

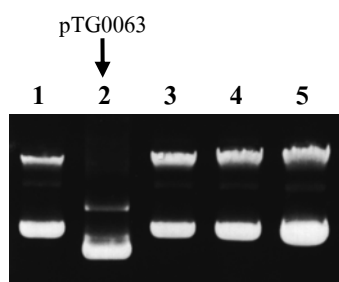
ผลและวิจารณ์

1. การตัดต่อยีน *f3'h* ในรูปแบบ antisense orientation

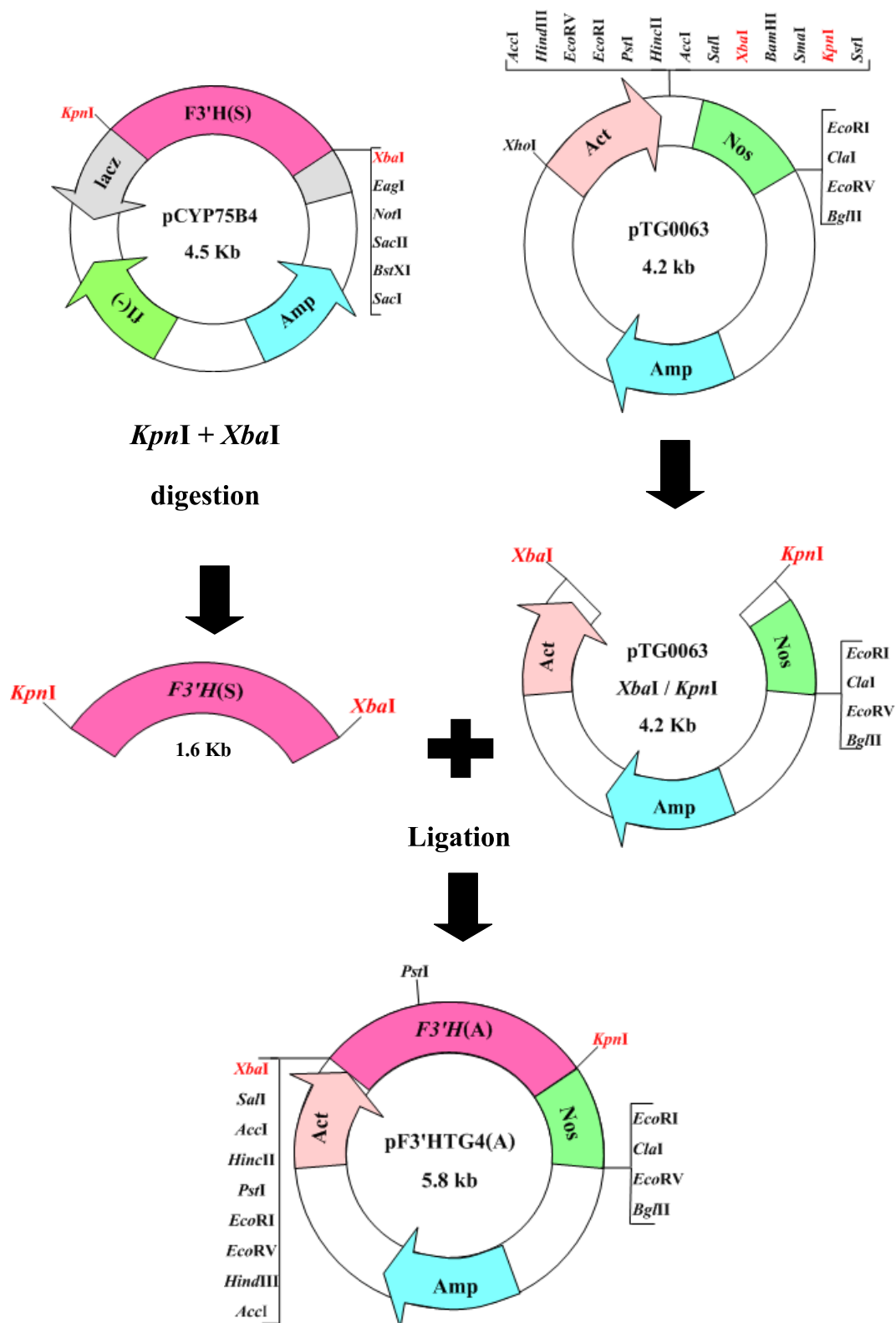
1.1 การตัดต่อยีน *f3'h* เข้ากับโปรโมเตอร์ Act-1

1.1.1 การตัดต่อยีน

การตัดต่อยีน *f3'h* ของ *Perilla frutescens* ในพลาสมิด pCYP75B4 ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจาก Kazuki Saito (Kitada *et al.*, 2001) เข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 (ภาพที่ 7) ทำโดยการตัดยีน *f3'h* ขนาด 1.6 กิโลเบส จากพลาสมิด pCYP75B4 ขนาด 4.5 กิโลเบส ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *XbaI* นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ต่อเข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 ขนาด 4.2 กิโลเบส ซึ่งมีโปรโมเตอร์ Actin-1 ที่แยกมาจากข้าว และเทอร์มินเตอร์ nos ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันแต่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์สลับด้านกัน แล้วนำพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue คัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมได้ทั้งหมด 4 โคลนี ซึ่งมีขนาดพลาสมิดใหญ่กว่าดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 (ภาพที่ 6) จึงนำโคลนทั้งหมดมาตรวจสอบทิศทางการตัดต่อโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* กับ *XbaI* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4.2 กับ 1.6 กิโลเบส ตรงตามขนาดของดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 และขนาดของยีน *f3'h* และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5.1 กับ 0.7 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดตรงกับแผนที่ของพลาสมิดสายผสมที่คาดหวังไว้เหมือนกันทั้ง 4 โคลน ทำการคัดเลือกพลาสมิดสายผสมจำนวน 1 โคลน ขนาด 5.8 กิโลเบส และให้ชื่อโคลนนี้ว่า pF3'HTG4(A) เพื่อใช้ในการถ่ายยีน *f3'h* เข้ากล้วยไม้ในทิศทาง antisense ต่อไป โดยมีโปรโมเตอร์ Act-1 เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน



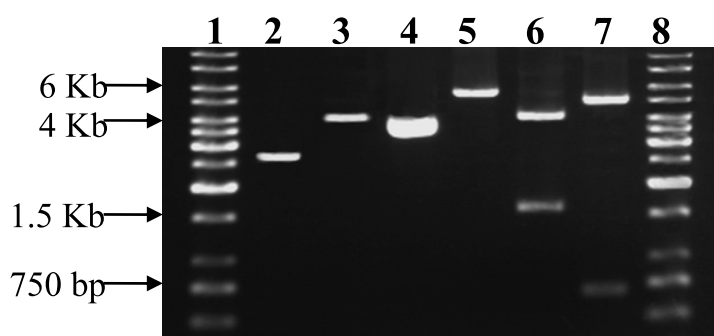
ภาพที่ 6 การตรวจสอบโคลนที่ได้จากการตัดต่อยีน *f3'h* เข้ากับโปรโมเตอร์ Act-1 จำนวน 4 โคลน



ภาพที่ 7 การสร้างพลาสมิดสายผสมที่มียีน *f3'h* ทิศทาง antisense ต่อกับโปรโมเตอร์ Actin 1 ใน ดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063

1.1.2 การตรวจสอบยีน โดยวิธีเอนไซม์ตัดจำเพาะ(Restriction Mapping)

ตรวจสอบความถูกต้องของทิศทางของการตัดต่อพลาสมิดสายผสมโดยการทำแผนที่ยีนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากการตรวจสอบพลาสมิดสายผสม pF3'HTG4(A) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* เพียง 1 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5.8 กิโลเบส ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *XbaI* เพียง 1 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4.2 กิโลเบส แสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอที่เข้าต่อกับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 มีขนาด 1.6 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดตรงกับชิ้นยีน *js'h* ที่ทำการตัดต่อเข้าไป และเมื่อนำพลาสมิดสายผสม pF3'HTG4(A) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ตำแหน่ง คือ เอนไซม์ *KpnI* และ *XbaI* ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 4.2 กิโลเบส และ 1.6 กิโลเบส ซึ่งตรงกับขนาดของดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 และชิ้นยีน *js'h* ตามลำดับ แสดงว่าชิ้นยีน *js'h* ขนาด 1.6 กิโลเบส สามารถตัดต่อเข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 ได้จริง และตรวจสอบทิศทางของยีนที่เข้าต่อกับดีเอ็นเอเวกเตอร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5.1 กิโลเบส และ 0.7 กิโลเบส ถูกต้องตรงตามแผนที่ยีนที่คาดหวังไว้ แสดงว่าสามารถตัดต่อยีน *js'h* เข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 ในทิศทาง antisense ได้ประสบความสำเร็จ (ภาพที่ 8)

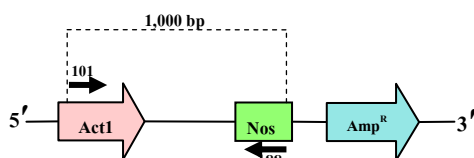


ภาพที่ 8 การศึกษาแผนที่ยีนของพลาสมิด pF3'HTG4(A) ที่มียีน *js'h* ต่อเข้ากับเวกเตอร์ pTG0063 แถวที่ 1 และ 8 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, 2 = pTG0063, 3 = pTG0063/ *XbaI*, 4 = pF3'HTG4(A), 5 = pF3'HTG4(A)/ *KpnI*, 6 = pF3'HTG4(A)/ *KpnI* และ *XbaI*, 7 = pF3'HTG4(A)/ *PstI*

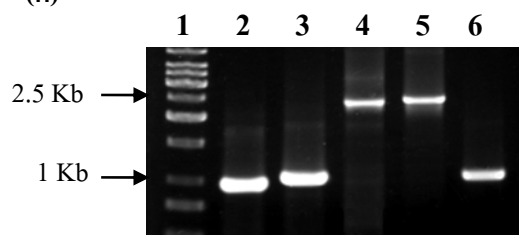
1.1.3 การตรวจสอบยีนโดยวิธีพีซีอาร์(PCR)

นำพลาสมิดสายผสม pF3'HTG4(A) มาตรวจสอบโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ต่าง ๆ (ตารางที่ 3) เพื่อยืนยันทิศทางของยีนที่เข้าต่อกับดีเอ็นเอเวกเตอร์และเพื่อตรวจสอบส่วนประกอบต่าง ๆ ในพลาสมิด ได้แก่ ยีน *3'h* โปรโมเตอร์ Act-1 และเทอร์มินเตอร์ nos จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าขนาดของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ F3'HPer(A)227 กับ F3'H(S)182 ได้ดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส ตรงตามขนาดการเข้าจับของไพรเมอร์กับยีน *3'h* สังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'HPer(A)227 กับ Nos(A)188 ได้ดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส แสดงว่ายีน *3'h* ต่อเข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ในทิศทาง antisense และพลาสมิดนี้ประกอบด้วยเทอร์มินเตอร์ nos ตรวจสอบโปรโมเตอร์ Act-1 โดยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ Act1(S)101 กับ F3'H(S)182 ได้ดีเอ็นเอขนาด 2,400 คู่เบส ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่ายีน *3'h* ต่อเข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์อย่างถูกต้องทิศทางและประกอบด้วยโปรโมเตอร์ Act-1 และเมื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากพลาสมิดสายผสม pF3'HTG4(A) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 ด้วยคู่ไพรเมอร์ Act1(S)101 กับ Nos(A)188 ได้ดีเอ็นเอขนาด 2,600 คู่เบส และ 1,000 คู่เบส ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าชิ้นยีนที่เข้าต่อกับเวกเตอร์มีขนาด 1,600 คู่เบส ซึ่งมีขนาดถูกต้องตรงกับขนาดดีเอ็นเอที่ตัดต่อเข้าไป (ภาพที่ 9)

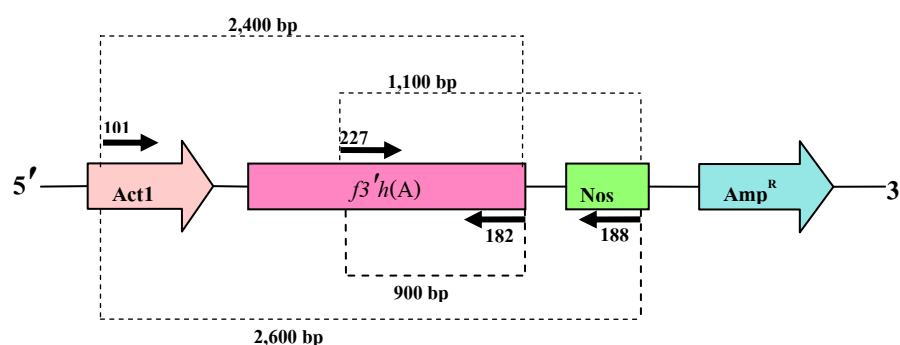
(ก) pTG0063



(ค)



(ข) pF3'HTG4(A)



ภาพที่ 9 แสดงตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063(ก) และพลาสมิด pF3'HTG4(A)(ข) และการตรวจสอบยืนยันด้วยเทคนิคพีซีอาร์(ค) แถวที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, 2 = ผลผลิตพีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ F3'HPer(A)227 กับ F3'H(S)182, 3 = ไพรเมอร์ F3'HPer(A)227 กับ Nos(A)188, 4 = Act1(S)101 กับ F3'H(S)182, 5 = ไพรเมอร์ Act1(S)101 กับ Nos(A)188, 6 = pTG0063 ด้วยคู่ไพรเมอร์ Act1(S)101 กับ Nos(A)188

1.1.4 การตรวจสอบยืนยันโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ pF3'HTG4(A)

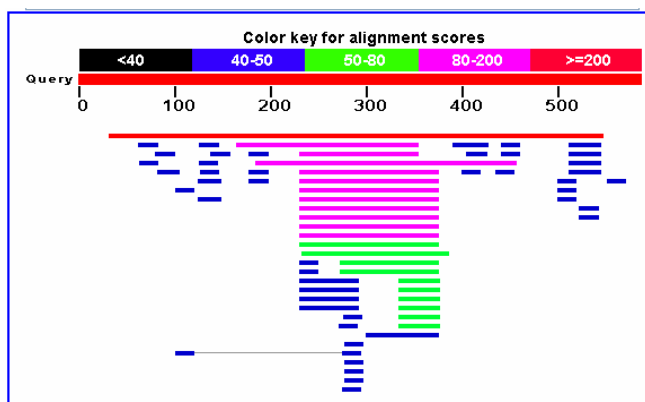
นำพลาสมิดสายผสม pF3'HTG4(A) 50 นาโนกรัม มาเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ NOS(A) (5'-GAGGATTCAATCTTAAGAAACTT-3') เพื่อใช้เป็นข้อมูลยืนยันว่ายีน *f3'h* ต่อเข้ากับเวกเตอร์ pTG0063 ในทิศทาง antisense ผลจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จากด้านปลาย 3' ด้วยไพรเมอร์ NOS(A) สามารถอ่านลำดับเบสได้ 587 คู่เบส (ภาพที่ 10) และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่อยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST-N ที่เว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/blast> พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับสาย sense ของยีน *f3'h* ใน *Perilla frutescens* (accession : AB045593) ในตำแหน่ง

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 42-564 คิดเป็นร้อยละ 97 (ภาพที่ 11) ซึ่งตรงกับยีนที่นำมาตัดต่อ แสดงว่าสามารถตัดต่อยีน *f3'h* เข้ากับเวกเตอร์ pTG0063 ในทิศทาง antisense และทำการศึกษาลำดับกรดอะมิโนโดยโปรแกรม ORF(open reading frame) พบว่าสามารถแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ใน frame +1 ตั้งแต่ตำแหน่ง 34-465 ได้ 143 เรสซิดิว (ภาพที่ 12) นำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลกรดอะมิโนที่อยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST-N พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนตรงกับยีน *f3'h* ใน *Perilla frutescens* (accession : BAB59005.1) คิดเป็นร้อยละ 90 (ภาพที่ 13) จากผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบดังกล่าวจึงนำไปใช้ในการถ่ายยีนต่อไป

>B4.TG4(F3'HTG4(A)), 587 bases, B43 checksum.

```
GCATGTTGACGATCGCCCCATTCGAGTCGGTCCATGATCAGTGCCGCCGT
AAGTTTGATCATATGCACTTCCATTTTAGGGGTACTGGTTTATTTTTTGT
TCCTCAGGCGGGGCGGCGGCAGTAATGGGCGGCCTCTGCCTCCAGGGCCG
AGGCCGTGGCCGATTGTCGGCAACCTTCCGCAGCTGGGGCCGAAGCCCCA
CCAGTCGATGGCAGCCTTGGCCCCGGGTGCATGGCCCCCTCATGCATCTCA
AGATGGGGTTCGTGCATGTTGTGGTGGCCGCCTCCGCCACCGTGGCGGAG
AAGTTCTTGAAGGTGCACGACACCAACTTCTTGAGCCGCCCGCCCAACTC
CGGCGCCGAGCACATTGCTTACAACACTACAACGACTTGGGTTTTTGTCTCCC
CACGGCCCCGCGGTGGCGGTTGCTTCGGAAAATTGTGCCCTCCACCTCTTC
TCCTCCAAGGCTTAGATGATTTTCGCCATGTTAGAGAGGAAGAATGGGGAT
CCTCATTCGCACTACAAGTGTGGGAAAATGCTGCAAGTATAGGCCAAAGA
GGGATGTGTGTGCACAAAGCATACCCGAGCATGTTAG
```

ภาพที่ 10 การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *f3'h* ในพลาสมิดสายผสม pF3'HTG4(A) ที่สังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ NOS(A) จำนวน 587 คู่เบส



>gi|14278924|dbj|AB045593.1 *Perilla frutescens* var. *crispa* SHT12 mRNA for flavonoid 3'-hydroxylase, complete cds, Length=1804

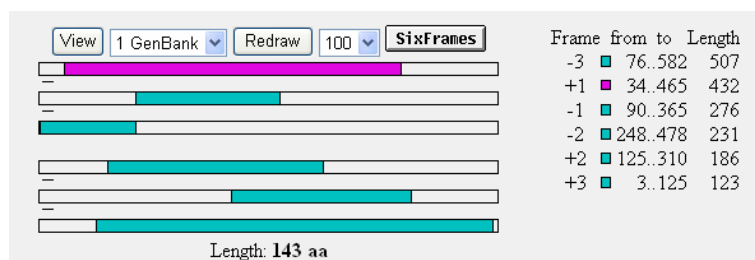
Score = 874 bits (441), Expect = 0.0

Identities = 512/524 (97%), Gaps = 10/524 (1%)

Strand=Plus/Plus

Query	34	ATGATCAGTGCCGCCGTAAGTTTGATCATATGCACTTCCATTTTAGGGGTACTGGTTTAT	93
Sbjct	42	ATGATCAGTGCCGCCGTAAGTTTGATCATATGCACTTCCATTTTAGGGGTACTGGTTTAT	101
Query	94	TTTTTGTTCCTCAGGCGGGCGGCGGCAAGTAATGGGCGGCCTCTGCCTCCAGGCGCGAGG	153
Sbjct	102	TTTTTGTTCCTCAGGCGGGCGGCGGCAAGTAATGGGCGGCCTCTGCCTCCAGGCGCGAGG	161
Query	154	CCGTGGCCGATTGTCGGCAACCTTCCGCAGCTGGGGCCGAAGCCCACAGTCGATGGCA	213
Sbjct	162	CCGTGGCCGATTGTCGGCAACCTTCCGCAGCTGGGGCCGAAGCCCACAGTCGATGGCA	221
Query	214	GCCTTGCCCCGGGTGCATGGCCCCCTCATGCATCTCAAGATGGGGTTCGTGCATGTTGTG	273
Sbjct	222	GCCTTGCCCCGGGTGCATGGCCCCCTCATGCATCTCAAGATGGGGTTCGTGCATGTTGTG	281
Query	274	GTGGCCGCCTCCGCCACCGTGGCGGAGAAGTTCTTGAAGGTGCACGACACCAACTTCTTG	333
Sbjct	282	GTGGCCGCCTCCGCCACCGTGGCGGAGAAGTTCTTGAAGGTGCACGACACCAACTTCTTG	341
Query	334	AGCCGCCCGCCCAACTCCGGCGCCGAGCACATTGCTTACAACACGACTTGGGTTTT	393
Sbjct	342	AGCCGCCCGCCCAACTCCGGCGCCGAGCACATTGCTTACAACACGACTT-GGTTTT	400
Query	394	TGCTCCCCACGGCCCGGCGGTGGCGGTTGCTTCGGAAAA-TTGTGCCCTCCACCTCTTCTC	452
Sbjct	401	TGCTCCCCACGGCCCGGCGGTGGCGGTTGCTTCGGAAAAATTTGTGCCCTCCACCTCTTCTC	460
Query	453	CTCCAAGG-CTTAGATGA-TTTCGCCATGTTAGAGAGGAAGAA-TGGGGATCCTCATTCG	509
Sbjct	461	CTCCAAGGCCTTAGATGACTTCCGCCATGTTAGAGAGGAAGAGTGGGGATCCTCATTCG	520
Query	510	CA--CTA-CAAGTGTGGGA-AAATG-CTGCAAGTATAGGCCAAA	548
Sbjct	521	CAACCTAGCAAGTGTGGGAGAAATGCCTGCAAGTATAGGTCAAA	564

ภาพที่ 11 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *f3'h* ในพลาสมิดสายผสม pF3'HTG4(A) ที่สังเคราะห์ได้จากข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST-N



```

34 atgatcagtgccgccgtaagtttgatcatatgcacttccatttta
   M I S A A V S L I I C T S I L
79 ggggtactggtttatTTTTgttcctcaggcggggcggcggcagt
   G V L V Y F L F L R R G G G S
124 aatgggcggcctctgcctccagggccgaggccgtggccgattgtc
   N G R P L P P G P R P W P I V
169 ggcaaccttccgcagctggggccgaagcccsaccagtcgatggca
   G N L P Q L G P K P H Q S M A
214 gccttggccccgggtgcatggccccctcatgcatctcaagatgggg
   A L A R V H G P L M H L K M G
259 ttcgtgcatgttggtggccgctccgccaccgtggcggagaag
   F V H V V V A A S A T V A E K
304 ttcttgaaggtgcacgacaccaacttcttgagccgccgcccaac
   F L K V H D T N F L S R P P N
349 tccggcgccgagcacattgcttacaactacaacgacttgggtttt
   S G A E H I A Y N Y N D L G F
394 tgctccccacggcccggtggcggttgcttcggaaaattgtgcc
   C S P R P A V A V A S E N C A
439 ctccaccttcttctcctccaaggcttag 465
   L H L F S S K A *

```

ภาพที่ 12 การแปลลำดับกรดอะมิโนของยีน *flavonoid 3'-hydroxylase* ในพลาสมิดสายผสม pF3'HTG4(A) ที่สังเคราะห์ได้ด้วยโปรแกรม ORF (open reading frame)

>dbj|BAB59005.1| flavonoid 3'-hydroxylase [Perilla frutescens], Length = 523

Score = 263 bits (671), Expect = 1e-69

Identities = 130/143 (90%), Positives = 132/143 (92%)

```

Query: 1  MISAAVSLIICTSILGVLVYFLFLRRGGGSNGRPLPPGPRWPPIVGNLPQLGPKPHQSMA 60
        MISAAVSLIICTSILGVLVYFLFLRRGGGSNGRPLPPGPRWPPIVGNLPQLGPKPHQSMA
Sbjct: 1  MISAAVSLIICTSILGVLVYFLFLRRGGGSNGRPLPPGPRWPPIVGNLPQLGPKPHQSMA 60

Query: 61  ALARVHGPLMHLKMGFVHVVAASATVAEKFLKVHDTNFLSRPPNSGAEHIAYNYNLGF 120
        ALARVHGPLMHLKMGFVHVVAASATVAEKFLKVHDTNFLSRPPNSGAEHIAYNYNL F
Sbjct: 61  ALARVHGPLMHLKMGFVHVVAASATVAEKFLKVHDTNFLSRPPNSGAEHIAYNYNLGF 120

Query: 121 C SPRPAVAVASENCALHLFSSKA 143
        P + + CALHLFSSKA
Sbjct: 121 A PHGPRWRLLRKICALHLFSSKA 143

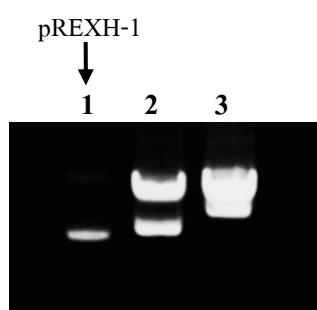
```

ภาพที่ 13 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *flavonoid 3'-hydroxylase* ในพลาสมิดสายผสม pF3'HTG4(A) ที่สังเคราะห์ได้กับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST-P

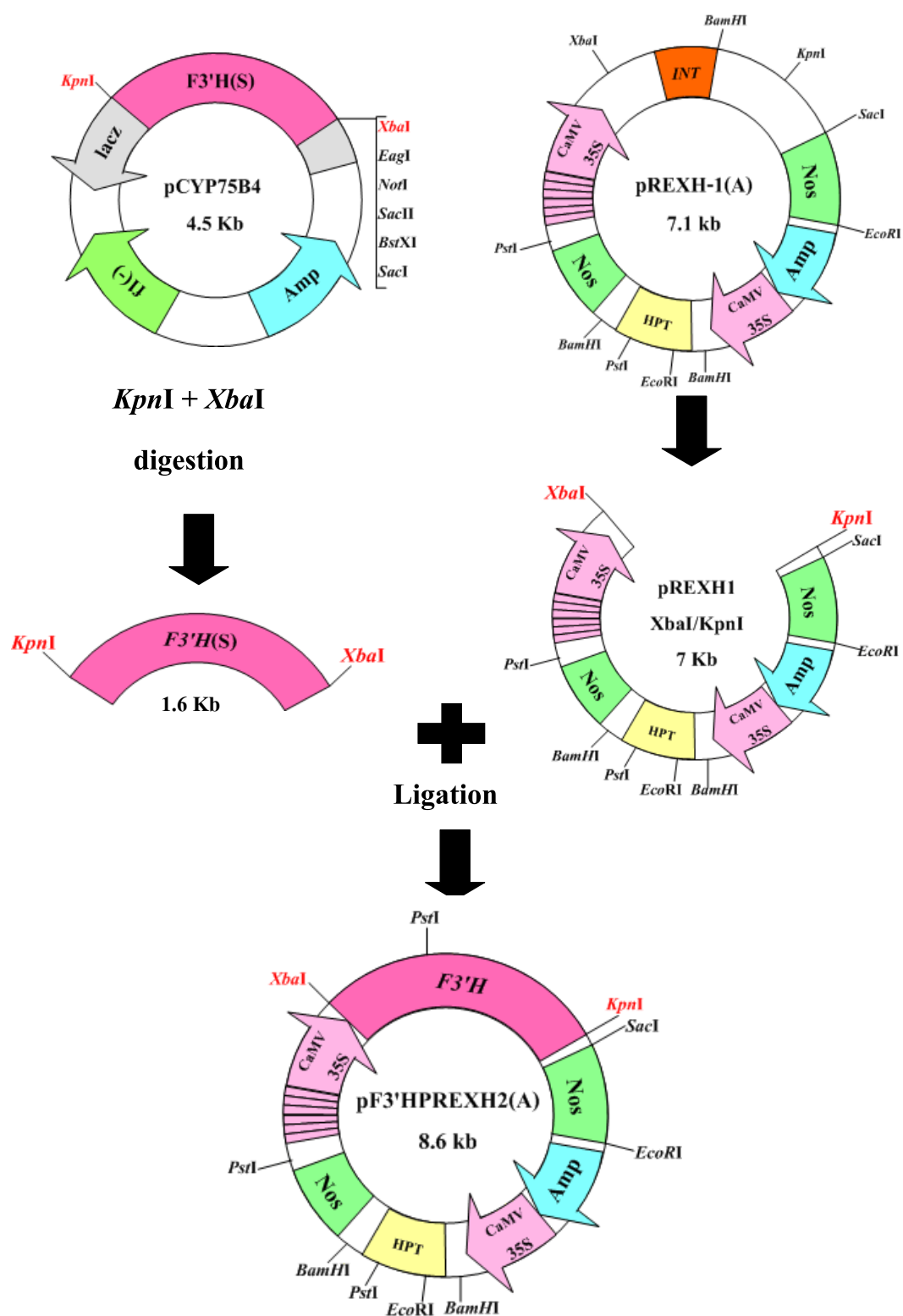
1.2 การตัดต่อยีน *f3'h* เข้ากับโปรโมเตอร์ CaMV35S

1.2.1 การตัดต่อยีน

นอกจากนี้ทำการตัดต่อยีน *f3'h* ของ *Perilla frutescens* ในพลาสมิด pCYP75B4 เข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1 (ภาพที่ 15) โดยการตัดยีน *f3'h* ขนาด 1.6 กิโลเบสจากพลาสมิด pCYP75B4 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *XbaI* นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ต่อเข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1 ขนาด 7.1 กิโลเบส ซึ่งมีโปรโมเตอร์ CaMV 35S จำนวนซ้ำกัน 7 ชุด เทอร์มินเตอร์ nos และยีนต้านทานสารไฮโกรมัยซิน ตัด pREXH-1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันแต่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์สลับด้านกัน นำพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ได้เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่เจริญบนอาหารคัดเลือกทั้งหมด 2 โคโลนี ที่มีขนาดพลาสมิดใหญ่กว่าดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1 (ภาพที่ 14) แต่เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของทิศทางการตัดต่อด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะพบว่าไม่มีเพียงโคลนที่ให้ชื่อว่า pF3'HPREXH2(A) ซึ่งมีขนาด 8.6 กิโลเบส เท่านั้น ที่ได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอถูกต้อง คือเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* กับ *XbaI* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 7 กับ 1.6 กิโลเบส ตรงตามขนาดของดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1 และขนาดของยีน *f3'h* และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5, 2.6 และ 1 กิโลเบส ซึ่งตรงกับแผนที่ ดังนั้นจึงคัดเลือกโคลน pF3'HPREXH2(A) นำไปใช้ในการถ่ายยีน *f3'h* เข้ากล้วยไม้ในทิศทาง antisense เช่นเดียวกัน แต่มีโปรโมเตอร์ CaMV 35S เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน อย่างไรก็ตามการตัดดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* กับ *XbaI* ทำให้ตัดส่วน intron ของดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1 ออกไป ทำให้ดีเอ็นเอเวกเตอร์มีขนาดเล็กลง



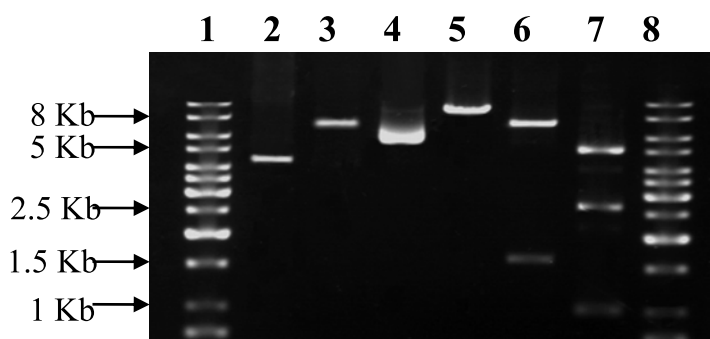
ภาพที่ 14 การตรวจสอบโคลนที่ได้จากการตัดต่อยีน *f3'h* เข้ากับโปรโมเตอร์ CaMV35S จำนวน 2 โคลน



ภาพที่ 15 การสร้างพลาสมิดสายผสมที่มียีน *f3'h* ทิศทาง antisense ต่อกับโปรโมเตอร์ *CaMV 35S* ในดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1

1.2.2 การตรวจสอบยีน โดยวิธีเอนไซม์ตัดจำเพาะ(Restriction Mapping)

ตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดสายผสม pF3'HPREXH2(A) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* เพียง 1 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 8.6 กิโลเบส ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1 ที่ตัด 1 ตำแหน่งเช่นเดียวกันด้วยเอนไซม์ *XbaI* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 7 กิโลเบส แสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอที่เข้าต่อกับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1 มีขนาด 1.6 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดตรงกับชิ้นยีน *f3'h* ที่ทำการตัดต่อเข้าไป และเมื่อตัดพลาสมิดสายผสม pF3'HPREXH2(A) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ตำแหน่ง คือ เอนไซม์ *KpnI* และ *XbaI* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 7 กิโลเบส และ 1.6 กิโลเบส ซึ่งตรงกับขนาดของดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1 และชิ้นยีน *f3'h* ตามลำดับ แสดงว่าสามารถตัดต่อชิ้นยีน *f3'h* ขนาด 1.6 กิโลเบส เข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1 ได้จริง และตรวจสอบทิศทางของยีนที่เข้าต่อกับดีเอ็นเอเวกเตอร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5 กิโลเบส, 2.6 กิโลเบส และ 1 กิโลเบส ตรงตามแผนที่ยีนที่คาดหวังไว้ แสดงว่าสามารถตัดต่อชิ้น *f3'h* เข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1 ในทิศทาง antisense ได้ถูกต้อง (ภาพที่ 16)

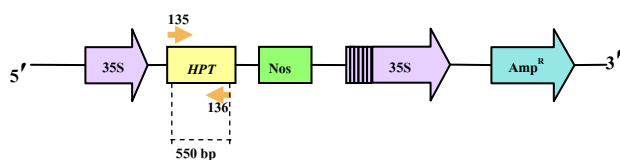


ภาพที่ 16 การศึกษาแผนที่ยีนของพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) ที่มียีน *f3'h* ต่อเข้ากับเวกเตอร์ pREXH-1 แถวที่ 1 และ 8 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, 2 = pTG0063, 3 = pTG0063/*XbaI*, 4 = pF3'HPREXH2(A), 5 = pF3'HPREXH2(A)/*KpnI*, 6 = pF3'HPREXH2(A)/*KpnI* และ *XbaI*, 7 = pF3'HPREXH2(A)/*PstI*

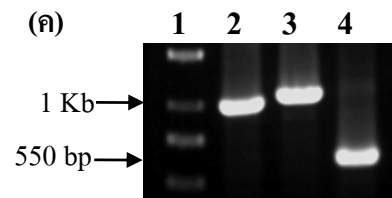
1.2.3 การตรวจสอบยีนโดยวิธีพีซีอาร์(PCR)

นำพลาสมิดสายผสม pF3'HPREXH2(A) มาตรวจสอบโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ต่าง ๆ ตามตารางที่ 3 แล้วนำมาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกัน พบว่าขนาดของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'HPer(A)227 กับ F3'H(S)182 มีขนาด 900 คู่เบส ตรงตามขนาดที่คาดไว้และเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ด้วยคู่ไพรเมอร์เดียวกันในพลาสมิด pF3'HTG4(A) (ภาพที่ 17) ตรวจสอบเทอร์มินเตอร์ โดยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'HPer(A)227 กับ Nos(A)188 ได้ดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส แสดงว่ายีนต่อเข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ในทิศทาง antisense ได้ถูกต้องเหมือนกับพลาสมิด pF3'HTG4(A) และพลาสมิดนี้ประกอบด้วยเทอร์มินเตอร์ nos เช่นเดียวกัน และตรวจสอบยีน *hptII* ด้วยคู่ไพรเมอร์ HPT(S)135 กับ HPT(A)136 พบว่าสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ขนาด 550 คู่เบส เท่ากับขนาดยีน *hptII* ที่ตรวจสอบได้ในดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1 ดังนั้นพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) จึงประกอบด้วยส่วนของยีน *hptII* ด้วย

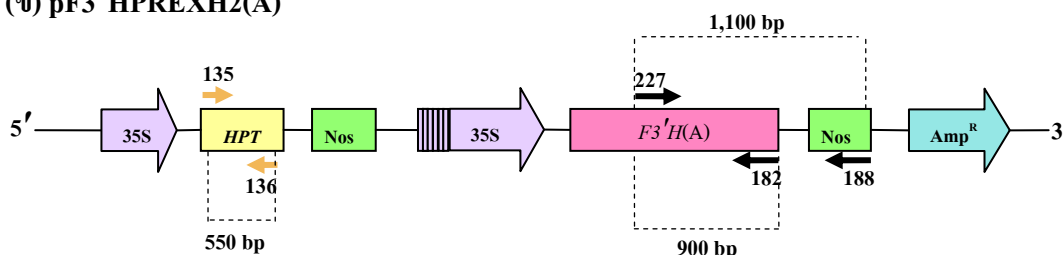
(ก) pREXH-1



(ค)



(ข) pF3'HPREXH2(A)

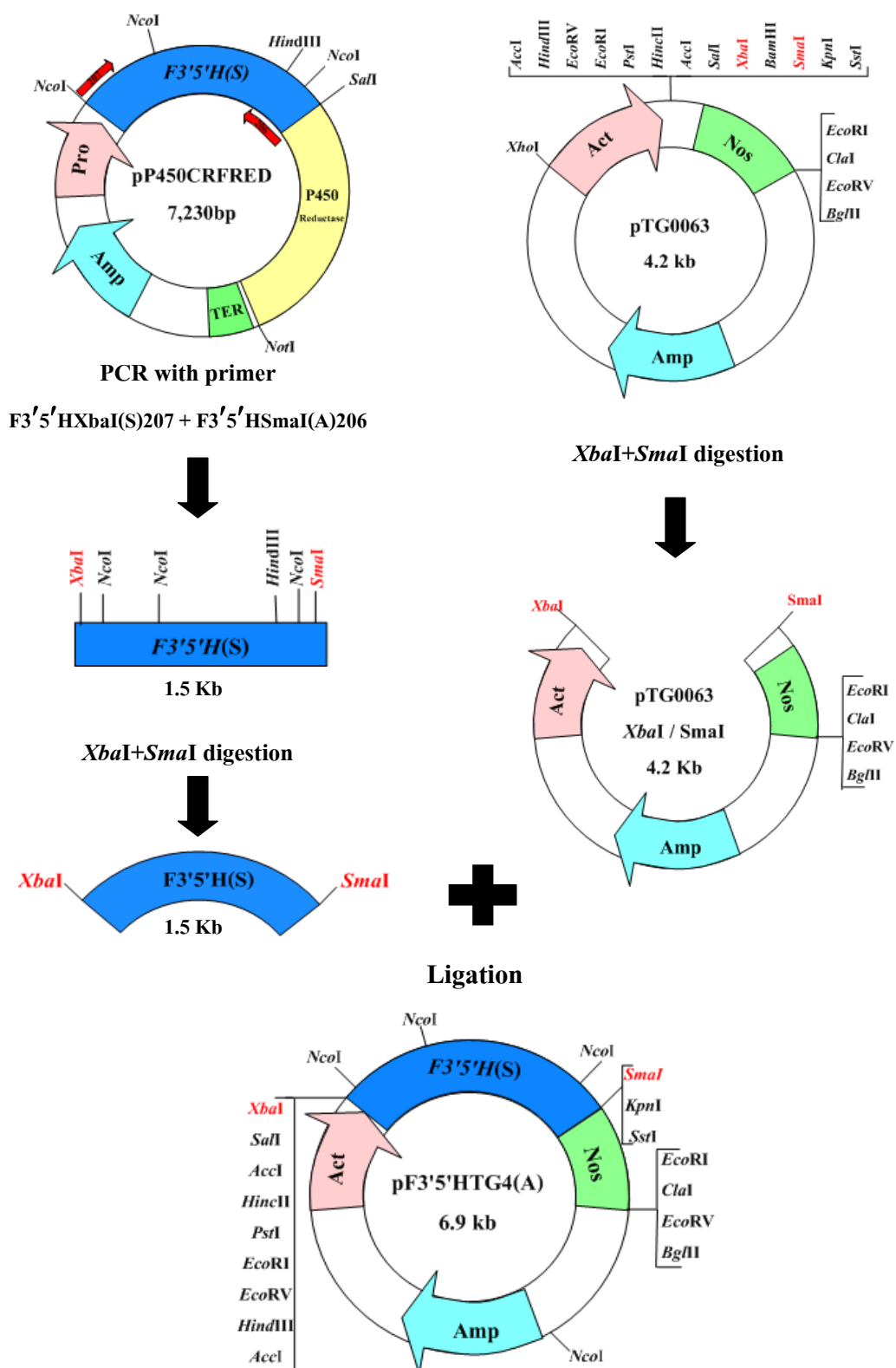


ภาพที่ 17 แสดงตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pREXH-1 (ก) และพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) (ข) และการตรวจสอบยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์(ค) แถวที่ 1 คือ แถบ ดีเอ็นเอมาตรฐาน, 2 = ผลผลิตพีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ F3'HPer(A)227 กับ F3'H(S)182, 3 = ไพรเมอร์ F3'HPer(A)227 กับ Nos(A)188, 4 = ไพรเมอร์ HPT(S)135 กับ HPT(A)136

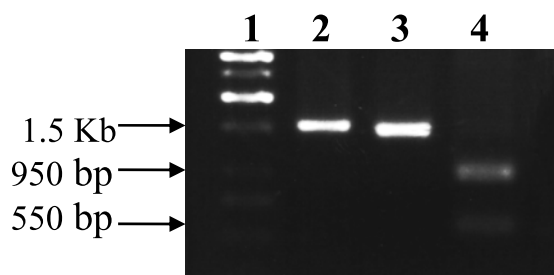
2. การตัดต่อยีน *f3'5'h* ในรูปแบบ *sense orientation*

2.1 การตัดต่อยีน *f3'5'h* เข้ากับโปรโมเตอร์ Act-1

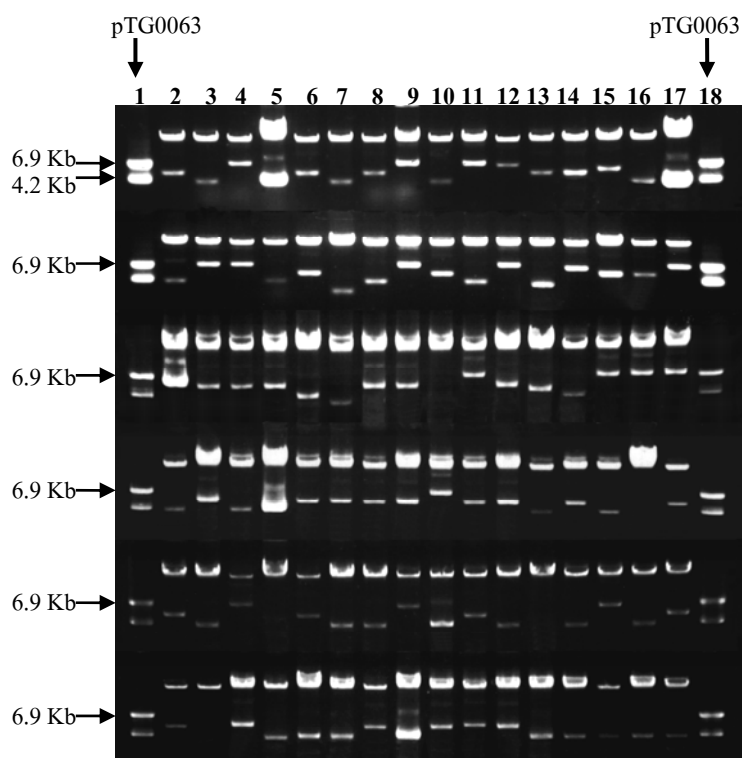
การตัดต่อยีน *f3'5'h* ของ *Catharanthus roseus* ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจาก Joachim Schroeder เข้ากับเวกเตอร์ pTG0063 ขนาด 4.2 กิโลเบส ซึ่งมีโปรโมเตอร์ Actin-1 และเทอร์มินเตอร์ nos โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *f3'5'h* ขนาด 1.5 กิโลเบส ในพลาสมิด pP450CRFRED ขนาด 7,230 คู่เบส ด้วยไพรเมอร์ F3'5'H XbaI(S)(207) ที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *XbaI* และไพรเมอร์ F3'5'HSmaI(A)(206) ที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *SmaI* ตรวจสอบความถูกต้องของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,450 คู่เบส และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 950 และ 550 คู่เบส ตรงตามขนาดดีเอ็นเอบนแผนที่ยีน *f3'5'h* ที่คาดหวัง (ภาพที่ 19) นำชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ขนาด 1.5 กิโลเบส ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *SmaI* ต่อเข้ากับเวกเตอร์ pTG0063 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน (ภาพที่ 18) หลังจากนั้นนำพลาสมิดสายผสมที่ได้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* พบเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่เจริญบนอาหารคัดเลือกทั้งหมด 159 โคโลนี นำมาตรวจสอบผลการตัดต่อยีนโดยการแยกขนาดพลาสมิดบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 20) พบว่าพลาสมิดสายผสมที่ได้ส่วนใหญ่มีขนาดดีเอ็นเอไม่ถูกต้อง ยกเว้นพลาสมิดสายผสมที่มีขนาดใหญ่กว่าดีเอ็นเอเวกเตอร์ จำนวน 18 โคโลนี เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* กับ *SmaI* ได้ดีเอ็นเอขนาด 5 กิโลเบส และ 1.9 กิโลเบส คัดเลือกโคลนจำนวน 1 โคลน ให้ชื่อโคลนนี้ว่า pF3'5'HTG24(S) เพื่อนำมาตรวจสอบและใช้ในการถ่ายยีน *f3'5'h* เข้ากล้วยไม้ในทิศทาง *sense* ซึ่งมีโปรโมเตอร์ Act-1 เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน



ภาพที่ 18 การสร้างพลาสมิดสายผสมที่มียีน *f3'5'h* ทิศทาง sense ต่อกับโปรโมเตอร์ Actin 1 ใน ดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063



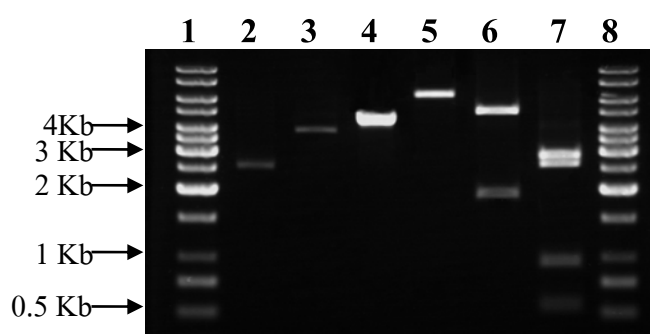
ภาพที่ 19 การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *f3'5'h* ในพลาสมิด pP450CRFRED , แถวที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, 2 = ชิ้นยีน *f3'5'h* ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยไพรเมอร์ F3'5'H XbaI(S)(207) และ ไพรเมอร์ F3'5' HSmaI(A)(206), 3 = ชิ้นยีน *f3'5'h* / *HindIII*, 4 = ชิ้นยีน *f3'5'h* / *NcoI*



ภาพที่ 20 การตรวจสอบโคลนที่ได้จากการตัดต่อยีน *f3'5'h* เข้ากับเวกเตอร์ pTG0063 ใน *E. coli* จำนวน 96 โคลน ด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม

2.2 การตรวจสอบยีนโดยวิธีเอนไซม์ตัดจำเพาะ(Restriction Mapping)

ทำแผนที่ยีนตรวจสอบพลาสมิดสายผสม pF3'5'HTG24(S) เช่นเดียวกันโดยการนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I เพียง 1 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 6.9 กิโลเบส ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I เพียง 1 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4.2 กิโลเบส แสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอที่เข้าต่อกับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 มีขนาด 2.7 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดใหญ่มากกว่าชิ้นยีน *f3'5'h* ขนาด 1.5 กิโลเบส ที่ทำการตัดต่อเข้าไป เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดต่อเข้าไปมีขนาดผิดปกติจึงทำให้แผนที่ยีนเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งเมื่อนำพลาสมิดสายผสม pF3'5'HTG24(S) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ตำแหน่ง คือ เอนไซม์ *Xba*I และ *Sma*I ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 5 กิโลเบส และ 1.9 กิโลเบส ผิดไปจากแผนที่ยีนที่คาดหวัง คือ ขนาด 4.2 และ 1.5 กิโลเบส และตรวจสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.8 กิโลเบส 2.6 กิโลเบส 0.95 กิโลเบส และ 0.55 กิโลเบส (ภาพที่ 21) ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.95 กิโลเบส และ 0.55 กิโลเบส มีขนาดถูกต้องตรงกับชิ้นดีเอ็นเอยีน *f3'5'h* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน แสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอ *F3'5'H* ขนาด 1.5 กิโลเบส ยังคงอยู่ในพลาสมิด แต่มีชิ้นดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นมาขนาด 1.2 กิโลเบส ต่อกับเวกเตอร์ pTG0063 ขนาด 4.2 กิโลเบส พลาสมิด pF3'5'HTG24(S) จึงมีขนาด 6.9 กิโลเบส ดังนั้นจึงนำพลาสมิด pF3'5'HTG24(S) ไปตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ต่อไป

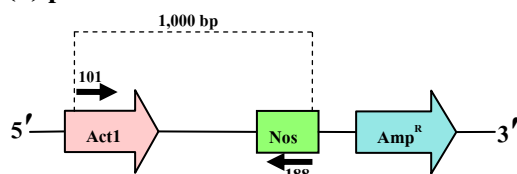


ภาพที่ 21 การศึกษาแผนที่ยีนของพลาสมิด pF3'5'HTG24(S) ที่มียีน *f3'5'h* ต่อเข้ากับเวกเตอร์ pTG0063, แถวที่ 1 และ 8 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, 2 = pTG0063, 3 = pTG0063/*Xba*I, 4 = pF3'5'HTG24(S), 5 = pF3'5'HTG24(S)/*Xba*I, 6 = pF3'5'HTG24(S)/*Xba*I และ *Sma*I, 7 = pF3'5'HTG24(S)/*Nco*I

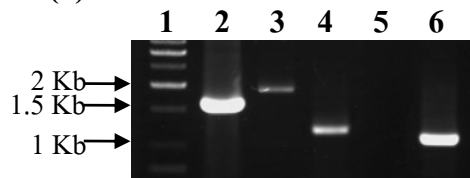
2.3 การตรวจสอบยืนยันโดยวิธีพีซีอาร์(PCR)

สังเคราะห์ดีเอ็นเอส่วนต่าง ๆ ของพลาสมิดลูกผสม pF3'5'HTG24(S) โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่สนใจดังตารางที่ 3 เพื่อตรวจสอบความถูกต้องและส่วนประกอบต่าง ๆ ในพลาสมิด (ภาพที่ 22) เมื่อสังเคราะห์ชิ้น $f3'5'h$ ด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'5'HXbaI(S)207 กับ F3'5'HSmaI(A)206 ได้ดีเอ็นเอขนาด 1,500 คู่เบส เท่ากับขนาดของชิ้นยีนในตอนแรกที่สังเคราะห์ขึ้นมาด้วยคู่ไพรเมอร์เดียวกันเพื่อใช้ในการตัดต่อเข้ากับดีเอ็นเอเวกเตอร์ สังเคราะห์ดีเอ็นเอครอบคลุมในส่วนของโปรโมเตอร์ Act-1 ด้วยคู่ไพรเมอร์ Act1(S)101 กับ F3'5'HSmaI(A)206 ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 1,900 คู่เบส แสดงว่ายีน $f3'5'h$ ติดต่อเข้ากับเวกเตอร์ในทิศทาง sense ตามคาดหมาย และพลาสมิดยังคงมีส่วนของโปรโมเตอร์ Act-1 แต่เมื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอครอบคลุมในส่วนของเทอร์มินเตอร์ nos ด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'5'HXbaI(S)207 กับ Nos(A)188 ปรากฏว่าได้ดีเอ็นเอขนาด 1,200 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าขนาดของยีน $f3'5'h$ ที่ติดต่อเข้าไป อาจเนื่องจากความผิดปกติของชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจพบเมื่อตรวจสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแทรกเพิ่มขึ้นมาขนาด 1.2 กิโลเบส ระหว่างชิ้นยีนและเวกเตอร์ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเจาะจง และเมื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ Act1(S)101 กับ Nos(A)188 พบว่าไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ (ภาพที่ 22(ก))

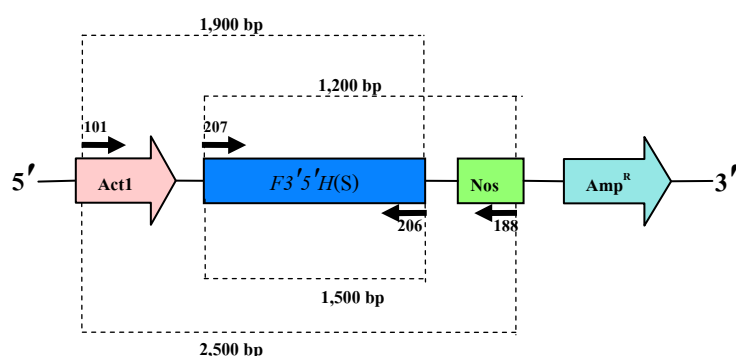
(ก) pTG0063



(ค)



(ข) pF3'5'HTG24(S)



ภาพที่ 22 แสดงตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเวกเตอร์ pTG0063 (ก) และพลาสมิด pF3'5'HTG24(S) (ข) และการตรวจสอบยืนยันด้วยเทคนิคพีซีอาร์(ค) แถวที่ 1 คือ แถบ ดีเอ็นเอมาตรฐาน, 2 = ผลผลิตพีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ F3'5'XbaI(S)207 กับ F3'5'SmaI(A)206, 3 = ไพรเมอร์ Act1(S)101 กับ F3'5'SmaI(A)206, 4 = ไพรเมอร์ F3'5'XbaI(S)207 กับ Nos(A)188, 5 = ไพรเมอร์ Act1(S)101 กับ Nos(A)188, 6 = pTG0063 ด้วยคู่ไพรเมอร์ Act1(S)101 กับ Nos(A)188

3. การเตรียมเนื้อเยื่อกล้วยไม้ที่ใช้ในการทดลอง

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายแจกเกอลีนโทมัสและกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลระยะโปรโตคอร์มในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ผสมกับอาหารสังเคราะห์ MS อย่างละครึ่ง เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง โปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายแจกเกอลีนโทมัสและกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลมีการเจริญเติบโตแบ่งขยายตัวได้ดี มีขนาดที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีน การเพิ่มขยายโปรโตคอร์มทำได้โดยตัดแบ่งโปรโตคอร์มให้มีขนาดเล็กลงประมาณ 0.5 เซนติเมตร และย้ายลงบนอาหาร

เพาะเลี้ยงใหม่ทุก ๆ 2 สัปดาห์ สำหรับโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเอื้องสกุลมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่า จึงสามารถตัดเพื่อเพาะเลี้ยงได้ถึง 3 สัปดาห์

การเตรียมสภาพเนื้อเยื่อให้เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและเนื้อเยื่อที่ใช้ และการเตรียมเนื้อเยื่อก่อนการถ่ายยีนให้เซลล์อยู่ในช่วงการแบ่งเซลล์จำนวนมาก จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนอย่างถาวรในเซลล์ ซึ่ง Iida *et al.*(1991) พบว่าการถ่ายยีนเข้าเซลล์ยาสูบในระยะการแบ่งเซลล์ M- และ G2 phase มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนมากกว่าการถ่ายเข้าเซลล์ในระยะ S- และ G1 phase และ Yang *et al.*(1999) ได้รายงานว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มไลด์บอดีในอาหารเหลวมีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนเซลล์มากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ที่เตรียมโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายแจ๊คเกอลีนโทมัสและเอื้องสกุลโดยการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรดัดแปลง VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ผสมกับอาหารสังเคราะห์ MS อย่างละครึ่ง โปรโตคอร์มสามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ดีเช่นเดียวกับการทดลองของ พิสิฐ(2546) และ Kuehnle and Sugii(1992) ที่ใช้อาหารเหลวสูตรดัดแปลง VW เพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายแจ๊คเกอลีนโทมัส

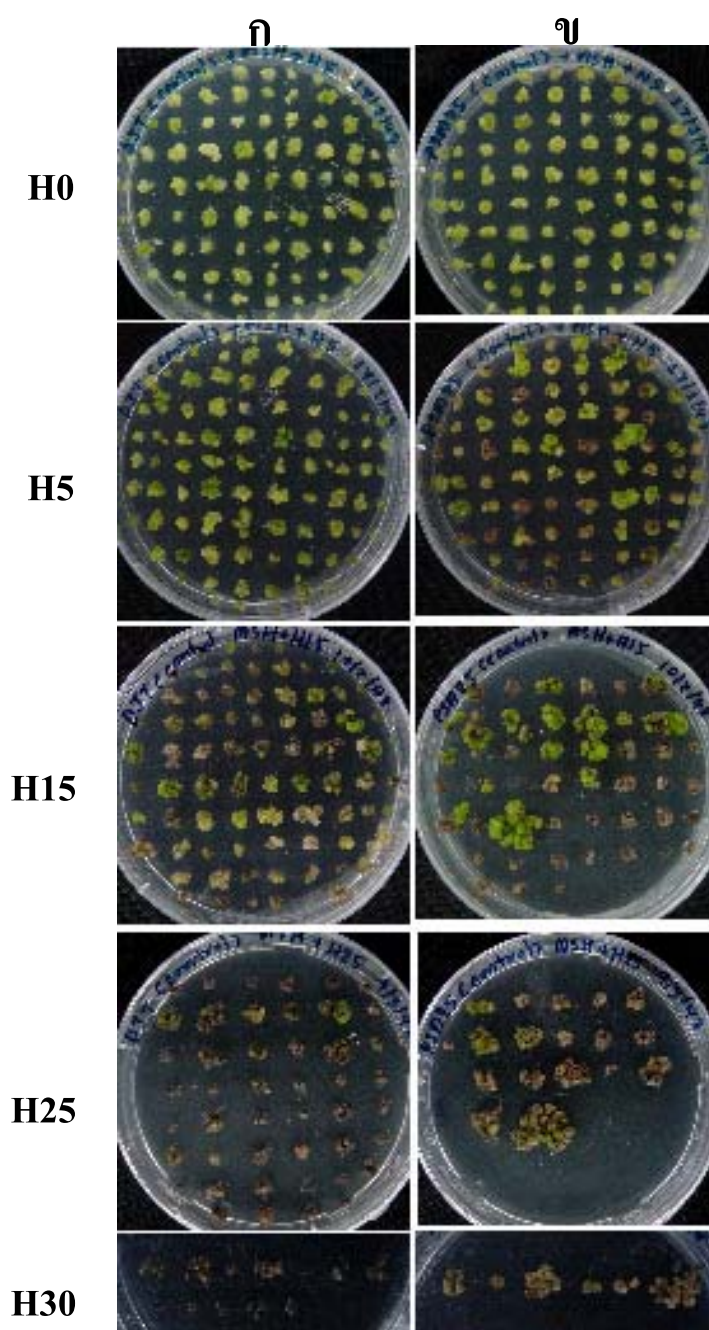
4. การทดสอบความต้านทานของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินของกล้วยไม้สกุลหวายแจ๊คเกอลีนโทมัสและเอื้องสกุลที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจำนวน 85 โปรโตคอร์ม และ 47 โปรโตคอร์มตามลำดับ โดยนำโปรโตคอร์มที่ได้จากข้อ 3 มาตัดแบ่งโปรโตคอร์มให้มีขนาด 0.3-0.5 เซนติเมตรวางบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวายเอื้องสกุลมีความไวต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินมากกว่ากล้วยไม้สกุลหวายแจ๊คเกอลีนโทมัส โดยโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเอื้องสกุลบางส่วนเริ่มตาย เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือสีน้ำตาลดำ ในขณะที่โปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวายแจ๊คเกอลีนโทมัสเนื้อเยื่อแสดงอาการซีดเหลืองและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเล็กน้อย จำนวนโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวายแจ๊คเกอลีนโทมัสและเอื้องสกุลที่รอดชีวิตมีจำนวน 75 โปรโตคอร์ม และ 47 โปรโตคอร์ม ซึ่งคิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 88.24 และ 60.26 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ต่อมาโปรโตคอร์มมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะกล้วยไม้สกุลหวายเอื้องสกุลมีการเจริญเติบโตมากกว่ากล้วยไม้แจ๊คเกอลีนโทมัส เมื่อแยกโปรโตคอร์มที่รอดชีวิตมาคัดเลือกต่อบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น

ระยะเวลา 4 สัปดาห์ โปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวายเยี่ยสกุลแสดงอาการตายอย่างเห็นได้ชัด มีลักษณะเนื้อเยื่อสีน้ำตาลดำ ส่วนโปรโตคอร์มกล้วยไม้แจกเกอลินโทมัสเนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลดำ จำนวนโปรโตคอร์มที่รอดชีวิตมีจำนวน 18 โปรโตคอร์ม และ 46 โปรโตคอร์ม คิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 38.3 และ 61.33 และมีบางส่วนที่รอดชีวิตซึ่งมีสีเขียวแต่การเจริญเติบโตช้า คัดเลือกโปรโตคอร์มที่รอดชีวิตต่อบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นมากขึ้นเป็น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวายแจกเกอลินโทมัสมีการตายมากขึ้นเกือบทั้งหมด เหลือโปรโตคอร์มที่รอดชีวิตจำนวน 13 โปรโตคอร์ม และกล้วยไม้สกุลหวายเยี่ยสกุลมีโปรโตคอร์มที่รอดชีวิตจำนวน 6 โปรโตคอร์ม คิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 28.26 ซึ่งน้อยกว่ากล้วยไม้สกุลหวายเยี่ยสกุลที่คิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 33.33 เปอร์เซนต์ และโปรโตคอร์มตายทั้งหมดเมื่อคัดเลือกต่อในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 23)

การทดลองครั้งนี้ได้เลือกใช้สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นตัวคัดเลือกกล้วยไม้สกุลหวายแจกเกอลินโทมัสและกล้วยไม้สกุลหวายเยี่ยสกุล ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ใช้สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นตัวคัดเลือกกล้วยไม้ (Yu *et al.*, 1999; Belarmino and Mii, 2000) ซึ่งสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินยังช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออีกด้วย ปริมาณสารและช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกขึ้นอยู่กับชนิดพืชและเนื้อเยื่อที่ใช้ ซึ่ง พรสุข(2543), พิสิฐ(2546), Yang *et al.*(1999), Knapp *et al.*(2000) และ Chai *et al.*(2002) ได้รายงานการใช้สารคัดเลือกกล้วยไม้ด้วยความเข้มข้นระดับต่ำ ๆ ก่อนการคัดเลือกด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อฟื้นฟูสภาพเนื้อเยื่อจากความบอบช้ำที่ถูกยิง และจากรายงานของ Ying *et al.*(1999) กล่าวว่าไวรัการแทรกยีนเข้าสู่จีโนมจะเกิดในช่วงแรก ๆ ของการถ่ายยีน ดังนั้นเพื่อเพิ่มโอกาสการคงอยู่ของยีนหรือเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีน การคัดเลือกที่ความเข้มข้นระดับต่ำ ๆ หลังการถ่ายยีนจะช่วยกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์มากขึ้น(Chai *et al.*, 2002) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองครั้งนี้ที่คัดเลือกโปรโตคอร์มในอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินระดับต่ำก่อนแล้วค่อยเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ คือ 5, 15, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เวลาคัดเลือก 1 เดือนในแต่ละช่วงความเข้มข้น ซึ่งต่างจากการทดลองของ พิสิฐ(2546) ที่ทำการคัดเลือกกล้วยไม้สกุลหวายแจกเกอลินโทมัสบนอาหารแข็งสังเคราะห์ MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน ก่อนคัดเลือกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน และต่างจากการทดลองของ Men *et al.*(2003) ที่คัดเลือกต้นกล้วยไม้ฟลาแลนคั่นอฟซิส (*Phalaenopsis*) และกล้วยไม้สกุลหวายโนบิล (*nobile*) ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 105 วัน

ในขณะที่ Yu *et al.*(1999) ได้คัดเลือกโปรโตคอร์ัมกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสม MiHua โดยใช้สาร
 ปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน



ภาพที่ 23 การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินของกล้วยไม้สกุลหวายแจกเกอ
 ลินโทมัส(ก) และเอียสกุล (ข) ที่ไม่ได้ถ่ายยีนบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกร
 มัยซินที่ระดับความเข้มข้น 0-30 มิลลิกรัมต่อลิตร (H0-H30) เป็นระยะเวลา 4 เดือน

ตารางที่ 4 อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลินโทมัสและกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลบนอาหาร MS ที่มีไฮโกรมัยซินอัตราต่าง ๆ กัน

ชุดการทดลอง	อัตราการรอดของโปรโตคอร์ม (ร้อยละ)				
	[H] (mg/ml)	H5	H15	H25	H30
	สายพันธุ์	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 8	สัปดาห์ที่ 12	สัปดาห์ที่ 16
แจคเกอลินโทมัส		88.24	61.33	28.26	0
เอียสกุล		60.26	38.3	33.33	0

หมายเหตุ: [H] คือ ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

5. การถ่ายยีนเข้าโปรโตคอร์มกล้วยไม้ด้วยเครื่องยิงอนุภาค

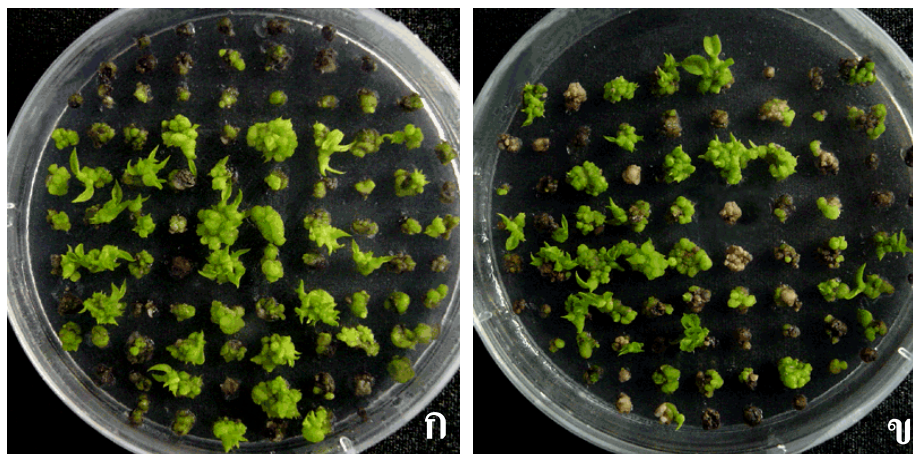
คัดเลือกโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MSVW หลังจากตัดแบ่งเนื้อเยื่อนาน 2 สัปดาห์ มาตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.3 ถึง 0.5 เซนติเมตร นำมาวางบนอาหาร MS ที่มี 0.25 M mannitol (Van *et al.*, 1993) ให้อยู่ในรัศมี 2.5 เซนติเมตร ก่อนการยิงอนุภาค 1 คืน เคลือบอนุภาคทองด้วยพลาสติกที่มียีน *f3'h* การถ่ายยีน *f3'h* แบ่งเป็น 2 ชุดการทดลองคือ 1. การถ่ายยีน *f3'h* ที่อยู่บนพลาสติก pF3'HTG4(A) ถ่ายยีนร่วมกับพลาสติก pMNK1005 ที่มียีนต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเพื่อใช้เป็นยีนคัดเลือก 2. การถ่ายยีน *f3'h* ที่อยู่บนพลาสติก pF3'HPREXH2(A) เนื่องจากพลาสติก pF3'HPREXH2(A) ประกอบด้วยยีนต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน จึงเคลือบอนุภาคทองด้วยพลาสติก pF3'HPREXH2(A) เท่านั้น นำอนุภาคที่เคลือบดีเอ็นเอยิงเข้าโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลินโทมัสและเอียสกุลด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS-1000/Helium Particle gun (Bio-Rad Laboratories)

5.1 การถ่ายยีน *f3'h* เข้ากล้วยไม้สกุลหวายในทิศทาง antisense

5.1.1 การถ่ายยีน *f3'h* เข้ากล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลินโทมัส

จากผลการทดลองความต้านทานของกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีนสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินในข้อ 4 พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร โปรโตคอร์มตายอย่าง

รวดเร็วภายใน 2 สัปดาห์ ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมในการคัดเลือกกล้วยไม้หลังการถ่ายยีนโดยนำโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายแจกเกอลินโทมัสที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 จำนวน 311 โปรโตคอร์ม และโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) จำนวน 316 โปรโตคอร์ม มาคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 5, 15, 25, 25 และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำการคัดเลือกกล้วยไม้ที่ได้รับยีนบนอาหาร MS ที่มีความเข้มข้นสารต่ำแล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นสารสูงขึ้นตามลำดับ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีน(Chai *et al.*, 2002) ใช้ระยะเวลาการคัดเลือกความเข้มข้นละ 4 สัปดาห์ ผลจากการทดลองพบว่าโปรโตคอร์มแสดงอาการตายตั้งแต่การคัดเลือกบนอาหารที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองและบางโปรโตคอร์มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล โดยที่โปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) แสดงอาการตายมากกว่าโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 โดยจำนวนโปรโตคอร์มที่รอดชีวิตคิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 87.03 และ 89.39 ตามลำดับ เมื่อคัดเลือกกล้วยไม้บนอาหารแข็ง MS ที่ความเข้มข้นไฮโกรมัยซิน 15 มิลลิกรัมต่อลิตร โปรโตคอร์มมีอัตราการตายมากขึ้น และโปรโตคอร์มที่รอดชีวิตมีการเจริญเติบโตเป็นยอดและใบเล็ก ๆ (ภาพที่ 24) โปรโตคอร์ม กล้วยไม้ถูกตัดยอดออกก่อนนำไปคัดเลือกต่อบนอาหารที่มีไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 2 ครั้ง ในการทดสอบความต้านทานไฮโกรมัยซินที่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร โปรโตคอร์มไวต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินมากและตายเกือบทั้งหมด จึงลดระดับความเข้มข้นเหลือ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากคัดเลือกพบว่าโปรโตคอร์มตายมากขึ้นและหลังสารพวกฟีนอลลิกออกมา และโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 คิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 24.9 และ 18.92 ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 16 จากนั้นลดระดับความเข้มข้นสารไฮโกรมัยซินลงเหลือ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อฟื้นฟูสภาพโปรโตคอร์มและเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีน (Yu *et al.*, 1999) เมื่อคัดเลือกในสัปดาห์ที่ 20 เหลือโปรโตคอร์มที่รอดชีวิตจากการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 จำนวน 2 โคลน คือ BEE 3.1 และ BEE 3.2.1 คิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 14.29 และโปรโตคอร์มที่รอดชีวิตจากการถ่ายพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) จำนวน 4 โคลน คือ BEE6.2.1, BEE6.2.2, BEE6.2.4, BEE6.3 คิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 23.53 (ตารางที่ 5)



ภาพที่ 24 ลักษณะโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสที่ได้รับการถ่ายยีน *g3'h* ด้วยพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 (ก) และพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) (ข) และผ่านการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ระดับ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังการคัดเลือกนาน 2 เดือน

ตารางที่ 5 อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัส ที่ได้รับการถ่ายยีน *g3'h* แบบ antisense และคัดเลือกบนอาหาร MS ที่มีระดับไฮโกรมัยซินที่แตกต่างกัน ระดับความเข้มข้นละ 4 สัปดาห์

ชุดการทดลอง		อัตราการรอดของโปรโตคอร์ม (ร้อยละ)				
		[H] (mg/ml)	H5	H15	H25	H15
รหัส	พลาสมิด	สัปดาห์ที่ 4 สัปดาห์ที่ 8 สัปดาห์ที่ 12 สัปดาห์ที่ 16 สัปดาห์ที่ 20				
BEE3	pF3'HTG4(A)					
	pMNK1005	89.39	61.51	4 .27	18.92	14.29
BEE6	pF3'HPREXH2(A)	87.03	56	45.45	24.29	23.53

หมายเหตุ: [H] คือ ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน
รหัส คือ รหัสโคลนกล้วยไม้ที่ผ่านการคัดเลือก

5.1.2 การถ่ายยีน *fr' h* เข้ากล้วยไม้สกุลหวายเยี่ยสกุล

นำโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเยี่ยสกุลที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 จำนวน 324 โปรโตคอร์ม และโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) จำนวน 252 โปรโตคอร์ม มาคัดเลือกในอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ โปรโตคอร์มมีอัตราการรอดสูงถึง 95.68 และ 96.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 มีการเจริญเติบโตกว่าโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) นำโปรโตคอร์มที่รอดชีวิตจำนวน 310 และ 244 โปรโตคอร์มตามลำดับ คัดเลือกต่อที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่ามีโปรโตคอร์มที่รอดชีวิตจำนวน 228 และ 155 โปรโตคอร์ม คิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 73.55 และ 63.52 ตามลำดับ (ตารางที่ 6) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรโตคอร์มที่มีขนาดเล็กประมาณ 0.2-0.4 เซนติเมตร (ภาพที่ 26 (ข และ ง)) จะมีการตายสูงกว่าโปรโตคอร์มที่มีขนาดใหญ่ประมาณ 0.5-0.8 เซนติเมตร (ภาพที่ 26 (ก และ ง)) ดังนั้นจึงทำการแยกโปรโตคอร์มขนาดใหญ่และขนาดเล็กมาคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้นต่างกันดังนี้

คัดเลือกโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 ขนาดใหญ่จำนวน 144 โปรโตคอร์ม และโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) ขนาดใหญ่จำนวน 69 โปรโตคอร์ม มาคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 7) และเนื่องจากได้ทดลองคัดเลือกโปรโตคอร์มที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีอัตราการตายสูงมากและตายอย่างรวดเร็วเพียง 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 25) ดังนั้นจึงลดระดับความเข้มข้นลงเหลือ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร คัดเลือกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งสอดคล้องกับ Yu *et al.* (1999) ที่ได้ทดลองการคัดเลือกโปรโตคอร์มบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากผ่านการคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม เพื่อรักษาและฟื้นฟูสภาพโปรโตคอร์มภายหลังการถ่ายยีนด้วยวิธีของอนุภาค ผลจากการคัดเลือกโปรโตคอร์มด้วยสูตรอาหารดังกล่าว โปรโตคอร์มมีการตายมากที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 47.92 และ 46.38 ตามลำดับ และโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 จะตายทั้งหมดที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด

pF3'HPREXH2(A) เพียง 1 โคลนเท่านั้นที่รอดชีวิต คือ BEE16.1 คิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 3.13 (ภาพที่ 27 (ข)) จึงคัดเลือกโคลน BEE16.1 นำไปตรวจสอบในขั้นต่อไป

คัดเลือกโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 ขนาดเล็กจำนวน 84 โปรโตคอร์ม และโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) ขนาดเล็กจำนวน 86 โปรโตคอร์ม มาคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จำนวน 2 ครั้ง (ตารางที่ 7) จากการคัดเลือกโปรโตคอร์มที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งแรกคิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 35.71 และ 32.56 ตามลำดับ และโปรโตคอร์มจะตายทั้งหมดเมื่อคัดเลือกในครั้งที่ 2

ผลจากการคัดเลือกโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเอื้องสกุลที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 และโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) ดังตารางที่ 5 และ 6 พบว่าโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) ในช่วงการคัดเลือกด้วยความเข้มข้นต่ำ เนื่องจากการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pF3'HTG4(A) ขนาด 5.8 กิโลเบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *f3'h* ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 ซึ่งมียีนคัดเลือก *hptII* ยีนทั้งสองยีนแยกกันอยู่บนพลาสมิดคนละชนิด ซึ่งทำให้ขนาดพลาสมิดที่ใช้ถ่ายเข้ากล้วยไม้มีขนาดเล็กลงจึงสามารถถ่ายยีนเข้ากล้วยไม้ได้ง่ายกว่าพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) ขนาด 8.6 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า แต่เมื่อคัดเลือกด้วยความเข้มข้นสูงขึ้นพบว่าโปรโตคอร์มที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) ที่ควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ CaMV35S จะมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าโปรโตคอร์มที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pF3'HTG4(A) ซึ่งควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ Actin-1 ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Anzai *et al.* (1996) ที่รายงานการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโปรโมเตอร์ที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของยีนพบว่าทุกโปรโมเตอร์สามารถควบคุมการแสดงออกของยีน *gus* ได้ แต่โปรโมเตอร์ CaMV35S ควบคุมการแสดงออกได้ดีที่สุด รองลงมาคือ Ubiquitin และ Actin ตามลำดับ และผลการทดลองยังสอดคล้องกับรายงานของ Kay *et al.* (1987), Russell *et al.* (1992) และ Nan *et al.* (1995) ซึ่งพบว่าการใช้พลาสมิดที่ควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ CaMV35S จำนวน 2 ชุด สามารถควบคุมการแสดงออกของยีน *gus* ได้มากกว่าการใช้พลาสมิดที่ควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ CaMV35S เพียง 1 ชุด ซึ่งพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) ที่ใช้ในการถ่ายยีนครั้งนี้ ควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ CaMV35S จำนวนมากถึง 7 ชุด จึงมีประสิทธิภาพการถ่ายยีนมากกว่าพลาสมิด pF3'HTG4(A) ที่ควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ Actin-

1 และผลจากการเปรียบเทียบขนาดโปรโตคอร์มพบว่าขนาดโปรโตคอร์มจึงเป็นปัจจัยหนึ่งในการถ่ายยีนโดยโปรโตคอร์มที่มีขนาดใหญ่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดมากกว่าขนาดเล็ก

ตารางที่ 6 อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเอื้องสกุลที่ได้รับการถ่ายยีน $f3'h$ และผ่านการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินอัตราต่าง ๆ นาน 6 สัปดาห์

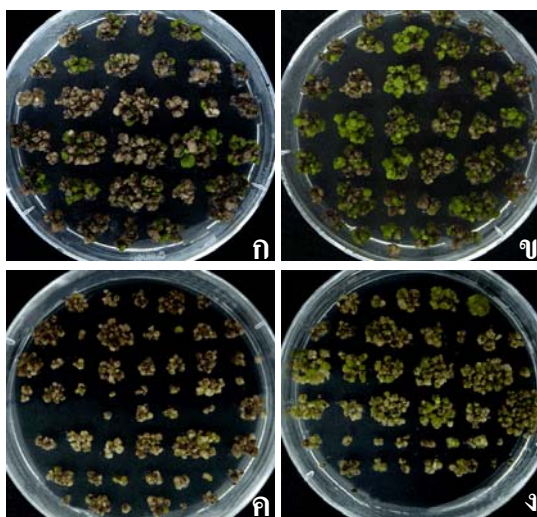
ชุดการทดลอง		อัตราการรอดของโปรโตคอร์ม (ร้อยละ)		
		[H] (mg/ml)	H5	H15
รหัส	พลาสมิด	สัปดาห์ที่	3	6
BEE15 pF3'HTG4(A)				
	pMNK1005		95.68	73.55
BEE16 pF3'HPREXH2(A)				
			96.83	63.52

หมายเหตุ: [H] คือ ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

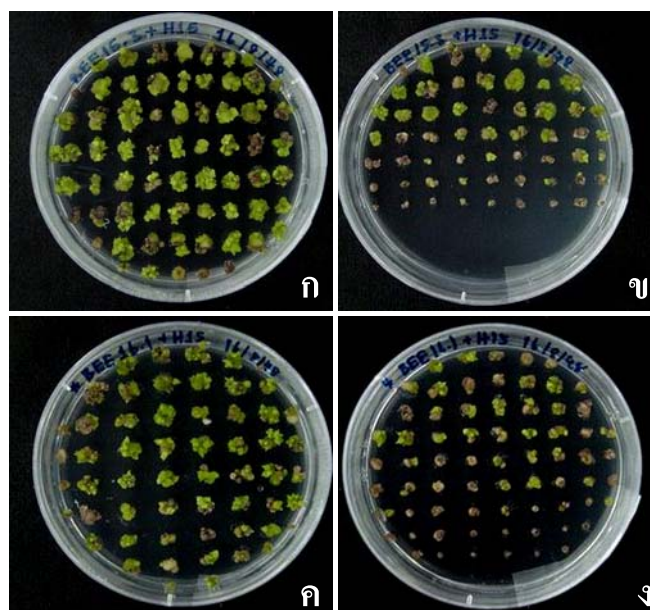
ตารางที่ 7 อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเย็บสกุลขนาดใหญ่และขนาดเล็กที่ได้รับการถ่ายยีน $g3'h$ และผ่านการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 8 สัปดาห์

รหัส	ขนาดโปรโตคอร์ม (ซม.)	คัดเลือกครั้งที่ 1	คัดเลือกครั้งที่ 2
		4 สัปดาห์	4 สัปดาห์
BEE15	ขนาดเล็ก(0.2-0.4)	35.71	0
	ขนาดใหญ่(0.5-0.8)	47.92	0
BEE16	ขนาดเล็ก(0.2-0.4)	32.56	0
	ขนาดใหญ่(0.5-0.8)	46.38	3.13

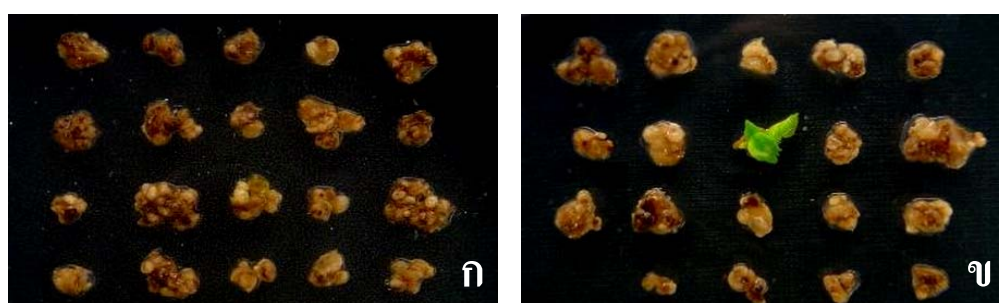
หมายเหตุ: โปรโตคอร์มขนาดใหญ่คัดเลือกบนอาหาร MS ที่มีความเข้มข้นไฮโกรมัยซิน 25 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และโปรโตคอร์มขนาดเล็กคัดเลือกบนอาหาร MS ที่มีความเข้มข้นไฮโกรมัยซิน 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 25 ลักษณะโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเย็บสกุลที่ได้รับการถ่ายยีน $g3'h$ ด้วยพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 (ก และ ค) และพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) (ข และ ง) ที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ระดับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสัปดาห์ที่ 9 (ก และ ข) และที่ระดับ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสัปดาห์ที่ 10 (ค และ ง)



ภาพที่ 26 ลักษณะความแตกต่างของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเยื่อสกุลขนาดใหญ่ (0.5-0.8 เซนติเมตร) (ก และ ค) กับโปรโตคอร์มขนาดเล็ก (0.2-0.4 เซนติเมตร) (ข และ ง) ที่ได้รับการถ่ายยีน *g3'h* ด้วยพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 (ก และ ข) และพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) (ค และ ง) บนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ระดับ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังคัดเลือกนาน 6 สัปดาห์



ภาพที่ 27 ลักษณะโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเยื่อสกุลขนาดใหญ่ที่ได้รับการถ่ายยีน *g3'h* ด้วยพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 (ก) และพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) (ข) และผ่านการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ระดับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังคัดเลือกนาน 14 สัปดาห์

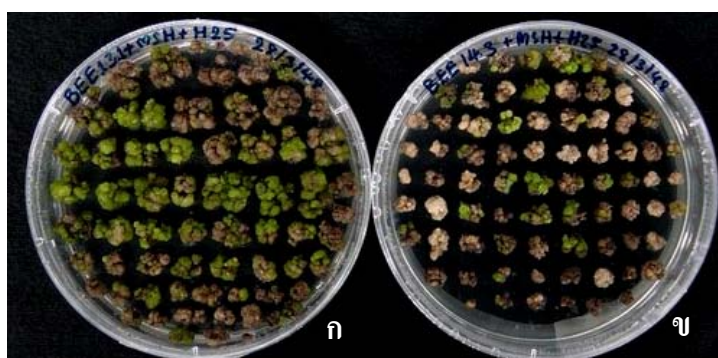
5.2 การถ่ายยีน $f3'5'h$ เข้ากล้วยไม้สกุลหวายในทิศทาง sense

ถ่ายยีน $f3'5'h$ ที่อยู่บนพลาสมิด pF3'5'HTG24(S) โดยเคลื่อนอนุภาคทองด้วย พลาสมิด pF3'5'HTG24(S) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 ที่มียีนต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเพื่อใช้เป็นยีนคัดเลือก และนำอนุภาคที่ได้ไปใช้ถ่ายยีนเข้าโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสและเอียสกุลด้วยเครื่องยิงอนุภาคตามวิธีการเดียวกับการถ่ายยีน $f3'h$ ในข้อ 5.1

5.2.1 การถ่ายยีน $f3'5'h$ เข้ากล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสและเอียสกุล

นำโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสและเอียสกุลที่ได้รับการถ่ายยีน $f3'5'h$ ที่อยู่ในพลาสมิด pF3'5'HTG24(S) ที่ถ่ายร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 จำนวน 331 และ 409 โปรโตคอร์ม ตามลำดับ มาคัดเลือกบนอาหาร MSH ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ระดับความเข้มข้น 5, 15, 25, 25 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแต่ละช่วงใช้เวลา 3 สัปดาห์ (ตารางที่ 8) ก่อนนำมาชักนำให้เกิดต้นในอาหารสังเคราะห์ MS ในการคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โปรโตคอร์มมีการเจริญขนาดใหญ่ขึ้นและมีการตายเล็กน้อยโดยเนื้อเยื่อของโปรโตคอร์ม กล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล และโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสจะเปลี่ยนเป็นสีขาวซีดหรือสีเหลือง เหลือโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสและเอียสกุลที่รอดชีวิตคิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 96.98 และ 96.1 ตามลำดับ คัดเลือกโปรโตคอร์มที่รอดชีวิตในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่กล่าวไว้ข้างต้นต่อไป พบว่าโปรโตคอร์มมีการตายเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ โดยที่โปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสจะมีอัตราการรอดสูงกว่าโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลในช่วงแรก ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ในการคัดเลือกช่วงหลังที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 2 ครั้ง โปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลกลับมีอัตราการรอดสูงกว่าโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัส (ภาพที่ 28) คิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 67.14 และ 27.27 ตามลำดับ หลังการคัดเลือกนาน 9 สัปดาห์ และคิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 35.86 และ 33.33 ตามลำดับ หลังการคัดเลือกนาน 12 สัปดาห์ แต่อย่างไรก็ตาม หลังจากคัดเลือกโปรโตคอร์มที่รอดชีวิตมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ MS โปรโตคอร์มยังคงมีการตายเกิดขึ้นโดยที่โปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลมีการตายมากกว่าโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัส เหลือโปรโตคอร์มที่รอดชีวิตจำนวน 4 และ 16 โคลน ซึ่งคิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 4.7 และ 57.14 ตามลำดับ โปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัส

มีอัตราการที่สูงขึ้นอาจเนื่องจากการฟื้นตัวของโปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน นำโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเอื้องสกุลจำนวน 4 โคลน คือ BEE13.1, BEE13.2.1, BEE13.2.3, BEE13.3 และโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสจำนวน 16 โคลน คือ BEE14.1.1, BEE14.1.2, BEE14.1.3, BEE14.1.4, BEE14.1.5, BEE14.1.6, BEE14.1.7, BEE14.1.8, BEE14.1.9, BEE14.1.10, BEE14.1.11, BEE14.1.12, BEE14.3.1 และ BEE14.3.2 มาชักนำให้เกิดต้นเพื่อนำไปตรวจสอบในขั้นต่อไป



ภาพที่ 28 ลักษณะโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเอื้องสกุล (ก) และแจคเกอลีนโทมัส(ข) ที่ได้รับการถ่ายยีน β '5' β 'h ด้วยพลาสมิด pF3'5'HTG24(S) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 และผ่านการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 9 สัปดาห์

ตารางที่ 8 อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสและเอื้องสกุลที่ได้รับการถ่ายยีน β '5' β 'h และผ่านการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่แตกต่างกัน ระดับความเข้มข้นละ 3 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	อัตราการรอดของโปรโตคอร์ม (ร้อยละ)					
	[H] (mg/ml)	H5	H15	H25	H25	H0
รหัส สายพันธุ์		สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 9	สัปดาห์ที่ 12	สัปดาห์ที่ 15
BEE14 แจคเกอลีนโทมัส		96.98	95.95	27.27	33.33	57.14
BEE13 เอื้องสกุล		96.1	89.82	67.14	35.86	4.7

หมายเหตุ: [H] คือ ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

5.2.2 การเปรียบเทียบขนาดโปรโตคอร์มและจำนวนการยิงที่ใช้ในการถ่ายยีน $f3'5'h$ เข้ากล้วยไม้สกุลหวายเอื้องสกุล

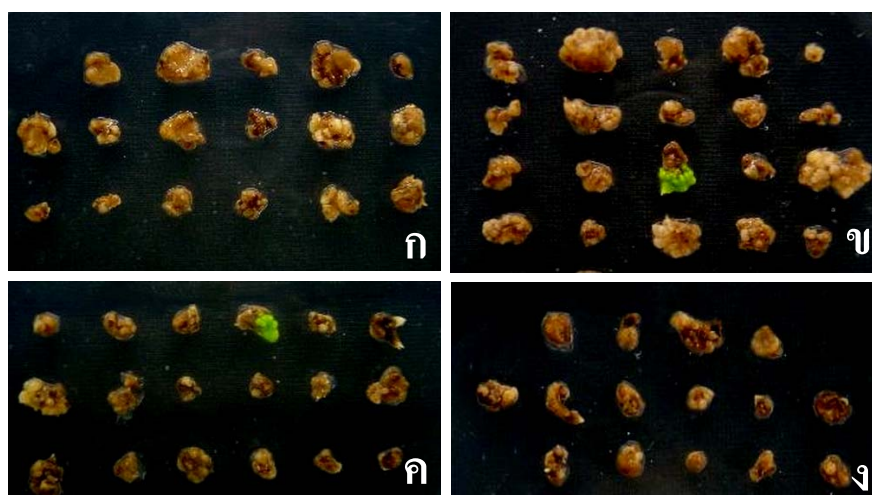
ถ่ายยีน $f3'5'h$ ที่อยู่ในพลาสมิด pF3'5'HTG24(S) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 เข้าโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเอื้องสกุลด้วยเครื่องยิงอนุภาค โดยเปรียบเทียบจำนวนการยิง 1 ครั้ง และ 2 ครั้ง เข้าโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเอื้องสกุลจำนวน 278 และ 122 โปรโตคอร์ม ตามลำดับ หลังจากคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ (ตารางที่ 9) พบว่าโปรโตคอร์มที่ได้รับการยิงจำนวน 1 และ 2 ครั้ง มีเนื้อเยื่อที่ตายเพียงเล็กน้อย คิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 98.56 และ 97.54 ตามลำดับ และคัดเลือกต่อที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร โปรโตคอร์มมีขนาดใหญ่ขึ้นและเป็นยอดเล็กน้อย มีอัตราการตายเพิ่มขึ้น ซึ่งลักษณะเนื้อเยื่อจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล และโปรโตคอร์มขนาดเล็กมีอัตราการตายมากกว่าโปรโตคอร์มขนาดใหญ่ คิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 67.52 และ 68.9 ตามลำดับ ดังนั้นจึงแยกโปรโตคอร์มขนาดใหญ่และขนาดเล็กคัดเลือกบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันดังนี้

ทำการคัดเลือกแยกโปรโตคอร์มเอื้องสกุลขนาดใหญ่ 0.5-0.8 เซนติเมตร ของโปรโตคอร์มที่ได้รับการยิง 1 ครั้ง จำนวน 68 โปรโตคอร์ม และที่ได้รับการยิง 2 ครั้ง จำนวน 43 โปรโตคอร์ม คัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำไปคัดเลือกต่อที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร อีกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 10) พบว่าภายหลังจากการคัดเลือก 14 สัปดาห์ โปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายยีนโดยการยิงจำนวน 1 ครั้ง ไม่เหลือโปรโตคอร์มที่รอดชีวิต (ภาพที่ 29 (ก)) และโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายยีนโดยการยิงจำนวน 2 ครั้ง พบต้นที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน จำนวน 1 โคลน คือ BEE17.1 คิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 3.85 (ภาพที่ 29 (ข)) ผลการทดลองพบว่าการถ่ายยีนเข้าโปรโตคอร์มที่มีขนาดใหญ่โดยการยิงอนุภาคจำนวน 2 ครั้ง มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนมากกว่าการยิงจำนวน 1 ครั้ง

คัดเลือกแยกโปรโตคอร์มเอื้องสกุลขนาดเล็ก 0.2-0.4 เซนติเมตร ของโปรโตคอร์มที่ได้รับการยิง 1 ครั้ง จำนวน 117 โปรโตคอร์ม และที่ได้รับการยิง 2 ครั้ง จำนวน 39 โปรโตคอร์ม คัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (ตารางที่ 10) พบว่าโปรโตคอร์มตายทั้งหมดเมื่อได้รับการถ่ายยีนโดยการ

ยิงจำนวน 2 ครั้ง(ภาพที่ 29 (ง)) เมื่อคัดเลือกโปรโตคอร์มที่ได้รับการถ่ายยีนโดยการยิงจำนวน 1 ครั้ง พบต้นที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินจำนวน 1 โคลน คือ BEE17.2 คิดเป็นอัตราการรอดร้อยละ 4 (ภาพที่ 29 (ค)) จากผลการทดลองพบว่าการถ่ายยีนเข้าโปรโตคอร์มที่มีขนาดเล็กโดยการยิงอนุภาคจำนวน 1 ครั้ง มีประสิทธิภาพมากกว่าการยิงจำนวน 2 ครั้ง

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่านอกจากการเตรียมโปรโตคอร์มให้อยู่ในสภาพขณะที่มีการแบ่งตัวที่ดี และการใช้สภาวะการยิงที่เหมาะสมกับพืชแล้ว อีกปัจจัยที่ควรคำนึงถึงคือ ขนาดของโปรโตคอร์มที่ใช้ถ่ายยีน จากผลการทดลองพบว่าการยิงอนุภาคซ้ำ 2 ครั้ง มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนมากกว่าการยิง 1 ครั้ง ประสิทธิภาพการถ่ายยีนคิดเป็นร้อยละ 0.82 และ 0.36 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามยังพบว่าจำนวนครั้งการยิงขึ้นอยู่กับขนาดโปรโตคอร์มด้วย โดยโปรโตคอร์มขนาดใหญ่ถ่ายยีนด้วยการยิงอนุภาคซ้ำ 2 ครั้ง ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนดีกว่าการยิง 1 ครั้ง ในขณะที่โปรโตคอร์มขนาดเล็กการยิง 1 ครั้ง ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนมากกว่า ทั้งนี้ เนื่องจากการยิง 2 ครั้งทำให้โปรโตคอร์มบอบช้ำมากจนไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ การทดลองครั้งนี้แต่อย่างใดก็ตามความสำเร็จในการถ่ายยีนยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ อีก



ภาพที่ 29 ลักษณะโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเอื้องสกุลขนาดใหญ่ 0.5-0.8 เซนติเมตร (ก และ ข) และขนาดเล็ก 0.2-0.4 เซนติเมตร (ค และ ง) หลังจากการยิงยีน 3×10^5 จำนวน 1 ครั้ง (ก และ ค) และจำนวน 2 ครั้ง (ข และ ง) และผ่านการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก และ ข) และที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค และ ง) เป็นเวลา 15 สัปดาห์

ตารางที่ 9 อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเอื้องสกุลที่ได้รับการถ่ายยีน *f3'5'h* และยีน *hpII* ด้วยการยิงจำนวน 1 ซ้ำ และ 2 ซ้ำ

ชุดการทดลอง			อัตราการรอดของโปรโตคอร์ม (ร้อยละ)	
			[H] (mg/ml)	
รหัส	พลาสมิด	จำนวนการยิง(ครั้ง)	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 6
BEE17	pF3'5'HTG24(S)+	1	98.56	67.52
	pMNK1005	2	97.54	68.9

หมายเหตุ: [H] คือ ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

ตารางที่ 10 อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเอื้องสกุลขนาดใหญ่และขนาดเล็กที่ได้รับการถ่ายยีน *f3'5'h* และผ่านการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 9 สัปดาห์

ขนาดโปรโตคอร์ม (ซม.)	จำนวนการยิง (ครั้ง)	คัดเลือกครั้งที่ 1	คัดเลือกครั้งที่ 2
		4 สัปดาห์	5 สัปดาห์
ขนาดเล็ก(0.2-0.4)	1	21.37	4
	2	35.9	0
ขนาดใหญ่(0.5-0.8)	1	60.29	0
	2	60.47	3.85

หมายเหตุ: โปรโตคอร์มขนาดใหญ่คัดเลือกบนอาหาร MS ที่มีความเข้มข้นไฮโกรมัยซิน 25 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ
โปรโตคอร์มขนาดเล็กคัดเลือกบนอาหาร MS ที่มีความเข้มข้นไฮโกรมัยซิน 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

6. การตรวจสอบและวิเคราะห์ผลของการถ่ายยีนและการแสดงออกของยีน

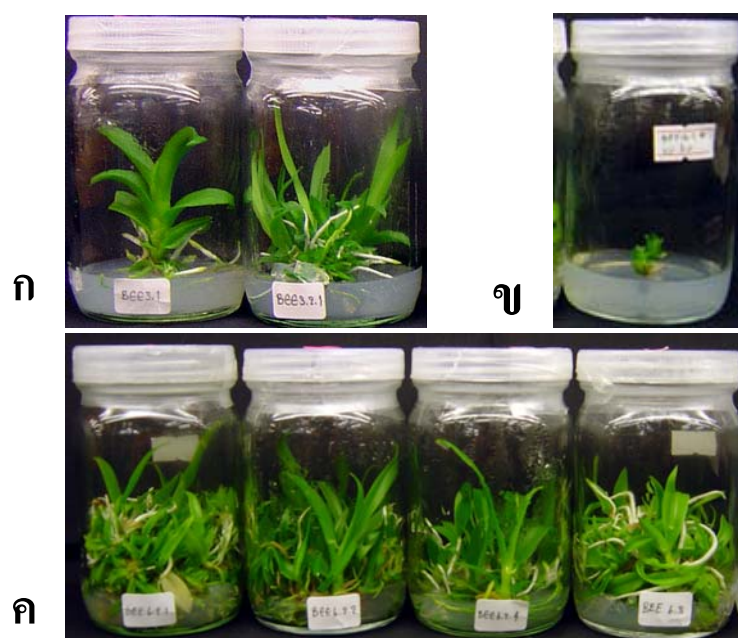
6.1 การตรวจสอบยีน *f3'h* และยีน *hptII*

6.1.1 การตรวจสอบโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

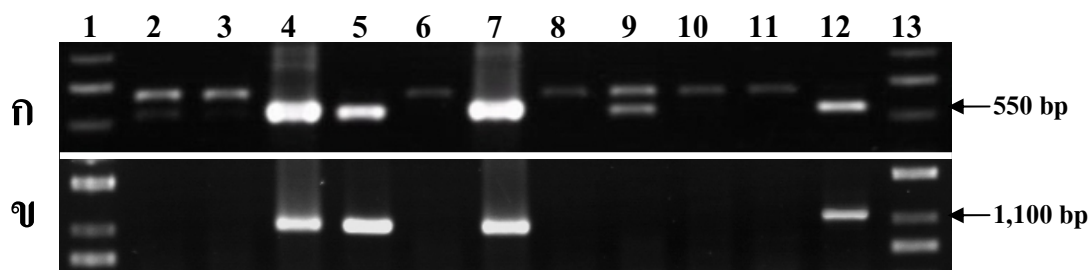
นำต้นกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสและเอียสกุลที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคและผ่านการคัดเลือกบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินจากข้อ 5.1 มาตรวจสอบยีน *f3'h* และ *hptII* โดยการสกัดดีเอ็นเอจากต้นกล้วยไม้แปลงพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 จำนวน 2 โคลน คือ กล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์ ได้แก่ โคลน BEE3.1 และ BEE3.2.1 (ภาพที่ 30 (ก)) สกัดดีเอ็นเอจากต้นกล้วยไม้แปลงพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'HPExH2(A) จำนวน 5 โคลน คือ กล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์จำนวน 4 โคลน ได้แก่ โคลน BEE6.2.1, BEE6.2.2, BEE6.2.4, BEE6.3 (ภาพที่ 30 (ค)) และกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลแปลงพันธุ์ จำนวน 1 โคลน ได้แก่ โคลน BEE16.1 (ภาพที่ 30 (ข)) นำไปตรวจสอบยีน *hptII* โดยการสังเคราะห์ด้วยวิธีพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรเมอร์ HPT(S)135 กับ HPT(A)136 และตรวจสอบยีน *f3'h* ด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'HPex(A)227 กับ Nos(A)188 เปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้กับกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

จากผลการตรวจสอบยีน *hptII* พบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากการทำพีซีอาร์ขนาดประมาณ 550 คู่เบส ในกล้วยไม้แปลงพันธุ์จำนวน 3 โคลน ได้แก่ โคลน BEE3.1, BEE6.2.2 และ BEE16.1 ซึ่งขนาดของดีเอ็นเอเท่ากับดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากการทำพีซีอาร์ของพลาสมิด pMNK1005 และ pREXH-1 ที่มียีน *hptII* เป็นยีนคัดเลือก อย่างไรก็ตามผลผลิตพีซีอาร์ในบางตัวอย่างพบแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอที่สนใจขนาด 700 คู่เบส ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไพรเมอร์เกาะโครโมโซมของกล้วยไม้ในส่วนที่มีลำดับเบสคล้ายกับยีนด้านทานไฮโกรมัยซิน ซึ่งการพิสูจน์แถบดีเอ็นเอที่ถูกต้องทำได้โดยการทำไฮบริดเซชันด้วยยีนด้านทานไฮโกรมัยซินซึ่งจะกล่าวต่อไป (ภาพที่ 31 (ก))

ผลการตรวจสอบยีน *g3' h* พบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากการทำพีซีอาร์ขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส ของกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์ที่ได้รับยีนจากการถ่ายพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 จำนวน 1 โคลน คือ BEE3.1 และกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลแปลงพันธุ์ที่ได้รับยีนจากการถ่ายพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) จำนวน 1 โคลน คือ BEE16.1 ซึ่งขนาดของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้เท่ากับขนาดของยีน *g3' h* ที่สังเคราะห์ได้จากการพีซีอาร์พลาสมิด pF3'HTG4(A) และ pF3'HPREXH2(A) ที่ใช้ในการถ่ายยีน *g3' h* เข้าไป (ภาพที่ 31 (ข)) เพื่อยืนยันความถูกต้องของผลผลิตพีซีอาร์ยีนที่สังเคราะห์ได้ จึงนำไปตรวจสอบความถูกต้องอีกครั้งด้วยเทคนิค Southern blot hybridization



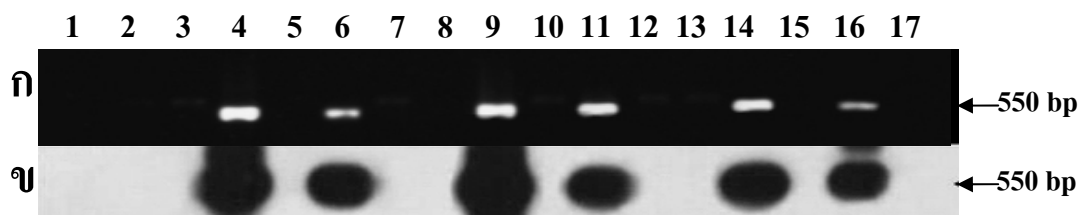
ภาพที่ 30 ต้นกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์(ก และ ค) และต้นกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลแปลงพันธุ์(ข) ที่ได้รับการถ่ายยีน *g3' h* ด้วยพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 ได้แก่ โคลนที่มีรหัส BEE3.1 และ BEE3.2.1(ก) และกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน *g3' h* ด้วยพลาสมิด pF3'HPREXH2(A) ได้แก่ BEE6.2.1, BEE6.2.2, BEE6.2.4, BEE6.3 (ค) และ BEE16.1(ข) ซึ่งผ่านการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นเวลา 14-20 สัปดาห์



ภาพที่ 31 การตรวจสอบยีน *hptII* (ก) และยีน *f3'h* (ข) ในกล้วยไม้แปลงพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีน โดยเทคนิคพีซีอาร์ แถวที่ 1 และ 13 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, 2 = กล้วยไม้สกุลหวาย แจกเกอลีนโทมัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control), 3 = กล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน(negative control), 4 = positive control ได้แก่ พลาสมิด pMNK1005 สำหรับการตรวจสอบยีน *hptII* (ก) และพลาสมิด pF3'HTG4(A) สำหรับการตรวจสอบยีน *f3'h* (ข), 5 = BEE3.1, 6 = BEE3.2.1, 7 = positive control ได้แก่ พลาสมิด pREXH-1 สำหรับการตรวจสอบยีน *hptII* (ก) และพลาสมิด pF3'HPEXH2(A) สำหรับการตรวจสอบยีน *f3'h* (ข), 8 = BEE6.2.1, 9 = BEE6.2.2, 10 = BEE6.2.4, 11 = BEE6.3, 12 = BEE16.1

6.1.2 การตรวจสอบโดยใช้เทคนิค Southern blot hybridization

นำผลผลิตพีซีอาร์ของยีนต่าง ๆ ที่สังเคราะห์ได้จากกล้วยไม้สกุลหวายแปลงพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีน *f3'h* ในข้อ 6.1.1 มาตรวจสอบโดยเทคนิค Southern blot hybridization อีกครั้งเพื่อยืนยันผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ พบว่าเกิดปฏิกิริยากับผลผลิตพีซีอาร์ยีน *hptII* ของ positive control ที่ตำแหน่ง 550 คู่เบส คือ พลาสมิด pMNK1005, pREXH-1 และดีเอ็นเอโพรบยีน *hptII* ที่ได้จากการทำพีซีอาร์พลาสมิด pMNK1005 ด้วยคู่ไพรเมอร์ HPT(S)135 และ HPT(A)136 ซึ่งมีขนาด 550 คู่เบส และพบว่าเกิดปฏิกิริยากับผลผลิตพีซีอาร์ยีน *hptII* ของกล้วยไม้สกุลหวายแจกเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์โคลน BEE3.1, BEE6.2.2 และกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลแปลงพันธุ์โคลน BEE16.1 ที่ตำแหน่ง 550 คู่เบส เช่นเดียวกับ positive control และได้ผลการเกิดปฏิกิริยาดตรงกับผลการตรวจสอบโดยเทคนิคพีซีอาร์ในข้อ 6.1.1 แสดงว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่สังเคราะห์ได้คือดีเอ็นเอยีน *hptII* ที่ถ่ายเข้าไป (ภาพที่ 32 (ข))

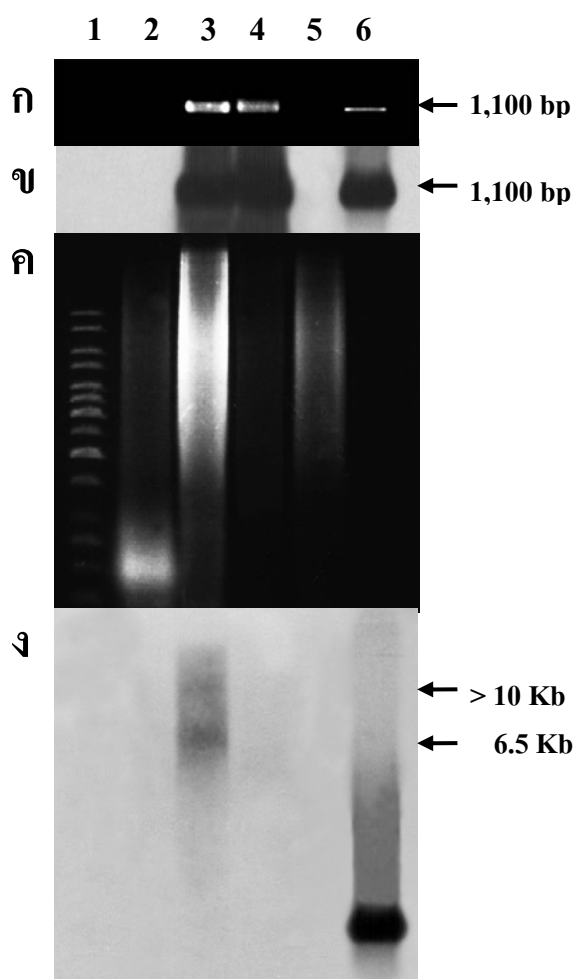


ภาพที่ 32 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *hptII* โดยเทคนิคพีซีอาร์ (ก) และ Southern Hybridization จากผลผลิตพีซีอาร์ของกล้วยไม้แปลงพันธุ์(ข) แถวที่ 1 และ 17 = แถบ ดีเอ็นเอมาตรฐาน, 2 = กล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control), 3 = กล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน(negative control), 4 = positive control ได้แก่ พลาสมิด pMNK1005, 6 = BEE3.1, 7 = BEE3.2.1, 9 = positive control ได้แก่ พลาสมิด pREXH-1, 10 = BEE6.2.1, 11 = BEE6.2.2, 12 = BEE6.2.4, 13 = BEE6.3, 14 = BEE16.1, 15 = โพรบยีน *hptII* (positive control)

นำผลผลิตพีซีอาร์ยีน *fr' h* จากดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์และกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลแปลงพันธุ์โคลน BEE3.1 และ BEE16.1 ตามลำดับ ที่ได้จากข้อ 6.1.1 (ภาพที่ 33 (ก)) มาตรวจสอบยืนยันโดยเทคนิค Southern blot hybridization พบว่าเกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง 1,100 คู่เบส กับผลผลิตพีซีอาร์ยีน *fr' h* ของโคลน BEE3.1 และ BEE16.1 และดีเอ็นเอโพรบยีน *fr' h* ที่ได้จากการพีซีอาร์ยืนยัน *fr' h* ด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'HPer(A)227 และ Nos(A)188 (ภาพที่ 33 (ข)) แสดงว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่สังเคราะห์ได้คือ ดีเอ็นเอยีน *fr' h* ที่ถ่ายเข้าไป

ตรวจสอบการแทรกของยีน *fr' h* เข้าสู่จีโนมกล้วยไม้สกุลหวายแปลงพันธุ์โดยการแยกดีเอ็นเอทั้งหมดจากกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสและกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน กล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีน *fr' h* ในทิศทาง antisense ด้วยพลาสมิด pF3'HTG4(A) จำนวน 2 โคลน คือ โคลน BEE3.1 และ BEE3.2.1 และกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลแปลงพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pF3'HPExH2(A) จำนวน 1 โคลน คือ โคลน BEE16.1 ซึ่งผ่านการตรวจสอบยืนยันโดยเทคนิคพีซีอาร์ในข้อ 6.1.1 นำดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ตำแหน่ง ด้วยเอนไซม์ *XbaI* และแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส 0.7 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (ภาพที่ 33 (ค)) นำไปตรวจสอบจำนวนชุดของยีน *fr' h* ในจีโนมกล้วยไม้สกุลหวายแปลงพันธุ์แต่ละโคลนโดยการไฮบริไดเซชันด้วยโพรบ

ยีน $f3'h$ ที่ได้จากการพีซีอาร์ขึ้นยีน $f3'h$ ด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'HPer(A)227 และ Nos(A)188 ขนาด 1,100 คู่เบส จากผลการทดลองพบการเกิดปฏิกิริยาที่ไพรบีน $f3'h$ และจีโนมของกล้วยไม้สกุลหวายแจกเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์โคลน BEE3.1 ปรากฏเป็นแถบสีดำบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ 2 ตำแหน่ง ของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 6.5 กิโลเบส และที่ขนาดมากกว่า 10 กิโลเบส (ภาพที่ 33 (ง)) แสดงว่ามีการแทรกของยีน $f3'h$ เข้าสู่จีโนมกล้วยไม้สกุลหวายแจกเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์ โคลน BEE3.1 จำนวน 2 ชุด ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการคงอยู่ของยีนที่ตรวจสอบโดยเทคนิคพีซีอาร์และผลการไฮบริไดเซชันผลผลิตพีซีอาร์ยีน $f3'h$ แต่ไม่พบการเกิดปฏิกิริยากับจีโนมกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลแปลงพันธุ์โคลน BEE 16.1 อาจเนื่องจากต้นกล้วยไม้ยังมีขนาดเล็กไม่สามารถตัดใบมาสกัดดีเอ็นเอให้มีปริมาณมากพอในการตรวจสอบด้วยเทคนิค Southern blot hybridization ได้ แต่อย่างไรก็ตามสามารถตรวจสอบการคงอยู่ของยีน $f3'h$ ในกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลแปลงพันธุ์ ตัวอย่าง BEE16.1 ได้โดยเทคนิคพีซีอาร์และการไฮบริไดเซชันผลผลิตพีซีอาร์ยีน $f3'h$ ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น (ภาพที่ 32)



ภาพที่ 33 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *f3 h* ที่ถ่ายเข้ากล้วยไม้สกุลหวายแปลงพันธุ์
 ดังนี้คือ 1 = แอปติเอ็นเอมาตรฐาน, 2 = กล้วยไม้สกุลหวายแจกเกอลีนโทมัสที่ไม่ได้รับ
 การถ่ายยีน(negative control), 3 = กล้วยไม้สกุลหวายแจกเกอลีนโทมัสที่ได้รับยีน *f3 h*
 (pF3'HTG4(A)) (BEE3.1), 4 = กล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลที่ได้รับการถ่ายยีน *f3 h*
 (pF3'HPREXH2(A)) (BEE16.1), 5 = กล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน
 (negative control), 6 = ยีน *f3 h* (positive control) บนพลาสมิด pF3'HTG4(A)
 (ก) ตรวจสอบด้วยพีซีอาร์ยีน *f3 h* ด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'HPer(A)227 และ Nos(A)188
 (ข) การไฮบริไดเซชันผลผลิตพีซีอาร์ยีน *f3 h* ด้วยโพรบของยีน *f3 h*
 (ค) ดีเอ็นเอทั้งหมดที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตร
 โฟเรซิสบนเจลอะกาโรส 0.7 %
 (ง) การไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอที่แยกจากจีโนมกล้วยไม้และตรวจสอบด้วยโพรบของ
 ยีน *f3 h*

6.2 การตรวจสอบยีน *f3'5'h* และยีน *hptII*

6.2.1 การตรวจสอบโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

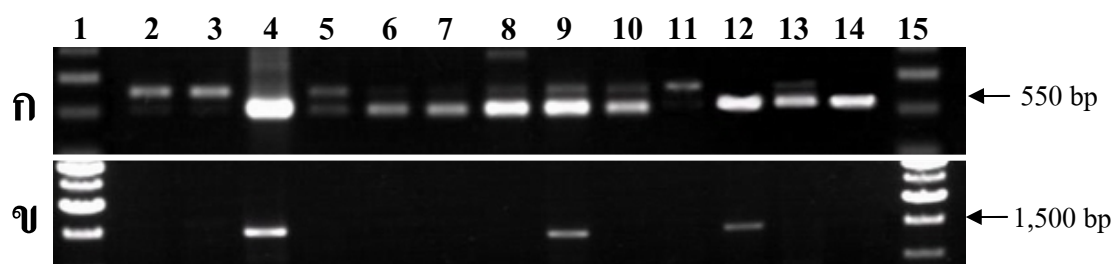
นำต้นกล้ากล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสและเอียสกุลที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคและผ่านการคัดเลือกบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินจากข้อ 5.2 มาตรวจสอบยีน *f3'5'h* และ *hptII* โดยการสกัดดีเอ็นเอจากต้นกล้วยไม้แปลงพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pF3'5'HTG24(S) ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 คือ กล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลแปลงพันธุ์จำนวน 6 โคลน (ภาพที่ 34 (ข)) ได้แก่ โคลน BEE13.1, BEE13.2.1, BEE13.2.3, BEE13.3, BEE17.1 และ BEE17.2 และกล้วยไม้แจคเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์ จำนวน 14 โคลน (ภาพที่ 34 (ก)) ได้แก่ BEE14.1.1, BEE14.1.2, BEE14.1.3, BEE14.1.4, BEE14.1.5, BEE14.1.6, BEE14.1.7, BEE14.1.8, BEE14.1.9, BEE14.1.10, BEE14.1.11, BEE14.1.12, BEE14.3.1 และ BEE14.3.2 นำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบยีน *hptII* โดยการสังเคราะห์ด้วยวิธีพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรเมอร์ HPT(S)135 กับ HPT(A)136 และตรวจสอบยีน *f3'5'h* ด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'5'HXbaI(S)207 กับ F3'5'HSmaI (A)206 เปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้กับกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

จากผลการตรวจสอบยีน *hptII* พบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากการทำพีซีอาร์ขนาดประมาณ 550 คู่เบส ในกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลแปลงพันธุ์ทั้ง 6 โคลน คือ BEE13.1, BEE13.2.1, BEE13.2.3, BEE13.3, BEE17.1 และ BEE17.2 และตรวจพบยีนในกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์ 3 โคลน คือ BEE14.1.3, BEE14.1.2 และ BEE14.1.5 ซึ่งขนาดของดีเอ็นเอเท่ากับดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากการทำพีซีอาร์ของพลาสมิด pMNK1005 ที่มียีน *hptII* เป็นยีนคัดเลือก (ภาพที่ 35 (ก)) ดังนั้นจึงคัดเลือก 3 โคลนนี้ ได้แก่ BEE14.1.3, BEE14.1.2 และ BEE14.1.5 มาตรวจสอบยีน *f3'5'h* ในขั้นตอนต่อไป

ผลการตรวจสอบยีน *f3'5'h* พบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากการทำพีซีอาร์ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ในกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลแปลงพันธุ์ จำนวน 1 โคลน คือ BEE17.1 และในกล้วยไม้สกุลหวายแปลงพันธุ์แจคเกอลีนโทมัสจำนวน 1 โคลน คือ BEE14.1.3 ซึ่งขนาดของดีเอ็นเอเท่ากับดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากการทำพีซีอาร์ของพลาสมิด pF3'5'HTG24(S) ที่ใช้ในการถ่ายยีน *f3'5'h* เข้าไป (ภาพที่ 35 (ข))



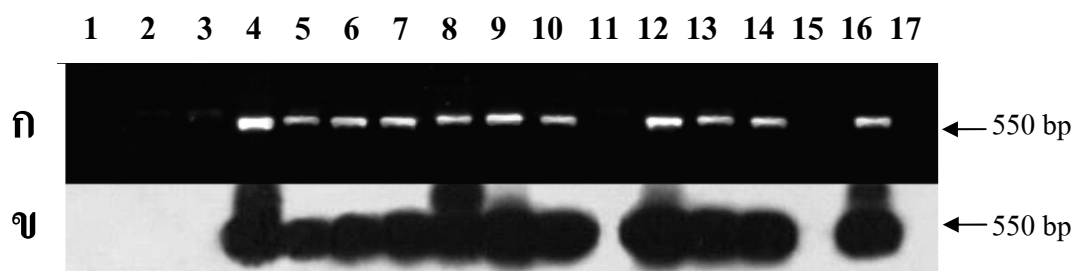
ภาพที่ 34 กล้วยไม้แปลงพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีน $pF3'5'$ HTG24(S)) และผ่านการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นเวลา 14-20 สัปดาห์ กล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์(ก) ได้แก่ BEE14.1.1, BEE14.1.2, BEE14.1.3, BEE14.1.4, BEE14.1.5, BEE14.1.6, BEE14.1.7, BEE14.1.8, BEE14.1.9, BEE14.1.10, BEE14.1.11, BEE14.1.12, BEE14.3.1, BEE14.3.2 และ BEE14.4.1 และ (ข) กล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลแปลงพันธุ์ ได้แก่ BEE13.1, BEE13.2.1, BEE13.2.3, BEE13.3, BEE17.1 และ BEE17.2



ภาพที่ 35 การตรวจสอบยีน *hptII* (ก) และยีน *f3'5'h* (ข) ในกล้วยไม้สกุลหวายแปลงพันธุ์โดยเทคนิคพีซีอาร์ 1 และ 15 = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, 2 = กล้วยไม้สกุลหวายเอียงสกุลสายพันธุ์ PSM 24 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control), 3 = กล้วยไม้สกุลหวายเอียงสกุลสายพันธุ์ PSM 25 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control), 4 = พลาสมิด pMNK1005 (positive control) สำหรับยีน *hptII* (ก) และพลาสมิด pF3'5'HTG24(S) สำหรับยีน *f3'5'h* (ข), 5-8 = กล้วยไม้สกุลหวายเอียงสกุลแปลงพันธุ์สายพันธุ์ PSM 24, 5 = BEE13.1, 6 = BEE13.2.1, 7 = BEE13.2.3 และ 8 = BEE13.3, 9-10 = กล้วยไม้สกุลหวายเอียงสกุลแปลงพันธุ์สายพันธุ์ PSM 25, 9 = BEE17.1 และ 10 = BEE17.2, 11 = กล้วยไม้สกุลหวายแจกเกอลีนโทมัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control), 12-14 = กล้วยไม้สกุลหวายแจกเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์, 12 = BEE14.1.3, 13 = BEE14.1.2 และ 14 = BEE14.1.5

6.2.2 การตรวจสอบโดยใช้เทคนิค Southern blot hybridization

นำผลผลิตพีซีอาร์ของยีนต่าง ๆ ที่สังเคราะห์ได้จากกล้วยไม้สกุลหวายแปลงพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีน *f3'5'h* ในข้อ 6.2.1 มาตรวจสอบโดยเทคนิค Southern blot hybridization ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ยีน *hptII* ด้วยดีเอ็นเอโพรบยีน *hptII* ที่ได้จากการทำพีซีอาร์พลาสมิด pMNK1005 ด้วยคู่ไพรเมอร์ HPT(S)135 และ HPT(A)136 ซึ่งมีขนาด 550 คู่เบส พบว่าเกิดปฏิกิริยากับผลผลิตพีซีอาร์ยีน *hptII* ของโคลนทุกโคลนที่ตำแหน่ง 550 คู่เบส และ positive control ที่ตำแหน่ง 550 คู่เบส คือ พลาสมิด pMNK1005 ไม่เกิดปฏิกิริยากับดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งได้ผลตรงกับการตรวจสอบโดยเทคนิคพีซีอาร์ในข้อ 6.2.1 (ภาพที่ 36)

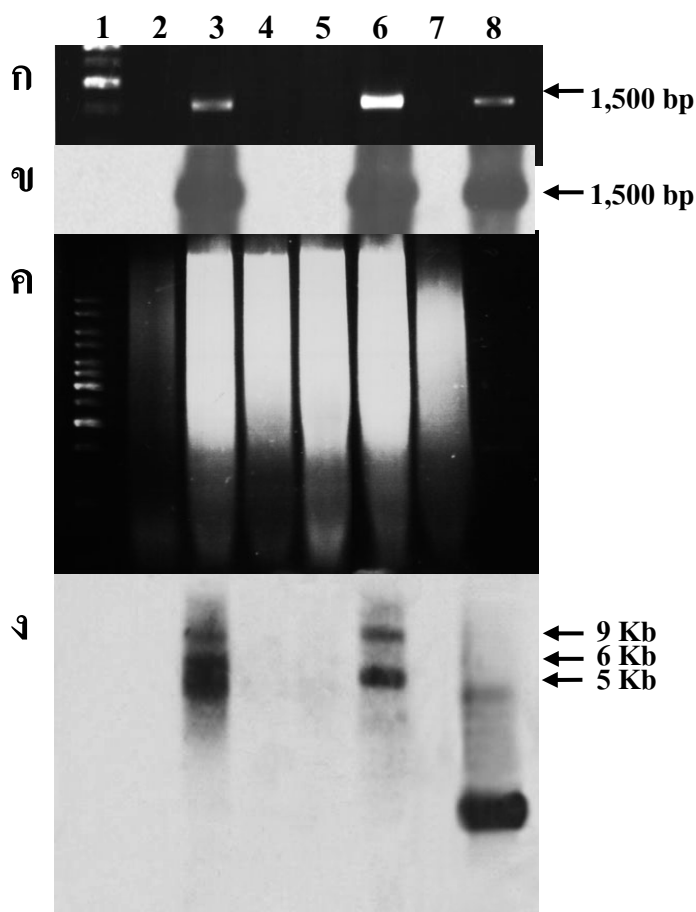


ภาพที่ 36 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *hptII* โดยเทคนิคพีซีอาร์ (ก) และ Southern

Hybridization (ข) จากผลผลิตพีซีอาร์ของกล้วยไม้แปลงพันธุ์ แถวที่ 1 และ 17 = แถบ
 ดีเอ็นเอมาตรฐาน, 2 = กล้วยไม้สกุลหวายเย็บสกุลสายพันธุ์ PSM 24 ที่ไม่ได้รับการถ่าย
 ยีน(negative control), 3 = กล้วยไม้สกุลหวายเย็บสกุลสายพันธุ์ PSM 25 ที่ไม่ได้รับการ
 ถ่ายยีน(negative control), 4 = positive control ได้แก่ พลาสมิด pMNK1005 , 5 =
 BEE13.1, 6 = BEE13.2.1, 7 = BEE13.2.3, 8 = BEE13.3, 9 = BEE17.1, 10 = BEE17.2,
 11 = กล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน(negative control), 12 =
 BEE14.1.3, 13 = BEE14.1.2, 14 = BEE14.1.5, 16 = โพรบยีน *hptII* (positive control)

นำผลผลิตพีซีอาร์ยีน *f3'5'h* จากดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัส
 แปลงพันธุ์ โคลน BEE14.1.3, BEE14.1.2 และ โคลน BEE14.1.5 กล้วยไม้สกุลหวายเย็บสกุลแปลง
 พันธุ์โคลน BEE17.1 ที่ได้จากข้อ 6.2.1 (ภาพที่ 37 (ก)) มาตรวจสอบยืนยันโดยเทคนิค Southern
 blot hybridization ด้วยโพรบยีน *f3'5'h* ขนาด 1,500 คู่เบส ที่ได้จากผลผลิตพีซีอาร์ยีน *f3'5'h* ใน
 พลาสมิด pF3'5'HTG24(S) ด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'5'HXbaI(S)207 กับ F3'5'HSmaI (A)206 พบการ
 สังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอทั้งหมดที่แยกได้จากกล้วยไม้แปลงพันธุ์ ขนาด 1,500 คู่เบส ของยีน
 BEE14.1.3 และ BEE17.1 และแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ทำปฏิกิริยากับโพรบของยีน *f3'5'h* ซึ่ง
 สามารถยืนยันได้ว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอที่แยกจากกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน
 คือ ยีน *f3'5'h* ที่ถ่ายเข้าไปในกล้วยไม้ (ภาพที่ 37 (ข))

ตรวจสอบการแทรกของยีน *f3'5'h* เข้าสู่จีโนมกล้วยไม้สกุลหวายแปลงพันธุ์ โดยการแยกดีเอ็นเอจากกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสและกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน กล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีน *f3'5'h* ในทิศทาง sense ด้วยพลาสมิด pF3'5'HTG24(A) จำนวน 3 โคลน คือ โคลน BEE14.1.3, BEE14.1.2 และ โคลน BEE14.1.5 และกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลแปลงพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีนเช่นเดียวกัน จำนวน 1 โคลน คือ โคลน BEE17.1 ซึ่งผ่านการตรวจสอบยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ในข้อ 6.2.1 นำดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ตำแหน่งด้วยเอนไซม์ *XbaI* และแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส 0.7 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (ภาพที่ 37 (ค)) นำไปตรวจสอบจำนวนชุดของยีน *f3'5'h* ในจีโนมกล้วยไม้สกุลหวายแปลงพันธุ์แต่ละโคลนโดยการไฮบริดเชชันด้วยโพรบยีน *f3'5'h* ที่ได้จากการพีซีอาร์ขึ้นยีน *f3'5'h* ด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'5'HXbaI(S)207 กับ F3'5'HSmaI (A)206 ขนาด 1,500 คู่เบส จากผลการทดลองพบการเกิดปฏิกิริยาที่โพรบยีน *f3'5'h* และจีโนมของกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์โคลน BEE14.1.3 ปรากฏเป็นแถบสีดำบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ 3 ตำแหน่ง ของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 9, 6 และ 5 กิโลเบส และพบการเกิดปฏิกิริยาที่จีโนมของกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลแปลงพันธุ์โคลน BEE17.1 ปรากฏเป็นแถบสีดำบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ 2 ตำแหน่ง ของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 9 และ 5 กิโลเบส (ภาพที่ 37 (ง)) แสดงว่ามีการแทรกของยีน *f3'5'h* เข้าสู่จีโนมกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์ โคลน BEE14.1.3 จำนวน 3 ชุด และกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลแปลงพันธุ์โคลน BEE17.1 จำนวน 2 ชุด ตามลำดับ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการคงอยู่ของยีนที่ตรวจสอบโดยเทคนิคพีซีอาร์และผลการไฮบริดเชชันผลผลิตพีซีอาร์ยีน *f3'5'h*



ภาพที่ 37 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *f3'5'h* (pF3'5'HTG24(S)) ที่ถ่ายเข้ากล้วยไม้สกุล หวายแปลงพันธุ์ ดังนี้คือ 1 = แอปติเอ็นเอมาตรฐาน, 2 = กล้วยไม้สกุลหวายแจกเกอลีน โทมัสที่ไม่ได้รับการยีน, 3-5 = กล้วยไม้สกุลหวายแจกเกอลีน โทมัสที่ได้รับการยีน, 3 = BEE14.1.3, 4 = BEE14.1.2, 5 = BEE14.1.5, 6 = กล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลที่ได้รับการ ถ่ายยีน (BEE17.1), 7 = กล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน(negative control), 8 = ยีน *f3'5'h* (positive control) บนพลาสมิด pF3'5'HTG24(S)

(ก) ตรวจสอบด้วยพีซีอาร์ยีน *f3'5'h* ด้วยคู่ไพรเมอร์ F3'5'HXbaI(S)207 กับ F3'5'HSmaI (A)206

(ข) การไฮบริไดเซชันผลผลิตพีซีอาร์ยีน *f3'5'h* ด้วยโพรบของยีน *f3'5'h*

(ค) ดีเอ็นเอทั้งหมดที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตร โฟเรซิสบนเจลอะกาโรส 0.7 %

(ง) การไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอที่แยกจากจีโนมกล้วยไม้และตรวจสอบด้วยโพรบของ ยีน *f3'5'h*

ภายหลังจากการคัดเลือกต้นกล้วยไม้สกุลหวายแจกเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์และกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลแปลงพันธุ์บนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน นำแต่ละโคลนที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดเพื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีนที่ถ่ายเข้าไปด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าสามารถตรวจพบการคงอยู่ของยีน *hptII*, *3'h* และ *3'5'h* ในกล้วยไม้สกุลหวายแปลงพันธุ์ในบางโคลน ทั้งนี้เนื่องจากการเกิด chimeric ในช่วงแรกของการคัดเลือกทำให้กล้วยไม้ที่ผ่านการคัดเลือกอาจสูญเสียยีนไปเมื่อกล้วยไม้เจริญเป็นต้นโตจึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบยีนในกล้วยไม้แปลงพันธุ์บางโคลน ดังที่ Kuehnle and Sugii (1992) และ Chai *et al.* (2002) ได้รายงานไว้ว่าการถ่ายยีนเข้าโปรโตคอร์มกล้วยไม้โดยการยิงอนุภาค โปรโตคอร์มที่ได้มีโอกาสได้รับยีนแบบ chimeric เพราะโปรโตคอร์มมีการเจริญแบบ embryogenesis สามารถเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการเป็น callus ก่อน ดังนั้นองค์ประกอบของอาหารเพื่อการคัดเลือกและระยะเวลาการคัดเลือกจึงต้องจัดให้เหมาะสม การคัดเลือกกล้วยไม้ที่รับยีนด้วยปริมาณสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อาจไม่เพียงพอสำหรับการคัดเลือกเซลล์กล้วยไม้ที่ได้รับยีนซึ่งต้องแบ่งตัวและเพิ่มปริมาณให้รวดเร็วพอที่จะแข่งขันกับเซลล์กล้วยไม้ที่ไม่ได้รับยีนที่มีปริมาณมากกว่า

ในการตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *3'h* และ *3'5'h* ที่ถ่ายเข้ากล้วยไม้ด้วยพลาสมิด pF3'HTG4(A) และ pF3'5'HTG24(S) ตามลำดับ ร่วมกับพลาสมิด pMNK1005 ที่มียีน *hptII* เป็นยีนคัดเลือก พบว่าบางโคลนที่ตรวจพบการคงอยู่ของยีน *hptII* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เมื่อนำมาตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *3'h* หรือ *3'5'h* ไม่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของยีน *3'h* หรือ *3'5'h* ได้ เนื่องจากวิธีการถ่ายยีนทั้งสองนี้เข้ากล้วยไม้ใช้พลาสมิดที่ถ่ายยีนพร้อมกันสองชนิดที่ยีนแต่ละยีนแยกกันอยู่บนพลาสมิดคนละชนิด ดังนั้นเซลล์กล้วยไม้ อาจได้รับการถ่ายยีนด้วยอนุภาคที่เคลือบด้วยพลาสมิดร่วมกันสองชนิดอาจมีโอกาที่จะสูญเสียพลาสมิดหรือยีนชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือได้รับยีนทั้งสองชนิดซึ่งสามารถอยู่รอดและแทรกเข้าไปในโครโมโซมของกล้วยไม้ได้ เนื่องจากการรับยีนเกิดขึ้นแบบสุ่ม ถ้าต้นกล้วยไม้ได้รับยีน *hptII* เพียงยีนเดียวก็ยังคงสามารถอยู่รอดและเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินได้ แต่ถ้าต้นกล้วยไม้ได้รับยีน *3'h* หรือ *3'5'h* เพียงยีนเดียวโดยไม่ได้รับยีน *hptII* จะไม่สามารถอยู่รอดบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินได้ จึงไม่สามารถตรวจสอบการคงอยู่ของยีนในกล้วยไม้แปลงพันธุ์นี้

กรณีการถ่ายยีน *g3'h* และ *hptII* ที่อยู่บนพลาสมิดเดียวกัน คือ พลาสมิด pF3'HPREXH2(A) เมื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่ากล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์ โคลน BEE6.2.2 ตรวจพบการคงอยู่ของยีน *hptII* แต่ไม่พบการคงอยู่ของยีน *g3'h* ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Men *et al.* (2003) ซึ่งพบว่ายีน *gus* และยีน *hpt* ซึ่งอยู่บนพลาสมิดเดียวกันเกิดการแยกกันของยีนเข้าแทรกในตำแหน่งของจีโนมพืช ซึ่งตรวจพบในการทดลองในครั้งนี้เช่นกันคือ พบการแทรกของยีน *hpt* เพียงยีนเดียวในกล้วยไม้แปลงพันธุ์ที่ได้

การตรวจสอบจีโนมของพืชแปลงพันธุ์ด้วยวิธี Southern blot hybridization สามารถใช้บ่งบอกจำนวนซ้ำของยีนที่เข้าไปแทรกในจีโนมของพืชแปลงพันธุ์ได้ จากผลการทดลองพบว่ายีนสียดอกที่ถ่ายเข้ากล้วยไม้ในครั้งนี้มีการแทรกตัวของยีนที่แตกต่างกันในแต่ละโคลนของพืชแปลงพันธุ์ เนื่องจากการแทรกของยีนเกิดขึ้นแบบสุ่ม ซึ่งในการทดลองถ่ายยีน *g3'h* ที่อยู่บนพลาสมิด pF3'HTG4(A) เข้ากล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัส ตรวจพบการแทรกของยีน *g3'h* เข้าสู่จีโนมกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์ โคลน BEE3.1 จำนวน 2 ชุด และการทดลองถ่ายยีน *g3'5'h* ที่อยู่บนพลาสมิด pF3'5'HTG24(S) เข้ากล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสและกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุล ตรวจพบการแทรกของยีน *g3'5'h* เข้าสู่จีโนมกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์โคลน BEE14.1.3 จำนวน 3 ชุด และกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลแปลงพันธุ์จำนวน 2 ชุด ซึ่งมีรูปแบบที่แตกต่างกัน สอดคล้องกับผลการทดลองของ Men *et al.* (2003) ซึ่งทดลองถ่ายยีน *hpt* ที่อยู่บนพลาสมิด pCAMBIA1301 ด้วยวิธีการยิงอนุภาคเข้ากล้วยไม้สกุลหวาย *D. phalaenopsis* และ *D. nobile* พบการแทรกของยีน *hpt* ตั้งแต่จำนวน 1-3 ชุด และ 1-6 ชุด ตามลำดับ โดยมีรูปแบบการแทรกของยีนแตกต่างกันไป

จากผลการทดลองถ่ายยีนสียโดยใช้วิธีการยิงอนุภาคในครั้งนี้ พบว่าประสิทธิภาพการถ่ายยีนค่อนข้างต่ำคิดเป็นร้อยละ 0.32-4.8 ทั้งนี้อาจขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่

1. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะและระยะเวลาที่ใช้ในการคัดเลือก การคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะความเข้มข้นต่ำเป็นระยะเวลานานมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์กล้วยไม้ที่ได้รับยีน (Kuehnle and Sugii, 1995) และไม่สามารถจัดแยกเซลล์กล้วยไม้ที่ไม่ได้รับยีนออกจากเซลล์กล้วยไม้ที่ได้รับยีน (Griesbash, 1994; Nan and Kuehnle, 1995) และการคัดเลือกบนอาหารแข็งที่มีความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะสูงในทันทีหลังจากถ่ายยีนจะทำให้อัตราการรอดของเซลล์ที่ได้รับยีนน้อยลงเนื่องจากการตายของเซลล์ข้างเคียงที่ไม่ได้รับยีน (Yang *et al.*, 1999) แต่ทว่าการทิ้งช่วง

หลังจากถ่ายยีนเป็นระยะเวลานาน ๆ ก่อนที่จะคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะความเข้มข้นสูงจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำ (Yu *et al.*, 1999; Men *et al.*, 2003) และอาจเกิด chimeric ด้วย (Christo and Ford, 1995) ดังนั้น การคัดเลือกบนอาหาร MS ที่มีสารไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยคัดเลือกแต่ละความเข้มข้น เป็นเวลา 45 วัน ก่อนการคัดเลือกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 30 วัน เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด chimeric หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์กล้วยไม้ที่ได้รับยีน (ชิดชนก สุวรรณเกษรนาทิต ตัดต่อส่วนตัว)

2. สายพันธุ์กล้วยไม้ นอกจากระดับความเข้มข้นของไฮโกรมัยซินที่ใช้ในการคัดเลือก และระยะเวลาในการคัดเลือก สายพันธุ์ของกล้วยไม้ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่บ่งชี้ถึงความสำเร็จ ดังการทดลองที่มีรายงานในกล้วยไม้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวาย *D. hybrid* 'MiHua' ที่ต้องการใช้ไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มที่ไม่ได้รับยีน (Yu *et al.*, 1999) ในขณะที่กล้วยไม้สกุลหวาย *D. phalaenopsis* และ *D. nobile* จะคัดเลือกโดยเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 105 วัน (Men *et al.*, 2003)

3. อัตราการแบ่งเซลล์และการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่ชำทำให้เซลล์ที่ได้รับยีนมีอัตราการแข่งขันในการแบ่งตัวไม่เท่าเทียมกับเซลล์ปกติ นอกจากนี้เนื้อเยื่อกล้วยไม้ยังมีการเจริญเติบโตแบบ embryogenesis โดยไม่ผ่านการสร้างแคลลัส ยังผลให้เนื้อเยื่อของกล้วยไม้ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะความเข้มข้นต่ำเกิดลักษณะ chimeric (Kuehnle and Sugii, 1992) ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนจึงต้องใช้เนื้อเยื่อที่อยู่ในระยะการแบ่งเซลล์ โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อกระตุ้นการแบ่งเซลล์ก่อนที่จะนำมาใช้ถ่ายยีน

4. ขนาดของโปรโตคอร์มที่ใช้ในการถ่ายยีน โดยพบว่าถึงแม้ว่าการถ่ายยีนเข้าโปรโตคอร์มขนาดเล็ก (1-2 มิลลิเมตร) จะทำให้เกิดอัตราการตายสูงกว่าการถ่ายยีนเข้าโปรโตคอร์มขนาดใหญ่ (3-5 มิลลิเมตร) เนื่องจากการบอบช้ำของโปรโตคอร์ม โปรโตคอร์มขนาดเล็กจะประกอบด้วยเซลล์ที่อยู่ในระยะการแบ่งตัวมากกว่าโปรโตคอร์มขนาดใหญ่ส่งผลให้การแทรกตัวของยีนเข้าโครโมโซมในโปรโตคอร์มขนาดเล็กมีสูงมากกว่าในโปรโตคอร์มขนาดใหญ่ นอกจากนี้ยังผลให้เกิดการรับยีนแบบ Stable transformation ได้มากกว่าด้วย (ชิดชนก สุวรรณเกษรนาทิต ตัดต่อส่วนตัว)

สรุป

การปรับปรุงสีดอกของกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสและกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุล โดยการถ่ายยีนที่ได้จากการตัดต่อยีน *f3'h* ของถั่วฝักยาวในทิศทาง antisense ได้พลาสมิด pF3'HTG4(A) ที่มีโครงสร้างเป็น Act-1: *f3'h*: nos และ พลาสมิด pF3'HPEXH2(A) ที่มีโครงสร้าง CaMV 35S: *f3'h*: nos ร่วมกับ CaMV 35S: *hptII*: nos (มียีนต้านทานไฮโกลอไมซิน) และตัดต่อยีน *f3'5'h* ของแพงพวงในทิศทาง sense เข้ากับคิเอ็นเอเวคเตอร์ pTG0063 ได้พลาสมิด pF3'5'HTG4(S) ที่มีโครงสร้างเป็น Act-1: *f3'5'h*: nos

การถ่ายยีน *f3'h* ด้วยวิธีการยิงอนุภาคที่เคลือบพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับ pMNK1005 ที่มียีนคัดเลือกไฮโกลอไมซินและการถ่าย pF3'HPEXH2(A) ผลการคัดเลือกกล้วยไม้ที่ได้รับยีนบนอาหาร MS ที่มีความเข้มข้นไฮโกลอไมซินด้วยระดับที่แตกต่างกัน พบโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกลอไมซินเป็นกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pF3'HTG4(A) ร่วมกับ pMNK1005 จำนวน 2 โคลน และพลาสมิด pF3'HPEXH2(A) จำนวน 4 โคลน โดยประสิทธิภาพการถ่ายยีนคิดเป็นร้อยละ 0.32 และ 1.27 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถคัดเลือกกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลที่ถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pF3'HPEXH2(A) จำนวน 1 โคลน ประสิทธิภาพการถ่ายยีนคิดเป็นร้อยละ 0.4 การใช้เทคนิคพีซีอาร์และ Southern blot hybridization สามารถตรวจพบการแทรกตัวของยีน *f3'h* เข้าสู่จีโนมกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสแปลงพันธุ์ในกล้วยไม้โคลน BEE3.1 และ BEE16.1

การถ่ายยีน *f3'5'h* ด้วยพลาสมิด pF3'5'HTG4(S) ร่วมกับ pMNK1005 เข้ากล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสและกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลสามารถคัดเลือกกล้วยไม้ที่ได้รับยีนจำนวน 16 และ 4 โคลนตามลำดับ โดยประสิทธิภาพการถ่ายยีนคิดเป็นร้อยละ 4.8 และ 0.98 การใช้เทคนิคพีซีอาร์และ Southern blot hybridization สามารถตรวจพบยีนในกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลโคลน BEE14.1.3 และ BEE17.1 และกล้วยไม้สกุลหวายแจคเกอลีนโทมัสโคลน BEE14.1.3 จากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า การถ่ายยีนด้วยเวคเตอร์พีช pREXH-1 มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนมากกว่าเวคเตอร์พีช pTG0063 ร่วมกับ pMNK1005

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2542. กล้วยไม้. แหล่งที่มา: <http://www.doae.go.th/plant/orchid.htm>, 24 มีนาคม 2547.

ครรชิต ธรรมศิริ. 2541. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. อัมรินทร์พรินต์ติ้งเอนด์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

จิตรพรรณ พิสิฐ. 2546. การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 86 น.

มาลินี อนุพันธุ์สกุล. 2542. กล้วยไม้. พิมพ์ครั้งที่ 3, สำนักพิมพ์เกษตรบุ๊คส์ จำกัด. กรุงเทพฯ. 120 น.

พรทิพย์ ถิ่นจวงจันทร์. 2539. การถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคให้กับข้าวไทยบางพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

พรสุข ชัยสุข. 2543. การถ่ายยีนเข้ากล้วยไม้ไทยโดยวิธียิงอนุภาค. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พิสิฐ ชัยประเดิมศักดิ์. 2546. การศึกษาวิธีการถ่ายยีน *Chalcone reductase (chr)* และ *Dihydroflavonol-4-reductase (dfr)* เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายโดยอะโกรแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ระพี สาคริก. 2530. กล้วยไม้. สำนักพิมพ์ช่อนนทรี, กรุงเทพฯ. 140 น.

วาสนา เข็มแก้ว. 2547. การโคลนยีนฟลาโวนอยด์ไฮดรอกซีเลสจากอัญชันและกล้วยไม้แอสโค เซ็นต้าและการศึกษาการแสดงออกของยีนในดอกกล้วยไม้ไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมชาย สุนทรสิงห์, โอฬาร พิทักษ์, ภาวนา อัสวะประภา, ทวีพงศ์ สุวรรณโร, เศรษฐพงศ์ เลขะ
วัฒนะ และอภิชาติ สุวรรณ. 2547. คู่มือการผลิตไม้ตัดดอก. แหล่งที่มา:

<http://web.ku.ac.th/agri/orchid/orchid4.htm>, 24 มีนาคม 2547.

Anzai, H., Y. Ishii, M. Shichinohe, K. Katsumata, C. Nojiri, H. Morikawa and M. Tanaka. 1996.

Transformation of Phalaenopsis by Particle Bombardment. **Plant Tissue Culture Letters**. 13(3): 265-272.

Arditti, J. 1992. **Fundamentals of orchid biology**. John Wiley & Sons, New York, pp 691.

Arida, R., K. Yoshida, T. Kondo, S. Kishimoto and M. Shibata. 2000. Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the antisense dihydroflavonol-4-reductase gene. **Plant Science** 160: 49-56.

Bartley, G.E. and P.A. Scolnik. 1995. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. **Plant Cell** 7: 1027-1038.

Belarmino, MM. and M. Mii. 2000. Agrobacterium-mediated genetic transformation of a Phalaenopsis orchid. **Plant Cell Rep**, 19:435-442.

Bohm, B. 1998. **Introduction to flavonoids**. Chemistry and Biochemistry of Organic Natural Product Vol 2. Smsterdam: Harwood Academic Publishers.

Brenda, W. 2001. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. **Plant Physiology** 126: 485-493.

Brouillard, R. and O. Dangles. 1993. **Genetics of flavonoids**, pp. 589-618. In J.B. Harborne (ed.). The Flavonoid. Champman and Hall, London.

- Brugliera, F., G. Barri-Rewell, T.A. Holton and J.G. Mason. 1999. Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the *Hfl* locus of *Petunia hybrida*. **Plant J.** 19:441-451.
- Cabrera-Ponce, J.L., L. Lo'pez, N. Assad-Garcia and C. Medina – Arevalo. 1997. An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). **Plant Cell Rep.** 16: 255-260.
- Cao, J., W. Zhang, D. McElroy and R. Wu. 1991. **Assessment of rice genetic transformation techniques**, pp. 175-198. In G.S. Khush and G.H. Torniessen (eds.) *Rice Biotechnology*. CAB International and IRRI, Wallingford
- Chai, M.L., C.J. Xu, K.K. Senthil, J.Y. Kim and D.H. Kim. 2002. Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Scientia Horticulturae** 96: 213-224.
- Chia, T.F., Y.S. Chan and N.H. Chua. 1990. **Genetic engineering of tolerance to cymbidium Mosaic Virus**, p. 284. In J. Kemohan, N. Bonham, D. Bonham and L. Cobb (eds.). *Proceedings of the 13th World Orchid Conference 1990*. 1990 WOC Trust, Auckland, New Zeland.
- Chia, T.F., Y.S. Chan and N.H. Chua. 1994. The firefly luciferase as a noninvasive reporter fot Dendrobium transformation. **Plant J.** 6: 441 – 449.
- Christou, P., T.L. Ford and M.Korom. 1993. The development of a variety independent gene transfer method for rice. **TIBTECH.** 10: 239-246.
- Christou, P., W.F. Swain, N.S. Yang and D.E. McCabe. 1989. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 86: 7500-7504.

- Dressler, R.L. 1993. **Phylogeny and Classification of the Orchid Family**. Cambridge University Press.
- Drew, R.A. and V.N. Villegas. 1996. Developing papaya ringspot virus resistance in *Carica papaya*. **Philippine J. of Crop Sci.** 22 (1): 9.
- Duchesne, L. C. and P. J. Charest. 1991. Transient expression of the β -glucuronidase gene in embryogenic callus of *Picea mariana* following microprojection. **Plant Cell Rep.** 10:191-194.
- Figueiredo, P., F.George, F.Tatsuzawa, K. Taki, N. Saito, R.Brouillard. 1999. New features of intramolecular copigmentation by acylated anthocyanins. **Phytochemistry.** 51: 125-132.
- Finer, J.J., P. Vain, M.W. Jones and M.D. McMullen. 1990. Transformation of cotton (*Gossypium hisutum* L.) via particle bombardment. **Plant Cell Rep.** 8: 586-589.
- Forkmann, G. 1991. Flavonoid as flower pigment : The formation of natural spectrum and its extension by genetic engineering. **Plant Breed.** 106: 1-26.
- Forkmann, G. 1993. **Genetics of flavonoids**, pp. 538-564. *In* J.B. Harborne (ed.). The Flavonoid. Chapman and Hall, London.
- Griesbach, R.J. 1994. An improved method for transforming plant through electrophoresis. **Plant Sci.** 102:81-89.
- Gordon-Kamm, W.J., T.M. Spencer, M.L. Mangano. T.R. Adams, R.J. Daines, W.G. Start, J.V. O'Brien, S.A. Chambers, W.R. Adams, N.G. Willetts, T.B. Rice, C.J. Mackey. R.W. Krueger, A.P. Kausch and P.G. Lemaux. 1990. Transformation of maize cell and regeneration of fertile transgenic plants. **Plant Cell.** 2: 603 – 618.

- Gutterson, N. 1995. Anthocyanin biosynthetic genes and their application to flower color modification through sense suppression. **Hort Sci.** 30: 964-966.
- Harborne, J.B. and C. Willams. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry.** 55: 481-504.
- Holton, T.A., F. Brugliera, D.R. Lester, Y. Tanaka, C.D. Hyland, J.G.T. Menting, Lu C-Y, E. Farcy, T.W. Stevenson, E.C. Cornish. 1993. Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. **Nature.** 366: 276–279.
- Holton, T. A. and C. E. Cornish. 1995. Genetic and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. **Plant Cell.** 7: 1071-1083.
- Holton, T.A. and Y. Tanaka. 1994. Blue roses –a pigment of our imagination?. **Trends Biotechnol.** 12: 40-42.
- India, A., T. Yamashida, Y. Yamada and H. Morikawa. 1991. Efficiency of particle-bombardment-mediated transformation is influenced by cell stage in synchronized cultured cells of tobacco. **Plant Physiol.** 97: 1585-1587.
- Jeffrey, B.H., A.W. Christine. 2000. Review Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry.** 55: 481-504.
- Kaltenbach, M., G. Schröder, E. Schmelzer, V. Lutz, J. Schröder. 1999. Flavonoid hydroxylase from *Catharanthus roseus* : cDNA, heterologous expression, enzyme properties and cell-type specific expression in plants. **Plant J.** 19: 183–193.
- Kitada, C., Z. Gong, Y. Tanaka, M. Yamazaki and K. Saito. 2001. Differential Expression of Two Cytochrome P450 Involved in the Biosynthesis of Flavones and Anthocyanins in Chemo-Varietal Forms of *Perilla frutescens*. **Plant Cell Physiol.** 42(12): 1338-1344.

- Kikkent, I.R. 1993. The Biolistic ® PDS-1000/He device. **Plant Cell, Tissue and Organ Cult.** 33: 221-226.
- Klein, T.M., E.C. Harper, Z. Svab, J.C. sanford, M.E. Fromm and P.Maliga. 1988(a). Stable genetic transformation of intact Nicotiana cells by the particle bombardment process. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 85: 8502-8505.
- Klein, T.M., A. Fromm,.D. Weissinger,.S. Tomes,.M. Steve, Sletten and J.C. Sanford. 1988(b). Transfer of foreign genes into intact maize cells with high velocity microprojectiles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 85: 4305-4309.
- Klein, T.M., E. D. Wolf, R. Wu, *et al.* 1987. High-velocity microprojectile for delivering nucleic acids into living cells. **Nature.** 327: 70-73.
- Knapp, J.E., A.P. Kausch and J.M. Chandlee. 2000. Transformation of three genera of orchid using the bar gene as a selectable marker. **Plant Cell Rep.** 19: 893-898.
- Kuehnle, A.R. and N. Sugii. 1992. Transformation of Dendrobium orchid using particle bombardment of protocrms. **Plant Cell Rep.** 11: 484-488.
- Liao, L.J., I.C Pan, Y.L. Chan, U.H. Hsu, W.H. Chen and M.T. Chan. 2004. Transgene silencing in Phalenopsis expressing the coat protein of cymbidium Mosaic Virus is a manifestation of RNA-mediated resistance. **Mol. Breeding.** 13: 229-242.
- Madhuri, G. and R. Reddy. 1999. Plant biotechnology of flavonoids. **Plant Biotechnol.** 16: 179-199.
- McCabe, D.E., W.F. Swain, B.J. Martinell and P. Christou. 1988. Stable transformation of soybean (Glycine max) by particle acceleration. **Bio/Tech.** 6: 923-926.

- McCabe, D.E. and B.J. Martinell. 1993. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. **Bio/Tech.** 11: 596-598.
- McCabe, D.E. and P.Christou. 1993. Direct DNA transfer using electric discharge particle acceleration (ACCELLTM technology). **Plant Cell, Tissue and Organ Cult.** 33: 227-236.
- McElroy, D. and RS. Brattel. 1994. Foreign gene expression in transgenic cereals. **Trends Biotechnol.** 12:62-68.
- Men, S., X. Ming, Y. Wang, R. Liu, C. Wei and Y. Li. 2003. Genetic transformation of two species of orchid by biolistic bombardment. **Plant Cell Rep.** 21: 592-598.
- Mol, JNMV., TA. Holton and RE. Koes. 1995. Floriculture genetic engineering of commercial trails. **Trends Biotechnol.** 13:350-355.
- Mol, J., E. Grotewold and R. Koes. 1998. How genes paint flowers and seeds. **Trends in Plant Sci.** 3: 212-217.
- Mori, S., H. Kobayashi, Y. Hoshi, M. Kondo and M. Nakano. 2003. Heterologous expression of the flavonoid 3',5'-hydroxylase gene of *Vinca major* alters flower color in transgenic *Petunia hybrida*. **Plant Cell Rep.** 22: 415-421.
- Morikawa, H., A. Iida and Y. Yamada. 1989. Transient expression of foreign genes in plant cells and tissue obtained by a simple biolistic device (particle-gun). **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 31: 320-322.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15: 473-497

- Nan, G.-L. and A.R. Kuehnle. 1995. Factors affecting gene delivery by particle bombardment of Dendrobium Orchids. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.** 31: 131-136.
- Nielson, K. M. and E. Podivinsky. 1997. cDNA cloning and Endogenous expression of flavonoid 3', 5' - hydroxylase from petals of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Grise). **Plant Sci.** 129: 167-174.
- Oard, J. 1993. Development of an airgun device for particle bombardment. **Plant Cell, Tissue and Organ Cult.** 33: 247 – 250.
- Okinaka, Y., Y. Shimada, R. Nakano-Shimada, M. Ohbayashi, S. Kiyokawa and Y. Kikuchi. 2003. Selective accumulation of delphinidin derivatives in tobacco using a putative flavonoid 3',5'-hydroxylase cDNA from *Campanula medium*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 67(1): 161-165.
- Park S. Y. and Y. Kim. 2000. The Expression of Egg Plant Flavonoid 3', 5'-hydroxylase Gene in Tobacco Plants (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi). **J. Plant Biotechnology.** 2(1): 25-28.
- Rochange, F., L. Serrano, C. Marque, C. Teulieres and A.-M. Boudet. 1995. DNA delivery into *Eucalyptus globulus* zygotic embryos through biolistics : optimization of the biological and physical parameters of bombardment for two different particle guns. **Plant Cell Rep.** 14: 674-678.
- Russell, J. A., M. K. Roy and J. C. Sanford. 1992. Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. **Plant Physiol.** 98: 1050-1056.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning : A Laboratory Manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Sanford, J.C., F.D. Smith and J.A. Russell. 1993. Optimizing the biolistic process for different biological applications. **Methods Enzymol.** 217: 483-509.
- Sanford, J.S., T.M. Klen, E.D. Wolf and N. Allen. 1987. Delivery of substances into cells and tissue using a particle bombardment process. **Part. Sci. Tech.** 5: 27-37.
- Steinhart, W.L., R.J. Winkler, K.L. Brierley, M.J. Hickman and D.T. Merlis. 1997. Expression of the beta-glucuronidase reporter gene from a variety of promoter constructs in *Cattaleya* protocorms and their protoplast. **Lindleyana.** 12: 172-179.
- Seagull, R.W. 1989. The plant cytoskeleton. **Crit Rev Plant Sci.** 8: 131-167.
- Shimada, Y., R. Nakano-shimada, M. Olbayashi, Y. Okinaka, S. Kiyokawa and Y. Kikichi. 1999. Expression of chimeric P450 genes encoding flavonoid 3', 5'-hydroxylase in transgenic tobacco and petunia plants. **FEBS Lett.** 461: 241-245.
- Shimada Y. 2000. Flower color engineering with flavonoid-biosynthetic genes. **Chem. Regul. Plants.** 35: 138-148.
- Shimada, Y., M. Ohbayashi, R. Nakano-Shimada, Y. Okinaka, S. Kiyokawa and Y. Kikuchi. 2001. Genetic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway of the pathway in petunia. **Plant Cell Rep.** 20: 456-462.
- Stafford, H.A. 1994. Anthocyanins and betalains : evolution of the mutually exclusive pathways. **Plant Sci.** 101: 91-98.
- Stevenson, T.W. 1991. **Molecular biology of flavonoid pigment biosynthesis in flower**, pp 122-148. In E.S. Dennis and D.J. Lewwlyn (eds). *Molecular Approaches to Crop Improvement*. Springer Verlag. Wein.

- Suzuki, K., H. Xue, Y. Tanaka, Y. Fukui, M. Fukuchi-Mizutani, Y. Murakami, Y. Katsumoto, S. Tsuda, T. Kusumi. 2000. Flower color modifications of *Torenia hybrida* by cosuppression of anthocyanin biosynthesis genes. **Mol. Breed.** 6: 239–246
- Suzuki, K., H. Xue, Y. Tanaka, Y. Fukui, M. Mizutani and T. Kusumi. 1997. Molecular breeding of flower color of *Torenia fourieri*. **Plant Cell Physiol.** 38: s38.
- Su V. and B.D. Hsu. 2003. Cloning and expression of a putative cytochrome P450 gene that influences the colour of *Phalaenopsis* flowers. **Biotechnol Lett.** 25(22): 1933-1939.
- Takenchi, Y., M. Dotson and N.T. Keen. 1992. Plant transformation : a simple particle bombardment device based on flowing helium. **Plant Mol. Biol.** 18: 835-839.
- Tanaka, Y., S. Thuda, K. Suzuki, H. Xue, Y. Fukui, M. Fukuchi-Mizutani, K. Ohhira, Y. Katsumoto, K. Yonekura-Sakakibara and T. Kusumi. 1998. **Flower colour modification with genetic engineering**, pp. 115. In P. S. Larkin (eds). *Agricultural Biotechnology Laboratory, Field and Market Proceeding of the 4th Asia-Pacific Conference on Agriculture Biotechnology* 13-16 July 1998. Darwin. Australia.
- Tanaka, Y., K. Yonekura, M. Fukuchi-Mizutani, Y. Fukui, H. Fujiwara, T. Ashikari, T. Kusumi. 1996. Molecular and biochemical characterization of three anthocyanin synthetic enzymes from *Gentiana triflora*. **Plant Cell Physiol.** 37: 711–716.
- Thammasiri, K., C. S. Tang, H. Y. Yamamoto and H. Kememoto. 1987. Degradation of flower pigments in *Dendrobium hybrids*. **Lindleyana.** 2: 169-175.
- Toguri, T., M. Azuma, T. Ohtani. 1993a. The cloning and characterization of a cDNA encoding a cytochrome P450 from the flowers of *Petunia hybrida*. **Plant Sci.** 94: 119–126.

- Toguri, T., N. Umemoto, O. Kobayashi, T. Ohtani. 1993b. Activation of anthocyanin synthesis genes by white light in eggplant hypocotyl tissues, and identification of an inducible P-450 cDNA. **Plant Mol. Biol.** 23: 933–946.
- Tome, D.T., A.K. Weissing, M.Ross, R. Higgins, B.J. Drummoud, S.Schaaf, JI Malone-Schoneberg, M. Staebell, P. Flynn. J. Anderson and J. Howard. 1990. Transgenic tobacco plants and their progeny derived by microprojectile bombardment of tobacco leaves. **Plant Mo., Biol.** 14: 261-268.
- Vacin, E. F. and F. W. Went. 1949. Som PH changes in nutrient solutions. **Bot. Gaz.** 110: 605-613.
- Van Tunen, A.J., L.A. Mur, K. Recourt, A.G.M. Greats and J.N.M. Mol. 1991. Regulation and manipulation of flavonoid gene expression in anthers of *Petunia* : The molecular basis of the *Po* mutation. **Plant Cell** 3: 39-48.
- Vetten, N. D., J. T. Horst, H. P. V. Schaik, A. D. Boer and J. Mol. 1999. A cytochrome b5 is required for full activity of flavonoid 3', 5'-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** 96: 778-783.
- Yang, J.H.-J. Lee, D.H.Shin, S.K. Oh, J.H. Seon, K.Y. Peak and K.-H. Han. 1999. Genetic transformation of *Cymbidium* orchid by particle bombardment. **Plant Cell Rep.** 18: 978-984.
- You, S.J., C.H. Liao, H.E. Huang, T.Y. Feng, V. Prasad, H.H. Hsiao, J.C. Lu and M.T. Chan. 2003. Sweet pepper ferredoxin-like protein (pflp) gene as a novel selection marker for orchid transformation. **Planta.** 217: 60-65.

- Yu, Z., M. Chen, L. Nie, H. Lu, X. Ming, H. Zheng, L.J Qu and Z.Chen. 1999. Recovery of transgenic orchid plants with hygromycin selection by particle bombardment to protocorms. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** 58: 87-92.
- Yu, H. and CH. Goh. 2001. Molecular genetics of reproductive biology in orchid. **Plant Physiol.** 127:1390-1393.
- Yukiko U., K. Suzuki, M. Fukuchi-Mizutani, Y. Fukui, K. Miyazaki, H. Ohkawa, T. Kusumi and Y. Tanaka. 2002. Molecular and biochemical characterization of torenia flavonoid 3'-hydroxylase and flavone synthase II and modification of flower color by modulating the expression of these genes. **Plant Science.** 163: 253-263.
- Zhang, S., L. Chen, R. Qu, R. beachy and C. Fauquet. 1996. Regeneration of fertile transgenic indica (group 1) rice plant following microprojectile transformation of embryogenic culture cells. **Plant Cell Rep.** 15: 465-469.
- Zhang, W., D. McElroy and R. Wu. 1991. Analysis of rice ACT-1 5' region activity in transgenic rice plants. **Plant Cell.** 3: 1155-1165.
- Zou, J.T., X.Y. Zhan, H.M. Wu, H. Wang and A.Y. Cheung. 1994. Characterization of a rice pollen-specific gene and its expression . **Amer. J. of Bot.** 81(5): 552-561.