



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การแสดงออกของยีน antisense papaya 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase และการศึกษาลักษณะทางสรีระของกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีน  
The Expression of Antisense Papaya 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase and the Physiological Study of Transgenic Dendrobium Orchids

นามผู้วิจัย นางสาวปิยนุช ศรีชัย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( อาจารย์ปรีชาติ เบิร์นส, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( อาจารย์วัชรินญา อิ่มสบาย, วท.ด. )

ประธานสาขาวิชา

( รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วัน ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การแสดงออกของยีน antisense papaya 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase  
และการศึกษาลักษณะทางสรีระของกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีน

The Expression of Antisense Papaya 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase  
and the Physiological Study of Transgenic *Dendrobium* Orchids

โดย

นางสาวปิยนุช ศรีชัย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปิยนุช ศรชัย 2553: การแสดงออกของยีน antisense papaya 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase และการศึกษาลักษณะทางสรีระของกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีน ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D. 120 หน้า

การศึกษาการคงอยู่ของยีน และ ลักษณะทางสรีระในระยะหลังออกปลูกของกล้วยไม้สกุลหวายสองพันธุ์ คือ พันธุ์บอม 17 และ พันธุ์เอียสกุล ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense papaya 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (antisense CPACO) เปรียบเทียบกับต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน พบว่า เมื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีนในกล้วยไม้ทั้งสองพันธุ์ที่อายุ 1 ปี หลังออกปลูก ด้วยเทคนิค PCR พบการคงอยู่ของยีน antisense CPACO และ ยีน *hpt* 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการตรวจสอบการคงอยู่ของยีน antisense CPACO ด้วยวิธี Southern PCR hybridization และ dot blot hybridization ก็ให้ผลยืนยันการคงอยู่ของยีน และเมื่อตรวจสอบจำนวนชุดของยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปในจีโนมโดยเทคนิค Southern blot hybridization และตรวจสอบด้วยตัวตรวจสอบที่จำเพาะกับ 35S CaMV โพรโมเตอร์ พบว่า พันธุ์บอม 17 มีจำนวนชุดยีนที่ถูกควบคุมด้วยโพรโมเตอร์ดังกล่าว 2-3 ชุด และพันธุ์เอียสกุลมีจำนวน 1-3 ชุด

การแสดงออกของยีน antisense CPACO โดยการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ACO และการผลิตเอทิลีน พบว่า ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนทุกสายต้นมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACO และการผลิตเอทิลีนต่ำกว่าต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยในพันธุ์บอม 17 มีกิจกรรมเอนไซม์ ACO ลดลง 41 ถึง 97 เปอร์เซ็นต์ และ มีการผลิตเอทิลีนลดลง 60 ถึง 76 เปอร์เซ็นต์ ส่วนพันธุ์เอียสกุลมีกิจกรรมเอนไซม์ ACO ลดลง 41 ถึง 94.5 เปอร์เซ็นต์ และ มีการผลิตเอทิลีนลดลง 42 ถึง 76 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการศึกษาลักษณะทางสรีระของต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO พบว่า ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนทุกสายต้นมีการเจริญเติบโตในภาพรวมดีกว่าต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และเมื่อศึกษาด้านสรีระวิทยาหลังการเก็บเกี่ยวของดอกจากต้นที่ได้รับการถ่ายยีน พบว่า ดอกของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีนมีอัตราการดูน้ำไม่แตกต่างกัน แต่ดอกของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีอายุการปักแจกันนานขึ้น 30 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับดอกของต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Piyanuch Sornchai 2010: The Expression of Antisense Papaya 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase and the Physiological Study of Transgenic *Dendrobium* Orchids. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Sermsiri Chanprame, Ph.D. 120 pages..

The existence of antisense papaya 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (antisense *CPACO*) gene and the physiological characters of transgenic *Dendrobium* ‘Sonia BOM17’ and *Den.* ‘Sonia Earsakul’ were studied. The results revealed that, at 1 year after transplanted, 90% of antisense *CPACO* gene and 100% of selectable marker gene, *hpt*, existed in the transgenic lines as confirmed by PCR technique. The Southern PCR hybridization and dot blot analysis also confirmed the similar results. The genomic Southern blot hybridization revealed the existed of 2-3 sets of genes in ‘Sonia BOM17’ and 1-3 sets of genes in ‘Sonia Earsakul’ transgenic lines as detected by 35S CaMV promoter specific probe.

The expression of antisense *CPACO* gene was studied through the level of ACO enzyme activity and ethylene production in orchid plants. All of the transgenic lines had lower ACO enzyme activity and lower ethylene production than that of the non-transformed orchid plants. In transgenic ‘Sonia BOM17’, the activity of ACO was decreased 41-97% and the ethylene production was decreased 60-76%. Similarly, in transgenic ‘Sonia Earsakul’, the activity of ACO was decreased 41-94.5% and the ethylene production was decreased 42-76%.

The physiological study of transgenic orchid lines, in overall, demonstrated the better growth as compared to the non-transformed plants. The post harvest physiology of flowers from transgenic lines showed similar water uptake compared to the non-transformed flowers. However, the 30% longer vase life than that of the control was observed in flowers of transgenic lines.

---

Student’s signature

---

Thesis Advisor’s signature

## กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ศส.ดร.เสริมศิริ จันทร์เปรม ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร. ปาริชาติ เบิร์นส และ ดร.วชิรญา อิ่มสบาย กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาเสมอมา ทั้งในด้านการเรียน การค้นคว้าวิจัยตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งสำเร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ ดร.พัชรินทร์ ตัญญา ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร. กุลนาถ ออบสุวรรณ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้ความกรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ที่ให้การสนับสนุนทุนบัณฑิตผู้ช่วยวิจัยและงบประมาณในการทำวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อพืชและถ่ายยีน ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว และกลุ่มวิจัยด้านพืชศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ให้แก่ข้าพเจ้าเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อเกษม คุณแม่มาลี สรชัย พี่ตุน พี่ต่าย และญาติทุกคนในครอบครัว ที่คอยให้ความรัก กำลังใจ และให้การสนับสนุนในการศึกษาแก่ข้าพเจ้าจนสำเร็จ ล่วงด้วยดีตลอดมา

ปิยนุช สรชัย

มีนาคม 2553

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(8)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	27
อุปกรณ์	27
วิธีการ	31
ผลและวิจารณ์	51
สรุป	94
เอกสารอ้างอิง	95
ภาคผนวก	111
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	120

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณเอทิลีนและปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ตรวจวัดได้หลังจาก บรรจุนักกล้วยไม้สกุลหวายที่อายุ 1 6 9 และ 12 เดือนหลังออกปลูก จำนวน 1 ถึง 4 ต้นลงในภาชนะคัดแปลงชั่วโมงที่ 1 ถึง ชั่วโมงที่ 9 เพื่อศึกษาระบบเก็บแก๊สเอทิลีน	65
2	ปริมาณเอทิลีนที่สร้างขึ้นในต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์บอม 17 และ เอียสกุลที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO และไม่ได้รับการถ่าย ยีน(control) ที่อายุ 1 6 9 และ 12 เดือนหลังออกปลูก	74
3	อายุการปักแจกันของช่อดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์เอียสกุลและบอม 17 ที่แช่ในน้ำกลั่น วางในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ มีความชื้นสัมพัทธ์ 60-65 % ในสภาพแสงธรรมชาติ	85
4	การเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ เอียสกุลและบอม 17 ที่อายุ 6 และ 12 เดือนหลังออกปลูก ทั้งที่ได้รับการถ่ายยีน เปรียบเทียบกับที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน	92
<b>ตารางผนวกที่</b>		
1	องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร VW	112
2	สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย สูตร LB	112
3	สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอจากกล้วยไม้โดย คัดแปลงจากวิธี TLEs	113
4	การเตรียมบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 10X สำหรับเทคนิค agarose gel electrophoresis	113
5	สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการทำ dot blot hybridization	114
6	สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสกัดเอนไซม์ ACO จากกล้วยไม้โดยวิธี ของ Vriezen <i>et al.</i> , (1999)	115

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
7	สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACO (ACO incubation buffer) จากกล้วยไม้โดยวิธีของ Vriezen <i>et al.</i> , (1999)	115
8	การสร้างเอทิลีนในดอกกล้วยไม้พันธุ์ บอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO และไม่ได้รับการถ่ายยีน	116
9	เปอร์เซ็นต์การบานเพิ่มของดอกตูม ของช่อดอกกล้วยไม้พันธุ์ บอม 17 และเอียสกุล ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO และไม่ได้รับการถ่ายยีน	117
10	เปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกตูมของช่อดอกกล้วยไม้พันธุ์ บอม 17 และเอียสกุล ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO และไม่ได้รับการถ่ายยีน	118
11	เปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกบานของช่อดอกกล้วยไม้พันธุ์ บอม 17 และเอียสกุล ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO และไม่ได้รับการถ่ายยีน	119

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	วัฏจักรเมทาโทนีของ Yang ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอทิลีน	17
2	การทำงานของ antisense oligonucleotide	24
3	แผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สำคัญของ binary vector ที่มียีน antisense CPACO และแสดงชุดยีน A ที่ได้หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งมีส่วนของ 35S CaMV โปรโมเตอร์ สำหรับหาจำนวนชุดยีนด้วยวิธี Southern blot hybridization	39
4	ภาพสำหรับบรรจุต้นกล้วยไม้ที่อายุต่าง ๆ โดยมีฝาชวดที่เจาะรูแล้วเสียบด้วย สายยางซิลิโคน	42
5	แสดงวิธีการศึกษาการวัดปริมาณเอทิลีนในดอกกล้วยไม้ โดยใช้วิธีดัดแปลงจาก Bolitho <i>et al.</i> (1997)	44
6	แสดงวิธีการศึกษาอายุการปักแจกันแบบทั้งช่อดอกและแบบแยกแต่ละดอก	47
7	แสดงอาการเสื่อมสภาพของดอกกล้วยไม้	48
8	ตำแหน่งการวัดการความสูงและความกว้างของลำลูกกล้วย และตำแหน่งลำลูกกล้วยที่มีกิจกรรมการสังเคราะห์แสงมากที่สุด	49
9	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน <i>hpt</i> แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แลบบยีนที่ได้มีขนาด 800 คู่เบสของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ บอม 17	55
10	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน <i>hpt</i> แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แลบบยีนที่ได้มีขนาด 800 คู่เบส ของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ เอียสกุล	56
11	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน antisense CPACO แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แลบบยีนที่ได้มีขนาดประมาณ 759 คู่เบสของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ บอม 17	57

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน antisense <i>CPACO</i> แยกขนาดจีนดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แลยีนที่ได้มีขนาดประมาณ 759 คู่เบสของกล้วยไม้สกุลหวาย สายพันธุ์เอียสกุล	58
13	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ CaMV 35s และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน antisense <i>CPACO</i> แยกขนาดจีนดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แลยีนที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 500 คู่เบส ถึง 2,300 คู่เบส	59
14	การตรวจวิเคราะห์การคงอยู่ของยีน antisense <i>CPACO</i> ในต้นกล้วยไม้ ที่ได้รับการถ่ายยีนพันธุ์บอม 17(AB1-AB4) และ พันธุ์เอียสกุล (AE1-AE4) โดยใช้เทคนิค dot blot hybridization ที่ตรวจสอบด้วย ตัวตรวจสอบยีน antisense <i>CPACO</i>	60
15	การตรวจวิเคราะห์การคงอยู่ของยีน antisense <i>CPACO</i> ในต้นกล้วยไม้ พันธุ์บอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้เทคนิค Southern PCR hybridization ที่ตรวจสอบด้วยตัวตรวจสอบยีน antisense <i>CPACO</i> แลยีนที่ได้มีขนาดประมาณ 759 คู่เบส	61
16	การตรวจวิเคราะห์การคงอยู่ของยีน antisense <i>CPACO</i> ในต้นกล้วยไม้ พันธุ์เอียสกุล ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้เทคนิค Southern PCR hybridization ที่ตรวจสอบด้วยตัวตรวจสอบยีน antisense <i>CPACO</i> แลยีนที่ได้มีขนาดประมาณ 759 คู่เบส	62
17	การตรวจวิเคราะห์จำนวนชุดยีน A ในต้นกล้วยไม้ทั้งพันธุ์เอียสกุลและ บอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้เทคนิค Southern blot hybridization	63

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	กราฟแสดงปริมาณเอทิลีน และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่สามารถวัดได้จากภาชนะตัดแปลงที่มีจำนวนต้นกล้วยไม้ 1 2 3 และ 4 ต้น หลังจากบรรจุลงในภาชนะปิดตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 1 ถึงชั่วโมงที่ 9 ในกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนช่วงเดือนที่ 1 และ 6 หลังออกปลูก เพื่อศึกษาระบบเก็บแก๊สเอทิลีน	68
19	กราฟแสดงปริมาณเอทิลีน และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่สามารถวัดได้จากภาชนะตัดแปลงที่มีจำนวนต้นกล้วยไม้ 1 2 3 และ 4 ต้น หลังจากบรรจุลงในภาชนะปิดตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 1 ถึงชั่วโมงที่ 9 ในกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนช่วงเดือนที่ 9 และ 12 หลังออกปลูก เพื่อศึกษาระบบเก็บแก๊สเอทิลีน	69
20	ปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นจากต้นกล้วยไม้พันธุ์บอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีน และที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (control) ในช่วงอายุ 1 6 9 และ 12 เดือน หลังออกปลูก	75
21	ปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นจากต้นกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุล ที่ได้รับการถ่ายยีน และที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (control) ในช่วงอายุ 1 6 9 และ 12 เดือน หลังออกปลูก	75
22	กิจกรรมของเอนไซม์ ACO ในใบของกล้วยไม้พันธุ์บอม 17 สายต้นที่ได้รับการถ่ายยีนและที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACO โดยวัดปริมาณเอทิลีนที่เกิด จากการเปลี่ยน ACC ที่ให้จากภายนอกด้วย เอนไซม์ ACO จากกล้วยไม้	76
23	กิจกรรมของเอนไซม์ ACO ในใบของกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุล สายต้นที่ได้รับการถ่ายยีนและที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACO โดยวัดปริมาณเอทิลีนที่เกิด จากการเปลี่ยน ACC ที่ให้จากภายนอกด้วย เอนไซม์ ACO จากกล้วยไม้	76
24	ปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นในช่อดอกของกล้วยไม้พันธุ์บอม 17 ใช้วิธีตัดแปลง โดยวัดปริมาณการสร้างจากต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน และต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน	80

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
25	ปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นในช่อดอกของกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุลที่ใช้วิธีตัดแปลงโดยวัดปริมาณการสร้างจากต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน และต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน	81
26	อัตราการคูดน้ำของช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์บอม17ที่ได้รับการถ่ายยีน (AB1-AB4) และไม่ได้รับการถ่ายยีน (control)	83
27	อัตราการคูดน้ำของช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลที่ได้รับการถ่ายยีน (AE1-AE4) และไม่ได้รับการถ่ายยีน (control)	83
28	เปอร์เซ็นต์การบานเพิ่มของดอกตูม (ก) เปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกตูม (ข) เปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกบาน (ค) ของช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์บอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีน (AB1-AB4) และที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (control)	88
29	เปอร์เซ็นต์การบานเพิ่มของดอกตูม (ก) เปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกตูม (ข) เปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกบาน (ค) ของช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลที่ได้รับการถ่ายยีน (AE1-AE4) และที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (control)	89

### คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CaMV	=	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
dNTP	=	deoxynucleotide triphosphate
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
GFP	=	green fluorescent protein
GUS	=	$\beta$ -glucuronidase
<i>hpt</i>	=	hygromycin phosphotransferase
PCR	=	polymerase chain reaction
PCI	=	phenol: chloroform: isoamyl alcohol
plbs	=	protocorm-like bodies
PVP	=	polyvinylpyrrolidone
RNase	=	ribonuclease
TBE	=	Tris-borate-EDTA electrophoresis buffer solution
T-DNA	=	transfer DNA

**การแสดงออกของยีน antisense papaya 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase และการศึกษาลักษณะทางสรีระของกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีน**

**The Expression of Antisense Papaya 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase and the Physiological Study of Transgenic *Dendrobium* Orchids**

**คำนำ**

ปัจจุบันกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* spp.) เป็นไม้ตัดดอกที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยมีสัดส่วนการส่งออกถึงร้อยละ 80 ของกล้วยไม้ทั้งหมด (อภิสิทธิ์ และคณะ, 2541) เป็นมูลค่ามากกว่า 2,000 ล้านบาทต่อปี โดยในปี 2551 มีปริมาณการส่งออกถึง 25,513 ตัน คิดเป็นมูลค่าการส่งออกถึง 2,411 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551) และมูลค่าการส่งออกมีแนวโน้มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรรายงานไว้ในปี พ.ศ. 2551 ว่าการส่งออกกล้วยไม้ของประเทศไทยประสบยังปัญหาหลายประการเช่น คุณภาพของดอกกล้วยไม้ไม่สม่ำเสมอและลดต่ำลงเมื่อถึงมือผู้บริโภค ปริมาณผลผลิตไม่สัมพันธ์กับความต้องการของตลาดขาดผลผลิตกล้วยไม้พันธุ์ใหม่ออกสู่ตลาด และการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น ปัจจุบันประเทศไทยยังขาดงานวิจัยและพัฒนาทางด้าน การปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้กล้วยไม้พันธุ์ใหม่ที่มีคุณลักษณะเหมาะสมตามความต้องการของตลาดโลก และสามารถแข่งขันกับประเทศคู่แข่งได้

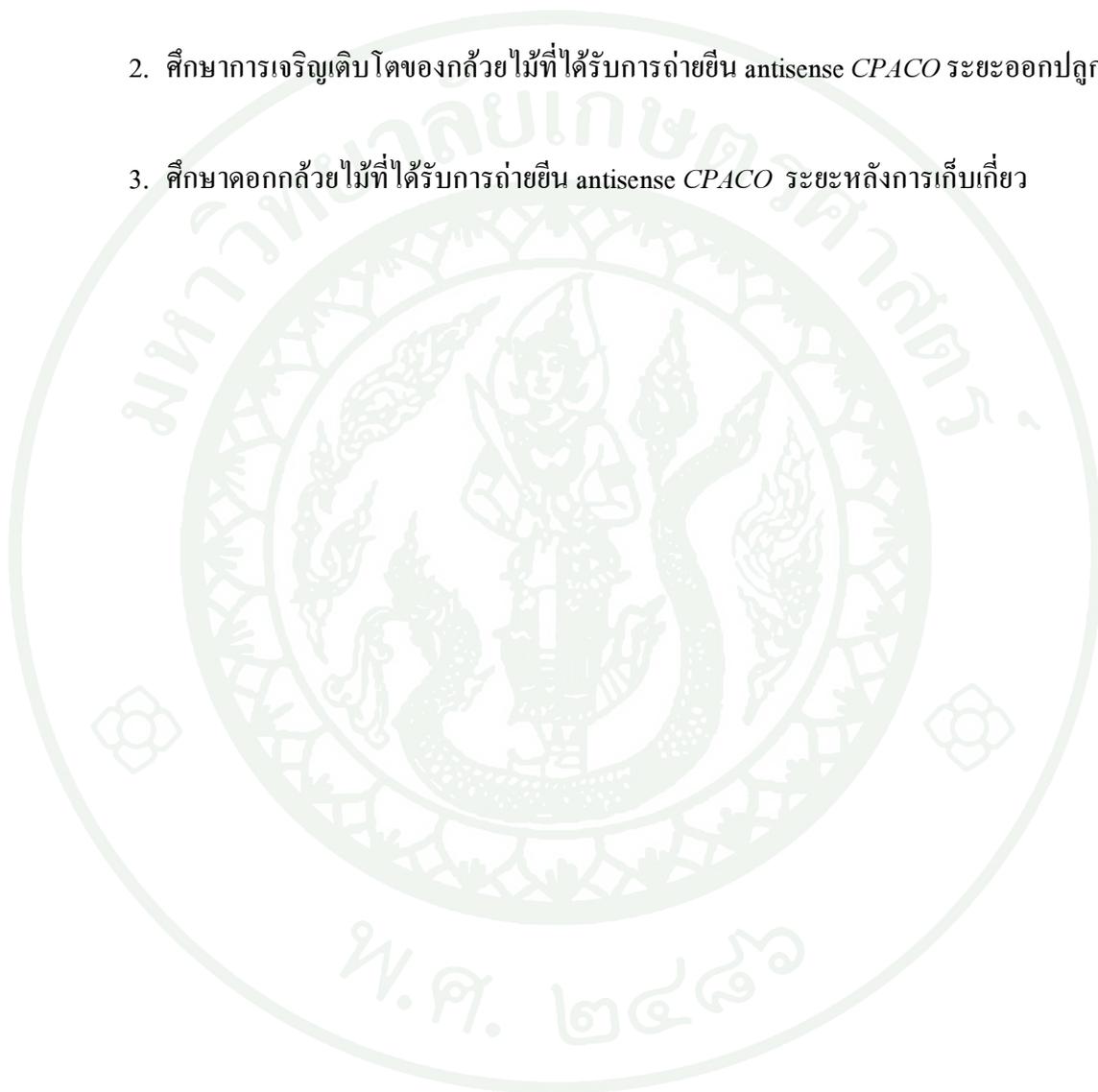
การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีดอกแข็งแรงและตรงตามที่ต้องการแบบดั้งเดิมทำโดยผสมเกสรข้ามพันธุ์ ซึ่งต้องใช้เวลาไม่น้อยกว่า 3-5 ปี และ โอกาสที่จะได้พันธุ์ใหม่ที่มีความแปรปรวนสูง และต้องมีการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเป็นจำนวนมากเพื่อคัดเลือกพันธุ์ลูกผสม ทำให้สิ้นเปลืองเงินทุน วัสดุ พื้นที่ และแรงงาน การนำเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วยจะทำให้ได้พืชพันธุ์ใหม่โดยใช้ระยะเวลาสั้นและพืชยังคงลักษณะเดิมที่ดีไว้ได้ แนวทางที่เป็นไปได้ คือ การถ่ายยีนแบบ antisense เข้าในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนนั้น ได้ดีขึ้น การถ่ายยีน antisense ACO เป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยเพิ่มอายุการใช้งานของดอกกล้วยไม้ให้นานขึ้น เนื่องจาก antisense ACO จะไปยับยั้งการทำงานของยีนที่สร้างเอนไซม์ ACO จึงทำให้มีการผลิตเอทิลีนน้อยลง ส่งผลให้ดอกกล้วยไม้มีอายุการปักแจกันนานขึ้น (Iwasaki *et al.*, 2004)

ในปี พ.ศ. 2549 รักชนก ได้ทำการถ่ายยีน *ACC oxidase (ACO)* แบบ antisense จากมะละกอ (antisense *CPACO*) เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายตัดดอกพันธุ์ที่นิยมทางการค้า 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์บอม 17 และพันธุ์เอียสกุล จึงเป็นที่มาของงานวิจัยครั้งนี้ที่ทำการศึกษารองอยู่และการแสดงออกของ ยีน antisense *CPACO* ที่ถ่ายเข้าไปในกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 2 พันธุ์ ในระยะออกปลูก



## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการคงอยู่และการแสดงออกของยีน antisense *CPACO* จากมะละกอที่ถูกถ่ายเข้าไปในกล้วยไม้สกุลหวายระยะออกปลูก
2. ศึกษาการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* ระยะออกปลูก
3. ศึกษาดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* ระยะหลังการเก็บเกี่ยว



## การตรวจเอกสาร

### 1. กล้วยไม้สกุลหวาย

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledonous plant) อยู่ในวงศ์ Orchidaceae ซึ่งเป็นพืชดอกวงศ์ใหญ่ที่สุดและมีการกระจายพันธุ์มากที่สุด ปัจจุบันพบกล้วยไม้ประมาณ 25,000 ชนิด กล้วยไม้เจริญเติบโตได้ในทุกทวีป ยกเว้นทวีปแอนตาร์กติกา โดยส่วนใหญ่จะพบในเขตร้อน (ครรรชิต, 2550) กล้วยไม้สกุลที่นิยมปลูกกันอย่างแพร่หลายได้แก่ สกุลหวาย (*Dendrobium*) แวนด้า (*Vanda*) ออนซิเดียม (*Oncidium*) อะแรนด้า (*Aranda*) ม็อคคาร่า (*Mokara*) และแมลงปอ (*Arachnis*) (สมชาย และคณะ, 2534)

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* spp.) เป็นสกุลที่ตั้งขึ้นในปี ค.ศ.1799 โดย นักพฤกษศาสตร์ชาวสวีเดนชื่อ Peter Olof Swartz ซึ่งมาจากรากศัพท์ภาษากรีกคือ dendron แปลว่าต้นไม้ และ bios แปลว่า ชีวิต เป็นการอ้างถึงสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่บนต้นไม้ ส่วนมากกล้วยไม้ สกุลหวาย มีการกระจายพันธุ์ในเขตร้อนและหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก ปัจจุบันพบว่ากล้วยไม้สกุลหวายเป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่สุดมีมากกว่า 1,200 ชนิด (Rittershausen and Rittershausen, 2001)

#### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ กล้วยไม้สกุลหวาย

กล้วยไม้สกุลหวายเป็นกล้วยไม้ที่มีระบบรากกึ่งอากาศ (semi-epiphyte) รากยาวและมีลักษณะอวบน้ำมีเชื้อหุ้มอยู่ด้านนอก บวมพองคล้ายฟองน้ำ ช่วยป้องกันการระเหยของน้ำ และทำหน้าที่สะสมอาหาร โดยปกติรากจะอาศัยเกาะยึดอยู่ตามต้นไม้ หรือวัสดุปลูก

ลำต้นกล้วยไม้สกุลหวายมีการเจริญเติบโตด้านข้างหรือแบบซิมโพเดียล (sympodial) คือเจริญไปตามแนวนอนด้วยเหง้า (rhizome) ซึ่งเป็นส่วนที่ทำหน้าที่เป็นลำต้นของกล้วยไม้ เมื่อต้นโตเต็มที่แล้วจะมีการแตกหน่อใหม่จากโคนกอเกิดขึ้นเรื่อยๆ และจะช่วยเก็บสะสมน้ำและอาหาร เรียกส่วนนี้ว่า ลำลูกกล้วย (pseudo-bulb) ส่วนของลำลูกกล้วยนี้มีข้อปล้อง และตา สามารถแตกเป็นหน่อ และเกิดเป็นเหง้าเล็กๆ สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ (ระพี, 2548)

ใบของกล้วยไม้สกุลหวายมีลักษณะสี่เหลี่ยม และขนาด ตามแต่ละชนิด ใบมีหน้าที่ช่วยในการสังเคราะห์แสง ใบของกล้วยไม้แบ่งออกเป็นสองส่วน คือ แผ่นใบ (leaf blade) และส่วนของ

กาบใบ (leaf sheath) โดยที่แผ่นใบมีลักษณะแบน ยาว มีหน้าตัดรูปตัววี เส้นกลางใบหรือเส้นย่อยๆ จะอยู่ในลักษณะขนานไปตามความยาวของใบ แผ่นใบจะอยู่ชิดกับกาบใบ ที่เป็นส่วนต่อจากแผ่นใบช่วยห่อหุ้มลำต้น ชีตใบไว้กับลำต้น (เศรษฐมนตร์, 2550)

กล้วยไม้สกุลหวายมีดอกสมบูรณ์เพศ (hermaphroditic หรือ perfect flower) ดอกกล้วยไม้ประกอบด้วย กลีบดอก 2 ชั้น ได้แก่ กลีบเลี้ยง (sepal) 3 กลีบ และกลีบดอก (petal) 3 กลีบ กลีบดอกชั้นนอกจะมีรูปร่างและสีส้มเหมือนกัน สำหรับกลีบดอกชั้นใน 2 กลีบบน จะมีรูปร่างเหมือนกัน แต่กลีบดอกล่างมีลักษณะแตกต่างออกไป จึงมีชื่อเรียกเฉพาะว่า ปาก (lip หรือ labellum) กลีบดอกทั้ง 6 กลีบ จะเชื่อมต่อกับเส้าเกสร (column) ซึ่งเป็นส่วนที่ประกอบด้วยเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย เส้าเกสรมีลักษณะเป็นเคียวหรือส่วนที่ยื่นออกมาจากกลางดอกที่ปลายสุดเป็นที่อยู่ของอับเรณู (anther) ภายในอับเรณูมีเรณูสีเหลืองเกาะกันเป็นก้อนๆ ก้อนเรณูนี้เรียกว่า กลุ่มเรณู (pollinia) ในกล้วยไม้สกุลหวาย มีกลุ่มเรณู 2 ก้อนอยู่ในอับเรณู ถัดเข้ามาข้างในของเส้าเกสรจะเป็นยอดเกสรเพศเมีย (stigma) โดยมีจะงอยเล็ก (rostellum) กั้นอยู่ระหว่างเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย ตรงส่วนยอดเกสรตัวเมียมีการสร้างน้ำเมือกเหนียวขึ้นมา ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการถ่ายเรณู (pollination) กลุ่มเรณูที่ตกลงมาบริเวณนี้เริ่มงอกและแทงเข้าไปในเส้าเกสร ภายในเป็นช่องของก้านชูเกสรเพศเมียเชื่อมต่อกันไปยังรังไข่ โดยทั่วไปเมื่อมีการถ่ายละอองเกสรช่องนี้จะเชื่อมปิดอย่างรวดเร็ว รังไข่ (ovary) ของดอกกล้วยไม้อยู่ตรงบริเวณก้านดอกที่อยู่ชิดกับโคนกลีบดอก ภายในมีช่อง 3 ช่อง แต่เนื่องจากว่ามีการเชื่อมกันของผนังด้านใน จึงทำให้เกิดช่องรังไข่เพียงช่องเดียว แต่ถ้าดูจากผนังด้านนอกแล้วจะเห็นว่าแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ภายในรังไข่มีไข่อ่อน (ovule) เม็ดเล็กๆ เกาะติดเรียงเป็น 3 แถว ไข่อ่อนมีการพัฒนาเมื่อดอกได้รับการผสมเกสรแล้ว (Der-Pijl and Dodson, 1996)

ช่อดอกของกล้วยไม้สกุลหวาย (inflorescence) เป็นแบบ raceme คือเป็นช่อดอกที่มีก้านยาวไม่แตกแขนง โดยจะออกช่อดอกจากข้อซึ่งอยู่ที่ปลายลำลูกกล้วย หรือตามข้อซึ่งอยู่ถัดลงมาทางส่วน โคนของลำลูกกล้วย (ระพี, 2548)

กล้วยไม้สกุลหวายมีผลซึ่งเรียกว่าฝัก (pods) ลักษณะคล้ายทรงกระบอกหรือทรงกลม บางชนิดรูปรี ฝักอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมีเมล็ดอยู่ด้านในเพื่อขยายพันธุ์ต่อไป เมล็ดของกล้วยไม้มีขนาดเล็กมากบางชนิดก็คล้ายฝุ่นผงเมื่อฝักแก่จะแตกออกสามารถปลิวลมไปไกล เมื่อตกอยู่ในที่อุดมสมบูรณ์ก็จะเจริญงอกงามได้ แต่เปอร์เซ็นต์การงอกนั้นน้อยมาก (เศรษฐมนตร์, 2550)

กล้วยไม้สกุลหวายชนิดแรกที่ปลูกเพื่อตัดดอกเป็นการค้าในประเทศไทยคือ ปอมปาดัวร์ *Dendrobium 'Pompador'* เป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากประเทศฝรั่งเศส พบว่า สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศของประเทศไทยและให้ดอกสวยงาม ในปี พ.ศ. 2509 มีผู้ทดลองตัดดอกส่งไปขายต่างประเทศ ปรากฏว่าได้รับความนิยมจึงมีการส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกตั้งแต่นั้นมา (ไพบูลย์, 2521) ปัจจุบันมีการผสมและคัดพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายเพื่อนำมาปลูกตัดดอกมากมายหลายชนิด แหล่งปลูกกล้วยไม้ที่สำคัญได้แก่ กรุงเทพมหานคร สมุทรสาคร นครปฐม นนทบุรี และราชบุรี ในปี 2551 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกกล้วยไม้ 20,739 ไร่ ให้ผลผลิต 45,937 ต้น มีปริมาณและมูลค่าการส่งออกของกล้วยไม้ตัดดอก 24,564 ต้น มีมูลค่า 2,545 ล้านบาท โดยสามารถส่งออกไปยังประเทศต่างๆ ได้กว่า 76 ประเทศ ปัจจุบันประเทศไทยส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกโดยมีส่วนแบ่งตลาดโลกอยู่ที่ 35.32% โดยแบ่งตลาดออกเป็น 3 ส่วนคือตลาดยุโรป มีประเทศอิตาลีเป็นผู้นำเข้าอันดับหนึ่ง รองลงมาคือ เนเธอร์แลนด์ และ เยอรมัน ตลาดเอเชียมีประเทศญี่ปุ่นเป็นผู้นำเข้ารายใหญ่ และตลาดอเมริกา ส่วนภายในประเทศเองก็มีความนิยมกล้วยไม้อย่างกว้างขวาง (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551)

อย่างไรก็ตามปริมาณและมูลค่าการส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกของไทยมีความไม่แน่นอน มีการเปลี่ยนแปลงทุกๆ ปี เนื่องจากประสบปัญหาเรื่องความผันผวนของราคา และภาวะการแข่งขันกับประเทศผู้ผลิตคู่แข่ง ได้แก่ ประเทศสิงคโปร์ มาเลเซีย และ อินโดนีเซีย ซึ่งมีการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ให้มีคุณภาพดี มีความทนทานมากขึ้น โดยเฉพาะในเรื่องของอายุการใช้งาน (สมเพียร, 2532); สายชล และคณะ (2528) รายงานว่าผู้ส่งออก 63.52 เปอร์เซ็นต์ได้รับแจ้งจากลูกค้าว่าดอกเหี่ยว ส่วนอีก 36.48 เปอร์เซ็นต์ได้รับแจ้งว่าดอกร่วง ซึ่งปัญหาเหล่านี้เป็นอุปสรรคต่อการขยายตัวและการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตกล้วยไม้เพื่อการส่งออก ทั้งนี้เนื่องจากดอกกล้วยไม้เมื่อถูกตัดแยกออกจากต้น สอร์โมนีซยังคงทำหน้าที่และกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ยังคงดำเนินต่อไปเพื่อความอยู่รอด ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านสรีระ ด้านกายภาพ และด้านชีวเคมี เช่นเดียวกับในขณะที่ยังอยู่บนต้น ดอกกล้วยไม้ยังคงมีการหายใจ การคายน้ำและการเปลี่ยนสีของกลีบดอก การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ล้วนมีผลกระทบต่อคุณภาพและอายุการใช้งานของดอกทั้งสิ้น (สายชล, 2531) เมื่อดอกกล้วยไม้เริ่มบานและแก่จะมีการสร้างเอทิลีน เอทิลีนจะเร่งทำให้ดอกกล้วยไม้ให้เสื่อมสภาพและเหี่ยวเร็วขึ้น (Akamine, 1963)

## 2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เป็นการขยายพันธุ์กล้วยไม้วิธีหนึ่งที่เป็นที่นิยมในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนกล้วยไม้ได้อย่างรวดเร็วเหมาะสำหรับการปลูกเลี้ยงเป็นการค้าต้นกล้วยไม้ที่ได้ปลอดเชื้อโรค ได้ผลผลิตสม่ำเสมอ สะดวกต่อการดูแลรักษา มีรายงานว่า การขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีผลทำให้ลูกกล้วยไม้ สามารถเจริญงอกงามและมีความแข็งแรงสมบูรณ์ได้ สดส่วน ดีกว่าการตัดแยกลำทำยซึ่งเป็นวิธีการขยายพันธุ์ในอดีต (ระพี, 2546) และจากการศึกษาของ Sahavacharin (1980) ศึกษาการกลายพันธุ์ของกล้วยไม้ 21 สกุล รวมทั้งสิ้น 121 สายพันธุ์ ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าในการผลิตกล้วยไม้จำนวนหมื่นต้นด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีโอกาสได้ต้นที่มีลักษณะเหมือนต้นเดิม 99.99% และ อีกไม่เกิน 0.01% เป็นต้นกลายพันธุ์ ดังนั้นวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่น่ามาช่วยในการขยายพันธุ์กล้วยไม้ได้ดี หลังจากที่เรารู้ต้นกล้วยไม้ลักษณะตามที่ต้องการแล้ว

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เริ่มจาก Knudson (1922) สามารถเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในอาหารวุ้นที่มีสารอินทรีย์และอนินทรีย์บางชนิดเป็นองค์ประกอบ และมีน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ต้องใส่เชื้อรา แต่ต้นอ่อนที่ได้ไม่แข็งแรงเหมือนต้นอ่อนที่งอกในสภาพธรรมชาติ ในปี ค.ศ. 1946 Knudson สามารถค้นพบสูตรอาหารใหม่ที่เหมาะสมกับการเจริญของ ต้นอ่อน และตั้งชื่อสูตรอาหารนี้ว่า “Knudson’s C” ต่อมาในปี ค.ศ. 1949 Vacin และ Went พบ สูตรอาหารที่สามารถใช้เพาะเมล็ดกล้วยไม้และเลี้ยงต้นอ่อน ได้เป็นผลดีเช่นกัน และในปีเดียวกันนั้น Rotor (1949) สามารถเลี้ยงก้านช่อดอกของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิสให้เป็นต้นได้ และ Morel (1960) ได้ชื่อว่าเป็นผู้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เพื่อเพิ่มปริมาณให้ได้จำนวนมากเป็นคนแรก โดยทำการขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลซิมบิเดียม (*Cymbidium*) ให้ปราศจากเชื้อไวรัส ทำโดยตัดชิ้นส่วนของยอดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ เลี้ยงในอาหารสูตร Knudson’s C จนเกิดเป็นก้อนเนื้อเยื่อสีเขียวเล็กๆ ขึ้น และให้ชื่อว่า “bulblet” ซึ่งต่อมาเปลี่ยนเป็น “protocorm like bodies” (plbs) และนักวิทยาศาสตร์ในยุคต่อมาได้พัฒนาเทคนิคนี้เพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ต้นกล้วยไม้หลายสกุล ปัจจุบันสามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ได้จากส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญต่างๆ เช่น ตายอด ตาข้าง และปลายรากอ่อน (จิตรพรพรณ, 2536) ในประเทศไทยเริ่มมีการทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาตั้งแต่ ปีพ.ศ. 2522 (ระพี, 2546) จนกระทั่งปัจจุบัน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในประเทศไทยได้มีการพัฒนาจนถึงระดับการค้าอย่างกว้างขวาง สูตรอาหารที่นิยมใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้คือ สูตรดัดแปลงของ Vacin และ Went (VW)

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยสังเขป เริ่มจากฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนกล้วยไม้แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง VW เขย่าเพื่อให้เซลล์ได้รับอากาศด้วยความเร็วประมาณ 120 รอบต่อนาทีจนสร้าง plbs จึงย้ายลงอาหารแข็งเพื่อกระตุ้นให้กล้วยไม้สร้างต้นที่สมบูรณ์ (ประศาสตร์, 2538) การพัฒนาไปเป็นต้นจากส่วน plbs ของกล้วยไม้สามารถกระทำได้ง่าย ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่น่านำมาใช้ร่วมกับการถ่ายยีนเข้าสู่พืช

### 3. การถ่ายยีนในกล้วยไม้

ปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยวิธีถ่ายยีนประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิดทั้งในไม้ผล ไม้ดอก ไม้ประดับ ซึ่งวัตถุประสงค์ของการถ่ายยีนแตกต่างกันไป ไม่ว่าจะเป็นการสร้างพืชที่ทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ สร้างพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช ต้านทานโรคและแมลง ยืดอายุการเก็บรักษา สร้างพืชที่ให้ดอกไม้สีต้นแปลกใหม่ เป็นต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าไปและยอมรับยีนนั้นให้เข้าไปแทรกอยู่ในจีโนมพืช ซึ่งพืชอาจแสดงลักษณะของยีนนั้นๆ ออกมาได้เรียกพืชนั้นว่าพืชดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic plant) ประโยชน์ของการถ่ายยีนที่สำคัญคือ สามารถสร้างพืชพันธุ์ใหม่ได้โดยใช้ระยะเวลาอันสั้นและพืชต้นใหม่ยังคงลักษณะเดิมที่ดีเอาไว้ได้ (ครรชิต, 2550) วิธีการถ่ายยีนอยู่ด้วยกันหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันออกไป ซึ่งวิธีการถ่ายยีนมีอยู่ 2 แบบหลักคือ

#### 3.1 การถ่ายยีนโดยตรง (direct gene transfer)

เป็นวิธีการที่ใช้ส่งผ่านสารพันธุกรรมหรือยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยไม่ต้องอาศัย พาหะเป็นตัวนำเข้าสู่เซลล์หรือนิวเคลียส สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การถ่ายยีนโดยใช้เข็มฉีดยา (microinjection) การถ่ายยีนโดย liposome fusion การถ่ายยีนโดย sonication การถ่ายยีนโดยใช้สารเคมีเช่นสาร polyethylene glycol (PEG) (สุรินทร์, 2539) การถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า ซึ่งมี 2 ระบบ คือ การใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำ ระยะเวลาสั้น กับ การใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูง ระยะเวลาสั้น (สนธิชัย, 2543) และการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาคซึ่งแต่ละวิธีที่ใช้ในการถ่ายยีนโดยตรงนั้นมีความเหมาะสมและข้อดีข้อเสียขึ้นอยู่กับชนิดพืช และชนิดของเนื้อเยื่อนำมาใช้

การถ่ายยีนโดยตรงในกล้วยไม้ มีผู้รายงานไว้หลายงานเช่น

Griesbach and Hammond (1993) ใช้กระแสไฟฟ้าในการถ่ายพลาสมิด pBI 121 ที่มี ยีน *gus* เป็นยีนรายงานผลเข้าสู่เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด apical meristem ของเอ็มบริโอ ของกล้วยไม้สกุล *Calanthe* หลังจากการถ่ายยีนพบว่ามี การแสดงออกของยีน *gus* ในใบของต้นกล้วยไม้ อายุ 6 เดือน

Griesbach (1994) ใช้กระแสไฟฟ้าในการถ่ายพลาสมิด pBI 121 เข้าสู่ plbs ของกล้วยไม้สกุล *Calanthe* พบว่าหลังการถ่ายยีนแล้วทำการคัดเลือกบนอาหารคัดเลือกแล้ว 1 เดือน มี plbs ที่รอดชีวิต 45% อีกทั้งพบการมีอยู่และการแสดงออกของยีน *gus* ในต้นถ่ายยีน

Kuehnle and Sugii (1992) ทดลองยิงอนุภาคทั้งสแตนเคลือบด้วยพลาสมิด pGA482GG ที่มียีน *cpPRV4* ซึ่งควบคุมการสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของ papaya ringspot virus (PRV CP) โดยมี CaMV 35S เป็นโปรโมเตอร์ และ ยีน *gus* เป็นยีนรายงานผล มียีน neomycin phosphotransferase (*nptII*) เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายถูกผสมสายพันธุ์ Jacquelyn Thomas พบว่าหลังจากคัดเลือกเนื้อเยื่อกล้วยไม้จำนวน 280 โปรโตคอร์ัมที่ผ่านการยิงด้วยอนุภาคแล้วเป็นเวลา 21 เดือน นำต้นกล้วยไม้ที่ได้จำนวน 13 ต้นมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Southern hybridization และ วิธี PCR พบว่าตัวอย่างทั้งหมด มียีน *nptII* แต่พบยีน *cpPRV4* เพียงต้นเดียว

Chai *et al.* (1994) ถ่ายยีนเข้าสู่ plbs ของกล้วยไม้สกุลหวาย โดยยิงด้วยอนุภาคทั้งสแตนขนาด 1-3 ไมครอนที่เคลือบด้วยพลาสมิด pUC19LUC และ pMON530LUC ที่มียีนรายงานผลที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ firefly luciferase (*luc*) ภายใต้การควบคุมการแสดงออกโดยโปรโมเตอร์ CaMV 35S และเทอร์มินเตอร์ nos3' พบว่า หลังจากยิงอนุภาคเป็นเวลา 3 วัน เติมนสาร luciferin ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ในอาหารที่ใช้เลี้ยง plbs เป็นเวลา 3 สัปดาห์ หลังจากนั้นคัดเลือกต้นถ่ายยีนโดยเลือกจากการต้นที่มีการแสดงออกของยีน *luc* และตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยวิธี Southern blot analysis แล้ว ได้ต้นกล้วยไม้ถ่ายยีนที่สมบูรณ์ 25 ต้น

Yang *et al.* (1999) ถ่ายยีนโดยการยิงอนุภาคทองที่เคลือบด้วยพลาสมิด pKH200 ที่มี ยีนรายงานผล  $\beta$ -glucuronidase (*gus*) และมียีนคัดเลือก neomycin phosphotransferase (*npt II*) เข้าสู่ plbs อายุ 6 เดือนของกล้วยไม้สกุลชิมบิเดียม แล้วคัดเลือกบนอาหารสูตร MS ที่เติมนสารปฏิชีวนะ

กานามัยซิน (kanamycin) ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 9 เดือน พบว่าต้นที่รอดชีวิต มี ยีน *npt II* อยู่ เมื่อทดสอบโดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ในกล้วยไม้ถ่ายยีนทุกต้น และพบการแสดงออกของยีน *gus* 69.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี histochemical assay

Knapp *et al.* (2000) ทดลองยิงอนุภาคทองที่เคลือบด้วยพลาสติก pDPG165 ที่มียีน คัดเลือก *bar* เข้าสู่ plbs ของกล้วยไม้ 3 สกุล คือ *Doritaenopsis Brassia* และ *Cattleya* หลังจาก คัดเลือกบนอาหารแข็งสูตร Phytamax ที่เติม bialaphos ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 1 เดือน และคัดเลือกในอาหารเหลวสูตรเดิมแต่เปลี่ยนความเข้มข้นของ bialaphos เป็น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร อีก 2 เดือนจึงชักนำให้กล้วยไม้เป็นต้นที่สมบูรณ์บนอาหารแข็งที่ไม่เติม bialaphos นาน 3-6 เดือน พบว่าหลังจากตรวจการมีอยู่ของยีน *bar* ด้วยวิธี Southern blot analysis และตรวจสอบการแสดงออก ด้วยวิธี northern blot analysis และตรวจสอบความต้านทานต่อ bialaphos แล้ว ได้ต้นกล้วยไม้ ถ่ายยีน *Doritaenopsis* 3 สายต้น *Brassia* 2 สายต้น และ *Cattleya* 2 สายต้น

Davina *et al.* (2007) ศึกษาวิธีการถ่ายยีนในกล้วยไม้ โดยเลือกใช้แคลลัสของกล้วยไม้ สกุลหวาย สายพันธุ์ *Dendrobium* 'Madame Thong-In' และ *Dendrobium* 'Chao Praya Smile' ใช้วิธีการถ่ายยีนโดยการยิงอนุภาคร่วมกับสาร utilizing L- methionine sulfoximine (MSO) โดยใช้ อนุภาคทองที่เคลือบด้วยพลาสติก pSEP1FL ที่มียีนคัดเลือกคือยีน *bar* และยีน *DcOSEPI* ใช้ แรงดันก๊าซฮีเลียม 1350 psi ระยะทางระหว่างเป้าหมาย 9 ซม. หลังจากการถ่ายยีนเลี้ยงแคลลัสบน อาหารแข็งที่ไม่มี MSO เป็นเวลา 4 วัน แล้วย้ายลงอาหารแข็งที่ประกอบด้วย 5 $\mu$ M MSO สำหรับ สายพันธุ์ *Dendrobium* 'Madame Thong-In' และ 0.5 $\mu$ M MSO สำหรับสายพันธุ์ *Dendrobium* 'Chao Praya Smile' เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ หลังจากนั้น 6 สัปดาห์ ย้ายลงอาหารแข็งที่ ประกอบด้วย 4.4  $\mu$ M BA และ 10 $\mu$ M MSO สำหรับสายพันธุ์ *Dendrobium* Madame Thong-In และ 4.4  $\mu$ M BA และ 2  $\mu$ M MSO สำหรับสายพันธุ์ *Dendrobium* Chao Praya Smile ตรวจสอบ ด้วยวิธี PCR และ Southern blot analysis พบยีน *bar* ในทุกสายต้นที่ได้รับการถ่ายยีน

### 3.2 การถ่ายยีนโดยพาหะ (vector mediated gene transfer)

เป็นการนำยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยใช้พาหะ ปัจจุบันพาหะที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางคือ เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งอาศัยอยู่ในดิน ตามธรรมชาติแบคทีเรียชนิดนี้สามารถ บุกรุกเข้าสู่พืชได้บริเวณที่มีบาดแผลทำให้เกิดโรค crown gall ในพืชใบเลี้ยงคู่เกือบทุกชนิด แต่สาย

พันธุ์ดั้งเดิมไม่สามารถก่อให้เกิดโรคกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้ ซึ่ง *A. tumefaciens* นี้มีความรุนแรงในการบุกรุกจึงสามารถปลูกเชื้อได้ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวบางชนิด เช่นในอ้อย (de la Riva *et al.*, 1998) *A. tumefaciens* สามารถถ่ายส่วนของ T-DNA (transferred-DNA) ซึ่งอยู่บน Ti plasmid (tumor-inducing plasmid) เข้าสู่เซลล์พืช โดยยีนที่อยู่ภายใน T-DNA ของเชื้อจะเข้าแทรกในจีโนมของพืชและสามารถแสดงออกได้ในพืช เซลล์ที่เกิดจากการชักนำของ *A. tumefaciens* จะไม่เหมือนกับเซลล์ที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อทั่วไป กล่าวคือ สามารถเพิ่มจำนวนและเจริญได้ในอาหารที่ปราศจากการให้ฮอร์โมนในกลุ่มออกซินและไซโตไคนิน *A. tumefaciens* สายพันธุ์ที่รุนแรงจะมี Ti-plasmid ขนาดใหญ่มากถึง 130 - 220 kb ซึ่งเป็นตัวชักนำให้เกิดปุ่มปม ส่วนในสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรงจะไม่สามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์ได้พบว่าไม่มี Ti plasmid ทำให้เกิดปุ่มปมในพืช (Monica, 1996) การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียชนิดนี้เพื่อการถ่ายยีนสามารถทำได้โดยตัดส่วนของยีนที่ชักนำให้เกิดปุ่มปมออกแล้วแทนที่ด้วยยีนที่ต้องการใส่ตรงส่วนของ T-DNA ซึ่ง Gardner *et al.* (1991) กล่าวว่าขอบเขตของ T-DNA ที่จะส่งถ่ายไปยังเซลล์พืช กำหนดโดยลำดับเบสซ้ำ 25 คู่เบส 2 ข้างของ T-DNA ที่เรียกว่า left border (LB) และ right border (RB) และกลไกการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชจะถูกควบคุมโดยกลุ่มยีน *virulence* ซึ่งมีทั้งหมด 8 transcription unit หรือเรียกว่า operon ประกอบด้วย *vir A vir B vir C vir D vir E vir G* และ *vir F* (Van Haaren *et al.*, 1987) โดยยีน *vir* นี้จะไม่ถูกถ่ายเข้าเซลล์พืช และมีส่วนของยีน *chv* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์หรือการขนส่งสารคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำได้แก่  $\beta$ -1,2-glucan *chv* ประกอบด้วย chromosomal loci 5 ตำแหน่งได้แก่ *chv A chvB exoC (pscA) cel* และ *att* (Nester and Gordon, 1984)

กลไกการถ่าย T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชโดย *A. tumefaciens* เริ่มขึ้นเมื่อพืชเกิดบาดแผลแล้วสังเคราะห์สารประกอบ phenolic (phenolic compound) หลายชนิด เช่น lignin และ flavonoid precursor โดยสารประกอบ phenolic สำคัญซึ่งเป็น signal molecule ชนิดหนึ่งที่พบคือ acetosyringone (3,5-dimethoxy-4-hydroxy acetophenone) acetosyringone นี้เองมีผลกระตุ้นให้ *A. tumefaciens* เข้ามาจับที่ผิวเซลล์พืชในบริเวณ vitronectin-like plant cell receptor (PVN) (Wagner and Matthyse, 1992) แล้ว *A. tumefaciens* จะสังเคราะห์ cellulose filament มายึดเกาะกับผิวเซลล์ให้แนบชิดที่สุด โดยกลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง filament จะอยู่บนโครโมโซมคือ *chv A chvB exoC(pscA)* และ *att* (Matthyse, 1986) นอกจาก acetosyringone จะกระตุ้นให้ *A. tumefaciens* เข้ายึดเกาะกับผิวเซลล์พืชแล้วยังทำหน้าที่กระตุ้นให้ *vir* genes ทำงานด้วย (Stachel *et al.*, 1985) โดย acetosyringone จะทำหน้าที่กระตุ้นให้โปรตีน Vir A ซึ่งเป็น transmembrane protein เกิด autophosphorylation

ซึ่งจะส่งผลให้โปรตีน Vir G ที่ไม่active ซึ่งเกาะอยู่กับโปรตีน Vir A เปลี่ยนเป็น Vir G ที่ active จากนั้น active Vir G นี้เองจะทำหน้าที่เป็น inducer ในการเปิดการ transcription ของ *vir* genes อื่นๆ บน Ti-plasmid (Jin *et al.*, 1990) ขั้นตอนต่อไปคือการสร้าง T-DNA complex เพื่อถ่ายเข้าสู่ เซลล์พืช โดยโปรตีน VirD1 และ VirD2 ซึ่งมีคุณสมบัติเหมือนเอนไซม์ endonuclease ทำหน้าที่ตัด T-DNA ในบริเวณ left และ right border โดยตัดเพียงสายเดี่ยวเฉพาะ bottom strand เท่านั้น (Wang *et al.*, 1987) หลังจากตัดแล้ว สาย T-DNA จะถูก mobilize เข้ากับโปรตีน VirD 2 หนึ่งโมเลกุล ที่ปลาย 5' ทางด้าน right border จากนั้นโปรตีน Vir E2 จะเข้ามาจับสายของ T-strand ตลอดความ ยาว เพื่อให้สายของ T-strand ไม่พับซ้อนกัน เรียกโครงสร้างประกอบด้วย T-DNA โปรตีน VirD 2 และโปรตีน Vir E 2 นี้ว่า T-complex ซึ่งมีความยาวประมาณ 3,600 นาโนเมตร กว้างประมาณ 2 นา โนเมตร และมีน้ำหนักประมาณ 50,000 กิโลดาลตัน (Citovsky *et al.*, 1989) หลังจากสร้าง T-complex แล้ว T-complex จะเคลื่อนออกจากเซลล์แบคทีเรียเข้าสู่เซลล์พืช โดยผ่านช่องเปิดที่สร้าง ขึ้นระหว่างของผนังเซลล์ของแบคทีเรียและเซลล์เมมเบรนของพืช โดยการทำงานร่วมกันของ โปรตีน VirB 11 ชนิด (Christie, 1997) เมื่อ T-DNA complex เข้าสู่ cytoplasm ของพืชแล้วจะมี plant signal molecule ที่เรียกว่า nuclear localization signal (NLS) จากพืชเข้ามาช่วยในการพา T-complex เข้าสู่นิวเคลียส ซึ่ง plant signal molecule นี้มี 2 ชนิดคือ VirD2 NLS และ VirE2 NLS โดยแต่ละชนิดจะจับกับ Vir D2 และ VirE2 ตามลำดับ แล้วนำพา T-DNA complex เข้าสู่นิวเคลียส (Sheng and Citovsky, 1996) ในขั้นตอนสุดท้ายคือ การแทรกตัวของ T-DNA เข้าร่วมกับจีโนมของ พืชนั้นมีหลายรายงานเสนอว่า เกิดจากกระบวนการ illegitimate recombination (Gheysen *et al.*, 1989; Lehman *et al.*, 1994 ; Puchta, 1998) เริ่มจากปลาย 3' ของ T-DNA strand เข้าจับกับจีโนมพืช โดยใช้ลำดับเบสคู่สมเพียง 2-3 เบสซึ่งเรียกว่า micro-homologies แล้วโปรตีน VirD2 ซึ่งอยู่ที่ปลาย ด้าน 5' ของ T-DNA strand และมีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์ endonuclease จะตัดดีเอ็นเอที่สาย 3'-5' ของพืชให้เกิดช่องว่างแล้วรวมปลาย 5' เข้ากับปลายด้าน 3' ของพืช จากนั้นปลาย 3' ของ T-DNA strand จึงเข้าร่วมที่ด้าน 5' ของพืช ขั้นตอนสุดท้ายคือการเชื่อมช่องว่างด้วยกระบวนการซ่อมแซม โดยกลไกพืช (Tinland *et al.*, 1995)

De la Riva *et al.* (1998) รายงานว่ากระบวนการส่งถ่าย T-DNA จาก *A. tumefaciens* ไปยังเซลล์พืชขึ้นอยู่กับหลายๆ ปัจจัย เช่น การเข้าไปเกาะกับพืชในบริเวณบาดแผล การชักนำให้ เกิดการทำงานของยีนในแบคทีเรีย การผลิตสารประกอบต่างๆ ในการส่งถ่าย T-DNA และ การแทรกตัวของ T-DNA เข้าไปในจีโนมของพืช

การถ่ายยีนใช้โดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะในกล้วยไม้ มีผู้รายงานไว้หลายงาน เช่น

การถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ในระยะแรกนั้น นิยมใช้การถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาค แต่ภายหลังนิยมใช้การถ่ายยีนโดย *Agrobacterium* เนื่องจากมีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงกว่า รายงานแรกๆที่สามารถใช้ *A. tumefaciens* ในการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ได้สำเร็จมีดังนี้

Hsieh *et al.* (1997) ได้ศึกษาการถ่ายยีนในกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส 4 สายพันธุ์ คือ True Lady A76-13 Brother Mirage A79-69 Asain Elegance B79-11 และ Taisuco Kaaladian F80-13 โดยใช้ transversely bisected plbs เลี้ยงร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 (pMT1) ที่มียีนคัดเลือกคือยีน *neomycin phosphotransferase (npt)* และมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล ผลการทดลองพบว่า เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบว่าในสายพันธุ์ Asain Elegance B79-11 และ Taisuco Kaaladian F80-13 มีการแสดงออกของยีน *gus* 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายพันธุ์ True Lady A76-13 พบการแสดงออกของยีน *gus* เพียง 50-80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในสายพันธุ์ Brother Mirage A79-69 พบการแสดงออกของยีนไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า สายพันธุ์พืชเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ

Belarmino and Mii (2000) รายงานผลการคัดเลือกต้นกล้วยไม้ลูกผสมฟาแลนนอพซิส พาหะเลี้ยงร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 และ EHA101 ซึ่งมียีนรายงานผล  $\beta$ -glucuronidase (*gus*) และยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ *hygromycin phosphotransferase (hpt)* พบว่า ประสิทธิภาพการถ่ายยีนจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเลี้ยงกลุ่มเซลล์กล้วยไม้กับเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 10 ชั่วโมง และหลังจากถ่ายยีนประมาณ 7 เดือน พบว่าได้กล้วยไม้ฟาแลนนอพซิสลูกผสมต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน มากกว่า 100 ต้น

Yu *et al.* (2001) ได้ศึกษาการถ่ายยีนในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ Madame Thong-In โดยใช้ thin-section plbs ความหนาขนาด 1 มม. เลี้ยงร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่มียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ *neomycin phosphotransferase (nptII)* เป็นยีนคัดเลือก และมียีนเป้าหมายคือ antisense ยีน *DOHI* และ หลังจากคัดเลือกบนอาหารแข็งสูตร Knudson C ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 15 สัปดาห์ พบว่าได้ต้นกล้วยไม้

ที่ด้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 190 ตัน แต่มีต้นกล้วยไม้ 154 ต้นที่แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ผิดปกติคือสามารถสร้างจำนวนยอดมากกว่าปกติและออกดอกได้เร็วขึ้น

Chai *et al.* (2002) ได้ศึกษาการถ่ายยีนใน กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอโฟซิส 4 สายพันธุ์ คือ T0 T5 T10 และ Hikaru โดยใช้ transversely bisected plbs และ plbs ที่ไม่ผ่านการตัดเลี้ยง ร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่มีเวกเตอร์ pTOK233 ซึ่งมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล และยีน *npt II* เป็นยีนคัดเลือก ผลการทดลองพบว่าเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบว่าสายพันธุ์ T0 และ Hikaru มีการแสดงออกของยีน *gus* ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ และสายพันธุ์ Hikaru ที่ได้รับการถ่ายยีนมี plbs เพียง 10 เปอร์เซ็นต์ที่สามารถชักนำให้เกิดรากและพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ได้

Men *et al.* (2003) ได้ทดสอบปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายยีนในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ *Den. nobile* โดยใช้ *A. tumefaciens* 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ EHA105 และสายพันธุ์ AGL- 1 โดยใช้ binary vector เดียวกันคือ pCAMBIA 1301 ซึ่งมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล และยีน *hpt* เป็นยีนคัดเลือก ซึ่งสามารถหาปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนได้คือ การเพาะเลี้ยง plbs ที่ตัดให้มีขนาด 4-6 มิลลิเมตร ร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL- 1 นาน 30 นาที แล้วจึง co-cultivation บนอาหาร สูตร ½ MS ที่เติม acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ นาน 2-3 วัน แล้วจึงคัดเลือก plbs บนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีสารปฏิชีวนะซีโฟทาซิม ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 3 เดือน วิธีนี้ให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงที่สุดเท่ากับ 18 เปอร์เซ็นต์

Liau *et al.* (2003a) ได้ศึกษาการถ่ายยีนใน กล้วยไม้สกุลออนซีเดียม โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ซึ่งมีพลาสมิด pCAMBIA 1301 เป็นเวกเตอร์พาหะ หลังจากการคัดเลือกในอาหาร PR medium ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 3 เดือน พบว่าได้ต้นกล้วยไม้ถ่ายยีนทั้งหมด 6 สายต้น และในปีเดียวกัน Liau *et al.* (2003b) ได้ถ่ายยีน *sweet pepper ferredoxin-like protein (pflp)* ซึ่งเป็นยีนเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในพริกหวาน หลังจากถ่ายยีนเข้าสู่ plbs และคัดเลือกนาน 3 เดือน ได้รับต้นกล้วยไม้ที่ด้านทานสารปฏิชีวนะ 17 สายต้นแต่มี 6 สายต้นเท่านั้นที่ตรวจพบการแสดงออกของยีน *gus* และด้านทานต่อเชื้อ *Erwinia carotovora*

Mishiba *et al.* (2005) ได้ศึกษาการถ่ายยีนในกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิสลูกผสม 2 สายพันธุ์ คือ S122-2 x S153 และ S153 x S119-4 โดยใช้ โปรโตคอร์มที่ได้จากการเพาะเมล็ดเลี้ยงร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA101 ซึ่งมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล และ *hpt* เป็นยีนคัดเลือก ผลการทดลองพบว่าสามารถชักนำโปรโตคอร์มให้เป็นต้นได้ทั้งหมด 88 ต้น และหลังจากนั้น 6 เดือน นำต้นกล้วยไม้ทั้งหมดมาตรวจสอบการมีอยู่ของ *hpt* ด้วยวิธี Southern blot พบการมีอยู่ของยีน *hpt* ในทุกต้น

Sjahril *et al.* (2006) ได้ศึกษาการถ่ายยีนในกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิสลูกผสม สายพันธุ์ Wataboushi # 6.13 โดยใช้ embryonic cell suspension culture เลี้ยงร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA101 ซึ่งมียีน *npt* และ *hpt* เป็นยีนคัดเลือก และมีส่วนของยีน *wasabi defensin* เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ด้วยวิธี PCR และ Southern blot ตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี western blot พบชิ้นส่วนของยีน *wasabi defensin* และส่วนใหญ่ของต้นกล้วยไม้ที่ได้รับยีน *wasabi defensin* มีความสามารถต้านทานเชื้อโรค *Erwinia carotovora*

Semiarti *et al.* (2007) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส สายพันธุ์ 'amabilis' เลี้ยงร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ซึ่งมียีนต้านทานสารปฏิชีวนะ กานามัยซิน ควบคุมการทำงานภายใต้ 35s โปรโมเตอร์ และบริเวณ T-DNA ประกอบด้วย *Arabidopsis class 1 KNOX gene*, *BP/KNAT1* ผลการทดลองพบว่า หลังจากชักนำยอดได้ พบรูปร่างใบกล้วยไม้ที่ผิดปกติ ที่เกิดจากยีน *BP/KNAT1* ซึ่งเป็นยีนที่สามารถชักนำให้เกิดการแตกยอดได้หลายยอดจากเอ็มบริโอเดี่ยวๆ ได้ และตรวจสอบพบการคงอยู่และการแสดงออกของยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ กานามัยซิน

Fan (2008) ได้ศึกษาการถ่ายยีนต้านทานไวรัสของ CyMV เข้าในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลออนซิเดียมสายพันธุ์การค้า 2 สายพันธุ์ โดยถ่ายยีนเข้าในเนื้อเยื่อบริเวณใบ และ plbs ภายใต้สภาวะต่างๆ ดังนี้ใช้ *A. tumefaciens* จากการทดลองพบว่า ไม่สามารถชักนำให้เป็นแคลลัสหรือเป็นโปรโตคอร์มได้จากส่วนของ เนื้อเยื่อบริเวณใบ ส่วนใน plbs เมื่อทำการผ่า plbs จะทำให้เกิดเป็นแคลลัสได้และสามารถเจริญเติบโตได้ นำ plbs ชักนำยอดในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกๆ เดือน เป็นเวลา 9 เดือน นำบางส่วนของต้นกล้วยไม้ที่ชักนำยอดได้มาตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี northern blot และการคงอยู่ของยีนด้วยวิธี Southern blot และ วิธี PCR พบการแสดงออกของยีนและการคงอยู่ของยีนทุกต้นที่สามารถชักนำเป็นต้นได้

## 4. การใช้พันธุวิศวกรรมในการแก้ปัญหาดอกเหี่ยว

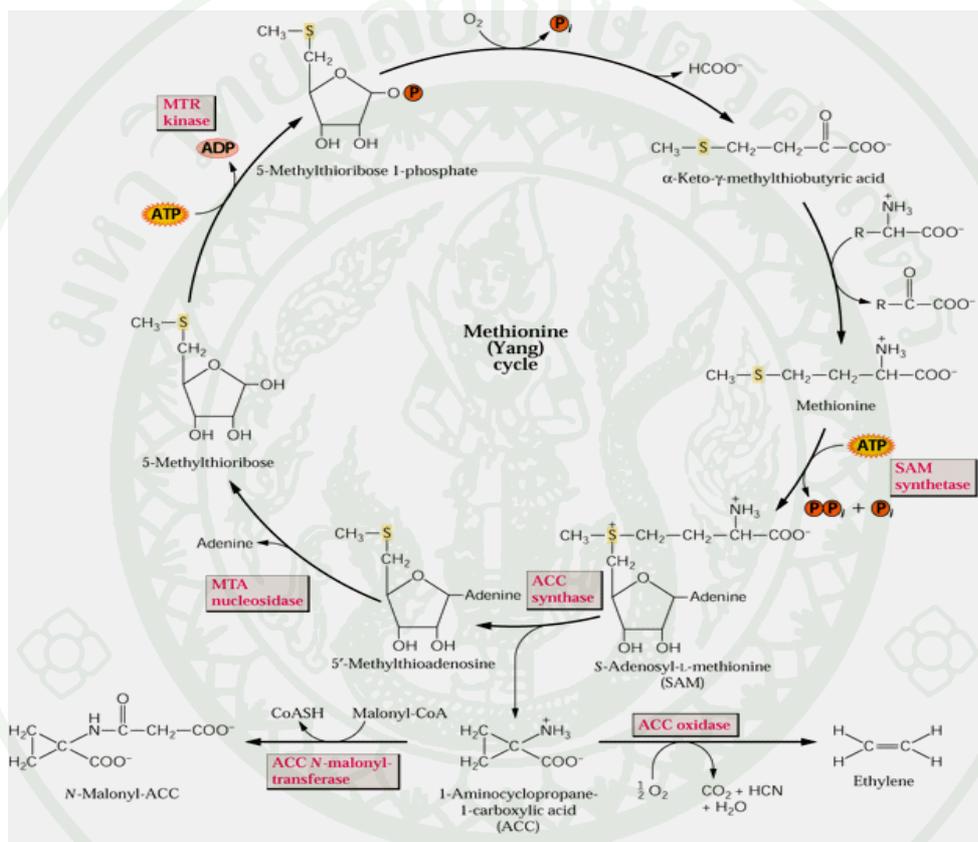
### 4.1 การสังเคราะห์เอทิลีน

ฮอร์โมนหลักที่พืชสร้างขึ้นแบ่งได้เป็น (plant hormone) 5 กลุ่ม คือ ออกซิน (auxin) ไซโตไคนิน (cytokinin) จิบเบอเรลลิน (giberellin) เอทิลีน (ethylene) และกรดแอบไซซิก (abscisic acid) ซึ่งเอทิลีนเป็นฮอร์โมนพืชที่มีสถานะก๊าซ และ พืชมีการสร้างเอทิลีนในทุกระยะของการเจริญเติบโต และทุกระยะการพัฒนารวมตั้งแต่การงอกของเมล็ดจนกระทั่งถึงการตายของพืช เอทิลีนมีบทบาทเกี่ยวข้องกับอายุการใช้งานของดอกไม้หลังการตัดดอกมากที่สุด นอกจากนี้พืชสามารถรับเอทิลีนจากแหล่งอื่นๆ จากภายนอกได้นอกเหนือไปที่พืชสร้างขึ้นจากภายในดอกไม้ว่าเอทิลีนจะเกิดจากแหล่งใดก็ตาม สามารถทำความเสียหายให้กับดอกไม้ ทำให้ดอกไม้มีอายุการใช้งานสั้น (สายชล, 2531)

#### 4.1.1 ขั้นตอนการสังเคราะห์เอทิลีนในพืช

กระบวนการสังเคราะห์เอทิลีนถูกค้นพบโดย Yang and Hoffman (1984) โดยพบว่า พืชสามารถสังเคราะห์เอทิลีนได้จากกรดอะมิโน methionine ที่พืชสามารถสังเคราะห์ได้เอง จากกรดอินทรีย์ที่มีอยู่ในเซลล์ และ methionine จะถูกเปลี่ยนไปเป็น S-adenosyl-L-methionine (SAM) โดยการทำงานของเอนไซม์ methionine-S-adenosyl transferase ทำงานร่วมกับ adenosine triphosphate (ATP) ต่อมา SAM จะถูกเปลี่ยนเป็น 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) โดยเอนไซม์ ACC synthase (ACS) ซึ่งมีอยู่ในไซโตพลาสซึม นอกจากนี้ ถูกเปลี่ยนเป็น ACC แล้ว บางส่วนของ SAM ยังถูกเปลี่ยนไปเป็น 5-methylthioadenosine ซึ่งสามารถนำกลับไปใช้สังเคราะห์ กรดอะมิโน methionine ได้ใหม่ (ภาพที่ 1) ดังนั้นพืชจึงสามารถผลิตเอทิลีนได้ในปริมาณมาก ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณกรดอะมิโนเมทไทโอนีนเพียงเล็กน้อย ส่วน ACC จะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไป เป็น เอทิลีนโดยเอนไซม์ ACC oxidase (ACO) ในสภาพที่มีก๊าซออกซิเจน โดยใช้ไอออนของเหล็ก (Fe<sup>2+</sup>) และกรด ascorbic เป็น cofactor (Yang, 1984; Kende, 1993) เราสามารถพบเอนไซม์ ACC oxidase บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ ACC ยังสามารถเปลี่ยนเป็น 1-malonylamino-cyclopropane-1-carboxylic acid (MACC) โดยเอนไซม์ ACC malonyltransferase ซึ่ง MACC นี้โดยปกติไม่สามารถ เปลี่ยนกลับไปเป็น ACC ได้ แต่มีรายงานว่าในกรณีที่มีความเข้มข้นของ MACC สูงๆ อาจกระตุ้น ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลับไปเป็น ACC ได้ โดยพบว่า MACC สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง ACC ให้มีมากขึ้นในดอกคาร์เนชั่น แต่ไม่ใช่การเปลี่ยนจาก MACC ไปเป็นเอทิลีน ดังนั้นการสร้าง

MACC จึงจัด ขึ้นเป็นกลไกหนึ่งสำหรับควบคุมระดับของ ACC และ ปริมาณการสร้างเอทิลีน (Crozier *et al.*, 2000) นอกจากนี้การสังเคราะห์เอทิลีนในขั้นสุดท้ายมีการสร้างสารอื่นๆ ด้วยเช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และ กรดไฮโดรเจนไซยาไนด์ ซึ่งภายหลังกระบวนการภายในเซลล์พืช จะลดความเป็นพิษโดยเปลี่ยนกรดไฮโดรเจนไซยาไนด์ไปเป็นสาร  $\beta$ -cyanoalanine เพื่อป้องกันการสะสมสารพิษ (Kende, 1993)



ภาพที่ 1 วัฏจักรเมทาไทโอนีนของ Yang ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอทิลีน

ที่มา: Crozier *et al.* (2000)

#### 4.2 ความเสียหายของดอกไม้เนื่องจากเอทิลีน

เอทิลีนเป็นฮอร์โมนพืชที่มีบทบาทมากที่สุดเกี่ยวกับคุณภาพของดอกไม้ เอทิลีนที่เกิดจากดอกไม้เองหรือจากแหล่งภายนอกอื่นๆ เมื่อดอกไม้ได้รับก็สามารถทำความเสียหายให้กับดอกไม้ได้เช่นกัน เอทิลีนในบรรยากาศเพียง 0.002-0.5 ไมโครลิตรต่อลิตร สามารถทำความเสียหายให้กับดอกไม้ได้ ดอกไม้ที่ได้รับเอทิลีนจะมีอายุการใช้งานสั้น เพราะเอทิลีนทำให้กลีบดอกไม้เหี่ยวและดอกร่วงเร็ว ตัวอย่างอาการของดอกไม้ที่เกิดขึ้นหลังจากได้รับเอทิลีน เช่น ดอกคาร์เนชัน กลีบดอกม้วนเข้าหรือไม่บาน (sleepiness) ซึ่งบางครั้งเรียกว่าดอกฟูบหรือช็อค กุหลาบหิน (*Kalanchoe*) จะมีอาการกลีบดอกมีสีเขียวและกลีบดอกม้วนงอเข้า ผักบุ้งฝรั่ง (morning glory) กลีบดอกมีสีเขียวและปลายของกลีบดอกเหี่ยว กล้วยไม้ในสกุลแคทลียา แวนดา หวาย และฟาแลนนอพิซิสจะมีอาการดอกเหี่ยวและกลีบดอกร่วง กล้วยไม้สกุลกุหลาบ จะมีก้านดอกของกล้วยไม้โค้งงอ (epinasty) และ กลีบดอกของกุหลาบเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีน้ำเงินม่วง (bluening) ซึ่งอาการเหล่านี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอทิลีน ชนิดของดอกไม้ วัยของดอกไม้ และอุณหภูมิ (สายชล, 2531)

ความเสียหายของดอกกล้วยไม้เนื่องมาจากเอทิลีนนั้นมีรายงานในต่างประเทศหลายรายงานเช่น

Halevy (1986) ศึกษาการร่วงโรยของดอกกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* พบว่า ACC ถูกเคลื่อนย้ายจากละอองเกสรไปสู่ยอดเกสรตัวเมีย และในเวลาต่อมาเกสรตัวเมียจะผลิต ACC ขึ้น โดยการกระตุ้นของเอนไซม์ ACC synthase และ ACC ที่ผลิตขึ้นมาในเกสรตัวเมียจะถูกส่งไปยังกลีบดอก เพื่อผลิตเอทิลีน

Nair and Tung (1987) พบว่ากล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ *Pompadour* หลังดอกบานเต็มที่ 3 สัปดาห์ มีการผลิตเอทิลีนสูงสุด และสัมพันธ์กับการสะสมสาร ACC ที่ตรวจวัดได้ในเนื้อเยื่อดอกกล้วยไม้ ทำให้เกิดการม้วนงอของกลีบดอกและหมดอายุการใช้งาน เมื่อให้สาร ACC จากภายนอกในขณะที่ดอกบานเต็มที่ทำให้เร่งการเสื่อมสภาพและการร่วงของดอกกล้วยไม้ให้เร็วขึ้น

Woltering *et al.* (1993) พบว่าดอกกล้วยไม้สกุลเข็มบีเดียม ที่ถูกปลิดส่วนเกสรตัวผู้ ออกสามารถชักนำให้เกิดการสังเคราะห์เอทิลีนภายใน 24 ชั่วโมง เมื่อนำเฉพาะส่วนแผ่นปาก (labellum) แช่น้ำภายในเวลา 10-15 ชั่วโมง หลังปลิดเกสรตัวผู้ สามารถชะลอการเปลี่ยนแปลงสี

ของแผ่นปากให้ช้าลง แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงสีน่าจะเกี่ยวข้องกับปัจจัยบางอย่างที่สามารถเคลื่อนที่เข้าหรือออกในแผ่นปาก และจากการวัดปริมาณเอทิลีนในแต่ละช่วงเวลาของอวัยวะต่างๆ ของดอก พบว่าการเพิ่มขึ้นของเอทิลีนในส่วนกลางของแผ่นปาก ส่วนรังไข่ แผ่นปาก และกลีบดอก มีการผลิตเอทิลีนเพียงเล็กน้อย

สำหรับในประเทศไทยก็มีรายงานปัญหาที่เกิดกับกล้วยไม้เนื่องจากเอทิลีนด้วยเช่น

ในปี พ.ศ. 2528 สายชลและคณะได้รายงานผลการส่งออกกล้วยไม้วางเมื่อถึงมือผู้บริโภคพบว่า 63.52 เปอร์เซ็นต์ ของดอกกล้วยไม้ที่ส่งออก มีอาการดอกเหี่ยว อีก 36.48 เปอร์เซ็นต์ มีอาการดอกร่วง

ฟองจันทร์ (2536) พบว่าดอกตูม ดอกแฉิม และดอกบานของดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ป้อมปาตัวรีได้รับ ACC 0.5 มิลลิโมลาร์ โดยแซโคโคนกันช่อดอกเกิดการสร้างเอทิลีนเพิ่มขึ้นเร่งการชราภาพ และมีอายุการปักแจกันลดลง และ ACC ความเข้มข้นสูงขึ้นคือ 2.0 มิลลิโมลาร์ ทำให้ดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ซีซาร์ 4N เกิดการเสื่อมสภาพเร็วกว่าดอกกล้วยไม้ที่ได้รับ ACC ความเข้มข้นต่ำกว่าคือ 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์

ประภาพร (2539) รายงานว่าการเสื่อมสภาพของดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์ซีซาร์ (*Dendrobium 'Caesar'*) ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่าง *D. phalaenopsis* กับ *D. stratiotes* ถูกเร่งให้เกิดเร็วขึ้นเมื่อได้รับการผสมเกสรภายในเวลา 3-4 วัน และมีการผลิตเอทิลีนในดอกที่มีการผสมเกสร มากกว่าดอกที่ไม่ได้รับการผสมเกสร

อดิเรก (2540) รายงานว่าดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการผสมเกสรจะมีความไวในการตอบสนองต่อเอทิลีนเพิ่มขึ้น เมื่อให้เอทิลีนแก่ดอกกล้วยไม้หวายที่ได้รับการผสมเกสร การเสื่อมสภาพมีความรุนแรงมากกว่าดอกที่ไม่ได้รับการผสมเกสรแต่ได้รับเอทิลีน

### 4.3 การสังเคราะห์เอทิลีนในดอกไม้

ดอกกล้วยไม้จัดเป็นดอกไม้ประเภทที่มีความไวต่อเอทิลีน (Hunter *et al.*, 2004; Reid and Wu, 1992; Van Doorn and Stead, 1994) ดอกไม้ประเภทนี้มีความสามารถในการสร้างเอทิลีนได้เหมือนผลไม้ประเภท climacteric คือ มีระบบการสร้างเอทิลีนแบบ autocatalytic system กล่าวคือ การได้รับเอทิลีนจากภายนอกนั้น สามารถชักนำให้ดอกไม้สังเคราะห์เอทิลีนขึ้นมาเองได้ ดอกไม้เมื่อได้รับอันตรายต่างๆ เช่น เกิดบาดแผล หรือได้รับสารเคมีที่เป็นพิษ ก็จะสามารถกระตุ้นให้กระบวนการภายในของดอกไม้สร้างเอทิลีนได้ เอทิลีนที่ดอกไม้สร้างขึ้นเนื่องจากสาเหตุดังกล่าวเรียกว่า wounded ethylene โดยทั่วไปการสังเคราะห์ เอทิลีนประกอบด้วย 3 ระยะ คือ ระยะแรก ดอกไม้มีอัตราการสังเคราะห์เอทิลีนค่อนข้างต่ำ ระยะกลาง ดอกไม้มีอัตราการสังเคราะห์เอทิลีนสูงสุด และระยะสุดท้าย ดอกไม้มีอัตราการสังเคราะห์เอทิลีนลดลง การสังเคราะห์เอทิลีนของดอกไม้จะเห็นชัดในระยะกลาง ซึ่งเกิดขึ้นพร้อมกับการเปลี่ยนแปลงในส่วนอื่นๆ ของดอกไม้ ซึ่งนำไปสู่การเกิดการชราภาพของดอกไม้ เช่น การเหี่ยวของดอก ดังนั้นการชักนำให้ดอกไม้มีอัตราการสร้างเอทิลีนสูงขึ้นในระยะกลาง ก็จะทำให้ดอกไม้มีอายุการใช้งานสั้นลงตามไปด้วย ดอกไม้บางชนิด เช่น กล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์ Jacquelyn Hawaii มีรายงานว่าเป็นกล้วยไม้ที่มีอัตราการสังเคราะห์เอทิลีนสูงมากในระยะที่ดอกตูม และลดลงเมื่อดอกเริ่มบาน อัตราการสังเคราะห์เอทิลีนจะสูงขึ้นอีกเมื่อดอกที่บานแล้วเข้าสู่ระยะชราภาพ (Goh *et al.*, 1985) ดอกไม้แต่ละชนิดมีอัตราการสร้างเอทิลีนและมีช่วงเวลาของการเกิดการชราภาพแตกต่างกัน อีกทั้งดอกไม้แต่ละชนิดสามารถผลิตเอทิลีนและทนต่อเอทิลีนในปริมาณที่แตกต่างกัน นอกจากบาดแผล และสารพิษแล้ว ยังมีพวกก๊าซอะเซทิลีน (acetylene) และ โพรพิลีน (propylene) ซึ่งทำหน้าที่คล้ายเอทิลีน (ethylene analog) นอกจากนี้ อุณหภูมิสูง การผสมเกสร และสารควบคุมการเจริญเติบโตใน กลุ่มออกซิน เช่น NAA และ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ก็สามารถกระตุ้นให้ดอกไม้สร้างเอทิลีนเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน แต่โดยภาพรวมแล้ววิธีการต่างๆ จะเกิดขึ้นโดยผ่าน กระบวนการที่ดอกไม้มีการสร้าง ACC synthase มากขึ้น ACC synthase จะเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยน AdoMet เป็น ACC และในที่สุด ACC จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทิลีน (สายชล, 2531)

#### 4.4 การยับยั้งการสังเคราะห์เอทิลีน

ดอกไม้ที่ถูกยับยั้งการสังเคราะห์เอทิลีน จะมีอายุการใช้งานนานขึ้น การยับยั้งการสร้างเอทิลีนในดอกไม้สามารถทำได้หลายวิธีทั้งวิธีการใช้สารเคมีและวิธีการที่ไม่ใช้สารเคมี สำหรับ สารยับยั้งหรือขัดขวางการสังเคราะห์และการทำงานของเอทิลีนแบ่งเป็น 6 กลุ่มได้แก่

- 1) สารยับยั้ง pyridoxal enzyme เช่น aminoethoxyvinyl glycine (AVG) และ aminoxyacetic acid (AOA)
- 2) inorganic ions เช่น  $\text{Co}^{+2}$  โดยไอออนทั้งสองจะเข้าไปจับกับหมู่ sulfhydryl ของ เอนไซม์ ACO ซึ่งมีผลยับยั้งการเปลี่ยน ACC ไปเป็นเอทิลีน
- 3) uncouplers และ membrane-disruptive agents อื่นๆ เช่น 2, 4 dinitrphenol (DNP) และ carbonylcyanide -M-chlorophenylhydrazone (CCCP)
- 4) free radical scavengers เช่น n-propyl gallate และ sodium benzoate
- 5) polyamines เช่น spermidine และ spermine
- 6) สารที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับ ACC เช่น  $\alpha$ -aminoisobutyric acid พวกสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งมีผลยับยั้งการเปลี่ยน AdoMet ไปเป็น ACC เช่น ไฮโดโคตินิน จิบเบอรลิน ก็สามารถยืดอายุการใช้งานของดอกไม้ได้

ส่วนการยับยั้งเอทิลีนโดยไม่ใช้สารเคมีก็มีหลายวิธีเช่น การใช้อุณหภูมิต่ำ การใช้ความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำกว่า 21 เปอร์เซ็นต์ หรืออาจใช้ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์สูงกว่า 0.03 เปอร์เซ็นต์ (Yang and Hoffman, 1984) แต่วิธีการที่น่าจะมีประสิทธิภาพให้ผลถาวร อีกทั้งยังลดค่าใช้จ่ายและลดการใช้สารเคมี โดยที่สามารถยับยั้ง การสังเคราะห์เอทิลีนได้โดยตรงได้แก่ การถ่ายยีน ACO แบบ antisense เข้าสู่พืช ซึ่งวิธีการนี้สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ เอทิลีนในระดับการแสดงออกของยีนในขั้นสุดท้าย ซึ่งเป็นขั้นตอนของการยับยั้งที่มีประสิทธิภาพมาก

#### 4.4.1 การควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับตำแหน่งที่จำเพาะต่อ ลำดับเบสของสายนิวคลีโอไทด์ถูกควบคุมโดยโปรตีน ในพวกยูคาริโอตมีโปรตีนจำนวนมากที่เป็นทั้งตัวกระตุ้นและตัวยับยั้งการถอดรหัส การควบคุมการแสดงออกของโปรตีนจาก mRNA ควบคุมโดยโปรตีนและตำแหน่งที่มีลำดับเบสที่จำเพาะบนสาย RNA และ โครงสร้างทุติยภูมิ เช่น hairpin กลไกการควบคุมในโปรคาริโอต พบว่าการนำโมเลกุล RNA เข้าไปจับกับ mRNA สามารถควบคุมการจำลองตัวของ พลาสมิด กลไกการควบคุมการแสดงออกของโปรตีน โดยการนำส่วนของ RNA ที่ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นเบสคู่สมกับ mRNA หรือส่วนหนึ่งส่วนใดของยีนที่สนใจ เพื่อควบคุมการทำงานและการแสดงออกของยีนนั้น เรียกว่า antisense ซึ่ง antisense คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอที่ไปเข้าคู่กับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ โมเลกุลอื่นแล้วทำให้โมเลกุลนั้นไม่ทำงาน

##### 4.4.1.1 กลไกการทำงานของ antisense

Blokland *et al.* (1993) ได้เสนอว่า กลไกการทำงานมีผลยับยั้งการแสดงออกของยีนโดย antisense อาจเกิดได้จากกระบวนการดังต่อไปนี้

##### 1) กระบวนการยับยั้งการ transcription

โดย antisense RNA จะเข้าไปรวมกับ DNA template เกิดเป็น triple helix การที่ antisense RNA เข้าไปรวมนี้ จะทำให้กระบวนการ transcription หยุดลงก่อนที่จะเริ่มทำ การ transcribe จากการศึกษาพบว่า single strand poly dT จะเข้าไปจับกับ poly dA- polydT duplex แล้วเกิดเป็น triple helix นั่นคือ poly dT จะเข้าไปทาง major groove เพื่อที่จะเข้าไปจับเกาะกับ poly dA เกิดเป็น duplex ซึ่งโครงสร้างนี้จะไปขัดขวางการเริ่มต้นขบวนการ transcription และ elongation ด้วยเหตุที่ทั้งสาย sense และ antisense สามารถที่จะมารวมกันเป็น triple helix complex ได้ ดังนั้นจุดที่สำคัญคือ กลไกการทำงานน่าจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ oligonucleotide หรือ โมเลกุลของ RNA ที่บริเวณเป้าหมาย ดังนั้นเมื่อมี oligonucleotide เข้มข้นสูงมากๆ จะไปขัดขวาง transcription และ elongation

2) การยับยั้งขบวนการตกแต่ง RNA และการส่งผ่าน mRNA ออกจากนิวเคลียส

antisense RNA สามารถยับยั้งขบวนการตกแต่ง pre-mRNA โดยการเข้าไปจับบริเวณที่จะเกิด splicing และเติม polyA ทำให้เอนไซม์จำไม่ได้ ปฏิกริยาจึงไม่เกิดขึ้น ทำให้ได้ mRNA ที่ไม่สมบูรณ์ ตัวอย่างเช่น antisense RNA ที่สามารถเข้าคู่กันได้ดีกับ pre-mRNA ในยีน  $\beta$ -globin ในมนุษย์ หรือบริเวณ 3' ของยีน *erb A alpha-2* ในหนู แต่จะไม่พบเหตุการณ์ดังกล่าวในพืช เนื่องจากยังไม่มีหลักฐานที่แสดงว่ามี pre-mRNA สะสมอยู่มากขึ้น แต่อาจเป็นไปได้ว่า pre-mRNA เหล่านั้นสลายไปอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังพบว่ายีนที่มีหรือไม่มี intron สามารถถูกยับยั้งได้เท่าๆ กัน

บริเวณของ poly A tail มีผลต่อความคงทนของ mRNA ในยูคาริโอต แต่เมื่อ antisense RNA เข้าไปเกาะบริเวณ poly A ของ pre-mRNA แล้วอาจทำให้ pre-mRNA ถูกย่อยสลายไปอย่างรวดเร็ว แต่การยับยั้งบริเวณปลาย 3' ไม่ใช่สาเหตุสำคัญที่ลดการแสดงออกของยีน เนื่องจากพบว่า antisense RNA ที่ไม่ได้มีเป้าหมายอยู่บริเวณ poly A ก็สามารถลดการแสดงออกของยีนได้ นอกจากนั้นก็มีหลักฐานแสดงแน่ชัดว่า บริเวณปลาย 3' ของ RNA จำเป็นต่อการส่ง RNA ออกจากนิวเคลียสสู่ไซโตพลาสซึม นอกจากนั้นยังพบว่า antisense RNA ไปรบกวนการส่งผ่าน mRNA ออกจากนิวเคลียส เนื่องจากว่ากระบวนการ transcription กระบวนการตัดแต่ง pre-mRNA และกระบวนการส่งผ่าน mRNA ออกนอกนิวเคลียส เป็นกระบวนการที่มีแบบแผนแน่นอน การไปขัดขวางหรือยับยั้งช่วงใดช่วงหนึ่ง จะทำให้ขบวนการทั้งหมดหยุดลง ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยวิธีการ *in situ* hybridization

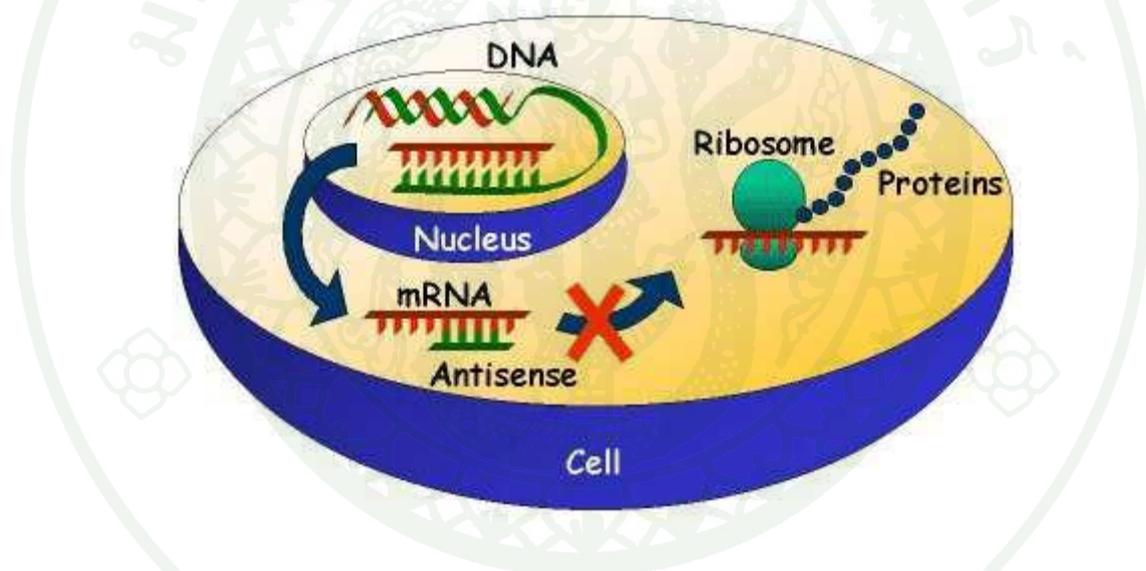
3) การยับยั้งกระบวนการ translation

antisense RNA จะไปยับยั้งขบวนการ translation ทั้งในโพรคาริโอตและยูคาริโอต ในโพรคาริโอตนั้น antisense RNA จะไปยับยั้งขบวนการเริ่มต้นของการ translation โดยจะเข้าไปจับที่บริเวณ ribosome binding site ส่วนในยูคาริโอตจะขึ้นอยู่กับปริมาณของ antisense RNA ในไซโตพลาสซึม จากการทดลองฉีด antisense *adh* RNA เข้าไปในไซโตพลาสซึมเซลล์ oocyte ของ *Xenopus* พบว่า antisense *adh* RNA จะไปยับยั้งการ translation ของ alcohol dehydrogenase (*adh*) โดยเกิดเป็น RNA-RNA hybrid และได้มีการศึกษา antisense ของ bialaphos resistance (*bar*) gene

ในพืช พบว่า กิจกรรมของยีน *bar* จะลดลง  $\frac{1}{4}$  เท่า ซึ่งเกิดจากการเข้าคู่กันที่ไม่เสถียรของสาย sense และ antisense *bar* RNA จึงกล่าวได้ว่า ประสิทธิภาพของการ translation และ *bar* mRNA ที่ลดลง เป็นผลเนื่องมาจาก ปฏิกิริยาของ antisense RNA ใน cytoplasm และในนิวเคลียส ตามลำดับ

#### 4) antisense RNA ชักนำให้เกิดการสลายตัวของ mRNA

การไร้เสถียรภาพของ mRNA ซึ่งถูกชักนำโดย antisense RNA เนื่องจากพบว่า เมื่อสาย sense และ antisense RNA มาจับคู่กันเป็น dsRNA แล้วจะถูกย่อยสลายไปอย่างรวดเร็วโดย เอนไซม์ ribonuclease ซึ่งมีการรายงานพบว่า dsRNA ในพืชแต่ละรูปแบบของ dsRNA ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เป็นไปได้ที่ dsRNA สูญเสียไประหว่างกระบวนการ isolation



ภาพที่ 2 การทำงานของ antisense oligonucleotide

ที่มา: Lambert *et al.* (2000)

## ตัวอย่างงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการใช้ antisense technology

สำหรับงานวิจัยที่ใช้ antisense technology ในการปรับปรุงสีดอกไม้ ได้แก่ งานวิจัยของ Elomaa *et al.* (1993) ได้ถ่ายยีน *chalcone synthase (chs)* แบบ antisense โดยใช้ *A. tumefaciens* ซึ่ง มีผลทำให้ดอกเยอบีราสีแดงเปลี่ยนเป็นสีชมพูและสีครีม ส่วนดอกสีแดงที่ได้รับยีน *dfr* แบบ antisense ให้ดอกไม้ใหม่เป็นสีชมพู Courtney- Gutterson *et al.* (1994) รายงานว่าเมื่อถ่ายยีน *chs* ที่โคลนได้จากเบญจมาศแบบ sense และ antisense เข้าสู่เบญจมาศสายพันธุ์ Moneymaker ซึ่งมี ดอกสีชมพูจะทำให้ดอกเปลี่ยนเป็นสีขาว และ Aida *et al.* (2000) ปรับปรุงสีดอกโทเรเนีย โดยการถ่ายยีน *dfr* แบบ antisense นั้นจะให้ดอกสีน้ำเงินกว่าต้นที่ได้รับยีน *chs* แบบ antisense และยังพบอีกว่าการถ่ายยีน *dfr* อาจทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินลดลง และทำให้ปริมาณสารฟลาโวนเพิ่มขึ้น ส่วนการถ่ายยีน *chs* ทำให้การสังเคราะห์แอนโทไซยานินและสารฟลาโวนลดลง

Jimenez-Bermudez *et al.* (2002) ศึกษาการถ่ายยีน antisense ของ pectate lyase ภายใต้ การควบคุมของ 35S promoter เข้าสู่สตอเบอรี่ พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนนี้ให้ผลที่มีขนาดและ กระบวนการสุกไม่แตกต่างไปจากผลของต้นปกติ แต่ให้ความแน่นเนื้อสูง และพบองค์ประกอบ ของผนังเซลล์เช่น เพคตินในผลที่ได้รับการถ่ายยีน antisense นี้ถูกย่อยสลายน้อยลงกว่าผลของ ต้นปกติงานวิจัยที่ใช้ antisense technology ในการลดการผลิตเอนไซม์ ACC oxidase

Hamilton *et al.* (1990) ทำการถ่ายยีน *ACO* แบบ antisense เข้าสู่มะเขือเทศพบว่า สามารถยับยั้งการสังเคราะห์เอทิลีนได้ถึง 87 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Klee *et al.* (1991) ทำการสร้าง ยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ ACC synthase แบบ antisense RNA แล้วถ่ายฝากยีนตัวนี้ลง ใน มะเขือเทศ พบว่ามะเขือเทศแปลงพันธุ์ที่ได้ไม่สุกเนื่องจากไม่มีการสังเคราะห์เอทิลีน และ Bolitho *et al.* (1997) ได้ถ่ายยีน *ACO* ของแอปเปิ้ลแบบ antisense เข้าสู่มะเขือเทศ พบว่ามะเขือเทศ ที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถลดการสังเคราะห์เอทิลีนได้ถึง 95 เปอร์เซ็นต์

Flores *et al.* (2000) ศึกษาการถ่ายยีน *ACO* แบบ antisense เข้าสู่แคนตาลูปสายพันธุ์การค้า เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาของผลแคนตาลูป พบว่า 35 วันหลังจากผสมเกสร สีรงควัตถุ เช่น คลอโรฟิลล์ และ แคลโรทีนอยด์ ในต้นแคนตาลูปที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน มีรงควัตถุทั้งสองตัว ลดลง ส่วนผลที่ได้จากต้นที่ได้รับการถ่ายยีนยังคงมีสีรงควัตถุทั้งสองชนิดในปริมาณสูงใกล้เคียง กับวันแรกๆ เมื่อตรวจสอบปริมาณกรด citric และปริมาณน้ำตาลซูโครสพบว่า ผลของต้นที่ไม่ได้รับ การถ่ายยีนมีปริมาณกรด citric และน้ำตาลซูโครสในปริมาณที่ต่ำกว่า ผลของต้นที่ได้รับการถ่ายยีน

อย่างมาก และเมื่อตรวจสอบการผลิเตอทีลินและการหายใจของผลแคนตาอูปพบว่า ผลของต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีอัตราการหายใจและการผลิเตอทีลินสูงตั้งแต่วันที่ 30 หลังจากผสมเกสร ส่วนผลของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนยังมีอัตราการหายใจและการผลิเตอทีลินในปริมาณที่ต่ำใกล้เคียงกับวันแรกแม้จะเลยมาถึงวันที่ 45 แล้วก็ตาม

Bower *et al.* (2002) ศึกษาการถ่ายยีน antisense *ACO* เข้าสู่แตง Charentais (*Cucumis melo*) พบว่าโดยปกติถ้าปล่อยให้ผลสุกคาต้นแล้วผลแตงจะมีการหายใจแบบ non-climacteric แต่ถ้าเก็บเกี่ยวผลจะมีการสุกแบบ climacteric และเมื่อถ่ายยีน antisense *ACO* แล้วพบว่าทั้งการหายใจและการผลิเตอทีลินอยู่ในระดับต่ำตลอดเวลา

Silva *et al.* (2004) ศึกษาลักษณะของเมลอนที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *ACO* จากแอปเปิ้ล พบว่าผลของเมลอนต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีอายุยาวนานกว่าผลของต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน 10 วันจนกระทั่งถึงระยะเก็บเกี่ยว และเมื่อตรวจสอบบริเวณเปลือกของเมลอน พบว่าคลอโรฟิลล์นั้นสำหรับผลของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีคลอโรฟิลล์สูงกว่าผลของต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนแม้อยู่ในระยะการเก็บเกี่ยว แต่พบว่าแคโรทีนอยด์นั้นมีปริมาณไม่แตกต่างกันทั้งในผลของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีน ส่วนเมื่อตรวจสอบบริเวณเนื้อของเมลอนพบว่ามีปริมาณกรด titratable สูงในผลของต้นที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งคุณสมบัติที่ได้มาหลังจากได้รับการถ่ายยีนนั้นเป็นคุณสมบัติที่ต้องการสำหรับพันธุ์การค้า

รักชนก (2549) ศึกษาการถ่ายยีน antisense *CPACO* เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายสองสายพันธุ์คือ บอม 17 และ อียสกุล โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ พบว่า กล้วยไม้สกุลหวายทั้งสองพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อที่มีอายุ 8 เดือนที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* มีการผลิเตอทีลินต่ำกว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และเมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ *ACO* พบว่าต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนมีกิจกรรมเอนไซม์ *ACO* ต่ำกว่ากล้วยไม้ปกติ

Li and *et al.* (2007) ศึกษาการถ่ายยีน *ACC synthase* และ *ACC oxidase* ของบร็อคโคลี่แบบ antisense เข้าสู่ดอกพืทูเนีย โดยใช้พาหะอะโกรแบคทีเรีย เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของต้นพืทูเนียที่ได้รับการถ่ายยีน พบว่า มีการผลิเตอทีลินในบริเวณเนื้อเยื่อของรากลดลง และพบว่าต้นพืทูเนียที่ได้รับการถ่ายยีน *ACC oxidase* แบบ antisense สามารถลดการผลิเตอทีลินและเกิดการชะลอการเสื่อมสภาพดีกว่าต้นพืทูเนียที่ได้รับการถ่ายยีน *ACC synthase* แบบ antisense

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

1.1 สายต้นกล้วยไม้สกุลหวายในสภาพปลอดเชื้อ 2 พันธุ์ ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนที่ได้จากงานวิจัยของรักชนก (2549) คือ

พันธุ์บอม 17 (*Dendrobium Sonia* 'BOM 17')

พันธุ์เอียสกุล (*Dendrobium Sonia* 'Earsakul')

1.2 สายต้นกล้วยไม้สกุลหวายในสภาพปลอดเชื้อ 2 พันธุ์ ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* จากมะละกอ ที่ได้จากงานวิจัยของรักชนก (2549) พันธุ์ละ 4 สายต้น คือ

พันธุ์บอม 17 (*Dendrobium Sonia* 'BOM 17') จำนวน 4 สายต้น ได้รับการถ่ายยีน ดังนี้

- สายต้น AB1 และ สายต้น AB2 ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ pCAMBIA 1301a*ACO1* ที่มียีน *ACO1* วางตัวแบบ antisense

- สายต้น AB3 และ สายต้น AB4 ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ pCAMBIA 13121a*ACO2* ที่มียีน *ACO2* วางตัวแบบ antisense

พันธุ์เอียสกุล (*Dendrobium Sonia* 'Earsakul') จำนวน 4 สายต้น ได้รับการถ่ายยีน ดังนี้

- สายต้น AE1 AE2 AE3 และ AE4 ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ pCAMBIA 1301a*ACO1* ที่มียีน *ACO1* วางตัวแบบ antisense

กล้วยไม้สกุลหวายสองพันธุ์ทั้งที่ ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีนในแต่ละสายต้น มีทั้งหมด 20 ต้น (R1 ถึง R20)

## 2. วัสดุและอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

### 2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

2.1.1 เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ กระจกบดทรง แท่งแก้วคนสาร ปิเปตต์ ขนาดขนาด 4 ออนซ์ ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เป็นต้น

2.1.2 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave machine, Sanyo Lab Autoclave MLS-3780)

2.1.3 ตู้อบ (hot air oven, Memmert)

2.1.4 เครื่องวัดความเป็นกรดค่า (Multi-parameter analyzer, Consort C831)

### 2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ

2.2.1 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar flow biological safety cabinet class II, Thai interfile)

2.2.2 มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว (Petri dish) และตะเกียงแอลกอฮอล์

2.2.3 ชั้นวางขวดเนื้อเยื่อ

## 3. วัสดุอุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการคงอยู่และการแสดงออกของยีน

### 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการคงอยู่ของยีน

3.3.1 เครื่อง Thermocycle (Biometra<sup>®</sup>) สำหรับทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)

3.3.2 เครื่องกวนตะกอน (Vortex<sup>®</sup>)

3.3.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

3.3.4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

3.3.5 เครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation system)

3.3.6 เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (GelMate 2000, Toyobo)

3.3.7 Pipetman P2 P20 P200 P1000 (Pipetman model, Gilson)

3.3.8 Incubator Shaker (Infors Model AI 72, Minitron)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน

3.2.1 เครื่อง Gas chromatography รุ่น Shimadza GC 14A

3.2.2 เข็มฉีดยา ขนาด 28 G และกระบอกฉีดยา

3.2.3 หลอดแก้วขนาด 9 มิลลิลิตร พร้อมจุกยาง

3.2.4 เวอร์เนียร์คาลิเปอร์

#### 4. สารเคมี

4.1 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสูตร VW (Vacin and Went, 1949) (ตารางภาคผนวกที่1)

4.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ได้แก่ hydrochloric acid (HCl) sodium hydroxide (NaOH) และ potassium hydroxide (KOH)

4.3 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการคงอยู่ของยีนต่างๆ โดยวิธี PCR และ Southern blot hybridization (ตารางภาคผนวกที่ 5)

4.4 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) (ตารางภาคผนวกที่ 6 และ 7)

## 5. ไพรมเมอร์สำหรับตรวจสอบยีน antisense CPACO และยีนคัดเลือก

5.1 ไพรมเมอร์สำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของยีนคัดเลือก *hygromycin phosphotransferase (hpt)* ซึ่งหลังจากทำปฏิกิริยา PCR แล้ว ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 800 คู่เบส (นุชจรี, 2552)

HPT-2F (forward): 5'-CCT GAA CTC ACC GCG ACG-3'

HPT-2Rv (reverse): 5'-AAG ACC AAT GCG GAG CAT ATA-3'

5.2 ไพรมเมอร์สำหรับตรวจสอบบางส่วนของยีน antisense CPACO ของสายต้นที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ pCAMBIA 1301aACO1 ที่มียีน ACO1 วางตัวแบบ antisense ซึ่งหลังจากทำปฏิกิริยา PCR แล้ว ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดประมาณ 759 คู่เบส (รักษนก, 2549)

aACO1F (forward): 5'-GGAGCTCGCTAGCCACCATGATCTCTC  
TCATGA CCTGATGGA-3'

aACO1R (reverse): 5'-GGTCTAGACCATGGTCTACCAG  
AGATGGTGCTGG-3'

5.3 ไพรมเมอร์สำหรับตรวจสอบบางส่วนของ 35S CaMV โพรโมเตอร์ และยีน antisense CPACO สำหรับสายต้นที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ pCAMBIA 1301aACO1 ที่มียีน ACO1 วางตัวแบบ antisense ซึ่งหลังจากทำปฏิกิริยา PCR แล้ว ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดประมาณ 1200 คู่เบส

35SF (forward): 5'- GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCA -3'

aACO1R (reverse): 5'-GGTCTAGACCATGGTCTACCA  
GAGATGGTGCTGG-3'

5.4 ไพร์เมอร์สำหรับตรวจสอบบางส่วนของยีน antisense *CPACO* ของสายต้นที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ pCAMBIA 13121a*ACO2* ที่มียีน *ACO2* วางตัวแบบ antisense ซึ่งหลังจากทำปฏิกิริยา PCR แล้ว ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดประมาณ 759 คู่เบส (รัชนีกร, 2549)

aACO2F (forward): 5'GGAGCTCGCTAGCCACCATGTGAATT  
CGCATGTGAGAATTG -3'

aACO2R (reverse): 5'-GGTCTAGACCATGGTACAGCTTCATG  
TAATCCTCGA-3'

5.5 ไพร์เมอร์สำหรับตรวจสอบบางส่วนของ 35S CaMV โปรโมเตอร์ และยีน antisense *CPACO* ของสายต้นที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ pCAMBIA 13121a*ACO2* ที่มียีน *ACO2* วางตัวแบบ antisense ซึ่งหลังจากทำปฏิกิริยา PCR แล้ว ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดประมาณ 1200 คู่เบส

aACO2F (forward): 5'GGAGCTCGCTAGCCACCATGTGAATTCGC  
ATGTGAGAATTG -3'

35SR (reverse): 5'-GACTGGTGATTCAGCGCGTGTCC-3'

## วิธีการ

### 1. การเพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ

เพาะเลี้ยงต้นกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 2 พันธุ์บนอาหารสังเคราะห์สูตร Vacin และ Went (Vacin and Went, 1949) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ที่มี pH 4.9 เพาะเลี้ยงในสภาพแสงประมาณ 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ จนมีการแตกหน่อใหม่เป็นต้นที่สมบูรณ์ จากนั้นแยกต้นอ่อนที่สมบูรณ์แล้วลงอาหารในขวดใหม่

แล้วเปลี่ยนอาหารทุก 6-8 สัปดาห์ จนมีปริมาณกล้วยไม้มากพอสำหรับทำการทดลอง แล้วจึงนำออกปลูก

## 2. การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน antisense CPACO

หลังจากเพิ่มปริมาณกล้วยไม้ทุกสายต้นที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีน มีจำนวนมากพอแล้ว นำต้นที่ได้ออกปลูกสายต้นละ 20 ช่อ จากนั้นเลือกมาสายต้นละ 5 ช่อโดยเลือกช่อที่ 1 (R1) ช่อที่ 5 (R5) ช่อที่ 9 (R9) ช่อที่ 13 (R13) และ ช่อที่ 17 (R17) นำใบมาสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอแล้ว ทำการตรวจสอบการคงอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR dot blot hybridization Southern PCR hybridization และ Southern blot hybridization โดยมีวิธีการดังนี้

### 2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้

สกัดจีโนมิคดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO และจากต้นกล้วยไม้ปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ที่มีอายุประมาณ 1 ปี ด้วยวิธี TLEs ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Verwoerd *et al.*, 1989 โดยใช้ใบกล้วยไม้ประมาณ 5 กรัม บดให้ละเอียดใน TLEs buffer (ภาคผนวกตารางที่ 3) เติม 2% polyvinylpyrrolidone (PVP-40) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (PCI) (25:24:1 โดยปริมาตร) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex<sup>®</sup> เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสประมาณ 7 มิลลิลิตร ใส่หลอดใหม่ และเติมสารละลาย PCI ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex<sup>®</sup> เป็นเวลา 2 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 0.1 เท่า และ เติม isopropanol ปริมาตร 1.5 เท่า ของส่วนใส ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมา นำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ใช้แท่งแก้วเกี่ยวตะกอนดีเอ็นเอใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วล้างตะกอนด้วย ethanol 70% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer ที่มี RNase 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 300 ไมโครลิตร (1mM Tris-HCl pH8.0, 0.1 mM EDTA pH8.0) ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยนำสารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร มาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟ 100 โวลต์

นาน 45 นาที ในบัฟเฟอร์ 1X TBE เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน แลมป์ดา ดีเอ็นเอ มาร์คเกอร์  
 ย้อมเจลในสารละลายเอทิลเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และบันทึกภาพ  
 สารละลายดีเอ็นเอที่ยังไม่ได้ใช้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการตรวจสอบ  
 การคงอยู่ของยีนต่อไป

## 2.2 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 2.1 มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน antisense *CPACO* ยีน *hpt*  
 ส่วนของ 35S *CaMV* โปรโมเตอร์ และยีน antisense *CPACO* พร้อมกัน ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้  
 ไพรมเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนนั้นๆ ดังนี้คือ

ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน antisense *CPACO* คือ aACO1F primer (forward) และ  
 aACO1R primer (reverse) ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้วจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด  
 759 คู่เบส

ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *hpt* ใช้ไพรมเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *hpt* คือ HPT-2F  
 (forward) และ HPT-2Rv (reverse) ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้วจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ  
 ที่มีขนาด 800 คู่เบส

ตรวจสอบการมีอยู่ของโปรโมเตอร์ 35S*CaMV* และยีน antisense *CPACO* พร้อมกัน  
 โดยใช้ไพรมเมอร์หนึ่งที่มีความจำเพาะต่อโปรโมเตอร์ 35S*CaMV* และ ไพรมเมอร์อีกตัวหนึ่งที่มี  
 ความจำเพาะต่อ ยีน antisense *CPACO* (ไพรมเมอร์ชุด 5.3 และ 5.5) ซึ่งหลังจากทำปฏิกิริยา PCR  
 แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 1200 คู่เบส

การตรวจหาชิ้นทั้งสามนี้ใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกันคือใน ส่วนผสม 25  
 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X PCR buffer 2.5 มิลลิโมลาร์  $MgCl_2$  250 ไมโครโมลาร์ dNTP 10  
 ไมโครโมลาร์ ไพรมเมอร์ *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร และใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจาก  
 ใบกล้วยไม้ที่มีความเข้มข้นประมาณ 100-300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สำหรับพลาสมิดดีเอ็นเอ  
 ที่มีความเข้มข้นประมาณ 0.5-1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำส่วนผสม

ปฏิกิริยาไปใส่เครื่อง Thermocycle (บริษัท Biometra®) และกำหนดอุณหภูมิโดยใช้โปรแกรมเฉพาะของแต่ละยีน ดังนี้

สำหรับยีน *hpt* ใช้โปรแกรมดังนี้

Initial PCR activation step                   ที่ 96°ซ นาน 3 นาที

3 step cycling จำนวน 35 รอบ กำหนดอุณหภูมิดังนี้

denature   ที่ 96°ซ นาน 20 วินาที

annealing   ที่ 55°ซ นาน 60 วินาที

extension   ที่ 72°ซ นาน 60 วินาที

และ final extension                         ที่ 72°ซ นาน 5 นาที

สำหรับ โปรโมเตอร์ 35SCaMV และยีน antisense *CPACO* ใช้โปรแกรมดังนี้

Initial PCR activation step                   ที่ 94°ซ นาน 3 นาที

3 step cycling จำนวน 40 รอบ

denature   ที่ 94°ซ นาน 30 วินาที

annealing   ที่ 55°ซ นาน 30 วินาที

extension   ที่ 72°ซ นาน 60 วินาที

และ final extension                         ที่ 72°ซ นาน 7 นาที

ตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ที่ได้โดยนำมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 1X TBE ใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ นาน 45 นาที เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) เมื่อครบเวลานำเจลมาเชื่อมด้วยสารละลาย เอทริเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และบันทึกภาพ

## 2.3 การตรวจสอบการคงอยู่ของยีนด้วยเทคนิค dot blot hybridization

หลังจากที่ทราบผลการมีอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR แล้ว ยืนยันผลเพิ่มเติมโดยการนำจีโนมิกจากข้อ 2.1 มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน antisense *CPACO* ด้วยเทคนิค dot blot hybridization ซึ่งการตรวจสอบด้วยวิธีนี้มีขั้นตอนคือ การเตรียมและติดฉลากดีเอ็นเอตัวตรวจสอบ (probe) ที่จำเพาะกับ ยีน antisense *CPACO* การเตรียม DNA blot และ การทำปฏิกิริยา hybridization ซึ่งแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้

### 2.3.1 การเตรียม DNA blot

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากใบกล้วยไม้ตามวิธีการข้อ 2.1 ทั้งที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* มาตัวอย่างละ 2 ไมโครกรัม นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 8 นาที เพื่อแยกดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว แล้วนำมาแช่น้ำแข็งโดยทันที จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอมาหยดลงบนไนลอนเมมเบรน (Hybond-N<sup>+</sup> บริษัท Amersham) ตึงเมมเบรนให้แห้ง แล้วนำไปฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 3 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอไว้กับเมมเบรน

### 2.3.2 การเตรียมและการติดฉลากดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) ที่จำเพาะกับยีน antisense *CPACO*

ใช้พลาสมิด pCAMBIA 1301a*ACO1* (รักชนก, 2549) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในการเตรียมดีเอ็นเอตัวตรวจสอบ โดยใช้ความเข้มข้นของพลาสมิด 200 พิโคกรัม และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับยีน antisense *CPACO* คือ a*ACO1*F (forward) และ a*ACO1*R (reverse) อย่างละ 0.25 ไมโครโมลาร์ ทำปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการในข้อ 2.2 หลังจากนั้นนำผลผลิตปฏิกิริยา PCR ที่ได้มาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1% ในบัฟเฟอร์ 1XTBE ใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA ladder marker หลังจากนั้นตรวจสอบขนาดผลผลิต PCR ภายใต้อัลตราไวโอเลต ตัดเจลที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 759 คู่เบส ของยีน antisense *CPACO* ซึ่งจะนำมาทำเป็นต้นแบบของดีเอ็นเอตรวจสอบ นำมาสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ QIA quick Gel Extraction kit (QIAGEN, Germany) หลังจากนั้นได้ดีเอ็นเอต้นแบบตรวจสอบแล้วนำมาทำปฏิกิริยา PCR อีกครั้งเพื่อติดฉลากดีเอ็นเอตรวจสอบโดยใช้ PCR DIG Labeling kit (Roche Applied Science) ใช้ส่วนผสมและอุณหภูมิปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับข้อ 2.2

### 2.3.3 การทำปฏิกิริยา hybridization

นำในลอนเมมเบรนที่ได้จากข้อ 2.3.1 มา pre-hybridization ในสารละลาย hybridization (ตารางภาคผนวกที่ 5) โดยเติมสารละลาย hybridization ลงในหลอด hybridization ที่ใส่ในลอนเมมเบรน ใช้ปริมาตรสารละลาย 10 มิลลิลิตร ต่อพื้นที่ในลอนเมมเบรน 100 ตารางเซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำดีเอ็นเอตรวจสอบที่ได้จากข้อ 2.3.2 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที หลังจากนั้นเติมสารละลาย hybridization ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในหลอดเซนตริฟิวจ์ แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ทั้งหมดเติมลงในหลอด hybridization ที่มีในลอนเมมเบรนอยู่ เพื่อทำปฏิกิริยา hybridization โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

### 2.3.4 การตรวจสอบผลการ hybridization

นำในลอนเมมเบรนที่ผ่านการทำ hybridization แล้วจากข้อ 2.3.3 มาล้างด้วยสารละลาย high stringency buffer (ตารางภาคผนวกที่ 5) โดยเติมสารละลายให้ท่วมในลอนเมมเบรน เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง และทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วล้างด้วยสารละลาย low stringency buffer (ตารางภาคผนวกที่ 5) โดยเขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วจึงล้างในลอนเมมเบรนด้วยสารละลาย washing buffer (ภาคผนวก ก) เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วย้ายในลอนเมมเบรนลงในถุงพลาสติก เติมสารละลาย blocking solution (ตารางภาคผนวกที่ 5) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปิดปากถุงให้สนิท นำไปเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำในลอนเมมเบรนไปแช่ในสารละลาย anti-digoxigenin conjugated alkaline phosphatase ที่เจือจางด้วยสารละลาย blocking solution ในอัตราส่วน 1:10,000 เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างในลอนเมมเบรนด้วย washing buffer 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที แล้วปรับสภาพในลอนเมมเบรนโดยแช่ในลอนเมมเบรนลงในสารละลาย detection buffer (ตารางภาคผนวกที่ 5) นาน 3 นาที แล้วย้ายในลอนเมมเบรนมาวางลงแผ่นพลาสติก ผสมสารละลาย detection buffer กับ chemiluminescent substrate (CDP star<sup>TM</sup>) ในอัตราส่วน 1:500 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเกลี่ยลงบนในลอนเมมเบรนให้ทั่ว วางในลอนเมมเบรนไว้ในที่มืดนาน 15 นาที แล้วจึงรีดเอาสารละลายส่วนเกินทิ้ง นำในลอนเมมเบรนไป

ประกบกับแผ่นฟิล์มในท้องมืด นาน 30 นาที ถึง 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างฟิล์มด้วยสารละลาย developer และ fixer ตามลำดับ ตรวจสอบแถบสัญญาณสีดำที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม

#### 2.4 การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน antisense CPACO ด้วยเทคนิค Southern PCR hybridization

หลังจากทราบผลการตรวจสอบการคงอยู่ของยีนด้วยเทคนิค PCR และ dot blot hybridization แล้ว นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ในแต่ละสายต้น โดยเลือกซ้ำที่ 1 (R1) ที่ให้ผลบวกทั้งสองการทดลอง มาทำอิลคโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1% ในบัฟเฟอร์ 1xTBE ใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA ladder marker ภายหลังจากการตรวจสอบการแยกของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสและตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลด้วย UV-transilluminator แล้ว จึงทำการย้ายดีเอ็นเอไปยังไนลอนเมมเบรน (Hybond-N<sup>+</sup> บริษัท Amersham) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ ล้างแผ่นเจลด้วยสารละลาย 0.25M HCl ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วล้างเจลด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นปรับสภาพดีเอ็นเอโดยแช่เจลในสารละลาย denaturation (0.5M NaOH และ 1.5M NaCl) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกครั้ง หลังจากนั้นล้างเจลด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นจึงเติมสารละลาย neutralization (0.5 M Tris-HCl: pH 7.5 และ 1.5 M NaCl) เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วทำซ้ำอีกครั้ง ล้างเจลด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

เตรียมชุดอุปกรณ์สำหรับย้ายดีเอ็นเอจากเจลมาอยู่บนไนลอนเมมเบรนโดยวางกระดาษ Whatman 3 MM ใช้เป็นสะพานในอ่างที่มีสารละลาย 10x SSC (0.3M Sodium citrate และ 3M NaCl) นำเจลที่ได้จากขั้นตอนด้านบนมาแช่ในสารละลายในสารละลาย 10x SSC (1.5M NaCl, 0.5M Na-citrate: pH 7.0) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วนำแผ่นเจลวางคว่ำหน้าลงบนกระดาษ Whatman 3MM จากนั้นนำไนลอนเมมเบรนวางบนแผ่นเจล วางทับด้วยกระดาษ 3 MM จำนวน 3 แผ่น แล้ววางทับด้วยกระดาษซับหลายๆชั้นให้มีความหนา 20 เซนติเมตร จากนั้นวางวัตถุที่มีน้ำหนัก 500 กรัม ทับบนกระดาษซับอีกครั้งแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาข้ามคืนเพื่อให้แถบดีเอ็นเอเคลื่อนย้ายจากแผ่นเจลขึ้นมาติดอยู่บนไนลอนเมมเบรน จากนั้นลอกไนลอนเมมเบรนออกจากเจลแล้วนำมาแช่ในสารละลาย 2x SSC นาน 5 นาที ผึ่งไนลอนเมมเบรน

ให้แห้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิห้อง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับไนลอนเมมเบรนและนำไปทำปฏิกิริยาไฮบริดในขั้นต่อไป

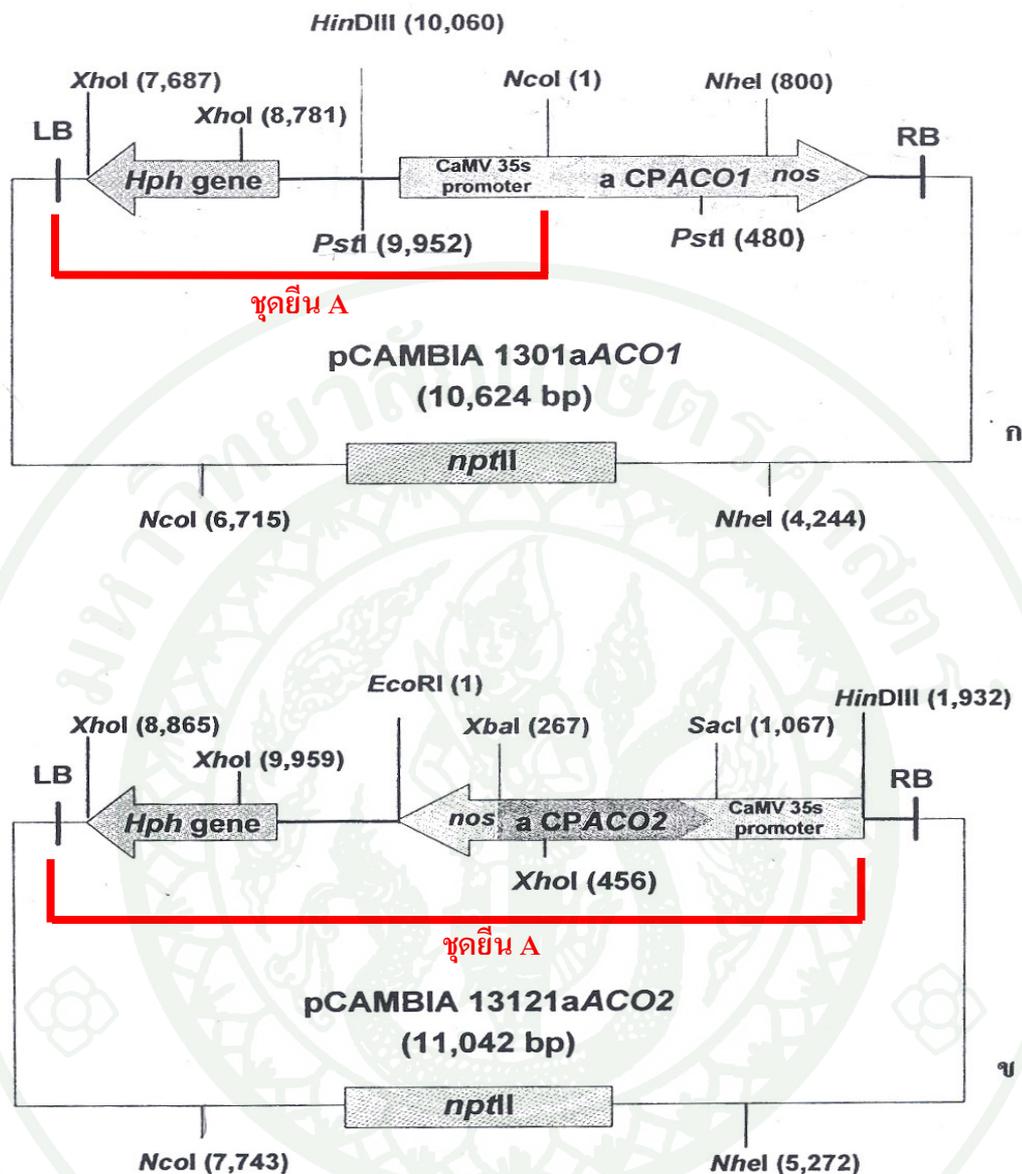
การทำปฏิกิริยา hybridization โดยนำไนลอนเมมเบรนที่ได้มาทำ pre-hybridization โดยวิธีการ เช่นเดียวกับข้อ 2.3.3 ตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยา hybridization โดยนำไนลอนเมมเบรน ที่ได้จากการ pre-hybridization มาตรวจสอบโดยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 2.3.4

2.5 การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน antisense CPACO ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization

2.5.1 สกัดจีโนมิคดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO และจากต้นปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ที่มีอายุ 1 ปี ในแต่ละสายต้น โดยเลือกซ้ำที่ 1(R1) ด้วยวิธี TLEs ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Verwoerd *et al.*, 1989 เช่นเดียวกับข้อ 2.1

2.5.2 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2.5.1 จำนวน 300 ไมโครกรัม โดยพันธุ์เอียงสกุลสายต้น AE1 AE2 AE3 AE4 และพันธุ์บอม 17 สายต้น AB1 AB2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* ส่วนพันธุ์บอม 17 สายต้น AB3 และ AB4 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* (ภาพที่ 3) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืนเพื่อให้เกิดการตัดดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ตัดสมบูรณ์แล้วไปทำอิลีกโทรโฟรีซิสเพื่อแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการบนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 1X TBE เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker โดยใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นานประมาณ 1 ชั่วโมงครึ่ง แล้วย้อมเจลด้วยสารละลายเอทิลเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและบันทึกภาพ

2.5.3 ย้ายดีเอ็นเอที่จะตรวจสอบจากเจลอะกาโรสไปสู่ไนลอนเมมเบรน โดยนำแผ่นเจลอะกาโรสจากข้อ 2.5.2 มาทำวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.4 แต่เปลี่ยนดีเอ็นเอตรวจสอบเป็นบริเวณ 35S CaMV โปรโมเตอร์



ภาพที่ 3 แผนผังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สำคัญของ binary vector ที่มีชิ้น antisense CPACO และแสดงชุดยีน A ที่ได้หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งมีส่วนของ 35S CaMV โปรโมเตอร์ สำหรับหาจำนวนชุดยีนด้วยวิธี Southern blot hybridization

ที่มา: รักชนก (2549)

### 3. ศึกษากระบวนการเก็บแก๊สเอทิลีนในต้นกล้วยไม้

เนื่องจากต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนมี 35S CaMV โปรโมเตอร์เป็นตัวควบคุมดังนั้นซึ่งจะทำให้ยีน antisense CPACO มีการทำงานตลอดเวลา อาจทำให้มีการผลิตก๊าซเอทิลีนลดลงในทุกระยะของกล้วยไม้เช่นในระยะที่เป็นต้น หรือ ระยะที่เป็นดอก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาการผลิตเอทิลีนในทุกระยะการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนเปรียบเทียบกับกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน แต่เนื่องจากการเก็บแก๊สเอทิลีนจากต้นกล้วยไม้ทั้งต้นยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองเก็บแก๊สเอทิลีน โดยใช้ภาชนะที่ดัดแปลงขึ้นเป็นการเฉพาะ (ภาพที่ 4) และศึกษาจำนวนต้นกล้วยไม้ที่ใส่ลงในภาชนะ และเวลาที่ใช้ในการเก็บแก๊ส เพื่อให้ได้วิธีการที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการตรวจสอบกับต้นที่ได้รับการถ่ายยีนต่อไป

โดยในการทดลองนี้ศึกษาในต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนในช่วงอายุ 1 6 9 และ 12 เดือนหลังออกปลูก โดยศึกษา 2 ปัจจัย คือ จำนวนต้นในภาชนะดัดแปลง ซึ่งมีทั้งหมด 4 สิ่งทดลอง คือจำนวน 1 2 3 และ 4 ต้นต่อภาชนะ และอีกปัจจัยหนึ่ง คือระยะเวลาในการบรรจุต้นกล้วยไม้ไว้ในภาชนะตั้งแต่ 1 ถึง 9 ชั่วโมง โดยมีวิธีการทดลองคือ บรรจุต้นกล้วยไม้ในภาชนะ (ภาพที่ 4) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ภายในห้องทดลอง 60-65% สภาพแสงธรรมชาติในที่ร่ม หลังจากนั้นเมื่อเวลาผ่านไป 1 2 3 4 5 6 7 8 และ 9 ชั่วโมง เก็บก๊าซจากแต่ละขวดปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้กระบอกฉีดยาและเข็มขนาด 28 G จากนั้นฉีดแก๊สเข้าไปใน column ของเครื่อง Gas chromatography รุ่น Shimadzu GC 14A ที่มี detector ชนิด flame ionization detector (FID) เพื่อวัดปริมาณเอทิลีนและคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากกล้วยไม้ ทำช่วงอายุละ 5 ชั่วโมง (1 กระบอกคือ 1 ชั่วโมง) เก็บข้อมูลแล้ววิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนต้นกล้วยไม้กับปริมาณเอทิลีนและปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ตรวจวัดได้ โดยคำนึงถึงสภาพต้นกล้วยไม้ที่จะต้องนำไปศึกษาต่อ

### 4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน antisense CPACO

#### 4.1 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ACO

ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ACO โดยวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Koto and Hyodo (1999) โดยนำใบของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีนที่อายุ 9 เดือน

หลังจาก ออกปลูกมาประมาณ 3 กรัม ใส่ลงใน extraction buffer (ตารางภาคผนวก ก) ในอัตราส่วน 1:3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วนำมาปั่นด้วยเครื่อง homogenizer ให้ละเอียด จากนั้นกรองด้วย cheese cloth 4 ชั้น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนใสเก็บไว้ใช้ในการวัดกิจกรรมเอนไซม์ และใช้ในการวัดปริมาณ โปรตีน

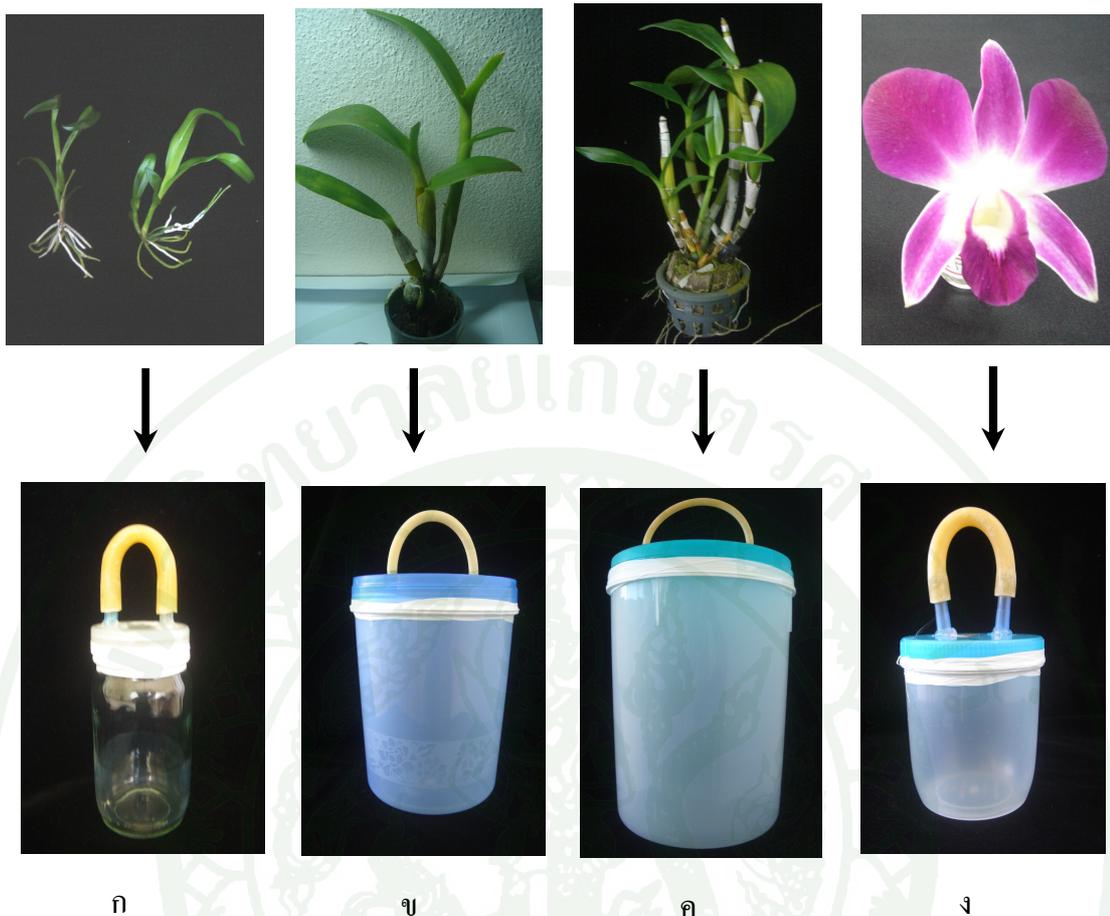
#### การวัดปริมาณ โปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976)

เนื่องจากการคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ ACO ต้องเปรียบเทียบกับปริมาณ โปรตีนดังนั้นจึงต้องวัดปริมาณ โปรตีนในสารละลายส่วนใสที่สกัดได้ โดยวิธีการของ Bradford (1976) ซึ่งทำโดยดูดสารละลายส่วนใสที่สกัดได้ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง และเติมสารละลาย Coomassie Brilliant Blue G-250 ความเข้มข้น 0.0125 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-60 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-240 spectrophotometer นำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของ bovine serum albumin(BSA) ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ACO ทำโดยใช้ reaction buffer (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และสาร ACC ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 7 มิลลิลิตร จำนวน 6 หลอด แบ่งเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 3 หลอด กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มตัวอย่าง ที่เติมสารละลายส่วนใสที่สกัดได้ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กลุ่มที่ 2 เป็น internal standard ใส่ extraction buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นปิดปากหลอดด้วยจุกยางให้แน่น แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำหลอดทดลองแช่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นใช้หลอดฉีดยาดูดก๊าซเหนือสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาวัดปริมาณเอทิลีน ด้วยเครื่อง Gas chromatograph รุ่น Shimadza GC 14A เพื่อตรวจสอบปริมาณก๊าซเอทิลีนจากตัวอย่าง แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ ACC oxidase มีหน่วยเป็น พิโคลิตร เอทิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมงโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ ACC oxidase} = \frac{\text{ค่าเอทิลีนที่ตรวจวัดได้}}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด X เวลาในการincubate}}$$

ปริมาณโปรตีนทั้งหมด X เวลาในการincubate



ภาพที่ 4 ภาพสำหรับบรรจุต้นกล้วยไม้เพื่อเก็บเก็บเสถียร โดยที่ฟางขูดเจาะรูแล้วเสียบด้วยสายยางซิลิโคน

- ก. ภาพสำหรับบรรจุต้นกล้วยไม้ อายุ 1 เดือน หลังออกปลูก ใช้ขวดแก้ว ปริมาตร 250 มิลลิลิตร
- ข. ภาพสำหรับบรรจุต้นกล้วยไม้ อายุ 6 และ 9 เดือน หลังออกปลูก ใช้ขวดโหลพลาสติก ปริมาตร 2.5 ลิตร
- ค. ภาพสำหรับบรรจุต้นกล้วยไม้ อายุ 1 ปี หลังออกปลูก ใช้ขวดโหลพลาสติก ปริมาตร 25 ลิตร
- ง. ภาพสำหรับบรรจุดอกกล้วยไม้ แยกดอกตูมและดอกบาน ใช้ขวดโหลพลาสติก ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

## 4.2 การวัดปริมาณเอทิลีนในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO

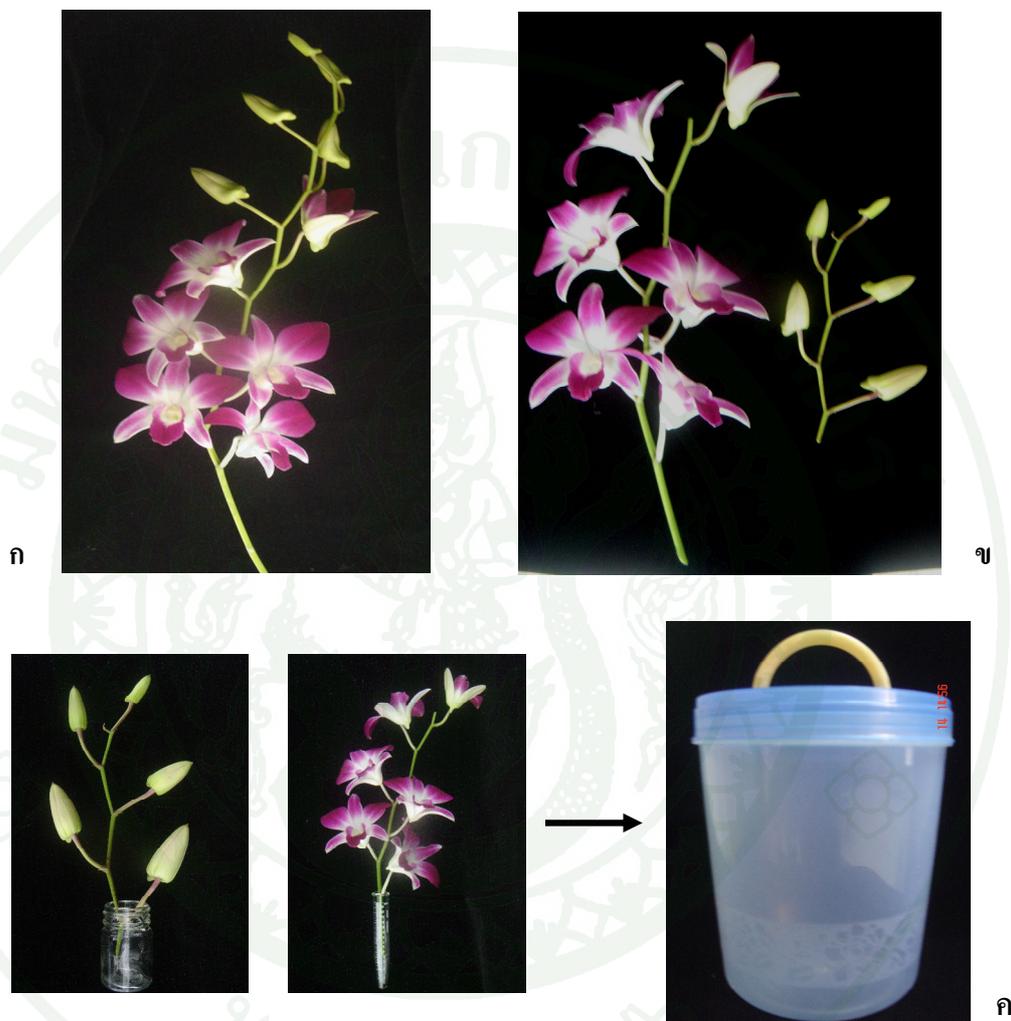
### 4.2.1 การวัดปริมาณเอทิลีนในต้นกล้วยไม้

การวัดปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นในต้นกล้วยไม้ที่อายุ 1 6 9 และ 12 เดือนหลังออกปลูก โดยใช้วิธีดัดแปลงจาก Bolitho *et al.* (1997) เปรียบเทียบระหว่างกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO กับกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ทดสอบโดยใช้กล้วยไม้ สายต้นละ 20 ช่อ โดยนำต้นกล้วยไม้ช่อที่ 1-4 ใส่งในภาชนะสำหรับเก็บแก๊สไบบที่ 1 ต้นกล้วยไม้ช่อที่ 5-8 ใส่งในภาชนะสำหรับเก็บแก๊สไบบที่ 2 ต้นกล้วยไม้ช่อที่ 9-12 ใส่งในภาชนะสำหรับเก็บแก๊สไบบที่ 3 ต้นกล้วยไม้ช่อที่ 13-16 ใส่งในภาชนะสำหรับเก็บแก๊สไบบที่ 4 และต้นกล้วยไม้ช่อที่ 17-20 ใส่งในภาชนะสำหรับเก็บแก๊สไบบที่ 5 หลังจากนั้น ปิดด้วยฝาขวดที่เจาะรูแล้วเสียบด้วยสายยางที่สามารถกันก๊าซออกได้ ภาชนะที่ใช้ขวดแก้วและขวดโพลีพลาสติกขนาดต่างๆ (ภาพที่ 4) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วเก็บก๊าซจากแต่ละขวดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกฉีดยาที่ใช้เข็มขนาด 28 G แล้วฉีดก๊าซเข้าใน column ของเครื่อง Gas chromatography รุ่น Shimadzu GC 14A ที่มี detector ชนิด flame ionization detector (FID) เพื่อวัดปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นจากกล้วยไม้ ทำ 5 ช่อ โดย 1 ขวดคือ 1 ช่อ

### 4.2.2 การวัดปริมาณเอทิลีนในดอกกล้วยไม้

ส่วนการวัดปริมาณเอทิลีนในดอกกล้วยไม้ โดยใช้วิธีดัดแปลงจาก Bolitho *et al.* (1997) เช่นเดียวกับการวัดปริมาณเอทิลีนในต้นกล้วยไม้ โดยเปรียบเทียบระหว่างดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO กับดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งทำโดยชั่งน้ำหนักของดอกกล้วยไม้แต่ละช่อดอก (ภาพที่ 5ก) หลังจากนั้นตัดแยกระหว่างดอกตูม และดอกบาน ออกจากกัน (ภาพที่ 5ข) โดยนำก้านช่อดอกตูมเสียบลงในหลอดแก้วบรรจุน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และก้านช่อดอกบานเสียบลงในหลอดแก้วขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำบรรจุลงในกระปุกพลาสติกปริมาตร 25 ลิตร ปิดขวดด้วยฝาขวดที่เจาะรูแล้วเสียบด้วยสายยางที่สามารถกันก๊าซออกได้ (ภาพที่ 5 ค) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (รุจิรา, 2549) แล้วเก็บก๊าซจากขวด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกฉีดยาที่ใช้เข็มขนาด 28 G แล้วฉีดเข้าใน column ของเครื่อง Gas chromatography รุ่น Shimadzu GC 14A ที่มี detector ชนิด flame ionization detector (FID) เพื่อวัดปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นจากดอกกล้วยไม้ แต่ละสายต้นทำทั้งหมด 5 ช่อ ( 1 ขวดคือ 1 ช่อ) ทำการเก็บ

ก๊าซ ในช่วงเวลาเดียวกันทุกวันจนกระทั่งดอกไม่มีการเสื่อมสภาพใช้เวลาประมาณ 14 วัน โดยหลังจากที่เก็บก๊าซเอทิลีนแล้วให้เปิดฝากระปุกออกแล้วนำช่อดอกตูมและช่อดอกบาน ออกวางในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสัมพัทธ์ 60-65% สภาพแสงธรรมชาติ



ภาพที่ 5 การวัดปริมาณเอทิลีนในดอกกล้วยไม้ โดยใช้วิธีดัดแปลงจาก Bolitho *et al.* (1997)

- ก. ช่อดอกกล้วยไม้ที่นำมาใช้วัดปริมาณเอทิลีน มีดอกบานประมาณครึ่งช่อ
- ข. นำช่อดอกกล้วยไม้มาตัดแยกส่วนดอกตูมและดอกบานออกจากกันแล้วนำแต่ละส่วนไปปักไว้ในน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้ว
- ค. นำทั้งช่อดอกตูมและช่อดอกบานใส่ลงภาชนะขนาด 2.5 ลิตรใช้สำหรับวัดปริมาณเอทิลีนปิดฝาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

## 5. การศึกษาอายุการปักแจกันของดอกกล้วยไม้

ศึกษาอายุการปักแจกันของดอกกล้วยไม้โดยศึกษาในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน เปรียบเทียบกับดอกจากต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ทำโดยศึกษา 2 แบบคือ อายุการปักแจกันของทั้งช่อดอก (ภาพที่ 6ก) และอายุการปักแจกันเฉพาะดอก (ภาพที่ 6ข) ในช่อดอกกล้วยไม้ ที่มีขนาดยาวประมาณ 40 เซนติเมตร มีดอกตูม 3 ถึง 5 ดอก และมีดอกบาน 4 ถึง 6 ดอก ตัดก้านช่อดอกให้เหลือความยาวจากปลายก้านถึงดอกล่างสุด ประมาณ 10 เซนติเมตร โดยเสียบก้านช่อดอกลงในหลอดแก้วขนาด 15 มิลลิเมตร ที่บรรจุน้ำกลั่น 14 มิลลิเมตร ส่วนการศึกษาในแต่ละดอกย่อยทำโดยใช้มีดโกนตัดก้านดอกทุกดอกออกจากก้านช่อดอกหลัก โดยแยกกลุ่มออกเป็นดอกตูมปลายช่อ ดอกตูมใหญ่ ดอกบานกลางช่อ และดอกบาน โคนช่อ นำแต่ละดอกย่อยมาเสียบลงในขวดพลาสติกขนาด 5 มิลลิเมตร แล้วนำไปวางไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสัมพัทธ์ 60-65 % ในสภาพแสงธรรมชาติ ทำการทดลองสายต้นละ 5 ชู้า บันทึกผลการทดลองดังนี้

1. บันทึกอายุการปักแจกัน โดยกำหนดจุดสิ้นสุดคือ เมื่อดอกบานในช่อเกิดการเสื่อมสภาพมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของดอกบานทั้งหมดถือว่าหมดอายุการปักแจกัน ซึ่งจะถือว่าดอกบานเสื่อมสภาพ เมื่อดอกบานเกิดการดอกคว่ำ สังเกตเห็นเส้นเวน (vien) กลีบดอกซีด หรือเหลือง และดอกเหี่ยวหรือร่วง (ภาพที่ 7)

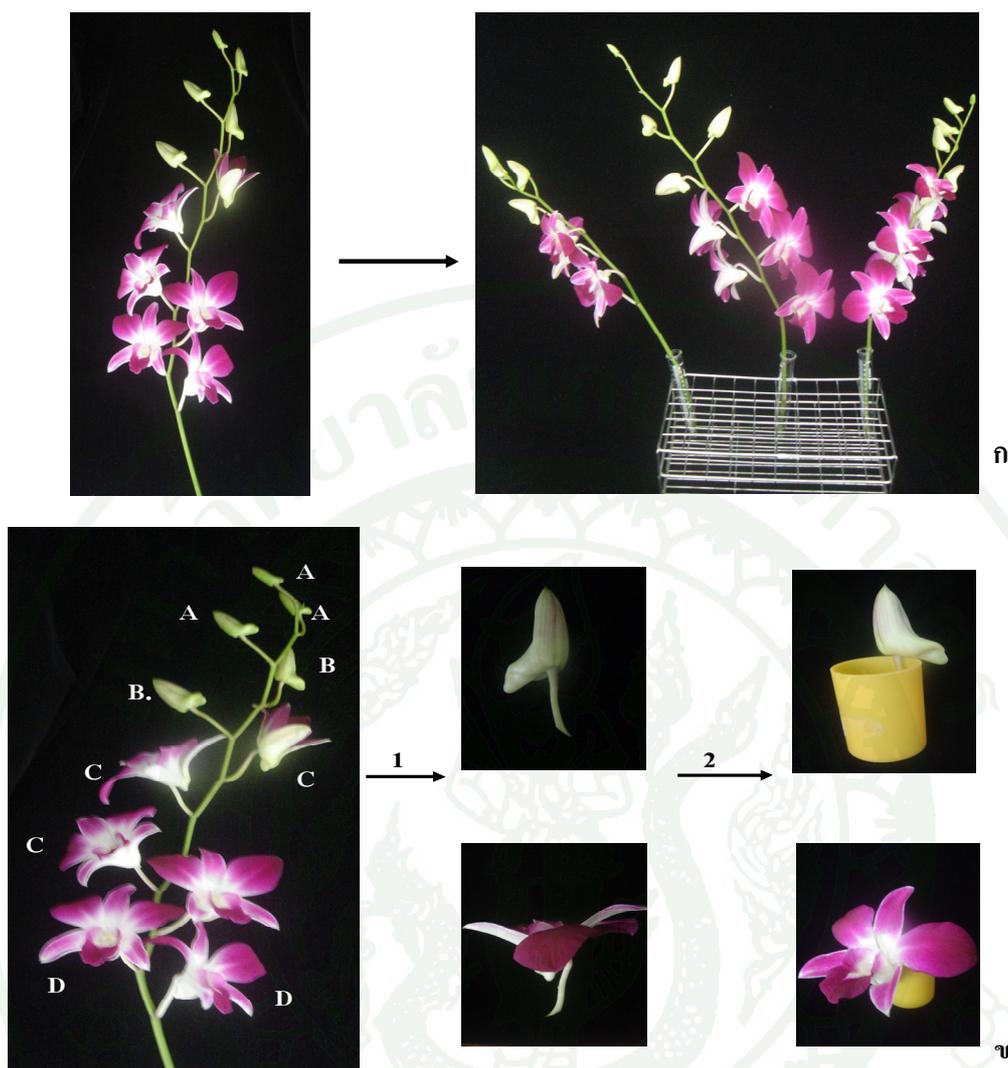
2. บันทึกการบานของดอกตูม โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การบานของดอกตูมในแต่ละวันเทียบกับจำนวนดอกของดอกตูมทั้งหมด เมื่อเริ่มต้นการทดลอง ใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{การบานของดอกตูม} = \frac{(\text{จำนวนของดอกตูมที่บานในแต่ละวัน}) \times 100}{(\text{จำนวนของดอกตูมวันแรกที่ปักแจกัน})}$$

3. คำนวณเปอร์เซ็นต์การร่วงของดอกตูมและดอกบาน โดยคิดเปอร์เซ็นต์การร่วงของดอกตูมและดอกบานในแต่ละวันเทียบกับจำนวนดอกของดอกตูมและดอกบานทั้งหมดเมื่อเริ่มต้นการทดลองใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ การเสื่อมสภาพของดอกตูม} = \frac{(\text{จำนวนของดอกตูมที่เสื่อมสภาพในแต่ละวัน}) \times 100}{(\text{จำนวนของดอกตูมวันแรกที่ปักแจกัน})}$$

$$\% \text{ การเสื่อมสภาพของดอกบาน} = \frac{(\text{จำนวนของดอกบานที่เสื่อมสภาพในแต่ละวัน}) \times 100}{(\text{จำนวนของดอกบานวันแรกที่ปักแจกัน})}$$



ภาพที่ 6 วิธีการศึกษาอายุการปักแจกันดอกกล้วยไม้แบบทั้งช่อดอก (ก) และแบบแยกแต่ละดอก (ข)

- ก. การศึกษาในช่อดอกกล้วยไม้ทั้งช่อ นำก้านดอกกล้วยไม้แช่ในหลอดแก้ว  
ขนาด 15 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำกลั่น 14 มิลลิลิตร
- ข. การศึกษาในเฉพาะส่วนดอกตัดแยกดอกกล้วยไม้แล้วแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ตามระยะ  
การเจริญเติบโต โดย A คือดอกตูมปลายช่อ B คือดอกตูมใหญ่ C คือดอกบานกลางช่อ  
D คือ ดอกบาน โคนช่อ แล้วนำดอกย่อยแต่ละดอกปักลงในขวดพลาสติกขนาด 5  
มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร



ภาพที่ 7 แสดงอาการเสื่อมสภาพของดอกกล้วยไม้

- ก. ดอกตูมเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้ม และมีอาการเหี่ยว
- ข. ดอกตูมเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและหลุดร่วง
- ค. ดอกตูมมีอาการฉ่ำน้ำ และเน่าละ
- ง. กลีบดอกบานดูเข้าข้างในและกลีบดอกมีอาการซีดเหลือง
- จ. ดอกบานมีอาการดอกคว่ำ
- ฉ. ดอกบานมีอาการเห็นเส้นเวน

##### 5. ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้

กล้วยไม้สกุลหวายมีการเจริญเติบโตแบบซิมโพเดียล คือ เจริญไปตามแนวนอนด้วยเหง้า ซึ่งทำหน้าที่เป็นลำต้นของกล้วยไม้ เมื่อเติบโตเต็มที่แล้วจะมีการแตกหน่อใหม่จากโคนกอขึ้นมาเรื่อยๆ จากการรายงานของ พรณี (2550) พบว่าถ้าปลูกกล้วยที่อยู่ตำแหน่งน้ำสุดท้ายจะมีกิจกรรมการสังเคราะห์แสงสูงสุด ดังนั้นในการศึกษาการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ครั้งนี้จึงเลือกที่จะวัดการเจริญเติบโตจากกล้วยไม้ที่อยู่ตำแหน่งน้ำสุดท้าย (ตำแหน่งที่ active) โดยศึกษาสายต้นละ 20 ชำบ้นที่ผลการทดลองในประเด็นต่างๆ ดังนี้ตลอดระยะเวลาการศึกษา

- ความสูงของลำลูกกล้วยไม้ โดยในที่นี้เลือกลำหน้าสุดที่เป็นลำลูกกล้วยที่ 5 และ 10 โดยวัดจากโคนของลำลูกกล้วยจนถึงโคนกาบใบของใบกล้วยไม้ (ภาพที่ 8)
- ความกว้างของลำลูกกล้วยไม้ โดยในที่นี้เลือกลำหน้าสุดที่เป็นลำลูกกล้วยที่ 5 และ 10 โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ลำลูกกล้วยมีความกว้างมากที่สุด (ภาพที่ 8)
- จำนวนใบต่อกอ นับจำนวนใบทั้งหมดต่อกอ
- จำนวนลำต่อกอ นับจำนวนลำลูกกล้วยทั้งหมดต่อกอ



ภาพที่ 8 ตำแหน่งการวัดการความสูงและความกว้างของลำลูกกล้วย และตำแหน่งลำลูกกล้วยที่มีกิจกรรมการสังเคราะห์แสงมากที่สุด

ที่มา: พรรณี (2550)

## 6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

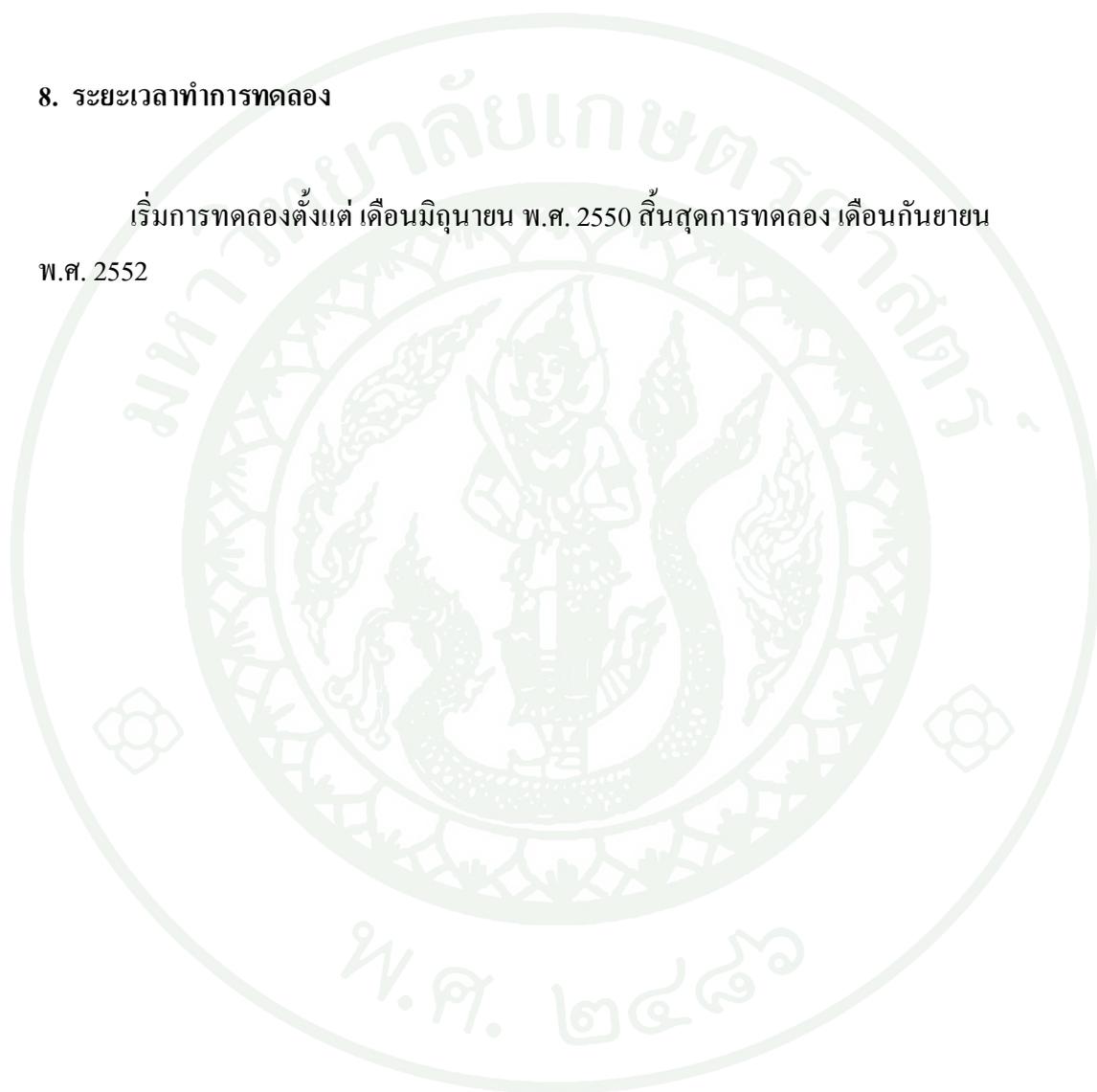
วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Statistic Analysis System และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

## 7. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

## 8. ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มการทดลองตั้งแต่ เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2550 สิ้นสุดการทดลอง เดือนกันยายน พ.ศ. 2552



## ผลและวิจารณ์

1. การทดลองที่ 1 การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *hpt* และ ยีน antisense *CPACO* ในกล้วยไม้สกุลหวายสองพันธุ์คือ บอม 17 และ เอียสกุล ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO*

1.1 การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *hpt* และ ยีน antisense *CPACO* โดยวิธี PCR

จากการนำไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hpt* และ antisense *CPACO* มาทำปฏิกิริยาดังวิธี PCR กับดีเอ็นเอของสายต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* จำนวน 2 พันธุ์คือ พันธุ์เอียสกุล จำนวน 4 สายต้นคือ AE1 AE2 AE3 AE4 และพันธุ์บอม 17 จำนวน 4 สายต้น คือ AB1 AB2 AB3 AB4 โดยแต่ละสายต้นมีจำนวน 5 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *hpt* และ antisense *CPACO* เปรียบเทียบกับกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยนำผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ไปวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที แล้วย้อมเจลในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ เมื่อนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่า ทุกสายต้นของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนทั้งสองพันธุ์ พบแถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบสของยีน *hpt* (ภาพที่ 9, 10) ซึ่งคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ส่วนในต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าว

สำหรับการตรวจสอบการคงอยู่ของยีน antisense *CPACO* พบแถบดีเอ็นเอขนาด 759 คู่เบส (ภาพที่ 11, 12) ของทุกสายต้น แต่พบว่าพันธุ์เอียสกุล สายต้น AE2 และ พันธุ์บอม 17 สายต้น AB4 ตรวจพบการคงอยู่ของยีน antisense *CPACO* เพียง 3 ซ้ำ คิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสายต้นที่มีการคงอยู่ของยีน antisense *CPACO* เพียง 3 ซ้ำ อาจเกิดจากในกรณีสายต้น AB4 นี้ได้รับการถ่ายยีน pCAMBIA 13121a*ACO2* ซึ่งยีน a*ACO2* อยู่ห่างจากบริเวณ right border ของ T-DNA ซึ่งกลไกการถ่ายยีนของแบคทีเรียจะมีการเคลื่อนย้าย T-DNA บริเวณ right border ก่อน ทำให้ยีนที่อยู่ส่วนปลายอาจเกิดการขาดหายไปของยีนบางส่วนในระหว่างการแทรกเข้าไปในจีโนมพืชทำให้บางต้นอาจมีเพียงยีน *hpt* แต่ไม่พบ antisense *CPACO* (Sheng and Citovsky, 1996)

นอกจากนี้ในกรณีที่พบว่าบางต้นในสายต้นเดียวกันไม่พบยีนที่สนใจอยู่ อาจเกิดจากการที่สายต้นเดิมมียีนเข้าไปเพียงบางเซลล์ซึ่งจะทำให้เกิด chimera เมื่อขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณ โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่า มีลำลูกกล้วยใหม่พัฒนาขึ้นมาจากเซลล์ที่ไม่มียีน antisense *CPACO* อยู่

ซึ่งผลการเกิด chimera นี้ ศิริวรรณ (2548) ได้รายงานว่าพบในพืชด้วยเช่นกัน หรืออีกกรณีอาจเกิดขึ้นในช่วงที่มีการถ่ายยีนเข้าไปในเซลล์ ทำให้มีการขาดหายไปของยีนบางส่วน เนื่องจากดีเอ็นเอถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ exonuclease ที่อยู่ภายในเซลล์ (Cooper, 2000) ซึ่งหากส่วนที่ขาดหายไปเป็นส่วนที่จำเพาะกับไพรเมอร์ที่ใช้จะทำให้ไม่สามารถตรวจพบโดยวิธี PCR ได้

ดังนั้นจึงตรวจสอบเพิ่มเติม เมื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยีนโดยใช้ไพรเมอร์ด้านหนึ่งซึ่งจำเพาะกับ CaMV 35S โพรโมเตอร์ และไพรเมอร์อีกด้านที่จำเพาะกับยีน antisense CPACO พบว่าให้ผลทำนองเดียวกับการคงอยู่ของยีน antisense CPACO คือ พบการคงอยู่ของยีน 90 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 13) แต่พบจำนวนแถบจีนดีเอ็นเอหลายขนาดตั้งแต่ 500 – 2,300 คู่เบส ซึ่งอาจเนื่องมาจากในแต่ละสายต้นจำนวนชุดของยีน antisense CPACO มีมากกว่า 1 ชุด และในกรณีที่แถบจีนดีเอ็นเอมีขนาด 500 คู่เบส อาจเนื่องมาจากเกิดการขาดหายไปบางส่วนของยีน antisense CPACO แต่ไม่ใช่ตำแหน่งที่ส่วนของไพรเมอร์เข้าไปจับจึงทำให้เกิดแถบจีนดีเอ็นเอขนาดเล็กกว่ายีน antisense CPACO ที่ถ่ายเข้าไปในกล้วยไม้

## 1.2 การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน antisense CPACO ตรวจสอบโดยเทคนิค dot blot hybridization

การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน antisense CPACO โดยวิธี dot blot hybridization ทำโดยการสกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO และต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค dot blot hybridization โดยหยดดีเอ็นเอปริมาณ 4 ไมโครกรัม ลงบนไนลอนเมมเบรน จากนั้นนำมาตรวจสอบการคงอยู่ของยีน antisense CPACO โดยทำการไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน antisense CPACO ที่ติดฉลากด้วยสารไร้งี้ digoxigenin (DIG) แล้วนำไปตรวจสอบผลโดยนำไปบนไนลอนเมมเบรนไปประกบกับแผ่นฟิล์ม x-ray หากมีการเข้าคู่กันระหว่างดีเอ็นเอที่สกัดได้กับ ดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบจะให้ผลเป็นจุดสัญญาณสีดำนบนแผ่นฟิล์ม

การตรวจสอบนี้ใช้ดีเอ็นเอจากต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็น negative control และดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิด pCAMBIA 1301aCOI เป็น positive control จากการทดลองพบสัญญาณ สีดำนบนแผ่นฟิล์มเมื่อตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน antisense CPACO ในทุกสายต้นของกล้วยไม้ทั้งสองพันธุ์ และให้ผลเหมือนกันกับดีเอ็นเอต้นแบบ (ภาพที่ 14) ซึ่งแสดงว่ามียีน

antisense *CPACO* เข้าไปรวมกับจีโนมของต้นกล้วยไม้อย่างถาวร ส่วนต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่ปรากฏสัญญาณสีดำนบนแผ่นฟิล์ม

ผลการทดลองนี้แตกต่างกับผลการทดลองที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยพบว่า สายต้น AB4 และ AE2 ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบแถบดีเอ็นเอเพียง 3 ซ้ำ แต่เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค dot blot hybridization ปรากฏจุดสัญญาณสีดำนบนแผ่นฟิล์มหมดทั้ง 5 ซ้ำ ซึ่งผลที่ต่างกันนี้เนื่องมาจากดีเอ็นเอตรวจสอบของวิธี dot blot hybridization มีขนาดยาวกว่าไพรเมอร์ของวิธี PCR ซึ่งการที่เกิดสัญญาณสีดำนนั้น อาจเนื่องมาจากการที่บางส่วนของดีเอ็นเอตรวจสอบสามารถเข้ากันได้กับบางส่วนของชิ้นส่วนยีน antisense *CPACO* จึงทำให้เกิดสัญญาณสีดำขึ้นมา ส่วนเทคนิค PCR จำเป็นจะต้องใช้ ไพรเมอร์ทั้งสองด้านคือ forward และ reverse ที่มีความจำเพาะสูงกับชิ้นยีน antisense *CPACO* ที่ต้องการและไพรเมอร์ที่ใช้มีขนาดสั้นๆ ซึ่งถ้าหากไม่สามารถเข้าคู่กับส่วนใดส่วนหนึ่งของยีนแล้วจะ ไม่มีการเริ่มต้นของการทำปฏิกิริยาส่งผลให้ไม่ได้ผลผลิต PCR ออกมา

ผลการตรวจสอบโดยวิธี PCR และวิธี dot blot hybridization นี้ สรุปเบื้องต้นได้ว่าทุกซ้าของทุกสายต้นมียีน antisense *CPACO* อยู่ แต่ในบางซ้าของบางสายต้นอาจเป็นยีนที่ไม่สมบูรณ์ และในบางซ้าอาจมีมากกว่า 1 ชุดยีน

### 1.3 การคงอยู่ของยีน antisense *CPACO* ตรวจสอบโดยเทคนิค Southern PCR hybridization

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน antisense *CPACO* ที่เข้าไปรวมกับจีโนมของกล้วยไม้ด้วยเทคนิค Southern PCR hybridization เพื่อยืนยันว่า ยีน antisense *CPACO* เข้าไปรวมตัวกับจีโนมของต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน โดยเลือกทดสอบเฉพาะต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR และ dot blot hybridization แล้วให้ผลเป็นบวก และใช้ดีเอ็นเอจากต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็น negative control และ ดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิด pCAMBIA 1301a*ACO1* เป็น positive control

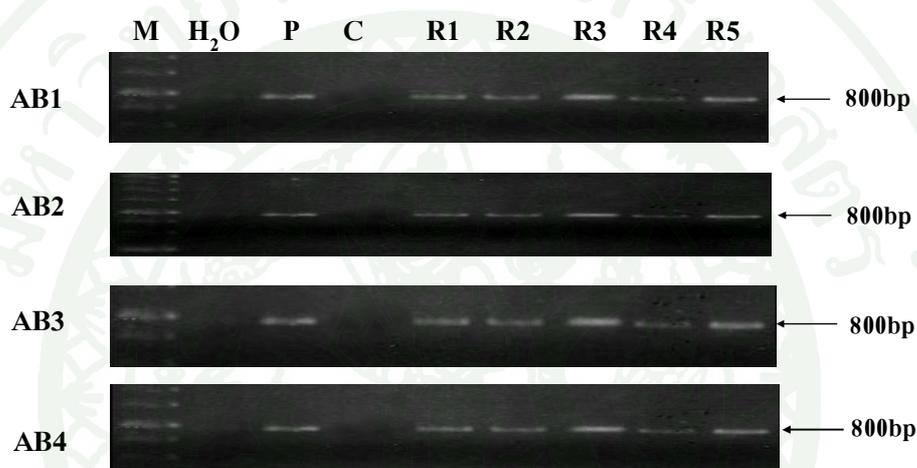
จากการนำผลผลิต PCR ที่ได้จากข้อ 1.1 โดยเลือกซ้าที่ 1(R1) มาแยกขนาดบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วย้ายดีเอ็นเอลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรนซึ่งหากมีการเข้าคู่กันระหว่างดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบจะให้ผลเป็นสัญญาณสีดำนบนแผ่นฟิล์ม และปรากฏเป็นแถบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 759 คู่เบส จากการทดลอง

พบว่า พบแถบสัญญาณสีดำขนาดชั้นดีเอ็นเอประมาณ 759 คู่เบสบนแผ่นฟิล์ม ในทุกสายต้นของ กล้วยไม้ทั้งสองพันธุ์ (ภาพที่ 15 และ ภาพที่ 16) และให้ผลเหมือนกันกับดีเอ็นเอต้นแบบ (positive control) ซึ่งแสดงว่ามียีน antisense *CPACO* เข้าไปรวมกับจีโนมของต้นกล้วยไม้อย่างถาวร ส่วนต้น กล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่ปรากฏสัญญาณสีดำบนแผ่นฟิล์ม ซึ่งการทดลองนี้เป็นการยืนยันผล ว่าต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน ในต้นกล้วยไม้ที่ตรวจสอบผลเป็นบวกจากวิธี PCR และ dot blot hybridization มียีน antisense *CPACO* อยู่จริง

#### 1.4 การคงอยู่ของยีน antisense *CPACO* และจำนวนชุดยีนตรวจสอบโดยเทคนิค Southern blot hybridization

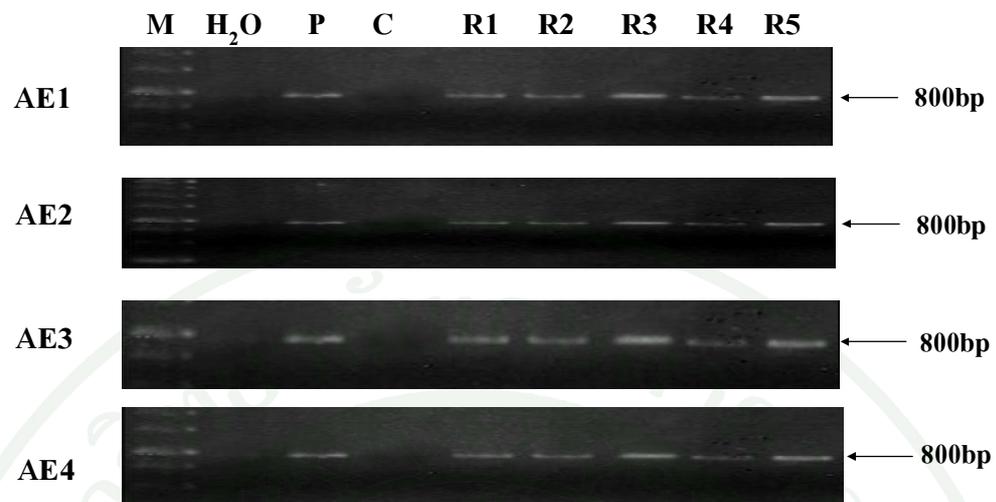
การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน antisense *CPACO* ที่เข้าไปรวมกับจีโนมของกล้วยไม้ ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization และเพื่อตรวจสอบจำนวนชุดยีน A (ภาพที่ 3) ที่เข้าไปรวมตัว กับจีโนมของต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน โดยเลือกทดสอบกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีนในซ้ำที่ 1 (R1) ซึ่งยืนยันผลบวกด้วยวิธี PCR dot blot hybridization และวิธี Southern PCR hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอจากต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็น negative control และ ดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิด pCAMBIA 1304 และยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1304 เป็น positive control ผลปรากฏว่าสามารถตรวจพบสัญญาณสีดำบนแผ่นฟิล์ม ที่ได้จากดีเอ็นเอจากต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน สายต้น AB1 AB3 AB4 AE3 และ AE4 โดยแต่ละ สายต้นให้แถบสีดำทั้งที่อยู่ในตำแหน่งเดียวกันและไม่อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน (ภาพที่ 17) โดยกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนพันธุ์บอม 17 สายต้น AB1 พบจำนวนชุดยีนอย่างน้อย 2 ชุด และ สายต้น AB3 และ AB4 พบจำนวนชุดยีนอย่างน้อย 3 ชุด สำหรับกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนพันธุ์เอีย สกุล สายต้น AE3 และ AE4 พบจำนวนชุดยีนอย่างน้อย 1 และ 3 ชุดตามลำดับ ในขณะที่ต้นกล้วยไม้ ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่ปรากฏแถบสีดำ (ภาพที่ 17) ซึ่งแสดงว่าทั้ง 5 สายต้นนี้มีการคงอยู่ของยีนที่ ถ่ายเข้าไปและสามารถแสดงออกได้ สำหรับ positive control โดย pCAMBIA 1304 พบแถบสัญญาณสีดำเข้ม ส่วนต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนที่มี 35S CaMV โปรโมเตอร์เป็นตัวควบคุม พบจำนวนชุดยีน 2 ชุด สำหรับบางสายต้น เช่น AB2 AE1 และ AE2 ที่ไม่พบแถบสัญญาณสีดำ อาจ เนื่องมาจากขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอนั้นมีเมือกเกิดขึ้นซึ่งส่งผลถึงการตรวจวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอทำให้ค่าดีเอ็นเอที่วัดได้คลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงทำให้ปริมาณดีเอ็นเอของต้นกล้วยไม้เหล่านี้ไม่ เพียงพอในการทำการทดลอง

ผลการทดลองที่พบว่าในแต่ละต้นมีจำนวนชุดยีนที่แตกต่างกันนี้ เป็นไปในทำนองเดียวกันกับงานวิจัยในพืชอื่นๆ หลายงานเช่น Dai *et al.* (2001) ศึกษาการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์ Taipei 309 โดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่า มีจำนวนชุดยีนที่ถูกถ่ายเข้าไป 1-5 ชุด Men *et al.* (2003) ทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนในกล้วยไม้สกุลหวาย *Den. nobile* โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 พบว่ามีจำนวนชุดยีนที่ถูกถ่ายเข้าไป 2-4 ชุด และจากการรายงานของ เบญจวรรณ (2552) ที่ตรวจสอบจำนวนชุดของยีน *AS-ACS* และ *AS-ACO* และยีน *ipt* ในต้นกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรม 5 สายต้น พบว่า มีจำนวนชุดของยีน *AS-ACS* เพียง 1 ชุดยีนและยีน *AS-ACO* อยู่ที่ 2- 4 ชุดยีน



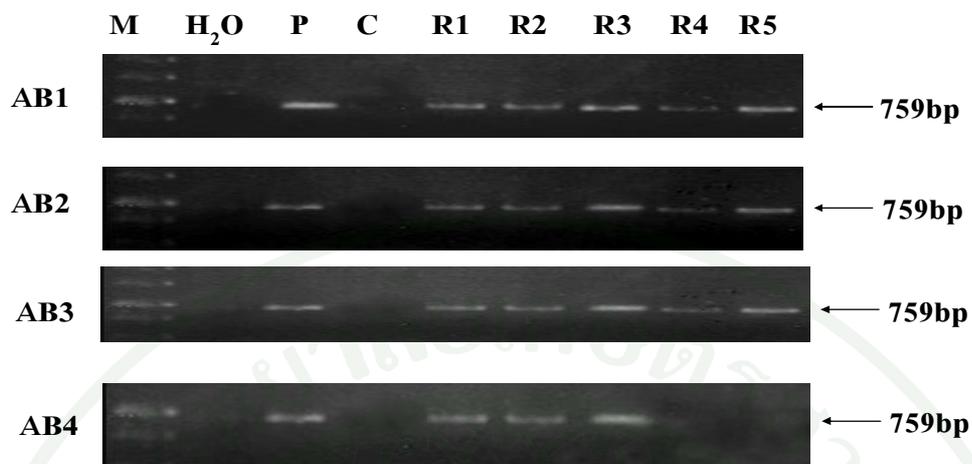
ภาพที่ 9 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *ipt* แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แถบยีนที่ได้มีขนาด 800 คู่เบส ทดสอบในกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์บอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีน ทั้งหมด 4 สายต้น (AB1 AB2 AB3 AB4)

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 100 bp Ladder (Fermentas)  
H<sub>2</sub>O negative control (dH<sub>2</sub>O)  
P positive control ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้พลาสมิด pCAMBIA 1301 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ  
C negative control ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นแบบ  
R1-R5 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นแบบซ้ำที่ 1-5 ตามลำดับ



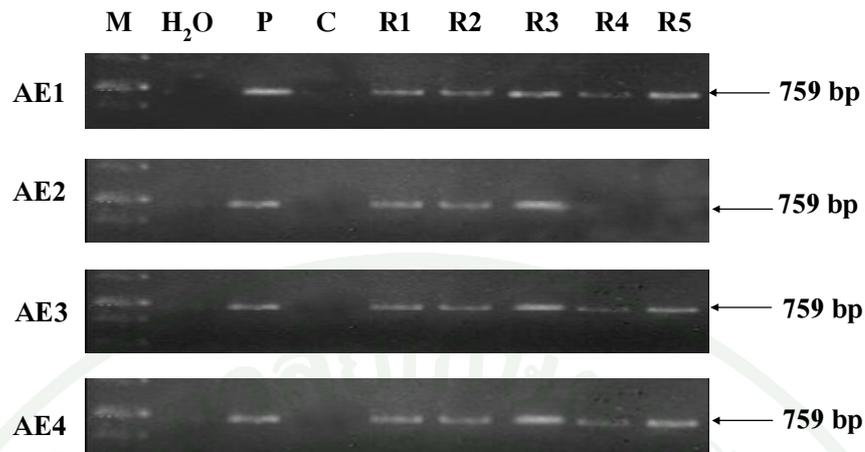
ภาพที่ 10 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hpt* แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แอบยีนที่ได้มีขนาด 800 คู่เบส ทดสอบในกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ เอียสกุลที่ได้รับการถ่ายยีน ทั้งหมด 4 สายต้น (AE1 AE2 AE3 และ AE4)

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 100 bp Ladder (Fermentas)
- H<sub>2</sub>O negative control (dH<sub>2</sub>O)
- P positive control ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้พลาสมิด pCAMBIA 1301 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ
- C negative control ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นแบบ
- R1-R5 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นแบบซ้ำที่ 1-5 ตามลำดับ



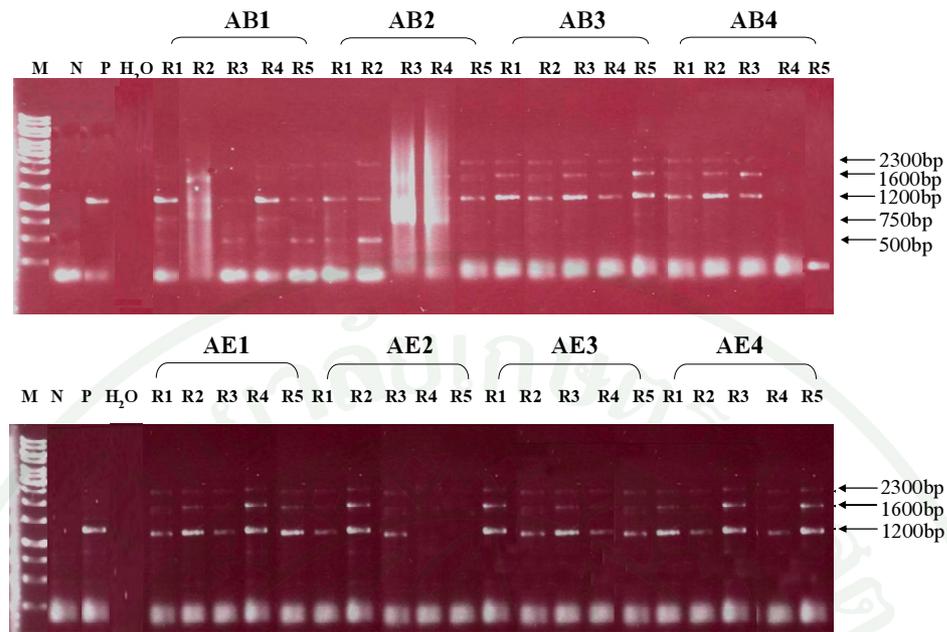
ภาพที่ 11 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน antisense *CPACO* แยกขนาดชิ้น ดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แถบยีนที่ได้มีขนาดประมาณ 759 คู่เบส ทดสอบในกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ บอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีน ทั้งหมด 4 สายต้น (AB1 AB2 AB3 และ AB4)

M	ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 1kb Ladder (Fermentas)
H <sub>2</sub> O	negative control (dH <sub>2</sub> O)
P	positive control ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้พลาสมิด pCAMBIA 1301a4COI เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ
C	negative control ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นแบบ
R1-R5	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นแบบ ซ้ำที่ 1- 5 ตามลำดับ



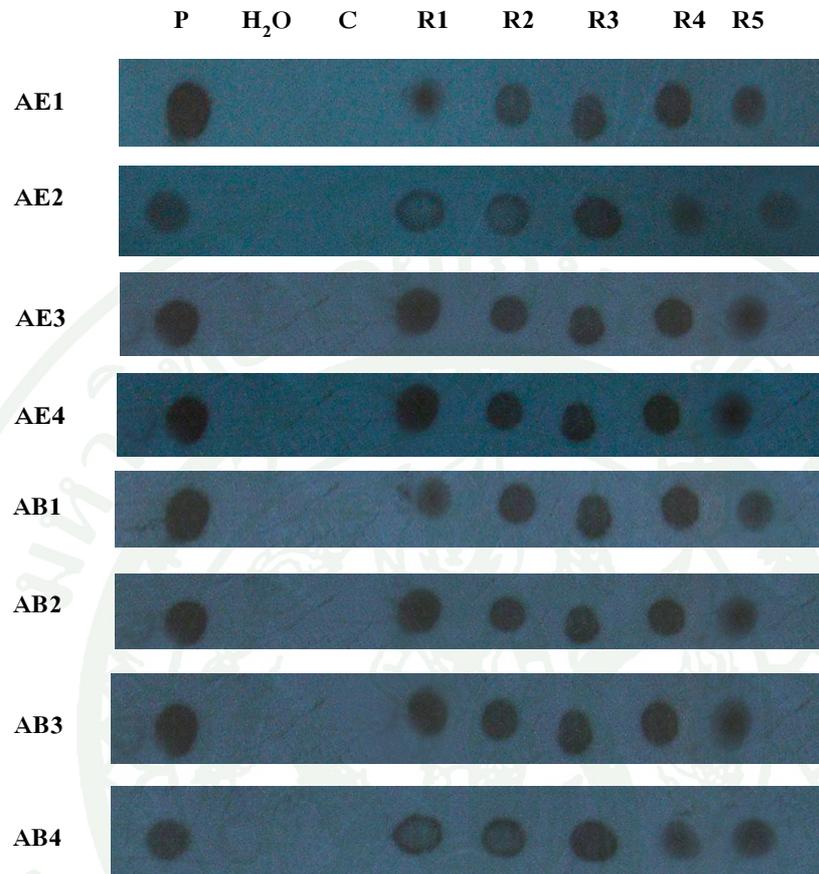
ภาพที่ 12 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน antisense *CPACO* แยกขนาดชิ้น ดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แลบบินที่ได้มีขนาดประมาณ 759 คู่เบส ทดสอบในกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอียสกุทที่ได้รับการถ่ายยีน ทั้งหมด 4 สายต้น (AE1 AE2 AE3 และ AE4)

M	ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 1kb Ladder (Fermentas)
H <sub>2</sub> O	negative control (dH <sub>2</sub> O)
P	positive control ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้พลาสมิด pCAMBIA 1301a <i>4COI</i> เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ
C	negative control ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นแบบ
R1-R5	ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นแบบ ซ้ำที่ 1-5 ตามลำดับ



ภาพที่ 13 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ 35S CaMV โปรโมเตอร์และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน antisense *CPACO* แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แลบนินที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 500 คู่เบส ถึง 2,300 คู่เบสทดสอบในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุลที่ได้รับการถ่ายยีน (AE1 AE2 AE3 และ AE4) พันธุ์บอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีน (AB1 AB2 AB3 และ AB4)

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 1kb Ladder (Fermentas)
- H<sub>2</sub>O negative control (dH<sub>2</sub>O)
- P positive control ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้พลาสมิด pCAMBIA 1301a*ACO1* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ
- N negative control ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นแบบ
- R1-R5 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นแบบซ้ำที่ 1- 5 ตามลำดับ



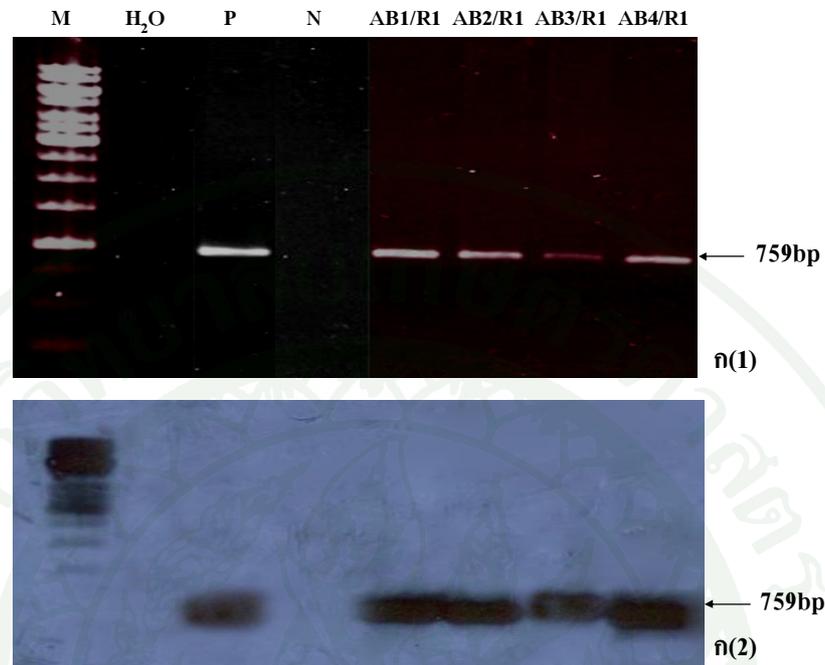
ภาพที่ 14 การตรวจวิเคราะห์การคงอยู่ของยีน antisense *CPACO* ในต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน พันธุ์บอม 17 (AB1-AB4) และ พันธุ์เอี้ยสกุล (AE1-AE4) โดยใช้เทคนิค dot blot hybridization ที่ตรวจสอบด้วยตัวตรวจสอบยีน antisense *CPACO*

P positive control ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้พลาสมิด pCAMBIA 1301a*ACO1* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

H<sub>2</sub>O negative control (dH<sub>2</sub>O)

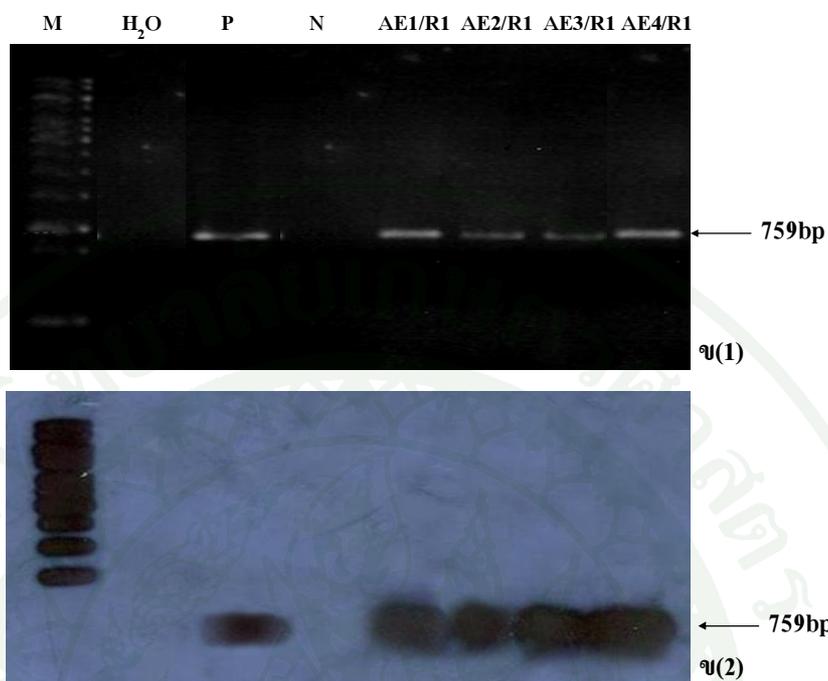
C negative control ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นแบบ

R1-R5 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นแบบซ้ำที่ 1-5 ตามลำดับ



ภาพที่ 15 การตรวจวิเคราะห์การคงอยู่ของยีน antisense *CPACO* โดยใช้เทคนิค Southern PCR hybridization ในต้นกล้วยไม้พันธุ์บอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีน ที่ตรวจสอบด้วยตัวตรวจสอบยีน antisense *CPACO* แถบยีนที่ได้มีขนาดประมาณ 759 คู่เบส

- ก(1) ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน antisense *CPACO* แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แถบยีนที่ได้มีขนาดประมาณ 759 คู่เบส
- ก(2) ผลการตรวจวิเคราะห์กล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์บอม 17 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (N) และได้รับการถ่ายยีน (AB1/R1 – AB4/R1) โดยเทคนิค Southern PCR hybridization
- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 1kb Ladder (Fermentas)
- H<sub>2</sub>O negative control (dH<sub>2</sub>O)
- P positive control ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้พลาสมิด pCAMBIA 1301a.*ACO1* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ
- N negative control ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นแบบ



ภาพที่ 16 การตรวจวิเคราะห์การคงอยู่ของยีน antisense *CPACO* โดยใช้เทคนิค Southern PCR hybridization ในต้นกล้วยไม้พันธุ์เอื้องสกุลที่ได้รับการถ่ายยีนที่ตรวจสอบด้วยตัวตรวจสอบยีน antisense *CPACO* แถบยีนที่ได้มีขนาดประมาณ 759 คู่เบส

- ข(1) ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน antisense *CPACO* แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แถบยีนที่ได้มีขนาดประมาณ 759 คู่เบส
- ข(2) ตรวจวิเคราะห์กล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์บอม 17 ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (N) และได้รับการถ่ายยีน โดยเทคนิค Southern PCR hybridization
- M. ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 1kb Ladder (Fermentas)
- H<sub>2</sub>O negative control (dH<sub>2</sub>O)
- P positive control ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้พลาสมิด pCAMBIA 1301a*ACO1* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ
- N negative control ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นแบบ



M N AB1 AB2 AB3 AB4 N AE1 AE2 AE3 AE4 ยาสูบ H<sub>2</sub>O p1304

ภาพที่ 17 การตรวจวิเคราะห์จำนวนชุดยีน A ในต้นกล้วยไม้ทั้งพันธุ์เอเซียสกุล (AE1-AE4) และ บอมบ์ (AB1-AB4) ที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้เทคนิค Southern blot hybridization ที่ตรวจสอบด้วยตัวตรวจสอบของ 35S CaMV โพรโมเตอร์

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 1kb Ladder (Fermentas)  
 N negative control จีโนมดีเอ็นเอของต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน  
 H<sub>2</sub>O negative control (dH<sub>2</sub>O)  
 p1304 positive control พลาสมิด pCAMBIA 1304 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ  
 ยาสูบ จีโนมดีเอ็นเอของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน pCAMBIA 1304 ใช้เป็น positive control

## 2. การทดลองที่ 2 การศึกษาวิธีการเก็บแก๊สเอทิลีนจากต้นกล้วยไม้

จากการทดลองศึกษาวิธีเก็บแก๊สเอทิลีน (ตารางที่ 1, ภาพที่ 18,19) พบว่า สำหรับจำนวนต้นกล้วยไม้ที่บรรจุลงในภาชนะเพียง 1 และ 2 ต้น นั้นทุกช่วงอายุของต้นกล้วยไม้ที่นำมาศึกษาไม่สามารถวัดปริมาณเอทิลีนได้ แม้จะบรรจุกล้วยไม้ลงในภาชนะนานจนครบ 9 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากค่าต่ำสุดที่เครื่อง gas chromatography ที่ใช้ในการทดลองสามารถตรวจวัดเอทิลีนได้ต่ำสุดอยู่ในช่วงที่มากกว่า 0.001 นาโนลิตรเอทิลีน ถ้าค่าเอทิลีนที่ต้นกล้วยไม้ปลดปล่อยออกมาภายในภาชนะบรรจุน้อยกว่านี้เครื่องจะแสดงผลออกมาเป็นค่าศูนย์เสมอ แต่สำหรับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์นั้น สามารถตรวจวัดได้ โดยพบว่าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ตรวจวัดได้มีค่าแปรผันตามชั่วโมงที่เพิ่มมากขึ้นด้วย

สำหรับการบรรจุต้นกล้วยไม้ลงในภาชนะจำนวน 3 และ 4 ต้นพบว่า สามารถตรวจวัดปริมาณเอทิลีนและปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ได้ ซึ่งเมื่อพิจารณาจากกราฟ (ภาพที่ 18,19) ในช่วง 3 ชั่วโมงแรกในทุกช่วงอายุ ปริมาณเอทิลีนมีแนวโน้มเชิงเส้น ( $R^2$ ) ที่มีค่าตั้งแต่ 0.95 ถึง 0.99 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ในช่วง 3 ชั่วโมงแรกว่า ปริมาณเอทิลีนแปรผันตามชั่วโมงที่เพิ่มมากขึ้น แต่หลังชั่วโมงที่ 3 นั้นพบว่าเกิดความแปรปรวนระหว่างปริมาณเอทิลีนกับจำนวนชั่วโมงที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเนื่องมาจากภาชนะที่บรรจุต้นกล้วยไม้นั้นเป็นระบบปิด ต้นกล้วยไม้ที่นำมาทดลองยังมีการหายใจและการคายน้ำอยู่ตลอดเวลา จึงมีการสะสมของปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้น และการลดลงของออกซิเจนอาจทำให้เกิดการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน (จริงแท้, 2544) ส่งผลให้เกิดกระบวนการหมักเกิดขึ้น ซึ่งจากการสังเกตพบว่า เมื่อเปิดฝาชวดจะพบว่า มีกลิ่นคล้ายแอลกอฮอล์เกิดขึ้น สอดคล้องกับข้อมูลที่ได้พบว่าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์แปรผันตรงตามชั่วโมงที่เพิ่มมากขึ้น

นอกจากนี้กรณีหนึ่งที่ทำให้หลังจากชั่วโมงที่ 4 มีปริมาณเอทิลีนที่แปรปรวนอาจเนื่องมาจากภาชนะที่ใช้เป็นระบบปิด และต้นกล้วยไม้ยังมีการคายน้ำตลอดเวลาจึงทำให้ภายในภาชนะบรรจุมีปริมาณความชื้นสัมพัทธ์มากขึ้นสังเกตได้จากเมื่อเปิดฝาชวดออกตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 เป็นต้นไปจะพบว่า ไอน้ำเกาะบริเวณขอบของต้นกล้วยไม้ และตามข้างภาชนะบรรจุ และเมื่อดูสภาพของใบกล้วยไม้พบอาการน้ำเน่า อาจทำให้เกิดความเสียหายกับกล้วยไม้ได้ และถ้ามีปริมาณน้ำระหว่างภายในปากใบกับภายนอกใกล้เคียงจะทำให้ปากใบไม่เปิด ซึ่งบริเวณปากใบนี้เองเป็นที่ปลดปล่อยก๊าซต่างๆ ดังนั้นถ้าปากใบปิดอาจทำให้การปลดปล่อยเอทิลีนต่ำลงได้ จากเหตุผลดังกล่าวจึงเลือก

ที่ศึกษาวิธีการเก็บเก็บแก๊สเอทิลีนจากต้นกล้วยไม้ภายใน 3 ชั่วโมงแรก ซึ่งพบว่า ชั่วโมงที่ 3 นั้นให้ปริมาณเอทิลีนสูงที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างจำนวนต้นกล้วยไม้ที่บรรจุลงในภาชนะ 3 ต้น และ 4 ต้น พบว่า การใช้ต้นกล้วยไม้ 4 ต้นทำให้สามารถวัดปริมาณเอทิลีนได้มากกว่า ดังนั้นในการตรวจวัดปริมาณเอทิลีนของต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน เลือกรวิธีการเก็บแก๊สเอทิลีนทุกช่วงอายุที่ทำการศึกษาโดยบรรจุต้นกล้วยไม้ 4 ต้นลงในภาชนะ และดูดแก๊สเอทิลีนเมื่อบรรจุต้นกล้วยไม้และปิดฝาแล้ว 3 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 ปริมาณเอทิลีน ( $C_2H_4$ ) และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ ( $CO_2$ ) ที่ตรวจวัดได้หลังจากบรรจุต้นกล้วยไม้สกุลหวายที่อายุ 1 6 9 และ 12 เดือนหลังออกปลูกจำนวน 1 ถึง 4 ต้นลงในภาชนะ และตรวจวัดในชั่วโมงที่ 1 ถึง ชั่วโมงที่ 9

อายุต้นกล้วยไม้	เวลาที่บรรจุกล้วยไม้ (ชั่วโมง)	จำนวนต้นกล้วยไม้ที่บรรจุลงในภาชนะตัดแปลง							
		1 ต้น		2 ต้น		3 ต้น		4 ต้น	
		ค่า $C_2H_4$	ค่า $CO_2$	ค่า $C_2H_4$	ค่า $CO_2$	ค่า $C_2H_4$	ค่า $CO_2$	ค่า $C_2H_4$	ค่า $CO_2$
1 เดือน	1	0	0.007	0	0.007	0.004	0.045	0.017	0.122
	2	0	0.007	0	0.012	0.005	0.058	0.030	0.168
	3	0	0.008	0	0.015	0.014	0.163	0.038	0.289
	4	0	0.015	0	0.024	0.015	0.245	0.032	0.375
	5	0	0.015	0	0.027	0.028	0.311	0.032	0.287
	6	0	0.056	0	0.059	0.045	0.217	0.050	0.68
	7	0	0.064	0	0.064	0.056	0.456	0.067	0.480
	8	0	0.075	0	0.084	0.048	0.566	0.069	0.430
	9	0	0.153	0	0.175	0.062	0.745	0.054	0.780

ตารางที่ 1 (ต่อ)

อายุต้น กล้วยไม้	เวลาที่บรรจุ กล้วยไม้ (ชั่วโมง)	จำนวนต้นกล้วยไม้ที่บรรจุลงในภาชนะตัดแปลง							
		1 ต้น		2 ต้น		3 ต้น		4 ต้น	
		ค่า C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	ค่า CO <sub>2</sub>	ค่า C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	ค่า CO <sub>2</sub>	ค่า C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	ค่า CO <sub>2</sub>	ค่า C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	ค่า CO <sub>2</sub>
6 เดือน	1	0	0.124	0	0.175	0.009	0.571	0.017	0.608
	2	0	0.274	0	0.247	0.012	0.676	0.024	0.746
	3	0	0.340	0	0.389	0.018	0.762	0.032	0.841
	4	0	0.458	0	0.425	0.017	0.789	0.033	0.870
	5	0	0.523	0	0.571	0.028	0.854	0.030	1.445
	6	0	0.542	0	0.645	0.025	1.231	0.032	1.439
	7	0	0.613	0	0.766	0.028	1.982	0.069	2.120
	8	0	0.712	0	0.843	0.048	2.781	0.075	3.540
	9	0	0.745	0	0.745	0.057	3.650	0.054	4.560
9 เดือน	1	0	0.841	0.001	0.854	0.002	1.445	0.0048	1.530
	2	0	0.570	0.001	1.251	0.004	1.439	0.007	2.370
	3	0	0.845	0.002	1.912	0.014	2.150	0.025	2.630
	4	0	1.439	0.002	2.731	0.017	2.540	0.019	3.240
	5	0	1.720	0.002	3.650	0.025	3.560	0.011	4.570
	6	0	2.540	0.003	4.124	0.011	4.120	0.020	5.780
	7	0	3.570	0.003	4.666	0.024	5.390	0.025	6.344
	8	0	4.210	0.003	6.172	0.031	6.781	0.034	8.111
	9	0	4.333	0.003	7.221	0.040	7.362	0.039	8.750

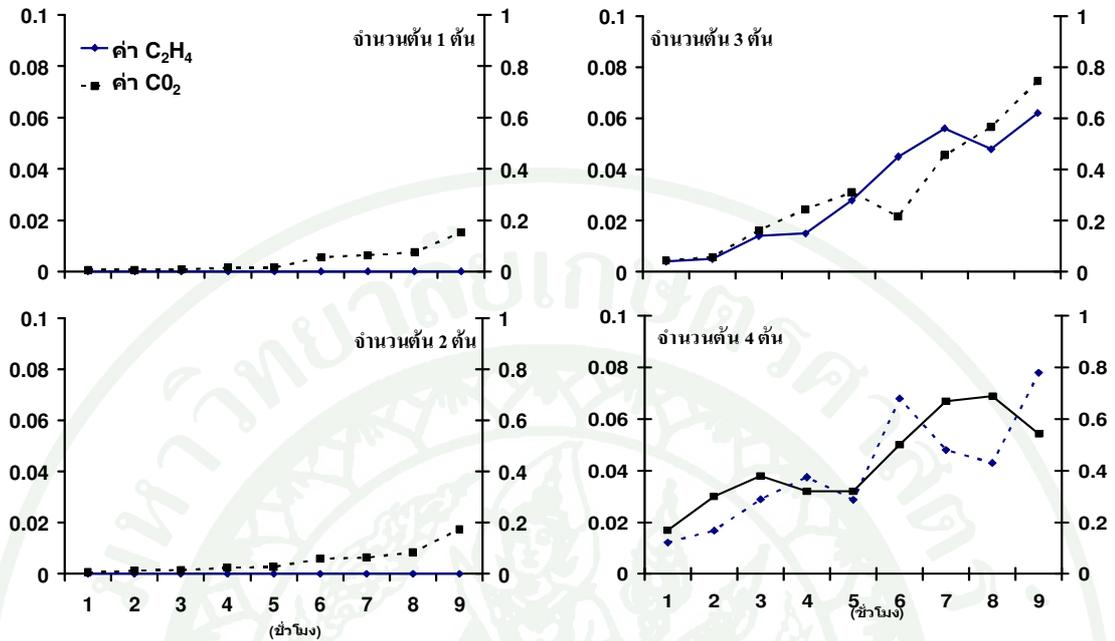
ตารางที่ 1 (ต่อ)

อายุต้น กล้วยไม้	เวลาที่บรรจุ กล้วยไม้ (ชั่วโมง)	จำนวนต้นกล้วยไม้ที่บรรจุลงในภาชนะตัดแปลง							
		1 ต้น		2 ต้น		3 ต้น		4 ต้น	
		ค่า C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	ค่า CO <sub>2</sub>	ค่า C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	ค่า CO <sub>2</sub>	ค่า C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	ค่า CO <sub>2</sub>	ค่า C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	ค่า CO <sub>2</sub>
12 เดือน	1	0.001	1.273	0.002	1.912	0.009	2.150	0.014	2.630
	2	0.001	1.902	0.003	2.731	0.009	2.547	0.051	3.240
	3	0.002	2.754	0.003	3.610	0.017	4.860	0.070	4.570
	4	0.002	3.691	0.004	4.174	0.020	5.420	0.065	5.780
	5	0.002	4.270	0.003	4.958	0.054	5.370	0.079	6.344
	6	0.003	5.580	0.004	6.372	0.048	6.756	0.061	8.111
	7	0.003	6.384	0.005	7.521	0.032	7.462	0.084	8.750
	8	0.003	7.181	0.006	7.762	0.065	8.692	0.085	9.775
	9	0.003	8.150	0.003	8.311	0.074	9.137	0.077	10.453

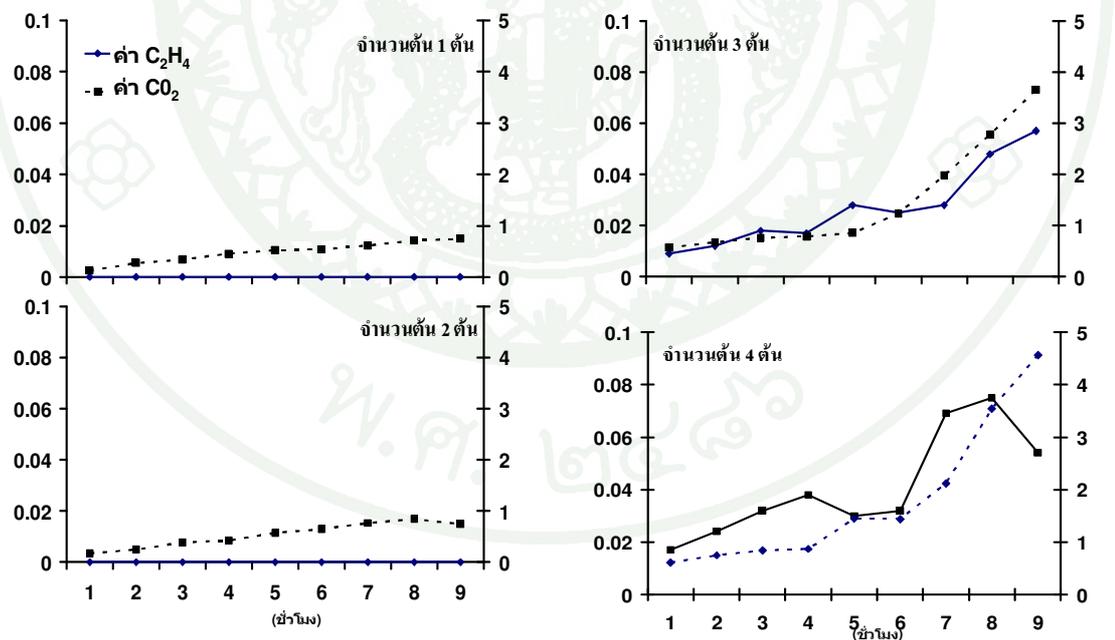
หน่วยของการวัด C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> คือ นาโนลิตรเอทิลีนต่อกรัมน้ำหนักต้นต่อชั่วโมง

หน่วยของการวัด CO<sub>2</sub> คือ ppm

ก. ต้นกล้วยไม้อายุ 1 เดือนหลังออกปลูก

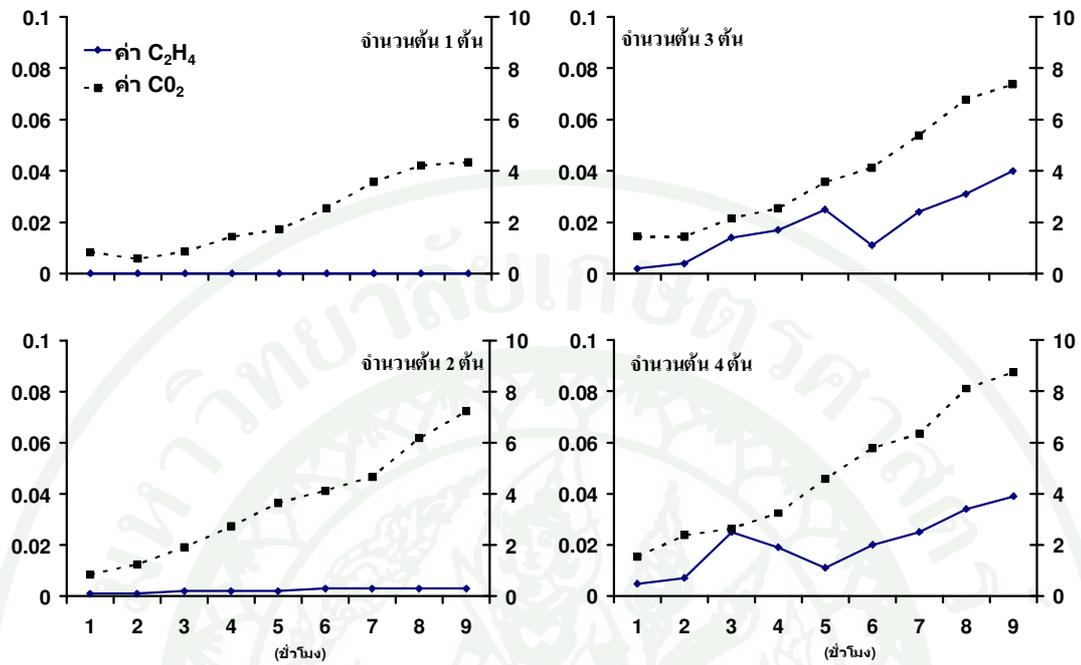


ข. ต้นกล้วยไม้อายุ 6 เดือนหลังออกปลูก

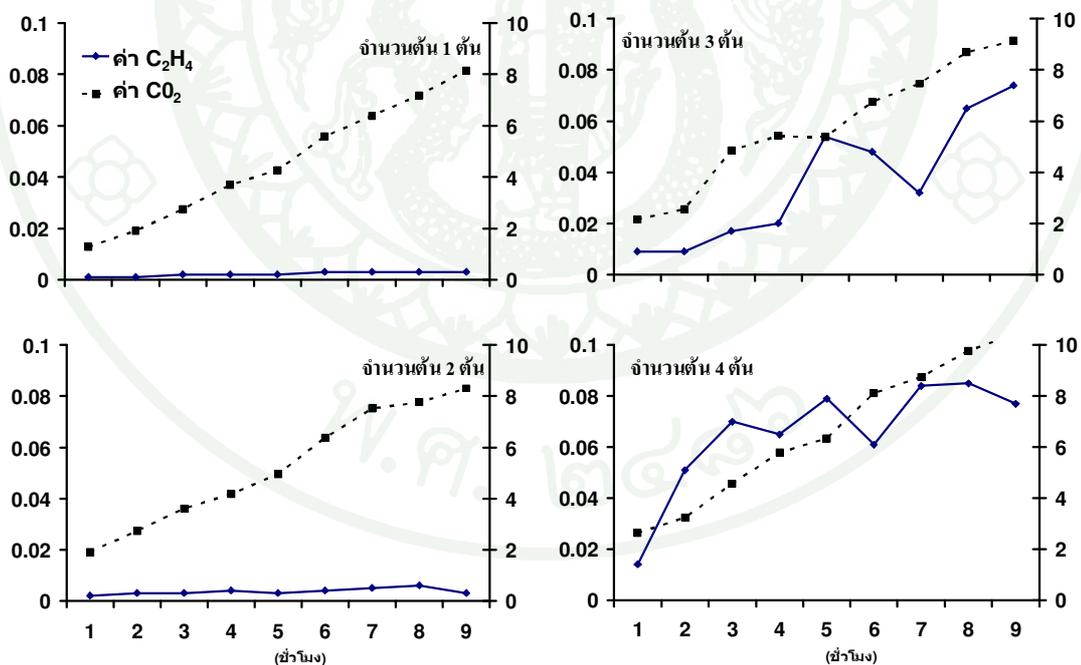


ภาพที่ 18 ปริมาณเอทิลีน (แกนปฐมภูมิ: หน่วยนาโนลิตรเอทิลีนต่อกรัม น้ำหนักต้นต่อชั่วโมง) และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (แกนทุติยภูมิ: หน่วย ppm) ที่สามารถวัดได้จากภาชนะที่มีจำนวนต้นกล้วยไม้ 1 2 3 และ 4 ต้น หลังจากบรรจุกล้วยไม้อายุ 1 เดือน และ 6 เดือนลงในภาชนะปิด ตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 1 ถึง ชั่วโมงที่ 9 (แกน X)

ค. ต้นกล้วยไม้อายุ 9 เดือนหลังออกปลูก



ง. ต้นกล้วยไม้อายุ 12 เดือนหลังออกปลูก



ภาพที่ 19 กราฟแสดงปริมาณเอทิลีน และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ ที่สามารถวัดได้จากภาชนะตัดแปลงที่มีจำนวนต้นกล้วยไม้ 1 2 3 และ 4 ต้น หลังจากบรรจุลงในภาชนะปิดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ถึงชั่วโมงที่ 9 ในกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนช่วงเดือนที่ 9 และ 12 หลังออกปลูก เพื่อศึกษาระบบเก็บแก๊สเอทิลีน

### 3. การทดลองที่ 3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน antisense CPACO

#### 3.1 การผลิตเอทิลีนของต้นและดอกกล้วยไม้และกิจกรรมของเอนไซม์ ACO

การวัดปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นในต้นกล้วยไม้ที่อายุ 1 6 9 และ 12 เดือนหลังออกปลูกใช้วิธีการดัดแปลงจาก Bolitho *et al.* (1997) โดยวัดปริมาณเอทิลีนที่สร้างจากต้นกล้วยไม้ทั้งต้นที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO เปรียบเทียบกับกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยใช้เครื่อง gas chromatography พบว่า กล้วยไม้ทั้งสองพันธุ์ คือ บอม 17 และ พันธุ์เอียสกุศล ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีการสร้างเอทิลีนมากกว่าต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนทุกสายต้น และสำหรับต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนมีการสร้างเอทิลีนแตกต่างกันในแต่ละสายต้น (ตารางที่ 2 ภาพที่ 20 และ 21)

ผลที่เกิดขึ้นดังกล่าวนี้สอดคล้องกับผลการถ่ายยีน antisense ACO ในพืชหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ (Hamilton, 1990) เมล่อน (Silva *et al.*, 2004) และบรอกโคลี (Li *et al.*, 2007) ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense ACO แล้วทำให้พืชนั้นมีการสร้างเอทิลีนลดลงหรือกระทั่งไม่มีเลย ทำให้พืชเหล่านี้มีอายุการเก็บรักษาหลังเก็บเกี่ยวนานขึ้น

ทั้งนี้การที่พืชที่ได้รับการถ่ายยีน antisense ACO มีปริมาณเอทิลีนต่ำกว่าพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็นผลมาจากการทำงานของยีน antisense ACO เมื่อเกิดการ transcription แล้วได้ mRNA ออกมาซึ่งจะไปจับกับ mRNA เส้น sense ของยีน ACO ในกล้วยไม้ที่มีความเป็นเบสคู่สมกัน ดังนั้นจึงทำให้ tRNA ไม่สามารถเข้ามาจับกับ mRNA ของเส้น sense ได้จึงไม่เกิดการ translation ทำให้มีการผลิตเอนไซม์ ACO ได้น้อยลง ส่งผลให้มีการผลิตเอทิลีนต่ำกว่ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (Oliver *et al.*, 1993) และจากการใช้โปรโมเตอร์ 35SCaMV เป็นตัวควบคุมการทำงานของยีน antisense CPACO ซึ่งมีการแสดงออกตลอดเวลาในทุกระยะของเนื้อเยื่อพืช จึงทำให้มีการทำงานของยีน antisense CPACO เกิดขึ้นตลอดระยะเวลาการเจริญเติบโต

จะเห็นได้ว่า กล้วยไม้ทั้งที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีนเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น จะมีการสร้างเอทิลีนน้อยลง (ภาพที่ 20 และ 21) นอกจากนี้ยังอาจเนื่องจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมนเอทิลีนกับออกซิน ในขณะที่พืชมีการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นจะมีฮอร์โมนออกซินเพิ่มขึ้นซึ่งจะไปยับยั้งการสร้างฮอร์โมนเอทิลีน จึงมีผลทำให้ปริมาณเอทิลีนที่วัดได้น้อยลงไปตามช่วงอายุ (นพดล, 2537)

อย่างไรก็ตามในช่วงเดือนที่ 12 หลังออกปลูกพบว่า ต้นกล้วยไม่มีการสร้างเอทิลีนเพิ่มมากขึ้นกว่าในเดือนที่ 9 หลังออกปลูกซึ่งอาจเนื่องมาจากในช่วง 12 เดือนหลังออกปลูกเป็นช่วงที่ตรงกับฤดูหนาวซึ่งมีอุณหภูมิต่ำทำให้ต้นกล้วยไม่มีการเจริญเติบโตน้อยกว่าปกติ และหลายต้นมีการทิ้งใบทำให้ต้นกล้วยไม่เกิดสภาวะเครียดจึงทำให้มีการสะสมเอโนไซม์ ACC และ ACC oxidase ไว้บริเวณเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก และบางส่วนเมื่อทำปฏิกิริยากับออกซิเจนแล้วเปลี่ยนมาเป็นเอทิลีน ผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับรายงานที่ว่าฮอร์โมนเอทิลีนเป็นตัวเร่งสภาวะการหลุดร่วงของใบในช่วงการปรับตัวของพืชช่วงเปลี่ยนแปลงฤดูกาล เพื่อให้พืชสามารถอยู่รอดในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ (นันทนา, 2549) นอกจากนี้กล้วยไม่จัดอยู่ในพืชประเภท climacteric ซึ่งมีระบบการกระตุ้นการสร้างเอทิลีนแบบ autocatalysis คือเมื่อต้นกล้วยไม่ได้รับเอทิลีนจากภายนอกหรือเกิดสภาวะขาดแคลนจะมีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอทิลีนในระบบที่ 2 เพิ่มมากขึ้น (จริงแท้, 2550) ดังนั้นการหลุดร่วงของใบ จึงส่งผลให้การสะสมเอทิลีนในต้นกล้วยไม่เมื่ออายุ 12 เดือนเพิ่มมากขึ้น

สำหรับต้นกล้วยไม่ที่ได้รับการถ่ายยีนแต่ละสายต้นมีการสร้างเอทิลีนได้แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจาก การถ่ายยีน antisense *CPACO* เข้าสู่เนื้อเยื่อกล้วยไม่โดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะมีผลทำให้การถ่ายยีนเป็นแบบสุ่มและมีจำนวนชุดของยีน antisense *CPACO* ที่อยู่ในต้นพืชแตกต่างกัน จำนวนชุดยีนที่ต่างกันนี้อาจส่งผลให้มีการยับยั้งการทำงานของยีน *ACO* ได้แตกต่างกัน ซึ่งจากการศึกษาของ เบญจวรรณ (2552) ที่ศึกษาในต้นกล้วยไม่ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยชุดยีน pMAT21-AS-*ACO* พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนแต่ละต้นจำนวนชุดยีนแตกต่างกันตั้งแต่ 1 ชุดยีน จนถึง 4 ชุดยีน ซึ่งเมื่อนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน AS-*ACO* ด้วยวิธี RT-PCR พบว่าต้นกล้วยไม่ที่มีจำนวนชุดยีนมากจะพบการแสดงออกของยีน AS-*ACO* มาก และพบการแสดงออกของยีน sense *ACO* ในปริมาณน้อย แต่ในทางตรงข้ามในต้นกล้วยไม่ที่มีจำนวนชุดยีนน้อยพบการแสดงออกของยีน AS-*ACO* น้อย และมีการแสดงออกของยีน sense *ACO* มาก

ในงานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACO ในใบของกล้วยไม่ที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีน ในช่วงเดือนที่ 9 หลังออกปลูก โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Kato and Hyodo (1999) โดยวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ACO จากปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้น ซึ่งได้มาจากการเปลี่ยน ACC ปริมาณ 200 ไมโครโมลาร์ ที่ให้จากภายนอก ด้วยเอนไซม์ ACO จากใบกล้วยไม่ วัดปริมาณเอทิลีนด้วยเครื่อง gas chromatography แล้วเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ตรวจสอบโดยวิธี Bardford protein assay (Bradford, 1976) ซึ่งผลที่ได้พบว่า ต้นกล้วยไม่พันธุ์บอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีนแต่ละสายต้นมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACO ที่แตกต่างกันไป แต่อยู่

ในช่วง 0.032-0.68 พิโคลิตร เอทิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง และมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACO ต่ำกว่าต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (control) ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACO สูงถึง 1.12 พิโคลิตร เอทิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง สำหรับสายต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีกิจกรรมเอนไซม์อยู่ในช่วง ถึง เท่านั้น โดยต้นที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACO น้อยที่สุดได้แก่ AB3 ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ รักชนก (2549) ที่พบว่ากล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ สายต้นที่ได้รับการถ่ายยีนโดยใช้ pCAMBIA 13121aACO2 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ ACO น้อยที่สุด (ภาพที่ 22) สำหรับพันธุ์เอี้ยสกุล ให้ผลในการทำงานเหมือนกันคือ ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนแต่ละสายต้นมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACO ที่แตกต่างกันไป แต่อยู่ในช่วง 0.035 - 0.378 พิโคลิตรเอทิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ซึ่งต่ำกว่า ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (control) ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ ACO 0.644 พิโคลิตรเอทิลีนต่อ มิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง สำหรับพันธุ์เอี้ยสกุลสายต้นที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACO น้อยที่สุด ได้แก่ สายต้น AE3 (ภาพที่ 23)

จากผลการทดลองที่พบว่าการถ่ายยีน antisense CPACO ทำให้ต้นกล้วยไม้มีการผลิตเอทิลีนลดลงนี้สอดคล้องกับผลการทดลองในพืชหลายชนิดเช่น Hector *et al.* (2006) ได้ถ่ายยีน antisense ACO ของเมลอนเข้าสู่เมลอนสายพันธุ์ “Galia’ male parental muskmelon” และเมื่อ ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACO ในเปลือกชั้นกลางของผลเมลอน พบว่าการถ่ายยีน antisense ACO สามารถลดกิจกรรมของเอนไซม์ ACO ซึ่งปกติอยู่ในระดับ 0.97 พิโคกรัมต่อกิโลกรัมต่อวินาที เหลือเพียงไม่เกิน 0.25 พิโคกรัมต่อกิโลกรัมต่อวินาทีได้ และมีรายงานในพืชอื่นๆ เช่น มะเขือเทศ (Hamilton *et al.*, 1990) แคนตาลูป (Flores *et al.*, 2000) และ พืชุนี (Li *et al.*, 2007) ที่พบว่าพืชที่ได้รับการถ่ายยีน antisense ACO มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACO ลดลงจากเดิม

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ ACO กับการผลิตเอทิลีน ในกล้วยไม้ที่ได้จากการทดลองนี้ พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน คือ ช่วงอายุเดือนที่ 9 หลังออกปลูก ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีการสร้างเอทิลีนสูงกว่าต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนทุกสายต้น ในทั้งสองพันธุ์ แสดงว่ายีน antisense CPACO ที่ถ่ายเข้าไปในกล้วยไม้ทั้งสองพันธุ์ สามารถยับยั้ง หรือลดการผลิตเอนไซม์ ACO ได้จริง ซึ่งส่งผลไปถึงการสร้างเอทิลีนที่ต่ำลงด้วย จากผลการทดลองทั้ง กิจกรรมของเอนไซม์และการผลิตเอทิลีนของต้นกล้วยไม้ สรุปได้ว่า การถ่ายยีน antisense CPACO ทำให้กล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนพันธุ์บอม 17 มีการผลิตเอทิลีนลดลง 60 ถึง 76 เปอร์เซ็นต์ และ กิจกรรมของเอนไซม์ ACO ลดลง 41 ถึง 97 เปอร์เซ็นต์ ส่วน กล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนพันธุ์เอี้ยสกุล มีการผลิตเอทิลีนลดลง 42 ถึง 76 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรมของเอนไซม์ลดลง 41 ถึง 94.5 เปอร์เซ็นต์

อย่างไรก็ตามในกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนนั้นแต่ละสายต้นมีการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากจำนวนชุดยีนที่ได้รับแตกต่างกัน หรือ ตำแหน่งของยีนที่ถ่ายเข้าไปในกล้วยไม้แต่ละสายต้นที่ต่างกันส่งผลให้มีการแสดงออกไม่เท่ากัน (Aida *et al.*, 1998)

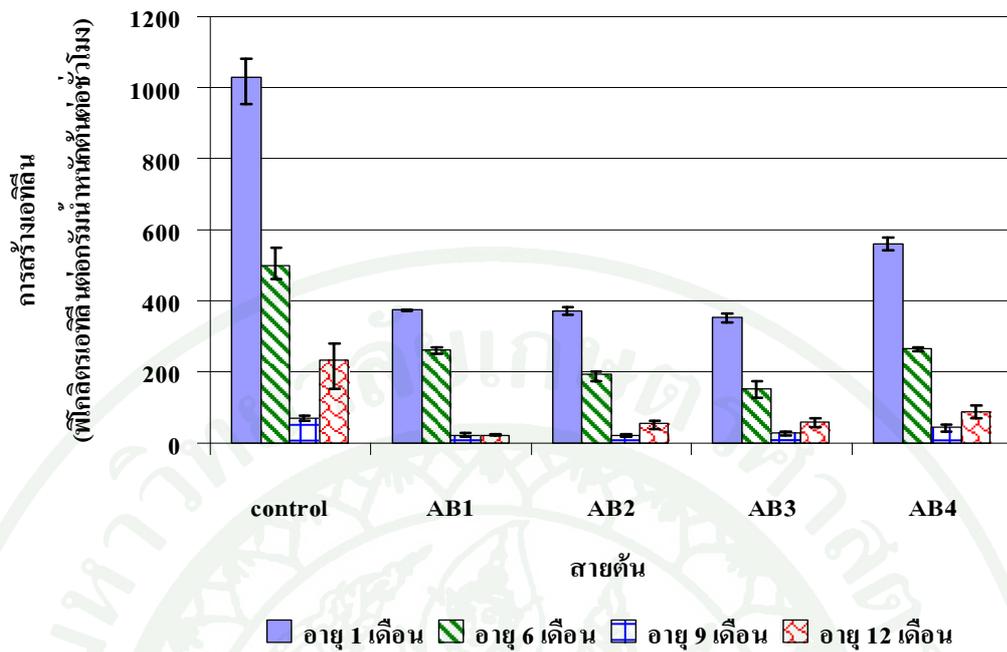
เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอของยีน *CPACO1* และ *CPACO2* ที่ได้จากมะละกอกับยีน *ACO* จากกล้วยไม้สกุลหวาย *Dendrobium crumenatum* พบว่ามีความแตกต่างกันเพียง 34 และ 31 เบอส์เรียงลำดับ (รักษนก, 2549) ซึ่งความแตกต่างเพียงบางส่วนนี้เป็นข้อดีประการหนึ่ง เมื่อถ่ายยีนแบบ antisense *CPACO* จากมะละกอเพื่อยับยั้งการทำงานของยีน *ACO* ในกล้วยไม้ จะทำให้เกิดการยับยั้งการ translation ของ mRNA เพียงบางส่วน ซึ่งส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากว่าถ้ามีการยับยั้งการ translation ของยีน *ACO* ในกล้วยไม้ทั้งหมดจะทำให้เกิดการผลิตเอทิลีนขึ้น ซึ่งเอทิลีนนี้เป็นฮอร์โมนหนึ่งที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการงอกและช่วยในการขยายเซลล์ทางด้านข้างของลำต้น อีกทั้งยังส่งผลต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมนชนิดอื่นๆ อีกด้วย (นภดล, 2537) โดยการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยวิธีการนำ antisense technology มาใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์เอทิลีนนั้น ส่วนใหญ่จะสร้างยีน antisense RNA จากยีนในพืชต่างชนิดกัน (heterologous antisense RNA) (Oliver *et al.*, 1993) พบตัวอย่างการถ่ายยีน antisense *ACO* ของมะเขือเทศ เข้าสู่ต้นมะเขือเทศ พบว่า ผลมะเขือเทศไม่สามารถสุกได้ต้องให้แก๊สเอทิลีนบ่มอีกครั้ง (Bolito, 1997)

ตารางที่ 2 ปริมาณเอทิลีนที่สร้างขึ้นในต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์บอม 17 และ เอียสกุลที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO และไม่ได้รับการถ่ายยีน (control) ที่อายุ 1 6 9 และ 12 เดือน หลังออกปลูก

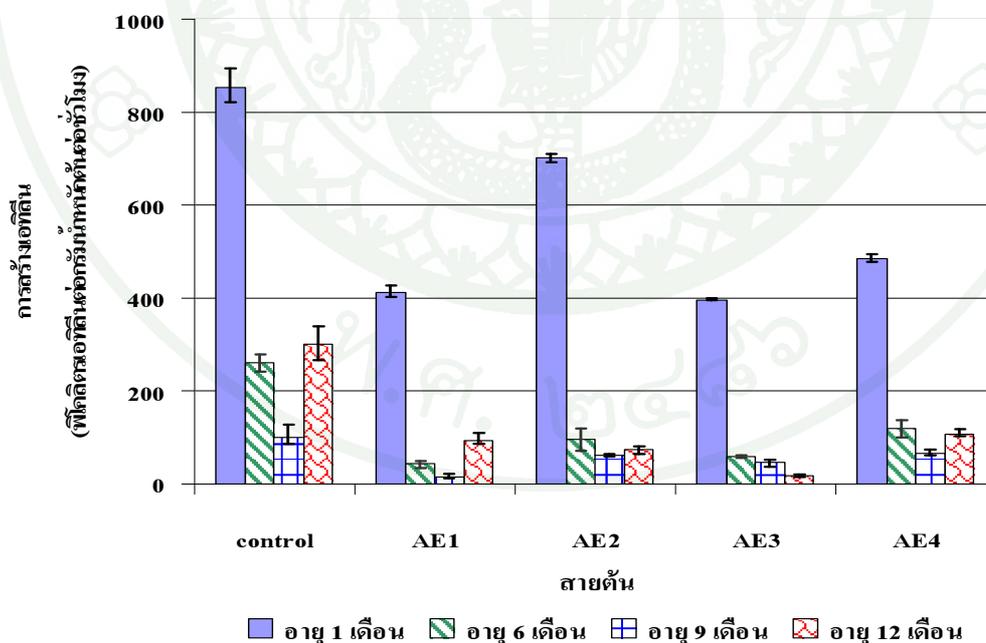
ปริมาณเอทิลีนที่ตรวจพบ (พิโคลิตรเอทิลีนต่อกรัมน้ำหนักต้นต่อชั่วโมง)					
พันธุ์	สายต้น	อายุ 1 เดือน <sup>1/</sup>	อายุ 6 เดือน <sup>1/</sup>	อายุ 9 เดือน <sup>1/</sup>	อายุ 12 เดือน <sup>1/</sup>
บอม 17	control	1029.3 a	499.0 a	67.7 a	231.5 a
	AB1	373.7 c	262.0 b	23.0 c	23.1 b
	AB2	372.7 c	191.0 c	21.3 c	54.6 b
	AB3	353.0 c	153.0 c	27.9 c	59.5 b
	AB4	559.7 b	264.0 b	43.0 b	85.7 b
	F-test	**	**	**	**
	C.V. (%)	9.59	18.8	19.79	35.64
เอียสกุล	control	854.0 a	261.0 a	100.7 a	299.0 a
	AE1	412.0c	43.0 c	15.3 c	93.7 b
	AE2	702.0 b	94.0 b	60.1 b	73.0 b
	AE3	396.0 c	58.0 c	45.5 b	17.0 c
	AE4	485.0 a	119.5 b	66.5 b	108.0 b
	F-test	**	**	**	**
	C.V. (%)	8.22	11.47	20.2	15.87

\*\* ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

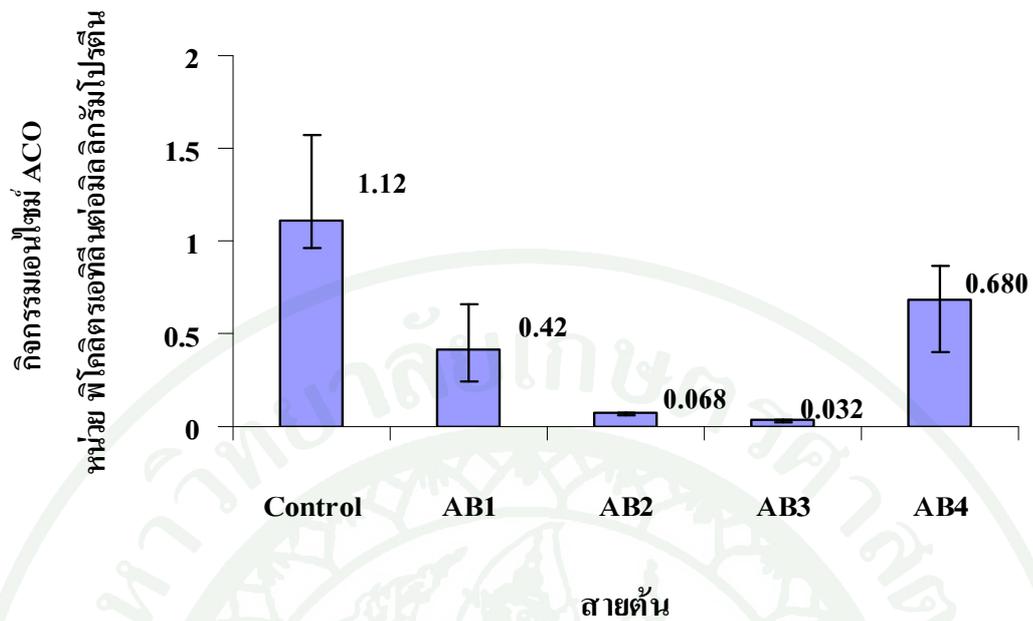
<sup>1/</sup> ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันในแต่ละต้นมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT



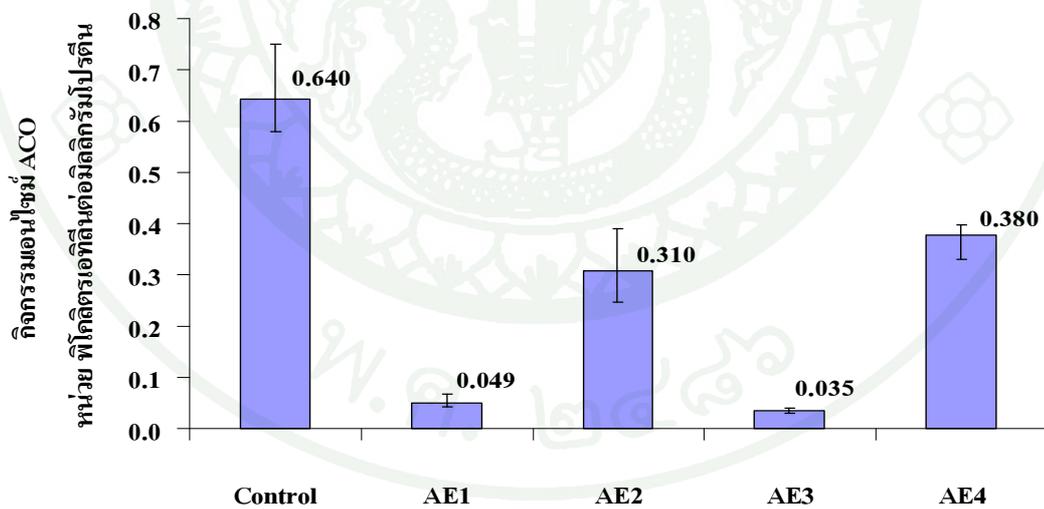
ภาพที่ 20 ปริมาณเอทีลินที่เกิดขึ้นจากต้นกล้วยไม้พันธุ์บอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีน (AB1 ถึง AB4) และที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (control) ในช่วงอายุ 1 6 9 และ 12 เดือนหลังออกปลูก



ภาพที่ 21 ปริมาณเอทีลินที่เกิดขึ้นจากต้นกล้วยไม้พันธุ์เสียดกุลที่ได้รับการถ่ายยีน (AE1 ถึง AE4) และที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (control) ในช่วงอายุ 1 6 9 และ 12 เดือนหลังออกปลูก



ภาพที่ 22 กิจกรรมของเอนไซม์ ACO ในใบของกล้วยไม้พันธุ์บอม 17 สายต้นที่ได้รับการถ่ายยีน (AB1 ถึง AB4) และที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (control) ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACO โดยวัดปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยน ACC ที่ให้จากภายนอกด้วยเอนไซม์ ACO จากต้นกล้วยไม้เอง



ภาพที่ 23 กิจกรรมของเอนไซม์ ACO ในใบของกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุลสายต้นที่ได้รับการถ่ายยีน (AE1 ถึง AE4) และที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (control) ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACO โดยวัดปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยน ACC ที่ให้จากภายนอกด้วยเอนไซม์ ACO จากต้นกล้วยไม้เอง

### 3.2 ปริมาณเอทิลีนของดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO

ผลการสร้างเอทิลีนของดอกกล้วยไม้ที่ได้จากการทดลองนี้ในภาพรวม สอดคล้องกับรายงานของ Goh และคณะ (1985) ที่พบว่า การสร้างเอทิลีนของดอกไม้แบ่งเป็น 3 ระยะ และเห็นได้ชัดเจนในระยะที่ 2 ซึ่งจะเกิดพร้อมกับการเปลี่ยนแปลงภายในอื่นๆ ของดอกไม้ซึ่งนำไปสู่การชราภาพของดอกไม้ และ พบว่า กล้วยไม้สกุลหวายมีอัตราการสร้างเอทิลีนสูงมากในระยะดอกตูม และลดลงเมื่อดอกเริ่มบาน จากนั้นอัตราการสร้างเอทิลีนจะสูงขึ้นอีกเมื่อดอกที่บานแล้วเข้าสู่ระยะชราภาพ และ จากผลการทดลองยังพบอีกว่า ดอกตูมของทั้งสองพันธุ์มีปริมาณเอทิลีนสูงกว่าดอกบาน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ketsa and Thampitakorn (1995) ที่พบว่า ช่อดอกที่มีเฉพาะดอกตูมของดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ชัชวาลดิพลอยด์ มีการผลิตเอทิลีนมากกว่าช่อดอกที่มีเฉพาะดอกบาน และในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ และ บอม 28 ดอกตูมมีปริมาณ ACC มากกว่าดอกบาน และปริมาณ ACC มีการเปลี่ยนแปลงสอดคล้องกับปริมาณการสร้างเอทิลีน และ อภิวิธา (2542) ได้รายงานการศึกษาอัตราการผลิตเอทิลีนของดอกตูมและดอกบานของกล้วยไม้สกุลหวายดิพลอยด์ และเตตราพลอยด์ พบว่า ดอกตูมของทั้งสองสายพันธุ์ มีการผลิตเอทิลีนสูงกว่าดอกบานของกล้วยไม้

จากการทดลองนี้เมื่อวัดปริมาณเอทิลีนที่สร้างจากดอกกล้วยไม้จากต้นที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO เปรียบเทียบกับดอกกล้วยไม้ของต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเครื่อง gas chromatography พบว่า ดอกกล้วยไม้ทั้งสองพันธุ์มีการสร้างเอทิลีน 3 ระยะ โดยระยะแรกดอกไม้มีปริมาณเอทิลีนค่อนข้างต่ำ ระยะกลาง เป็นระยะที่ดอกไม้มีปริมาณเอทิลีนสูงที่สุด และระยะสุดท้ายระยะที่ 3 ดอกไม้จะมีปริมาณเอทิลีนลดลง (ภาพที่ 24 และ ภาพที่ 25)

การผลิตเอทิลีนของดอกกล้วยไม้พันธุ์บอม 17 ใน 3 ระยะตามที่กล่าวมาแล้วจากภาพที่ 24 พบว่า ระยะที่ 1 อยู่ในช่วง 4 วันแรกของการปักแจกันซึ่งทั้งดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน (AB1- AB4) และดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีการผลิตเอทิลีนใกล้เคียงกัน ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.5 – 2 พิโคลิตรเอทิลีนต่อกรัมน้ำหนักช่อดอกต่อชั่วโมง ยกเว้นในวันแรกดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนสายต้น AB2 มีการผลิตเอทิลีนสูงมากประมาณ 5 พิโคลิตรเอทิลีนต่อกรัมน้ำหนักช่อดอกต่อชั่วโมง ซึ่งอาจเนื่องมาจาก จำนวนของดอกตูมที่มากกว่า และเป็นช่อดอกแรกที่ตัดได้ในช่วงเดือนกันยายน ซึ่งตรงกับฤดูฝน ซึ่งคุณภาพของดอกอาจไม่ดีเท่ากับดอกกล้วยไม้ช่อดอกแรกที่ตัดในช่วงฤดูหนาว หรืออีกกรณีอาจเกิดจากการบาดแผลที่ได้รับการตัดแยกกระหว่างดอกตูมกับดอกบาน

ต่อมาระยะที่ 2 เป็นระยะที่ค่าเอทิลีนสูงสุด อยู่ในช่วงวันที่ 5 ถึง วันที่ 8 ของการปักแจกัน โดยช่อดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนทุกสายต้น (AB1 ถึง AB4) มีระยะ สูงสุดอยู่ในช่วงวันที่ 5 และ วันที่ 6 ของการปักแจกัน แต่ทั้งหมดนี้มีการผลิตเอทิลีนเพียง 2.7 - 5.3 พิโคลิตรเอทิลีนต่อกรัม น้ำหนักช่อดอกต่อชั่วโมง แต่สำหรับช่อดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีค่าเอทิลีนสูงสุดในวันที่ 8 ของการปักแจกัน ซึ่งช้ากว่ากล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน แต่มีการผลิตเอทิลีนสูงมากถึง 8.4 พิโคลิตรเอทิลีนต่อกรัม น้ำหนักช่อดอกต่อชั่วโมง

สุดท้ายระยะที่ 3 เป็นช่วงที่การผลิตเอทิลีนลดลงจากระยะที่ 2 มากโดยกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและได้รับการถ่ายยีนมีการผลิตเอทิลีนใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 0.5-2 พิโคลิตรเอทิลีนต่อกรัม น้ำหนักช่อดอกต่อชั่วโมง ส่วนระยะเวลาในระยะเวลาที่ 3 นั้นแตกต่างกันไปดังนี้ ช่อดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนสิ้นสุดระยะที่ 3 ในวันที่ 10 ของการปักแจกัน อาจเป็นผลมาจาก ระยะที่ 2 ซึ่งมีค่าเอทิลีนสูงมากเกินไปช่อดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนสายต้น AB1 AB2 และ AB3 สิ้นสุดในวันที่ 12 ของการปักแจกัน และ สุดท้ายช่อดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนสายต้น AB3 สิ้นสุดระยะที่ 3 ช้าที่สุดคือวันที่ 14 ของการปักแจกัน

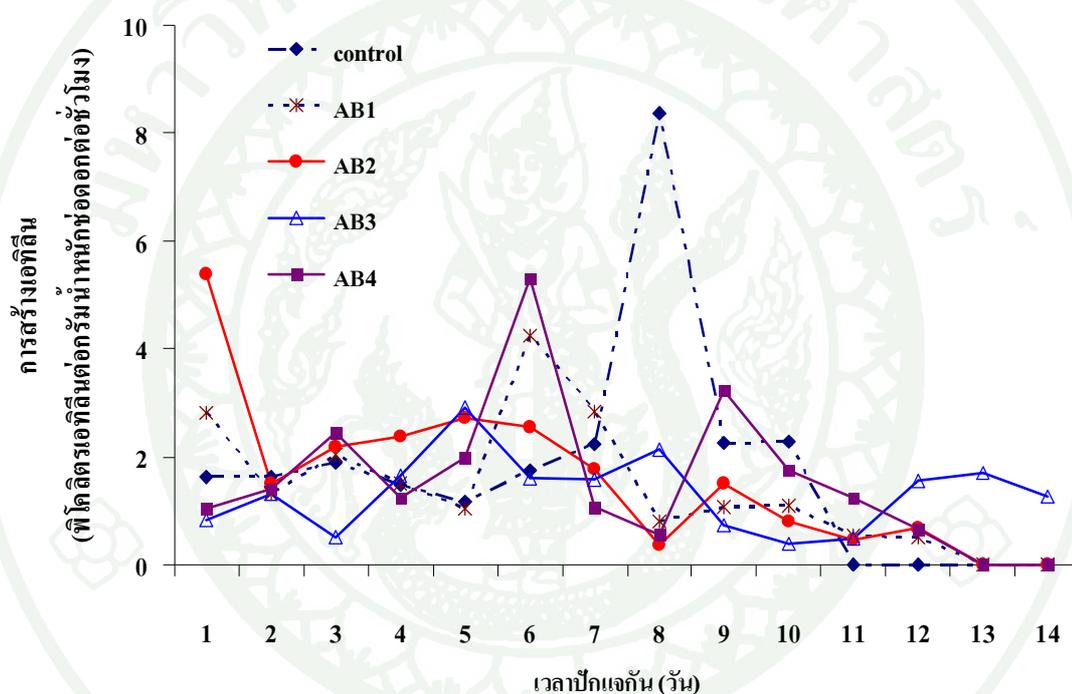
สำหรับสายพันธุ์เอเซียสกุล (ภาพที่ 25) ให้ผลทำนองเดียวกันกับพันธุ์บอม 17 คือแบ่งได้ 3 ระยะ โดยระยะที่ 1 อยู่ในช่วง 6 วันแรกของเวลาในการปักแจกันซึ่งทั้งช่อดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน (AE1- AE4) และช่อดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีการผลิตเอทิลีนใกล้เคียงกันซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.4 – 3.5 พิโคลิตรเอทิลีนต่อกรัม น้ำหนักช่อดอกต่อชั่วโมง ซึ่งในระยะนี้เมื่อพิจารณาช่อดอกกล้วยไม้ยังไม่พบอาการเสื่อมสภาพของดอก

ระยะที่ 2 เป็นระยะที่มีค่าเอทิลีนสูงสุด อยู่ในช่วงวันที่ 7 ถึง วันที่ 9 ของการปักแจกัน โดยช่อดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนทุกสายต้น (AE1-AE 4) มีระยะสูงสุดในช่วงวันที่แตกต่างกันไป สายต้น AE1 มีค่าเอทิลีนสูงสุดในวันที่ 7 ของการปักแจกัน มีการผลิตเอทิลีนอยู่ที่ 6.55 พิโคลิตรเอทิลีนต่อกรัม น้ำหนักช่อดอกต่อชั่วโมง สายต้น AE2 และช่อดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีค่าเอทิลีนสูงสุดในวันเดียวกันคือวันที่ 8 ของการปักแจกัน แต่มีการผลิตเอทิลีนต่างกัน โดยสายต้น AE 2 มีการผลิตเอทิลีนต่ำกว่า คือ 8.49 พิโคลิตรเอทิลีนต่อกรัม น้ำหนักช่อดอกต่อชั่วโมง ส่วนช่อดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีการผลิตเอทิลีนสูงถึง 26.53 พิโคลิตรเอทิลีนต่อกรัม น้ำหนักช่อดอกต่อชั่วโมง สำหรับกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนสายต้น AE3 และ AE4 มีระยะที่มีการสร้างเอทิลีนสูงสุดในวันเดียวกันคือวันที่ 9 ของการปักแจกัน แต่การผลิตเอทิลีนแตกต่างกันโดย สาย

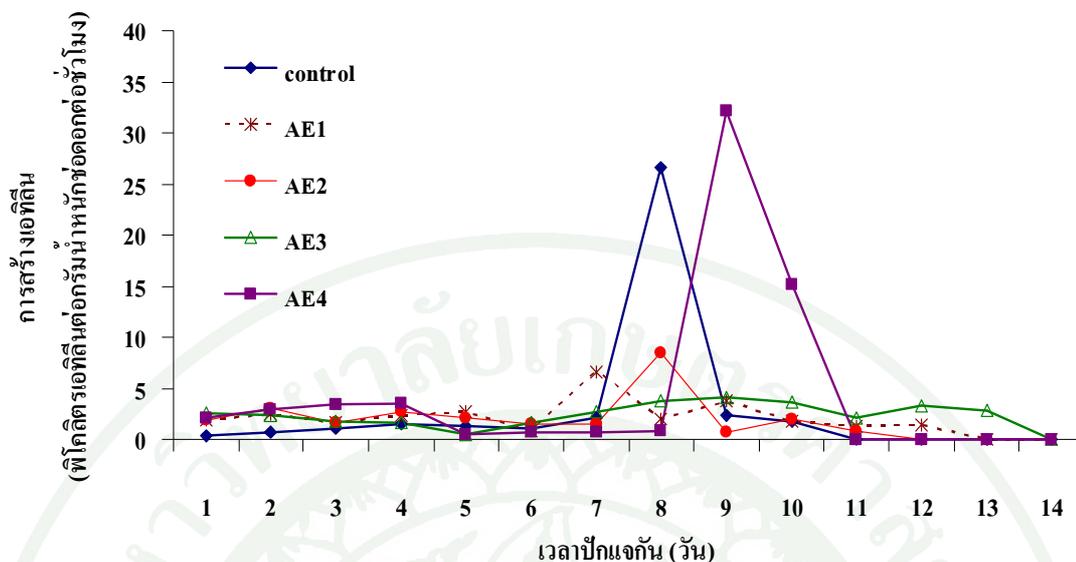
ต้น AE3 ผลิเดเททิตินต่ำมาก คือ 4.13 พิโคลิตรเอทิตินต่อกรัมน้ำหนักช่อดอกต่อชั่วโมง ส่วนสายต้น AE 4 ผลิเดเททิตินสูงถึง 32.17 พิโคลิตรเอทิตินต่อกรัมน้ำหนักช่อดอกต่อชั่วโมง

ระยะที่ 3 เป็นช่วงที่ดอกกล้วยไม้มีการผลิเดเททิตินลดลงจากระยะที่ 2 มากโดยกล้วยไม้ทั้งที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและได้รับการถ่ายยีนมีการผลิเดเททิตินใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 1-5 พิโคลิตรเอทิตินต่อกรัมน้ำหนักช่อดอกต่อชั่วโมง ส่วนระยะเวลาของระยะที่ 3 นั้นแตกต่างกันไปดังนี้  
ช่อดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและช่อดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนสายต้น AE4 สิ้นสุดระยะที่ 3 ในวันที่ 10 ของการปักแกลง ช่อดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนสายต้น AE2 AE1 และ AE3 สิ้นสุดในวันที่ 11 12 และ 13 การปักแกลงตามลำดับ

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าทั้งช่อดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนของพันธุ์บอม 17 และช่อดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนกับได้รับการถ่ายยีนสายต้น AE4 ของพันธุ์ เอียสกุล มีการผลิตเอทิลีนสูงกว่า ช่อดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO สายต้นอื่นๆ จึงทำให้มีช่วงระยะที่ 3 ก่อนข้างสั้นเพียงประมาณ 10 วันของการปักแจกันเท่านั้น ซึ่งอาจสรุปได้ว่าการที่มีระยะที่ 2 มีการผลิตเอทิลีนสูงมากจะทำให้อายุการปักแจกันสั้นลง การถ่ายยีน antisense CPACO พบว่าในกล้วยไม้หลายสายต้นมีการผลิตเอทิลีนในระยะที่ 2 ต่ำกว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ส่งผลให้มีอายุการปักแจกันเพิ่มขึ้นประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 24 การสร้างเอทิลีนในช่อดอกของกล้วยไม้พันธุ์บอม 17 ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน (AB1-AB4) และต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (control)



ภาพที่ 25 การสร้างเอทิลีนในช่อดอกกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุล ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน (AE1-AE4) และต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (control)

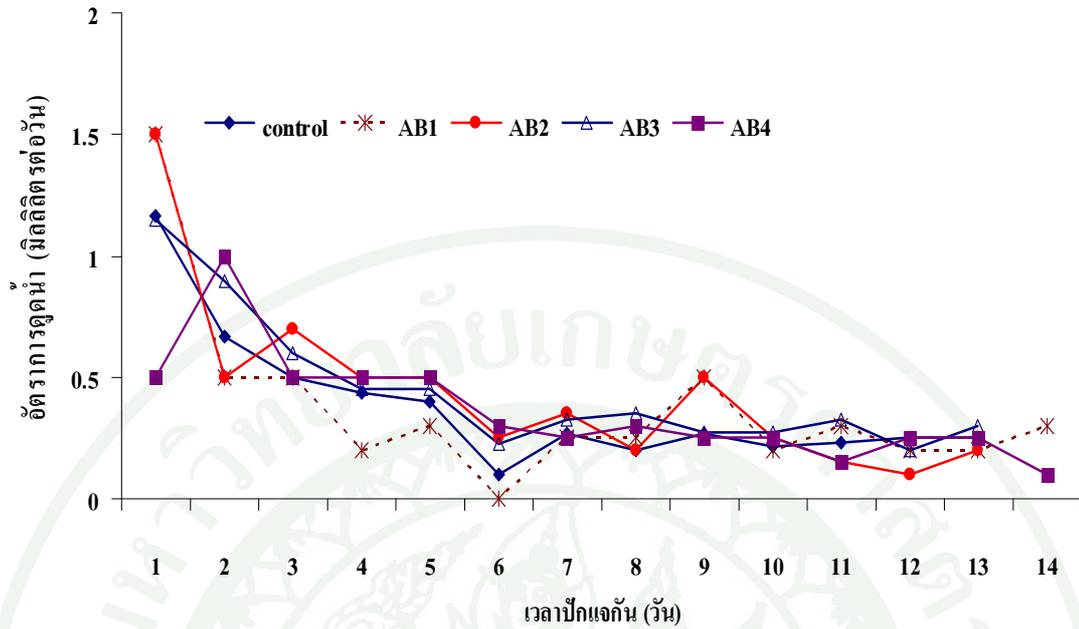
#### 4. อัตราการดูดน้ำ

ศึกษาอัตราการดูดน้ำของช่อดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* เปรียบเทียบกับช่อดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยแช่ช่อดอกกล้วยไม้ในน้ำกลั่น พบว่า พันธุ์บอม 17 ช่อดอกกล้วยไม้ทั้งที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* และไม่ได้รับการถ่ายยีน มีอัตราการดูดน้ำสูงในช่วงวันแรกแล้วลดต่ำลง และคงที่จนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดยในช่วงวันแรกของการปักแจกันช่อดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน สายต้น AB1 และ AB2 มีอัตราการดูดน้ำมากที่สุด รองลงมา คือ สายต้น AB3 ส่วนสายต้น AB4 มีอัตราการดูดน้ำต่ำที่สุดในวันแรก แต่วันที่สองมีอัตราการดูดน้ำเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 27) ส่วนพันธุ์เอียสกุล ช่อดอกกล้วยไม้ทั้งที่ได้รับการถ่ายยีน *CPACO* แบบ antisense และไม่ได้รับการถ่ายยีน มีอัตราการดูดน้ำสูงสุดภายในช่วงสองวันแรก แล้วลดต่ำลงและคงที่จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ยกเว้นช่อดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน สายต้น AE3 ที่มีอัตราการดูดน้ำสูงถึงช่วงวันที่สามของอายุการปักแจกัน (ภาพที่ 27)

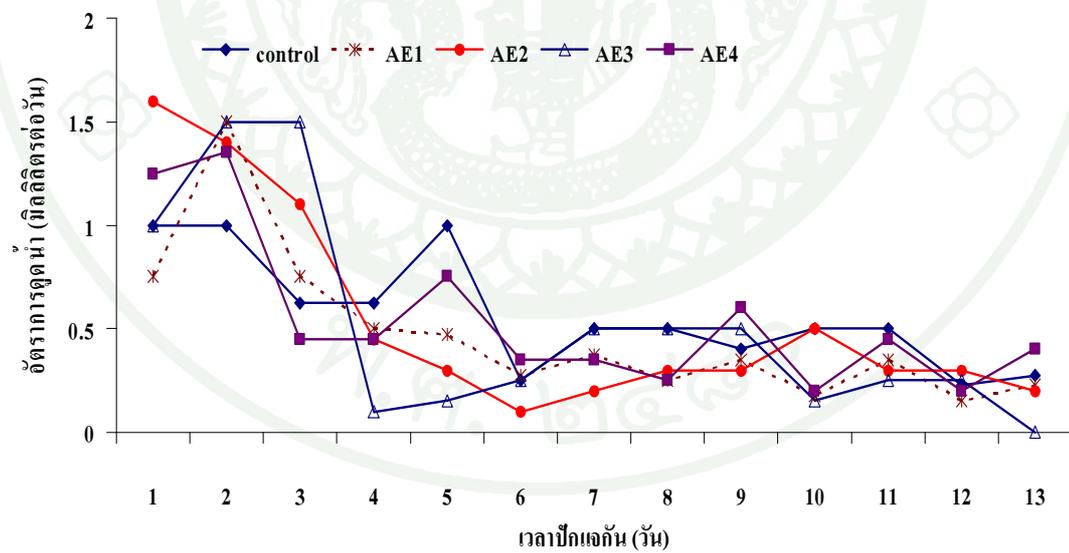
โดยปกติการดูดน้ำของช่อดอกกล้วยไม้นั้นเกิดขึ้นตลอดเวลา เพราะน้ำมีความจำเป็นต่อกระบวนการหายใจในดอกไม้ที่ยังไม่เกิดการวาย การดูดน้ำก็จะเกิดขึ้นตลอดเวลา ซึ่งการดูดน้ำยังมีความสัมพันธ์กับการคายน้ำของเซลล์ด้วย แต่อัตราการดูดน้ำของช่อดอกกล้วยไม้ในการทดลองนี้

ที่มีค่าลดลงคาดว่า ไม่น่าจะเป็นผลมาจากการคายน้ำของช่อดอก เนื่องจากหลังจากการเก็บเกี่ยวช่อดอกกล้วยไม้มาศึกษาอายุการปักแจกันในสภาพตัดแปลง คือ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60-65% ทำให้อัตราการคายน้ำน่าจะใกล้เคียงกันในทุกช่อดอก ดังนั้นการที่อัตราการคายน้ำลดลง อาจเนื่องมาจากมีสิ่งอุดกั้นก้านช่อดอก เช่น เชื้อจุลินทรีย์ (Rogers, 1973) หรืออาจเนื่องมาจากสารประกอบบางชนิดจากการปลดปล่อยของผนังเซลล์หลังจากตัดโคนก้าน เช่น สารที่ปลดปล่อยในกลุ่ม polyphenol ซึ่งทำให้เกิดการเป็นพิษของเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผล (Durkin, 1979) หรือเกิดจากการสะสมของสารประเภทคาร์โบไฮเดรต โพรตีน ไขมัน สารในกลุ่มเพคติน และ เอนไซม์บางชนิดจากการสลายตัวของ secondary wall ของ xylem (Parups and Molner, 1972) นอกจากนี้ยังอาจเป็นผลมาจากฟองอากาศที่เข้าทางรอยตัดของก้านช่อดอก (Reid, 1985)

จากการทดลองพบว่า ช่อดอกกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุลมีความแข็งแรง และขนาดก้านใหญ่กว่า ซึ่งจะทำให้ดูน้ำได้มากกว่า เพราะมีจำนวนของท่อลำเลียงมากกว่า (ช. ณีภูริศิริ, 2538) นอกจากนี้ยังพบว่า พันธุ์เอียสกุลมีขนาดดอกใหญ่กว่าพันธุ์บอม 17 ซึ่ง Fahm (1982) กล่าวว่าดอกไม้ที่บาน ทำหน้าที่คล้ายใบในการสะสมอาหารและมีการคายน้ำแบบเดียวกับใบ และจากการรายงานของเฉลิมชัย (2538) พบว่าการห่อดอกบานสามารถลดอัตราการสูญเสียน้ำและการบานของดอกตูม แต่มีผลน้อยกว่าการปลิดดอกบานทั้งหมด แสดงว่า ซึ่งถ้าดอกกล้วยไม้มีขนาดใหญ่และมีจำนวนดอกมาก ก็มีพื้นที่ในการคายน้ำสูง ข้อแตกต่างอีกประการหนึ่งคือ จากการสังเกตพบการเกิดแบคทีเรียในน้ำปักแจกันของพันธุ์บอม 17 มีมากกว่าในพันธุ์เอียสกุล



ภาพที่ 26 อัตราการดูหน้าของช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์บอม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีน (AB1-AB4) และที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (control)



ภาพที่ 27 อัตราการดูหน้าของช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลที่ได้รับการถ่ายยีน (AE1-AE4) และที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (control)

## 5. อายุการปักแจกัน

การศึกษาอายุการปักแจกันของดอกกล้วยไม้ โดยศึกษาทั้งช่อดอกกล้วยไม้และศึกษาดอกย่อย โดยแบ่งเป็นดอกตูมปลายช่อ ดอกตูมใหญ่ ดอกบานกลางช่อ และดอกบานโคนช่อของกล้วยไม้สกุลหวาย ทั้งสองสายพันธุ์ คือ บอม 17 และ เอียสกุลที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO เปรียบเทียบกับกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน พบว่า อายุการปักแจกันของช่อดอกกล้วยไม้ทั้งสองสายพันธุ์ทั้งที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีนนั้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ช่อดอกกล้วยไม้ของต้นที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO มีอายุการปักแจกันอยู่ในช่วง 15 ถึง 18.5 วันซึ่งมากกว่าช่อดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนที่มีอายุการปักแจกันอยู่ในช่วง 14 วัน (ตารางที่ 3)

ในกรณีศึกษาอายุการปักแจกันของช่อดอกกล้วยไม้ที่ไม่อาจแยกความแตกต่างของอายุการปักแจกันระหว่างต้นที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีนได้ชัดเจน อาจเนื่องมาจากช่อดอกกล้วยไม้ที่นำมาศึกษาเป็นดอกไม้ช่อแรกที่ช่อดอกไม่สมบูรณ์และตัวอย่างในการศึกษามีจำนวนค่อนข้างน้อยจึงทำให้ข้อมูลที่ได้อาจคลุมเครือ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกศึกษาดอกย่อยภายในช่อดอกกล้วยไม้ซึ่งพบว่า ดอกบานกลางช่อของพันธุ์บอม 17 ของต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนสายต้น AB3 มีอายุการปักแจกันนานที่สุดถึง 48.33 วัน รองลงมา คือดอกบานโคนช่อ ดอกตูมใหญ่ และ ดอกตูมปลายช่อ คือมีอายุการปักแจกันดังนี้ 34 23.67 และ 17.33 วันตามลำดับ ส่วนพันธุ์เอียสกุล ดอกบานกลางช่อของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนสายต้น AE3 มีอายุการปักแจกันนานที่สุดคือ 36 วัน ส่วนดอกบานโคนช่อ และดอกตูมใหญ่ของสายต้น AE3 นั้นมีอายุการปักแจกัน คือ 25.67 และ 24.33 วันตามลำดับ ซึ่งทั้งสองสายต้นมีอายุการปักแจกันมากกว่า สายต้นอื่นๆ และมากกว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน อย่างไรก็ตามในพันธุ์เอียสกุลนี้พบว่า ส่วนของดอกตูมปลายช่อ ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีอายุการปักแจกันนานที่สุดคือ 17 วัน

สาเหตุที่เมื่อพิจารณาที่ดอกย่อยพบว่า ดอกบานกลางช่อมีอายุการปักแจกันนานกว่าดอกบานโคนช่อ หรือ ดอกตูม อาจเนื่องมาจากโดยปกติดอกบานซึ่งเป็นแหล่งสะสมอาหารและแหล่งผลิตอาหารไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของช่อดอกรวมถึงดอกตูมด้วย (Lutz and Hardenburg, 1968) ดังนั้นเมื่อตัดแยกดอกจากกันทำให้ดอกตูมไม่สามารถรับอาหารจากดอกบานได้ สำหรับดอกบานเองนั้นก็มีการสะสมอยู่ภายในดอกแล้ว (Fahn, 1982) จึงสามารถนำไปใช้ในการหายใจและใช้ในการดำรงชีวิตทำให้มีอายุปักแจกันได้นานกว่าดอกตูม และสำหรับดอกบานกลางช่อ กับดอกบานโคนช่อพบว่า ดอกบานโคนช่อมีอายุการปักแจกันน้อยกว่าดอกบานกลางช่อ เนื่องจาก เวลาที่ดอกกล้วยไม้

บานจะเริ่มบานจากโคนช่อขึ้นมาดังนั้น อาหารที่มีสะสมไว้นั้นจะค่อยๆ ถูกใช้ไปก่อนจึงทำให้เกิดการเสื่อมสภาพเร็วกว่า ดอกบานกลางช่อ (สายชล, 2531)

จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่า กล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนพันธุ์เอียสกุล สายต้น AE3 และ AE2 และพันธุ์บอม 17 สายต้น AB3 มีอายุการปักแจกันของทั้งช่อดอกกล้วยไม้และแบบแยกดอกย่อยมากกว่าต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และมากกว่าต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนสายต้นอื่นๆ

**ตารางที่ 3** อายุการปักแจกันของช่อดอกกล้วยไม้หวายพันธุ์เอียสกุลและพันธุ์บอม 17 ที่แช่ในน้ำกลั่น วางในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสัมพัทธ์ 60-65 % ในสภาพแสงธรรมชาติ

พันธุ์	สายต้น	อายุการปักแจกัน				
		ทั้งช่อดอก <sup>1/</sup>	เฉพาะแต่ละดอก			
			ดอกตูม ปลายช่อ <sup>1/</sup>	ดอกตูมใหญ่ <sup>1/</sup>	ดอกบาน กลางช่อ <sup>1/</sup>	ดอกบาน ปลายช่อ <sup>1/</sup>
เอียสกุล	control	13.67b	17a	20.33b	29.67b	20.67b
	AE1	16ab	6c	14c	27.67b	18.33b
	AE2	17a	14.33b	24a	29b	23.67a
	AE3	17.33a	12.67b	24.33a	36a	25.67a
	AE4	16ab	6c	14.67c	29b	15c
	F-test	*	**	**	**	**
	C.V.(%)	9.60	11.75	10.01	3.52	7.28
บอม 17	control	14	12bc	17b	29c	24bc
	AB1	15	11c	17b	43b	25b
	AB2	17	12.67bc	16b	30c	25b
	AB3	18.5	17.33a	23.67a	48.33a	34a
	AB4	16.5	14b	24a	26c	20.33c
	F-test	ns	**	**	**	**
	C.V.(%)	14.49	10.38	7.44	7.12	8.60

### ตารางที่ 3 (ต่อ)

<sup>1/</sup>เฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน ในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

\* ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

\*\* ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์  
ns ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

#### 6. การเสื่อมสภาพของดอกกล้วยไม้ และ เปอร์เซ็นต์การบานเพิ่มของดอกบาน

การศึกษาการเสื่อมสภาพของดอกตูม ดอกบาน และเปอร์เซ็นต์การบานเพิ่มของดอกตูมของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน *antisense CPACO* เปรียบเทียบกับกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนพันธุ์บอม 17 (ภาพที่ 28) และพันธุ์เอียสกุล (ภาพที่ 29) พบความสัมพันธ์ระหว่างการเสื่อมสภาพของดอกตูมกับเปอร์เซ็นต์การบานเพิ่มของดอกตูมโดยกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีเปอร์เซ็นต์การบานเพิ่มของดอกตูมเพียง 22 เปอร์เซ็นต์ สำหรับพันธุ์เอียสกุล และ 35 เปอร์เซ็นต์สำหรับพันธุ์บอม 17 ในขณะที่เปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกตูมพันธุ์บอม 17 เกิดขึ้น 65 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์เอียสกุลมีมากถึง 78 เปอร์เซ็นต์

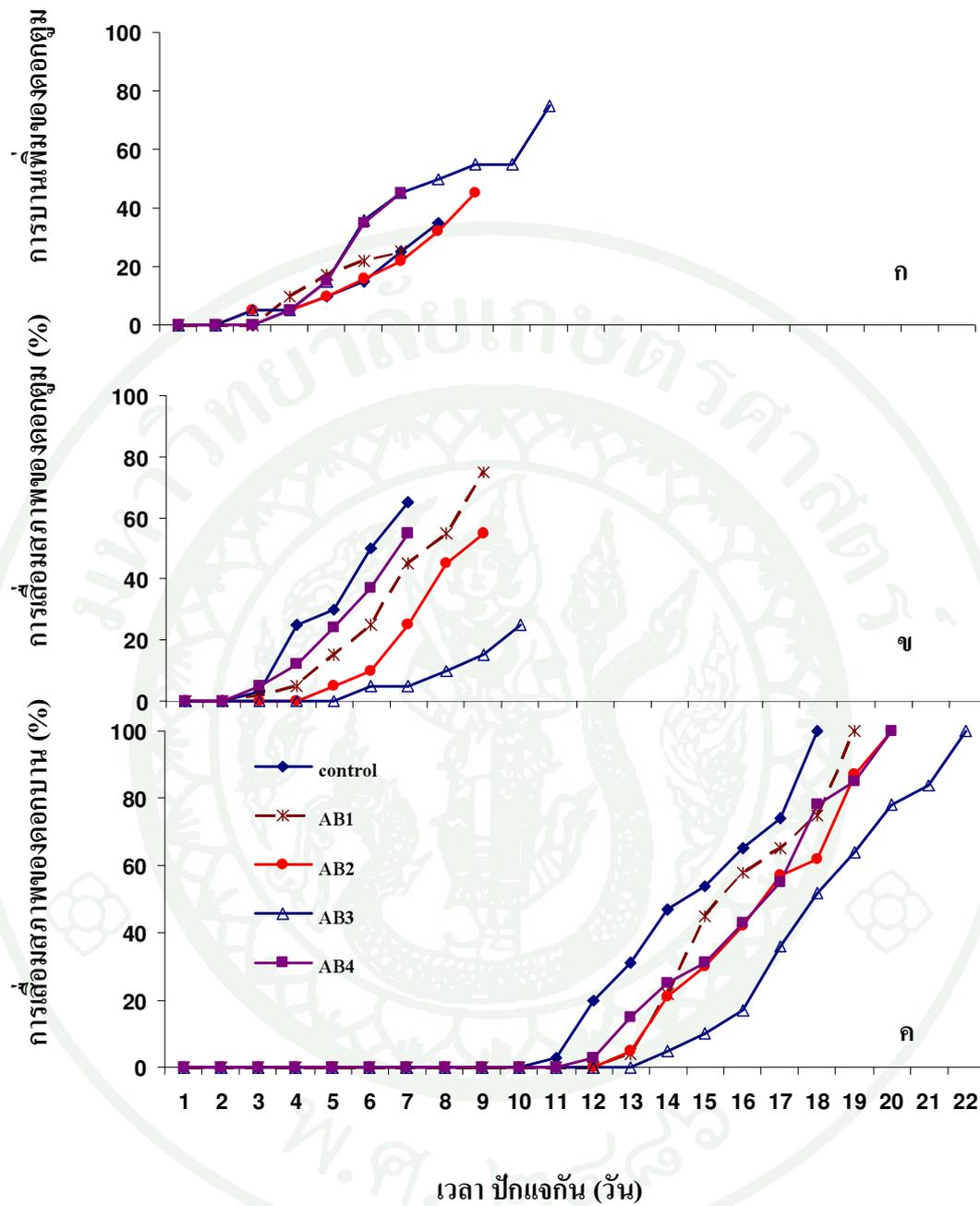
สำหรับต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน พันธุ์บอม 17 มีเปอร์เซ็นต์การบานเพิ่มของดอกตูม และเปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกตูมตั้งแต่ 25-75 เปอร์เซ็นต์ โดยสายต้นที่มีเปอร์เซ็นต์การบานเพิ่มของดอกตูมมากที่สุดและมีเปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพน้อยที่สุด คือสายต้น AB3 สำหรับพันธุ์เอียสกุล ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนมีเปอร์เซ็นต์การบานเพิ่มของดอกตูม และมีเปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกตูมตั้งแต่ 35- 65 เปอร์เซ็นต์ โดยสายต้น AE3 ที่มีเปอร์เซ็นต์การบานเพิ่มของดอกตูมมากที่สุดและมีเปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพน้อยที่สุด (ภาคผนวก ข, ตารางที่ 9 และ 10)

นอกจากนี้ยังพบว่าทั้งพันธุ์เอียสกุล และ บอม 17 ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนหยุดการบานเพิ่มของดอกตูมในวันที่ 8 ของการปักแจกัน สำหรับต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนพันธุ์บอม 17 หยุดการบานเพิ่มของดอกตูมแตกต่างกันตั้งแต่ วันที่ 7 – 11 ของการปักแจกัน โดยสายต้น AB 3 มีการบานเพิ่มของดอกตูมถึงวันที่ 11 ของการปักแจกัน สำหรับต้นกล้วยไม้

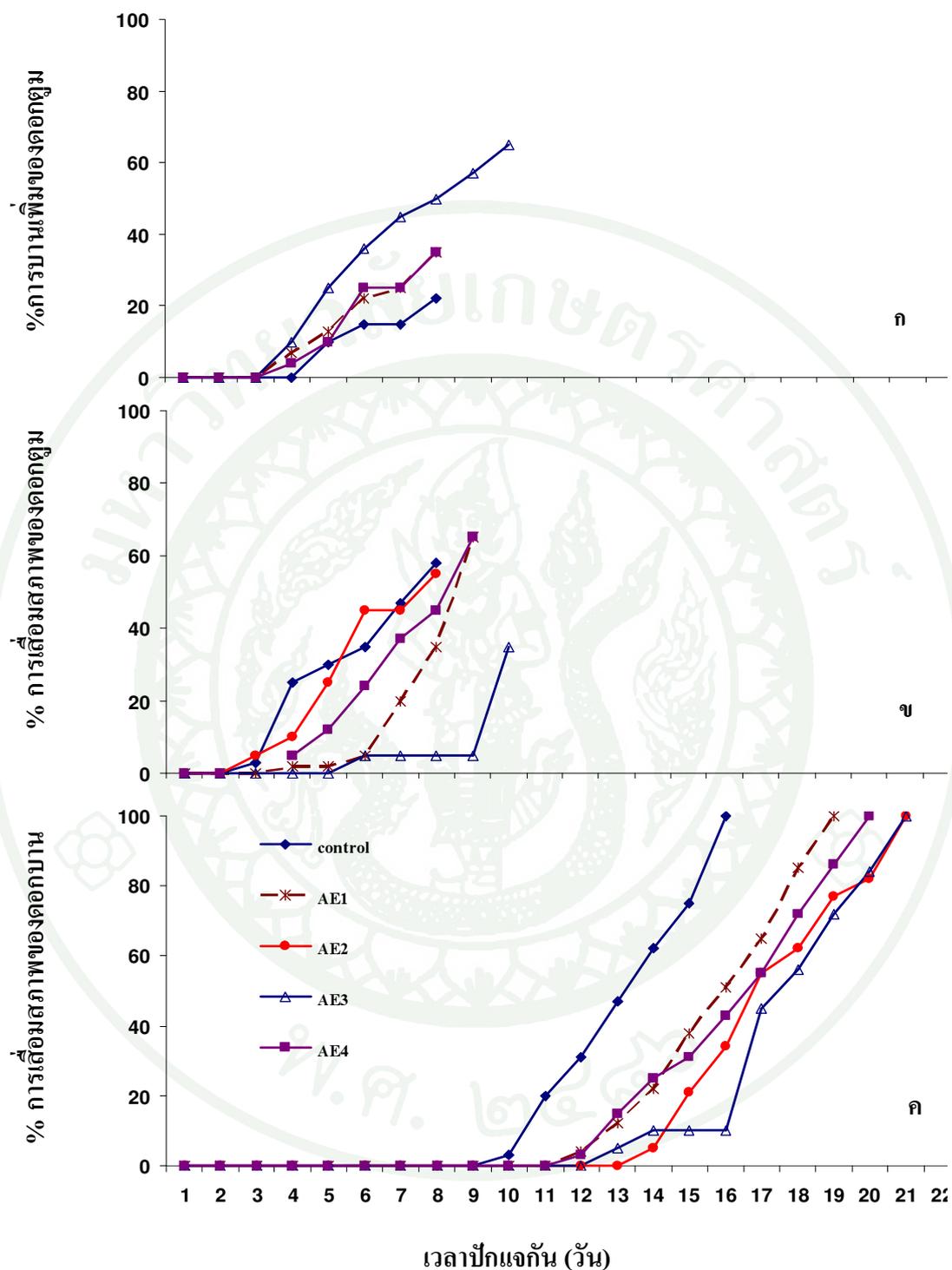
ที่ได้รับการถ่ายยีนพันธุ์เอียสกุล หยุดการบานเพิ่มของดอกตูมตั้งแต่ วันที่ 8 – 10 ของการปักแจกัน โดยสายต้น AE 3 มีการบานเพิ่มของดอกตูมถึงวันที่ 10 ของการปักแจกัน

สำหรับการเสื่อมสภาพของดอกตูมพันธุ์เอียสกุล และ บอม 17 ทั้งในกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและที่ได้รับการถ่ายยีนเริ่มมีการเสื่อมสภาพตั้งแต่วันที่ 3 ของการปักแจกัน จนกระทั่งถึงวันที่ 10 ของการปักแจกัน ยกเว้นพันธุ์บอม 17 สายต้น AB3 และ พันธุ์เอียสกุล สายต้น AE3 มีการเสื่อมสภาพของดอกตูมเกิดขึ้นช้าที่สุดคือในวันที่ 6 ของการปักแจกัน

จากการศึกษาการเสื่อมสภาพของดอกบานพบว่า เริ่มเกิดขึ้นประมาณ วันที่ 11 ของการปักแจกัน โดยต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน พันธุ์บอม 17 มีการเสื่อมสภาพของดอกบานวันแรกคือ วันที่ 11 และมีเปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกบานถึง 50 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 15 ของการปักแจกัน สำหรับพันธุ์เอียสกุลมีการเสื่อมสภาพของดอกบานวันแรกคือ วันที่ 3 ของการปักแจกันและมีเปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกบานถึง 50 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 17 ของการปักแจกัน สำหรับต้นที่ได้รับการถ่ายยีน พบว่า มีการเสื่อมสภาพของดอกบานแตกต่างกันไป โดยเริ่มประมาณวันแรก วันที่ 12-14 ของการปักแจกัน และมีการเสื่อมสภาพของดอกบาน 50 เปอร์เซ็นต์ในช่วงวันที่ 16-18 ของการปักแจกัน ซึ่งพันธุ์บอม 17 สายต้น AB3 และ พันธุ์เอียสกุล สายต้น AE3 มีเปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกบาน 50 เปอร์เซ็นต์ช้าที่สุดคือในวันที่ 18 ของการปักแจกัน



ภาพที่ 28 เปอร์เซ็นต์การบานเพิ่มของดอกตูม (ก) เปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกตูม (ข) เปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกบาน (ค) ของช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์บ่อม 17 ที่ได้รับการถ่ายยีน (สายต้น AB1-AB4) และที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (control)



ภาพที่ 29 เปรอร์เซ็นต์การบานเพิ่มของดอกตูม (ก) เปรอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกตูม (ข) เปรอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกบาน (ค) ของช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์เอียสกุลที่ได้รับการถ่ายยีน (สายต้นAE1-AE4) และที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (control)

#### 4. ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้

##### 4.1 การเจริญเติบโตทางด้านลำต้นของกล้วยไม้

ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีนหลังออกปลูก โดยวัดความสูงต้น ความกว้างลำของลำลูกกล้วยที่ 5 และ ลำลูกกล้วยที่ 10 จำนวนลำต่อกอ จำนวนใบต่อกอ พบว่าในช่วงหกเดือนแรกหลังออกปลูก ในพันธุ์เอ็ยสกุลกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนสายต้น AE3 มีการเจริญเติบโตดีที่สุด มีจำนวนใบต่อกอเฉลี่ย 3.51 ใบ จำนวนลำต่อกอ 1.73 ลำต่อกอ ความกว้างและ ความสูงลำลูกกล้วยลำที่ 5 คือ 11.89 และ 40.87 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนสายต้น AE1 มีการเจริญเติบโตรองลงมาจากสายต้น AE3 คือ มีจำนวนใบต่อกอเฉลี่ย 3.3 ใบ จำนวนลำต่อกอเฉลี่ย 1.69 ลำ ความกว้างและ ความสูงลำลูกกล้วยลำที่ 5 11.89 และ 35.38 มิลลิเมตร ส่วนกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนอีกสองสายต้นคือ สายต้น AE2 และ AE4 มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ตารางที่ 4)

ในช่วงเดือนที่ 7 ถึง เดือนที่ 12 หลังออกปลูกพบว่า ต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนพันธุ์เอ็ยสกุลสายต้น AE 1 AE2 AE4 มีการเจริญเติบโตทั้งจำนวนใบต่อกอเฉลี่ย จำนวนลำต่อกอ ความสูง และความกว้างของลำลูกกล้วยที่ 10 ใกล้เคียงกัน ยกเว้นแต่เพียงต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนสายต้น AE3 มีการเจริญเติบโตดีที่สุด มีจำนวนใบต่อกอเฉลี่ย 2.57 ใบ จำนวนลำต่อกอ 2.03 ลำต่อกอ ความกว้างและ ความสูงลำลูกกล้วยลำที่ 5 10.99 และ 66.91 มิลลิเมตร ตามลำดับ

สำหรับพันธุ์บอม 17 ช่วง 6 เดือนแรกหลังออกปลูก และช่วงเดือนที่ 7 ถึง เดือนที่ 12 หลังออกปลูกนั้น ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนทุกสายต้นคือ AB1 AB2 AB3 และ AB4 มีการเจริญเติบโตทั้ง จำนวนใบต่อกอเฉลี่ย จำนวนลำต่อกอเฉลี่ย ความกว้างและความสูงลำลูกกล้วยที่ 5 และ 10 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติภายในสายต้น แต่มีความแตกต่างกันระหว่างต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน และต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีการเจริญเติบโตในทุกด้านน้อยกว่า ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน

จากผลการทดลองในภาพรวมพบว่า ต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนพันธุ์เอียสกุล สายต้น AE1 AE3 และพันธุ์บอม 17 ทุกสายต้น มีการเจริญเติบโตทางด้าน จำนวนใบ ความสูงลำ ลูกกล้วย ความกว้างลำลูกกล้วย และจำนวนลำต้อกอ ดีกว่าต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ทั้งนี้อาจ เนื่องมาจาก ได้มีการคัดเลือกต้นกล้วย ไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนตั้งแต่ระยะที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว โดยในการเปลี่ยนอาหารแต่ละครั้งมีการเลือกต้นที่แข็งแรงสมบูรณ์มาก่อนเพื่อนำมาย้ายอาหารแล้วใน การนำออกปลูก ก็มีการคัดเลือกเฉพาะสายต้นที่มีการเจริญเติบโตดีมาใช้ในการทดลองนี้ จึงทำให้ต้น กล้วยไม้ที่นำมาศึกษาในการทดลองนี้ ไม่มีสภาพแคระ และข้อสั้น ใบหนา ไม่แผ่ขยาย ดังเช่นการ รายงานของ รักชนก (2549) ที่พบว่า กล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO ที่ยังอยู่ในสภาพเพาะเลี้ยงมีสภาพดังกล่าว

ตารางที่ 4 การเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ เอียสกุลและบอม 17 ที่อายุ 6 และ 12 เดือนหลังออกปลูก ทั้งที่ได้รับการถ่ายยีนเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้รับถ่ายยีน

พันธุ์	สายต้น	จำนวนใบต่อกอเฉลี่ย		ความกว้าง(มม.) <sup>1/</sup> ลำเมื่อสุดลำ		ความสูงลำ(มม.) <sup>1/</sup> เมื่อสุดลำที่		จำนวนลำต่อกอที่เพิ่มขึ้นภายใน <sup>3/</sup>	
		6 เดือน	12 เดือน	ลำที่ 5	ลำที่ 10	ลำที่ 5	ลำที่ 10	6 เดือน	12 เดือน
เอียสกุล	control	2.88 c	2.33 a	9.27 b	8.7 b	23.56 b	32.08 c	1.54 b	1.89 b
	AE1	3.3 ab	2.36 a	11.89 a	10.43 a	35.38 a	42.5 b	1.69 a	2.01 a
	AE2	3.1 bc	2.53 a	9.20 b	10.27 a	22.96 b	34.34 bc	1.54 b	1.91b
	AE3	3.51 a	2.57 a	11.89 a	10.99 a	40.87 a	66.91 a	1.73 a	2.03 a
	AE4	3.44 ab	1.92 b	10.74 ab	10.95 a	28.36 b	37.34 bc	1.56 b	1.88 b
F-test		**	**	**	**	**	**	**	ns
C.V. (%)		16.68	25.45	24.99	19	30.18	35.39	10.28	8.3

ตารางที่ 4 (ต่อ)

พันธุ์	สายต้น	จำนวนใบต่อกอเฉลี่ย		ความกว้าง(มม.) <sup>1/</sup> ลำเมื่อสุดลำ		ความสูงลำ(มม.) <sup>1/</sup> เมื่อสุดลำที่		จำนวนลำต่อกอที่เพิ่มขึ้นภายใน <sup>3/</sup>	
		6 เดือน	12 เดือน	ลำที่ 5	ลำที่ 10	ลำที่ 5	ลำที่ 10	6 เดือน	12 เดือน
	control	2.85 c	1.78	9.79 b	9.69 b	23.41 c	26.5 b	1.49 b	1.82 b
	AB1	3.23 ab	2.09	11.43 a	11.04 ab	33.51 ab	42.36 a	1.72 a	2.02 a
บอม 17	AB2	3.04 bc	2.18	11.15 ab	11.62 a	36.95 a	43.78 a	1.68 a	2.01 a
	AB3	3.45 a	1.83	10.63 ab	9.84 ab	33.26 ab	38.89 a	1.62 a	1.89 b
	AB4	2.96 bc	1.85	10.40 ab	10.49 ab	30.39 b	36.94 a	1.62 a	1.89 b
	F-test	**	ns	ns	ns	**	**	**	**
	C.V.(%)	17.06	31.31	19.73	26.11	27.94	35.98	9.43	8.12

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

\*\* มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% <sup>1/</sup> ความกว้างลำลูกกล้วยที่กว้างที่สุด

<sup>2/</sup> ความสูงของลำลูกกล้วยที่สูงที่สุด

<sup>3/</sup> จำนวนลำต่อกอที่เพิ่มขึ้นภายในช่วง 6 เดือนแรก และ เดือนที่ 7-12 หลังออกปลูก

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

## สรุป

1. กล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* สองพันธุ์ คือ บอม 17 และ เอียสกุล ทุกสายต้นที่ระยะออกปลุกอายุ 1 ปี เพื่อตรวจสอบด้วยวิธี PCR dot blot hybridization Southern PCR hybridization พบการคงอยู่ของยีน antisense *CPACO* และ ยีน *hpt* เมื่อตรวจสอบจำนวนชุดยีน A โดยเทคนิค Southern blot hybridization พบว่า พันธุ์บอม 17 มีจำนวนชุดยีน 2-3 ชุด และ พันธุ์เอียสกุลมีจำนวนชุดยีน 1-3 ชุด

เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน antisense *CPACO* ของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนทั้งสองพันธุ์ คือ บอม 17 และ เอียสกุล ทุกสายต้นที่ระยะออกปลุก มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACO และ ปริมาณเอทิลินที่สร้างขึ้นจากต้นกล้วยไม้ต่ำกว่ากล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ดังนี้ พันธุ์บอม 17 มีกิจกรรมเอนไซม์ ACO ลดลง 41-71 เปอร์เซ็นต์ และมีการผลิตเอทิลินลดลง 60-76 เปอร์เซ็นต์ ส่วน พันธุ์เอียสกุลมีกิจกรรมเอนไซม์ ACO ลดลง 41-94.5 เปอร์เซ็นต์ และมีการผลิตเอทิลินลดลง 42-76 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

2. ศึกษากล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CPACO* ที่ระยะออกปลุก ทั้งพันธุ์บอม 17 ทุกสายต้นและพันธุ์เอียสกุล สายต้น AE1 และ AE3 มีการเจริญเติบโตโดยรวมดีกว่าต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ยกเว้น พันธุ์เอียสกุล สายต้น AE2 และ AE4 มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับต้นกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

3. ศึกษาดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนระยะหลังเก็บเกี่ยวพบว่า ดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนพันธุ์เอียสกุล สายต้น AE3 และ AE2 และพันธุ์บอม 17 สายต้น AB3 มีอายุการปักแจกันของ ทั้งช่อดอกกล้วยไม้และแบบแยกดอกย่อยมากกว่าดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนสายต้นอื่นๆ และ ดอกกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนทุกสายต้นมีอายุการปักแจกันเพิ่มขึ้น 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับดอกกล้วยไม้ของต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ครรชิต ธรรมศิริ. 2550. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. อัมรินทร์พรินต์ติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

จิตรภาพรณ พิถี. 2529. คู่มือการผลิตกล้วยไม้เพื่อการส่งออก. กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.

\_\_\_\_\_. 2536. การเพาะเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จริงแท้ ศิริพานิช. 2550. ชีววิทยาหลังการเก็บเกี่ยวและการวางของพืช. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ, นครปฐม.

ช.ณัฐศิริ สุขสุวรรณ. 2538. วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวไม้ตัดดอกไม้ตัดใบ. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

นพดล จรัสสัมฤทธิ์. 2537. สอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช. สำนักพิมพ์ริ้วเขียว, กรุงเทพฯ.

นุชจรี ทัดเศษ. 2552. การถ่ายยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียวเข้าสู่พรรณไม้น้ำสกุล *Cryptocoryne* โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นันทนา อังกิ้นนทน์. 2549. สอร์โมนพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

เบญจวรรณ สุวรรณเนตย์. 2552. การถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอทิลีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ปอมปาดัวร์โดยใช้เวกเตอร์ pMAT21. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- ประภาพร ไชยเจริญ. 2539. ความสัมพันธ์ระหว่างการผสมเกสร การผลิตเอทิลีน และการเสื่อมสภาพของดอกกล้วยไม้หวายชิวาร์ 4 N. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประศาสตร์ เกี่ยมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์ โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.
- พรรณี ชื่นนนคร. 2550. ศักยภาพการสังเคราะห์แสงและอัตราการแลกเปลี่ยนแก๊สในรอบวันของใบกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์ บอม โจ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พีรเดช ทองอำไพ. 2529. สอรัมโนพืชและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. ไดนามิกการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- ไพบุลย์ ไพรีพ่ายฤทธิ. 2521. ตำรากกล้วยไม้สำหรับผู้เริ่มต้น. อาทรการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- พองจันทร์ ธรรมพิทักษ์อร. 2536. ผลของการสังเคราะห์เอทิลีนและการควบคุมการสร้างเอทิลีนที่มีต่ออายุการปักแจกันของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ระพี ศาคริก. 2546. การปลูกกล้วยไม้เป็นการค้า และการพัฒนาบนพื้นฐานความมั่นคง. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- \_\_\_\_\_. 2548. กล้วยไม้. สำนักพิมพ์ช่องนนทรี, กรุงเทพฯ.
- \_\_\_\_\_. 2549. กล้วยไม้สำหรับผู้เริ่มต้น. โครงการส่งเสริมคุณธรรมและการศึกษา, กรุงเทพฯ.
- รุจิรา สุขโหด. 2549. ผลของ 1-methylcyclopropene ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงและการแสดงออกของยีนการสร้างเอทิลีนในดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 'โชเนี่ย บอม#17' หลังการผสมเกสร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- รัชนีกร โคโคต. 2549. การถ่ายยีน antisense *ACO* จากมะละกอ เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศิริวรรณ อินทร์พรหม. 2548. การถ่ายยีนในถั่วเขียวโดยการใช้และไม่ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เศรษฐมนตร์ กาญจนกุล. 2550. ร้อยพรรณพฤกษา “กล้วยไม้”. เศรษฐศิลป์ 2550, กรุงเทพฯ.
- สนธิชัย จันทน์เปรม. 2543. เทคนิคการถ่ายยีนกับการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย, น. 109-111. ใน เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืชครั้งที่ 13: เทคโนโลยีใหม่พันธุ์พืชใหม่ ระหว่างวันที่ 13-14 ธันวาคม. สมาคมปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืชแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.
- สมชาย สุกนธสิงห์, เสรี วิริยะวัฒน์, โอปาร พิทักษ์ และ ชัยณรงค์ ชูจันทร์. 2534. คู่มือการผลิตกล้วยไม้เพื่อการส่งออก. กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- สมเพียร เกษมทรัพย์. 2532. เทคโนโลยีการผลิตและธุรกิจไม้ตัดดอก. โรงพิมพ์สำนักเลขาธิการคณะรัฐมนตรี, กรุงเทพฯ.
- สายชล เกตุษา, จิตราพรรณ พิถี, ดวงพร อมัตติรัตน์ และ รัชณี ชีระพจนารถ. 2528. รายงานการวิจัยการปรับปรุงคุณภาพและยืดอายุการใช้งานของดอกกล้วยไม้. รายงานการวิจัยภายใต้, สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ.
- สายชล เกตุษา. 2531. เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวของดอกไม้. สารมวลชน, กรุงเทพฯ.
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2539. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2550. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2551. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2551.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

อดิเรก รักคง. 2540. ความสัมพันธ์ระหว่างออกซิน 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) และเอทิลีน กับการเสื่อมสภาพของดอกกล้วยไม้หวายปอมปาดัวร์ที่ได้รับการผสมเกสร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อบจันทร์ ไทยทอง. 2543. กล้วยไม้เมืองไทย. สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.

Abeles, F.B., P.W. Morgan, M.E. Saltveit. 1992. **Ethylene in plant biology**, 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press, Inc., California.

Aida, R., K. Yoshida, T. Kondo, S. Kishimoto and M. Shibata. 2000. Modification of flower colour in torenia (*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation. **Plant Science** 153: 33-42.

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 Science** 138: 91-101.

Akamine, E.K. 1963. Ethylene production in fading *Vanda* orchid blossoms. **Science** 140: 1217-1218.

Apelbaum, A. and M. Katchansky. 1978. Effects of thiabendazole on ethylene production and sensitivity to ethylene of bud cut flower. **Horticultural Science** 13: 593-597.

Arditti, J. 1977. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture, *In* J. Arditti (ed.).

**Orchid Biology I**. Cornell University Press., New York.

- Belarmino, M.M, and M. Mii. 2000. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Phalaenopsis* orchid. **Plant Cell Report** 19: 435-442.
- Blokland, R., P. Lange, N.M. Joseph and J. M. Kooter. 1993. What do the antisense gene experiments in plant tell us about the mechanism(s) of suppression. **Antisense Research and Applications** 134-318.
- Bolitho, K.M., M. Lay-Lee, M.L. Knighton and G.S. Ross. 1997. Antisense apple ACC oxidase RNA reduces ethylene production in transgenic tomato fruit. **Plant Science** 122: 91-99.
- Bourque, J.E. 1995. Antisense strategies for genetic manipulations in plants. **Plant Science** 105: 125-149.
- Bower, J., P. Holford, A. Latche and J. C. Pech. 2002. Culture conditions and detachment of the fruit influence the effect of ethylene on the climacteric respiration of melon. **Postharvest Biology and Technology** 26: 135-146.
- Bradford, M. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254.
- Brakel, L. C. 1989. **Discoveries in antisense nucleic acid**. Portfolio Publishing Company, Texas.
- Chia, T.F., Y.S. Chan and N.H.Chan. 1994. The firefly luciferase as a noninvasive reporter for *Dendrobium* transformation. **The Plant Journal** 6: 441-449.
- Chai, M.L., C.J. Xu, K.K. Senthil, J.Y.Y. Kim and D.H. Kim. 2002. Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Scientia Horticulturae** 69: 213-224.

- Christie, P.J. 1997. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in Eubacteria. **Journal of Bacteriology** 179: 3085-3094.
- Citovsky, V., M.L. Wong and P. Zambryski. 1989. Cooperative interaction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single stranded DNA: Implications for the T-DNA transfer process. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 86: 1193-1197.
- Cooper, G. M. 2000. **The cell: A Molecular Approach**. 2<sup>nd</sup> ed. Sinauer Associates, Inc., U.S.A.
- Courtesy-Gutterson, N., C. Napoli, C. Lemieux, A. Morgan, E. Firoozabady and K.E.P. Robinson. 1994. Modification of flower color in florist's chrysanthemum: production of a white flowering variety through molecular genetic. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 12: 268-271.
- 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 Society of Plant Physiologists, Rockville.**
- Dai, S., P. Zheng, P. Marmey, S. Zhang, W. Tian, S. Chen, R. N. Beachy and C. Fauquet. 2001. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. **Molecular Breeding** 7: 25-33.
- Davina C., S. M. Lee, J. H. Ng, H. Yu. 2007. L-Methionine sulfoximine as a novel selection agent for genetic transformation of orchids. **Journal of Biotechnology** 131: 466-472.
- De la Riva, G.A., J.G. Cabrela, R.V. Pradon and C.A. Pardo. 1998. *Agrobacterium tumefaciens* : a natural tool for plant transformation. **Electronic Journal of Biotechnology** 1: 1-16

- Der-Pijl, L.V. and C.H. Dodson. 1996. **Orchid Flowers; their Pollination and Evolution.**  
The University of Miami Press, Florida.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12: 13-15.
- Durkin, D. J. 1979. Some characteristics of water flow through isolated rose stem segments.  
**Journal of the American Society for Horticultural Science** 104: 777-783.
- Elomaa, P., J. Honkanen, R. Puska, P. Seppanen, Y. Helariutta, M. Mehtro, M. Kotilainen,  
L. Nevalainen and T.H. Teeri. 1993. *Agrobacterium*-mediated transfer of a antisense  
*chalcone synthase* cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation.  
**Nature Biotechnology** 11: 508-511.
- Fahn, A. 1982. **Plant Anatomy.** 3<sup>rd</sup> ed. Pergamon Press, New York.
- Fan, S.G. 2008. *Agrobacterium* mediated transformation of oncidium resistant to virus infection.  
**Journal of Biotechnology** 136: 243.
- Flores, F.B., M.C., F.J. and F. Romojaro. 2001. Differential rind and pulp ripening of transgenic  
antisense *ACC oxidase* melon. **Plant Physiology and Biochemistry** 39: 37-43.
- Gardner, E.J., M.J. Simmous and D.P. Snustad. 1991. **Principles of Genetic** 8<sup>th</sup> edition.  
John Wiley and Son Inc., New York.
- Goh, C. J., A.H. Halevy, R. Engel and A.M. Kofranek. 1985. Ethylene evolution and sensitivity  
in cut orchid flowers. **Scientia Horticulturae** 26: 57-67.
- Griesbach, R.J. and J. Hammond. 1993. Incorporation of the *gus* gene into orchids through  
embryo electrophoresis. **Acta Horticulturae** 336: 165-169.

Griesbach, R.J. 1994. An improved method for transforming plants through electrophoresis.

**Plant Science** 102: 81-89.

Halevy, A.H. and S. Mayak. 1981. Senescence and postharvest physiology of cut flower part 2.

**Horticultural Review** 3: 59-143.

Halevy, A.H. 1986. Pollination induced corolla senescence. **Acta Horticulture** 181: 25-32.

Hamilton, A.J., G.W. Lycett and D. Grierson. 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. **Nature** 346: 284-287.

Hector G. N., L. Palenius, D J. Huber, H. J. Klee, D. J. Cantliffe. 2006. Fruit ripening characteristics in a transgenic 'Galia' male parental muskmelon (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Ser.) line. **Postharvest Biology and Technology**. 44: 95-100.

Hew, C.S. and J.W.H. Yong. 2004. The physiology of tropical orchids in relation to the industry. **World Scientific**.

Hsieh, R.M., W.H. Chen and Y.S. Lin. 1997. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Phalaenopsis* orchid. **Report Taiwan Sugar Research Institute** 155: 41-54.

Hunter, D.A., N. E. Lange and M. S. Reid. 2004. Physiology of flower senescence, pp. 307-318. *In* L. D. Nooden (ed.). **Plant cell Death Processes**. Academic Press, San Diego.

Iwasaki, 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. **Journal of Applied Horticulture** 6: 67-71.

Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric gene in plant : the *gus* gene fusion system.

**Plant Molecular Biology Reporter** 5: 378-405.

Jimenez-Bermudez, S., J. Redondo-Nevado, J. Munoz-Blanco, J. L. Caballero, J. M. Lopez-

Aranda, V. Valpuesta, F. Pliego-Alfaro, M. A. Quesada and J. A. Mercodo. 2002.

Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a *pectate lyase* gene. **Plant Physiology** 128: 751-759.

Jin, S., R.K. Prusti, T. Roitsch, R.G Ankenbauer and E.W. Nester. 1990. The *VirG* protein of

*Agrobacterium tumefaciens* is phosphorylated by the autophosphorylated *Vir A* protein and this is essential for its biological activity. **Journal of Bacteriology** 172: 4945-4950.

Jonsson, E.T., H.K. Yi, B.C. Shin, B.J. Oh, H.S. Cheong and G. Choi. 1999. *Cymbidium* hybrida

dihydroflavonol 4-reductase does not efficiently reduce dihydrokaempferol to produce orange pelargonidin- type anthocyanins. **The Plant Journal** 19: 81-85.

Kato, M. and H. Hyodo. 1999. Purification and characterization of ACC oxidase and increase in

its activity during ripening of pear fruit. **Journal of the Japanese Society for Horticulture Science** 68: 551-557.

Kende, H. 1993. Ethylene biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant**

**Molecular Biology** 44: 283-307

Ketsa, S. 1989. Vase-life characteristics of inflorescences of *Dendrobium* 'Pompador'.  
**Journal of Horticultural Science** 64: 611-615.

Ketsa, S. and F. Thampitakorn. 1995. Characteristic of ethylene production of *Dendrobium* orchid

flowers. **Acta Horticulture** 405: 253-263.

- 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. **The Plant Cell** 3: 1187-1193.
- Knapp, J.E., A.P. Kausch and J.M. Chandlee. 2000. Transformation of three genera of orchid using the *bar* gene as a selectable marker. **Plant Cell Report** 19: 983-998.
- Knudson, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. **Botanical Gazette** 73: 1-25.
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin** 15: 214-217.
- Kuehnle, A.R. and N. Sugii. 1992. Transformation of *Dendrobium* orchid using particle gun bombardment of protocorms. **Plant Cell Report** 11: 484-488.
- Lambert G., E. Fattal and Couvreur. 2000. Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides. **Advanced Drug Delivery Reviews** 47: 99-112.
- Liau, C.H., S.-J. You, V. Prasad, H.H. Hsiao, J.-C. Lu, N.-S. Yang and M.-T. Chan. 2003a. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of an *Oncidium* orchid. **Plant Cell Report** 21: 993-998.
- Liau C.H., Lu J. C, Prasad V, *et al.* 2003b. The sweet pepper ferredoxin-like protein (*pflp*) conferred resistance against soft rot disease in *Oncidium* orchid. **Transgenic Research** 12: 329-336.
- Li C.H., U.L. Lai, S. F. Yang, M. J. Chu, C.I. Kuo, M. F. Tsai and C.W. Sun. 2007. Delayed flower senescence of *Petunia hybrida* plants transformed with antisense broccoli *ACC synthase* and *ACC oxidase* genes. **Postharvest Biology and Technology** 46: 47-53.

- Lichtenstein, C. 1986. Bacterial-plant conjugation. Abizarre begetal bestiality. **Nature** 332: 682-683.
- Lin, C.T., M.T. Lin and J.F. Shaw. 1997. Cloning and characterization of a cDNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase form papaya fruit. **Journal of Agriculture and Food Chemistry** 45: 526-530.
- Lutz, J. M. and R. E. Hardenburg. 1968. The commercial storage of fruits, vegetables and florist and nursery stock. **USDA Agricultural Handbook**. No.69.
- Man, S., X. Ming, Y. Wang, R. Liu, C. Wei and Y. Li. 2003. Genetic transformation of two species of orchid by biolistic bombardment. **Plant Cell Report** 21: 592-598.
- Matthysse, A.G. 1986. Initial interaction of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells. **Critical Reviews in Microbiology** 13: 281-307.
- Mayak, S., Y. Vaadia and D.R. Dilley. 1977. Regulation of senescence in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by ethylene. **Plant Physiology** 59: 591-593.
- Men, S., X. Ming., R. Liu, C. Wei and Y. Li. 2003. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 75: 63-71.
- Mishiba K.I., Chin D.P, M. Mii. 2005. *Agrobacterium* mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorms at an early stage after germination. **Plant Cell Report** 24: 297-303.
- Monica, A. H. 1996. **Plant Molecular Genetic**. Addison Wesley Longman Limited, Edinburgh, England.

- Morel, G. 1960. Producing virus-free Cymbidium. **American Orchid Society Bulletin** 29: 495-497.
- Nair, H. and H.F. Tung. 1987. Ethylene production and 1- aminocyclopropane-1-carboxylic acid levels in detached orchid flowers of *Dendrobium* 'Pompadour'. **Scientia Horticulturae** 32: 145-151.
- Nester, E.W., M.P. Gordon, R.M. Amasino and M.F. Yanofsky. 1984. Crown gall: a molecular and physiological analysis. **Annual Review of Plant Physiology** 35: 387-413.
- Oliver, M.J., D.L Ferguson, J.J. Burke. and J. Velton. 1993. Inhibition of tobacco NADH-hydroxypyruvate reductase by expression of heterologous antisense RNA derived from a cucumber cDNA: implication for the mechanism of action of antisense RNAs. **Molecular and General Genetic** 239: 425-434.
- Parup, E.V. and J.M. Molner. 1972. Histochemical study of xylem blockage in cut roses. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 97: 532-534.
- Puchta, H. 1998. Repair of genomic double-strand breaks in somatic cells by one-side invasion of homologous sequences. **Plant Journal** 13: 331-339.
- Reid, M.S. 1985. Ethylene in postharvest technology, pp. 68-74. *In* A.A. Kader, R.F. Kasmire, F.G. Mitchell, M.S. Reid, N.F. Sommer and J.F. Thompson (eds.). **Postharvest Technology of Horticultural Crops**. University of California, Berkeley, USA.
- Reid, M. S. and M. J. Wu. 1992. Ethylene and flower senescence. **Plant Growth Regulation** 11: 37-43.
- Rittershausen, B., and W. Rittershausen. 2001. Orchids : The Complete Grower's Guide. **Garden Art Press**, Woodbridge.

- Rogers, M. N. 1973. An historical and critical review of post-harvest physiological research on cut flower. **Horticultural Science** 8: 189-194.
- Rotor, G. 1949. A method of vegetative propagation of *Phalaenopsis* species and hybrids. **American Orchid Society Bulletin** 18: 738-739.
- Sahavacharin, O. 1980. Mutation in the Tissue Culture of Orchids. **In Proceedint of 9<sup>th</sup> World Orchid Conference**, Thailand.
- 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. **Horticultural Science** 30: 970-972.
- Semiarti, E., A. Indrianto, A. Purwantoro, S. Isminingsih, N. Suseno, T. Ishikawa, Y. Yoshioka, Y. Machida and C. Machida. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of the wild orchid species *Phalaenopsis amabilis*. **Plant Biotechnology** 24: 265-272.
- Sexton, R. 2002. Abscission, pp. 205-227. *In* M. Pessaraki, ed. **Handbook of Plant and Crop Physiology**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Sheng, J. and V. Citovsky. 1996. *Agrobacterium* plant cell DNA transport: Have virulence protein, will tavel. **Plant cell** 1699-1710.
- Silva, J.A., da Costa T. S., Lucchetta L., Marini L. J., Marcio R. Zanuzo, N. Leonardo, Nora F.R., Twyman R. M. and Rombaldi C.V. 2004. Characterization of ripening behavior in transgenic melons expressing an antisense *1- aminocyclopropane -1-carboxylate (ACC) oxidase* gene from apple. **Postharvest Biology and Technology** 32: 263-268.

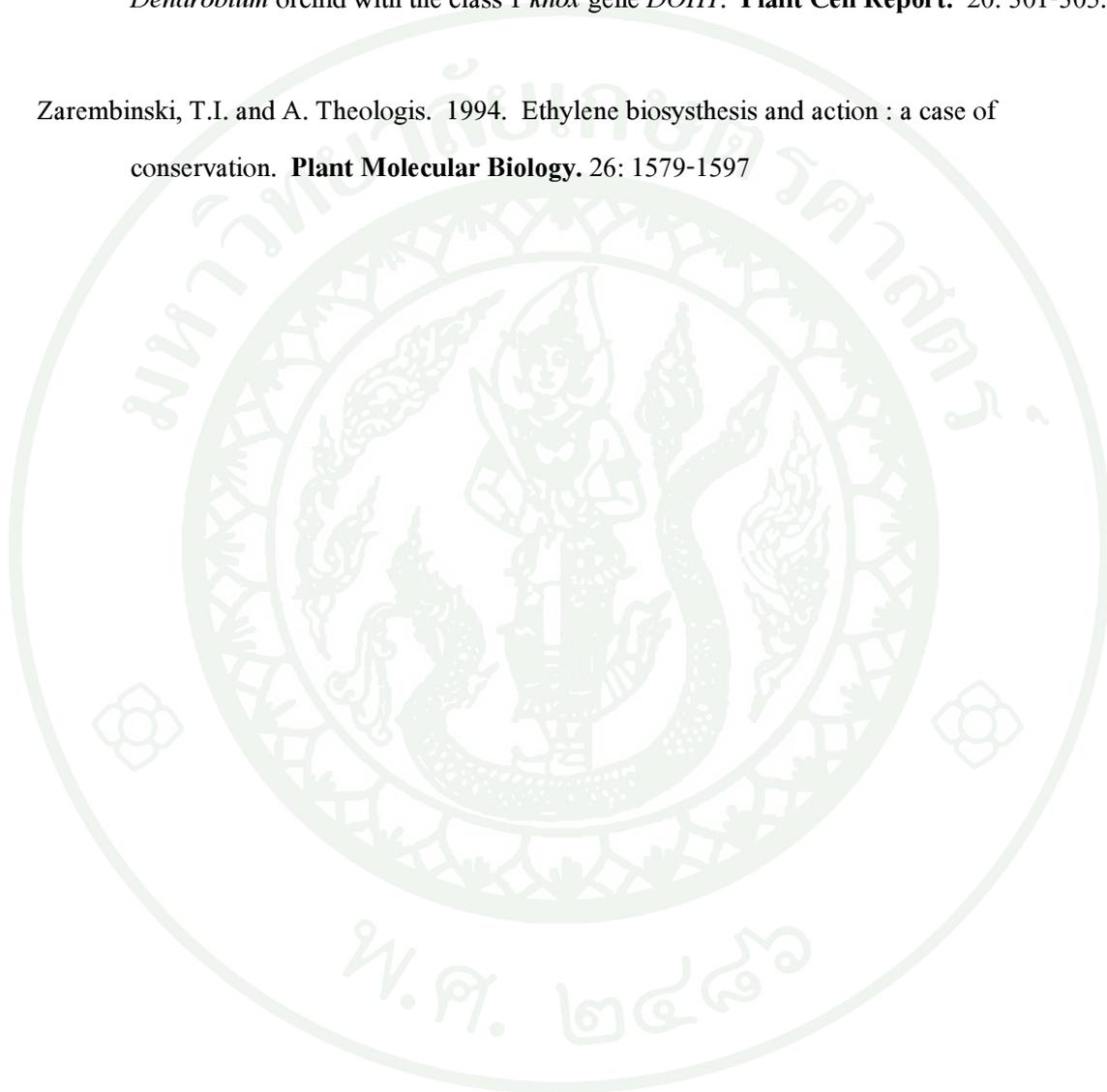
- Stachel, S.E., E. Messens, M.M. Van and P. Zambryski. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature** 318: 624-629.
- Sjahril R, Chin DP, Khan RS, *et al.* 2006. Transgenic *Phalaenopsis* plants with resistance to *Erwinia carotovora* produced by introducing wasabi defensin gene using *Agrobacterium* method. **Plant Biotechnology** 23: 191-194.
- Stead, A. D. and W. G. van Doorn. 1994. Strategies of flower senescence –a review, pp. 215-237. *In* R. J. Scott and A. D. Stead (eds.). **Molecular and Cellular Aspects of Plant Reproduction** Cambridge University Press. Cambridge.
- Tinland, B., F. Schoumacher, V. Gloeckler, A.M.A. Bravo and B. Hohn. 1995. The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise intergration of T-DNA into the plant genome. **The EMBO Journal** 14: 3585-3595.
- Vacin E. and F.W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette** 110: 605-613.
- Van Doorn, W. G. and A. D. Stead. 1994. The physiology of petal senescence which is not initiated by ethylene, pp. 239-254. *In* R. J. Scott and A. D. Stead (eds.). **Molecular and Cellular Aspects of Plant Reproduction**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Van Haaren M.J.J., J.T. Pronk, R.A. Schilperoort and P.J.J. Hooykaas (1987). Functional analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti-plasmid left and right T-Region border fragments. **Plant Molecular Biology** 8:95-104
- Verwoerd, T.C., B. M. Dekker and A. Hoekema. 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. **Nucleic Acids Research**. 17: 23-62.

- Virezen, W.H., R. Hulzink, C. Mariani and L.A.C.J. Voeselek. 1999. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase activity limits ethylene biosynthesis in *Rumex palustris* during submergence. **Plant Physiology** 121: 189-195.
- Wagner, V.T. and A.G. Matthysse. 1992. Involvement of vitronectin-like protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot suspension culture cells. **Journal of Bacteriology** 174: 5999-6003.
- Wang, K., S.E. Stachel, B. Timmerman, M.M. Van and P. Zambryski. 1987. Site-specific nick occurs within the 25 bp transfer promoting border sequence following induction of *vir* gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*. **Science** 235: 587-591.
- Woltering, E.J., M. van Hout, D. Somhorst and F. Harren. 1993. Roles of pollination and short-chain saturated fatty acid in flower senescence. **Plant Growth Regulator** 92: 837-845.
- Wong, W. S., G.G. Li, E. Ning, Z.F. Xu, W.W.L Hsiao, L.Y. Zhang and N. Li. 2001. Repression of chilling-induced ACC accumulation in transgenic citrus by over-production of antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase RNA. **Plant Science** 161: 969-977.
- Yang, S.F. and N.E. Hoffman. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**. 35: 155-189.
- Yang, J., H.-J. Lee, D.H. Shin, S.K. Oh and J.H. Seon. 1999. Genetic transformation of *Cymbidium* orchid by particle bombardment. **Plant Cell Report** 18: 978-984.
- Yu, Z., L. Nie, H. Lu, X. Ming, H. Zheng, L. Qu, and Z. Chen. 1999. Recovery of transgenic orchid plant with hygromycin selection by particle bombardment to protocorms. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 58: 87-92.

Yu, H. and C.J. Goh. 2000. Identification and characterization of three orchid MADS-box gene of AP1/AGL9 subfamily during floral transition. **Plant Physiology**. 123: 1325-1336.

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 Report**. 20: 301-305.

Zarebinski, T.I. and A. Theologis. 1994. Ethylene biosynthesis and action : a case of conservation. **Plant Molecular Biology**. 26: 1579-1597





ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร VW

ส่วนประกอบ	มิลลิกรัมต่อลิตร
<b>Macronutrients</b>	
KNO <sub>3</sub>	525
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	250
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	200
<b>Micronutrients</b>	
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	5.7
<b>Organic compounds</b>	
Coconut water	150 มิลลิกรัมต่อลิตร
<b>Other</b>	
sucrose	20 กรัมต่อลิตร
pH	4.8-5.0

ที่มา: Vacin and Went (1949)

ตารางผนวกที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสูตร LB (Luria Betani)

ส่วนประกอบ	กรัมต่อลิตร
Bacto <sup>®</sup> tryptone	10
Bacto <sup>®</sup> yeast extract	5
NaCl	10
Bacto <sup>®</sup> agar	15
pH	7

ที่มา: Maniatis *et al.* (1982)

ตารางผนวกที่ 3 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอจากกล้วยไม้โดยดัดแปลงจาก  
วิธี TLEs

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย
tris-HCl, pH8.0	0.1M
LiCl	0.1M
EDTA,pH 8.0	10mM
SDS	1%
PVP	2%

ที่มา: Verword *et al.* (1989)

ตารางผนวกที่ 4 การเตรียมบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 10X สำหรับเทคนิค agarose gel  
electrophoresis

ส่วนประกอบ	กรัมต่อลิตร
tris-base	54
Glacial acetic acid	27.5
0.5M EDTA:pH 8.0	20 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำดีไอออนไนซ์ที่นิ่งมาเชื้อแล้ว จนปริมาตรครบ 1 ลิตร

ตารางผนวกที่ 5 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการทำ dot blot hybridization และ Southern blot hybridization

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย
<b>Hybridization buffer</b>	
SSC	5X
N-lauroylsarcosine	0.1%
SDS	0.02%
blocking solution	1X
(1:10 dilution of stock 10X blocking solution)	
<b>High stringency buffer</b>	
SSC	2X
SDS	0.1%
<b>Low stringency buffer</b>	
SSC	0.1X
SDS	0.1%
<b>Washing buffer</b>	
Maleic acid buffer	1X
Tween 20	0.3%
<b>Maleic acid buffer</b>	
maleic acid	0.1M
NaCl	0.15M
ปรับ pH เป็น 7.5 ด้วย NaOH	
<b>Blocking Solution</b>	
dilute 10X blocking solution 1: 10 with Maleic acid buffer	
<b>Detection buffer</b>	
tris-HCl	0.1M
NaCl	0.1M
ปรับ pH เป็น 9.5 ด้วย NaOH	

ตารางผนวกที่ 6 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสกัดเอนไซม์ ACO จากกล้วยไม้โดยวิธีของ

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย
tris-HCl : pH7.2	300 mM
sodium ascorbate	30 mM
glycerol	10%

ที่มา: Vriezen *et al.* (1999)

ตารางผนวกที่ 7 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACO  
(ACO incubation buffer) จากกล้วยไม้โดยวิธีของ

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย
tris-HCl : pH7.2	100 mM
sodium ascorbate	30 mM
glycerol	10%

ที่มา: Vriezen *et al.* (1999)

ตารางผนวกที่ 8 การสร้างเอทิลีนในดอกกล้วยไม้พันธุ์ บอม 17 และเอียสกุลที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CP ACO และไม่ได้รับการถ่ายยีน

การสร้างเอทิลีนในดอกกล้วยไม้ (พิโคลิตรเอทิลีนต่อกรัมน้ำหนักดอกต่อชั่วโมง)															
พันธุ์	สายต้น	อายุการปักแจกัน (วัน)													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
บอม 17	control	1.62	1.62	1.89	1.48	1.16	1.75	2.22	8.36	2.25	2.28	0	0	0	0
	AB1	2.81	1.31	2.04	1.51	1.04	4.25	2.85	0.81	1.07	1.09	0.54	0.51	0	0
	AB2	5.39	1.52	2.17	2.37	2.71	2.55	1.78	0.38	1.51	0.80	0.45	0.67	0	0
	AB3	0.83	1.32	0.51	1.65	2.90	1.61	1.58	2.13	0.74	0.38	0.49	1.56	0	0
	AB4	1.04	1.40	2.45	1.24	1.99	5.33	1.08	0.57	3.24	1.75	1.24	0.65	1.7	1.26
เอียสกุล	control	0.41	0.69	1.12	1.50	1.33	1.06	2.15	26.53	2.39	1.75	0	0	0	0
	AE1	1.85	2.53	1.70	2.38	2.68	0.85	6.55	2.04	3.73	1.72	1.25	1.36	0	0
	AE2	1.94	3.09	1.68	2.76	2.17	1.52	1.49	8.49	0.66	1.98	0.85	0	0	0
	AE3	2.64	2.31	1.76	1.67	0.49	1.63	2.73	3.74	4.13	3.60	2.15	3.30	2.80	0
	AE4	1.04	1.40	2.45	1.24	1.99	5.33	1.08	0.57	3.24	1.75	1.24	0.65	0	0

ตารางผลผนวกที่ 9 เปอร์เซ็นต์การบานเพิ่มของดอกตูม ของช่อดอกกล้วยไม้พันธุ์ บอม 17 และเอียสกุล ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CP ACO และไม่ได้รับการถ่ายยีน

		เปอร์เซ็นต์การบานเพิ่มของดอกตูม																					
พันธุ์	สายต้น	อายุการปักแจกัน(วัน)																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
บอม 17	Control	0	0	0	5	10	15	25	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AB1	0	0	0	10	17	22	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AB2	0	0	5	5	10	16	22	32	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AB3	0	0	5	5	15	36	45	50	55	55	75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AB4	0	0	0	5	15	35	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
เอียสกุล	Control	0	0	0	0	10	15	15	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AE1	0	0	0	7	13	22	25	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AE2	0	0	0	5	10	16	22	32	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AE3	0	0	0	10	25	36	45	50	57	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AE4	0	0	0	4	10	25	25	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางผนวกที่ 10 เปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกตูมของช่อดอกกล้วยไม้พันธุ์ บอม17และเอียสกุล ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CP ACO และไม่ได้รับการถ่ายยีน

พันธุ์	สายต้น	เปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกตูม																					
		อายุการปักแจกัน(วัน)																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
บอม 17	Control	0	0	3	25	30	50	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	AB1	0	0	2	5	15	25	45	55	75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	AB2	0	0	0	0	5	10	25	45	55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	AB3	0	0	5	0	0	5	5	10	15	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	AB4	0	0	5	12	24	37	55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
เอียสกุล	Control	0	0	3	25	30	35	47	78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	AE1	0	0	0	2	2	5	20	35	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	AE2	0	0	5	10	25	45	45	55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	AE3	0	0	0	0	0	5	5	5	5	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	AE4	0	0	0	5	12	24	37	45	65	๒๕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

ตารางผนวกที่ 11 เปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกบานของช่อดอกกล้วยไม้พันธุ์ บอม 17 และเอียสกุลที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CPACO และไม่ได้รับการถ่ายยีน

		เปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของดอกบาน																					
พันธุ์	สายต้น	อายุการปักแจกัน(วัน)																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
บอม 17	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	20	31	47	54	65	74	100	-	-	-	-
	AB1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	22	45	58	65	75	100	-	-	-
	AB2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	21	30	42	57	62	87	100	-	-
	AB3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	10	17	36	52	64	78	84	100
	AB4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	15	25	31	43	55	78	85	100	-	-
เอียสกุล	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	31	47	62	75	100	-	-	-	-	-	-
	AE1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	12	22	38	51	65	85	100	-	-	-
	AE2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	21	34	55	62	77	82	100	-
	AE3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	10	10	10	45	56	72	84	100	-
	AE4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	15	25	31	43	55	72	86	100	-	-

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ	ปิยนุช ศรีชัย
เกิดวันที่	28 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2527
สถานที่เกิด	จังหวัดฉะเชิงเทรา
ประวัติการศึกษา	จบการศึกษาระดับปริญญาตรี ปีการศึกษา 2548 สาขาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	รางวัลดีเด่น การนำเสนอผลงานวิชาการภาคบรรยาย การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 8 ระหว่างวันที่ 6-9 พฤษภาคม พ.ศ. 2552 เรื่อง การผลิต เอทิลีนของต้นกล้วย ไม้ที่ได้รับการถ่ายยีน CPACO จากมะละกอ แบบ Antisense
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนบัณฑิตผู้ช่วยวิจัย ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานักจิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ