

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	(1)
สารบัญตาราง.....	(2)
สารบัญภาพ.....	(3)
คำนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	3
การตรวจเอกสาร.....	4
อุปกรณ์และวิธีการ.....	28
อุปกรณ์.....	28
วิธีการ.....	37
ผลและวิจารณ์.....	54
สรุป.....	103
เอกสารและสิ่งอ้างอิง.....	104
ภาคผนวก.....	116

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	สารประกอบเชิงซ้อนฟลาโวนอยด์ในดอกไม้สีน้ำเงิน.....18
2	พลาสมิดที่มียีนที่ต้องการและพลาสมิดที่ใช้เป็นดีเอ็นเอเวกเตอร์ ในการถ่ายยีน.....32
3	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์.....36
4	อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายแจ็กเกอลีน โทมัส และเยื่อสกุลบนอาหาร MS ที่มีไฮโกรมัยซินอัตราต่าง ๆ กัน.....75
5	อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายแจ็กเกอลีน โทมัส ที่ได้รับการถ่ายยีน <i>3' h</i> แบบ antisense และคัดเลือกลูกบนอาหาร MS ที่มีระดับไฮโกรมัยซินที่ต่างกันระดับความเข้มข้นละ 4 สัปดาห์.....77
6	อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเยื่อสกุล ที่ได้รับการถ่ายยีน <i>3' h</i> และผ่านการคัดเลือกลูกบนอาหาร MS ที่เดิมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินอัตราต่าง ๆ นาน 6 สัปดาห์.....80
7	อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเยื่อสกุลขนาดใหญ่ และขนาดเล็กที่ได้รับการถ่ายยีน <i>3' h</i> และผ่านการคัดเลือกลูกบนอาหาร MS ที่เดิมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 8 สัปดาห์.....81
8	อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายแจ็กเกอลีน โทมัส และเยื่อสกุลที่ได้รับการถ่ายยีน <i>3' 5' h</i> และผ่านการคัดเลือกลูกบนอาหาร MS ที่เดิมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ต่างกัน ระดับความเข้มข้นละ 3 สัปดาห์....84
9	อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเยื่อสกุลที่ได้รับ การถ่ายยีน <i>3' 5' h</i> และยีน <i>hptII</i> ด้วยการยิงจำนวน 1 ซ้ำ และ 2 ซ้ำ.....87
10	อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเยื่อสกุลขนาดใหญ่ และขนาดเล็กที่ได้รับการถ่ายยีน <i>3' 5' h</i> และผ่านการคัดเลือกลูกบนอาหาร MS ที่เดิมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 9 สัปดาห์.....87
ตารางผนวกที่	
1	สูตรเคมีในอาหารสังเคราะห์สูตร MS และอาหารสูตรดัดแปลง VW.....116

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	โครงสร้างของฟลาโวนอยด์.....8
2	กระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์.....9
3	กระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน.....11
4	ไพรเมอร์ F3'5'H XbaI(S)(207) และไพรเมอร์ F3'5'HSmaI(A)(206).....40
5	ส่วนประกอบการทำงานของเครื่องยิงอนุภาค (ก) และลักษณะการวาง โปรโตคอร์มก่อนนำไปถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค (ข).....48
6	การตรวจสอบโคลนที่ได้จากการตัดต่อยีน <i>f3'h</i> เข้ากับโปรโมเตอร์ Act-1.....54
7	การสร้างพลาสมิดสายผสมที่มียีน <i>f3'h</i> ทิศทาง antisense ต่อกับ โปรโมเตอร์ Actin 1 ในดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063.....55
8	การศึกษาแผนที่ยีนของพลาสมิด pF3'HTG4(A) ที่มียีน <i>f3'h</i> ต่อเข้ากับเวกเตอร์ pTG0063.....56
9	แสดงตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063(ก) และ พลาสมิด pF3'HTG4(A)(ข) และการตรวจสอบยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์(ค)58
10	การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>f3'h</i> ในพลาสมิดสายผสม pF3'HTG4(A)ที่สังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ NOS(A).....59
11	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>f3'h</i> ในพลาสมิดสายผสม pF3'HTG4(A)ที่สังเคราะห์ได้กับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST-N.....60
12	การแปลลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>f3'h</i> ในพลาสมิดสายผสม pF3'HTG4(A) ที่สังเคราะห์ได้ด้วยโปรแกรม ORF.....61
13	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>f3'h</i> ในพลาสมิดสายผสม pF3'HTG4(A)ที่สังเคราะห์ได้กับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST-P.....61
14	การตรวจสอบโคลนที่ได้จากการตัดต่อยีน <i>f3'h</i> เข้ากับโปรโมเตอร์ CaMV35S....62
15	การสร้างพลาสมิดสายผสมที่มียีน <i>f3'h</i> ทิศทาง antisense ต่อกับ โปรโมเตอร์ CaMV 35S ในดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1.....63

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
16	การศึกษาแผนที่ยีนของพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) ที่มียีน <i>f3'h</i> ต่อเข้ากับเวกเตอร์ pREXH-1.....64
17	แสดงตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1 (ก) และพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) (ข) และการตรวจสอบยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์(ค).....65
18	การสร้างพลาสมิดสายผสมที่มียีน <i>f3'5'h</i> ทิศทาง sense ต่อกับโปรโมเตอร์ Actin 1 ในดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063.....67
19	การตรวจสอบชั้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน <i>f3'5'h</i> ในพลาสมิด pP450CRFRED.....68
20	การตรวจสอบโคลนที่ได้จากการตัดต่อยีน <i>f3'5'h</i> เข้ากับเวกเตอร์ pTG0063 ด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม.....68
21	การศึกษาแผนที่ยีนของพลาสมิด pF3'5'HTG24(S) ที่มียีน <i>f3'5'h</i> ต่อเข้ากับเวกเตอร์ pTG0063.....69
22	แสดงตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 (ก) และพลาสมิด pF3'5'HTG24(S) (ข) และการตรวจสอบยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์(ค).....71
23	การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโครมัยซินของกล้วยไม้สกุลหวาย แจคเกอลีนโทมัส(ก) และเอียสกุล (ข) ที่ไม่ได้ถ่ายยีน.....74
24	ลักษณะโปรโตคอร์มกล้วยไม้หวายแจคเกอลีนโทมัสที่ได้รับการถ่ายยีน <i>f3'h</i> ด้วยพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 (ก) และพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) (ข) และผ่านการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ ไฮโครมัยซินที่ระดับ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังการคัดเลือกนาน 2 เดือน.....77
25	ลักษณะโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอียสกุลที่ได้รับการถ่ายยีน <i>f3'h</i> ด้วยพลาสมิด F3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 (ก และ ค) และพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) (ข และ ง) ที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติมสาร ปฏิชีวนะไฮโครมัยซินที่ระดับ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 9 (ก และ ข) และที่ระดับ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 10 (ค และ ง).....81

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
26	ลักษณะความแตกต่างของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องสกุลขนาดใหญ่ (0.5-0.8 เซนติเมตร) (ก และ ค) กับโปรโตคอร์มขนาดเล็ก (0.2-0.4 เซนติเมตร) (ข และ ง) ที่ได้รับการถ่ายยีน $f3'h$82
27	ลักษณะโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องสกุลขนาดใหญ่ที่ได้รับการถ่ายยีน $f3'h$ และผ่านการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ที่ระดับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังคัดเลือกนาน 14 สัปดาห์.....82
28	ลักษณะโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องสกุล (ก) และแจกเกอลีนโทมัส(ข) ที่ได้รับการถ่ายยีน $f3'5'h$ ด้วยพลาสมิด pF3'5'HTG24(S) ร่วมกับ พลาสมิด pMNK1005 และผ่านการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ ไฮโกรมัยซินที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 9 สัปดาห์.....84
29	ลักษณะโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องสกุลขนาดใหญ่ 0.5-0.8 เซนติเมตร (ก และ ข) และ ขนาดเล็ก 0.2-0.4 เซนติเมตร (ค และ ง) หลังจากการยิงยีน $f3'5'h$ จำนวน 1 ครั้ง (ก และ ค) และจำนวน 2 ครั้ง (ข และ ง) และผ่านการคัดเลือก บนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก และ ข) และที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค และ ง) เป็นเวลา 15 สัปดาห์.....86
30	กล้วยไม้แปลงพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีน $f3'h$ และผ่านการคัดเลือก บนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นเวลา 14-20 สัปดาห์.....89
31	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน $hptII$ และยีน $f3'h$ ในกล้วยไม้แปลงพันธุ์ ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์90
32	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน $hptII$ โดยเทคนิคพีซีอาร์และ Southern Hybridization จากผลผลิตพีซีอาร์ของกล้วยไม้แปลงพันธุ์ ที่ได้รับการถ่ายยีน $f3'h$91
33	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน $f3'h$ ที่ถ่ายเข้ากล้วยไม้ สกุลหวายแปลงพันธุ์โดยเทคนิค Southern Hybridization.....93

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
34	กล้วยไม้แปลงพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีน <i>f3'5'h</i> (pF3'5'HTG24(S)) และผ่านการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน เป็นเวลา 14-20 สัปดาห์.....95
35	การตรวจสอบยีน <i>hptII</i> (ก) และยีน <i>f3'5'h</i> (ข) ในกล้วยไม้สกุลหวายแปลงพันธุ์โดยเทคนิคพีซีอาร์.....96
36	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>hptII</i> โดยเทคนิคพีซีอาร์ (ก) และ Southern Hybridization (ข) จากผลผลิตพีซีอาร์ ของกล้วยไม้แปลงพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีน <i>f3'5'h</i>97
37	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>f3'5'h</i> (pF3'5'HTG24(S)) ที่ถ่ายเข้ากล้วยไม้สกุลหวายแปลงพันธุ์99
 ภาพผนวกที่	
1	โครงสร้างพลาสมิด pCYP75B4.....118
2	โครงสร้างพลาสมิด pP450CRFRED.....118
3	โครงสร้างพลาสมิด pTG0063.....119
4	โครงสร้างพลาสมิด pPREXH-1.....119