



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
ปริญญา

..... เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

สาขา

..... โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

ภาควิชา

เรื่อง การถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอทิลีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์โดยใช้เวกเตอร์ pMAT21

Transformation of Ethylene-Related Genes into *Dendrobium* 'Pompadour' Using pMAT21 Vector

นามผู้วิจัย นางสาวเบญจวรรณ สุวรรณนิตย์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(..... อาจารย์อรรณพ ชัยวาทการพาณิชย์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(..... ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(..... อาจารย์ยวีร์ฉิรา อิมสภาย, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา
(..... รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
(..... รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ **เดือน** **พ.ศ.**

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอทิลีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาด้ว
โดยใช้เวกเตอร์ pMAT21

Transformation of Ethylene-Related Genes into *Dendrobium* 'Pompadour'
Using pMAT21 Vector

โดย

นางสาวเบญจวรรณ สุวรรณเนตย์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2552

เบญจวรรณ สุวรรณเนตย์ 2552: การถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอทิลีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์โดยใช้เวกเตอร์ pMAT21 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ เกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์อรรณพ ชัชวาลการพาณิชย์, Ph.D. 140 หน้า

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์โดยใช้เวกเตอร์ pMAT21 ซึ่งมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผลและยีน *ipt* เป็นยีนคัดเลือก พบว่าการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ความเข้มข้น $\sim 4.1 \times 10^{17}$ cfu/ml และการ co-cultivation ระหว่างเชื้อกับ PLBs ของกล้วยไม้ร่วมกับสาร celite ความเข้มข้น 4.5 กรัมต่อลิตร โดยใช้เครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 30 นาที เป็นวิธีที่เหมาะสมในการถ่ายยีน และใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียภายหลังการถ่ายยีน การศึกษาครั้งนี้ทำการถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอทิลีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ คือ ยีน *ACS* และ *ACO* โดยใช้ระบบเวกเตอร์ pMAT21 เพื่อสร้างกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนเป้าหมายและปราศจากยีนคัดเลือก ในการทดลองครั้งนี้ทำการแบ่งยีน *ACS* และ *ACO* ออกเป็นส่วนต่าง ๆ 3 ส่วน ได้แก่ บริเวณ 5' ของยีน, บริเวณ central region และบริเวณ 3' ของยีน ซึ่งเรียกว่า *ACS4*, *ACSB*, *ACSC* สำหรับยีน *ACS* และ *ACO4*, *ACOB*, *ACOC* สำหรับยีน *ACO* ตามลำดับ จากนั้นทำการสร้างชุดยีนแต่ละส่วนดังกล่าวในลักษณะ antisense orientation เข้าสู่เวกเตอร์ pMAT21 เพื่อถ่ายเข้าสู่กล้วยไม้โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย ภายหลังการถ่ายยีน 3-4 เดือน PLBs พัฒนาเป็นยอดกระจุกที่เกาะตัวกันแน่น และเกิดการพัฒนาด้านปอดจากยอดกระจุกดังกล่าวภายหลังการถ่ายยีน 6-8 เดือน หลังจากนั้นนำต้นปอดมาตรวจสอบด้วยวิธี Southern blot analysis พบว่ากล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน AS-*ACSB* และยีน AS-*ACOB* มียีนแทรกตัวอยู่ในจีโนม 1 ชุด จำนวน 5 และ 2 ต้น ตามลำดับ ในขณะที่กล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน AS-*ACO4* มียีนแทรกตัวอยู่ในจีโนมตั้งแต่ 2-4 ชุด โดยต้นกล้วยไม้ดังกล่าวทุกต้นปราศจากยีนคัดเลือก จากการตรวจการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ พบว่าต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน AS-*ACSB* ได้แก่ line AS-*ACSB*-203A และ AS-*ACSB*-208A มีการแสดงออกของยีน AS-*ACSB* มาก และพบการแสดงออกของยีน sense *ACS* น้อยลง และในต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน AS-*ACOB* ได้แก่ line AS-*ACOB*-10B และ AS-*ACOB*-11B มีการแสดงออกของยีน AS-*ACOB* มาก และพบการแสดงออกของยีน sense *ACO* น้อยลง ดังนั้นการถ่ายยีน AS-*ACS* หรือ AS-*ACO* ด้วยเวกเตอร์ pMAT21 สามารถสร้างกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน AS-*ACS* หรือ AS-*ACO* และปราศจากยีนคัดเลือกได้

Benjawan Suwannate 2009: Transformation of Ethylene-Related Genes into *Dendrobium* 'Pompadour' Using pMAT21 Vector. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Ms. Orawan Chatchawankanphanich, Ph.D. 140 pages.

Parameters affecting gene transformation into *Dendrobium* 'Pompadour' by pMAT21 vector containing *gus* gene as reporter gene and *ipt* gene as selectable gene were studied. The optimum conditions were used of *Agrobacterium* strain EHA105 at concentration of $\sim 4.1 \times 10^7$ cfu/ml, co-cultivation between *Agrobacterium* and PLBs added with celite 4.5 g/l by vortex mixer for 30 min and use of cefotaxime 200 mg/l for growth suppression of *Agrobacterium* after transformation. In this study, ethylene-related genes which are *ACS* and *ACO* genes were transformed into *Dendrobium* 'Pompadour' by pMAT21 vector to generate marker free transgenic orchid. Both *ACS* and *ACO* genes were divided into 3 regions including 5' region, central region and 3' region that was named as *ACSA*, *ACSB*, *ACSC* for *ACS* gene and *ACOA*, *ACOB* and *ACOC* for *ACO* gene, respectively. Each region was cloned into pMAT21 vector in antisense orientation for gene transformation into orchid by *Agrobacterium*. The transformed PLBs developed extreme shooties within 3-4 months after transformation. Then, normal shoot developed from shooties within 6-8 months after transformation. From Southern blot analysis of normal shoots, it showed that five and two putative transgenic orchids transformed with AS-*ACSB* and AS-*ACOB* contained only one copy of transgene, respectively. While, orchids transformed with AS-*ACOA* contained 2-4 copies of transgene. All of these putative transgenic orchids were free of marker gene. From analysis of gene expression at RNA level, two transgenic lines of orchid transformed with AS-*ACSB* which are line AS-*ACSB*-203A and line AS-*ACSB*-208A showed high level of expression of antisense *ACSB*, but expression of endogenous sense *ACS* was low. The results were the same in two transgenic lines of orchid transformed with AS-*ACOB* which are line AS-*ACOB*-10B and line AS-*ACOB*-11B. Therefore, transformation with AS-*ACS* or AS-*ACO* cloned in pMAT21 vector could produce marker-free transgenic orchids containing AS-*ACS* or AS-*ACO* transgenes.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร. อรวรรณ ชัชวาลย์การพาณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้ให้คำปรึกษาและแนะนำแนวทางในการปฏิบัติงานและทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ และได้ให้ความรู้ อบรมสั่งสอน ช่วยเหลือทั้งทางด้านการเรียนและด้านอื่น ๆ อย่างเอาใจใส่เสมอมา ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสริมศิริ จันทรเปรม และ ดร. วชิรญา อิมสบาย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. นงลักษณ์ เทียนเสรี ประธานการสอบ และ ดร. ภาณุ เรืองจันทร์ ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ ขอขอบคุณคณาจารย์สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษาทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้จนข้าพเจ้าประสบผลสำเร็จในการศึกษา

ขอขอบพระคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (สวทช.) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ช่วยเหลือให้ทุนการศึกษาและสนับสนุนการค้นคว้าวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยด้านพืช ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (สวทช.) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ เครื่องมือและอุปกรณ์ สถานที่การวิจัยตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และพี่ ๆ ทุกคนในกลุ่มวิจัยด้านพืช โดยเฉพาะพี่น้องนาง วารินทร์ พี่ราตรี คุณพิทักษ์ธรรม พี่อัญญา บุญชด พี่น้ำทิพย์ พิรณฤทธิ์ และพี่มณฑนา บุญธรรม ที่ให้คำแนะนำรวมทั้งความช่วยเหลือด้านต่าง ๆ เป็นอย่างดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พี่ ๆ ที่ให้กำลังใจเสมอมาและให้การสนับสนุนทางการศึกษามาโดยตลอด และเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่งของข้าพเจ้าเสมอมา ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ผู้ที่เป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษา และเป็นมิตรที่ดี

เบญจวรรณ สุวรรณเนตย์

กุมภาพันธ์ 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(14)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	28
ผลและวิจารณ์	52
ผล	52
วิจารณ์	114
สรุป	120
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	122
ภาคผนวก	136
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	140

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ชูดยีน AS-ACS และยีน AS-ACO ในเวกเตอร์ pMAT21 ที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์	35
2 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เนื้อเยื่อกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชูดยีน AS-ACS หรือ AS-ACO	42
3 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีน AS-ACS และยีน AS-ACO ด้วยวิธี RT-PCR	47
4 ผลของการทดสอบสายพันธุ์ และความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้อ <i>A. tumefaciens</i> สายพันธุ์ EHA105, AGL-1 และ C58 ที่บรรจุเวกเตอร์ pMAT21 ต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์	53
5 ผลของการเจือจางสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่บรรจุเวกเตอร์ pMAT21 ในช่วงความเข้มข้น $OD_{600} = 1.61-2.00$ ที่มีต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์	55
6 ผลการทดสอบระยะเวลาที่ใช้ในการ co-cultivation ระหว่างสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 กับ PLBs ของกล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์	56
7 ผลการทดสอบวิธีการ co-cultivation ของสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 กับ PLBs ของกล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์	57
8 ผลของการเติมสาร celite ในสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียในการ co-cultivation กับ PLBs ของกล้วยไม้ต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์	59
9 ผลการทดสอบการเติมสาร celite ปริมาณต่าง ๆ ในสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียในการ co-cultivation นาน 30 นาที	61
10 ผลการทดสอบระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่สามารถกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ออกจาก PLBs ของกล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์ภายหลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 4 สัปดาห์	66

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
11 ชุดยีน AS-ACS และยีน AS-ACO ในเวกเตอร์ pCAMBIA1304, pGEM [®] -T Easy และ pMAT21 ที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์	70
12 ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์ในระยะยอดกระจุก (<i>ipt</i> shooties)	80
13 ประสิทธิภาพในการถ่ายยีน AS-ACS และ AS-ACO เข้าสู่กล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์ตรวจสอบในระยะต้นปกติโดยวิธี PCR	89
14 การตรวจวิเคราะห์จำนวนชุดของยีนที่อยู่ในจีโนมของกล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน AS-ACS และ AS-ACO ส่วน A, B และ C ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization	97
15 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน AS-ACS และ AS-ACO ในระดับอาร์เอ็นเอของกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี RT-PCR และ northern blot analysis	111

ตารางผนวกที่

1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว (ดัดแปลงมาจาก Vacin and Went, 1949)	137
2 องค์ประกอบของสูตร 2X-YT (Sambrook <i>et al.</i> , 1989) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	137
3 การเตรียมสารละลาย X-gluc solution ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใช้สำหรับเทคนิค GUS histochemical assay ดัดแปลงจากวิธีของ Jefferson <i>et al.</i> (1987)	138
4 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอจากจีโนมของกล้วยไม้โดยดัดแปลงจากวิธี TLES (Verword <i>et al.</i> , 1989)	138
5 การเตรียมบัฟเฟอร์สำหรับเทคนิค agarose gel electrophoresis	139

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ขั้นตอนการสังเคราะห์เอทิลีนในพืช	7
2	วัฏจักรเมทไทโอนีนของ Yang ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอทิลีน	8
3	การผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกโดยวิธี co-transformation ซึ่งประกอบด้วยยีนคัดเลือกและยีนที่สนใจมาจาก T-DNA ที่แตกต่างกัน 2 ชนิด ไปรวมตัวกันอยู่ที่ unlinked loci โดยวิธีการ co-transformation ยีนที่สนใจถูกแยกออกจากยีนคัดเลือกโดยการผสมข้าม (sexual crossing) ก. Two plasmid/two strain ข. Two plasmid/one strain ค. Two T-DNA/one plasmid	19
4	การเคลื่อนย้ายยีนคัดเลือกโดยวิธี transposable elements ซึ่งประกอบด้วย ยีน <i>Ds</i> ขนาบข้างยีนที่สนใจร่วมกับยีนคัดเลือกและยีน <i>Ac</i> transposase หลังจากยีนที่สนใจเคลื่อนที่ไปที่ตำแหน่ง unlinked loci มีการแยกยีนคัดเลือก โดยการผสมข้าม (sexual crossing)	21
5	การเคลื่อนย้ายยีนคัดเลือกออกจากระบบโดยวิธี Cre/ <i>lox</i> ซึ่งประกอบด้วยยีน <i>lox</i> P ขนาบข้างยีนคัดเลือกและอยู่ร่วมกับยีนที่สนใจ ยีน <i>Cre</i> ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายยีนคัดเลือกและยีนที่สนใจโดยวิธี re-transformation และ cross-pollination และสามารถสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือก โดยการผสมข้าม	23
6	การผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกโดยใช้ MAT Vector System ซึ่งประกอบด้วยยีนที่สนใจอยู่ข้างนอกส่วน recognition site ยีนคัดเลือกและยีน <i>recombinase</i> อยู่ภายในยีน RS, ยีนคัดเลือกจะถูกกำจัดออกจากจีโนมพืช โดยการทำงานของยีน <i>recombinase</i> (R)	24
7	ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเวกเตอร์ pMAT21 (ก) และการผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกโดยระบบ site-specific recombination (ข)	27

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	แผนภาพแสดงส่วนต่าง ๆ ของยีน <i>ACS</i> ในลักษณะ antisense (AS- <i>ACS</i>) ซึ่งแบ่งเป็น 3 ส่วน ได้แก่ AS- <i>ACSA</i> , AS- <i>ACSB</i> และ AS- <i>ACSC</i> และชนิดของไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการสร้าง construct ของยีน AS- <i>ACS</i> ใน plant expression vector pCAMBIA1304 ในตำแหน่ง <i>SpeI</i> และ <i>BstEII</i>	36
9	แผนภาพแสดงส่วนต่าง ๆ ของยีน <i>ACO</i> ในลักษณะ antisense (AS- <i>ACO</i>) ซึ่งแบ่งเป็น 3 ส่วน ได้แก่ AS- <i>ACOA</i> , AS- <i>ACOB</i> และ AS- <i>ACOC</i> และชนิดของไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการสร้าง construct ของยีน AS- <i>ACO</i> ใน plant expression vector pCAMBIA1304 ในตำแหน่ง <i>SpeI</i> และ <i>BstEII</i>	37
10	ขั้นตอนการสร้างชุดยีน AS- <i>ACS</i> และ AS- <i>ACO</i> เข้าสู่เวกเตอร์ pMAT21 โดยเริ่มจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน AS- <i>ACS</i> และยีน AS- <i>ACO</i> ที่อยู่ในเวกเตอร์ pCAMBIA1304 ซึ่งประกอบด้วย 35S promoter, AS- <i>ACS</i> หรือ AS- <i>ACO</i> และ NOS-T ย้ายชุดยีนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM [®] -T Easy จากนั้นทำการย้ายชุดยีนเข้าสู่เวกเตอร์ pMAT21 ที่ตำแหน่ง <i>SmaI</i> ดังนั้นจะได้ pMAT21-AS- <i>ACS</i> หรือ pMAT21-AS- <i>ACO</i>	38
11	แสดงตำแหน่งและทิศทางของยีน AS- <i>ACSB</i> หรือ AS- <i>ACOA</i> ที่อยู่ในพลาสมิด pGEM [®] -T Easy	50
12	การติดสีน้ำเงินของ PLBs กล้วยไม้ที่ทำการถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียโดยเติมสาร celite ความเข้มข้น 2.5 กรัม ในระหว่างการ co-cultivation ก) ไม่มีการเติมสาร celite ข) มีการเติมสาร celite	60
13	ลักษณะการติดสีน้ำเงินที่เกิดจากการแสดงออกของยีน <i>gus</i> ในเนื้อเยื่อกล้วยไม้ PLBs ที่เติมสาร celite ในปริมาณต่าง ๆ ในช่วงของการทำ co-cultivation	62
14	ลักษณะการเจริญของ PLBs ของกล้วยไม้พันธุ์ป้อมปาดัวร์เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าวและเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime	64
15	ลักษณะของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ภายหลังการถ่ายยีน เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว	67

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
16 การตรวจวิเคราะห์ชุดยีน AS-ACS และ ยีน AS-ACO ส่วน A, B และ C ที่เพิ่มปริมาณได้จากในเวกเตอร์ pCAMBIA1304-AS-ACSA, pCAMBIA1304-AS-ACSB, pCAMBIA1304-AS-ACSC, pCAMBIA1304-AS-ACOA, pCAMBIA1304-AS-ACOB และ pCAMBIA1304-AS-ACOC ตามลำดับ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-SmaI และ NOST-SmaI	71
17 แผนที่ของยีน AS-ACSA, AS-ACSB, AS-ACSC, AS-ACOA, AS-ACOB และ AS-ACOC ที่อยู่ในเวกเตอร์ pGEM [®] -T Easy	72
18 การตรวจวิเคราะห์ชุดยีน AS-ACS และยีน AS-ACO ส่วน A, B และ C ที่อยู่ในเวกเตอร์ pGEM [®] -T Easy ตรวจสอบโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ SpeI	73
19 การตรวจวิเคราะห์ชุดยีน AS-ACS และ ยีน AS-ACO ส่วน A, B และ C ที่อยู่ในเวกเตอร์ pGEM [®] -T Easy ตรวจสอบโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ SmaI	74
20 แผนที่ของยีน AS-ACS และ AS-ACO ที่บรรจุในเวกเตอร์ pMAT21 และ (ก) การตรวจวิเคราะห์ชุดยีน AS-ACS และ ยีน AS-ACO ส่วน A, B และ C ที่อยู่ในเวกเตอร์ pMAT21 ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-SmaI และ NOST-SmaI (ข)	75
21 ขั้นตอนในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียโดยใช้เวกเตอร์ pMAT21	78
22 ลักษณะการพัฒนาเป็นยอดกระจุกของ PLBs กล้วยไม้ภายหลังการถ่ายยีน pMAT21-AS-ACS หรือ pMAT21-AS-ACO	79

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- | | | |
|----|---|----|
| 23 | <p>การตรวจสอบยีน AS-ACSA และยีน <i>ipt</i> ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอด
 กระจกด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-<i>Sma</i>I และ ACS1BstEII ในการ
 ตรวจสอบยีน AS-ACSA วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel
 electrophoresis (ก) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization
 ตรวจสอบยีน AS-ACSA ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2
 ตรวจสอบยีน <i>ipt</i> (ค) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization
 ตรวจสอบยีน <i>ipt</i> ด้วย <i>ipt</i> probe (ง)</p> | 81 |
| 24 | <p>การตรวจสอบยีน AS-ACSB และยีน <i>ipt</i> ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอด
 กระจกด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-<i>Sma</i>I และ ACS400BstEII ในการ
 ตรวจสอบยีน AS-ACSB วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel
 electrophoresis (ก) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization
 ตรวจสอบยีน AS-ACSB ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2
 ตรวจสอบยีน <i>ipt</i> (ค) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization
 ตรวจสอบยีน <i>ipt</i> ด้วย <i>ipt</i> probe (ง)</p> | 82 |
| 25 | <p>การตรวจสอบยีน AS-ACSC และยีน <i>ipt</i> ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอด
 กระจกด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-<i>Sma</i>I และ ACS400BstEII ตรวจสอบ
 ยีน AS-ACSC วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก)
 และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน AS-ACSC
 ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ตรวจสอบยีน <i>ipt</i> (ค) และ
 ยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน <i>ipt</i> ด้วย <i>ipt</i>
 probe (ง)</p> | 83 |

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
26	การตรวจสอบยีน AS- <i>ACO</i> A และยีน <i>ipt</i> ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอค กระจุกด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S- <i>Sma</i> I และ ACO1R-B1 ตรวจสอบยีน AS- <i>ACO</i> A วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก) และ ยีนยัณผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน AS- <i>ACO</i> A ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ตรวจสอบยีน <i>ipt</i> (ค) และทำ การยีนยัณผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน <i>ipt</i> ด้วย <i>ipt</i> probe (ง)	84
27	การตรวจสอบยีน AS- <i>ACO</i> B และยีน <i>ipt</i> ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอค กระจุกด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S- <i>Sma</i> I และ ACO301R-B2 ตรวจสอบยีน AS- <i>ACO</i> B วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก) และ ยีนยัณผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน AS- <i>ACO</i> B ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ตรวจสอบยีน <i>ipt</i> (ค) และ ยีนยัณผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน <i>ipt</i> ด้วย <i>ipt</i> probe (ง)	85
28	การตรวจสอบยีน AS- <i>ACO</i> C และยีน <i>ipt</i> ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอค กระจุกด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S- <i>Sma</i> I และ ACO301R-B2 ตรวจสอบยีน AS- <i>ACO</i> C วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก) และ ยีนยัณผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน AS- <i>ACO</i> C ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ตรวจสอบยีน <i>ipt</i> (ค) และ ยีนยัณผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน <i>ipt</i> ด้วย <i>ipt</i> probe (ง)	86

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
29	การตรวจสอบยีน AS-ACSA และยีน <i>ipt</i> ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ในระยะ ยอดปกติด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S- <i>Sma</i> I และ ACS1 <i>Bst</i> II ในการ ตรวจสอบยีน AS-ACSA วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน AS-ACSA ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ในการตรวจสอบยีน <i>ipt</i> (ค) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน <i>ipt</i> ด้วย <i>ipt</i> probe (ง)	90
30	การตรวจสอบยีน AS-ACSB และยีน <i>ipt</i> ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอด ปกติด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S- <i>Sma</i> I และ ACS400 <i>Bst</i> II ในการ ตรวจสอบยีน AS-ACSB วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน AS-ACSB ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ในการตรวจสอบยีน <i>ipt</i> (ค) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน <i>ipt</i> ด้วย <i>ipt</i> probe (ง)	91
31	การตรวจสอบยีน AS-ACSC และยีน <i>ipt</i> ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอด ปกติ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S- <i>Sma</i> I และ ACS400 <i>Bst</i> II ในการ ตรวจสอบยีน AS-ACSC วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน AS-ACSC ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ในการตรวจสอบยีน <i>ipt</i> (ค) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน <i>ipt</i> ด้วย <i>ipt</i> probe (ง)	92

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- | | | |
|----|--|----|
| 32 | <p>การตรวจสอบยีน AS-<i>ACOA</i> และยีน <i>ipt</i> ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอค
 ปกติด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-<i>Sma</i>I และ ACO1R-B1 ในการตรวจสอบ
 ยีน AS-<i>ACOA</i> วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก)
 และยีนย่นผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน AS-<i>ACOA</i>
 ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ในการตรวจสอบยีน <i>ipt</i>
 (ค) และยีนย่นผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน <i>ipt</i> ด้วย
 <i>ipt</i> probe (ง)</p> | 93 |
| 33 | <p>การตรวจสอบยีน AS-<i>ACOB</i> และยีน <i>ipt</i> ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอค
 ปกติด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-<i>Sma</i>I และ ACO301R-B2 ในการตรวจสอบยีน
 AS-<i>ACOB</i> วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก) และ
 ยีนย่นผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน AS-<i>ACOB</i> ด้วย
 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ในการตรวจสอบยีน <i>ipt</i> (ค)
 และยีนย่นผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน <i>ipt</i> ด้วย <i>ipt</i>
 probe (ง)</p> | 94 |
| 34 | <p>การตรวจสอบยีน AS-<i>ACOC</i> และยีน <i>ipt</i> ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอค
 ปกติด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-<i>Sma</i>I และ ACO301R-B2 ในการ
 ตรวจสอบยีน AS-<i>ACOC</i> วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel
 electrophoresis (ก) และยีนย่นผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization
 ตรวจสอบยีน AS-<i>ACOC</i> ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2
 ในการตรวจสอบยีน <i>ipt</i> (ค) และยีนย่นผล PCR ด้วยวิธี Southern blot
 hybridization ตรวจสอบยีน <i>ipt</i> ด้วย <i>ipt</i> probe (ง)</p> | 95 |

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
35 การตรวจสอบจำนวนชุดของยีน <i>AS-ACSB</i> และ <i>ipt</i> ในกล้วยไม้ตัดแปลง พันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21- <i>AS-ACSB</i> ย่อยดีเอ็นเอด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bgl</i> II (ก) และตรวจวิเคราะห์จำนวนชุดของยีน <i>AS-ACSB</i> และ <i>ipt</i> ด้วยวิธี Southern blot hybridization ทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับ 35S-promoter probe (ข) และ <i>ipt</i> probe (ค) ตามลำดับ และตรวจสอบด้วยวิธี chemiluminescence detection	98
36 การตรวจสอบจำนวนชุดของยีน <i>AS-ACSB</i> และ <i>ipt</i> ในกล้วยไม้ตัดแปลง พันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21- <i>AS-ACSB</i> ย่อยดีเอ็นเอด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III (ก) และตรวจวิเคราะห์จำนวนชุดของยีน <i>AS-ACSB</i> และ <i>ipt</i> ด้วยวิธี Southern blot hybridization ทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับ 35S-promoter probe (ข) และ <i>ipt</i> probe (ค) ตามลำดับ และตรวจสอบด้วยวิธี chemiluminescence detection	99
37 การตรวจสอบจำนวนชุดของยีน <i>AS-ACOA</i> และ <i>ipt</i> ในกล้วยไม้ตัดแปลง พันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21- <i>AS-ACOA</i> ย่อยดีเอ็นเอด้วย เอนไซม์จำเพาะ <i>Hind</i> III (ก) และตรวจวิเคราะห์จำนวนชุดของยีน <i>AS-ACOA</i> และ <i>ipt</i> ด้วยวิธี Southern blot hybridization ทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับ 35S-promoter probe (ข) และ <i>ipt</i> probe (ค) ตามลำดับ และตรวจสอบด้วยวิธี chemiluminescence detection	101
38 การตรวจสอบจำนวนชุดของยีน <i>AS-ACOA</i> และ <i>ipt</i> ในกล้วยไม้ตัดแปลง พันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21- <i>AS-ACOA</i> ย่อยดีเอ็นเอด้วย เอนไซม์ <i>Bgl</i> II (ก) และตรวจวิเคราะห์จำนวนชุดของยีน <i>AS-ACOA</i> และ <i>ipt</i> ด้วยวิธี Southern blot hybridization ทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับ 35S-promoter probe (ข) และ <i>ipt</i> probe (ค) ตามลำดับ และตรวจสอบด้วยวิธี chemiluminescence detection	103

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
39	การตรวจสอบจำนวนชุดของยีน <i>AS-ACOB</i> และ <i>ipt</i> ในกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21- <i>AS-ACOB</i> ย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์จำเพาะ <i>Bgl</i> II (ก) และตรวจวิเคราะห์จำนวนชุดของยีน <i>AS-ACOB</i> และ <i>ipt</i> ด้วยวิธี Southern blot hybridization ทำปฏิกิริยาไฮบริดไคเซชันกับ 35S-promoter probe (ข) และ <i>ipt</i> probe (ค) ตามลำดับ และตรวจสอบด้วยวิธี chemiluminescence detection 104
40	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน sense <i>ACS</i> และ <i>AS-ACSB</i> ในต้นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21- <i>AS-ACSB</i> ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ S-ACSBC1F2 และ S-ACSBC215R2 สำหรับยีน sense <i>ACS</i> (ก) และยีนย่นผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน sense <i>ACS</i> ด้วย sense <i>ACS</i> probe (ข) ใช้ไพรเมอร์ AS-ACS400R-BstEII และ AS-ACS900F-SpeI สำหรับตรวจสอบยีน <i>AS-ACSB</i> (ค) และยีนย่นผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน <i>AS-ACSB</i> ด้วย <i>AS-ACSB</i> probe (ง) 107
41	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน sense <i>ACO</i> และ <i>AS-ACOA</i> ในต้นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21- <i>AS-ACOA</i> ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ S-ACOA745F1 กับ S-ACOA945R1 สำหรับยีน sense <i>ACO</i> (ก) และยีนย่นผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน sense <i>ACO</i> ด้วย sense <i>ACO</i> probe (ข) ใช้ไพรเมอร์ AS-ACO301R-B2 และ AS-ACO635F-S1 สำหรับตรวจสอบยีน <i>AS-ACOA</i> (ค) และยีนย่นผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน <i>AS-ACOA</i> ด้วย <i>AS-ACOA</i> probe (ง) 108

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
42	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน sense <i>ACO</i> และ AS- <i>ACOB</i> ในต้นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21-AS- <i>ACOB</i> ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ S-ACOB1F2 กับ S-ACOB200R2 สำหรับยีน sense <i>ACO</i> (ก) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน sense <i>ACO</i> ด้วย sense <i>ACO</i> probe (ข) ใช้ไพรเมอร์ AS-ACO301R-B2 และ AS-ACO635F-S1 สำหรับตรวจสอบยีน AS- <i>ACOB</i> (ค) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน AS- <i>ACOB</i> ด้วย AS- <i>ACOB</i> probe (ง)	109
43	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน sense <i>ACS</i> (ก) ยีน AS- <i>ACSB</i> (ข) ยีน 18s rRNA (ค) ในต้นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21-AS- <i>ACOA</i> โดยใช้เทคนิค northern blot hybridization ตรวจสอบด้วย AS- <i>ACS</i> RNA probe, sense <i>ACS</i> RNA probe และ 18s rRNA probe ตามลำดับ	112
44	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน sense <i>ACO</i> (ก) ยีน AS- <i>ACOA</i> และ AS- <i>ACOB</i> (ข) ยีน 18s rRNA (ค) ในต้นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21-AS- <i>ACOA</i> และ pMAT21-AS- <i>ACOB</i> โดยใช้เทคนิค northern blot hybridization ตรวจสอบด้วย AS- <i>ACO</i> RNA probe, sense <i>ACO</i> RNA probe และ 18s rRNA probe ตามลำดับ	113

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AS	=	antisense
bp	=	base pair
CaMV-35S promoter	=	35S promoter from <i>Cauliflower mosaic virus</i>
CIAP	=	calf intestinal alkaline phosphatase
dNTPs	=	deoxynucleoside triphosphate
<i>gus</i> gene	=	<i>β-glucuronidase</i> gene
<i>hpt</i>	=	hygromycin phosphotransferase
Hm	=	hygromycin
<i>ipt</i> gene	=	<i>isopentenyl transferase</i> gene
KPa	=	kilopascal
KV	=	kilovolt
<i>lac Z</i> gene	=	<i>β-galactosidase</i> gene
LB	=	left border
<i>Luc</i> gene	=	<i>firefly luciferase</i> gene
MATVS	=	Multi-Auto-Transformation Vector System
μF	=	microfarad
μg	=	microgram
μl	=	microlitre
μM	=	micromolar
M	=	molar
mM	=	millimolar
msec	=	millisecond
MCS	=	multi-cloning site
NAA	=	naphthalene acetic acid
NDM	=	New Dogashima Medium
Nos-terminator	=	nopaline synthase terminator
OD ₆₀₀	=	optical density at six hundred nanometer
<i>Pat</i>	=	phosphinothricin acetyltransferase
PCI	=	phenol: chloroform: isoamyl alcohol

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

PCR	=	polymerase chain reaction
PLBs	=	protocorm-like bodies
PPT	=	phosphinothricin
R_{int}	=	recombinase gene with intron sequences from <i>Eucalyptus</i> histone gene
RS	=	recognition site
RB gene	=	right border
VW medium	=	Vacin & Went medium
X-gluc	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid

การถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอทิลีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาด้ว
โดยใช้เวกเตอร์ pMAT21

Transformation of Ethylene-Related Genes into *Dendrobium* 'Pompadour' Using
pMAT21 Vector

คำนำ

กล้วยไม้เป็นหนึ่งในสินค้าเกษตรที่มีมูลค่าการส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศสูง โดยในปี พ.ศ.2552 มีมูลค่าประมาณ 2,400 ล้านบาท กล้วยไม้ที่นิยมปลูกเพื่อตัดดอกในปัจจุบัน ส่วนใหญ่เป็นกล้วยไม้สกุลหวาย ประมาณร้อยละ 80 ของผลผลิตทั้งหมด ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งในการผลิตและส่งออกกล้วยไม้ คือ การร่วงโรยของดอกซึ่งทำให้สูญเสียมูลค่าของดอกกล้วยไม้ การแก้ปัญหาดังกล่าวทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่นิยมได้แก่ การใช้สารละลาย silver thiosulfate และสาร 1-methylcyclopropane (1-MCP) ถึงแม้สารทั้งสองชนิดจะใช้ได้ผลดี แต่ก็มีขั้นตอนและวิธีการใช้ที่ยุ่งยาก นอกจากนี้สารเงิน (silver) ที่ตกค้างก็เป็นอันตรายต่อสุขภาพ ดังนั้นการพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้ให้มีอายุการปักแจกันนานขึ้น โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ก็อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการช่วยลดปัญหาและความเสียหายต่อดอกกล้วยไม้ที่ส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศ เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับอุตสาหกรรมการส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกของไทย

ในพืชชั้นสูงเอทิลีนเกิดจากกระบวนการ biosynthetic pathway โดยเริ่มต้นจากการที่เมไทโอนีน (methionine) ถูกเปลี่ยนเป็น S-adenosyl methionine (SAM) ด้วยเอนไซม์ S-adenosyl transferase และ SAM เปลี่ยนเป็น 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) ด้วยเอนไซม์ ACC synthase จากนั้นเอนไซม์ ACC oxidase จะเปลี่ยน ACC เป็นเอทิลีนในสภาพที่มีออกซิเจน (Yang and Hoffman, 1984)

ในกระบวนการสร้างเอทิลีนของพืชชั้นสูง เอนไซม์ ACC synthase และ ACC oxidase เป็นเอนไซม์สำคัญที่ควบคุมการสร้างเอทิลีน (rate-limiting step) นอกจากนี้เอทิลีนยังมีส่วนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการร่วงโรย (senescence) ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ผล ใบ และดอก การยับยั้งกระบวนการสร้างเอทิลีน สามารถชะลอการเกิดการร่วงโรย (senescence) ได้ แสดงว่าเอทิลีนเป็นตัวส่งสัญญาณที่สำคัญในกระบวนการเสื่อมสภาพ (senescence) ในพืช (Yang and Hoffman, 1984)

ยีนที่ควบคุมการสร้างเอทิลีนในดอกไม้นี้คือ *ACC synthase* และ *ACC oxidase* ในขณะที่ดอกไม้มิเริ่มร่วงโรย กิจกรรมของเอนไซม์ *ACC synthase* และ *ACC oxidase* มีอยู่น้อยมาก เมื่อดอกไม้มิเริ่มร่วงโรย กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้จะมีเพิ่มมากขึ้น (สายชล และคณะ, 2540) และปัญหาสำคัญของผู้ส่งออกดอกกล้วยไม้ของประเทศไทยมีอยู่ 2 ประการคือ ดอกกล้วยไม้เหี่ยว ซึ่งเกิดกับดอกย่อยรวมทั้งดอกตูมและดอกบาน (สายชล, 2530) และดอกกล้วยไม้ของไทยมีอายุการปักแจกันค่อนข้างสั้น (Ketsa, 1995)

ดังนั้นจึงมีการนำเทคโนโลยีที่เรียกว่า antisense RNA technology มาใช้เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *ACC synthase (ACS)* และยีน *ACC oxidase (ACO)* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการร่วงโรยของดอกกล้วยไม้ โดยทำการศึกษายีนดังกล่าวและนำมาสร้างชุดยีนที่จะทำให้เกิดการสร้าง antisense RNA ต่อยีนทั้งสอง จากนั้นทำการถ่ายชุดยีนที่ได้เข้าสู่เนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ เพราะเป็นกล้วยไม้ที่มีอายุในการปักแจกันที่สั้นประมาณ 7-10 วัน จึงเลือกใช้กล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์เป็นต้นแบบในการถ่ายยีน เพื่อยืดอายุในการปักแจกันให้ยาวนานขึ้น

โดยทั่วไปในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชใช้ยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ (antibiotic resistant gene) หรือยีนที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช (herbicide resistant gene) เป็นยีนคัดเลือก (Permingeat *et al.*, 2003) แต่การคัดเลือกโดยวิธีนี้ก็มีข้อเสียอยู่บ้าง เช่น สารคัดเลือก (selective agents) บางชนิดจะไปลดความสามารถในการขยายขนาดของเซลล์ และการเจริญไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ของพืช (Weising *et al.*, 1988; Zuo *et al.*, 2002) และความวิตกกังวลในด้านความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ในการใช้ยีนคัดเลือกที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะต่าง ๆ ซึ่งอาจก่อให้เกิดการสร้างสายพันธุ์ใหม่ของแบคทีเรีย ทำให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะทางการแพทย์ หรือยีนคัดเลือกอาจจะมีการส่งถ่ายยีนดังกล่าวไปยังจุลินทรีย์อื่น ๆ เป็นต้น ดังนั้นการใช้ระบบการถ่ายยีนที่จะกำจัดยีนคัดเลือกออกจากพืชคัดแปลงพันธุกรรม จึงเป็นทางเลือกที่ช่วยลดความวิตกกังวลเกี่ยวกับความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชคัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งได้มีการพัฒนาระบบที่เรียกว่า MAT (Muli-Auto-Transformation) vector system มาใช้ในการถ่ายยีน เพื่อสร้างพืชคัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือก (marker-free transgenic plant) (Dale and Ow, 1991; Yoder and Goldsbrough, 1994; Ebinuma *et al.*, 2001; Hohn *et al.*, 2001)

ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้เวกเตอร์ pMAT21 ในการถ่ายยีน antisense *ACC synthase* (AS-*ACS*) และยีน antisense *ACC oxidase* (AS-*ACO*) เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ เพื่อให้ได้กล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่มีอินที่ีต้องการและปราศจากยีนคัดเลือก

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่บรรจุเวกเตอร์ pMAT21 เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเป้าหมายเข้าสู่กล้วยไม้
2. ถ่ายยีน *ACS* และ *ACO* ที่อยู่ในลักษณะที่สร้าง antisense RNA เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ โดยใช้เวกเตอร์ pMAT21 เพื่อสร้างกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนเป้าหมายและปราศจากยีนคัดเลือก

การตรวจเอกสาร

1. ความสำคัญของกล้วยไม้ในเชิงเศรษฐกิจ

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในวงศ์ Orchidaceae ซึ่งมีหลายร้อยสกุล ประเทศไทยนับเป็นแหล่งกำเนิดกล้วยไม้จำนวนมากถึง 1,100 ชนิด ใน 150 สกุล กล้วยไม้แบ่งตามลักษณะการเจริญเติบโตได้ 2 ประเภท คือ ประเภทที่เจริญเติบโตไปทางยอด ได้แก่ สกุลแวนด้า อะแรนด้าและม็อคคาร่า อีกประเภทหนึ่งเจริญแบบแตกกอหรือเหง้า ได้แก่ สกุลหวาย และออนซิเดียม โดยปกติกล้วยไม้เป็นพืชที่ต้องการสภาพแวดล้อมที่ดีในการเจริญเติบโต เช่น น้ำที่สะอาด ความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 5.2-6.2 แสงแดด 40-60% อุณหภูมิ 25-32 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 50-60% (สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, 2548)

แหล่งกำเนิดกล้วยไม้ป่าที่สำคัญของโลกมี 2 แหล่งใหญ่ ๆ คือ ลาตินอเมริกา และเอเชียแปซิฟิก สำหรับในลาตินอเมริกาเป็นอาณาบริเวณอเมริกากลางติดต่อกับเขตเหนือของอเมริกาใต้ ส่วนแหล่งกำเนิดกล้วยไม้ป่าในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิก มีประเทศไทยเป็นศูนย์กลาง มีพันธุ์กล้วยไม้ป่าเป็นจำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีสภาพแวดล้อมเอื้ออำนวยต่อการเจริญงอกงามของกล้วยไม้ (อบจันทร์, 2543)

กล้วยไม้เป็นไม้ตัดดอกที่สำคัญของไทย เนื่องจากมีความหลากหลายด้านสี กลิ่น ขนาด และรูปทรง ทำให้แนวโน้มการส่งออกกล้วยไม้เติบโตต่อเนื่อง มีความต้องการที่ยังคงเพิ่มขึ้นในตลาดโลก ไทยเป็นประเทศส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกอันดับ 1 ของโลก มูลค่าส่งออกปี พ.ศ. 2551 ยังคงขยายต่อเนื่องจากปี พ.ศ. 2550 และปี พ.ศ. 2551 นำรายได้เข้าประเทศไม่ต่ำกว่า 2,400-2,600 ล้านบาท เพิ่มจากปี พ.ศ. 2549-2550 ประมาณ 10-20% (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร โดยความร่วมมือของกรมศุลกากร, 2552) เนื่องมาจากการขยายตัวการส่งออกของตลาดหลัก โดยเฉพาะญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และสหภาพยุโรป รวมทั้งการขยายตัวตลาดใหม่ ๆ โดยเฉพาะจีน พันธุ์ที่นิยมปลูกตัดดอกมากที่สุดคือ กล้วยไม้หวายลูกผสม ซึ่งมีดอกสีขาว ม่วงเข้ม เช่น *Dendrobium* Walter Oumae, *D. Sonia Bom*#17, *D. Sonia Bom*#18, *D. Sonia Bom*#28 (จิตราพรธ, 2537) และกล้วยไม้หวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ (*D. Pompadour*) ซึ่งเป็นกล้วยไม้หวายลูกผสมที่มีความสำคัญทางการค้าซึ่งเป็นลูกผสมระหว่าง *D. Louis Bleriot* กับ *D. Phalaenopsis* (The Royal Horticultural Society, 1972)

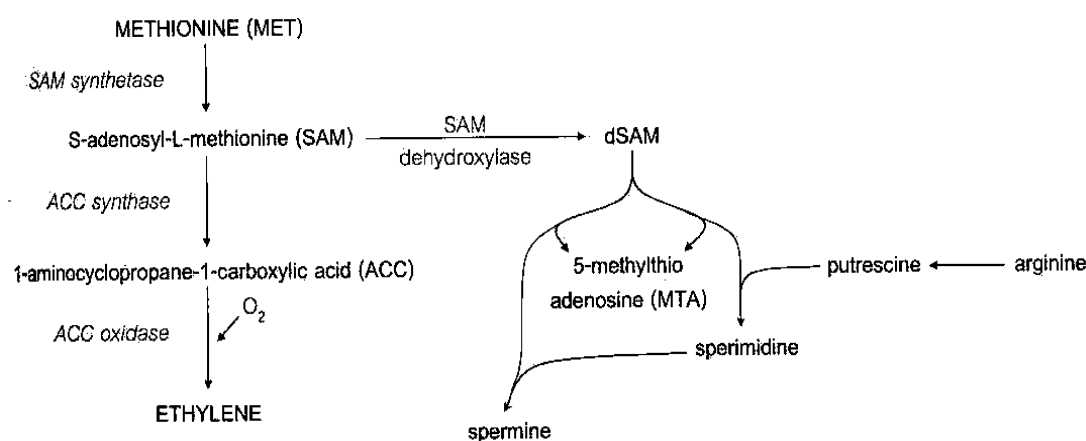
กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้กำหนดให้กล้วยไม้เป็น 1 ใน 4 ของพืชเศรษฐกิจ เนื่องจากความนิยมใช้ในต่างประเทศสูง และปริมาณการส่งออกมีจำนวนถึง 24,567 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร โดยความร่วมมือของกรมศุลกากร, 2552) ประเทศไทยส่งออกกล้วยไม้ไปสู่ตลาดโลก โดยมีทั้งไม้ตัดดอกและไม้กระถาง การค้ากล้วยไม้เติบโตมากทั้งปริมาณและมูลค่า โดยมีพื้นที่ปลูกกล้วยไม้ประมาณ 20,700 ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร โดยความร่วมมือของกรมศุลกากร, 2552) ส่วนใหญ่อยู่ในกรุงเทพฯ และจังหวัดใกล้เคียง ได้แก่ นครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี ปทุมธานี และพระนครศรีอยุธยา เนื่องจากสภาพภูมิอากาศเหมาะกับการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ ใกล้เคียงแหล่งน้ำ ตลาด และการคมนาคมขนส่งสะดวก พื้นที่ปลูกกล้วยไม้มีแนวโน้มจะย้ายจากกรุงเทพฯ ไปจังหวัดใกล้เคียงมากขึ้น เนื่องจากที่ดินราคาสูง และประสบปัญหาหมอกควันน้ำและอากาศ ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโต และคุณภาพกล้วยไม้ (ครรชิต, 2547)

ปริมาณและมูลค่าการส่งออกดอกกล้วยไม้ของไทยเพิ่มขึ้นทุก ๆ ปี แต่ราคาต่อช่อดอกกลับลดลงตลอด สาเหตุหนึ่งมาจากคุณภาพของดอกกล้วยไม้ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการส่งออกโดยผู้นำเข้าดอกกล้วยไม้ของไทยจะร้องเรียนปัญหา 2 ประการคือ ดอกกล้วยไม้เหี่ยวและดอกย่อยร่วงโรยซึ่งมีทั้งดอกตูมและดอกบาน (สายชล, 2530) นอกจากนี้ยังพบว่าดอกกล้วยไม้ของประเทศไทยมีอายุการปักแจกันค่อนข้างสั้น (Ketsa, 1995) โดยระหว่างที่มีการร่วงโรยมีการสร้างเอทิลีนเพิ่มมากขึ้นและเอทิลีนเป็นตัวการสำคัญทำให้ดอกไม้เหล่านี้มีอายุการปักแจกันสั้นลงกว่าปกติและร่วงโรยหมดอายุเร็วขึ้น (Borochoy and Woodson, 1989)

2. เอทิลีน (Ethylene)

เอทิลีนเป็นฮอร์โมนพืชชนิดเดียวที่มีสถานะเป็นก๊าซ ไม่มีสี มีกลิ่นเล็กน้อย จัดเป็นสารประเภทไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) มีสูตรทางเคมีคือ $\text{CH}_2 = \text{CH}_2$ ติดไฟและเกิดการระเบิดได้ ในช่วงความเข้มข้น 3.2 – 32% สามารถแพร่กระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ง่าย ทำให้มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยทั่วไปเอทิลีนจะไปเร่งอัตราการเสื่อมสภาพของพืชหรือส่วนของพืชพืชและจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตก๊าซเอทิลีนได้ (Van *et al.*, 1995) การสังเคราะห์เอทิลีนภายในพืช โดยเริ่มจากเอทิลีนสร้างขึ้นจากกรดอะมิโนเมทไทโอนีน (methionine) ผ่าน S-adenosyl-L-methionine (AdoMet หรือ SAM) และกรดอะมิโนวงแหวนที่ไม่ได้เป็นส่วนประกอบของโปรตีน 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) (ภาพที่ 1) และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอทิลีน ได้แก่ SAM synthase, ACC synthase และ ACC oxidase เอนไซม์ ACC synthase

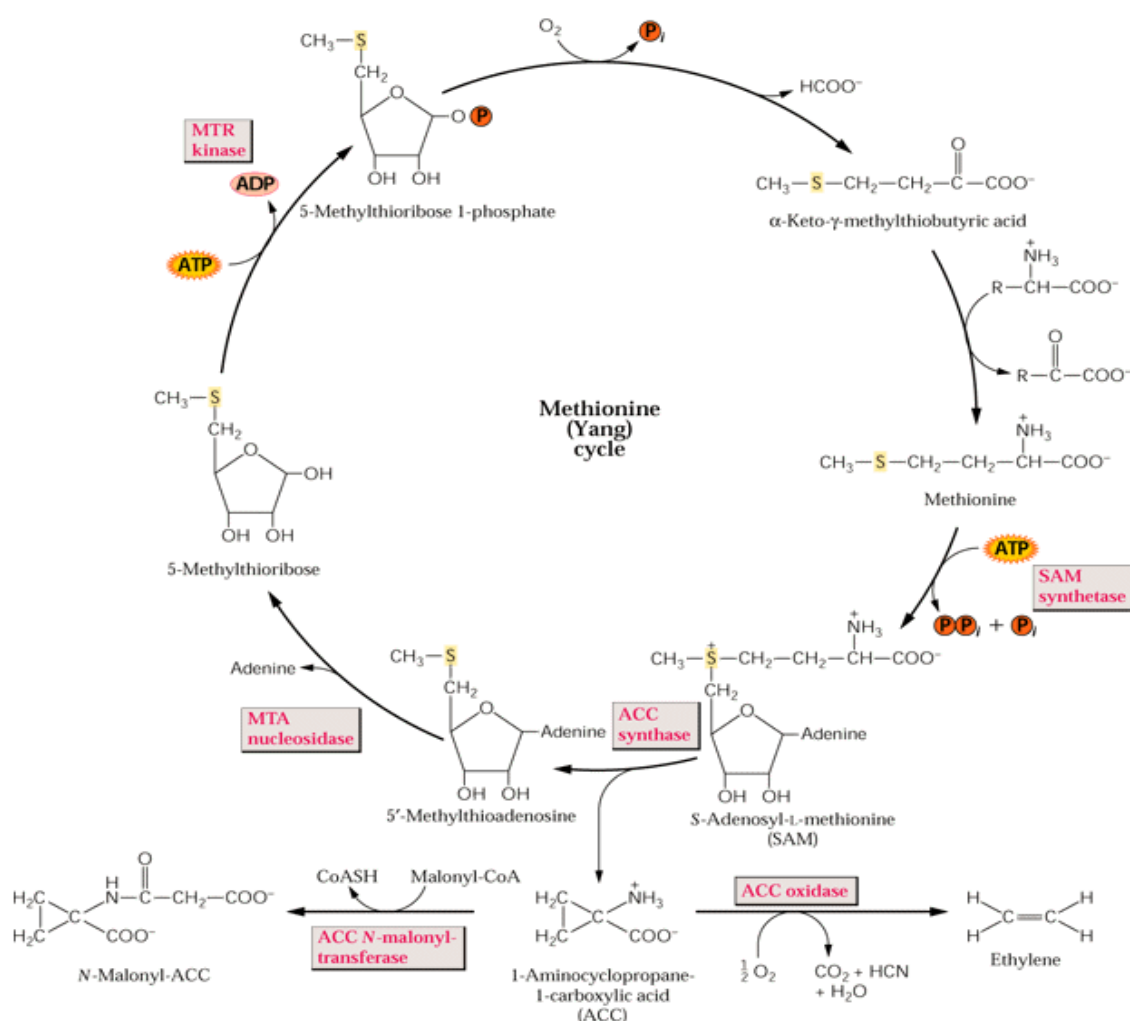
ซึ่งอยู่ภายในไซโทพลาซึม ทำหน้าที่สร้าง ACC และสร้าง 5-methylthioadenosine ซึ่งนำไปใช้สร้าง เมทไทโอนีนขึ้นมาใหม่ผ่าน methionine cycle หรือที่เรียกกันว่า วงจร Yang ตามชื่อผู้ค้นพบ วิธีการสร้างเอทิลีน (ภาพที่ 2) ในวงจร Yang นี้ จะเห็นว่าได้คาร์บอนของน้ำตาลไรโบส (ribose) จะถูกเปลี่ยนไปเป็นคาร์บอนหลักของเมทไทโอนีนซึ่งถูกใช้ไปในการสร้างเอทิลีน ดังนั้นคาร์บอนอะตอมของโมเลกุลของเอทิลีนที่ถูกสร้างขึ้นที่จริงแล้วได้มาจาก adenosine ซึ่งมาจาก ATP นั่นเอง ส่วนกลุ่ม methylthio นั้น จะถูกนำกลับไปใช้ในการสร้างเมทไทโอนีนอยู่เรื่อย ๆ ดังนั้นพืชจึงสามารถผลิตเอทิลีนได้ในปริมาณมาก ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณกรดอะมิโนเมทไทโอนีนเพียงเล็กน้อย (Crozier *et al.*, 2000)



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการสังเคราะห์เอทิลีนในพืช

ที่มา: Crozier *et al.* (2000)

สำหรับ ACC oxidase นั้น พบว่าเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเยื่อหุ้มเซลล์และมีข้อมูลสนับสนุนว่าอยู่บนผิวด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากทำหน้าที่สร้างเอทิลีนแล้วยังปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) น้ำ (H_2O) และไฮโดรเจนไซไดยาไนซ์ (HCN) ออกมา โดยที่เอทิลีนได้มาจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 ของเมทไทโอนีน ในขณะที่ HCN ได้จากคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ส่วน CO_2 ได้จาก carboxyl group โดย HCN ที่เกิดขึ้นรวมตัวกับ cysteine เปลี่ยนไปเป็น β -cyanoalanine และเปลี่ยนเป็นแอสพาราจีน (asparagines) หรือ glutamyl- β -cyanoalanine ทำให้ไม่เกิดการสะสม HCN จนเกิดเป็นพิษต่อพืช (Crozier *et al.*, 2000)



ภาพที่ 2 วัฏจักรเมทไทโอนินของ Yang ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอทิลีน
ที่มา: Crozier *et al.* (2000)

นอกจาก ACC จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทิลีนได้แล้วยังถูกเปลี่ยนไปเป็น 1-(malonylamino) cyclopropane-1-carboxylic acid (MACC) ซึ่งไม่สามารถเปลี่ยนกลับไปเป็น ACC ได้ แต่มีรายงานว่าในกรณีที่มีความเข้มข้นของ MACC สูง ๆ อาจกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลง MACC กลับไปเป็น ACC และมีรายงานว่า MACC สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง ACC ให้มีมากขึ้นได้ในดอกคาร์เนชั่น แต่ไม่ใช่การเปลี่ยนจาก MACC เป็นเอทิลีน การสร้าง MACC ขึ้นนี้น่าจะเป็นกลไกหนึ่งในการควบคุมระดับของ ACC และปริมาณการสร้างเอทิลีน (ภาพที่ 2) (Crozier *et al.*, 2000) ในกระบวนการสร้างเอทิลีนของพืชชั้นสูง เอนไซม์ ACC synthase และเอนไซม์ ACC oxidase เป็นเอนไซม์สำคัญที่ควบคุมการสร้างเอทิลีน โดยเอทิลีนมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดการเสื่อมสภาพ (senescence) ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ผล ใบและดอก การยับยั้งกระบวนการสร้างเอทิลีน

สามารถชะลอการเสื่อมสภาพ (senescence) ได้ แสดงว่าเอทิลีนเป็นตัวส่งสัญญาณที่สำคัญในกระบวนการเสื่อมสภาพในพืช (Yang and Hoffman, 1984)

ดอกไม้มีลักษณะการหายใจคล้ายผลไม้ กล่าวคือ มีทั้งการหายใจแบบ climacteric ซึ่งเริ่มจากการหายใจในระดับต่ำและค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ แล้วการหายใจจะค่อย ๆ ลดลงพร้อม ๆ กับการเสื่อมของดอก เช่น ในดอกเบญจมาศ มะลิลา คาร์เนชั่น รักเร่ และ daylily และแบบ non-climacteric ซึ่งการหายใจลดลงโดยตลอด เช่น ดอกไอริส และ narcissus การเพิ่มขึ้นแล้วลดลงของอัตราการหายใจในดอกไม้ส่วนใหญ่จะพบในดอกไม้ที่กระบวนการร่วงโรยของดอกไม้ (senescence) อยู่ภายใต้การควบคุมของเอทิลีน ส่วนดอกไม้ซึ่งกระบวนการร่วงโรยไม่ได้ถูกควบคุมโดยเอทิลีนจะมีการหายใจลดลงโดยตลอด หรือถ้ามีการหายใจเพิ่มขึ้นก็เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย การเพิ่มขึ้นของการหายใจในดอกไม้ประเภท climacteric อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการตอบสนองต่อการผลิตเอทิลีน (จริงแท้, 2550)

2.1 ความเสียหายของดอกไม้เนื่องจากเอทิลีน

เอทิลีนเป็นฮอร์โมนพืชที่มีบทบาทมากที่สุดเกี่ยวกับคุณภาพของดอกไม้เอทิลีนจะเกิดจากดอกไม้เองหรือจากแหล่งอื่น ๆ สามารถทำความเสียหายให้กับดอกไม้ได้เหมือนกัน เอทิลีนในบรรยากาศเพียง 0.002-0.5 ไมโครลิตรต่อลิตร (พีพีเอ็ม) สามารถทำความเสียหายให้กับดอกไม้ได้ ดอกไม้ที่ได้รับเอทิลีนจะมีอายุการใช้งานสั้น เพราะเอทิลีนทำให้ดอกไม้เหี่ยวและกลีบดอกร่วงเร็ว ตัวอย่างของความเสียหายของดอกไม้ที่เกิดขึ้นเนื่องจากเอทิลีน เช่น กลีบดอกม้วนเข้าหรือไม่บาน (sleepiness) ซึ่งบางครั้งเรียกว่าดอกพุบหรือซ็อค เช่น คาร์เนชั่น และกุหลาบหิน (kalanchoe) กลีบดอกมีสีซีดและกลีบดอกม้วนงอเข้า เช่น ผักบุ้งฝรั่ง (morning glory) กลีบดอกมีสีซีดและปลายของกลีบดอกเหี่ยว เช่น กล้วยไม้ในสกุลแคลทียา แวนดา หวาย และฟาแลนนอโฟซิส (สายชล, 2531)

2.2 การสังเคราะห์เอทิลีนในดอกไม้

ดอกไม้หลายชนิดมีอัตราการผลิตเอทิลีนเพิ่มสูงขึ้นมาก ก่อนที่ดอกจะแสดงอาการเหี่ยว หรือหลุดร่วง เช่น ดอกฝ้าย ผักบุ้งฝรั่ง ชบา และดอกมะลิลา ในดอกคาร์เนชั่นพบว่าอัตราการผลิตเอทิลีนเพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 50-200 เท่า อัตราการผลิตเอทิลีนนี้มีความสัมพันธ์กับอายุของดอก ดอกที่มีการผลิตเอทิลีนมากจะมีอายุสั้นกว่าดอกที่มีการผลิตเอทิลีนน้อยอย่างเห็นได้ชัด

แต่สำหรับดอกเบญจมาศ และดอก narcissus ไม่พบการเพิ่มขึ้นของการผลิตเอทิลีน ในกลุ่มดอกที่มีการผลิตเอทิลีนมากขึ้นพบว่า การเหี่ยวของดอกเกิดจากการกระตุ้นด้วยเอทิลีน โดยจะมีอัตราการผลิตเอทิลีนสูงกว่าดอกที่การเหี่ยวไม่ได้เกิดขึ้นจากการกระตุ้นของเอทิลีน (Van *et al.*, 1993)

โดยทั่วไปการสร้างเอทิลีนของดอกไม้ประกอบด้วย 3 ระยะ คือ 1) ระยะแรก ดอกไม้มีอัตราการสร้างเอทิลีนค่อนข้างต่ำ 2) ระยะกลาง ดอกไม้มีอัตราการสร้างเอทิลีนสูงสุด และ 3) ระยะสุดท้าย ดอกไม้มีอัตราการสร้างเอทิลีนลดลง การสร้างเอทิลีนของดอกไม้จะเห็นชัดในระยะกลาง ซึ่งเกิดขึ้นพร้อมกับการเปลี่ยนแปลงภายในอื่น ๆ ของดอกไม้ซึ่งนำไปสู่การเกิดการชราภาพของดอกไม้ เช่น การเหี่ยวของดอกไม้ ดอกไม้บางชนิด เช่น หวายแจ็กเก็ตกลีนาฮาไว มีอัตราการสร้างเอทิลีนสูงมากในระยะที่ดอกตูม และลดลงเมื่อดอกเริ่มบาน อัตราการสร้างเอทิลีนสูงขึ้นอีกเมื่อดอกที่บานแล้วเข้าสู่ระยะชราภาพ (สายชล, 2531) และช่อดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ป้อมปาด้ว ที่มีเฉพาะดอกตูมมีอัตราการสร้างเอทิลีนสูงกว่าช่อดอกกล้วยไม้หวายที่มีเฉพาะดอกบาน ดอกตูมมีขนาดเล็กมีอัตราการสร้างเอทิลีนสูงกว่าดอกตูมที่มีขนาดใหญ่ ดอกเริ่มบานมีอัตราการสร้างเอทิลีนสูงกว่าดอกตูมที่มีขนาดโต และดอกบานที่เริ่มเข้าสู่ระยะชราภาพมีอัตราการสร้างเอทิลีนเพิ่มมากขึ้น (สายชล และคณะ, 2540)

การผลิตเอทิลีนในดอกไม้ที่เพิ่มขึ้นนี้ถูกกระตุ้นได้ด้วยเอทิลีนเอง เรียกว่า autocatalytic ethylene production โดยพบว่าส่วนต่าง ๆ ของดอกมีการผลิตเอทิลีนเพิ่มมากขึ้นและตอบสนองต่อเอทิลีนในช่วงเวลาที่ต่างกัน ดังนั้นเอทิลีนน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณในการควบคุมกระบวนการเสื่อมสภาพ (senescence) ในส่วนต่าง ๆ ของดอก การศึกษาในระดับชีวโมเลกุล พบว่ามีการแสดงออกของยีน *ACS* และ *ACO* โดยมีปริมาณ mRNA เพิ่มขึ้นก่อนดอกคาร์เนชันจะเหี่ยว ซึ่งยีนเหล่านี้เป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยาเปลี่ยน SAM เป็น ACC และจาก ACC เป็นเอทิลีน ตามลำดับ เช่นการทดลองถ่ายยีน antisense *ACO* ให้คาร์เนชันทำให้ออกดอกคาร์เนชันมีการผลิตเอทิลีนต่ำลงและกลีบดอกเสื่อมสภาพช้าลง (Woodson, 1994)

การผสมเกสร (pollination) เป็นปัจจัยหนึ่งที่กระตุ้นการผลิตเอทิลีนในทุกส่วนของดอกกล้วยไม้ ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนสีของดอก กลีบดอกซีด รังไข่มีการเจริญเติบโต (Stead, 1992) ในดอกคาร์เนชัน กล้วยไม้ และพิทูเนีย การผสมเกสรเป็นการชักนำให้เกิดการผลิตเอทิลีน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน *ACS* และ *ACO* (Woodson *et al.*, 1992; O'Neill *et al.*, 1993; Tang and Woodson, 1996; O'Neill and Nadeau, 1997)

การร่วงโรยของดอกกล้วยไม้ถูกกระตุ้นโดยการกำจัดเอแอสเทสเพศผู้ออกไป (emasculatation) และการผสมเกสร (pollination) โดยพบว่าการผลิตเอทิลีนมากขึ้นภายหลัง emasculatation และการผสมเกสร ทำให้กลีบดอกเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว O'Neill *et al.* (1993) พบว่าหลังจากการทำ emasculatation กับดอกกล้วยไม้ทำให้ตรวจพบ ACS-mRNA และ ACO-mRNA มากในส่วน of stigma, ovary และ labelum ในส่วนของกลีบดอกตรวจพบเอทิลีนสูงถึง 26 % จาก ส่วนของดอกทั้งหมด และมีการสะสมของ ACO-mRNA ภายหลังการผสมเกสรปริมาณมากแต่ไม่พบ ACS-mRNA ในส่วนของกลีบดอก

ดอกคาร์เนชันจะมีอายุอยู่ได้ 6-7 วัน ถ้าไม่ได้รับการผสมเกสร แต่จะเหี่ยวและหลุดร่วงภายใน 1-2 วัน ภายหลังการผสมเกสร แต่ถ้าให้สาร silver thiosulfate (STS) ซึ่งยับยั้งการทำงานของเอทิลีน กลีบดอกจะยังคงสดอยู่ได้นาน เมื่อวัดอัตราการผลิตเอทิลีนในส่วน of เกสรเพศเมีย พบว่าเกิดการสร้างเอทิลีนเพิ่มสูงขึ้นภายใน 1-2 ชั่วโมง ภายหลังการผสมเกสร ตามด้วยการผลิตเอทิลีนในส่วน of รังไข่ และกลีบดอก เรณูของดอกคาร์เนชันมีปริมาณ ACC ก่อนข้างสูงจึงอาจถ่ายเทให้กับเกสรเพศเมียแล้วเคลื่อนย้ายไปสู่กลีบดอก หรืออาจเปลี่ยนไปเป็นเอทิลีนแล้วเคลื่อนที่ไปสู่กลีบดอก (Jonnes and Woodson, 1999)

การศึกษาการแสดงออกของยีน ACS และ ACO ในดอกคาร์เนชัน พบว่าการแสดงออกของยีน ACS และ ACO เกิดขึ้นก่อนในส่วน of เกสรเพศเมีย ช่วยยืนยันว่าการผลิตเอทิลีนในกลีบดอกเป็นผลมาจากเอทิลีน ในส่วน of เกสรเพศเมียและการร่วงโรยของกลีบดอกอยู่ภายใต้การควบคุมของ เอทิลีน การให้ 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) แก่ดอก ภายหลังการปลดเอแอสเทสเพศเมียออก ไม่สามารถกระตุ้นให้กลีบดอกเหี่ยวและหลุดร่วง แต่ถ้าให้ ACC กับดอกที่ยังมีเกสรเพศเมียอยู่จะกระตุ้นให้เกิดการร่วงโรยของดอกไม่ได้เพราะเกสรเพศเมียเป็นส่วนที่มีการผลิตเอนไซม์ ACC synthase และ ACC oxidase ทำให้เกิดการสร้างเอทิลีนของดอกคาร์เนชันและเกิดกระบวนการร่วงโรยของดอกไม่เกิดขึ้น (Shibuya *et al.*, 2000)

ดอกพิทูเนียที่ได้รับการถ่ายเรณูจะเกิดการผลิตเอทิลีนเพิ่มสูงขึ้นจากปกติในระยะเวลาอันสั้น และการผลิตเอทิลีนนี้เพิ่มสูงขึ้นระยะเวลาหนึ่งจากนั้นจะลดลง แล้วจึงเกิดการสร้างเอทิลีนมากขึ้นอีกพร้อม ๆ กับการร่วงโรยของกลีบดอกหากเกสรเพศเมียรับเรณูที่เข้ากันได้ (Hoeskstra and Weges, 1986)

2.3 การศึกษาการเสื่อมสภาพ (senescence) ของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย

(*Dendrobium*)

กล้วยไม้เป็นไม้ตัดดอกเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งมีการผลิตจำหน่ายทั้งภายในประเทศและส่งออก แม้ว่าผู้ปลูกสามารถปลูกกล้วยไม้ได้ดอกที่มีคุณภาพดี แต่เมื่อกล้วยไม้ถึงมือผู้ใช้คุณภาพของดอกมักจะเสื่อมลงอย่างรวดเร็ว ทำให้อายุการปักแจกันสั้นลง โดยปัจจัยที่มีผลต่ออายุการปักแจกัน คือ คุณภาพดอก อายุของดอกก่อนตัด และสภาพการเก็บรักษา ระหว่างการขนส่ง ดอกกล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์, บอม#28 และ Jo Big White ที่ลดอุณหภูมิเบื้องต้นและเสียบโคนก้านช่อดอกในหลอดพลาสติกบรรจุสารละลาย AgNO_3 30 มิลลิกรัมต่อลิตร + HQS 225 มิลลิกรัมต่อลิตร + กลูโคส 4% มีคุณภาพดีกว่าและสดกว่าดอกกล้วยไม้สกุลหวายทุกพันธุ์ที่ลดอุณหภูมิเบื้องต้นและเสียบโคนก้านช่อดอกในหลอดพลาสติกบรรจุน้ำกลั่น โดยมีดอกตูมร่วง 3.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกรณีลดอุณหภูมิเบื้องต้นและเสียบโคนก้านช่อดอกในสารละลายดังกล่าว ดอกตูมไม่ร่วง โดยดอกตูมบานเร็วกว่าที่ดอกที่เสียบโคนก้านช่อดอกในน้ำกลั่น ส่วนกล้วยไม้พันธุ์บอม#28 และ Jo Big White ที่ลดอุณหภูมิเบื้องต้นและเสียบโคนก้านช่อดอกในหลอดพลาสติกบรรจุน้ำกลั่นเกิดการร่วงและเสื่อมสภาพของดอกตูมมากกว่าและเร็วกว่าดอกที่เสียบโคนก้านช่อดอกในสารละลายเคมี ดอกกล้วยไม้พันธุ์โชเนียบบอม#28 เกิดการเสื่อมสภาพของดอกตูมมากกว่าดอกกล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์และ Jo Big white ส่วนการร่วงและเสื่อมสภาพของดอกบานในดอกกล้วยไม้สกุลหวายทุกพันธุ์ที่ลดอุณหภูมิเบื้องต้นและเสียบโคนก้านช่อดอกในหลอดพลาสติกบรรจุน้ำกลั่นเกิดมากกว่าดอกที่เสียบโคนก้านช่อดอกในหลอดพลาสติกบรรจุสารละลายเคมี ดอกกล้วยไม้พันธุ์ Jo Big White และปอมปาดัวร์ มีดอกบานเสื่อมสภาพเร็วกว่าดอกกล้วยไม้พันธุ์โชเนียบบอม#28 (สายชล และคณะ, 2540)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของดอกบานที่มีผลต่อการร่วงและการบานของดอกตูมในกล้วยไม้สกุลหวาย โดยใช้ดอกกล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์ มิสทีน ซากุระ ซีซาร์ และอินทวงศ์ ไม่ปลิดและปลิดดอกบานออก 50 และ 100% แล้วปักแจกันในน้ำกลั่นนาน 15 วัน พบว่าดอกกล้วยไม้ทุกพันธุ์ที่ไม่ปลิดดอกบาน มีดอกตูมร่วงน้อยกว่าและดอกบานเพิ่มมากกว่าดอกกล้วยไม้ที่ปลิดดอกบาน 50 และ 100% ดอกกล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์ที่ไม่ปลิดและปลิดดอกบาน 50 และ 100% เกิดการร่วงของดอกตูมมากกว่าพันธุ์อื่นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ดอกกล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์ที่ไม่ปลิดและปลิดดอกบาน 50 และ 100% แล้วปักแจกันในน้ำกลั่น มีปริมาณ reducing sugars (RS), total sugars (TS), total non-structural carbohydrates (TNC) ในดอกตูมขนาดใหญ่ (อายุมาก) มากกว่า

ดอกตูมขนาดเล็ก (อายุน้อย) ปริมาณ non reducing sugars (NRS) ในดอกตูมขนาดเล็กมีมากกว่าดอกตูมขนาดใหญ่ และมีปริมาณ NRS, RS, TS, TNC ลดต่ำลงหลังการปักแจกัน (อารีรัตน์, 2547)

ดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ป้อมปาดัวร์ ซอนยา บอม#28 และบลัสซิ่ง ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 10° ซ. นาน 60 นาที มีการผลิตเอทิลีนในดอกตูมและดอกบานลดลง โดยที่ดอกตูมลดลงมากกว่าในดอกบาน แต่ดอกตูมมีการผลิตเอทิลีนมากกว่าดอกบาน ดอกกล้วยไม้พันธุ์ป้อมปาดัวร์และขาวโจไวท์ที่ผ่านการลดอุณหภูมิอายุปักแจกันมากกว่าดอกที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง และดอกกล้วยไม้ทั้ง 3 พันธุ์ที่ผ่านการลดอุณหภูมิมีการบานของดอกตูมมากที่สุด ดอกตูมและดอกบานเกิดการเสื่อมสภาพน้อยและช้า และการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดและการคุดน้ำลดลงช้าในดอกกล้วยไม้พันธุ์ป้อมปาดัวร์ ส่วนดอกกล้วยไม้พันธุ์ซอนยา บอม#28 และบลัสซิ่งมีการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดและการคุดน้ำไม่แตกต่างจากดอกที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง (วชิรญา, 2542) การลดอุณหภูมิเบื้องต้นของดอกกล้วยไม้สกุลหวายโดยห้องเย็นที่อุณหภูมิ 10° ซ. นาน 30, 60, 90 และ 120 นาที ก่อนบรรจุสามารถลดความเข้มข้นเอทิลีนภายในกล่อกระดาดูกฟูกและการลดอุณหภูมิเบื้องต้นของดอกกล้วยไม้หวายที่อุณหภูมิ 10° ซ. นาน 60 นาที ทำให้ลดอัตราการสร้างเอทิลีนของดอกกล้วยไม้หวายได้มากที่สุด (สายชล และคณะ, 2540)

การถ่ายเรณูทำให้ดอกกล้วยไม้หวายเสื่อมสภาพเร็วกว่าดอกที่ไม่ได้รับการถ่ายเรณูโดยมีอาการโค้งงอของก้านดอก ทำให้ดอกคว่ำ กลีบดอกคู่ลง กลีบดอกบริเวณปากอาจเปลี่ยนเป็นสีเหลือง สังเกตเห็นร็วบนกลีบดอกได้ชัดเจนและมีอาการสีซีดหรือมีอาการจ้ำน้ำ อัตราการเสื่อมสภาพของดอกที่ได้รับการถ่ายละอองเรณูขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของเรณู กล่าวคือ ถ้าปริมาณเรณูมากการร่วงโรยของกลีบดอกก็เกิดได้เร็วขึ้น การถ่ายละอองเรณูชักนำให้เกิดการสร้างเอทิลีนทำให้กลีบดอกไม่เกิดการเหี่ยว เรณูจากกล้วยไม้หวายต่างสายพันธุ์นำมาผสมกัน เช่น กล้วยไม้พันธุ์ป้อมปาดัวร์และพันธุ์ Sonia Bom#28 ส่งผลให้อัตราการเสื่อมสภาพเกิดขึ้นช้าเร็วต่างกัน เพราะกล้วยไม้แต่ละชนิดมีปริมาณเรณูมากน้อยต่างกัน เรณูที่มีปริมาณ ACC มาก หรือออกเข้าผสมกับไข่ได้จะส่งผลให้เกิดการร่วงโรยอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้เรณูจากพืชชนิดอื่น เช่น ต้อยตังสามารถทำให้เกิดการร่วงโรยของกลีบดอกกล้วยไม้หวายได้อย่างรวดเร็ว ในขณะที่เรณูจากดอกหางนกยูงและพุระหงไม่มีผลมากนัก การร่วงโรยของกลีบดอกนี้สัมพันธ์กับอัตราการสังเคราะห์เอทิลีนที่เกิดขึ้นภายในกลีบดอกโดยการกระตุ้นของการถ่ายเรณู ในขณะเดียวกันก็พบว่าเอทิลีนช่วยกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของรังไข่ขึ้นอย่างรวดเร็ว (กนกพร, 2541)

อภิญา (2544) รายงานว่าหลังการผสมเกสรดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์โซเนีย บอม #28 (*Dendrobium Sonia* #28) กลีบดอกเกิดการเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็วและมีการขยายขนาดของรังไข่เกิดขึ้นพร้อมกับมีการกระตุ้นให้ผลิตเอทิลีน Ketsa and Rugkong (2000) พบว่าการผสมเกสรดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ปอมปาดัวร์สามารถกระตุ้นการผลิตเอทิลีนและการขยายขนาดของรังไข่ ดังนั้นหลังการผสมเกสรอาจมีสารบางอย่างส่งผ่านจากเกสรตัวผู้สู่เกสรตัวเมีย เพื่อกระตุ้นให้เกิดการผลิตเอทิลีนและเกิดการเสื่อมสภาพของดอกตามมา ซึ่งสารดังกล่าวน่าจะเป็น ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) หรือออกซิน เนื่องจากพบสาร ACC และ IAA (indole acetic acid) ในละอองเกสรของดอกกล้วยไม้ปริมาณมาก (Stead, 1992; Ketsa and Luangsuwalai, 1996) ออกซินเป็นสารที่ช่วยส่งเสริมให้มีการผลิตเอทิลีนขึ้นได้ในเนื้อเยื่อพืชโดยชักนำให้มีการสร้างเอนไซม์ ACC synthase เพิ่มขึ้น (Abeles *et al.*, 1992) ส่วน ACC เป็นตัวกลางของการผลิตเอทิลีน (Yang and Hoffman, 1984) เป็นไปได้ว่าเอทิลีนและออกซินทำงานร่วมกันในการส่งเสริมให้มีการขยายขนาดของรังไข่ภายหลังได้รับการผสมเกสรของดอกกล้วยไม้และทำให้ดอกเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว (O'Neill and Nadeau, 1997)

ประภาพร (2539) รายงานว่าการเสื่อมสภาพของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ซีซาร์ (*Dendrobium Caesar*) ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่าง *D. phalaenopsis* กับ *D. stratiotes* ถูกเร่งให้เกิดเร็วขึ้นเมื่อได้รับการผสมเกสรภายในเวลา 3-4 วัน และมีการผลิตเอทิลีนในดอกที่มีการผสมเกสร มากกว่าดอกที่ไม่ได้รับการผสมเกสร Halevy (1986) ศึกษาการร่วงโรยของกล้วยไม้ *Phalaenopsis* พบว่า ACC ถูกเคลื่อนย้ายจากละอองเกสรไปสู่ยอดเกสรตัวเมีย และในเวลาต่อมาเกสรตัวเมียจะผลิต ACC ขึ้นโดยการกระตุ้นของเอนไซม์ ACC synthase และ ACC ที่ผลิตขึ้นมาในเกสรตัวเมียจะถูกส่งไปยังกลีบดอกไม้เพื่อผลิตเอทิลีน

3. การควบคุมการสังเคราะห์เอทิลีนในระดับยีนโดยใช้เทคโนโลยี antisense RNA

การยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอทิลีน ได้แก่ ยีน ACS และยีน ACO โดยเทคนิคที่เรียกว่า antisense RNA technology ทำให้สามารถชะลอการสุกแก่ของผลไม้หรือชะลอการร่วงโรยของดอกไม้ โดยมีการศึกษาถ่ายยีน antisense ACS หรือ ACO เข้าไปในต้นมะเขือเทศ พบว่าสามารถชะลอการสุกของผลมะเขือเทศได้เป็นอย่างดี ส่วนระดับการชะลอการสุกจะเกิดขึ้นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับการแสดงออกของ antisense RNA และพบว่าประมาณ 5% ของมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนแล้ว การสร้างเอทิลีนลดลงมากกว่า 99% และจะไม่สุกเลยถ้าไม่ได้รับเอทิลีนจากภายนอก และประมาณ 25% ของมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนมีการสร้างเอทิลีนลดลง

มากกว่า 95% และพบว่าเมื่อการสร้างเอทิลีนลดลงมากกว่า 90% จึงชะลอการสุกได้ (Hamilton *et al.*, 1997) Bolitho *et al.* (1997) ศึกษาใน *ACO* ของแอปเปิล และทำการถ่าย antisense *ACO* เข้าสู่มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) พบว่ามะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถลดการสังเคราะห์เอทิลีนได้ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ Klee *et al.* (1991) ศึกษาเอนไซม์ ACC ซึ่งเป็นตัวกำหนดการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ที่สร้างมาจากยีน ACC ของแบคทีเรียในดิน และทำการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศด้วย antisense *ACS* พบว่าสามารถชะลอการสุกแก่ของมะเขือเทศได้เนื่องจากไม่มีการสังเคราะห์เอทิลีน

สำหรับการยับยั้งการสร้างเอทิลีนในพืชโดยมีเป้าหมายที่ตัวรับเอทิลีน (ethylene receptor) นั้น ได้มีการศึกษาถ่ายยีน *ERT1* จาก *Arabidopsis* เข้าไปในต้นมะเขือเทศ พบว่าผลของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมมีขนาดเล็กเหมือนกับผลจากต้นกลายพันธุ์ Nerver ripen (Nr) ซึ่งไม่ค่อยมีประโยชน์นักในทางการค้า (Kieber, 1997) ดังนั้นการยับยั้งการสร้างเอทิลีนที่มีเป้าหมายที่ตัวรับเอทิลีนจึงน่าจะใช้กับพืชที่ต้องการยับยั้งการสร้างเอทิลีนในการร่วงโรยของดอกไม้และพืชที่ไม่ต้องใช้เอทิลีนเพื่อการสุกอีกในภายหลัง (Mullins, 2000)

การใช้เทคนิค antisense RNA technology เพื่อยืดอายุการปักแจกันของดอกไม้สามารถทำได้สำเร็จในดอกคาร์เนชั่นและ torenia โดย Savin *et al.* (1995) ได้ถ่ายยีน antisense *ACO* เข้าสู่คาร์เนชั่น พบว่าสามารถยืดอายุการปักแจกันของดอกไม้ได้นานขึ้น 7 วัน Aida *et al.* (1998) ได้ทดลองยืดอายุการปักแจกันของ torenia (*Torenia fournier* Lind.) โดยถ่ายยีน sense และ antisense *ACO* เข้าสู่ torenia โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน sense *ACO* สามารถช่วยยืดอายุของดอกไม้ torenia ได้ถึง 2.7-7.1 วัน และต้นที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *ACO* สามารถช่วยยืดอายุของดอกไม้ได้ 2.5-2.7 วัน ในขณะที่ต้น torenia ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนปกติจะมีอายุการปักแจกัน 2 วัน เมื่อนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธี northern blot analysis พบว่าการยืดอายุการปักแจกันมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน โดยพบว่าระดับ mRNA ของยีน *ACO* ลดลงและการผลิตเอทิลีนลดลงทำให้ดอกไม้มีอายุการปักแจกันนานขึ้น

4. ยีนคัดเลือกกับการถ่ายยีนเข้าสู่พืช

ยีนคัดเลือกใช้เป็น genetic tag เพื่อคัดเลือกเอาเฉพาะเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนเท่านั้น (transformed cells) ยีนคัดเลือกที่นิยมใช้มี 2 ประเภท คือ ยีนที่สร้างความต้านทานต่อ

สารปฏิชีวนะ และยีนที่สร้างความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชแก่เนื้อเยื่อเป้าหมายที่ทำการถ่ายยีน (Keith, 1999)

ยีนคัดเลือกที่ต้านทานสารปฏิชีวนะ (antibiotic resistance gene) ได้แก่ ยีน *hpt/hph* แยกมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ hygromycin phosphotransferase (*hpt*) เป็นเอนไซม์ลดความเป็นพิษของ hygromycin B (Hm) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม aminoglycoside antibiotic ที่มีบทบาทในการรบกวนกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน พืชที่ใช้ hygromycin B เป็นสารคัดเลือก ได้แก่ ยาสูบ *Arabidopsis* ข้าวโพด ข้าว พืชวงศ์หญ้า (Brian and Sylvia, 2004) สารปฏิชีวนะ aminoglycoside ได้แก่ กานามัยซิน นิโอมัยซิน gentamycin ที่ได้จาก G418 และ paromomycin สารพวกนี้มีความเป็นพิษกับพืช สัตว์และเชื้อรา (Brian and Sylvia, 2004)

ยีนคัดเลือกที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช (herbicide resistant gene) ได้แก่ ยีน *bar* ซึ่งสร้างเอนไซม์ phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT) ต้านทานสารในกลุ่ม phosphinothricin และ bialaphos เป็นสารที่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glutamine synthase ที่ใช้ในกระบวนการ ammonia assimilation มีประสิทธิภาพสูงในการคัดเลือกเซลล์พืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีการใช้ยีน *bar* เป็นยีนคัดเลือกในพืช *Brassica napus* และ *Brassica oleracea* และต่อมา ยีน *bar* นี้ได้ถูกใช้เป็นยีนคัดเลือกในพืชหลายชนิด ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าว ถั่ว และสน (Fromm *et al.*, 1990) นอกจากนี้ยีน *bar* ยังถูกนำมาใช้ประโยชน์ในพืชชนิดอื่น เช่น กล้วยไม้ ทำให้กล้วยไม้ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช (Brian and Sylvia, 2004)

ข้อเสียการใช้ยีนคัดเลือกที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะหรือสารกำจัดวัชพืชอยู่หลายประการ ได้แก่

1. สารคัดเลือก (selective agents) บางชนิดจะไปลดความสามารถในการขยายขนาดของเซลล์ และการพัฒนาของเซลล์ไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ (Weising *et al.*, 1988; Zuo *et al.*, 2002)

2. ในด้านความปลอดภัยต่อผู้บริโภค การใช้ยีนคัดเลือกที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะต่างๆ อาจทำให้เกิดการสร้างสายพันธุ์ใหม่ของแบคทีเรีย ทำให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้ในทางการแพทย์ หรือก่อให้เกิดการแพ้ยาต่อผู้บริโภค หรือยีนที่ใช้ในการคัดเลือกอาจจะถ่ายทอดไปสู่จุลินทรีย์ก่อโรคได้

3. การถ่ายยีนหลาย ๆ ยีนเข้าสู่พืชโดยใช้ยีนคัดเลือกชนิดเดิมทำได้ยาก เพราะไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ (Ebinuma *et al.*, 2000)

4. นอกจากนี้ความวิตกกังวลในการใช้ยีนที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช อาจจะมีการถ่ายทอดโดยเกิดการแพร่กระจายโดยละอองเกสรให้กับวัชพืชทั่วไป ทำให้วัชพืชเกิดการพัฒนาด้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชหรือทำให้เกิด super weed และด้วยสาเหตุนี้อาจจะไปเปลี่ยนแปลงสมดุลของระบบนิเวศน์ได้ (Lu *et al.*, 2001)

จากการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของยีนคัดเลือกในพืชดัดแปลงพันธุกรรมโดยผู้เชี่ยวชาญจาก Internationally Recognized Scientific Bodies และ Scientific Committees ใน European Union และผู้เชี่ยวชาญจากแคนาดา ญี่ปุ่น สวิตเซอร์แลนด์และอังกฤษ โดยได้ทำการศึกษา ยีนคัดเลือกที่ต้านทานสารปฏิชีวนะ ได้แก่ ยีน *nptII* ที่ต้านทานสารปฏิชีวนะ neomycin และ kanamycin ยีน *aad* ที่ต้านทานสารปฏิชีวนะ streptomycin และ spectinomycin และยีน *bla* ที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช ผู้เชี่ยวชาญลงมติกันว่าควรหลีกเลี่ยงยีนคัดเลือกที่ต้านทานสารปฏิชีวนะ เพื่อลดความวิตกกังวลเกี่ยวกับความปลอดภัยทางชีวภาพของยีนคัดเลือกดังกล่าว ซึ่งอาจเคลื่อนย้ายจากพืชดัดแปลงพันธุกรรมไปสู่จุลินทรีย์ได้ (European Federation of Biotechnology, 2001)

5. การสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมให้ปราศจากยีนคัดเลือก (marker-free transgenic plant)

จากการที่พืชดัดแปลงพันธุกรรมมียีนคัดเลือกที่ต้านทานสารปฏิชีวนะหรือสารกำจัดวัชพืช ไม่เป็นที่ยอมรับในด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ จึงมีการพัฒนาเทคนิคเพื่อกำจัดยีนคัดเลือกออกจากจีโนมพืชดัดแปลงพันธุกรรมหลังจากพืชได้รับการถ่ายยีนแล้ว เพื่อลดความวิตกกังวลในด้านความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่มีต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภค โดยการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมให้ปราศจากยีนคัดเลือกมีวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

5.1 วิธี Co-transformation

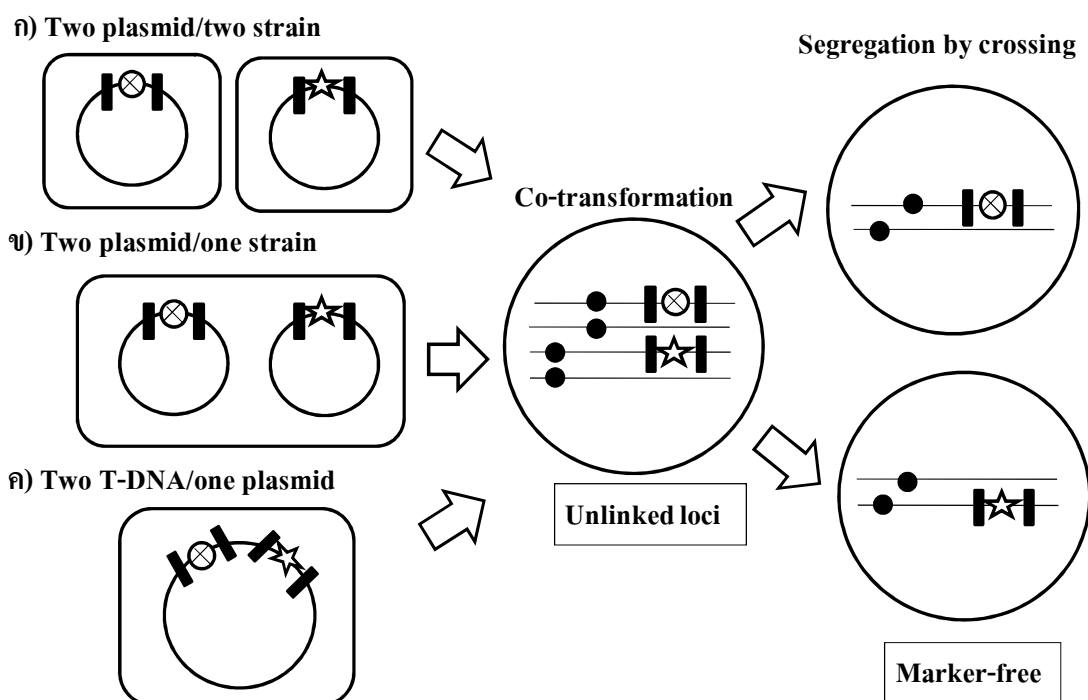
เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้แยกยีนคัดเลือกออกจากยีนที่ต้องการซึ่งอยู่ต่างชุดยีนกัน โดยทำการถ่ายยีนทั้งสองเข้าสู่เซลล์พืชไปด้วยกัน เมื่อยีนทั้งสองแทรกเข้าไปที่ตำแหน่ง unlinked loci ของจีโนมพืช ยีนคัดเลือกจะถูกแยกออกจากยีนที่ต้องการในรุ่นลูกภายหลังการผสมพันธุ์ และสามารถ

ถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ (progeny) ทำให้ได้พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกในรุ่นลูก (Komari *et al.*, 1996; Daley *et al.*, 1998) โดยแบ่งออกเป็น 3 วิธีคือ

5.1.1 การใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่บรรจุพลาสมิดต่างชนิดกัน โดยเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์แรกบรรจุพลาสมิดที่มียีนที่สนใจและเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สองบรรจุพลาสมิดที่มียีนคัดเลือก ถ่ายยีนเข้าสู่พืชไปพร้อมกัน (two-plasmids/two-strains) (ภาพที่ 3ก)

5.1.2 การใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์เดียว ที่มียีนคัดเลือกและยีนที่สนใจบรรจุอยู่ในพลาสมิดที่แตกต่างกัน ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช (two-plasmid/one strain) (ภาพที่ 3ข)

5.1.3 การใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์เดียว ที่มียีนคัดเลือกและยีนที่สนใจบรรจุอยู่ในพลาสมิดเดียวกัน ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช (two-T-DNA/one plasmid) (ภาพที่ 3ค)



ภาพที่ 3 การผลิตพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกโดยวิธี co-transformation ซึ่งประกอบด้วยยีนคัดเลือกและยีนที่สนใจมาจาก T-DNA ที่แตกต่างกัน 2 ชนิด ไปรวมตัวกันอยู่ที่ unlinked loci โดยวิธีการ co-transformation ยีนที่สนใจถูกแยกออกจากยีนคัดเลือกโดยการผสมข้าม (sexual crossing)

ก. Two plasmid/two strain

ข. Two plasmid/one strain

ค. Two T-DNA/one plasmid

⊗ = ยีนคัดเลือก ☆ = ยีนที่สนใจ ■ = LB/RB ของ T-DNA

Komari *et al.* (1996) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบและข้าวด้วยวิธี co-transformation 2 วิธี คือ การใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่บรรจุพลาสมิดต่างชนิดกัน (two-plasmids/two-strains) แล้วถ่ายยีนเข้าสู่พืชไปพร้อมกัน และการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวที่มียีนคัดเลือกและยีนที่สนใจบรรจุอยู่ในพลาสมิดเดียวกัน (two-T-DNA/ one plasmid) พบว่าวิธีแรกยีน *nptII/hpt* และยีน *gus* เข้าไปแทรกที่ตำแหน่ง unlinked loci ของยาสูบ ยีนคัดเลือก *nptII* ถูกแยกออกจากยีน *gus* ในรุ่นลูกหลังจากการผสมตัวเอง ทำให้ได้ยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกจำนวน 10 ต้น จากทั้งหมด 14 ต้น และได้ข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือก 2 ต้น จากทั้งหมด 2 ต้น และวิธีที่ใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวที่มียีนคัดเลือกและยีนที่

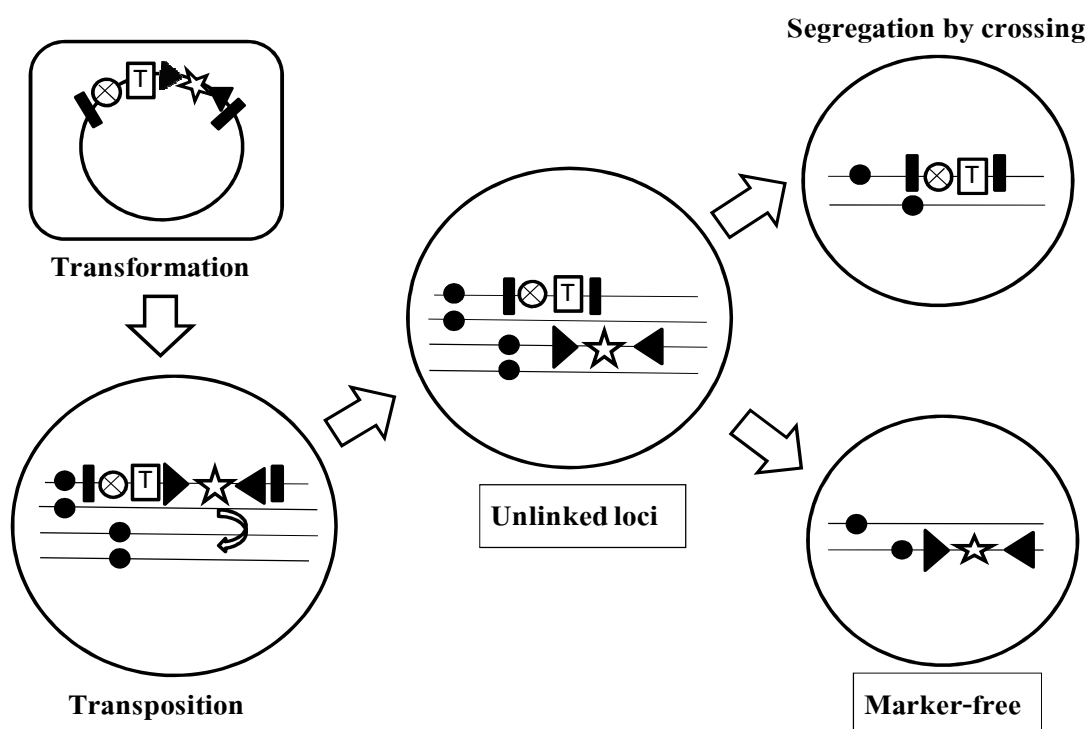
สนใจบรรจุอยู่ในพลาสมิดเดียวกัน สามารถสร้างยาสูบในรุ่นลูกที่มีการแสดงออกของยีน *gus* แต่ไม่มีการแสดงออกของยีนคัดเลือก จำนวน 5 ต้น จากทั้งหมด 9 ต้น และสามารถสร้างข้าวได้จำนวน 13 ต้น จากทั้งหมด 20 ต้น ตามลำดับ ทำให้ทราบว่ายีน *gus* เข้าไปแทรกตรงตำแหน่ง *unlinked locus* มากกว่าครึ่งของการถ่ายยีนเข้าสู่พืชด้วยวิธี *co-transformation*

Daley *et al.* (1998) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่ rapeseed และยาสูบ โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์เดียวกัน ที่มียีนคัดเลือกและยีนที่สนใจบรรจุอยู่ในพลาสมิดที่แตกต่างกัน ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช (*two-plasmid/one strain*) พบว่า rapeseed จำนวน 8 ต้น จากทั้งหมด 20 ต้น และยาสูบจำนวน 24 ต้น จากทั้งหมด 41 ต้น เป็นต้นพืชคัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือก โดยพืชดังกล่าวมีการแยกตัวของยีนคัดเลือกออกจากยีนที่สนใจที่ตำแหน่ง *unlinked loci*

5.2 การใช้ transposable element

การใช้ transposable element สามารถสร้างพืชที่ปราศจากยีนคัดเลือก โดยการย้ายตำแหน่งของยีนคัดเลือกออกจากยีนที่สนใจในพืชรุ่นลูก โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ *transposase* ซึ่งอยู่ในส่วนของ *non-mobile unit* ขณะที่ *mobile unit* มีส่วนที่ใช้ในกลไกสำหรับเคลื่อนย้ายยีนคัดเลือกออก หลักการคือ ยีนคัดเลือกถูกวางในตำแหน่ง *mobile element* ซึ่งจะถูกกำจัดออกหลังการถ่ายยีน ซึ่งมียีนหลายชนิด เช่น *Ac/Ds* สามารถย้ายทั้งส่วนที่ *linked* และ *unlinked site* ในพืชได้ แต่ถ้ายีนเคลื่อนย้ายมาอยู่ในส่วน *unlinked site* จะสามารถสร้างพืชคัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ภาพที่ 4) (Hohn *et al.*, 2001)

Goldsbrough *et al.* (1993) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียที่บรรจุ *binary vector* ซึ่งมียีน *gus* อยู่ขนานข้าง *Ds* ยีน *Ac transposase* และยีน *nptII* สามารถสร้างพืชคัดแปลงพันธุกรรมได้โดยการผสมตัวเองคิดเป็น 2/87 (2.3%) และในรุ่นลูก 7/106 (6.6%) ซึ่งประกอบด้วย *Ds/gus element* แต่ไม่มียีน *nptII* ผลลัพธ์แสดงให้เห็นว่าระบบ *Ac/Ds* มีความสามารถเคลื่อนย้ายตำแหน่งของยีนที่สนใจและสร้างพืชคัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกได้ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 การเคลื่อนย้ายยีนคัดเลือกโดยวิธี transposable elements ซึ่งประกอบด้วยยีน *Ds* ขนาดข้าง ยีนที่สนใจร่วมกับยีนคัดเลือกและยีน *Ac* transposase หลังจากยีนที่สนใจเคลื่อนที่ไปที่ ตำแหน่ง unlinked loci มีการแยกยีนคัดเลือกโดยการผสมข้าม (sexual crossing)

⊗ = ยีนคัดเลือก ☆ = ยีนที่สนใจ ■ = LB/RB ของ T-DNA ► = *Ds* □ T = transposon

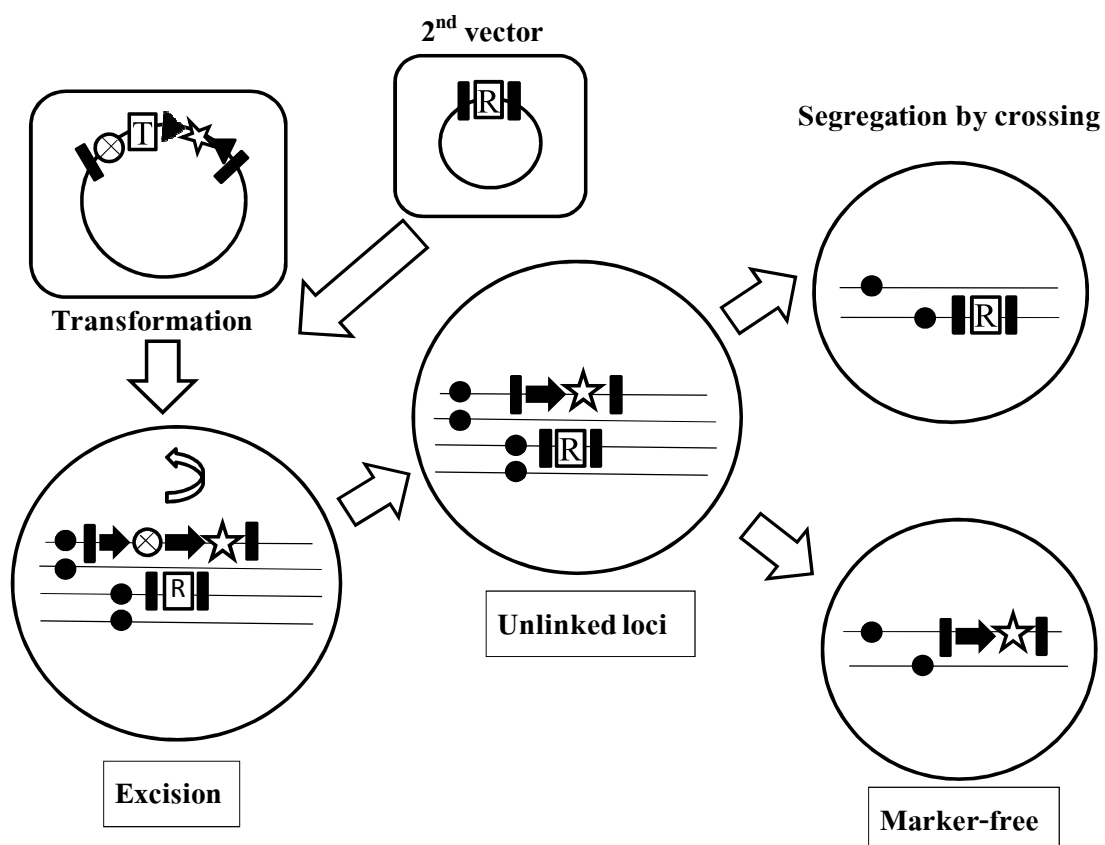
5.3 Site specific recombination

วิธีที่กำหนดยีนคัดเลือกออกจากจีโนมของพืชโดยอาศัยการทำงานของยีน *recombinase* ซึ่งประกอบด้วย 3 ระบบ ได้แก่

5.3.1 ระบบ Cre/lox มาจาก *Escherichia coli* ของ bacteriophage P1 ประกอบด้วย ส่วนของยีน *recombinase* (Cre) และตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจง (recognition site) คือ lox P site ยีน Cre เกิดกระบวนการ recombination ตัดส่วน DNA ตรงตำแหน่ง lox P (Odell et al., 1990) หลังจากนั้น ยีนคัดเลือกจะถูกตัดออกจากจีโนมพืช สามารถสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกได้ในรุ่นลูก (ภาพที่ 5)

5.3.2 ระบบ FLP/FRT มาจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ประกอบด้วยส่วนของ ยีน *FLP* ซึ่งทำหน้าที่เป็นยีน recombination และ *FRT* เป็นตำแหน่งตัดจำเพาะ (*FRT* site) ซึ่งมีอยู่ 2 ตำแหน่ง และประสิทธิภาพของระบบ FLP/FRT ขึ้นอยู่กับการแสดงออกของยีน *FLP* ที่จะเกิด กระบวนการ recombination ตัดส่วนยีนคัดเลือกออกจากจีโนมพืชและขึ้นอยู่กับความยาวและ โครงสร้างของยีน *FRT* ด้วย

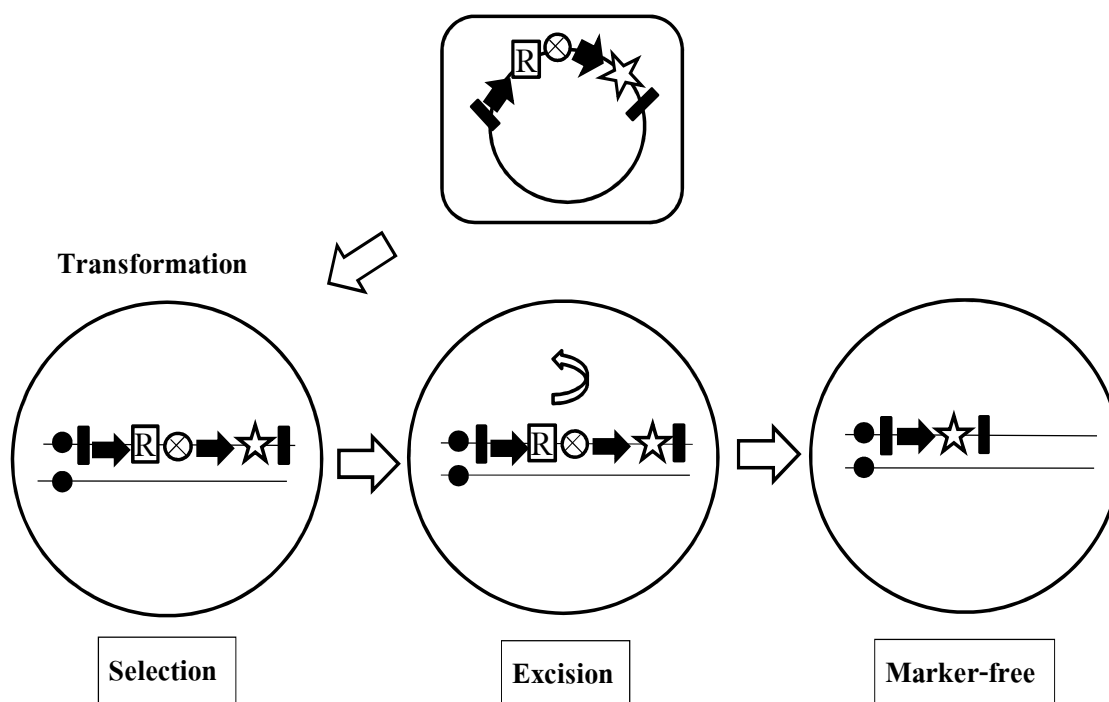
5.3.3 ระบบ *R/Rs* ซึ่งอาศัยการทำงานของกระบวนการที่เรียกว่า site-specific recombination พลาสมิด pRS1 ของ *Zygosaccharomyces rouxii* (Araki *et al.*, 1987) ยีน *recombinase* (*R*) ตัดดีเอ็นเอตรงตำแหน่งตัดจำเพาะ recognition site (*RS*) ซึ่งมีอยู่ 2 ตำแหน่ง Onouchi *et al.* (1991, 1995) และระบบนี้ยีนคัดเลือก (*ipt/rol*) และยีน *R* ถูกวางไว้ระหว่างตำแหน่ง *RS* และยีนที่สนใจถูกวางไว้ภายนอก *R/RS* cassette ซึ่งยีนคัดเลือกนี้จะถูกตัดจากจีโนมพืชที่ ตำแหน่ง *RS* โดยการทำงานของยีน *recombinase* ทำให้ได้พืชที่มียีนที่ต้องการ แต่ไม่มียีนคัดเลือก (Ebinuma *et al.*, 1997b) (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 การเคลื่อนย้ายยีนคัดเลือกออกจากระบบโดยวิธี Cre/lox ซึ่งประกอบด้วยยีน *lox P* ขนาดข้างยีนคัดเลือกและอยู่ร่วมกับยีนที่สนใจ ยีน *Cre* ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายยีนคัดเลือกและยีนที่สนใจโดยวิธี re-transformation และ cross-pollination และสามารถสร้างพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกโดยการผสมข้าม

lox P = ตำแหน่งตัดจำเพาะเจาะจง (recognition site) และยีน R (*Recombinase*) = ยีน *cre*

⊗ = ยีนคัดเลือก ☆ = ยีนที่สนใจ ■ = LB/RB ของ T-DNA ▴ = *lox P* □R = ยีน *cre*



ภาพที่ 6 การผลิตพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกโดยใช้ MAT Vector System ซึ่งประกอบด้วยยีนที่สนใจอยู่ข้างนอกส่วน recognition site ยีนคัดเลือกและยีน *recombinase* อยู่ภายในยีน RS, ยีนคัดเลือกจะถูกกำจัดออกจากจีโนมพืช โดยการทำงานของยีน *recombinase* (R)

⊗ = ยีนคัดเลือก ☆ = ยีนที่สนใจ ■ = LB/RB ของ T-DNA ➡ = RS

Dale and Ow (1991) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย ซึ่งใช้ยีน *Cre* ในการเคลื่อนย้ายยีนคัดเลือก คือยีน *hpt* ออกจากจีโนมของพืช โดยระบบนี้ยีนคัดเลือกจะอยู่ในส่วน *lox P* site ของชุดยีน ส่วนยีนที่ต้องการอยู่ภายนอกตำแหน่ง *lox P* (*luc/lox/hpt/lox*) ซึ่งพบต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนจำนวน 78 ต้น มีเพียง 42 ต้น ที่ปราศจากยีนคัดเลือกโดยการทำงานของ *Cre/lox*

นอกจากนี้ Russell *et al.* (1992) ถ่ายยีนเข้าสู่ *Arabidopsis* โดยใช้ระบบ *Cre/lox* พบว่า *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีนในรุ่นลูกทั้งหมด 14 ต้น ด้านทานสาร sulfonyleurea จำนวน 9 ต้น ทำให้สามารถสร้างพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกได้คิดเป็น 64.3 %

Xiao-Yi *et al.* (2006) ทำการผลิตยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกโดยใช้ site-specific recombination ระบบ FLP/*FRT* โดยใช้เวกเตอร์ pCAMBIA1300-*betA-FRT-als-FRT* และเวกเตอร์ pCAMBIA1300-HSP-FLP-*hpt* พบว่าสามารถสร้างต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี re-transformation และหลังจากนั้นนำมาทำ heat-shock ต่อมา ยีน *FLP recombinase* ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ heat-shock inducible promoter (HSP) เกิดกระบวนการ site-specific recombination กำจัดยีนคัดเลือก (*als*) ออกจากยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม (re-transgenic tobacco plants) ทำให้สามารถสร้างยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมได้ถึง 41%

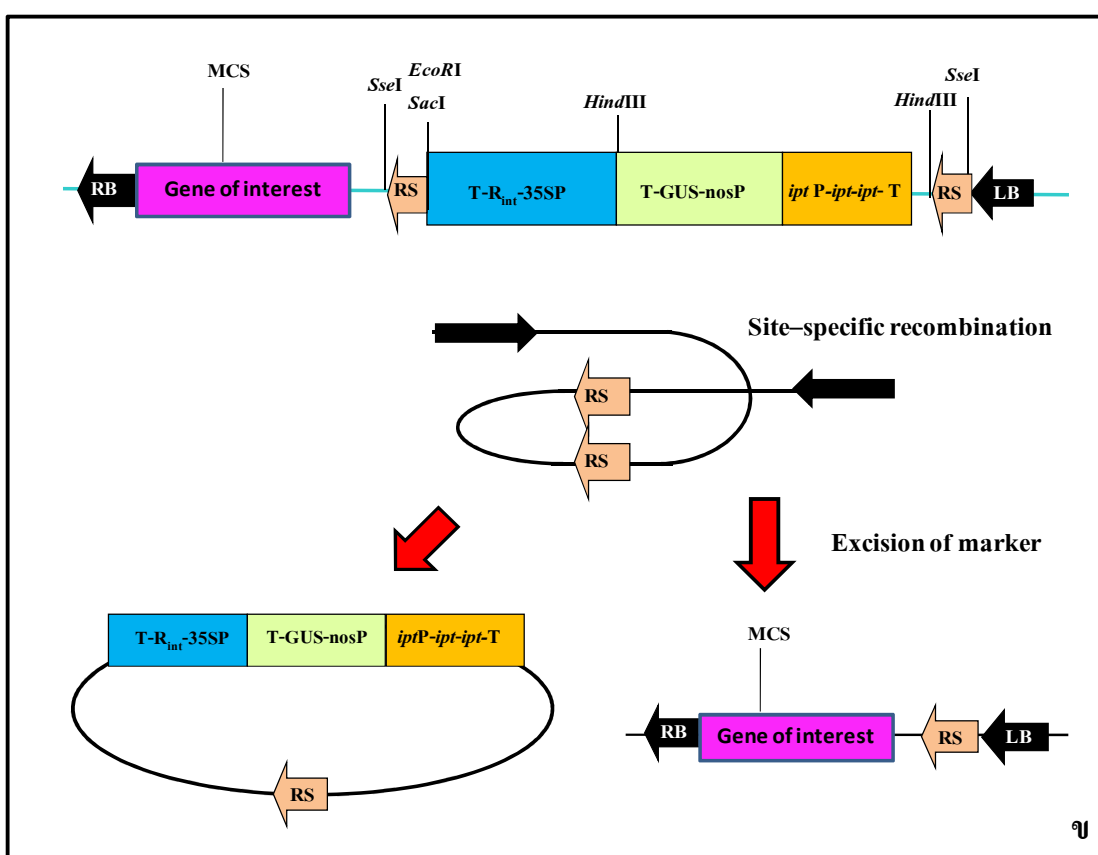
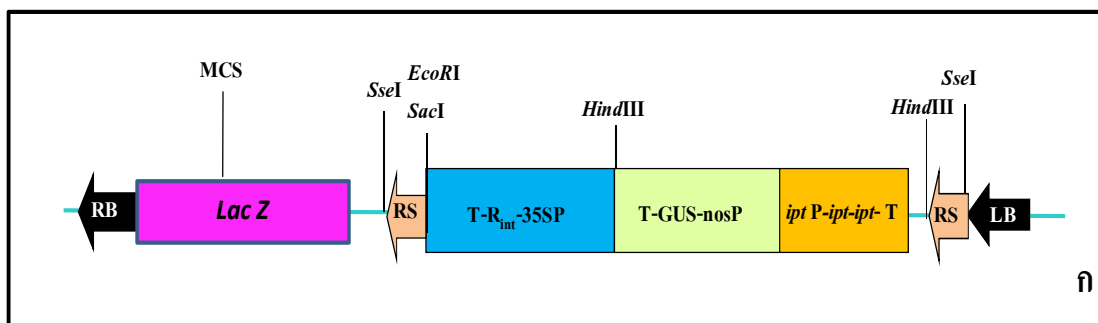
ในการสร้างพืชที่ปราศจากยีนคัดเลือกโดยใช้ oncogenes เป็นยีนที่ใช้คัดเลือกร่วมกับระบบ site-specific recombination เพื่อให้เกิดการพัฒนาของเซลล์พืชที่ผิดปกติ เนื่องจากการแสดงออกของยีน *ipt* ที่ใช้เป็นยีนคัดเลือก หลังจากนั้นยีนคัดเลือกจะถูกกำจัดออกจากพืช ทำให้ได้ต้นที่มีลักษณะการเจริญที่ปกติและปราศจากยีนคัดเลือก เรียกว่า Multi-Auto-Transformation Vector System (MATVS) ระบบนี้ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้ยีน *ipt* หรือยีน *rol* จากเชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นยีนคัดเลือก และยีน *recombinase* (*R*) จากยีสต์ที่ตั้งอยู่ที่ตำแหน่งภายในตำแหน่งจดจำ (recognition site; RS) และยีนที่ต้องการถูกวางไว้ภายนอก *R/RS* cassette ซึ่งยีนคัดเลือกนี้จะถูกตัดจากจีโนมพืชที่ตำแหน่ง RS โดยการทำงานของยีน *recombinase* ทำให้ได้พืชที่มียีนที่ต้องการ แต่ไม่มียีนคัดเลือก (Ebinuma *et al.*, 1997b)

เวกเตอร์ pMAT21 (ภาพที่ 7ก) อาศัยการทำงานโดยกระบวนการที่เรียกว่า site-specific recombination (ภาพที่ 7ข) ซึ่งเป็นเวกเตอร์ที่สร้างพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือก โดยเวกเตอร์นี้ประกอบด้วยยีน *ipt* (*isopentenyl transferase*) ที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมนไซโตไคนินที่ทำให้เกิดยอดกระจุย ยีน *gus* ซึ่งเป็นยีนรายงานผล ทำให้เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน ยีน *recombinase* (*R*) ซึ่งตั้งอยู่ภายใน recognition site (RS) ทำหน้าที่เกิดกระบวนการที่เรียกว่า site-specific recombination ตัดชุดของยีนคัดเลือกออกจากระบบ ทำให้ได้พืชที่ปราศจากยีนคัดเลือกแต่มียีนที่สนใจ และส่วนของ *lac Z* ที่ตั้งอยู่ภายนอก *R/RS* cassette เป็นส่วนที่ไว้วรรจยีนที่สนใจตรงตำแหน่ง multi-cloning site (Ebinuma *et al.*, 1997a, 1997b)

มีการนำระบบ MAT มาใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชหลาย ๆ ชนิด เพื่อสร้างพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือก ได้แก่ ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*), snapdragon (*Antirrhinum majus*) ข้าว (Sugita *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 2001; Ebinuma and Komamine, 2001; Endo *et al.*, 2002) *Nierembergia caerulea* (Khan *et al.*, 2006), white poplar (*Populus alba* L., cv.

‘Villafranca’) (Zelasco *et al.*, 2007) มันสำปะหลังพันธุ์ KU50 (Saelim *et al.*, 2008) hybrid aspen (*Populus sieboldii* × *P. grandidentata*) (Ebinuma and Komamine, 2001), sweet orange (*Citrus sinensis* L.) (Ballester *et al.*, 2007) และ Apricot (Lopez-Noguera *et al.*, 2007)

การสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกด้วยวิธี co-transformation ประสบความสำเร็จในถั่วเหลืองสายพันธุ์ Thorne ซึ่งมีประสิทธิภาพในการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกได้ถึง 37.1% (Ye and Qin 2008) และ canola (*Brassica napus*) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกได้ 1.8%-9.9% (Richael *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังได้มีการปรับปรุงพันธุ์พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกด้านทานโรคแมลงและทนเค็มได้ เช่น สามารถสร้างมันฝรั่ง 4 สายพันธุ์ (*Solanum tuberosum* cv. Mindnes, Kisvardai Rozsa, Gulbaba และ Russet Burbank) ที่ต้านทานโรค Potato virus Y (PVY) โดยถ่ายยีนหุ้มโปรตีน (ยีน PVY-NTN) ที่อยู่ในลักษณะ hairpin เข้าไปยับยั้งการสร้างยีนหุ้มโปรตีนของเชื้อ PVY โดยใช้วิธี site specific recombination ระบบ R/RS ซึ่งมียีน *ipt* เป็นยีนคัดเลือก (Bukovinszki *et al.*, 2007) สร้างข้าวที่ต้านทานโรคกาบใบแห้ง (sheath blight resistant transgenic rice plants) โดยถ่ายยีน chitinase (*chi11*) เข้าไปยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ที่เป็นสาเหตุของโรคกาบใบแห้งด้วยวิธี co-transformation พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อโรคนี้นี้ได้ 38-40% (Sripriya *et al.*, 2008) สร้างยาสูบที่ต้านทานแมลงปากดูด (*Myzus persicae*) ซึ่งเป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญของพืชหลายชนิด เช่น ยาสูบ สามารถสร้างโดยถ่ายยีนที่ต้านทานแมลง (*Allium sativum* leaf agglutinin) โดยใช้ระบบ Cre/lox ซึ่งประกอบด้วย binary vector พบว่าสร้างยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกได้ถึง 19.2 % (Chakraborti *et al.*, 2008) และใช้ระบบ Cre/lox เช่นเดียวกันในการถ่ายยีน glyoxalase I (*glyI*) จาก *Brassica juncea* ซึ่งเป็นยีนทนเค็มและใช้ salt-inducible rd29A promoter ควบคุมยีน *glyI* ในการถ่ายยีนเข้าสู่ *Arabidopsis thaliana* พบว่าสามารถสร้าง *Arabidopsis thaliana* ดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกซึ่งทนเค็มได้ถึง 150 มิลลิโมล (Roy *et al.*, 2008) ทำให้เกิดประโยชน์ทางการเกษตรและทำให้ไม่เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม



ภาพที่ 7 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเวกเตอร์ pMAT21 (ก) และการผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกโดยวิธี site-specific recombination (ข)

RB/LB = right border/left border; RS = Recombination site, CaMV-35S-P = 35S-promoter of *Cauliflower mosaic virus*, R_{int} = Recombinase gene with intron sequences from *Eucalyptus* histone gene, *ipt* = isopentenyl transferase gene, GUS = β -glucuronidase gene, MCS = multicloning site, *lac Z* = β -galactosidase gene

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมเนื้อเยื่อกล้วยไม้ที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีน

เตรียม protocorm-like bodies (PLBs) จากส่วนเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) โดยการนำหน่ออ่อนของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวลอกกาบใบออกจนเหลือส่วนปลายยอด ตัดเฉพาะส่วนเนื้อเยื่อเจริญขนาดประมาณ 0.2-0.3 มิลลิเมตร ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์แบบสเตอริโอ นำเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW (Vacin and Went, 1949) เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นประมาณ 6 เดือน นำ PLBs ที่เพาะเลี้ยงได้ไปตรวจสอบด้วย GLIFT kit เพื่อตรวจหา PLBs ที่ปลอดจากเชื้อไวรัส *Cymbidium mosaic virus* (CyMV) และ *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) จากนั้นนำ PLBs ที่ปราศจากเชื้อไวรัสมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเพื่อใช้ในการถ่ายยีน

2. การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ โดยใช้เวกเตอร์ pMAT21

นำเนื้อเยื่อ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ที่ปราศจากเชื้อไวรัส มาใช้ในการถ่ายยีนโดยใช้เวกเตอร์ pMAT21 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจาก Dr. H. Ebinuma (Nippon Paper Industries Co. Ltd., Japan) (ภาพที่ 7) ซึ่งมียีน *ipt* (*isopentenyl transferase*) ที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมน cytokinin เป็นยีนคัดเลือก และมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล โดยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ คือ

2.1 สายพันธุ์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เหมาะสมกับการถ่ายยีน โดยทำการทดสอบเชื้ออะโกรแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่บรรจุเวกเตอร์ pMAT21 ได้แก่ AGL-1:: pMAT21, C58:: pMAT21 และ EHA105:: pMAT21

2.2 ความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย โดยวัดจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เหมาะสม (จากข้อ 2.1) โดยทำการทดสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ที่ช่วงต่าง ๆ ดังนี้ 0.80-1.20, 1.21-1.60 และ 1.61-2.00

2.3 การทดสอบความเจือจางของสารแขวนลอยเชื้ออะโกราแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีน โดยทำการเจือจางสารแขวนลอยเชื้ออะโกราแบคทีเรีย ณ ช่วงค่า OD₆₀₀ ที่ได้จากการทดสอบข้อ 2.2 ดังนี้ 1:0, 1:1, 1:10, 1:20, 1:50 และ 1:100 (สารแขวนลอยเชื้อ : อาหารเหลวสูตร VW) (ตารางภาคผนวกที่ 1)

2.4 การทดสอบระยะเวลาในการ co-cultivation ระหว่างสารแขวนลอยเชื้ออะโกราแบคทีเรียกับเนื้อเยื่อกล้วยไม้ ได้แก่ 10, 30 และ 60 นาที

2.5 การทดสอบวิธีการ co-cultivation ระหว่างสารแขวนลอยเชื้ออะโกราแบคทีเรียกับเนื้อเยื่อกล้วยไม้ ได้แก่ การเขย่าเป็นครั้งคราวทุก ๆ 5 นาทีเป็นเวลา 30 นาที, การใช้ vortex mixer ยี่ห้อ vortex-2 Genie ที่ความเร็วระดับ 7 และการใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็ว 175 รอบต่อนาที

2.6 การทดสอบปริมาณของสาร celite ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดบาดแผลกับเนื้อเยื่อพืชที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อกล้วยไม้โดยเชื้ออะโกราแบคทีเรีย

2.7 การทดสอบระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกล้วยไม้

2.8 การทดสอบระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่สามารถกำจัดเชื้ออะโกราแบคทีเรียออกจากเนื้อเยื่อกล้วยไม้ภายหลังจากการถ่ายยีน

ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน *gus* เข้าสู่เนื้อเยื่อกล้วยไม้ด้วยวิธี histochemical assay (Jefferson, 1987) ภายหลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 7 วัน นำ PLBs มาแช่ในสารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-16 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดสีเขียวของคลอโรฟิลล์ออกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบผลโดยการนับ PLBs ที่ติดสีน้ำเงิน การทดลองครั้งนี้ทดสอบปัจจัยละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 20 จิน และนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS 15.0 Family Serial 5048214

3. การสร้าง construct ของยีน *ACS* และ *ACO* เข้าสู่เวกเตอร์ pMAT 21

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอทิลีนของดอกกล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์ซึ่งได้แก่ ยีน *ACS* (GeneBank Accession No. EF488013) และยีน *ACO* (GeneBank Accession No. EF487342) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการวิจัย “การยืดอายุการปักแจกันของกล้วยไม้สกุลหวาย” ซึ่งทางโครงการได้แบ่งยีน *ACS* และ *ACO* แต่ละยีนออกเป็นส่วนตัวต่าง ๆ 3 ส่วน ได้แก่ บริเวณ 5' ของยีน (ส่วน A), บริเวณ central region (ส่วน B) และบริเวณ 3' ของยีน (ส่วน C) ซึ่งเรียกว่า *ACSA*, *ACSB*, *ACSC* สำหรับยีน *ACS* และ *ACOA*, *ACOB*, *ACOC* สำหรับยีน *ACO* ตามลำดับ และยีนดังกล่าวถูกสร้างเป็น construct ในลักษณะที่เป็น antisense ใน pCAMBIA 1304 ซึ่งเป็น plant expression vector เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ (ภาพที่ 8 และ 9) ดังนั้นจึงย้ายชุดยีนซึ่งประกอบด้วย 35S promoter, ยีน *ACS* หรือยีน *ACO* (antisense orientation) และ NOS-terminator ไปสู่เวกเตอร์ pMAT21 ซึ่งเป็นเวกเตอร์สำหรับการสร้าง marker-free transgenic orchid (ภาพที่ 10) โดยได้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อขยายชุดยีนดังกล่าวโดยใช้ไพรเมอร์ 35S-*Sma*I (5' GG CCC GGG CAT GGA GTC AAA GAT TCA AA 3') และไพรเมอร์ NOS-T-*Sma*I (5' GG CCC GGG CCC GAT CTA GTA ACA TAG AT 3') ซึ่งมีลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I (CCCGGG) ตรงส่วนปลาย 5' ของแต่ละไพรเมอร์ เพื่อสะดวกในการโคลนเข้าสู่ตำแหน่ง *Sma*I ของเวกเตอร์ pMAT21

การทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ construct ของยีน AS-*ACS* และ AS-*ACO* ในเวกเตอร์ pCAMBIA 1304 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ได้แก่ p1304-AS-*ACSA*, p1304-AS-*ACSB* และ p1304-AS-*ACSC* สำหรับยีน *ACS* และ p1304-AS-*ACOA*, p1304-AS-*ACOB* และ p1304-AS-*ACOC* สำหรับยีน *ACO* เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-*Sma*I และ NOS-T-*Sma*I ส่วนประกอบของปฏิกิริยาปริมัตรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X PCR buffer (500 mM KCl, 200 mM Tris HCl, pH 8.4) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 50 mM MgCl₂ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 2 mM dNTP ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 20 µM ไพรเมอร์ แต่ละชนิดปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ *Taq* DNA polymerase (0.02 ยูนิตต่อไมโครลิตร; Invitrogen, USA) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เริ่มปฏิกิริยา PCR โดยใช้อุณหภูมิสำหรับ denaturation ในครั้งแรกที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบ โดยใช้อุณหภูมิสำหรับ denaturation, annealing และ extension เป็น 94, 55 และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, 30 วินาที และ 1 นาที ตามลำดับ และใช้อุณหภูมิสำหรับ extension รอบสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ได้ผลผลิตของแต่ละยีน และตัดแถบดีเอ็นเอขนาด

ตามชุดยีนที่ต้องการ (ตารางที่ 1) แล้วทำการสกัดแยกดีเอ็นเอที่ต้องการจากแผ่นเจลด้วยวิธี QIA Quick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี QIA Quick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pGEM[®]-T Easy Vector (Promega, USA) ด้วยเอนไซม์ไลเกส โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร, 10X ligation buffer (60 mM Tris HCl pH 7.8, 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10% polyethylene glycol) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, pGEM[®]-T Easy Vector (25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase (400 ยูนิตต่อไมโครลิตร; Biolabs, USA) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ครบ 10 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง นำดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) ที่ได้ถ่ายเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1-blue ด้วยวิธี heat shock transformation ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที คัดเลือกเซลล์ที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมด้วยระบบ blue-white colony บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม IPTG (100 มิลลิโมลาร์) 100 ไมโครลิตร และ X-Gal (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่คาดว่าจะมีดีเอ็นเอสายผสม สกัดแยกดีเอ็นเอจากเซลล์โดยวิธี Alkaline lysis (Sambrook *et al.*, 1989) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว 2X-YT ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอโดยตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ละลายตะกอนเซลล์ใน Solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แช่น้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นเติม Solution II [0.2 N NaOH, 1% SDS] ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมาแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติม Solution III (3 M potassium acetate, 0.2 M glacial acetic acid) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมา แล้วแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที ปั่นหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสประมาณ 400 ไมโครลิตร มาเติม PCI (phenol:chloroform:isoamyl อัตราส่วน 25:24:1 โดยปริมาตร) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำส่วนใสมาเติม 2.5 เท่าของ absolute ethanol แล้วแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นจึงล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำตะกอนให้แห้งแล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer (10 mM Tris, pH 8.0 และ

1 mM EDTA, pH 8.0) ที่มี RNase A 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อกำจัด อาร์เอ็นเอ ตรวจสอบพลาสมิคลูกผสมที่ได้ด้วยการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *SmaI* โดยใช้ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร, 10X NEB buffer 4 (50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM dithiothreitol, pH 7.9) ปริมาตร 1 ไมโครลิตรและเอนไซม์ *SmaI* (20 ยูนิตต่อไมโครลิตร; BioLabs, USA) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตรเติมน้ำให้ครบ 10 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis เลือกดีเอ็นเอขนาดตามชุดยีนที่ต้องการ (ตารางที่ 1) ทำการสกัดแยก ดีเอ็นเอที่ต้องการจากแผ่นเจลโดยใช้ QIA Quick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) ตรวจสอบ ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis

เตรียมเวกเตอร์ pMAT21 ขนาด 17.1 กิโลเบส เพื่อใช้ในการสร้าง construct โดยใช้ ดีเอ็นเอของ pMAT21 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร, 10X NEB buffer 4 (50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM dithiothreitol, pH 7.9) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเอนไซม์ *SmaI* (20 ยูนิตต่อไมโครลิตร; Biolabs, USA) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ครบ 60 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้น เติมน้ำ PCI เพื่อกำจัดเอนไซม์ แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำ dephosphorylation เพื่อกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ ปลาย 5' ของดีเอ็นเอ โดยใช้ *SmaI*-digested pMAT21 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร 10X NEB buffer 3 (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, pH 7.9) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เอนไซม์ calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร; Biolabs, USA) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ครบ 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมน้ำ CIAP เพิ่มอีก 3 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำ 0.5% SDS จำนวน 5 ไมโครลิตร และ 5 mM EDTA จำนวน 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำ proteinase K (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วย PCI และละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำ 20 ไมโครลิตร ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis และตรวจสอบการเกิด dephosphorylation ว่าเกิดขึ้นสมบูรณ์หรือไม่ โดยการทำได้ด้วย self-ligation ของ pMAT21 ที่ผ่านการ ทำ dephosphorylation

เชื่อมต่อชุดยีน AS-ACS และยีน AS-ACO ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *SmaI* ต่อเข้ากับเวกเตอร์ pMAT21 ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วยชุดยีน AS-ACS cassette หรือชุดยีน AS-ACO cassette ปริมาตร 15 ไมโครลิตร, *SmaI*-digested pMAT21 ที่ผ่านการทำ dephosphorylation ปริมาตร

1 ไมโครลิตร, 10X T4 DNA ligase reaction buffer (500 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 100 mM dithiothreitol, 10 mM ATP) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ T4 DNA ligase (400 ยูนิตต่อไมโครลิตร; Biolabs, USA) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ครบ 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง จากนั้นเคลื่อนย้ายพลาสติกสายผสมเข้าสู่ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 (ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการทดสอบปัจจัย) โดยวิธี electroporation

3.1 การเตรียม competent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens* สำหรับการทำ electroporation

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 หรือ C58 หรือ AGL-1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2X-YT ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เข้าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชม. นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงต่อในอาหาร 2X-YT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือมีค่า OD_{600nm} ประมาณ 0.25-0.3 หมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากอาหารด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนเซลล์ใน 10% sterile glycerol ที่แช่ไว้ในที่เย็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนเซลล์ใน 10% sterile glycerol ที่แช่ไว้ในที่เย็นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนเซลล์ใน 10% sterile glycerol ที่แช่ไว้ในที่เย็นปริมาตร 2 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดหลอดละ 120 ไมโครลิตร ทำให้เซลล์แข็งอย่างรวดเร็วในไนโตรเจนเหลวเก็บเซลล์ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้ในการเคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี electroporation (Walkerpeach and Velten, 1994)

3.2 ขั้นตอนการถ่ายชุดยีน AS-ACS หรือ AS-ACO cassette เข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

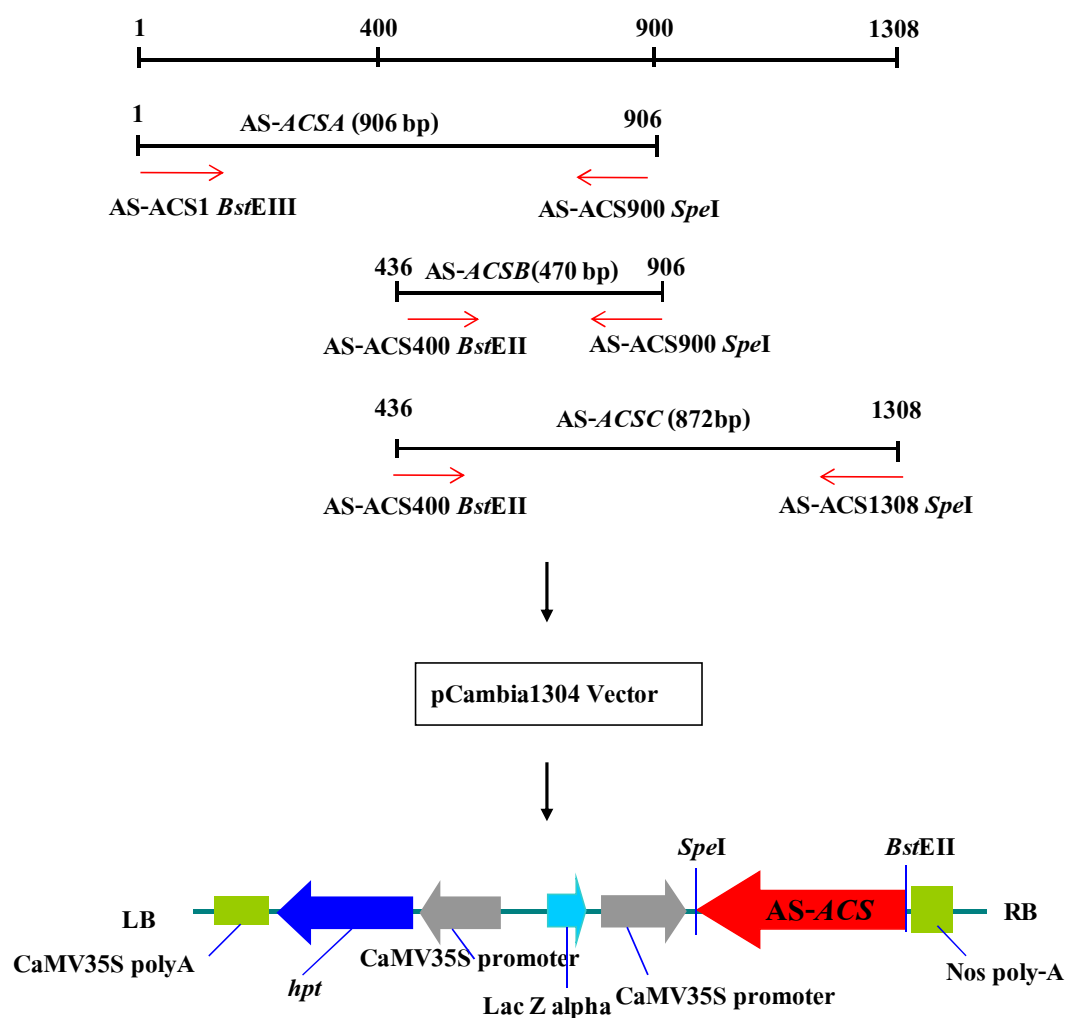
นำดีเอ็นเอสายผสม pMAT-AS-ACS หรือ pMAT21-AS-ACO ถ่ายเข้าสู่เซลล์อะโกรแบคทีเรียด้วยวิธี electroporation (Walkerpeach and Velten, 1994) โดยนำ competent cell ของเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ได้จากการทดสอบปัจจัย ปริมาตร 120 ไมโครลิตร มาแช่น้ำแข็งให้เย็นจัด เติมพลาสมิดสายผสมปริมาตร 2 ไมโครลิตร (2.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันแล้วเติมลงใน cuvette แช่น้ำแข็ง เป็นเวลา 10-20 นาที ใช้สภาวะการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์อะโกรแบคทีเรียมตามคำแนะนำของบริษัท Bio-Rad โดยใช้เครื่อง Gene Pulser ซึ่งตั้งค่าการใช้

งาน ดังนี้ Cuvette Gap 0.2 cm, Voltage 2.5 kV, Capacitor 25 μ F, Resistor 400 Ω และ time constant 8-9 msec เช็ด cuvette ให้แห้งแล้วใส่ในช่องสำหรับผ่านกระแสไฟฟ้า กดปุ่ม pulse ที่หน้าจอจะปรากฏเลข 9 ซึ่งแสดงว่าได้ผ่านกระแสไฟแล้ว จากนั้นดึง cuvette ออก แล้วใช้พลาสติกเจอร์ปิเปตย้ายเซลล์ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว 2X-YT ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมอาหารกับเซลล์เลี้ยงเชื้อโดยนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเชื้อ 100 ไมโครลิตร และ 200 ไมโครลิตร มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง 2X-YT ที่เตรียมสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน ตรวจสอบชุดยีน AS-ACS หรือ AS-ACO จากโคลนที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-SmaI กับ NOST-SmaI ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis จากนั้นนำโคลนที่ได้มาใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์ต่อไป

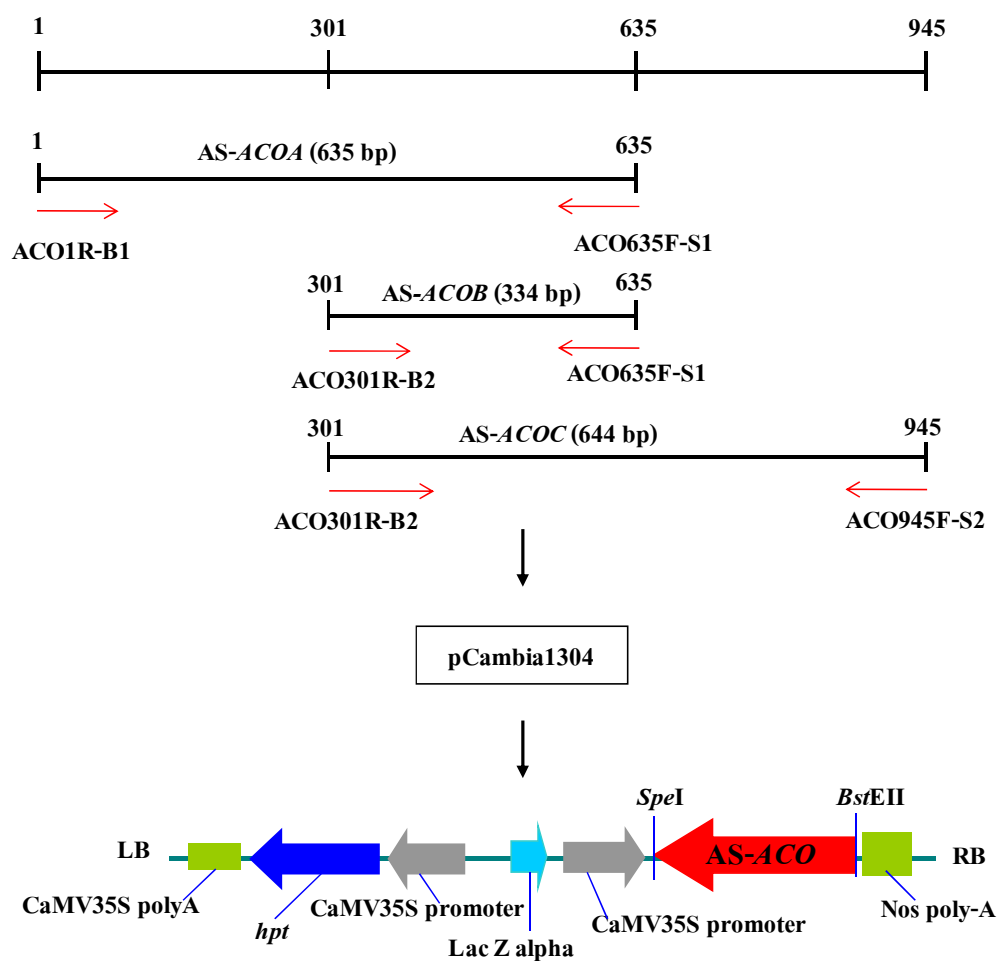
ตารางที่ 1 ชุดยีน AS-ACS และยีน AS-ACO ในเวกเตอร์ pMAT21 ที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์

ยีน	ขนาดของยีน	ดีเอ็นเอต้นแบบของ PCR ใช้ไพรเมอร์ 35P- <i>Sma</i> I/ NOST- <i>Sma</i> I	ขนาดของ PCR product (bp)	ชุดยีน	ขนาดของชุดยีนทั้งหมด ^{1/} (bp)
ยีน ACS					
<i>ACSA</i>	906	p1304 AS- <i>ACSA</i>	1697	pMAT21-AS- <i>ACSA</i>	18,797
<i>ACSB</i>	470	p1304 AS- <i>ACSB</i>	1261	pMAT21-AS- <i>ACSB</i>	18,361
<i>ACSC</i>	872	p1304 AS- <i>ACSC</i>	1663	pMAT21-AS- <i>ACSC</i>	18,763
ยีน ACO					
<i>ACOA</i>	635	p1304 AS- <i>ACOA</i>	1426	pMAT21-AS- <i>ACOA</i>	18,526
<i>ACOB</i>	334	p1304 AS- <i>ACOB</i>	1125	pMAT21-AS- <i>ACOB</i>	18,225
<i>ACOC</i>	644	p1304 AS- <i>ACOC</i>	1435	pMAT21-AS- <i>ACOC</i>	18,535

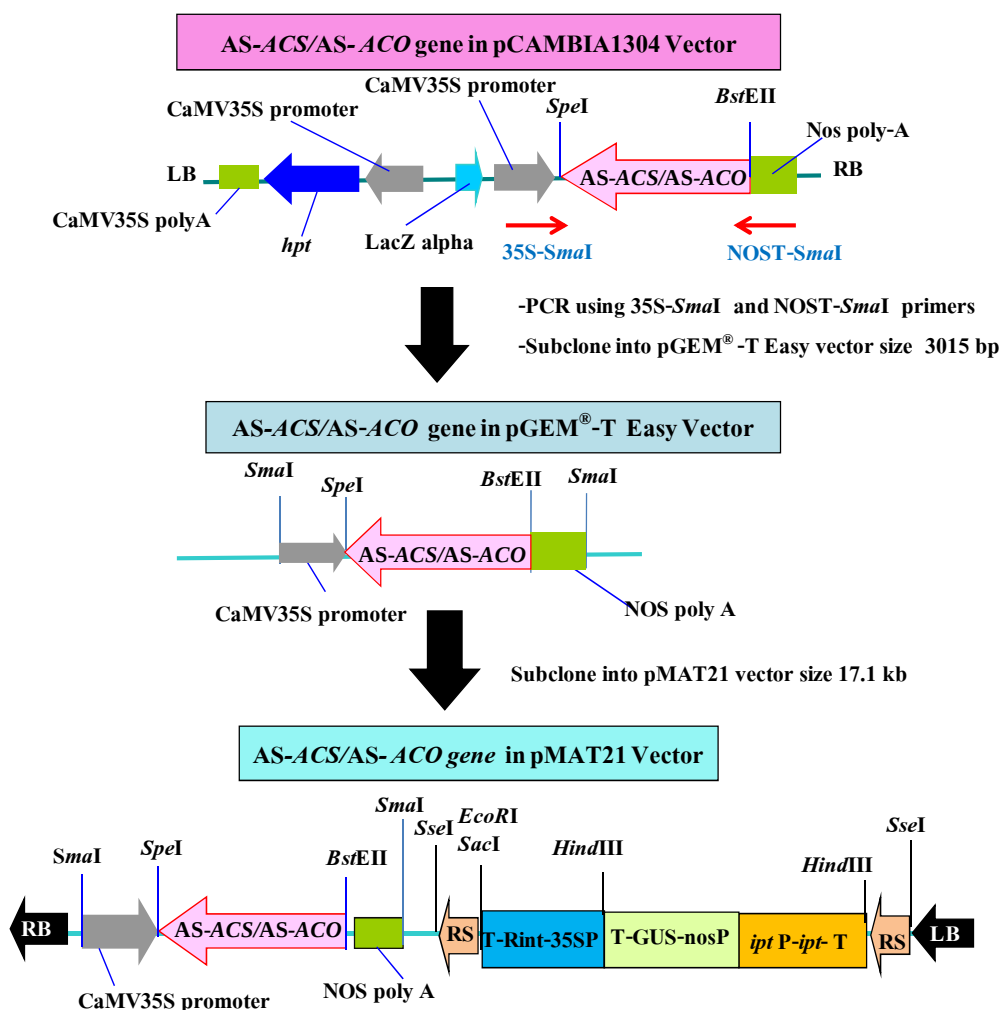
^{1/}ชุดยีนประกอบด้วยเวกเตอร์ pMAT21 มีขนาด 17,100 คู่เบส, CaMV-35S promoter ขนาด 538 คู่เบส, ยีนต้นแบบ ได้แก่ ยีน AS-ACS หรือ AS-ACO และ NOS terminator ขนาด 253 คู่เบส



ภาพที่ 8 แผนภาพแสดงส่วนต่าง ๆ ของยีน *ACS* ในลักษณะ antisense (AS-ACS) ซึ่งแบ่งเป็น 3 ส่วน ได้แก่ AS-ACSA, AS-ACSB และ AS-ACSC และชนิดของไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการสร้าง construct ของยีน AS-ACS ใน plant expression vector pCambia1304 ในตำแหน่ง *SpeI* และ *BstEII*



ภาพที่ 9 แผนภาพแสดงส่วนต่าง ๆ ของยีน *ACO* ในลักษณะ antisense (AS-*ACO*) ซึ่งแบ่งเป็น 3 ส่วน ได้แก่ AS-*ACO*A, AS-*ACO*B และ AS-*ACO*C และชนิดของไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการสร้าง construct ของยีน AS-*ACO* ใน plant expression vector pCambia1304 ในตำแหน่ง *Spe*I และ *Bst*EII



ภาพที่ 10 ขั้นตอนการสร้างชุดยีน AS-ACS และ AS-ACO เข้าสู่เวกเตอร์ pMAT21

โดยเริ่มจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน AS-ACS และยีน AS-ACO ที่อยู่ในเวกเตอร์ pCambia1304 ซึ่งประกอบด้วย 35S promoter, AS-ACS หรือ AS-ACO และ NOS-T ย้ายชุดยีนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy จากนั้นทำการย้ายชุดยีนเข้าสู่เวกเตอร์ pMAT21 ที่ตำแหน่ง *SmaI* ดังนั้นจะได้ pMAT21-AS-ACS หรือ pMAT21-AS-ACO ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้คือ RB = right border, LB = left border; RS = Recombination site, CaMV-35SP = 35S-promoter of *Cauliflower mosaic virus*; R_{int} = Recombinase gene with intron sequences, *ipt* = isopentenyl transferase gene, MCS = multicloning site, AS-ACO = antisense-1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO) gene, AS-ACS = antisense-1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (ACS) gene, *gus* gene = β -galactosidase gene

3.3 การถ่ายยีน AS-ACS หรือยีน AS-ACO เข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์

หลังจากได้ทำการทดสอบปัจจัยต่าง ๆ แล้วจึงได้นำผลการทดสอบมาใช้ในการถ่ายยีนซึ่งมีวิธีการดังนี้

3.3.1 เตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิดสายผสม

การเตรียมเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ที่ได้จากการทดสอบปัจจัย ที่บรรจุชุดยีนของ pMAT21-AS-ACS หรือ pMAT21-AS-ACO (ตารางที่ 1) โดยการเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียในอาหารเหลว 2X-YT ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสาร acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200-250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ค่า OD_{600nm} ประมาณ 1.61-2.00 นำเชื้อที่เลี้ยงได้มาปั่นตกตะกอนเซลล์แล้วเจือจางเซลล์ในอาหารเหลวสูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าวในอัตรา 1:1 (สารแขวนลอยเชื้อ : อาหารเหลวสูตร VW) ซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 4.1×10^{17} cfu/ml แล้วเติมสาร acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์

3.3.2 การถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

ตัด PLBs ของกล้วยไม้เป็นชิ้นหนา ประมาณ 2 มิลลิเมตร ผสม PLBs กับสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียโดย co-cultivation ด้วยเครื่อง vortex mixer (vortex-2 Genie) ที่ความเร็วระดับ 7 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาดูดสารแขวนลอยเชื้อออก ซับ PLBs บนกระดาษทิชชูที่ปลอดเชื้อ วางบนอาหารแข็งสูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว และเติมสาร acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ บ่มไว้นาน 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด จากนั้นย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว และเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียและเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์ จน PLBs พัฒนาเป็นยอดกระจุก (*ipt-shooties*) จากนั้นเพาะเลี้ยงให้เป็นต้นเดี่ยวที่สมบูรณ์ต่อไป

4. การตรวจวิเคราะห์ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน

คัดเลือก PLBs ที่ได้รับการถ่ายยีนซึ่งมีลักษณะเป็นยอดกระจุกที่เกาะตัวกันแน่น (*ipt-shooty*) ซึ่งเป็นผลมาจากการแสดงออกของยีน *ipt* เลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และนำยอดกระจุกของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และ Southern blot hybridization of PCR products หลังจากนั้นนำยอดกระจุกที่มียีน AS-ACS หรือ AS-ACO และยีน *ipt* ซึ่งเป็นยีนคัดเลือกมาเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว แต่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และสังเกตการพัฒนาของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนพัฒนาเป็นยอดปกติ ซึ่งคาดว่าปราศจากยีน *ipt* ซึ่งเป็นยีนคัดเลือก มาเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว สำหรับพัฒนาให้เกิดรากต่อไปและนำยอดปกติดังกล่าวมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR, Southern blot analysis of PCR products และ Southern blot analysis โดยแบ่งการวิเคราะห์เป็น 2 ส่วน คือ

4.1 การตรวจวิเคราะห์เนื้อเยื่อกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน โดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

นำ PLBs ที่ได้รับการถ่ายยีนมาตรวจสอบประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนโดยการแยกสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอของกล้วยไม้ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Verwoerd *et al.* (1989) โดยใช้ชิ้นส่วนของใบกล้วยไม้ประมาณ 0.2 กรัม มาบดให้ละเอียดใน TLES buffer (2 M Tris-HCl, 4 M LiCl, 0.5 M EDTA, pH 8.0, 20% SDS) และ 2% Na₂SO₃ ปริมาตร 750 ไมโครลิตร และเติม PCI (25 : 24 : 1 ปริมาตรโดยปริมาตร) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 2 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ประมาณ 500 ไมโครลิตร และเติม PCI ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 2 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ประมาณ 400 ไมโครลิตร เติม 0.1 เท่า ของ sodium acetate, pH 5.2 และ 1 เท่า ของ isopropanol จากนั้นผสมโดยพลิกหลอดไปมา แช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer ที่มี RNaseA 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบยีน AS-ACS หรือ AS-ACO และ ยีน *ipt* ด้วยเทคนิค PCR โดย

ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *AS-ACS* หรือ *AS-ACO* (ตารางที่ 2) ปฏิบัติ PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X PCR buffer (50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 0.1 mg/ml BSA, 10 mM (NH₄)₂SO₄) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร, 10 ไมโครโมลาร์ของไพรเมอร์แต่ละชนิด ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร; RBC, Taiwan) ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอที่สกัดจากใบกล้วยไม้ 1 ไมโครลิตร เริ่มปฏิบัติ PCR โดยใช้อุณหภูมิสำหรับ denaturation รอบแรก ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำปฏิบัติ PCR จำนวน 31 รอบ โดยใช้อุณหภูมิสำหรับ denaturation, annealing และ extension เป็น 94, 55 และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, 30 วินาที และ 1 นาที ตามลำดับ และใช้อุณหภูมิสำหรับ extension รอบสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที สำหรับตรวจสอบยีน *AS-ACS/AS-ACO* ส่วนยีน *ipt* ใช้อุณหภูมิสำหรับ denaturation รอบแรก ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำปฏิบัติ PCR จำนวน 31 รอบ โดยใช้อุณหภูมิสำหรับ denaturation, annealing และ extension เป็น 94, 60 และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, 30 วินาที และ 1 นาที ตามลำดับ และใช้อุณหภูมิสำหรับ extension รอบสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุตราไวโอเลต ทำการยืนยันผลของ PCR ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization of PCR products โดยเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอจากเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน (positively charged nylon membrane; Roche, Germany) ด้วยเทคนิค capillary transfer โดยนำเจลไปแช่ใน 0.25 M HCl เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นแช่เจลใน 0.4 N NaOH ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เพื่อปรับดีเอ็นเอเข้าสู่สภาพเป็นกลาง วางแผ่นพลาสติกพาดปากกล่องแล้วนำกระดาษกรอง What mann 3 MM มาวางพาดแผ่นพลาสติกให้ปลายทั้ง 2 ข้างของกระดาษจุ่มใน 0.4 N NaOH วางแผ่นไนลอนลงบนเจล วางแผ่นกระดาษกรองทับบนแผ่นไนลอน วางกระดาษทิชชูซ้อนด้านบนตามลำดับ ให้สูงประมาณ 10 เซนติเมตร นำวัสดุกดทับด้านบน น้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัม ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนย้ายจากแผ่นเจลไปสู่แผ่นไนลอนเป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาแช่ใน 2X SSC buffer เป็นเวลา 10 นาที นำแผ่นไนลอนเมมเบรนอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอไว้กับแผ่นไนลอนเมมเบรน แล้วนำมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีนโดยทำปฏิบัติ prehybridization เริ่มจากแช่แผ่นไนลอนเมมเบรนในสารละลายไฮบริไดเซชัน (5X SSC, 0.1% N-lauroylsarcosine, 1% blocking reagent, 0.02% SDS) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แช่แผ่นเมมเบรนในสารละลายไฮบริไดเซชันที่เติม 35S promoter probe เพื่อตรวจสอบยีน *AS-ACS* หรือ *AS-ACO*

และใช้ *ipt* probe เพื่อตรวจสอบยีน *ipt* ซึ่งติดฉลากด้วยสาร digoxigenin โดยใช้ PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Germany) ทำปฏิกิริยา hybridization ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง probe ส่วนเกินด้วย washing solution I (2X SSC, 0.1% SDS) ที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที และล้างด้วย washing solution II (0.1X SSC, 0.1% SDS) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จำนวน 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และตรวจผลไฮบริไดเซชันด้วยเทคนิค chemiluminescence detection โดยใช้ CDP starTM (Roche, Germany) เป็นสับสเตรท ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เนื้อเยื่อกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน AS-ACS หรือ AS-ACO

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
ยีน ACS		
AS-ACSA	35S-SmaI	5'GG CCC GGG CAT GGA GTC AAA GAT TCA AA 3'
	AS-ACS1BstEII	5'GGT TAC CAT GTC CAA AGA GTT TGG G 3'
AS-ACSB หรือ AS-ACSC	35S-SmaI	5'GG CCC GGG CAT GGA GTC AAA GAT TCA AA 3'
	AS-ACS400BstEII	5'GGT TAC CGT CTG AGA AGA AAC AAG A 3'
ยีน ACO		
AS-ACOA	35S-SmaI	5'GG CCC GGG CAT GGA GTC AAA GAT TCA AA 3'
	ACO1R-B1	5'GGT TAC CAT GGA GCT TCT TGA GGG T 3'
AS-ACOB หรือ AS-ACOC	35S-SmaI	5'GG CCC GGG CAT GGA GTC AAA GAT TCA AA 3'
	ACO301R-B2	5'GGT TAC CGA TTG CCG CAG CAC GAT 3'
ยีน <i>ipt</i>	IPT1	5'CTT GCA CAG GAA AGA CGT CG 3'
	IPT2	5'AAT GAA GAC AGG TGT GAC GC 3'

4.2 การตรวจวิเคราะห์จำนวนชุดของยีนจากต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมโดยวิธี

Southern blot hybridization

ตรวจสอบจำนวนชุดของยีน AS-ACS หรือ AS-ACO ของกล้วยไม้ต้นที่ตรวจพบยีน AS-ACS หรือ AS-ACO ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ใบกล้วยไม้ประมาณ 5 กรัม มาบดในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด นำมาใส่ในหลอดที่มี TLES buffer และ 2% Na₂SO₃ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำมาเติม PCI ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ นำมาเติม PCI ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ประมาณ 400 ไมโครลิตร เติม 1 เท่าของ isopropanol จากนั้นพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายดีเอ็นเอด้วย TE ที่มี RNaseA 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร วิเคราะห์หาความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยนำดีเอ็นเอที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร นำดีเอ็นเอ 100 ไมโครกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ Bgl/II ปริมาตร 17 ไมโครลิตร (10 units/μl; Biolabs, USA) ในปฏิกิริยารวม 500 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X NEB buffer 3 (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, pH 7.9) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ได้ครบ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หรือตัดด้วยเอนไซม์ HindIII 3 ไมโครลิตร (100 หน่วยต่อไมโครลิตร; Biolabs, USA) ในปฏิกิริยารวม 500 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X NEB buffer 2 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, pH 7.9) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ได้ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วย PCI และละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 40 ไมโครลิตร

นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบจำนวนชุดของยีนโดยแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel ใน 1XTAE buffer (0.004 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA) (ตารางภาคผนวกที่ 5) ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 60 โวลต์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุตราไวโอเลต จากนั้นเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอจากเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน (positively charged nylon membrane; Roche, Germany) ด้วยเทคนิค capillary transfer โดยนำเจลไปแช่ใน 0.25 M HCl เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้าง

ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นแช่เจลใน 0.4 N NaOH ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เพื่อปรับดีเอ็นเอเข้าสู่สภาพเป็นกลาง วางแผ่นพลาสติกพาดปากกล่องแล้วนำกระดาษกรอง What mann 3 MM มาวางพาดแผ่นพลาสติกให้ปลายทั้ง 2 ข้างของกระดาษจุ่มใน 0.4 N NaOH วางแผ่นไนลอนลงบนเจล วางแผ่นกระดาษกรองทับบนแผ่นไนลอน วางกระดาษทิชชูซ้อนด้านบนบนตามลำดับ ให้สูงประมาณ 10 เซนติเมตร นำวัสดุกดทับด้านบนน้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัม ปลอຍให้ดีเอ็นเอเคลื่อนย้ายจากแผ่นเจลไปสู่แผ่นไนลอนเป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาแช่ใน 2X SSC buffer เป็นเวลา 10 นาที นำแผ่นไนลอนเมมเบรนอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอไว้กับแผ่นไนลอนเมมเบรน แล้วนำมาตรวจสอบจำนวนชุดของยีน AS-ACS หรือ AS-ACO โดยใช้ 35S promoter probe หรือตรวจสอบยีน *ipt* ด้วย *ipt* probe โดยทำตามวิธีการในหัวข้อ 4.1 แต่ทำปฏิกิริยา prehybridization และ hybridization ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

5. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรม

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน sense ACS, antisense ACS (AS-ACS), sense ACO, antisense ACO (AS-ACO) และ 18s rRNA ในระดับอาร์เอ็นเอด้วยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) และ northern blot analysis

5.1 การสกัด total RNA จากกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรม

สกัด total RNA จากใบกล้วยไม้ตามวิธีการของ Verwoerd *et al.* (1989) โดยนำตัวอย่างต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมที่ทราบผลการวิเคราะห์จำนวนชุดของยีน AS-ACS หรือ AS-ACO มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน AS-ACS และ AS-ACO ในระดับอาร์เอ็นเอ ใช้ใบพืช 3 กรัม นำมาบดด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด นำมาใส่ในหลอดที่มี TLES buffer (0.1 M Tris-HCL, pH 8.0, 0.1 M LiCl, 10 mM EDTA, pH 8.0, 1% SDS) และ 2% Na₂SO₃ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร เติม phenol ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ประมาณ 2 นาที ปั่นหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที คูลน้ำใสปริมาตร 6 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดใหม่ เติม chloroform : isoamyl alcohol, CI (24:1, ปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากันดีโดยใช้ vortex เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเก็บน้ำใสด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที คูลส่วนใส ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม 4 M LiCl ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ

ต่อมาที่ เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้ง ละลายอาร์เอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 2.5 M CH_3COONa , pH 6.0 ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใส และ absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับปามาแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase ปริมาตร 30 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 230 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer เพื่อคำนวณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ

5.2 การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

กำจัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง total RNA ที่สกัดได้ โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย total RNA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม, 10X Reaction buffer with MgCl_2 (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl_2 , 50% glycerol) (Fermentas, Lithuania) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, DNase I (1 หน่วยต่อไมโครลิตร; Fermentas, Lithuania) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำที่ปราศจาก RNase ให้ปริมาตรครบ 10 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 25 mM EDTA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยนำไปอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดปฏิกิริยาแช่ในน้ำแข็งทันที จากนั้นนำ total RNA ที่กำจัดดีเอ็นเอแล้วไปใช้ในการสังเคราะห์ยีน AS-ACS หรือ AS-ACO และยีน 18s rRNA ซึ่งนำมาใช้เป็น internal control ด้วยเทคนิค RT-PCR ต่อไป

เตรียมปฏิกิริยา reverse transcription โดยเติมส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้ total RNA ที่ทำการกำจัดดีเอ็นเอแล้วความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม เติม reverse primer ของยีน sense ACSA ได้แก่ S-ACSA-1270R1, ยีน sense ACSB และยีน sense ACSC ได้แก่ S-ACSB215R2, ยีน AS-ACS ได้แก่ AS-ACS400R-BstEII (ตารางที่ 3) ของยีน sense ACOA ได้แก่ S-ACOA945R1, ยีน sense ACOB และ sense ACOC ได้แก่ S-ACOB200R2, ยีน AS-ACO ได้แก่ AS-ACO301R-B2 (ตารางที่ 3) และยีน 18s rRNA ซึ่งเป็น internal control ได้แก่ 18s rRNA-R (ตารางที่ 3) ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมน้ำที่ปราศจาก RNase ให้ครบปริมาตร 12 ไมโครลิตร

นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และแช่น้ำแข็งทันที จากนั้นเติม 5X Reaction buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT) (Fermentas, Lithuania) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, Ribonuclease inhibitor (1.2 mM EDTA, 0.1 mg/ml *E.coli* [³H]-RNA, 50 mg/ml yeast RNA, 8 mM DTT (40 ยูนิตต่อไมโครลิตร; Fermentas, Lithuania) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, RevertAid™ M-MuLV RT (200 ยูนิตต่อไมโครลิตร; Fermentas, Lithuania) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตรและเติมน้ำที่ปราศจาก RNase ให้ปริมาตรครบ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาใช้เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา PCR

สำหรับปฏิกิริยา PCR ในแต่ละตัวอย่างจะแบ่งเป็น 3 ชุด ชุดแรกใช้คู่ไพรเมอร์ที่เฉพาะกับยีน *AS-ACS* หรือ *AS-ACO* ชุดที่สองใช้คู่ไพรเมอร์ที่เฉพาะกับยีน *sense ACS* หรือ *sense ACO* ชุดที่สามใช้คู่ไพรเมอร์ที่เฉพาะกับยีน 18s rRNA ซึ่งนำมาใช้เป็น internal control (ตารางที่ 3)

ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 10X PCR buffer (50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 0.1 mg/ml BSA, 10 mM (NH₄)₂SO₄) (RBC, Taiwan), 0.1 mM dNTPs, 0.3 ไมโครโมลาร์ ของไพรเมอร์แต่ละชนิด (ตารางที่ 3) และ *Taq* DNA polymerase (RBC, Taiwan) (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร สำหรับปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบ อุณหภูมิที่ใช้สำหรับ denature, annealing และ extension คือ 94, 55 และ 72 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 50 วินาที, 1 นาที และ 1 นาที ตามลำดับ เมื่อปฏิกิริยา PCR สิ้นสุด นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน 1X TAE buffer และทำการยืนยันผลของ PCR โดยการทำ Southern blot hybridization of PCR products ตรวจสอบผลโดยทำปฏิกิริยา prehybridization เริ่มจากแช่แผ่นไนลอนเมมเบรนในสารละลายไฮบริไดเซชัน (hybridization) (5X SSC, 0.1% N-lauroylsarcosine, 1% blocking reagent, 0.02% SDS) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แช่แผ่นเมมเบรนในสารละลายไฮบริไดเซชันที่เติมยีน *AS-ACS/AS-ACO* หรือยีน *sense ACS/sense ACO* หรือ 18s rRNA ซึ่งติดฉลากด้วยสาร digoxigenin โดยใช้ PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Germany) ทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชัน ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง probe ส่วนเกินด้วย washing solution I (2X SSC, 0.1% SDS) ที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที และล้างด้วย washing solution II (0.1X SSC, 0.1% SDS) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จำนวน

2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และตรวจผลไฮบริโดเซชันด้วยเทคนิค chemiluminescence detection โดยใช้ CDP starTM (Roche, Germany) เป็นสับสเตรท ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *AS-ACS* และยีน *AS-ACO* ด้วยวิธี RT-PCR

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาด PCR product (bp)
ยีน antisense- <i>ACS</i>			
<i>AS-ACSA</i>	AS-ACS400R-BstEII	5'GTC CCG ACT CCT TAT TAC CC 3'	470
<i>AS-ACSB</i>	AS-ACS900F-SpeI	5'GTC TGA GAA GAA ACA AGA CT 3'	
<i>AS-ACSC</i>			
ยีน sense <i>ACS</i>			
<i>ACSA</i>	S-ACSA1070F1	5'GAT TGT TCT GCT GGG TGA AT 3'	215
	S-ACSA-1270R1	5'ATC TCT TCA GCG CCA CCT CC3'	
<i>ACSB</i>	S-ACSBC1F2	5'ATG TCC AAA GAG TTT GGG AT 3'	215
<i>ACSC</i>	S-ACSBC215R2	5'GCT TCT GGG TGC TGC TCC AG 3'	
ยีน antisense- <i>ACO</i>			
<i>AS-ACOA</i>	AS-ACO301R-B2	5'GAT TGC CGC AGC ACG ATG AA 3'	334
<i>AS-ACOB</i>	AS-ACO635F-S1	5'GCC GAT ATT AAC AAV AAT GG 3'	
<i>AS-ACOC</i>			
ยีน sense <i>ACO</i>			
<i>ACOA</i>	S-ACOA745F1	5'AGC GAC GCT GTC ATC TTC CC3'	200
	S-ACOA945R1	5'TCA AGC AGT AGG AAT CGG CT3'	
<i>ACOB</i>	S-ACOBC1F2	5'ATG GAG CTT CTT GAG GGT TC 3'	200
<i>ACOC</i>	S-ACOBC200R2	5'GAA TCT AAG GTT TTC GCA GC 3'	
ยีน 18s rRNA	18s rRNA-F	5'GGA TCC ATT GGA GGG CAA GT3'	295
	18s rRNA-R	5'CCC TCT TAA TCA TTA CTC-CG3'	

5.3 การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอในกล้วยไม้ตัดแปลง

พันธุกรรมโดยวิธี northern blot hybridization

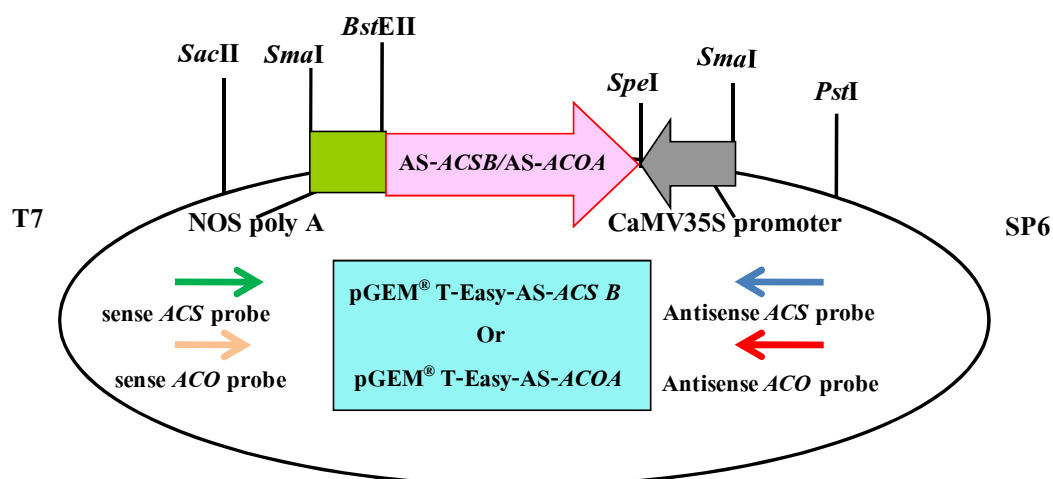
นำ total RNA ที่สกัดได้จากกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรม มาตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค northern blot hybridization โดยนำ total RNA ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม มาทำปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 10X Reaction buffer with $MgCl_2$ (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM $CaCl_2$, 50% glycerol) (Fermentas, Lithuania) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร, DNase I (1 ยูนิตต่อไมโครลิตร; Fermentas, Lithuania) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมน้ำที่ปราศจาก RNase ให้ปริมาตรครบ 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 25 mM EDTA ปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดปฏิกิริยาแช่ในน้ำแข็งทันที นำมาเติม PCI ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ดูดส่วนใสให้หลอดใหม่ประมาณ 400 ไมโครลิตร เติมน้ำของ isopropanol และ 0.1 เท่าของ sodium acetate, pH 5.2 ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมาแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เทส่วนใสทิ้ง ทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase หลังจากนั้นเติมน้ำ 2 เท่าของตัวอย่างด้วย 1.5X RNA loading dye [1.5X dye (0.06% bromophenol blue, 0.06% xylene cyanol), 1.5X MOPS, 9% formaldehyde, 60% formamide] นำไปต้มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แยกขนาดอาร์เอ็นเอด้วย 1% formaldehyde gel ใน 1X MOPS (20 mM MOPS, 5 mM sodium citrate, 2 mM EDTA) โดยหลอมเจล ก่อนเติม 37% formaldehyde ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 60 โวลต์ ย้ายอาร์เอ็นเอจากเจลไปสู่แผ่นไนลอนเมมเบรนโดยใช้ 20X SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0) เป็นเวลาประมาณ 12-16 ชั่วโมง นำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาล้างด้วย 2X SSC เป็นเวลา 10 นาที ตริ้งแผ่นไนลอนเมมเบรนโดยอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นตรวจผลโดยทำปฏิกิริยา prehybridization และ hybridization เริ่มจากแช่แผ่นไนลอนเมมเบรนในสารละลาย high SDS (50 mM Sodium phosphate, pH 7.0, 30X SSC, 0.1% (w/v) N-lauroylsarcosine, 2% blocking reagent, 7% SDS, 50% formamide deionized) ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แช่แผ่นไนลอนเมมเบรนในสารละลาย high SDS ที่เติม AS-ACS probe หรือ AS-ACO probe (antisense RNA probe) เพื่อใช้ตรวจการแสดงออกของยีน ACS หรือ ACO ที่ผลิตจากพืชเอง (sense RNA) และตรวจสอบการแสดงออกของยีน AS-ACS หรือ AS-ACO (antisense RNA) ที่ใส่

เข้าไปในพีช sense RNA probe ที่จำเพาะเจาะจงสำหรับแต่ละยีน ติดฉลากด้วยสาร digoxigenin โดยใช้ RNA Labelling Kit (Roche, Germany) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต หรือตรวจสอบยีน 18s rRNA ซึ่งใช้เป็น internal control โดยติดฉลากด้วย digoxigenin โดยใช้ PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Germany) ทำปฏิกิริยา hybridize ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง probe ส่วนเกินด้วย washing solution I (2X SSC, 0.1% SDS) ที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที และล้างด้วย washing solution II (0.1X SSC, 0.1% SDS) ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส จำนวน 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และตรวจผลไฮบริไดเซชัน (hybridization) ด้วยเทคนิค chemiluminescence detection โดยใช้สับสเตรท CDPStar (Roche, Germany) ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต

5.3.1 การสร้าง RNA Probe โดยใช้ DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)

5.3.1.1 การเตรียมพลาสมิดสายผสม

นำพลาสมิดสายผสม pGEM[®]-T Easy AS-ACSB หรือ pGEM[®]-T Easy AS-ACO4 ซึ่งมีโครงสร้างยีนดังภาพที่ 11 มาตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I ในกรณีสร้าง sense RNA probe ของยีน *ACS* และ *ACO* และตัดด้วยเอนไซม์ *Sac*II สำหรับสร้าง antisense RNA probe ของยีน *ACS* และ *ACO* ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม มาทำปฏิกิริยาการสร้าง RNA probe ด้วยชุดปฏิกิริยา DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche, Germany) ในปฏิกิริยาประกอบด้วยพลาสมิดสายผสมความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม 10X NEB buffer 3 (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, pH 7.9) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, เติมน้ำ 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร BSA ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร, เอนไซม์ *Pst*I (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร; Biolabs; USA) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สำหรับสร้าง sense RNA probe ส่วนการสร้าง antisense RNA probe ปฏิกิริยาประกอบด้วย 10X NEB buffer 4 (50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM dithiothreitol, pH 7.9), เอนไซม์ *Sac*II (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร; Biolabs; USA) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำให้ปริมาตรครบ 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะย่อย ดีเอ็นเอได้สมบูรณ์ นำพลาสมิดสายผสมที่ตัดสมบูรณ์แล้ว มาทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยใช้ชุดปฏิกิริยา GF-1 Gel DNA Recovery Kit (Vivantis, Malaysia) และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 10 mM Tris; pH 8.0 นำดีเอ็นเอที่ได้มาใช้ในการผลิต RNA probe



ภาพที่ 11 แสดงตำแหน่งและทิศทางของยีน AS-ACSB หรือ AS-ACO ที่อยู่ในพลาสมิด pGEM[®]-T Easy ลูกศรสีต่าง ๆ แสดงโพรบชนิดต่าง ๆ ดังนี้

← sense ACS probe ← antisense ACS probe ← sense ACO probe ← antisense ACO probe

5.3.1.2 วิธีการติดฉลาก RNA probe ด้วยชุด DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)

(Roche, Germany)

การสร้าง sense RNA probe เพื่อใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน AS-ACS หรือ AS-ACO จากกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรม โดยใช้ T7 RNA polymerase ปฏิบัติการสังเคราะห์ sense RNA probe ด้วยชุดปฏิกิริยา DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche, Germany) ประกอบด้วยพลาสมิด pGEM[®]-T Easy-AS-ACSB สำหรับสร้าง sense ACS RNA probe และ pGEM[®]-T Easy-AS-ACO สำหรับสร้าง sense ACO RNA probe ซึ่งย่อยด้วยเอนไซม์ PstI ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม, 10X NTP labeling mixture (10 mM ATP, 10mM GTP, 6.5 mM UTP, 3.5 mM DIG-UTP in Tris-HCl, pH 7.5) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 10X Transcription buffer (400 mM Tris-HCl, pH 8.0, 60 mM MgCl₂, 100 mM dithioerythritol (DTE), 20 mM spermidine, 100 mM NaCl, 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร RNase inhibitor ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, protector RNase inhibitor ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, T7 RNA polymerase (20 หน่วยต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจาก RNase ให้ครบ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ และนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.2 mM EDTA, pH 8.0 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำ RNA probe ที่ได้มาตกตะกอนโดยเติม 4 M LiCl ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตรและ 100% ethanol ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือที่อุณหภูมิ -15 ถึง -25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ นำมาปั่นหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และนำมาปั่นหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ทำตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บ RNA probe ไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส โดยแบ่งเก็บตามปริมาณที่ต้องการใช้ในแต่ละครั้ง

การสร้าง antisense RNA probe เพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ACS* หรือ *ACO* จากกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมโดยใช้ SP6 RNA polymerase ปฏิบัติการสังเคราะห์ antisense RNA probe ด้วยชุดปฏิกิริยา DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) ปฏิบัติการประกอบด้วยพลาสมิด pGEM[®]-T Easy-AS-*ACSB* สำหรับสร้าง AS-*ACS* RNA probe และ pGEM[®]-T Easy-AS-*ACO*A สำหรับสร้าง AS-*ACO* RNA probe ซึ่งย่อยด้วยเอนไซม์ *Sac*II ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม, 10X NTP labeling mixture (10 mM ATP, 10mM GTP, 6.5 mM UTP, 3.5 mM DIG-UTP in Tris-HCl, pH 7.5) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 10X Transcription buffer (400 mM Tris-HCl, pH 8.0, 60 mM MgCl₂, 100 mM dithioerythritol (DTE), 20 mM spermidine, 100 mM NaCl, 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร RNase inhibitor ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, protector RNase inhibitor ปริมาตร 1 ไมโครลิตร , SP6 RNA polymerase (20 หน่วยต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจาก RNase ให้ครบ 20 ไมโครลิตร และขั้นตอนการสังเคราะห์ antisense RNA probe เช่นเดียวกับการสร้าง sense RNA probe

6. สถานที่ทำการทดลอง

กลุ่มวิจัยด้านพืช ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตกำแพงแสน
โรงเรียนปลูกพืชทดลองของกลุ่มวิจัยด้านพืช ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

7. ระยะเวลาทำการทดลอง

การทดลองครั้งนี้เริ่มตั้งแต่กุมภาพันธ์ 2549 ถึง กุมภาพันธ์ 2552

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ด้วยอะโกรแบคทีเรียโดยใช้เวกเตอร์ pMAT21

1.1 การศึกษาสายพันธุ์และความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์

จากการทดสอบสายพันธุ์ *A. tumefaciens* ที่ใช้ในการศึกษาการถ่ายยีนโดยใช้เวกเตอร์ pMAT21 เข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์ ได้แก่ สายพันธุ์ EHA105, C58 และ AGL-1 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้อยู่ในช่วง OD₆₀₀ 0.8-1.20 , 1.21-1.60 และ 1.61-2.00 ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันในแต่ละช่วง OD₆₀₀ คือ สายพันธุ์ C58 ในช่วง OD₆₀₀ = 0.80-1.20 มีความเข้มข้นของเชื้อ $\sim 4.4 \times 10^7$ cfu/ml ในช่วง OD₆₀₀ = 1.21-1.60 มีความเข้มข้นของเชื้อ $\sim 2.0 \times 10^8$ cfu/ml และในช่วง OD₆₀₀ = 1.60-2.00 มีความเข้มข้นของเชื้อ $\sim 2.5 \times 10^8$ cfu/ml ส่วนสายพันธุ์ AGL-1 ในช่วง OD₆₀₀ = 0.80-1.20 มีความเข้มข้นของเชื้อ $\sim 1.0 \times 10^8$ cfu/ml ในช่วง OD₆₀₀ = 1.21-1.60 มีความเข้มข้นของเชื้อ $\sim 1.9 \times 10^8$ cfu/ml และในช่วง OD₆₀₀ = 1.60-2.00 มีความเข้มข้นของเชื้อ $\sim 2.9 \times 10^8$ cfu/ml และสายพันธุ์ EHA105 ในช่วง OD₆₀₀ = 0.80-1.20 มีความเข้มข้นของเชื้อ $\sim 6.0 \times 10^{16}$ cfu/ml ในช่วง OD₆₀₀ = 1.21-1.60 มีความเข้มข้นของเชื้อ $\sim 4.7 \times 10^{17}$ cfu/ml และ ในช่วง OD₆₀₀ = 1.60-2.00 มีความเข้มข้นของเชื้อ $\sim 8.2 \times 10^{17}$ cfu/ml ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี histochemical assay

ผลการทดลองพบว่าเชื้ออะโกรแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการตรวจนับจำนวน PLBs ที่ติดสีน้ำเงินของยีน *gus* ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเวกเตอร์ pMAT21 พบว่าเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ในช่วงความเข้มข้น OD₆₀₀ = 1.61-2.00 มีจำนวนชิ้น PLBs ที่ติดสีน้ำเงินมากที่สุด คือ 85 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 และ C58 ในช่วงความเข้มข้นที่ OD₆₀₀ = 1.61-2.00 มี PLBs ติดสีน้ำเงิน 75 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ดังนั้นการทดลองขั้นตอนต่อไปจึงเลือกใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่ความเข้มข้น 8.2×10^{17} cfu/ml มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1.61-2.00 ซึ่งมีปริมาณของเชื้อที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์

ตารางที่ 4 ผลของการทดสอบสายพันธุ์และความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105, AGL-1 และ C58 ที่บรรจุเวกเตอร์ pMAT21 ต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์

สายพันธุ์เชื้อ อะโกรแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของเชื้อ อะโกรแบคทีเรีย ที่ OD ₆₀₀	จำนวน PLBs ที่ให้ผล ยีน <i>gus</i> บวก ต่อจำนวน PLBs ทั้งหมด ^{1/}	เปอร์เซ็นต์การเกิดสี น้ำเงินของ PLBs ที่ได้ รับการถ่ายยีน ^{2/}
EHA105	0.80 - 1.20	12.00/20	60.00 ^b
	1.21 - 1.60	13.33/20	66.67 ^a
	1.61 - 2.00	17.00/20	85.00 ^a
AGL-1	0.80 - 1.20	11.67/20	58.35 ^b
	1.21 - 1.60	14.00/20	70.00 ^a
	1.61 - 2.00	15.00/20	75.00 ^a
C58	0.80 - 1.20	8.00/20	40.00 ^b
	1.21 - 1.60	13.00/20	65.00 ^a
	1.61 - 2.00	14.00/20	70.00 ^a
<i>F</i> -test			*
CV (%)			16.04

^{1/}ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ โดย 1 ซ้ำใช้ PLBs จำนวน 20 ชิ้น

^{2/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

* แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

1.2 การศึกษาอัตราการเจริญของสารแขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105

จากการทดลองถ่ายยีนที่ผ่านมา เลือกใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่บรรจุเวกเตอร์ pMAT21 ถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs กล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์ ด้วยการเจาะเซลล์แขวนลอยของเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่มีค่า $OD_{600} = 1.61-2.00$ ขึ้นต่อมาทำการทดสอบอัตราการเจริญของสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียต่ออาหารเหลวเพาะเลี้ยงกล้วยไม้สูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าวในอัตรา 1:0, 1:1, 1:10, 1:20, 1:50 และ 1:100 และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี histochemical assay

ผลการทดลองพบว่า PLBs ที่ผ่านการถ่ายยีน มีการติดสีน้ำเงินของยีน *gus* เท่ากับ 48.35, 68.35, 50.00, 48.35, 46.35 และ 48.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 5) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียออกจาก PLBs ของกล้วยไม้ภายหลังการถ่ายยีน ปริมาณของเชื้อที่ใช้ไม่ควรมากเกินไป เนื่องจากจะกำจัดเชื้อออกจากชิ้นพืชภายหลังการถ่ายยีนได้ยาก และมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนลดลง (Lin *et al.*, 1994) ดังนั้นปริมาณเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีน คือ มีค่า OD_{600} ในช่วง 1.61-2.00 และเจาะเชื้อในอัตรา 1:1 ซึ่งมีปริมาณเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่มีชีวิต 4.1×10^{17} cfu/ml (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลของการเจือจางสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่บรรจุเวกเตอร์ pMAT21 ในช่วงค่า OD₆₀₀ = 1.61-2.00 ที่มีต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ป้อมปาด้ว

ช่วงความเข้มข้น ของเชื้ออะโกร แบคทีเรียที่ OD ₆₀₀	อัตราการเจือจางเชื้อ อะโกรแบคทีเรียใน อาหารเหลวสูตร VW ที่ ไม่เติมน้ำมะพร้าว	ผลการแสดงออกของยีน <i>gus</i> ใน PLBs ของกล้วยไม้	
		ค่าเฉลี่ยของจำนวน PLBs ที่ได้รับการถ่ายยีนต่อ จำนวน PLBs ที่ทำ การถ่ายยีน ^{1/}	เปอร์เซ็นต์การ เกิดสีน้ำเงินของ PLBs ที่ได้รับการ ถ่ายยีน ^{2/}
1.61-2.00 (~8.2 × 10 ¹⁷ cfu/ml)	1:0 (~8.2 × 10 ¹⁷ cfu/ml)	9.67/20	48.35 ^a
	1:1 (~4.1 × 10 ¹⁷ cfu/ml)	13.67/20	68.35 ^a
	1:10 (~8.2 × 10 ¹⁶ cfu/ml)	10.00/20	50.00 ^a
	1:20 (~4.1 × 10 ¹⁶ cfu/ml)	9.67/20	48.35 ^a
	1:50 (~1.64 × 10 ¹⁶ cfu/ml)	9.33/20	46.65 ^a
	1:100 (~8.2 × 10 ¹⁵ cfu/ml)	9.67/20	48.35 ^a
<i>F</i> -test		ns	
CV (%)		34.81	

^{1/}ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ โดย 1 ซ้ำใช้ PLBs จำนวน 20 ชิ้น

^{2/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

1.3 การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการ co-cultivation ระหว่าง PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ป้อมปาด้วกับสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

เมื่อทำการ co-cultivation ระหว่าง PLBs ของกล้วยไม้กับสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียด้วยวิธี vortex mixer (Vortex-2 Genie) ที่ความเร็วระดับ 7 เป็นเวลา 10 นาที, 30 นาที และ 60 นาที และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี histochemical assay พบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดสีน้ำเงินของยีน *gus* บน PLBs เท่ากับ 20.00, 53.35 และ 38.35 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 6) ในการทดลองต่อไปได้เลือกใช้ระยะเวลาในการ co-cultivation เป็นเวลา 30 นาที ในการถ่ายเวกเตอร์ pMAT21 โดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 เข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์ เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่พบจำนวน PLBs ติดสีน้ำเงินมากที่สุด

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบระยะเวลาที่ใช้ในการ co-cultivation ระหว่างสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 กับ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์

ระยะเวลาในการ co-cultivation	ผลการแสดงออกของยีน <i>gus</i> ใน PLBs กล้วยไม้	
	ค่าเฉลี่ยจำนวน PLBs ที่ได้รับการถ่ายยีน ต่อจำนวน PLBs ที่ทำการถ่ายยีน ^{1/}	เปอร์เซ็นต์การเกิดสีน้ำเงิน ของ PLBs ที่ได้รับการ ถ่ายยีน ^{2/}
10 นาที	4.00/20	20.00 ^a
30 นาที	10.67/20	53.35 ^a
60 นาที	7.67/20	38.35 ^a
<i>F</i> -test		ns
CV (%)		50.46

^{1/}ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ โดย 1 ซ้ำใช้ PLBs จำนวน 20 ชิ้น

^{2/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

1.4 การทดสอบวิธีในการ co-cultivation ระหว่าง PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์กับสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

จากการทดสอบวิธีการต่าง ๆ ของการ co-cultivation ได้แก่ วิธีผสมสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียกับ PLBs โดยเข้าไปมาเป็นครั้งคราวทุก ๆ 5 นาที เป็นเวลา 30 นาที ใช้เครื่อง vortex mixer (Vortex-2 Genie) ที่ความเร็วระดับ 7 เป็นเวลา 30 นาที และใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็ว 175 รอบต่อนาที ทำการ co-cultivation เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี histochemical assay

เมื่อนำ PLBs ของกล้วยไม้ที่ผ่านการถ่ายยีนมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ภายหลังการถ่ายยีน 7 วัน พบว่าวิธีการ co-cultivation โดยใช้เครื่อง vortex mixer (Vortex-2 Genie) ที่ความเร็วระดับ 7 เป็นเวลา 30 นาที และใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็ว 175 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เป็นวิธีที่พบ PLBs ที่ติดสีน้ำเงินมากที่สุด คือ 65 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สำหรับวิธีการ co-cultivation โดยการเขย่าไปมาเป็นครั้งคราวทุก ๆ 5 นาที เป็นเวลา 30 นาที พบ PLBs ที่ติดสีน้ำเงินต่ำสุด คือ 31.65 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7) ดังนั้นวิธีการที่เหมาะสมในการทำ co-cultivation คือ วิธีผสมสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียกับ PLBs โดยใช้เครื่อง vortex mixer (Vortex-2 Genie) ที่ความเร็วระดับ 7 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากเป็นวิธีการที่พบจำนวน PLBs ที่ติดสีน้ำเงินมากที่สุด

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบวิธีการ co-cultivation ของสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 กับ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์

วิธี co-cultivation	ผลการแสดงออกของยีน <i>gus</i> ใน PLBs กล้วยไม้	
	ค่าเฉลี่ยจำนวน PLBs ที่ได้รับการถ่ายยีนต่อจำนวน PLBs ที่ทำการถ่ายยีน ^{1/}	เปอร์เซ็นต์การเกิดสีน้ำเงินของ PLBs ที่ได้รับการถ่ายยีน ^{2/}
เขย่าไปมาเป็นครั้งคราวทุก ๆ 5 นาที เป็นเวลา 30 นาที	6.33/20	31.65 ^b
ใช้เครื่อง vortex mixer ที่ความเร็วระดับ 7 เป็นเวลา 30 นาที	13.00/20	65.00 ^a
ใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็ว 175 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที	12.00/20	60.00 ^a
<i>F</i> -test		*
CV (%)		24.62

^{1/} ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ โดย 1 ซ้ำใช้ PLBs จำนวน 20 ชิ้น

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

* แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

1.5 การทดสอบการเติมสาร celite ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้ด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

จากการทำ co-cultivation ของ PLBs กล้วยไม้กับสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย โดยใช้เครื่อง vortex mixer ที่ความเร็วระดับ 7 เป็นเวลา 30 นาที เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีน และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนให้ดียิ่งขึ้น จึงนำสาร celite ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดบาดแผลมาช่วยในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs กล้วยไม้ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองเติมสาร celite ปริมาณ 2.5 กรัมต่อลิตร ลงในสารแขวนลอยเชื้อในช่วงการ co-cultivation ที่ระยะเวลานาน 10, 30, และ 60 นาที ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการไม่เติมสาร celite และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี histochemical assay

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ใน PLBs กล้วยไม้ที่ผ่านการถ่ายยีนในสภาวะที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นเป็นเวลา 7 วัน พบว่าการเติมสาร celite ปริมาณ 2.5 กรัมต่อลิตร ลงในสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียในช่วงการ co-cultivation ที่ระยะเวลานาน 10, 30 และ 60 นาที ตรวจพบ PLBs ที่ติดสีน้ำเงินเท่ากับ 33.35, 65.00 และ 51.65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าในการทดลองที่ไม่เติมสาร celite โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 8 และภาพที่ 12) ดังนั้นการเติมสาร celite ลงในสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียในช่วงการทำ co-cultivation ปริมาณ 2.5 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลานาน 30 นาที สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้พันธุ์ป้อมปาด้ว ในการทดลองขั้นต่อไปจึงทำการทดสอบปริมาณของสาร celite ในปริมาณต่าง ๆ ดังนี้ 0, 0.5, 2.5, 4.5, 6.5, 8.5 และ 10.5 กรัมต่อลิตร ที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้ด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

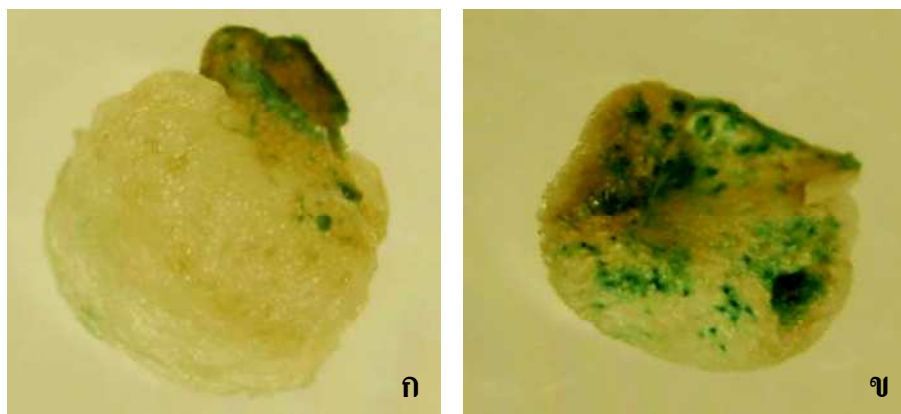
ตารางที่ 8 ผลของการเติมสาร celite ในสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียในการ co-cultivation กับ PLBs ของกล้วยไม้ต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์

ระยะเวลาในการ co-cultivation (นาที่)	การเติม สาร celite	ผลการแสดงออกของยีน <i>gus</i> ใน PLBs กล้วยไม้	
		ค่าเฉลี่ยของจำนวน PLBs ที่ได้รับการถ่ายยีนต่อจำนวน PLBs ที่ทำการถ่ายยีน ^{1/}	เปอร์เซ็นต์การเกิดสีน้ำ เงินของ PLBs ที่ได้รับการ ถ่ายยีน ^{2/}
10	ไม่เติม	5.67/20	28.35 ^c
	เติม	6.67/20	33.35 ^c
30	ไม่เติม	6.00/20	30.00 ^c
	เติม	13.00/20	65.00 ^a
60	ไม่เติม	8.33/20	41.65 ^{bc}
	เติม	10.33/20	51.65 ^{ab}
<i>F</i> -test			*
CV (%)			18.46

^{1/}ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ โดย 1 ซ้ำใช้ PLBs จำนวน 20 ชิ้น

^{2/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

* แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์



ภาพที่ 12 การติดสีน้ำเงินของ PLBs กล้วยไม้ที่ทำการถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียโดยเติมสาร celite ปริมาณ 2.5 กรัม ในระหว่างการ co-cultivation

ก) ไม่มีการเติมสาร celite

ข) มีการเติมสาร celite

1.6 การทดสอบปริมาณของสาร celite ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้

จากการทดสอบปริมาณของสาร celite ปริมาณต่าง ๆ ดังนี้ 0, 0.5, 2.5, 4.5, 6.5, 8.5 และ 10.5 กรัมต่อลิตร ในระหว่างการ co-cultivation โดยใช้เครื่อง vortex mixer (Vortex-2 Genie) ที่ความเร็วระดับ 7 เป็นเวลา 30 นาที และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี histochemical assay พบว่าการเติมสาร celite ปริมาณ 0, 0.5, 2.5, 4.5, 6.5, 8.5 และ 10.5 กรัมต่อลิตร ในสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียในช่วงการ co-cultivation เป็นเวลา 30 นาที มีเปอร์เซ็นต์การติดสีน้ำเงินบน PLBs เท่ากับ 60.00, 65.00, 66.65, 85.00, 81.65, 75 และ 78.50 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) และพบว่า PLBs ที่ได้รับการถ่ายยีนติดจุดสีน้ำเงินในระดับความเข้มที่แตกต่างกัน โดยพบว่าการเติมสาร celite ปริมาณ 4.5 กรัมต่อลิตร PLBs ติดสีน้ำเงินเข้มมากกว่าการเติมสาร celite ที่ปริมาณอื่น ๆ (ตารางที่ 9 และภาพที่ 13)

ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปได้เลือกเติมสาร celite ปริมาณ 4.5 กรัมต่อลิตร ลงในสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียช่วงในการ co-cultivation เนื่องจากช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้พันธุ์ป้อมปาตัวรีได้ดีที่สุดและทำให้ PLBs มีการติดสีน้ำเงินในปริมาณที่เข้มมากขึ้น

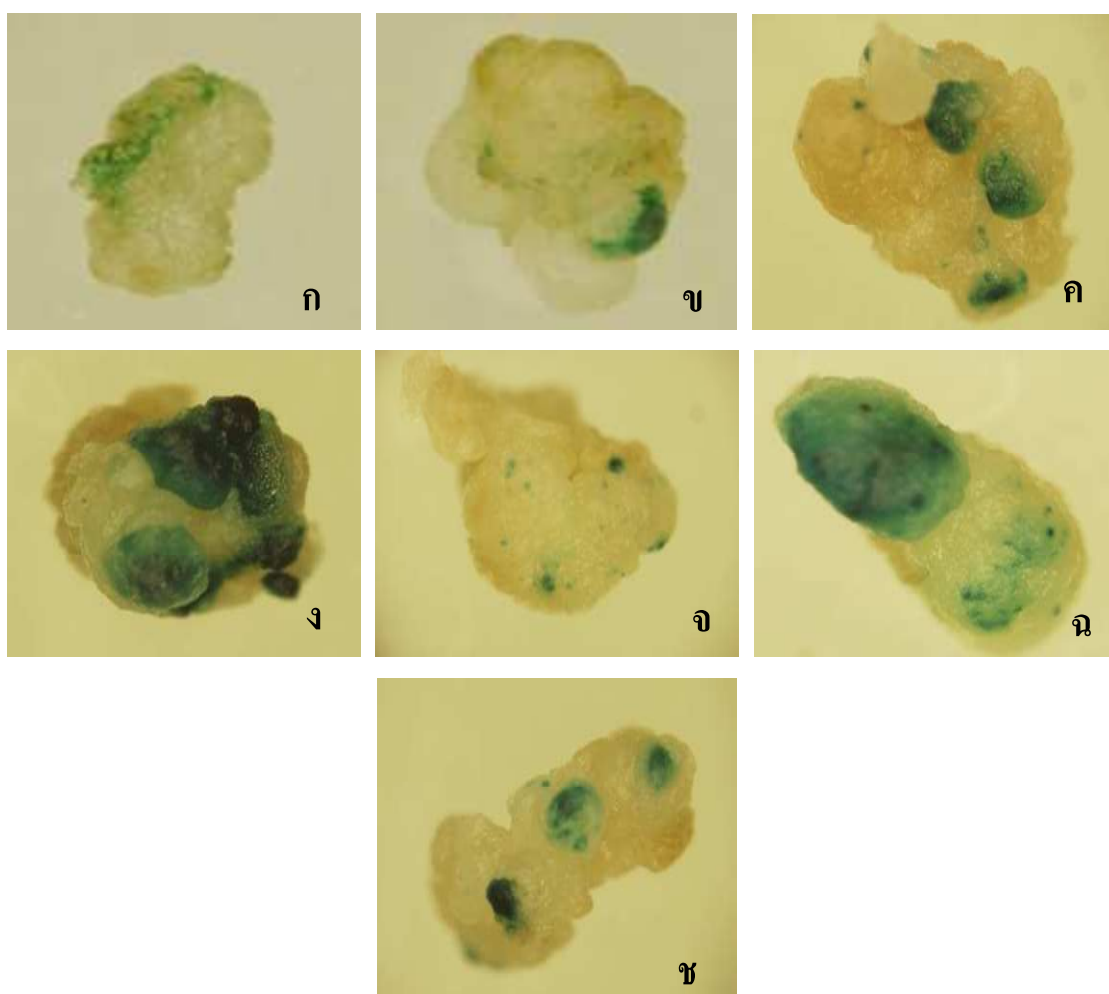
ตารางที่ 9 ผลการทดสอบการเติมสาร celite ปริมาณต่าง ๆ ในสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย
ในการ co-cultivation

ปริมาณของ สาร celite (กรัมต่อลิตร)	ผลการแสดงออกของยีน <i>gus</i> ใน PLBs ของกล้วยไม้	
	ค่าเฉลี่ยของจำนวน PLBs ที่ได้รับการถ่าย ยีนต่อจำนวน PLBs ที่ทำการถ่ายยีน ^{1/}	เปอร์เซ็นต์การเกิดสีน้ำเงินของ PLBs ที่ได้รับการถ่ายยีน ^{2/}
0	12.00/20	60.00 ^a
0.5	13.33/20	65.00 ^a
2.5	14.33/20	66.67 ^a
4.5	17.00/20	85.00 ^a
6.5	16.33/20	81.65 ^a
8.5	15.00/20	75.00 ^a
10.5	15.67/20	78.35 ^a
<i>F</i> -test		ns
CV (%)		5.52

^{1/}ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ โดย 1 ซ้ำใช้ PLBs จำนวน 20 ชิ้น

^{2/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95
เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



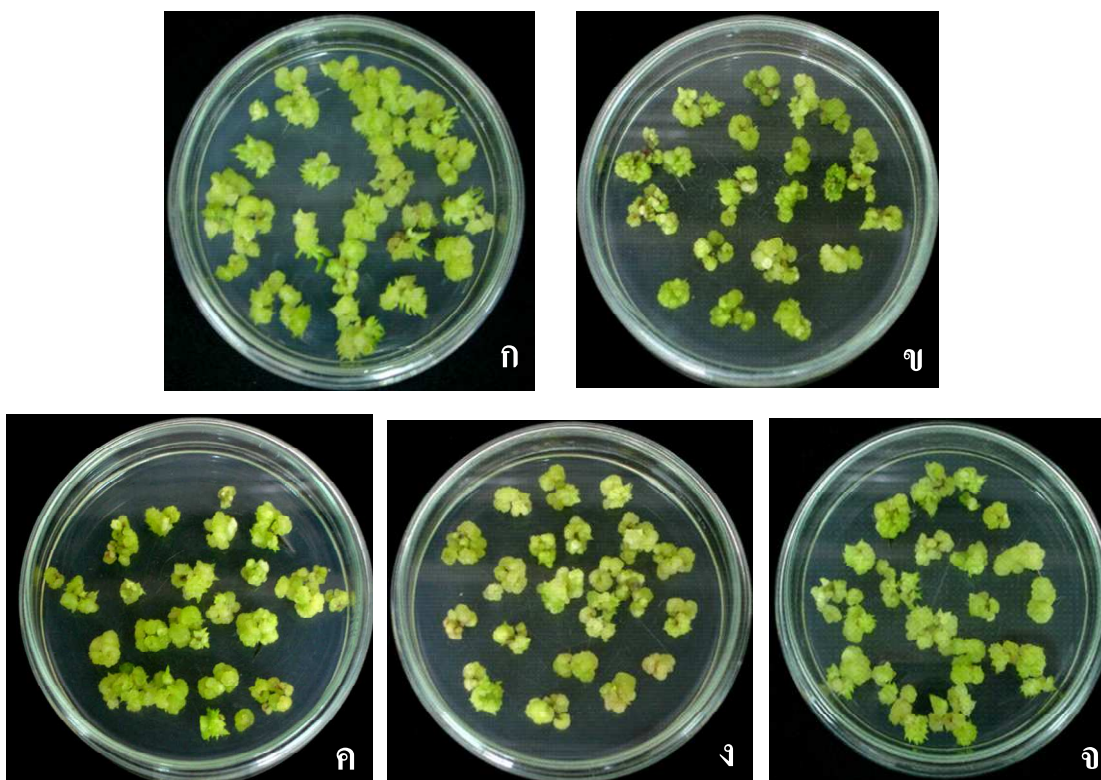
ภาพที่ 13 ลักษณะการติดสีน้ำเงินที่เกิดจากการแสดงออกของยีน *gus* ในเนื้อเยื่อกล้วยไม้ PLBs ที่
 เติบโตบน celite ในปริมาณต่าง ๆ ในช่วงของการทำ co-cultivation
 ก. ไม่เติมสาร celite ในช่วงการทำ co-cultivation
 ข. เติบโตบน celite ในปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร
 ค. เติบโตบน celite ในปริมาณ 2.5 กรัมต่อลิตร
 ง. เติบโตบน celite ในปริมาณ 4.5 กรัมต่อลิตร
 จ. เติบโตบน celite ในปริมาณ 6.5 กรัมต่อลิตร
 ฉ. เติบโตบน celite ในปริมาณ 8.5 กรัมต่อลิตร
 ช. เติบโตบน celite ในปริมาณ 10.5 กรัมต่อลิตร

1.7 การทดสอบผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime และระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการเจริญเติบโตของ PLBs กล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์

1.7.1 การทดสอบผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการเจริญเติบโตของ PLBs กล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์

ตัด PLBs กล้วยไม้หนาประมาณ 2 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว (ตารางภาคผนวกที่ 1) เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ PLBs จำนวน 20 ชิ้น ในแต่ละความเข้มข้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจสอบผลโดยการนับจำนวน PLBs ที่เจริญได้ภายหลังการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า เนื้อเยื่อกล้วยไม้สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime ทุกระดับความเข้มข้น เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ โดยเนื้อเยื่อกล้วยไม้มีขนาด และปริมาณเพิ่มมากขึ้น กลุ่มของเนื้อเยื่อมีสีเขียว และสามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ตามปกติ (ภาพที่ 14)

ดังนั้นการเพาะเลี้ยง PLBs ของกล้วยไม้สายพันธุ์ปอมปาดัวร์ โดยการเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้น 100 – 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตไปเป็นยอดของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ ดังนั้นในการถ่ายยีนจึงสามารถเลือกใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ในการกำจัดเชื้ออะโกราแบคทีเรียภายหลังการถ่ายยีนได้



ภาพที่ 14 ลักษณะการเจริญของ PLBs ของกล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าวและเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ก. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ. ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.7.2 การทดสอบระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียออกจาก PLBs ของกล้วยไม้หลังจากการถ่ายยีน

นำ PLBs ของกล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ซึ่งบรรจุเวกเตอร์ pMAT21 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว และเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพื่อกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียภายหลังการถ่ายยีน โดยเมื่อนำ PLBs ที่ผ่านการถ่ายยีนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว และไม่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime พบว่า PLBs ทุกชิ้นที่ทดสอบมีเชื้ออะโกรแบคทีเรียมีสีขาวขุ่นเจริญปกคลุมขึ้นพืชและบนอาหาร ภายหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ภาพที่ 15) ส่วน PLBs ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว และเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้ออะโกรแบคทีเรียบน PLBs ของกล้วยไม้ 31.65 และ 26.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว และเติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้น 200, 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย เมื่อเพาะเลี้ยงจนครบเวลา 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 10 และภาพที่ 15)

ดังนั้นในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้จึงเลือกใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ระดับความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมลงในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ เพื่อกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียภายหลังการถ่ายยีน โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ PLBs ของกล้วยไม้

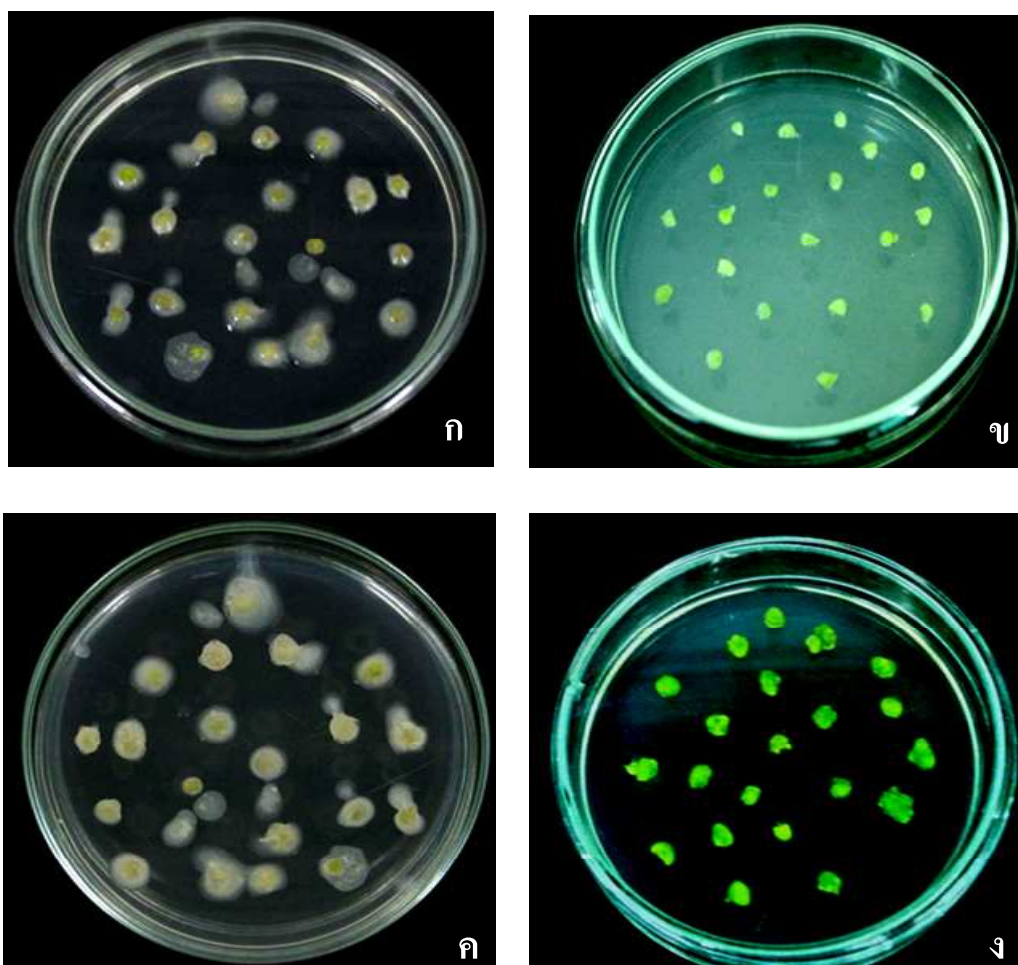
ตารางที่ 10 ผลการทดสอบระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่สามารถกำจัดเชื้อ
อะโกราแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ออกจาก PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอม
ปาดัวร์ภายหลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ระดับความเข้มข้นของสาร ปฏิชีวนะ cefotaxime (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ยของจำนวน PLBs ที่ ปนเปื้อนเชื้ออะโกราแบคทีเรีย ต่อจำนวน PLBs ที่ทดสอบ ^{1/}	เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของ เชื้ออะโกราแบคทีเรีย ^{2/}
0	20.00/20	100.00 ^a
50	6.33/20	31.65 ^b
100	5.33/20	26.65 ^b
200	0.00/20	0.00 ^c
300	0.00/20	0.00 ^c
400	0.00/20	0.00 ^c
<i>F</i> -test		*
CV (%)		5.90

^{1/}ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ โดย 1 ซ้ำใช้ PLBs จำนวน 20 ชิ้น

^{2/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์
เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

* แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 15 ลักษณะของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ภายหลังการถ่ายยีน เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว

- ก. ไม่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ลงในอาหาร และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์
- ข. เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารและเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์
- ค. ไม่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ลงในอาหาร และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์
- ง. เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารและเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

2. การโคลนยีน AS-ACS และ AS-ACO เข้าสู่เวกเตอร์ pMAT21

จากการเพิ่มปริมาณชุดยีน AS-ACSA, AS-ACSB และ AS-ACSC และชุด AS-ACOA, AS-ACOB และ AS-ACOC จากเวกเตอร์ pCAMBIA1304-AS-ACSA, pCAMBIA1304-AS-ACSB, pCAMBIA1304-AS-ACSC, pCAMBIA1304-AS-ACOA, pCAMBIA1304-AS-ACOB และ pCAMBIA1304-AS-ACOC ที่ประกอบด้วย 35S-promoter ยีน ACS หรือ ACO ส่วน A, B และ C และ NOS-terminator ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-SmaI และ NOST-SmaI สามารถเพิ่มปริมาณชุดยีนได้ดังนี้ ชุดยีน AS-ACSA มีขนาด 1,697 คู่เบส ชุดยีน AS-ACSB มีขนาด 1,261 คู่เบส ชุดยีน AS-ACSC มีขนาด 1,663 คู่เบส ชุดยีน AS-ACOA มีขนาด 1,426 คู่เบส ชุดยีน AS-ACOB มีขนาด 1,125 คู่เบส และชุดยีน AS-ACOC มีขนาด 1,435 คู่เบสตามลำดับ (ภาพที่ 16 และ ตารางที่ 11)

ย้ายชุดยีนดังกล่าวเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และตรวจสอบทิศทางของชุดยีนที่อยู่ในเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy โดยใช้เอนไซม์ *SpeI* ผลการตรวจสอบพบว่า ชุดยีน AS-ACSA พบแถบดีเอ็นเอขนาด 4,110 และ 602 คู่เบส ยีน AS-ACSB พบแถบดีเอ็นเอขนาด 3,674 และ 602 คู่เบส ยีน AS-ACSC พบแถบดีเอ็นเอขนาด 3,489 และ 1,189 คู่เบส ยีน AS-ACOA พบแถบดีเอ็นเอขนาด 3,839 และ 602 คู่เบส ยีน AS-ACOB พบแถบดีเอ็นเอขนาด 3,489 และ 651 คู่เบส และยีน AS-ACOC พบแถบดีเอ็นเอขนาด 3,839 และ 602 คู่เบส (ภาพที่ 17, ภาพที่ 18 และ ตารางที่ 11) ซึ่งเป็นขนาดที่ถูกต้องสำหรับแต่ละชุดยีน

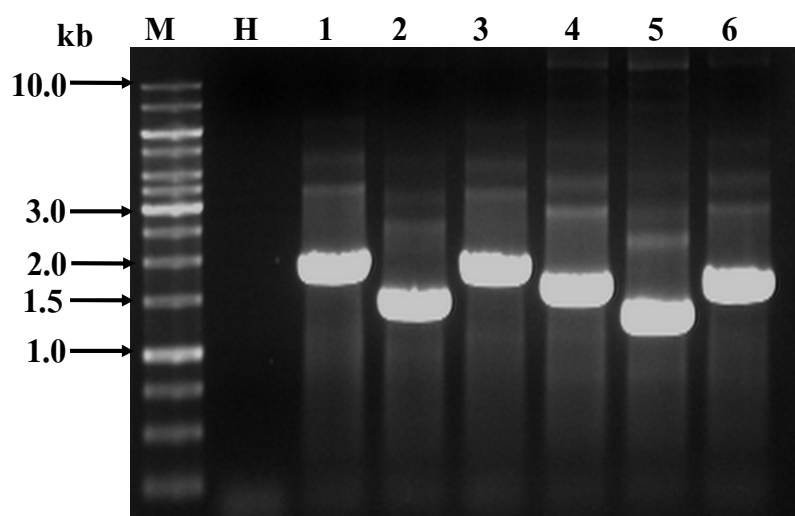
จากนั้นทำการย้ายชุดยีน AS-ACS หรือ AS-ACO ส่วน A, B และ C จากเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy โดยย่อยด้วยเอนไซม์ *SmaI* ผลการตรวจสอบพบว่าชุดยีน AS-ACSA พบแถบดีเอ็นเอขนาด 3,015 และ 1,697 คู่เบส ส่วนยีน AS-ACSB พบแถบดีเอ็นเอขนาด 3,015 และ 1,261 คู่เบส ยีน AS-ACSC พบแถบดีเอ็นเอขนาด 3,015 และ 1,663 คู่เบส ยีน AS-ACOA พบแถบดีเอ็นเอขนาด 3,015 และ 1,426 คู่เบส ยีน AS-ACOB พบแถบดีเอ็นเอขนาด 3,015 และ 1,125 คู่เบส และยีน AS-ACOC พบแถบดีเอ็นเอขนาด 3,015 และ 1,435 คู่เบส (ภาพที่ 17, ภาพที่ 19 และ ตารางที่ 11) ซึ่งเป็นขนาดที่ถูกต้องสำหรับแต่ละชุดยีน

นำชุดยีนดังกล่าวเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pMAT21 ที่ตำแหน่ง *SmaI* ในบริเวณ multi-cloning site (ภาพที่ 7) ได้ชุดยีน pMAT21-AS-ACS หรือ AS-ACO ส่วน A, B และ C (ภาพที่ 20ก) จากนั้นทำการถ่ายชุดยีนที่ได้เข้าสู่เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ซึ่งตรวจสอบการมีอยู่ของ

ชุดยีน pMAT21-AS-ACS หรือ AS-ACO ส่วน A, B และ C ในเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เตรียมโดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-*Sma*I กับ NOST-*Sma*I (ภาพที่ 20ก) ตรวจพบชุดยีน AS-ACSA มีขนาด 1,697 คู่เบส ชุดยีน AS-ACSB มีขนาด 1,261 คู่เบส ชุดยีน AS-ACSC มีขนาด 1,663 คู่เบส ชุดยีน AS-ACOA มีขนาด 1,426 คู่เบส ชุดยีน AS-ACOB มีขนาด 1,125 คู่เบส และชุดยีน AS-ACOC มีขนาด 1,435 คู่เบสตามลำดับ (ภาพที่ 20ข และตารางที่ 11) ซึ่งเป็นขนาดของ 35S promoter, AS-ACS หรือ AS-ACO ส่วน A, B และ C, และ NOS-poly A ในทุก construct ดังภาพที่ 20ก และตารางที่ 11 จากนั้นใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียดังกล่าวในการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ต่อไป

ตารางที่ 11 ชุดยีน AS-ACS และยีน AS-ACO ในเวกเตอร์ pCAMBIA1304, pGEM®-T Easy และ pMAT21 ที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่สเต็มเซลล์พืช
พันธุ์ปอมน้ำดำ

ยีน AS-ACS และ AS-ACO ที่บรรจุในเวกเตอร์ pGEM®-T Easy					
ชุดยีน	ขนาด	เอนไซม์ SpeI	เอนไซม์ SmaI	ชุดยีน	ขนาด
	ของ PCR			pMAT21-AS-ACS	ของ
	Product (คู่เบส)	ชุดยีน	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (คู่เบส)	หรือ pMAT21-AS-ACOC	Product (คู่เบส)
ยีน AS-ACS					
pCAMBIA1304-AS-ACS4	1,697	pGEM®-T Easy-AS-ACS4	4,110 และ 602	pMAT21-AS-ACS4	1,697
pCAMBIA1304-AS-ACSB	1,261	pGEM®-T Easy-AS-ACSB	3,674 และ 602	pMAT21-AS-ACSB	1,261
pCAMBIA1304-AS-ACSC	1,663	pGEM®-T Easy-AS-ACSC	3,489 และ 1,189	pMAT21-AS-ACSC	1,663
ยีน AS-ACO					
pCAMBIA1304-AS-ACOA	1,426	pGEM®-T Easy-AS-ACOA	3,839 และ 602	pMAT21-AS-ACOA	1,426
pCAMBIA1304-AS-ACOB	1,125	pGEM®-T Easy-AS-ACOB	3,261 และ 651	pMAT21-AS-ACOB	1,125
pCAMBIA1304-AS-ACOC	1,435	pGEM®-T Easy-AS-ACOC	3,839 และ 602	pMAT21-AS-ACOC	1,435



ภาพที่ 16 การตรวจวิเคราะห์ชุดยีน *AS-ACS* และ ยีน *AS-ACO* ส่วน A, B และ C ที่เพิ่มปริมาณได้ จากในเวกเตอร์ *pCAMBIA1304-AS-ACSA*, *pCAMBIA1304-AS-ACSB*, *pCAMBIA1304-AS-ACSC*, *pCAMBIA1304-AS-ACOA*, *pCAMBIA1304-AS-ACOB* และ *pCAMBIA1304-AS-ACOC* ตามลำดับ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-*SmaI* และ NOST-*SmaI*

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder-DNA marker; Fermentas, Lithuania)

H : น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ใช้เป็น negative control

1 : PCR product ขนาด 1,697 คู่เบส จาก *pCAMBIA1304-AS-ACSA*

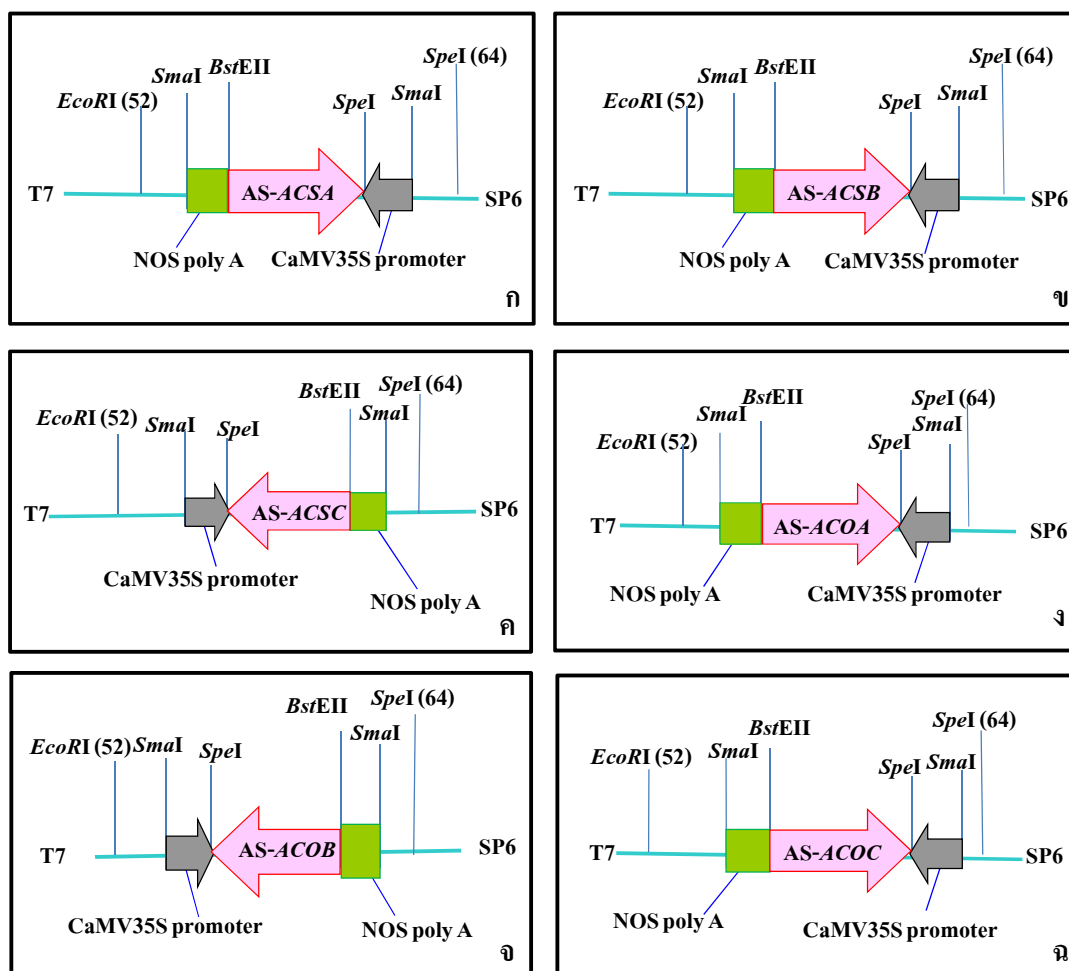
2 : PCR product ขนาด 1,261 คู่เบส จาก *pCAMBIA1304-AS-ACSB*

3 : PCR product ขนาด 1,663 คู่เบส จาก *pCAMBIA1304-AS-ACSC*

4 : PCR product ขนาด 1,426 คู่เบส จาก *pCAMBIA1304-AS-ACOA*

5 : PCR product ขนาด 1,125 คู่เบส จาก *pCAMBIA1304-AS-ACOB*

6 : PCR product ขนาด 1,435 คู่เบส จาก *pCAMBIA1304-AS-ACOC*



ภาพที่ 17 แผนที่ของยีน AS-ACSA, AS-ACSB, AS-ACSC, AS-ACOA, AS-ACOB และ AS-ACOC ที่บรรจุอยู่ในเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy

ก. pGEM[®]-T Easy-AS-ACSA

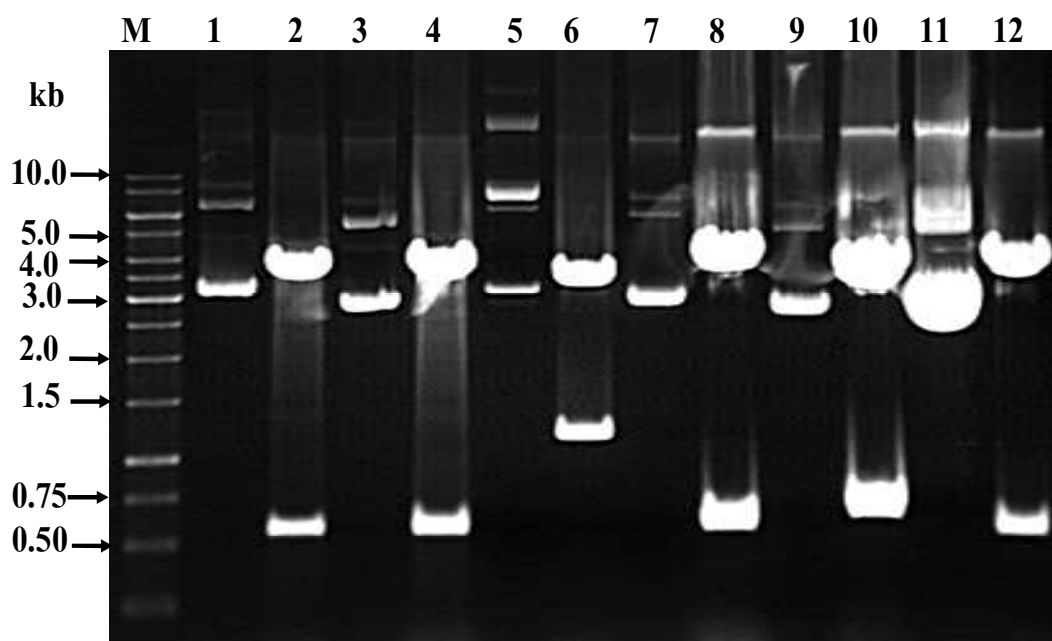
ข. pGEM[®]-T Easy-AS-ACSB

ค. pGEM[®]-T Easy-AS-ACSC

ง. pGEM[®]-T Easy-AS-ACOA

จ. pGEM[®]-T Easy-AS-ACOB

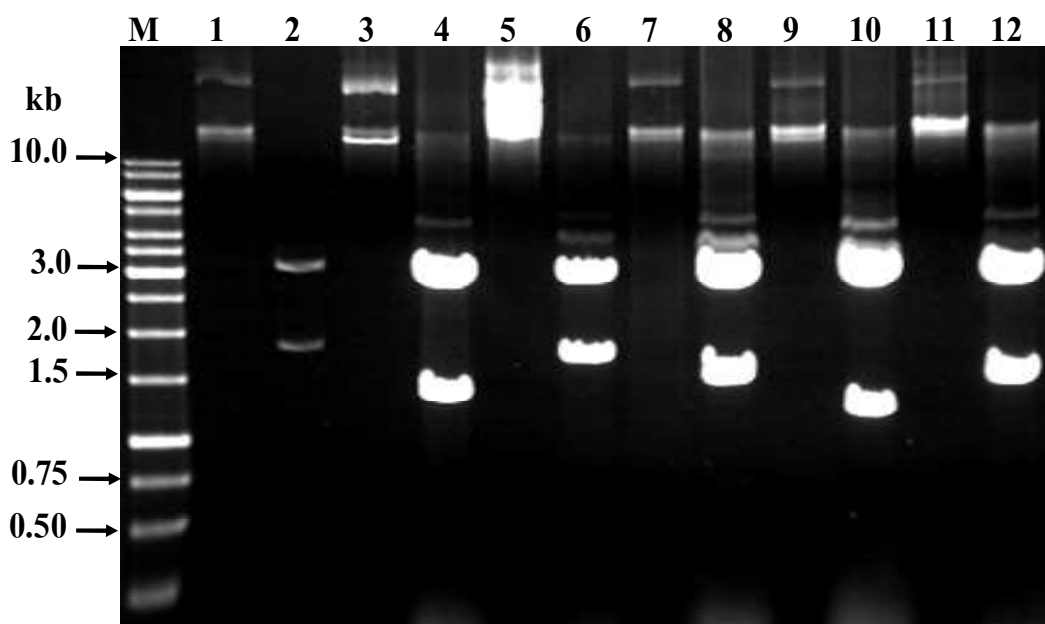
ฉ. pGEM[®]-T Easy-AS-ACOC



ภาพที่ 18 การตรวจวิเคราะห์ชุดยีน AS-ACS และ ยีน AS-ACO ส่วน A, B และ C ที่อยู่ในเวกเตอร์

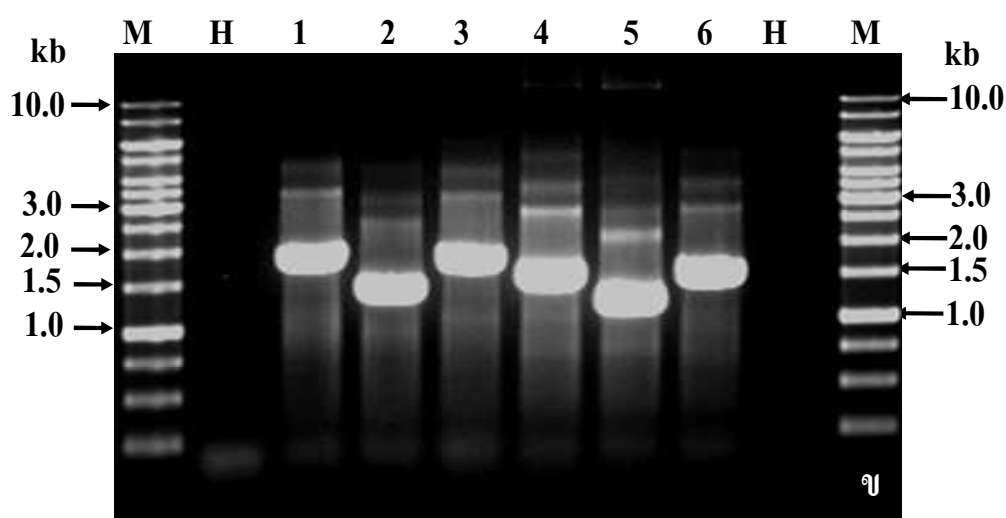
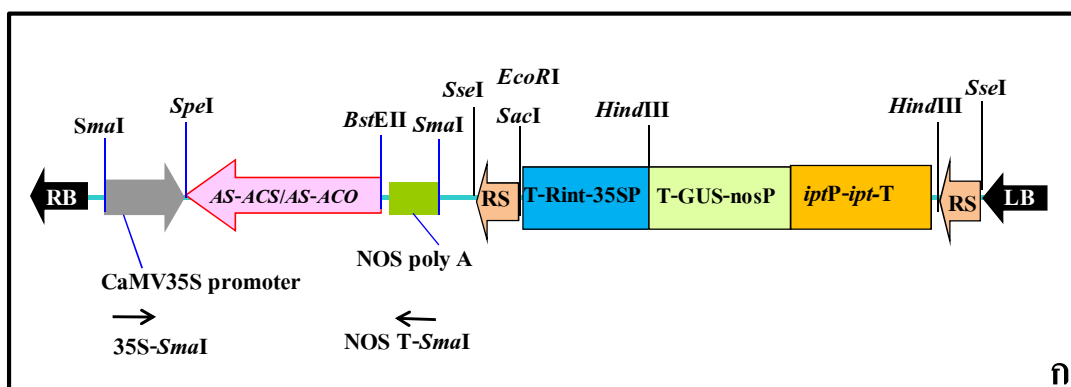
pGEM[®]-T Easy ตรวจสอบโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI*

- M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder-DNA marker; Fermentas, Lithuania)
- 1 : ดีเอ็นเอของ pGEM[®]-T Easy -AS-ACSA ที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
- 2 : ดีเอ็นเอของ pGEM[®]-T Easy -AS-ACSA ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI*
- 3 : ดีเอ็นเอของ pGEM[®]-T Easy -AS-ACSB ที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
- 4 : ดีเอ็นเอของ pGEM[®]-T Easy -AS-ACSB ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI*
- 5 : ดีเอ็นเอของ pGEM[®]-T Easy -AS-ACSC ที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
- 6 : ดีเอ็นเอของ pGEM[®]-T Easy -AS-ACSC ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI*
- 7 : ดีเอ็นเอของ pGEM[®]-T Easy -AS-ACOA ที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
- 8 : ดีเอ็นเอของ pGEM[®]-T Easy -AS-ACOA ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI*
- 9 : ดีเอ็นเอของ pGEM[®]-T Easy -AS-ACOB ที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
- 10 : ดีเอ็นเอของ pGEM[®]-T Easy -AS-ACOB ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI*
- 11 : ดีเอ็นเอของ pGEM[®]-T Easy -AS-ACOC ที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
- 12 : ดีเอ็นเอของ pGEM[®]-T Easy -AS-ACOC ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI*



ภาพที่ 19 การตรวจวิเคราะห์ชุดยีน AS-ACS และ ยีน AS-ACO ส่วน A, B และ C ที่อยู่ในเวกเตอร์ pGEM®-T Easy ตรวจสอบโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I

- M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder-DNA marker; Fermentas, Lithuania)
- 1 : ดีเอ็นเอของ pGEM®-T Easy -AS-ACSA ที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
- 2 : ดีเอ็นเอของ pGEM®-T Easy -AS-ACSA ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I
- 3 : ดีเอ็นเอของ pGEM®-T Easy -AS-ACSB ที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
- 4 : ดีเอ็นเอของ pGEM®-T Easy -AS-ACSB ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I
- 5 : ดีเอ็นเอของ pGEM®-T Easy -AS-ACSC ที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
- 6 : ดีเอ็นเอของ pGEM®-T Easy -AS-ACSC ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I
- 7 : ดีเอ็นเอของ pGEM®-T Easy -AS-ACOA ที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
- 8 : ดีเอ็นเอของ pGEM®-T Easy -AS-ACOA ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I
- 9 : ดีเอ็นเอของ pGEM®-T Easy -AS-ACOB ที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
- 10 : ดีเอ็นเอของ pGEM®-T Easy -AS-ACOB ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I
- 11 : ดีเอ็นเอของ pGEM®-T Easy -AS-ACOC ที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์
- 12 : ดีเอ็นเอของ pGEM®-T Easy -AS-ACOC ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I



ภาพที่ 20 แผนที่ของยีน *AS-ACS* และ *AS-ACO* ที่บรรจุในเวกเตอร์ pMAT21 (ก) และการตรวจวิเคราะห์ชุดยีน *AS-ACS* และยีน *AS-ACO* ส่วน A, B และ C ที่อยู่ในเวกเตอร์ pMAT21 ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-*SmaI* และ NOST-*SmaI* (ข)

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder-DNA marker; Fermentas, Lithuania)

H : น้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ ใช้เป็น negative control

1 : PCR product ขนาดประมาณ 1,697 คู่เบส จาก pMAT21-*AS-ACSA*

2 : PCR product ขนาดประมาณ 1,261 คู่เบส จาก pMAT21-*AS-ACSB*

3 : PCR product ขนาดประมาณ 1,663 คู่เบส จาก pMAT21-*AS-ACSC*

4 : PCR product ขนาดประมาณ 1,426 คู่เบส จาก pMAT21-*AS-ACOA*

5 : PCR product ขนาดประมาณ 1,125 คู่เบส จาก pMAT21-*AS-ACOB*

6 : PCR product ขนาดประมาณ 1,435 คู่เบส จาก pMAT21-*AS-ACOC*

3. การตรวจสอบยีน AS-ACS หรือ AS-ACO และยีน *ipt* ซึ่งเป็นยีนคัดเลือกในกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมในระยะยอดกระจุก

จากการถ่ายยีน pMAT21-AS-ACS และ pMAT21-AS-ACO ที่มียีน AS-ACS และ AS-ACO ส่วน A, B และ C เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย พบว่า ภายหลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 2 เดือน เนื้อเยื่อเริ่มพัฒนาเป็นกลุ่มแคลลัสสีเขียว และพัฒนาต่อไปเป็นยอดกระจุก เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว นานประมาณ 4-6 เดือน (ภาพที่ 21 และภาพที่ 22) ลักษณะของยอดกระจุกที่สังเกตได้มี 2 แบบ คือ ยอดกระจุกแบบที่เกาะตัวกันอย่างหนาแน่น และแบบเกาะตัวกันหลวม ๆ จากนั้นนำยอดกระจุกที่เกาะตัวกันอย่างหนาแน่นมาตรวจวิเคราะห์หา ยีน AS-ACS, AS-ACO และยีน *ipt* โดยเทคนิค PCR และ Southern blot hybridization of PCR products

ผลการตรวจสอบยีน AS-ACSA, AS-ACSB, AS-ACSC, AS-ACOA, AS-ACOB, AS-ACOC และยีน *ipt* ในกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมในระยะยอดกระจุกด้วยเทคนิค PCR และทำการยืนยันผลด้วย Southern blot hybridization of PCR products โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-SmaI และ AS-ACS1BstEII, 35S-SmaI และ AS-ACS400BstEII, 35S-SmaI และ AS-ACS400BstEII, 35S-SmaI และ ACO1R-B1, 35S-SmaI และ ACO301R-B2, 35S-SmaI และ ACO301R-B2, IPT1 และ IPT2 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

กล้วยไม้ที่มียีน AS-ACSA ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,440 คู่เบส (ภาพที่ 23ก และ 23ข) และยีน *ipt* ขนาด 800 คู่เบส (ภาพที่ 23ค และ 23ง) จำนวน 8 ต้น จากจำนวนยอดกระจุกทั้งหมด 300 กระจุก ซึ่งมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนคิดเป็น 2.66 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12)

กล้วยไม้ที่มียีน AS-ACSB ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,008 คู่เบส (ภาพที่ 24ก และ 24ข) และยีน *ipt* ขนาด 800 คู่เบส (ภาพที่ 24ค และ 24ง) จำนวน 124 ต้น จากจำนวนยอดกระจุกทั้งหมด 281 กระจุก ซึ่งมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนคิดเป็น 44.12 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12)

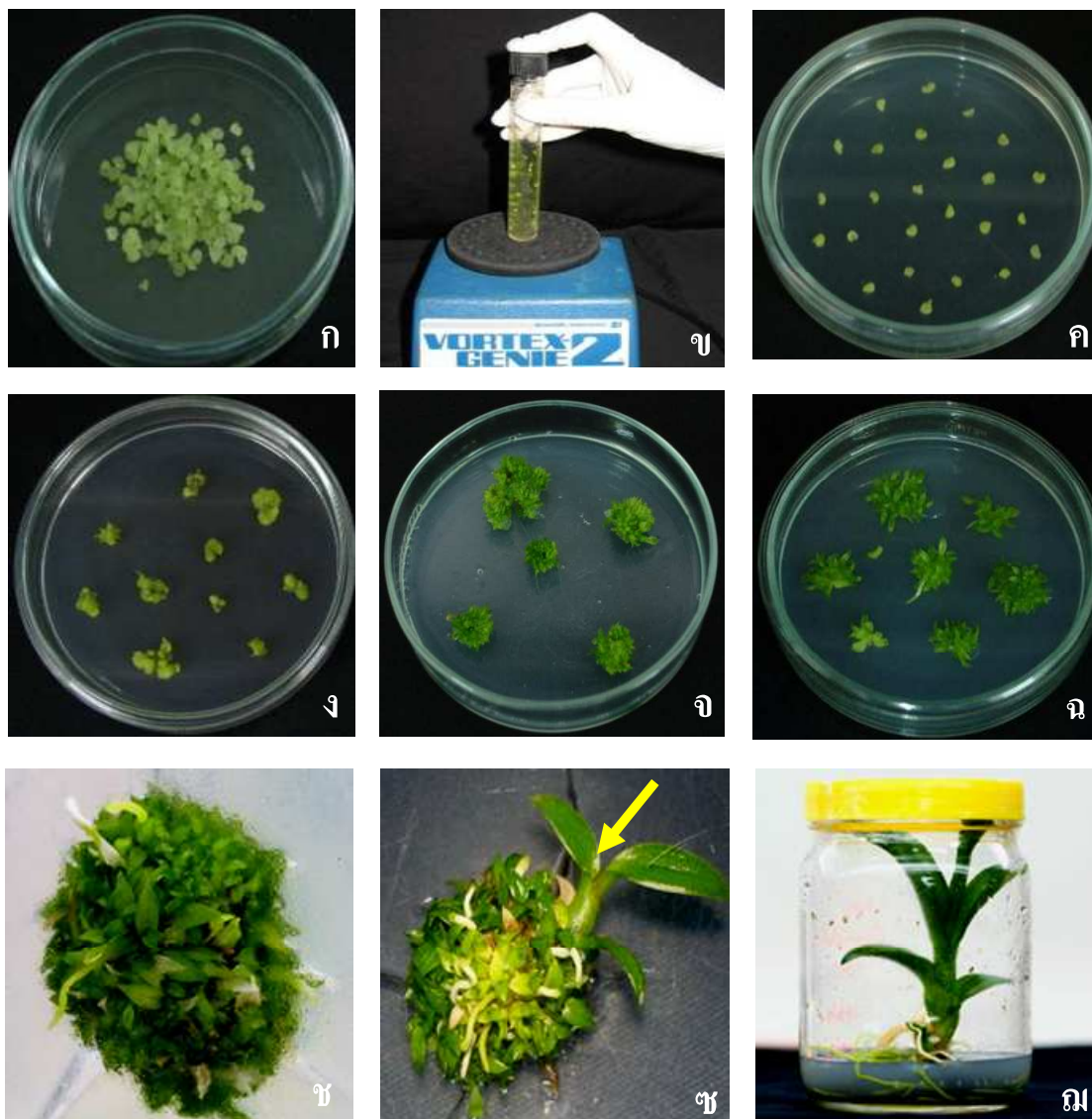
กล้วยไม้ที่มียีน AS-ACSC ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,410 คู่เบส (ภาพที่ 25ก และ 25ข) และยีน *ipt* ขนาด 800 คู่เบส (ภาพที่ 25ค และ 25ง) จำนวน 76 ต้น จากจำนวนยอดกระจุกทั้งหมด 300 กระจุก ซึ่งมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนคิดเป็น 25.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12)

กล้วยไม้ที่มียีน AS-*ACO4* ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,173 คู่เบส (ภาพที่ 26ก และ 26ข) และยีน *ipt* ขนาด 800 คู่เบส (ภาพที่ 26ค และ 26ง) จำนวน 219 ดัน จากจำนวนยอดกระจุกทั้งหมด 540 กระจุก ซึ่งมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนคิดเป็น 40.55 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12)

กล้วยไม้ที่มียีน AS-*ACOB* ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 872 คู่เบส (ภาพที่ 27ก และ 27ข) และยีน *ipt* ขนาด 800 คู่เบส (ภาพที่ 27ค และ 28ง) จำนวน 240 ดัน จากจำนวนยอดกระจุกทั้งหมด 404 กระจุก ซึ่งมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนคิดเป็น 59.40 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12)

และกล้วยไม้ที่มียีน AS-*ACOC* ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,182 คู่เบส (ภาพที่ 28ก และ 28ข) และยีน *ipt* ขนาด 800 คู่เบส (ภาพที่ 28ค และ 28ง) จำนวน 169 ดัน จากจำนวนยอดกระจุกทั้งหมด 457 กระจุก ซึ่งมีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนคิดเป็น 36.98 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12) ส่วน ดันที่ได้ทำการถ่ายยีนที่ไม่มียีนและดันที่ไม่ได้ถ่ายยีนจะตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าว

การตรวจสอบการมีอยู่ของชุดยีน AS-*ACS* หรือ AS-*ACO* และยีน *ipt* นั้น เป็นการตรวจสอบยีนเบื้องต้น ในเนื้อเยื่อที่พัฒนาเป็นยอดกระจุก นำยอดกระจุกที่ให้ผลบวกจากการ ตรวจสอบด้วยวิธี PCR และ Southern blot hybridization of PCR products (ตารางที่ 12) มา เพาะเลี้ยงให้พัฒนาให้เป็นดันที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 21 และ 22) และนำไปตรวจสอบยีน AS-*ACS*, AS-*ACO* และยีน *ipt* ด้วยวิธี PCR และ Southern blot hybridization of PCR product อีกครั้ง เพื่อ ตรวจวิเคราะห์ว่ายีน *ipt* ซึ่งเป็นยีนคัดเลือกได้ถูกตัดออกจากจีโนมกล้วยไม้และมีเฉพาะยีน AS-*ACS* หรือ AS-*ACO*



ภาพที่ 21 ขั้นตอนในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมโดยใช้เวกเตอร์ pMAT21

- ก. ลักษณะของ PLBs ที่ใช้สำหรับการถ่ายยีน
- ข. ขั้นตอนการ co-cultivation ในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม
- ค. ย้าย PLBs วางบนอาหารสูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว
- ง. ลักษณะเนื้อเยื่อพัฒนาเป็นกลุ่มแคลลัสสีเขียว ภายหลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 2 เดือน
- จ. ลักษณะยอดที่แตกเป็นกระจุก (*ipt*-shooties) ภายหลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 4 เดือน
- ฉ. ลักษณะยอดที่แตกเป็นกระจุก (*ipt*-shooties) ภายหลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 5 เดือน
- ช. ลักษณะยอดที่แตกเป็นกระจุก (*ipt*-shooties) ภายหลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 6 เดือน
- ซ. ยอดปกติพัฒนามาจากยอดกระจุก บริเวณลูกศรชี้
- ณ. พัฒนายอดปกติให้เป็นต้นและรากที่สมบูรณ์



ภาพที่ 22 ลักษณะการพัฒนามีเป็นยอดกระจุกของ PLBs กล้วยไม้ภายหลังการถ่ายยีน pMAT21-AS-

ACS หรือ pMAT21-AS-ACO

ก-ค. การเกิดยอดของกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

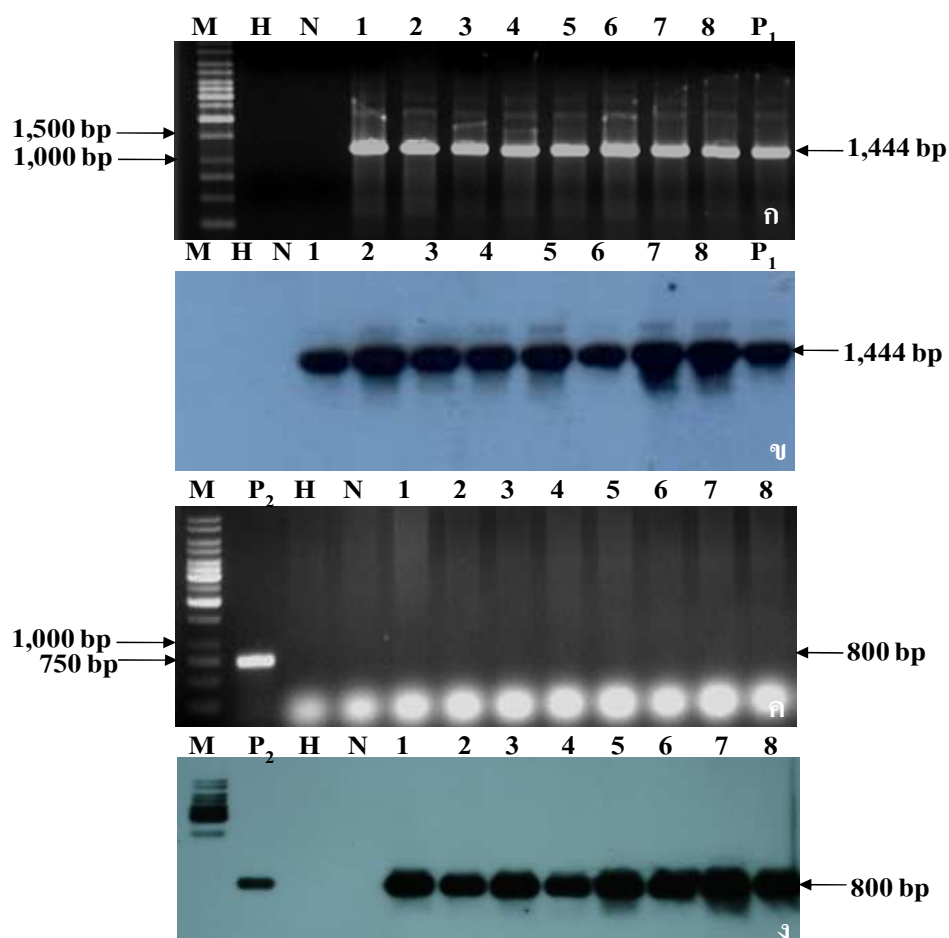
ง-ฉ. การเกิดยอดกระจุก (*ipt*-shooties) ภายหลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 4-5 เดือน

ช-ฅ. การเกิดยอดปกติ (*normal*-shooty) บริเวณลูกศรชี้ ภายหลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 6-8 เดือน

ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์ในระยะยอดกระจุก
(*ipt* shooties)

ชุดยีน	จำนวน PLBs ที่ใช้ในการ ถ่ายยีน	จำนวนยอดกระจุกที่ตรวจพบยีน AS-ACS หรือ AS-ACO และยีน <i>ipt</i> บวกต่อจำนวนยอดกระจุกทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ ที่ได้รับการ ถ่ายยีน ⁽¹⁾
ยีน AS-ACS			
pMAT21-AS-ACSA	250	8/300	2.66
pMAT21-AS-ACSB	290	124/281	44.12
pMAT21-AS-ACSC	220	76/300	25.33
ยีน AS-ACO			
pMAT21-AS-ACOA	300	219/540	40.55
pMAT21-AS-ACOB	285	240/404	59.40
pMAT21-AS-ACOC	230	169/457	36.98

⁽¹⁾ เปอร์เซ็นต์ที่ได้รับการถ่ายยีน =
$$\frac{\text{จำนวนยอดกระจุกที่ตรวจพบยีน AS-ACS}^+/\text{AS-ACO}^+ \text{ และยีน } ipt^+}{\text{จำนวนยอดกระจุกทั้งหมด}} \times 100$$



ภาพที่ 23 การตรวจสอบยีน *AS-ACSA* และยีน *ipt* ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอคกระจุก ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-*Sma*I และ ACS1BstEII ในการตรวจสอบยีน *AS-ACSA* วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *AS-ACSA* ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ตรวจสอบยีน *ipt* (ค) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *ipt* ด้วย *ipt* probe (ง)

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder-DNA marker; Fermentas, Lithuania)

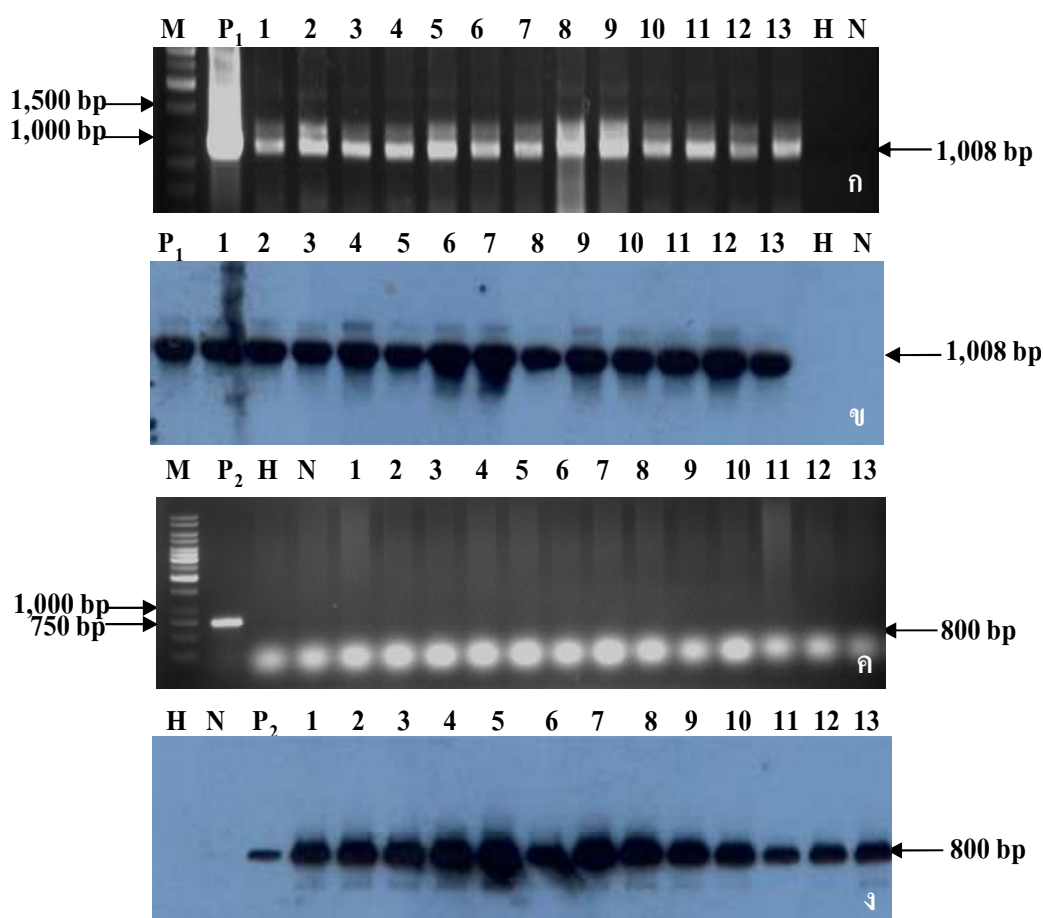
H : น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ใช้เป็น negative control

N : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีน ใช้เป็น negative control

1-8 : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรม line 1-8

P₁ : พลาสมิด pMAT21-*AS-ACSA* เป็น positive control ของยีน *AS-ACSA* ซึ่งมีขนาด 1,444 คู่เบส

P₂ : พลาสมิด pMAT21 vector เป็น positive control ของยีน *ipt* ซึ่งมีขนาด 800 คู่เบส



ภาพที่ 24 การตรวจสอบยีน *AS-ACSB* และยีน *ipt* ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอดกระจุก ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-*Sma*I และ ACS400BstEI ในการตรวจสอบยีน *AS-ACSB* วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *AS-ACSB* ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ตรวจสอบยีน *ipt* (ค) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *ipt* ด้วย *ipt* probe (ง)

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder-DNA marker; Fermentas, Lithuania)

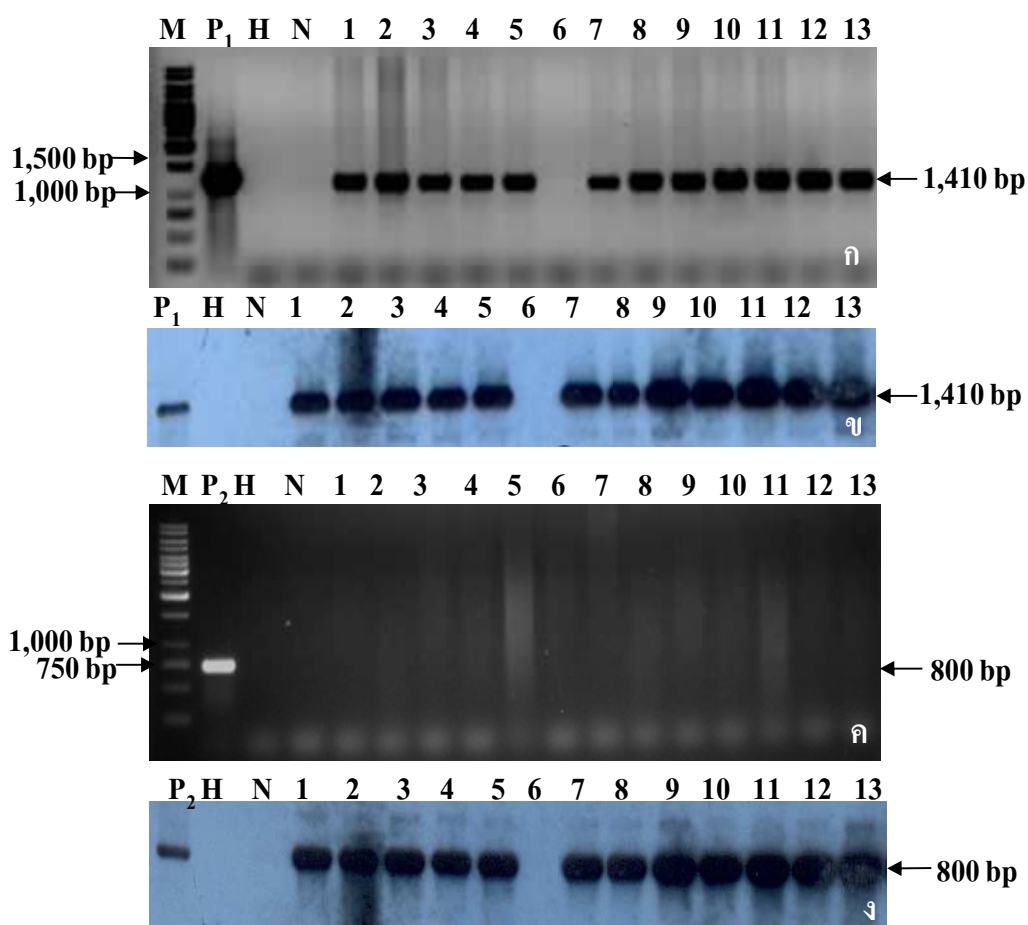
H : น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ใช้เป็น negative control

N : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีน ใช้เป็น negative control

1-13 : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรม line 1-13

P₁ : พลาสมิด pMAT21-*AS-ACSB* เป็น positive control ของยีน *AS-ACSB* ซึ่งมีขนาด 1,008 คู่เบส

P₂ : พลาสมิด pMAT21 vector เป็น positive control ของยีน *ipt* ซึ่งมีขนาด 800 คู่เบส



ภาพที่ 25 การตรวจสอบยีน AS-ACSC และยีน *ipt* ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะขอดกระจุก ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-*Sma*I และ ACS400BstEI ตรวจสอบยีน AS-ACSC วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก) และยีนยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน AS-ACSC ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ตรวจสอบยีน *ipt* (ค) และยีนยืนยันผลวิเคราะห์ PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *ipt* ด้วย *ipt* probe (ง)

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder-DNA marker; Fermentas, Lithuania)

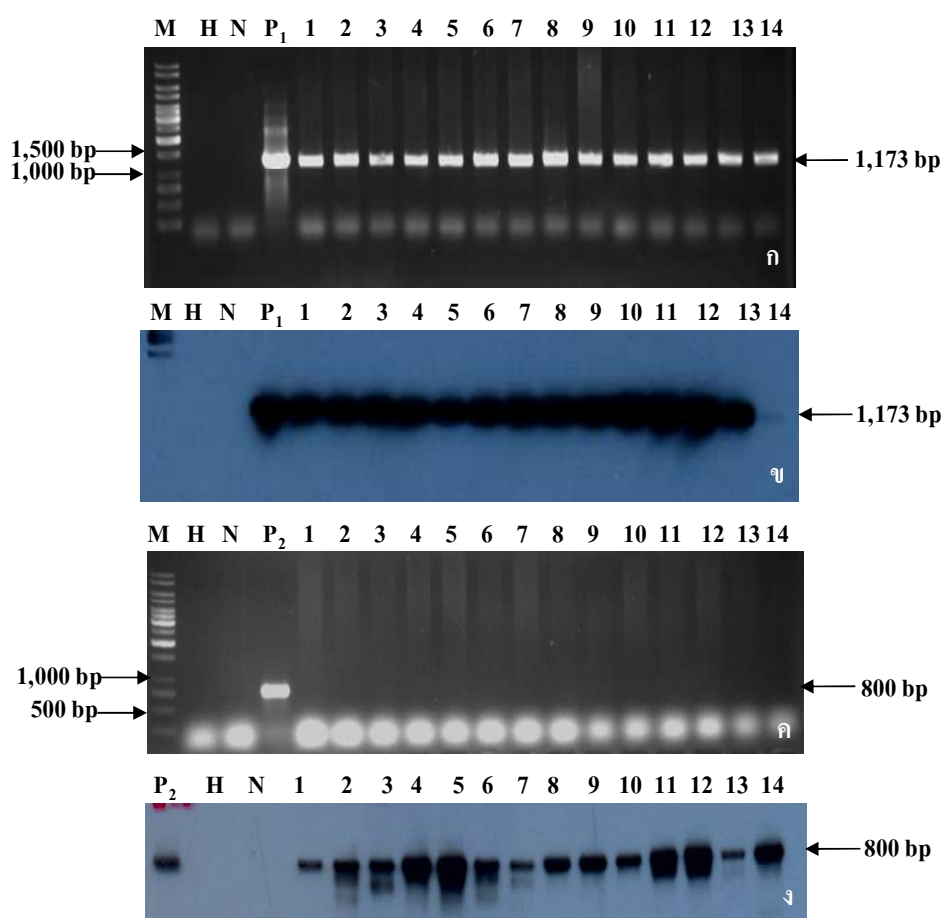
H : น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ใช้เป็น negative control

N : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีน ใช้เป็น negative control

1-13 : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรม line 1-13

P₁ : พลาสมิด pMAT21-AS-ACSC เป็น positive control ของยีน AS-ACSC ซึ่งมีขนาด 1,410 คู่เบส

P₂ : พลาสมิด pMAT21 vector เป็น positive control ของยีน *ipt* ซึ่งมีขนาด 800 คู่เบส



ภาพที่ 26 การตรวจสอบยีน *AS-ACO* และยีน *ipt* ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอคกระดูก ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-*Sma*I และ ACO1R-B1 ตรวจสอบยีน *AS-ACO* วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *AS-ACO* ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ตรวจสอบยีน *ipt* (ค) และทำการยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *ipt* ด้วย *ipt* probe (ง)

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder-DNA marker; Fermentas, Lithuania)

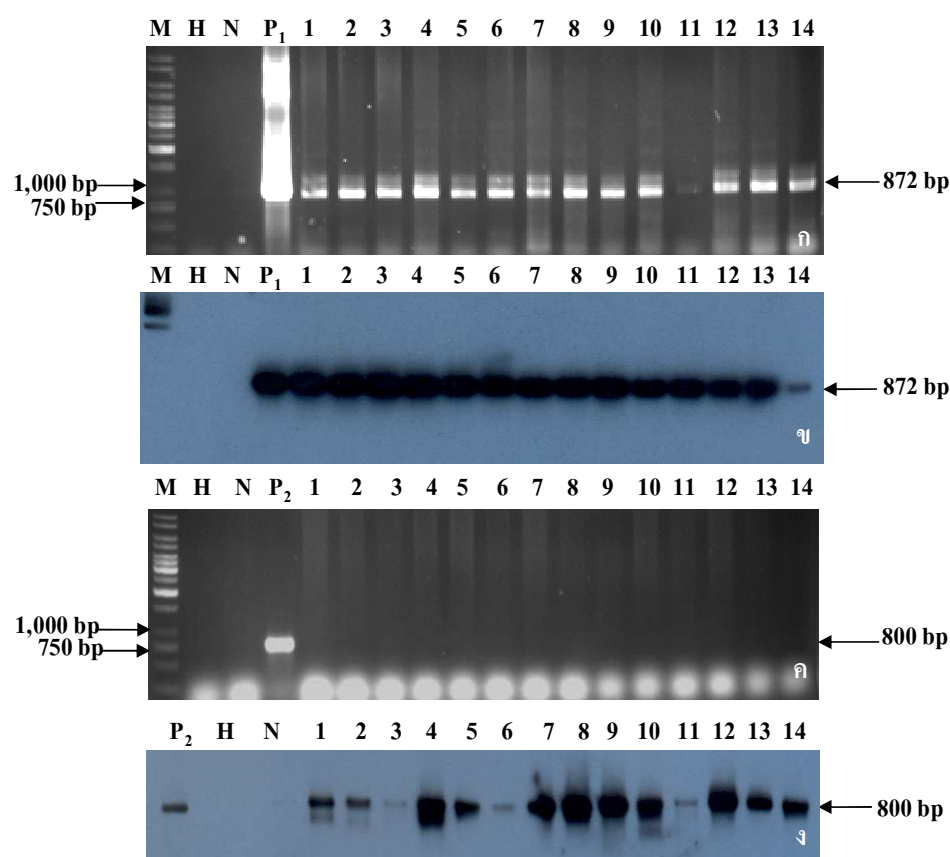
H : น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อใช้เป็น negative control

N : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีน ใช้เป็น negative control

1-14 : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรม line 1-14

P₁ : พลาสมิด pMAT21-*AS-ACO* เป็น positive control ของยีน *AS-ACO* ซึ่งมีขนาด 1,173 คู่เบส

P₂ : พลาสมิด pMAT21 vector เป็น positive control ของยีน *ipt* ซึ่งมีขนาด 800 คู่เบส



ภาพที่ 27 การตรวจสอบยีน AS-*ACOB* และยีน *ipt* ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอดกระจุก ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-*Sma*I และ ACO301R-B2 ตรวจสอบยีน AS-*ACOB* วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน AS-*ACOB* ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ตรวจสอบยีน *ipt* (ค) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *ipt* ด้วย *ipt* probe (ง)

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder-DNA marker; Fermentas, Lithuania)

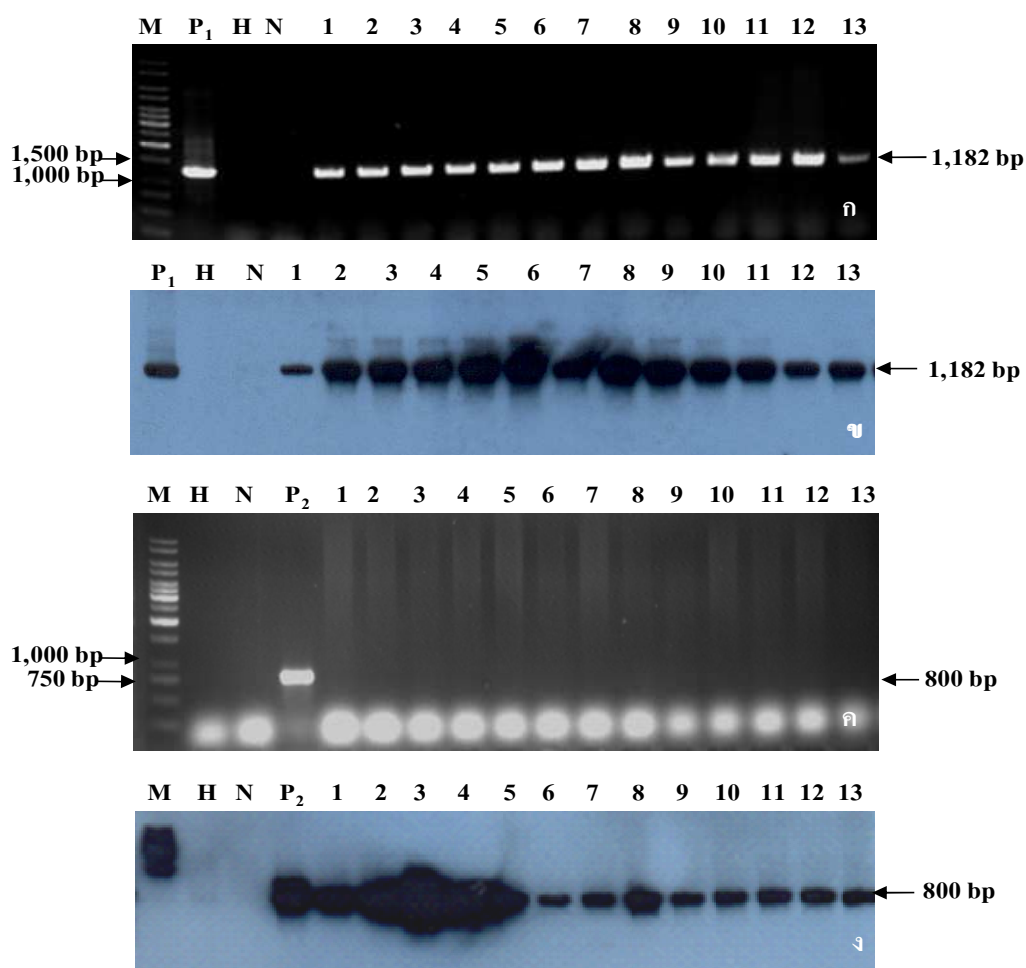
H : น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ใช้เป็น negative control

N : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีน ใช้เป็น negative control

1-14 : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรม line 1-14

P₁ : พลาสมิด pMAT21-AS-*ACOB* เป็น positive control ของยีน AS-*ACOB* ซึ่งมีขนาด 872 คู่เบส

P₂ : พลาสมิด pMAT21 vector เป็น positive control ของยีน *ipt* ซึ่งมีขนาด 800 คู่เบส



ภาพที่ 28 การตรวจสอบยีน *AS-ACOC* และยีน *ipt* ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอดกระจุก ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-*Sma*I และ ACO301R-B2 ตรวจสอบยีน *AS-ACOC* วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *AS-ACOC* ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ตรวจสอบยีน *ipt* (ค) และยืนยันผล PCR ด้วย วิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *ipt* ด้วย *ipt* probe (ง)

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder-DNA marker; Fermentas, Lithuania)

H : น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ใช้เป็น negative control

N : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีน ใช้เป็น negative control

1-13 : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรม line 1-13

P₁ : พลาสมิด pMAT21-*AS-ACOC* เป็น positive control ของยีน *AS-ACOC* ซึ่งมีขนาด 1,182 คู่เบส

P₂ : พลาสมิด pMAT21 vector เป็น positive control ของยีน *ipt* ซึ่งมีขนาด 800 คู่เบส

4. การตรวจสอบยีน AS-ACS หรือ AS-ACO และยีน *ipt* ซึ่งเป็นยีนคัดเลือกในกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมในระยะต้นปกติ

นำยอดกระจุกที่ตรวจพบยีน AS-ACS และ AS-ACO ส่วน A, B, และ C และตรวจพบยีน *ipt* ด้วยวิธี PCR และ Southern blot hybridization of PCR product (ตารางที่ 12) มาเลี้ยงให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 21 และ 22) และนำไปตรวจสอบยีนดังกล่าวอีกครั้งด้วยวิธี PCR และทำการยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization of PCR products เพื่อวิเคราะห์ว่าต้นปกติที่ได้ยังคงมียีน AS-ACS และ AS-ACO อยู่แต่ปราศจากยีน *ipt* ซึ่งเป็นยีนคัดเลือก ผลการตรวจสอบพบว่ากล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนยีน AS-ACSA ตรวจพบต้นที่มียีน AS-ACSA (ภาพที่ 29ก และ 29ข) ที่ยังมียีน *ipt* อยู่ในจีโนม (ภาพที่ 29ค, 29ง และตารางที่ 13)

ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน AS-ACSB ที่เป็นยีนคัดเลือกและให้ผล PCR บวกในระยะยอดกระจุก จำนวน 124 ต้น มาตรวจสอบด้วยวิธี PCR อีกครั้ง พบต้นที่มียีน AS-ACSB ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,008 คู่เบส (ภาพที่ 30ก และ 30ข) แต่ตรวจไม่พบยีน *ipt* ขนาด 800 คู่เบส (ภาพที่ 30ค และ 30ง) จำนวน 5 ต้น ได้แก่ ต้นกล้วยไม้ line 1 = AS-ACSB-107A, line 2 = AS-ACSB-108A, line 3 = AS-ACSB-117A, line 5 = AS-ACSB-203A และ line 6 = AS-ACSB-208A คิดเป็นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกเท่ากับ 4 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 13)

ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน AS-ACSC ที่เป็นยีนคัดเลือกซึ่งให้ผล PCR บวกในระยะยอดกระจุก จำนวน 76 ต้น มาตรวจสอบด้วยวิธี PCR อีกครั้ง พบต้นที่มียีน AS-ACSC ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,410 คู่เบส (ภาพที่ 31ก และ 31ข) แต่ตรวจไม่พบยีน *ipt* ขนาด 800 คู่เบส (ภาพที่ 31ค และ 31ง) จำนวน 4 ต้น ได้แก่ต้นกล้วยไม้ line 2 = AS-ACSC-2E, line 3 = AS-ACSC-7E, line 6 = AS-ACSC-34E และ line 7 = AS-ACSC-50E คิดเป็นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกเท่ากับ 5.26 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 13)

สำหรับต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน AS-ACOA ที่เป็นยีนคัดเลือกที่ให้ผล PCR บวกในระยะยอดกระจุก จำนวน 219 ต้น มาตรวจสอบด้วยวิธี PCR อีกครั้ง พบต้นที่มียีน AS-ACOA ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,173 คู่เบส (ภาพที่ 32ก และ 32ข) แต่ตรวจไม่พบยีน *ipt* ขนาด 800 คู่เบส (ภาพที่ 32ค และ 32ง) จำนวน 11 ต้น ได้แก่ ต้นกล้วยไม้ line 1 = AS-ACOA-30B, line 2 = AS-ACOA-10C, line 3 = AS-ACOA-11C, line 4 = AS-ACOA -12C, line 5 = AS-ACOA-14C, line 6 = AS-ACOA-16C, line 7 = AS-ACOA-18C, line 8 = AS-ACOA-29C, line 11 = AS-ACOA-33C, line 12 =

AS-*ACO*A-45C และ line 13 = AS-*ACO*A-61C คิดเป็นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกเท่ากับ 5 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 13)

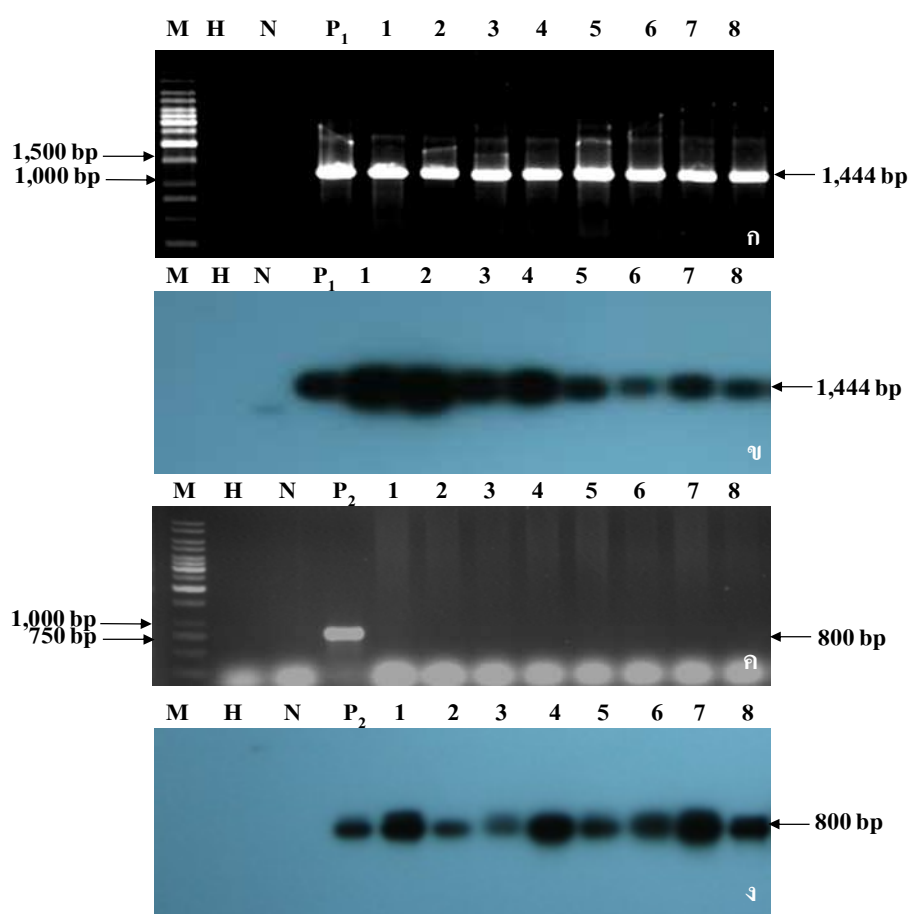
ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน AS-*ACO*B ที่เป็นยอคเดี่ยวที่ให้ผล PCR บวกในระยะยอคกระจุก จำนวน 221 ต้น มาตรฐานทดสอบด้วยวิธี PCR อีกครั้ง พบต้นที่มียีน AS-*ACO*B ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 872 คู่เบส (ภาพที่ 33ก และ 33ข) แต่ตรวจไม่พบยีน *ipt* ขนาด 800 คู่เบส (ภาพที่ 33ค และ 33ง) จำนวน 2 ต้น ได้แก่ ต้นกล้วยไม้ line 11 = AS-*ACO*B-10B และ line 12 = AS-*ACO*B-11B คิดเป็นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกเท่ากับ 0.90 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 13)

ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน AS-*ACO*C ที่เป็นยอคเดี่ยวที่ให้ผล PCR บวกในระยะยอคกระจุก จำนวน 169 ต้น มาตรฐานทดสอบด้วยวิธี PCR อีกครั้ง ตรวจพบต้นที่มียีน AS-*ACO*C ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,182 คู่เบส (ภาพที่ 34ก และ 34ข) แต่ตรวจไม่พบยีน *ipt* ขนาด 800 คู่เบส (ภาพที่ 34ค และ 34ง) จำนวน 12 ต้น ได้แก่ ต้นกล้วยไม้ line 2 = AS-*ACO*C-7E, line 3 = AS-*ACO*C-10E, line 4 = AS-*ACO*C-14E, line 5 = AS-*ACO*C-20E, line 6 = AS-*ACO*C-21E, line 7 = AS-*ACO*C-22E, line 9 = AS-*ACO*C-30E, line 10 = AS-*ACO*C-34E, line 11 = AS-*ACO*C-36E, line 12 = AS-*ACO*C-55E, line 13 = AS-*ACO*C-56E และ line 14 = AS-*ACO*C-98E คิดเป็นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกเท่ากับ 7.10 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพในการถ่ายยีน AS-ACS และ AS-ACO เข้าสู่กล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์
ตรวจสอบในระยะต้นปกติโดยวิธี PCR

ชุดยีน	จำนวนยอดปกติ ที่ตรวจพบยีน ACS^+/ACO^+ และยีน <i>ipt</i> ต่อจำนวนยอดกระจุกทั้งหมด ที่เป็นยอดเดี่ยวที่ให้ผล PCR บวก	เปอร์เซ็นต์กล้วยไม้ ดัดแปลงพันธุกรรม ที่ปราศจากยีน คัดเลือก ⁽¹⁾
ยีน AS-ACS		
pMAT21-AS-ACSA	0/8	0.00
pMAT21-AS-ACSB	5/124	4.00
pMAT21-AS-ACSC	4/76	5.26
ยีน AS-ACO		
pMAT21-AS-ACOA	11/219	5.00
pMAT21-AS-ACOB	2/221	0.90
pMAT21-AS-ACOC	12/169	7.10

⁽¹⁾ % กล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือก = $\frac{\text{จำนวนยอดกระจุกที่พบยีน AS-ACS}^+/\text{AS-ACO}^+ \text{ ยีน } ipt}{\text{จำนวนยอดกระจุกทั้งหมดที่เป็นยอดเดี่ยวที่ให้ผล PCR บวก}} \times 100$



ภาพที่ 29 การตรวจสอบยีน AS-*ACSA* และยีน *ipt* ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ในระยะขอลปกติ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-*Sma*I และ ACS1*Bst*II ในการตรวจสอบยีน AS-*ACSA* วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน AS-*ACSA* ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ในการตรวจสอบยีน *ipt* (ค) และยืนยันผล PCR และวิเคราะห์ PCR product ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *ipt* ด้วย *ipt* probe (ง)

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder-DNA marker; Fermentas, Lithuania)

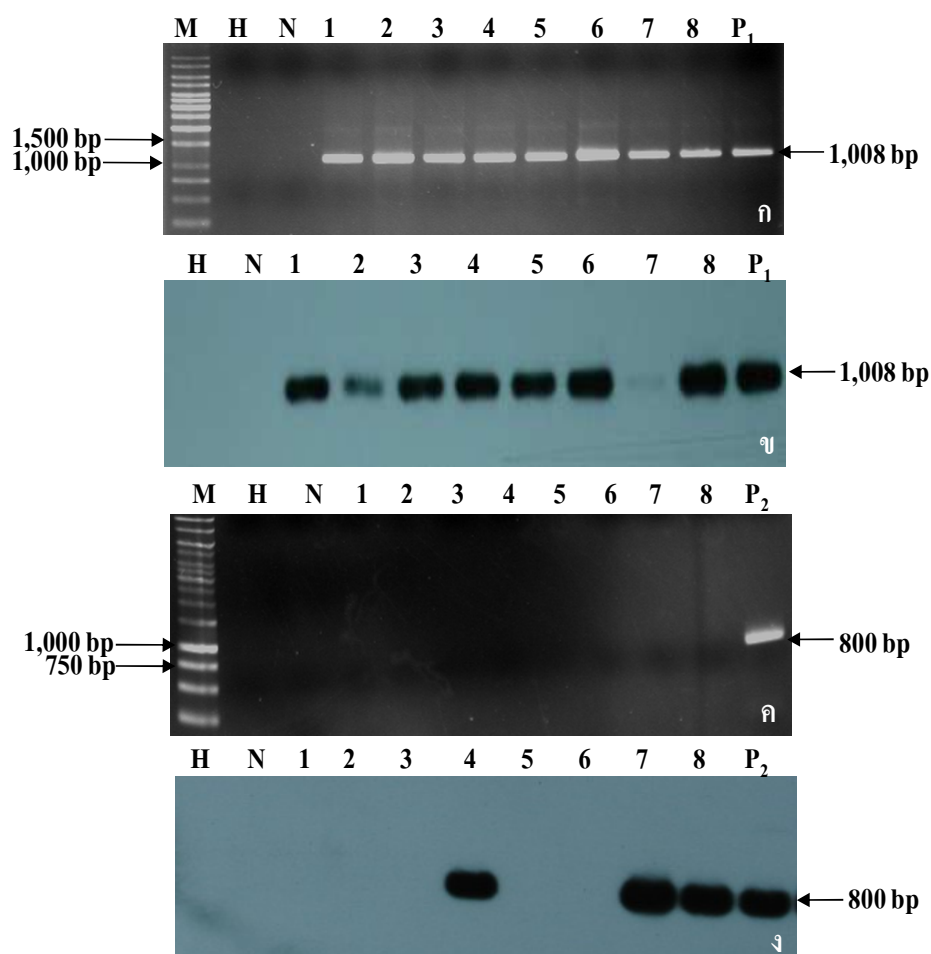
H : น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อใช้เป็น negative control

N : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีน ใช้เป็น negative control

1-8 : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรม line 1-8

P₁ : พลาสมิด pMAT21-AS-*ACSB* เป็น positive control ของยีน AS-*ACSB* ซึ่งมีขนาด 1,008 คู่เบส

P₂ : พลาสมิด pMAT21 vector เป็น positive control ของยีน *ipt* ซึ่งมีขนาด 800 คู่เบส



ภาพที่ 30 การตรวจสอบยีน *AS-ACSB* และยีน *ipt* ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอดปกติ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-*Sma*I และ ACS400BstEII ในการตรวจสอบยีน *AS-ACSB* วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *AS-ACSB* ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ในการตรวจสอบยีน *ipt* (ค) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *ipt* ด้วย *ipt* probe (ง)

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder-DNA marker; Fermentas, Lithuania)

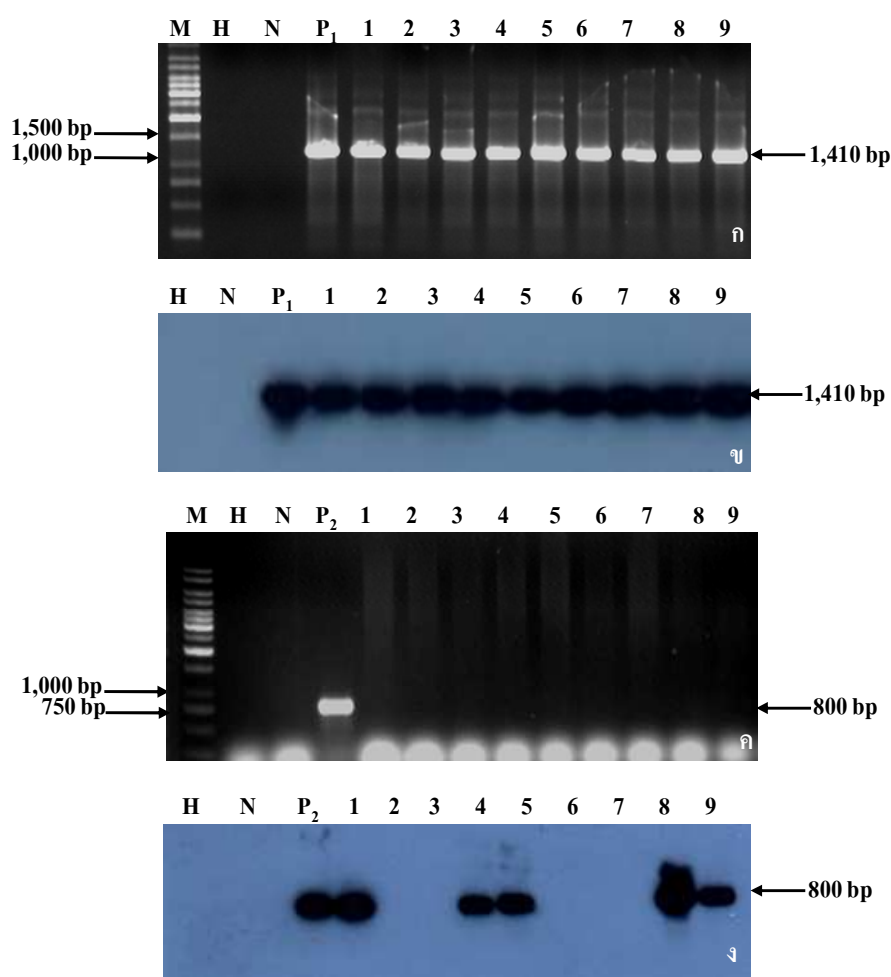
H : น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ใช้เป็น negative control

N : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีน ใช้เป็น negative control

1-8 : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรม line 1-8

P₁ : พลาสมิด pMAT21-*AS-ACSC* เป็น positive control ของยีน *AS-ACSC* ซึ่งมีขนาด 1,410 คู่เบส

P₂ : พลาสมิด pMAT21 vector เป็น positive control ของยีน *ipt* ซึ่งมีขนาด 800 คู่เบส



ภาพที่ 31 การตรวจสอบยีน *AS-ACSC* และยีน *ipt* ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอดปกติ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-*Sma*I และ ACS400BstEII ในการตรวจสอบยีน *AS-ACSC* วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *AS-ACSC* ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ในการตรวจสอบยีน *ipt* (ค) และยืนยันผล PCR ด้วย วิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *ipt* ด้วย *ipt* probe (ง)

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder-DNA marker; Fermentas, Lithuania)

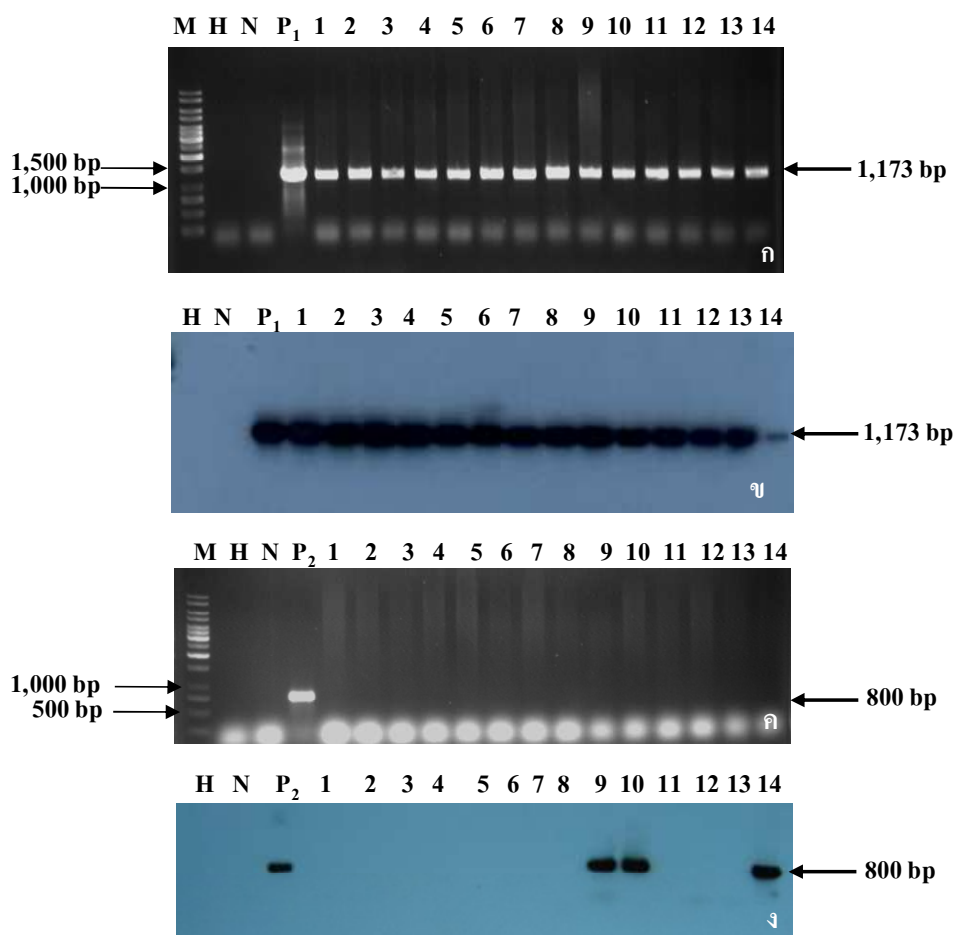
H : น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ใช้เป็น negative control

N : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีน ใช้เป็น negative control

1-9 : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรม line 1-9

P₁ : พลาสมิด pMAT21-*AS-ACSC* เป็น positive control ของยีน *AS-ACSC* ซึ่งมีขนาด 1,410 คู่เบส

P₂ : พลาสมิด pMAT21 vector เป็น positive control ของยีน *ipt* ซึ่งมีขนาด 800 คู่เบส



ภาพที่ 32 การตรวจสอบยีน *AS-ACO* และยีน *ipt* ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะขอดปกติ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-*Sma*I และ ACO1R-B1 ในการตรวจสอบยีน *AS-ACO* วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *AS-ACO* ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ในการตรวจสอบยีน *ipt* (ค) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *ipt* ด้วย *ipt* probe (ง)

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder-DNA marker; Fermentas, Lithuania)

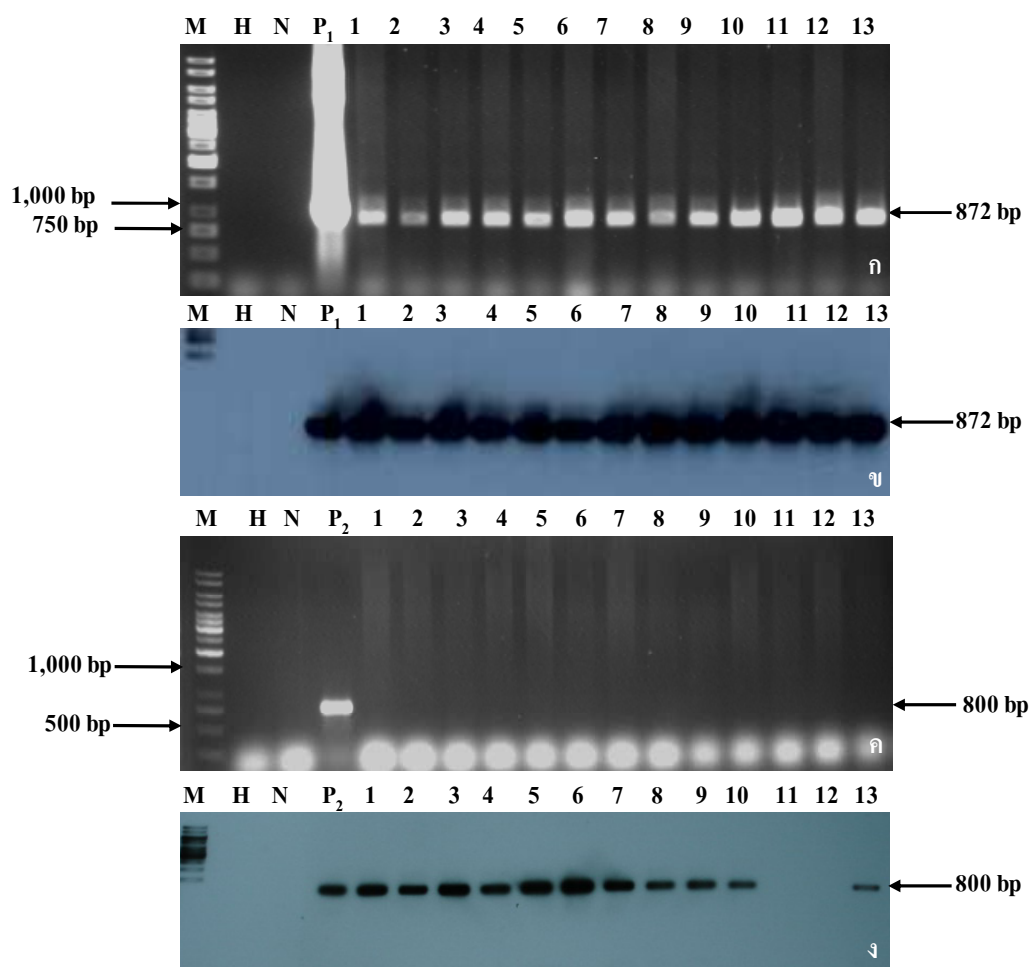
H : น้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ ใช้เป็น negative control

N : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีน ใช้เป็น negative control

1-14 : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรม line 1-14

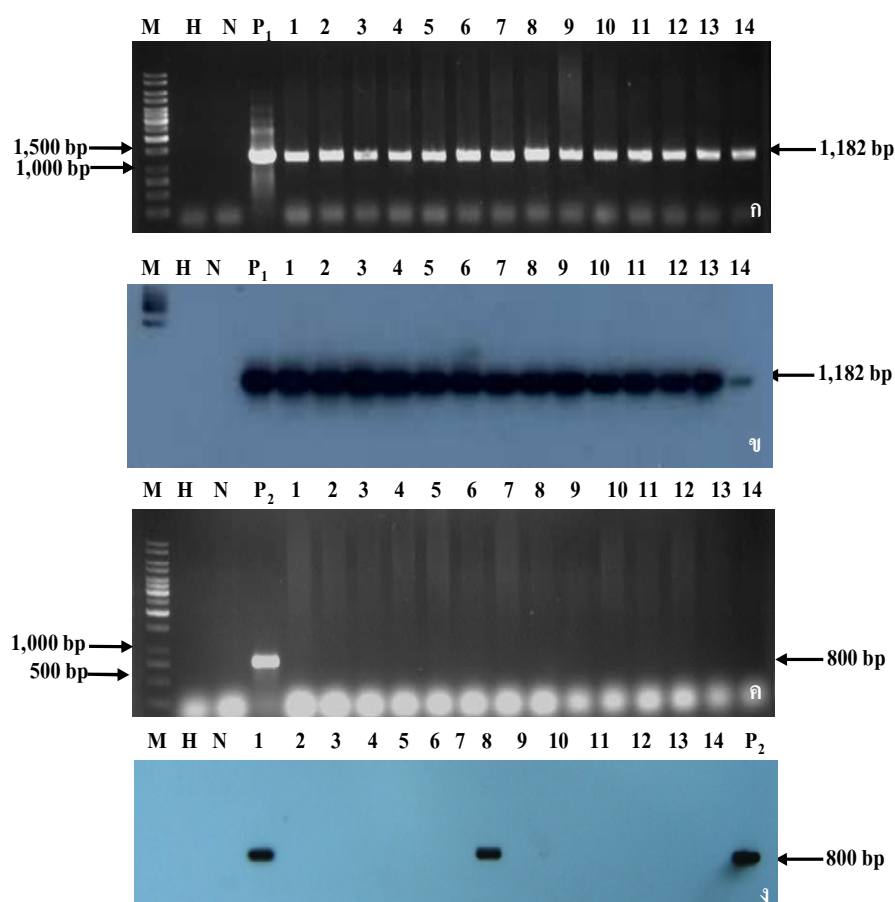
P₁ : พลาสมิด pMAT21-*AS-ACO* เป็น positive control ของยีน *AS-ACO* ซึ่งมีขนาด 1,173 คู่เบส

P₂ : พลาสมิด pMAT21 vector เป็น positive control ของยีน *ipt* ซึ่งมีขนาด 800 คู่เบส



ภาพที่ 33 การตรวจสอบยีน *AS-ACOB* และยีน *ipt* ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอดปกติ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-*Sma*I และ ACO301R-B2 ในการตรวจสอบยีน *AS-ACOB* วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *AS-ACOB* ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ในการตรวจสอบยีน *ipt* (ค) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *ipt* ด้วย *ipt* probe (ง)

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder-DNA marker; Fermentas, Lithuania)
H : น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ใช้เป็น negative control
N : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีน ใช้เป็น negative control
1-13 : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรม line 1-13
P₁ : พลาสมิด pMAT21-*AS-ACOB* เป็น positive control ของยีน *AS-ACOB* ซึ่งมีขนาด 872 คู่เบส
P₂ : พลาสมิด pMAT21 vector เป็น positive control ของยีน *ipt* ซึ่งมีขนาด 800 คู่เบส



ภาพที่ 34 การตรวจสอบยีน *AS-ACOC* และยีน *ipt* ในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ระยะยอดปกติ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S-*Sma*I และ ACO301R-B2 ในการตรวจสอบยีน *AS-ACOC* วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis (ก) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *AS-ACOC* ด้วย 35S-promoter probe (ข) ไพรเมอร์ IPT1 และ IPT2 ในการตรวจสอบยีน *ipt* (ค) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี

Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *ipt* ด้วย *ipt* probe (ง)

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder-DNA marker; Fermentas, Lithuania)

H : น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ใช้เป็น negative control

N : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีน ใช้เป็น negative control

1-14 : ดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรม line 1-14

P₁ : พลาสมิด pMAT21-*AS-ACOC* เป็น positive control ของยีน *AS-ACOC* ซึ่งมีขนาด 1,182 คู่เบส

P₂ : พลาสมิด pMAT21 vector เป็น positive control ของยีน *ipt* ซึ่งมีขนาด 800 คู่เบส

5. การตรวจสอบจำนวนชุดของยีน AS-ACS หรือ AS-ACO และยีน *ipt* ในต้นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมโดยวิธี Genomic Southern blot hybridization

ตรวจสอบจำนวนชุดของยีน AS-ACS หรือ AS-ACO และยีน *ipt* บนโครโมโซมของต้นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมโดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* หรือ *BglIII* และตรวจหาชิ้น AS-ACSB หรือ AS-ACO และยีน *ipt* ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization ผลการตรวจสอบในต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21-AS-ACSB จำนวน 5 line ได้แก่ line AS-ACSB-107A, AS-ACSB-108A, AS-ACSB-117A, AS-ACSB-203A และ AS-ACSB-208A ตรวจพบยีน AS-ACSB แทรกอยู่ในโครโมโซมของกล้วยไม้จำนวน 1 ชุด (ภาพที่ 35ข, 36ข และตารางที่ 14) และตรวจไม่พบยีน *ipt* (ภาพที่ 35ค และ 36ค)

ผลการตรวจสอบต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21-AS-ACOA จำนวน 11 ต้น พบว่าต้นกล้วยไม้ line AS-ACOA-30B, AS-ACOA-10C, AS-ACOA-12C, AS-ACOA-14C, AS-ACOA-18C, AS-ACOA-33C และ AS-ACOA-61C พบยีน AS-ACOA แทรกอยู่ในโครโมโซมของกล้วยไม้จำนวน 2 ชุด ส่วน line AS-ACOA-29C ตรวจพบยีน AS-ACOA แทรกอยู่ในโครโมโซมของกล้วยไม้จำนวน 4 ชุด และ line AS-ACOA-11C, AS-ACOA-16C และ AS-ACOA-45C ตรวจพบยีน AS-ACOA แทรกอยู่ในโครโมโซมของกล้วยไม้จำนวน 3 ชุด (ภาพที่ 37ข, 38ข และตารางที่ 14) และตรวจไม่พบยีน *ipt* จากกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมทุกต้น (ภาพที่ 37ค, 38ค และตารางที่ 14)

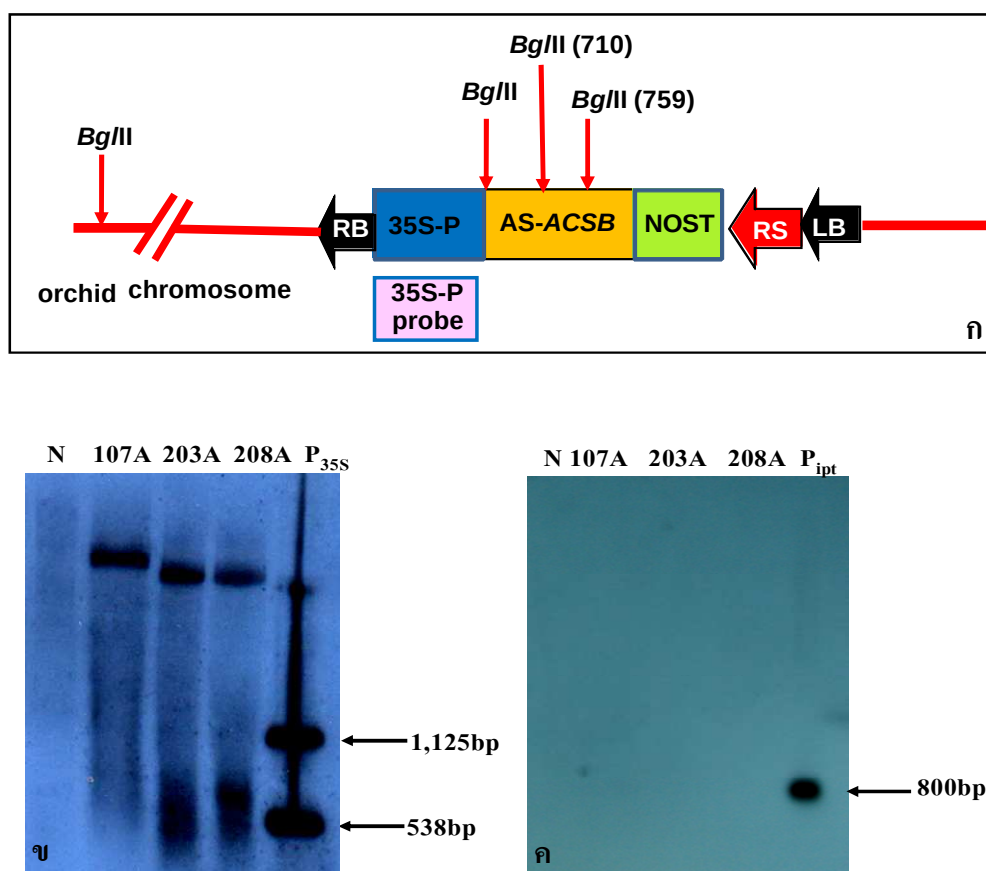
ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21-AS-ACOB จำนวน 2 ต้น ได้แก่ line AS-ACOB-10B และ AS-ACOB-11B สามารถตรวจพบยีน AS-ACOB แทรกอยู่ในโครโมโซมของกล้วยไม้จำนวน 1 ชุด (ภาพที่ 39ข และตารางที่ 14) และตรวจไม่พบยีน *ipt* (ภาพที่ 39ค) แสดงให้เห็นว่าต้นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ทำการตรวจสอบเป็นต้นที่ปราศจากยีนคัดเลือก (marker free transgenic orchid) นำต้นกล้วยไม้ที่ปราศจากยีนคัดเลือกมาศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอต่อไป

สำหรับต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21-AS-ACSC และยีน pMAT21-AS-ACOC ยังไม่สามารถนำมาตรวจสอบจำนวนชุดของยีน AS-ACS หรือ AS-ACO และยีน *ipt* โดยวิธี Southern blot hybridization ได้ เนื่องจากต้นกล้วยไม้เหล่านี้มีขนาดเล็กมากยังไม่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธีดังกล่าว ซึ่งต้องใช้ปริมาณของจีโนมดีเอ็นเออย่างน้อย

100 ไมโครกรัม และต้องใช้ใบพืชเริ่มต้นในการสกัดดีเอ็นเอประมาณ 3 กรัม จึงมีปริมาณไม่เพียงพอในการตรวจสอบด้วยเทคนิค Southern blot hybridization

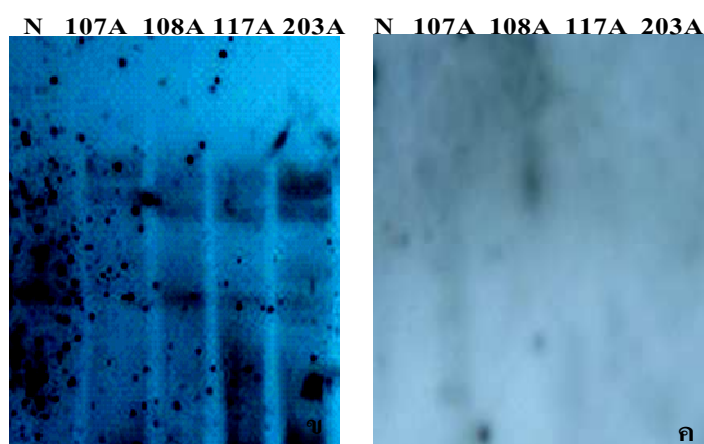
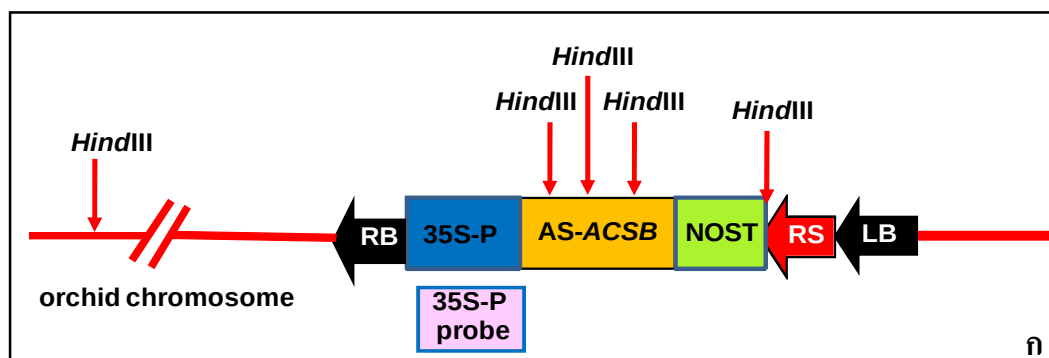
ตารางที่ 14 การตรวจวิเคราะห์จำนวนชุดของยีนที่อยู่ในจีโนมของกล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน AS-ACS และ AS-ACO ส่วน A, B และ C ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization

ชุดยีนที่ถ่ายเข้าสู่กล้วยไม้/ line	จำนวนชุดของยีน AS-ACS/AS-ACO ที่ตรวจพบ
ยีน AS-ACS ส่วน B	
AS-ACSB-107A	1
AS-ACSB-108A	1
AS-ACSB-117A	1
AS-ACSB-203A	1
AS-ACSB-208A	1
ยีน AS-ACO ส่วน A	
AS-ACOA-30B	2
AS-ACOA-10C	2
AS-ACOA-11C	3
AS-ACOA-12C	2
AS-ACOA-14C	2
AS-ACOA-16C	3
AS-ACOA-18C	2
AS-ACOA-29C	4
AS-ACOA-33C	2
AS-ACOA-45C	3
AS-ACOA-61C	2
ยีน AS-ACOB	
AS-ACOB-10B	1
AS-ACOB-11B	1



ภาพที่ 35 การตรวจสอบจำนวนชุดของยีน *AS-ACSB* และ *ipt* ในกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21-*AS-ACSB* ย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl/II* (ก) และตรวจวิเคราะห์จำนวนชุดของยีน *AS-ACSB* และ *ipt* ด้วยวิธี Southern blot hybridization ทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับ 35S-promoter probe (ข) และ *ipt* probe (ค) ตามลำดับ และตรวจสอบด้วยวิธี chemiluminescence detection

N	: ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีนซึ่งใช้เป็น negative control
P _{35S}	: PCR products ของ 35S-promoter จาก pGEM [®] -T Easy- <i>AS-ACOB</i> ขนาด 538 คู่เบส ใช้เป็น positive control และ 35S-promoter จาก pGEM [®] -T Easy- <i>AS-ACOB</i> ขนาด 1,125 คู่เบส เป็น positive control
P _{ipt}	: pMAT21- <i>AS-ACOB</i> ซึ่งใช้ส่วนยีน <i>ipt</i> เป็น positive control
<i>AS-ACSB</i> -107A	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 107A
<i>AS-ACSB</i> -203A	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 203A
<i>AS-ACSB</i> -208A	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 208A

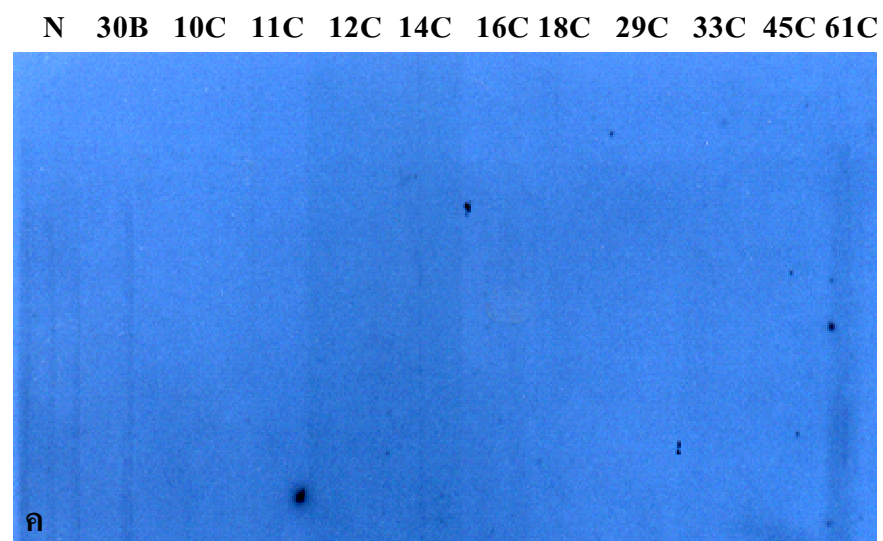
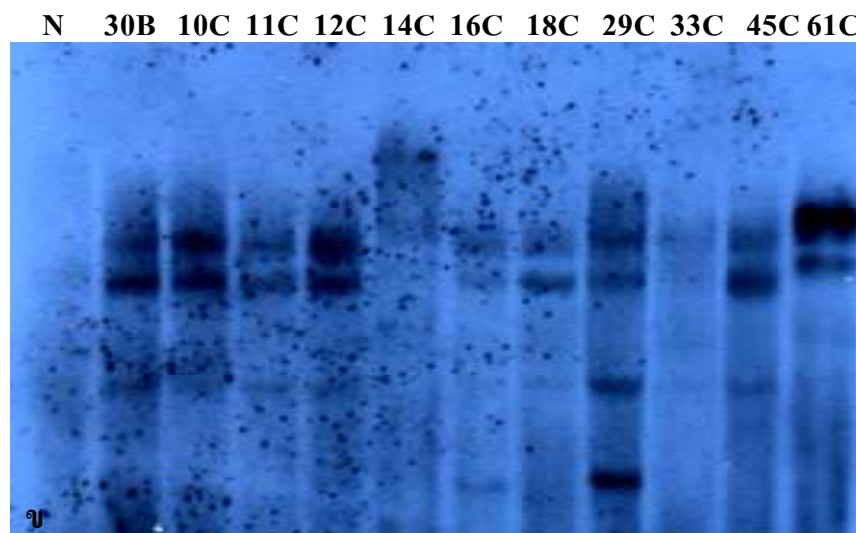
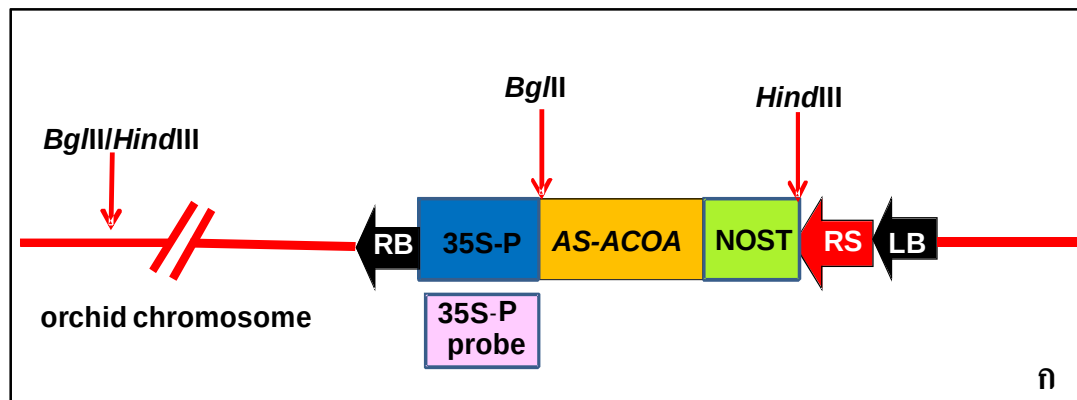


ภาพที่ 36 การตรวจสอบจำนวนชุดของยีน *AS-ACSB* และ *ipt* ในกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21-*AS-ACSB* ย่อยจีเอ็มเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* (ก) และตรวจวิเคราะห์จำนวนชุดของยีน *AS-ACSB* และ *ipt* ด้วยวิธี Southern blot hybridization ทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับ 35S-promoter probe (ข) และ *ipt* probe (ค) ตามลำดับ และตรวจสอบด้วยวิธี chemiluminescence detection

- N : ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีน ซึ่งใช้เป็น negative control
- AS-ACSB-107A : ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R₀-line 107A
- AS-ACSB-108A : ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R₀-line 108A
- AS-ACSB-117A : ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R₀-line 117A
- AS-ACSB-203A : ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R₀-line 203A

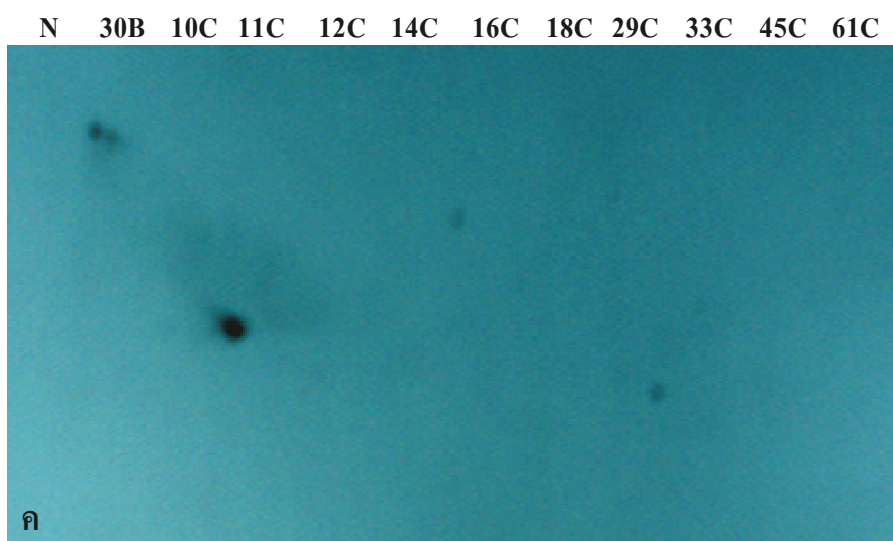
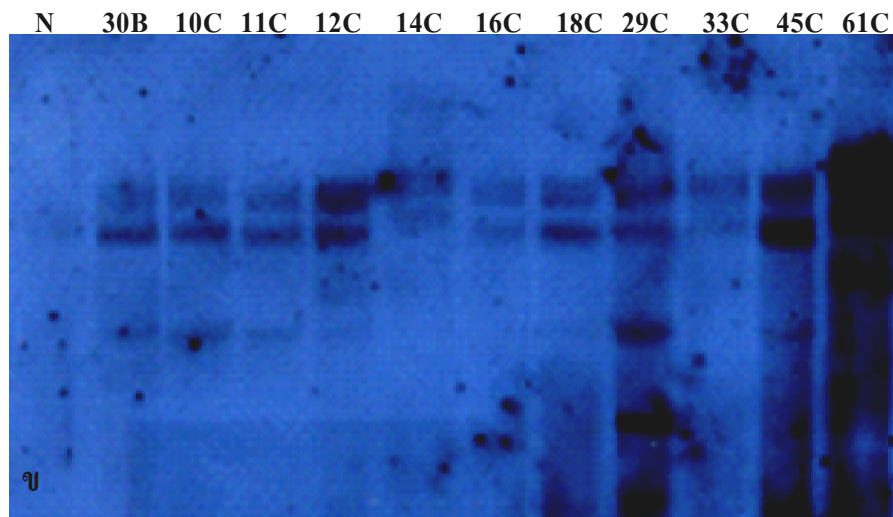
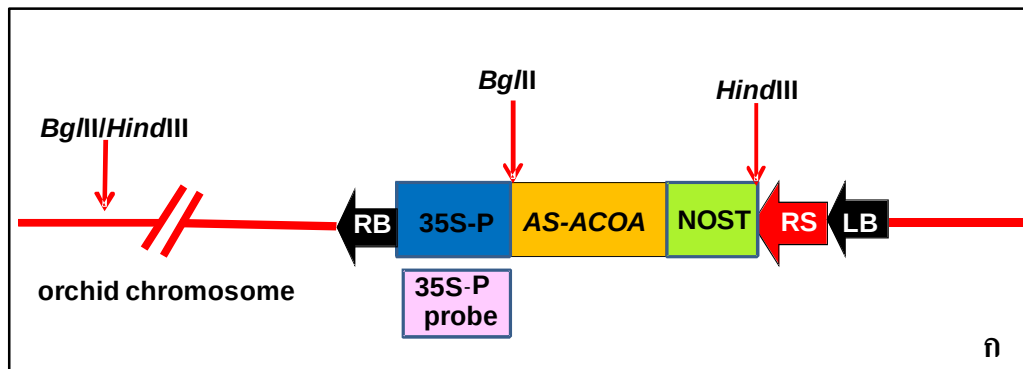
ภาพที่ 37 การตรวจสอบจำนวนชุดของยีน *AS-ACOA* และ *ipt* ในกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21-*AS-ACOA* ย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์จำเพาะ *HindIII* (ก) และตรวจวิเคราะห์จำนวนชุดของยีน *AS-ACOA* และ *ipt* ด้วยวิธี Southern blot hybridization ทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับ 35S-promoter probe (ข) และ *ipt* probe (ค) ตามลำดับ และตรวจสอบด้วยวิธี chemiluminescence detection

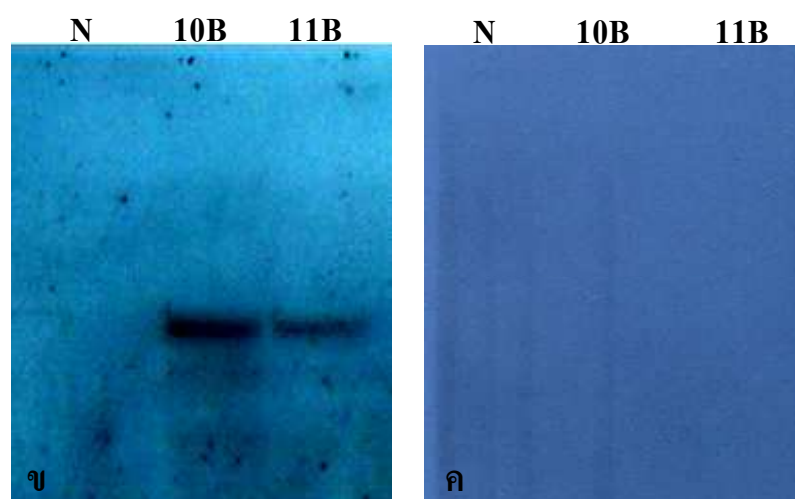
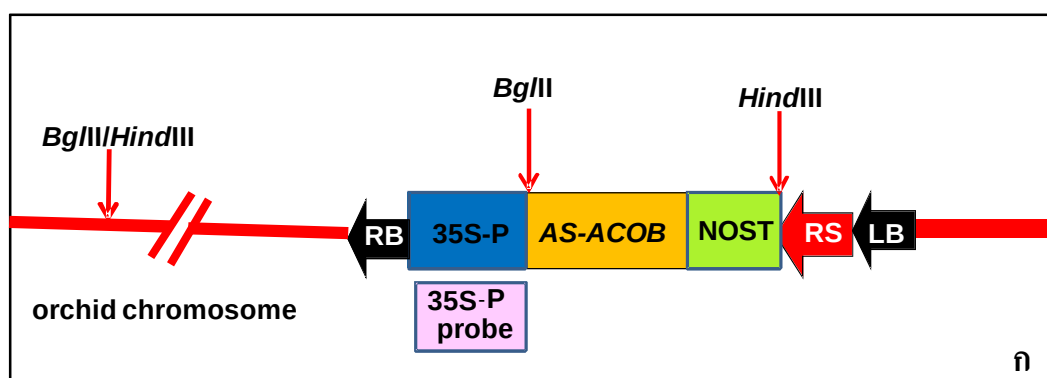
N	: ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีนซึ่งใช้เป็น negative control
AS- <i>ACOA</i> -30B	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 30B
AS- <i>ACOA</i> -10C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 10C
AS- <i>ACOA</i> -11C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 11C
AS- <i>ACOA</i> -12C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 12C
AS- <i>ACOA</i> -14C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 14C
AS- <i>ACOA</i> -16C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 16C
AS- <i>ACOA</i> -18C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 18C
AS- <i>ACOA</i> -29C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 29C
AS- <i>ACOA</i> -33C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 33C
AS- <i>ACOA</i> -45C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 45C
AS- <i>ACOA</i> -61C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 61C



ภาพที่ 38 การตรวจสอบจำนวนชุดของยีน *AS-ACOA* และ *ipt* ในกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21-*AS-ACOA* ย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Bgl*II (ก) และตรวจวิเคราะห์จำนวนชุดของยีน *AS-ACOA* และ *ipt* ด้วยวิธี Southern blot hybridization ทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับ 35S-promoter probe (ข) และ *ipt* probe (ค) ตามลำดับ และตรวจสอบด้วยวิธี chemiluminescence detection

N	: ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีนซึ่งใช้เป็น negative control
AS- <i>ACOA</i> -30B	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 30B
AS- <i>ACOA</i> -10C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 10C
AS- <i>ACOA</i> -11C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 11C
AS- <i>ACOA</i> -12C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 12C
AS- <i>ACOA</i> -14C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 14C
AS- <i>ACOA</i> -16C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 16C
AS- <i>ACOA</i> -18C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 18C
AS- <i>ACOA</i> -29C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 29C
AS- <i>ACOA</i> -33C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 33C
AS- <i>ACOA</i> -45C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 45C
AS- <i>ACOA</i> -61C	: ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R ₀ -line 61C





ภาพที่ 39 การตรวจสอบจำนวนชุดของยีน *AS-ACOB* และ *ipt* ในกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21-*AS-ACOB* ย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Bgl*III (ก) และตรวจวิเคราะห์จำนวนชุดของยีน *AS-ACOB* และ *ipt* ด้วยวิธี Southern blot hybridization ทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับ 35S-promoter probe (ข) และ *ipt* probe (ค) ตามลำดับ และตรวจสอบด้วยวิธี chemiluminescence detection

- N : ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีนซึ่งใช้เป็น negative control
- AS-ACOB*-10B : ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_0 -line 10B
- AS-ACOB*-11B : ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_0 -line 11B

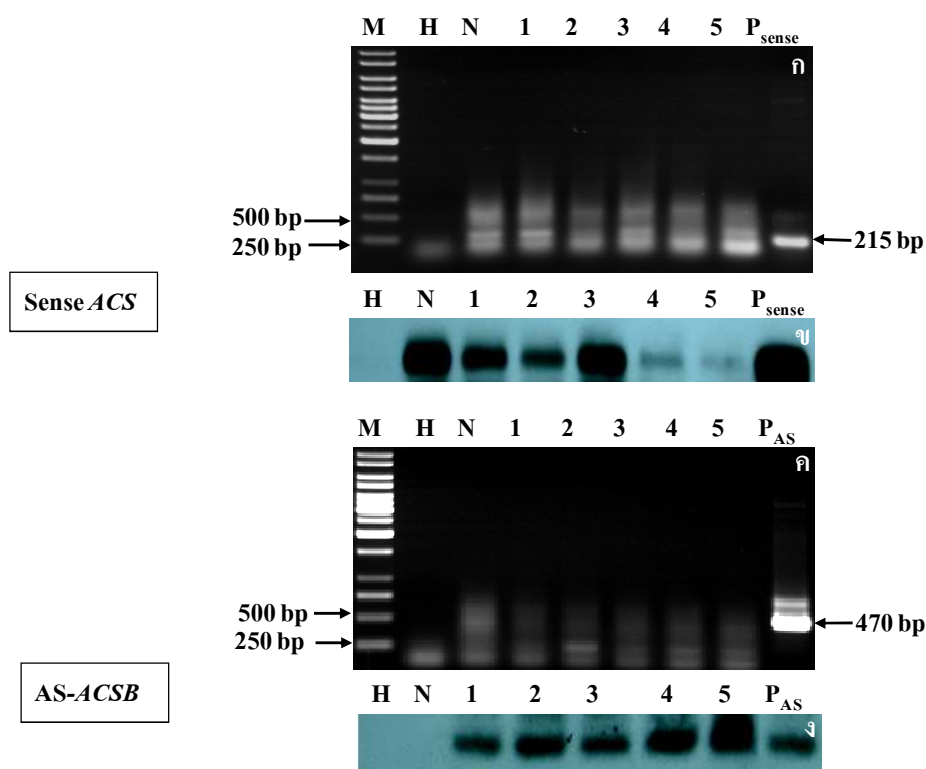
6. การตรวจสอบการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของยีน *AS-ACS* หรือ *AS-ACO* เปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน *ACS* หรือ *ACO* จากกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค RT-PCR

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AS-ACS* และ *AS-ACO* ในกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกด้วยเทคนิค RT-PCR และทำการยืนยันผลของ PCR products of RT-PCR ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงในการแสดงออกของยีน sense *ACS* และ sense *ACO* หลังจากกล้วยไม้ได้รับการถ่ายยีน *AS-ACS* และ *AS-ACO* โดยใช้ 18s rRNA เป็น internal control

กล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน *AS-ACSB* ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AS-ACSB* จำนวน 5 ต้น ได้แก่ line *AS-ACSB-107A*, *AS-ACSB-108A*, *AS-ACSB-117A*, *AS-ACSB-203A* และ *AS-ACSB-208A* โดยตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 470 คู่เบส พบว่าตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าวในกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีน (ภาพที่ 40ค และ 40ง) และกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมและกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีนทุกต้น ตรวจพบการแสดงออกของยีน sense *ACS* ขนาด 215 คู่เบส (ภาพที่ 40ก และ 40ข) โดยพบว่าต้นที่มีการแสดงออกของยีน *AS-ACSB* มาก จะมีการแสดงออกของยีน sense *ACS* น้อยลง ได้แก่ line *AS-ACSB-203A* และ *AS-ACSB-208A* ส่วนต้นที่พบการแสดงออกของยีน *AS-ACSB* น้อย จะพบว่ามีแสดงออกของยีน sense *ACS* มาก ได้แก่ line *AS-ACSB-107A*, *AS-ACSB-108A*, *AS-ACSB-117A* (ภาพที่ 40 และตารางที่ 15)

กล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน *AS-ACOA* ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AS-ACOA* จำนวน 11 ต้น ได้แก่ line *AS-ACOA-30B*, *AS-ACOA-10C*, *AS-ACOA-11C*, *AS-ACOA-12C*, *AS-ACOA-16C*, *AS-ACOA-18C*, *AS-ACOA-29C*, *AS-ACOA-33C*, *AS-ACOA-45C*, *AS-ACOA-61C* (ภาพที่ 41ค และ 41ง) โดยตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 334 คู่เบส แต่ตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวในต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีน และตรวจพบการแสดงออกของยีน sense *ACO* ขนาด 200 คู่เบส ทุกต้น (ภาพที่ 41ก และ 41ข) โดยพบว่าต้นที่มีการแสดงออกของยีน *AS-ACOA* มาก จะมีการแสดงออกของยีน sense *ACO* น้อย ส่วนต้นที่มีการแสดงออกของยีน *AS-ACOA* น้อย จะพบการแสดงออกของยีน sense *ACO* มาก ได้แก่ line *AS-ACOA-30B*, *AS-ACOA-10C*, *AS-ACOA-11C*, *AS-ACOA-12C*, *AS-ACOA-14C*, *AS-ACOA-16C*, *AS-ACOA-18C*, *AS-ACOA-29C*, *AS-ACOA-33C*, *AS-ACOA-45C* และ *AS-ACOA-61C* (ภาพที่ 41 และตารางที่ 15)

กล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน *AS-ACOB* ตรวจพบการแสดงออกของยีน *AS-ACOB* จำนวน 2 ต้น ได้แก่ line *AS-ACOB-10B*, *AS-ACOB-11B* (ภาพที่ 42ค และ 42ง) โดยตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 334 คู่เบส ตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวในกล้วยไม้ที่ไม่ได้ถ่ายยีน และตรวจพบการแสดงออกของยีน *sense ACO* ขนาด 200 คู่เบส ทุกต้น (ภาพที่ 42ก และ 42ข) กล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการแสดงออกของยีน *AS-ACOB* มาก จะมีการแสดงออกของยีน *sense ACO* ในปริมาณน้อย ได้แก่ line *AS-ACOB-10B*, *AS-ACOB-11B* เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้ถ่ายยีน (ภาพที่ 42 และตารางที่ 15)



ภาพที่ 40 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *sense ACS* และ *AS-ACSB* ในต้นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน *pMAT21-AS-ACSB* ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ S-ACSB1F2 และ S-ACSB215R2 สำหรับยีน *sense ACS* (ก) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *sense ACS* ด้วย *sense ACS* probe (ข) ใช้ไพรเมอร์ AS-ACS400R-BstEII และ AS-ACS900F-SpeI สำหรับตรวจสอบยีน *AS-ACSB* (ค) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *AS-ACSB* ด้วย *AS-ACSB* probe (ง)

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder-DNA marker; Fermentas, Lithuania)

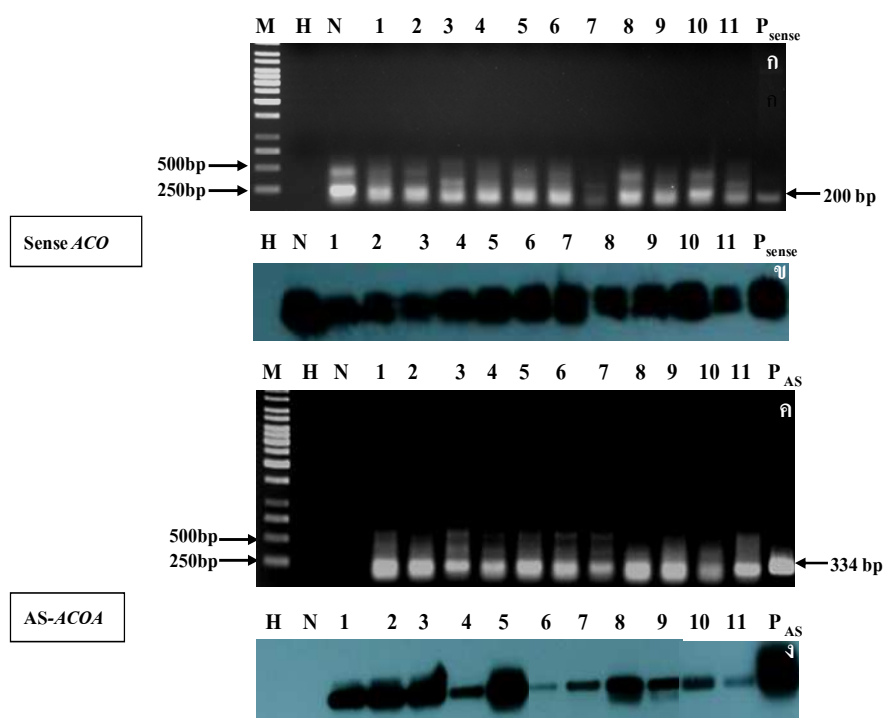
H : H₂O (น้ำ)

N : กล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนซึ่งใช้เป็น negative control

P_{sense} : พลาสมิด *pMAT21-AS-ACSB* ใช้เป็น positive control ของยีน *sense ACO*

P_{AS} : พลาสมิด *pMAT21-AS-ACSB* ใช้เป็น positive control ของยีน *AS-ACOB*

1-5 : ต้นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ *AS-ACSB-107A*, *AS-ACSB-108A*, *AS-ACSB-117A*, *AS-ACSB-203A* และ *AS-ACSB-208A*



ภาพที่ 41 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *sense ACO* และ *AS-ACO* ในต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน *pMAT21-AS-ACO* ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ S-ACO745F1 กับ S-ACO945R1 สำหรับยีน *sense ACO* (ก) และยีนย่นผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *sense ACO* ด้วย *sense ACO* probe (ข) ใช้ไพรเมอร์ AS-ACO301R-B2 และ AS-ACO635F-S1 สำหรับตรวจสอบยีน *AS-ACO* (ค) และยีนย่นผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *AS-ACO* ด้วย *AS-ACO* probe (ง)

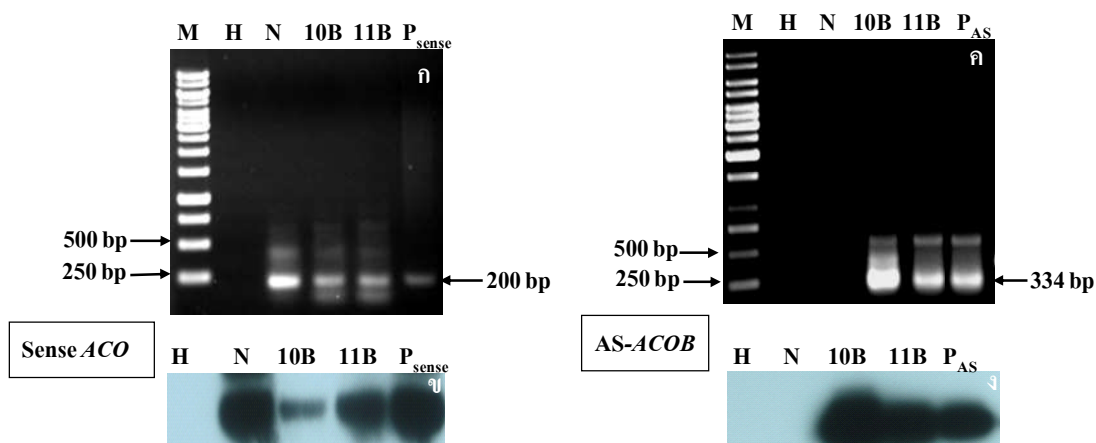
H : H₂O (น้ำ)

N : กล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งใช้เป็น negative control

P_{sense} : พลาสมิด *pMAT21-AS-ACO* ใช้เป็น positive control ของยีน *sense ACO*

P_{AS} : พลาสมิด *pMAT21-AS-ACO* ใช้เป็น positive control ของยีน *AS-ACO*

1-11 : ต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรม line-*AS-ACO*-30B, *AS-ACO*-10C, *AS-ACO*-11C, *AS-ACO*-12C, *AS-ACO*-14C, *AS-ACO*-16C, *AS-ACO*-18C, *AS-ACO*-29C, *AS-ACO*-33C, *AS-ACO*-45C, *AS-ACO*-61C



ภาพที่ 42 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *sense ACO* และ *AS-ACOB* ในต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21-*AS-ACOB* ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ S-ACOB1F2 กับ S-ACOB200R2 สำหรับยีน *sense ACO* (ก) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *sense ACO* ด้วย *sense ACO* probe (ข) ใช้ไพรเมอร์ AS-ACO301R-B2 และ AS-ACO635F-S1 สำหรับตรวจสอบยีน *AS-ACOB* (ค) และยืนยันผล PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization ตรวจสอบยีน *AS-ACOB* ด้วย *AS-ACOB* probe (ง)

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder-DNA marker; Fermentas, Lithuania)

H : H₂O (น้ำ)

N : กล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งใช้เป็น negative control

P_{sense} : พลาสมิด pMAT21-*AS-ACOB* ใช้เป็น positive control ของยีน *sense ACO*

P_{AS} : พลาสมิด pMAT21-*AS-ACOB* ใช้เป็น positive control ของยีน *AS-ACOB*

1-2 : กล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ *AS-ACOB*-10B และ *AS-ACOB*-11B

7. ผลการตรวจสอบการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอของยีน *AS-ACS* หรือ *AS-ACO* และยีน *Sense ACS* หรือ *Sense ACO* จากกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค **northern blot hybridization**

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AS-ACS* และ *AS-ACO* ในกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกด้วยเทคนิค northern blot hybridization โดยใช้ *sense ACS* RNA probe และ *sense ACO* RNA probe ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AS-ACS* และ *AS-ACO* ในกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน *AS-ACS* และ *AS-ACO* ตามลำดับ และใช้ *AS-ACS* RNA probe และ *AS-ACO* RNA probe ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *sense ACS* และ *sense ACO* ในกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน *AS-ACS* และ *AS-ACO* ตามลำดับ

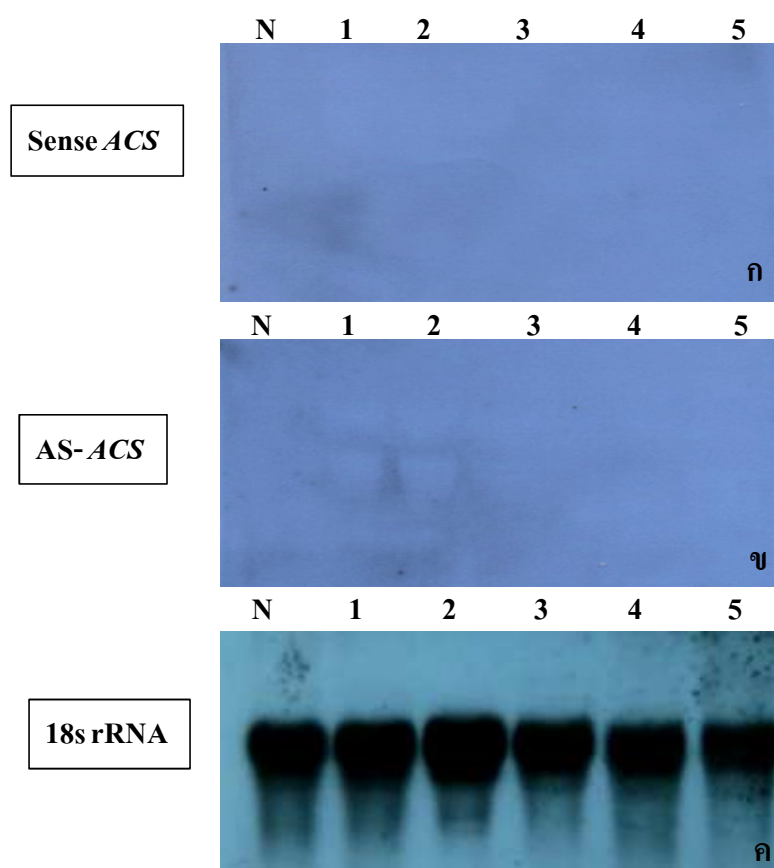
จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AS-ACSB* จากกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน *AS-ACSB* ตรวจไม่พบการแสดงออกของยีน *AS-ACSB* และ *sense ACS* (ภาพที่ 43) ทั้งนี้เป็นเพราะว่ายีน *AS-ACS* ที่นำมาใช้ในการสร้างกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมและผลิต probe เป็นยีนที่มีการแสดงออกเฉพาะในดอกเท่านั้น จึงตรวจไม่พบการแสดงออกของยีน *sense ACS* จากส่วนใบของกล้วยไม้ และการที่ตรวจไม่พบการแสดงออกของยีน *AS-ACSB* จากกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน *AS-ACSB* ด้วยเทคนิค northern blot hybridization แต่ตรวจพบด้วยเทคนิค RT-PCR อาจเป็นเพราะว่ากล้วยไม้มีการแสดงออกของยีน *AS-ACSB* น้อยมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค northern blot hybridization ได้ (ภาพที่ 43 และตารางที่ 15)

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AS-ACOA* และ *AS-ACOB* ในกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน *AS-ACOA* และ *AS-ACOB* ตรวจพบการแสดงออกยีน *AS-ACOA* และ *AS-ACOB* ทุกต้นในปริมาณที่แตกต่างกัน และตรวจพบยีน *sense ACO* ทุกต้น ซึ่งมีการแสดงออกในปริมาณที่แตกต่างกัน ต้นที่พบการแสดงออกของยีน *AS-ACO* มาก จะพบการแสดงออกของยีน *sense ACO* น้อย ได้แก่ *AS-ACOB-10B* และ *AS-ACOB-11B* ส่วนต้นที่พบการแสดงออกของยีน *AS-ACO* น้อย จะพบการแสดงออกของยีน *sense ACO* มาก ได้แก่ *AS-ACOA-30B*, *AS-ACOA-10C*, *AS-ACOA-11C*, *AS-ACOA-12C*, *AS-ACOA-14C*, *AS-ACOA-16C*, *AS-ACOA-18C*, *AS-ACOA-29C*, *AS-ACOA-33C*, *AS-ACOA-45C* และ *AS-ACOA-61* (ภาพที่ 44 และตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AS-ACS* และ *AS-ACO* ในระดับอาร์เอ็นเอของ
กล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี RT-PCR และ northern blot analysis

ชนิดของชุดยีนที่ ถ่ายเข้าสู่กล้วยไม้ / line	จำนวนชุดของ ยีน AS-ACS และ AS-ACO ที่ตรวจพบ(ชุด)	การแสดงออกของยีน AS-ACS และ AS-ACO ด้วยวิธี RT-PCR		การแสดงออกของยีน AS-ACS และ AS-ACO ด้วยวิธี northern blot analysis	
		sense	AS	sense	AS
ยีน AS-ACS ส่วน B					
AS-ACSB-107A	1	++	++	-	-
AS-ACSB-108A	1	++	++	-	-
AS-ACSB-117A	1	+++	++	-	-
AS-ACSB-203A	1	++	+++	-	-
AS-ACSB-208A	1	++	+++	-	-
ยีน AS-ACO ส่วน A					
AS-ACOA-30B	2	++	++	++	++
AS-ACOA-10C	2	++	++	++	++
AS-ACOA-11C	3	++	++	+	+
AS-ACOA-12C	2	++	+	+	+
AS-ACOA-14C	2	+++	+++	++	++
AS-ACOA-16C	3	++	+	+	+
AS-ACOA-18C	2	+++	+	++	+
AS-ACOA-29C	4	++	++	++	+
AS-ACOA-33C	2	++	+	++	+
AS-ACOA-45C	3	++	++	+	+++
AS-ACOA-61C	2	++	+	+	++
ยีน AS-ACO ส่วน B					
AS-ACOB-10B	1	+	+++	+	+++
AS-ACOB-11B	1	++	++	+	+++

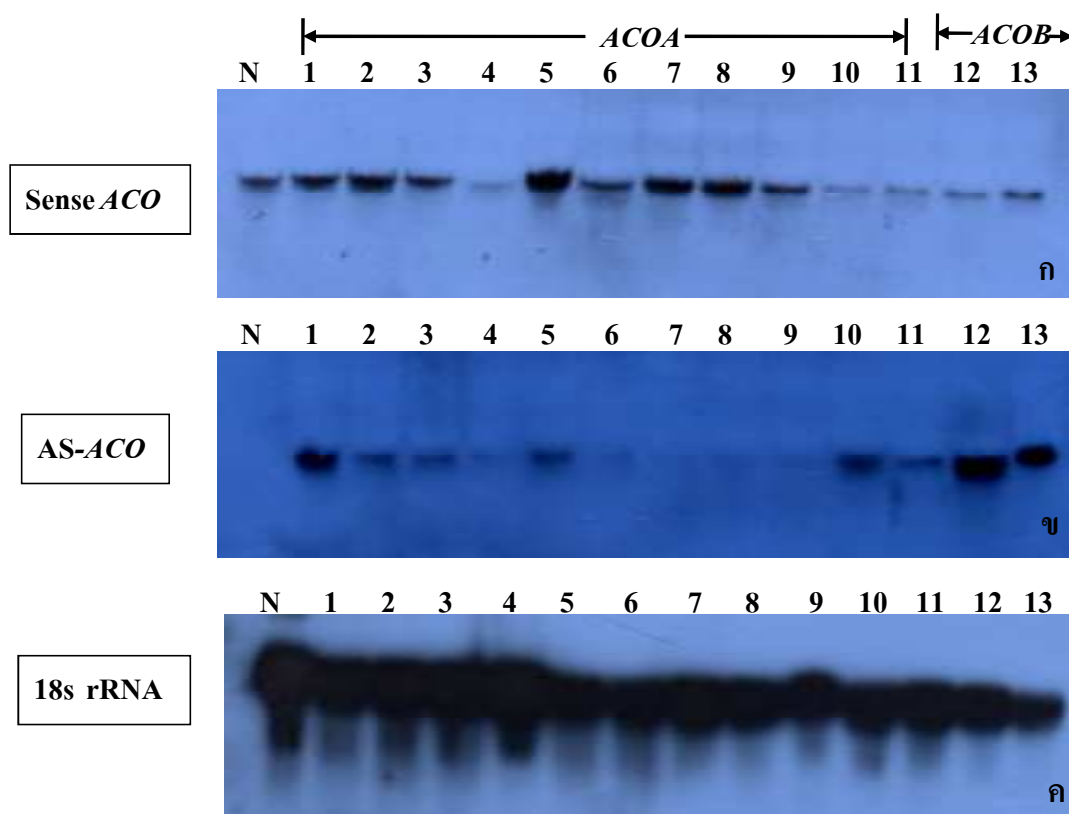
หมายเหตุ + = การแสดงออกของยีนในระดับต่ำ, ++ = การแสดงออกของยีนในระดับปานกลาง
+++ = การแสดงออกของยีนในระดับมาก, - = ไม่พบการแสดงออกของยีน



ภาพที่ 43 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน sense *ACS* (ก) ยีน *AS-ACSB* (ข) ยีน 18s rRNA (ค) ในต้นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21-*AS-ACO1* โดยใช้เทคนิค northern blot hybridization ตรวจสอบด้วย *AS-ACS* RNA probe, sense *ACS* RNA probe และ 18s rRNA ตามลำดับ

N : กล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนซึ่งใช้เป็น negative control

1-5 : ต้นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรม line *AS-ACSB-107A*, *AS-ACSB-108A*, *AS-ACSB-117A*, *AS-ACSB-203A* และ *AS-ACSB-208A*



ภาพที่ 44 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน sense *ACO* (ก) ยีน *AS-ACO* และ *AS-ACOB* (ข) ยีน 18s rRNA (ค) ในต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21-*AS-ACO*A และ pMAT21-*AS-ACOB* โดยใช้เทคนิค northern blot hybridization ตรวจสอบด้วย *AS-ACO* RNA probe, sense *ACO* RNA probe และ 18s rRNA ตามลำดับ

N : กล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งใช้เป็น negative control

1-11 : กล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21-*AS-ACO*A line ต่าง ๆ ดังนี้ *AS-ACO*A-30B, *AS-ACO*A-10C, *AS-ACO*A-11C, *AS-ACO*A-12C, *AS-ACO*A-14C, *AS-ACO*A-16C, *AS-ACO*A-18C, *AS-ACO*A-29C, *AS-ACO*A-33C, *AS-ACO*A-45C และ *AS-ACO*A-61C,

12-13 : กล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21-*AS-ACOB* line ต่าง ๆ ดังนี้ *AS-ACOB*-10B และ *AS-ACOB*-11B

วิจารณ์

การถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์โดยใช้เวกเตอร์ pMAT21 จำเป็นต้องศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการถ่ายยีน โดยที่กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและมีเชื้ออะโกรแบคทีเรียบางสายพันธุ์เท่านั้นที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยว จึงจำเป็นต้องศึกษาทดสอบสายพันธุ์และปริมาณความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ใช้ในการถ่ายยีน จากรายงานต่าง ๆ พบว่าเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ใช้สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่พืชมีหลายสายพันธุ์ เช่น EHA101, EHA105, AGL0, AGL-1, C58 และ LBA4404 ดังนั้นควรเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเข้าสู่เซลล์พืชสูง มีความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เหมาะสมกับชนิดของพืช โดยปริมาณเชื้อมากเป็นเพิ่มโอกาสให้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเข้าสู่เซลล์พืชได้มากขึ้น แต่ถ้าปริมาณเชื้อมากเกินไปทำให้กำจัดเชื้อภายหลังการถ่ายยีนได้ยากและมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช ทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำลง (Lin *et al.*, 1994) นอกจากนี้ระยะเวลา co-cultivation ระหว่าง PLBs กับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมากหรือน้อยแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ชนิดของพืช ประเภทของเนื้อเยื่อที่นำมาใช้ในการถ่ายยีน นอกจากนี้วิธีการ co-cultivation และอาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน ก็มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน (Mondal *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001) ภายหลังการถ่ายยีนต้องมีการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย โดยสารปฏิชีวนะซึ่งนิยมใช้กันมี 3 ชนิด คือ cefotaxime, carbenicillin และ vancomycin โดยสารปฏิชีวนะเหล่านี้จะต้องไม่ทำลายเนื้อเยื่อพืช ข้อคำนึงถึงในการเลือกใช้สารปฏิชีวนะเหล่านี้ ได้แก่ ชนิดพืช, สายพันธุ์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย, สารปฏิชีวนะที่ใช้คัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน และชนิดของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย (Silva and Fukai., 2001)

การทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียที่บรรจุเวกเตอร์ pMAT21 ซึ่งมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผลและยีน *ipt* เป็นยีนคัดเลือก พบว่าการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ความเข้มข้น $\sim 4.1 \times 10^{17}$ cfu/ml และการ co-cultivation ระหว่างสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียกับ PLBs ของกล้วยไม้ร่วมกับสาร celite ความเข้มข้น 4.5 กรัมต่อลิตร ด้วยวิธีการใช้เครื่อง vortex mixer ที่ความเร็วระดับ 7 เป็นเวลา 30 นาที เป็นวิธีที่เหมาะสมในการถ่ายยีน และใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียภายหลังการถ่ายยีน โดยไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของ PLBs กล้วยไม้

Liau *et al.* (2003) ถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลออนซีเดียม ‘Sherry Baby cv. OM8’ โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ซึ่งบรรจุ พลาสมิด pCAMBIA 1301 พบจุดสีน้ำเงินที่ใบกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน และตรวจพบยีน *gus* แทรกในจีโนมของพืช 1 ชุค จำนวน 6 ต้น คิดเป็น 21 % เช่นเดียวกับการทดลองของ Sreeramanan *et al.* (2008) ที่ถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ *Phalaenopsis* ด้วยเวกเตอร์ pCAMBIA1304 พบว่าการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ให้เปอร์เซ็นต์การติดสีน้ำเงินของยีน *gus* สูงกว่าสายพันธุ์ EHA101 แต่ Chai *et al.* (2002) ใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่บรรจุพลาสมิด pTOK 233 ในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ *Phalaenopsis* 4 สายพันธุ์ ได้แก่ T0, T5, T10 และ Hikaru พบว่าความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสม คือ $OD_{600} = 0.2$ มีการแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด De Bondt *et al.* (1994) กล่าวว่าปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่พืช นอกจากความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียแล้ว ยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย และชนิดพืช แต่การใช้ความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่สูงเกินไป ทำให้การเจริญเติบโตของพืชลดลงและเนื้อเยื่อพืชตายภายหลังการถ่ายยีน (Wilson *et al.*, 2006) แต่มีพืชบางชนิดที่ต้องอาศัยเชื้ออะโกรแบคทีเรียปริมาณมากในการส่งถ่ายยีน เช่น กล้วยไม้ *Phalaenopsis* โดยใช้ระยะเวลาในการบ่มเชื้ออะโกรแบคทีเรียร่วมกับเนื้อเยื่อกล้วยไม้ที่สั่นลงและมีการเติมสาร L-cysteine และกรด ascorbic ลงในอาหารเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ เพื่อป้องกันเนื้อเยื่อกล้วยไม้เกิดสภาวะเครียด ยับยั้งการตายของเนื้อเยื่อพืชได้ (Sreeramanan *et al.*, 2008) Wilson *et al.* (2006) พบว่าความเข้มข้นของเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่แตกต่างกัน มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน โดยอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ในช่วง $OD_{600} = 0.8$ มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ $\sim 1 \times 10^7$ cfu/ml ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการถ่ายยีนเข้าสู่ *Melastomataceae malabathricum* และ *Tibouchina semidecandra* และได้ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่ส่วนต่าง ๆ เช่น ขั้วและยอดของ *M. malabathricum* โดยใช้ค่า OD_{600} เดียวกัน พบว่ามีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนลดลง แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ ชนิดของพืชที่ใช้ในการถ่ายยีน และชิ้นส่วนของพืชที่นำมาถ่ายยีนด้วย เช่น ใบ ขั้ว ยอด และโปรโตคอร์ม เป็นต้น

ระยะเวลาในการปลูกเชื้อในแต่ละพืชแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและชิ้นส่วนที่นำมาใช้ในการถ่ายยีนด้วย เช่น การถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลแวนด้า โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA101 ที่บรรจุเวกเตอร์ pIG121Hm ซึ่งมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล และยีนคัดเลือกคือ ยีน *hpt* และ *npII* พบว่าปัจจัยที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีน คือ การบ่มเชื้ออะโกรแบคทีเรียร่วมกับโปรโตคอร์ม เป็นเวลา 240 นาที ร่วมกับวิธี sonication เป็นเวลา 5 นาที ทำให้โปรโตคอร์มเกิดบาดแผล ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนและพบการแสดงออกของยีน *gus* ได้ดี

ขึ้น (Shrestha *et al.*, 2007) Belarmino and Mii (2000) ถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ *Phalaenopsis* ลูกผสมระหว่าง [*Doritaenopsis* Coral Fantasy×*Phalaenopsis* (Baby Hat×Ann Jessical)] โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่บรรจุพลาสมิด pTOK233 และสายพันธุ์ EHA101 ที่บรรจุพลาสมิด pIG121Hm มียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล พบว่าการ co-cultivation PLBs ร่วมกับสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นเวลา 10 ชั่วโมง สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีน โดยพบการแสดงออกของยีน *gus* เกิดจุดสีน้ำเงินที่แคลลัส ใบ และราก

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทดลองเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนโดยการเติมสาร celite ซึ่ง เป็นสารที่ทำให้เกิดบาดแผลบน PLBs พบว่าเกิดจุดสีน้ำเงินหนาแน่นมากยิ่งขึ้น เนื่องจากเชื้ออะโกรแบคทีเรียสามารถส่งถ่ายยีนเข้าสู่ PLBs ได้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของน้ำทิพย์ (2544) ถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวไร่พันธุ์เจ้าสอโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 โดยเติมสาร celite 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในช่วงการ co-cultivation ทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนได้ดีขึ้น โดยพบการเกิดสีน้ำเงินของยีน *gus* จาก 12 เป็น 30 เปอร์เซ็นต์

การกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียภายหลังการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ โดยใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า PLBs สามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ สอดคล้องกับการใช้สารปฏิชีวนะที่ความเข้มข้นดังกล่าวในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียภายหลังการถ่ายยีนในกล้วยไม้ *Phalaenopsis* (Chai *et al.*, 2002) แต่ Belarmino and Mii (2000) รายงานการใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime 300 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียภายหลังการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้พันธุ์เดียวกัน และมีรายงานว่าเมื่อใช้ timentin 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลออนชidium (Liau *et al.*, 2003)

ในการทดลองครั้งนี้ได้นำยีน *ACS* หรือ *ACO* เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pMAT21 .ในลักษณะที่เป็น antisense orientation เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย โดยเวกเตอร์นี้มียีน *ipt* ที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมนไซโตไคนินเป็นยีนคัดเลือก ทำให้สามารถคัดเลือกเนื้อเยื่อกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน จากลักษณะการเจริญเป็นยอดกระจุก (*ipt-shooty*) (Ebinuma *et al.*, 2001; Ebinuma and Komamine, 2001) จากนั้นยอดกระจุกสามารถพัฒนาเป็นยอดปกติได้ภายหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีการเติมฮอร์โมน เนื่องจาก การตัดยีน *ipt* ออกจากจีโนมของกล้วยไม้โดยกระบวนการ site-specific recombination ในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้โดยใช้เวกเตอร์ pMAT21 เนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนมีการพัฒนาเกิดเป็นยอด

กระจกที่เกาะตัวกันแน่น ซึ่งเป็นผลมาจากการแสดงออกของยีน *ipt* ทำให้มีการสร้างฮอร์โมนไซโตไคนินมากขึ้น แต่ก็พบว่าเนื้อเยื่อกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนก็มีการพัฒนาเกิดเป็นยอดกระจกเช่นเดียวกัน แต่ไม่เกาะตัวกันหนาแน่นเหมือนกับยอดกระจกที่พัฒนามาจากเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งทำให้เกิดปัญหาในการคัดเลือก ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการคัดเลือกยอดกระจกที่ได้รับการถ่ายยีน มีการทดลองใช้โปรโมเตอร์ต่าง ๆ เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีน *ipt* ที่เหมาะสม โดย Ebinuma *et al.* (2000) ถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบและ aspen โดยใช้โปรโมเตอร์ที่แตกต่างกันควบคุมการทำงานของยีน *ipt* ได้แก่ CaMV-35S promoter, *ipt* promoter และ ribulose-1,5-biphosphate carboxylase small subunit 3B promoter พบว่ายาสูบมีการพัฒนาเป็นยอดกระจกที่สูงขึ้น แต่การใช้ *rbcS* 3B promoter ทำให้อาสาสามารถพัฒนาเป็นยอดกระจกสูงกว่าการใช้ CaMV-35S promoter และ *ipt* promoter โดยมีประสิทธิภาพการถ่ายยีนเพิ่มขึ้น 10 เท่า และลดระยะเวลาในการพัฒนาเป็นยอดกระจกของยาสูบด้วย Richael *et al.* (2008) ถ่ายยีนเข้าสู่พืชตระกูล Solanaceous ใช้เวกเตอร์ pSIM108 ที่ใช้โปรโมเตอร์ Ubiquitin-3 (Ubi3) ควบคุมการทำงานของยีน *ipt* ทำให้มันฝรั่งพัฒนาเป็นยอดกระจกได้ถึง 93.4 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้อาจใช้ยีนคัดเลือกอื่นร่วมกับยีน *ipt* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกยอดกระจก โดย Endo *et al.* (2002) ศึกษาการใช้เวกเตอร์ pIPTIMH ซึ่งมียีน *ipt* ร่วมกับยีน *iaaM/H* ควบคุมการสร้างฮอร์โมนออกซิน เป็นยีนคัดเลือก เพื่อถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบ พบว่าสามารถคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนสูงขึ้นถึง 80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ใช้ *GST* promoter ซึ่งเป็น inducible promoter ควบคุมการทำงานของยีน recombinase ทำให้ได้ยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกสูงถึง 41.6%

ในการทดลองนี้สามารถสร้างกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกได้แต่พบว่ามีประสิทธิภาพต่ำ ประมาณ 1-7% เนื่องจากการทำงานของยีน *recombinase* ในเวกเตอร์ pMAT21 ควบคุมโดย 35S-promoter ซึ่งเป็น constitutive promoter ทำให้มีการแสดงออกตลอดเวลาในทุกส่วนของเนื้อเยื่อพืช ซึ่งบางครั้งมีการกำจัดยีน *ipt* ตั้งแต่ในระยะแรก ๆ ของการพัฒนาของเนื้อเยื่อภายหลังการถ่ายยีน ทำให้เนื้อเยื่อดังกล่าวไม่เกิดเป็นยอดกระจกที่เกาะตัวกันอย่างหนาแน่น ทำให้ยากต่อการคัดเลือกหรือบางครั้งเกิดการผิดพลาดคัดเลือกเนื้อเยื่อดังกล่าวทิ้งไป เพราะเข้าใจผิดว่าเป็นเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ดังนั้นเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวจึงมีการศึกษาการใช้ inducible promoter เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีน recombinase เช่น *GST-II-27* promoter ของ glutathione-S-transferase gene จากข้าวโพด โดยใช้สารเคมี Safener กระตุ้นการทำงานของ *GST-II-27* promoter เพื่อชักนำให้ยอดกระจกของยาสูบพัฒนาเป็นยอดปกติ และสร้างยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนคัดเลือกได้ถึง 14 เปอร์เซ็นต์ (Sugita *et al.*, 2000) Schaart *et al.* (2004) ศึกษาการใช้ยีนคัดเลือกเชิงลบ (negative selection) คือ ยีน cytosine deaminase (*codA*)

ร่วมกับยีนคัดเลือก *nptII* สำหรับถ่ายยีนเข้าสู่สตรอเบอร์รี่ ซึ่งยีน *codA* ซึ่งไวต่อสาร 5-fluorocytosine (5-FC) โดยในระยะแรกทำการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนที่สามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน หลังจากนั้นทำการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่มีการกำจัดยีนคัดเลือกบนอาหารที่เติมด้วยสาร 5-FC เนื้อเยื่อที่ยังคงมียีนคัดเลือกทั้งสองคือยีน *nptII* และยีน *codA* เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารดังกล่าวจะตาย ส่วนเนื้อเยื่อที่มีการกำจัดยีนคัดเลือกออกสามารถเจริญเติบโตได้

ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งในการผลิตและส่งออกกล้วยไม้ คือ การร่วงโรยของดอกซึ่งมีสาเหตุมาจากเอทิลีนซึ่งทำให้สูญเสียมูลค่าของดอกกล้วยไม้ ปัจจุบันนี้มีการแก้ปัญหาดังกล่าวทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่นิยมได้แก่การใช้สารละลาย silver thiosulfate (Veen, 1979) สาร 1-methylcyclopropane (1-MCP) (ศิริพิมล และคณะ, 2550) และ 1,1-dimethyl-4-(phenylsulfonyl) semicarbazide (DPSS) (Midoh *et al.*, 1996) ถึงแม้สารทั้งสามชนิดจะใช้ได้ผลดี แต่ก็มีขั้นตอนและวิธีการใช้ที่ยุ่งยาก นอกจากนี้สารเงิน (silver) ที่ตกค้างก็เป็นอันตรายต่อสุขภาพและสาร 1-MCP เมื่อพืชสร้างตัวรับเอทิลีนขึ้นมาใหม่ก็ไม่สามารถป้องกันการผลิตเอทิลีนได้ ดังนั้นการพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้ให้มีอายุการปักแจกันนานขึ้น โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ได้แก่ เทคโนโลยี antisense และเทคโนโลยี RNA interference (RNAi) เป็นทางเลือกหนึ่งในการช่วยลดปัญหาและความเสียหายต่อดอกกล้วยไม้ที่ส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศ เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับอุตสาหกรรมการส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกของไทย

โดยในการทดลองครั้งนี้ใช้เทคโนโลยี antisense RNA ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ให้มีอายุการปักแจกันยาวนานขึ้น พบว่าจากการตรวจการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน AS-ACSB ได้แก่ line AS-ACSB-203A และ AS-ACSB-208A มีการแสดงออกของยีน AS-ACSB มาก และพบการแสดงออกของยีน sense ACS น้อยลง ในการตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR แต่เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค northern blot analysis ไม่พบการแสดงออกของยีน AS-ACS และยีน sense ACS ทั้งนี้เป็นเพราะว่ายีน AS-ACS ที่นำมาใช้ในการสร้างกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรม เป็นยีนที่มีการแสดงออกเฉพาะในดอกเหี่ยวเท่านั้น จึงตรวจไม่พบการแสดงออกของยีน sense ACS จากส่วนใบของกล้วยไม้ ให้ผลเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Yu *et al.* (2000) ได้ถ่ายยีน sense/antisense *DOHI* (*Dendrobium orchid homeobox1*) เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ Madame Thong-In โดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้าง shoot apical meristem (SAM) และการออกดอก (early flowering) ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีน *DOHI* ในใบอ่อนและใบแก่ของกล้วยไม้ได้ แต่จะตรวจพบการแสดงออกที่ leaf primordial ได้ Lanahan *et al.* (1994) ศึกษาการแสดงออกของยีน ACS ในมะเขือ

เทศดัดแปลงพันธุกรรม พบการแสดงออกของยีน *ACS* ปริมาณมากที่ก้านใบและดอกในระยะก่อนการร่วงโรยและหลุดร่วง แต่พบการแสดงออกของยีน *ACS* ไม่เด่นชัดในใบที่ร่วงโรย (senescence) ในกรณีของต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน *AS-ACO* มีการแสดงออกของยีน *AS-ACO* ในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังนี้เพราะยีนดังกล่าวไปแทรกตัวยังตำแหน่งที่ไม่ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน (gene silencing) และขึ้นกับจำนวนชุดของยีน ทำให้พบการแสดงออกของยีน sense *ACO* มากกว่ายีน *AS-ACO*

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้โดยใช้ antisense RNA technology ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอทิลีน ได้แก่นิย *ACS* และยีน *ACO* ทำให้ชะลอการร่วงโรยของดอกไม้เช่นรายงานของ Iwazaki *et al.* (2004) ถ่ายยีน sense/antisense *ACS* เข้าสู่คาร์เนชัน (*Dianthus caryophyllus* L. cv. Nora) โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ได้คาร์เนชันดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน sense *ACS* จำนวน 2 lines และได้รับยีน antisense *ACS* จำนวน 3 lines สามารถยับยั้งการสร้างเอทิลีนในระหว่างที่ดอกคาร์เนชันเกิดการร่วงโรยเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และ line sense *ACS-1* ที่ได้รับยีน sense *ACS* สามารถลดการสร้างเอทิลีนและดอกคาร์เนชันมีอายุการปักแจกันที่ยาวนานขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากตำแหน่งและจำนวนชุดของยีน sense *ACS* ที่เข้าไปแทรกตัวในโครโมโซมพืชที่ตำแหน่งต่าง ๆ กัน โดยบางตำแหน่งอาจทำให้เกิด silencing ของยีน endogenous *ACS* ทำให้ยีนดังกล่าวไม่สามารถแสดงออกได้และทำให้ยีนมีการแสดงออกในระดับที่แตกต่างกัน และการที่ยีน sense *ACS* ยับยั้งการแสดงออกของยีน endogenous *ACS* ได้ดี ยีน antisense *ACS* เนื่องจากยีนดังกล่าวมีการแสดงออกในลักษณะที่เรียกว่า co-expression ร่วมกับยีน endogenous *ACS* ภายในพืชเอง (Iwazaki *et al.*, 2004) Kosugi *et al.* (2000) กล่าวเช่นเดียวกันว่าคาร์เนชันที่ถ่ายยีน sense *ACO* มีการสร้างเอทิลีนในดอกลดลง ซึ่งเกิดจากกระบวนการ co-suppression ร่วมกับยีน endogenous *ACO* ทำให้อายุการปักแจกันนานขึ้น Kinouchi *et al.* (2006) ถ่ายยีน sense/antisense *ACO* เข้าสู่ดอกคาร์เนชัน (*D. caryophyllus* L. cv. Lillipot) พบว่าการแสดงออกของยีน sense *ACO* ลดลง ทำให้กิจกรรมของ ACC oxidase ภายในพืชลดลงในบางสายพันธุ์ของคาร์เนชันดัดแปลงพันธุกรรม

ในการทดลองครั้งนี้สามารถสร้างกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน *AS-ACS* หรือ *AS-ACO* ที่ปราศจากยีนคัดเลือกและพบการแสดงออกของยีน endogenous *ACS* หรือ *ACO* ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งต้นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะมีอายุการปักแจกันที่นานขึ้น ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์ในการสร้างกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่สามารถยืดอายุการปักแจกันของดอกกล้วยไม้สกุลหวายได้ในอนาคต

สรุป

งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษา 2 เรื่องได้แก่ การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ โดยการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียที่บรรจุเวกเตอร์ pMAT 21 และการถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอทิลีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ โดยใช้เวกเตอร์ pMAT21 เพื่อสร้างกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนเป้าหมายและปราศจากยีนคัดเลือก ซึ่งได้สรุปผลการทดลองดังนี้

1. การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ โดยการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียที่บรรจุเวกเตอร์ pMAT21

1.1 เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 มีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้พันธุ์ปอมปาดัวร์ได้ดีกว่าสายพันธุ์ AGL-1 และ C58 เนื่องจากมีรายงานว่าอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 เหมาะสำหรับการใช้ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจึงเลือกใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ในการถ่ายยีน

1.2 ปริมาณเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 :: pMAT21 vector ที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ คือ เชื้ออะโกรแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นเมื่อวัดค่า OD₆₀₀ ในช่วง 1.61-2.00 และเจือจางเชื้อ 1:1 ซึ่งมีปริมาณเชื้อ $\sim 4.1 \times 10^{17}$ cfu/ml

1.3 วิธีการและเวลาที่เหมาะสมในการทำ co-cultivation คือ วิธีผสมสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียกับเนื้อเยื่อกล้วยไม้โดยใช้เครื่อง vortex mixer ที่ความเร็วระดับ 7 เป็นเวลา 30 นาที

1.4 การเติมสาร celite ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดบาดแผล ลงในสารแขวนลอยเชื้ออะโกรแบคทีเรียในช่วงการทำ co-cultivation ที่ความเข้มข้น 4.5 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 นาที ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อกล้วยไม้ได้ดีที่สุด

1.5 การกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียจาก PLBs ภายหลังจากถ่ายยีนโดยใช้ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออะโกรแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกล้วยไม้

2. การถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอทิลีนคือ ยีน *ACS* และ *ACO* เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์โดยใช้เวกเตอร์ pMAT21 เพื่อสร้างกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีนเป้าหมายและปราศจากยีนคัดเลือก

การทดลองครั้งนี้ทำการแบ่งยีน *ACS* และ *ACO* ออกเป็นส่วนต่าง ๆ 3 ส่วน ได้แก่ บริเวณ 5' ของยีน, บริเวณ central region และบริเวณ 3' ของยีน ซึ่งเรียกว่า *ACSA*, *ACSB*, *ACSC* สำหรับยีน *ACS* และ *ACOA*, *ACOB*, *ACOC* สำหรับยีน *ACO* ตามลำดับ จากนั้นทำการสร้างชุดยีนแต่ละส่วนดังกล่าวในลักษณะ antisense orientation เข้าสู่เวกเตอร์ pMAT21 เพื่อถ่ายเข้าสู่กล้วยไม้โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย พบว่าภายหลังจากถ่ายยีน 3-4 เดือน PLBs พัฒนาเป็นยอดกระจุกที่เกาะตัวกันแน่น และเกิดการพัฒนาด้านปกติจากยอดกระจุกดังกล่าวภายหลังจากถ่ายยีน 6-8 เดือน หลังจากนั้นนำต้นปกติมาตรวจสอบด้วยวิธี Southern blot analysis พบว่ากล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน AS-*ACSB* และยีน AS-*ACOB* มียีนแทรกตัวอยู่ในจีโนม 1 ชุด จำนวน 5 และ 2 ดันตามลำดับ ในขณะที่กล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน AS-*ACOA* มียีนแทรกตัวอยู่ในจีโนมตั้งแต่ 2-4 ชุด โดยต้นกล้วยไม้ดังกล่าวทุกต้นปราศจากยีนคัดเลือก จากการตรวจการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ พบว่าต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน AS-*ACSB* ได้แก่ line AS-*ACSB*-203A และ AS-*ACSB*-208A มีการแสดงออกของยีน AS-*ACSB* มาก และพบการแสดงออกของยีน sense *ACS* น้อยลง และในต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน AS-*ACOA* มีการแสดงออกของยีน AS-*ACOA* ในปริมาณที่แตกต่างกันและในต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน AS-*ACOB* ได้แก่ line AS-*ACOB*-10B และ AS-*ACOB*-11B มีการแสดงออกของยีน AS-*ACOB* มาก และพบการแสดงออกของยีน sense *ACO* น้อยลง ดังนั้นการถ่ายยีน AS-*ACS* หรือ AS-*ACO* ด้วยเวกเตอร์ pMAT21 สามารถสร้างกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน AS-*ACS* หรือ AS-*ACO* และปราศจากยีนคัดเลือกได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กนกพร บุญญะอดิชาติ. 2541. อิทธิพลของละอองเกสรจากดอกไม้ชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการผลิต
เอทธิลีนและการเสื่อมสภาพของดอกกล้วยไม้หวายปอมปาด้วรั้วภายหลังการถ่ายละออง
เกสร. ปัญหาพิเศษปริญญาโท. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ . 45 น.
- ครรชิต ธรรมศิริ. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. อัมรินทร์พรินต์ติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด
(มหาชน) กรุงเทพฯ. 283 น.
- จิตรพรพรรณ พิลึก. 2537. กล้วยไม้ในไม้ตัดดอกเขตร้อน. กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริม
การเกษตร. 10-34 น.
- จริงแท้ สิริพานิช. 2550. ชีววิทยาหลังการเก็บเกี่ยวและการหายใจของพืช. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและ
ฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ, นครปฐม. 453 น.
- น้ำทิพย์ พิรณฤทธิ. 2544. การถ่ายยีนจากไวรัสสาเหตุโรคของข้าวให้กับข้าวไร่. วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 97 น.
- ประภาพร ไชยเจริญ. 2539. ความสัมพันธ์ระหว่างการผสมเกสร การผลิตเอทธิลีน และการ
เสื่อมสภาพของดอกกล้วยไม้หวายชัชวาล์ 4N. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาพืชสวน
คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 82 น.
- วชิรญา อิมสบาย. 2542. ผลของการลดอุณหภูมิ ตัวดูดเอทธิลีนและสารละลายเคมียืดอายุปักแจกัน
ต่อคุณภาพของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาพืชสวน คณะ
เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 48 น.
- สาขชล กตุษา. 2530. เทคนิคในการปฏิบัติงานเพื่อรักษาคุณภาพของดอกกล้วยไม้โดยผู้ส่งออก.
วิทยาสารเกษตรศาสตร์ (สงคม) 8: 118-122.

สายชล เกตุษา. 2531. เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวของดอกไม้. บริษัท สารมวลชน จำกัด, กรุงเทพฯ. 291 น.

สายชล เกตุษา, ฟองจันทร์ ธรรมพิทักษ์กร, จิตรา ตระกูลนำเลื่อมใส และ วชิรญา อิ่มสบาย.

2540. รายงานวิจัยการศึกษาควบคุมการสร้างและการทำงานของเอทิลีนที่มีผลต่อคุณภาพและอายุการปักแจกันของดอกกล้วยไม้หวายเพื่อการส่งออก. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 151 น.

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. 2548. โรคไม้ดอก. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 3 น.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร โดยความร่วมมือของกรมศุลกากร. 2552. ปริมาณและมูลค่าการส่งออกดอกกล้วยไม้สด ปี 2549-2552. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2552. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. แหล่งที่มา: <http://www.oae.go.th/statistic/export/QVExp.xls>, 20 มีนาคม 2552.

ศิริพิมล หงษ์เหม วิไลภรณ์ บุญญกิจจินดา อภิรดี อุทัยรัตนกิจ และกุลนาถ อบสุวรรณ. 2550. ผลของระยะเวลาในการรม 1-MCP ต่ออายุการปักแจกันของกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ *Mokara Jairak Gold*. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 38(6): 255-258.

อภิญญา วิสุทธีอมรกุล. 2544. การเปลี่ยนแปลงหลังการเก็บเกี่ยวด้านสรีระของดอกกล้วยไม้หวายปอมปาดัวร์ในการตอบสนองต่อการผสมเกสร. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 47 น.

อารีรัตน์ การุณสถิตย์ชัย. 2547. อิทธิพลของดอกบานที่มีผลต่อการร่วงและการบานของดอกตูมในกล้วยไม้สกุลหวายหลังการเก็บเกี่ยว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 131 หน้า

อบฉันท์ ไทยทอง. 2543. กล้วยไม้เมืองไทย. สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ. 461 น.

- Abeles, F. B., P. W. Morgan and M. E. Saltveit. 1992. **Ethylene in Plant Biology**. Academic Press, California. Inc. Sandiego. 414 p.
- Aida, R., T. Yoshida, K. Ichimura, G. Goto and M. Shibata. 1998. Extension of flower longevity in transgenic torenia plants incorporating *ACC oxidase* transgene. **Plant Sci.** 138: 91-101.
- Araki, H., A. Jearnpipatkul, H. Tatsumi, T. Sakurai, K. Ushino, T. Muta and Y. Oshima. 1987. Molecular and functional organization of yeast plasmid pSR1. **J. Mol. Biol.** 182: 191-203.
- Ballester, A., M. Cervera and L. Pena. 2007. Efficient production of transgenic citrus plants using isopentenyl transferase positive selection and removal of marker gene by site-specific recombination. **Plant Cell Rep.** 26:39-45.
- Belarmino, M. M. and M. Mii. 2000. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Phalaenopsis* orchids. **Plant Cell Rep.** 19: 435-442.
- Bolitho, K., M. Lay-Lee, M. L. Knighton and G. S. Ross. 1997. Antisense apple *ACC oxidase* RNA reduces ethylene production in transgenic tomato fruit. **Plant Sci.** 122: 91-99.
- Borochoy, A and W. R. Woodson. 1989. Physiology and biochemistry of flower petal senescence. **Hort. Rev.** 11: 15-43.
- Brian, M and M. Sylvia. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. **J. Biotech.** 107: 193-232.
- Bukovinszki, A., Z. Diveki, M. Csanyi, L. Palkovics and E. Balazs. 2007. Engineering resistance to PVY in different potato cultivars in a marker-free transformation system using a 'shooter mutant' *A. tumefaciens*. **Plant Cell Rep.** 26: 459-465.

- Chai, M. L., C. J. Xu, K. K. Senthil, J. Y. Kim and D. H. Kim. 2002. Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchids mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Science Hort.** 96: 213-224.
- Chakraborti, D., A. Sarkar, H. A. Mondal, D. Schuermann, B. Hohn, B. K. Sarmah and S. Das. 2008. Cre/lox system to develop selectable against sap sucking homopteran insect. **Plant Cell Rep.** 27(10): 1623-1633.
- Crozier, A., Y. Kamiya, G. Bishop and T. Yokota. 2000. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules, pp. 850-929. *In* B. B. Buchanan, W. Gruissem and R. L. Jones (eds.) **Biochemistry and Molecular Biology of plants.** American. Socie. plant physiol, Rockville.
- Cui, M., K. Takayanagi, H. Kamada, S. Nishimura and T. Handa. 2001. Efficient shoot regeneration from hairy roots of *Antirrhinum majus*, L. transformed by the the *rol*-type MAT vector system. **Plant Cell Rep.** 20: 55-59.
- Dale, E. C. and D. W. Ow. 1991. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the genome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 88:10558-10562.
- Daley, M., V. C. Knauf, K. R. Summerfelt and J. C. Turner. 1998. Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants. **Plant Cell Rep.** 17: 489-496.
- De Bondt, A., K. Eggermont, P. Druart, M. D. Vil, L. Goderis, J. Vanderleyden and W. F. Broekaert. 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. **Plant Cell Rep.** 13: 587-593.

- Ebinuma, H., K. Sugita, E. Matsunaga and M. Yamakado. 1997a. Selection of marker-free transgenic plants using the *isopentenyl transferase* gene as a selectable marker. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 94: 2117-2121
- Ebinuma, H., K. Sugita, E. Matsunaga, M. Yamakado and A. Komamine. 1997b. Principle of MAT vector. **Plant Biotech.** 14: 133-139.
- Ebinuma, H. and A. Komamine. 2001. MAT (Multi-Auto-transformation) vector system. The oncogenes of *Agrobacterium* as positive markers for regeneration and selection of marker-free transgenic plants. **In Vitro Cell Dev. Biol. Plant** 37: 103-113.
- Ebinuma, H., K. Sugita, E. Matsunaga, S. Endo and T. Kasahara. 2000. Selection of marker-free transgenic plants using the oncogenes (*ipt, rol A, B, C*) of *Agrobacterium* as selectable markers. **Mol. Biol. Woody Plant** 2: 25-46.
- Ebinuma, H., K. Sugita, E. Matsunaga, S. Endo, K. Yamada and A. Komamine. 2001. Systems for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker. **Plant Cell Rep.** 20: 383-392.
- Endo, S., K. Sugita, T. Kasahara and H. Ebinuma. 2002. A new GST-MAT vector containing both *ipt* and *iaaM/H* genes can produce marker-free transgenic tobacco plants with high frequency. **The Plant Cell Rep.** 20:923-928.
- European Federation of Biotechnology. 2001. Antibiotic resistance markers in genetically modified GM crops. Briefing Paper 10. Available source: <http://www.efbweb.org/public/pubview.htm> (site accessed 12 February 2003).
- Fromm, M. E., F. Morrish, C. Armstrong, R. Williams, J. Thomas and T. M. Klein. 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. **Biotech.** 833-839.

- Goldsbrough, A. P., C. N. Lastrella and J. I. Yoder. 1993. Transposition mediated re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato. **Biotech.** 11: 1286-1292.
- Hamilton, A. J., G. W. Lycett and D. Grierson. 1997. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. **Nature** 346: 284-287.
- Halevy, A. H. 1986. Pollination induced corolla senescence. **Acta Hort.** 181: 25-32.
- Hoekstra, F. A and R. Weges. 1986. Lack of control by early pistillate ethylene of the accelerated wilting of *Petunia* hybrid flowers. **Plant Physiol.** 80: 403-408.
- Hohn, B., A. A. Leavy and H. Puchta. 2001. Elimination of selection markers from transgenic plants. **Curr. Opin. Biotech.** 12: 139-143.
- Iwazaki, Y., Y. Kosug, K. Waki, T. Yoshioka and S. Satoh. 2004. Generation and ethylene production of transgenic carnations harboring ACC synthase cDNA in sense or antisense orientation. **J. Appl. Hort.** 6(2): 67-71.
- Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Mol. Biol. Rep.** 5: 387-405.
- Jonnes, M. L and W. R. Woodson. 1999. Interorgan signaling following pollination in carnations. **J. Hort. Sci.** 124: 598-604.
- Ketsa, S. 1995. Problem associated with postharvest handling and export of vegetables and flowers in Thailand, In W. Mod. Wan Othman, K. Sijam, S. H. Ahmad and N. M. N. Hassan (eds.). **Commercial production of Fruits, Vegetables and Flowers.** University Pertanian Malaysia, Selangor. 331-340 pp.

- Ketsa, S and A. Rugkong. 2000. Ethylene production, senescence and ethylene sensitivity of *Dendrobium* 'Pompadour' flowers following pollination. **J. Hort. Sci. Biotech.** 75: 149-153.
- Ketsa, S and K. Luangsuwalai. 1996. The relationship between 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content in pollinia, ethylene production and senescence of pollinated *Dendrobium* orchid flowers. **Postharvest Biol. Technol.** 8: 57-65.
- Keith H. 1999. **Biosafety of Selectable Marker Genes.** United Nations Industrial Development Organization. May 15, 2000.
- Kieber, J. J. 1997. The ethylene response pathway in *arabidopsis*. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.** 48: 277-296.
- Khan, T., Y. Hiei, Y. Saito, N. Murai and T. Kumashiro. 2006. Production of marker-free transgenic *Nierembergia caerulea* using MAT vector system. **Plant cell Rep.** 25: 914-919.
- Kinouchi, T., R. Endo, A. Yamashita and S. Satoh. 2006. Transformation of carnation with genes related to ethylene production and perception: towards generation of potted carnations with a longer displays time. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 86: 27-35.
- Klee, H. J., M. B. Hayford, K. A. Kratzmer, G. F. Barry and G. M. Kistone. 1991. Control of ethylene synthesis by a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. **Plant cell Rep.** 3: 1187-1193.
- Komari, T., Y. Hiei, Y. Saito, N. Murai and T Kumashiro. 1996. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. **Plant J.** 10: 165-174.

- Kosugi, Y., W. Keisuke, Y. Iwazaki, N. Tsuruno, A. Mochizuki, T. Yoshioka, T. Hashiba and S. Satoh. 2000. Senescence and expression of transgenic non-ethylene-producing carnation flowers. **J. Japan. Soc. Hort. Sci.** 71(5): 638-642.
- Lanahan, M., B., H. C. Yen, J. J. Giovannoni and H. J. Klee. 1994. The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. **Plant Cell** 6: 521-530.
- Liau, C. H., S. J. You, V. Prasad, H. H. Hsiao, J. C. Lu., N. S. Yang and M. T. Chan. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an *Oncidium* orchid. **Plant Cell Rep.** 21: 993-998.
- Lin, J.J., N. A. Garcia and J. Kuo. 1994. Effects of *Agrobacterium* cell concentration on the transformation efficiency of tobacco and *Arabidopsis thaliana*. **Focus** 16: 72-77.
- Lopez-Noguera, S., C. Petri and L. Burgos. 2007. Using MAT Vector System to produce marker-free transformed apricot plants. **Acta Hort.** 607-612.
- Midoh, N., Y. Saijou, K. Matsumoto and M. Iwata. 1996. Effects of 1, 1-dimethyl-4-(phenylsulfonyl) semicarbazide (DPSS) on carnation flower longevity. **Plant Growth Regul.** 20: 195-199.
- Mondal, T. K., A. Bhattacharya, P. S. Ahuja and P. K. Chand. 2001. Transgenic tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. Kangra Jat] plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. **Plant Cell Rep.** 20: 712-720.
- Mullins, E. D., T. G. McCollum and R. E. McDonald. 2000. Consequence on ethylene metabolism of inactivating the ethylene receptor sites in diseased non-climacteric fruits. **Postharvest Biol. Technol.** 19: 155-164.
- Odell, J., P. Caimi, B. Sauer and S. Ressel. 1990. Site-directed recombination in the genome of transgenic tobacco. **Mol. Gen. Gent.** 223: 369-378.

- Onouchi, H., K. Yokoi, C. Machida, H. Mastsuzaki, Y. Oshima, K. Matsuoka, K. Nakamura and Y. Machida. 1991. Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. **Nucleic Acids Res.** 19: 6373-6378.
- Onouchi H, R. Nishihama, M. Kudo, Y. Machida. 1995. Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Gen. Genet.** 234: 49-59.
- O'Neill, S. D. and J. A. Nadeau. 1997. Postpollination flower development. **Hort. Rev.** 19: 1-58.
- O'Neill, S. D., J. A. Nadeau, X. S. Zhang, A. Q. Bui and A. H. Halvey. 1993. Interorgan regulation of ethylene biosynthetic genes by pollination. **Plant Cell** 5: 419-432.
- Permingeat, H., R. M. L. Alvarez, G. D. L. Cervigni, R. A. Ravizzini and R. H. Vallejos. 2003. Stable wheat transformation obtained without selectable markers. **Plant Mol. Biol.** 52: 415-419.
- Richael, C. M., M. Kalyaeva, R. C. Chretien, H. Yan, S. Adimulam, A. Stivison, J. T. Weeks and C. M. Rommens. 2008. Cytokinin vector mediate marker-free and backbone-free plant transformation. **Transgenic Res.** 17(5): 905-917.
- Roy, S. D., M. Saxena, P. S. Bhomkar, M. Pooggin, T. Hohn and N. Bhalla-Sarin. 2008. Generation of marker free salt tolerant transgenic plants of *Arabidopsis thaliana* using the *gry I* gene and *cre* gene under inducible promoters. **Plant Cell Tiss. Organ. Cult.** 95: 1-11.
- Russell, S. H., J. L. Hoopes and J. T. Odell. 1992. Directed excision of a transgene from the plant genome. **Mol. Gen. Genet.** 234: 49-59.

- Saelim, L., S. Phansiri. M. Suksangpanomrung, S. Netrphan and J. Narangajavana. 2008. Evaluation of a morphological marker selection and excision system to generate marker-free transgenic cassava plants. **Plant Cell Rep.** 28(3): 445-455.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. USA. 113 p.
- Savin, K. W., S. C. Baudinette, M. W. Graham, M. Z. Michael, G. D. Nugent and C. Y. Lu. 1995. Antisense *ACC oxidase* RNA delays carnation petal senescence. **Hort. Sci.** 30: 970-972.
- Schaart, J. G., F. A. Krens, K. T. B. Pelgrom, O. Mendes and G. J. A. Rouwendal. 2004. Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene. **Plant Biotech. J.** 2: 233-240.
- Shibuya, K., T. Yoshioka, T. Hashiba and S. Satoh. 2000. Role of the gynoecium in natural senescence of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers. **J. Exp. Botany.** 51: 2067-2073.
- Shrestha, B. R., D. Poh Chin., K. Tokuhara and M. Mii. 2007. Efficient production of transgenic plants of *Vanda* through sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of protocorm-like bodies. **Plant Biotech.** 24: 429-434.
- Silva, J. A. T and S. Fukai. 2001. The impact of carbenicillin, cefotaxime and vancomycin on chrysanthemum and tobacco TCL morphogenesis and *Agrobacterium* growth. **J. Appl. Hort.** 3(1): 3-12.

- Sreeramanan, S., B. Vinod, S. Sashi and R. Xavier. 2008. Optimization of the transient *Gusa* gene transfer of *Phalaenopsis violacea* orchid via *Agrobacterium tumefaciens*: an assessment of factor influencing the efficiency of gene transfer mechanisms. **Advances in Natural and Applied Sciences** 2(2): 77-88.
- Sripriya, R., V. Raghupathy and K. Veluthambi. 2008. Generation of selectable marker-free sheath blight resistant transgenic rice plants by efficient co-transformation of a cointegrate vector T-DNA and a binary vector T-DNA in one *Agrobacterium tumefaciens* strain. **Plant Cell Rep.** 27(10): 1635-1644.
- Stead, A. D. 1992. Pollination-induced flower senescence: a review. **Plant Growth Regul.** 11: 13-20.
- Sugita, K., E. Matsunaga and E. Ebinuma. 1999. Effective selection system for generating marker-free transgenic plants independent of sexual crossing. **Plant Cell Rep.** 18: 941-947.
- Sugita, K., T. Kasahara, E. Matsunaga and H. Ebinuma. 2000. A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency. **Plant J.** 22(5): 461-469.
- Suzuki, A., K. Supaibulwatana, M. Mii and M. Nakano. 2001. Production of transgenic plants of the Liliaceous ornamental plant *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Leighton) Leighton via *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calli. **Plant Sci.** 161(1): 89-97.
- Tang, X and W. R. Woodson. 1996. Temporal and spatial expression of 1- aminocyclopropan-1-carboxylate oxidase mRNA following pollination of immature and mature petunia flowers. **Plant Physiol.** 112: 503-511.

- The Royal Horticultural Society. 1972. **Sander's List of Orchid Hybrids**. Addendum 1961-1970. Sole Publisher, The Royal Horticultural Society, Vincent Square, London. 632 p.
- Vacin, E. and F. W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. **Bot. Gaz.** 110: 605-613.
- Van, A., C. Altvorst and A. G. Bovy. 1995. The role of ethylene in the senescence of carnation flowers, a review. **Plant Growth Regul.** 16: 43-53.
- Van , D. W., G. E. J. Woltering, M. S. Redid and M. J. Wu. 1993. Reduced sensitivity to ethylene and delayed senescence in a group of related carnation cultivars, *In* J. C. Pech, A. Latche and C. Balague (eds.). **Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 188-194.
- Veen, H. 1979. Effects of silver on ethylene synthesis and action in cut carnations. **Planta** 145: 465-470.
- Verwoerd, T., C., B. M. Dekker and A. Hoekema. 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. **Nucleic. Acids. Res.** 17: 23-62.
- Walkerpeach, C. R and J. Velten. 1994. *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector system. **In Plant Molecular Biology Manual** (eds. S. B. Gelvin and R. A. Schilperoot), 2 nd ed, pp. B1: 1-19. Dordrecht Kluwer Academic Publishers.
- Weising, K., J. Schell and G. Kahl. 1988. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression and applications. **Ann. Rev. Genet.** 22: 421-477.
- Wilson, T. L. Y., O. A. Janna and M. Maziah. 2006. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation parameters for *Melastomataceae spp.* using green fluorescent protein (GFP) as a reporter. **Scientia Hort.** 38: 101-105.

- Woodson, W. R., K. Park, Y. Drory, A. P. B. Larsen and H. Wang. 1992. Expression of ethylene biosynthetic pathway transcripts in senescing carnation flowers. **Plant Physiol.** 99: 526-532.
- Woodson, W. R. 1994. Molecular biology of flower senescence in carnation. In R. J. Scott and A. D. Stead (eds.). **Molecular and Cellular Aspects of Plant Reproduction.** Cambridge University Press, Cambridge. 255-267.
- Xiao-Yi, S., B. Li and J. R. Zhang. 2006. Production of marker-free transgenic tobacco plants by FLP/*frt* recombination system. **Chinese J. Biotech.** 22 (5): 744-750.
- Yang, S. F and N. E. Hoffman. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 35: 155-189.
- Ye, X and H. Qin. 2008. Obtaining marker-free transgenic soybean plants with optimal frequency by constructing a three T-DNA binary vector. **Front. Agric. China** 2(2): 156-161.
- Yoder, J. I and A. P. Goldsbrough. 1994. Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. **Biotech.** 12: 263-267.
- Yu, H., S. H. Yang and C. J. Goh. 2000. *DOH1*, a Class 1 *knox* gene, is required for maintenance of the basic plant architecture and floral transition in orchid. **The Plant Cell.** 12: 2143-2159.
- Yu, H., S. H. Yang and C. J. Goh. 2001. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Dendrobium* orchid with the class 1 *knox* gene *DOH1*. **Plant Cell Rep.** 20: 301-305.

- Zelasco, S., V. Ressegotti, M. Confalonieri, D. Carbonera, P. Calligari, M. Bonadei, S. Bisoffi, K. Yamada and A. Balestrazzi. 2007. Evaluation of MAT vector system in white poplar (*Populus alba* L.) and production of *ipt* marker-free transgenic plants by ‘single-step transformation’. **Plant Cell Tiss Organ Cult.** 91: 61-72.
- Zuo, J., Q. W. Niu, Y. Ikeda and N. H. Chua. 2002. Marker-free transformation increasing transformation frequency by the use of regeneration promoting genes. **Curr. Opin. Biotech.** 13: 173-180.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร VW ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว (ดัดแปลงมาจาก Vacin and Went, 1949)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Macronutrients	
KNO ₃	525
(NH ₄) ₂ SO ₄	500
KH ₂ PO ₄	250
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250
Ca ₃ (PO ₄) ₂	200
Micronutrients	
MnSO ₄ ·H ₂ O	5.7
Iron	
Fe ₂ (C ₄ H ₄ O ₆) ₃ ·2H ₂ O	28
Other	
Sucrose	20 กรัมต่อลิตร
pH	4.8-5.0

ตารางผนวกที่ 2 องค์ประกอบของสูตร 2X-YT (Sambrook *et al.*, 1989) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

ส่วนประกอบ	กรัมต่อลิตร
Bacto-tryptone	16
Bacto-yeast extract	10
NaCl	5
pH 7.5	

ตารางผนวกที่ 3 การเตรียมสารละลาย X-gluc solution ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใช้สำหรับเทคนิค GUS histochemical assay คัดแปลงจากวิธีของ Jefferson *et al.* (1987)

สารละลาย	ส่วนประกอบ (มิลลิลิตร)
0.1 M Na ₂ HPO ₄	5
0.025 M K ₃ Fe(CN) ₆	1
0.025 M K ₄ Fe(CN) ₆	1
0.25 M NaH ₂ PO ₄	5
10% Triton X-100	0.5
เติม substrate X-gluc	25 มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	50

ตารางผนวกที่ 4 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอจากจีโนมของกล้วยไม้โดยคัดแปลงจากวิธี TLES (Verword *et al.*, 1989)

ส่วนประกอบ	กรัมต่อลิตร
Tris-HCl, pH8.0	0.1 M
LiCl,	0.1 M
EDTA, pH 8.0	10 mM
SDS	1%
Na ₂ SO ₃	2%

ตารางผนวกที่ 5 การเตรียมบัฟเฟอร์สำหรับเทคนิค agarose gel electrophoresis
(Sambrook *et al.*, 1989)

บัฟเฟอร์	ความเข้มข้นสุดท้าย	ความเข้มข้นของสารละลาย
Tris-borate(TBE)	0.9 M Tris-borate	10X : Tris base ปริมาตร 109 กรัม
	0.646 M boric acid	: boric acid ปริมาตร 40 กรัม
	0.025 M EDTA	: EDTA-free acid ปริมาตร 7.3 กรัม
		: น้ำ ปริมาตร 750 มิลลิลิตร
Tris-acetate (TAE)	0.004 M Tris-acetate	50X : Tris base ปริมาตร 242 กรัม
	0.001 M EDTA	: glacial acetic acid ปริมาตร 51.1 มิลลิลิตร
		: 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวเบญจวรรณ สุวรรณนต์ย์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	30 มีนาคม พ.ศ. 2526
สถานที่เกิด	อำเภอ สามพราน จังหวัด นครปฐม
ประวัติการศึกษา	จบการศึกษาระดับปริญญาตรี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัด นครปฐม คณะเกษตร สาขาวิชาโรคพืช ในปี 2549
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	1. รางวัลดีเด่น การเสนอผลงานวิชาการภาคบรรยาย การ ประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษา เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ครั้งที่ 3 เรื่อง Production of marker-free transgenic orchid using <i>ipt-</i> type MAT vector 2. นำเสนอโปสเตอร์ในงาน BioAsia 2007 Transformation of <i>Dendrobium</i> orchid for production of marker-free transgenic orchid.
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	1. ทุนบัณฑิตผู้ช่วยวิจัย จากศูนย์ความเป็นเลิศด้าน เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงาน คณะกรรมการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ 2. ทุนศึกษาวิจัยระดับปริญญาโท จากโครงการยืดอก การปักแจกันของกล้วยไม้สกุลหวาย กลุ่มวิจัยด้านพืช ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (สวทช.) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)