

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ศึกษาการสะสมสารเฟลโวนอยด์ในยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมตอบสนองต่อ
โรคพืช



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาคชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**A Study of The Flavonoid Accumulation in Transgenic Tobaccos Response to
Plant Pathogens**



Phanthipa Klaydach

**A Special Project Submitted in Partial of the Requirement for the Degree of
Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic Year 2007**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง ศึกษาการสะสมสารเฟลโวนอยด์ในยาสูบคัดแปลงพันธุกรรมตอบสนอง
ต่อโรคพืช

นักศึกษา นางสาวพันธิพา กล้ายเดช รหัส 47050520

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

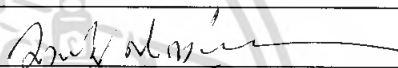

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพฑิณ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้ทำโครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์	
กรรมการ ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพฑิณ	
กรรมการ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล	

..... นวพล นนทอ

(รศ.ดร. นวพล นนทอ ธีระนนง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	ศึกษาการสะสมสารฟเลโวนอยด์ในยาสูบคัดแปลงพันธุกรรมตอบสนองต่อโรคพืช
นักศึกษา	นางสาวพันธิพา คล้ายเดช รหัส 47050520
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2550
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพลิน

บทคัดย่อ

ฟเลโวนอยด์เป็นสารสีที่พบในพืชมีบทบาทหน้าที่หลากหลาย รวมทั้งการต้านทานต่อโรคพืช ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาการถ่ายโอนยีน flavonol synthase (*FLS*) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์ฟเลโวนอยด์เข้าสู่ต้นยาสูบ โดยใช้อะโกรแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังนำต้นยาสูบคัดแปลงพันธุกรรมที่มีการแสดงออกของยีน chalcone synthase (*CHS*) และ flavonoid 3'-hydroxylase (*F3'H*) มาศึกษาความสามารถในการต้านทานต่อการทำลายของเชื้อ *Rhizopus* sp. และ *Sclerotium rolfsii* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคเน่าเปรียบเทียบกับต้นปกติ หลังจากต้นพืชคัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน *CHS* และ *F3'H* ได้รับการติดเชื้อโรคพืช พบว่าต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* และต้นยาสูบที่มียีน *CHS* มีลักษณะทางสรีรวิทยาที่ดีกว่าต้นยาสูบปกติ แต่ต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* มีแนวโน้มทน ได้ดีกว่าต้นยาสูบที่มียีน *CHS* การตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* มีแนวโน้มทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อได้ดีกว่าต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และต้นยาสูบปกติ ตามลำดับ ปริมาณของรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง (คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคาโรทีนอยด์) ในต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* เมื่อติดเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ติดเชื้อ ส่วนต้นยาสูบที่ยีน *CHS* เมื่อติดเชื้อจะลดลงแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ต้นยาสูบปกติจะมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบที่ไม่ติดเชื้อ ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และ *F3'H* ติดเชื้อ พบว่าในใบยาสูบมีการสะสมสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มสูงขึ้นกว่าที่ได้ไม่ได้ติดเชื้อ โดยการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์เช่นเดียวกับต้นยาสูบปกติ ปริมาณสารกลุ่มฟเลโวนอยด์ (ฟเลวาโนน ฟเลโวนอล แทนนิน และแอนโทไซยานิน) ในต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* เมื่อได้รับการติดเชื้อจะมีการผลิตสารทุกชนิดที่ทำการศึกษาเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจากเมื่อไม่ได้รับการติดเชื้อ ในขณะที่ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* ที่ติดเชื้อมีการเพิ่มขึ้นของสารกลุ่มฟเลโวนอยด์ที่น้อยกว่าต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* ที่ติดเชื้อ แต่มากกว่าต้นยาสูบปกติที่ติดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	A Study of The Flavonoid Accumulation in Transgenic Tobaccos Response to Plant Pathogens
Name	Phanthipa Klaydach
Department	Applied Biology
Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2007
Special Project Advisor	Asst. Prof. Dr. Kanokporn Sompornpailin

Abstract

Flavonoids are plant color pigment with various biological function, including plant protection against pathogen. In this study, the *Agrobacterium* mediated transformation of tobaccos was performed using flavonol synthase (*FLS*) gene involved in flavonoids biosynthesis. Moreover, the transgenic tobaccos overexpressing chalcone synthase (*CHS*) and flavonoid 3'-hydroxylase (*F3'H*) were determined as the ability inhibit the infection of *Rhizopus* sp. and *Sclerotium rolfsii*, the plant pathogen causing fungi blight comparing with wild type. After infection of the *CHS* and *F3'H* transgenic plants showed the better physiological characteristic than the treated wild type plants. Between these two transgenic lines, *F3'H* transgenic plants exhibited the greater ability to tolerate this pathogen than *CHS* transgenic plants. The infected tobacco leaves were examined under microscope, *F3'H* transgenic plants showed the better ability to tolerate than the treated *CHS* transgenic and wild type plants, respectively. The level of photosynthetic pigment (chlorophyll A chlorophyll B and carotenoid) were increased significantly in infection of *F3'H* transgenic plants when compared to untreated plants. Treated *CHS* transgenic plants were reduced nonsignificantly where as treated wild type plants were reduced significantly when compared to untreated plants. The infected *CHS* and *F3'H* transgenic plants were greater increase in phenolic compounds in treated transgenic leaves than those in untreated transgenic leaves using fluorescence microscope, as well as in treated leaves of wild type tobacco. The level of all flavonoids (flavanone, flavone, flavonol, tannin and anthocyanin) in this study were increased significantiy in infection of *F3'H* transgenic plants that were treated while those in infected *CHS* transgenic plants showed the increase level of flavonoids less than the infected *F3'H* transgenic plants but more than infected wild type plants.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการพิเศษตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ของคณะ
วิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยโครงการพิเศษนี้ได้
ทำการศึกษาเกี่ยวกับการศึกษาการสะสมสารเฟลโวนอยด์ในยาสูบคัดแปลงพันธุกรรมตอบสนอง
ต่อโรคพืช ซึ่งต้องขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.กนกพร สมพร ไพลิน ที่สละเวลามาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา
และให้คำปรึกษาตลอดการดำเนินงานจน โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.มาลินี ดันติยาภรณ์ และ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ที่เสียสละเวลามาเป็น
ประธานกรรมการ และกรรมการในการสอบโครงการพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณพี่ๆ และเพื่อนๆ ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือจน โครงการพิเศษนี้สำเร็จ
ลุล่วงไปด้วยดี

พันธิพา กล้ายเดช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
Abstract.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของ โครงการงานพิเศษ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของ โครงการงานพิเศษ.....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการงานพิเศษ.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....	2
บทที่ 2 หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 สารเฟลโวนอยด์.....	3
2.2 ยีนเฟลโวนอล ซินเทส.....	6
2.3 การโคลนยีน.....	7
2.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	7
2.5 เวกเตอร์.....	8
2.6 การเชื่อมต่อโมเลกุลของดีเอ็นเอ.....	9
2.7 โพลีเมอเรส เซน รีแอกชัน.....	10
2.8 การทำอิเล็กโตโพรมิชชันของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล.....	11
2.9 การถ่ายโอนยีนในพืช.....	11
2.10 เชื้อราทำให้เกิดโรคพืช.....	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	18
3.1 อุปกรณ์.....	18
3.2 วิธีการทดลอง.....	19
3.2.1 การโคลนยีน <i>FLS</i> จากต้นอะราบิโดปซิส.....	19
3.2.2 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับ <i>Agrobacterium</i> expression vector.....	22
3.2.3 การถ่ายโอนยีน <i>FLS</i> เข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย.....	24
3.2.4 การตรวจสอบการแสดงออกของพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนต่อเชื้อ เกิดโรค.....	24
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง.....	26
4.1 การโคลนยีน <i>FLS</i> จากต้นอะราบิโดปซิส.....	26
4.1.1 ผลการเพิ่มจำนวนยีน <i>FLS</i> ด้วยเทคนิค PCR.....	26
4.1.2 ผลการเชื่อมต่อและถ่ายโอนยีนส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่ <i>E. coli</i>	27
4.1.3 ผลการตรวจสอบยีนดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pGEM.....	29
4.2 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ <i>Agrobacterium</i> expression vector.....	29
4.2.1 ผลการเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอ.....	29
4.2.2 ผลการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิดที่เป็น <i>Agrobacterium</i> expression vector.....	31
4.2.3 ผลการพิสูจน์ทิศทางการเชื่อมต่อของการโคลนยีน <i>FLS</i> ที่ได้ใน พลาสมิด pBI121.....	33
4.3 ผลการถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียและต้นยาสูบ.....	33
4.4 การตรวจสอบการแสดงออกของพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนต่อเชื้อเกิดโรค.....	34
4.4.1 ผลการตรวจสอบด้วยการสังเกตลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นและใบยาสูบ.....	34
4.4.2 ผลการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	35
4.4.3 ผลการตรวจสอบปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง.....	36
4.4.4 ผลการตรวจสอบการผลิตสารประกอบฟีนอลิกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ฟลูออเรสเซนซ์.....	38
4.4.5 ผลการตรวจสอบการผลิตสารกลุ่มฟลโวนอยด์ด้วยเครื่อง สเปกโตรโฟโตมิเตอร์.....	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้หรือเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....	43
5.1 การโคลนยีน <i>FLS</i> จากต้นอะราบิโดปซิส.....	43
5.2 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ <i>Agrobacterium</i> expression vector.....	43
5.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมวลละด้นยาสูบ.....	43
5.4 การตรวจสอบการแสดงออกของพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรค...43	43
เอกสารอ้างอิง.....	46
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....	48
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการทดลอง.....	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงผลการตรวจสอบการผลิตสารประกอบฟีนอลิก จากการนำเชื้อ <i>Rhizopus</i> sp. มาทดสอบกับต้นยาสูบ.....	39
4.2 แสดงผลการตรวจสอบการผลิตสารประกอบฟีนอลิก จากการนำเชื้อ <i>Sclerotium rolfsii</i> มาทดสอบกับต้นยาสูบ.....	39
4.3 แสดงผลการตรวจสอบการผลิตสารด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากการนำเชื้อ <i>Rhizopus</i> sp. มาทดสอบกับต้นยาสูบ.....	40
4.4 แสดงผลการตรวจสอบการผลิตสารด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากการนำเชื้อ <i>Sclerotium rolfsii</i> มาทดสอบกับต้นยาสูบ.....	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของเฟลวอนอยด์.....	4
2.2 โครงสร้างของไอโซเฟลวอนอยด์.....	4
2.3 วิธีชีวสังเคราะห์เฟลวอนอยด์.....	5
2.4 แสดงส่วนประกอบของเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp.....	14
2.5 โคโลนีของ <i>Sclerotium rolfsii</i> บนอาหาร PDA.....	17
3.1 แสดงจุดตัดของเอนไซม์บนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ <i>FLS</i>	21
3.2 แสดงจุดตัดของเอนไซม์บนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ <i>FLS</i> และเวกเตอร์ pBI121.....	23
4.1 แสดงผลการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์สำหรับยีน <i>FLS</i> จากเทคนิค PCR โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์.....	26
4.2 แสดงผลการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีสีขาวที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอ.....	27
4.3 ผลการตัดพลาสมิด pGEM ด้วย <i>Bam</i> HI เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่คาดว่ามีส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1011 คู่เบสแทรกอยู่.....	28
4.4 ผลการสกัดพลาสมิด pGEM ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอแทรกอยู่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Bgl</i> III เพื่อตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ.....	29
4.5 การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ <i>FLS</i> ออกจากพลาสมิด pGEM โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	30
4.6 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ <i>FLS</i> บริสุทธิ์.....	30
4.7 แสดงผลการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีสีขาวที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอ.....	31
4.8 ผลการตัดพลาสมิด pBI121 ด้วย <i>Bam</i> HI เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของ <i>FLS</i> แทรกอยู่.....	32
4.9 แสดงผลการตรวจสอบทิศทางของยีน <i>FLS</i> ว่ามีลักษณะเป็น sense หรือ antisense ด้วยการตัดด้วย <i>Bgl</i> III และ <i>Hind</i> III	33
4.10 ผลการตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นยาสูบ รูป (ก) คือ ภาพของต้นยาสูบที่ไม่ติดเชื้อ (ข) คือ ภาพของต้นยาสูบที่ติดเชื้อ <i>Rhizopus</i> sp.....	34
4.11 ผลการตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นยาสูบ รูป (ก) คือ ภาพของต้นยาสูบที่ไม่ติดเชื้อ (ข) คือ ภาพของต้นยาสูบที่ติดเชื้อ <i>Sclerotium rolfsii</i>	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.12 ผลการตรวจสอบลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อ <i>Rhizopus</i> sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	35
4.13 ผลการตรวจสอบลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อ <i>Sclerotium rolfsii</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	35
4.14 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารคลอโรฟิลล์ ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบ ที่มีเชื้อ <i>CHS</i> และต้นยาสูบที่มีเชื้อ <i>F3'H</i> ทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ <i>Rhizopus</i> sp.	36
4.15 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารคลอโรฟิลล์ ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบ ที่มีเชื้อ <i>CHS</i> และต้นยาสูบที่มีเชื้อ <i>F3'H</i> ทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ <i>Sclerotium rolfsii</i>	37
4.16 ระดับคะแนนของการผลิตสารประกอบฟีนอลิก.....	38



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการพิเศษ

เฟลโวนอยด์ (flavonoid) เป็นสารสีที่พบในดอกไม้ ผลไม้ สารเหล่านี้จะช่วยให้แมลงเข้ามาผสมเกสร และยังปกป้องพืชจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตและเชื้อโรคจากไวรัส เชื้อรา แบคทีเรียต่างๆ เฟลโวนอยด์ชนิดต่างๆจะพบได้ในผักและผลไม้ (Elio และคณะ, 2004) คุณสมบัติของเฟลโวนอยด์ที่ใช้ในด้านเกษตรกรรม เช่น ใช้ในการต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ เชื้อรา และไวรัส ต่อต้านโรคเห็ด ป้องกันการเกิดออกซิเดชัน รักษาอาการเจ็บปวด ป้องกันโรคความดันโลหิตสูง ป้องกันการเกิดอาการกำหนัด (estrogenic symptom) และเป็นยาขับปัสสาวะ (Narayana และคณะ, 2006)

โรคพืชไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรียหรือเชื้อรา ซึ่งล้วนก่อให้เกิดความเสียหายทางด้านการเกษตร เศรษฐกิจและการค้า การนำสารเคมีเพื่อการป้องกันและกำจัด โรคพืชจากต่างประเทศ การใช้สารเคมีของเกษตรกรส่งผลให้เพิ่มค่าใช้จ่ายในการผลิตและมีสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคและเกษตรกร จึงมีการนำทางเลือกที่จะใช้กลไกทางธรรมชาติมาต่อต้านเชื้อโรค โดยเฉพาะสารกลุ่มเฟลโวนอยด์เป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไปและมีส่วนเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อโรคพืชและมีรายงานการศึกษาในสารกลุ่มเฟลโวนอยด์นี้ด้วย เช่น การนำสารเฟลวาโนนและสารโพลีเมทอกซิเฟลโวน (polymethoxyflavones) ที่พบมากในเปลือกของผลส้มเกรฟรุท (*Citrus paradisi*) และสวิตทอเรนซ์ (*Citrus sinensis*) ได้แก่ นารินจิน (naringin) และเฮสเพอริดีน (hesperidin) มาใช้ในการต่อต้านเชื้อรา *Penicillium digitatum* เป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคเน่าในพืชตระกูลส้มหลังการเก็บเกี่ยว และยังมีการใช้ไฟโตอะแลกซิน (phytoalexins) ในพืชตระกูลส้มบางชนิด (Ortuno และคณะ, 2006) และมีรายงานการศึกษาในพืชพวงแตงกวา (*Cucumis sativus*) ซึ่งใช้เอนไซม์แซลโคน ซินเทส (chalcone synthase, CHS) ในวัฏจักรของการสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ ชักนำให้ผลิตไฟโตอะแลกซินที่มีผลในการต่อต้านเชื้อรา *Podosphaera xanthii* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคราแป้ง (powdery mildew) ในแตงกวา (Bourlaye และคณะ, 2005)

จากการศึกษาพบว่ามีเอนไซม์ในกลุ่มชีวสังเคราะห์สารเฟลโวนอยด์ประกอบด้วยยีนหลายชนิด ซึ่งเฟลโวนอล ซินเทส (flavonol synthase หรือ *FLS*) เป็นหนึ่งยีนในอีกหลายยีนที่จะทำการโคลนและนำมาศึกษาการทำงานร่วมกับยีนอื่น ในการทดลองนี้ยีน *FLS* นี้ อาจจะมีกลไกในการผลิตสารกลุ่มเฟลโวนอลกลุ่มหนึ่งในกลุ่มชีวสังเคราะห์สารเฟลโวนอยด์เพิ่มขึ้น ซึ่งคาดว่าจะช่วยให้พืชปกป้องตัวเองจากเชื้อโรคได้

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาการถ่ายโอนยีนสารกลุ่มชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ในต้นยาสูบ โดยใช้อะโกรแบคทีเรียที่มี T-DNA เพื่อชักนำให้ต้นยาสูบมีการสะสมสารหรือผลิตสารเฟลโวนอยด์เพิ่มมากขึ้นแล้วนำไปทดสอบกับเชื้อราที่ก่อโรคในพืช ทำการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของพืชและการผลิตสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ตอบสนองเชื้อโรครดงกล่าว

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. ศึกษาการโคลนยีน *FLS* จากต้นอะราบิโดปซิส (*Arabidopsis*)
2. ศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาของต้นยาสูบคัดแปลงทางพันธุกรรมต่อโรคพืช

เปรียบเทียบกับต้นปกติ

3. ศึกษาการสะสมสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ในพืชทดสอบตอบสนองต่อโรคพืช

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ทำการโคลนยีน *FLS* ด้วยเทคนิค PCR จากต้นอะราบิโดปซิส เพื่อใช้สำหรับการถ่ายโอนยีนในพืช และตรวจสอบผลการสร้างและสะสมสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ของพืชปกติและพืชคัดแปลงพันธุกรรมต่อเชื้อราที่ก่อโรคพืช

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เทคนิคการโคลนยีน *FLS*
2. เทคนิคการถ่ายเชื้อโรครดงเข้าสู่พืชทดลอง
3. ผลการตอบสนองของต้นยาสูบที่ได้รับและไม่ได้รับยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ต่อโรคพืช

1.5 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

1.5.1 ขั้นตอนโคลนยีน *FLS* จากต้นอะราบิโดปซิส

- 1.5.1.1 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ด้วยเทคนิค PCR
- 1.5.1.2 เชื่อมต่อชิ้นส่วน DNA เข้ากับเวกเตอร์สำหรับเพิ่มจำนวน DNA
- 1.5.1.3 ทำการพิสูจน์โคลนที่ได้ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
- 1.5.1.4 ทำการตัดชิ้นส่วน DNA ของ *FLS* ได้เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ที่แสดงออกใน *E.coli*
- 1.5.1.5 พิสูจน์ทิศทางการเชื่อมต่อของโคลนยีน *FLS* ที่ได้

1.5.2 ขั้นตอนการถ่ายโอนยีน *FLS* เข้าสู่พืชโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

1.5.3 ขั้นตอนการทดสอบพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนกับเชื้อเกิดโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารฟลาโวนอยด์ (flavonoid)

ฟลาโวนอยด์เป็นสารทุติยภูมิหลักที่พบในพืชหลายชนิด ซึ่งมีประมาณ 9000 โครงสร้าง เป็นสารประกอบที่พบในท่อลำเลียงของพืชทั่วไปและพบบ้างในพืชพวกมอส โครงสร้างของฟลาโวนอยด์ มี 15-คาร์บอน สร้างจากสารพื้นฐาน 2 ชนิด คือ malonyl-CoA และ p-coumaroyl-CoA (Stefan and Axel, 2005)

โครงสร้างของฟลาโวนอยด์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน 15 ตัว จะจัดเรียงตัวเป็น 3 วง (ring) เรียกเป็นวง A, B, และ C โดยวง A และ B เป็นวงฟีนิล (phenyl ring) ส่วนวง C เป็นวงแลคโตน (lactone ring) ดังรูปที่ 2.1 การเกิดออกซิเดชัน (oxidation) ที่วง C ทำให้มีการแยกฟลาโวนอยด์ออกเป็นกลุ่มย่อยได้ต่าง ๆ กัน และการเกิดไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) ที่วง A และ B ทำให้เกิดอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ชนิดนั้น ๆ

ตัวอย่างของสารประกอบฟลาโวนอยด์

สารประกอบฟลาโวนอยด์มีอยู่มากมายในธรรมชาติ ในที่นี้จะกล่าวถึงฟลาโวนอยด์บางกลุ่ม พร้อมทั้งตัวอย่างของอนุพันธ์ที่สำคัญ

2.1.1 ฟลาโวนอล (flavonol)

เป็นสารที่ไม่มีสี แต่สามารถดูดกลืนรังสีในช่วงใกล้แสงยูวี ซึ่งเป็นช่วงคลื่นที่แมลงสามารถมองเห็นได้ ดังนั้นฟลาโวนอลจึงมีบทบาทสำคัญในการล่อแมลงเพื่อการผสมเกสร ฟลาโวนอลที่พบมากในพืชชั้นสูง ได้แก่ แคมเฟอร์อล (kaempferol) และเคอร์ซีทีน (quercetin)

2.1.2 ฟลาโวน (flavone)

มักพบฟลาโวนในส่วนของเปลือกต้น แก่น ผล และ ราก ฟลาโวนที่พบในเปลือกต้นของพืชพวกขนุน (*Artocarpus*) และหม่อน (*Morus*) วงศ์ Moraceae จะมีลักษณะเฉพาะคือ มีหน่วยของไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid) ในโมเลกุล ได้แก่ อาร์โทคาร์พิน (artocarpin) และมัลเบอร์ริน (mulberin)

2.1.3 ไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid)

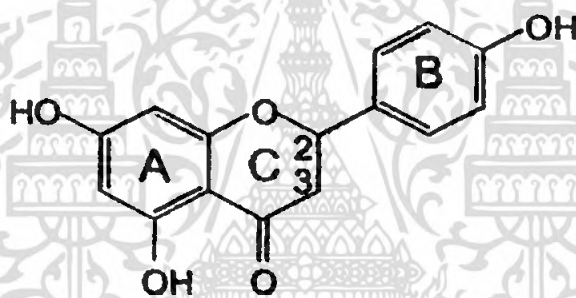
ไอโซฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มสารที่พืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมเช่นเดียวกับสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ กระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มนี้แยกจากกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่สารชักนำให้เกิดแซลโคเน (chalcone precursor) และเมื่อแซลโคเนเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นฟลาวานอน (flavanone) แล้วการออกซิเดชันมีผลให้วง B เปลี่ยนตำแหน่งและได้สารตัวแรกในกลุ่มที่เรียกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเฟลโวน (isoflavone) สารไอโซเฟลโวนอยด์พบมากในพืชตระกูลถั่ว สารที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไอโซเฟลโวน (isoflavone) และโคเมสแทน (coumestan)

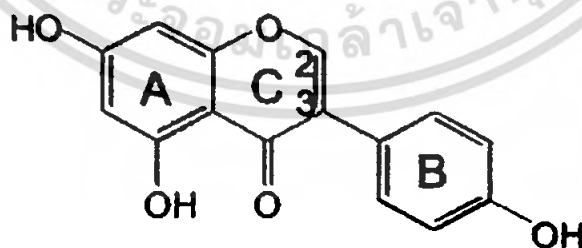
2.1.4 แอนโทไซยานิน (anthocyanin)

รงควัตถุของเฟลโวนอยด์จะอุดมไปด้วยแอนโทไซยานินมากที่สุด แอนโทไซยานินแยกได้จากแวคิวโอล (vacuoles) และมีผลต่อรงควัตถุหลายชนิดทั้งสีส้ม สีแดง สีม่วงและสีน้ำเงินซึ่งพบได้ในดอกไม้และผลไม้ จะพบแอนโทไซยานินบ่อยที่ใบไม้ ลำต้น เมล็ดและเนื้อเยื่ออื่นๆ สารประกอบหลักของแอนโทไซยานิน ได้แก่ เพลาร์โกนิน (pelargonidin) ไซยานิดิน (cyanidin) พีโอนิน (peonidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) เพตุนิดิน (petunidin) และเมลวิดิดิน (malvidin) ซึ่งจะแตกต่างกันในการไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) และเมทิลเลชัน (methylation) ที่วง B และอนุพันธ์ของเพลาร์โกนินและไซยานิดินในรงควัตถุทั่วไปจะผลิตสีแดงและสีม่วงตามลำดับ ในขณะที่อนุพันธ์ของเดลฟินิดินจะแสดงสีม่วงหรือสีน้ำเงิน (Surinder และคณะ, 2006)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเฟลโวนอยด์

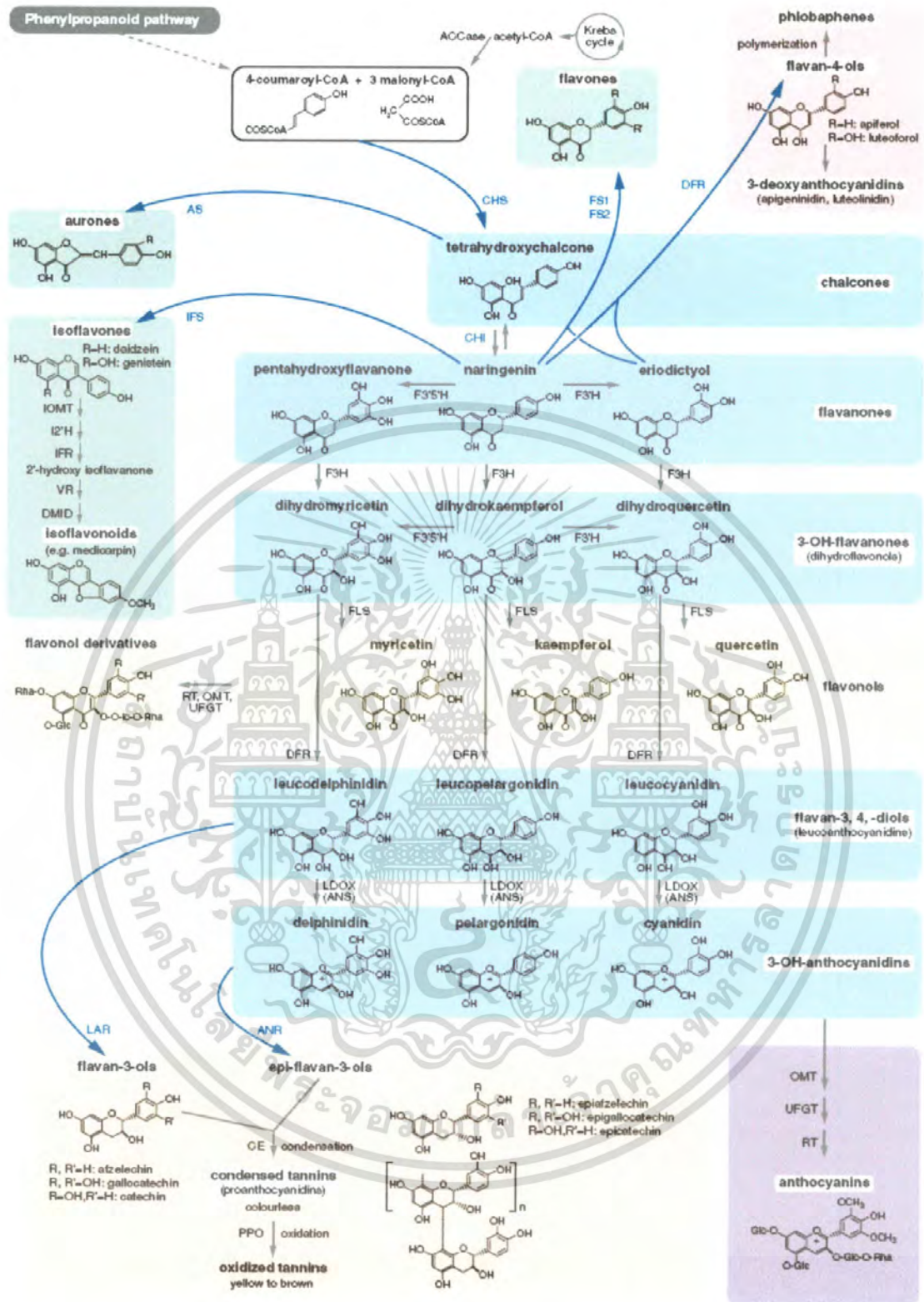
ที่มา: Shaw และคณะ (2006)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของไอโซเฟลโวนอยด์

ที่มา: Shaw และคณะ (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 วิถีชีวสังเคราะห์ฟีนอลโวนอยด์ ซึ่งมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องดังนี้ คือ

acetyl CoA carboxylase (ACCase); anthocyanidin synthase (ANS); aureusidin synthase (AS); dihydroflavonol 4-reductase (DFR); 7,2-dihydroxy, 4-Methoxyisoflavanol dehydratase (DMID); flavanone 3-hydroxylase (F3H); flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H); flavonoid 3'5'

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ขออภัยเป็นอย่างสูง และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

hydroxylase (F3'5'H); flavonol synthase (FLS); flavone synthase (FS1/FS2); isoflavone 2-hydroxylase (I2'H); isoflavone reductase (IFR); isoflavone synthase (IFS); isoflavone O-methyltransferase (IOMT); leucoanthocyanidin reductase (LAR); leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX); O-methyltransferase (OMT); RT, rhamnosyl transferase (RT); UDP flavonoid glucosyl transferase (UFGT); vestitone reductase (VR) .

ที่มา: Lepinice และคณะ (2006)

2.2 ยีนเฟลโวนอล ซินเทส (flavonol synthase หรือ FLS)

ในปี 1981 Britsch และคณะได้ทำการโคลนยีนที่ให้เอนไซม์เฟลโวนอล ซินเทส (Flavonol synthase, FLS) ซึ่งเป็นยีนในกลุ่มของ 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (2-ODD) จากจีโนม (cDNA) ของ *Arabidopsis thaliana* และนำมาแสดงออกใน *Escherichia coli* แล้วพบว่า ยีน FLS ใน *Arabidopsis thaliana* มีลักษณะเป็น multigene family ซึ่งมี 6 ยีน ที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับยีน FLS จากพืชชนิดอื่นในระดับสูง (Andrea และคณะ, 2002)

เอนไซม์ FLS เร่งการเปลี่ยน (2R, 3R) - ไดไฮโดรเฟลโวนอล (dihydroflavonols) เป็นเฟลโวนอล โดยการทำให้เกิดพันธะคู่ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ไดไฮโดรแคมเฟอร์อล (dihydrokaempferol) เป็นสับสเตรตที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ FLS ได้ดีที่สุด มีการสันนิษฐานว่าการเกิดพันธะคู่เกิดจากการดึงอะตอมของไฮโดรเจนซึ่งอยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกันมากกว่าการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งที่คาร์บอนตำแหน่ง 2 (2-hydroxylation) และตามด้วยการดึงน้ำออก (dehydration) ซึ่งเป็นกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเฟลวาโนน-3-ไฮดรอกซีเลส (flavanone 3-hydroxylase, F3H) พบกิจกรรมของเอนไซม์ FLS ในการสกัดสารจากดอกไม้ เช่น *Dianthus caryophyllus*, *Gerbera hybrida*, *Matthiola incana* และ *Petunia hybrida* และมีการโคลนยีน FLS ได้จากดอกไม้หลายชนิด จะพบกิจกรรมของเอนไซม์ FLS ระดับสูงในบริเวณช่อดอกไม้ที่ไม่มีสี ซึ่งเป็นส่วนที่ใกล้เคียงกับเริ่มการสังเคราะห์แอนโทไซยานินจึงทำให้มีการแข่งขันกันเพราะแย่งกันจับกับไดไฮโดรเฟลโวนอลซึ่งเป็นสับสเตรต และสับสเตรตนี้สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไฮโดรเฟลโวนอล รีดักเทส (dihydroflavonol reductase) ในวิถีสังเคราะห์ของเฟลโวนอยด์ อย่างไรก็ตามจะทำให้เฟลโวนอลเหล่านี้ช่วยให้เกิดสีในดอกไม้โดยร่วมกับรงควัตถุชนิดอื่นจึงทำให้มีสีค่อนข้างเหลือง เช่น เฟลโวนอล ไกลโคไซด์ (flavonol glycosides) และ แอนโทไซยานินมีความสำคัญทำให้เกิดการพัฒนาการเกิดสีในดอกไม้และผลไม้ นอกจากนี้เฟลโวนอล ไกลโคไซด์ยังมีสำคัญในการสร้างเกสรดอกไม้ (Oliver Yu และคณะ, 2006)

2.3 การโคลนยีน (gene cloning)

การโคลนยีนหรือการโคลนดีเอ็นเอ (DNA cloning) เป็นเทคนิคเบื้องต้นทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งหมายถึง การเพิ่มปริมาณยีนดีเอ็นเอที่มียีนที่ต้องการมากขึ้น โดยการเพิ่มปริมาณเซลล์ที่มียีนดีเอ็นเอดังกล่าวอยู่ หรืออาจจะเพิ่มปริมาณยีนดีเอ็นเอที่มียีนที่ต้องการในหลอดทดลองโดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) การโคลนยีนโดยการเพิ่มปริมาณเซลล์ที่มียีนดีเอ็นเอที่มียีนที่ต้องการนั้น ต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1. วิธีที่จะเชื่อมต่อดีเอ็นเอจาก 2 แหล่งเข้าด้วยกัน เพื่อสร้างดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA)
2. เวกเตอร์ (vector) หรือพาหะที่จะทำหน้าที่พาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนที่ต้องการเข้าไปในเซลล์ผู้รับ (recipient cell) และทำให้ยีนดีเอ็นเอดังกล่าวเพิ่มปริมาณโดยเวกเตอร์ดังกล่าวมีความสามารถคงตัวอยู่ในเซลล์ผู้รับและจำลองตัวเองได้ (self replication) และยังมียีนเครื่องหมาย (marker gene) สำหรับใช้คัดเลือกด้วย
3. วิธีการนำดีเอ็นเอสายผสมนั้นใส่ไปในเซลล์ของผู้รับ
4. วิธีที่ใช้คัดเลือกเซลล์ที่มีดีเอ็นเอสายผสมตามที่ต้องการ (ประคิษฐ์, 2541)

2.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme หรือ restriction endonuclease)

ปี ค.ศ.1978 คับเบิลยู อาร์เบอร์ (W. Arber) เอช สมิทธี (H. Smith) และ ดี. นาทานส์ (D. Nathans) ได้รับรางวัลโนเบลจากการเป็นผู้เริ่มต้นในการศึกษาเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะเหล่านี้แบคทีเรียใช้ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าไปในเซลล์ ปกติเป็นดีเอ็นเอของไวรัส เอนไซม์เหล่านี้จะตัดตรงตำแหน่งที่มีลำดับเบสจำเพาะทุกตำแหน่งบน โมเลกุลของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนี้จะมีลำดับเบสที่จำเพาะ 4-10 คู่เบสเรียกตำแหน่งนี้ว่า บริเวณจดจำ (recognition site)

เอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แบบ ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบที่ 2 นิยมใช้ในการโคลนยีน โดยจะตัด โมเลกุลของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะ และตำแหน่งดังกล่าวมักจะมีลำดับเบสสมมาตรกัน (two fold symmetry) ปัจจุบันแยกได้กว่า 400 ชนิด การเรียกชื่อเอนไซม์เหล่านี้ได้มาจากชื่อสกุล (genus) และชื่อของชนิด (species) โดยใช้ระบบอักษรสามตัว พิมพ์ตัวเอนอักษรตัวแรกชื่อของสกุล อักษรตัวที่ 2 และ 3 เป็นตัวพิมพ์เล็ก เป็นชื่อชนิดของแบคทีเรียที่แยกเอนไซม์นั้นได้ ถ้ามีชื่อของสายพันธุ์นั้นก็ใส่ตามมา และสุดท้ายเป็นเลขโรมันบอกลำดับของเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรียดังกล่าว เช่น

*Bam*HI ได้มาจาก *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ H แยกได้เป็นชนิดแรก

*Hind*III ได้มาจาก *Haemophilus influenzae* แยกได้เป็นชนิดที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์เหล่านี้จะตัดโมเลกุลดีเอ็นเอที่บริเวณจดจำได้ 2 แบบ เช่น เอนไซม์ *HindIII* จะตัดตรงตำแหน่งกลางของบริเวณจดจำหรือบริเวณตรงกันที่แกนสมมาตร ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายทั้งสองยาวเท่ากัน เรียกว่า ปลายทู่ (blunt end) แต่เอนไซม์ *BamHI* จะตัดทั้งสองสายดีเอ็นเอบริเวณจดจำที่ตำแหน่งเอียงกันไป 2 ข้างของแกนสมมาตร ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายสายเคี้ยวสั้นๆ เรียกว่า ปลายเหนียว (sticky end หรือ cohesive end) บริเวณจดจำของเอนไซม์บางชนิดไม่มีแกนสมมาตรและเอนไซม์อาจจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างจากบริเวณจดจำก็ได้ (ประคิษฐ์, 2541)

2.5 เวกเตอร์ (vector)

ในการโคลนนิ่งจำเป็นต้องอาศัยเวกเตอร์ที่ทำหน้าที่เป็นพาหะที่จะนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจหรือดีเอ็นเอแปลกปลอมเข้าไปในเซลล์ของผู้รับ และเวกเตอร์นั้นต้องมีคุณสมบัติที่สามารถจำลองโมเลกุลของตัวเองได้ในเซลล์ของผู้รับ และมีอินทรีย์เครื่องหมายสำหรับการคัดเลือก นอกจากนี้ควรมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือหลายชนิดเพียงตำแหน่งเดียวในโมเลกุลของเวกเตอร์ (unique site) ประมาณกลางทศวรรษ 1970-80 ได้มีการพัฒนาเวกเตอร์ขึ้นมาเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะเวกเตอร์ที่ใช้กับ *Escherichia coli* ซึ่งมีหลายประเภทได้แก่

2.5.1 พลาสมิด (plasmid)

พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซม พบในแบคทีเรียหลายชนิด มีโครงสร้างเป็นดีเอ็นเอวงแหวนเกลียวคู่ มีขนาดตั้งแต่ 1000 คู่เบส จนถึงมากกว่า 200000 คู่เบส หรือมีขนาดประมาณ 0.2-4% ของโครโมโซมแบคทีเรีย ในพลาสมิดจะมียีนที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์หรือสารต่างๆที่จะเป็นประโยชน์ต่อแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียที่มีพลาสมิดเหล่านี้มีคุณสมบัติพิเศษบางประการ เช่น มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะบางชนิด และใช้น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานได้ เป็นต้น

พลาสมิดมีคุณสมบัติที่สามารถจำลองโมเลกุลของตัวเองได้ (replicon) แต่พลาสมิดแต่ละชนิดจะมีการจำลองโมเลกุลของตัวเองต่างกัน พลาสมิดที่นิยมใช้ในสมัยแรกๆ คือ pBR 322

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาพลาสมิดขึ้นมาใช้จำนวนมาก ได้มีการรวมเอาตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิดที่ตัดพลาสมิดนั้นได้ตำแหน่งเดียวมารวมไว้ใกล้ๆกัน เรียกว่า มัลติคลoning site (multiple cloning site) ซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่จะได้เลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมในการสอดใส่ชิ้นดีเอ็นเอได้และพลาสมิดแบบใหม่นี้ช่วยให้สามารถคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดสายผสมได้ในขั้นตอนเดียวไม่ต้องทำ replica plating อีก นอกจากนี้ภายในพลาสมิดยังมีส่วนของยีนส่งเสริม (promoter gene) ของเอนไซม์บางชนิด เช่น T3, T7, SP6 อยู่ติดกับบริเวณที่ใช้โคลนนิ่ง เพื่อช่วยในกระบวนการถอดรหัสดีเอ็นเอที่สอดใส่เข้าไป ให้เกิดเป็นอาร์เอ็นเอในหลอดทดลอง และยังมีส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองโมเลกุลของเอนไซม์เป็นวงแหวนสายเคี้ยวด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 ฝาจแลมบ์ดา (lambda phage)

ฝาจแลมบ์ดาเป็นไวรัสที่อาศัยอยู่ในเซลล์ของ *E. coli* มีดีเอ็นเอเกลียวคู่ขนาดประมาณ 48,500 คู่เบส ข้อดีของฝาจแลมบ์ดาก็คือสามารถจะนำชิ้นดีเอ็นเอแปลกปลอมขนาดใหญ่กว่าการใช้พลาสมิด เช่น ฝาจซารอน 4 สามารถนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอแปลกปลอมขนาดประมาณ 12-20 กิโลเบส

2.5.3 คอสมิด (cosmid)

คอสมิดเป็นเวกเตอร์ลูกผสมมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งของพลาสมิดและฝาจแลมบ์ดา คอสมิดประกอบด้วยตำแหน่งคอสม (cos site) ของฝาจแลมบ์ดา เพื่อให้บรรจุคอสมิดสายผสมนี้ลงไปในโปรตีนห่อหุ้มของฝาจแลมบ์ดา ซึ่งคอสมิดนี้สามารถจะรับดีเอ็นเอแปลกปลอมขนาดใหญ่กว่าฝาจแลมบ์ดา คือประมาณ 40-50 กิโลเบส

2.5.4 ฝาจ M13 (M13 phage)

จีโนมของฝาจชนิดนี้เป็นดีเอ็นเอวงแหวนสายเดี่ยว (single strand DNA) สามารถนำมาใช้เป็นเวกเตอร์ได้ มีประโยชน์ในการชักนำให้เกิดการกลายของยีนโคอินหนึ่งได้ ปัจจุบันไม่นิยมใช้เพราะสามารถใช้พลาสมิดแทนได้

2.5.5 เวกเตอร์ร่วม (shuttle vector)

ประกอบด้วยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ควบคุมการจำลอง โโมเลกุลในสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด โดยทั่วไปจะเป็น *E. coli* กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น แบคทีเรียชนิดอื่น ยีสต์ หรือยูคาริโอท มีประโยชน์ในการโคลนยีน และการศึกษาการแสดงออกของยีนของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (ประคิษฐ์, 2541)

2.6 การเชื่อมต่อโมเลกุลของดีเอ็นเอ

การเชื่อมต่อโมเลกุลระหว่างดีเอ็นเอที่สนใจหรือ และดีเอ็นเอของเวกเตอร์ที่ใช้เป็นพาหะ เพื่อจะผลิตดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) มีหลายวิธี ได้แก่ การเชื่อมต่อระหว่างปลายเหนียว (cohesive end ligation) ของดีเอ็นเอที่สนใจและของเวกเตอร์ โดยปลายเหนียวที่เกิดขึ้นจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน ปลายเหนียวจะมาจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนก่อน และจะเชื่อมต่อกันสนิทโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกส (DNA ligase)

นอกจากนี้อาจจะเป็นการเชื่อมต่อโมเลกุลดีเอ็นเอที่สนใจ และของเวกเตอร์ ซึ่งมีปลายทุ่ เช่นเดียวกัน (blunt end ligation) ซึ่งมีหลายวิธีดังนี้

2.6.1 การเติมนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกันหลายๆ นิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' (homopolymer tailing)

วิธีนี้ต้องอาศัยเอนไซม์เทอร์มินอล นิวคลีโอไทด์ ทรานสเฟอเรส (terminal nucleotidyl transferase) เข้ามาช่วยในการนำนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกันหลายๆ นิวคลีโอไทด์ นิวคลีโอไทด์เข้าไปต่อที่ปลาย 3' ของเวกเตอร์และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการโคลน

2.6.2 การเชื่อมต่อปลายทู่เข้ากันด้วยกันโดยตรง (blunt end ligation)

วิธีนี้เป็นการเชื่อมต่อปลายทู่ระหว่างดีเอ็นเอของพลาสมิดหรือเวกเตอร์ และดีเอ็นเอที่ต้องการโคลน ซึ่งเกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

2.6.3 ดีเอ็นเอ ลิงเคอร์ (DNA linker)

วิธีนี้ใช้ดีเอ็นเอสายสั้นประมาณ 12 คู่เบสที่มีตำแหน่งที่จะตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใดชนิดหนึ่ง ซึ่งเรียกส่วนนี้ว่า ดีเอ็นเอ ลิงเคอร์ เติมเข้าที่ปลายทู่ของพลาสมิดและดีเอ็นเอที่ต้องการโคลน (ประคิษฐ์, 2541)

2.7 โพลีเมอเรส เชน รีแอคชัน (PCR)

ในปี ค.ศ.1985 ได้มีการพัฒนาเทคนิคในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยไม่ต้องนำไปขยายหรือเพิ่มภายในเซลล์ของแบคทีเรียหรือการโคลน เทคนิคดังกล่าวนี้เรียกว่า โพลีเมอเรส เชน รีแอคชัน โดยเริ่มต้นต้องทราบลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีนหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณเสียก่อน อาจจะทราบเฉพาะช่วงปลายของยีนหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นทั้งหมดก็ได้ จากนั้นสังเคราะห์สายเริ่มต้น (primer) 2 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ (oligonucleotide) โดยทั่วไปมีความยาวประมาณ 20-35 เบส สายเริ่มต้นนี้จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กับส่วนปลาย 3' ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณทั้งสองด้าน โดยที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการให้เพิ่มปริมาณนั้นไม่จำเป็นต้องทำบริสุทธิ์มากนัก และไม่ต้องมีปริมาณมาก ก็สามารถจะใช้เทคนิค PCR นี้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดังกล่าวได้

นำดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการเพิ่มปริมาณหรือดีเอ็นเอทั้งหมดที่แยกได้จากเซลล์ (genomic DNA) สายเริ่มต้นปริมาณมากเกินพอ และเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (DNA polymerase) มาใส่ในหลอดทดลองเดียวกัน เมื่อให้ความร้อนสูงขึ้น ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณซึ่งเป็นเกลียวคู่จะแยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว แล้วลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว จะทำให้สายเริ่มต้นซึ่งมีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลาย 3' ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือยีนที่ต้องการเข้าไปจับกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวได้อย่างถูกต้อง และอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส จะทำให้ได้โมเลกุลดีเอ็นเอเกลียวคู่เกิดขึ้น กระบวนการดังกล่าวจะเกิดขึ้นซ้ำแล้วซ้ำอีกหลายรอบ ทุกๆ รอบที่เกิดปฏิกิริยาปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าของที่มีอยู่เดิม เมื่อทำซ้ำกัน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลายรอบปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มเป็น 2^n เท่า เมื่อ n คือจำนวนรอบที่ทำซ้ำ เช่น ถ้าทำซ้ำ 30 รอบ จะได้ปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการประมาณ 10 ล้านโมเลกุล ด้วยปริมาณของดีเอ็นเอขนาดจะตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส หรือนำมาวิเคราะห์หาลำดับของนิวคลีโอไทด์ต่อไป

การใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจาก *E. coli* หรือจากเซลล์ชนิดอื่นๆ เมื่อใช้อุณหภูมิสูงถึง 95 องศาเซลเซียส เพื่อให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่ แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยวนั้น เอนไซม์ดังกล่าวจะเสียดูดสมบัติไป ต่อมาได้มีการค้นพบเอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Taq DNA polymerase) จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* ซึ่งสามารถทนความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียสได้ จึงนิยมนำมาใช้ในการทำ PCR เพราะประหยัดเอนไซม์และเวลาเนื่องจากไม่จำเป็นต้องเติมเอนไซม์ในการสังเคราะห์แต่ละรอบ เติมเพียงครั้งเดียวแล้วค่อยเปลี่ยนอุณหภูมิเท่านั้น (ประดิษฐ์, 2541)

2.8 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) เป็นเทคนิคที่อาศัยคุณสมบัติการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรส ซึ่งอยู่ในบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ประมาณ 8 ที่ pH นี้ดีเอ็นเอจะประจุลบเนื่องจากการแตกตัวของหมู่ฟอสเฟต ส่งผลให้การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของดีเอ็นเอขึ้นกับขนาดและรูปร่างของดีเอ็นเอ โดยอัตราส่วนของประจุลบต่อมวลของดีเอ็นเอ โมเลกุลเล็กหรือใหญ่จะมีขนาดเท่ากัน ดังนั้นอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจึงเป็นผลของขนาดดีเอ็นเอโดยตรง โมเลกุลขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าขนาดเล็ก นอกจากนี้ดีเอ็นเอขนาดโมเลกุลเท่ากันแต่รูปร่างต่างกันจะมีผลทำให้เคลื่อนที่ต่างกันด้วย เช่น พลาสมิดดีเอ็นเอ ซึ่งอยู่ในรูปซูเปอร์คอยล์ (supercoiled form) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่ารูปร่างเส้นตรง (linear form) รูปร่างรีแลกซ์ (relaxed form) ความเข้มข้นของเจลจะเป็นตัวกำหนดขนาดของรูพรุนภายในเจล สำหรับให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ผ่าน ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ควรใช้เจลความเข้มข้นต่ำ (กนกพร, 2550)

2.9 การถ่ายโอนยีนในพืช

การถ่ายโอนยีนในพืช จะต้องอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้ามารองรับ โดยสามารถจะเลี้ยงส่วนต่างๆของพืช ตั้งแต่ในระดับเซลล์โปรโตพลาสต์ ใบ ราก ลำต้น กิ่ง ดอก อับเรณู คัพภะ จนเกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ การถ่ายโอนยีนในพืชทำได้หลายวิธี ได้แก่ การถ่ายฝากยีนโดยตรงผ่านทางโปรโตพลาสต์ โดยใช้สารเคมีโพลีเอทิลีน ไกลคอล (polyethylene glycol หรือ PEG) ช่วย หรือกระแสไฟฟ้า (electroporation) หรือใช้เข็มฉีดยา (microinjection) แต่ที่ค่อนข้างจะได้ผล คือ ใช้เครื่องยิง (particle gun หรือ microprojectile bombardment หรือ biolistic technique) ซึ่งสามารถจะยิงยีนหรือดีเอ็นเอที่ต้องการเข้าไปในเนื้อเยื่อใดๆของพืชก็ได้ ไม่จำเป็นต้องใช้

โพรโตพลาสต์ และทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนนั้น จนกระทั่ง ได้ต้นที่สมบูรณ์ นอกจากนี้ อาจจะถ่ายโอนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งได้ผลในพืชใบเลี้ยงคู่หลายชนิด

วัตถุประสงค์ของการถ่ายฝากโอนยีนในพืช คือ การสร้างพืชแปลงพันธุ์ (transgenic plant) ที่มีลักษณะต่างๆ เช่น ด้านทานต่อโรคหรือแมลงบางชนิด ด้านทานต่อไวรัส พืชทนแล้ง พืชต้านทานต่อยากำจัดวัชพืชบางชนิด พืชที่มีโปรตีนสูง หรือการศึกษางานของยีนหรือกลไกอื่นๆ

2.9.1 การถ่ายโอนยีนในพืชโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

การถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชได้นำมาไปสู่การปฏิวัติการศึกษาชีววิทยาด้านพืช และให้ผลผลิตซึ่งแตกต่างไปจากการผสมพันธุ์พืชโดยธรรมชาติ ในปัจจุบัน ได้มีการผลิตพืชต้านทานต่อศัตรูพืช การพัฒนาผลผลิตพืช และอื่นๆอีกมากมาย ซึ่งแนวทางพัฒนาสายพันธุ์พืชนี้จะขึ้นอยู่กับความรู้เกี่ยวกับกลไกการทำงานภายในเซลล์ของพืช อะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) เป็นระบบในการถ่ายโอนยีนซึ่งใช้มากที่สุดในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืช ในสภาพธรรมชาติอะโกรแบคทีเรียจะก่อให้เกิดโรคในพืชใบเลี้ยงคู่ โดยมีผลในการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในพืช ในกระบวนการก่อให้เกิดโรคพืชนั้น อะโกรแบคทีเรียจะถ่ายโอนยีนส่วนที่เรียกว่า ทีดีเอ็นเอ (T-DNA) เข้าไปสู่เซลล์พืช และส่วนทีดีเอ็นเอนี้จะเข้าร่วมกับโครโมโซมพืชอย่างถาวร ยีนในส่วนของทีดีเอ็นเอจะถอดและแปลรหัสให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งจะมีผลต่อการผลิตฮอร์โมนในพืชอย่างไม่เหมาะสม และทำให้เกิดการเจริญเป็นเนื้อเยื่อ (tumor) นอกจากนี้เซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนนี้จะผลิตโอปีน (opine) ซึ่งเป็นแหล่งอาหารสำหรับแบคทีเรีย

แนวทางการใช้ประโยชน์จากอะโกรแบคทีเรียในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชโดยเปลี่ยนแปลงเวกเตอร์ให้สามารถถ่ายโอนยีนทีดีเอ็นเอเข้าสู่พืช แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดการเจริญเป็นก้อนเนื้อเยื่อผิดปกติ เรียกแบคทีเรียที่มีเวกเตอร์ชนิดนี้ว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ดิสอาร์ม (disarmed strain) เราสามารถถ่ายโอนยีนที่เราสนใจเข้าสู่พืช โดยแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เข้าไปในทีดีเอ็นเอของอะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ดิสอาร์มแล้วจึงนำอะโกรแบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายโอนยีน บ่มกับชิ้นเนื้อเยื่อพืชเพื่อให้ส่วนของทีดีเอ็นเอเข้าร่วมกับโครโมโซมของพืช เซลล์พืชนั้นจะสามารถพัฒนากลับมาเป็นต้นใหม่ โดยอาศัยคุณสมบัติที่เรียกว่า โททิโพเทนซี ในสถานะแวดล้อมที่เหมาะสม จึงได้ต้นแปลงพันธุ์ที่มียีนใหม่ (ประดิษฐ์, 2541)

2.10 เชื้อราทำให้เกิดโรคพืช

โรคพืช คือ การเปลี่ยนแปลงใดๆ ที่ผิดไปจากพืชปกติ เกิดจากการถูกรบกวนอย่างต่อเนื่อง หากเกิดจากสิ่งมีชีวิตเรียกว่า โรคมื้อเชื้อ (parasitic disease) สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ พืช และสัตว์ที่มีขนาดเล็ก หลายชนิดเป็นเชื้อสาเหตุที่ทำให้พืชผิดปกติไป สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำที่เป็นสาเหตุสำคัญ เช่น รา แบคทีเรีย ไวรัส ไฟโตพลาสมา (phytoplasma) และไวรอยด์ (viroid) และสาเหตุที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต ได้แก่ สภาพแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการปลูกพืชนั้นๆ ไม่เหมาะสม โรคพืชที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคอาจเรียกว่าโรคติดเชื้อหรือโรคระบาด และโรคพืชที่เกิดจากสภาพแวดล้อมเรียกว่า โรคไม่ติดเชื้อหรือโรคที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต (ทวิชชัย, 2540)

ตัวอย่างเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคพืช

2.10.1 เชื้อรา *Rhizopus* sp.

ราในجنัส *Rhizopus* มีประมาณ 14 สปีชีส์ เป็นเชื้อราที่พบทั่วไปในดินและฝุ่นผงในบ้าน และพบบ่อยในเครื่องปรับอากาศ เป็นสาเหตุของโรคเน่าและของหัวมันเทศ ตลอดจนผลไม้ต่างๆ บางพวกเป็นสาเหตุของโรคไซโกมาโยโคซิส (zygomycosis) ของคนและสัตว์บางชนิด ใช้ประโยชน์ในการผลิตแอลกอฮอล์ กรดฟูมาริก และกรดแลกติก เชื้อรา *R. oligosporus* ใช้ในการทำอาหารหมักเทมเป้ (tempeh) ในประเทศอินโดนีเซีย

2.10.1.1 การจำแนกทางวิทยาศาสตร์

Kingdom : Fungi

Division : Zygomycota

Class : Zygomycetes

Order : Mucorales

Family : Mucoraceae

Genus : *Rhizopus*

2.10.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะสำคัญของราในجنัส *Rhizopus* คือ มีการสร้างไรซอยด์ (rhizoid) ตรงบริเวณที่สร้างก้านสปอร์แรงจิโอฟอร์ (sporangiophore) ซึ่งมักเกิดรวมกันเป็นกลุ่ม แต่ละกลุ่มเชื่อมโยงกันด้วยสโตลอน (stolon) สปอร์เป็นแบบคอลลูเมลลา (columellate) คือ มีรูปร่างกลมหรือเกือบกลม เกิดที่ปลายของก้านสปอร์แรงจิโอฟอร์ การสืบพันธุ์เป็นแบบอาศัยเพศสร้างสปอร์แรงจิโอสปอร์ (sporangiospores) (วิชัย, 2546)

2.10.1.3 ลักษณะทางชีววิทยา

เชื้อรา *Rhizopus* sp. มีการเจริญที่เร็วมากที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และการสร้างสปอร์ถูกยับยั้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10.1.4 อาการของโรค

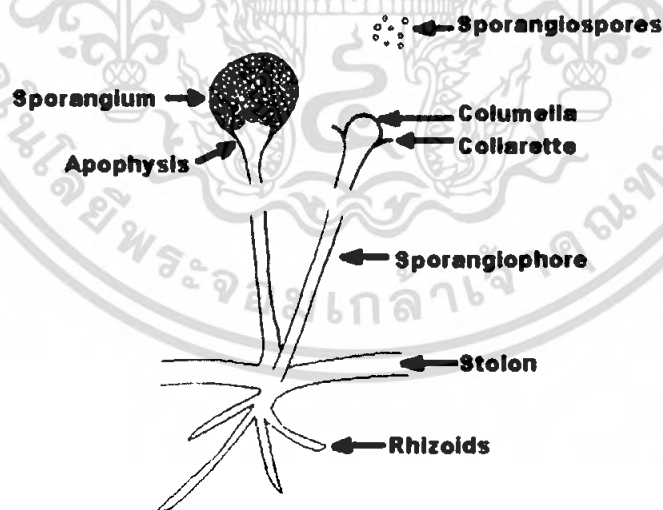
1.) โรค *Rhizopus solf rot* ในผลไม้

โรคที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้พบได้ทั่วไปกับผัก ผลไม้ ไม้ดอก หลังการเกี่ยวเก็บแล้ว ซึ่งอาจอยู่ในระหว่างการขนส่ง เก็บรักษาและวางจำหน่าย เช่น มันเทศ สตรอเบอรี่ ท้อ แดง ถั่ว อาการของโรคนี้ เนื้อของส่วนที่เป็นโรคช้ำ ชุ่มน้ำ ต่อมาความชื้นจะระเหยออกไปทีละน้อย จนผิวหดย่น หากส่วนที่เป็นโรคที่ชุ่มน้ำนั้นอยู่ระหว่างการขนส่ง ผิวอาจแตกและมีน้ำไหลออก สีขาวถึงเหลือง เชื้อราจะเจริญออกมาทางบาดแผลมีสปอร์แรงจีโอฟอร์สืทาคลุม และเกิดสปอร์แรงจีโอฟอร์สสีดำที่ปลายการเจริญของเชื้อรานี้อาจลุกลามไปยังผิวของหีบห่อที่ใช้บรรจุและสัมผัสกับส่วนของพืชที่เป็นโรคได้ เนื้อเยื่อของพืชที่เป็นโรคนี้อาจส่งกลิ่นเหม็น เนื่องจากมียีสต์และแบคทีเรียต่างๆเข้าทำลายซ้ำเติม (ไพโรจน์, 2525)

2.) โรค *Rhizopus solf rot* ในมันเทศ

เชื้อโรคจะเข้าสู่พืชทางรากอ่อน แล้วจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เมื่อมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญ และเมื่อเข้าสู่รากแล้วจะเจริญเร็วแล้วทำลายรากโดยใช้เวลาเพียงเล็กน้อย หลังจากนั้นก็เริ่มทำลายหัวมันเทศจนเน่าและ นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อรานี้ก่อให้เกิดโรคในหัวบีทและต้นยาสูบ โดยการเข้าไปกระทำทางรากของเชื้อรา *R. arrhizus*

(<http://www.britannica.com/eb/topic-501518/Rhizopus-stolonifer>)



รูปที่ 2.3 แสดงส่วนประกอบของเชื้อรา *Rhizopus* sp.

ที่มา : <http://en.wikipedia.org/wiki/Rhizopus>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10.2 เชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

S. rolfsii เป็นเชื้อราที่พบในดินทำให้เกิดโรคน้ำ (blight) พบแพร่หลายในการเกษตรและการปลูกพืชสวน พืชผล วัชพืชและป่าไม้ เป็นเชื้อราที่มีการแพร่กระจายไปทั่วโลก (Flores-Moctezuma และคณะ, 2006) และยังเป็นสาเหตุของโรค damping off ของกล้าพืช โรคน้ำและโคนเน่าของพืชหลายชนิด

2.10.2.1 การจำแนกทางวิทยาศาสตร์

Kingdom : Fungi

Division : Basidiomyceta

Class : Basidiomycetes

Order : Agaricales

Family : Typhulaceae

Genus : *Sclerotium*

Species : *rolfsii*

2.10.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เชื้อรา *S. rolfsii* เมื่ออ่อนจะสร้างเส้นใยสีขาวหรือสีอ่อนมีแคมป์คอนเน็คชัน (clamp connection) เจริญเติบโตรวดเร็ว และสร้างสเคลอโรเทียม (sclerotium) สีน้ำตาลดำถึงสีดำเมื่อเจริญเต็มที่ มีลักษณะเป็นเม็ดกลมประกอบด้วยเส้นใยอัดตัวกันเป็นชั้นหลายชั้น และมีลักษณะเนื้อเยื่อแบบซูโคพารเรนโคมา (pseudoparenchyma) (วิจัย, 2546)

2.10.2.3 ลักษณะทางชีววิทยา

เชื้อรา *S. rolfsii* เหมือนกับกลุ่ม *Athelia rolfsii* (ระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ) และ *S. delphinii* (เหมือนกันในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของ *Corticium rolfsii* และ *Pellicularia rolfsii*)

S. rolfsii เจริญ ดำรงชีพและเข้าสู่พืชในระดับดิน ก่อนเชื้อโรคจะแทรกซึมเข้าสู่โฮสต์ มันจะผลิตไมซีเลียม (mycelium) จำนวนมากบนผิวหน้าพืช และจะเข้ายึดพืชภายใน 2 ถึง 10 วัน การแทรกเข้าเนื้อเยื่อโฮสต์เกิดขึ้นเมื่อเชื้อราผลิตเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ภายนอกของโฮสต์ให้เสื่อมลงซึ่งทำให้เนื้อเยื่อของโฮสต์เน่าเปื่อย นอกจากนี้การผลิตไมซีเลียมจะทำให้เกิดสเคลอโรเทียม (sclerotia) ซึ่งจะเจริญขึ้นเมื่อมีสิ่งแวดล้อมเอื้ออำนวย

การสร้างสเคลอโรเทียมเกิดจากการแตกออกของเส้นใย (hypha) อันใดอันหนึ่ง ลักษณะการสร้างเส้นใยมีการเจริญแบบเส้นใยต่อกันจากผิวหน้าของสเคลอโรเทียม ในเวลาที่มีการสร้างจะเกิดการรวมกลุ่มของไมซีเลียมแล้วแตกออกผ่านผิวหน้าสเคลอโรเทียม ซึ่งการสร้างไมซีเลีย (mycelia) จำนวนมากจะต้องใช้อาหารพื้นฐานที่จำเป็น คือ อินทรีย์วัตถุที่ไม่เคลื่อนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การดำรงชีพของ *S. rolfii* ในสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม จะเจริญดีที่สุดในดินที่เป็นกรด pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของไมซีเลีย คือ 3.0 ถึง 5.0 และการสร้างสเคอโรเทียที่ pH ระหว่าง 2.0 และ 5.0 ซึ่งการสร้างจะถูกยับยั้งเมื่อ pH สูงกว่า 7.0 อุณหภูมิที่ไมซีเลียเจริญได้มากที่สุด ระหว่าง 25 องศาเซลเซียสและ 35 องศาเซลเซียส เจริญได้น้อยหรือไม่เจริญเลยที่ 10 องศาเซลเซียสหรือ 40 องศาเซลเซียส ไมซีเลียมจะตายที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แต่สเคอโรเทียสามารถอยู่รอดได้ที่ อุณหภูมิต่ำประมาณ -10 องศาเซลเซียสได้ และต้องการความชื้นสูงสุดในการเจริญ เมื่อได้รับแสงอย่างต่อเนื่อง ไมซีเลียจะเจริญและเกิดการสร้างสเคอโรเทียอย่างรวดเร็ว แต่การสร้างก็เกิดขึ้นได้เมื่อ ไม่มีแสงถ้ามีสิ่งที่มีเอื้ออำนวยต่อการเจริญ

ในระหว่างการสืบพันธุ์จะผลิตสปอร์ที่มี 2 หรือ 4 สปอร์บนเส้นใย สปอร์มีผนังเซลล์บาง สปอร์ไม่มีสี สปอร์จะสามารถผลิตได้ในจำนวนมากถ้ามีแสงและสามารถแพร่กระจายไปในอากาศ ได้ไกล

2.10.2.4 แหล่งที่พบ

พบได้ในเขตร้อน (tropical) เขตกึ่งร้อนกึ่งอบอุ่น (subtropical) และพบได้ในเขตอบอุ่น อื่นๆ มีรายงานการพบที่ทางใต้ของประเทศสหรัฐอเมริกาและศูนย์กลางของประเทศอเมริกาใต้ พบในทวีปแอฟริกา เอเชีย ออสเตรเลียและยุโรป มีโฮสต์ (host) พืชของ *S. rolfii* อยู่ทั่วโลก เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีรายงานว่าพบพืชประมาณ 500 ชนิดที่เป็นโฮสต์และในประเทศนิวซีแลนด์ พบพืช 44 ชนิดที่เป็นโฮสต์ ส่วนในประเทศเม็กซิโก ไม่มีการรายงานการพบเพราะว่าเป็นเชื้อโรค ตัวสำคัญที่พบอยู่แล้ว (Flores-Moctezuma และคณะ, 2006)

2.10.2.5 อาการของโรค

S. rolfii เริ่มเข้าสู่โฮสต์ทางลำต้นและส่วนของพืช ได้แก่ ราก ผล ก้านใบ ใบและดอกที่สัมผัสกับดิน อาการเริ่มแรกเมื่อเชื้อเข้าไปจะมีสีน้ำตาลดำบริเวณขอบบาดแผล ลักษณะแรกที่สังเกตเห็นได้ชัด คือ ใบพืชมีสีเหลืองเข้มมากขึ้นและต่อมาก็เหี่ยวแห้ง ซึ่งลักษณะนี้เกิดจากเชื้อราที่มีการผลิตเส้นใยสีขาวอย่างสมบูรณ์ ในเชื้อเหี่ยวและดินที่เชื้อเข้าไปจะพบไมซีเลียมมีลักษณะเป็นฟู เบาและนุ่ม การผลิตไมซีเลียมจะสัมพันธ์กับขนาดของสเคอโรเทียที่มีลักษณะค่อนข้างกลม สีขาว เมื่อยังไม่แก่และกลายเป็นสีน้ำตาลดำถึงดำเมื่อแก่ เชื้อรานี้จะผลิตสปอร์ที่เรียกว่า เบสิดิโอสปอร์ (basidiospores) ในระหว่างการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งจะ ไม่ค่อยพบในบริเวณขอบบาดแผลที่เปื่อยขึ้น

เมล็ดพืชจะมีการตอบสนองเร็วต่อเชื้อและตายอย่างรวดเร็ว ในพืชที่อายุมากเนื้อไม้จะถูกบาดแผลล้อมรอบก่อนและตายในที่สุด ลักษณะของเนื้อเยื่อที่ถูกบุกรุกจะมีสีน้ำตาลอ่อนและอ่อนนุ่มลง แต่ไม่เปื่อยขึ้น

2.10.2.6 โฮสต์ (host) ที่อาศัย

พบโฮสต์ที่ตอบสนองต่อ *S. rolfii* ที่แพร่หลายในอัตราส่วนน้อยกว่า 500 สปอร์ใน 100 แพนมีลี โฮสต์ทั่วไปที่พบมากที่สุด ได้แก่ พริกขี้หนูและพริกขี้หนู และพริกขี้หนูแดง

โฮสต์ที่รู้จักในประเทศสวาวย ได้แก่ คาร์เนชัน (*Dianthus caryophyllus* L.) ข้าวโอ๊ตหรือข้าวโพด (*Zea mays* L.) มะเขือ (*Solanum melongena* L.) กระจับ (*Hibiscus esculentus* L.) ถั่ว (*Phaseolus* sp.) อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) ถั่วลิสง (*Capsicum frutescens* L.) มันเทศ (*Ipomoea batatas* (L.) Poir) เหือก (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) และแตงโม (*Citrullus vulgaris* Schrad.)

โฮสต์อื่นๆที่มีรายงานการพบทั่วโลก ได้แก่ พริกขี้หนู พริกดอกจำพวกวาน กล้วย ถั่ว บีท กระหล่ำปลี แครอท กระหล่ำดอก ผักชี กวางเฟ ผ่าย แตงกวา ผักกาดเขียว มังคุด ต้นหอม มันฝรั่ง ไพนแอปเปิ้ล มาสตา์ด ถั่วเหลือง ต้นขาสูบ ต้นทิวลิป สนามหญ้า และมันแกว

2.10.2.7 การระบาดของโรค

ไมซีเลียของ *S. rolfii* จะเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อหรือซากพืช เพื่อเป็นแหล่งอาหารในฤดูหนาว สเคอโรทีเยปกติจะมีความทนทานอากาศหนาวได้ สามารถที่จะแพร่กระจายในดินปนเปื้อน อุปรณ์ น้ำ (โดยเฉพาะน้ำที่ใช้ชลประทาน) ลมและเมล็ดพืช นอกจากนี้ยังพบได้ในแกะ ปศุสัตว์ และสามารถแพร่กระจายได้ในเรือ (http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/Crop/Type/s_rolfs.htm)



รูปที่ 2.4 โคลนินของ *Sclerotium rolfii* บนอาหาร PDA
ที่มา : <http://www.bspp.org.uk/ndr/jan2004/2003-57.asp>

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

- 3.1.1 ต้นยาสูบ (*Nicotina tobaccum*)
- 3.1.2 ต้นอะราบิโดปซิส (*Arabidopsis thaliana*)
- 3.1.3 เชื้อ *Rhizopus* sp.
- 3.1.4 เชื้อ *Sclerotium rolfsii*
- 3.1.5 เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*
- 3.1.6 สารเคมี
 - 3.1.6.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
 - 3.1.6.2 สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ
 - 3.1.6.3 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อและทำการเลือกโคลน
 - 3.1.6.4 สารเคมีที่ใช้ในการถ่ายโอนยีน
 - 3.1.6.5 สารเคมีที่ใช้ในการอิเล็กทรอนิกส์
 - 3.1.6.6 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสาร
- 3.1.7 อุปกรณ์ที่ใช้
 - 3.1.7.1 ประเภทเครื่องแก้ว
 - ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
 - จาน Petri-dish
 - แ่งแก้วคน
 - ขวดวัดปริมาตร
 - บีกเกอร์
 - กระบอกตวง
 - ปีเปต
 - 3.1.7.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ
 - หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
 - เครื่องสเปกโฟโตมิเตอร์
 - เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
 - เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่ง **vortex** สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เครื่องชั่งสาร
- กล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์
- คิวเวต
- haemocytometer
- ไมโครปิเปตและทิวขนาดต่างๆ
- เข็มฉีดยา
- เต้าไมโครเวฟ
- ตู้เย็น
- water bath
- กระจกครอบชั่งสาร
- ถังพลาสติก
- มีด
- ปากคีบ (forcep)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)
- ตู้อบ
- ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.8 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1.9 ห้องเครื่องมือรวม

3.1.10 ห้องสารเคมีรวม

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การโคลนยีน *FLS* จากต้นอะราบิโดปซิส

3.2.1.1 การเพิ่มจำนวนยีน *FLS* ด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบการเพิ่มปริมาณยีน

การเพิ่มปริมาณยีน *FLS* โดยใช้เทคนิค PCR ในช่วง open reading frame (ORF) และไพรเมอร์ที่เหมาะสม ซึ่งมีปฏิกิริยาของการทำ PCR ดังนี้

cDNA จากต้นอะราบิโดปซิส	1	ไมโครลิตร
dNTP(10 mM)	1	ไมโครลิตร
10X buffer	5	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ (25 mM)	5	ไมโครลิตร
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (10 μ M)	1	ไมโครลิตร
รีเวิร์สไพรเมอร์(10 μ M)	1	ไมโครลิตร
แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (1.25U/50 μ l)	0.25	ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำดีอินซูลินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	35.75	ไมโครลิตร
รวม	50	ไมโครลิตร

มีสภาวะในการทำ PCR คือ การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพตามธรรมชาติ (denaturing) ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที การทำให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอ (annealing) ที่ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที และทำการต่อเติมสายดีเอ็นเอ (extension) จากไพรเมอร์โดยการทำงานของ เอนไซม์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยทำทั้งหมด 40 รอบ

ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับยีน *FLS* มีลำดับเบสดังนี้

ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ 5'- CGGGATCCATGGAGGTCGAAAGAGTCCAA-3'

รีเวอร์สไพรเมอร์ 5'- GCGGATCCTCAATCCAGAGGAAGTTTATT-3'

ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน หลังจากนั้นจึงแยกชิ้นส่วนยีน *FLS* จากเจลอะกาโรส โดยวิธีตาม GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit ของ Amersham Pharmacia Biotech

3.2.1.2 ทำการเชื่อมต่อ และถ่ายโอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ *E. coli*

ทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ที่มีขนาดตามต้องการจาก เจล และเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ pGEM โดยใช้เทคนิค T-A cloning โดยปฏิกิริยา ประกอบด้วย

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แยกมาจากการทำ PCR	3.25	ไมโครลิตร
เวกเตอร์ pGEM	1	ไมโครลิตร
2 X ligation buffer	5	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (3U/μl)	1	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

บ่ม 4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วบ่มที่ 22 องศาเซลเซียส ประมาณ 4 ชั่วโมงก่อน การถ่ายโอน

ถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ เข้าสู่ *E. coli* โดยเลือก โคลนีนีที่น่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนยีนบนอาหาร แข็ง LB (ภาคผนวก ก) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินร่วมกับ IPTG และ X-gal บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และทำการสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกไว้ โดยก่อนนำมาสกัดพลาสมิดให้ทำการ จุ่ม โคลนนี้ด้วยบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินร่วมกับ IPTG และ X-gal ลงในอาหาร เหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะชนิดเดียวกัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วนำมาสกัดพลาสมิด ตรวจสอบผลการสกัดพลาสมิดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่มี ชิ้นส่วนดีเอ็นเอแทรกอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการพิสูจน์โคลนที่ได้ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

พลาสมิดที่คัดเลือกได้	2	ไมโครลิตร
10X buffer E	1	ไมโครลิตร
<i>Bam</i> HI (10 U/ μ l)	0.15	ไมโครลิตร
BSA	0.1	ไมโครลิตร
น้ำคือนไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	6.75	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

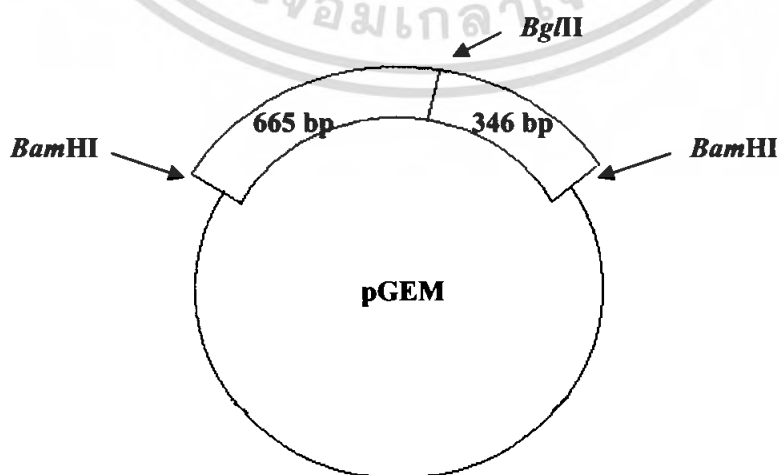
บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยการ
ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.1.3 ทำการพิสูจน์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pGEM

ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิดว่าเป็นยีน *FLS* โดยการตัดด้วย
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Bgl* II มีปฏิกิริยาดังนี้

ดีเอ็นเอ	3	ไมโครลิตร
10X buffer E	1	ไมโครลิตร
<i>Bam</i> HI (10 U/ μ l)	0.15	ไมโครลิตร
<i>Bgl</i> II (10 U/ μ l)	0.15	ไมโครลิตร
BSA	0.1	ไมโครลิตร
น้ำคือนไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	6	ไมโครลิตร
รวม	10.4	ไมโครลิตร

บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยการ
ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน จากข้อมูลของ GenBank *FLS*
ไม่มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *Bam*HI แต่มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *Bgl*II ซึ่งแสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงจุดตัดของเอนไซม์บนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *FLS*
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์และห้ามเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 การเชื่อมต่ोजีนส่วนดีเอ็นเอเข้ากับ *Agrobacterium* expression vector

3.2.2.1 การเตรียมจีสวนดีเอ็นเอ

เมื่อพบว่าจีสวนดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pGEM เป็นชิ้น *FLS* ให้แยกจีสวนดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI มีปฏิกิริยาดังนี้

พลาสมิดที่มีจีสวนดีเอ็นเอ <i>FLS</i>	60	ไมโครลิตร
10 X buffer E	10	ไมโครลิตร
<i>Bam</i> HI (10 U/ μ l)	5	ไมโครลิตร
BSA	1	ไมโครลิตร
น้ำคือน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	24	ไมโครลิตร
รวม	100	ไมโครลิตร

บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วตรวจสอบขนาดของจีสวนดีเอ็นเอด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีตาม GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit ของ Amersham Pharmacia Biotech และละลายดีเอ็นเอในน้ำ 18 ไมโครลิตร

3.2.2.2 การเชื่อมจีสวนดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิดที่เป็น *Agrobacterium* expression vector

นำจีสวนดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์และตรวจสอบแล้ว นำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pBI121 ซึ่งมีปฏิกิริยาการเชื่อมตื่อดังนี้

จีสวนดีเอ็นเอ	4	ไมโครลิตร
เวกเตอร์ pBI121	5.6	ไมโครลิตร
2 X ligation buffer	1.2	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (3U/ μ l)	1.2	ไมโครลิตร
รวม	12	ไมโครลิตร

บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และก่อนการถ่ายโอนนำมาบ่มที่ 22 องศาเซลเซียส ประมาณ 4 ชั่วโมง

ถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ เข้าสู่ *E. coli* และคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะมีพลาสมิดที่มีจีสวนดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนขึ้นบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และทำการสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกไว้ โดยก่อนนำมาสกัดพลาสมิดให้ทำการจุ่มโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินลงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะชนิดเดียวกัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วนำมาสกัดพลาสมิด ตรวจสอบผลการสกัด พลาสมิดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่มีจีสวนดีเอ็นเอแทรกอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการพิสูจน์พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอแทรกอยู่โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI มีปฏิกิริยาดังนี้

พลาสมิดที่คัดเลือกได้	4	ไมโครลิตร
10X buffer E	1	ไมโครลิตร
<i>Bam</i> HI (10 unit/ μ l)	0.2	ไมโครลิตร
BSA	0.12	ไมโครลิตร
น้ำคือน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	4.7	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

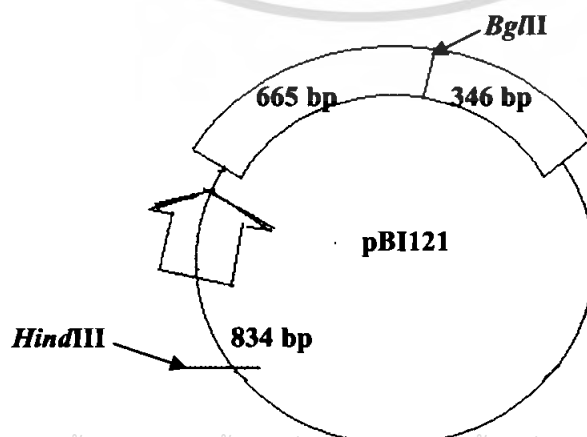
บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.2.3 พิสูจน์ทิศทางการเชื่อมต่อของการโคลนยีน *FLS* ที่ได้ในพลาสมิด pBI121

ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิดว่ามีทิศทางของยีน *FLS* เป็นลักษณะ sense หรือ antisense โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bg*III และ *Hind*III มีปฏิกิริยาดังนี้

ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิด	8	ไมโครลิตร
10x buffer C	1.5	ไมโครลิตร
<i>Bg</i> III (10 U/ μ l)	0.15	ไมโครลิตร
<i>Hind</i> III (10 U/ μ l)	0.15	ไมโครลิตร
BSA	0.15	ไมโครลิตร
น้ำคือน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	5.1	ไมโครลิตร
รวม	15	ไมโครลิตร

บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานจากข้อมูลของ GenBank *FLS* มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *Bg*III และเวกเตอร์ pBI121 มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *Hind*III ซึ่งแสดงดังรูปที่ 3.2



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
รูปที่ 3.2 แสดงจุดตัดของเอนไซม์บนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *FLS* และเวกเตอร์ pBI121

ไม่วารณใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การถ่ายโอนเวกเตอร์ที่มียีน *FLS* เข้าสู่โกรแบคทีเรีย

การถ่ายโอนเวกเตอร์ที่มียีน *FLS* เข้าสู่โกรแบคทีเรีย จะใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ LBA4404 กับยีน *FLS* ที่เชื่อมด้วยเวกเตอร์ pBI121 โดยเลือกชนิดของยีน *FLS* ที่จะถ่ายโอนเป็น sense

ถ่ายพลาสมิดยีนที่ต้องการเข้าสู่โกรแบคทีเรีย โดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะคานามัยซิน แล้วนำไปบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นำโคลนโกรแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดมาถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ ทำการเลี้ยงใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนบนอาหาร MS ที่ชักนำการเกิดคลัสต์ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นย้ายไปวางบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินและคาเบนนิซิลิน เพื่อใช้ในการฆ่าโกรแบคทีเรีย ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์

3.2.4 การตรวจสอบการแสดงออกของพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนต่อเชื้อเกิดโรค

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus* sp. และเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ในอาหาร potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และนำเชื้อราที่เจริญเติบโตเต็มที่มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วทำการฉีดเข้าที่บริเวณโคนต้นของต้นพืชทดลอง (ต้นพืชปกติ ต้นพืชที่มียีน *CHS* และ *F3'H*) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำต้นยาสูบที่ได้รับเชื้อไปเพาะเลี้ยงปกติ จนครบ 8 วัน แล้วตรวจสอบผลการตอบสนองของต้นยาสูบถ่ายโอนยีนกับเชื้อโรคพืช

3.2.4.1 ตรวจสอบด้วยการสังเกตทางสรีรวิทยาของต้นและใบยาสูบ

สังเกตลักษณะสรีรวิทยาของต้นพืชทดลองที่ทดสอบกับเชื้อแล้ว 8-10 วัน เปรียบเทียบกับต้นพืชควบคุมที่ไม่มีการบุกรุกของเชื้อ

3.2.4.2 ตรวจสอบการทำลายของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

สังเกตลักษณะของใบพืชทดลองที่ทดสอบกับเชื้อแล้ว 8 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับต้นพืชควบคุมที่ไม่มีการบุกรุกของเชื้อ

3.2.4.3 ตรวจสอบปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง

นำใบของต้นพืชทดลองที่ทดสอบกับเชื้อแล้ว 8 วัน มาสกัดสาร และดูการผลิตสารคลอโรฟิลล์ชนิดต่าง ๆ ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 662, 644, 470 นาโนเมตร และคำนวณค่าคลอโรฟิลล์

3.2.4.4 ตรวจสอบการผลิตสารประกอบฟีนอลิกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

นำใบของต้นพืชที่ทดสอบกับเชื้อแล้ว 8 วัน มาดูการผลิตสารประกอบฟีนอลิก โดยดูที่บริเวณที่มีการบุกรุกของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Nikon eclipse 80i : exciter filter 450-490 nm, dichroic mirror 505 nm, barrier filter 520 nm) ที่กำลังขยาย 100x เปรียบเทียบกับต้นพืชควบคุมที่ไม่มีการบุกรุกของเชื้อ

3.2.4.5 ตรวจสอบการผลิตสารด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

นำใบของต้นพืชทดลองที่ทดสอบกับเชื้อแล้ว 8 วัน มาสกัดสาร และดูการผลิตสารกลุ่มฟีนอลอยด์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ในช่วงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 250-550 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับต้นพืชควบคุมที่ไม่มีการนุกรุกของเชื้อ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

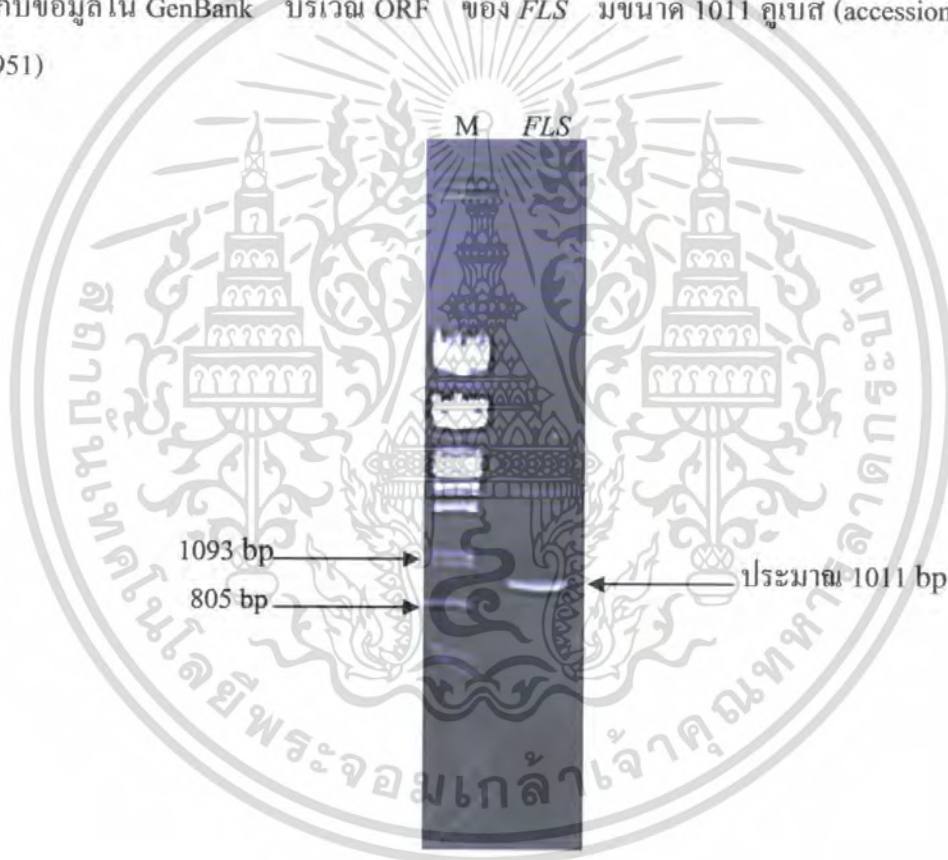
บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การโคลนยีน *FLS* จากต้นอะราบิโดปซิส (*Arabidopsis thaliana*)

4.1.1 ผลการเพิ่มจำนวนยีน *FLS* ด้วยเทคนิค PCR

ใช้เทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *FLS* และตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลดังรูปที่ 4.1 คาดว่าน่าจะเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *FLS* เนื่องจากมีขนาดอยู่ระหว่าง 805 และ 1093 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับข้อมูลใน GenBank บริเวณ ORF ของ *FLS* มีขนาด 1011 คู่เบส (accession no. NM_120951)

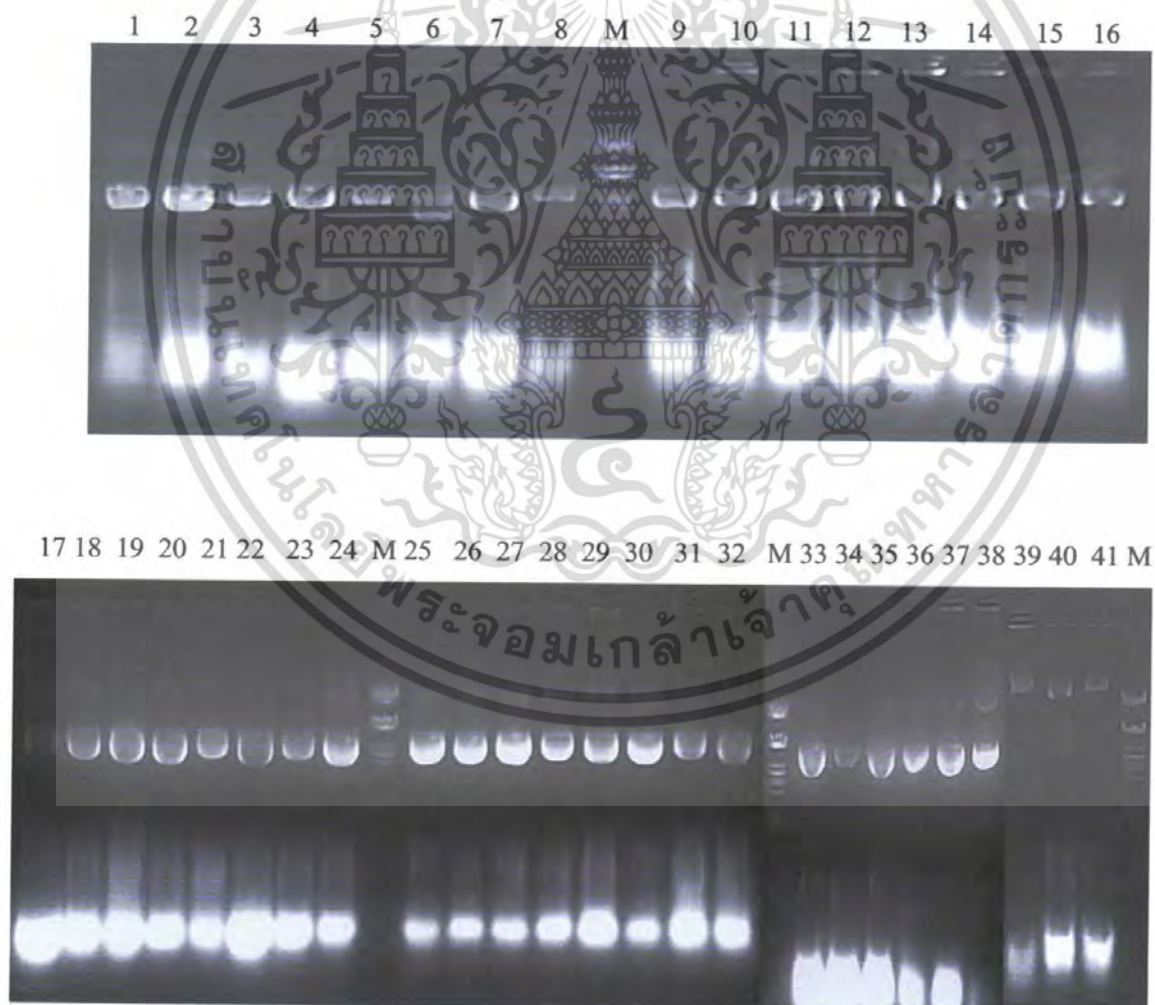


รูปที่ 4.1 แสดงผลการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์สำหรับยีน *FLS* จากเทคนิค PCR โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ (M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน *FLS* คือ ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ผลการเชื่อมต่อและการถ่ายโอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ *E. coli*

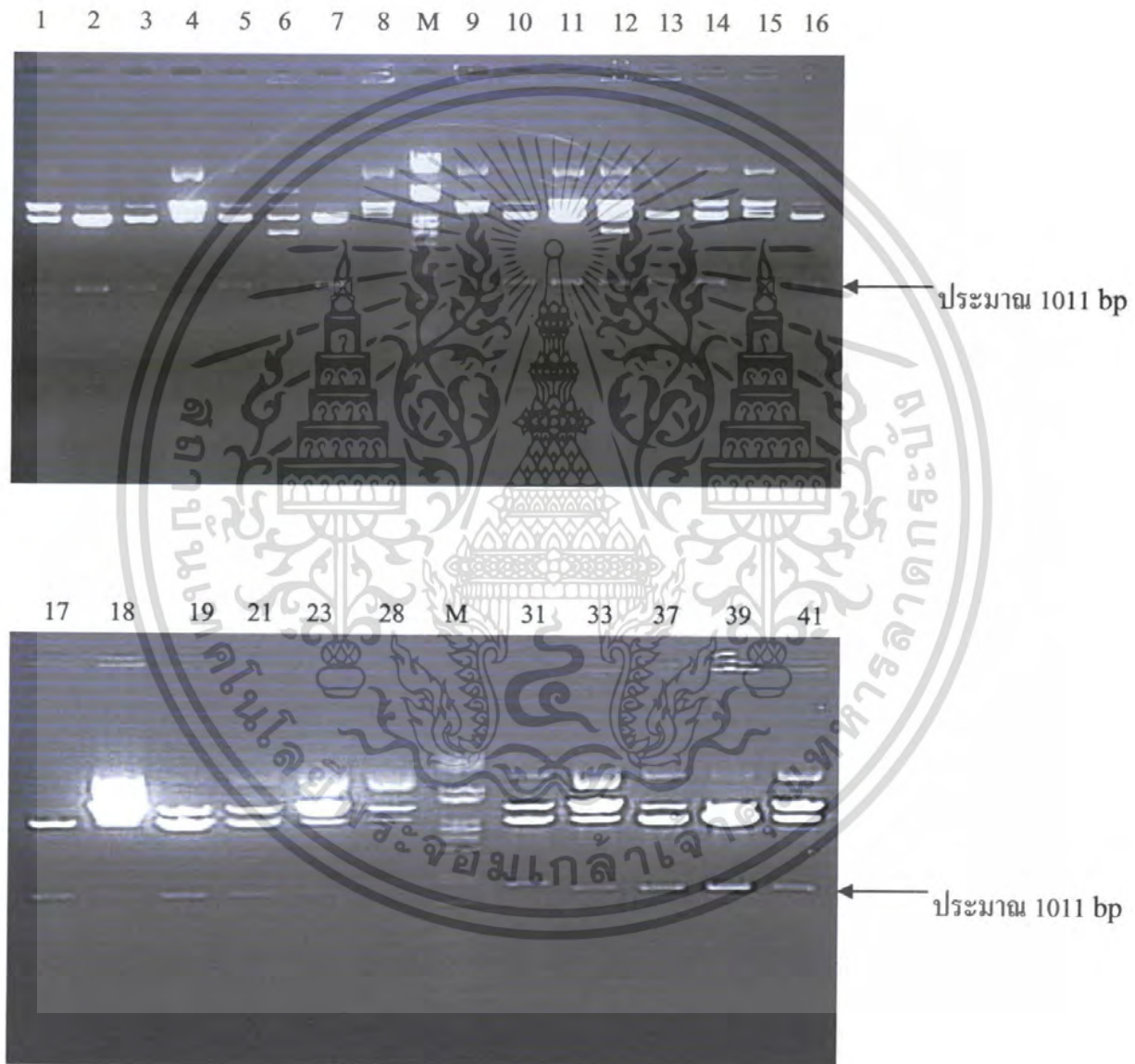
เมื่อทำการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากเจลและนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM นำสารละลายที่ทำการเชื่อมต่อมาถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* และเลี้ยงเซลล์บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินร่วมกับ IPTG และ X-gal จะได้โคโลนีเกิดขึ้น 2 ลักษณะ ได้แก่ โคโลนีสีขาว ซึ่งคาดว่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ เพราะการแทรกของชิ้นดีเอ็นเอนี้จะเกิดในยีน *lacZ* ทำให้ได้เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสที่มีลักษณะผิดปกติ จึงไม่สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้น (X-gal) ให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีฟ้าได้ และโคโลนีสีฟ้า ซึ่งคาดว่าพลาสมิดไม่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ ทำให้เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสทำงานได้ตามปกติ จึงสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้น (X-gal) ให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีฟ้าได้ จึงเห็น โคโลนีเป็นสีฟ้า ทำการคัดเลือกโคลนของ *E. coli* ที่ทำให้โคโลนีสีขาว ซึ่งคาดว่าจะมี พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่มาสกัดพลาสมิดและตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยการทำอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 แสดงผลการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีสีขาวที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอ

(1-41 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิดที่สกัดได้ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคัดเลือกพลาสมิด pGEM ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลดังรูปที่ 4.3 พบว่าโคลนหมายเลข 1-3, 5-7, 10-19, 21, 23, 31, 33, 37, 39 และ 41 มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1011 คู่เบสแทรกอยู่ ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR



รูปที่ 4.3 ผลการตัดพลาสมิด pGEM ด้วย *Bam*HI เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่คาดว่าจะมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1011 คู่เบสแทรกอยู่ (1-41 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิดที่สกัดได้ ซึ่งเป็นหมายเลขเดิมของรูปที่ 4.2 และตัดด้วย *Bam*HI M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ผลการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pGEM

ทำการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Bg*III และตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 ผลการสกัดพลาสมิด pGEM ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอแทรกอยู่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Bg*III เพื่อตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (2-37 คือ หมายเลขโคเลนของพลาสมิดที่สกัดได้หมายเลขเดิมกับรูป 4.3 ตัดด้วย *Bam*HI และ *Bg*III M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

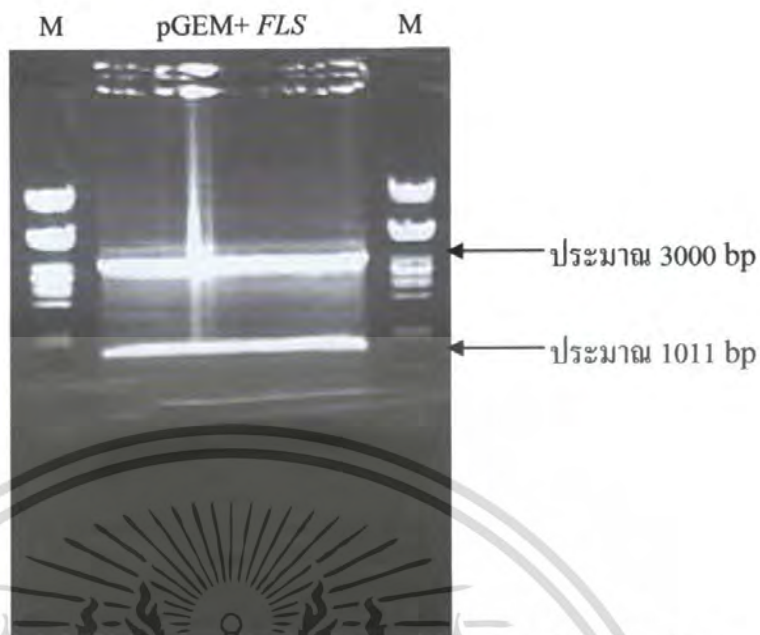
หลังจากตัดพลาสมิดด้วย *Bam*HI และ *Bg*III ในเบื้องต้นคาดว่าโคเลนของพลาสมิดที่สกัดได้น่าจะเป็น *FLS* เนื่องจากพบแถบดีเอ็นเอประมาณ 3 ชิ้น ในโคเลนที่ 2, 3, 5, 10, 18, 19, 33 และ 37 ได้แก่ แถบที่ *Bam*HI ตัดชิ้น *FLS* ได้ขนาดประมาณ 1011 คู่เบส และแถบที่ *Bg*III ตัดได้ 2 ชิ้น ที่ขนาด 665 คู่เบส และ 346 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยการนำลำดับเบสของ ORF *FLS* มาหาจุดตัดของ *Bg*III

4.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ *Agrobacterium* expression vector

4.2.1 ผลการเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

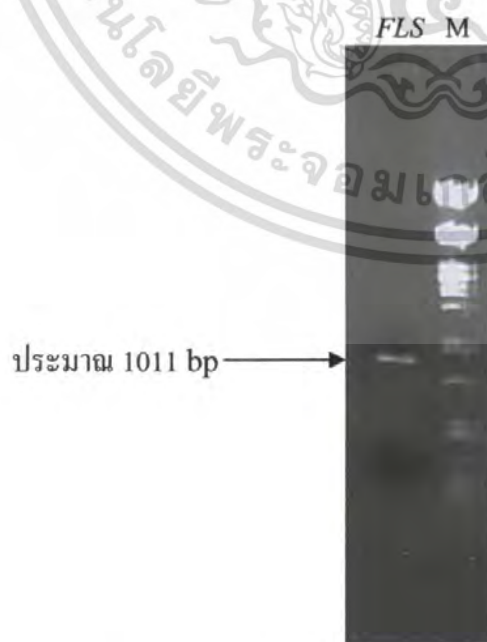
ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *FLS* ที่ต้องการออกจากพลาสมิด pGEM ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *FLS* และพลาสมิด pGEM ขนาดประมาณ 1011 คู่เบส และ 3000 คู่เบส ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *FLS* ออกจากพลาสมิด pGEM โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (pGEM + *FLS* คือ พลาสมิด pGEM ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *FLS* และทำการตัดด้วย *Bam*HI M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

ตัดชิ้นส่วน *FLS* จากเจล แยกชิ้นส่วน *FLS* ออกจากเจลด้วยวิธีตาม GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit ของ Amersham Pharmacia Biotech ตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *FLS* บริสุทธิ์ ซึ่งมีขนาดใกล้เคียง 1011 คู่เบส ดังรูปที่ 4.6



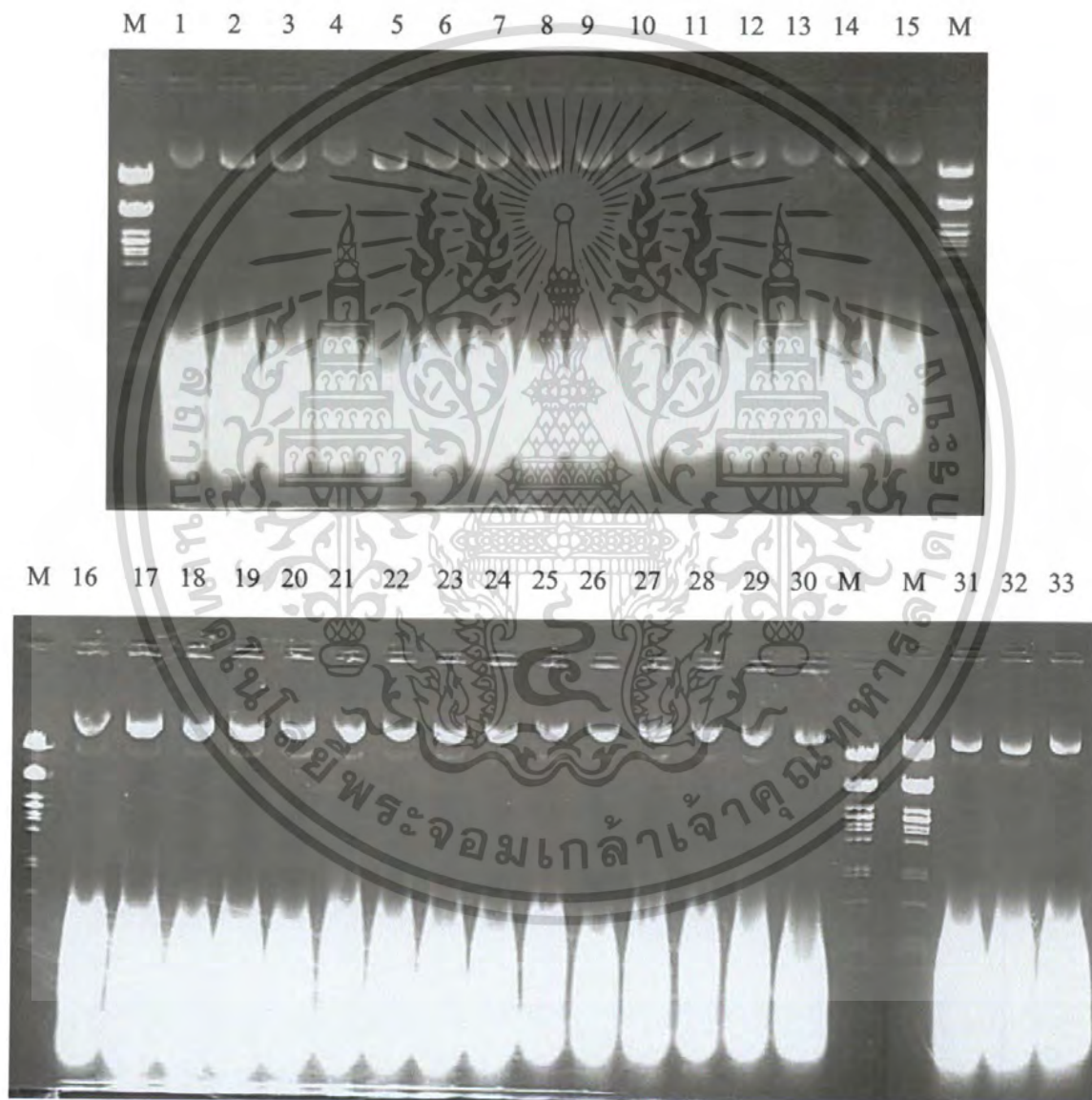
รูปที่ 4.6 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *FLS* บริสุทธิ์ (*FLS* คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *FLS* M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิดที่เป็น *Agrobacterium* expression vector

จากการถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *FLS* กับเวกเตอร์ pBI121 โดยการเลี้ยงเซลล์บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน ได้โคโลนีสีขาว

ทำการคัดเลือกโคลนของ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBI121 แบบสุ่ม และสกัดพลาสมิด pBI121 ที่อาจจะมีชิ้นดีเอ็นเอของ *FLS* แทรกอยู่ แล้วตรวจสอบผลการสกัดพลาสมิดโดยการทำอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลดังรูปที่ 4.7

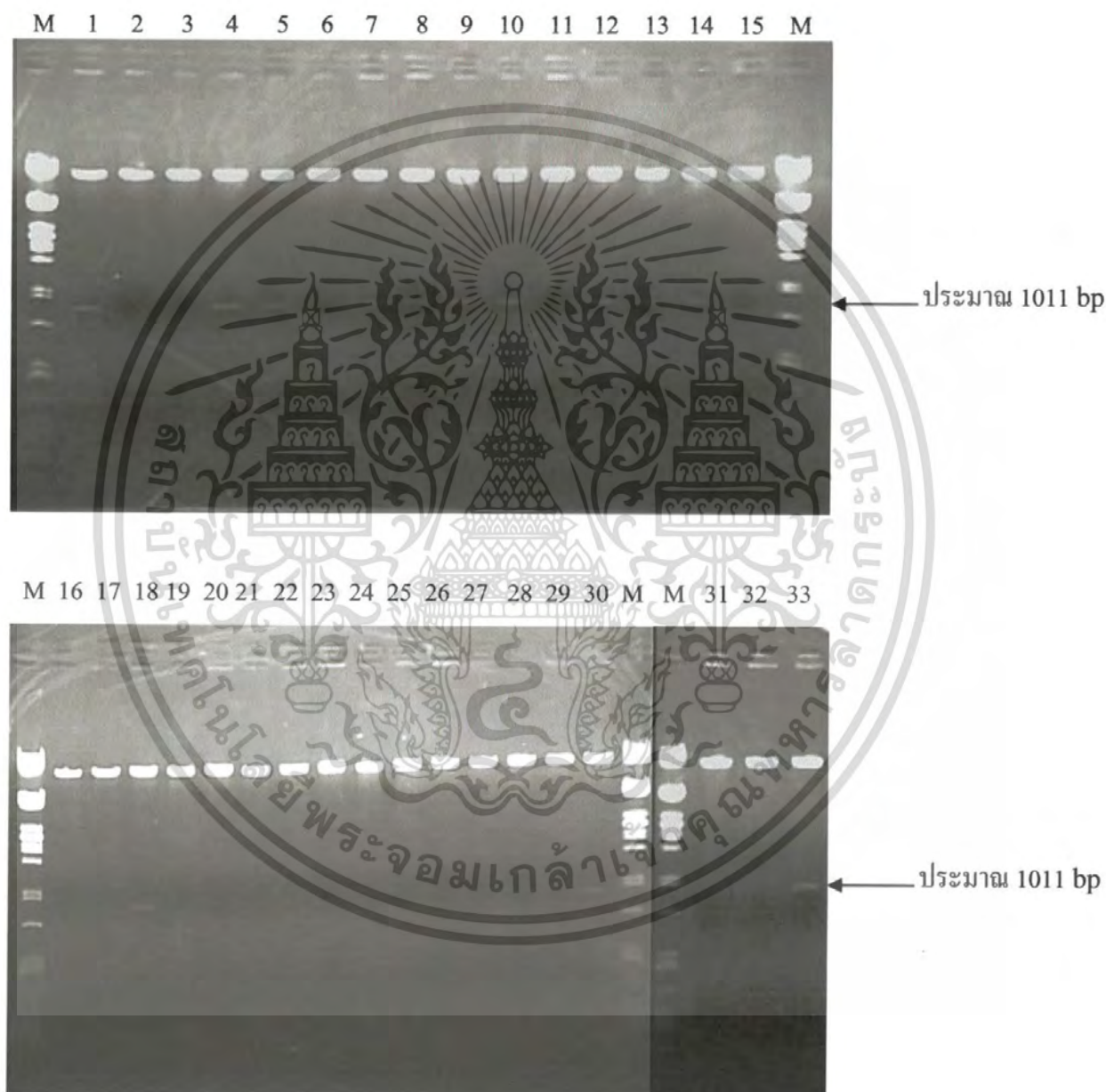


รูปที่ 4.7 แสดงผลการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีสีขาวที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอ

(1-33 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิดที่สกัดได้ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการตรวจสอบพลาสมิด pBI121 ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าโคลนหมายเลข 1, 4, 5, 7-10, 12-14, 18, 30 และ 33 มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *FLS* แทรกอยู่ ได้ผลดังรูปที่ 4.8

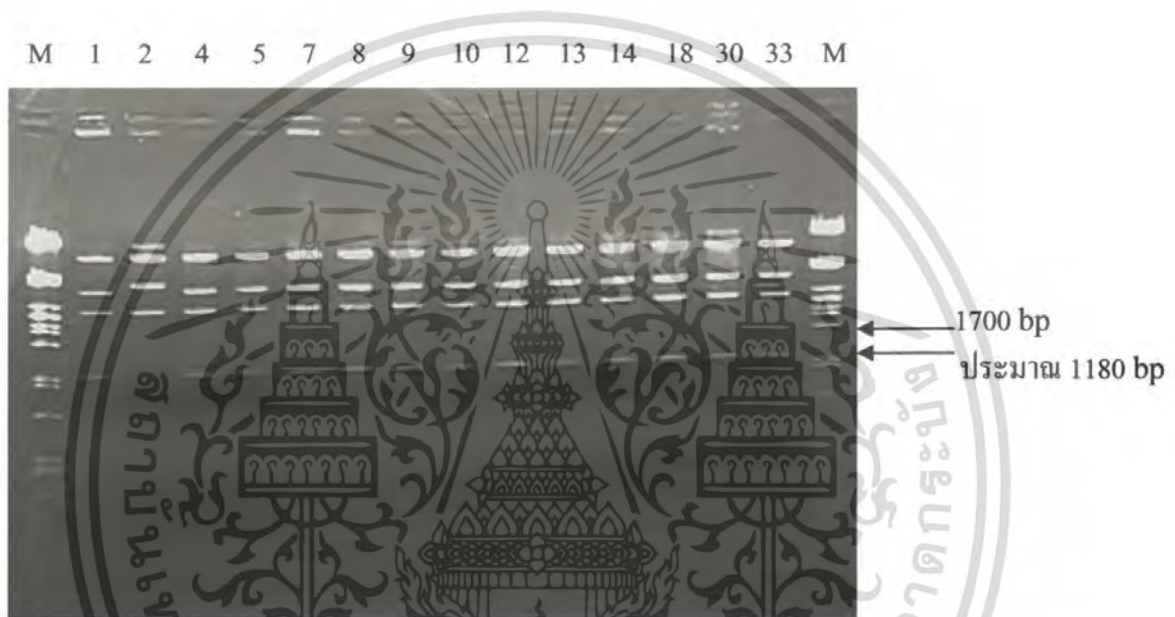


รูปที่ 4.8 ผลการตัดพลาสมิด pBI121 ด้วย *Bam*HI เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของ *FLS* แทรกอยู่ (1-33 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิด pBI121 หมายเลขเดิมกับรูปที่ 4.7 ที่ตัดด้วย *Bam*HI M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ผลการพิสูจน์ทิศทางการเชื่อมต่อของการโคลนยีน *FLS* ที่ได้ในพลาสมิด pBI121

ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิดว่ามีทิศทางของยีน *FLS* ว่ามีลักษณะเป็น sense หรือ antisense ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II และ *Hind*III ซึ่งขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *FLS* ที่มีลักษณะเป็น sense จะมีขนาดประมาณ 1499 คู่เบส และ antisense จะมีขนาดประมาณ 1180 คู่เบส ตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าทุกโคลนมีขนาดประมาณ 1180 คู่เบส ซึ่งเป็นลักษณะของ antisense จึงไม่ทำการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชทดลอง ผลเป็นดังรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 แสดงผลการตรวจสอบทิศทางของยีน *FLS* ว่ามีลักษณะเป็น sense หรือ antisense ด้วยการตัดด้วย *Bgl*II และ *Hind*III (1-33 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิด pBI121 ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *FLS* แทรกอยู่ ยกเว้นหมายเลข 2 ซึ่งไม่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ *FLS* แทรกอยู่ หมายเลขเดียวกับรูปที่ 4.8 ที่ตัดด้วย *Bgl*II และ *Hind*III M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

4.3 ผลการถ่ายโอนยีนเข้าสู่โอรแบคทีเรียและต้นยาสูบ

การถ่ายโอนยีน *FLS* เข้าสู่โอรแบคทีเรีย จะใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ LBA4404 กับยีน *FLS* ที่เชื่อมด้วยเวกเตอร์ pBI121 โดยเลือกชนิดของยีน *FLS* ที่จะถ่ายโอนเป็น sense เนื่องจากผลที่ได้จากการตรวจสอบทิศทางของยีน *FLS* มีลักษณะเป็น antisense จึงไม่ทำการถ่ายโอนยีนเข้าสู่โอรแบคทีเรียและต้นยาสูบต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การตรวจสอบการแสดงออกของพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนต่อเชื้อเกิดโรค

4.4.1 ผลการตรวจสอบด้วยการสังเกตทางสรีรวิทยาของต้นและใบยาสูบ

จากการนำเชื้อ *Rhizopus* sp. และเชื้อ *S. rolfsii* มาทดสอบกับต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* จะสังเกตเห็นลักษณะทางสรีรวิทยา ดังรูปที่ 4.10 และรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.10 ผลการตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นยาสูบ รูป (ก) คือ ภาพของต้นยาสูบที่ไม่ติดเชื้อ (ข) คือ ภาพของต้นยาสูบที่ติดเชื้อ *Rhizopus* sp. เป็นระยะเวลา 10 วัน

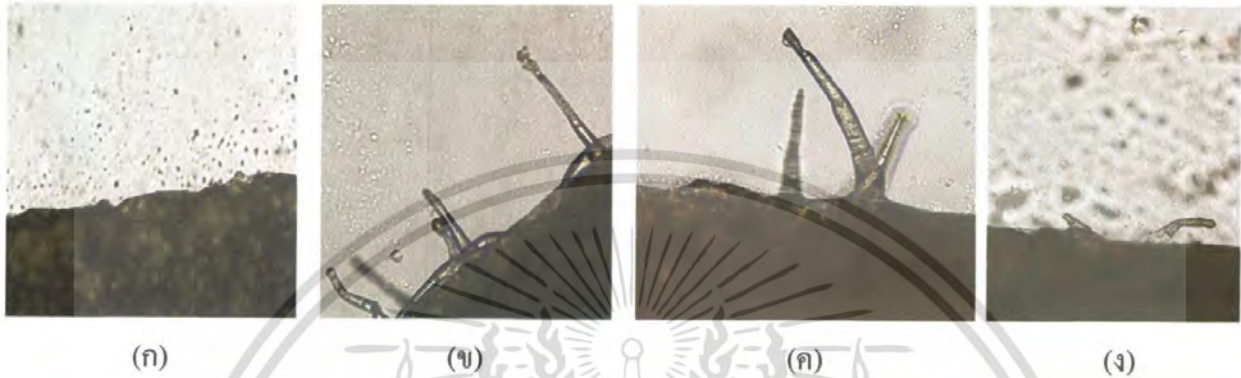


รูปที่ 4.11 ผลการตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นยาสูบ รูป (ก) คือ ภาพของต้นยาสูบที่ไม่ติดเชื้อ (ข) คือ ภาพของต้นยาสูบที่ติดเชื้อ *Sclerotium rolfsii* เป็นระยะเวลา 10 วัน

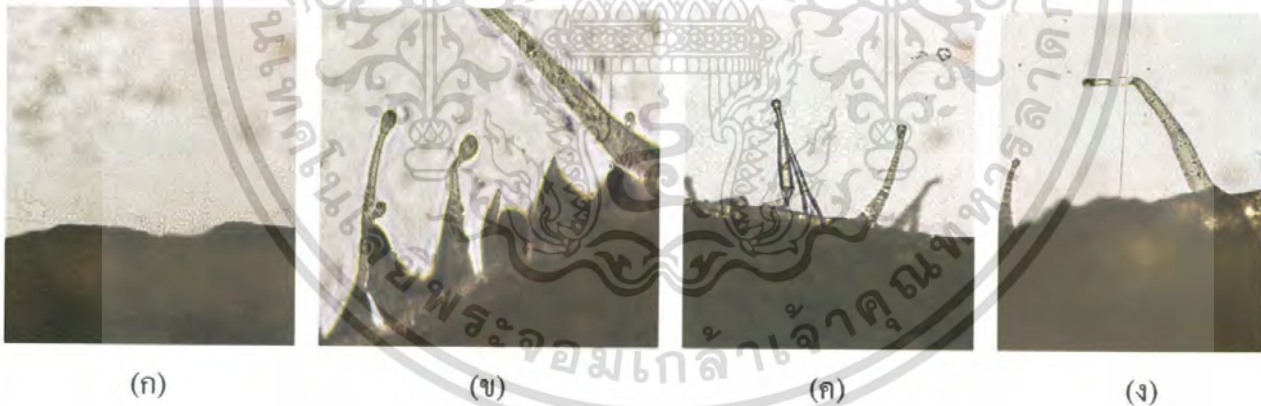
จากการสังเกตลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นและใบยาสูบที่ติดเชื้อ *Rhizopus* sp. และเชื้อ *S. rolfsii* พบว่าต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* จะมีลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นและใบยาสูบที่ดีกว่าต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และต้นยาสูบปกติ ตามลำดับ เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ผลการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

จากการนำเชื้อ *Rhizopus* sp. และเชื้อ *S. rolfsii* มาทดสอบกับต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* จะสังเกตเห็นลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้ดังรูปที่ 4.12 และรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.12 ผลการตรวจสอบลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อ *Rhizopus* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (100x) (รูป (ก) คือ ภาพของต้นยาสูบที่ไม่ติดเชื้อ รูป (ข) (ค) และ (ง) คือ ภาพของต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* ที่ติดเชื้อ *Rhizopus* sp. ตามลำดับ)



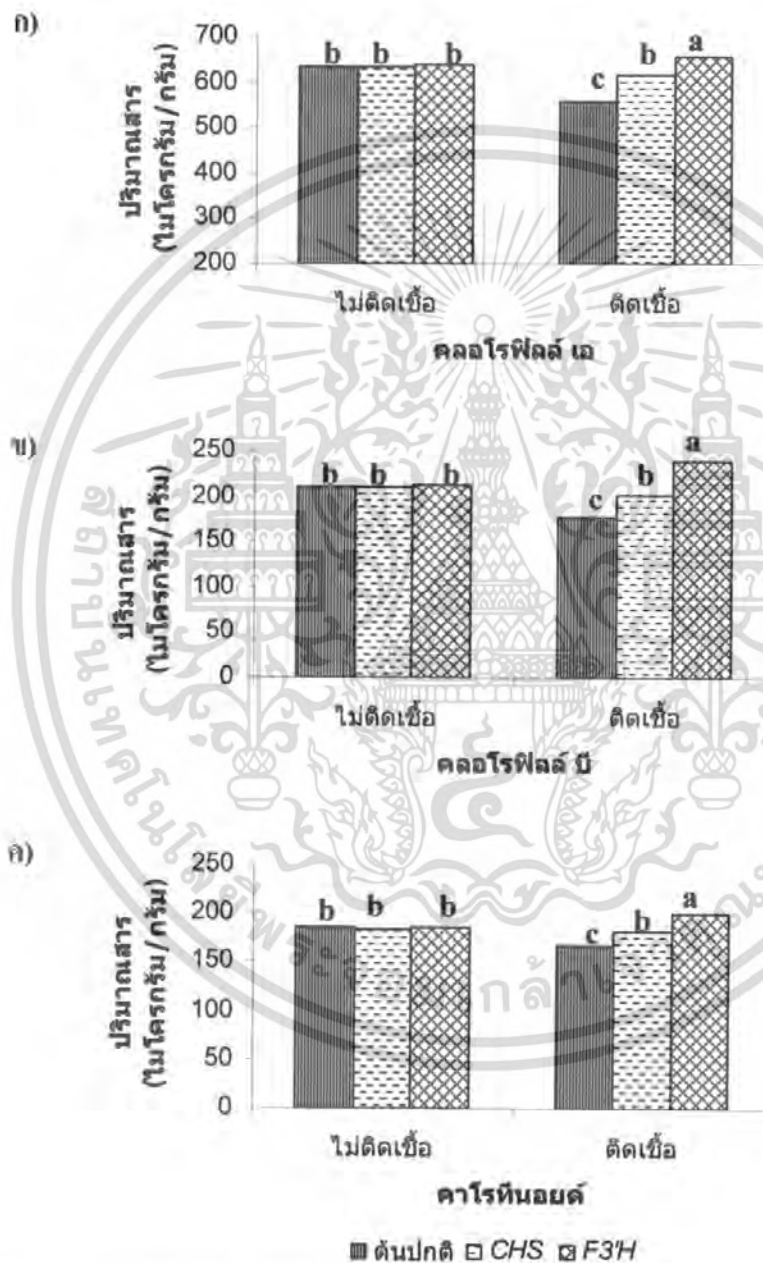
รูปที่ 4.13 ผลการตรวจสอบลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (100x) (รูป (ก) คือ ภาพของต้นยาสูบที่ไม่ติดเชื้อ รูป (ข) (ค) และ (ง) คือ ภาพของต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* ที่ติดเชื้อ *S. rolfsii* ตามลำดับ)

จากการสังเกตเห็นลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อ *Rhizopus* sp. และเชื้อ *S. rolfsii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าต้นยาสูบปกติถูกเชื้อเข้าทำลายได้มากที่สุด รองลงมาคือต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และเชื้อเข้าทำลายได้น้อยที่สุดคือต้นยาสูบที่มียีน *F3'H*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

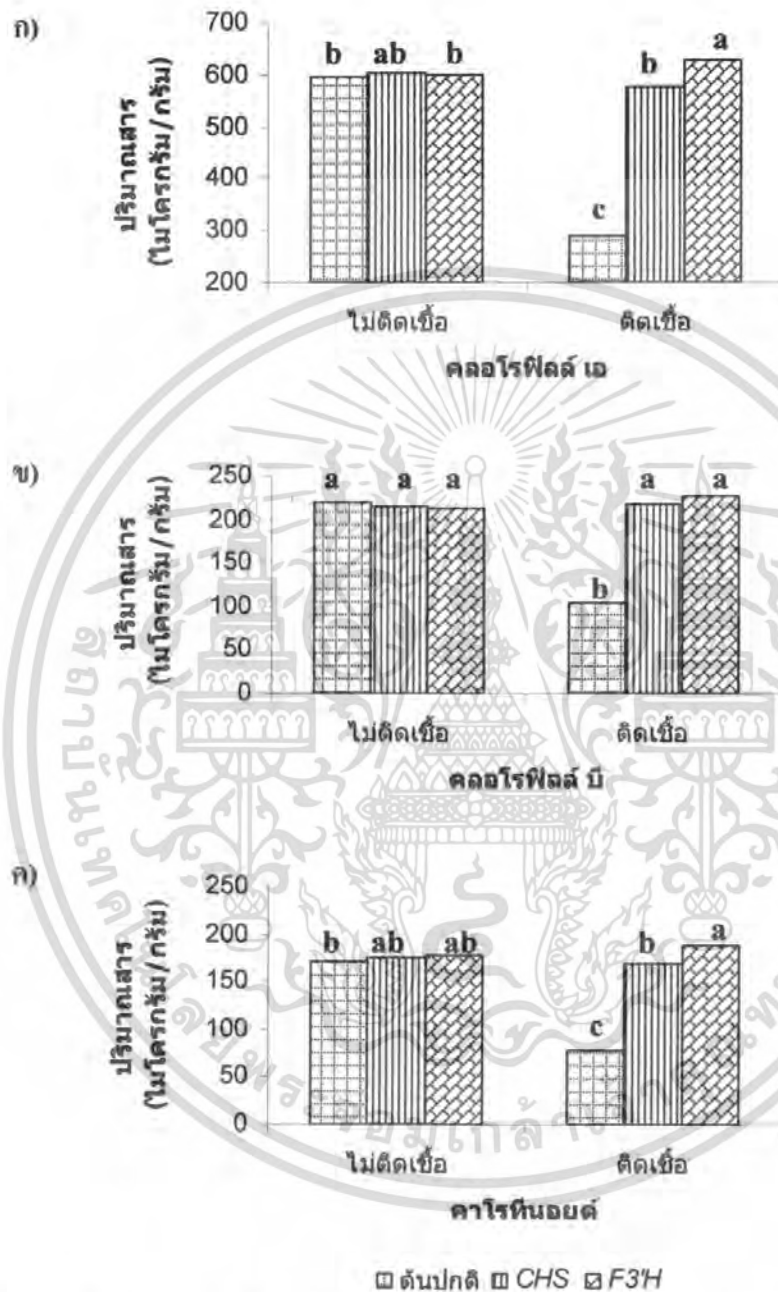
4.4.3 ผลการตรวจสอบปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง

จากการนำใบของต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* ที่ทดสอบกับเชื้อ *Rhizopus* sp. และเชื้อ *S. rolfsii* มาสกัดรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง และตรวจสอบการผลิตสารด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 662, 644, 470 นาโนเมตร และคำนวณค่าคลอโรฟิลล์ จะได้ผลดังรูปที่ 4.14 และรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.14 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารคลอโรฟิลล์ ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* ทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ *Rhizopus* sp. ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 6 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารคลอโรฟิลล์ ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มีเชื้อ *CHS* และต้นยาสูบที่มีเชื้อ *F3'H* ทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 6 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองพบว่า ปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงในต้นยาสูบทั้ง 3 ชนิดที่ไม่ติดเชื้อ พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อนำต้นยาสูบทั้ง 3 ชนิดมาทดสอบกับเชื้อ *Rhizopus* sp. จะพบว่าปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงทั้ง 3 ชนิดในต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* ที่ติดเชื้อ มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* ที่ไม่ติดเชื้อและมีค่าแตกต่างทางสถิติกัน ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* ที่ติดเชื้อจะมีปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงคงที่เมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบที่มียีน *CHS* ที่ไม่ติดเชื้อ ต้นยาสูบปกติจะพบว่ามีปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงลดลงมากที่สุดและมีค่าแตกต่างทางสถิติกัน ดังรูปที่ 4.14

จากผลการทดลองต้นยาสูบทั้ง 3 ชนิดเมื่อทดสอบกับเชื้อ *S. rolfii* ซึ่งสามารถเข้าทำลายพืชได้เร็วกว่าเชื้อ *Rhizopus* sp. ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* ที่ติดเชื้อมีค่าเพิ่มขึ้นจากต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* ที่ไม่ติดเชื้อ ส่วนรงควัตถุอื่นไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* ที่ติดเชื้อมีปริมาณรงควัตถุที่ใช้สังเคราะห์แสงไม่เปลี่ยนแปลงจากต้นที่ไม่ติดเชื้อ ในขณะที่ต้นยาสูบปกติที่ติดเชื้อมีปริมาณรงควัตถุที่ใช้สังเคราะห์แสงทั้ง 3 ชนิดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 4.15

4.4.4 ผลการตรวจสอบการผลิตสารประกอบฟีนอลิกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

จากการนำเชื้อ *Rhizopus* sp. และเชื้อ *S. rolfii* ทดสอบกับต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* ระดับการผลิตสารประกอบฟีนอลิกให้เป็นระดับคะแนน ดังรูปที่ 4.16



(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

(จ)

รูปที่ 4.16 ระดับคะแนนของการผลิตสารประกอบฟีนอลิก (รูป (ก) คือ ระดับ 0 รูป (ข) คือ ระดับ 1 รูป (ค) คือ ระดับ 2 รูป (ง) คือ ระดับ 3 และรูป (จ) คือระดับ 4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการตรวจสอบการผลิตสารประกอบฟีนอลิก จากการนำเชื้อ *Rhizopus* sp. มาทดสอบกับต้นยาสูบ

จำนวนซ้ำ	ต้นยาสูบปกติ		ต้นยาสูบที่มียีน <i>CHS</i>		ต้นยาสูบที่มียีน <i>F3'H</i>	
	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ
1	ระดับ 0	ระดับ 1	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 0	ระดับ 3
2	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ 1	ระดับ 3
3	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 0	ระดับ 2	ระดับ 2	ระดับ 4
4	ระดับ 0	ระดับ 3	ระดับ 2	ระดับ 4	ระดับ 2	ระดับ 4
5	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ 2	ระดับ 3
เฉลี่ย	0.8 ^c	2.2 ^{bc}	1.4 ^{cd}	2.8 ^{ab}	1.4 ^{cd}	3.4 ^a

* ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความต่างกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการตรวจสอบการผลิตสารประกอบฟีนอลิก จากการนำเชื้อ *Sclerotium rolfsii* มาทดสอบกับต้นยาสูบ

จำนวนซ้ำ	ต้นยาสูบปกติ		ต้นยาสูบที่มียีน <i>CHS</i>		ต้นยาสูบที่มียีน <i>F3'H</i>	
	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ
1	ระดับ 1	ระดับ 3	ระดับ 2	ระดับ 3	ระดับ 1	ระดับ 3
2	ระดับ 0	ระดับ 2	ระดับ 1	ระดับ 3	ระดับ 2	ระดับ 4
3	ระดับ 1	ระดับ 3	ระดับ 1	ระดับ 3	ระดับ 3	ระดับ 4
4	ระดับ 2	ระดับ 4	ระดับ 2	ระดับ 4	ระดับ 0	ระดับ 3
5	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 0	ระดับ 4	ระดับ 2	ระดับ 4
เฉลี่ย	1.0 ^b	2.8 ^a	1.2 ^b	3.4 ^a	1.6 ^b	3.6 ^a

* ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความต่างกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

จากการทดลองจะพบว่าต้นยาสูบที่ติดเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มีแนวโน้มในการผลิตสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าต้นยาสูบที่ไม่ติดเชื้อ ในต้นยาสูบที่มียีนกลุ่มเฟลโวนอยด์ (*CHS* และ *F3'H*) มีแนวโน้มในการผลิตสารประกอบฟีนอลิกได้สูงกว่าต้นยาสูบปกติ

4.4.5 ผลการตรวจสอบการผลิตสารกลุ่มฟลาวอนอยด์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

จากการนำเชื้อ *Rhizopus* sp. ทดสอบกับต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และที่มียีน *F3'H* เมื่อทำการสกัดสารและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่จำเพาะต่อสารนั้น ได้ผลดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการตรวจสอบการผลิตสารกลุ่มฟลาวอนอยด์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากการนำเชื้อ *Rhizopus* sp. มาทดสอบกับต้นยาสูบ

กลุ่มสาร	ชื่อสาร	OD (nm)	ต้นยาสูบปกติ		ต้นยาสูบที่มียีน <i>CHS</i>		ต้นยาสูบที่มียีน <i>F3'H</i>	
			ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ
ฟลาวาโนน	นาริจินิน	330	.475 ^c	.533 ^c	.683 ^b	.712 ^b	.705 ^b	.860 ^a
ฟลาวอน	ลูทีโอลิน	350	.284 ^e	.332 ^{de}	.446 ^c	.540 ^b	.388 ^{cd}	.715 ^a
	อะพิจินิน	336	.484 ^d	.517 ^{cd}	.583 ^{bc}	.646 ^b	.633 ^b	.894 ^a
ฟลาวอนอล	ไมริเซติน	378	.546 ^c	.559 ^c	.589 ^c	.649 ^b	.661 ^b	.795 ^a
	เคอร์ซีทีน	374	.656 ^b	.687 ^b	.665 ^b	.721 ^b	.664 ^b	.846 ^a
	แคมเฟอร์อล	368	.819 ^c	.841 ^{bc}	.883 ^{abc}	.889 ^{abc}	.907 ^{ab}	.948 ^a
แทนนิน	แกลโลแทนนิน	550	.094 ^c	.096 ^{bc}	.094 ^c	.107 ^{ab}	.094 ^c	.114 ^a
แอนโทไซยานิน	เคลฟีนิดิน	546	.083 ^b	.089 ^b	.095 ^b	.113 ^a	.096 ^b	.121 ^a
	ไซยานิดิน	535	.082 ^c	.093 ^{bc}	.093 ^{bc}	.110 ^a	.099 ^b	.114 ^a
	เพลาร์โกนิน	520	.094 ^b	.096 ^b	.097 ^b	.115 ^a	.099 ^b	.119 ^a

* ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 6 ซ้ำ เปรียบเทียบเฉพาะสาร ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT (p=0.05)

จากการทดลองพบว่า ต้นยาสูบปกติที่ติดเชื้อ *Rhizopus* sp. มีแนวโน้มการผลิตสารในกลุ่มฟลาวอนอยด์เพิ่มขึ้นจากต้นยาสูบปกติที่ไม่ติดเชื้อเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* ที่ไม่ติดเชื้อมีสารกลุ่มฟลาวาโนน (นาริจินิน) ฟลาวอน (ลูทีโอลิน และอะพิจินิน) สูงกว่าต้นยาสูบปกติที่ไม่ติดเชื้อ เมื่อต้นยาสูบที่มียีน *CHS* ที่ติดเชื้อ *Rhizopus* sp. จะให้สารลูทีโอลินไมริเซติน แกลโลแทนนินและแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นจากต้นยาสูบที่ไม่ติดเชื้อ

ต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* ที่ไม่ติดเชื้อ นอกจากจะมีสารกลุ่มฟลาวาโนนและฟลาวอนสูงกว่าต้นยาสูบปกติที่ไม่ติดเชื้อ เช่นเดียวกับต้นยาสูบที่มียีน *CHS* แล้วยังมีสารกลุ่มฟลาวอนอล (ไมริเซติน และแคมเฟอร์อล) และสารกลุ่มแอนโทไซยานิน (ไซยานิดิน) สูงกว่าต้นยาสูบปกติที่ไม่ติดเชื้อ เมื่อต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* ติดเชื้อ *Rhizopus* sp. จะมีการสะสมสารฟลาวอนอยด์ทุกกลุ่มเพิ่มขึ้นจากต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* ที่ไม่ติดเชื้อและต้นยาสูบปกติที่ติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยต้นยาสูบที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีน *F3'H* ที่ติดเชื้อ *Rhizopus* sp. มีการสะสมสารกลุ่มฟลาวอนอยด์ในต้นชีวสังเคราะห์ ได้แก่ ฟลาวอน (นาริจินิน) ฟลาวอน (ลูทิโอลินและอะพิจินิน) ฟลาวอนอล (ไมริเซตินและเคอร์ซีทีน) ที่สูงกว่าต้นยาสูบที่มียีน *CHS* ที่ติดเชื้อ *Rhizopus* sp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่การสะสมสารกลุ่มฟลาวอนอยด์ที่ปลายชีวสังเคราะห์ ได้แก่ แทนนินและแอนโทไซยานิน ในต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนทั้ง 2 สายพันธุ์มีการเพิ่มขึ้นจากต้นยาสูบที่ไม่ติดเชื้อ แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ติดเชื้อจะมีการสะสมสารกลุ่มฟลาวอนอยด์เพิ่มขึ้นกว่าต้นยาสูบปกติที่ติดเชื้อ

จากการนำเชื้อ *S. rolfii* ทดสอบกับต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* เมื่อทำการสกัดสารและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่จำเพาะต่อสารนั้น ได้ผลดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการตรวจสอบการผลิตสารกลุ่มฟลาวอนอยด์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์จากการนำเชื้อ *Sclerotium rolfii* มาทดสอบกับต้นยาสูบ

กลุ่มสาร	ชื่อสาร	OD (nm)	ต้นยาสูบปกติ		ต้นยาสูบที่มียีน <i>CHS</i>		ต้นยาสูบที่มียีน <i>F3'H</i>	
			ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	ติดเชื้อ
ฟลาวอนิน	นาริจินิน	330	.162 ^c	.551 ^a	.412 ^b	.589 ^a	.378 ^b	.602 ^a
ฟลาวอน	ลูทิโอลิน	350	.084 ^c	.331 ^a	.113 ^c	.349 ^a	.205 ^b	.380 ^a
	อะพิจินิน	336	.125 ^e	.416 ^c	.134 ^e	.485 ^b	.286 ^d	.607 ^a
ฟลาวอนอล	ไมริเซติน	378	.160 ^e	.353 ^c	.204 ^{de}	.530 ^b	.218 ^d	.671 ^a
	เคอร์ซีทีน	374	.180 ^e	.423 ^c	.247 ^d	.595 ^b	.269 ^d	.803 ^a
	แคมเฟอรอล	368	.206 ^e	.557 ^c	.341 ^d	.682 ^b	.356 ^d	.904 ^a
แทนนิน	แกดโลแทนนิน	550	.039 ^d	.042 ^{cd}	.044 ^{bcd}	.049 ^{ab}	.047 ^{bc}	.055 ^a
แอนโทไซยานิน	เดลฟินิดิน	546	.040 ^c	.043 ^c	.044 ^{bc}	.050 ^{ab}	.053 ^a	.056 ^a
	ไซยานิดิน	535	.043 ^a	.046 ^a	.047 ^a	.054 ^a	.060 ^a	.063 ^a
	เพลาร์โกนิน	520	.049 ^d	.054 ^{cd}	.051 ^d	.058 ^{bc}	.063 ^{ab}	.068 ^a

* ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 6 ซ้ำ เปรียบเทียบเฉพาะสาร ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความต่างทางสถิติ จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ($p=0.05$)

ในสถานะที่ไม่ติดเชื้อ ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และ *F3'H* มีสารฟลาวอนอยด์สูงกว่าต้นยาสูบปกติ โดยต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* มีสารกลุ่มฟลาวอนสูงกว่าต้นยาสูบที่มียีน *CHS* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อได้รับการติดเชื้อ *S. rolfsii* ต้นยาสูบทุกสายพันธุ์มีการสะสมสารเฟลวาโนน เฟลโวน และเฟลโวนอลเพิ่มขึ้นทุกสายพันธุ์ ส่วนสารแทนนินและแอนโทไซยานินมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก โดยต้นยาสูบที่ยีน *F3'H* ให้ปริมาณการสะสมสารสูงที่สุดในสารทั้งสามชนิด (เฟลวาโนน เฟลโวนและเฟลโวนอล) รองลงมาได้แก่ ต้นยาสูบที่ยีน *CHS* และต่ำที่สุดในต้นยาสูบปกติ ในต้นยาสูบที่ยีน *F3'H* ที่ติดเชื้อมีการสะสมสารเฟลโวนอลเพิ่มขึ้นจากต้นยาสูบที่ยีน *F3'H* อย่างเด่นชัด ซึ่งคาดว่าอาจเป็นสารสำคัญที่มีส่วนช่วยในการปกป้องพืชจากเชื้อก่อโรค *S. rolfsii*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 การโคลนยีน *FLS* จากต้นอะราบิโดปซิส

จากการโคลนยีน *FLS* จาก cDNA ของต้นอะราบิโดปซิส โดยใช้เทคนิค PCR และใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับยีน *FLS* แล้วนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ทำการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM เพื่อเพิ่มจำนวนและตรวจสอบโคลนที่ได้ พบว่าเป็นยีน *FLS* ทั้งหมด 23 โคลน แล้วนำทั้ง 23 โคลนมาตรวจสอบโคลนที่คาดว่าจะเป็ยีน *FLS* พบว่าทั้งหมด 8 โคลน จากนั้นนำโคลน *FLS* มาทำให้บริสุทธิ์เพื่อแยกเอาเฉพาะชิ้นส่วนยีนที่ต้องการเท่านั้น

5.2 การเชื่อมต่อยีนดีเอ็นเอเข้ากับ *Agrobacterium* expression vector

ยีน *FLS* ที่หลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้ว นำไปเชื่อมต่อกับ *Agrobacterium* expression vector (pBI121) แล้วตรวจสอบผลการเชื่อมต่อด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI พบว่าได้โคลนที่เป็นยีน *FLS* ทั้งหมด 13 โคลน แล้วนำเอาทั้ง 13 โคลนมาตรวจสอบทิศทางของยีน *FLS* ว่ามีลักษณะเป็น sense หรือ antisense โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Bgl*III และ *Hind*III ซึ่งพบว่าทั้ง 13 โคลน มีลักษณะเป็น antisense ทั้งหมด

5.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียและต้นยาสูบ

เนื่องจากทิศทางของยีน *FLS* มีลักษณะเป็น antisense ทั้งหมดจึงไม่ทำการถ่ายโอนยีน *FLS* นี้เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียและต้นยาสูบต่อไป

5.4 การทดสอบพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนกับเชื้อที่ทำให้เกิดโรค

5.4.1 ผลการตรวจสอบด้วยการสังเกตทางสรีรวิทยาของต้นและใบยาสูบ

เมื่อสังเกตลักษณะทางสรีรวิทยาของต้นและใบยาสูบที่มียีน *F3'H* *CHS* และต้นยาสูบปกติที่ติดเชื้อจาก *Rhizopus* sp. และ *S. rolfisii* พบว่าต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* และ *CHS* สามารถทนต่อเชื้อโรคได้ดีกว่าต้นยาสูบปกติ โดยต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* มีแนวโน้มในการทนต่อโรคได้ดีกว่าต้นยาสูบที่มียีน *CHS* จึงสรุปได้ว่า ต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* มีแนวโน้มในการต้านทานต่อโรคพืชที่เกิดจากเชื้อ *Rhizopus* sp. และ *S. rolfisii* ได้ดี

5.4.2 ผลการตรวจสอบการทำลายของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

จากการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *Rhizopus* sp. และ *S. rolfsii* ที่บริเวณใบยาสูบของต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* พบว่าต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* และต้นยาสูบที่มียีน *CHS* สามารถทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อได้ดีกว่าต้นยาสูบปกติ โดยต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* มีแนวโน้มในการทนต่อการทำลายของเชื้อได้ดีกว่าต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และต้นยาสูบปกติ จึงสรุปได้ว่า ต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* มีแนวโน้มในการทนต่อการทำลายของเชื้อดี

5.4.3 ผลการตรวจสอบปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง

ปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง (คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และคาโรทีนอยด์) ที่ตรวจสอบได้ เมื่อต้นยาสูบทั้ง 3 สายพันธุ์ติดเชื้อ *Rhizopus* sp. และ *S. rolfsii* จะพบว่าต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* เมื่อติดเชื้อมีการผลิตรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงทั้ง 3 ชนิดเพิ่มขึ้นจากต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* ที่ไม่ติดเชื้อเล็กน้อย ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* เมื่อติดเชื้อพบว่าการผลิตรงควัตถุลดลงอย่างไม่มีทิศทางสถิติ ในขณะที่ต้นยาสูบปกติเมื่อติดเชื้อจะมีการผลิตรงควัตถุทั้ง 3 ชนิดลดลงอย่างมากและแตกต่างทางสถิติ จึงสรุปได้ว่าต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* มีแนวโน้มในการต้านทานต่อเชื้อก่อโรค *Rhizopus* sp. และ *S. rolfsii* ได้ดี

5.4.4 ผลการตรวจสอบการผลิตสารประกอบฟีนอลิกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

การผลิตสารประกอบฟีนอลิกของต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* และ *CHS* ที่ติดเชื้อ *Rhizopus* sp. และ *S. rolfsii* มีการผลิตสารกลุ่มนี้มากกว่าต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* และ *CHS* ที่ไม่ติดเชื้อ และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนมีการผลิตสารฟีนอลิกสูงกว่าต้นยาสูบปกติ จึงสรุปได้ว่าต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* มีการผลิตสารฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมาคือต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และต้นยาสูบปกติที่มีการผลิตน้อยที่สุด

5.4.5 ผลการตรวจสอบการผลิตสารด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

จากการวัดปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นจำเพาะของสารแต่ละชนิด เมื่อนำสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* ที่ติดเชื้อ *Rhizopus* sp. และไม่ติดเชื้อมาวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* ที่ติดเชื้อมีการผลิตสารต้นชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ (ฟลาวานอน ฟลาโวนและฟลาโวนอล) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบที่มียีน *CHS* ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ ต้นปกติที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ ขณะที่ต้นยาสูบที่มียีน *CHS* ที่ติดเชื้อมีการผลิตสารต้นชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ทั้ง 3 กลุ่มเพิ่มมากขึ้นกว่าต้นปกติทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ แต่สารในปลายชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ (แทนนินและแอนโทไซยานิน) ในต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ติดเชื้อจะมีการเพิ่มขึ้นจากต้นไม่ติดเชื้ออย่างไม่มีแตกต่างกันทางสถิติ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ติดเชื้อยังมีการสะสมสารฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นสูงกว่าต้นปกติที่ติดเชื้อ จึงสรุปได้ว่าต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* มีแนวโน้มในการต้านทานต่อเชื้อ *Rhizopus* sp. ได้ดีและ

คาดว่าจะเป็นสารในกลุ่มต้นชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ที่มีส่วนในการปกป้องพืชจากเชื้อก่อโรค

Rhizopus sp.

ต้นยาสูบทั้ง 3 สายพันธุ์เมื่อติดเชื้อ *S. rolfsii* จะตรวจสอบปริมาณสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ที่ได้เพิ่มขึ้นจากต้นที่ไม่ติดเชื้อทุกสาร โดยต้นยาสูบที่มียีน *CHS* และต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* ที่ติดเชื้อ จะมีการผลิตสารต้นชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์เพิ่มขึ้นกว่าต้นปกติที่ติดเชื้อ โดยต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* ที่ติดเชื้อจะมีการผลิตมากกว่าต้นยาสูบที่มียีน *CHS* ที่ติดเชื้อ จึงสรุปได้ว่า ต้นยาสูบที่มียีน *F3'H* สามารถต้านทานต่อเชื้อ *S. rolfsii* ได้ดี และสารเฟลโวนอยด์เป็นสารที่ผลิตมากขึ้นอย่างเด่นชัด ซึ่งคาดว่าจะเป็นสารสำคัญในการปกป้องพืชจากเชื้อราก่อโรค *S. rolfsii*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กนกพร สมพรไพสิน. 2550. บทปฏิบัติการวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

กนกพร สมพรไพสิน. 2550. บทปฏิบัติการวิชาเทคโนโลยีชีวภาพของพืช. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ธวัชชัย รัตน์ชเลศ. 2540. ศัตรูพืชและการจัดการ. เทคโนโลยีการกำจัดพืช

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2541. พันธุศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ : 367-383.

ไพโรจน์ จัวงพานิช. 2525. หลักวิชาการโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิชัย รักวิทยาศาสตร์. 2546. ราวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาโรคพืช. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, วิทยาเขตกำแพงแสน : 133-237.

สุรีย์ นานาสมบัติ. 2549. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรรูปอาหาร. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Andrea G. Prescott , Nicholas P.J. Stamford, Guy Wheeler, John L. Firmin. 2002. In vitro properties of a recombinant flavonol synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*. 60 : 589-593.

Bourlaye Fofana, Nicole Benhamou, David J. McNally, Caroline Labbe, Armand Seguin, and Richard R. Belanger. 2005. Suppression of Induced Resistance in Cucumber Pathway. *Phytopathology* : 114-123.

Elio G.W.M. Schijlen, C.H. Ric de Vos, Arjen J.van Tunen, Arnaud G. Bovy. 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants . *Phytochemistry* : 2631-2648

Flores-Moctezuma, R. Montes-Belmont, A. Jimenez-Perez, R. Nava-Juarez. 2006. Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates from Mexico, and potential control of southern blight through solarization and organic amendments. *Crop Protection*. 25 : 195-201.

Narayana Subbiah Hari Narayana MOORTHY, Rahul Jitendra SINGH, Hemendra Pratap SINGH, and Sayan Dutta GUPTA . 2006. Synthesis, Biological Evaluation and *In Silico* Metabolic and Toxicity Prediction of Some Flavanone Derivatives. *Chem. Pharm. Bull* : 1384-1390.

Lepinice, L., Debeaujon, I., Routaboul, J. M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N. and Caboche, M. 2006. Genetics and Biochemistry of Seed Flavonoid. *Plant Biol*. 57 : 405-430.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Oliver Yu, Michiyo Matsuno, and Senthil Subramanian. 2006. Flavonoid Compounds in Flowers: Genetics and Biochemistry. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology* : 282-292.
- Ortuno, A. Baidez, P. Gomez, M.C. Arcas, I. Porras, A. Garcia-Lidon, J.A. Del Rio. 2006. *Citrus paradise* and *Citrus sinensis* flavonoids : Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum* ; *Food Chemistry* : 351-358
- Shaw, Phil Morris and John E. Hooker. 2006. Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms; *Environmental Microbiology* : 1867-1880
- Stefan Martens and Axel Mithofer. 2005. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* : 2399-2409.
- Surinder Chopra, Atsushi Hoshino, Jayanand Boddu, and Shigeru Iida. 2006. Flavonoid Pigments as tools in Molecular. Genetics. *The Science of Flavonoids* : 150-173.
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Rhizopus>
- <http://www.britannica.com/eb/topic-501518/Rhizopus-stolonifer>
- <http://www.bspp.org.uk/ndr/jan2004/2003-57.asp>
- http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/Crop/Type/s_rolfs.htm

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani)

ส่วนประกอบ

Bacto typtone	10	กรัมต่อลิตร
Bacto yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
NaCl	10	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.2

(ถ้าเป็นอาหารแข็งให้เติมวุ้น 8 กรัมต่อลิตร)

2. อาหารสูตร PDA (Potato Dextrose Agar)

วิธีที่ 1

ส่วนประกอบ

Potato infusion	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม

เตรียม potato infusion โดยหั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นเล็กๆ ไม่ต้องปอกเปลือก ชั่งน้ำหนักมันฝรั่ง 200 กรัมใส่ภาชนะ เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้ม 30 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง น้ำมันฝรั่งที่กรองได้คือ potato infusion เติมวุ้นและ dextrose ลงไปต้มจนวุ้นละลาย บรรจุลงขวดหรือหลอดทดลองนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย 5.6±0.2

(สุรีย์, 2549)

วิธีที่ 2

ส่วนประกอบ

Standard potato dextrose agar	39	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม

ละลาย standard potato dextrose agar 39 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มประมาณ 30 นาที แล้ว

เทใส่ขวดหรือหลอดทดลองนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. อาหารสูตร MS

ส่วนประกอบของอาหาร MS ใน 1 ลิตร

NH_4NO_3	165	มิลลิกรัม
KNO_3	192	มิลลิกรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37	มิลลิกรัม
KH_2PO_4	17	มิลลิกรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44	มิลลิกรัม
H_3BO_3	3.1	มิลลิกรัม
KI	0.415	มิลลิกรัม
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.125	มิลลิกรัม
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0125	มิลลิกรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.23	มิลลิกรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.86	มิลลิกรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025	มิลลิกรัม
Na_2EDTA	3.73	มิลลิกรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.78	มิลลิกรัม
Inositol	5	มิลลิกรัม
Nicotinic acid	0.025	มิลลิกรัม
Pyridoxin HCl	0.025	มิลลิกรัม
Thiamine HCl	0.005	มิลลิกรัม
Glycine	0.1	มิลลิกรัม

ปรับพีเอช 5.6-5.8 เติมน้ำ 8 กรัมต่อลิตร

4. สารเคมีที่ใช้ทำการอิเล็กโทรโฟรีซิส

1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล

Agarose	1	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
TBE buffer(5x)	100	มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตร
EtBr (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	5	ไมโครลิตร

TBE buffer(5x) ประกอบด้วย

Tris	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสาร 0.5 M EDTA 20 มิลลิตร นั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. สารเคมีที่ใช้สกัดดีเอ็นเอจากพืช

สารสกัดดีเอ็นเอความเข้มข้น 2 เท่า

ประกอบด้วย 0.6 M NaCl
0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)
40 mM EDTA (pH 8.0)
1% SDS

สารสกัดดีเอ็นเอความเข้มข้น 1 เท่า (เตรียมก่อนใช้)

ประกอบด้วย 5 M urea
10 mM mercaptoethanol
5 % (v/v) Phenol

ปรับปริมาตรเป็น 2 เท่า

สารละลายผสม phenol/ chloroform/ isoamylalcohol (25:24:1)

สารละลาย TE buffer

ประกอบด้วย 1 M Tris-HCl (pH 8.0)
0.5 M EDTA (pH 8.0)

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการทดลอง

1. การแยกดีเอ็นเอจากเจล

- 1.1 ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการแล้ว ตัดเจลส่วนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นใส่หลอด eppendorf
- 1.2 เติม capture buffer ลงในหลอด eppendorf ในข้อ 1.1 ในอัตราส่วน capture buffer 10 ไมโครลิตรต่อเจลหนัก 10 มิลลิกรัม
- 1.3 บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 5-15 นาที จนกว่าเจลจะละลายหมด
- 1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่ำ เพื่อให้ของเหลวในหลอดตกลงมารวมกัน
- 1.5 ย้ายของเหลวในหลอด eppendorf ไปใส่ในจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ (GFX column) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที
- 1.6 นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอจะจับกับคอลัมน์
- 1.7 เติม wash buffer 500 ไมโครลิตร ลงในจีเอฟเอกซ์คอลัมน์อันเดิม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 1.8 ย้ายจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ใส่ในหลอด eppendorf หลอดใหม่ แล้วเติมน้ำคืออินซูลินที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 20 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ เพื่อละลายดีเอ็นเอที่ติดอยู่กับคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที
- 1.9 นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ที่ใส่ในหลอด eppendorf ไปปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 1.10 นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ออก จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในหลอด eppendorf

2. การทำคอมพิเทนท์เซลล์

- 2.1 ถ่ายเชื้อ *Escherichia coli* 1 โคโลนีลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่งมีแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที
- 2.2 ถ่ายเชื้อจากข้อ 2.1 ลงในอาหาร LB ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ซึ่งมีแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ โดยใช้เชื้อปริมาณเท่ากับ 1-2 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ค่าประมาณ 0.4-0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2.3 นำเซลล์แขวนลอยไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 2.4 เทส่วนอาหารทิ้ง แล้วทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้ง โดยปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 2.5 วางบนน้ำแข็ง 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 2.6 เทส่วนใสทิ้ง แล้ววางหลอดบนน้ำแข็ง ทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งโดยใช้ TFB buffer ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
- 2.7 เติม DMSO 30 ไมโครลิตร เขย่าผสมกันพอคี่
- 2.8 แบ่งเซลล์แขวนลอยลงในหลอด eppendorf หลอดละ 200 ไมโครลิตร
- 2.9 เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส

3. การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์โดยวิธี heat-shock และการคัดเลือกโคลน

- 3.1 การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์
 - 3.1.1 นำคอมพีเทนท์เซลล์ที่เก็บ -70 องศาเซลเซียส มาละลาย โดยการวางบนน้ำแข็ง
 - 3.1.2 ดูดคอมพีเทนท์เซลล์ที่ละลายแล้วปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด eppendorf ซึ่งแช่บนน้ำแข็ง แล้วเติม ligation solution และผสมให้เข้ากัน โดยการปิเปตขึ้นลง วางบนน้ำแข็ง 30 นาที
 - 3.1.3 นำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
 - 3.1.4 เติมอาหาร SOC ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 3.2 การคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับเวกเตอร์ pGEM และเวกเตอร์ pBI121 ที่มีซันดีเอ็นเอแทรกอยู่
 - 3.2.1 เตรียม plate ที่มีอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินสำหรับเวกเตอร์ pGEM และเติมยาปฏิชีวนะคานามัยซินสำหรับเวกเตอร์ pBI121 spread เซลล์แขวนลอยที่เหลือบน plate ที่เตรียมไว้ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

4. การสกัดพลาสมิด

- 4.1 ถ่ายโอนโคโลนีเดี่ยวบน plate ที่มีอาหาร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะ ลงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินสำหรับเวกเตอร์ pGEM และเติมยาปฏิชีวนะคานามัยซินสำหรับเวกเตอร์ pBI121 (100 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 4.2 นำสารละลายแขวนลอยของเซลล์ ใส่หลอด eppendorf แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการเก็บเซลล์
- 4.3 เทส่วนอาหารทิ้ง เติม TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นวางหลอดบนน้ำแข็ง
- 4.4 เติม Solution II ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววางบนบนน้ำแข็ง 5 นาที
- 4.5 เติม Solution III ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววางบนบนน้ำแข็ง 5 นาที
- 4.6 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 4.7 ย้ายของเหลวส่วนบนไปใส่หลอด eppendorf ใหม่ แล้วเติมเอทานอลที่เย็นจัดเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
- 4.8 นำไปเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส 10-15 นาที
- 4.9 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทเอทานอลทิ้ง
- 4.10 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
- 4.11 นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งโดยใช้ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทเอทานอลทิ้ง
- 4.12 ทำให้ดีเอ็นเอแห้ง โดยคว่ำลงบนกระดาษทิชชู หรือใช้เดซิเคเตอร์
- 4.13 ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ซึ่งมี RNase เข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 4.14 เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

5. การสกัดดีเอ็นเอจากพืช

- 5.1 ใส่ใบไม้ 50-100 มิลลิกรัม ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายสกัดดีเอ็นเอ 150 ไมโครลิตร
- 5.2 ใช้แท่งแก้วบนจนละเอียดจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกัน
- 5.3 เติมสารละลายสกัดดีเอ็นเอ 300 ไมโครลิตร และสารผสม phenol/ chloroform/ isoamylalcohol 450 ไมโครลิตร แล้วปิดฝาและเขย่าประมาณ 1 นาที
- 5.4 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- 5.5 นำสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดไปมา
- 5.6 วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- 5.7 เทของเหลวทิ้ง ล้างส่วนตะกอนข้างล่างด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500

เอกสารนี้เป็นไมโครลิตร วนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 5.8 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
- 5.9 เทของเหลวทิ้ง และทำให้แห้ง (คว่ำบนกระดาษซับที่สะอาด)
- 5.10 ละลายตะกอนใน TE buffer ซึ่งมี RNase (20 µg/ml) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
- 5.11 ตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอด้วยการทำอะกาโรสอิเล็กโตโฟรีซิส

6. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มเฟลโวนอยด์

- 6.1 บดพืชสดด้วยไนโตรเจนเหลว
- 6.2 เติมสารสกัด 3 มิลลิลิตร
- 6.3 นำไปเขย่า 250 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง และเติมคลอโรฟอร์มครึ่งหนึ่งของสารสกัด
- 6.4 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- 6.5 นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเฉพาะสารนั้นๆ
- 6.6 ค่าที่ได้นำไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี Duncan's new multiple-range test (DMRT) และ ANOVA ซึ่งเป็นการวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD)

7. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มคลอโรฟิลล์

- 7.1 หั่นชิ้นใบพืชให้เป็นชิ้นเล็กๆ
- 7.2 เติมอะซิโตน
- 7.3 บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง
- 7.4 นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 662, 644 และ 470 นาโนเมตร
- 7.5 คำนวณค่าคลอโรฟิลล์ และนำไปวิเคราะห์ทางสถิติเหมือนข้อ ที่ 6.6