# ผลและวิจารณ์

## 1. <u>การทดสอบปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้</u>

จากการเพาะเลี้ยง PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 เพื่อเพิ่มจำนวน PLBs ให้เพียงพอเพื่อใช้ในการถ่ายยีน โดยเลี้ยง PLBs ในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงนาน 4-6 สัปดาห์ พบว่า PLBs เพิ่มขึ้นประมาณ 5 เท่า แต่ PLBs มีขนาดไม่สม่ำเสมอ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วงประมาณ 1-6 มิลลิเมตร PLBs ที่มีขนาดเล็กจะมีสีเขียวอ่อน ส่วน PLBs ขนาดใหญ่จะมีสีเหลือง และมีบางส่วนขาวซีดหรือเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 9 ก) และยังพบว่า PLBs สร้างสารประกอบฟีนอลลิกมากขึ้นโดยสังเกตได้จากคราบสีน้ำตาลที่พบในขวดเพาะเลี้ยง ซึ่งลักษณะที่ไม่สม่ำเสมอดังกล่าวนี้จะส่งผลต่อเนื่องถึงประสิทธิภาพการถ่ายยีนในขั้นตอนต่อไป จึงได้ทดลองปรับปริมาณน้ำตาลในอาการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ PLBs ที่มีลักษณะสม่ำเสมอสำหรับนำไปใช้ในการถ่ายยีน

### 1.1 การทดสอบปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณ PLBs ของกล้วยไม้

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า PLBs ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการถ่ายยีนควรมีลักษณะกลมหรือรี ขนาดประมาณ 3-5 มิลลิเมตร มีสีเขียวอ่อนจนถึงสีเขียวเข้ม (Belarmino and Mii, 2000 ; Men *et al*., 2003 a,b) ดังนั้นผลจากการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณ PLBs ในขั้นตอนแรกนั้น PLBs ที่ได้จึงมีลักษณะที่ยังไม่เหมาะสมเพื่อใช้ในการถ่ายยีน จึงได้ทดลองเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยงโดยการเพาะเลี้ยง PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ใช้ PLBs เริ่มต้น 2 กรัมในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และ น้ำตาลซูโครส 0  1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ พบว่า PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากที่สุดคือ 8.73 มิลลิกรัม แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับ PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก 8.44 มิลลิกรัม) แต่ PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครส มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นน้อยที่สุดคือ 8.1 มิลลิกรัม (ตารางที่ 2)

นอกจากความแตกต่างในเรื่องน้ำหนักของ PLBs แล้วยังพบความแตกต่างด้านลักษณะอีกด้วย โดยพบว่าลักษณะของ PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดไม่สม่ำเสมอ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-6 มิลลิเมตร PLBs ขนาดเล็กจะมีสีเขียวอ่อน ส่วน

PLBs ขนาดใหญ่จะมีสีเหลือง และบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ส่วน PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดค่อนข้างสม่ำเสมอ มีสีเขียวอ่อน ลักษณะเป็นก้อนกลมหรือรี PLBs ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วงประมาณ 3-5 มิลลิเมตร บางส่วนมีการพัฒนาเป็นปลายยอดแหลมเล็กน้อย ส่วน PLBs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครส ส่วนใหญ่พัฒนาเป็นต้นอ่อน (ภาพที่ 9 ข) ซึ่งเป็นลักษณะที่คาดว่าไม่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีน

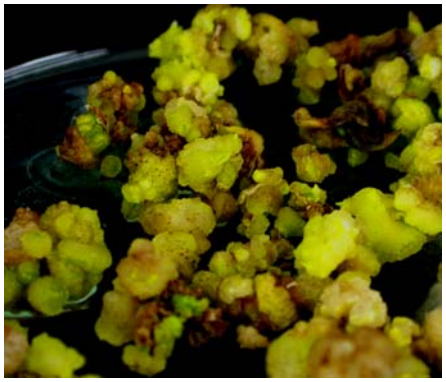
จากผลการทดลองนี้พบว่าในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์กระตุ้นให้มีการแบ่งเซลล์เกิดเป็น PLBs ใหม่ได้มากและรวดเร็ว แต่ PLBs ที่ได้มีขนาดไม่สม่ำเสมอ ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีรายงานว่าไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการถ่ายยีน แม้ว่ารายงานอื่น ๆ เหล่านั้นจะเตรียม PLBs ของกล้วยไม้เพื่อการถ่ายยีนโดยเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารเหลวที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกันก็ตาม (Belarmino and Mii, 2000 ; Yu *et al*., 2001 ; Men *et al*., 2003 a,b) สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากระตุ้นให้มีการแบ่งเซลล์และเกิดเป็น PLBs ใหม่ได้มากใกล้เคียงกับอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ แต่ PLBs ที่ได้มีขนาดสม่ำเสมอกว่า ทำให้มีลักษณะเหมาะสมที่จะใช้ในการถ่ายยีน ผลในลักษณะดังกล่าวนี้อาจเนื่องมาจากการที่อาหารเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลมากเกินไป มีผลทำให้ในอาหารมีแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) เพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจไม่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้บางสกุลหรือบางสายพันธุ์ ซึ่งข้อสันนิษฐานนี้มีรายงานสนับสนุนหลายรายงานเช่น Tokuhara and Mii (1993) Samoylov *et al*. (1998) และ Park *et al*. (2002)

ดังนั้นการเพาะเลี้ยง PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 เพื่อเพิ่มปริมาณให้มากพอและทำให้ PLBs มีลักษณะเหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการถ่ายยีนจึงควรเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ และคาดว่าวิธีการดังกล่าวน่าจะได้ผลเช่นเดียวกันกับกล้วยไม้พันธุ์ เอียสกุล ซึ่งเป็นพันธุ์ที่กลายมาจากพันธุ์ บอม17

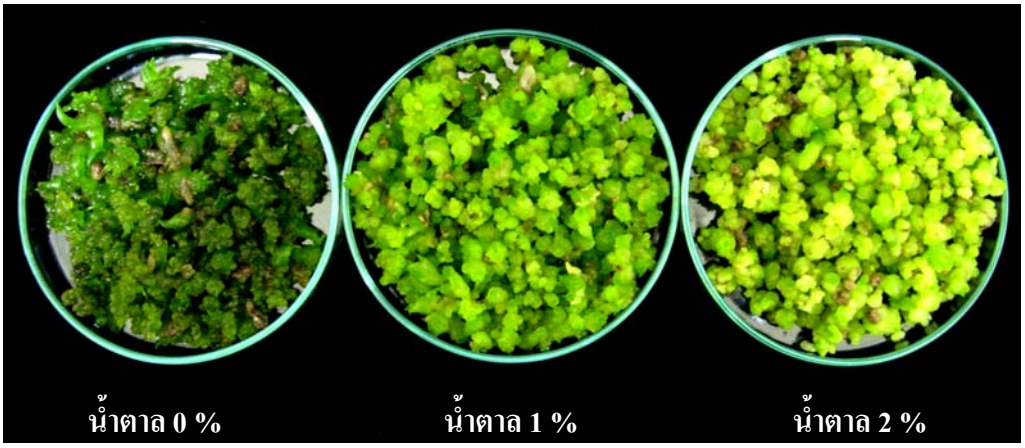
ตารางที่ 2 น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นของ PLBs กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 0 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ เครื่องเขย่า โดยใช้ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมง ต่อวันอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์

| ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยง (เปอร์เซ็นต์) | น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นของ PLBs (มิลลิกรัม) [1/] |
|---|---|
| 0 | 6.10 b |
| 1 | 8.44 a |
| 2 | 8.73 a |
| F-test | * |

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT



ก




ข

<u>ภาพที่ 9</u> ลักษณะ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง PLBs ใน อาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 3 ระดับ เพาะเลี้ยงในที่มีแสงประมาณ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

ก. ลักษณะของ PLBs หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ นาน 6 สัปดาห์

ข. ลักษณะของ PLBs หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครสในปริมาณที่แตกต่างกัน 3 ระดับ และเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ นาน 4 สัปดาห์

1.2 ทดสอบความหนาของ tTCLs (transversely thin cell layer) จาก PLBs ที่เหมาะสมสำหรับชักนำให้เกิด PLBs ใหม่ได้

การทดสอบความหนาของ tTCLs ที่ได้จาก PLBs เพื่อชักนำให้เกิด PLBs ใหม่ได้ในปริมาณมากและรวดเร็ว โดยใช้ PLBs ของกล้วยไม้หวายสกุลพันธุ์ บอม17 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์นาน 4 สัปดาห์ นำมาตัดตามขวางให้มีความหนา 3 ระดับคือ 0.5 1 และ 2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 10 ก) แล้วเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร 2 ชนิดคืออาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และ BA เข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบผลการทดลองด้วยการชั่งน้ำหนักสดและนับจำนวนชิ้นของ tTCL ที่สามารถเกิด PLBs ใหม่ได้ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบเฉพาะผลความหนาของชิ้น tTCL ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งต่อการเกิด PLBs ใหม่ พบว่า tTCL ที่ความหนา 2 มิลลิเมตร มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นมากที่สุด และเปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่เกิด PLBs ใหม่สูงที่สุดคือมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.015 กรัมต่อชิ้น และมีจำนวนชิ้นที่สามารถเกิด PLBs ใหม่ 26 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ tTCL ที่มีขนาดบางลงมีผลทำให้มีน้ำหนักเฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่เกิด PLBs ใหม่ลดลง โดยแปรผันตามความหนาของ tTCLs (ตารางที่ 3) สำหรับกรณีการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวนั้นให้ผลโดยรวมเป็นไปในทำนองเดียวกับการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง แต่มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่า โดยพบว่า tTCL ที่ความหนา 2 มิลลิเมตร มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้น และเปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่เกิด PLBs ใหม่สูงที่สุดคือมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 0.017 กรัมต่อชิ้น และมีจำนวนชิ้นที่สามารถเกิด PLBs ใหม่มากถึง 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วน tTCL ที่มีขนาด 1 และ 0.5 มิลลิเมตร มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นและจำนวนชิ้นที่เกิด PLBs ใหม่น้อยกว่า โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 0.012 และ 0.005 กรัม และเปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่เกิด PLBs ใหม่ที่ 26 และ 8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

จากรายงานการเลือกใช้ความหนาของชิ้น tTCL ที่เตรียมจาก PLBs เพื่อใช้ในการชักนำให้เกิด PLBs ใหม่ของกล้วยไม้สกุลหวายนั้นมีความแตกต่างกันเช่น 0.5 มิลลิเมตร (Nayak *et al.*, 2002) 1 มิลลิเมตร (Yu *et al.*, 2001) หรือ 3-5 มิลลิเมตร (Men *et al.*, 2003b) ในการทดลองนี้ได้เลือกทดสอบความหนาของชิ้น tTCL 3 ระดับคือ 0.5 1 และ 2 มิลลิเมตร เนื่องจาก PLBs เริ่มต้นมีความหนาเฉลี่ยประมาณ 2-3 มิลลิเมตร และจากผลการทดลองพบว่าชิ้น tTCL ที่ความหนา 2 มิลลิเมตร มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น และเปอร์เซ็นต์การเกิด PLBs ใหม่สูงกว่าความหนาอีก 2 ระดับ เนื่องจากความหนาของ PLBs ที่มากกว่าส่งผลให้มีอัตราการรอดชีวิตและประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็น PLBs ใหม่สูง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Duong *et al.* (2001) ที่ได้ทดสอบความหนา

ของ tTCL ของฐานรองดอกลิลลี่เพื่อชักนำให้เกิดยอด โดยได้ทดสอบความหนา 5 ระดับตั้งแต่ 1-5 มิลลิเมตร พบว่าความหนาของ tTCL ที่ 1 มิลลิเมตรมีอัตราการรอดชีวิตต่ำเพียง 15 เปอร์เซ็นต์ และมียอดเกิดขึ้นเพียง 10 ยอดต่อชิ้นในขณะที่ tTCL ที่ความหนา 2 มิลลิเมตรขึ้นไปมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้นมากคือ 80-100 เปอร์เซ็นต์ และมียอดเกิดขึ้นมากถึง 30-40 ยอดต่อชิ้น แต่อย่างไรก็ตาม tTCL ที่มีความหนา 5 มิลลิเมตร แม้ว่าจะมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ แต่มีจำนวนยอดเฉลี่ยลดลงเหลือเพียง 18 ยอดต่อชิ้น แสดงให้เห็นว่าความหนาของชิ้น tTCL ที่มากเกินไปไม่ส่งเสริมให้เกิดยอดมากขึ้น

เมื่อพิจารณาชนิดอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง tTCL ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 โดยเปรียบเทียบระหว่างอาหารแข็งและอาหารเหลวพบว่า tTCL ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้น และเปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่สามารถเกิด PLBs ใหม่ที่สูงกว่า tTCL ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งอย่างมาก (ตารางที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Nayak *et al*. (2002) และ Kanjilal *et al*. (1999) เนื่องจาก tTCL ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมีพื้นที่ในการสัมผัสอาหารได้ทั่วทั้งชิ้น จึงสามารถนำอาหารไปใช้ในการเจริญและพัฒนาเป็น PLBs ใหม่ได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (Arditti and Ernst, 1993)

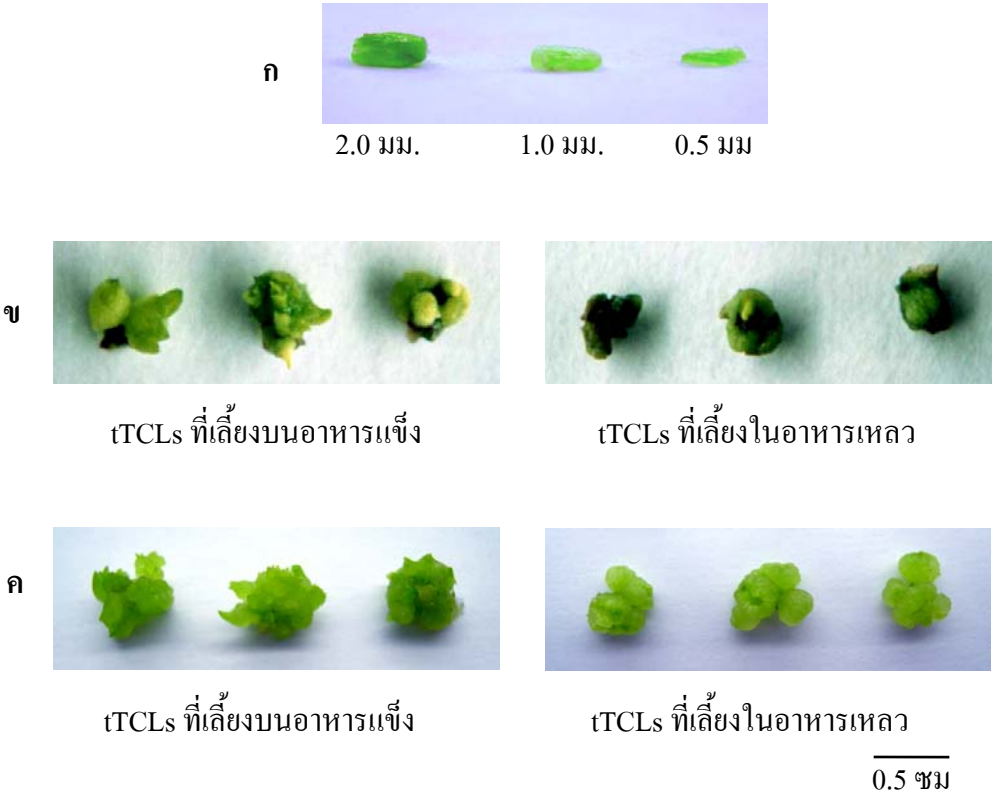
เมื่อสังเกตลักษณะของ PLBs ใหม่ที่เกิดจาก tTCLs ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร 2 ชนิดคืออาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และ BA เข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ พบว่า tTCL ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสามารถสร้าง PLBs ที่มีสีเขียวเข้มและเริ่มพัฒนาเป็นยอดใหม่ ทั้งนี้เนื่องจากการพัฒนาเป็นยอดหรือเป็นต้นใหม่ต้องมีทิศทางที่แน่นอนในการกำหนดให้เป็นยอดและราก ซึ่งโดยทั่วไปแล้วการชักนำให้ PLBs ที่เกิดเป็นยอดใหม่นิยมเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (Arditti and Ernst, 1993) แต่ tTCL ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมีการสร้าง PLBs ใหม่มีสีเขียวลักษณะกลม และไม่มีแนวโน้มพัฒนาเป็นยอด (ภาพที่ 10 ข) ดังนั้นการเตรียมเนื้อเยื่อที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนในกล้วยไม้สกุลหวายควรตัด PLBs ตามขวางให้มีความหนา 2 มิลลิเมตร เพื่อใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการถ่ายยีน ส่วนในขั้นตอนของการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนควรเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อให้ tTCL ได้สัมผัสกับอาหารและสารปฏิชีวนะได้ทั่วถึง เพื่อเพิ่มโอกาสของการเกิด PLBs ใหม่ แล้วจึงย้าย PLBs มาเลี้ยงบนอาหารแข็งเพื่อชักนำให้เกิดยอดและต้นใหม่

อย่างไรก็ตาม แม้จะพบว่าการใช้ tTCLs ที่มีความหนา 2 มิลลิเมตร มีความเหมาะสมที่สุด แต่ลักษณะที่คล้ายกันของ PLBs ที่พบในอาหารทั้งสองชนิดคือการเกิดคราบสีดำบน PLBs และมีเนื้อเยื่อบางส่วนตาย และพบว่าชิ้น tTCLs ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งปล่อยสารสีดำออกมารอบ ๆ ชิ้น ซึ่งคาดว่าอาจเกิดจากสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงกระตุ้นให้ PLBs ที่เกิดบาดแผลสร้างสารประกอบฟีนอลลิกมากเกินไป ทำให้การเจริญเติบโตของ PLBs ไม่ดี (Roy and Banerjee, 2003 ; Ket *et al*., 2004) และสืบเนื่องจากผลการทดลองในข้อ 1.1 ซึ่งพบว่าการเพาะเลี้ยง PLBs ในอาหารที่เติมซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เนื้อเยื่อบางส่วนตายและเกิดคราบสีดำ จึงได้ทดลองเพาะเลี้ยงชิ้น tTCLs ที่มีความหนา 2 มิลลิเมตรด้วยอาหารแข็งและเหลวสูตร VW ที่ลดปริมาณน้ำตาลลงเหลือ 1 เปอร์เซ็นต์ และไม่เติม BA ซึ่งผลที่ได้พบว่า tTCLs สารมารถสร้าง PLBs ใหม่ได้ดีโดย PLBs มีสีเขียวเข้มถึงสีเขียวอ่อน ไม่พบการตายของเนื้อเยื่อ รวมทั้งไม่พบคราบสีดำบนผิว PLBs อีกด้วย (ภาพที่ 10 ค) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยงเพราะนอกจากสารควบคุมการเจริญเติบโตจะกระตุ้นให้พืชสร้างสารประกอบฟีนอลลิกมากเกินไปแล้ว ยังส่งผลให้เกิด somaclonal variation ได้มากขึ้น ซึ่งมีรายงานความผันแปรดังกล่าวในงานวิจัยหลายรายงานเช่น Chen and Chang (2000)  Roy and Banerjee (2003) และ Ket *et al*. (2004) เป็นต้น

ตารางที่3 น้ำหนัก PLBs ที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อชิ้น เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น และเปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่เกิด PLBs ใหม่เฉลี่ยของ tTCLs ที่ได้จาก PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร 2 ชนิดคืออาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร VW ที่เติม BA 5 ไมโครโมลาร์ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ pH 4.9 และเติมวุ้น 6.5 กรัมต่อลิตร สำหรับอาหารแข็ง เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 28 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์

| ชนิดของอาหาร | ความหนา tTCL (มม.) | น้ำหนัก PLBs ที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อชิ้น (กรัม)[1/] | เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น (%) | เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่เกิด PLBs ใหม่ (%)[1/] |
|---|---|---|---|---|
| อาหารแข็ง | 0.5 | 0.005 ± 0.01 b | 68.69 | 2c |
| | 1 | 0.012 ± 0.04 ab | 121.43 | 12c |
| | 2 | 0.015 ± 0.01 a | 127.85 | 26b |
| อาหารเหลว | 0.5 | 0.005 ± 0.01 b | 89.60 | 8c |
| | 1 | 0.012 ± 0.03 ab | 92.97 | 26b |
| | 2 | 0.017 ± 0.12 a | 107.09 | 60a |
| F-test | | * | | * |

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT




ภาพที่ 10 ลักษณะชิ้น tTCLs ที่ตัดให้มีความหนาแตกต่างกัน 3 ระดับ และ PLBs ใหม่ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง tTCLs ด้วยอาหารแข็งและเหลวสูตร VW ดัดแปลง ในห้องเพาะเลี้ยงที่ให้แสงประมาณ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์

ก. tTLC เริ่มต้นที่มีความหนา 2.0 1.0 และ 0.5 มิลลิเมตร

ข. tTCL ความหนา 2 มิลลิเมตรที่เกิด PLBs ใหม่ได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและเหลวสูตร VW ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 4 สัปดาห์

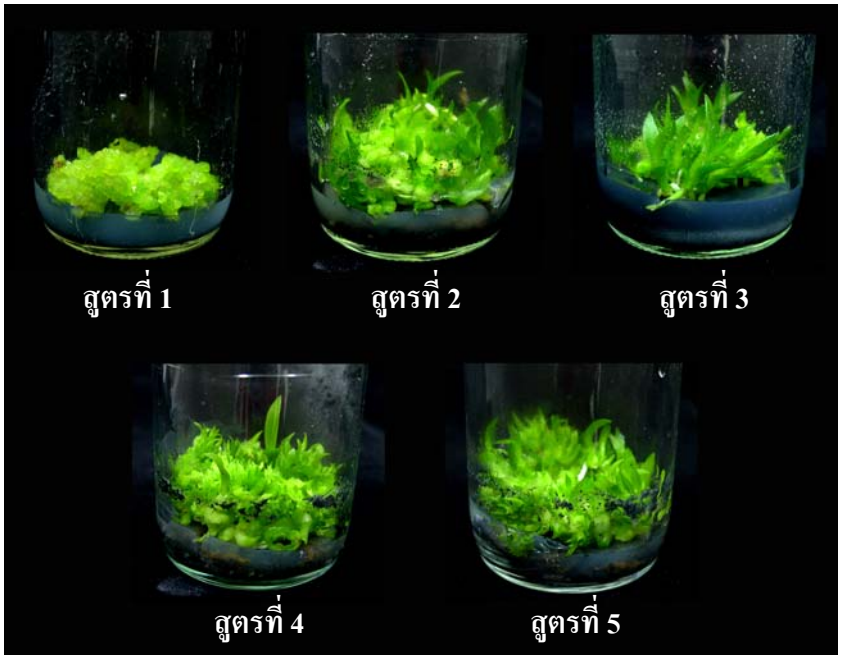
ค. tTCL ความหนา 2 มิลลิเมตรที่เกิด PLBs ใหม่ได้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและเหลวสูตร VW ที่เติม น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์

1.3 การชักนำให้ PLBs เจริญเป็นต้นอ่อน

โดยทั่วไปแล้วการชักนำให้ PLBs ของกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนเจริญเป็นต้นอ่อนทำได้โดยเพาะเลี้ยง PLBs บนอาหารแข็งโดยใช้สูตรอาหารเดิมที่ใช้ในการคัดเลือกเพียงแต่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ และสารควบคุมการเจริญใด ๆ และเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 1-2 เดือน (Knapp *et al*., 2000 ; Men *et al*., 2003 a,b ; Liau *et al*., 2003 a,b) แต่จากการทดลองเบื้องต้นของงานวิจัยนี้ได้ทดลองชักนำต้นอ่อนจาก PLBs ที่ได้ผ่านการคัดเลือกในอาหารสูตร VW ที่เติมสารปฏิชีวนะเป็นเวลา 3 เดือน โดยย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิมแต่ไม่เติมสารสารปฏิชีวนะอีกเป็นเวลา 2-3 เดือน พบว่าไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้ แต่ PLBs จะเพิ่มปริมาณเกิดเป็น PLBs ใหม่ได้มากขึ้นเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงต้องทดสอบสูตรอาหารเพื่อชักนำให้ PLBs ที่เกิดใหม่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนได้รวดเร็ว และได้ต้นอ่อนที่สมบูรณ์แข็งแรงจำนวนมาก ซึ่งวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้ PLBs พัฒนาเป็นต้นอ่อนทำได้หลายวิธี เช่นการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติมสารประกอบอินทรีย์ (organic complex additives) หลาย ๆ ชนิด เช่น มันฝรั่งบด กล้วยหอมบด และน้ำมะพร้าว (Lo *et al*., 2004) หรือเติมน้ำคั้นมันฝรั่ง น้ำคั้นข้าวโพด หรือ น้ำคั้นมะละกอ (Rahman *et al*., 2004) แต่โดยทั่วไปในปัจจุบันไม่นิยมใช้สารควบคุมการเจริญในการชักนำให้ PLBs พัฒนาเป็นต้นอ่อน (Tokuhara and Mii, 1993 ; Chen and Chang, 2000 ; Roy and Banerjee, 2003) เนื่องจากสารควบคุมการเจริญอาจเป็นสาเหตุให้เกิด somaclonal variation (Vajrabhaya, 1977) หรืออาจชักนำให้มีจำนวนชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้นได้ (Mishiba *et al*., 2001)

การทดสอบสูตรอาหารเพื่อชักนำให้เกิดต้นอ่อน ในการทดลองนี้ทำโดยเพาะเลี้ยง tTCLs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ที่มีความหนาประมาณ 2 มิลลิเมตร ในอาหารเหลวสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ นาน 4 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้ได้ PLBs จากนั้นนำ PLBs นี้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติมสารประกอบอินทรีย์แตกต่างกัน 5 สูตร โดยสารประกอบอินทรีย์ที่ใช้คือ มันฝรั่งบด กล้วยหอมบด หรือน้ำมะพร้าว นาน 8 สัปดาห์ เพื่อเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ PLBs เกิดเป็นต้นใหม่ได้รวดเร็วสม่ำเสมอ และได้ต้นที่สมบูรณ์ เปรียบเทียบผลการทดลองโดยสังเกตจากลักษณะ PLBs ที่เปลี่ยนแปลง และต้นที่เกิดขึ้นใหม่ จากผลการทดลอง (ภาพที่ 11) พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมคือสูตรอาหาร VW ที่เติมมันฝรั่งบด 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถชักนำให้ PLBs ส่วนใหญ่พัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ โดยต้นอ่อนมีขนาดใหญ่และมีรากเกือบทุกต้น ซึ่งเปรียบเทียบกับ PLBs ที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงทั่วไปคือสูตร VW ซึ่งเติมเฉพาะน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่า PLBs

เกิดเป็น PLBs ใหม่ได้จำนวนมาก แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้จาก PLBs เหล่านั้น ส่วนสูตรอาหาร VW ที่มีส่วนประกอบของกล้วยบดทั้ง 3 สูตร ให้ผลใกล้เคียงกันคือ สามารถชักนำให้ PLBs เกิดเป็นต้นใหม่ได้บางส่วน ต้นที่เกิดขึ้นใหม่บางต้นมีรากสมบูรณ์ แต่บางต้นมีเฉพาะยอด และ PLBs บางส่วนยังคงเพิ่มปริมาณเป็น PLBs ใหม่โดยไม่พัฒนาไปเป็นยอด จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เพื่อชักนำ ให้ PLBs ที่ได้รับการถ่ายยีนพัฒนาเป็นต้นอ่อน




ภาพที่ 11 ลักษณะ PLBs และต้นอ่อนของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง PLBs บนอาหารแข็งสูตร VW ดัดแปลงที่เติมสารประกอบอินทรีย์แตกต่างกัน 5 สูตร ในห้องเพาะเลี้ยงที่ให้แสงประมาณ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 8 สัปดาห์

สูตรที่ 1 อาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 2 อาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และกล้วยหอมสุกบด 15 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 3 อาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และมันฝรั่งบด 15 เปอร์เซ็นต์

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

สูตรที่ 5 อาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ กล้วยหอมสุกบด 5 เปอร์เซ็นต์ และมันฝรั่งบด 5 เปอร์เซ็นต์

**2. <u>ศึกษาระบบการถ่ายยีนที่เหมาะสมเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้</u>**

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

2.1 ทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่เหมาะสมเพื่อใช้คัดเลือกชิ้นส่วนของ PLBs ที่ได้รับการถ่ายยีน

ปัจจัยสำคัญในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชให้ประสบความสำเร็จปัจจัยหนึ่งคือ การคัดเลือกให้ได้เฉพาะเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนแบบถาวร ชนิดของสารเคมีที่ใช้คัดเลือกต้องสอดคล้องกับยีนคัดเลือกที่ใช้ และความเข้มข้นของสารคัดเลือกต้องเหมาะสมต่อชนิดและพันธุกรรมของพืช ถ้าใช้ความเข้มข้นของสารคัดเลือกน้อย อาจทำให้การคัดเลือกไม่มีประสิทธิภาพ เซลล์พืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนอาจอยู่รอดได้ ทำให้ได้ต้นพืชที่มีบางเซลล์หรือบางอวัยวะที่ไม่มียีนเป้าหมาย (variegated plants) แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นของสารคัดเลือกมากเกินไป อาจมีผลยับยั้งการพัฒนาเป็นต้นของพืช (Dekeyser *et al*., 1989)

ในปัจจุบันยีนคัดเลือกที่ได้รับความนิยมอย่างกว้างขว้างคือยีน *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*, *aph*-IV หรือ *hph*) เป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ hygromycin phosphotransferase (HPT) ซึ่งมีคุณสมบัติลดความเป็นพิษของสารปฏิชีวนะ hygromycin B สารปฏิชีวนะนี้เป็นสารในกลุ่ม aminogycoside ทำหน้าที่รบกวนการสังเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนการทำงานของไรโบโซม 70s ในสิ่งมีชีวิตทั้งที่เป็นโปรคาริโอต และยูคาริโอต (Calbiochem, 2005) การคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้สารปฏิชีวนะ hygromycin B ให้ผลการคัดเลือกที่แน่นอน สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์พืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้ทั้งหมด และไม่พบภาวะเผือก (albino) หรือได้ต้นถ่ายยีนที่เป็นหมัน (Hiei *et al*., 1997)

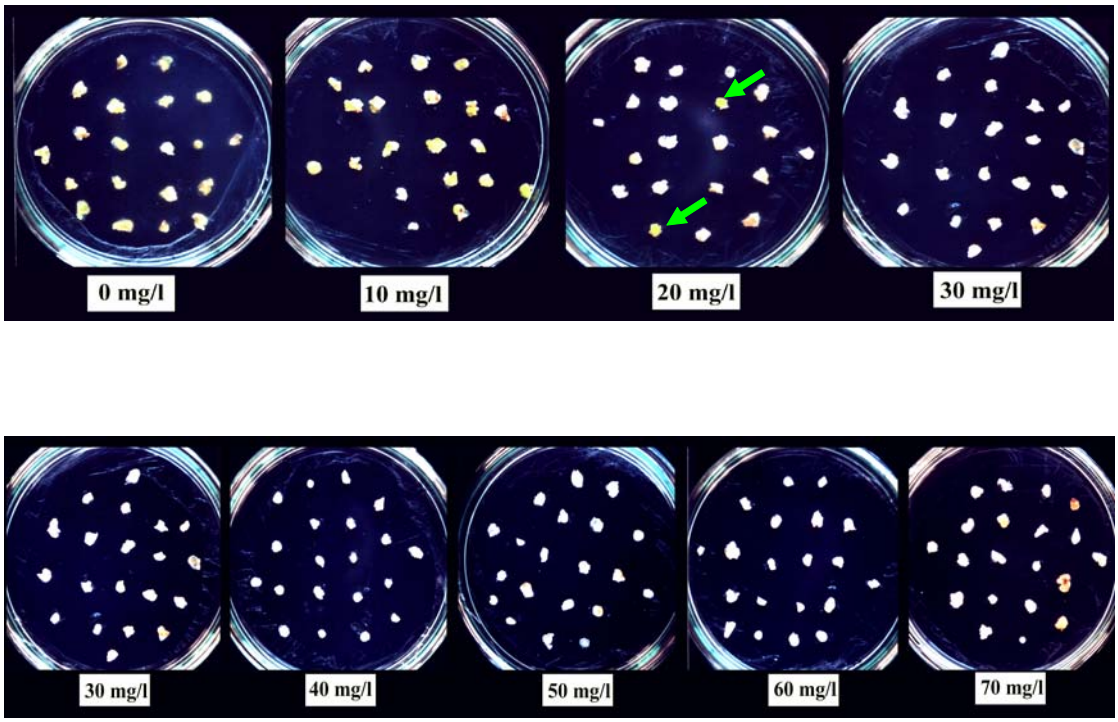
การทดลองนี้จึงได้ทดสอบความต้านทานของชิ้น tTCLs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล ที่มีต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin B โดยตัด PLBs ตามขวางหนา 2 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่ความเข้มข้น 7 ระดับตั้งแต่ 0-70 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้น tTCLs ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะบางชิ้นยังคงเขียวสดอยู่ บางชิ้นมี PLBs ใหม่เกิดขึ้น และมีบางชิ้นที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย โดยพบว่ามี tTCLs ตาย 47.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจากขนาดความหนาของ tTCLs ดังที่ได้อธิบายในการทดลองที่ 1 สำหรับชิ้น tTCLs ที่เพาะเลี้ยงบน

อาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B ความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การตายที่ 45 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนชิ้น tTCLs ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B ความเข้มข้นที่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไปทุกชิ้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือขาวซีด (ภาพที่ 12) โดยเริ่มแสดงอาการตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 หลังการคัดเลือก และมีเปอร์เซ็นต์การตาย 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) ดั้งนั้นความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่เหมาะสมในการใช้คัดเลือกคือ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถกำจัดเซลล์ของเนื้อเยื่อปกติได้หมด ความเข้มข้นดังกล่าวนี้สอดคล้องกับหลายรายงานที่ใช้สารปฏิชีวนะ hygromycin B เพื่อการคัดเลือกกล้วยไม้ในการถ่ายยีน (Men *et al*., 2003 a,b ; Liao *et al*., 2004)

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้น tTCL ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ เอียสกุล ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B ความเข้มข้นแตกต่างกัน 8 ระดับ ในห้องเพาะเลี้ยงที่ให้แสงประมาณ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์

| ความเข้มข้น hygromycin (มิลลิกรัมต่อลิตร) | เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้น tTCLs |
|---|---|
| 0 | 47.5 b |
| 10 | 45 b |
| 20 | 95 a |
| 30 | 100 a |
| 40 | 100 a |
| 50 | 100 a |
| 60 | 100 a |
| 70 | 100 a |
| F-test | * |

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT




ภาพที่ 12 ลักษณะของชิ้น tTCL ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ เอียสกุล ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B ความเข้มข้นแตกต่างกัน 8 ระดับ ในห้องเพาะเลี้ยงที่ให้แสงประมาณ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ (ศรชี้แสดงตัวอย่างชิ้น tTCLs ที่บางส่วนยังคงมีชีวิตอยู่)

2.2 ทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301 มียีน *hpt* เป็นยีนคัดเลือกโดยวิธีการคัดเลือกบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B

การถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะนั้นทำได้ยากกว่าการถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงคู่ ดังนั้นเพื่อให้การถ่ายยีนประสบความสำเร็จจึงจำเป็นต้องศึกษาระบบการถ่ายยีนที่เหมาะสมเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวาย โดยในการทดลองนี้ใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่บรรจุพลาสมิด pCAMBIA 1301 เพื่อให้ได้วิธีการที่ดีที่สุดโดยมียีน *hpt* เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อการคัดเลือก และยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล ในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนทั้งหมด 6 ปัจจัย โดยปัจจัยที่ 1 ถึง ปัจจัยที่ 5 ได้ทดลองใน PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ส่วนปัจจัยที่ 6 ได้ทดสอบกับ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ เอียสกุล เปรียบเทียบผลการทดลองโดยบันทึกจำนวนชิ้น tTCLs ที่สามารถเกิด PLBs ใหม่ได้บนอาหารคัดเลือกหลังจากคัดเลือกนาน 4 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์ ซึ่งแสดงถึงจำนวน PLBs ที่ยังคงมียีนอยู่อย่างถาวรและสามารถแสดงออกได้ดี (putative transformants)

การทดสอบแต่ละปัจจัยมีชุดควบคุม 2 ชุดได้แก่ ชุดควบคุมที่ 1 คือ การเพาะเลี้ยงชิ้น tTCLs ที่ปลูกด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* บนอาหารสูตร VW ที่เติมเฉพาะสารปฏิชีวนะ cefotaxime เพื่อกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* เท่านั้น โดยชุดควบคุมนี้ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของเนื้อเยื่อเป้าหมายในการชักนำให้เกิด PLBs ใหม่ได้ และวิธีการถ่ายยีนที่ใช้ไม่ส่งผลให้เนื้อเยื่อพืชตาย ซึ่ง tTCL ทุกชิ้นยังคงมีชีวิตอยู่และสามารถชักนำให้เกิด PLBs ใหม่ได้ (ภาพที่ 13 ก) ชุดควบคุมที่ 2 คือ การเพาะเลี้ยงชิ้น tTCLs ที่ไม่ผ่านกระบวนการถ่ายยีน บนอาหารสูตร VW ที่เติมปฏิชีวนะ hygromycin โดยชุดควบคุมนี้ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของสารคัดเลือกที่ใช้ในแต่ละชุดทดลอง ซึ่ง tTCLs ทุกชิ้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรนี้ควรเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายภายใน 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 13 ข) ชิ้น tTCLs ในการทดลองที่ผ่านกระบวนการถ่ายยีนและปนเปื้อนเชื้อ *A. tumefaciens* และเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin B และ cefotaxime นั้นควรมีบางส่วนของบางชิ้นเท่านั้นที่สามารถเกิด PLBs ใหม่บนอาหารคัดเลือกซึ่งคาดว่าเป็น PLBs ที่เกิดใหม่เหล่านั้นเป็น PLBs ที่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่ 13 ค) และจากผลของการทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนทั้ง 6 ปัจจัยให้ผลดังต่อไปนี้

- ปัจจัยที่ 1 ชนิดของอาหารคัดเลือกในช่วง 4 สัปดาห์แรกของการคัดเลือก

การคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนอย่างถาวรและกำจัดเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็นขั้นตอนสำคัญในการถ่ายยีนให้ประสบความสำเร็จ ซึ่งรายงานการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ส่วนใหญ่ใช้การคัดเลือกบนอาหารแข็งตลอดการคัดเลือก (Chai *et al*., 1994; Yu *et al*., 1999 ; Belarmino and Mii, 2000 ; Men *et al*., 2003 a,b ; Liau *et al*., 2003 a,b) แต่การเพาะเลี้ยง tTCL ในอาหารเหลวมีข้อดีที่เหนือกว่าการใช้อาหารแข็งคือมีพื้นที่ผิวในการสัมผัสอาหารได้ทั่วทั้งชิ้น สามารถนำอาหารไปใช้ในการเจริญและพัฒนาเป็น PLBs ใหม่ได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (Arditti and Ernst, 1993 ; Nayak *et al*.,2002 ; Kanjilal *et al*., 1999) ถ้าสามารถคัดเลือก tTCLs ในอาหารเหลวได้น่าจะทำให้การคัดเลือกมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น จึงได้ทดสอบชนิดของอาหารคัดเลือกในช่วง 4 สัปดาห์แรก โดยเปรียบเทียบระหว่างอาหารแข็งและอาหารเหลว จากผลการทดลองพบว่าหลังคัดเลือกนาน 4 สัปดาห์ tTCLs ที่คัดเลือกบนอาหารแข็งมีเปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่เกิด PLBs ใหม่ 16 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่า tTCLs ที่คัดเลือกในอาหารเหลว ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นที่เกิด PLBs ใหม่เพียง 6.25 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5)

การคัดเลือกชิ้น tTCLs ที่ยังอ่อนแอเนื่องจากผ่านกระบวนการถ่ายยีนแล้วคัดเลือกในอาหารเหลวอย่างกะทันหัน ทำให้เนื้อเยื่อได้รับความกระทบกระเทือนเพิ่มขึ้นเนื่องจากการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเนื่องจากเซลล์บอบช้ำมาก อาจทำให้เซลล์ที่ถึงแม้ได้รับการถ่ายยีนก็ไม่อาจแสดงความสามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะได้ ในขณะที่ชิ้น tTCLs ที่คัดเลือกบนอาหารแข็งไม่ได้รับความกระทบกระเทือนซ้ำเติม จึงช่วยทำให้เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถแสดงลักษณะต้านทานสารปฏิชีวนะและสามารถแบ่งเซลล์และพัฒนาเป็น PLBs ใหม่ได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

หลังจากคัดเลือกในช่วง 4 สัปดาห์แรกแล้วได้นำ tTCLs ที่สามารถเกิด PLBs ใหม่ได้ทั้งหมดมาคัดเลือกในช่วงที่ 2 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือกชนิดเหลวสูตรเดิมต่ออีก 8 สัปดาห์เพื่อคัดเลือกเฉพาะ PLBs ที่ยังคงมียีนอยู่อย่างถาวรและสามารถแสดงออกได้ดี ซึ่งปรากฏว่าให้ผลการแสดงออกสอดคล้องกับการคัดเลือกในช่วง 4 สัปดาห์แรกคือ tTCLs ที่ผ่านคัดเลือกช่วงแรกบนอาหารแข็งให้เปอร์เซ็นต์ putative transformants สูงกว่า tTCLs ที่ผ่านคัดเลือกช่วงแรกในอาหารเหลว คือการคัดเลือกในอาหารแข็งช่วงแรกมีเปอร์เซ็นต์ putative transformants เมื่อคัดเลือกนาน 4 สัปดาห์ที่ 4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการคัดเลือกช่วงแรกในอาหารเหลวมีเปอร์เซ็นต์ putative transformants เมื่อคัดเลือกนาน 12 สัปดาห์ ที่ 1 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7)

- ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลา pre-culture

วิธีการกระตุ้นเนื้อเยื่อพืชก่อนการถ่ายยีน (pre-culture) เพื่อกระตุ้นให้เนื้อเยื่อเป้าหมายตื่นตัวต่อการแบ่งเซลล์ ซึ่งเพิ่มโอกาสให้ยีนจากภายนอกเข้าไปสอดแทรกอยู่ในยีโนมได้มากขึ้นนั้น มีรายงานว่าใช้ได้ผลดีในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชหลายชนิด (Iida *et al*., 1990 ; Gallo-Meagher and Irvine, 1993) โดยเฉพาะในกล้วยไม้นั้นมีงานวิจัยของ Yang *et al.* (1999) ที่พบว่าปัจจัยสำคัญที่ทำให้การถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลซิมบิเดียมประสบความสำเร็จคือการ pre-culture ก่อนการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค และงานวิจัยของ Liau *et al*. (2003 a,b) ที่ได้ pre-culture โดยตัด PLBs เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร G 10 นาน 7 วัน ก่อนการถ่ายยีน ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการ pre-culture นั้นมีรายงานที่แตกต่างกันเช่น Yu *et al*. (2001) และ Men *et al*. (2003 a,b) ได้ใช้ระยะเวลา pre-culture นาน 2-3 วัน แต่อย่างไรก็ตามมีบางงานวิจัยที่ไม่ได้ pre-culture เนื้อเยื่อในอาหารเหลวก่อนการถ่ายยีนเลย (Knapp *et al*., 2000) ในงานวิจัยครั้งนี้จึงได้เปรียบเทียบระยะเวลา pre-culture ที่ 0 3 และ 6 วัน จากผลการทดลอง (ตารางที่ 5) พบว่าระยะเวลา pre-culture ที่ 3 วัน ให้เปอร์เซ็นต์ putative transformation เมื่อคัดเลือกนาน 4 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์สูงสุดที่ 26.04 และ 4.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนชิ้น tTCLs ที่ไม่ได้ pre-culture เลยไม่ประสบผลสำเร็จในการถ่ายยีน แต่ในกรณีของการ pre-culture นาน 6 วัน ที่พบว่าแม้จะมีเปอร์เซ็นต์ putative transformation เมื่อคัดเลือกนาน 4 สัปดาห์ ใกล้เคียงกับ การ pre-culture ที่ 3 วัน คือ 23.96 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มี putative transformant เกิดขึ้นเมื่อคัดเลือกนาน 12 สัปดาห์ ซึ่งอาจเกิดจากการ pre-culture ที่นานเกินไปทำให้ชิ้น tTCLs เกิดการสมานบาดแผลและสามารถสร้าง PLBs ใหม่ขึ้นมาได้ก่อนการถ่ายยีน และ PLBs ใหม่เมื่อไม่มีบาดแผลทำให้เชื้อ *A. tumefaciens* ไม่สามารถ infect เข้าไปได้ นอกจากนี้ชิ้น PLBs ใหม่ยังมีความต้านท้านต่อสารปฏิชีวนะมากกว่าชิ้น tTCLs อีกด้วย (Chai *et al*., 2002) ทำให้รอดชีวิตอยู่ได้นานเกินกว่า 4 สัปดาห์ ดังนั้นระยะเวลา pre-culture ที่เหมาะสมสำหรับกล้วยไม้สกุลหวายที่ทดสอบคือเพาะเลี้ยงชิ้น tTCLs ในอาหารเหลวนาน 3 วัน ซึ่งระยะเวลา pre-culture ที่เหมาะสมนี้จะช่วยกระจายและลดความเป็นพิษของสารประกอบฟีนอลลิกที่เกิดจากบาดแผลที่ถูกตัดในระยะแรก ทั้งยังกระตุ้นให้ชิ้น tTCLs ตื่นตัวต่อการแบ่งเซลล์ ซึ่งส่งผลให้การถ่ายยีนประสบความสำเร็จ (Yang *et al.*, 1999)

- ปัจจัยที่ 3 ระยะเวลา co-cultivation

การเลี้ยงเนื้อเยื่อเป้าหมายร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* (co-cultivation) ในระยะเวลาที่นานขึ้น มีรายงานว่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีน เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่มีกลไกการส่งถ่ายยีนจาก *A. tumefaciens* เข้าสู่เซลล์พืช (Belarmino and Mii, 2000) รายงานการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้โดย *A. tumefaciens* ส่วนใหญ่เลือกใช้ระยะเวลา co-cultivation ที่ 3 วัน ( Belarmino and Mii, 2000 ; Yu *et al*., 2001 ; Liau *et al*., 2003 a,b) แต่ Men *et al*. (2003 b) ใช้ระยะเวลา co-cultivation ที่ 2 วัน ในงานวิจัยครั้งนี้จึงได้ทดสอบระยะเวลา co-cultivation ที่ 2 และ 3 วัน จากผลการทดลอง (ตารางที่ 5) พบว่า ระยะเวลา co-cultivation ที่ 2 วัน ให้เปอร์เซ็นต์ putative transformation เมื่อคัดเลือกนาน 4 สัปดาห์ 26.04 เปอร์เซ็นต์ และ เปอร์เซ็นต์ putative transformants เมื่อคัดเลือกนาน 12 สัปดาห์ที่ 5.21 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่า ระยะเวลา co-cultivation ที่ 3 วัน ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์ putative transformation เมื่อคัดเลือกนาน 4 สัปดาห์เพียง 7.29 เปอร์เซ็นต์และไม่มี putative transformant เกิดขึ้นเมื่อคัดเลือกนาน 12 สัปดาห์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Men *et al*. (2003 b) ที่สามารถถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวาย *Den* ‘nobile’ โดยใช้ระยะเวลา co-cultivation 2 วัน ทั้งนี้การใช้ระยะเวลา co-cultivation ที่นานขึ้นอาจเกิดผลเสียจากเชื้อ *A. tumefaciens* ที่เจริญขึ้นคลุมชิ้น tTCLs มากเกินไปมีผลให้ความมีชีวิตของเนื้อเยื่อลดลง และทำให้การกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ทำได้ยากขึ้น ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงควรเลือกระยะเวลา co-cultivation ที่ 2 วัน ในการถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้น tTCLs ของกล้วยไม้สกุลหวาย

- ปัจจัยที่ 4 ความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens*

ความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ใช้มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนด้วยเช่นกัน ปริมาณเชื้อที่มากแม้ว่าจะทำให้เพิ่มโอกาสให้เซลล์พืชถูก *A. tumefaciens* เข้า infect ได้มากขึ้น แต่ปริมาณเชื้อที่มากเกินไปจะทำให้กำจัดได้ยาก และสามารถยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อ ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำลง (Lin *et al*., 1994) จึงจำเป็นต้องทดสอบหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ 0.5 1 2 5 และ 10 x $10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลการทดลอง (ตารางที่ 5) พบว่าความเข้มข้นที่ 5 x $10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ($OD_{600}$ ≈1) ให้เปอร์เซ็นต์ putative transformation เมื่อคัดเลือกนาน 4 สัปดาห์ได้สูงที่สุดคือ ที่ 27.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับ เปอร์เซ็นต์ putative transformants เมื่อคัดเลือกนาน 12 สัปดาห์ที่ได้สูงถึง 17.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับความเข้มข้นเชื้อ $10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนรองลงมาคือให้

เปอร์เซ็นต์ putative transformation เมื่อคัดเลือกนาน 4 สัปดาห์ที่ 21.25 เปอร์เซ็นต์และ เปอร์เซ็นต์ putative transformants เมื่อคัดเลือกนาน 12 สัปดาห์ที่ 1.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้นของเชื้อที่น้อยกว่า 5 x $10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำลงมาก ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับหลาย ๆ รายงานที่ใช้ความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* มีค่า $OD_{600}$ ในช่วง 0.8-1 ในการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้ (Men *et al*., 2003 b ; Liau *et al*., 2003 a,b) ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ 5 x $10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ($OD_{600} \approx 1$) ในการถ่ายยีนต่อไป

- ปัจจัยที่ 5 การสร้างบาดแผลขนาดเล็กโดยศึกษาระยะเวลาการ sonicate เนื้อเยื่อเป้าหมาย

การสร้างบาดแผลให้เนื้อเยื่อเป้าหมายเป็นปัจจัยสำคัญอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดย *A. tumefaciens* ประสบความสำเร็จ เพราะนอกจากจะกระตุ้นให้พืชปล่อยสารประกอบฟีนอลลิกที่เป็นประโยชน์ต่อกระบวนการส่งถ่ายยีนของ *A. tumefaciens* เข้าสู่นิวเคลียสของพืชซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญที่ทำให้ยีนเป้าหมายสามารถสอดแทรกเข้าสู่ยีโนมพืชได้ และการเกิดบาดแผลยังกระตุ้นให้พืชเกิดการแบ่งเซลล์ใหม่ (Binns and Thomashow, 1988) แต่ถ้าบาดแผลที่สร้างขึ้นได้ทำความเสียหายแก่เนื้อเยื่อเป้าหมายมากเกินไปพืชจะสร้างสารประกอบฟีนอลลิกออกมามากซึ่งอาจส่งผลให้ยับยั้งการแบ่งเซลล์ ทำให้พืชไม่สามารถฟื้นตัวใหม่ได้ การถ่ายยีนจึงไม่ประสบความสำเร็จ การสร้างบาดแผลขนาดเล็ก (micro-wounding) ให้กับเนื้อเยื่อเป้าหมายโดยเทคนิค sonication จะทำให้เกิดบาดแผลเป็นช่องเปิดขนาดเล็กจำนวนมาก ซึ่งส่งผลให้ *A. tumefaciens* มีพื้นที่ในการเข้า infect เนื้อเยื่อพืชได้มากกว่าการสร้างบาดแผลโดยการตัดเนื้อเยื่อ (Santarem *et al*., 1998) การใช้ sonication ร่วมกับการถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* นี้มีชื่อเรียกเฉพาะว่า sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation (SAAT) เทคนิคนี้นิยมใช้เพื่อการถ่ายยีนในถั่วเหลืองเป็นอย่างมาก (Trick and Finer,1997 ; Meurer *et al*., 1998 ; Finer and Finer, 2000) แต่ยังไม่พบรายงานการใช้เทคนิคนี้เพื่อการถ่ายยีนในกล้วยไม้ ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาระยะเวลา sonication ที่เหมาะสมโดยทดลองที่ 0 2 4 6 8 และ 10 วินาที ผลการทดลอง (ตารางที่ 5) พบว่าระยะเวลา sonication ที่ 6 วินาที ทำให้ชิ้น tTCLs เกิด PLBs ใหม่ ให้เปอร์เซ็นต์ putative transformation เมื่อคัดเลือกนาน 4 สัปดาห์ได้สูงที่สุดคือ 67 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์ putative transformants เมื่อคัดเลือกนาน 12 สัปดาห์ที่ 30 เปอร์เซ็นต์ สำหรับระยะเวลา sonication ที่ให้ผลรองลงมาคือ 4 และ 8 วินาที ตามลำดับ ส่วนระยะเวลา sonication ที่ 10 วินาที ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำที่สุด อาจเนื่องจากช่วงเวลาของการ sonication ที่นานเกินไปทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์พืชมากเกินไป เพราะโดยปกติการใช้เวลา sonication ที่เหมาะสมจะทำให้เกิดบาดแผลขนาดเล็ก ๆ บนเนื้อเยื่อพืช แต่

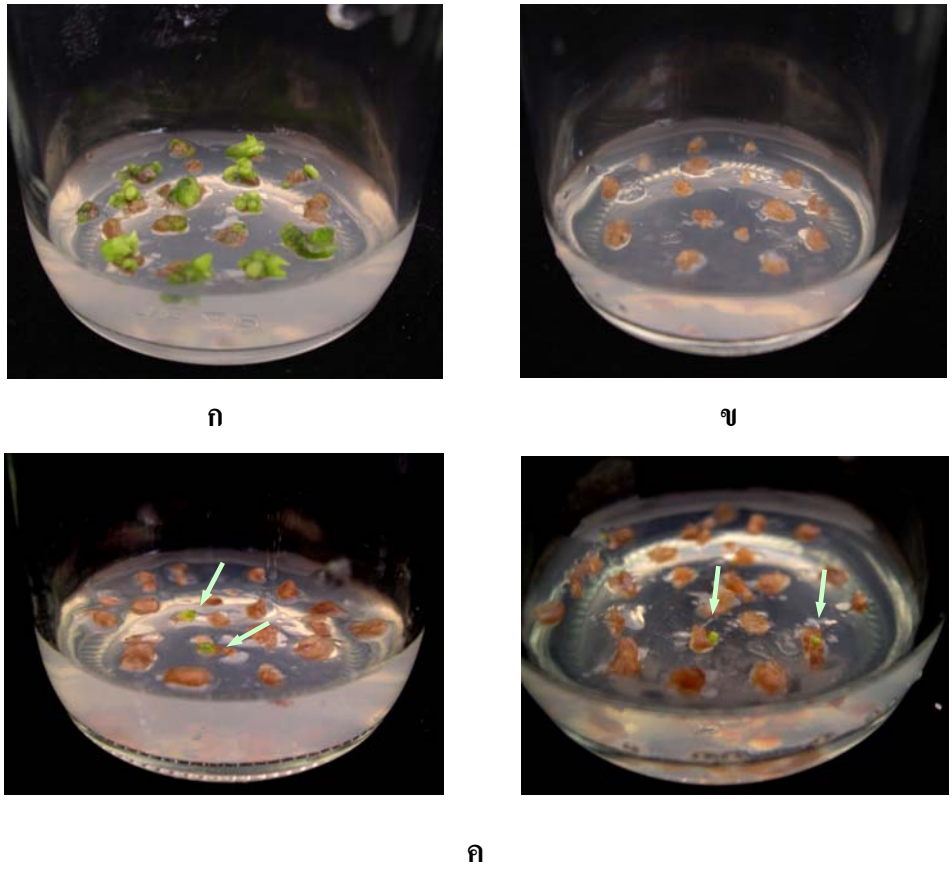
เซลล์พืชยังสามารถเจริญเติบโตได้ หากใช้เวลานานเกินไปก็จะส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์พืชที่รุนแรงขึ้นจนอาจถึงขั้นทำให้เซลล์พืชตาย กิจกรรมต่างๆภายในเซลล์หยุดลง (Santarem *et al*., 1998) ดังนั้นจึงเลือกใช้ความระยะเวลา sonication ที่ 6 วินาที ในการถ่ายยีนครั้งต่อไป

- ปัจจัยที่ 6 ความเข้มข้นของ acetosyringone ในอาหารสำหรับ co-cultivation

แม้ว่าการสร้างบาดแผลในพืชใบเลี้ยงคู่จะกระตุ้นให้พืชผลิตสารในกลุ่มฟีนอลิก เช่น acetosyringone ที่จำเป็นสำหรับการถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* ได้แต่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวเกือบทุกชนิดไม่สามารถสร้างสารเหล่านี้ได้ (Smith and Hood, 1995) ดังนั้นการใช้ acetosyringone เติมลงในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ *A. tumefaciens* และในอาหารที่ใช้ระหว่างการ co-cultivate จึงสามารถช่วยกระตุ้นให้ *vir* genes ในเซลล์ *A. tumefaciens* ให้ทำงานได้ทำให้การถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดย *A. tumefaciens* ประสบความสำเร็จมากขึ้น (Hiei *et al*., 1994 ; Amoah *et al*., 2001) สำหรับการถ่ายยีนในกล้วยไม้นั้นมีหลายรายงานที่ใช้ acetosyringone โดยส่วนใหญ่การเติมในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ *A. tumefaciens* นั้นใช้ความเข้มข้นของ acetosyringone ที่ 100 ไมโครโมลาร์ (Chai *et al*., 2002 ; Men *et al*., 2003 b) แต่ระดับความเข้มข้นที่ใช้เติมในอาหารสำหรับ co-cultivation มีความแตกต่างกันโดยรายงานของ Belarmino and Mii (2000) ใช้ความเข้มข้นที่ 500 ไมโครโมลาร์ ต่อมา Chai *et al*. (2002) และ Men *et al*. (2003 b) ใช้ความเข้มข้นที่ 100 ไมโครโมลาร์ ส่วน Liau *et al*. (2003 a,b) ใช้ความเข้มข้นที่ 200 ไมโครโมลาร์

ในการวิจัยนี้ได้ทดสอบความเข้มข้นของ acetosyringone ที่เติมในอาหารสำหรับเลี้ยงร่วมกันระหว่างเนื้อเยื่อพืชและเชื้อ *A. tumefaciens* (co-cultivation medium) ที่เหมาะสมเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* โดยใช้ความเข้มข้นของ acetosyringone 6 ระดับ คือ
0 100 200 300 400 และ 500 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลอง (ตารางที่ 5) พบว่าความเข้มข้นของ acetosyringone ที่ให้เปอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นของ tTCLs ที่สามารถเกิด PLBs ใหม่ได้สูงที่สุดได้แก่ ความเข้มข้นที่ 200 และ 300 ไมโครโมลาร์ โดยให้เปอร์เซ็นต์ putative transformation เมื่อคัดเลือกนาน 4 สัปดาห์ที่ 54 และ 52 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และยังให้ เปอร์เซ็นต์ putative transformants เมื่อคัดเลือกนาน 12 สัปดาห์เท่ากันที่ 32 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้นของ acetosyringone ที่ให้เปอร์เซ็นต์ putative transformants รองลงมาคือ 100 ไมโครโมลาร์ ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ acetosyringone ที่ 200 ไมโครโมลาร์ ในการถ่ายยีนครั้งต่อไป เนื่องจากสามารถใช้

acetosyringone ในปริมาณที่น้อยกว่าแต่ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนที่เท่ากับการใช้เข้มข้นที่ 300 ไมโครโมลาร์



ก ข

ค

ภาพที่ 13 ชิ้น tTCLs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ในห้องเพาะเลี้ยงที่ให้แสงประมาณ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์

ก. ชิ้น tTCLs ที่ถูก infect ด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* ซึ่งได้เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมเฉพาะสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดควบคุมที่ 1)

ข. ชิ้น tTCLs ที่ไม่ผ่านกระบวนการถ่ายยีน ซึ่งได้เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมปฏิชีวนะ hygromycin ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดควบคุมที่ 2)

ค. ชิ้น tTCLs ที่ถูก infect ด้วยเชื้อ *A. tumefaciens* ซึ่งได้เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefotaxime ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร (ลูกศรชี้แสดง PLBs ที่เกิดขึ้นใหม่)

2.3 การชักนำให้ PLBs ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนให้เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์

ภายหลังการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนนาน 12 สัปดาห์ จึงชักนำให้ PLBs จากกล้วยไม้สกุลหวายทั้งสองพันธุ์คือ บอม17 และ เอียสกุล ที่เกิดใหม่ในอาหารคัดเลือกซึ่งคาดว่ามียีนเป้าหมายสอดแทรกอยู่ในยีโนมของพืชอย่างถาวรแล้วให้เกิดเป็นต้นอ่อน โดยเพาะเลี้ยง PLBs ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนบนอาหารชักนำต้นอ่อนสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ มันฝรั่งบด 15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านกำมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ PLBs สามารถเกิดต้นอ่อนขนาดเล็กมากมาย และมีการเติบโตอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 14 ก) แต่เมื่อเพาะเลี้ยงถึง 8 สัปดาห์ ต้นอ่อนเจริญช้าลงและมีลักษณะอวบน้ำเล็กน้อย จึงได้ย้ายต้นอ่อนที่ได้มาชักนำให้เป็นต้นที่มีรากสมบูรณ์บนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านกำมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ โดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 8 สัปดาห์ ซึ่งหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์พบว่าต้นอ่อนมีการเติบโตอย่างรวดเร็วและไม่มีอาการอวบน้ำ และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อจนต้นกล้วยไม้มีอายุ 6 เดือนหลังการคัดเลือก ก็สามารถนำออกปลูกในโรงเรือนได้ (ภาพที่ 14 ข) ผลการชักนำให้ PLBs เกิดเป็นต้นอ่อน พบว่า PLBs ทุกชิ้นสามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้

ก

ข

ภาพที่ 14 ต้นอ่อนของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ที่เจริญบนอาหารชักนำต้นอ่อน ในห้องเพาะเลี้ยงควบคุมที่ให้แสงประมาณ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

ก. ต้นอ่อนที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ มันฝรั่งบด 15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านกำมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 6 สัปดาห์

ข. ต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านกำมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 16 สัปดาห์

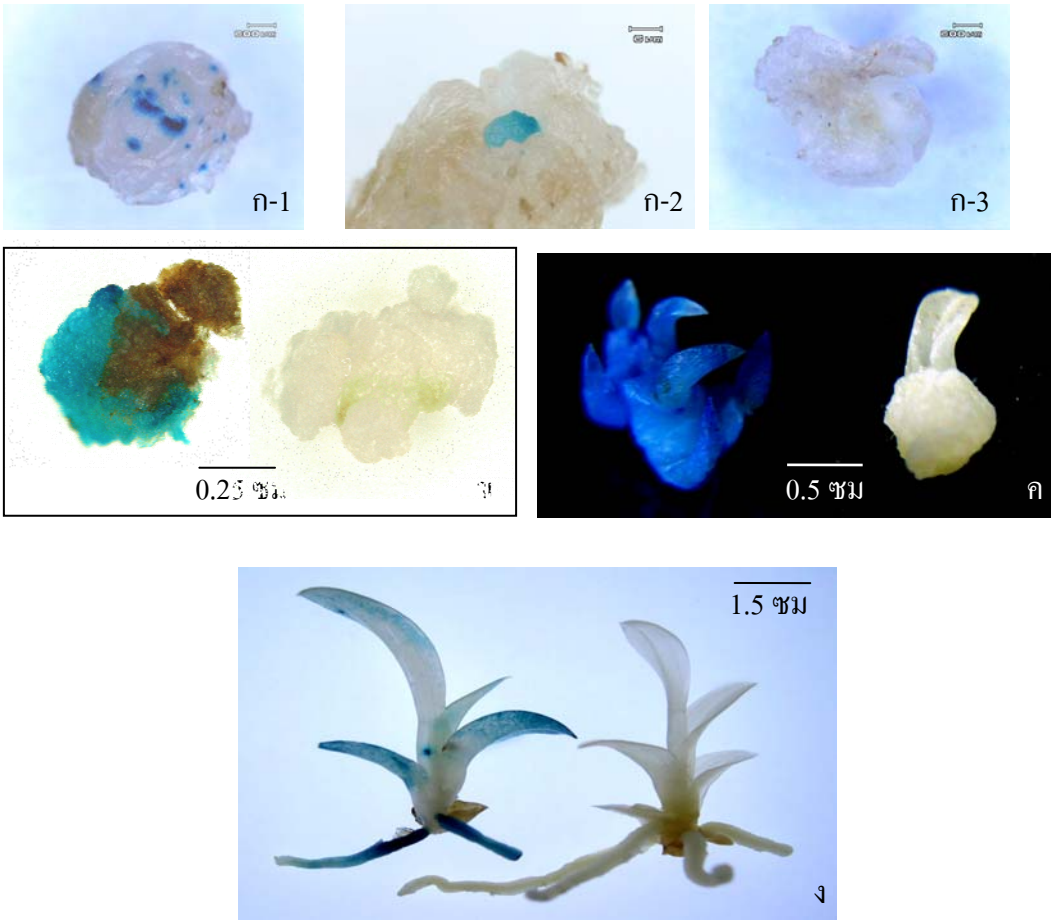
2.4 การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนรายงานผล *gus* โดยวิธี GUS histochemical assay ในกล้วยไม้ที่ได้รับถ่ายยีนระยะต่าง ๆ

ยีนรายงานผล (reporter gene) เป็นยีนที่นิยมใช้เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีน และสามารถใช้ตรวจสอบการมีอยู่และประสิทธิภาพในการแสดงออกของยีนเป้าหมายในต้นพืชดัดแปลงพันธุกรรมได้ เนื่องจากยีนเหล่านี้เมื่อแสดงออกในเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนแล้วสามารถตรวจสอบได้ง่าย ยีนรายงานผลที่ใช้งานวิจัยนี้ได้แก่ยีน *gus* หรือ *uidA* ซึ่งเมื่อแปลรหัสแล้วจะได้เอนไซม์ GUS เมื่อเอนไซม์ GUS ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่ไม่มีสีคือ 5-bromo-4-chloro-3-indodyl-β-glucuronide ได้ตะกอนสีน้ำเงินไม่ละลายน้ำ (Jefferson *et al*., 1987 ; Stomp, 1992) จึงใช้วิธีการนี้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ในกล้วยไม้ถ่ายยีนระยะต่าง ๆ โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราว (transient expression) บนชิ้น tTCLs หลังการถ่ายยีน 3 วัน และตรวจสอบการแสดงออกแบบถาวรในระยะ PLBs ที่เกิดใหม่หลังคัดเลือกนาน 3 เดือน ระยะยอดอ่อนอายุ 1 เดือน และต้นอ่อนอายุ 4 เดือน

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราวบนชิ้น tTCLs หลังการถ่ายยีนนาน 3 วันนั้นได้ตรวจสอบเฉพาะในขั้นตอนของการศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของ acetosyringone ที่เติมในอาหารสำหรับ co-cultivation ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของ acetosyringone ที่ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงสุดคือ 200 ไมโครโมลาร์ สามารถพบจุดสีน้ำเงินบนชิ้น tTCLs ได้ (ภาพที่ 15 ก-1) โดยพบจำนวนชิ้นที่ย้อมติดสีน้ำเงินได้ประมาณ 56 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนจุดต่อชิ้นเฉลี่ย 2 จุด และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดสอบภายหลังการคัดเลือก tTCLs ที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะพบว่าให้ผลสอดคล้องกัน คือที่ความเข้มข้นนี้ให้ เปอร์เซ็นต์ putative transformants สูงสุดเช่นกัน และตรวจพบว่ามี PLBs ที่เกิดใหม่บน tTCLs สามารถย้อมติดสีน้ำเงินได้ทั้งก้อน (ภาพที่ 15 ก-2) ซึ่งเป็นเครื่องหมายเบื้องต้นที่ชี้ให้เห็นว่าวิธีการถ่ายยีนที่ใช้นี้สามารถชักนำให้เกิด PLBs ที่มียีนเป้าหมายอยู่อย่างถาวร (stable transformation) ได้

ในการตรวจสอบการเข้ารวมตัวของยีน *gus* กับยีโนมของกล้วยไม้อย่างถาวรนั้นได้ตรวจสอบในระยะ PLBs ที่เกิดใหม่หลังคัดเลือกนาน 3 เดือน และระยะยอดอ่อนอายุ 1 เดือน พบว่าสามารถย้อมติดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อที่มีชีวิตได้ทุกส่วน (ภาพที่ 15 ข และค) และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* บนต้นอ่อนอายุ 4 เดือนพบว่าเนื้อเยื่อทุกส่วนโดยเฉพาะรากและใบสามารถย้อมติดสีน้ำเงินได้ (ภาพที่ 15 ง) ขณะที่เนื้อเยื่อกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่สามารถย้อมติดสี

น้ำเงินได้ สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ได้ทดสอบในกล้วยไม้ทั้งสองพันธุ์ ซึ่งพบว่าทั้งสองพันธุ์ให้รูปแบบการแสดงออกของยีนเหมือนกัน แต่ได้เสนอผลเฉพาะกล้วยไม้พันธุ์บอม17 เท่านั้น และจากผลการแสดงออกของยีน *gus* แสดงให้เห็นว่าวิธีการที่ใช้ สามารถถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้โดยอาศัย *A. tumefaciens* เป็นพาหะและชักนำให้เกิด stable transformation ในกล้วยไม้ได้




ภาพที่ 15 การแสดงออกของยีน *gus* ตรวจสอบโดยวิธี GUS histochemical assay ในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ในการเจริญเติบโตระยะต่าง ๆ

ก-1 การแสดงออกของยีนแบบชั่วคราวบนชิ้น tTCLs หลังการถ่ายยีน 3 วัน

ก-2 PLBs ที่เกิดใหม่บน tTCLs สามารถย้อมติดสีน้ำเงินได้ทั้งก้อน

ก-3 ชิ้น tTCLs ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

ข. PLBs ที่เกิดใหม่หลังคัดเลือกนาน 3 เดือนที่ได้รับการถ่ายยีน *gus* และแสดงออกอย่างถาวร (ซ้าย) เปรียบเทียบกับ PLBs ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ขวา)

ค. ยอดอ่อนอายุ 1 เดือนที่ได้รับการถ่ายยีน *gus* และแสดงออกอย่างถาวร (ซ้าย) เปรียบเทียบกับยอดที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ขวา)

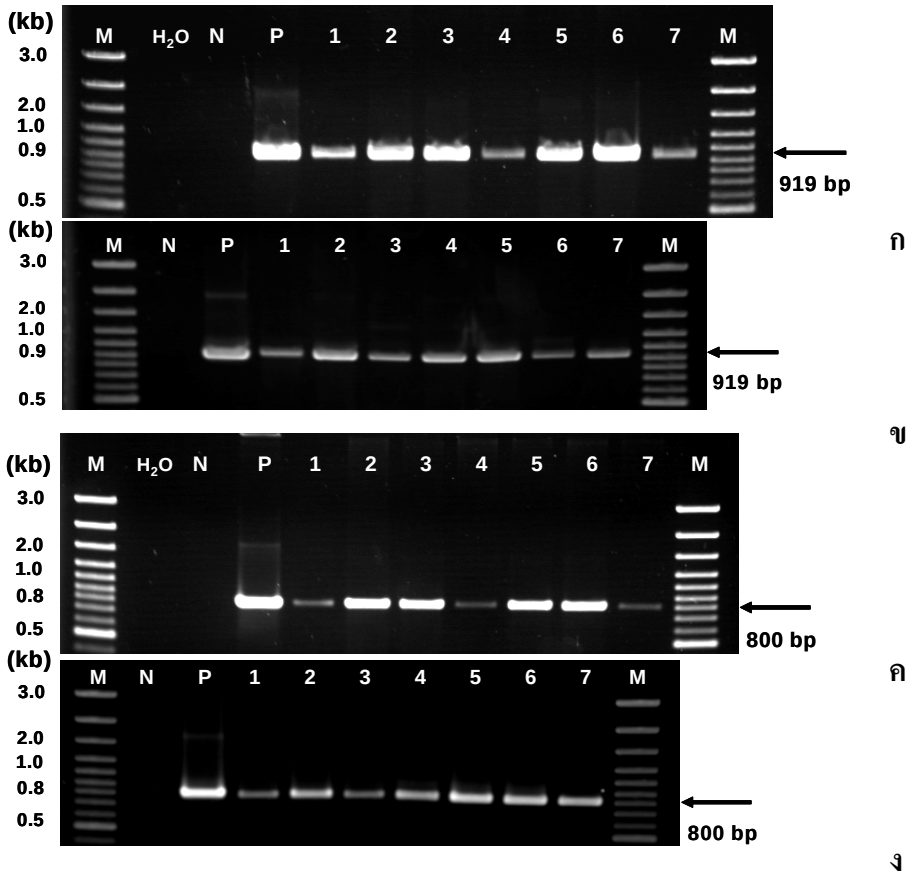
ง. ต้นอ่อนอายุ 4 เดือนที่ได้รับการถ่ายยีน (ซ้าย) เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ขวา)

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

หลังจากชักนำให้ต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการคัดเลือกให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบรูณ์แล้ว สามารถชักนำต้นกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนจากกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ที่ได้จากการทดลองของปัจจัยที่ 1-5 ทั้งหมด 84 สายต้น และจากกล้วยไม้พันธุ์ เอียสกุล ที่ได้จากการทดลองของปัจจัยที่ 6 ทั้งหมด 80 สายต้น แต่ได้เลือกต้นกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีนโดยเทคนิค PCR และ dot blot hybridization พันธุ์ละ 7 ต้น โดยเลือกจากสายต้นที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical assay

2.5.1 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* และ *hpt* ในกล้วยไม้โดยเทคนิค PCR

สกัดดีเอ็นเอจากใบของกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนพันธุ์ละ 7 ต้นที่คัดเลือกไว้แล้วนำไปตรวจหายีน *gus* และ *hpt* โดยเทคนิค PCR จากการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* พบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *gus* ขนาด 919 คู่เบส จากดีเอ็นเอของกล้วยไม้ทั้งสองพันธุ์ทุกสายต้น (ภาพที่ 16 ก และ ข) และเมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *hpt* พบแถบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส จากดีเอ็นเอของกล้วยไม้ทั้งสองพันธุ์ทุกสายต้นเช่นกัน (ภาพที่ 16 ค และ ง)




<u>ภาพที่ 16</u> ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gus* และ *hpt* แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์

ก. ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *gus* ขนาด 919 คู่เบส จากกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17
ข. ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *gus* ขนาด 919 คู่เบส จากกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ เอียสกุล
ค. ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *hpt* ขนาด 800 คู่เบส จากกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17
ง. ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *hpt* ขนาด 800 คู่เบส จากกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ เอียสกุล

M. เครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 100 bp Ladder (Fermentus)

$H_2O$ negative control ($dH_2O$)

N. negative control จากดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

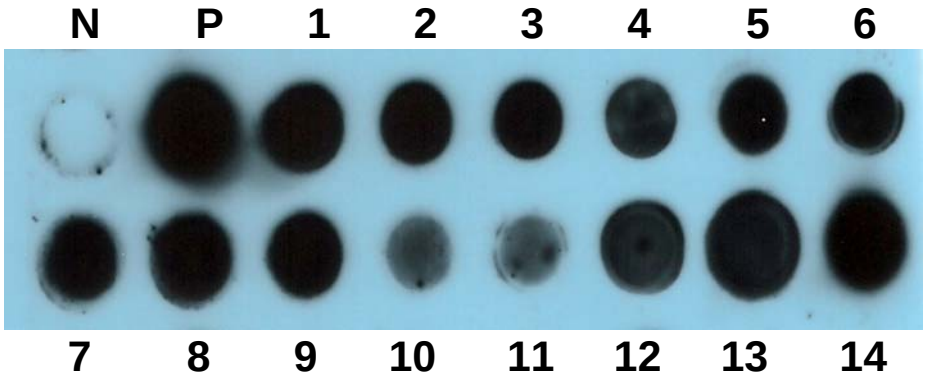
P. ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้พลาสมิด pCAMBIA 1301 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

1-7. ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของต้นกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

2.5.2 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* ในกล้วยไม้โดยเทคนิค dot blot hybridization

จากการตรวจวิเคราะห์การคงอยู่ของยีน *gus* โดยใช้วิธี dot blot hybridization เพื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีนอย่างถาวรในยีโนมของกล้วยไม้ โดยการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบ ทั้ง 14 สายต้น ที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธี GUS histochemical assay และตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *gus* โดยวิธี PCR มาหยดลงบนแผ่นไนล่อนเมมเบรน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอตัวตรวจสอบของยีน *gus* ซึ่งติดฉลากด้วยสารไร้รังสี digoxigenin แล้วนำไปตรวจผลบนแผ่นฟิล์ม ซึ่งถ้ากล้วยไม้มียีน *gus* สอดแทรกอยู่กับยีโนมของกล้วยไม้จะให้สัญญาณสีดำบนแผ่นฟิล์มเพราะเกิดการเข้าคู่กันของดีเอ็นเอที่เป็นตัวตรวจสอบกับดีเอ็นเอที่นำมาทดสอบ พบว่าหลังจากนำแผ่นเมมเบรนไปประกบบนแผ่นฟิล์มเป็นเวลา 10 นาที ปรากฏสัญญาณ จุดสีดำบนแผ่นฟิล์ม (ภาพที่ 17) ซึ่งแสดงว่าสายต้นของกล้วยไม้ที่ทำการตรวจสอบได้รับการถ่ายยีน *gus* โดยที่ยีน *gus* เข้าไปรวมตัวกับยีโนมของกล้วยไม้ได้อย่างถาวร ซึ่งผลการทดลองพบว่ากล้วยไม้ทุกสายต้นที่มีการแสดงออกของยีน *gus* ซึ่งทดสอบด้วยวิธี GUS histochemical assay ปรากฏสัญญานจุดสีดำบนแผ่นฟิลม์ทุกสายต้นที่ทดสอบจึงอาจสรุปได้ว่า ยีน *gus* สามารถเข้าไปรวมตัวกับยีโนมของกล้วยไม้ได้จริง

จากการทดลองในขั้นตอนต่าง ๆ ในการศึกษาระบบการถ่ายยียที่เหมาะสมเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้นี้ทำให้ทราบตัวแปรต่าง ๆ ที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 เป็นพาหะ ซึ่งในการทดลองขั้นต่อไปจะได้นำตัวแปรต่าง ๆ เหล่านี้ไปใช้ในการถ่ายยีน *CPACO* แบบ antisense จากมะละกอเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายต่อไป




ภาพที่ 17 การตรวจวิเคราะห์การคงอยู่ของยีน *gus* ในต้นกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน โดยใช้เทคนิค dot blot hybridization ที่ตรวจสอบด้วยตัวตรวจสอบยีน *gus*

N. negative control จากดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

P. ดีเอ็นเอปริมาณ 1 นาโนกรัม จากพลาสมิด pCAMBIA 1301

1-7 ดีเอ็นเอปริมาณ 2 ไมโครกรัม ที่สกัดจากใบของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน

8-14 ดีเอ็นเอปริมาณ 2 ไมโครกรัมที่สกัดจากใบของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ เอียสกุล ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน

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

3.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม (binary vector) ที่มียีน *CPACO* แบบ antisense และถ่ายเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens*

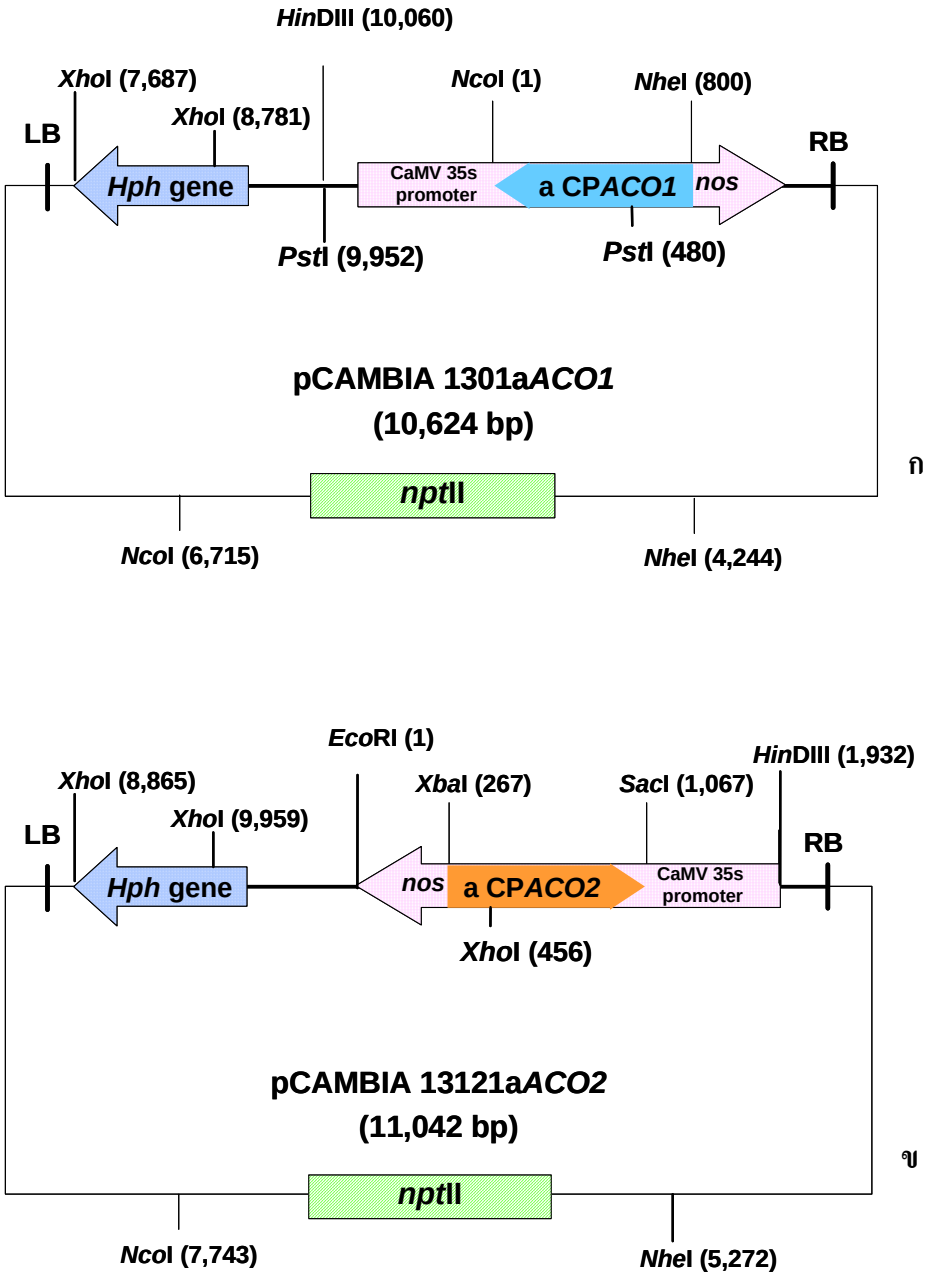
เนื่องจากการสร้าง binary vector ให้มียีน *CPACO* แบบ antisense จาก cDNA ของทั้งสองยีน ต้องการโปรโมเตอร์ 35sCAMV และเทอร์มิเนเตอร์ NOS เพื่อมาควบคุมการแสดงออกของยีน จึงได้ เชื่อมต่อ cDNA ของยีน *CPACO1* กับ binary vector ของ pCAMBIA 1301 ที่ตัดส่วนของยีน *gus* ออก ส่วน cDNA ของยีน *CPACO2* จะเชื่อมต่อกับ binary vector ของ pCAMBIA 13121 ที่ตัดส่วนของยีน *gus* ออกเช่นกัน โดยการสร้าง binary vector ที่สมบูรณ์ของทั้งสองยีนนี้ใช้วิธีการเดียวกัน โดยเริ่มจากการ cloning vector เพื่อแยกส่วน cDNA ของยีน ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แยกผลของปฏิกิริยาการย่อยโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงสกัดแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลโดยการใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่สกัดได้มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน antisense *ACO* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ส่วนปลายของ forward และ reverse ไพรเมอร์มีลำดับเบสที่จำเพาะต่อการตัดของเอนไซม์เดียวกับตำแหน่งที่จะทำการเชื่อมต่อใน binary vector แต่กำหนดให้สลับทิศทางกัน จากนั้นย่อยส่วนปลายของผลผลิต PCR ที่ได้พร้อมทั้ง binary vector โดยวิธี double digestion แล้วจึงแยกผลของปฏิกิริยาการย่อยโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นสกัดแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลแล้วจึงนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่สกัดได้มาใช้ในการเชื่อมต่อด้วยวิธี ligation หลังจาก ligation แล้วจึงตรวจสอบผลการเชื่อมต่อโดยนำไปเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α และตรวจสอบโคโลนีที่คาดว่าได้รับ binary vector โดยเลือกจากโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบโคโลนีของเซลล์เจ้าบ้านที่มี binary vector ของ pCAMBIA 1301a*ACO1* เพียง 1 โคโลนี และ โคโลนีที่มี binary vector ของ pCAMBIA 13121a*ACO2* เพียง 2 โคโลนี ซึ่งแผนที่ของ binary vector ที่มีการเชื่อมต่ออย่างสมบูรณ์ของยีน *CPACO* antisense ทั้งสองได้แสดงในภาพที่ 18 ก และ ข

ตรวจสอบ binary vector ที่มีการเชื่อมต่อของยีน *CPACO* antisense อย่างสมบูรณ์ด้วย 2 วิธี คือวิธีที่ 1 การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *CPACO1* antisense และ *CPACO2* บน binary vector โดยใช้วิธีการเดียวกับการสังเคราะห์ยีน *CPACO* antisense และวิธีที่ 2

คือ ตรวจสอบโดยวิธี restriction digestion analysis ด้วยการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะต่าง ๆ โดยพลาสมิด pCAMBIA 1301a*ACO1* ได้ทดสอบ 5 ปฏิกิริยา และพลาสมิด pCAMBIA 13121a*ACO2* ได้ทดสอบ 4 ปฏิกิริยา

ผลของการตรวจสอบผลผลิต PCR จาก binary vector ทั้งสองด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่า pCAMBIA 1301a*ACO1* ที่ได้สกัดจากโคโลนีของเซลล์เจ้าบ้าน 1 โคโลนีให้ชิ้นดีเอ็นเอจากผลผลิต PCR ของ antisense *CPACO1* ขนาดประมาณ 800 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากผลผลิต PCR ของยีน *CPACO1* ที่ใช้ยีน *ACO1* ที่แยกจาก cloning vector เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (ภาพที่ 19 ก) ส่วน pCAMBIA 13121a*ACO2* ที่ได้สกัดจากโคโลนีของเซลล์เจ้าบ้านทั้ง 2 โคโลนีให้ชิ้นดีเอ็นเอจากผลผลิต PCR ของ antisense *CPACO2* ขนาดประมาณ 800 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากผลผลิต PCR ของยีน *CPACO2* ที่ใช้ยีน *CPACO2* ที่แยกจาก cloning vector เป็นดีเอ็นเอต้นแบบเช่นกัน (ภาพที่ 19 ข)

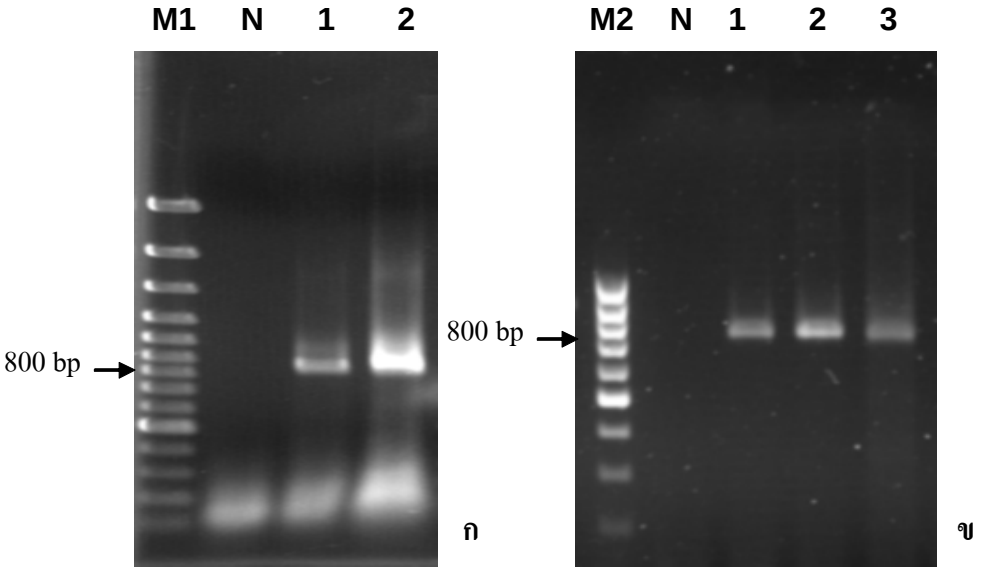
การตรวจสอบความถูกต้องของ binary vector โดยวิธี restriction digestion analysis ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ โดยพลาสมิด pCAMBIA 1301a*ACO1* ได้ทดสอบทั้งหมด 5 ปฏิกิริยา และแยกผลของปฏิกิริยาการย่อยด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 20 ก) หลังจากย่อยพลาสมิด pCAMBIA 1301a*ACO1* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 5 ปฏิกิริยา พบรูปแบบการย่อยซึ่งให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดถูกต้องเช่นเดียวกับแผนที่ยีนในภาพ ที่ 18 ก. แต่ในปฏิกิริยาที่ 4 ซึ่งเป็นการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Nhe*I พบชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 3,909 คู่เบส ซึ่งเกิดจากการย่อยที่ไม่สมบูรณ์ สำหรับพลาสมิด pCAMBIA 13121a*ACO2* ได้เลือกมาทดสอบเพียง 1 โคโลนี โดยได้ทดสอบการย่อย 4 ปฏิกิริยา ผลการทดสอบ(ภาพที่ 20 ข) พบรูปแบบการย่อยซึ่งให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดถูกต้องเช่นเดียวกับแผนที่ยีนในภาพที่ 19 ข.




ภาพที่ 18 แผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สำคัญของ binary vector ที่มียีน *CPACO* antisense

ก. แผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของพลาสมิด pCAMBIA 1301a*ACO1*

ข. แผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของพลาสมิด pCAMBIA 13121a*ACO2*




ภาพที่ 19 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน antisense *ACO* โดยใช้ binary vector เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ วิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์

ก. ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของบางส่วนของยีน *CPACO1*

M1. เครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 100 bp Ladder Plus (Fermentus)

N. negative control ($dH_2O$)

1. ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ cDNA ของยีน *CPACO1* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

2. ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ pCAMBIA 1301a*ACO1* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

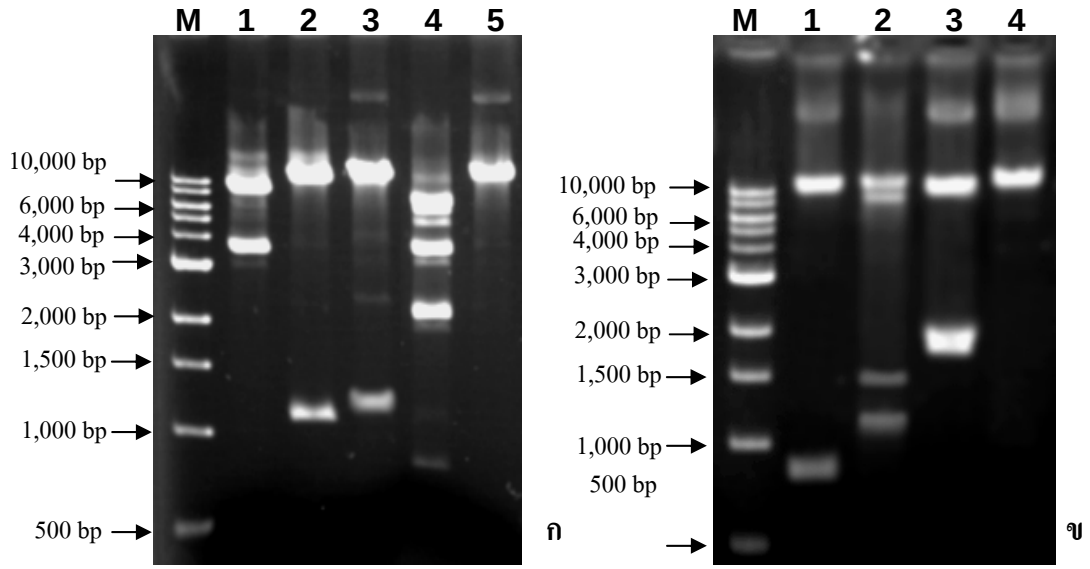
ข. ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของบางส่วนของยีน *CPACO2*

M2. เครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 100 bp Ladder (Fermentus)

N. negative control ($dH_2O$)

1. ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ cDNA ของยีน *CPACO2* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

2-3. ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ pCAMBIA 13121a*ACO2* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ




ภาพที่ 20 รูปแบบการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดของ binary vector วิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์

ก. รูปแบบการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของพลาสมิด pCAMBIA 1301a*ACO1*

M. เครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Biolab)

1. รูปแบบการย่อยด้วยเอนไซม์ *Nhe*I ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3,444 และ 7,180 คู่เบส
2. รูปแบบการย่อยด้วยเอนไซม์ *Xho*I ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,094 และ 9,930 คู่เบส
3. รูปแบบการย่อยด้วยเอนไซม์ *Pst*I ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,152 และ 9,472 คู่เบส
4. รูปแบบการย่อยด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Nhe*I ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 800 2,471 3,444 และ 7,180 คู่เบส
5. รูปแบบการย่อยด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 10,624 คู่เบส

ข. รูปแบบการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของพลาสมิด pCAMBIA 13121a*ACO2*

M. เครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Biolab)

1. รูปแบบการย่อยด้วยเอนไซม์ *Xba*I และ *Sac*I ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 800 และ 10,242 คู่เบส
2. รูปแบบการย่อยด้วยเอนไซม์ *Xho*I ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,094 1,539 และ 8,409 คู่เบส
3. รูปแบบการย่อยด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Eco*RI ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,932 และ 9,110 คู่เบส
4. รูปแบบการย่อยด้วยเอนไซม์ *Hin*dII ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 11,042 คู่เบส

เมื่อสร้าง binary vector ที่บรรจุยีน *CPACO* antisense ได้สมบูรณ์แล้ว จึงได้ถ่าย binary vector ทั้งสองเข้าสู่ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 เพื่อใช้เป็นพาหะในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายต่อไป โดยสกัดพลาสมิดที่ต้องการโดยวิธีของ QIAprep Purification of Plasmid DNA Miniprep (QIAGEN) เพื่อให้ได้พลาสมิดที่สะอาด และมีสิ่งปนเปื้อนน้อย แล้วจึงถ่ายเข้าสู่ competent cell ของ *A. tumefaciens* โดยวิธี electroporation ด้วยเครื่อง Gene Pulser (Bio-Rad®) จากนั้นเพาะเลี้ยงและคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตรวจสอบโคลนของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่บรรจุพลาสมิดที่ถูกต้องด้วย 2 วิธี คือการตรวจสอบโดยเทคนิค PCR เพื่อนำมาตรวจหาการมีอยู่ของยีน *CPACO* antisense ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้เช่นเดียวกับการตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้จากเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* คือพบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 คู่เบส และยังได้ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin (*hpt*) บน binary vector ที่ได้สร้างขึ้นใหม่ โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีนซึ่งให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 คู่เบส จากการตรวจผลผลิต PCR พบว่าให้ผลตรงกับขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิด pCAMBIA 1301 และ pCAMBIA 13121 คือ ขนาดประมาณ 800 คู่เบส นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบความถูกต้องโดยวิธี restriction digestion analysis ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ ซึ่งพบว่าให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้จากเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli*

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

หลังจากเตรียมเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่บรรจุพลาสมิด pCAMBIA 1301a*ACO1* และ pCAMBIA 13121a*ACO2* โดยเจือจางเชื้อให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 5 x $10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเตรียมเนื้อเยื่อเป้าหมายหรือ tTCLs โดยการ pre-culture ในอาหารเหลวสูตร VW นาน 3 วัน และ sonication เนื้อเยื้อเป้าหมายนาน 6 วินาที แล้วจึงถ่ายยีนเข้าสู่ tTCLs ของกล้วยไม้สกุลหวาย โดยเลี้ยง tTCLs ที่ pre-culture แล้วร่วมกับเซลล์แขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* นาน 60 นาที จากนั้นย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติม acetosyringone ในที่มืดเพื่อเป็นการ co-cultivation นาน 2 วัน แล้วจึงนำ tTCLs ไปคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนพร้อมทั้งกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* บนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติมสารปฏิชีวนะ 2 ชนิดคือ hygromycin ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefotaxime ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นจึงนำไปคัดเลือกในอาหารคัดเลือกชนิดเหลวโดยใช้สูตรเดิมต่ออีก 8 สัปดาห์ หลังคัดเลือกได้ชักนำให้ PLBs ที่เกิดใหม่บนอาหารคัดเลือกให้เกิดเป็นต้นอ่อน 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 บันทึกผลการทดลองโดยบันทึกจำนวน tTCLs ที่สามารถชักนำให้เกิด PLBs ใหม่บนอาหารคัดเลือก และบันทึกจำนวนสายต้นของต้นกล้วยไม้หลังจากสามารถชักนำให้เป็นต้นอ่อน สำหรับการถ่ายยีน ได้ทำทั้งหมด 5 ครั้ง โดยที่ครั้งที่ 1-4 ได้ใช้สภาวะและปัจจัยต่าง ๆ เหมือนกันทั้งหมด แต่ในการถ่ายยีนครั้งที่ 5 มีความแตกต่างจากการถ่ายยีน 4 ครั้งก่อน คือการใช้ PLBs เริ่มต้นที่มีอายุ 6 สัปดาห์ ในขณะที่การถ่ายยีน 4 ครั้งใช้ PLBs เริ่มต้นที่มีอายุ 4 สัปดาห์

จากผลการถ่ายยีน *CPACO*1 antisense จาก binary vector คือ pCAMBIA 1301a*ACO1* เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 5 ครั้ง พบว่าหลังคัดเลือกนาน 12 สัปดาห์ กล้วยไม้พันธุ์ บอม17 ให้จำนวนชิ้น tTCLs ที่ชักนำให้เกิด PLBs ใหม่ 36 ชิ้น ซึ่งคิดเป็น 1.9 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบจากจำนวนชิ้น tTCLs เริ่มต้น ส่วนในกล้วยไม้พันธุ์ เอียสกุล ให้จำนวนชิ้น tTCLs ที่ชักนำให้เกิด PLBs ใหม่ 18 ชิ้น ซึ่งคิดเป็น 1.0 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากคัดเลือกแล้วได้ชักนำให้ PLBs เกิดเป็นต้นอ่อน พบว่าในกล้วยไม้พันธุ์ บอม17 มีจำนวนชิ้น tTCLs ที่สามารถเกิดต้นอ่อนได้เพียง 7 ชิ้น คิดเป็นเพียง

19 เปอร์เซ็นต์ ของเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก ส่วนในกล้วยไม้พันธุ์ เอียสกุล มีจำนวนชิ้น tTCLs ที่สามารถเกิดต้นอ่อนได้เพียง 3 ชิ้น คิดเป็นเพียง 18 เปอร์เซ็นต์ ของเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก (ตารางที่ 6) ให้ชื่อกล้วยไม้หวายพันธุ์ บอม17 ทั้ง 7 สายต้นนี้ว่า Bo aACO1.1-Bo aACO1.7 และชื่อกล้วยไม้หวายพันธุ์ เอียสกุล ทั้ง 3 สายต้นว่า Es aACO1.1-Es aACO1.3

ผลการถ่ายยีน antisense *ACO*2 จาก binary vector คือ pCAMBIA 13121 a*ACO2* เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 5 ครั้ง พบว่าหลังคัดเลือกนาน 12สัปดาห์ กล้วยไม้พันธุ์ บอม17 ให้จำนวนชิ้น tTCLs ที่ชักนำให้เกิด PLBs ใหม่ 23 ชิ้น ซึ่งคิดเป็น 1.2 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบจากจำนวนชิ้น tTCLs เริ่มต้น ส่วนในกล้วยไม้พันธุ์ เอียสกุล ให้จำนวนชิ้น tTCLs ที่ชักนำให้เกิด PLBs ใหม่ 11 ชิ้น ซึ่งคิดเป็น 0.6 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากคัดเลือกแล้วได้ชักนำให้ PLBs เกิดเป็นต้นอ่อน พบว่าในกล้วยไม้พันธุ์บอม17 มีจำนวนชิ้น tTCLs ที่สามารถเกิดต้นอ่อนได้เพียง 4 ชิ้น คิดเป็นเพียง 17 เปอร์เซ็นต์ ของเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก ส่วนในกล้วยไม้พันธุ์ เอียสกุล มีจำนวนชิ้น tTCLs ที่สามารถเกิดต้นอ่อนได้เพียง 3 ชิ้น คิดเป็นเพียง 27 เปอร์เซ็นต์ ของเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก (ตารางที่ 7) ให้ชื่อกล้วยไม้หวายพันธุ์ บอม17 ทั้ง 4 สายต้นว่า Bo aACO2.1-Bo aACO2.4 และ ชื่อกล้วยไม้หวายพันธุ์ เอียสกุล ทั้ง 3 สายต้นนี้ว่า Es aACO2.1-Es aACO2.3

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการถ่ายยีนระหว่างพันธุ์ของกล้วยไม้ พบว่าพันธุ์ บอม17 ให้ผลการถ่ายยีนได้สูงกว่าพันธุ์ เอียสกุล จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าพันธุกรรมที่แตกต่างกันส่งผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chai *et al*. (2002) ที่ได้ใช้วิธีการถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* เข้าสู่กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอฟซิส 4 พันธุ์ ได้แก่ T0 T5 T10 และ Hikaru จากผลการทดลองพบว่า กล้วยไม้แต่ละสายพันธุ์ตอบสนองปัจจัยต่าง ๆ แตกต่างกัน ทั้งการตอบสนองต่ออาหารเพื่อเพิ่มปริมาณ PLBs และความทนทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin และยังส่งผลให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนแตกต่างกัน และยังสอดคล้องกับหลายรายงานที่ได้ใช้วิธีการถ่ายยีนโดย particle bombardment เข้าสู่กล้วยไม้ซึ่งได้รายงานตรงกันว่าพันธุกรรมที่แตกต่างกันส่งผลให้มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนที่แตกต่างกัน (Knapp *et al*., 2000 ; Men *et al*., 2003a ) นอกจากนี้ยังพบว่าการถ่ายยีนใน 4 ครั้งแรกที่ใช้ tTCLs ที่มีอายุ 4 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำต้นกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุล ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนเพียง 1 สายต้นเท่านั้น แต่ในการทดลองที่ 5 ซึ่งใช้ tTCLs ที่มีอายุ 6 สัปดาห์พบว่าสามารถชักนำต้นกล้วยไม้พันธุ์ เอียสกุล ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนเพิ่มขึ้นถึง 5 สายต้น แสดงให้เห็นว่าอายุของ PLBs เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนใน

กล้วยไม้แต่ละพันธุ์ ดังนั้นการศึกษาอายุของ PLBs ที่เหมาะสมอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนให้กล้วยไม้ในสายพันธุ์ที่ถ่ายยีนยาก ๆ ได้

สำหรับการชักนำให้ PLBs ที่เกิดใหม่บนอาหารคัดเลือกให้เกิดเป็นต้นอ่อนโดยเพาะเลี้ยง PLBs บนอาหารชักนำต้นอ่อนสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ มันฝรั่งบด 15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านกำมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 8 สัปดาห์นั้นพบว่า PLBs ส่วนใหญ่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้และตายในที่สุด (ภาพที่ 21 ก 1-3) มี PLBs ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ นอกจากนี้ PLBs บางชิ้นที่ได้พัฒนาเป็นต้นอ่อนยังมีลักษณะทางสรีระที่แตกต่างกัน เช่นพบว่าบางชิ้นเกิดยอดเล็ก ๆ ขึ้นมากมาย แต่เป็นยอดที่แคระ ใบสั้นหนา และไม่แผ่ขยาย (ภาพที่ 21 ข 1-2) และ PLBs อีกส่วนหนึ่งสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่มีรากสมบูรณ์ได้ (ภาพที่ 21 ข 3) แต่มีการพัฒนาที่ช้ากว่าต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน *gus* และ *hpt* โดยใช้ binary vector pCAMBIA 1301 (ภาพที่ 21 ค 1-2) ซึ่งการที่ PLBs ที่ได้ผ่านการคัดเลือกในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin มานานถึง 3 เดือน แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้อาจเกิดจากการถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการสร้างฮอร์โมนเอทิลีนคือ *CPACO* antisense โดยผลของการแสดงออกของยีนซึ่งควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ 35SCaMV ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่แสดงออกได้ตลอดเวลาและทุกเนื้อเยื่อ (constitutive promoter) อาจมีผลยับยั้งการสร้างเอทิลีนในระยะของการพัฒนาจาก PLBs ไปเป็นต้นอ่อน ซึ่งเอทิลีนเข้ามามีบทบาทอย่างมากต่อการพัฒนาของพืชในระยะดังกล่าว (Abeles *et al*., 1992) ซึ่งข้อสันนิฐานนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Bovy *et al*. (1999) ที่ได้ทดลองยืดอายุการปักแจกันของคาร์เนชั่นโดยถ่ายยีน *etr1-1* ซึ่งเป็นยีนจาก *Arabidopsis* ที่กำหนดการสร้าง ethylene receptor โดยเปรียบเทียบโปรโมเตอร์ที่แตกต่างกัน 3 โปรโมเตอร์ ได้แก่ PETR1 ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์จากยีน *ERT1-1* เอง P35SCaMV ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ชนิดที่แสดงออกได้ทุกเนื้อเยื่อ และ PFBP1 ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์จากพิทูเนียที่แสดงออกเฉพาะที่ดอก โดยพบว่าประสิทธิภาพการถ่ายยีนที่ได้จากโปรโมเตอร์ PFBP1 นั้นสูงกว่าอีกสองโปรโมเตอร์ และยังพบว่าคาร์เนชั่นที่ได้รับการถ่ายยีน *ERT1-1* ที่ควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ P35SCaMV และ PETR1 ส่วนมากได้ตายลงในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและหลังนำออกปลูก ซึ่งคาดว่าการยับยั้งการตอบสนองต่อเอทิลีนในทุกระยะของพืชจะทำให้ความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นใหม่ในขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและความอยู่รอดของพืชภายหลังการออกปลูกในสภาพธรรมชาติลดลง แต่การถ่ายยีนโดยใช้ PFBP1 ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่แสดงออกเฉพาะที่ดอกทำให้ลดผลกระทบที่จะเกิดขึ้นจากการตอบสนองของเอทิลีนที่เปลี่ยนแปลงไปในกระบวนการพัฒนาและยังมีผลกระทบต่อ

กระบวนการเพื่อความอยู่รอดของพืชที่ต้องอาศัยเอทิลีน เช่น การงอกของเมล็ด การพัฒนาของต้นอ่อน รวมทั้งกลไกการป้องกันตัวเองต่อเชื้อโรคและแมลง

ในงานวิจัยนี้ได้ถ่ายยีน *CPACO* antisense ซึ่งเป็นยีนที่ได้จากมะละกอ เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย โดยเป็นการถ่ายยีนแบบ heterologous antisense RNA ซึ่งยีน *CPACO1* มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสที่ 66 เปอร์เซ็นต์ และ *CPACO2* มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 69 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน *ACO* ในกล้วยไม้สกุลหวาย ดังนั้นการที่ใช้ยีน *CPACO* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสน้อยกว่าการใช้ยีนจากกล้วยไม้สกุลหวายเอง ก็คาดว่าทำให้ช่วยให้ลดผลกระทบที่จะเกิดขึ้นจากการผลิตเอทิลีนที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาของพืชในระยะต่าง ๆ ลดลงบ้าง แต่เมื่อพิจารณาผลของการถ่ายยีนในขั้นตอนของการพัฒนาเป็นต้นใหม่ ซึ่งพบว่าบางสายต้นมีการพัฒนาเป็นต้นใหม่มีประสิทธิภาพลดลง แสดงให้เห็นว่าน่าจะเกิดจากอิทธิพลของโปรโมเตอร์ 35SCaMV ที่ใช้มีผลให้ยีนที่ใส่เข้าไปแสดงออกได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ทำให้เกิดผลเชิงลบต่อการพัฒนาเป็นต้นของ PLBs ที่ได้รับการถ่ายยีน

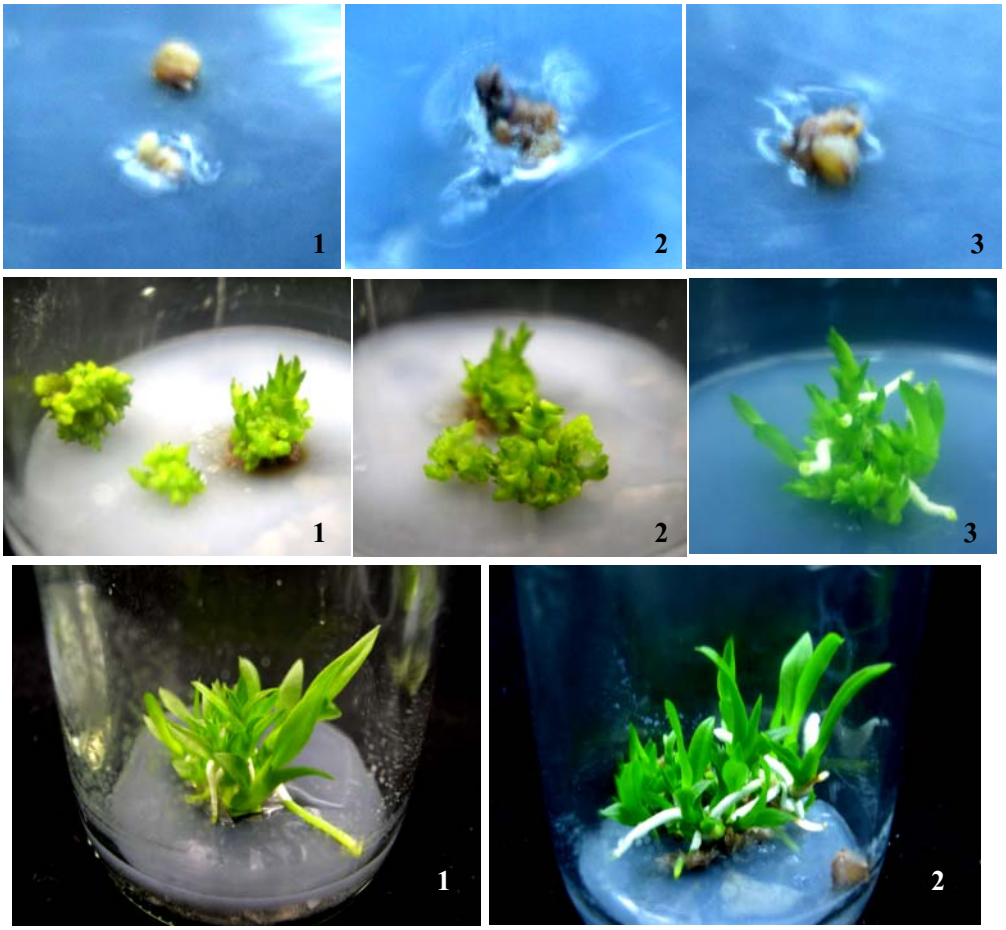
เมื่อชักให้เกิดนำต้นอ่อนหรือยอดอ่อนได้แล้ว ได้ย้ายต้นกล้วยไม้ที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านกำมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 12-16 สัปดาห์ เพื่อการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ของกล้วยไม้ พบว่ากล้วยไม้พันธุ์บอม17 ที่ได้รับการถ่ายยีนส่วนใหญ่มีลักษณะที่ใกล้เคียงกับกล้วยไม้ปกติ แต่บางต้นพบลักษณะของลำลูกกล้วยที่ยืดยาวกว่าปกติ (ภาพที่ 22 ก) และมีบางสายต้นมีลำต้นที่แคระ และมีข้อสั้น (ภาพที่ 22 ข) สำหรับกล้วยไม้พันธุ์ เอียสกุล ที่ได้รับการถ่ายยีนก็พบลักษณะของลำลูกกล้วยที่ยืดยาวกว่าปกติเช่นกัน (ภาพที่ 22 ง) และยังพบว่าบางสายต้นมีลำต้นที่แคระ ข้อสั้น ใบสั้นหนา และไม่แผ่ขยาย (ภาพที่ 22 จ) ซึ่งอาจเกิดจากผลของการแสดงออกของยีน *CPACO* antisense ที่ยับยั้งการสร้างเอทิลีนในกล้วยไม้แต่ละสายต้นไม่เท่ากันเนื่องจากตำแหน่งของการมีอยู่ของยีนในแต่ละสายต้นอาจแตกต่างกัน ซึ่งส่งผลถึงปริมาณการสร้างเอทิลีนที่ไม่เท่ากัน ซึ่งระดับของเอทิลีนที่แตกต่างกันนี้อาจมีผลรบกวนสมดุลของการสร้างและการทำงานของฮอร์โมนพืชที่แตกต่างกัน เช่นถ้ามีระดับเอทิลีนที่เหมาะสม เอทิลีนจะทำงานร่วมกับ ออกซิน และ จิบเบอเรลลิน ทำให้พืชมีลักษณะที่ปกติ แต่ถ้ามีเอทิลีนปริมาณน้อยการตอบสนองของพืชต่อฮอร์โมนเหล่านี้จะเปลี่ยนแปลงไป เช่นมีผลต่อการพัฒนาของเอมบริโอ และการพัฒนาของต้นอ่อน ทำให้เกิดการยืดตัวของข้อ เกิดรากได้น้อยและมีลักษณะผิดปกติ (Abeles *et al*., 1992)

ตารางที่ 6 จำนวนชิ้น tTCLs ที่เกิด PLBs ใหม่หลังคัดเลือก และจำนวนชิ้น tTCLs ที่สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้ จากการถ่ายยีน antisense *CPACO1* จาก pCAMBIA 1301a*ACO1* เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 และ เอียสกุล โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1

| การทดลอง | จำนวนชิ้น tTCL เป้าหมาย | | จำนวนชิ้น tTCLs ที่เกิด PLBs ใหม่หลังคัดเลือก นาน 12 สัปดาห์ | | จำนวนชิ้น tTCLs ที่สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อน | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 'บอม17' | 'เอียสกุล' | 'บอม17' | 'เอียสกุล' | 'บอม17' | 'เอียสกุล' |
| 1 | 420 | 411 | 8 | 1 | 3 | 0 |
| 2 | 155 | 152 | 6 | 5 | 2 | 0 |
| 3 | 508 | 470 | 10 | 4 | 2 | 0 |
| 4 | 416 | 409 | 12 | 3 | 1 | 0 |
| 5 | 409 | 410 | 0 | 5 | 0 | 3 |
| รวม | 1,908 | 1,852 | 36 | 18 | 7 | 3 |

ตารางที่ 7 จำนวนชิ้น tTCLs ที่เกิด PLBs ใหม่หลังคัดเลือก และจำนวนชิ้น tTCLs ที่สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้ จากการถ่ายยีน antisense *CPACO2* จาก pCAMBIA 13121a*ACO2* เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 และ เอียสกุลโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1

| การทดลอง | จำนวนชิ้น tTCL เป้าหมาย | | จำนวนชิ้น tTCLs ที่เกิด PLBs ใหม่หลังคัดเลือก นาน 12 สัปดาห์ | | จำนวนชิ้น tTCLs ที่สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อน | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 'บอม17' | 'เอียสกุล' | 'บอม17' | 'เอียสกุล' | 'บอม17' | 'เอียสกุล' |
| 1 | 400 | 390 | 5 | 0 | 1 | 0 |
| 2 | 157 | 153 | 3 | 2 | 0 | 0 |
| 3 | 508 | 460 | 5 | 4 | 2 | 1 |
| 4 | 415 | 402 | 7 | 2 | 1 | 0 |
| 5 | 391 | 402 | 3 | 3 | 0 | 2 |
| รวม | 1,871 | 1,807 | 23 | 11 | 4 | 3 |




ภาพที่ 21 การชักนำให้ PLBs ที่เกิดใหม่บนอาหารคัดเลือกให้เกิดเป็นต้นอ่อนโดยเพาะเลี้ยง PLBs บนอาหารชักนำต้นอ่อนสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ มันฝรั่งบด 15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านกำมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 8 สัปดาห์ ในห้องเพาะเลี้ยงควบคุมที่ให้แสงประมาณ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

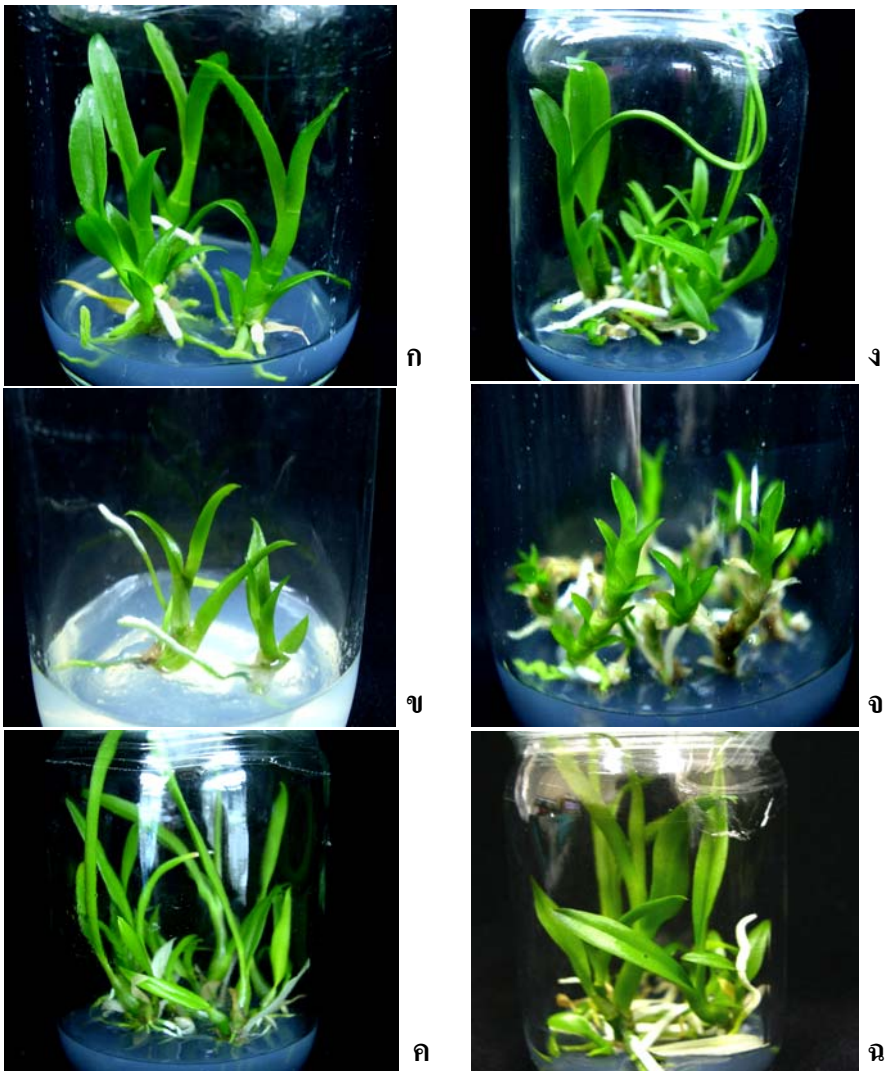
ก 1-3. PLBs ที่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้และตายในที่สุด

ข 1-2. PLBs ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *ACO* และพัฒนาเป็นยอดขนาดเล็กมากมาย แต่เป็นยอดที่แคระ ใบสั้นหนา และไม่แผ่ขยาย

ข 3. PLBs ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *ACO* และพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่มีรากสมบูรณ์

ค 1. ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน *gus* และ *hpt* โดยใช้ binary vector pCAMBIA 1301

ค 2. ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน




ภาพที่ 22 ลักษณะผิดปกติต่าง ๆ ของต้นกล้วยไม้ทั้ง 2 พันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีน *CPACO* antisense

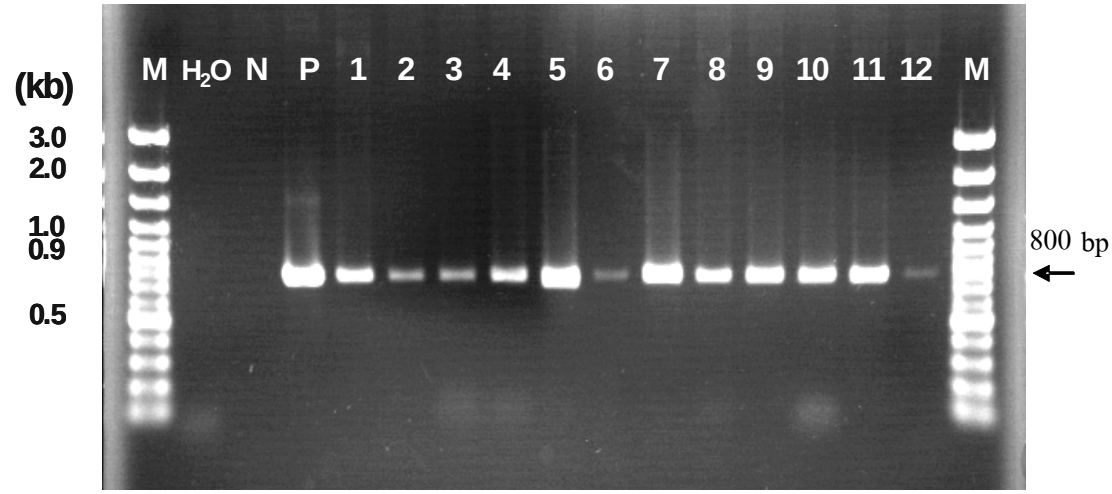
ก. กล้วยไม้พันธุ์ บอม17 ที่มีลักษณะของลำลูกกล้วยที่ยืดยาวกว่าปกติ
ข. กล้วยไม้พันธุ์ บอม17 ที่มีลำต้นที่แคระ ข้อสั้น ใบสั้นหนา และไม่แผ่ขยาย
ค. กล้วยไม้พันธุ์ บอม17 ที่มีลักษณะปกติ
ง. กล้วยไม้พันธุ์ เอียสกุล ที่มีลักษณะของลำลูกกล้วยที่ยืดยาวกว่าปกติ
จ. กล้วยไม้พันธุ์ เอียสกุล ที่มีลำต้นที่แคระ ข้อสั้น ใบสั้นหนา และไม่แผ่ขยาย
ฉ. กล้วยไม้พันธุ์ เอียสกุล ที่มีลักษณะปกติ

3.3 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR เทคนิค dot blot hybridization และเทคนิค Southern blot hybridization

หลังการคัดเลือกและชักนำให้ได้ต้นกล้วยไม้จากการถ่ายยีน *CPACO* antisense ในการทดลอง 4 ครั้งแรกสามารถชักนำต้นกล้วยไม้พันธุ์ บอม17 ที่ได้รับยีน antisense *CPACO1* ทั้งหมด 7 สายต้น แล้วเพิ่มจำนวนจากการเพาะเลี้ยงได้ทั้งหมด 294 ต้น และยีน antisense *CPACO2* ทั้งหมด 4 สายต้น ซึ่งเพิ่มจำนวนโดยการเพาะเลี้ยงได้ทั้งหมด 117 ต้น และ กล้วยไม้พันธุ์ เอียสกุล ที่ได้รับยีน antisense *CPACO2* 1 สายต้น ซึ่งเพิ่มจำนวนจากการเพาะเลี้ยงได้ทั้งหมด 4 ต้น จึงได้สกัดยีโนมิคดีเอ็นเอจากใบของกล้วยไม้ในแต่ละสายต้น สายต้นละ 1 ต้น (รวม 12 สายต้น) แล้วตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR และ dot blot hybridization ต่อไป แต่ต้นกล้วยไม้ถ่ายยีนที่ได้จากการทดลองในครั้งที่ 5 นั้นยังมีขนาดเล็กเกินไป จึงยังไม่ได้ทดสอบ

3.3.1 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *hpt* ในกล้วยไม้โดยเทคนิค PCR

เมื่อนำยีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจหายีน *hpt* โดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *hpt* คือ HPT-2F (forward) และ HPT-2Rv (reverse) ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้วจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 800 คู่เบส จากผลการตรวจสอบพบการมีอยู่ของยีน *hpt* ในยีโนมของกล้วยไม้ทั้งสองพันธุ์ทุกสายต้น (ภาพที่ 23)




ภาพที่ 23 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ขนาด 800 คู่เบส โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hpt* และใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของต้นกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนต้นแบบ วิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์

M. เครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 100 bp Ladder (Fermentus)

$H_2O$ negative control ($dH_2O$)

N. negative control จากดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

P. ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้พลาสมิด pCAMBIA 1301a*ACO1* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

1-7. ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของต้นกล้วยไม้พันธุ์ บอม17 ที่ได้รับยีน antisense *CPACO1* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

8-11. ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของต้นกล้วยไม้พันธุ์ บอม17 ที่ได้รับยีน antisense *CPACO2* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

12. ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของต้นกล้วยไม้พันธุ์ เอียสกุล ที่ได้รับยีน antisense *CPACO2* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

3.2.2 การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *hpt* ในกล้วยไม้โดยเทคนิค dot blot hybridization

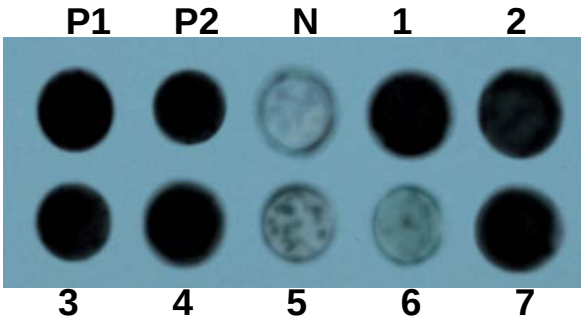
จากการตรวจวิเคราะห์การคงอยู่ของยีน *hpt* โดยใช้วิธี dot blot hybridization เพื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีนอย่างถาวรในยีโนมของกล้วยไม้ ผลการทดสอบพบว่าหลังจากนำแผ่นเมมเบรนไปประกบบนแผ่นฟิล์มเป็นเวลา 10 นาที พบว่ามีดีเอ็นเอจากบางสายต้นปรากฏสัญญาณจุดสีดำบนแผ่นฟิล์ม ซึ่งแสดงว่าสายต้นของกล้วยไม้เหล่านี้ได้รับการถ่ายยีน *hpt* โดยยีน *hpt* เข้าไปรวมตัวกับยีโนมของกล้วยไม้ได้อย่างถาวรและมีการแสดงออกอย่างสมบูรณ์ ซึ่งดีเอ็นเอจากต้นกล้วยไม้พันธุ์ บอม17 ที่ได้รับยีน antisense *CPACO1* ทั้งหมด 7 สายต้น ปรากฏสัญญาณจุดสีดำ 5 สายต้นได้แก่ Bo aACO1.1 1.2 1.3 1.4 และ 1.7 (ภาพที่ 24 ก) ดีเอ็นเอของต้นกล้วยไม้พันธุ์ บอม17 ที่ได้รับยีน antisense *CPACO2* ทั้งหมด 4 สายต้น ปรากฏสัญญาณจุดสีดำทั้ง4 สายต้น (ภาพที่ 24 ข) และกล้วยไม้พันธุ์ เอียสกุล ที่ได้รับยีน antisense *CPACO2* 1 สายต้นได้ปรากฏสัญญาณจุดสีดำเช่นกัน (ภาพที่ 24 ค)

การที่พบว่าบางสายต้นของกล้วยไม้พันธุ์ บอม17 ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนไม่ปรากฏจุดสัญยานสีดำบนแผ่นฟิลม์นี้อาจเนื่องจากในขั้นตอนของการเพิ่มต้นอ่อนสามารถเพิ่มต้นอ่อนได้จำนวนมาก โดยได้ต้นกล้วยไม้พันธุ์ บอม17 ที่คาดว่าได้รับยีน antisense *CPACO1* จาก 7 สายต้น เพิ่มจำนวนได้ 294 ต้น และต้นกล้วยไม้พันธุ์ บอม17 ที่คาดว่าได้รับยีน antisense *CPACO2* จาก 4 สายต้น เพิ่มจำนวนได้ 117 ต้น และ กล้วยไม้พันธุ์ เอียสกุล ที่ได้รับยีน antisense *CPACO2* จาก 1 สายต้น เพิ่มจำนวนได้ 4 ต้น ซึ่งการที่ได้รับต้นอ่อนจำนวนมากนี้อาจทำให้มีต้นอ่อนบางต้นเกิดการขาดหายไปของยีน *hpt* เนื่องจากในขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณต้นอ่อนไม่ได้ใช้สารคัดเลือกเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง เมื่อสุ่มเลือกต้นกล้วยไม้จากแต่ละสายต้นมาเพียง 1 ต้น นำมาตรวจสอบโดยวิธี dot blot hybridization จึงพบว่ามีบางสายต้นไม่ปรากฏสัญญาณจุดสีดำบนแผ่นฟิล์ม

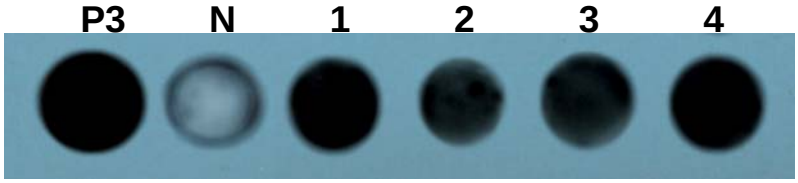
เนื่องจากผลของการตรวจสอบการคงอยู่ยีนโดยเทคนิค dot blot hybridization ปรากฏว่ามีบางสายต้นที่ไม่ปรากฏสัญญาณจุดสีดำ จึงได้คัดเลือกต้นกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนซ้ำเพื่อเลือกเฉพาะต้นที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin โดยเพาะเลี้ยงต้นกล้วยไม้ที่ได้ทั้งหมดบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านกำมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และสารปฏิชีวนะ hygromycin ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ปรากฏว่าต้นกล้วยไม้แต่ละสายต้นแสดงอาการทนทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin ได้ไม่เท่ากัน โดยสายต้น Bo aACO1.1 Bo aACO2.1 Bo aACO2.2 Bo aACO2.3 และ Bo aACO2.4

สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin ได้ดีคือมีต้นกล้วยไม้ส่วนมากที่ยังคงแสดงลักษณะปกติ เพียงแต่ชะงักการเจริญเติบโต แต่มีบางต้นไม่สามารถทนทานได้โดยใบและลำต้นเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแต่มี PLBs เกิดใหม่ขึ้นบริเวณรอบ ๆ ต้น และมีบางต้นตายในที่สุด ส่วนสายต้น Bo aACO1.2 Bo aACO1.3 และ Bo aACO1.4 สามารถทนทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin ได้ปานกลางคือ มีต้นที่ทนทาน และไม่ทนทานจำนวนใกล้เคียงกัน ส่วนสายต้น Bo aACO1.5 Bo aACO1.6 และ Bo aACO1.7 สามารถทนทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin ได้เล็กน้อย และสายต้น Es aACO2.1 ทั้ง 4 ต้น ซึ่งมีขนาดต้นเล็ก โดยมีความสูงเพียง 1 เซนติเมตร ไม่สามารถทนทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin ได้เลย

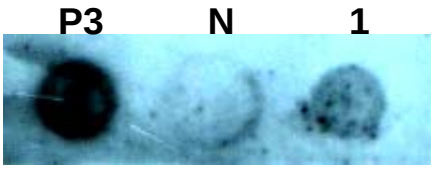
จากผลการคัดเลือกซ้ำที่พบว่า ต้นกล้วยไม้บางส่วนไม่สามารถทนทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin ได้อาจเกิดจากการใช้สารปฏิชีวนะ hygromycin ในความเข้มข้นเดียวกับการคัดเลือกชิ้น tTCLs คือความเข้มข้นที่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตรอาจเป็นความเข้มข้นที่มากเกินไปที่จะใช้คัดเลือกกล้วยไม้ในระยะที่พัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์แล้ว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chai *et al.* (2002) ที่ได้ทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนใน PLBs กล้วยไม้ฟาแลนนอพซิส ซึ่งขั้นตอนของการคัดเลือกในระยะ PLBs ได้ใช้สารปฏิชีวนะ hygromycin ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่การคัดเลือกในระยะการพัฒนาเป็นต้นได้ใช้ความเข้มข้นของ hygromycin ลดลงเหลือ1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้การที่พบว่ากล้วยไม้แต่ละสายต้นแสดงการทนทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin ได้ไม่เท่ากัน อาจเกิดจากแต่ละสายต้นมีจำนวนชุดของยีน *hpt* ที่สอดแทรกเข้าไปรวมอยู่กับยีโนมของพืชแตกต่างกัน และตำแหน่งที่อยู่ของยีนที่แตกต่างกัน ส่งผลให้มีการแสดงออกได้ไม่เท่ากัน (Dai *et al*., 2001)




ก




ข




ค

<u>ภาพที่ 24</u> การตรวจวิเคราะห์การคงอยู่ของยีน *hpt* ในต้นกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน โดยใช้เทคนิค dot blot hybridization ที่ตรวจสอบด้วยตัวตรวจสอบยีน *hpt*

P1. ดีเอ็นเอปริมาณ 1 นาโนกรัม จากพลาสมิด pCAMBIA 1301

P2. ดีเอ็นเอปริมาณ 1 นาโนกรัม จากพลาสมิด pCAMBIA 1301 a*ACO1*

P3. ดีเอ็นเอปริมาณ 1 นาโนกรัม จากพลาสมิด pCAMBIA 13121 a*ACO2*

N. negative control จากดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

1-7 ดีเอ็นเอปริมาณ 2 ไมโครกรัมที่สกัดที่สกัดจากใบของกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน

ก. 1-7 ดีเอ็นเอจากต้นกล้วยไม้ Bo aACO1.1 – Bo aACO1.7

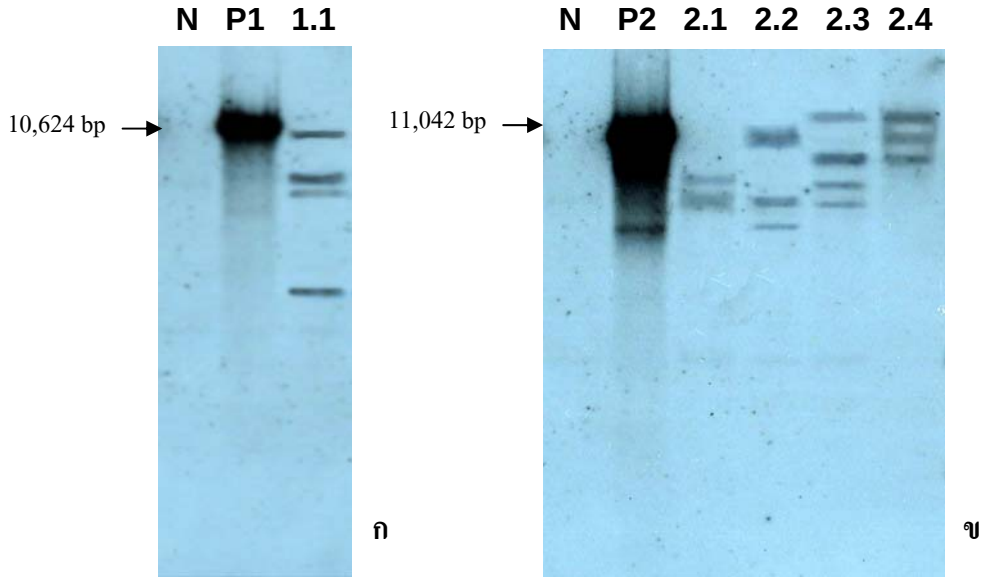
ข. 1-4 ดีเอ็นเอของต้นกล้วยไม้ Bo aACO2.1 – Bo aACO2.4

ค. 1 ดีเอ็นเอของต้นกล้วยไม้ Es aACO2.1

3.3.3 การตรวจสอบการคงอยู่และจำนวนชุดของยีน *hpt* ในกล้วยไม้โดยเทคนิค Southern blot hybridization

สกัดดีเอ็นเอจากต้นกล้วยไม้ในสายต้นที่ทนต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin ได้ดี 5 สายต้น คือ Bo aACO1.1 Bo aACO2.1 Bo aACO2.2 Bo aACO2.3 และ Bo aACO2.4 เพื่อตรวจสอบการคงอยู่และจำนวนชุดของยีน *hpt* ในกล้วยไม้โดยเทคนิค Southern blot hybridization ผลปรากฏว่าสามารถตรวจพบสัญญาณสีดำบนแผ่นฟิล์มที่ได้จากดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ทุกสายต้น โดยแต่ละสายต้นให้แถบสีดำที่ไม่อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน โดยต้นกล้วยไม้ Bo aACO1.1 และ Bo aACO2.3 พบจำนวนชุดของยีนอย่างน้อย 4 ชุด ส่วน Bo aACO2.1 พบจำนวนชุดของยีน *hpt* อย่างน้อย 2 ชุด ต้นกล้วยไม้ Bo aACO2.2 และ 2.4 พบจำนวนชุดของยีนอย่างน้อย 3 ชุด (ภาพที่ 25)

จากผลการการตรวจสอบการคงอยู่และจำนวนชุดของยีน *hpt* ในกล้วยไม้โดยเทคนิค Southern blot hybridization จากต้นกล้วยไม้ในสายต้นที่ทนต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin ได้ดีทั้ง 5 สายต้น พบว่าทุกสายต้นปรากฏแถบสีดำบนแผ่นฟิลม์ ในขณะที่ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่ปรากฏแถบสีดำ แสดงว่าทั้ง 5 สายต้นนี้มีการคงอยู่ของยีนที่ถ่ายเข้าไปและสามารถแสดงออกได้ แต่พบว่าจำนวนชุดของยีนที่ได้ถ่ายเข้าไปโดยพบจำนวนชุดของยีนอยู่ที่ 2-4 ชุด และตำแหน่งของยีนที่คงอยู่แตกต่างกันในทุกสายต้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Men *et al*. (2003b) ที่ทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนในกล้วยไม้หวาย *Den. nobile* โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ซึ่งก็พบว่าจำนวนชุดที่ถ่ายเข้าไปอยู่ที่ 2-4 ชุดเช่นเดียวกัน นอกจากนั้นยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dai *et al*. (2001) ที่ได้เปรียบเทียบผลของการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์ Taipei 309 โดยใช้ *A. tumefaciens* และการถ่ายยีนโดยวิธี particle bombardment โดยเปรียบเทียบทั้งจำนวนชุดของยีน และปริมาณการแสดงออกของยีน โดยเขาพบว่าการถ่ายยีนโดย ใช้ *A. tumefaciens* ให้จำนวนชุดของยีนอยู่ที่ 1-5 ชุด




<u>ภาพที่ 25</u> การตรวจวิเคราะห์การคงอยู่ของยีน *hpt* ในต้นกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน โดยใช้เทคนิค Southern blot hybridization ที่ตรวจสอบด้วยตัวตรวจสอบยีน *hpt*

ก. ตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *hpt* ในต้นกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO1*

N. negative control จากดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

P1. ดีเอ็นเอปริมาณ 3 นาโนกรัม จากพลาสมิด pCAMBIA 1301 a*ACO1*

1.1. ดีเอ็นเอปริมาณ 15 นาโนกรัม จากสายต้น Bo aACO 1.1

ข. ตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *hpt* ในต้นกล้วยไม้ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO2*

N. negative control จากดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

P2. ดีเอ็นเอปริมาณ 3 นาโนกรัม จากพลาสมิด pCAMBIA 13121 a*ACO2*

2.1. ดีเอ็นเอปริมาณ 15 นาโนกรัม จากสายต้น Bo aACO 2.1

2.2. ดีเอ็นเอปริมาณ 15 นาโนกรัม จากสายต้น Bo aACO 2.2

2.3. ดีเอ็นเอปริมาณ 15 นาโนกรัม จากสายต้น Bo aACO 2.3

2.4. ดีเอ็นเอปริมาณ 15 นาโนกรัม จากสายต้น Bo aACO 2.4

3.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ACO* ในระดับกิจกรรมของเอนไซม์ และการผลิตเอทิลีน

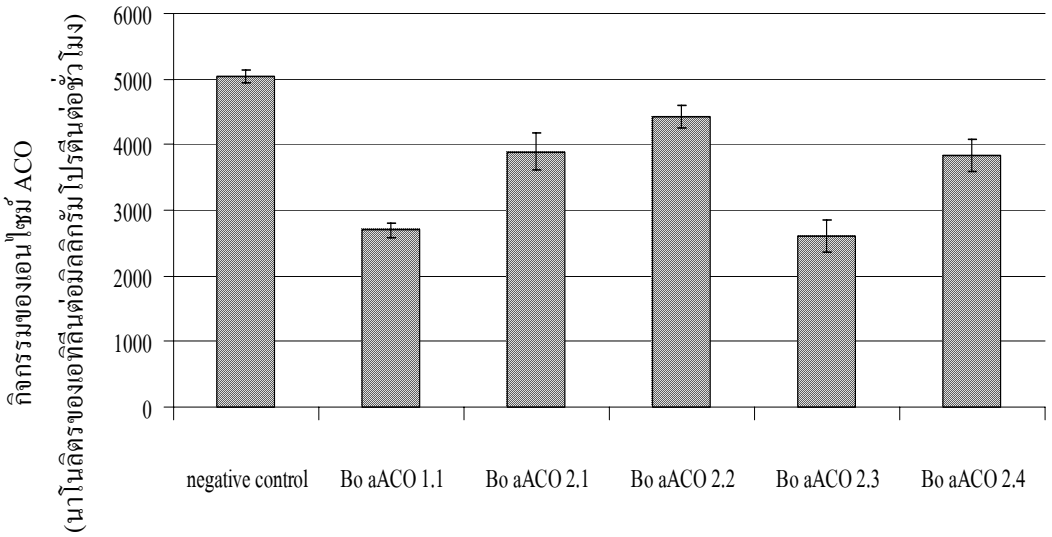
3.4.1 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACO ของต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน *CPACO* แบบ antisense

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACO ทำโดยวิธีดัดแปลงจากวิธีการของ Virezen *et al*. (1999) โดยใช้ใบของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีน นำไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACO โดยวัดจากปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยน ACC ปริมาณ 200 ไมโครโมลาร์ ที่ให้จากภายนอกด้วยเอนไซม์ ACO จากใบกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน วัดปริมาณเอทิลีนด้วยเครื่อง gas chromatography แล้วเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดซึ่งตรวจสอบโดยวิธี Bradford protein assay (Bradford, 1976) ผลการทดลองพบว่าต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACO สูงกว่าต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนทุกสายต้น โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACO ที่ 5036 นาโนลิตรต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง และสำหรับต้นกล้วยไม้ถ่ายยีนแต่ละสายต้นก็มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACO ที่แตกต่างกัน โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACO อยู่ในช่วง 2610 – 4425 นาโนลิตรต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง สายต้นที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ ACO น้อยที่สุดคือ Bo aACO2.3 (ภาพที่ 26)

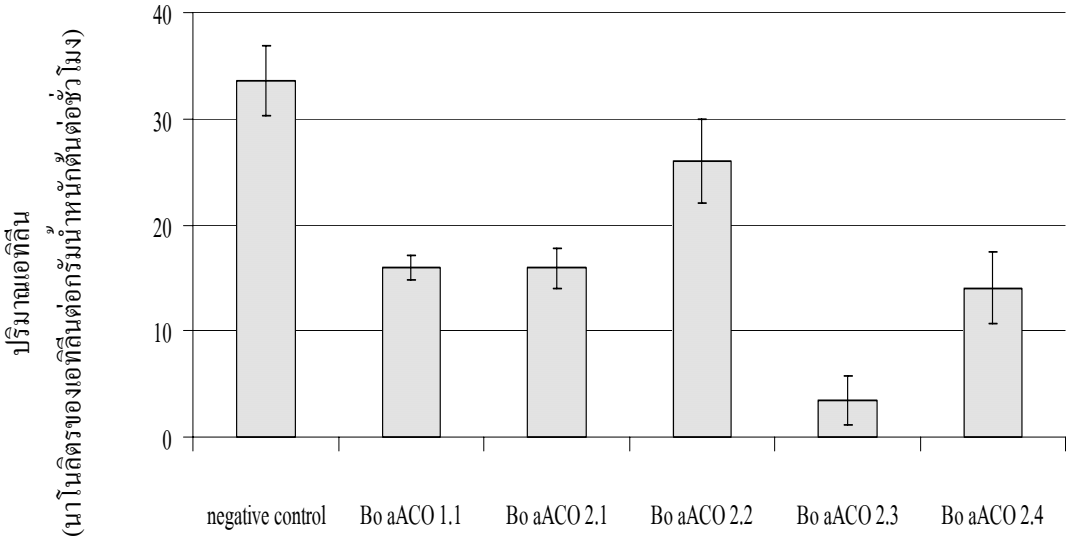
3.4.2 การวัดปริมาณเอทิลีนของต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ACO แบบ antisense

การวัดปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อของกล้วยไม้ใช้วิธีการดัดแปลงจาก Bolitho *et al.* (1997) โดยวัดปริมาณเอทิลีนการสร้างจากต้นกล้วยไม้ทั้งต้นที่ได้รับการถ่ายยีนเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเครื่อง gas chromatography พบว่า ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีการสร้างเอทิลีนได้มากกว่าต้นกล้วยไม้ถ่ายยีนทุกสายต้น โดยมีปริมาณเอทิลีน 34 นาโนลิตรต่อกรัมน้ำหนักต้นต่อชั่วโมง และสำหรับต้นกล้วยไม้ถ่ายยีนแต่ละสายต้นก็มีปริมาณเอทิลีนที่แตกต่างกันเช่นเดียวกับกิจกรรมของเอนไซม์ ACO โดยมีปริมาณเอทิลีนอยู่ในช่วง 3 – 26 นาโนลิตรต่อกรัมน้ำหนักต้นต่อชั่วโมง และสายต้นที่วัดปริมาณเอทิลีนได้น้อยที่สุดคือ Bo aACO2.3 ซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ ACO ที่วัดได้ข้างต้น (ภาพที่ 27)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CPACO1* และ *CPACO2* ที่ถูกถ่ายเข้าไปในกล้วยไม้โดยเทคนิค antisense โดยตรวจสอบระดับกิจกรรมของเอนไซม์ และการผลิตเอทิลีนที่สร้างขึ้นในต้นกล้วยไม้ถ่ายยีน 5 สายต้นได้แก่ Bo aACO1.1 และ Bo aACO2.1-2.4 โดยได้ทดสอบกับต้นกล้วยไม้ที่เป็น mericlone ของแต่ละสายต้น ซึ่งทุกสายต้นที่ได้ทดสอบนี้มีลักษณะทางสรีระที่ไม่แตกต่างกันและไม่แตกต่างจากต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ผลการตรวจสอบแสดงให้เห็นว่าต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* สามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ ACO และการสร้างเอทิลีนได้ในต้นกล้วยไม้ได้ แต่การที่สามารถยับยั้งในระดับที่แตกต่างกัน อาจเป็นผลมาจากทั้งจำนวนชุดและตำแหน่งของยีนที่ถ่ายเข้าสู่กล้วยไม้ในแต่ละสายต้นที่แตกต่างกันส่งผลให้มีการแสดงออกได้ไม่เท่ากัน โดยพบว่าในสายต้นที่มีจำนวนชุดของยีน antisense มากขึ้นมีแนวโน้มยับยั้งการทำงานของยีน *ACO* ได้มากขึ้นด้วย เช่นในสายต้น Bo aACO2.3 และ Bo aACO1.1 ที่มีจำนวนชุดของยีน 4 ชุด พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ ACO และการสร้างเอทิลีน น้อยกว่าสายต้นที่มีจำนวนชุดของยีน 2-3 ชุด ซึ่งโดยปกติแล้วถ้าพืชดัดแปลงพันธุกรรมมีจำนวนชุดของยีนที่ถูกถ่ายมากมักจะพบว่าเกิดการจะยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่ถ่ายเข้าไป (Chia *et al*. 1990 ; Finnegan and MacElroy, 1994) แต่ในกรณีของการถ่ายยีนแบบ antisense เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนที่มีอยู่ในพืชแล้วนั้น เมื่อพืชดัดแปลงพันธุกรรมมีจำนวนชุดของยีนที่ถูกถ่ายมากอาจทำให้สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ต้องการได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบสายต้นที่มีจำนวนชุดของยีนที่ถูกถ่ายเท่ากัน เช่นสายต้น Bo aACO2.2 และ Bo aACO2.4 ซึ่งมีจำนวนชุดของยีน 3 ชุด กลับพบว่าให้ผลการยับยั้งการแสดงออกที่แตกต่างกันโดย Bo aACO2.4 สามารถยับยั้งการแสดงออกได้มากกว่า Bo aACO2.2 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าตำแหน่งแตกต่างกันของยีนบนโครโมโซมของกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมน่าจะมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีนอย่างมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Aida *et al*. (1998) ที่ได้ถ่ายยีน *ACO* แบบ antisense เพื่อยืดอายุการใช้งานของดอก torenia พบว่าได้ต้น torenia ถ่ายยีนที่มีจำนวนชุดของยีน 1 ชุดเท่ากัน แต่แสดงผลของการยับยั้งได้ไม่เท่ากัน




ภาพที่ 26 กิจกรรมของเอนไซม์ ACO ในใบของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน (BOaACO1.1 และ BOaACO2.1-2.4) และไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control) ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACO โดยวัดปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยน ACC ที่ให้จากภายนอกด้วยเอนไซม์ ACO จากกล้วยไม้




ภาพที่ 27 ปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อของกล้วยไม้ใช้วิธีการดัดแปลง โดยวัดปริมาณการสร้างจากต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน(BOaACO1.1 และ BOaACO2.1-2.4) และไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control)

# สรุป

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการถ่ายยีนเพื่อให้ทราบปัจจัยที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้ *A tumefaciens* เป็นพาหะ และนำปัจจัยต่าง ๆ ที่ทดสอบแล้วนั้นมาใช้ในการถ่ายยีน antisense *CPACO* เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย

การทดสอบปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ ได้ทดสอบปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร VW เพื่อเพิ่มปริมาณ PLBs ของกล้วยไม้พบว่าปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมคือน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทดสอบความหนาของ tTCLs จาก PLBs ที่มีลักษณะเหมาะสม พบว่าความหนาของ tTCLs ที่ 2 มิลลิเมตร สามารถชักนำให้เกิด PLBs ใหม่ได้มากและรวดเร็ว ส่วนการทดสอบสูตรอาหารเพื่อชักนำให้ PLBs เกิดใหม่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนได้รวดเร็ว และได้ต้นอ่อนที่สมบูรณ์แข็งแรง พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมคือสูตรอาหาร VW ที่เติมมันฝรั่งบด 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านกำมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาระบบการถ่ายยีนที่เหมาะสมเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้ *A tumefaciens* เป็นพาหะ ได้ทดสอบระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin B ที่เหมาะสมพบว่า ความเข้มข้นที่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารคัดเลือก สามารถกำจัดเนื้อเยื่อของ tTCLs ความหนา 2 มิลลิเมตรที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้ทั้งหมด และเมื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวาย โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่บรรจุพลาสมิด pCAMBIA 1301 โดยมียีน *hpt* เป็นยีนคัดเลือก และยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล ในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบทั้งหมด 6 ปัจจัย พบว่าวิธีการที่เหมาะสมในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนอย่างถาวรและกำจัดเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้พร้อมทั้งกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* คือการเลี้ยงชิ้น tTCLs ที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกชนิดแข็งสูตร VW ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 4 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายมาเลี้ยงในอาหารคัดเลือกเหลวสูตรเดิมต่ออีก 8 สัปดาห์ สำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก่อนการถ่ายยีน (pre-culture) เพื่อกระตุ้นให้เนื้อเยื่อเป้าหมายตื่นตัวต่อการแบ่งเซลล์ พบว่าระยะเวลา pre-culture ที่เหมาะสมคือระยะเวลา 3 วัน ส่วนการทดสอบการเลี้ยงเนื้อเยื่อเป้าหมายร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* (co-cultivation) พบว่าระยะเวลา co-cultivation ที่เหมาะสมคือ 2 วัน และความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ใช้เลี้ยงร่วมกับชิ้น tTCLs ของกล้วยไม้สกุลหวายที่

เหมาะสมคือความเข้มข้นที่ 5 x $10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ($OD_{600}$ ≈1) และเมื่อศึกษาระยะเวลา sonication ที่เหมาะสมเพื่อสร้างบาดแผลขนาดเล็กให้กับเนื้อเยื่อเป้าหมายพบว่าระยะเวลา sonication ที่เหมาะสมคือ 6 วินาที ส่วนการทดสอบความเข้มข้นของ acetosyringone ที่เติมในอาหารสำหรับเลี้ยงร่วมกันระหว่างเนื้อเยื่อพืชและเชื้อ *A. tumefaciens* (co-cultivation medium) ที่เหมาะสมเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีน พบว่าความเข้มข้นของ acetosyringone ที่ควรเลือกใช้ได้แก่ความเข้มข้นที่ 200 ไมโครโมลาร์

การศึกษาถ่ายยีน *CPACO* antisense เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย โดยสร้าง binary vector ของยีน *CPACO* แบบ antisense 2 constructs จากยีน *CPACO*1 และ *CPACO*2 คือ pCAMBIA 1301a*ACO1* และ pCAMBIA 13121a*ACO2* แล้วถ่ายยีนเข้าสู่ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 เพื่อใช้ถ่ายยีนเข้าสู่ tTCLs ของกล้วยไม้สกุลหวายสองพันธุ์คือ บอม17 และ เอียสกุล และถ่ายยีนโดยใช้ปัจจัยต่าง ๆ ที่ได้ศึกษาแล้วข้างต้น พบว่าจากการถ่ายยีน *CPACO1* antisense พบว่าได้รับจำนวนสายต้นของต้นกล้วยไม้พันธุ์ บอม17 7 สายต้น และ พันธุ์ เอียสกุล 3 สายต้น ส่วนการถ่ายยีน antisense *ACO2* พบว่าได้รับจำนวนสายต้นของต้นกล้วยไม้พันธุ์ บอม17 4 สายต้น และ พันธุ์ เอียสกุล 3 สายต้น

เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *hpt* ในกล้วยไม้โดยเทคนิค PCR พบว่าปรากฏแถบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส จากดีเอ็นเอของกล้วยไม้ทั้งสองพันธุ์ทุกสายต้น แต่เมื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *hpt* ในกล้วยไม้โดยเทคนิค dot blot hybridization พบว่าส่วนใหญ่ตรวจพบการมีอยู่ของยีน เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *hpt* ในยีโนม และจำนวนชุดของยีน *hpt* โดยเทคนิค Southern blot hybridization ในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ บอม17 จาก 5 สายต้นที่ได้ตรวจพบการมีอยู่ของยีนโดยเทคนิค dot blot hybridization แล้ว พบการคงอยู่ของยีน *hpt* ในทุกสายต้นโดยพบจำนวนชุดของยีนอย่างน้อย 2-4 ชุด

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACO และการวัดปริมาณเอทิลีนของต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน *CPACO1* และ *CPACO2* แบบ antisense พบว่าต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACO และการสร้างเอทิลีนต่ำกว่าต้นกล้วยไม้ปกติทุกสายต้น