H มียีนคัดเลือกในพืชคือ *phosphinothricin acetyl transferrase (bar gene)* ซึ่งต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช basta (glufosinate ammonium) เมื่อทำการถ่ายโอนยีน F3H เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุญทรึก จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi ยับยั้งการแสดงออกของยีน F3H ในพืช โดยทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมของยีน F3H (*flavanone 3-hydroxylase*) มีผลไปขัดขวางการสังเคราะห์สารกลุ่มแอนโทไซยานิน การเปลี่ยนแปลงของวิถีสังเคราะห์สารกลุ่มแอนโทไซยานิน จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเปลี่ยนแปลงสีของดอกไม้ที่มีข้อจำกัดในการพัฒนาสายพันธุ์ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน F3H ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) ในบัวหลวงพันธุ์บุญทรึก (*Nelumbo nucifera* Geartn.) โดยแบ่งเป็น 2 การทดลอง คือการถ่ายโอนพลาสมิดโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค และใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ ให้ผลการทดลองดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5.1 การถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ

ผลการทดลองการถ่ายโอนยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์มณฑลทริกโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ GV3101 ที่มีพลาสมิด pJA8F3H เป็นพาหะ ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่ชิ้นส่วนของบัวหลวงในอะโกรแบคทีเรียต่ออาหาร MS (1962) คือ 1:10 นาน 10 นาที (วิลาสินี ลีทวีทรัพย์, 2554) โดยใช้ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์มณฑลทริก จำนวน 5 ชิ้นส่วนต่อจานเพาะเลี้ยง ทำการถ่ายโอนพลาสมิดโดยใช้อะโกรแบคทีเรียทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งที่ 1 และ 2 จำนวน 12 จานเพาะเลี้ยง รวมชิ้นส่วนทั้งหมด 60 ชิ้นส่วน ส่วนในครั้งที่ 3 จำนวน 15 จานเพาะเลี้ยง รวมชิ้นส่วนทั้งหมด 75 ชิ้นส่วน บ่มร่วมกับเชื้อของอะโกรแบคทีเรียในที่มืด เป็นเวลา 2 วัน คัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายโอน บนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม BA 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ basta 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ augmentin 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการบันทึกผลการทดลอง ได้แก่ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้น บันทึกผลการทดลอง 16 สัปดาห์ และเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์

##### 4.5.1.1 ผลของการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ ครั้งที่ 1

ผลของจำนวนยอด และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ multiple shoot หลังการถ่ายโอนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ บนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ basta 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ augmentin 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลของจำนวนยอดพบว่าในสัปดาห์ที่ 2 มีจำนวนยอดเฉลี่ย  $2.85 \pm 0.22$  ยอด และมีการเจริญของยอดใหม่เพิ่มขึ้นเล็กน้อย จนถึงสัปดาห์ที่ 12 มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดคือ  $4.73 \pm 0.52$  ยอด หลังจากนั้นการเจริญและพัฒนาของยอดจะค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งพบว่าจำนวนยอดเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 14 และ 16 มีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ  $2.98 \pm 0.56$  และ  $2.41 \pm 0.36$  ยอด ตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลของเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาพบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจะค่อยๆ ลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น จนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยที่สุด ในสัปดาห์ที่ 16 คือ 43.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.7)

##### 4.5.1.2 ผลของการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ ครั้งที่ 2

ผลของจำนวนยอด และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ multiple shoot หลังการถ่ายโอนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ บนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ basta 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ augmentin 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลของจำนวนยอดพบว่าในสัปดาห์ที่ 2 มีจำนวนยอดเฉลี่ย  $2.38 \pm 0.27$  ยอด และมีการเจริญของยอดใหม่เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่เป็นการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เล็กน้อย จนถึงสัปดาห์ที่ 10 มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดคือ  $3.81 \pm 0.35$  ยอด หลังจากนั้นการเจริญและพัฒนาของยอดจะค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งพบว่าจำนวนยอดเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 14 และ 16 มีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ  $2.50 \pm 0.47$  และ  $1.66 \pm 0.77$  ยอด ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาผลของเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาพบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจะค่อยๆ ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น จนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยที่สุด ในสัปดาห์ที่ 14 และ 16 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 28.33 และ 16.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)

#### 4.5.1.3 ผลของการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวง โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ ครั้งที่ 3

ผลของจำนวนยอด และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ multiple shoot หลังการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ บนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ร่วมกับ basta 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ augmentin 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลของจำนวนยอด พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 มีจำนวนยอดเฉลี่ย  $2.45 \pm 0.19$  ยอด และมีการเจริญของยอดใหม่เพิ่มขึ้นเล็กน้อย จนถึงสัปดาห์ที่ 8 มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดคือ  $4.00 \pm 0.37$  ยอด หลังจากนั้นการเจริญและพัฒนาของยอดจะค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งพบว่าจำนวนยอดเฉลี่ยในสัปดาห์ที่ 14 และ 16 มีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ  $2.40 \pm 0.43$  และ  $2.04 \pm 0.29$  ยอด ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาผลของเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาพบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจะค่อยๆ ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น จนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยที่สุด ในสัปดาห์ที่ 14 และ 16 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 30.66 และ 24.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)

**ตารางที่ 4.7** จำนวนยอด (ยอด) และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ multiple shoot หลังการถ่ายยีนโดยใช้โอะโรแบคทีเรียเป็นพาหะ บนอาหารคัดเลือก MS และ BA ความเข้มข้น 50 ไมโคร โมลาร์ ร่วมกับ basta 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ augmentin 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

		อายุ (สัปดาห์)							
		2	4	6	8	10	12	14	16
ครั้งที่ 1	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด)	2.85±0.22	3.29±0.31	3.42±0.33	3.65±0.31	3.95±0.39	4.73±0.52	2.98±0.56	2.41±0.36
	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต	100	88.33	85	81.66	71.66	56.66	50	43.33
ครั้งที่ 2	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด)	2.38±0.27	2.59±0.29	2.93±0.41	3.39±0.38	3.81±0.35	3.15±0.34	2.5±0.47	1.66±0.77
	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต	100	81.66	71.66	61.66	55	41.66	28.33	16.33
ครั้งที่ 3	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด)	2.45±0.19	2.91±0.42	3.44±0.37	4.00±0.37	3.14±0.42	2.57±0.40	2.40±0.43	2.04±0.29
	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต	100	81.33	69.33	60	52	44	30.66	24

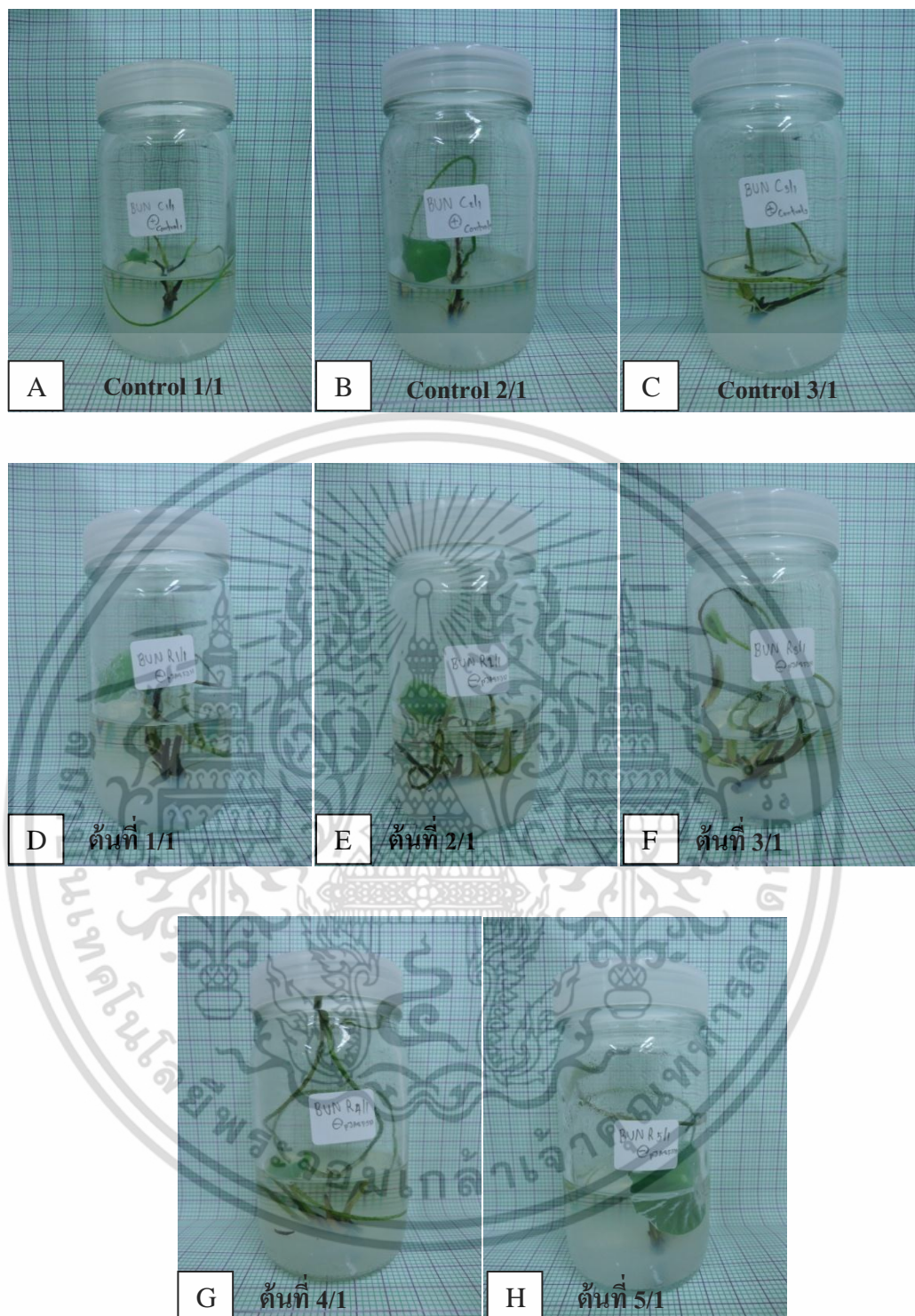
#### 4.5.2 การถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวง โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle gun bombardment)

ถ่ายยีน โดยเครื่องยิงอนุภาคตามวิธีของ (Buathong *et al.* 2013) โดยเครื่องยิงอนุภาคทั้งหมด 1 ครั้ง เตรียมเนื้อเยื่อที่มีชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์บุญทริกจำนวน 21 ชิ้นส่วนต่อจานเพาะเลี้ยง จำนวน 5 จานเพาะเลี้ยง รวมชิ้นส่วนทั้งหมด 105 ชิ้นส่วน นำมาวางที่ชั้นวางให้อยู่จากระดับยีนเป้าหมาย 9 เซนติเมตร คัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS (1962) ที่เติม BA 50 ไมโครโมลาร์ และ basta 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการบันทึกผลการทดลองได้แก่ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต, จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้น และจำนวนต้นที่รอดชีวิต บันทึกผลการทดลอง 16 สัปดาห์ และเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์

ผลของจำนวนยอด เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ multiple shoot และ จำนวนต้นที่รอดชีวิต หลังการถ่ายยีน โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคเป็นพาหะ บนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ basta 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลของจำนวนยอด พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 มีจำนวนยอดเฉลี่ย  $1.90 \pm 0.44$  และ  $2.22 \pm 0.30$  ยอด ตามลำดับ มีการเจริญของยอดใหม่เพิ่มขึ้นเล็กน้อย จนถึงสัปดาห์ที่ 14 และ 16 มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดคือ  $2.50 \pm 0.65$  และ  $2.47 \pm 0.67$  ยอด ตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลของเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 64.05 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาซึ่งพบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจะลดลง ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น จนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยที่สุด ในสัปดาห์ที่ 12, 14 และ 16 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 28.35 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมาคิดเป็นจำนวนของต้นที่รอดชีวิต พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 มีจำนวนต้นที่รอดชีวิต 61 ต้น หลังจากนั้นพบว่าจำนวนของต้นที่รอดชีวิตจะลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มในอาหารคัดเลือก จนในสัปดาห์ที่ 12, 14 และ 16 มีจำนวนต้นที่รอดชีวิตน้อยที่สุดคือ 27 ต้น (ตารางที่ 4.8)

**ตารางที่ 4.8** จำนวนยอด (ยอด) เเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ multiple shoot และจำนวนต้นที่รอด (ต้น) หลังการถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาคบนอาหารคัดเลือก MS และ BA ความเข้มข้น 50 ไมโคร โมลาร์ ร่วมกับ basta 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนชิ้นส่วนทั้งหมด 105 ชิ้นส่วน

		ชิ้นส่วน multiple shoot หลังการถ่ายยีนด้วยการยิงอนุภาค อายุ (สัปดาห์)							
		2	4	6	8	10	12	14	16
ครั้งที่ 1	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด)	1.90±0.44	2.24±0.30	2.48±0.39	2.18±0.50	2.38±0.33	2.35±0.63	2.50±0.65	2.47±0.67
	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต	64.05	57.77	49.35	45.15	42.00	28.35	28.35	28.35
	จำนวนต้นที่รอดชีวิต (ต้น)	61	55	47	43	40	27	27	27



ภาพที่ 4.8 บั้วหลวงพันธุ์มูทริกหลังการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค ที่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ และพร้อมนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน ประกอบด้วยต้นบั้วหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด control 1/1 (A), control 2/1 (B), control 1/3 (C) และต้นบั้วหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด ต้นที่ 1/1 (D), ต้นที่ 2/1 (E), ต้นที่ 3/1 (F), ต้นที่ 4/1 (G) และ ต้นที่ 5/1 (H)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.6 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* และ *CHS* ในบัวหลวงพันธุ์มณฑุทริกภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* โดยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

ผลการทดลองการถ่ายโอนยีนเข้าสู่บัวหลวงพันธุ์มณฑุทริก โดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ที่มีพลาสมิด pJA8*F3H* เป็นพาหะ ทำการถ่ายโอนพลาสมิด ทั้งหมด 3 ครั้ง พบว่าต้นบัวหลวงไม่มีความสมบูรณ์ และไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ การเจริญและพัฒนาของยอดจะค่อยๆ หยุดการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนมาก ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำ และลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น จนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยมาก และตายลงในที่สุด ทำให้ไม่สามารถนำต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะไปทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้

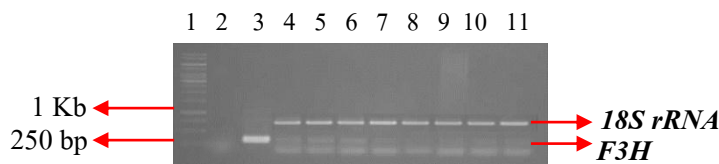
การถ่ายยีน โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค ได้ต้นบัวหลวงที่มีความสมบูรณ์และสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ในอาหารคัดเลือก ภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* จำนวนทั้งหมด 5 ต้นประกอบด้วย ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด ต้นที่ 1/1, ต้นที่ 2/1, ต้นที่ 3/1, ต้นที่ 4/1 และต้นที่ 5/1 และต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด control 1/1, control 2/1, control 3/1 (ภาพที่ 4.8) มาทำการสกัด RNA ของบัวหลวงตามวิธีของ Invitrap Spin Plant RNA Mini Kit จากนั้นทำการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA (complementary DNA) โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase นำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี RT-PCR ต่อไป

##### 4.6.1 ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* (*flavanone 3-hydroxylase*)

ภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์มณฑุทริกแล้วทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน นำ cDNA มาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H* โดยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) เริ่มจากนำ cDNA ของบัวหลวงพันธุ์มณฑุทริกที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* และบัวหลวงที่ไม่ได้ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิดมาปรับความเข้มข้นของ cDNA เริ่มต้นให้เท่ากัน โดยใช้ *18S rRNA* เป็นตัวเปรียบเทียบการแสดงออก และนำไปตรวจสอบด้วยวิธีการ gel electrophoresis จากนั้นนำ cDNA ที่ได้จากการปรับความเข้มข้นให้เท่ากันข้างต้นแล้ว ทำ PCR โดยใช้ cDNA เป็น DNA แม่แบบ ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *F3H* คือ ใช้ไพรเมอร์ F3H sense F, F3H sense R ได้ DNA ขนาดประมาณ 300 คู่เบส นำบัวหลวงพันธุ์มณฑุทริกที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* และต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดจำนวน 3 ต้นคือ control 1/1, control 2/1 และ control 3/1 มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน พบว่าบัวหลวงในต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* (ภาพที่ 4.9) ได้แก่ ต้นที่ 1/1, ต้นที่ 2/1, ต้นที่ 3/1, ต้นที่ 4/1 และต้นที่ 5/1 ทั้งหมดเกิดแถบ

DNA ขนาดประมาณ 300 คู่เบส แต่ในต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดมีการแสดงออกที่ลดลง ซึ่งเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

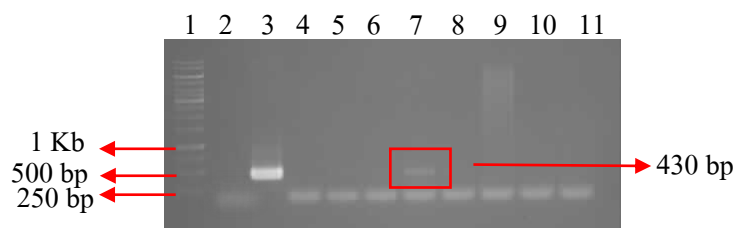
มีความเข้มของแถบ DNA น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน จะมีปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* มากกว่า



**ภาพที่ 4.9** การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เกิดแถบ DNA ขนาดประมาณ 300 คู่เบสโดยใช้ *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง ช่องที่ 1 DNA มาตรฐานชนิด 1Kb DNA ladder  
 ช่องที่ 2 Negative control  $\text{dH}_2\text{O}$   
 ช่องที่ 3 Positive control พลาสมิด pJA8*F3H*  
 ช่องที่ 4-6 บัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด control 1/1 (4), control 2/1 (5) และ control 3/1 (6)  
 ช่องที่ 7-11 บัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดต้นที่ 1/1 (7), ต้นที่ 2/1 (8), ต้นที่ 3/1 (9), ต้นที่ 4/1 (10) และต้นที่ 5/1 (11)

#### 4.6.2 ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *bar* (*phosphinothricin acetyl transferrase*)

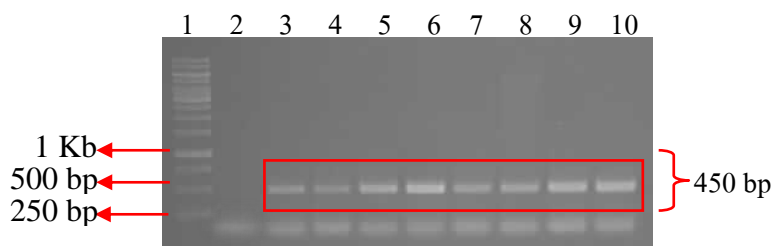
ภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกแล้ว จะต้องมีการตรวจสอบการแสดงออกของยีน โดยวิธี RT-PCR ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *bar* ด้วยชุดไพรเมอร์ *bar* gene F, *bar* gene R มีความจำเพาะกับยีน *bar* ซึ่งเป็นยีนคัดเลือกในพืชเกิดแถบ DNA ขนาด 430 คู่เบส นำบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* และต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดจำนวน 3 ต้นคือ control 1/1, control 2/1 และ control 3/1 มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน พบว่าบัวหลวงในต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* ได้แก่ ต้นที่ 1/1, ต้นที่ 2/1, ต้นที่ 3/1, ต้นที่ 4/1 และต้นที่ 5/1 เกิดแถบ DNA ขนาดประมาณ 430 คู่เบส ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดจำนวนทั้งหมด 1 ต้นที่ 1/1 จากจำนวนต้นทั้งหมด 5 ต้น ส่วนต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด control 1/1, control 2/1 และ control 3/1 ทั้ง 3 ต้น ไม่พบการมีอยู่ของยีน *bar* (ภาพที่ 4.10)



**ภาพที่ 4.10** การแสดงออกของยีน *bar* ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *bar* gene F, *bar* gene R เกิดแถบ DNA ขนาดประมาณ 430 คู่เบส เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 1Kb DNA ladder ช่องที่ 1 DNA มาตรฐานชนิด 1Kb DNA ladder  
 ช่องที่ 2 Negative control dH<sub>2</sub>O  
 ช่องที่ 3 Positive control พลาสมิด pJA8F3H  
 ช่องที่ 4-6 บัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด control 1/1(4), control 2/1 (5) และ control 3/1 (6)  
 ช่องที่ 7-11 บัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด ต้นที่ 1/1 (7), ต้นที่ 2/1 (8), ต้นที่ 3/1 (9), ต้นที่ 4/1 (10) และต้นที่ 5/1 (11)

#### 4.6.3 ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* (*chalcone synthase*)

ภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์อนุชกริกแล้ว จะต้องมีการตรวจสอบการแสดงออกของยีน นำ cDNA มาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *CHS* ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สาร flavonoids โดยวิธี RT-PCR ใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA) ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CHS* ด้วยชุดไพรเมอร์ CHSA forward, CHSA reverse เกิดแถบ DNA มีขนาดประมาณ 450 คู่เบส นำบัวหลวงพันธุ์อนุชกริกที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H และต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดจำนวน 3 ต้นคือ control 1/1, control 2/1 และ control 3/1 และต้นบัวหลวงในต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H ได้แก่ ต้นที่ 1/1, ต้นที่ 2/1, ต้นที่ 3/1, ต้นที่ 4/1 และต้นที่ 5/1 มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน พบว่าทั้งต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด และต้นบัวหลวงในต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เกิดแถบ DNA ขนาด 458 คู่เบสทั้งหมด และมีความเข้มของแถบ DNA ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4.11)



ภาพที่ 4.11 การแสดงออกของยีน *CHS* ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *CHSA forward*, *CHSA reverse* เกิดแถบ DNA ขนาดประมาณ 450 คู่เบส เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 1Kb DNA ladder ช่องที่ 1 DNA มาตรฐานชนิด 1Kb DNA ladder

ช่องที่ 2 Negative control  $dH_2O$

ช่องที่ 3-5 บัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด control 1/1 (3), control 2/1 (4) และ control 3/1 (5)

ช่องที่ 6-10 บัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด ต้นที่ 1/1 (6), ต้นที่ 2/1 (7), ต้นที่ 3/1 (8), ต้นที่ 4/1 (9) และต้นที่ 5/1 (10)

#### 4.7 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *18S rRNA F3H bar* และ *CHS* ในบัวหลวงพันธุ์มัทริก ภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด *pJA8F3H* ด้วยเทคนิค Real time PCR

ภายหลังจากการสกัด RNA ตามวิธีของ Invitrap spin plant RNA mini kit เริ่มด้วยนำตัวอย่างบัวหลวงที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด *pJA8F3H* และตัวอย่างบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเป็นต้นควบคุม นำมาทำการสังเคราะห์เป็น cDNA โดยทำตามวิธีของ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, USA) นำ cDNA ที่ได้มาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน โดยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *18S rRNA F3H bar* และ *CHS* ด้วยเทคนิค Real time PCR

##### 4.7.1 ผลการเตรียม Standard Curve ของยีน *18S rRNA F3H* และ *CHS* ด้วยเทคนิค Real time PCR ภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด

ภายหลังจากการนำ cDNA ของบัวหลวง ที่สกัดได้มาเจือจาง ให้มีความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 1/10, 1/100, 1/1,000 และ 1/10,000 และทำทั้งหมด 3 ยีน คือยีน *18S rRNA*, *F3H* และ *CHS* โดยที่ 1 คู่ไพรเมอร์ ทำ 3 ซ้ำ ใช้  $dH_2O$  เป็นตัวควบคุม ทำปฏิกิริยา Real time PCR ใช้เครื่อง Bio-Rad CFX Manager 3 โดยแต่ละปฏิกิริยามีปริมาณ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยน้ำยา SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA. Cat. No.172-5260) ปริมาณ 10 ไมโครลิตร เมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์จึงคำนวณค่า Crossing point (Cp) และกราฟ Amplification curves ที่ตรวจวัดสัญญาณได้ด้วย Software ของเครื่อง Bio-Rad CFX Manager 3.0

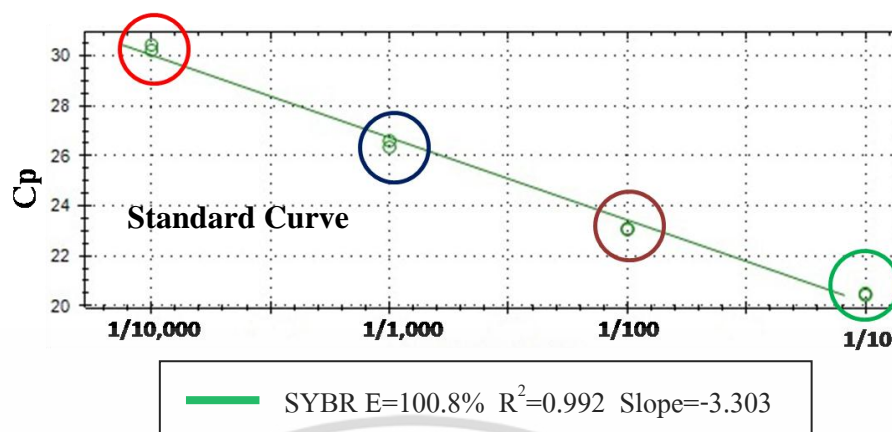
#### 4.7.1.1 ผลการเตรียม Standard Curve ของยีน *F3H*

หลังจากที่นำ cDNA ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก การทำ Standard Curve ที่ความเข้มข้นต่างๆ 4 ระดับ คือ 1/10, 1/100, 1/1,000 และ 1/10,000 โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *F3H* คือ ไพรเมอร์ F3H sense F, F3H sense R มีขนาดประมาณ 300 คู่เบส เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 44 รอบ สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ 1/10 มีค่า  $C_p$  เฉลี่ย 20.45 รอบ ที่ความเข้มข้น คือ 1/100 มีค่า  $C_p$  เฉลี่ย 23.07 รอบ ต่อมาที่ความเข้มข้น คือ 1/1,000 มีค่า  $C_p$  เฉลี่ย 26.47 รอบ และที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 1/10,000 มีค่า  $C_p$  เฉลี่ย 30.33 รอบ ตามตารางที่ 4.9 แสดงใน Crossing point ( $C_p$ ) หลังจากนั้นมาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ cDNA ของบัวหลวง และค่า Crossing point ( $C_p$ ) ได้ค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.992 ดังภาพที่ 4.12

ตารางที่ 4.9 จำนวนรอบ Crossing point ( $C_p$ ) ปฏิกิริยาที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน *F3H* ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ cDNA ดังนี้ 1/10x, 1/100x, 1/1,000x และ 1/10,000x

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น DNA	จำนวนรอบ ( $C_p$ )	จำนวนรอบเฉลี่ย ( $C_p$ )
control 1/1	1/10x	20.49	20.45
	1/10x	20.42	
control 1/1	1/100x	23.05	23.07
	1/100x	23.09	
control 1/1	1/1000x	26.35	26.47
	1/1000x	26.60	
control 1/1	1/10000x	30.44	30.33
	1/10000x	30.22	
NTC-1	dH <sub>2</sub> O	00.00	00.00
	dH <sub>2</sub> O	00.00	

control 1/1 คือต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด, Non template control (NTC) คือหลอดที่ไม่เติม DNA ตัวอย่าง



ภาพที่ 4.12 Standard curves แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ cDNA ของบัวหลวง พันธุ์บุณฑริกที่ความเข้มข้นต่างๆ กับค่า Crossing point (Cp) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *F3H*

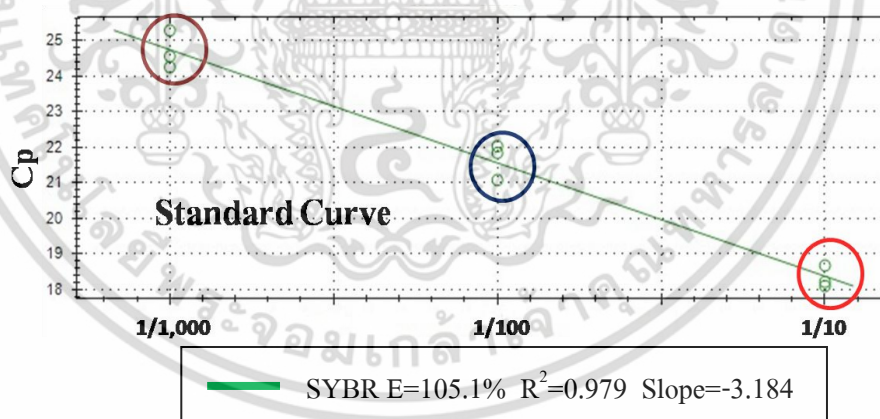
#### 4.7.1.2 ผลการเตรียม Standard Curve ของยีน *18S rRNA*

หลังจากที่นำ cDNA ของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก การทำ Standard Curve ที่ความเข้มข้นต่างๆ 3 ระดับ คือ 1/10, 1/100 และ 1/1,000 โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *18S rRNA* คือ ไพรเมอร์ 18S\_forward, 18S\_reverse ได้ DNA ขนาดประมาณ 600 คู่เบส เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบ 44 รอบ สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ 1/10 มีค่า Cp เฉลี่ย 18.32 รอบ ที่ความเข้มข้น คือ 1/100 มีค่า Cp เฉลี่ย 21.65 รอบ และที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 1/1,000 มีค่า Cp เฉลี่ย 24.70 รอบ ตามตารางที่ 4.10 แสดงใน Crossing point (Cp) หลังจากนั้นมาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ cDNA ของบัวหลวง และค่า Crossing point (Cp) ได้ค่า R<sup>2</sup> เท่ากับ 0.979 ดังภาพที่ 4.13 แสดงใน Standard curves

ตารางที่ 4.10 จำนวนรอบ Crossing point (Cp) ปฏิบัติการที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน *18S rRNA* ในบิวทลงพ่นรุ่มณฑริกโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ cDNA ดังนี้ 1/10x, 1/100x และ 1/1,000x

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น DNA	จำนวนรอบ (Cp)	จำนวนรอบเฉลี่ย (Cp)
control 1/1	1/10x	18.21	18.32
	1/10x	18.10	
	1/10x	18.67	
control 1/1	1/100x	22.02	21.65
	1/100x	21.08	
	1/100x	21.84	
control 1/1	1/1000x	24.25	24.70
	1/1000x	25.28	
	1/1000x	24.56	
NTC-1	dH <sub>2</sub> O	00.00	00.00
	dH <sub>2</sub> O	00.00	

control 1/1 คือต้นบิวทลงพ่นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด, Non template control (NTC) คือหลอดที่ไม่เติม DNA ตัวอย่าง



ภาพที่ 4.13 Standard curves แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ cDNA ของบิวทลงพ่นรุ่มณฑริกที่ความเข้มข้นต่างๆ กับค่า Crossing point (Cp) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *18S rRNA*

#### 4.7.1.3 ผลการเตรียม Standard Curve ของยีน *CHS*

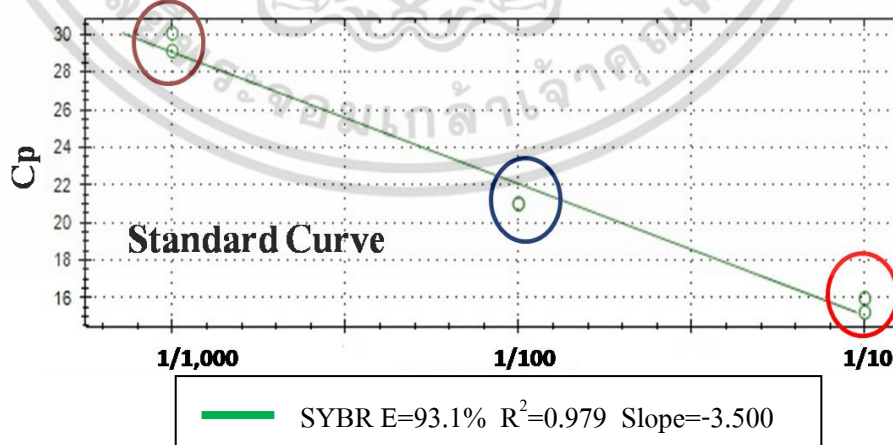
หลังจากที่นำ cDNA ของบิวทลงพ่นรุ่มณฑริก การทำ Standard Curve ที่ความเข้มข้นต่างๆ 3 ระดับ คือ 1/10, 1/100 และ 1/1,000 โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*CHS* คือ ไพรเมอร์ *CHSA forward*, *CHSA reverse* ได้ DNA ขนาดประมาณ 450 คู่เบส เมื่อปฏิกิริยา ดำเนินไปจนครบ 44 รอบ สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ 1/10 มี ค่า  $C_p$  เฉลี่ย 15.60 รอบ ที่ความเข้มข้น คือ 1/100 มีค่า  $C_p$  เฉลี่ย 20.49 รอบ และที่ความเข้มข้น ต่ำสุด คือ 1/1,000 มีค่า  $C_p$  เฉลี่ย 29.60 รอบ ตามตารางที่ 4.11 แสดงใน Crossing point ( $C_p$ ) หลังจากนั้นมาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ cDNA ของบัว หลวง และค่า Crossing point ( $C_p$ ) ได้ค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.979 ดังแสดงใน Standard curves ภาพที่ 4.14

ตารางที่ 4.11 จำนวนรอบ Crossing point ( $C_p$ ) ปฏิกิริยาที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน *CHS* ใน บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ cDNA ดังนี้ 1/10x, 1/100x, 1/1,000x และ 1/10,000x

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น DNA	จำนวนรอบ ( $C_p$ )	จำนวนรอบ เฉลี่ย ( $C_p$ )
control 1/1	1/10x	15.23	15.60
	1/10x	15.97	
control 1/1	1/100x	21.00	20.49
	1/100x	20.99	
control 1/1	1/1000x	29.13	29.60
	1/1000x	30.07	
NTC-1	dH <sub>2</sub> O	00.00	00.00
	dH <sub>2</sub> O	00.00	

Control 1/1 คือต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด, Non template control (NTC) คือหลอดที่ไม่เติม DNA ตัวอย่าง



ภาพที่ 4.14 Standard curves แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ cDNA ของบัวหลวง พันธุ์บุณฑริกที่ความเข้มข้นต่างๆ กับค่า Crossing point ( $C_p$ ) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ ยีน *CHS*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.7.2 ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *18S rRNA* *F3H bar* และ *CHS* ด้วย

##### เทคนิค Real time PCR ภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด

ภายหลังจากการทำ Standard Curve ของยีน *18S rRNA* *F3H* และ *CHS* ด้วยเทคนิค Real time PCR จากนั้นนำ cDNA ของบัวหลวงพันธุ์มุกทริกที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* และบัวหลวงที่ไม่ได้ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิดที่ได้ปรับความเข้มข้นของ cDNA เริ่มต้นให้เท่ากัน โดยใช้ *18S rRNA* เป็นตัวเปรียบเทียบการแสดงออก และนำไปตรวจสอบด้วยวิธีการ gel electrophoresis นำ cDNA ดังกล่าวมาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *18S rRNA* *F3H bar* และ *CHS* ด้วยเทคนิค Real time PCR เริ่มต้นจากการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *18S rRNA* เพื่อให้ได้ cDNA เริ่มต้นมีปริมาณใกล้เคียงกัน โดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ด้วยเทคนิค Real time PCR จะทำการตรวจสอบการแสดงออก 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ได้แก่ต้น ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดจำนวนทั้งหมด 5 ต้นคือ ต้นที่ 1/1, ต้นที่ 2/1, ต้นที่ 3/1, ต้นที่ 4/1 และต้นที่ 5/1 ส่วนต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดจำนวนทั้งหมด 1 ต้นคือ control 1/1 ครั้งที่ 2 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนห่างจากครั้งที่ 1 เป็นเวลา 10 เดือน เพื่อเป็นการยืนยันผลการแสดงออกของยีนอีกครั้ง นำบัวหลวงพันธุ์มุกทริกที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* และเพิ่มต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเพิ่มเป็น 3 ต้นคือ control 1/1, control 2/1 และ control 3/1 มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน ครั้งที่ 2 บัวหลวงในต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* ได้แก่ ต้นที่ 1/1, ต้นที่ 2/1, ต้นที่ 3/1, ต้นที่ 4/1 และต้นที่ 5/1 ซึ่งให้ให้ผลดังต่อไปนี้

##### 4.7.2.1 ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *18S rRNA* ด้วยเทคนิค Real time

##### PCR

ผลของการปรับความเข้มข้นของ cDNA โดยใช้ *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *18S rRNA* คือ ไพรเมอร์ 18S\_forward, 18S\_reverse ได้ DNA ขนาดประมาณ 600 คู่เบส ทำการตรวจสอบครั้งที่ 1 ผลปรากฏในตาราง Crossing point (Cp) (ตารางที่ 4.12) พบว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด คือ control 1/1 สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน มีค่า Cp เฉลี่ย 28.37 รอบ ส่วนต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดต้นที่ 1/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 30.25 รอบ ต้นที่ 2/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 29.56 รอบ ต้นที่ 3/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 26.22 รอบ ต้นที่ 4/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 29.60 รอบ และต้นที่ 5/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 27.93 รอบ (ภาพที่ 4.15)

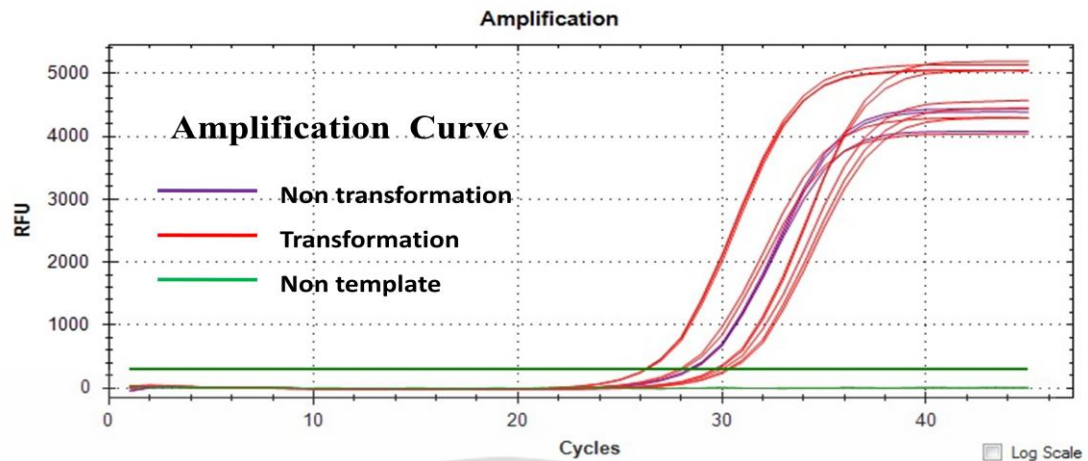
ตรวจสอบการแสดงออกของยีนครั้งที่ 2 พบว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด คือต้นที่ 1 control 1/1 สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน มีค่า Cp เฉลี่ย 22.41 รอบ ต้นที่ 2 control 2/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 22.05 รอบ และต้นที่ 3 control 3/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 22.63 รอบ ส่วนต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดต้นที่ 1/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 25.14 รอบ ต้นที่ 2/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 22.54 รอบ ต้นที่ 3/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 24.91 รอบ ต้นที่ 4/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 23.68 รอบ และต้นที่ 5/1 มี

ค่า Cp เฉลี่ย 24.56 รอบ ส่วน non-template control (NCT-1) คือหลอดที่ไม่ได้ใส่ cDNA template ไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน (ตารางที่ 4.12, ภาพที่ 4.16) หลังจากการปรับความเข้มข้นของ cDNA โดยใช้ *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิงแล้วซึ่งให้ผลจำนวนรอบ Crossing point (Cp) มีจำนวนรอบที่ใกล้เคียงกัน แล้วทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H bar* และ *CHS* ต่อไป

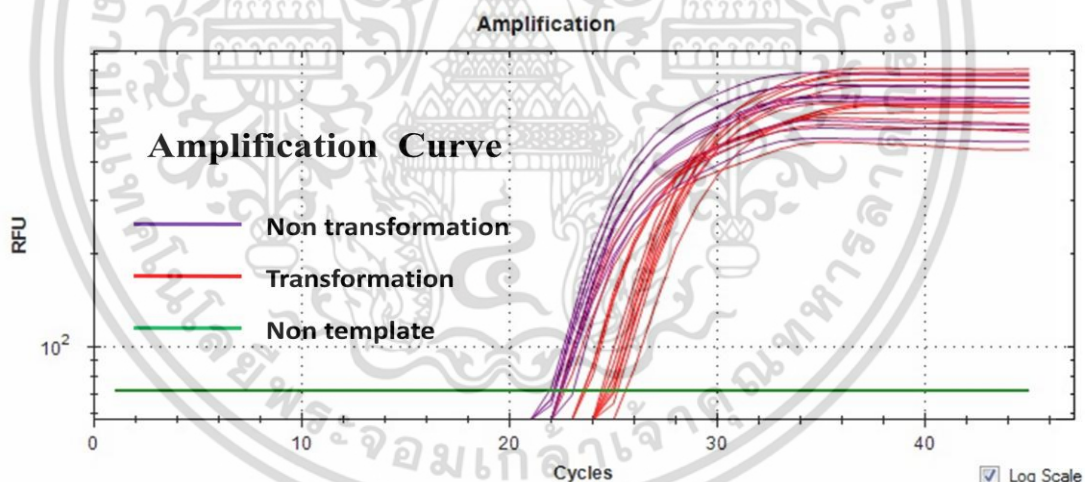
**ตารางที่ 4.12** จำนวนรอบ Crossing point (Cp) ปฏิบัติการที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน *18S rRNA* ในบัวหลวงพันธุ์บุณทริก โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง ทำการตรวจสอบ ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2

ตัวอย่าง	จำนวนรอบ (Cp) 1	จำนวนรอบ เฉลี่ย (Cp) 1	จำนวนรอบ (Cp) 2	จำนวนรอบ เฉลี่ย (Cp) 2
control 1/1	28.47	28.37	22.17	22.41
	28.35		22.53	
	28.31		22.53	
control 2/1			21.96	22.05
			22.10	
			22.10	
control 3/1			22.40	22.63
			22.46	
			23.05	
ต้นที่ 1/1	30.20	30.25	24.79	25.14
	30.31		25.03	
			25.60	
ต้นที่ 2/1	29.94	29.56	22.43	22.54
	29.19		22.78	
			22.42	
ต้นที่ 3/1	26.18	26.22	24.93	24.91
	26.26		24.80	
			25.01	
ต้นที่ 4/1	29.55	29.60	23.63	23.68
	29.66		23.69	
			23.78	
ต้นที่ 5/1	28.03	27.93	24.63	24.56
	27.83		24.63	
			25.42	
NCT-1	0.00	00.00	00.00	00.00
	0.00		00.00	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.15 Amplification Curve (ครั้งที่ 1) ที่แสดงความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณของยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิงกับจำนวนรอบ Crossing point (Cp) ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก เส้นกราฟสีม่วง คือต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด เส้นสีแดง คือต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด และเส้นสีเขียว คือ non-template control (NCT-1)



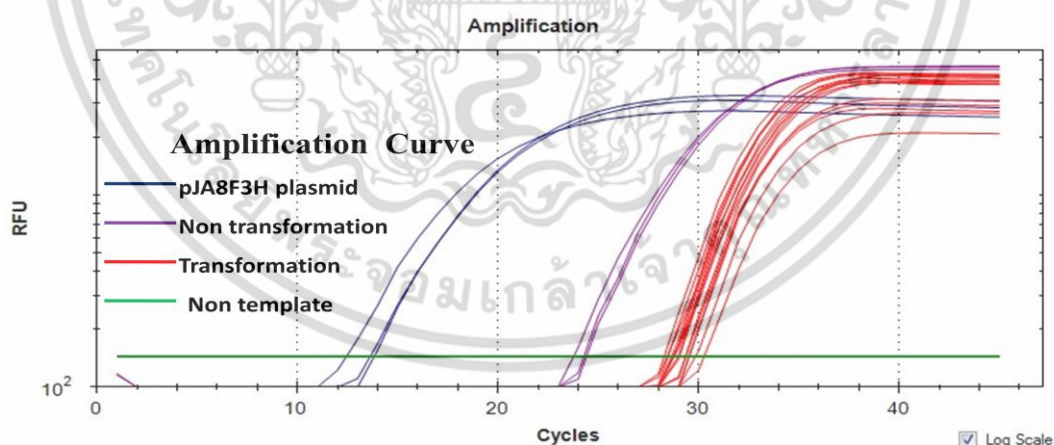
ภาพที่ 4.16 Amplification Curve (ครั้งที่ 2) ที่แสดงความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณของยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิงกับจำนวนรอบ Crossing point (Cp) ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก เส้นกราฟสีม่วง คือต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด เส้นสีแดง คือต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด และเส้นสีเขียว คือ non-template control (NCT-1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.7.2.2 ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค Real time PCR

ผลของการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *F3H* คือ ไพรเมอร์ F3H sense F, F3H sense R ได้ DNA ขนาดประมาณ 300 คู่เบส ทำการตรวจสอบครั้งที่ 1 ผลปรากฏในตาราง Crossing point (Cp) (ตารางที่ 4.13) พบว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด คือ control 1/1 สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน มีค่า Cp เฉลี่ย 24.11 รอบ ส่วนต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดต้นที่ 1/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 28.86 รอบ ต้นที่ 2/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 28.90 รอบ ต้นที่ 3/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 28.57 รอบ ต้นที่ 4/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 28.80 รอบ และต้นที่ 5/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 29.05 รอบ (ภาพที่ 4.17)

ตรวจสอบการแสดงออกของยีนครั้งที่ 2 ห่างจากครั้งแรก 10 เดือน พบว่าพลาสมิด pJA8*F3H* (Positive Ctrl-1) สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน มีค่า Cp เฉลี่ย 13.26 รอบ ต่อมาเป็นต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด คือต้นที่ 1 control 1/1 สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน มีค่า Cp เฉลี่ย 24.76 รอบ ต้นที่ 2 control 2/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 23.33 รอบ และต้นที่ 3 control 3/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 25.09 รอบ ส่วนต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด ต้นที่ 1/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 28.55 รอบ ต้นที่ 2/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 27.67 รอบ ต้นที่ 3/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 29.10 รอบ ต้นที่ 4/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 26.68 รอบ และต้นที่ 5/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 27.25 รอบ non-template control (NCT-1) คือหลอดที่ไม่ได้ใส่ cDNA template ไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน (ตารางที่ 4.13, ภาพที่ 4.18)

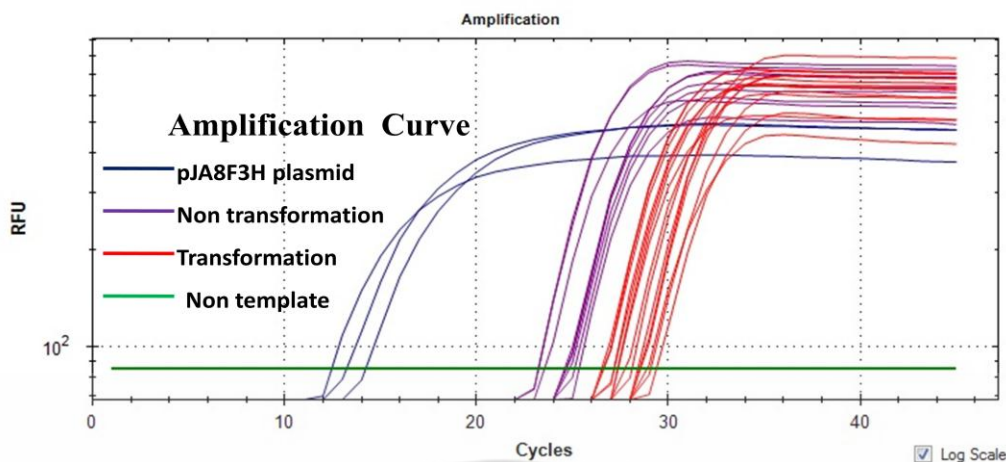


ภาพที่ 4.17 Amplification Curve (ครั้งที่ 1) ที่แสดงความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณของยีน *F3H* กับจำนวนรอบ Crossing point (Cp) ในบัวหลวงพันธุ์มณฑลจันทริก เส้นกราฟสีน้ำเงิน คือพลาสมิด pJA8*F3H* สีม่วง คือต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด เส้นสีแดง คือต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด และเส้นสีเขียว คือ non-template control (NCT-1)

ตารางที่ 4.13 จำนวนรอบ Crossing point (Cp) ปฏิบัติการที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน *F3H* ใน บัวหลวงพันธุ์บุษกริกโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ทำการตรวจสอบ ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2

ตัวอย่าง	จำนวนรอบ (Cp) 1	จำนวนรอบ เฉลี่ย (Cp) 1	จำนวนรอบ (Cp) 2	จำนวนรอบ เฉลี่ย (Cp) 2
pJA8 <i>F3H</i>	12.40	13.26	12.40	13.26
	13.58		13.20	
	13.80		14.19	
control 1/1	24.33	24.11	24.70	24.76
	24.22		24.78	
	23.79		24.82	
control 2/1			23.17	23.33
			23.18	
			23.65	
control 3/1			25.25	25.09
			25.09	
			24.91	
ต้นที่ 1/1	30.22	28.86	28.42	28.55
	29.88		28.60	
	29.49		28.64	
ต้นที่ 2/1	29.27	28.90	27.82	27.67
	28.69		27.13	
	28.75		28.08	
ต้นที่ 3/1	28.79	28.57	28.94	29.10
	28.22		29.06	
	28.72		29.32	
ต้นที่ 4/1	28.37	28.80	26.68	26.68
	29.03		26.63	
	29.00		26.75	
ต้นที่ 5/1	29.47	29.05	27.33	27.25
	29.29		27.30	
	28.39		27.13	
NTC-1	00.00	00.00	00.00	00.00
	00.00		00.00	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

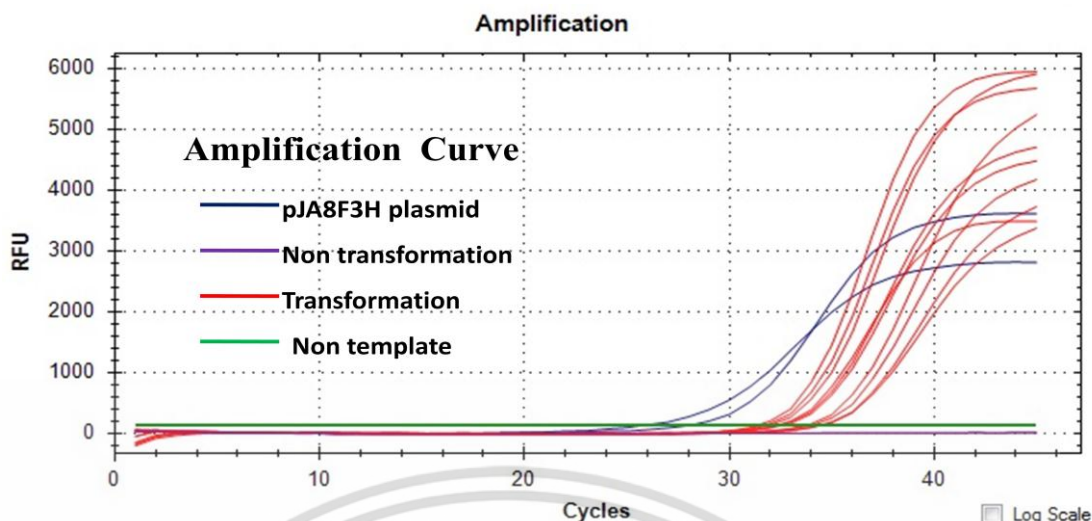


ภาพที่ 4.18 Amplification Curve (ครั้งที่ 2) ที่แสดงความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณของยีน *F3H* กับจำนวนรอบ Crossing point (Cp) ในบัวหลวงพันธุ์มณฑกริก เส้นกราฟสีน้ำเงิน คือพลาสมิด pJA8F3H สีม่วง คือต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด เส้นสีแดง คือต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด และเส้นสีเขียว คือ non-template control (NCT-1)

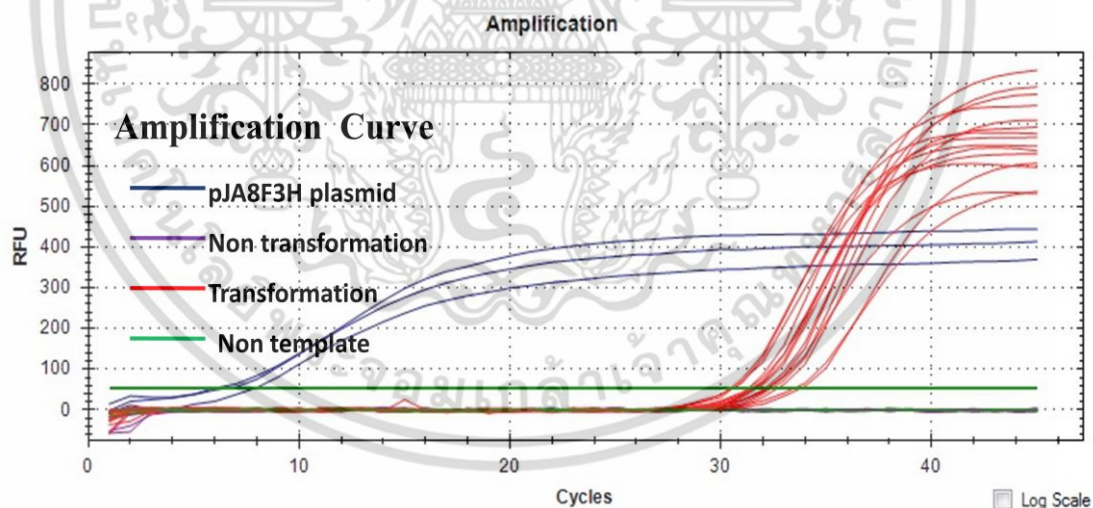
#### 4.7.2.3 ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *bar* ด้วยเทคนิค Real time PCR

ผลของการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *bar* ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *bar* คือ ไพรเมอร์ *bar* gene F, *bar* gene R ได้ DNA ขนาดประมาณ 430 คู่เบส ทำการตรวจสอบ ครั้งที่ 1 ผลปรากฏในตาราง Crossing point (Cp) (ตารางที่ 4.14) พบว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด คือ control 1/1 ไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน ส่วนต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดต้นที่ 1/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 31.50 รอบ ต้นที่ 2/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 34.45 รอบ ต้นที่ 3/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 33.20 รอบ ต้นที่ 4/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 32.84 รอบ และต้นที่ 5/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 32.50 รอบ (ภาพที่ 4.19)

ตรวจสอบการแสดงออกของยีนครั้งที่ 2 พบว่า พลาสมิด pJA8F3H (Positive Ctrl-1) สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน มีค่า Cp เฉลี่ย 6.63 รอบ ต่อมาเป็นต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด คือต้นที่ 1 control 1/1 ต้นที่ 2 control 2/1 และต้นที่ 3 control 3/1 ทั้ง 3 ต้นไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน ส่วนต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด ต้นที่ 1/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 32.02 รอบ ต้นที่ 2/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 30.44 รอบ ต้นที่ 3/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 33.39 รอบ ต้นที่ 4/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 31.92 รอบ และต้นที่ 5/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 31.46 รอบ non-template control (NCT-1) คือหลอดที่ไม่ได้ใส่ cDNA template ไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน (ตารางที่ 4.14, ภาพที่ 4.20)



ภาพที่ 4.19 Amplification Curve (ครั้งที่ 1) ที่แสดงความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณของยีน *bar* กับจำนวนรอบ Crossing point (Cp) ในบัวหลวงพันธุ์อนุชกริก เส้นกราฟสีน้ำเงิน คือพลาสมิด pJA8F3H สีม่วง คือต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด เส้นสีแดง คือต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด และเส้นสีเขียว คือ non-template control (NCT-1)



ภาพที่ 4.20 Amplification Curve (ครั้งที่ 2) ที่แสดงความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณของยีน *bar* กับจำนวนรอบ Crossing point (Cp) ในบัวหลวงพันธุ์อนุชกริก เส้นกราฟสีน้ำเงิน คือพลาสมิด pJA8F3H สีม่วง คือต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด เส้นสีแดง คือต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด และเส้นสีเขียว คือ non-template control (NCT-1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 จำนวนรอบ Crossing point (Cp) ปฏิบัติการที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน *bar* ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ทำการตรวจสอบ ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2

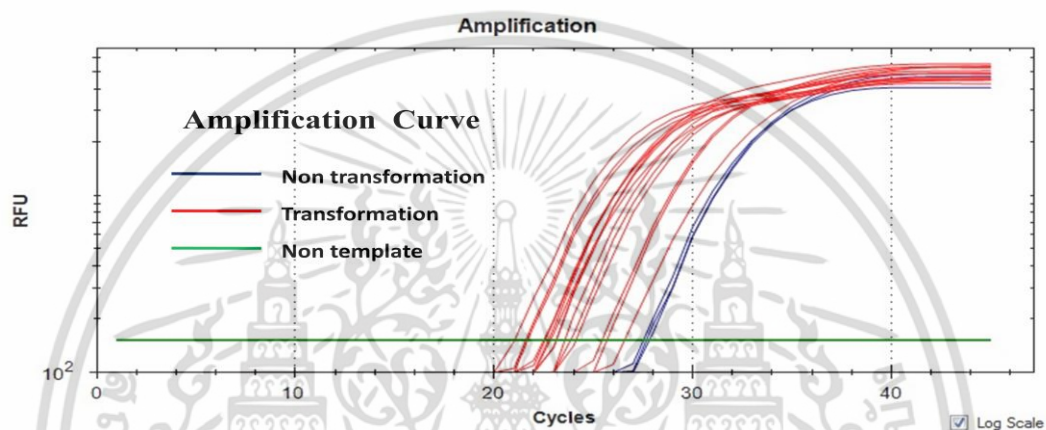
ตัวอย่าง	จำนวนรอบ (Cp) 1	จำนวนรอบเฉลี่ย (Cp)	จำนวนรอบ (Cp)	จำนวนรอบเฉลี่ย (Cp)
pJA8F3H	25.85 28.10	26.97	7.78 5.83 6.29	6.63
control 1/1	00.00 00.00	00.00	00.00 00.00 00.00	00.00
control 2/1			00.00 00.00 00.00	00.00
control 3/1			00.00 00.00 00.00	00.00
ต้นที่ 1/1	31.63 31.38	31.50	32.62 32.05 31.39	32.02
ต้นที่ 2/1	34.50 34.40	34.45	30.46 30.51 30.36	30.44
ต้นที่ 3/1	32.36 34.05	33.20	32.17 33.39 33.71	33.39
ต้นที่ 4/1	33.73 31.95	32.84	32.34 32.17 31.27	31.92
ต้นที่ 5/1	32.39 32.62	32.50	31.50 31.23 31.65	31.46
NTC-1	00.00 00.00	00.00	00.00 00.00 00.00	00.00

#### 4.7.2.4 ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ด้วยเทคนิค Real time PCR

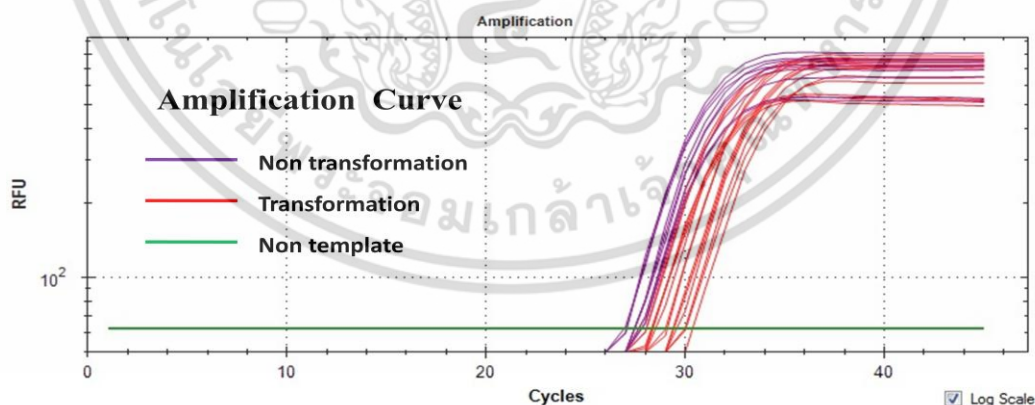
ผลของการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *CHS* ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *CHS* คือ ไพรเมอร์ CHSA forward, CHSA reverse ได้ DNA ขนาดประมาณ 450 คู่เบส ทำการตรวจสอบ ครั้งที่ 1 ผลปรากฏในตาราง Crossing point (Cp) (ตารางที่ 4.15) พบว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด คือ control 1/1 สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน มีค่า Cp เฉลี่ย 27.62 รอบ ส่วนต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดต้นที่ 1/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 21.40 รอบ ต้นที่ 2/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 23.81 รอบ ต้นที่ 3/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 22.96 รอบ ต้นที่ 4/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 25.84 รอบ และต้นที่ 5/1 มีค่า Cp เฉลี่ย 22.58 รอบ (ภาพที่ 4.21)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจสอบการแสดงออกของยีนครั้งที่ 2 พบว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด คือต้นที่ 1 control 1/1 สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน มีค่า  $C_p$  เฉลี่ย 27.64 รอบ ต้นที่ 2 control 2/1 มีค่า  $C_p$  เฉลี่ย 27.02 รอบ และต้นที่ 3 control 3/1 มีค่า  $C_p$  เฉลี่ย 27.73 รอบ ส่วนต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดต้นที่ 1/1 มีค่า  $C_p$  เฉลี่ย 27.96 รอบ ต้นที่ 2/1 มีค่า  $C_p$  เฉลี่ย 30.12 รอบ ต้นที่ 3/1 มีค่า  $C_p$  เฉลี่ย 28.29 รอบ ต้นที่ 4/1 มีค่า  $C_p$  เฉลี่ย 28.91 รอบ และต้นที่ 5/1 มีค่า  $C_p$  เฉลี่ย 29.54 รอบ non-template control (NCT-1) คือหลอดที่ไม่ได้ใส่ cDNA template ไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน (ตารางที่ 4.15, ภาพที่ 4.22)



ภาพที่ 4.21 Amplification Curve (ครั้งที่ 1) ที่แสดงความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณของยีน *CHS* กับจำนวนรอบ Crossing point ( $C_p$ ) ในบัวหลวงพันธุ์มณฑริก เส้นกราฟสีน้ำเงิน คือต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด เส้นสีแดง คือต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด และเส้นสีเขียว คือ non-template control (NCT-1)



ภาพที่ 4.22 Amplification Curve (ครั้งที่ 2) ที่แสดงความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณของยีน *CHS* กับจำนวนรอบ Crossing point ( $C_p$ ) ในบัวหลวงพันธุ์มณฑริก เส้นกราฟสีม่วง คือต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด เส้นสีแดง คือต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด และเส้นสีเขียว คือ non-template control (NCT-1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.15 จำนวนรอบ Crossing point (Cp) ปฏิบัติการที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน *CHS* ใน บัวหลวงพันธุ์มณฑริกโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ทำการตรวจสอบ ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2

ตัวอย่าง	จำนวนรอบ (Cp) 1	จำนวนรอบเฉลี่ย (Cp) 1	จำนวนรอบ (Cp) 2	จำนวนรอบเฉลี่ย (Cp) 2
control 1/1	27.45	27.62	27.87	27.64
	27.60		27.52	
	27.82		27.53	
control 2/1			27.05	27.02
			26.98	
			27.04	
control 3/1			27.79	27.73
			27.48	
			27.92	
ต้นที่ 1/1	21.64	21.40	28.04	27.96
	21.03		27.82	
	21.54		28.04	
ต้นที่ 2/1	23.48	23.81	30.03	30.12
	23.87		30.00	
	24.09		30.33	
ต้นที่ 3/1	22.68	22.96	28.33	28.29
	23.10		28.29	
	23.10		28.26	
ต้นที่ 4/1	25.65	25.84	29.01	28.91
	25.37		29.08	
	26.51		28.65	
ต้นที่ 5/1	22.50	22.58	29.42	29.54
	22.44		29.70	
	22.81		29.50	
NTC-1	00.00	00.00	00.00	00.00
	00.00		00.00	

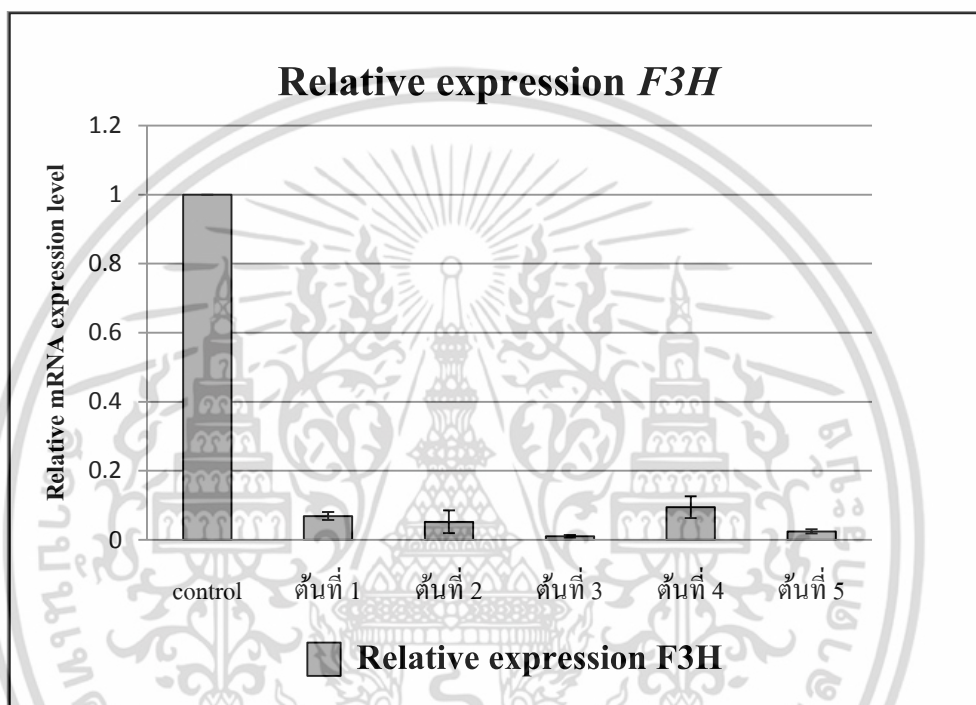
#### 4.7.3 ผลการคำนวณค่าการแสดงออกของยีน *F3H* (Relative gene expression ) โดยใช้ ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง ด้วยเทคนิค Real time PCR

จากผลเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน โดยดูจากกราฟ Amplification Curve ที่ แสดงความสัมพันธ์ในการเพิ่มปริมาณของยีน *F3H* กับจำนวนรอบ Crossing point (Cp) ในบัวหลวงพันธุ์มณฑริก จากนั้นนำค่าจำนวนรอบ Crossing point (Cp) ของยีน *F3H* มาคำนวณหาค่าการแสดงออกของยีน *F3H* (Relative gene expression) โดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง ตามวิธีของ Livak and Schmittgen. (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.7.3.1 ผลการคำนวณค่าการแสดงออกของยีน *F3H* ครั้งที่ 1

ผลการคำนวณค่าการแสดงออกของยีน *F3H* มีระดับการแสดงออกที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด (control) ซึ่งมีค่าการแสดงออกของยีนเท่ากับ 1 ส่วนต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด ต้นที่ 1/1 มีค่าการแสดงออกของยีน 0.068, ต้นที่ 2/1 มีค่าการแสดงออกของยีน 0.052, ต้นที่ 3/1 มีค่าการแสดงออกของยีน 0.010, ต้นที่ 4/1 มีค่าการแสดงออกของยีน 0.094 และต้นที่ 5/1 มีค่าการแสดงออกของยีน 0.024 (ภาพที่ 4.23)

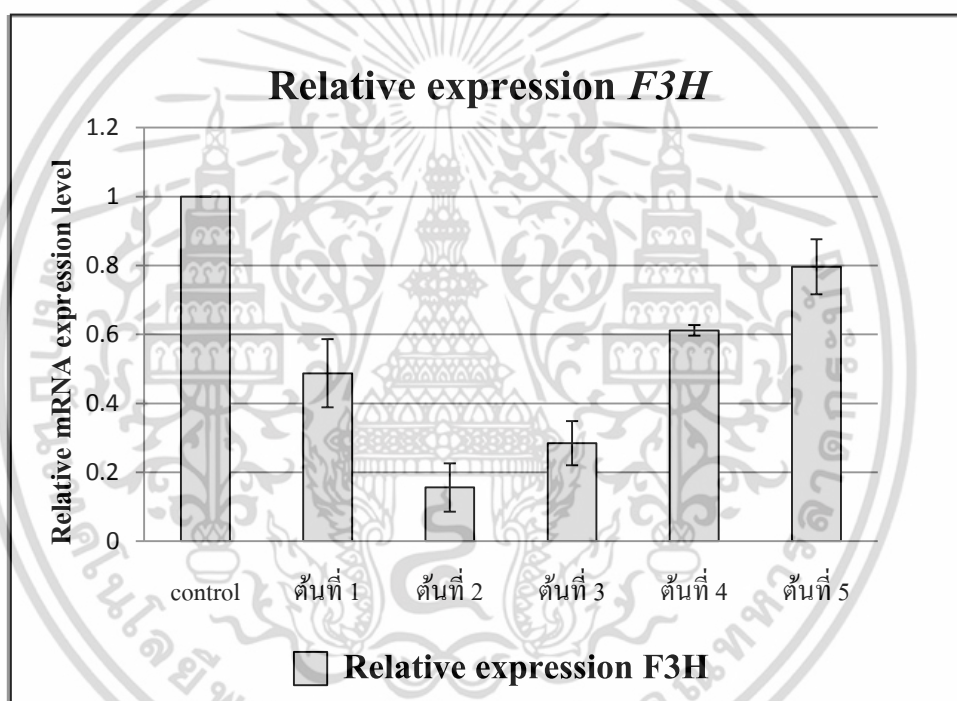


ตัวอย่าง	Relative expression <i>F3H</i>	SD
control	1	0
ต้นที่ 1	0.068	0.011
ต้นที่ 2	0.052	0.033
ต้นที่ 3	0.010	0.003
ต้นที่ 4	0.094	0.031
ต้นที่ 5	0.024	0.006

ภาพที่ 4.23 ค่าการแสดงออกของยีน *F3H* (Relative gene expression) โดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง (ครั้งที่ 1) ประกอบด้วยต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด (control) และต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด ได้แก่ ต้นที่ 1-5 (ภาคผนวกที่ 3.4)

#### 4.7.3.2 ผลการคำนวณค่าการแสดงออกของยีน *F3H* ครั้งที่ 2

ภายหลังกการคำนวณค่าการแสดงออกของยีนครั้งที่ 1 เพื่อเป็นการยืนยันผลการแสดงออกของยีน นำบัวหลวงพันธุ์มณฑริก มาคำนวณค่าการแสดงออกของยีนครั้งที่ 2 ผลการคำนวณค่าการแสดงออกของยีน *F3H* ยังมีระดับการแสดงออกที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด (control) ซึ่งมีค่าการแสดงออกของยีนเท่ากับ 1 ส่วนต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด ต้นที่ 1/1 มีค่าการแสดงออกของยีน 0.487, ต้นที่ 2/1 มีค่าการแสดงออกของยีน 0.155, ต้นที่ 3/1 มีค่าการแสดงออกของยีน 0.284, ต้นที่ 4/1 มีค่าการแสดงออกของยีน 0.611 และ ต้นที่ 5/1 มีค่าการแสดงออกของยีน 0.796 (ภาพที่ 4.24)



ตัวอย่าง	Relative expression <i>F3H</i>	SD
control	1	0
ต้นที่ 1	0.487	0.098
ต้นที่ 2	0.155	0.070
ต้นที่ 3	0.284	0.064
ต้นที่ 4	0.611	0.015
ต้นที่ 5	0.796	0.080

ภาพที่ 4.24 ค่าการแสดงออกของยีน *F3H* (Relative gene expression) โดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง (ครั้งที่ 2) ประกอบด้วยต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด (control) และต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด ได้แก่ ต้นที่ 1-5 (ภาคผนวกที่ 3.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### วิจารณ์ผลการทดลอง

#### 5.1 การศึกษาหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช basta (glufosinate amonium) เพื่อใช้ในการคัดเลือก ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน

การศึกษาหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช basta (glufosinate amonium) เพื่อใช้ในการคัดเลือกชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์กริกที่ที่ได้รับการถ่ายยีน พบว่าความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช basta ที่ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ multiple shoot ของบัวหลวงตายภายใน 8 สัปดาห์ สารกำจัดวัชพืช basta เป็นสารปราบวัชพืชที่นิยมนำมาใช้คัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *glutamine synthase* ซึ่งปกติพืชจะเปลี่ยน *glutamate* เป็น *glutamine* ด้วยเอนไซม์ *phosphinothricin* ทำให้เอนไซม์รวมตัวกับ *glutamate* ไม่ได้จึงเกิดการสะสมของเอนไซม์ ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์พืช (Bai and Qu, 2001; พงมาลย์ สุรนิลพงศ์ และคณะ, 2554) ซึ่งในการหาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะในบัวหลวงมีรายงานของ วิลาสินี ลิทวิทรพ์ (2554) และรวีวธู บัวทอง (2554) ได้ทำการถ่ายยีน antisense *DFR* เข้าสู่บัวหลวง และใช้สารคัดเลือกเป็นสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ระยะเวลาคัดเลือก 16 สัปดาห์ และ ปฤษฎาภรณ์ อะโน (2557) ได้ทำการถ่ายยีน *chalcone synthase (CHS)* เข้าสู่บัวหลวง และใช้สารคัดเลือกเป็นสารปฏิชีวนะ hygromycin ที่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ระยะเวลาคัดเลือก 8 สัปดาห์ ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการใช้สารกำจัดวัชพืช basta ในการคัดเลือกชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงพันธุ์กริกภายหลังการถ่ายยีนมาก่อน แต่ก็ได้มีการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช basta ในพืชชนิดอื่นๆ ได้แก่ในกล้วย (Pisang Rastali AAB) เลี้ยงในอาหาร MS-solid ที่เติมสารกำจัดวัชพืช basta ความเข้มข้น 15-20 มิลลิกรัมต่อลิตร (Sreeramanan *et al.* 2006) ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (*Dumaliella salina*) สามารถต้านทานสารกำจัดวัชพืช basta ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (Tan *et al.* 2005) ในต้นข้าว (*Oryza sativa* L. ssp.) ได้ใช้สารกำจัดวัชพืช basta ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Dedicova *et al.* 2015) และในกะหล่ำปลี (*Brassica oleracea* var.) สามารถต้านทานสารกำจัดวัชพืช basta ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (Christey *et al.* 1999) จะเห็นได้ว่าการใช้สารกำจัดวัชพืช basta ในพืชชนิดอื่นใช้ความเข้มข้น 10-25 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ชิ้นส่วนบัวหลวงตายภายในเวลา 8 สัปดาห์

## 5.2 การศึกษาหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ augmentin (amoxicillin) ที่ใช้ในการกำจัดอะโกราแบคทีเรียของบัวหลวงภายหลังการถ่ายยีน

การศึกษาค้นหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ใช้ในการกำจัดอะโกราแบคทีเรีย เพื่อใช้คัดเลือก multiple shoot ของบัวหลวงภายหลังการถ่ายยีน และพบว่าความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ทำให้ขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวง มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนน้อยที่สุด 75 เปอร์เซ็นต์ พบว่าขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงมีการปนเปื้อนอาจมีสาเหตุมาจากการเสื่อมประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลานาน สอดคล้องกับงานวิจัยของ สุภาภรณ์ เอี่ยมแข่ง และคณะ (2547) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ augmentin ในการกำจัดเชื้ออะโกราแบคทีเรียหลังการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ พบว่าที่ความเข้มข้นที่ 300-500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ ไม่มีผลต่อการชักนำการเกิดแคลลัส และการเกิดยอด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสารปฏิชีวนะ augmentin มีเสถียรภาพและประสิทธิภาพต่ำลงเมื่อเตรียมเป็น stock solution และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ขึ้นไป ในการศึกษาการใช้สารปฏิชีวนะ augmentin ใช้กำจัดอะโกราแบคทีเรียในพืชอื่น พบว่าระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วง 300-500 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่น ในต้นถั่วฝรั่ง (*Medicago truncatula*) เลี้ยงในอาหารแข็ง CIM medium ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ augmentin ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถต้านทานต่อเชื้ออะโกราแบคทีเรีย สายพันธุ์ LBA4404 (Chabaud *et al.* 2007) ในต้นโกศจุฬาลัมพา (*Artemisia annua* L.) ใช้ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะ augmentin ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการกำจัดเชื้ออะโกราแบคทีเรีย สายพันธุ์ C58C1 (Vergauwe *et al.* 1996) ในต้นยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camaldulensis*) ได้ใช้สารปฏิชีวนะ augmentin กำจัดเชื้ออะโกราแบคทีเรีย สายพันธุ์ C58C1 ที่ระดับความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร (Quisen *et al.* 2009) และในต้นเมล่อน ใช้กำจัดอะโกราแบคทีเรีย สายพันธุ์ C58C1 โดยเลี้ยงในอาหาร embryo-induction (EI) ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ augmentin ความเข้มข้น 375 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่า 83.3 เปอร์เซ็นต์ สามารถเจริญเป็นต้นได้ (Kennedy *et al.* 2003) และได้มีการรายงานการใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ในบัวหลวงมาแล้วในงานวิจัยของ วรวิฑูลี เอื้อมงคลการ (2556) ทำการถ่ายยีน *chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT)* เข้าสู่บัวหลวงโดยใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ใช้ความเข้มข้นคือ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไม่สามารถกำจัดเชื้ออะโกราแบคทีเรียของต้นบัวหลวงภายหลังการถ่ายยีนได้

### 5.3 การถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงโดยใช้อะโกราแบคทีเรียเป็นพาหะ และเครื่องยิงอนุภาค (particle gun bombardment)

การถ่ายโอนพลาสมิด pJA8F3H เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุนนาคโดยใช้อะโกราแบคทีเรีย พบว่าทั้ง 3 ครั้ง ดันที่ได้ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ในอาหารคัดเลือก ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น ระยะเวลาในการ cocultivation แสง ความเข้มข้นของ acetosyringon สายพันธุ์ของเชื้อ และชิ้นส่วนเริ่มต้น ซึ่งพืชแต่ละชนิดมีเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการถ่ายยีนแตกต่างกัน (Nandakumar *et al.* 2004) แต่อย่างไรก็ตามไม่ควรใช้เนื้อเยื่อที่มีชอกมูม หรือมีขนาดเล็กมาก เพราะวิธีการถ่ายยีนโดยใช้อะโกราแบคทีเรียเป็นพาหะ จำเป็นต้องทำบาดแผลให้กับเนื้อเยื่อเป้าหมาย และต้องกำจัดเชื้อออกจากเนื้อเยื่อภายหลังการถ่ายยีน ซึ่งเนื้อเยื่อที่มีขนาดเล็กทำให้เกิดการบอบช้ำได้ง่าย และเนื้อเยื่อที่มีชอกมูมมากทำให้การกำจัดเชื้ออะโกราแบคทีเรียออกภายหลังทำได้ยาก (สนธิชัย จันท์เปรม. 2549) สายพันธุ์ของเชื้ออะโกราแบคทีเรียเป็นอีกปัจจัยที่มีความสำคัญมาก ซึ่งเชื้ออะโกราแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการส่งถ่าย DNA ที่แตกต่างกัน จากงานวิจัยของ Lee *et al.* (2006) ได้ทำการทดสอบเชื้ออะโกราแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ EHA105, GV3101 และ LBA4404 เพื่อที่จะหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุดในการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ของหญ้า Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* พบสายพันธุ์ EHA105 มีการแสดงออกของยีน *GUS* มากที่สุด Riva *et al.* (1998) ได้อธิบายถึงสาเหตุที่พืชเมื่อได้รับการถ่ายยีนโดยเชื้ออะโกราแบคทีเรียแล้วไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ในอาหารคัดเลือก มีสาเหตุมาจากการแทรกตัวของ T-DNA ซึ่งมียีนที่กำหนดการสังเคราะห์ฮอร์โมนในกลุ่มของออกซิน และไซโตไคนิน เข้าไปในจีโนมของพืช ส่งผลให้พืชมีการเจริญอย่างรวดเร็ว แต่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากได้ และปัญหาสำคัญมากคือในเรื่องของการปนเปื้อน ส่วนใหญ่ปัญหาของการปนเปื้อนมาจากการถ่ายยีนโดยใช้อะโกราแบคทีเรียเป็นพาหะ ซึ่งมีความยุ่งยากมากในการกำจัด แต่การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาคจะสามารถลดปัญหาด้านการปนเปื้อนภายหลังการถ่ายยีนได้ (Latham *et al.* 2005) และการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค โดยสามารถถ่ายยีนได้มากกว่าหนึ่งยีนไปพร้อมกัน และไม่มีข้อกำหนดด้านขนาดของเวกเตอร์ (Altpeter *et al.* 2005) ดังนั้นด้วยสาเหตุและปัญหาต่างๆ ในการถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวงโดยใช้อะโกราแบคทีเรียเป็นพาหะ ไม่ค่อยจะประสบความสำเร็จ จึงได้เปลี่ยนวิธีการถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาคตามวิธีของ (Buathong *et al.* 2013) โดยใช้ระยะห่างในการยิง 9 เซนติเมตร และแรงดันของก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ได้ต้นบัวหลวงที่มีความสมบูรณ์และสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ในอาหารคัดเลือก จำนวนทั้งหมด 5 ต้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pettillo *et al.* (2008) ทำการถ่ายโอนพลาสมิด pCAMBIA 3301 เข้าสู่เอ็มบริโอของข้าวโพด (*Zea mays*) ใช้แรงดันของก๊าซฮีเลียม 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และทำการทดสอบหาระยะห่างในการยิงที่ 9 เซนติเมตร สามารถตรวจสอบการ

แสดงออกของยีน *GUS* มากที่สุด 56.73 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับกับงานวิจัยของ สุนทรียา กาละวงศ์ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2553) ทำการหาระยะห่างในการยิงที่เหมาะสมกับ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq) พบว่าระยะห่างในการยิงกับเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ 9 เซนติเมตร ให้การแสดงออกของยีน *GUS* ดีที่สุด 62.33 เปอร์เซ็นต์

#### 5.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* bar และ *CHS* ในบัวหลวงพันธุ์อนุกรมทริกภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* โดยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

บัวหลวงพันธุ์อนุกรมทริกที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* มีการแสดงออกที่ลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากการยับยั้งการแสดงออกด้วยเทคนิค RNAi โดยเวกเตอร์ pJA8*F3H* เป็นเวกเตอร์ที่สามารถสร้าง RNA รูปแบบ inverted repeat เมื่อทำการถ่ายโอนยีน *F3H* เข้าสู่พืช จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi ยับยั้งแสดงออกของยีน *F3H* ในพืช (gene silencing) โดยทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมของยีน *F3H* มีผลไปขัดขวางการสังเคราะห์สารกลุ่มแอนโทไซยานิน (พัชร บุญศิริ และคณะ. 2551) สอดคล้องกับงานวิจัยของ ชัยวรกุล ไชยปัญญา (2555) ได้ศึกษาหน้าที่ของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi โดยการถ่ายยีนเข้ากลีบดอกอุบลชาติ ลูกผสม PW5409 hybrid และอุบลชาติแสดงชัยพล ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ ภายหลังจากถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วัน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสีในกลีบดอกอุบลชาติทั้ง 2 ชนิด แต่ในกลีบดอกอุบลชาติที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 (control) มีปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* มากที่สุด และพบว่าการแสดงออกของยีน *F3H* ลดลงในเนื้อเยื่อกลีบดอกอุบลชาติที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJA8*F3H* สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nakatsuka *et al.* (2007) ได้ทำการถ่ายยีน *flavonal synthase* (*FLS*) และยีน *flavanone 3-hydroxylase* (*F3H*) ในรูปแบบของ RNAi เพื่อยับยั้งการแสดงออก และถ่ายยีน *Dihydroflavonol 4-reductase* (*DFR*) จากต้นเยอบีร่าในรูปแบบของการเพิ่มการแสดงออก เข้าสู่ต้นยาสูบ (*Nicotina tobaccum*) โดยใช้อะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 ตรวจสอบโดยวิธี northern blot พบว่ายีน *FLS* และยีน *F3H* มีการแสดงออกที่ลดลง และพบว่ายีน *DFR* ที่ได้จากต้นเยอบีร่ามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ดอกของต้นยาสูบเปลี่ยนจากสีชมพูอ่อนเป็นสีแดง ซึ่งเกิดจากการสะสมของสาร pelargonidin เป็นสารในกลุ่มโทนสี ส้ม-แดง เพิ่มมากขึ้นในต้นที่ได้รับการถ่ายยีน และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tsuda *et al.* (2004) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนในต้นพิทูเนีย (*Petunia hybrida*) เพื่อให้ได้ดอกสีส้ม โดยทำการถ่ายยีน *F3H* ในรูปแบบของ RNAi และยีน *DFR* จากต้นกุหลาบ โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ พบว่าเมื่อทำการถ่ายยีน *F3H* ในรูปแบบยับยั้งการแสดงออกเพียงยีนเดียว ดอกพิทูเนียกลายเป็นสีขาว หลังจากนั้นทำการถ่ายยีน *F3H* ในรูปแบบยับยั้งการแสดงออกพร้อมด้วย *DFR* ในรูปแบบเพิ่มการแสดงออก พบว่าดอกพิทูเนียเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง เกิดจากการสะสมของสาร pelargonidin ภายหลังจากถ่ายยีน *DFR* เข้าไปในต้นที่ได้รับการถ่ายยีน จากผลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi ในต้นบัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ขึ้นต้นการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลวง ต้นยาสูบ และต้นพิทูเนีย ภายหลังจากทดสอบด้วยวิธี RT-PCR พืชทั้ง 3 ชนิด ให้ผลไปในแนวทางที่สอดคล้องกัน ผลการทดลองได้แสดงว่ายีน *F3H* มีการแสดงออกที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งบ่งบอกได้ว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *bar* จำนวนทั้งหมด 5 ต้น มีเพียง 1 ต้นที่พบการแสดงออกของยีน *bar* อาจมาจากสาเหตุในช่วงเวลาที่เพาะเลี้ยงต้นบัวหลวงเมื่อย้ายจากอาหารคัดเลือก มาอยู่ในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ต้นบัวหลวงมีการเจริญอย่างรวดเร็ว และจำเป็นต้องทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ มีการตัดแต่งต้นบัวหลวงให้เหมาะสม ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ใหม่ เนื้อเยื่อของบัวหลวงที่แตกออกมาใหม่เกิดจากเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่าย จึงพบยีนที่ถ่ายเข้าไปเพียงต้นเดียว และเมื่อเวลาผ่านไปมีการขยายพันธุ์เพิ่มมากขึ้นต้นที่ตรวจพบ เมื่อนำมาทำการตรวจสอบใหม่อาจไม่พบการแสดงออกของยีน (Tardif *et al.* 1985) หรือเกิดจากสาเหตุที่ยีนที่ถ่ายเข้าไปบางส่วนอาจขาดหายไปในระหว่างนั้น เนื่องจากทิศทางการส่งถ่ายจะเริ่มจากขอบเขตทางด้านขวา Right Border (RB) เป็นส่วนที่จำเป็นมากสำหรับการส่ง T-DNA ส่วนขอบเขตทางด้านซ้าย Left Border (LB) ทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดปลายของชิ้น DNA ที่จะส่งเท่านั้น (Lee and Gelvin, 2008) ซึ่งในเวกเตอร์ pJA8*F3H* ที่ถูกควบคุมด้วย CaMV 35s promoter และ CaMV 35s terminator มียีนคัดเลือกในพืชคือ *phosphinothricin acetyl transferrase* (*bar* gene) อยู่ทางด้านซ้าย Left Border (LB) ของเวกเตอร์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ กาญจนา แซ่เฮียบ (2551) ได้ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้เหลืองจันทร์ โดยใช้อะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301 ซึ่งมียีน *GUS* เป็นยีนรายงานผล และยีน *hpt* เป็นยีนคัดเลือก ผลการตรวจสอบการส่งถ่ายยีนโดยวิธี RT-PCR ไม่พบการแสดงออกของยีน *GUS* และยีน *hpt*

จากผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi และทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CHS* จากใบของบัวหลวงอาจมีการแสดงออกของยีน *CHS* ที่ไม่แตกต่างกัน สอดคล้องงานวิจัยของ วรวิทย์ เอื้อมงคลการ (2556) ศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ภายหลังจากถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT* เข้าสู่ multiple shoot ของบัวหลวง นำใบจากต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT* ด้วยวิธีการยิงอนุภาคมาสกัด RNA และทำการสังเคราะห์ cDNA เพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบในปฏิกิริยา RT-PCR พบการแสดงออกของยีน *CHS* ในตัวอย่าง cDNA จากใบบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนและไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT* โดยการแสดงออกของยีน *CHS* นั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT*

### 5.5 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H* bar และ *CHS* และผลการคำนวณค่าการแสดงออกของยีน *F3H* (Relative gene expression) ด้วยเทคนิค Real time PCR ภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด

การแสดงออกของยีน *F3H* ในบัวหลวงพันธุ์มณฑกริกภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด ซึ่งพบว่าได้ค่าเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกทั้ง 2 ครั้ง ระหว่างต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด มีจำนวนรอบ Crossing point (Cp) เฉลี่ยสูงกว่าต้นไม่ได้รับการถ่ายโอน ซึ่งเป็นที่ยืนยันได้ว่าการถ่ายยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ในบัวหลวงพันธุ์มณฑกริกได้ และการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *CHS* พบว่าต้นที่ได้รับและไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด มีค่า Cp เฉลี่ยใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *CHS* เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน โดยวิธี RT-PCR ทั้งต้นบัวหลวงที่ไม่ได้ และต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด มีความเข้มของแถบ DNA ไม่แตกต่างกัน และสอดคล้องกับงานวิจัยของ ชัยวรกุล ไชยปัญญา (2555) ศึกษาหน้าที่ของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi โดยการถ่ายยีนใน กลีบดอกอุบลชาติ ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ ถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 (control) และ โอนเวกเตอร์ pJA8*F3H* ภายหลังจากการถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CHS* ในเนื้อเยื่อกลีบดอกอุบลชาติทั้งที่ไม่ได้รับและได้รับการถ่ายยีน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ในเนื้อเยื่อกลีบดอกของอุบลชาติทั้ง 2 ชนิด

ผลการคำนวณค่าการแสดงออกของยีน *F3H* ครั้งที่ 1 มีค่าการแสดงออกของยีน *F3H* ที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด (control) ส่วนต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเฉลี่ยทั้ง 5 ต้น มีค่าการแสดงออกของยีน 0.0496 เท่า คำนวณค่าการแสดงออกของยีน *F3H* ครั้งที่ 2 พบว่าในต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเฉลี่ยทั้ง 5 ต้น มีค่าการแสดงออกของยีน 0.466 เท่า เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าการแสดงออกของยีนในต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดระหว่างค่าการแสดงออกของยีน *F3H* ทั้ง 2 ครั้ง พบว่าค่าการแสดงออกของยีน *F3H* ครั้งที่ 2 มีค่าการแสดงออกของยีนเฉลี่ยมากกว่า ครั้งที่ 1 ถึง 0.419 เท่า เป็นเพราะการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi มีค่าการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน เนื่องจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ห่างกันเป็นเวลาถึง 10 เดือน มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงใหม่ และมีการตัดแต่งต้นบัวหลวงให้เหมาะสม ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ใหม่ เนื้อเยื่อของบัวหลวงที่แตกออกมาใหม่เกิดจากเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน จึงทำให้ประสิทธิภาพของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi เมื่อเวลาผ่านไปทำให้ความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ลดลง สอดคล้องกับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* โดยวิธี RT-PCR และวิธี Real Time PCR โดยดูค่าการเพิ่มปริมาณของยีนกับจำนวนรอบ Crossing point (Cp) ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด มีจำนวนรอบของปฏิกิริยา (Cp) เฉลี่ยสูงกว่าต้นไม่ได้รับการถ่ายยีน

## บทที่ 6

### สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาค้นคว้าหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช basta เพื่อใช้ในการคัดเลือกและศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ใช้กำจัดอะโกราแบคทีเรียขึ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงภายหลังการถ่ายยีน ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช basta 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ augmentin คับความเข้มข้นที่ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน  $75.00 \pm 4.75$  เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต  $90.00 \pm 5.50$  เปอร์เซ็นต์

ผลการตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H bar* และ *CHS* ด้วยเทคนิค RT-PCR การแสดงออกของยีน *F3H* ในบัวหลวงต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดมีการแสดงออกที่ลดลง การแสดงออกของยีน *bar* ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนโอนพลาสมิดพบเพียง 1 ต้น จากต้นที่ได้รับการถ่ายยีน 5 ต้น และการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CHS* ยังคงเดิมไม่มีความแตกต่าง เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

ผลของการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H bar* และ *CHS* ด้วยเทคนิค Real time PCR ทำการตรวจสอบ ทั้ง 2 ครั้ง (ห่างกัน 10 เดือน) การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H* พบการแสดงออกของยีน *F3H* ในต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีการแสดงออกที่ลดลงจากค่า  $C_p$  ที่สูงขึ้น การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *bar* พบเฉพาะต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด และการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *CHS* ต้นที่ไม่ได้รับ และต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนมีค่า  $C_p$  ที่ใกล้เคียงกัน ผลการคำนวณค่าการแสดงออกของยีน *F3H* ในต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด 5 ต้น ค่าการแสดงออก 0.0496 เท่า และ 0.466 เท่า ตามลำดับ พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีนลดลงเมื่อต้นถูกเลี้ยงเป็นเวลานาน

## บรรณานุกรม

- กาญจนา แซ่เสียบ. 2551. “การปลูกถ่ายยีนในกล้วยไม้หวายเหลืองจันทบูรโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย.”  
 วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2547. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ. กระทรวงสาธารณสุข  
 กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข.
- กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2553. แอนโทไซยานิน. กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กรุงเทพฯ:  
 สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.
- คณิตา เลขะกุล. 2535. “บัว ราจีนี่แห่งไม้น้ำ”: มุลนิธิสวนหลวง ร. 9. กรุงเทพมหานคร.
- ชัยวรกุล ไชยปัญญา. 2555. “การโคลนยีน flavanone 3-hydroxylase (*F3H*) จากปทุมชาติ  
 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) และอุบลชาติ (*Nymphaea* spp.) และการสร้าง DNA สายผสม  
 เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNA interference.” วิทยานิพนธ์วิทยา  
 ศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบัน  
 เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ตรีทิพย์ รัตนวรชัย. 2552. อนุพันธุศาสตร์เบื้องต้น มหัศจรรย์ DNA. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ:  
 สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 301 หน้า.
- นิสารัตน์ ศิริวัฒนเมธานนท์. 2526. “สารเคมีที่มีประโยชน์จากผักผลไม้สีม่วงและสีน้ำเงิน.”  
 กรุงเทพฯ : ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- ปฤษฎางค์ อะโน. 2557. “การถ่ายยีน *chalcone synthase* (*CHS*) แบบ antisense เข้าสู่บัวหลวง  
 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) ด้วยวิธียิงอนุภาค.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขา  
 เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ  
 ทหารลาดกระบัง.
- พจนมาลย์ สุรนิลพงศ์, สุภาวดี ถาวรโร และสมปอง เตชะโต. 2554. “ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการถ่าย  
 ยีนเข้าสู่ปาล์มน้ำมัน.” วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 39(2): 72-77.
- พัชรี บุญศิริ, เปรมใจ อารีจิตรานุสรณ์, อุบล ชาอ่อน และปิติ ชูจิตต์. 2551. ตำราชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่  
 5. ขอนแก่น : โรงพิมพ์คลังน่านวิทยา. 544 หน้า.
- พรชนก ต้นประคู้ และพัฒนา ศรีฟ้า. 2555. “การโคลนยีนควบคุมการสร้างแอนโทไซยานิน  
 จากดอกกล้วยไม้ลูกผสมแวนด้า.” ใน การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
 ครั้งที่ 49. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.  
 หน้า 59-66.
- รวีรัฐ บัวทอง. 2554. “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยีน antisense ของ dihydroflavonol 4-  
 reductase (*DFR*) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยวิธียิงอนุภาค.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร  
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มหบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วงศ์ขวัญ จิตนุพงศ์, สุนันทา รุ่งมี, เนาวรัตน์ เพ็ญจันทร์ และวนิดา ถลุงเรือง. 2555. “การตรวจหาเชื้อสุกร โคยวิธี Real time PCR.” ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 กรุงเทพฯ : คณะเกษตร.

วิเศษฐ คำสุวรรณ. 2535. การปลูกบัว. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช. 54 หน้า.

วิเศษฐ คำสุวรรณ. 2551. เทคนิคการปลูกบัว. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์คลื่นอักษร. 160 หน้า.

วีระพงศ์ ลูติตานนท์ และนิภาภรณ์ แสนคุณท้าว. 2551. “พื้นฐานเทคนิค Polymerase Chain Reaction.” กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วรวิติ เอี่ยมมงคลการ. 2556. “การแสดงออกของยีน chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT) ในลั่นมังก (Antirrhinum majus) และการเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์ยีน 4'CGT ของลั่นมังกในบัวหลวง (Nelumbo nucifera Gaertn.)” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิลาสินี ลิทวิทรัพย์. 2554. “การถ่ายยีน antisense ของ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยใช้อะโกแบคทีเรียเป็นพาหะ.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุนทรียา กาละวง. 2553. “ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เอ็มบริโอเจเนติกเซลล์ของปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สนธิชัย จันทร์เปรม. 2549. “เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการเกษตร.” ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการเกษตร. นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. วิทยาเขตกำแพงแสน.

สุภาภรณ์ เอี่ยมแข่ง, ปัทมา สีน้าเงิน และอรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์. 2547. “ผลของสารปฏิชีวนะ timenin และ augmentin ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ Agrobacterium tumefaciens ในการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ” ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. กรุงเทพฯ : คณะเกษตร. หน้า 118-125 (651 หน้า).

สุรเชษฐ์ จิตตะวิกุล และปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์. 2535. เทคนิคการปลูกบัว. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 51 หน้า.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล. 2536. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 258 หน้า .
- เสริมลาภ วสุวัต. 2547. **บัวประดับในประเทศไทย**. กรุงเทพฯ: เนชั่นบุค. 192 หน้า.
- หัตยา การิวงค์. 2548. **อณูพันธุศาสตร์**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ บุญไชยการพิมพ์. 312 หน้า.
- Anonymous.n.d. [Online]. Available :[http://www. www.water-lily.com](http://www.water-lily.com)
- Andre, C. M., R. Schafleitner, S. Legay, C. A. Aliaga, G. Nomberto, L. Hoffmann, J. F. Hausman and D. Evers. 2009. "Gene expression changes related to the production of phenolic compounds in potato tubers grown under drought stress." **Phytochemistry** 70: 1107-1116.
- Alpeter, F., N. Baisakh, R. Beachy, R. Bock, T. Capell, P. Christou, H. Daniell, K. Datta, S. Datta, P. J. Dix, C. Fauquet and R. Visser. 2005. "Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities." **Molecular Breeding** 15: 305-327
- Bai, Y and R. Qu. 2001. "Genetic transformation of elite turf-type cultivars of tall fescue." **International Turfgrass Society Research Journal** 9: 129-136.
- Buathong, R., K. Saetiew, S. Phansirib, N. Parinthawong and S. Arunyanart. 2013. "Tissue culture and transformation of the antisense *DFR* gene into lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) through particle bombardment." **Scientia Horticulturae** 161: 216–222.
- Chabaud, M., P. Ratet, S. de Sousa, A. Lopes, A. Duque, M. Harrison and D. G. Barker. 2007. "Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation and *in vitro* plant regeneration of *Medicago truncatula*." **Plant Cell Biotechnology** 127: 1-34.
- Christey, M. C., R. H. Braun, J. K. Reader, J. S. Lambie and M.E. Forbes. 1999. "Field testing transgenic basta resistant forage kale and forage rape" **Crop and Food Research** Christchurch, New Zealand.
- Daud, M. K., M. T. Variath, S. Ali, M. Jamil, M. T. Khan, M. Shafi and Z. Shuijin. 2009. "Genetic transformation of *bar* gene and its inheritance and segregation behavior in the resultant transgenic cotton germplasm ( BR001) ." **Pakistan Journal of Botany** 41(5): 2167-2178.
- Dedicova, B., C. Bermudez, M. Prias, E. Zuniga and C. Baondani. 2015. "High-throughput transformation pipeline for a Brazilian japonica rice with *bar* gene selection". **Protoplasma** 252: 1071-1083.
- Riva, G. A., J. G. Cabrelá, R. V. Pradon and C. A. Pradon. 1998. *Agrobacterium tumefaciens* : A natural tool for plant transformation. **Electronic Journal of Biotechnology** 1 : 1-16.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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 down regulation of *chalcone synthase* genes with RNA interference." **Journal of Biotechnology** 111: 229–240.
- Gachon, C., A. Mingam and B. Charrier. 2004. "Real-time PCR: what relevance to plant studies." **Journal of Experimental Botany** 55: 1445-1454.
- Hua-Zhang, H., C. Jin-Qing, W. Guan-Ting, L. Chun-Xiu, H. Rui-Zhi, W. Fu-Lin, L. Zhi-Hong and C. Xiao-Yun. 2005. "Highly efficient transformation and plant regeneration of tall fescue mediated by *Agrobacterium tumefaciens*." **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology** 31(2): 149-159.
- Jeknic, Z., S. P. Lee, J. Davis, R. C. Ernst and T. H. Chen. 1999. "Genetic transformation of *Iris germanica* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*." **Journal of the American Society for Horticultural Science** 124(6): 575-580.
- Jiang, F., J.-Y. Wang, H.-F. Jia, W.-S. Jia and H.-Q. Wang. 2013. "RNAi-mediated silencing of the *flavanone 3-hydroxylase* gene and its effect on *flavonoid* biosynthesis in strawberry fruit." **Journal of Plant Growth Regulation** 32: 182-190.
- Kadir, G., A. Malid, A. Zainal and O. A. Rasid. 2007. "Determination of minimal inhibitory concentration of selection agents for selecting transformed immature embryos of oil palm." **Asia Pacific Journal of Molecular Biotechnology** 15(3): 133-146.
- Kennedy, Y. A., K. O. Tomita and H. Ezura. 2004. "Efficient plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation via somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.)" **Plant Science** 166: 763-769.
- 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 gene preferentially expressed in apple skin." **Plant Science** 165: 403-413.
- Kusaba, M., 2004. "RNA interference in crop plant." **Current Opinion in Biotechnology** 15: 139-143.
- Kutty, P. C., G. K. A. Parveez and F. Huyop. 2011. "*Agrobacterium tumefaciens*-infection strategies for greater transgenic recovery in *Nicotiana tabacum* cv. TAPM26." **International Journal of Agricultural Research** 6(2): 119-133.
- Latham, R., A. K. Wilson and R. A. Steinbrecher. 2006. "The Mutational Consequences of Plant Transformation." **Journal of Biomedicine and Biotechnology** 10: 1-7.

- Lee, S. H., D. G. Lee, H. S. Woo, K. W. Lee, D. H. Kim, S. S. Kwak, J. S. Kim, H. Kim, N. Ahsan, Y. K. Yang and B. H. Lee. 2006. Production of transgenic orchardgrass via *Agrobacterium*-mediated transformation of seed-derived callus tissues . **Plant Science** 171: 404-414.
- Lee, L. Y and S. B. Gelvin. 2008. T-DNA binary vectors and systems. **American Society of Plant Biologists** 146: 325-332.
- Lin, J., 1995. Electro transformation of *Agrobacterium*, in method in molecular biology, 47, Nickoloff, J. A., ed., Humana Press, Totowa, NJ,171.
- Livak, J. k and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_p}$  method. **Elsevier Science** 25: 402-408.
- Lohar, D. P., K. Schuller, D. M. Buzas, P. M. Gresshoff and J. Stiller. 2001. “Transformation of *Lotus japonicas* using the herbicide resistance *bar* gene as a selectable marker.” **Journal of Experimental Botany** 52: 1697-1702.
- Malabadi, R. B. and K. Nataraja. 2007. “Stable transformation and recovery of transgenic plant by particle bombardment in *Pinus wallichiana* A.B. Jacks ( Himalayan Blue Pine).” **Biotechnology** 6(1): 105-111.
- Miyawaki, K., S. Fukuoka, Y. Kadamura, H. Hamaoka, T. Mito, H. Ohuchi, W. Schwab and S. Noji. 2012. “Establishment of a novel system to elucidate the mechanisms underlying light-induced ripening of strawberry fruit with an *Agrobacterium*-mediated RNAi technique.” **Plant Biotechnology** 29: 271-277.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. “ A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture.” **Plant Physiology** 15: 473 – 497.
- Nakatsuka, T., Y. Abe, Y. Kakizaki, S. Yamamura and M. Nishihara. “Production of red flowered plants by genetic engineering of multiple flavonoid biosynthetic genes.” **Plant Cell** 26: 1951-1959.
- Nandakumar, R., L. Chen and M. D. Rogers. 2004. “Factors affecting the *Agrobacterium*-mediated transient transformation of the wetland monocot, *Typha latifolia*.” **Plant Cell** 79: 31-38.
- Nishihara, M., T. Nakatsuka and S. Yamamura. 2005. “Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of *chalcone isomerase* gene.” **Federation of European Biochemical Societies**. 579: 6074-6078.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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.
- Petrillo, C. P., N. P. Carneiro, A. C. Purcino, H. S. Carvalho and J. D. Alves. 2008. "Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines." **Pesquisa Agropecuaria Brasileira** 43(3): 371-378.
- Quisen, R., Y. de Oliveira, M. Pileggi, F. Cuquel and M. Quoirin. 2009. "Selective Agent and *A. tumefaciens* Overgrowth-control Antibiotics in *Eucalyptus camaldulensis* Cotyledonary Culture." **Brazilian Archives of Biology and Technology** 56(6): 1485-1492.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. **Molecular cloning: A laboratory manual** Volume 1 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY., USA.
- Sreeramanan, S., M. Maziah, M.P. Abdullah, N.M. Rosli and R. Xavier. 2006. "Potential selectable marker for genetic transformation in banana" **Biotechnology** 5: 189-197.
- Tan, C., S. Qin, Q. Zhang, P. Jiang and F. Zhao. 2005. "Establishment of micro-particle bombardment transformation system for *Dunaliella salina*." **The Journal of Micrological** 361-365.
- Tardif, M. D., R. Broglie, J. Slightom and D. Tepfer. 1985. "Structure and expression of Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* in *Nicotiana tobacco*, Organ and phenotypic specificity." **Journal of Molecular Biology** 186: 557-564.
- Tsuda, S., Y. Fukui, N. Nakamura, Y. Katsumoto, 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(5): 377-386.
- Vergauwe, A., E. V. Geldre, M. V. Montagu and V. D. Eeckhout. 1996. "The use of amoxicillin and ticarcillin in combination with a beta-lactamase inhibitor as decontaminating agents in the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Artemisia annua* L." **Journal of Biotechnology** 52: 89-95.



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
<b>Macroelements</b>			(100 เท่า)	
MS1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650.00	16.50	100 มิลลิลิตร
MS2	KNO <sub>3</sub>	1,900.00	19.00	100 มิลลิลิตร
MS3	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	450.00	4.50	100 มิลลิลิตร
MS4	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370.00	3.70	100 มิลลิลิตร
MS5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00	1.70	100 มิลลิลิตร
<b>Microelements</b>			(10 เท่า)	
MS6	ZnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	86.0	8.60	10 มิลลิลิตร
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3	2.23	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	0.62	
	KI	0.83	0.083	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.025	
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.0025	
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.0025	
<b>Microelements</b>			(10 เท่า)	
MS7	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	37.30	3.73	10 มิลลิลิตร
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.85	2.785	
<b>Organic nutrients</b>			(10 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	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย อาหารเลี้ยงเชื้อ 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

### 1.2.3 การเตรียม Yeast Extract Phosphate broth ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Bacto-Trypton	10	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
NaCl	10	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ค่า 7.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 1.3 การเตรียมสารเคมีสำหรับการเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (Sambrook *et al.* 1989)

### 1.3.1 100 mM CaCl<sub>2</sub> ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

CaCl <sub>2</sub>	1.12	กรัม
น้ำกลั่น	70	มิลลิลิตร

ละลาย CaCl<sub>2</sub> ในน้ำกลั่นปริมาตร 70 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 1.3.2 20% Glycerol : 50 mM CaCl<sub>2</sub> ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Glycerol	20	มิลลิลิตร
100 mM CaCl <sub>2</sub>	25	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	70	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

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

1M Tris buffer pH 8.0	100	มิลลิลิตร
5M NaCl	280	มิลลิลิตร
0.5M EDTA	40	มิลลิลิตร

CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) 20 กรัม

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

### 1.5 การเตรียมสารละลาย TE (Tris - EDTA) buffer

10mM Tris - HCl pH 8.0	1000	ไมโครลิตร
1mM EDTA pH 8.0	100	ไมโครลิตร

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

### 1.6 การเตรียมสารละลาย TAE (Tris acetate EDTA) buffer

#### 1.6.1 การเตรียมสารละลาย 50X TAE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

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

ผสมสารละลายให้เข้ากันและปรับปริมาตรของสารละลายให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที Acetic acid เป็นกรดเข้มข้น ควรใส่ถุงมือกันกรด และเตรียมภายในตู้ดูดควัน

#### 1.6.2 การเตรียมสารละลาย 0.5X TAE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

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

#### 1.7 การเตรียม 10X loading buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

0.25 % Bromophenol blue

30 % Glycerol

60 mM EDTA

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 1.8 การเตรียม Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Ethidium bromide 0.5 กรัม

น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ละลาย Ethidium bromide ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตรให้เข้ากัน เก็บสารละลายในขวดแก้วทึบแสง Ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง ควรใส่ถุงมือในการเตรียม

#### 1.9 การเตรียม 100 mM Acetosyringone ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Acetosyringone 0.0196 กรัม

Dimethylsulfoxide 1 มิลลิลิตร

ละลาย Acetosyringone ใน Dimethylsulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

#### 1.10 การเตรียม 20 % Glucose ปริมาตร 60 มิลลิลิตร

Glucose 2.16 กรัม

น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 50 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลาย Glucose ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 60 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อนำไปกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

### 1.11 การเตรียม 1 M Sorbitol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Sorbitol	18.2	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ละลาย Sorbitol ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 1.12 การเตรียม 1U/ $\mu$ l Ribolock RNase Inhibiter ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

10X buffer DNase I	5	ไมโครลิตร
DEPC	45	ไมโครลิตร

ใช้ปิเปตดูขึ้นลงผสมให้เข้ากัน ในหลอดไมโครเซนติฟิวด์ ขนาด 1000 ไมโครลิตร ได้สารละลายตัวที่ไว้สำหรับเจือจาง 40U/ $\mu$ l Ribolock RNase Inhibiter

10X buffer DNase I ที่มี DEPC	39	ไมโครลิตร
40U/ $\mu$ l Ribolock RNase Inhibiter	1	ไมโครลิตร

ใช้ปิเปตดูขึ้นลงผสมให้เข้ากัน ในหลอดไมโครเซนติฟิวด์ ขนาด 1000 ไมโครลิตร จะได้ 1U/ $\mu$ l Ribolock RNase Inhibiter ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

### 1.13 การเตรียม Alkaline lysis solution สำหรับสกัดพลาสมิด

#### 1.13.1 การเตรียม Alkaline lysis solution I ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

50mM Glucose	10	มิลลิลิตร
25mM Tris- HCl pH8.0	5	มิลลิลิตร
10mM EDTA	4	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ครบ 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**1.13.2 การเตรียม Alkaline lysis solution II ปริมาตร 100 ไมโครลิตร**

0.2N NaOH	2	มิลลิลิตร
-----------	---	-----------

1% w/v SDS	10.2	มิลลิลิตร
------------	------	-----------

ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ไม่ต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (การเตรียม Alkaline lysis solution II ต้องเตรียมสดทุกครั้ง) เก็บที่อุณหภูมิห้อง

**1.13.3 การเตรียม Alkaline lysis solution III ปริมาตร 100 ไมโครลิตร**

3M Potasium acetate	60	มิลลิลิตร
---------------------	----	-----------

5M Glacial acetic acid	11.5	มิลลิลิตร
------------------------	------	-----------

ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที





เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

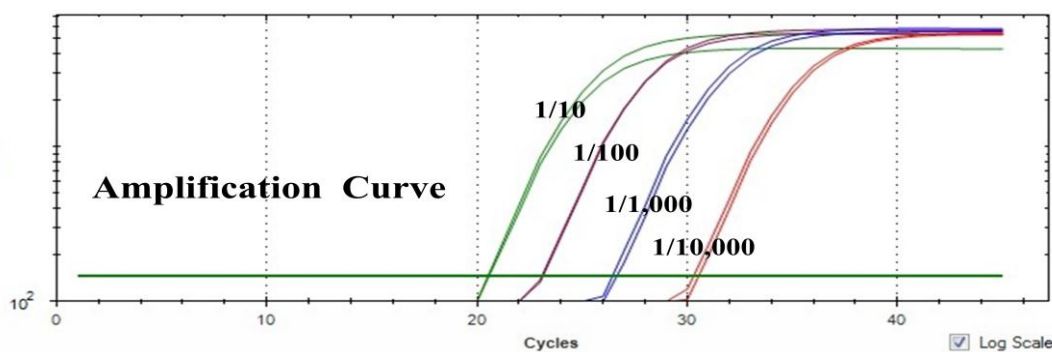
ตารางที่ 2.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR และ Real time RCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H*, *CHS* และ *bar*

ชื่อยีน	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' - 3')	ขนาดของ ผลผลิต PCR
<i>18S rRNA</i>	18S_forward	GGCTCGAAGACGATCAGATACCG	600 คู่เบส
	18S_reverse	GTACAAAGGGCAGGGACGTAGTCAA	
<i>F3H</i>	F3H Sense F	GAGAAGCTCCGGTTCGACAT	308 คู่เบส
	F3H Sense R	TAGTTCACCACCATCTTCTGG	
<i>bar gene</i>	bar_forward	TTGACCGTGCTTGTCTCGAT	429 คู่เบส
	bar_reverse	AAGGCGGGAAACGACAATCT	
<i>CHS</i>	CHSA_forward	AAGAGCTCCCGTCAAGAGACTCA	458 คู่เบส
	CHSA_reverse	AAGGATCCCAGAAAATTGAGTTC	

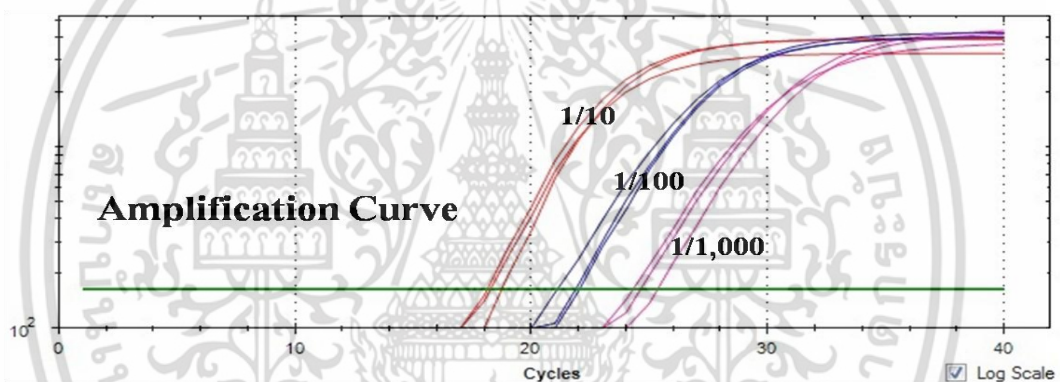
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



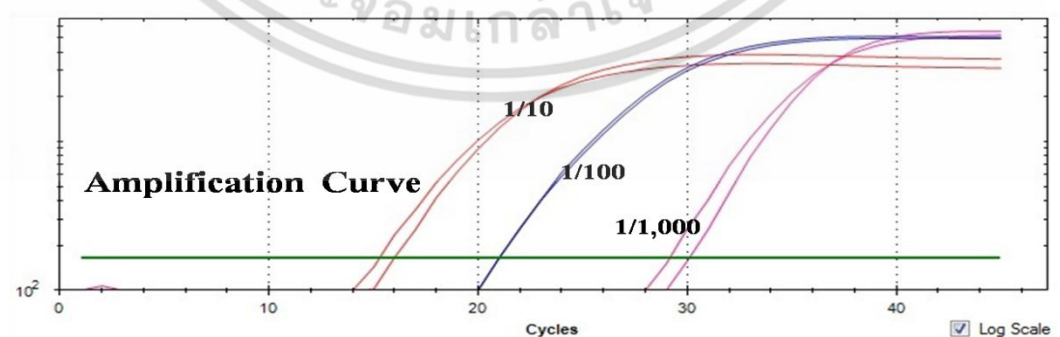
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 Amplification curves ของบิวทลงพันธุ์บุนทรริกโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *F3H* ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ cDNA ต่อจำนวนรอบ (Cycles) ของปฏิกิริยา Real time PCR



ภาพที่ 3.2 Amplification curves ของบิวทลงพันธุ์บุนทรริกโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *18S rRNA* ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ cDNA ต่อจำนวนรอบ (Cycles) ของปฏิกิริยา Real time PCR



ภาพที่ 3.3 Amplification curves ของบิวทลงพันธุ์บุนทรริกโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *CHS* ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ cDNA ต่อจำนวนรอบ (Cycles) ของปฏิกิริยา Real time PCR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 เปรียบเทียบการแสดงของยีน *F3H* ของบัวหลวงพันธุ์มุกทริก จำนวนทั้งหมด 5 ต้น โดยใช้ *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง (ครั้งที่ 1)

sample	Cp- <i>18S</i>	Cp- <i>F3H</i> transform	$\Delta$ Cp	average $\Delta$ Cp	$2^{\Delta\Delta$ Cp	average $2^{\Delta\Delta$ Cp	SD	SEM
ต้น control	28.47	24.33	-4.14	-4.263333333	1	1	0	0
	28.35	24.22	-4.13		1			
	28.31	23.79	-4.52		1			
ต้นที่ 1	30.2	30.22	0.02	-0.39	0.055939067	0.068899211	0.011332707	0.006542942
	30.31	29.88	-0.43		0.076946526			
	30.25	29.49	-0.76		0.073812041			
ต้นที่ 2	29.94	29.27	-0.67	0.173333333	0.090245575	0.052238632	0.033119042	0.019121288
	28.06	28.69	0.63		0.036906021			
	28.19	28.75	0.56		0.029564301			
ต้นที่ 3	26.18	28.97	2.79	2.416666667	0.008200912	0.010195299	0.003891811	0.002246938
	26.26	28.22	1.96		0.014680043			
	26.22	28.72	2.5		0.007704943			
ต้นที่ 4	29.55	28.37	-1.18	-0.803333333	0.128514228	0.094322068	0.031645318	0.018270433
	29.66	29.03	-0.63		0.088388348			
	29.6	29	-0.6		0.066063628			
ต้นที่ 5	28.03	29.47	1.44	1.12	0.020905118	0.024450689	0.006266581	0.003618012
	27.83	29.29	1.46		0.020760716			
	27.93	28.39	0.46		0.031686234			

ตารางที่ 3.5 เปรียบเทียบการแสดงของยีน *F3H* ของบัวหลวงพันธุ์มุกตริก จำนวนทั้งหมด 5 ต้น โดยใช้ *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง (ครั้งที่ 2)

sample	Cp-18S	Cp-F3H transform	$\Delta$ Cp	average $\Delta$ Cp	$2^{\Delta\Delta$ Cp	average $2^{\Delta\Delta$ Cp	SD	SEM
ต้น control	22.17	24.7	2.53	2.356666667	1	1	0	0
	22.53	24.78	2.25		1			
	22.53	24.82	2.29		1			
ต้นที่ 1	24.79	28.42	3.63	3.413333333	0.466516496	0.487218331	0.098676652	0.056970992
	25.03	28.6	3.57		0.400534939			
	25.6	28.64	3.04		0.594603558			
ต้นที่ 2	22.43	27.82	5.39	5.133333333	0.137738139	0.1559064	0.070057445	0.040447685
	22.78	27.13	4.35		0.233258248			
	22.42	28.08	5.66		0.096722812			
ต้นที่ 3	24.93	28.94	4.01	4.193333333	0.358488812	0.284440037	0.064133852	0.037027697
	24.8	29.06	4.26		0.248273124			
	25.01	29.32	4.31		0.246558176			
ต้นที่ 4	23.63	26.86	3.23	3.066666667	0.615572207	0.611447013	0.015206469	0.008779459
	23.63	26.63	3		0.594603558			
	23.78	26.75	2.97		0.624165274			
ต้นที่ 5	24.63	27.33	2.7	2.69	0.888842681	0.796296893	0.080189145	0.046297224
	24.63	27.3	2.67		0.747424624			
	24.43	27.13	2.7		0.752623374			

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นายชาตรี กอนี
วัน เดือน ปีเกิด	16 มีนาคม พ.ศ. 2533
ที่อยู่ปัจจุบัน	16/2 หมู่ 16 ถนนร่มเกล้า แขวงแสนแสบ เขตมีนบุรี กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2554 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 10520
ทุนวิจัยที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ภายใต้โครงการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยวิธีตัดแต่งพันธุกรรม ทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)
ผลงานทางวิชาการ	ชาตรี กอนี <input type="checkbox"/> , สุเมธ อรัญนารถ, นงลักษณ์ เกรินทวงศ์ และกัญจนา แซ่เตียว. "การยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>flavanone 3-hydroxylase (F3H)</i> ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) ในบัวหลวงพันธุ์บุณทริก ( <i>Nelumbo nucifera</i> Geartn.)" วารสารเกษตรพระจอมเกล้า ปีที่ 34 ฉบับที่ 2 เดือน พฤษภาคม – สิงหาคม 2559.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้