สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
ตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	28
อุปกรณ์	28
วิธีการ	38
ผลและวิจารณ์	62
สรุป	121
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	123
ภาคผนวก	138

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เอนไซม์ตัดจำเพาะและบัฟเฟอร์ที่ใช้เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิด pCAMBIA1301a*ACO1* และ pCAMBIA 13121a*ACO*2 จากเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน	53
2	น้ำหนักสดของ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 0 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่า โดยใช้ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที นาน 16 ชั่วโมง ต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์	64
3	น้ำหนัก PLBs ที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อชิ้น เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น และเปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่เกิด PLBs ใหม่เฉลี่ยของ tTCLs ที่ได้จาก PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์ บอม17 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร 2 ชนิดคืออาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร VW ที่เติม BA 5 ไมโครโมลาร์ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และเติมวุ้น 6.5 กรัมต่อลิตรสำหรับอาหารแข็ง pH 4.9 เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 28 ไมโครโมล์ต่อตารางเมตรต่อวินาที นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์	69
4	เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้น tTCL ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ เอียสกุล ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B ความเข้มข้นแตกต่างกัน 8 ระดับ ในห้องเพาะเลี้ยงควบคุมที่ให้แสงประมาณ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวันอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์	76
5	เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้น tTCL ที่สามารถสร้าง PLBs ใหม่ได้บนคัดเลือกสูตร VW ที่เติมสารปฏิชีวนะ hymycin ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefotaxime ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ในห้องเพาะเลี้ยงควบคุมที่ให้แสงประมาณ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 และ 12 สัปดาห์	86

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
6	จำนวนชิ้น tTCLs ที่เกิด PLBs ใหม่หลังคัดเลือก และจำนวนชิ้น tTCLs ที่สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้ จากการถ่ายยีน *CPACO1* antisense จาก pCAMBIA 1301aACO*1* เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 และ เอียสกุล โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์AGL-1	107
7	จำนวนชิ้น tTCLs ที่เกิด PLBs ใหม่หลังคัดเลือก และจำนวนชิ้น tTCLs ที่สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้ จากการถ่ายยีน *CPACO2* antisense จาก pCAMBIA 13121aACO*2* เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 และ เอียสกุล โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์AGL-1	108

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	มูลค่าและปริมาณการส่งออกดอกกล้วยไม้สดตั้งแต่ พ.ศ. 2542-2548	9
2	ขั้นตอนโดยสรุปของการถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* เข้าสู่พืช	16
3	กระบวนการสังเคราะห์เอทิลีนในพืชชั้นสูง	22
4	กลไกการทำงานของ antisense RNA	27
5	แผนที่โครงสร้างและขนาดของพลาสมิด pCAMBIA 1301 ที่ใช้ในการทดลองการถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 เป็นพาหะ	32
6	พลาสมิด pCAMBIA 1300 ซึ่งมีขนาด 8,958 คู่เบส (ก) และพลาสมิด pCAMBIA 13121 ที่มีขนาด 11,990 คู่เบส (ข)	33
7	แผนที่โครงสร้างของพลาสมิด pGEM-T Easy vector ที่บรรจุยีน *CPACO1*	34
8	แผนที่โครงสร้างของพลาสมิด pPCR-Script Amp SK(+) ที่บรรจุยีน *CPACO2*	34
9	ลักษณะ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 3 ระดับ เพาะเลี้ยงควบคุมในที่มีแสงประมาณ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส	65
10	ลักษณะชิ้น tTCLs ที่ตัดให้มีความหนาแตกต่างกัน 3 ระดับ และ PLBs ใหม่ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง tTCLs ด้วยอาหารแข็งและเหลวสูตร VW ในห้องเพาะเลี้ยงควบคุมที่ให้แสงประมาณ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์	70
11	ลักษณะ PLBs และต้นอ่อนของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง PLBs บนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติมสารประกอบอินทรีย์แตกต่างกัน 5 สูตร ในห้องเพาะเลี้ยงควบคุมที่ให้แสงประมาณ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 8 สัปดาห์	73

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	ลักษณะของชิ้น tTCL ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ เอียสกุล ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B ความเข้มข้นแตกต่างกัน 8 ระดับ ในห้องเพาะเลี้ยงควบคุมที่ให้แสงประมาณ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวันอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์	77
13	ชิ้น tTCLs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ในห้องเพาะเลี้ยงควบคุมที่ให้แสงประมาณ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์	85
14	ต้นอ่อนของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำต้นอ่อน ในห้องเพาะเลี้ยงควบคุมที่ให้แสงประมาณ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวันอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส	89
15	การแสดงออกของยีน *gus* ซึ่งตรวจสอบโดยวิธี GUS histochemical assay ในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ถ่ายยีนระยะต่าง ๆ	92
16	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gus* และ *hpt* แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์	94
17	การตรวจวิเคราะห์การคงอยู่ของยีน *gus* ในต้นกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนโดยใช้เทคนิค dot blot hybridization ที่ตรวจสอบด้วยตัวตรวจสอบยีน *gus*	96
18	แผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สำคัญของ binary vector ที่มียีน *CPACO* antisense	99
19	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน antisense *ACO* โดยใช้ binary vector เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ วิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์	100

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	รูปแบบการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดของ binary vector วิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์	101
21	การชักนำให้ PLBs ที่เกิดใหม่บนอาหารคัดเลือกให้เกิดเป็นต้นอ่อนโดยเพาะเลี้ยง PLBs บนอาหารชักนำต้นอ่อนสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ มันฝรั่งบด 15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านกำมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 8 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงในที่ให้แสงประมาณ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส	109
22	ลักษณะผิดปกติต่าง ๆ ของต้นกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีน *CPACO* antisense	110
23	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ขนาด 800 คู่เบส โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hpt* และใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของต้นกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนต้นแบบ วิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์	112
24	การตรวจวิเคราะห์การคงอยู่ของยีน *hpt* ในต้นกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนโดยใช้เทคนิค dot blot hybridization ที่ตรวจสอบด้วยตัวตรวจสอบยีน *hpt*	115
25	การตรวจวิเคราะห์การคงอยู่ของยีน *hpt* ในต้นกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน โดยใช้เทคนิค Southern blot hybridization ที่ตรวจสอบด้วยตัวตรวจสอบยีน *hpt*	117
26	กิจกรรมของเอนไซม์ ACO ในใบของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน (BOaACO1.1 และ BOaACO2.1-2.4) และไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control) ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACO โดยวัดปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยน ACC ที่ให้จากภายนอกด้วยเอนไซม์ ACO จากกล้วยไม้	120
27	ปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อของกล้วยไม้ใช้วิธีการดัดแปลง โดยวัดปริมาณการสร้างจากต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน(BOaACO1.1 และ BOaACO2.1-2.4) และไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)	120

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

BA	: N_6-benzyladenine
CTAB	: N-cetyl-N,N,N-trimethyl-ammonium bromide
dNTP	: deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	: ethylenediaminetetraacetate dehytrate
GUS	: β-glucuronidase
PCR	: polymerase chain reaction
PLBs	: protocorm liked bodies
PVP	: polyvinylpyrrolidone
SDS	: sodium dodecyl sulfate
T-DNA	: transfer DNA
Tween 20	: polyethylene sorbitan
VW	: Vacin and Went medium
X-gluc	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide