การถ่ายยีน *CPACO* antisense เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย

Transformation of *CPACO* Antisense into *Dendrobium* Orchid

คำนำ

อุตสาหกรรมกล้วยไม้ของประเทศได้เจริญก้าวหน้าอย่างมาก และทำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นอันดับหนึ่งในจำนวนไม้ดอกไม้ประดับทั้งหมดที่มีการส่งออก โดยเฉพาะกล้วยไม้ตัดดอกที่มีมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นโดยตลอด ในช่วงปี 2546-2548 มีมูลค่าส่งออก 1,985.43 2,136.06 และ 2,538.06 ล้านบาทต่อปีตามลำดับ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2548) ส่งออกไปยังประเทศต่างๆกว่า 77 ประเทศ โดยมีประเทศ ญี่ปุ่น สหรัฐ อิตาลี ฮ่องกง และ เนเธอร์แลนด์ เป็นตลาดส่งออกที่สำคัญ (กรมศุลกากร, 2548) และภายในประเทศเองยังมีความนิยมใช้กล้วยไม้อย่างกว้างขวางอีกด้วย

อย่างไรก็ตามปริมาณและมูลค่าการส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกของไทยมีความไม่แน่นอน เนื่องจากประสบปัญหาเรื่องความผันผวนของราคาและภาวะการแข่งขันกับประเทศผู้ผลิตอื่น ๆ ในภูมิภาคอาเซียนด้วยกันทั้ง ประเทศสิงคโปร์ มาเลเซีย และ อินโดนีเซีย นอกจากปัญหาดังกล่าวแล้ว ยังพบปัญหาด้านการขนส่งคือ การส่งดอกกล้วยไม้ไปจำหน่ายยังต่างประเทศโดยเครื่องบินมีเที่ยวบินไม่แน่นอนและหาระวางได้ยาก และปัญหาด้านคุณภาพ คือ ดอกกล้วยไม้มีความคงทนของดอกน้อย เมื่อถึงมือผู้รับปลายทางมักปรากฏว่า ดอกจะเหี่ยว หลุดร่วง และมีอายุการปักแจกันสั้น ดังนั้นเพื่อรักษาตลาดและเพิ่มมูลค่าการส่งออก จึงต้องปรับปรุงคุณภาพและอายุการใช้งานของดอกกล้วยไม้ให้มีอายุการใช้งานนานขึ้น

ในประเด็นอายุการใช้งานของดอกกล้วยไม้นั้นเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่งคือ เอทิลีน ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชในรูปแก๊ส ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อคุณภาพและอายุการใช้งานของดอกไม้ทุกชนิด (Abeles *et al.*, 1992) หลังการตัดช่อดอกไม้ออกจากต้นแม่ ช่อดอกจะเร่งให้มีการสร้างเอทิลีนขึ้นมากในบริเวณรอยตัดและสะสมในช่อดอก มีผลทำให้โครงสร้างทางกายภาพของเซลล์และเอนไซม์ในช่อดอกเปลี่ยนแปลงไป การดูดน้ำของเซลล์ลดลง ทำให้ดอกขาดน้ำและเหี่ยว (Mayak *et al.*, 1977) ซึ่งพบว่าถ้าหลังการเก็บเกี่ยวและระหว่างการเก็บรักษามีปริมาณเอทิลีนมากจะมีผลทำให้ดอกกล้วยไม้เกิดการเสื่อมสภาพเร็วขึ้น (Apelbaum and Katchansky, 1978) ดังนั้นถ้าสามารถทำให้ดอกไม้มีการสร้างเอทิลีนได้น้อยลง จะช่วยชะลอการเสื่อมสภาพและช่วยยืดอายุการใช้งานให้นานขึ้น (Halevy and Mayak, 1981)

กระบวนการสังเคราะห์เอทิลีนในพืชชั้นสูงต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์หลักสองชนิดในสองขั้นตอน คือเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (ACS) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยน S-adenosyl-L-methionine (SAM) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของกระบวนการนี้ ให้เป็น 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) และเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO) ทำหน้าที่เปลี่ยน ACC ให้เป็น เอทิลีน (Kende, 1993) ซึ่งจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ ACO นั้นทำหน้าที่ในการสังเคราะห์เอทิลีนโดยตรง ดังนั้นถ้าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACO ก็จะทำให้ลดการสังเคราะห์เอทิลีนลง ซึ่งอาจช่วยยืดอายุการปักแจกันและลดความเสียหายของดอกกล้วยไม้เนื่องจากเอทิลีนในระหว่างการขนส่งได้ (Savin *et al.*, 1995)

การที่กล้วยไม้ตัดดอกในประเทศไทยประสบปัญหาด้านคุณภาพ โดยเฉพาะเรื่องของความคงทนของดอกและอายุการใช้งานที่สั้นนั้น ทางแก้ไขคือการสร้างกล้วยไม้พันธุ์ใหม่ที่มีคุณลักษณะของดอกที่เป็นที่ต้องการของตลาด โดยวิธีการที่นิยมคือการผสมเกสรข้ามพันธุ์ซึ่งต้องใช้เวลานาน อีกทั้งยังต้องมีการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเป็นจำนวนมากเพื่อคัดเลือกพันธุ์ลูกผสม ทำให้สิ้นเปลืองเงินทุน วัสดุ พื้นที่ และแรงงานเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการนำเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งจะทำให้ได้ลักษณะใหม่ที่เฉพาะเจาะจงเพิ่มเข้ามาโดยพืชยังคงลักษณะเดิมที่ดีไว้ได้เข้ามาช่วยจึงเป็นแนวทางที่น่าจะได้ผลดี ซึ่งในกรณีนี้สามารถทำได้โดยการถ่ายยีนที่ยับยั้งกระบวนการสร้างเอทิลีนซึ่งเป็นสารสำคัญที่ทำให้เกิดการเหี่ยวของดอกกล้วยไม้หลายชนิด ทั้งนี้จากการวิจัยในต่างประเทศพบว่าการถ่ายยีนแบบ antisense ของยีนใดยีนหนึ่งเข้าในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนนั้นได้ดี (Henzi *et al*., 1999 ;Wi and Park, 2001) ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงทำการถ่ายยีน *ACO* แบบ antisense เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายตัดดอกพันธุ์ที่นิยมทางการค้า 2 พันธุ์ ได้แก่พันธุ์ บอม17 และพันธุ์ เอียสกุล ซึ่งนอกจากจะทำให้ได้เทคนิคที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย แล้วยังคาดว่าการถ่ายยีนดังกล่าวจะทำให้ได้ดอกกล้วยไม้มีอายุการใช้งานนานขึ้น ซึ่งในอนาคตจะทำให้ประเทศไทยมีกล้วยไม้พันธุ์ใหม่ที่มีอายุการปักแจกันนานขึ้น ซึ่งจะมีผลทำให้ตลาดส่งออกของกล้วยไม้ไทยดีขึ้น

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายโดยการใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

2. ถ่ายยีน *ACO1* และ *ACO2* เข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้ โดยให้ยีนที่ถ่ายเข้าไปมีการวางตัวแบบ antisense และสร้างกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่สร้างเอทิลีนน้อยลง

ตรวจเอกสาร

1. พฤษศาสตร์ของกล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledonous plant) จำพวกไม่มีเนื้อไม้ (perennial herbs) อยู่ในวงศ์ (Orchidaceae) เป็นพืชที่มีอายุยืนนานหลายปี พืชในวงศ์นี้จัดว่ามีจำนวนชนิดมากที่สุดในบรรดาไม้ดอกด้วยกัน โดยพบแล้วทั่วโลกมากกว่า 796 สกุล ประมาณ 19,000 ชนิด ประเทศไทยนับเป็นแหล่งกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก มีกล้วยไม้พันธุ์พื้นเมือง 167 สกุล 1,140 ชนิด (อบฉันท์, 2543)

1.1 ระบบราก (roots)

กล้วยไม้มีระบบรากหลายชนิดโดยได้แก่ รากดิน รากกึ่งดิน รากกึ่งอากาศ และรากอากาศ กล้วยไม้ระบบรากดินเป็นกล้วยไม้ที่มีระบบรากเกิดจากหัวอวบน้ำที่อยู่ใต้ดิน รากมีน้ำมาก เช่น กล้วยไม้สกุลนางอั้ว (*Pseteilis*) กล้วยไม้ประเภทนี้พบมากบริเวณพื้นที่ที่มีสภาพอากาศที่มีฤดูกาลชัดเจน เช่น ฤดูฝนมีฝนตกชุกและมีฤดูแล้ง เมื่อถึงฤดูฝนหัวจะแตกหน่อแทงใบอ่อนชูพ้นผิวดินและออกดอกในช่วงปลายฤดูฝน เมื่อพ้นฤดูฝนไปแล้วใบก็จะทรุดโทรมและแห้งไปคงเหลือแต่หัวที่อวบน้ำและมีอาหารสะสมฝังอยู่ใต้ดิน ซึ่งสามารถทนความแห้งแล้งได้ ส่วนกล้วยไม้ระบบรากกึ่งดินมีรากซึ่งมีลักษณะอวบน้ำ ใหญ่หยาบและแตกแขนงแผ่กระจายอย่างหนาแน่นสามารถเก็บสะสมน้ำได้ดีพอสมควร กล้วยไม้ประเภทนี้พบขึ้นอยู่ตามอินทรียวัตถุที่เน่าเปื่อยผุพังร่วนโปร่งได้แก่ กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum*) สกุลสเปโธกล๊อตติส (*Spathoglottis*) และสกุลเอื้องพร้าว (*Phaius*) สำหรับกล้วยไม้ระบบรากกึ่งอากาศ เป็นระบบรากที่มีชั้นเซลล์ผิวของรากที่หนาผิวนอกเกลี้ยงไม่มีขนมีลักษณะคล้ายฟองน้ำ ทำให้เก็บและดูดน้ำได้มากและสามารถนำน้ำไปใช้ตามเซลล์ผิวได้ตลอดความยาวของราก และมักมีรากแขนงใหญ่หยาบอยู่กันอย่างหนาแน่นไม่มีรากขนอ่อน รากมีขนาดเล็กกว่ารากอากาศ กล้วยไม้ระบบรากกึ่งอากาศได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) สกุลแคทลียา (*Cattleya*) สกุลออนซิเดียม (*Ondidium*) เป็นต้น ส่วนกล้วยไม้ที่มีระบบรากอากาศนี้จะมีรากขนาดใหญ่ แขนงรากหยาบ เซลล์ที่ผิวรากทำหน้าที่ดูดน้ำ และ เก็บน้ำ ทำให้สามารถทนทานต่อความแห้งแล้งได้ดี กล้วยไม้ที่มีระบบรากอากาศไม่ชอบอยู่ในสภาพเปียกแฉะนานเกินไป นอกจากนั้นปลายรากสดยังมีสีเขียวของคลอโรฟิลล์สามารถทำหน้าที่สร้างอาหารได้เช่นเดียวกับใบ เพราะฉะนั้นรากประเภทนี้จึงไม่หลบแสงสว่างเหมือนรากต้นไม้ดินทั่ว ๆ ไป

กล้วยไม้ที่มีระบบรากอากาศเช่น กล้วยไม้สกุลแวนด้า (*Vanda*) สกุลช้าง (*Rhynchostylis*) สกุลกุหลาบ (*Aerides*) และสกุลเข็ม(*Ascocentrum*) (สำอางค์, 2548)

1.2 ต้น และลำต้นเทียม (stem or rhizome and pseudobulb)

ลำต้นของกล้วยไม้ หมายถึงส่วนที่เป็นข้อ บริเวณส่วนเหนือข้อและติดอยู่กับข้อจะมีตา ตาอาจจะแตกเป็นหน่ออ่อน กิ่งอ่อนหรือช่อดอกก็ได้ ข้อเป็นส่วนที่มีใบ กาบใบ หรือกาบของลำต้นที่ไม่มีส่วนของใบเจริญออกมาได้ ส่วนที่อยู่ระหว่างข้อเรียกว่า ปล้อง สำหรับลำต้นของกล้วยไม้ที่โผล่พ้นจากเครื่องปลูกแบ่งได้ 2 ประเภท คือ ลำต้นแท้ และลำต้นเทียม ซึ่งลำต้นแท้ คือลำต้นที่มีข้อ ปล้อง เหมือนกับลำต้นของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวทั่วไป ที่ส่วนเหนือข้อจะมีตา ซึ่งสามารถเจริญเป็นหน่อใหม่ และช่อดอกได้ ลำต้นประเภทนี้จะเจริญเติบโตออกไปทางยอด กล้วยไม้ที่มีลำต้นแท้ลักษณะเช่นนี้ได้แก่ กล้วยไม้สกุลแวนด้า แมลงปอ และรองเท้านารี ส่วนลำต้นเทียม หรือที่เรียกว่าลำลูกกล้วย (pseudobulb) ทำหน้าที่สะสมอาหาร ตาที่อยู่ตามข้อบน ๆ ของลำลูกกล้วยสามารถแตกเป็นหน่อหรือช่อดอกได้ แต่ลำต้นที่แท้จริงของกล้วยไม้ประเภทนี้คือเหง้า (rhizome) ซึ่งเจริญในแนวนอนไปตามผิวของเครื่องปลูก ลักษณะของเหง้ามีข้อและปล้องถี่ กล้วยไม้ที่มีลำต้นลักษณะนี้ได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวาย แคทลียา สกุลเอพิเดนดรัม (*Epidrendrun*) และสกุลออนซิเดียม (สำอางค์, 2548)

1.3 ใบ (leave)

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ใบของกล้วยไม้มีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปตามชนิดของกล้วยไม้ นับตั้งแต่รูปร่าง สี ขนาด และความหนา (Hew and Yong, 2004) ลักษณะใบของกล้วยไม้มีหลายชนิด เช่น ใบแบน ใบกลม และใบร่องซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างพวกใบกลมกับใบแบน แต่ใบกล้วยไม้ส่วนมากจะมีลักษณะแบน การเรียงตัวจะมีทั้งเรียงสลับกันและเรียงซ้อนทับกัน สีของใบส่วนมากมีสีเขียวอมเหลือง บางชนิดใบมีสีสันลวดลายสวยงาม ใบของกล้วยไม้มีลักษณะแตกต่างกันตามสกุล เช่น กล้วยไม้ในสกุลสแพโตกล๊อตทิส มีลักษณะใบเป็นจีบ กล้วยไม้พญาไร้ใบ (*Chiloschista usneoides* LDL) มีลักษณะใบที่เล็กมากโดยมีขนาดใหญ่กว่าหัวเข็มหมุดเล็กน้อย ใบของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีบางชนิด ใบมีสีสันงดงาม หลายชนิดมีใบสีเขียวแก่สลับเขียวอ่อน ใบของกล้วยไม้เอื้องดินสยาม (*Anoectochilus siamensis*) มีสีน้ำตาลอมแดงและมีลายหรือกระสีขาวสวยงามมาก (อบฉันท์, 2543)

1.4 ช่อดอก และดอก (inflorescence and flower)

ช่อดอกของกล้วยไม้มีลักษณะแตกต่างกันไปอย่างมาก ขึ้นกับสกุลและชนิดของกล้วยไม้ บางชนิดมีก้านช่อสั้นมาก บางชนิดมีก้านช่อยาว บางชนิดมีช่อดอกตั้งแข็ง (erect) บางชนิดมีช่อดอกลักษณะโค้งหรือห้อยหัวลง เช่นช่อดอกกล้วยไม้ไอยเรศ (*Rhynchostylis retusa*) กล้วยไม้บางชนิดมีช่อดอกยาวและมีแขนงแยกออกไปอีก เช่นช่อดอกกล้วยไม้ในสกุลเรแนนเธอร่า (Renanthera) ก้านซึ่งเป็นแกนกลางของช่อดอกจะประกอบด้วยข้อและปล้อง ช่อดอกของกล้วยไม้บางชนิดมีตาซึ่งอยู่ตามข้อของก้านที่เป็นแกนช่อสามารถแตกและเจริญออกมาเป็นต้นกล้วยไม้เล็ก ๆ ได้ เช่นก้านช่อของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอฟซิส (*Phalaenopsis*) เป็นต้น (สำอางค์, 2548)

ดอกกล้วยไม้เป็นดอกสมบูรณ์เพศ คือ เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน กลีบดอกกล้วยไม้มี 6 กลีบ แบ่งออกเป็น 2 ชั้น ชั้นนอกคือกลีบเลี้ยง (sepal) มี 3 กลีบ จะเห็นได้ชัดเมื่อคว่ำดอก แยกเป็นกลีบเลี้ยงบน (dorsal sepal) 1 กลีบ และกลีบเลี้ยงด้านล่าง (lateral sepal) 2 กลีบ สำหรับชั้นในคือกลีบดอก (petal) มี 3 กลีบ ประกอบด้วยกลีบดอกด้านข้าง (lateral petal) 2 กลีบอยู่ข้างบน กลีบคู่นี้จะมีขนาด รูปทรง สีสันเหมือนกัน และอีก 1 กลีบอยู่ข้างล่างและมีลักษณะแตกต่างไปอย่างชัดเจน กลีบล่างนี้มีชื่อเรียกเฉพาะว่า ปาก หรือ กระเป๋า
(อบฉันท์, 2543)

1.5 ผลหรือฝัก และเมล็ด (fruit capsule or pod and seed)

ผลหรือฝักของกล้วยไม้มีขนาด ลักษณะรูปร่างต่าง ๆ กัน เมื่อแก่เต็มที่แล้วจะแตกตามแนวยาว 3 แนว ภายในมีเมล็ดที่มีขนาดเล็กมาก ลักษณะเป็นผงละเอียดจำนวนมาก บางชนิดอาจมีถึงล้านเมล็ด เป็นเมล็ดที่ภายในไม่มีอาหารสะสม และใบเลี้ยงที่ไม่เจริญ ในธรรมชาติเมล็ดจำนวนมากมายเหล่านี้จึงมีโอกาสงอกเจริญเป็นต้นใหม่ได้ไม่มากนัก เมล็ดที่งอกและเจริญเติบโตได้นั้นต้องปลิวไปตกในที่ที่มีสภาพแวดล้อมเหมาะสม และมีราพวกไมคอไรซา (mycorrhiza) อยู่ด้วย ราพวกนี้จะมีเส้นใยเจริญเข้าไปในเมล็ด ทั้งราและเมล็ดหรือต้นอ่อนของกล้วยไม้จะอยู่ด้วยกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน (อบฉันท์, 2543)

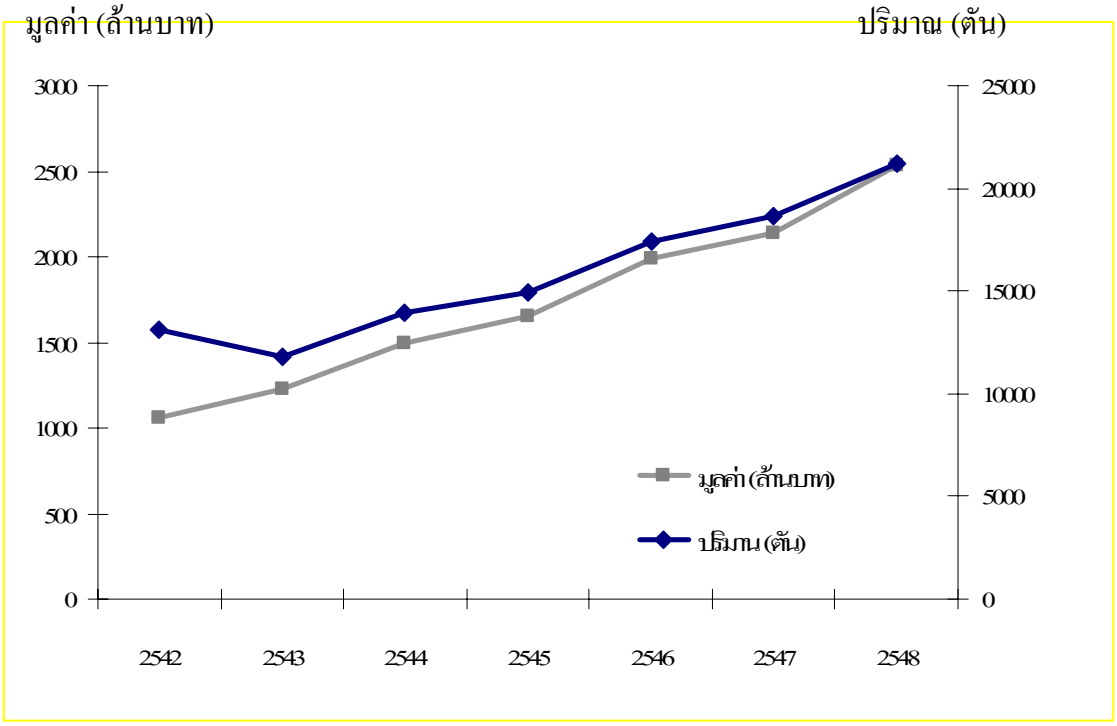
2. <u>กล้วยไม้สกุลหวายตัดดอก</u>

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* spp.) เป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่สุด มีแหล่งกำเนิดในเขตร้อน มีการแพร่กระจายพันธุ์ออกไปในบริเวณกว้างทั้งในทวีปเอเชียและหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก นักพฤกษศาสตร์ค้นพบแล้วประมาณ 1,000 ชนิดพันธุ์ ในประเทศไทยมีมากกว่า 150 พันธุ์ (อบ ฉันท์, 2543) กล้วยไม้สกุลหวายทุกชนิดเป็นกล้วยไม้อิงอาศัยที่มีระบบรากแบบกึ่งอากาศ มีลักษณะการเจริญเติบโตแบบซิมโพเดียล คือมีลำลูกกล้วย เมื่อลำต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะแตกหน่อเป็นลำต้นใหม่และเป็นกอ ใบแข็งหนาสีเขียว ลักษณะของดอกมีกลีบเลี้ยง 3 กลีบ และกลีบดอก 3 กลีบ โดยกลีบเลี้ยงบนและกลีบเลี้ยงคู่ล่างขนาดยาวพอ ๆ กัน ส่วนกลีบดอกคู่บนจะอยู่อย่างอิสระเดี่ยว ๆ และมีลักษณะเหมือนกัน ส่วนกลีบดอกล่างจะมีลักษณะที่แตกต่างออกไปเรียกว่า ปาก หรือ กระเป๋า (อดุลย์, 2533)

กล้วยไม้สกุลหวายเข้าสู่สังคมกล้วยไม้ของเมืองไทยเป็นอันดับสองรองจากสกุลแคทลียา กล้วยไม้สกุลหวายชนิดแรกที่ปลูกเพื่อตัดดอกเป็นการค้าคือ หวายปอมปาดัวร์ (*Dendrobium* 'Pompadour') โดยนำเข้ามาจากประเทศฝรั่งเศส แล้วพบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศของประเทศไทยและให้ดอกสวยงาม ในปี 2508 จึงได้ทดลองตัดดอกส่งไปขายต่างประเทศ ปรากฏว่าได้รับความนิยมจึงมีการส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกตั้งแต่นั้นมา ปัจจุบันมีการผสมและคัดพันธุ์กล้วยไม้หวายเพื่อนำมาปลูกตัดดอกมากมายหลายชนิด พันธุ์ที่นิยมปลูกมากที่สุดคือ กล้วยไม้สกุลหวายลูกผสม (*Dendrobium* hybrid) (ระพี, 2546)

ในปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกกล้วยไม้ประมาณ 17,500 ไร่ พื้นที่ส่วนใหญ่ใช้ปลูกกล้วยไม้สกุลหวายตัดดอก โดยกล้วยไม้ที่ผลิตได้ประมาณครึ่งหนึ่งใช้บริโภคภายในประเทศเองและอีกส่วนหนึ่งผลิตเพื่อการส่งออก โดยมีแนวโน้มของมูลค่าและปริมาณการส่งออกสูงขึ้นโดยตลอด (ภาพที่ 1) พื้นที่ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ส่วนใหญ่อยู่บริเวณภาคกลางใกล้กรุงเทพมหานคร เนื่องจากสภาพภูมิอากาศเหมาะสมกับการเจริญเติบโต ใกล้แหล่งน้ำและตลาด รวมทั้งการคมนาคมขนส่งที่สะดวกและมีประสิทธิภาพ พื้นที่ปลูกส่วนใหญ่อยู่ใน 3 จังหวัดคือ นครปฐม กรุงเทพมหานคร และสมุทรสาคร นอกจากนี้ยังมีพื้นที่ปลูกในจังหวัดอื่นเช่น นนทบุรี ปทุมธานี ราชบุรี และพระนครศรีอยุธยา (ครรชิต, 2547)

อย่างไรก็ตามปริมาณและมูลค่าการส่งออกกล้วยไม้สกุลหวายตัดดอกของไทยมีความไม่แน่นอน มีการเปลี่ยนแปลง ทุก ๆ ปี เนื่องจากประสบปัญหาเรื่องความผันผวนของราคา และภาวะการแข่งขันกับประเทศผู้ผลิตอื่น นอกจากปัญหาดังกล่าวแล้ว ปัญหาที่สำคัญคือดอกกล้วยไม้ของประเทศไทยมีคุณภาพต่ำ โดยเฉพาะในเรื่องของอายุการใช้งาน (สมเพียร, 2532) สายชล และคณะ (2528) รายงานว่าผู้ส่งออก 63.52 เปอร์เซ็นต์ ได้รับแจงจากลูกค้าว่าดอกเหี่ยว ส่วนอีก 36.48 เปอร์เซ็นต์ ได้รับแจ้งว่าดอกร่วง ซึ่งปัญหาเหล่านี้เป็นอุปสรรคต่อการขยายตัวและการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตกล้วยไม้เพื่อการส่งออก ทั้งนี้เนื่องจากดอกกล้วยไม้เมื่อถูกตัดแยกออกจากต้นฮอร์โมนพืชยังคงทำหน้าที่ได้ และกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ยังคงดำเนินต่อไปเพื่อความอยู่รอด ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้าน สรีระ กายภาพ และชีวเคมี เช่นเดียวกับในขณะที่อยู่บนต้น ดอกไม้ยังคงมีการหายใจ การคายน้ำ และเกิดการเปลี่ยนสีของกลีบดอก การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ล้วนมีผลกระทบต่อคุณภาพและอายุการใช้งานของดอกทั้งสิ้น (สายชล, 2531) โดยเฉพาะการสร้างเอทิลีน เมื่อดอกเริ่มบานและแก่ ก๊าซเอทิลีนจะเร่งทำให้ดอกกล้วยไม้เสื่อมสภาพและเหี่ยวเร็วขึ้น (Akamine, 1963)



ภาพที่ 1 มูลค่าและปริมาณการส่งออกดอกกล้วยไม้สดตั้งแต่ พ.ศ. 2542-2548

ที่มา : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร โดยความร่วมมือของ กรมศุลกากร
ปรับปรุงครั้งสุดท้ายเมื่อ27/01/2006

3. <u>การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้</u>

เนื่องจากในการถ่ายยีนสู่พืชจำเป็นต้องใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื้อเข้าร่วมด้วยตลอดกระบวนการ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เริ่มขึ้นเมื่อ Barnard ประสบความสำเร็จในการเพาะเมล็ดของกล้วยไม้ ซึ่งปกติเมล็ดกล้วยไม้ภายในมีเพียงคัพภะ (embryo) และแทบไม่มีอาหารสำรองไว้ใช้ในการงอกของเมล็ดเลย Bernard พบว่า ในธรรมชาติเมล็ดกล้วยไม้ได้รับอาหารจากเชื้อราพวก mychorrhiza ในสกุล *Rhizoctonia* ซึ่งอาศัยอยู่ตามรากกล้วยไม้ และได้ศึกษาต่อมาจนสามารถเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในหลอดทดลอง โดยใส่เชื้อราดังกล่าวลงไปในอาหารด้วย (Arditti, 1977)

Knudson (1922) สามารถเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในอาหารวุ้นที่มีสารอินทรีย์และอนินทรีย์บางชนิดเป็นองค์ประกอบ และมีน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ต้องใส่เชื้อรา แต่ต้นอ่อนที่ได้ไม่แข็งแรงเหมือนต้นอ่อนที่งอกในสภาพธรรมชาติ ต่อมาในปี ค.ศ. 1946 Knudson ค้นพบสูตรอาหารใหม่ที่เหมาะสมกับการเจริญของต้นอ่อน และตั้งชื่อสูตรอาหารนี้ว่า “Knudson’s C” ต่อมาในปี ค.ศ. 1949 Vacin and Went พบสูตรอาหารที่สามารถใช้เพาะเมล็ดกล้วยไม้และเลี้ยงต้นอ่อนได้เป็นผลดีเช่นกัน และในปีเดียวกันนั้น Rotor (1949) สามารถเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิสให้เกิดเป็นต้นได้ อย่างไรก็ตาม ถือว่า Morel (1960) ได้ชื่อว่าเป็นผู้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื้อกล้วยไม้เพื่อเพิ่มปริมาณให้ได้จำนวนมาก ๆ เป็นคนแรก ซึ่งเขามีจุดประสงค์เพื่อขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลซิมบิเดียม (*Cymbidium*) ให้ปราศจากเชื้อไวรัส โดยตัดชิ้นส่วนของยอดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาเลี้ยงในอาหารสูตร Knudson’s C จนเกิดเป็นก้อนเนื้อเยื่อสีเขียวเล็ก ๆ ขึ้น และให้ชื่อว่า “bulblet” ซึ่งต่อมาเปลี่ยนเป็น “protocorm like bodies” (PLBs) และนักวิทยาศาสตร์ในยุคต่อมาได้พัฒนาเทคนิคนี้ออกไปเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์กล้วยไม้หลายสกุล โดยสามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ได้จากส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญต่าง ๆ เช่น ตายอด ตาข้าง และปลายรากอ่อน (จิตราพรรณ, 2536) ในประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2517 จนถึงปัจจุบัน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในประเทศได้มีการพัฒนาจนถึงระดับการเพาะเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์เป็นการค้าอย่างกว้างขวาง สูตรอาหารที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ได้แก่สูตรดัดแปลงของ Vacin และ Went (VW) (1949) ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยสังเขป คือ ฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนกล้วยไม้แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง VW เขย่าเพื่อให้เซลล์ได้รับอากาศด้วยความเร็วประมาณ 120 รอบต่อนาทีจนสร้าง PLBs จึงย้ายลงอาหารแข็งเพื่อกระตุ้นให้ PLBs สร้างต้นที่สมบูรณ์ (ประศาสตร์, 2538) การพัฒนาไปเป็นต้นจากส่วน PLBs ของกล้วยไม้สามารถกระทำได้ง่าย จึงไม่เป็นอุปสรรคต่อการคัดเลือกส่วนของเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในการถ่ายยีน

4. <u>การถ่ายยีนในกล้วยไม้</u>

การถ่ายยีนในพืชเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์อย่างมากในการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดต่าง ๆ โดยเซลล์พืชที่ได้รับยีนเข้าไป และยอมรับยีนนั้นให้เข้าไปแทรกอยู่ในยีโนมซึ่งพืชอาจแสดงลักษณะของยีนนั้นออกมาได้ เรียกพืชนั้นว่า พืชดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic plant) ประโยชน์ของการถ่ายยีนที่สำคัญคือสามารถสร้างพืชพันธุ์ใหม่ได้โดยยังคงลักษณะเดิมที่ดีเอาไว้ การสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมมีวัตถุประสงค์หลายด้าน เช่น สร้างพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช ต้านทานโรคและแมลง ทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ผลิตสารเคมีในอุตสหกรรมอาหารและยา ยืดอายุการใช้งานและการเก็บรักษาผัก ผลไม้ และดอกไม้ ผลิตไม้ดอกไม้ประดับและพืชอาหารให้มีผลผลิตและคุณภาพตามต้องการ (ครรชิต, 2547) เทคนิคการถ่ายยีนที่ใช้สำหรับกล้วยไม้มีทั้งการถ่ายยีนโดยตรงและการถ่ายยีนโดยใช้พาหะ ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้มีกระบวนการและข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกันดังนี้

4.1 การถ่ายยีนโดยตรง (direct gene transfer)

การถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยตรง เป็นวิธีการที่ส่งผ่านสารพันธุกรรมหรือยีนเข้าสู่พืชโดยไม่ต้องอาศัยพาหะเป็นตัวนำเข้าสู่เซลล์หรือนิวเคลียสซึ่งมีหลายวิธีเช่น การถ่ายยีนโดยใช้สารเคมี การถ่ายยีนโดยใช้เข็มฉีดยา แต่วิธีการถ่ายยีนโดยตรงที่ใช้ในกล้วยไม้มี 2 วิธีคือการใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) และการถ่ายยิงด้วยเครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment)

4.1.1 การถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation)

การถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าเป็นวิธีที่ทำให้เกิดช่องขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์โดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยนำโปรโตพลาสต์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะของพืช มาบ่มรวมกับสารละลายดีเอ็นเอแล้วผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไป เพื่อทำให้เกิดช่องขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ และดีเอ็นเอมีโอกาสแทรกเข้าสู่เซลล์ทางช่องเปิดนั้น โดยกระแสไฟฟ้าที่ใช้มี 2 ระบบ คือ ระบบที่ใช้ความต่างศักย์ต่ำ ระยะเวลานาน (long pulse) และระบบที่ใช้ความต่างศักย์สูงแต่ใช้เวลาสั้น (short pulse) โดยขนาดของความต่างศักย์ไฟฟ้าและระยะเวลาขึ้นกับขนาดและชนิดของเนื้อเยื่อ ข้อดีของการถ่ายยีนโดยวิธีนี้ คือ สามารถใช้ได้กับเนื้อเยื่อหลายชนิด และสามารถใช้ถ่ายยีนในพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ยาก ส่วนข้อเสียคือ มักพบปัญหาในการเพาะเลี้ยงและพัฒนาของโปรโตพลาสต์ หรือเนื้อเยื่อ ให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ และยังเกิดอันตรายจากกระแสไฟฟ้าทำให้ความมีชีวิตของพืชลดลง (สนธิชัย, 2543)

สำหรับกล้วยไม้ Griesbach and Hammond (1993) ใช้การถ่ายยีนโดยกระแสไฟฟ้าในการถ่ายพลาสมิด pBI 121 เข้าสู่เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดของเอมบริโอ (apical meristem) ของกล้วยไม้สกุล *Calanthe* ซึ่งจากการตรวจสอบพบการมีอยู่และการแสดงออกของยีน *gus* ในใบของต้นกล้วยไม้อายุ 6 เดือน และต่อมา Griesbach (1994) ถ่ายยีนโดยกระแสไฟฟ้าเข้าสู่กล้วยไม้สกุลเดียวกันและใช้พลาสมิดเดิม แต่เปลี่ยนเนื้อเยื่อโดยได้ถ่ายยีนสู่เข้า PLBs แทน และพบว่าหลังจากคัดเลือกแล้ว 1 เดือน มี PLBs ที่ยังมีชีวิตถึง 45 เปอร์เซ็นต์ และยังพบการมีอยู่และการแสดงออกของยีน *gus* ในต้นถ่ายยีน

4.1.2 การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment หรือ microprojectile bombardment)

การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค เป็นวิธีการที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นเนื่องจากข้อจำกัดของวิธีอื่น ๆ เช่นการถ่ายยีนโดย *Agrobacterium* ทำได้ยากในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Cheng *et al*., 1997) เทคนิคการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคนี้เป็นวิธีการที่ใช้อนุภาคโลหะขนาดเล็กขนาด 0.6-4.0 ไมโครเมตร โดยทั่วไปนิยมใช้อนุภาคทังสเตนหรือทองคำ นำมาเคลือบด้วยชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือพลาสมิดที่ต้องการถ่ายเข้าสู่พืช แล้วยิงด้วยความเร็วสูง อนุภาคเหล่านั้นจะนำยีนเข้าสู่พืช และเกิดการเชื่อมต่อของยีนเป้าหมายกับดีเอ็นเอในยีโนมของพืช การสร้างเครื่องยิงอนุภาคเริ่มจากงานประดิษฐ์ของ Klein *et al*. (1987) ที่มหาวิทยาลัยคอร์แนล สหรัฐอเมริกา ซึ่งสามารถพัฒนาเครื่องยิงอนุภาคโดยใช้แรงดันจากการระเบิดของดินปืนให้สามารถถ่ายยีนเข้าสู่พืช และมีการแสดงออกของยีนอย่างถาวร (stable transformation) ต่อมาได้มีการพัฒนาเครื่องยิงอนุภาคขึ้นอีกหลายรูปแบบซึ่งส่วนใหญ่จะแตกต่างกันในการใช้แหล่งของแรงดันที่ใช้ขับเคลื่อนอนุภาค ได้แก่การใช้กระแสไฟฟ้าแรงสูง (McCabe *et al*., 1988) ก๊าซไนโตรเจน (Morikawa *et al*., 1989) แรงอัดอากาศ (Oard, 1990) และใช้ก๊าซฮีเลียม (Takenchi *et al*., 1992) เครื่องยิงอนุภาคที่ผลิตเป็นการค้าครั้งแรก คือเครื่องที่ใช้แรงดันจากกระสุนดินดำที่ชื่อ Biolistic PDS-1000 Dupont Company, Willington, DE แต่ต่อมาได้พัฒนาเครื่องรุ่นใหม่ที่ใช้แรงดันก๊าซฮีเลียม และทำให้สภาพภายในตู้ยิงเป็นสุญญากาศขณะยิง ในชื่อ PDS-1000/He Biolistic® particle delivery system, Biorad gun ซึ่งประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงกว่าเครื่องที่ใช้กระสุนดินดำประมาณ 5-10 เท่า (Kikkent, 1993) ข้อจำกัดที่สำคัญของการถ่ายยีนโดยเทคนิคนี้คือต้นพืชที่ได้ถ่ายยีนมักมีจำนวนซ้ำของชุดยีนที่ถ่ายเข้าไปหลายชุด (multiple copy number) ทำให้ยีนเป้าหมายมักไม่แสดงออก (Finnegan and MacElroy, 1994 ; Dai *et al*., 2001) และยังทำให้การถ่ายทอดของยีนเป้าหมายไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล (Spencer *et al*., 1992)

การถ่ายยีนในกล้วยไม้ในระยะแรก ๆ นั้น นิยมใช้การถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment) เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Li *et al*., 1993) ซึ่งมีการศึกษาในกล้วยไม้ทั้งสกุลแวนด้า (Chia *et al*., 1990) สกุลหวาย (Chai *et al*., 1994 ; Yang *et al*., 1999 ; Men *et al*., 2003a) สกุลดอร์ริทิส บราส์เซีย และแคทรียา (Knapp *et al*., 2000) ตัวอย่างงานวิจัยในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลต่าง ๆ โดยเครื่องยิงอนุภาคมีดังนี้

รายงานแรกของการถ่ายยีนในกล้วยไม้ได้แก่ Chia *et al*. (1990) ได้ทดลองถ่ายยีนรายงานผล (reporter gene) คือยีน *firely luciferase* (*luc*) เข้าสู่คัพภะ ของกล้วยไม้สกุลแวนด้า (*Vanda*) และสามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้จาก PLBs อายุ 6 สัปดาห์หลังถ่ายยีน และอีก 4 ปีต่อมา Chai *et al*. (1994) ได้รายงานผลการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวาย โดยยิงอนุภาคทังสเตนที่เคลือบด้วยพลาสมิด pUC19LUC และ pMON530LUC ซึ่งมียีนรายงานผล *luc* หลังจากคัดเลือกต้นถ่ายยีนโดยเลือกจากการต้นที่มีแสดงออกของยีน *luc* และตรวจสอบการมีอยู่ของยีนโดย Southern blot analysis แล้วได้ต้นกล้วยไม้ถ่ายยีนที่สมบูรณ์ 25 สายต้น

Yang *et al*. (1999) ทดลองถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้สกุลซิมบิเดียม (*cymbidium*) อายุ 6 เดือนโดยยิงอนุภาคทองที่เคลือบด้วยพลาสมิด pKH200 ซึ่งมียีนรายงานผล *β-glucuronidase* (*gus*) และยีนคัดเลือก neomycin phosphotransferase (*npt* II) หลังจากคัดเลือกบนอาหารสูตร Murashigi and Skoog (1962) (MS) ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin) ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 9 เดือน ได้ตรวจพบการมีอยู่ของยีน *npt* II เมื่อทดสอบโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ในกล้วยไม้ถ่ายยีนทุกต้น แต่พบการแสดงออกของยีน *gus* เมื่อตรวจสอบโดยวิธี histochemical assay 69.4 เปอร์เซ็นต์

Knapp *et al*. (2000) ทดลองถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้ 3 สกุล คือ ดอร์ริทานอฟซิส (*Doritaenopsis*) บราส์เซีย (*Brassia*) และแคทลียา (*Cattleya*) โดยยิงอนุภาคทองที่เคลือบด้วยพลาสมิด pDPG165 ซึ่งมียีนคัดเลือก (*bar*) หลังจากคัดเลือกบนอาหารแข็งสูตร Phytamax ที่เติม bialaphos ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 1 เดือน และคัดเลือกต่อในอาหารเหลวสูตรเดิม ที่เติม bialaphos ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร อีก 2 เดือน จึงชักนำให้กล้วยไม้เป็นต้นที่สมบูรณ์บนอาหารแข็งที่ไม่เติม bialaphos นาน 3-6 เดือน หลังการตรวจการมีอยู่ของยีน โดยวิธี Southern blot analysis และการแสดงออกของยีน *bar* โดยวิธี northern blot analysis และความต้านท้านต่อ bialaphos แล้วได้ต้นกล้วยไม้ถ่ายยีนสกุลดอร์ริทานอฟซิส 3 สายต้น สกุลบราส์เซีย 2 สายต้น และสกุลแคทลียา 2 สายต้น

4.2 การถ่ายยีนโดยใช้พาหะ (vector mediated gene transfer)

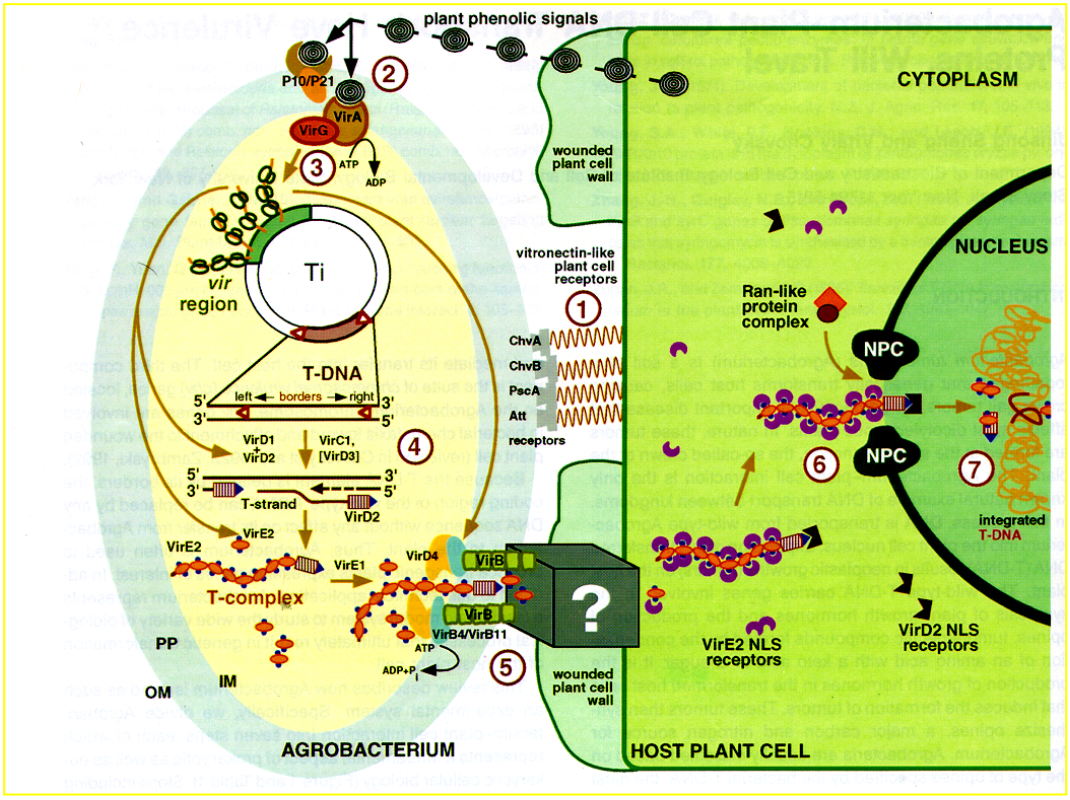
การถ่ายยีนโดยวิธีนี้เป็นการนำยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยพาหะ พาหะที่ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางคือ เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในดินแกรมลบรูปแท่ง เป็นสาเหตุของโรคปุ่มปม (crown gall disease) ในพืชใบเลี้ยงคู่เกือบทุกชนิด แต่สายพันธุ์ดั้งเดิมไม่สามารถก่อโรคกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้ *A. tumefaciens* สามารถถ่ายส่วนของ T-DNA (transferred-DNA) ซึ่งอยู่บน Ti-plasmid (tumor-inducing plasmid) เข้าสู่เซลล์พืช โดยจะเข้าแทรกในยีโนมของพืชและสามารถแสดงออกได้ในพืช (Horsch *et al.*,1985) การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียชนิดนี้เพื่อการถ่ายฝากยีนสามารถทำได้โดยตัดยีนที่ชักนำให้เกิดปุ่มปมในพืชออกแล้วแทนที่ด้วยยีนที่ต้องการในส่วนของ T-DNA

4.2.1 กลไกการถ่าย T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชโดย *A. tumefaciens*

การถ่ายยีนเป้าหมายโดย *A. tumefaciens* เข้าสู่ยีโนมของพืชต้องการส่วนประ กอบทางพันธุกรรมของ *A. tumefaciens* 3 ส่วนคือ T-DNA, virulence region (*vir*) และ chromosomal virulence genes (*chv*) ส่วนแรกคือ T-DNA เป็นส่วนของ DNA บน Ti-plasmid ของ *A. tumefaciens* ซึ่งเป็นส่วนแท้จริงที่เข้าแทรกในยีโนมของพืช ส่วนประกอบที่สำคัญคือ T-DNA border ซึ่งมีความยาวข้างละประมาณ 25 bp (Sheng and Citovsky, 1996) ส่วนที่สองคือ *vir* region อยู่บน Ti-plasmid มีความยาวประมาณ 35 กิโลเบสซึ่งจำเป็นต่อการเกิด crown gall tumor โดย *vir* genes จะไม่ได้ถูกถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชด้วย พบ *vir* genes ทั้งหมด 8 transcription unit หรือเรียกว่า operon ประกอบด้วย *vir*A *vir*G *vir*B *vir*C *vir*D *vir*E *vir*H และ *vir*F (Van Haaren *et al*., 1987) และส่วนสุดท้าย *chv* genes เป็นยีนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์หรือการขนส่งสารพวกคาร์โบไฮเดรทที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำได้แก่ β-1,2-glucan *chv* ประกอบด้วย chromosomal loci 5 ตำแหน่งได้แก่ *chv*A *chv*B *exo*C (*psc*A) *cel* และ *att* (Nester and Gordon ,1984)

กลไกการถ่าย T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชโดย *A. tumefaciens* เริ่มขึ้นเมื่อพืชเกิดบาดแผลแล้วสังเคราะห์สารประกอบ phenolic (phenolic compound) หลายชนิด เช่น lignin และ flavonoid precursor โดยสารประกอบ phenolic สำคัญซึ่งเป็น signal molecule ชนิดหนึ่งที่พบคือ acetosyringone (3,5 – dimethoxy-4-hydroxy acetophenone) acetosyringone นี้เองมีผลกระตุ้นให้ *A. tumefaciens* เข้ามาจับที่ผิวเซลล์พืชในบริเวณ vitronectin-like plant cell receptors (PVN) (Wagner and Matthysse , 1992) แล้ว *A. tumefaciens* จะสังเคราะห์ cellulose filament มายึดเกาะกับ

ผิวเซลล์ให้แนบชิดที่สุด โดยกลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง filamemt จะอยู่บนโครโมโซม คือ *chvA chvB pscA* และ *att* (Matthysse,1986) นอกจาก acetosyringone จะกระตุ้นให้ *A. tumefaciens* เข้ายึดเกาะกับผิวเซลล์พืชแล้วยังทำหน้าที่กระตุ้นให้ *vir* genes ทำงานด้วย (Stachel *et al*., 1985) โดย acetosyringone จะทำหน้าที่กระตุ้นให้โปรตีน Vir A ซึ่งเป็น transmembrane protein เกิด autophosphorylation ซึ่งจะส่งผลให้โปรตีน Vir G ที่ไม่ active ซึ่งเกาะอยู่กับโปรตีน Vir A เปลี่ยนเป็น Vir G ที่ active จากนั้น active Vir G นี้เองจะทำหน้าที่เป็น inducer ในการเปิดการ transcription ของ *vir* genes อื่น ๆ บน Ti-plasmid (Jin *et al*., 1990) ขั้นตอนต่อไปคือการสร้าง T-DNA complex เพื่อถ่ายเข้าสู่เซลล์พืช โดยโปรตีน VirD1 และ VirD2 ซึ่งมีคุณสมบัติเหมือนเอนไซม์ endonuclase ทำหน้าที่ตัด T-DNA ในบริเวณ left และ right border โดยตัดเพียงสายเดียวเฉพาะ bottom strand เท่านั้น (Wang *et al*., 1987) หลังจากตัดแล้ว สาย T-DNA จะถูก mobilize เข้ากับโปรตีน VirD 2 หนึ่งโมเลกุล ที่ปลาย 5’ ทางด้าน right border จากนั้นโปรตีน VirE2 จะเข้ามาจับสายของ T-strand ตลอดความยาวเพื่อให้สายของ T-strand ไม่พับซ้อนกัน เรียกโครงสร้างประกอบด้วย T-DNA โปรตีน VirD 2 และโปรตีน VirE2 นี้ว่า T-complex ซึ่งมีความยาวประมาณ 3,600 นาโนเมตร กว้างประมาณ 2 นาโนเมตร และมีน้ำหนักประมาณ 50,000 กิโลดาลตัน (Citovsky *et al*., 1989) หลังจากสร้าง T-complex แล้ว T-complex จะเคลื่อนออกจากเซลล์แบคทีเรียเข้าสู่เซลล์พืชโดยผ่านช่องเปิดที่สร้างขึ้นระหว่างของผนังเซลล์ของแบคทีเรียและเซลล์เมมเบรนของพืชโดยการทำงานร่วมกันของโปรตีน Vir B 11 ชนิด (Christie, 1997) เมื่อ T-DNA complex เข้าสู่ cytoplasm ของพืชแล้วจะมี plant signal molecule ที่เรียกว่า nuclear localization signal (NLS) จากพืชเข้ามาช่วยในการพา T-complex เข้าสู่นิวเคลียส ซึ่ง plant signal molecule นี้มี 2 ชนิดคือ VirD2 NLS และ VirE2 NLS โดยแต่ละชนิดจะจับกับ VirD2 และ VirE2 ตามลำดับ แล้วนำพา T-DNA complex เข้าสู่นิวเคลียส (Sheng and Citovsky , 1996) ในขั้นตอนสุดท้ายคือการแทรกตัวของ T-DNA เข้ารวมกับยีโนมของพืชนั้นมีหลายรายงานเสนอว่าเกิดจากกระบวนการ illegitimate recombination (Gheysen *et al*., 1989, Lehman *et al*., 1994 ; Puchta, 1998) เริ่มจากปลาย 3’ ของ T-DNA strand เข้าจับกับยีโนมพืชโดยใช้ลำดับเบสคู่สมเพียง 2-3 เบสซึ่งเรียกว่า micro-homologies แล้วโปรตีน VirD2 ซึ่งอยู่ที่ปลายด้าน 5’ ของ T-DNA strand และมีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์ endonuclease จะตัดดีเอ็นเอที่สาย 3’-5’ ของพืชให้เกิดช่องว่างแล้วรวมปลาย 5’ เข้ากับปลายด้าน 3’ ของพืช จากนั้นปลาย 3’ ของ T-DNA strand จึงเข้ารวมที่ด้าน 5’ ของพืช ขั้นตอนสุดท้ายคือการเชื่อมช่องว่างด้วยกระบวนการซ่อมแซมโดยกลไกของพืช (Tinland *et al*., 1995) กระบวนการส่งถ่ายยีนจาก *A. tumefaciens* เข้าสู่พืชนี้แสดงในภาพที่ 2



ภาพที่2 ขั้นตอนโดยสรุปของการถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* เข้าสู่พืช (Sheng and Citovsky ,1996)

1) แสดงการจับของ *Agrobacterium* กับ surface reception ของเซลล์พืช
2) การจดจำ plant signal molecules โดย Vira/VirG sensor – transducer ของแบคทีเรีย
3) การกระตุ้น *vir* genes ของแบคทีเรีย
4) การสร้าง transferable T- strand
5) การสร้าง T-complex และการขนส่งเข้าสู่เซลล์พืช
6) การขนส่งเข้าสู่นิวเคลียสของ T-complex
7) การแทรกของ T-DNA เข้าสู่จีโนมพืช

IM,bacterial inner membrane ; NPC, nuclear pore complex ;

OM, bacterial outer membrane ;PP, bacterial periplasm

4.2.2 การถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* เข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยว

ในปัจจุบันนิยมใช้การถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดย *A. tumefaciens* อย่างกว้างขวางทั้งในพืชใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยว เนื่องจากให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูง ต้นถ่ายยีนที่ได้มีจำนวน copy ของยีนน้อย สามารถใช้ถ่ายชิ้นส่วนของยีนที่มีขนาดใหญ่ได้ และมีค่าใช้จ่ายน้อย (Hiei *et al*., 1994 ; Cheng *et al*., 1997) ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะแม้ว่าไม่ใช่พืชอาศัยของ *A. tumefaciens* แต่ได้มีการศึกษาและปรับปรุงจนสามารถใช้เทคนิคนี้ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยปัจจัยที่ทำให้การถ่ายยีนวิธีนี้ประสบความสำเร็จได้แก่

ก. กระตุ้นให้ *vir* gene ทำงานโดยสารประกอบ phenolic

การเกิดบาดแผลจะกระตุ้นให้พืชใบเลี้ยงคู่ผลิตสารประกอบ phenolic ที่จำเป็นสำหรับการถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* ได้แก่ acetosyringone หรือ α-hydroxy-acetosyringone แต่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวเกือบทุกชนิดไม่สามารถสร้างสารเหล่านี้ได้ (Smith and Hood, 1995) แต่ถ้าใช้ acetosyringone เติมในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ *A. tumefaciens* และระหว่างการ co-cultivation จะสามารถกระตุ้นให้ *vir* genes ในเซลล์ *A. tumefaciens* ทำงานได้และทำให้การถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวประสบความสำเร็จ เช่น Hiei *et al.* (1994) ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนในข้าวเมื่อเติม acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ในอาหารสำหรับ co-cultivation และ Men *et al.* (2003b) สามารถถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ *Den*. 'nobile' ได้โดยเติม acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ในอาหารสำหรับเลี้ยง *A. tumefaciens* และอาหาร co-cultivation นอกจากการใช้ acetosyringone แล้วยังมีปัจจัยอื่นที่สามารถช่วยกระตุ้นให้ *vir* genes ทำงานได้เช่น ใช้อาหารสำหรับ co-cultivation ที่เป็นกรดอ่อน (pH 5-6) (Turk *et al.,* 1991) ที่มีค่าแรงดันออสโมติกสูง (Usami *et al.,* 1988) และใช้อุณหภูมิระหว่าง co-cultivation ไม่เกิน 28 องศาเซลเซียส (Alt-Morbe *et al.,* 1988)

ข. เลือกใช้สายพันธุ์ *A. tumefaciens* ที่เหมาะสม

A. tumefaciens มีหลากหลายสายพันธุ์ที่แยกได้จากธรรมชาติและพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการถ่ายยีน แต่มีบางสายพันธุ์เท่านั้นที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น *A. tumefaciens* สายพันธ์ LBA 4404 ซึ่งบรรจุ Ti-plasmid คือ pAL4404 เป็นสายพันธุ์รุนแรงปานกลาง (virulence strain) โดยพัฒนามาจากสายพันธุ์ดังเดิม (wild type) คือ *A. tumefaciens*

สายพันธ์ Ach5 (Hoekema *et al.,* 1983) และ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ A281 และกลุ่มที่พัฒนาจากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เช่น *A. tumefaciens* สายพันธ์ EHA 101, EHA 105, AGL 0 และ AGL 1 ซึ่งทั้งหมดบรรจุ Ti-plasmid คือ pTiBo542 หรือพลาสมิดดัดแปลงของพลาสมิดนี้ แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นสายพันธุ์รุนแรงมาก (hyper-virulence strains) (Lazo *et al.,* 1991 ; Hood *et al.,*1993) การถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* ประสบความสำเร็จทั้งในข้าว (Hiei *et al.,*1994 ; Aldemita and Hodges, 1996) ข้าวสาลี (Cheng *et al.,* 1997) ข้าวโพด (Finer and Finer, 2000) และกล้วยไม้ (Belarmino and Mii, 2000 ; Yu *et al.*,2001; Liau *et al*., 2003 a,b) ในพืชแต่ละชนิดหรือแม้แต่ชนิดเดียวกันแต่ต่างพันธุ์กันยังมีความจำเพาะต่อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน และ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ที่รุนแรงมากอาจไม่สามารถใช้ในการถ่ายยีนได้ในพืชทุกชนิด เช่น Hiei *et al.* (1994) ได้ทดลองถ่ายยีนในข้าวญี่ปุ่น 3 พันธุ์ โดยเปรียบเทียบผลการทดลองพบว่า *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงกว่าสายพันธุ์ EHA 101 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Belarmino and Mii (2000) ที่ได้ทำการถ่ายยีนในกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอฟซิส ในขณะที่การถ่ายยีนในข้าวสาลี และข้าวบาเลย์ พบว่า *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 101 ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงกว่าสายพันธุ์ LBA 4404 (Guo *et al*., 1998) ซึ่งสอดคล้องกับกล้วยไม้สกุลออนซิเดียมที่ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงกว่าสายพันธุ์ LBA 4404 (Liau *et al*., 2003 a) ดังนั้นเพื่อให้การถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* ประสบความสำเร็จควรทดสอบสายพันธุ์ของ *A. tumefaciens* ที่เหมาะสมต่อพืชชนิดนั้น ๆ ด้วย

ค. ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสม

ปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งของการถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* คือวิธีการเตรียมเนื้อเยื่อเป้าหมายให้เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีน ทั้งการทำบาดแผล การกระตุ้นให้สามารถแบ่งเซลล์ได้อย่างรวดเร็วและมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้สูง การเตรียมเนื้อเยื่อเป้าหมายในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมีความแตกต่างจะพืชใบเลี้ยงคู่ เนื่องจากเมื่อพืชใบเลี้ยงคู่เกิดบาดแผลจะกระตุ้นให้มีการแบ่งเซลล์ใหม่เพื่อซ่อมแซมบริเวณนั้น ซึ่งเหตุนี้ทำให้ยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปมีโอกาสแทรกรวมกับยีโนมพืชได้มากขึ้น แต่ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะไม่แบ่งเซลล์ใหม่ แต่ทำให้บริเวณนั้นแข็งตัว (lignified) เพื่อลดการสูญเสียน้ำ นี้จึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้พืชใบเลี้ยงเดี่ยวไม่ใช่พืชอาศัยของ *A. tumefaciens* (Potrykus, 1990) ดังนั้นถ้าเลือกใช้การถ่ายยีน *A. tumefaciens* เข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวต้องศึกษาระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชนั้น ๆ ก่อน โดยควรเลือกชนิดของเนื้อเยื่อที่อยู่ในระยะแบ่งเซลล์ เช่น แคลลัสที่พัฒนาจากเอมบริโอ (Hiei *et al*., 1994) scutellum และ mesocotyl (Graves and Goldman, 1986) และ PLBs (Chai *et al*., 2002 ; Men *et al*., 2003 b ; Liau *et al*., 2003 a,b)

นอกจากชนิดของเนื้อเยื่อแล้วควรศึกษาถึงชนิดและสูตรของอาหารเพาะเลี้ยงที่กระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชแบ่งเซลล์ในขณะที่เลี้ยงรวมกับเชื้อ *A. tumefaciens* และสูตรของอาหารที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ (Hiei *et al*., 1994)

4.2.3 การถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* เข้าสู่กล้วยไม้

การถ่ายยีนในกล้วยไม้ในระยะแรก ๆ นั้น นิยมใช้การถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาค แต่ภายหลังมักนิยมใช้การถ่ายยีนโดย *Agrobacterium* เนื่องจากวิธีนี้ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนที่สูงกว่า รายงานแรก ๆ ที่สามารถใช้ *A. tumefaciens* ในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้และบังคับให้เป็นต้นได้สำเร็จคือ Belarmino and Mii (2000) ได้ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ฟาแลนนอพซิส ลูกผสมระหว่าง *Doritaenopsis* Coral Fantasy x *Phalanenopsis* (Baby Hat x Ann Jessica) โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่มีพลาสมิด pTok233 และ สายพันธุ์ EHA101 ที่มีพลาสมิด pIG121Hm โดยทั้งสองพลาสมิดมี *gus* เป็นยีนรายงานผล และ *hygromycin phosphotransferase* (*hpt* หรือ *hph*) เป็นยีนคัดเลือก และยังได้มีการตรวจสอบต้นที่ได้รับการถ่ายยีนโดยวิธี GUS histochemical assay วิธีการ PCR analysis และวิธีการ Southern blot hybridization เพื่อตรวจสอบการมีอยู่และการแสดงออกของยีนอีกด้วย

Chai *et al*. (2002) ได้ทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนใน PLBs กล้วยไม้ฟาแลนนอพซิศ 4 สายพันธุ์โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ถ่ายพลาสมิด pTOK233 ซึ่งมี *gus* เป็นยีนรายงานผล และ *hpt* เป็นยีนคัดเลือก จากผลการทดลองสรุปปัจจัยที่เหมาะสมในการถ่ายยีนคือ ใช้ PLBs ที่ถูกผ่าครึ่งตามขวางที่ทำบาดแผลโดยใช้เข็มฉีดยาแทงบริเวณต่าง ๆ 10 แห่งเลี้ยงร่วมกับเซลล์แขวนลอยของ *A. tumefaciens* ที่มีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.3 แล้วเพาะเลี้ยงพร้อมกำจัด *A. tumefaciens* ส่วนเกินบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติม มันฝรั่งบด 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 6 สัปดาห์ แล้วจึงคัดเลือกบนอาหารสูตรเดิมแต่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 2 เดือน หลังจากคัดเลือกแล้วพบ PLBs ที่สามารถชักนำให้เกิดรากและพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ได้บนอาหารคัดเลือก และยังได้มีการตรวจสอบต้นที่ได้รับการถ่ายยีนโดยวิธี PCR analysis วิธี Southern blot hybridization เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical assay

Yu *et al*. (2001) ได้ศึกษาการถ่ายยีนในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ Madame Thong-In โดยใช้ thin-section PLBs ขนาด 1 มิลลิเมตร เลี้ยงร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่มียีนเป้าหมายคือ antisense ของยีน *DOH1* และยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin คือ *neomycin phosphotransferase* (*npt*II) หลังจากคัดเลือกบนอาหารแข็งสูตร Knuson C ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรนาน 15 สัปดาห์ ได้รับต้นกล้วยไม้ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ 190 ต้น แต่มีต้นกล้วยไม้ 154 ต้นที่แสดงลักษณะทาง phenotype ที่ผิดปกติคือสามารถสร้างยอดมากกว่า 1 ยอดบน PLBs เดียวกัน และสร้างดอกได้เร็วขึ้น ซึ่งเกิดจากการทำงานจาก antisense ของยีน *DOH1*

Men *et al*. (2003b) ได้ทดสอบปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายยีนในกล้วยไม้ *Den.* 'nobile' โดย *A tumefaciens* 2 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ EHA 105 และสายพันธุ์ AGL 1 โดยใช้ binary vector เดียวกันคือ pCAMBIA 1301 ซึ่งมี *gus* เป็นยีนรายงานผล และ *hpt* เป็นยีนคัดเลือก จากผลการทดลองสรุปปัจจัยที่เหมาะสำหรับการถ่ายยีนคือ การเลี้ยง PLBs ที่ตัดให้มีขนาดประมาณ 4-6 มิลลิเมตรร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL 1นาน 30 นาที (infection) แล้วจึง co-cultivate บนอาหารแข็งสูตร ½ MS ที่เติม 6-benzylaminopurine (BA) และ acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครไมลาร์ นาน 2-3 วัน แล้วจึงคัดเลือกบนอาหารสูตรเดิมและเติมสารปฏิชีวนะ hygromycin ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตรและ cefotaxime ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตรนาน 3 เดือน วิธีการนี้ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุดที่ 18 เปอร์เซ็นต์

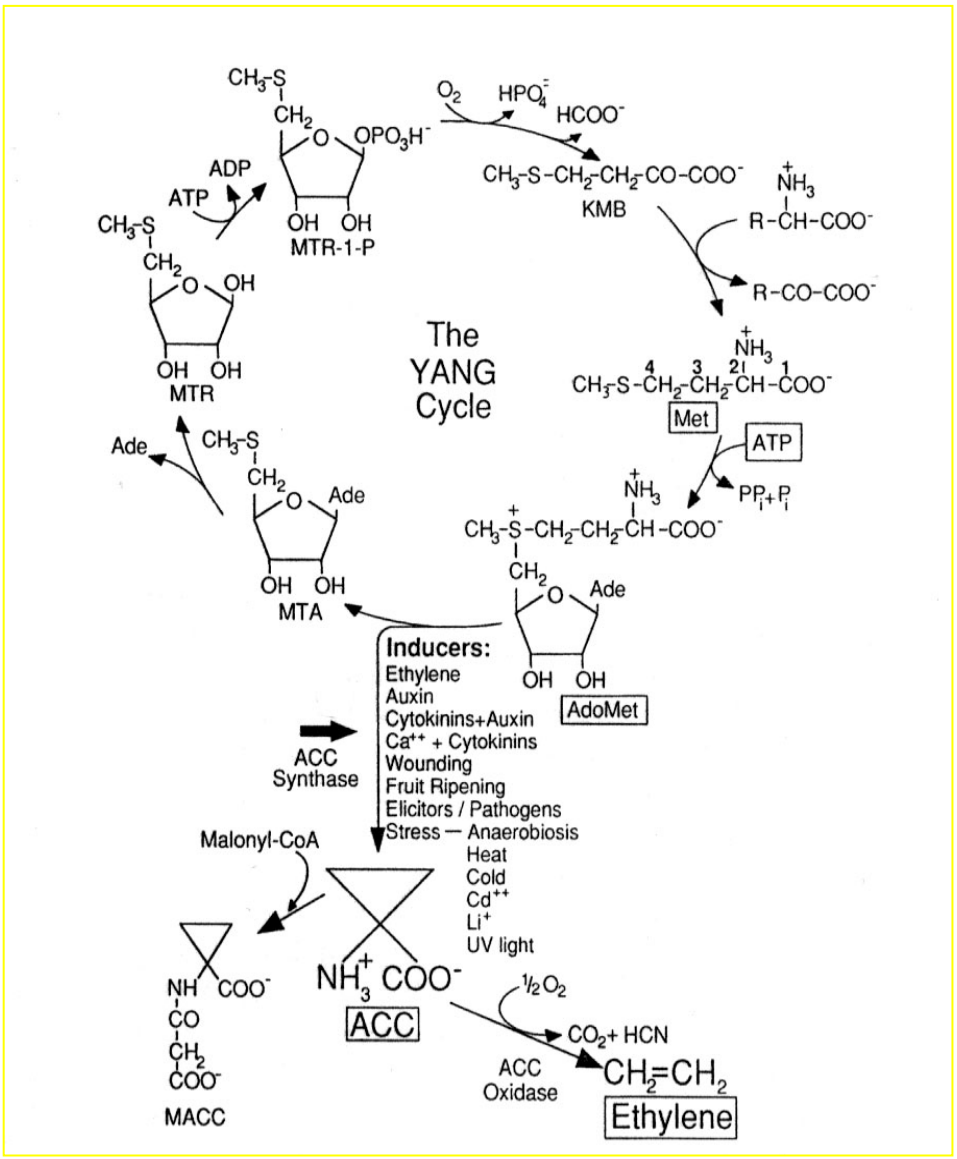
Liau *et al*. (2003a) สามารถถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลออนซิเดียมโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA 1301 เป็นเวกเตอร์พาหะ หลังจากการคัดเลือกในอาหาร PR medium ที่เติม hygromycin 5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 3 เดือน พบว่าได้ต้นกล้วยไม้ถ่ายยีนทั้งหมด 6 สายต้น และในปีเดียวกัน Liau *et al*. (2003b) ได้ถ่ายยีน *sweet pepper ferredoxin-like protein* (*pflp*) ซึ่งเป็นยีนเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในพริกหวาน หลังจากถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs และคัดเลือกนาน 3 เดือนได้รับต้นกล้วยไม้ที่ต้านทานสารปฏิชีวนะ 17 สายต้น แต่มี 6 สายต้นเท่านั้นที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน *gus* และต้านทานต่อเชื้อ *Erwinia carotovora*

5. การสังเคราะห์เอทิลีนในดอกไม้

ทุกระยะการเจริญเติบโตของดอกไม้ตั้งแต่เริ่มสร้างตาดอกจนกระทั่งดอกไม้หมดอายุการใช้งาน เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนพืช (plant hormone) ทั้ง 5 ชนิด คือ ออกซิน (auxin) ไซโตไคนิน (cytokinin) จิบเบลเรลลิน (giberellin) เอทิลีน (ethylene) และกรดแอบซิสิก (abscisic acid) แต่เป็นที่ยอมรับแล้วว่าเอทิลีนเป็นฮอร์โมนพืชที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับอายุการใช้งานของดอกไม้หลังการตัดดอกมากที่สุด เอทิลีนมีสถานะเป็นก๊าซและสามารถเกิดขึ้นได้จากแหล่งอื่น ๆ นอกเหนือไปจากดอกไม้ ไม่ว่าเอทิลีนจะเกิดจากแหล่งใดก็ตาม สามารถทำความเสียหายให้กับดอกไม้และทำให้ดอกไม้มีอายุการใช้งานสั้น (สายชล, 2531)

5.1 ขั้นตอนการสังเคราะห์เอทิลีน

กระบวนการสังเคราะห์เอทิลีนถูกค้นพบโดย Yang *et al*. (1984) โดยพบว่ามี กรดอะมิโน methionine เป็นสารตั้งต้นซึ่งพืชสามารถสังเคราะห์ได้เอง methionine จะถูกเปลี่ยนไปเป็น S-adenosyl-L-methionine (AdoMet) โดยเอนไซม์ methionine adenosyl transferase ทำงานร่วมกับ adenosine triphosphate (ATP) แล้วเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (ACS) จะทำการเปลี่ยน AdoMet ให้เป็น 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) และ 5-methylthioadenosine สามารถนำกลับไปใช้ในการสังเคราะห์ กรดอะมิโน methionine ได้ใหม่แล้ว เอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO) ทำหน้าที่เปลี่ยน ACC ให้เป็น เอทิลีน ในสภาพที่มีก๊าซออกซิเจน การสังเคราะห์เอทิลีนในขั้นตอนสุดท้ายมีการสร้างสารอื่น ๆ ด้วย คือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และกรดไฮโดรเจนไซยาไนด์ ซึ่งจะถูกลดความเป็นพิษด้วยกระบวนการภายในเซลล์พืชโดยเปลี่ยนไปเป็นสาร β-cyanoalanine นอกจากนี้ ACC ยังสามารถถูกเปลี่ยนไปเป็น 1-(malonyl) aminocyclopropane-carboxylic acid (MACC) (ภาพที่ 3) (Zarembinski and Theologis, 1994)



ภาพที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์เอทิลีนในพืชชั้นสูง (Zarembinski และ Theologis, 1994)

5.2 ความเสียหายของไม้ดอกเนื่องจากเอทิลีน

เอทิลีนเป็นฮอร์โมนที่มีบทบาทมากที่สุดเกี่ยวกับคุณภาพของดอกไม้ ไม่ว่าเอทิลีนจะเกิดจากดอกไม้เองหรือจากแหล่งอื่น ๆ สามารถทำความเสียหายให้กับดอกไม้ได้เหมือนกัน เอทิลีนในบรรยากาศเพียง 0.002-0.5 ไมโครลิตรต่อลิตร สามารถทำความเสียหายให้กับดอกไม้ได้ ดอกไม้ที่ได้รับเอทิลีนจะมีอายุการใช้งานสั้น เพราะเอทิลีนทำให้กลีบดอกไม้เหี่ยวและดอกร่วงเร็ว ตัวอย่างของความเสียหายของดอกไม้ที่เกิดขึ้นเนื่องจากเอทิลีน เช่น กลีบดอกม้วนเข้าหรือไม่บาน (sleepiness) ซึ่งบางครั้งเรียกว่าดอกฟุบหรือช็อค เกิดใน คาร์เนชัน และกุหลาบหิน (kalanchoe) กลีบดอกมีสีซีดและกลีบดอกม้วนงอเข้า เช่น ผักบุ้งฝรั่ง (morning glory) กลีบดอกมีสีซีดและปลายของกลีบดอกเหี่ยว เช่นกล้วยไม้ในสกุล แคทลียา แวนดา หวาย และฟาแลนนอพซิส ดอกเหี่ยวและกลีบดอกร่วง เช่น กุหลาบ ก้านดอกของของกล้วยไม้โค้งงอ (epinasty) และ กลีบดอกของกุหลาบเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีน้ำเงินม่วง (blueing) (Hew and Yong, 2004)

5.3 ระบบการสังเคราะห์เอทิลีนในดอกไม้

ดอกไม้หลายชนิด เช่น กุหลาบ คาร์เนชัน และกล้วยไม้ มีความสามารถในการสร้างเอทิลีนได้เหมือนผลไม้ประเภท climacteric คือระบบการสร้างเอทิลีนเป็น autocatalytic system เอทิลีนที่ดอกไม้ได้รับจากภายนอกสามารถชักนำให้ดอกไม้สร้างเอทิลีนขึ้นมาเองได้ ก๊าซอะเซทาลีน (acetylene) และโพรพิลิน (propylene) ซึ่งทำหน้าที่คล้ายเอทิลีน (ethylene analog) สามารถชักนำให้ดอกไม้สร้างเอทิลีนได้เช่นเดียวกันกับในผลไม้ประเภท climacteric เมื่อดอกไม้ได้รับอันตรายต่าง ๆ เช่น บาดแผล ชอกช้ำ และสารเคมีเป็นพิษ สามารถกระตุ้นให้ดอกสร้างเอทิลีนได้ เอทิลีนที่ดอกไม้สร้างขึ้นเนื่องจากสาเหตุดังกล่าวเรียกว่า wounded ethylene เอทิลีนที่ดอกไม้เริ่มสร้างเพียงเล็กน้อย หรือเอทิลีนจากแหล่งอื่น ๆ ก็ตามสามารถชักนำให้ดอกไม้สร้างเอทิลีนมากขึ้นได้ โดยทั่วไปการสร้างเอทิลีนประกอบด้วย 3 ระยะ คือ ระยะแรก ดอกไม้มีอัตราการสร้างเอทิลีนค่อนข้างต่ำ ระยะกลาง ดอกไม้มีอัตราการสร้างเอทิลีนสูงสุด และระยะสุดท้าย ดอกไม้มีอัตราการสร้างเอทิลีนลดลง การสร้างเอทิลีนของดอกไม้จะเห็นชัดในระยะกลาง ซึ่งเกิดขึ้นพร้อมกับการเปลี่ยนแปลงในส่วนอื่น ๆ ของดอกไม้ซึ่งนำไปสู่การเกิดชราภาพของดอกไม้ เช่นการเหี่ยวของดอก ดอกไม้บางชนิด เช่นกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์แจกเกอลีนฮาไวอิ อาจจะมีอัตราการสร้างเอทิลีนสูงมากในระยะที่ดอกตูม และลดลงเมื่อดอกเริ่มบาน อัตราการสังเคราะห์เอทิลีนจะสูงขึ้นอีกเมื่อดอกที่บานแล้วเข้าสู่ระยะชราภาพ ดังนั้นวิธีใดที่ชักนำให้ดอกไม้มีอัตราการสร้างเอทิลีนสูงขึ้นในระยะกลาง ก็จะทำให้ดอกไม้มีอายุการใช้งานสั้นลงเร็วตามไปด้วย การกระตุ้นให้ดอกไม้สร้างเอทิลีน

เพิ่มขึ้นยังมีวิธีการอื่น ๆ อีก เช่น อุณหภูมิสูง การผสมเกสร และสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน เช่น NAA และ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) การกระตุ้นให้ดอกไม้สร้างเอทิลีนเพิ่มขึ้นโดยวิธีการต่าง ๆ จะเกิดขึ้นโดยผ่านกระบวนการที่ดอกไม้มีการสร้าง ACC synthase มากขึ้น ACC synthase จะเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยน AdoMet เป็น ACC และในที่สุด ACC จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทิลีน (สายชล, 2531)

5.4 การยับยั้งการสังเคราะห์เอทิลีน

ดอกไม้จะมีการสร้างเอทิลีนอย่างเด่นชัดในช่วงเวลาก่อนหมดอายุการใช้งาน ถ้าการสร้างเอทิลีนของดอกไม้นั้นถูกยับยั้ง อายุการใช้งานของดอกไม้จะนานขึ้น การยับยั้งการสร้างเอทิลีนในดอกไม้สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้อุณหภูมิต่ำ ความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำ คือ น้อยกว่า 21 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่สูง คือมากกว่า 0.03 เปอร์เซ็นต์ (สายชล, 2531) การใช้สาร rhizobitoxine aminoethoxyvinyl glycine (AVG) aminooxyacetic acid (AOA) methoxyvinyl glycine (MVG) ที่มีผลยับยั้งการเปลี่ยน AdoMet ไปเป็น ACC ซึ่งเป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACC synthase (Yang and Hoffman, 1984) ส่วนการให้ benzyladenine (BA) จากภายนอก หรือไอออนของสาร เช่นโคบอลท์ไอออน (Co^{2+}) และนิเกิลไอออน (Ni^{2+}) มีผลทำให้การเปลี่ยน ACC ไปเป็นเอทิลีนลดลง จึงน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACC oxidase (จริงแท้, 2549) แต่วิธีการที่น่าจะมีประสิทธิภาพที่จะยับยั้งการสังเคราะห์เอทิลีนได้โดยตรงได้แก่ การถ่ายยีน antisense *ACO* เข้าสู่พืช ซึ่งวิธีการนี้สามารถยับยั้งการสังเคราะห์เอทิลีนในระดับการแสดงออกของยีน

6. <u>การควบคุมการสังเคราะห์เอทิลีนในระดับยีนโดยใช้ antisense</u>

โมเลกุลสายคู่ของ DNA ในบริเวณที่เป็นยีน จะมีเพียงสายเดียวเท่านั้นที่สามารถถอดรหัสได้เป็น RNA และแปรรหัสเป็นโปรตีนเพื่อนำไปใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ ซึ่งสายเดียวของ DNA มีทิศทางจาก 5’-3’ ซึ่งสามารถถอดรหัสได้เป็น mRNA ส่วนอีกสายหนึ่งซึ่งมีลำดับเบสคู่สมที่มีทิศทางจาก 3’-5’ ถ้าถูกถอดรหัสสายอาร์เอ็นเอที่ได้เรียกว่า antisense RNA ถ้าในเซลล์มี RNA ที่มีลำดับเบสคู่สมกับ mRNA แล้วเกิดการเข้าคู่กัน จะทำให้ mRNA นั้นไม่สามารถแปรรหัสเป็นโปรตีนได้ (Brakel, 1989)

กลไกที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ต้องการได้ โดยใช้หลักการของ antisense technology คือการนำส่วนของ cDNA ที่สร้างจาก sense strand ของยีนที่ต้องการไปต่อกับเวคเตอร์แบบกลับทิศทาง (reverse orientation) ของสาย coding region แล้วถ่ายเข้าสู่สิ่งมีชีวิตที่ต้องการ เพื่อให้สร้าง antisense RNA ที่เข้าคู่กับ mRNA เกิดเป็น RNA สายคู่ (RNA duplex) ซึ่งทำให้ mRNA นั้นไม่สามารถแปรรหัสเป็นโปรตีนได้ (ภาพที่ 4 ก) และเมื่อมี RNA duplex ของยีนเป้าหมายอยู่ในเซลล์ จะชักนำให้กลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีนซึ่งเกิดขึ้นเองในธรรมชาติทำงาน เรียกกลไกนี้ว่า RNAi (RNA interference) หรือ PTGS (post-transcriptional gene silencing) ขั้นตอนของกลไกนี้เริ่มจาก RNA duplex ที่เกิดขึ้นจะถูกจับและตัดโดยเอนไซม์ Dicer ให้เป็นอาร์เอ็นเอนสายคู่เส้นสั้น ขนาดประมาณ 21-25 basepair ที่เรียกว่า siRNA (small interferening RNA) จากนั้นโมเลกุลนี้จะถูกจับด้วย RISC (RNA-induced silencing complex) และทำให้เกิดโครงสร้างใหม่ที่ประกอบด้วย RISC และ siRNA สายเดี่ยว ซึ่งโครงสร้างนี้มีความเสถียรมาก และเมื่อมี mRNA ของยีนเป้าหมายที่เกิดขึ้นใหม่ โครงสร้างนี้เองจะทำหน้าที่ตัด mRNA นั้น (ภาพที่ 4 ข) (Antier, 2005) ดังนั้นกลไกนี้จึงสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ

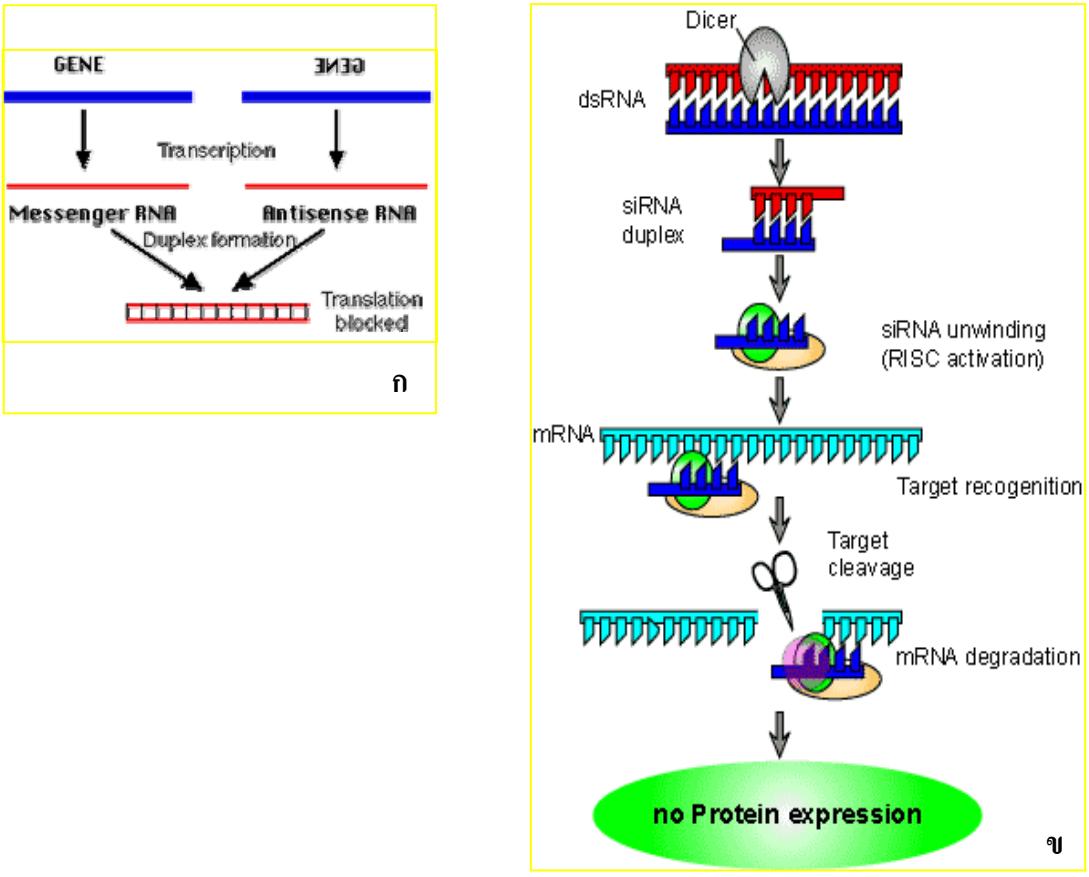
ในงานวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการนำ antisense technology มาใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์เอทิลีนนั้น สามารถสร้าง antisense RNA จากยีนในพืชชนิดเดียวกัน (homologous antisense RNA) (Wong *et al*., 2001) หรือการสร้างจาก antisense RNA จากยีนในพืชต่างชนิดกัน (heterologous antisense RNA) (Oliver *et al*., 1993) ตัวอย่างงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการยับยั้งการสังเคราะห์เอทิลีนได้แก่

Hamilton *et al*. (1990) ถ่ายยีน *ACO* แบบ antisense เข้าสู่มะเขือเทศแล้วพบว่าสามารถยับยั้งการสังเคราะห์เอทิลีนถึงได้ 87 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Klee *et al.* (1991) ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสุกของผลไม้ แล้วแยกยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เอนไซม์ ACC syntase ในลักษณะที่เป็น antisense RNA แล้วถ่ายฝากยีนนี้ลงในมะเขือเทศ พบว่ามะเขือเทศแปลงพันธุกรรมที่ได้ไม่สุกเนื่องจากไม่มีการสังเคราะห์เอธิลีน และ Bolitho *et al*. (1997) ได้ถ่าย *ACO* ของแอปเปิ้ลแบบ antisense เข้าสู่มะเขือเทศ พบว่ามะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถลดการสังเคราะห์เอทิลีนได้ถึง 95 เปอร์เซ็นต์

สำหรับงานวิจัยที่ใช้ antisense technology ในการยืดอายุการใช้งานของดอกไม้ได้สำเร็จได้แก่ งานวิจัยของ Savin *et al*. (1995) ได้ถ่าย *ACO* RNA แบบ antisense เข้าสู่คาร์เนชั่น และสามารถยืด

อายุการปักแจกันได้ ส่วน Aida *et al*. (1998) ถ่าย *ACO* แบบ sense และ antisense เข้าสู่ torenia ซึ่งพบว่าทั้ง 2 วิธีนี้สามารถช่วยยืดอายุของดอก torenia ได้เพิ่มขึ้น 2 วัน

ดังนั้นแนวทางการถ่ายยีน antisense จากมะละกอเข้าสู่กล้วยไม้ น่าจะเป็นงานวิจัยที่สามารถช่วยให้ดอกกล้วยไม้มีการสร้างเอทิลีนลดน้อยลง ซึ่งจะส่งผลให้กล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนมีอายุการใช้งานนานขึ้น ซึ่งจะเป็นผลดีต่อการผลิตกล้วยไม้เพื่อการส่งออกของประเทศไทย การทดลองนี้ได้เลือกใช้กล้วยไม้สกุลหวาย 2 สายพันธุ์คือ บอม17 และ เอียสกุล เป็นพืชเป้าหมายเพื่อการถ่ายยีน *ACO*1 และ *ACO*2 จากมะละกอ โดยเทคนิค antisense



<u>ภาพที่4</u> กลไกการทำงานของ antisense RNA (ก) และ RNA interference (ข) (ที่มา Antier, 2005)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สายพันธุ์กล้วยไม้ที่ใช้ในการทดลอง

กล้วยไม้สกุลหวายที่ใช้ในงานวิจัยนี้มี 2 พันธุ์ คือ บอม17 (*Dendrobium* 'Bom 17') และ เอียสกุล (*Den*. 'Earsakul') ซึ่งทั้งสองพันธุ์มีสีชมพูเข้มปนขาว กล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์นี้เป็นไม้ตัดดอกส่งออกที่มีลักษณะดีและกำลังเป็นที่นิยม และยังสามารถขยายพันธุ์ได้ดีโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ PLBs ของกล้วยไม้ทั้งสองพันธุ์นี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท กรุงเทพอุตสหกรรมเมล็ดพันธุ์ จำกัด

2. วัสดุและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและการถ่ายยีน

2.1 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave machine, Sanyo Labo Autoclave MLS-3780)
2.2 ตู้อบ (hot air oven, Memmert)
2.3 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (multi-parameter analyzer, Consort C831)
2.4 เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ บีกเกอร์ กระบอกตวง
2.5 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar flow biological safety cabinet class II, Thai interfil)
2.6 มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว (Petri dish) และตะเกียงแอลกอฮอล์
2.7 ชั้นวางขวดเนื้อเยื่อ
2.8 เครื่อง electroporation (gene Pulser II Capacitance extender Plus, Bio-RAD®)
2.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Universal 32R Centrifuge, Hettich ; High speed centrifuge, Kubota)
2.10 เครื่อง vortex (Vortex Genie2, Scientific Industries)
2.11 เครื่อง PCR Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer)
2.12 เครื่อง Gel electrophoresis (GelMate 2000, Toyobo)
2.13 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer, Ultrospec 2100 pro)
2.14 gel Documentation (Vilber Lourmat)
2.15 incubator shaker (Infors Model AI 72, Minitron)

3. <u>สารเคมี</u>

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร VW (Vacin and Went, 1949) (ภาคผนวก ก)

3.2 สารที่ใช้สำหรับปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ได้แก่ hydrochloric acid (HCl) sodium hydroxide (NaOH) และ potassium hydroxide (KOH)

3.3 สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ 6-benzyadenine (BA)

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสูตร LB (Luria-Betani) และ SOB (ภาคผนวก ก)

3.5 สารปฏิชีวนะที่ใช้ในขั้นตอนของการสร้างพลาสมิดสายผสม และขั้นตอนของการถ่ายยีน ได้แก่ amplicillin kanamycin hygromycin B และ cefotaxime

3.6 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน โดยวิธี PCR และการทำปฏิกิริยา Southern blot hybridization

3.5 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical assay (ภาคผนวก ก)

3.7 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1 carboxylate oxidase (ACO) (ภาคผนวก ก)

4. <u>พลาสมิด</u>

4.1 พลาสมิด pCAMBIA 1301

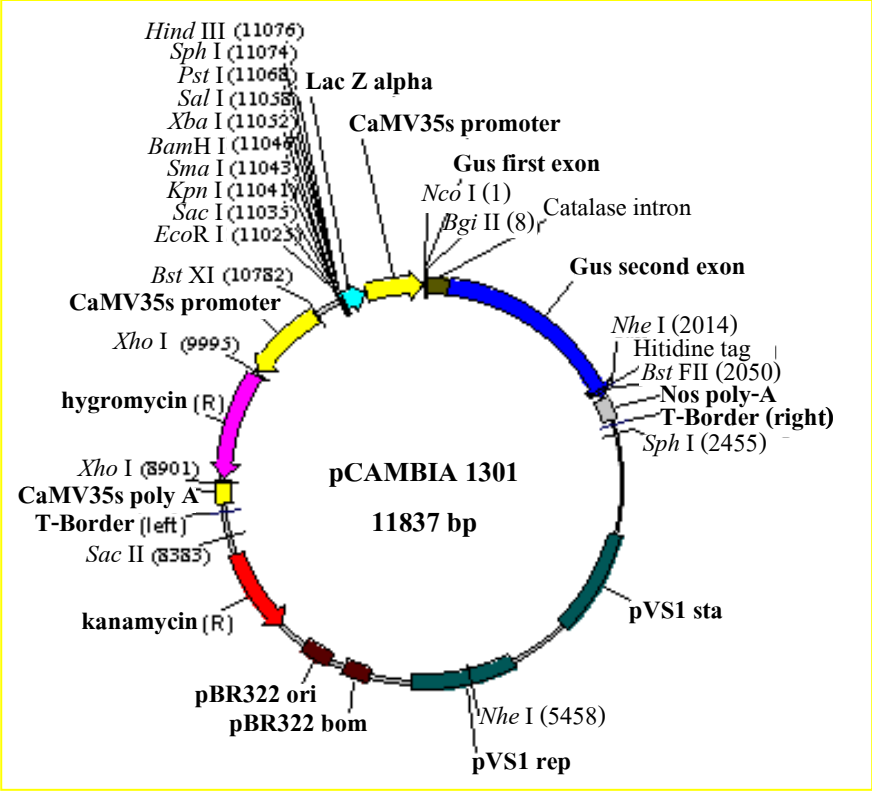
พลาสมิด pCAMBIA 1301 (ภาพที่ 5) เป็นพลาสมิดสำหรับถ่ายเข้าสู่กล้วยไม้เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีน และใช้สำหรับสร้างพลาสมิดลูกผสมของยีน *CPACO1* antisense ซึ่งเป็น binary vector ขนาด 11,837 bp โดยส่วนของ T-DNA มียีนสังเคราะห์เอนไซม์ β-glucuronidase (ยีน *gus*) เป็นยีนรายงานผล และยีนสังเคราะห์เอนไซม์ hygromycin phosphotransferase (ยีน *hpt*) ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin B เป็นยีนคัดเลือก ซึ่งทั้ง 2 ยีนมีโปรโมเตอร์คือ 35SCaMV promoter และเทอร์มิเนเตอร์คือ NOS เป็นส่วนควบคุม และยังมียีนสังเคราะห์เอนไซม์ neomycin phosphotransferase (ยีน *nptII*) ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanymycin (CAMBIA GPO Box3200, Canberra ACT 2601, Australia)

4.2 พลาสมิด pCAMBIA 13121

พลาสมิด pCAMBIA 13121 เป็นพลาสมิดที่ใช้สำหรับสร้างพลาสมิดลูกผสมของยีน *CPACO*2 antisense ซึ่งมีขนาด 11,990 bp (ภาพที่ 6) เป็น binary vector ลูกผสมระหว่าง พลาสมิด pCAMBIA 1300 และ pBI 121 ได้มาโดยการเชื่อมต่อยีนสังเคราะห์เอนไซม์ β-glucuronidase (GUS) รวมทั้งส่วนของโปรโมเตอร์คือ 35SCaMV promoter และเทอร์มิเนเตอร์คือ nos-ter จากพลาสมิด pBI 121 กับบริเวณ multiple cloning site ของพลาสมิด pCAMBIA 1300 โดยพลาสมิดนี้มียีนสังเคราะห์เอนไซม์ hygromycin phosphotransferase (HPT) ซึ่งเป็นส่วนของพลาสมิด pCAMBIA 1300 เป็นยีนคัดเลือก ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin B มีโปรโมเตอร์คือ 35SCaMV promoter และเทอร์มิเนเตอร์คือ NOS เป็นส่วนควบคุม ยีนทั้งหมดที่กล่าวถึงนี้อยู่ภายในส่วน LB และ RB ของ T-DNA นอกจากนี้ส่วนของ T-DNA ยังมียีนสังเคราะห์เอนไซม์ neomycin phosphotransferase (ยีน *nptII*) ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin (ภาพที่ 6)

5. <u>cDNA ของยีน *ACO*</u>

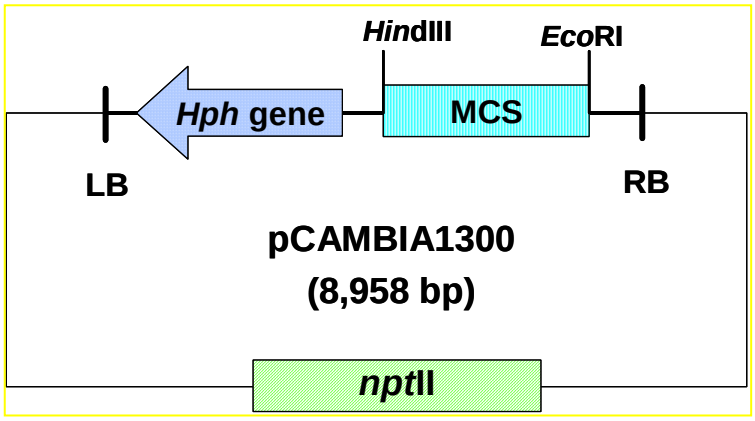
ยีนที่ใช้ในการทดลองคือ cDNA ของยีน *CPACO1* และ *CPACO2* จากมะละกอโดย cDNA ของยีน *ACO1* อยู่บนพลาสมิด pGEM-T Easy vector (ภาพที่ 7) และ cDNA ของยีน *ACO2* อยู่บนพลาสมิด pPCR-Script Amp SK(+) (ภาพที่ 7) ซึ่งพลาคมิดทั้งสองนี้บรรจุอยู่ใน *Escherichai coli* สายพันธุ์ JM109 เลี้ยงในอาหาร Luria-Bertani (LB) ซึ่งเติมสารปฏิชีวนะ amplicillin 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และเก็บใน glycerol 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการทดลองนี้ต้องการถ่ายยีน *CPACO* แบบ antisense จากมะละกอเข้าสู่กล้วยไม้ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอของยีน *CPACO1* และ *CPACO2* กับยีน *ACO* จากกล้วยไม้สกุลหวายซึ่งได้ข้อมูลจากฐานข้อมูลของ GenBank เปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม clustal W พบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสที่ 66 และ 69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาคผนวก ค)



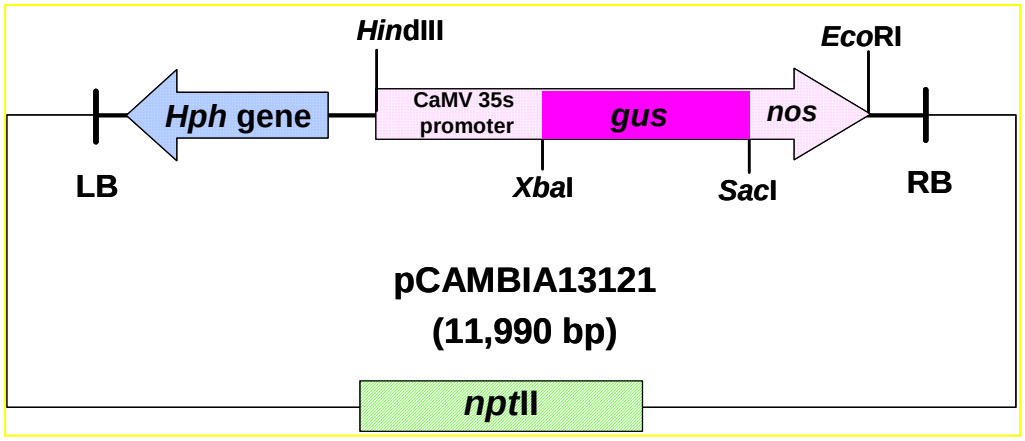
ภาพที่ 5 แผนที่โครงสร้างของพลาสมิด pCAMBIA 1301

ที่มา: CAMBIA GPO Box3200, Canberra ACT 2601, Australia

(www.cambia.org/daisy/cambia/585#Description)

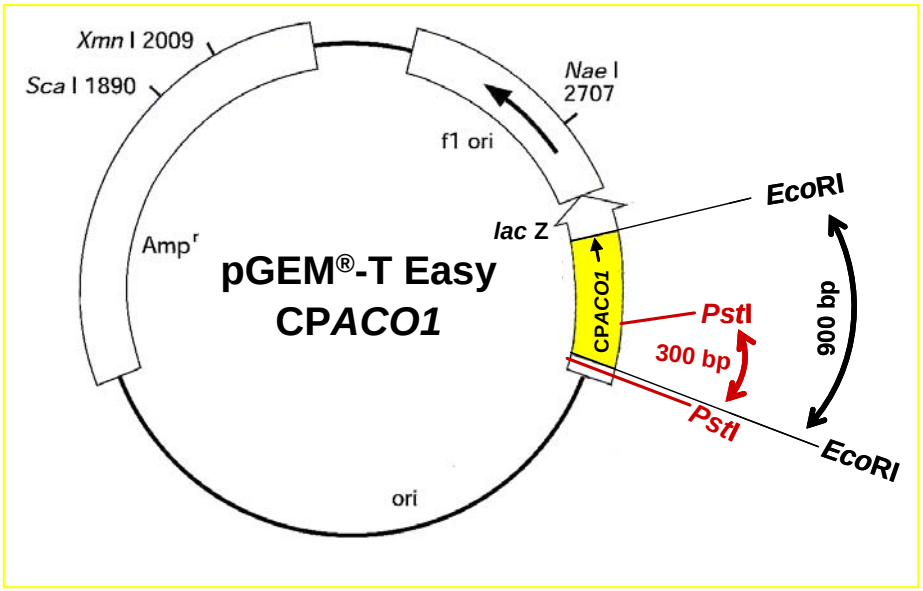


ก

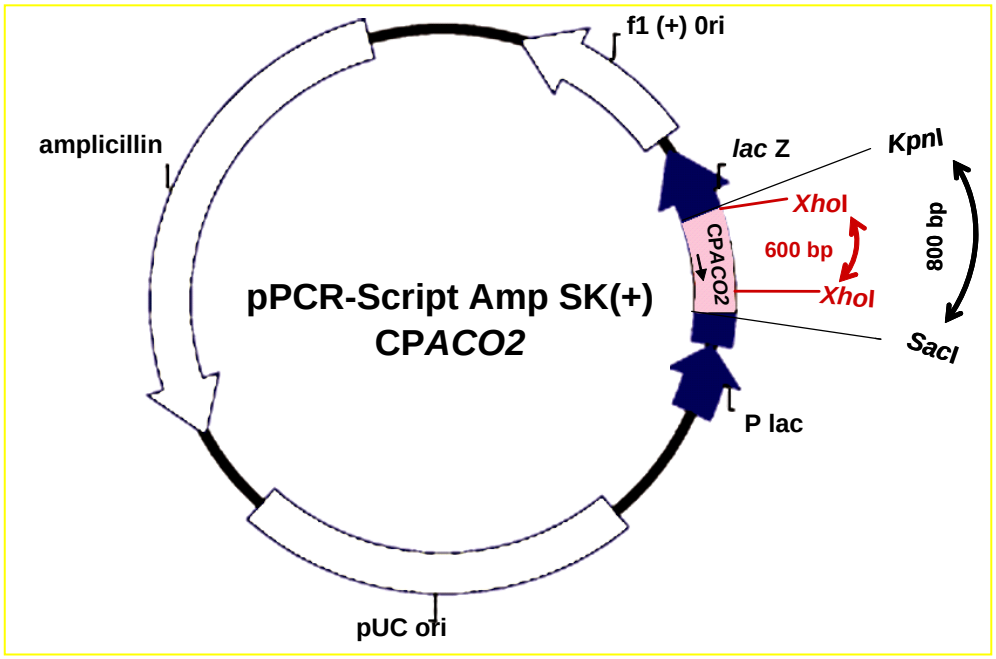


ข

ภาพที่ 6 พลาสมิด pCAMBIA 1300 ซึ่งมีขนาด 8,958 คู่เบส (ก) และพลาสมิด pCAMBIA 13121 ที่มีขนาด 11,990 คู่เบส (ข)



ภาพที่ 7 แผนที่โครงสร้างของพลาสมิด pGEM-T Easy vector ที่บรรจุยีน *CPACO1*



ภาพที่ 8 แผนที่โครงสร้างของพลาสมิด pPCR-Script Amp SK(+) ที่บรรจุยีน *CPACO2*

6. <u>เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens*</u>

6.1 *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105

A. tumefaciens สายพันธุ์ EHA 105 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์รุนแรงมาก (hyper-virulence strain) ที่ได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงและสามารถเข้าบุกรุกพืชใบเลี้ยงคู่ได้หลากหลายชนิด (broad host range) โดยเฉพาะพืชในวงศ์ solanaceae (solanaceous plant) *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 พัฒนามาจาก *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 101 ให้บรรจุ Ti-plasmid คือ pEHA 105 โดยพัฒนามาจาก pTiBo542ΔT-region ซึ่งเป็นพลาสมิดชนิด succinamopine type (Hood *et al.*, 1993) ในงานวิจัยนี้ใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105ที่บรรจุพลาสมิด pCAMBIA 1301 ซึ่งมียีน *β-glucuronidase* (*gus*) เป็นยีนรายงานผล และยีน *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) เป็นยีนคัดเลือก ใช้ในการทดลองเพื่อสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนในกล้วยไม้สกุลหวาย

6.2 *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1

A. tumefaciens สายพันธุ์ AGL-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์รุนแรงมากที่ได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงและสามารถเข้าบุกรุกพืชใบเลี้ยงคู่ได้หลากหลายชนิดโดยเฉพาะพืชในสกุล crucifer (cruciferous plant) *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 พัฒนามาจาก *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 101 ให้บรรจุ Ti-plasmid คือ C58 pTiBo542 recA::bla, T-region deleted Mop(+) Cb(R) (Lazo *et al*., 1991) แบคทีเรียสายพันธุ์นี้เป็นแบคทีเรียที่ใช้สำหรับถ่ายยีน *ACO* แบบ antisense เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย

7. <u>ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน *CPACO* antisense และสำหรับตรวจสอบยีนคัดเลือกและยีนรายงานผล</u>

7.1 ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน *CPACO* antisense จาก cDNA *CPACO* ของมะละกอ

7.1.1 ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน *CPACO1* antisense บางส่วนจาก *CPACO 1* cDNA

a*CPACO1* F (forward) : 5'-GGAGCTCGCTAGCCACCATGATCTCTCATGACCTGATGGA-3'
a*CPACO1* R (reverse) : 5'-GGTCTAGACCATGGTCTACCAGAGATGGTGCTGG-3'

7.1.2 ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน antisense *ACO2* บางส่วนจาก cDNA *ACO2*

a*CPACO2* F (forward) : 5'-GGAGCTCGCTAGCCACCATGTGAATTCGCATGTGA
GAATTG-3'
a*CPACO2* R (reverse): 5'–GGTCTAGACCATGGTACAGCTTCATGTAATCCTCGA-3'

7.2 ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบยีนคัดเลือกและยีนรายงานผล

7.2.1 ไพรเมอร์สำหรับยีนคัดเลือก *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*)
HPT-2F (forward) : 5'-CCTGAACTCACCGCGACG-3'
HPT-2Rv (reverse) : 5'-AAGACCAATGCGGAGCATATA-3'

7.2.2 ไพรเมอร์สำหรับยีนรายงานผล *β-glucuronidase* (*gus*)
GUS456 (forward) : 5'-AAACGGCAAGAAAAAGCAGTC-3'
GUS1375 (reverse) : 5'-CAGGCACAGCACATCAAAGAG-3'

8. <u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางอณูชีววิทยาบนเครือข่ายอินเตอร์เน็ต</u>

8.1 โปรแกรมสำหรับหาลำดับเบสของยีนหรือสายดีเอ็นเอที่สนใจจากฐานข้อมูล

โปรแกรมจาก website http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/

8.2 โปรแกรมสำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างสายดีเอ็นเอหรือโปรตีนที่สนใจกับฐานข้อมูล

โปรแกรม clustal W จาก website http://www.ebi.ac.uk/clustal W/

8.3 โปรแกรมสำหรับหาตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบนสายดีเอ็นเอ

โปรแกรม Webcutter จาก website http://www.firstmarket.com/firstmarket/cutter/cut2.html

วิธีการ

1. การทดสอบปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

เพาะเลี้ยง protocorm like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ในอาหารเหลวสูตร Vacin และWent (VW; Vacin and Went, 1949) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่า โดยใช้ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมง ต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 6 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 6 สัปดาห์ จนมีปริมาณ PLBs เพียงพอที่จะใช้ในการทดลองต่อไป

1.1 การทดสอบปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวาย

เพาะเลี้ยง PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 อายุ 6 สัปดาห์ ในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 0 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่า โดยใช้ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมง ต่อวันอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ บันทึกผลโดยชั่งน้ำหนักสด วางแผนการทดลอง แบบ Completely Randomized Design (CRD) 3 ทรีตเมนท์ ทรีตเมนท์ละ 4 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำใช้ PLBs เริ่มต้นหนัก 2 กรัม เพาะเลี้ยงใน flask ขนาดความจุ 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร 40 มิลลิลิตร

1.2 การทดสอบความหนาของ tTCLs (transversely thin cell layers) จาก PLBs ที่เหมาะสมที่สามารถชักนำให้เกิด PLBs ใหม่ได้

เพิ่มปริมาณ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 โดยการเพาะเลี้ยง PLBs บนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ pH 4.9 เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 28 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ แล้วจึงนำ PLBs ที่ได้มาตัดตามขวางให้มีความหนา 0.5 1 และ 2 มิลลิเมตรด้วยมีดผ่าตัด เรียกเนื้อเยื่อที่ตัดขวางนี้ว่า transversely thin cell layers (tTCLs) นำ tTCLs มาเพาะเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบการเกิด PLBs ใหม่เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร 2 ชนิด

คืออาหารเหลวและ อาหารแข็งสูตร VW ที่เติม 6-benzylaminopurine (BA) ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ pH 4.9 โดยเติมวุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์สำหรับอาหารแข็ง เพาะเลี้ยงในสภาพแสงและอุณหภูมิเดิม นาน 4 สัปดาห์ สำหรับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวใช้ flask ขนาดความจุ 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร 20 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มี 6 ทรีตเมนท์ ทรีตเมนท์ละ 5 ซ้ำ โดยในแต่ละซ้ำใช้ tTCLs 10 ชิ้น บันทึกผลโดยการชั่งน้ำหนักสดหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์

1.3 การทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ PLBs เจริญเป็นต้นอ่อน

ใช้ tTCLs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ที่มีความหนาประมาณ 2 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW นาน 4 สัปดาห์ ให้เกิดเป็น PLBs ใหม่ แล้วจึงย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ดัดแปลง เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสงประมาณ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบผลการทดลองโดยการบันทึกการเปลี่ยนแปลงของ PLBs ในอาหารอาหารแข็งสูตร VW ดัดแปลง 5 สูตรได้แก่

สูตรที่ 1 อาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ผงถ่านกำมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 2 อาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ผงถ่านกำมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และกล้วยหอมสุกบด 15 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 3 อาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ผงถ่านกำมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และมันฝรั่งบด 15 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 4 อาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ผงถ่านกำมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ กล้วยหอมสุกบด 7.5 เปอร์เซ็นต์ และมันฝรั่งบด 7.5 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 5 อาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ผงถ่านกำมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ กล้วยหอมสุกบด 5 เปอร์เซ็นต์ และมันฝรั่งบด 5 เปอร์เซ็นต์

2. <u>ศึกษาระบบการถ่ายยีนที่เหมาะสมเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายโดย</u>

***<u>Agrobacterium tumefaciens</u>* <u>เป็นพาหะ</u>**

เพาะเลี้ยง PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 และพันธุ์ เอียสกุล ในอาหารเหลวสูตร Vacin และWent (VW; Vacin and Went, 1949) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่า โดยใช้ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เพาะเลี้ยงในสภาพ ที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศา เซลเซียส นาน 6 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 6 สัปดาห์ จนมีปริมาณ PLBs เพียงพอทีจะใช้ในการทดลองต่อไป

2.1 ทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่เหมาะสมเพื่อใช้คัดเลือกชิ้นส่วนของ PLBs ที่ได้รับการถ่ายยีน

ทดสอบความต้านทานของชิ้น tTCLs ของกล้วยไม้สกุลหวาย ที่มีต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin B ได้ทดสอบกับกล้วยไม้พันธุ์ เอียสกุล โดยตัด PLBs ตามขวางหนา 2 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ และเติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่ความเข้มข้น 0 10 20 30 40 50 60 และ 70 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์ บันทึกการตายของ PLBs ในสัปดาห์ที่ 4 เพื่อเลือกความเข้มข้น hygromycin B ที่น้อยที่สุดที่ทำให้ PLBs ตายทั้งหมดภายใน 4 สัปดาห์ เพื่อใช้เป็นความเข้มข้นสำหรับการคัดเลือก PLBs ที่ได้รับการถ่ายยีน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 8 ทรีตเมนท์ ทรีตเมนท์ละ 4 ซ้ำ โดยในแต่ละซ้ำใช้ tTCLs 20 ชิ้น

2.2 ทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301โดยมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล และยีน *hph* เป็นยีนคัดเลือก

ในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนทั้งหมด 6 ปัจจัย โดยปัจจัยที่ 1 ถึงปัจจัยที่ 5 ได้ทดลองโดยใช้ tTCLs ขนาดความหนา 2 มิลลิเมตรที่ได้จาก PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ส่วนปัจจัยที่ 6 ได้ทดสอบกับกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ เอียสกุล

ปัจจัยที่ 1 ชนิดของอาหารคัดเลือกในช่วง 4 สัปดาห์แรกของการคัดเลือก เปรียบเทียบระหว่างอาหารแข็ง และอาหารเหลว

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลา pre-culture (pre-culture period) เปรียบเทียบที่ 0 3 และ 6 วัน

ปัจจัยที่ 3 ระยะเวลา co-cultivation (co-cultivation period) เปรียบเทียบที่ 2 และ 3 วัน

ปัจจัยที่ 4 ความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* เปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นที่ 0.5 1 2 5 และ 10 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ปัจจัยที่ 5 การสร้างบาดแผลขนาดเล็กโดยศึกษาระยะเวลา sonication กับเนื้อเยื่อเป้าหมาย เปรียบเทียบที่ 0 2 4 6 8 และ 10 วินาที

ปัจจัยที่ 6 ความเข้มข้นของ acetosyringone ในอาหารสำหรับ co-cultivation เปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นที่ 0 100 200 300 400 และ 500 ไมโครโมลาร์

ในการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายโดย *A. tumefaciens* มีขั้นตอนหลักที่สำคัญ 3 ขั้นตอนได้แก่ การเตรียมเนื้อเยื่อเป้าหมาย การเตรียมเชื้อ *A. tumefaciens* และการถ่ายยีนเข้าสู่ tTCLs ของกล้วยไม้สกุลหวาย

การเตรียมเนื้อเยื่อเป้าหมายหรือ tTCLs จาก PLBs ของกล้วยไม้สำหรับการถ่ายยีน เริ่มจากการเลี้ยง PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เพาะเลี้ยง ในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ จากนั้นตัด PLBs ตามขวาง ให้ได้เป็น tTLCs ที่มีความหนาประมาณ 2 มิลลิเมตร แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว VW บนเครื่องเขย่า เพื่อเป็นการ pre-culture ในขั้นตอนนี้ได้ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 2 ปัจจัยคือ

- ระยะเวลา pre-culture (pre-culture period) โดยเปรียบเทียบที่ 0 3 และ 6 วัน

- การสร้างบาดแผลขนาดเล็กบนเนื้อเยื่อเพื่อส่งเสริมให้แบคทีเรียเข้า infect พืชได้ดีขึ้น โดยศึกษาระยะเวลาการ sonicate เนื้อเยื่อเป้าหมายโดยเปรียบเทียบที่ 0 2 4 6 8 และ 10 วินาที

การเตรียมเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301 ทำโดยเขี่ยเชื้อ *A. tumefaciens* บนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสนาน 2-3 วัน เลือกโคโลนีเดี่ยว แล้วปลูกเชื้อ 1 โคโลนีนี้ ลงในอาหารเหลวสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตรใน flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200-250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นานประมาณ 24 ชั่วโมง แล้วจึงปลูกเชื้อใหม่อีกครั้งโดยเติมเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *A. tumefaciens* ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่สภาพแวดล้อมเดิมนาน 16 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) จะได้ประมาณ 1.8-2. 0 จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยเชื้อมาปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อออก ละลายตะกอนเชื้อด้วยอาหารเหลวสูตร VW ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จะได้เป็นเซลล์แขวนลอยเชื้อเริ่มต้นซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วจึงเจือจางเซลล์แขวนลอยเชื้อด้วยอาหารเหลวสูตร VW ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ เพื่อศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือ ความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* เปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นที่ 0.5 1 2 5 และ 10 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ในขั้นตอนของการถ่ายยีนเข้าสู่ tTCLs ของกล้วยไม้สกุลหวายทำโดยเพาะเลี้ยง tTCLs ที่ pre-culture แล้วร่วมกับเซลล์แขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* นาน 60 นาที บนเครื่องเขย่า ซับเชื้อ *A. tumefaciens* ส่วนเกินบนกระดาษซับนึ่งที่ฆ่าเชื้อแล้วย้าย tTCLs ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติม acetosyringone ในที่มืด เพื่อเป็นการทำ co-cultivation จากนั้นกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* โดยการล้างออกด้วยอาหารเหลว VW ที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime 500 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 30 นาที แล้วจึงนำ tTCLs ไปเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือกเพื่อคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนและกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ต่อโดยใช้อาหารคัดเลือกสูตร VW ที่เติมสารปฏิชีวนะ 2 ชนิดคือ cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* และ hygromycin 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายมา

คัดเลือกในอาหารคัดเลือกชนิดเหลวโดยใช้สูตรเดิมต่ออีก 8 สัปดาห์ ซึ่งในขั้นตอนนี้ได้ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 3 ปัจจัยคือ

- ชนิดของอาหารคัดเลือกในช่วง 4 สัปดาห์แรกของการคัดเลือกโดยเปรียบเทียบระหว่างอาหารแข็ง และอาหารเหลว

- ระยะเวลา co-cultivation โดยเปรียบเทียบที่ 2 และ 3 วัน

- ความเข้มข้นของ acetosyringone ในอาหารสำหรับ co-cultivation เปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นที่ 0 100 200 300 400 และ 500 ไมโครโมลาร์

เปรียบเทียบผลของแต่ละปัจจัย โดยบันทึกเปอร์เซ็นต์ tTCLs ที่สามารถชักนำให้เกิด PLBs ใหม่ได้บนอาหารคัดเลือกเปรียบเทียบกับจำนวน tTCL ทั้งหมดที่ใช้ถ่ายยีน โดยบันทึกหลังการคัดเลือกนาน 4 และ 12 สัปดาห์

2.3 การชักนำให้ PLBs ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนให้เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์

หลังจากการถ่ายยีนและเพาะเลี้ยง tTCLs บนอาหารคัดเลือกนาน 12 สัปดาห์ เพื่อให้ได้ PLBs ใหม่จากนั้นจึงชักนำให้ PLBs ซึ่งคาดว่าได้รับการถ่ายยีนที่เกิดใหม่บนอาหารคัดเลือกให้เกิดเป็นต้นอ่อน โดยเพาะเลี้ยง PLBs บนอาหารชักนำต้นอ่อนที่เหมาะสมซึ่งได้ทำการทดสอบในข้อ 1.2 นาน 8 สัปดาห์ แล้วจึงชักนำให้เป็นต้นที่มีรากสมบูรณ์บนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านกำมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 12-16 สัปดาห์

2.4 การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical assay ในกล้วยไม้ระยะต่าง ๆ ที่ได้รับการถ่ายยีน

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในกล้วยไม้ที่ได้รับถ่ายยีนได้ตรวจสอบในระยะต่าง ๆ ได้แก่ การแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวบนชิ้น tTCLs ระยะ PLBs ระยะยอดอ่อนอายุ 1 เดือน และต้นอ่อนอายุ 4 เดือน ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Stomp (1992) และ Jefferson *et al.* (1987) โดยแช่เนื้อเยื่อกล้วยไม้ในสารละลาย X-Gluc solution mixed (ภาคผนวก ก) แล้วใช้วิธี vacuum

infiltration ประมาณ 30 นาที เพื่อให้สารละลาย X-Gluc แพร่เข้าสู่เนื้อเยื่อกล้วยไม้ได้ทั่วถึง แล้วจึงบ่มเนื้อเยื่อในสารละลาย X-Gluc ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นสกัดคลอโรฟิลล์ออกโดยใช้ เอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบผลการเกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

2.5 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และ dot blot hybridization

หลังจากชักนำให้ต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการคัดเลือกให้เป็นต้นที่สมบรูณ์แล้ว ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนโดยเทคนิค PCR ในขั้นแรก แล้วจึงคัดเลือกสายต้นที่ให้ผล positive นำมาตรวจสอบอีกครั้งโดยวิธี dot blot hybridization

ในการตรวจสอบโดยวิธี PCR และวิธี dot blot hybridization นั้นใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอวิธีเดียวกันคือสกัดยีโนมิคดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ที่ได้จากต้นที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนและจากต้นปกติที่มีอายุประมาณ 5-6 เดือน โดยดัดแปลงจากวิธี CTAB (Doyle and Doyle, 1990) โดยตัดใบกล้วยไม้หนักประมาณ 0.2-0.3 กรัม ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แช่หลอดในไนโตรเจนเหลวจนเนื้อเยื่อแข็ง บดให้ละเอียดแล้วเติม CTAB extraction buffer (2%CTAB, 2%PVP, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2% α-mercaptoethanol) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนประมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติมส่วนผสมของ phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมานาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10-15 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนประมาณ 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม Rnase (DNAse-free) (US Biological, USA) ปริมาณ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของปริมาตรส่วนใส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที แล้วเติมส่วนผสมของ phenol : chloroform : isoamyl alcohol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมา นาน 5 นาที หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนใสข้างบนใส่หลอดใหม่ เติม 3M sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใสที่ได้ และเติม isopropanol (แช่เย็นที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมาแล้วบ่มที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอธานอล 70% ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้ว

ละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (1 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 25-30 ไมโครลิตร ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร ทำการอิเลคโตรโฟรีซีสบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซนต์ใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ นาน 40 นาที ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA marker แล้วย้อมเจลในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและบันทึกภาพ เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนต่อไป

2.5.1 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* และ *hpt* ในกล้วยไม้โดยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจหายีน *gus* และ *hpt* โดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *gus* คือไพรเมอร์ GUS456 primer และไพรเมอร์ GUS1375 primer ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้วจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 919 คู่เบส และไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะต่อยีน *hpt* คือไพรเมอร์ HPT-2F และไพรเมอร์ HPT-2Rv ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้วจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 800 คู่เบส ซึ่งการตรวจหายีนทั้งสองนี้ใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาเหมือนกันคือ ในส่วนผสมของปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 250 μM dNTP, 0.125 μM forward primer, 0.125 μM reverse primer และ 0.5U *Taq* DNA polymerase แล้วเติมดีเอ็นเอต้นแบบประมาณ 50-100 นาโนกรัม (สำหรับดีเอ็นเอจากกล้วยไม้) หรือ 0.5-1 นาโนกรัม (สำหรับพลาสมิดดีเอ็นเอ) นำไปใส่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Perkin Elmer) 2400 โดยใช้โปรแกรมดังนี้

	initial PCR activation step	ที่ 96 °ซ นาน 3 นาที
3 step cycling	จำนวน 35 รอบ	
	denature	ที่ 96 °ซ นาน 20 วินาที
	annealing	ที่ 55 °ซ นาน 60 วินาที
	extension	ที่ 72 °ซ นาน 60 วินาที
	final extension	ที่ 72 °ซ นาน 5 นาที

ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่ได้โดยการทำอิเลคโตรโฟรีซีสบนอะกาโรส 0.8 เปอร์เซนต์ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ นาน 40 นาที เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100

bp DNA ladder marker ย้อมเจลในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและบันทึกภาพ

2.5.2 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* ในกล้วยไม้โดยเทคนิค dot blot hybridization

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนโดยเทคนิค dot blot hybridization ประกอบด้วย3 ขั้นตอนหลักได้แก่ การเตรียมและติดฉลากดีเอ็นเอตัวตรวจสอบยีน *gus* การเตรียม DNA blot และการ hybridization ซึ่งแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้

การเตรียมและติดฉลากดีเอ็นเอตัวตรวจสอบยีน *gus* โดยเตรียมดีเอ็นเอของยีน *gus* เพื่อใช้เป็นต้นแบบสำหรับเตรียมตัวตรวจสอบยีน *gus* ที่ติดฉลากด้วยสารไร้รังสี digoxigenin โดยใช้ PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science, USA) ซึ่งทำได้โดยการตัดยีน *gus* ออกจากพลาสมิด pCAMBIA 1301 4 ไมโครกรัมด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Nhe*I (MBI Fermentas, Thailand) ชนิดละ 5 ยูนิต ในปฏิกิริยารวม 30 ไมโครลิตร และ 1X buffer (Y^+/Tango^{TM}) บ่มปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง แบ่งส่วนผสมมาวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอของยีน *gus* (ขนาด 2,014 คู่เบส) ที่ตัดออกมาได้ด้วยเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE แล้วตัดเจลที่มีแถบดีเอ็นเอของยีน *gus* นำมาสกัดยีน *gus* ออกจากเจลโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) แล้วติดฉลากดีเอ็นเอของยีน *gus* ที่เตรียมได้ด้วย PCR DIG Probe Synthesis Kit ใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *gus* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *gus* ซึ่งได้แก่ ไพรเมอร์ GUS456 (forward) และไพรเมอร์ GUS1375 (reverse) โดยใช้ DIG-dUTP แทน dTTP เติมส่วนผสมสำหรับเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ขั้นตอนและส่วนผสมเช่นเดียวกับข้อ 2.5.1 โดยปรับส่วนผสมของปฏิกิริยาให้มีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE และหากยังไม่นำไปทำไฮบริไดเซชันทันทีสามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

การเตรียม DNA blot โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ มาตัวอย่างละ 2 ไมโครกรัม นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5-10 นาที เพื่อแยกดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยวแล้วนำขึ้นมาแช่ในน้ำแข็งทันที ต่อจากนั้นนำไปหยดลงบนแผ่นไนล่อนเมมเบรน ตากทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วจึงนำแผ่นไนล่อนเมมเบรนไปฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 3 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอไว้กับแผ่นไนล่อนเมมเบรน หากยังไม่นำไปทำไฮบริไดเซชันทันทีสามารถเก็บแผ่นเมมเบรนไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

การ hybridization เริ่มจากการทำ pre-hybridization ด้วยการนำแผ่นเมมเบรนมาบ่มในถุงพลาสติกที่มีสารละลายไฮบริไดเซชัน (0.75 M NaCl, 75 mM sodium citrate, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 1% blocking solution, pH 7.0) ปริมาตรเท่ากับ 0.1 เท่าของขนาดพื้นที่ของเมมเบรน (ตารางเซนติเมตร) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นต้มดีเอ็นเอที่เป็นตัวตรวจสอบยีน *gus* ที่เตรียมไว้ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5-10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที เติมสารละลายไฮบริไดเซชันปริมาตรเท่ากับ 0.035 เท่าของขนาดพื้นที่ของเมมเบรน ผสมให้เข้ากันแล้วเติมลงในถุงพลาสติกที่มีแผ่นเมมเบรนแทนที่สารละลายไฮบริไดเซชันเดิม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย 2X SSC (0.3M NaCl, 30mM sodium citrate, pH 7.0) ผสมกับ 0.1% SDS 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และล้างซ้ำด้วยสารละลาย 0.1X SSC ผสมกับ 0.1% SDS 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลด้วยวิธี chemiluminescence detection โดยแช่แผ่นเมมเบรนที่ผ่านการล้างแล้วใน washing buffer (0.1M maleic acid, 0.15M NaCl, pH 7.5, 0.3% (v/v) Tween20) 15 นาที นำแผ่นเมมเบรนใส่ในถุงพลาสติก โดยระวังไม่ให้เมมเบรนแห้ง เติม blocking solution (1% blocking reagent ใน maleic acid buffer) ประมาณ 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเขย่าเบา ๆ เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที จึงนำเมมเบรนไปแช่ในสารละลาย anti-digoxigenin conjugated alkaline phosphatase ที่เจือจาง 1:10,000 ส่วนในสารละลาย blocking solution เขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างเมมเบรนด้วย washing buffer 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แล้วปรับสภาพเมมเบรนด้วยการแช่ลงในสารละลาย detection buffer เป็นเวลา 3 นาที โดยไม่ต้องเขย่า ย้ายเมมเบรนมาวางบนแผ่นพลาสติก ผสมสารละลาย detection buffer เข้ากับ chemiluminescent substrate (CDP star^{TM}) ในอัตราส่วน 1:250–1:500 ปริมาตร 500-1,000 ไมโครลิตร แล้วนำไปหยดลงบนเมมเบรนให้ทั่ววางทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงรีดเอาสารละลายส่วนเกินทิ้งไป นำเมมเบรนไปประกบกับแผ่นฟิล์มในห้องมืด ประมาณ 10 นาที ล้างฟิลม์ด้วยสารละลาย developer และ fixer ตรวจดูภาพที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม

3. <u>การถ่ายยีน *CPACO* แบบ antisense จากมะละกอเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย</u>

3.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม (binary vector) ที่มียีน *CPACO* แบบ antisense จากมะละกอและถ่ายเข้าสู่ *A. tumefaciens*

ย่อยพลาสมิด pGEM-T Easy vector ที่ได้จากการสกัดในข้อ 3.1.1 เพื่อแยกส่วน cDNA ของยีน *CPACO1* ขนาด 900 คู่เบส ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI โดยใช้บัฟเฟอร์ของเอ็นไซม์ *Eco*RI (Biolabs®) ส่วนพลาสมิด pPCR-Script Amp SK(+) แยกส่วน cDNA ของยีน *CPACO2* ขนาด830 คู่เบส โดยวิธี double digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Sac*I โดยใช้บัฟเฟอร์ NBE 1 (Biolabs®) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิเดียวกันคือ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วจึงแยกผลของปฏิกิริยาการย่อยโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิส บนอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 60 นาที โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker แล้วจึงสกัดแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลโดยการใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) (ภาคผนวก ข) นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่สกัดได้มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน antisense *ACO* จาก cDNA ของยีน *CPACO1* และ *CPACO2* ต่อไป

สังเคราะห์ยีน *CPACO* antisense จาก cDNA ของยีน *CPACO1* และ *CPACO2* ของมะละกอ โดย *CPACO1* antisense ใช้ไพรเมอร์ที่ส่วนปลายของ forward ไพรเมอร์มีลำดับเบสที่จำเพาะต่อการตัดของเอนไซม์ *Nco*I และ reverse ไพรเมอร์ มีลำดับเบสที่จำเพาะต่อการตัดของเอนไซม์ *Nhe*I การสังเคราะห์ *CPACO1* antisense ใช้คู่ไพรเมอร์ a*CPACO1* F (forward) และ a*CPACO1* R (reverse) ซึ่งผลผลิต PCR ของ *CPACO1* antisense มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา 5 ชุดแต่ละชุดมีปริมาณ 40 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 4 mM $MgCl_2$, 250 μM dNTP, 0.125 μM forward primer, 0.125 μM reverse primer และ 1 U *Taq* DNA polymerase แล้วเติมดีเอ็นเอต้นแบบคือส่วน cDNA ของยีน *ACO1* ที่แยกจากเจลประมาณ 5 นาโนกรัม นำส่วนผสมใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Perkin Elmer 2400) โดยใช้โปรแกรมดังนี้

initial pcr activation step ที่ 96 °ซ นาน 3 นาที

3 step cycling จำนวน 35 รอบ

denature ที่ 96 °ซ นาน 20 วินาที

annealing ที่ 55 °ซ นาน 60 วินาที

extension ที่ 72 °ซ นาน 60 วินาที

final extension ที่ 72 °ซ นาน 5 นาที

สังเคราะห์ *CPACO2* antisense โดยใช้ไพรเมอร์ที่ส่วนปลายของ forward ไพรเมอร์มีลำดับเบสที่จำเพาะต่อการตัดของเอนไซม์ *Sac*I และ reverse ไพรเมอร์ มีลำดับเบสที่จำเพาะต่อการตัดของเอนไซม์ *Xba*I โดยใช้คู่ไพรเมอร์ a*CPACO*2 F (forward) และ a*CPACO*2 R (reverse) ซึ่งผลผลิต PCR ของ *CPACO2* antisense มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา 5 ชุดแต่ละชุดมี 40 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 3 mM $MgCl_2$, 250 μM dNTP, 0.125 μM forward primer, 0.125 μM reverse primer และ 1 U *Taq* DNA polymerase แล้วเติมดีเอ็นเอต้นแบบคือส่วน cDNA ของยีน *CPACO2* ที่แยกจากเจลประมาณ 5 นาโนกรัม นำส่วนผสมใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Perkin Elmer) 2400 โดยใช้โปรแกรมดังนี้

initial pcr activation step ที่ 96 °ซ นาน 3 นาที

3 step cycling จำนวน 35 รอบ

denature ที่ 96 °ซ นาน 20 วินาที

annealing ที่ 57 °ซ นาน 60 วินาที

extension ที่ 72 °ซ นาน 60 วินาที

final extension ที่ 72 °ซ นาน 5 นาที

นำผลผลิต PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาในแต่ละชุดมารวมกันซึ่งมีปริมาณรวม 200 ไมโครลิตร ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม 3M sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใส และเติมเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ (แช่เย็นที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมาแล้วบ่มที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ผึ่งตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำปริมาตร 30 ไมโครลิตร

ย่อยส่วนปลายของผลผลิต PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาทั้งสองซึ่งมีน้ำหนักประมาณ 1 ไมโครกรัม พร้อมทั้งพลาสมิด pCAMBIA 1301 และ pCAMBIA 13121 น้ำหนัก 10 ไมโครกรัม เพื่อแยกส่วนของยีน *gus* ออกไป โดยวิธี double digestion โดยผลผลิต PCR ของ antisense *CPACO1* และ พลาสมิด pCAMBIA 1301 ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Nhe*I (Fermentas) ใช้บัฟเฟอร์ (Y^+/Tango™) ส่วนผลผลิต PCR ของ antisense *CPACO2* และ พลาสมิด pCAMBIA 13121 ต้องย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I และ *Xba*I (Biolabs®) ใช้บัฟเฟอร์ NEB buffer 4 บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วจึงแยกผลของปฏิกิริยาการย่อยโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 60 นาที โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Biolabs®) และ 100 bp plus (Fermentas) แล้วจึงสกัดแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลโดยการใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) (ภาคผนวก ข) แล้วนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่สกัดได้มาใช้ในการเชื่อมต่อเพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสมต่อไป

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์ของยีน *CPACO* antisense ทั้งสองที่สกัดได้มาเชื่อมกับ binary vector โดย *CPACO* antisense ของยีนทั้งสองแทนที่ในส่วนของยีน *gus* โดยเชื่อมระหว่าง 35SCaMV promoter และ NOS terminator เพื่อควบคุมการถอดรหัสของ *CPACO* antisense

ผลผลิต PCR ของ *CPACO1* antisense เชื่อมกับ พลาสมิด pCAMBIA 1301 โดยปฏิกิริยา ligation ของ *CPACO1* antisense ปริมาณ 10 ไมโครลิตรประกอบด้วย ชิ้นส่วนของ *CPACO1* antisense ปริมาณ 26 นาโนกรัม ชิ้นส่วนของ pCAMBIA1301 ปริมาณ 100 นาโนกรัม 1X T_4 ligase buffer และ T_4 ligase enzyme (Biolabs®) 3 weiss unit บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง ให้ชื่อพลาสมิดลูกผสมใหม่นี้ว่า pCAMBIA 1301a*ACO1*

ผลผลิต PCR ของ *CPACO2* antisense เชื่อมกับ พลาสมิด pCAMBIA 13121 โดยปฏิกิริยา ligation ของ *CPACO2* antisense ปริมาณ 10 ไมโครลิตรประกอบด้วย ชิ้นส่วนของ *CPACO2* antisense ปริมาณ 24 นาโนกรัม ชิ้นส่วนของ pCAMBIA13121 ปริมาณ 100 นาโนกรัม 1X T_4 ligase buffer และ T_4 ligase enzyme 3 weiss unit บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง ให้ชื่อพลาสมิดลูกผสมใหม่นี้ว่า pCAMBIA 13121a*ACO2*

ตรวจสอบผลการเชื่อมต่อโดยนำไปเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน โดยถ่ายเข้าสู่ competent cell ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α (ภาคผนวก ข) ด้วยวิธี heat shock โดยละลาย

competent cell ปริมาณ 100 ไมโครลิตรซึ่งอยู่ในหลอดเซนตริฟิวจ์บนน้ำแข็ง นาน 3-5 นาที เติมพลาสมิดลูกผสมปริมาตร 10 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ บ่มบนน้ำแข็งนาน 30 นาที จุ่มในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที แล้วนำกลับมาบ่มบนน้ำแข็งโดยเร็วนาน 5 นาที เติมอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีนาน 1 ชั่วโมง นำสารละลายเชื้อที่ได้มาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

ตรวจสอบโคโลนีที่คาดว่าได้รับ binary vector ผสมโดยเลือกแต่ละโคโลนี เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นานข้ามคืน แล้วจึงสกัดพลาสมิดที่ต้องการโดยวิธี alkaline lysis (ภาคผนวก ข) ตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดที่สกัดได้ด้วย 2 วิธี คือการตรวจสอบโดยเทคนิค PCR โดยตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *CPACO1* antisense บน binary vector pCAMBIA 1301 และ *CPACO2* antisense บน binary vector pCAMBIA 13121 โดยใช้วิธีการเดียวกับการสังเคราะห์ยีน *CPACO* antisense ที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น และวิธีการที่ 2 คือตรวจสอบโดยวิธี restriction digestion analysis ด้วยการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะต่าง ๆ โดยพลาสมิด pCAMBIA 1301a*ACO1* ได้ทดสอบ 5 ปฏิกิริยา และพลาสมิด pCAMBIA 13121a*ACO2* ได้ทดสอบ 4 ปฏิกิริยา ดังที่ได้แสดงในตารางที่ 1 โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 60 นาที โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Biolabs®) ย้อมเจลในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและบันทึกภาพ

การบรรจุพลาสมิดสายผสม (binary vector) เข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ด้วยวิธี electroporation และตรวจสอบความถูกต้อง โดยเลี้ยงโคลนของเชื้อ *E. coli* ซึ่งบรรจุพลาสมิดที่ถูกต้องในอาหารเหลวสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นานข้ามคืน แล้วจึงสกัดพลาสมิดที่ต้องการโดยวิธีของ QIAprep Purification of Plasmid DNA Miniprep (QIAGEN) (ภาคผนวก ข)

นำสารละลายพลาสมิดบริสุทธิ์ที่สกัดได้ 1 ไมโครลิตร ผสมกับ competent cell ของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งทิ้งไว้ 2-3 นาที ย้ายส่วนผสมลงใน cuvette ที่แช่เย็นไว้แล้ว ให้ส่วนผสมอยู่ก้นหลอด เช็ด cuvette ให้แห้งแล้วใส่ในช่องสำหรับผ่านกระแสไฟฟ้าของเครื่อง Gene Pulser (Bio-Rad®) โดยตั้งค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (voltage) 2.5 กิโลโวลต์ ความจุไฟฟ้า (capacitance) 25 ไมโครฟารัด ค่าความต้านทาน (resistance) 600 โอห์ม และใช้ระยะเวลา 4.7 มิลลิวินาที เมื่อให้กระแสไฟฟ้าแล้วรีบดึง cuvette ออก แล้วเติมอาหารเหลว LB แช่เย็น ลงใน cuvette ผสมอาหารให้เข้ากับเซลล์อย่างรวดเร็ว แล้วย้ายส่วนผสมลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งไป โดยให้เหลืออยู่ในหลอดประมาณ 200 ไมโครลิตร เขย่าให้ตะกอนเซลล์แขวนลอยออกมา จากนั้นดูดสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 5 ไมโครลิตรนำไปเกลี่ยบนผิวหน้าของอาหารแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 2-3 วัน เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว

ตรวจสอบโคลนของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่บรรจุพลาสมิดที่ถูกต้องโดยคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมาแยกสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAprep Purification of of plasmid DNA miniprep (QIAGEN) (ภาคผนวก ข) แล้วตรวจสอบด้วย 2 วิธี คือการตรวจสอบโดยเทคนิค PCR เพื่อนำมาตรวจหายีน *CPACO* antisense และ ยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin (*hpt*) โดยใช้วิธีการเดียวกับการสังเคราะห์ยีน *CPACO* antisense ที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น และวิธีการที่ 2 คือตรวจสอบโดยวิธี restriction digestion analysis ด้วยการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะต่าง ๆ

ตารางที่ 1 เอนไซม์ตัดจำเพาะและบัฟเฟอร์ที่ใช้เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิด pCAMBIA 1301a*ACO1* และ pCAMBIA 13121a*ACO*2 จากเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน

ปฏิกิริยา	พลาสมิด			
	pCAMBIA 1301a*ACO1*		pCAMBIA 13121a*ACO2*	
	เอนไซม์	บัฟเฟอร์	เอนไซม์	บัฟเฟอร์
ปฏิกิริยาที่ 1	*Nhe*I	Y^+/Tango (Fermentas)	*Xba*I และ *Sac*I	NEB buffer 4
ปฏิกิริยาที่ 2	*Xho*I	NEB buffer 2	*Xho*I	NEB buffer 2
ปฏิกิริยาที่ 3	*Pst*I	NEB buffer 3	*Hin*dIII และ *EcoR*I	R^+ (Fermentas)
ปฏิกิริยาที่ 4	*Nco*I และ *Nhe*I	Y^+/Tango (Fermentas)	*Hin*dIII	R^+ (Fermentas)
ปฏิกิริยาที่ 5	*Hin*dIII	R^+ (Fermentas)		

3.2 การถ่ายยีน antisense ของ *CPACO1* และ *CPACO2* เข้าสู่ tTCLs ของกล้วยไม้สกุลหวายโดยเทคนิค SAAT

การถ่ายยีน antisense ของ *CPACO1*และ *CPACO2* เข้าสู่ tTCLs ของกล้วยไม้สกุลหวายโดยเทคนิค SAAT ได้แสดงขั้นตอนโดยสรุปดังนี้

เตรียมเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่บรรจุพลาสมิด pCAMBIA 13121a*ACO1* และ pCAMBIA 13121a*ACO2* โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงและเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อเช่นเดียวกับการเตรียมในข้อ 2.2 โดยเจือจางเชื้อให้เข้มข้นประมาณ 5.0 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

การเตรียมเนื้อเยื่อเป้าหมายหรือ tTCLs จาก PLBs ของกล้วยไม้สำหรับการถ่ายยีน เริ่มจากการเลี้ยง PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวาย 2 พันธุ์คือ บอม17 และ เอียสกุล ในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ จากนั้นตัด PLBs ตามขวาง (tTLCs) ให้มีความหนาประมาณ 2 มิลลิเมตร แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว VW บนเครื่องเขย่า (pre-culture) นาน 3 วัน ในสภาพเพาะเลี้ยงเดิม จากนั้นสร้างบาดแผลขนาดเล็กโดยวิธี sonication เนื้อเยื่อเป้าหมายนาน 6 วินาที

ถ่ายยีนเข้าสู่ tTCLs ของกล้วยไม้สกุลหวาย โดยเลี้ยง tTCLs ที่ pre-culture แล้วร่วมกับเซลล์แขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* นาน 60 นาที บนเครื่องเขย่า ซับเชื้อ *A. tumefaciens* ส่วนเกินบนกระดาษซับนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ในที่มืด (co-cultivation) นาน 2 วัน จากนั้นกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* โดยการล้างด้วยอาหารเหลวVW ที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime 500 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 30 นาที แล้วจึงนำ tTCLs ไปคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนและกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* บนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติมสารปฏิชีวนะ 2 ชนิดคือ hygromycin 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วจึงคัดเลือกในอาหารคัดเลือกเหลวโดยใช้สูตรเดิมต่ออีก 8 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองโดยบันทึกจำนวน tTCLs ที่สามารถชักนำให้เกิด PLBs ใหม่ได้บนอาหารคัดเลือกเปรียบเทียบกับจำนวน tTCL ทั้งหมดที่ใช้ถ่ายยีน โดยบันทึกหลังการคัดเลือกนาน 12 สัปดาห์

หลังคัดเลือกจึงชักนำให้ PLBs ที่เกิดใหม่บนอาหารคัดเลือกซึ่งคาดว่าได้รับการถ่ายยีนให้เกิดเป็นต้นอ่อน โดยเพาะเลี้ยง PLBs ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนบนอาหารชักนำต้นอ่อนสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ มันฝรั่งบด 15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านกำมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 8 สัปดาห์ แล้วจึงชักนำให้เป็นต้นที่มีรากสมบูรณ์บนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านกำมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 12-16 สัปดาห์

3.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR dot blot hybridization และ Southern blot hybridization

หลังจากชักนำให้ต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการคัดเลือกให้เป็นต้นที่สมบรูณ์แล้ว ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนโดยเทคนิค PCR ในขั้นแรกแล้วคัดเลือกสายต้นที่ให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก นำมาตรวจสอบอีกครั้งโดยวิธี dot blot hybridization และ Southern blot hybridization โดยสกัดยีโนมิคดีเอ็นเอ จากใบกล้วยไม้ที่ได้จากต้นที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนและจากต้นปกติที่มีอายุประมาณ 5-6 เดือน โดยดัดแปลงจากวิธี CTAB (Doyle and Doyle, 1990) ซึ่งได้กล่าวแล้วในข้อ 2.5

3.3.1 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *hpt* ในกล้วยไม้โดยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจหายีน *hpt* โดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *hpt* คือไพรเมอร์ HPT-2F (forward) และไพรเมอร์ HPT-2Rv (reverse) ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้วจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 800 คู่เบส ซึ่งการตรวจหายีนใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 250μM dNTP, 0.125 μM forward primer, 0.125 μM reverse primer และ 0.5U*Taq* DNA polymerase แล้วเติมดีเอ็นเอต้นแบบประมาณ 50-100 นาโนกรัม (สำหรับดีเอ็นเอจากกล้วยไม้) หรือ 0.5-1 นาโนกรัม (สำหรับพลาสมิดดีเอ็นเอ) นำไปใส่เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ Perkin Elmer 2400 โดยใช้โปรแกรมดังนี้

initial pcr activation step	ที่ 96 °ซ นาน 3 นาที
3 step cycling จำนวน 35 รอบ	
denature	ที่ 96 °ซ นาน 20 วินาที
annealing	ที่ 55 °ซ นาน 60 วินาที
extension	ที่ 72 °ซ นาน 60 วินาที
final extension	ที่ 72 °ซ นาน 5 นาที

ตรวจสอบผล PCR ที่ได้โดยการทำอิเลคโตรโฟรีซีสบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซนต์ ใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ นาน 40 นาที ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA

ladder marker ย้อมเจลในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกภาพ

3.2.2 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *hpt* ในกล้วยไม้โดยเทคนิค dot blot hybridization

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนโดยเทคนิค dot blot hybridization ประกอบด้วยหลายขั้นตอนได้แก่ การเตรียมและติดฉลากดีเอ็นเอตัวตรวจสอบยีน *hpt* การเตรียม DNA blot และการ hybridization ซึ่งแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้

การเตรียมและติดฉลากดีเอ็นเอตัวตรวจสอบยีน *hpt* โดยเตรียมดีเอ็นเอของยีน *hpt* เพื่อใช้เป็นต้นแบบสำหรับเตรียมตัวตรวจสอบยีน *hpt* ที่ติดฉลากด้วยสารไร้รังสี digoxigenin โดยใช้ PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science) ซึ่งทำได้โดยการตัดยีน *hpt* ออกจากพลาสมิด pCAMBIA 1300 ด้วยเอนไซม์ *Xho*I (Biolab) 5 ยูนิต ในปฏิกิริยารวม 30 ไมโครลิตร ที่มีดีเอ็นเออยู่ 4 ไมโครกรัม และ 1X buffer NEBbuffer 2 บ่มปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง แบ่งส่วนผสมมาวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอของยีน *hpt* (ขนาด 1,094 คู่เบส) ที่ย่อยได้ด้วยเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE แล้วตัดเจลที่มีแถบดีเอ็นเอของยีน *hpt* นำมาสกัดยีน *hpt* ออกจากเจลโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) แล้วติดฉลากดีเอ็นเอของยีน *hpt* ที่เตรียมได้ด้วย PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science) ใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *hpt* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *hpt* ซึ่งได้แก่ ไพรเมอร์ HPT-2F (forward) และ HPT-2Rv (reverse) โดยใช้ DIG-dUTP แทน dTTP เติมส่วนผสมสำหรับเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ขั้นตอนและส่วนผสมเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1 โดยปรับส่วนผสมของปฏิกิริยาให้มีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE และหากยังไม่นำไปทำไฮบริไดเซชันทันทีสามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

การเตรียม DNA blot โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัวอย่างละ 2 ไมโครกรัม นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5-10 นาที เพื่อแยกดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยวแล้วนำขึ้นมาแช่ในน้ำแข็งทันทีต่อจาก นั้นนำไปหยดลงบนแผ่นไนล่อนเมมเบรน ตากทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วจึงนำแผ่นไนล่อนเมมเบรนไปฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 3 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอไว้กับแผ่นไนล่อนเมมเบรน ต่อไปนำแผ่นไนล่อนเมมเบรนมา hybridization โดยใช้กระบวนการเดียวกับวิธี hybridization ในข้อ 2.5.2 แต่เปลี่ยนดีเอ็นเอตัวตรวจสอบเป็นชิ้นส่วนของยีน *hpt* ขนาด 800 bp

3.3.3 การตรวจสอบการมีอยู่และจำนวนชุดของยีน *hpt* ในกล้วยไม้โดยเทคนิค Southern blot hybridization

สกัดยีโนมิคดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ที่ได้จากต้นที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนและจากต้นปกติที่มีอายุประมาณ 5-6 เดือน โดยดัดแปลงจากวิธี CTAB (Doyle and Doyle, 1990) โดยเตรียมสารละลาย CTAB extraction buffer (2% CTAB, 2% PVP, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2% (v/v) α-mercaptoethanol) และตัดใบกล้วยไม้หนักประมาณ 0.7-1.0 กรัม บดในไนโตรเจนเหลวจนให้ละเอียดเป็นผงในโกร่ง รีบตักเนื้อเยื่อใส่ในหลอดแก้วขนาด 20 มิลลิลิตร ที่มี CTAB extraction buffer ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที จากนั้นเปลี่ยนใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนใส่หลอดเซนตริฟิวส์ใหม่ เติมส่วนผสมของ phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาณ 12 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมานาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10-15 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนประมาณ 12 มิลลิลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม Rnase (DNAse-free) (US Biological, USA) ปริมาณ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของปริมาตรส่วนใส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที แล้วเติมส่วนผสมของ phenol : chloroform : isoamyl alcohol ประมาณ 12 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมา นาน 5 นาที หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนใสข้างบนใส่หลอดใหม่ เติม 3M sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใสที่ได้ และเติม isopropanol (แช่เย็นที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมาแล้วบ่มที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอธานอล 70% ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (1 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 250-300 ไมโครลิตร ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร ทำการอิเลคโตรโฟรีซีสบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซนต์ใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ นาน 40 นาที ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA marker ย้อมเจลในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและบันทึกภาพ เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการตรวจสอบการมีอยู่ของยีนต่อไป

การย่อยดีเอ็นเอกล้วยไม้ด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะ *Hin*dIII โดยใช้ดีเอ็นเอ ประมาณ 15 ไมโครกรัม แล้วทำอิเลคโตรโฟรีซีสบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซนต์ ใช้กระแสไฟ 50 โวลต์ ใน

บัฟเฟอร์ 0.5X TBE เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Biolabs®) นานประมาณ 12 ชั่วโมง ย้อมเจลในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและบันทึกภาพ

การเตรียมดีเอ็นเอในเจลให้เป็นสายเดี่ยวและการย้ายดีเอ็นเอไปยังไนล่อนเมมเบรน โดยแช่เจลที่มีดีเอ็นเอในสารละลาย depurination (0.25 M HCl) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า (rocker) นาน 20 นาที ล้างเจลด้วยน้ำดีไอออนไนซ์นึ่งฆ่าเชื้อ แช่เจลในสารละลาย denaturation (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า นาน 15 นาทีทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกหนึ่งรอบ ล้างเจลด้วยน้ำดีไอออนไนซ์นึ่งฆ่าเชื้อ แช่เจลในสารละลาย neutralization (0.5 M Tris-HCL pH 7.5, 1.5 M NaCl) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า นาน 15 นาทีทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกหนึ่งรอบ แล้วแช่เจลในสารละลาย 10 X SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M Na-citrate ; pH 7.0) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นาน 10 นาที แล้วจึงย้ายดีเอ็นเอจากเจลไปยังแผ่นไนล่อนเมมเบรน จัดชุดทดลองโดยวางองค์ประกอบเป็นชั้น ซึ่งชั้นแรกวางเจลบนกระดาษ 3MM ที่ชุมไปด้วย 10 X SSC ทำเป็นสะพานซึ่งได้วางในอ่างที่มีสารละลาย 10 X SSC แล้ววางแผ่นไนล่อนเมมเบรน ขนาดเท่ากับเจลให้พอดีกับเจล ชั้นต่อมาวางกระดาษ 3MM จำนวน 3 แผ่นบนไนล่อนเมมเบรน แล้ววางกระดาษซับหลายชั้นจนมีความหนาประมาณ 20 เซนติเมตร ในชั้นสุดท้ายวางวัตถุที่มีน้ำหนักประมาณ 500 กรัม ใช้เวลาการย้ายดีเอ็นเอไปยังแผ่นไนล่อนเมมเบรน นาน 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแยกแผ่นไนล่อนเมมเบรน ที่มีดีเอ็นเอออกมาจากเจล แล้วแช่แผ่นไนล่อนเมมเบรน ในสารละลาย 2 X SSC นาน 5 นาที ผึ่งแผ่นไนล่อนเมมเบรนให้แห้ง แล้วจึงอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เพื่อตรึงดีเอ็นเอไว้กับแผ่นไนล่อนเมมเบรน ต่อไปนำแผ่นไนล่อนเมมเบรนมา hybridization โดยใช้กระบวนการเดียวกับวิธี hybridization ในข้อ 2.5.2 แต่เปลี่ยนดีเอ็นเอตัวตรวจสอบเป็นชิ้นส่วนของยีน *hpt* ขนาด 800 bp

3.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับกิจกรรมของเอนไซม์ และการผลิตเอทิลีน

3.4.1 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACO ของต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน *ACO* แบบ antisense

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACO ใช้วิธีดัดแปลงจากวิธีการของ Virezen *et al.* (1999) โดยใช้ใบจาก mericlone ของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีน สายต้นละ 4 ต้น ที่ได้เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 8 เดือน โดยใช้ใบกล้วยไม้น้ำหนัก 0.5 กรัม บดในไนโตรเจนเหลวจนเป็นผง เติม ACO extraction buffer (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน เทใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซสเซียส นาน 10 นาที แยกส่วนใสปริมาตร 700 ไมโครลิตร ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ เพื่อนำไปใช้ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACO และวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Bradford protein assay (Bradford, 1976) (ภาคผนวก ข)

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACO โดยเติมโปรตีนที่สกัดได้ปริมาตร 200 ไมโครลิตรในสารละลาย incubation buffer (ภาคผนวก ก) 1.7 มิลลิลิตร สารประกอบ ACC ความเข้มข้น 80 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 50 ไมโครลิตร $FeSO_4$ ความเข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 50 ไมโครลิตร และ $NaHCO_3$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณ 100 ไมโครลิตรซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วขนาด 9 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วเก็บแก๊สบริเวณที่อยู่เหนือสารละลาย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกฉีดยาที่ใช้เข็มขนาด 24 G แล้วฉีดเข้าใน column ของเครื่อง gas chromatography รุ่น Shimadza GC 8A เพื่อวัดปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยน 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) ที่ให้จากภายนอกโดยเอนไซม์ ACO จากใบกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน

การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Bradford protein assay (Bradford, 1976) โดยใช้โปรตีนที่สกัดได้ข้างต้นปริมาตร 100 ไมโครลิตรเติมในสารละลาย Bradford working solution (เจือจาง Bradford stock solution 15 มิลลิลิตรต่อน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 85 มิลลิลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันทีด้วย vortex ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร คำนวณปริมาณโปรตีนเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

3.4.2 การวัดปริมาณเอทิลีนของต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน *ACO* แบบ antisense

การวัดปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อของกล้วยไม้ใช้วิธีการดัดแปลงจาก Bolitho *et al*. (1997) วัดปริมาณการสร้างเอทิลีนจากต้นกล้วยไม้ที่เป็น mericlone ของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีน สายต้นละ 4 ต้น ซึ่งได้เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 8 เดือน โดยย้ายต้นกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อออกมา ล้างวุ้นออกจากราก ซับน้ำออกให้แห้ง ชั่งน้ำหนักสด แล้วย้ายต้นกล้วยไม้ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 4 ออนซ์ ที่มีวุ้นปริมาตร 20 มิลลิลิตรเพื่อช่วยยึดต้นและป้องกันการขาดน้ำในต้นกล้วยไม้ ปิดด้วยฝาขวดซึ่งเจาะรูและปิดด้วยแผ่นยาง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง แล้วเก็บแก๊สบริเวณที่ว่างในขวด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกฉีดยาที่ใช้เข็มขนาด 24 G แล้วฉีดเข้าใน column ของเครื่อง gas chromatography รุ่น Shimadza GC 8A เพื่อวัดปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นโดยตรงจากต้นกล้วยไม้

9. <u>สถานที่ทดลอง</u>

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน และห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและการถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม

10. <u>ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง</u>

เดือนมีนาคม พ.ศ. 2545 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2549