การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการถ่ายยีนไดไฮโดรฟลาโวนอล 4-รีดักเทสในบอนสี

นางสาว ศิริพร คุ้มแว่น

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC RELATIONSHIP AND *Dihydroflavonol 4-reductase* GENE TRANSFER IN CALADIUM

Miss Siriporn Khumwan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

492007

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการถ่ายยีนไดไฮโดรฟลาโวนอล 4-รีดักเทสในบอนสี
โดย	นางสาวศิริพร คุ้มแว่น
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ โก้สกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญ-หลง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ โก้สกุล)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อรดี สหวัชรินทร์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กระบวน วัฒนปรีชานนท์)

ศิริพร คุ้มแว่น : การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการถ่ายยีนไดไฮโดรฟลาโวนอล 4-รีดักเทสในบอนสี (GENETIC RELATIONSHIP AND DIHYDROFLAVONOL 4-REDUCTASE GENE TRANSFER IN CALADIUM) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.เตือนใจ โก้สกุล 94 หน้า.

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและความหลากหลายของบอนสี 28 สายพันธุ์ และพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อรองรับการถ่ายยีนไดไฮโดรฟลาโวนอล 4-รีดักเทส (*Dihydroflavonol 4-reductase*) ในบอนสี พบว่าสามารถใช้ลักษณะของตำแหน่งของก้านใบในการแบ่งกลุ่มบอนสีได้ 2 กลุ่ม และแบ่งกลุ่มย่อยตามลักษณะของก้านใบ ได้ 5 กลุ่มย่อย เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของตัวอย่างบอนสี 15 สายพันธุ์ ในระดับดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP) ด้วยใช้คู่ไพรเมอร์ 6 ไพรเมอร์ จำนวน 9 คู่ พบว่าคู่ไพรเมอร์ M-CAA/E-AAC สามารถจำแนกกลุ่มบอนสีในกลุ่มบอนใบไทยได้ ผลการวิเคราะห์จากเดนโดรแกรม (dendrogram) จำแนกกลุ่มบอนสีประเภทใบไทยออกจากกลุ่มสายพันธุ์อื่น ขณะที่การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในบริเวณโคเปียไลค์รีโทรทรานสโพซอน (copia like retrotransposon) ของบอนสี 7 สายพันธุ์ พบว่ามีความแตกต่างในแต่ละสายพันธุ์สูงมาก ซึ่งความรู้ดังกล่าวสามารถนำไปเป็นพื้นฐานในการอนุรักษ์ และปรับปรุงพันธุ์ได้ สำหรับการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 mg/L และ NAA 1 mg/L เหมาะสมที่สุดในการชักนำเนื้อเยื่อใบอ่อนบอนสี ให้พัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ภายใน 8 สัปดาห์และแคลลัสที่ได้สามารถชักนำต่อให้เป็นต้นได้ดีที่สุด ในอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 mg/L ในการทดลองสามารถนำระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้เป็นพื้นฐานในการถ่ายยีนโดยการศึกษาการถ่ายยีนไดไฮโดร ฟลาโวนอล 4-รีดักเทสในแคลลัสของบอนสี โดยวิธีเลี้ยงร่วมกับอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 พบว่าสามารถชักนำให้แคลลัสต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน และเมื่อเพาะเลี้ยงให้เจริญเป็นต้น พบว่าสามารถการตรวจสอบการปรากฏตัวของยีนและการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) และเทคนิค RT-PCR (Reverse-transcription polymerase chain reaction) ตามลำดับได้ ผลการทดลองเป็นพื้นฐานในการจำแนกพันธุ์และถ่ายยีนเข้าสู่บอนสีเพื่อปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....ศิริพร คุ้มแว่น.....

สาขาวิชา .... พันธุศาสตร์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4672428523 : MAJOR GENETICS

KEY WORD : AFLP / CALADIUM / GENE TRANSFER / GENETIC RELATIONSHIP / TISSUE CULTURE

SIRIPORN KHUMWAN : GENETIC RELATIONSHIP AND DIHYDROFLAVONOL 4-REDUCTASE GENE TRANSFER IN CALADIUM. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PIYASAK CHAUMPLUK, Ph.D. THESIS COADVISOR : ASST. PROF. TEUNCHAI KOSAKUL., 94 pp.

In this study, variation and genetic relationships among 28 cultivars of caladium were carried out. The development of tissue culture system and the dihydroflavonol 4-reductase (Dfr) gene transferring in this plant were also investigated. Results showed that, based on petiole position to leaf, caladium cultivars could be classified into two major groups. Further identification through petiole's shape divided those to 5 subgroups. When 15 representative cultivars from the above subgroups were analyzed via AFLP technique, it was found that, among 6 specific primers randomly combined to 9 combinations, M-CAA/E-AAC primers could separate the Thai style leaf caladiums out of the rest. Detail analysis on nucleotide sequence at copia-like transposon domain revealed high variation in sequences among 7 cultivars, tested, enable to identify caladium cultivars efficiently. These results served as basis for genetic conservation, cultivar authentication and breeding of caladium. Further development of the tissue culture system revealed a suitable media of MS supplemented with 1 mg/L BA and 1 mg/L NAA could induced leaf tissue to regenerate to calli within 8 weeks. Those calli could be induced again to shoot formation when they were cultured on MS supplemented with 1 mg/L BA. The resulting system could be used as a platform for gene transferring study. The transferring of dihydroflavonol 4-reductase gene using calli and LBA4404 Agrobacterium co-cultivation was carried out. Results showed some calli could be induced to kanamycin resistances. And when these calli were regenerated to shoots, molecular analysis confirmed for the existence of Dfr gene in genomic DNA from samples via PCR technique and confirmed for gene expression at RNA level by RT-PCR technique, respectively. All these results constitute basis for cultivar identification and genetic transformation in caladium for future cultivar improvement.

Department : .....Botany..... Student's signature .....

Field of study : .....Genetics..... Advisor's signature .....

Academic year .....2006..... Co-advisor's .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ด้วยความกรุณาช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่ง จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ โก้สกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งท่านทั้งสองได้กรุณาให้คำแนะนำข้อคิดเห็นต่างๆและเอาใจใส่ด้วยดีมาตลอด จึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ และกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญ-หลง ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. อรดี สหวัชรินทร์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กระบวน วัฒนปรีชานนท์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษาแนะนำข้อคิดเห็นต่างๆ และตรวจแก้ไขในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนการศึกษาและทุนสนับสนุนการวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ทางด้านเครื่องมือ อุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อรดี สหวัชรินทร์ ที่ให้โอกาสในการฝึกงาน ณ ศูนย์ฝึกอบรมการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ไร่เอื้องผึ้ง อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ และขอขอบคุณ พ.ต.อ.(พิเศษ) พยนต์ ชื่นบาน นายกสมาคมส่งเสริมและอนุรักษ์บอนสีแห่งประเทศไทย ที่ได้ให้โอกาสในการฝึกงานและความอนุเคราะห์ตัวอย่างต้นบอนสีในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อมรา คัมภิรานนท์ รองศาสตราจารย์ เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา น.ส.มัลลิกา แก้วดี น.ส.ปาลิตา แปวไธสง นายปรเมษฐ์ กลั่นฤทธิ์ นายรัชนิกร เมฆขยาย ที่ได้ให้กำลังใจผู้วิจัยมาตลอด ขอขอบคุณ น.ส.นิติญา ทองบุญรอด ที่ให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือทางด้านเทคนิค ขอขอบคุณ น.ส.ภัทรศรี วอนขอพร น.ส.สุดารัตน์ อรรถโสภณศักดิ์ น.ส.อภิลดา โอเจริญ และนายศรุต ไทยรัตน์ สำหรับภาพวาดประกอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งน.ส.นันทวัน หัตถมาศ น.ส.พัชนี เอื้อรักสกุล นายวรุณ สุวรรณกิตติ นายศจิษฐา ประเสริฐกุล นายสุขุม งามพร้อมพงศ์ ที่ให้ความช่วยเหลือจนสามารถทำวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ นายสมนึก และนางบัวเขียว คุ้มแว่น คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้ชีวิตและให้ความช่วยเหลือสนับสนุนในด้านการเงินและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดียิ่ง ทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี คุณความดีและประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นด้วย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญรูป.....ฌ
บทที่ 1 บทนำ.....1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1
2. วัตถุประสงค์การวิจัย.....6
3. ขอบเขตการวิจัย.....6
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....7
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....22
1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี.....22
2. วิธีดำเนินการวิจัย.....25
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....29
1. การศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยา.....29
2. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบอนสีบนพื้นฐานดีเอ็นเอ.....39
3. การศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตของบอนสีด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ....56
4. การศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่บอนสีด้วยวิธีชักนำด้วยอะโกรแบคทีเรีย.....63
5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *dfr* ในบอนสีที่ได้รับการถ่ายยีน.....67
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....69
รายการอ้างอิง.....73
ภาคผนวก.....80
ภาคผนวก ก.....81
ภาคผนวก ข.....84
ภาคผนวก ค.....86
ภาคผนวก ง.....90
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....94

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของบอนสี 28 สายพันธุ์ที่ได้สำรวจเบื้องต้น	35
2	แสดงภาพตัวอย่างและลักษณะทั่วไปบอนสีที่นำมาทดลองสกัดดีเอ็นเอ	39
3	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากบอนสี 15 สายพันธุ์ และความสัมพันธ์ในเชิงสัดส่วนของค่าดูดกลืนแสงและปริมาณดีเอ็นเอ	44
4	แสดงคู่ไพรเมอร์ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี AFLP	45
5	แสดงการให้คะแนนจำนวนแถบดีเอ็นเอ 15 ตัวอย่างจากไพรเมอร์ M-CAA/E-AAC	48
6	แสดงความสัมพันธ์ของบอนสีจากโปรแกรม phylip	52
7	ค่า Alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างบอนสี 7 พันธุ์	53
8	แสดงอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อการเจริญของบอนสีด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใน 8 สัปดาห์	59

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	แสดงส่วนต่างๆ ของบอนสี	11
2	แสดงดอกของบอนสี	12
3	แสดงบอนสีที่มีลักษณะเป็นบอนป้าย	12
4	แสดงรูปร่างใบ (leaf shape) ของบอนสี	13
5	บอนใบไทย	29
6	บอนใบกลม	30
7	บอนใบกาบ	30
8	บอนใบไผ่	31
9	บอนใบยาว-รูปคล้ายหอก	32
10	บอนใบยาว-รูปหัวใจ (ชิด)	33
11	บอนใบยาว-รูปหัวใจ (ห่าง)	34
12	แถบจีโนมดีเอ็นเอบอนสี 15 สายพันธุ์ ตรวจสอบด้วย 1 % agarose gel eletrophoresis	43
13	แถบดีเอ็นเอบอนสีพันธุ์จังหวัดกระบี่ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 9 คู่ ตรวจสอบด้วย polyacrylamide gel eletrophoresis	46
14	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ M-CAA/E-AAC ตรวจสอบด้วย polyacrylamide gel eletrophoresis	47
15	ความแตกต่างของพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างบอนสีเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA และใช้โปรแกรม NTSYS-pc ver 2.0	49
16	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย ไพรเมอร์ copia-like retro transposon ตรวจสอบด้วย 2% agarose gel eletrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง	50
17	แผนภาพเดนโดรแกรม (dendrograme) แสดงความแตกต่างของพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างบอนสีบริเวณ copia like retro transposon ด้วยโปรแกรมphylip	55
18	ชิ้นส่วนของใบบอนสีพันธุ์อิเหนาบนอาหาร MS ก่อนนำไปทดสอบอาหารสูตรต่างๆ	56
19	การพัฒนาของใบอ่อนเป็นแคลลัสในสูตรอาหารต่างๆ ที่ระยะการปลูก 8 สัปดาห์	57
20	แคลลัสบอนสีพันธุ์อิเหนาบนอาหาร MS ก่อนนำไปทดสอบอาหารสูตรต่างๆ	57
21	การพัฒนาของแคลลัสไปเป็นต้นอ่อนในสูตรอาหารต่างๆ ที่ระยะการปลูก 8 สัปดาห์	58
22	กราฟค่าเฉลี่ยจำนวนยอด (shoot) ของบอนสีในสูตรอาหารต่างๆ	60

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
23	กราฟค่าเฉลี่ยจำนวนราก (root) ของบอนสีในสูตรอาหารต่างๆ	61
14	กราฟแสดงการรอดชีวิตของแคลลัสบอนสีพันธุ์อิเหนาที่เลี้ยงบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน	60
15	แคลลัสบอนสีที่ใช้ในการศึกษาการถ่ายยีน	61
16	เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pDFR81	62
17	โคโลนีเดี่ยวของ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pDFR81	62
18	แคลลัสบอนสีที่ต้านทานยาปฏิชีวนะพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้	63
19	แถบดีเอ็นเอบอนสีภายหลังเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ *dfr*	64
20	แถบดีเอ็นเอบอนสีภายหลังเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ *dfr*	65