การถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสรูปแบบลิเนียร์ดีเอ็นเอเข้าสู่กล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea*

นางสาวอินทิรา จารุเพ็ง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TRANSFORMATION OF BIALAPHOS RESISTANT GENE IN LINEAR DNA FORM INTO *Rhynchostylis gigantea*

Miss Intira Jarupeng

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 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสรูปแบบลิเนียร์ดีเอ็นเอเข้าสู่กล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea*
โดย	นางสาวอินทิรา จารุเพ็ง
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…… ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง)

……..อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์)

……อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์)

……กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

……กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พีระศักดิ์ ฉายประสาท)

อินทิรา จารุเพ็ง : การถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสรูปแบบลิเนียร์ดีเอ็นเอเข้าสู่กล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea.* (TRANSFORMATION OF BIALAPHOS RESISTANT GENE IN LINEAR DNA FORM INTO *Rhynchostylis gigantea*) อ.ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม ดร. ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์, 71 หน้า.

พัฒนาวิธีการถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสรูปแบบลิเนียร์ดีเอ็นเอเข้าสู่กล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* เริ่มจากหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณแคลลัสจากโปรโตคอร์มที่ได้จากการเพาะเมล็ด การทดสอบหาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีน ได้แก่ ระดับปริมาณดีเอ็นเอในรูปแบบลิเนียร์ดีเอ็นเอ ระดับความเข้มข้นของสารละลาย PEG ระยะเวลาในการส่งผ่านสนามไฟฟ้าที่ระดับแรงเคลื่อนไฟฟ้า 50 โวลท์ และอิทธิพลของการให้ชุดการทดลองที่มีและไม่มีจีโนมดีเอ็นเอของกล้วยไม้ และการทำหรือไม่ทำปฏิกิริยาตัดจีโนมดีเอ็นเอของแคลลัสของกล้วยไม้ด้วยเอ็นไซม์จำเพาะ พบว่าอาหารสูตร VW ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตซักนำให้เกิดแคลลัสจากโปรโตคอร์มที่เหมาะเป็นวัสดุวิจัยมากที่สุด และพบว่าภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสเพื่อกระตุ้นให้เกิดกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส ได้แก่ การใช้ดีเอ็นเอเข้มข้น 10 µg/ml ในสารละลาย PEG 1% ระยะเวลาในการส่งผ่านสนามไฟฟ้าที่ระดับแรงเคลื่อนไฟฟ้า 50 โวลท์ 20 วินาที การเพิ่มจีโนมดีเอ็นเอของแคลลัสกล้วยไม้มีผลให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงขึ้น ขณะที่การให้ชุดการทดลองตัดจีโนมดีเอ็นเอของแคลลัสกล้วยไม้ด้วยเอ็นไซม์จำเพาะไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีน

ภาควิชา……พฤกษศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต…….
สาขาวิชา .... พันธุศาสตร์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....……
ปีการศึกษา…2550…… ลายมือชื่ออาจารย์ทีปรึกษาร่วม.....

4672553223 : MAJOR GENETICS

KEY WORDS: BIALAPHOS RESISTANT GENE / LINEAR DNA FORM / *Rhynchostylis gigantea*

INTIRA JARUPENG : TRANSFORMATION OF BIALAPHOS RESISTANT GENE IN LINEAR DNA FORM INTO *Rhynchostylis gigantea*. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. PIYASAK CHAUMPLUK, PH.D., THESIS CO-ADVISOR: PIYARAT PARINYAPONG, PH.D., 71 PP.

Transformation of bialaphos resistant gene in linear DNA form into orchid *Rhynchostylis gigantea* was developed. Optimal condition for callus cultured from protocorm was initiated. DNA concentration, linear DNA, PEG concentration, electropulse period, the presence or absence of genomic DNA and the restriction enzyme activity were studied to investigate their effects on transformation efficiency. The result indicated that VW medium without hormone was the most appropriate condition, induced callus from protocorm the most. The suitable transformation condition inducing bialaphos resistance was 10 μg/ml DNA, 1% PEG, 20 seconds of 50 volt electropulse. Adding genomic DNA from callus enhanced the potential of transformation whereas adding restriction-digested genomic DNA from callus had no effect on transformation efficiency.

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

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

Academic year …….2007….. Co-advisor's signature……..

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์แบบด้วยการดูแลเอาใจใส่อย่างใกล้ชิดตลอดเวลา พร้อมที่จะให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เห็นว่าเป็นประโยชน์และสละเวลาให้การปรึกษาได้ทุกเมื่อเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์ รองหัวหน้าสำนักงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ช่วยดูแลเอาใจใส่ รวมทั้งให้คำปรึกษาในทุกๆ เรื่องอันเป็นประโยชน์ยิ่งสำหรับการนำไปใช้ในชีวิตประจำวันทั้งในด้านการทำงานและการเรียนได้อย่างดีเยี่ยม

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญหลง ประธานคณะกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พีระศักดิ์ ฉายประสาท กรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพรชัย จุฑามาศ หัวหน้าสำนักงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ที่กรุณาให้โอกาสในการทำงานวิจัยครั้งนี้รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์ในทุกๆ ด้าน ทั้งสถานที่ พืชทดลอง และเครื่องมืออุปกรณ์ต่างๆ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ทุกๆ ท่านในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจอย่างดียิ่ง

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้และวิทยาการใหม่ๆ ระหว่างการเข้ามาศึกษาหาความรู้ ณ สถาบันการศึกษาแห่งนี้

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาพฤกษศาสตร์ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งสมาชิกห้องปฏิบัติการแพลนท์ทรานสเจนิกเทคโนโลยีและไบโอเซนเซอร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจมาโดยตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ เป็นอย่างสูงที่ให้การสนับสนุนในทุกๆ เรื่อง ทั้งคอยให้ความช่วยเหลือ และคอยให้กำลังใจเสมอมา ความสำเร็จในครั้งนี้จึงบังเกิดขึ้นได้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่

1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 5

1.3 ขอบเขตของการวิจัย..... 5

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 5

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 6

3 วิธีดำเนินงานวิจัย..... 15

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย..... 15

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย..... 18

3.2.1 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ในสภาพปลอดเชื้อ..... 18

3.2.2 ผลของยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส(Bialaphos ; Basta TX®) ต่อโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* และขนาดความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้เป็นดัชนีชี้วัดความสามารถในการต้านทาน..... 19

3.2.3 โครงสร้างของยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส..... 20

3.2.4 การถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสเข้าสู่กล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea*..... 21

3.2.5 การตรวจสอบและประเมินสภาวะการถ่ายยีนโดยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล. 22

บทที่ **หน้า**

4 ผลการทดลอง..... 23
4.1 ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ในสภาพปลอดเชื้อ..... 23
4.2 ชักนำให้เกิดการเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* 23
4.3 โครงสร้างของยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส..... 28
4.4 ผลของยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส (Bialaphos ; Basta TX®) ต่อโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* และขนาดความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้เป็นดัชนีวัดความสามารถในการต้านทาน..... 29
4.5 การถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสเข้าสู่กล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea*..... 33
4.6 การตรวจสอบและประเมินผลสภาวะการถ่ายยีนโดยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล..... 40
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 46
รายการอ้างอิง..... 51
ภาคผนวก..... 57
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 71

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโปรโตคอร์มเฉลี่ย ค่าเฉลี่ยระดับคะแนนความสามารถในการเจริญ น้ำหนักสดเฉลี่ยของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่เลี้ยงในอาหาร บนที่เติมสารอาหารควบคุมการเจริญเติบโต.....	27
2	ค่า anodic current peak ของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea*.....	44
3	จำนวนชุดของดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea*.....…	45

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW + 2,4-D 0 ppm, VW+2,4-D 0.1 ppm และ VW+2,4-D 0.5 ppm ตามลำดับ นาน 2 เดือน.....	24
2	แสดงลักษณะสีของระดับคะแนนความสามารถในการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea*	25
3	แสดงค่าเฉลี่ยระดับคะแนนความสามารถในการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW + 2,4-D 0 ppm, VW+2,4-D 0.1 ppm และVW+2,4-D 0.5 ppm ตามลำดับ นาน 2 เดือน.....	25
4	แสดงน้ำหนักสดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW + 2,4-D 0 ppm, VW+2,4-D 0.1 ppm และ VW+2,4-D 0.5 ppm ตามลำดับ นาน 2 เดือน.....	26
5	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการใช้คู่ไพรเมอร์ของยีน bar (T-border primer).....	28
6	ผลของความเข้มข้นของยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสต่อความสามารถในการอยู่รอดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea*.....	30
7	ผลของยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส (Bialaphos ; Basta TX®) ต่ออัตราการอยู่รอดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทดสอบความเหมาะสมในการใช้เป็นดัชนีวัดความสามารถในการต้านทาน.....	31
8	อัตราการตายของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ทดสอบจากความสามารถในการต้านทานต่อสารละลายยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสและหาค่าอัตราการตายที่ 50%.....	32
9	ศึกษาระดับปริมาณของ PEG 6000 และระยะเวลาที่เหมาะสมในการผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 50 โวลท์ โดยใช้ยีน *bar* เป็นต้นแบบ และคัดเลือกโดยใช้ยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส.....	34
10	เนื้อเยื่อแคลลัสของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส.....	35

ภาพที่ **หน้า**

11 ศึกษาระดับปริมาณของดีเอ็นเอที่เหมาะสมโดยคัดเลือกบนยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส…….. 36

12 เนื้อเยื่อแคลลัสของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ได้รับการถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสในภาวะที่มีหรือไม่มีเอ็นไซม์จำเพาะ……... 37

13 การศึกษาการถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสในภาวะที่มีหรือไม่มีเอ็นไซม์จำเพาะ..... 38

14 เนื้อเยื่อแคลลัสของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ได้รับการถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสในภาวะที่มีหรือไม่มีจีโนมดีเอ็นเอ..... 39

15 ศึกษาการถ่ายยีนในภาวะที่มีหรือไม่มีจีโนมดีเอ็นเอ..... 40

16 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการใช้ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นแบบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอชุดควบคุม..... 41

17 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี RT-PCR..... 42

18 ลักษณะของการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าในรูป anodic current peak …….. 43

19 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอและค่า anodic current peak ของยีน *bar*…….. 44

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Rhynchostylis sp. หรือกล้วยไม้สกุลช้าง มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย พม่า มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ สำหรับในประเทศไทยพบกล้วยไม้สกุลช้างกระจายพันธุ์ อยู่ทุกภาคของประเทศ บางภาคอาจมีกล้วยไม้สกุลช้างชนิดหนึ่งแต่อาจไม่มีอีกชนิดหนึ่ง โดยพบกล้วยไม้สกุลช้างตามธรรมชาติ 4 ชนิด ได้แก่ กล้วยไม้ช้าง (*Rhynchostylis gigantea*) กล้วยไม้ไอยเรศหรือพวงมาลัย (*Rhynchostylis retusa*) กล้วยไม้เขาแกะ (*Rhynchostylis coelestis*) และกล้วยไม้ช้างฟิลิปปินส์ (*Rhynchostylis violacea*) สำหรับ 3 ชนิดแรก มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยและประเทศใกล้เคียง ส่วนช้างฟิลิปปินส์มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศฟิลิปปินส์

สำหรับในกล้วยไม้สกุลช้างด้วยกัน พบว่า กล้วยไม้ช้างมีรูปร่างใหญ่โตกว่ากล้วยไม้ชนิดอื่นๆ สามารถแบ่งกล้วยไม้ช้างในประเทศไทยออกเป็น 3 ประเภท ตามลักษณะสีของดอก คือ ช้างกระ ช้างแดง และช้างเผือก ทั้งสามประเภทเป็นพันธุ์แท้พันธุ์เดียวกัน มีลักษณะลำต้น ใบ ราก ช่อดอก และดอกคล้ายคลึงกัน แต่ต่างกันตรงที่สีของดอกคือช้างกระมีดอกสีขาวประด้วยจุดสีม่วงแดง ช้างแดงดอกมีสีม่วงแดงทั้งดอกหรือเกือบทั้งดอก และช้างเผือกมีดอกสีขาวล้วน สำหรับช้างกระขาวปากแดงนั้น ถือได้ว่าเป็นพันธุ์ลูกผสม สีของดอกจะเป็นสีขาวมีลายจุดสีม่วงแดง บริเวณปากจะเป็นสีแดง (มลิวัลย์ พรหมรักษา, 2539)

เนื่องจากกล้วยไม้เป็นไม้ดอกประดับที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย มีมูลค่าทางเศรษฐกิจกว่า 20,000 ล้านบาท ซึ่งจัดเป็นพืชสำคัญและเป็นสินค้าส่งออกของประเทศ (ไมตรี ปทุมวงษ์, 2541) การรักษาศักยภาพในการแข่งขันด้านการตลาดเพื่อส่งออกสู่ต่างประเทศเชื่อมโยงโดยตรงกับความสามารถในการวางตลาดกล้วยไม้ที่มีความแปลกใหม่ของสายพันธุ์ทั้งในด้านรูปลักษณ์ สี และกลิ่น ให้ได้อย่างสม่ำเสมอ ด้วยแนวทางดังกล่าวจึงจำเป็นต้องปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ลักษณะที่ต้องการ ที่ผ่านมาแม้ว่าการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional breeding) โดยการผสมและคัดเลือกจะทำได้ไม่ยากนัก แต่เนื่องจากกล้วยไม้เจริญเติบโตช้าจึงมีความพยายามในการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเทคนิคทางพันธุศาสตร์สมัยใหม่ เช่น การถ่ายยีนเข้ามาประยุกต์ใช้ (ก้องเกียรติ เขาหลวง, 2543)

ที่ผ่านมาพบว่ามีการศึกษาการถ่ายยีนในกล้วยไม้เป็นจำนวนมาก ซึ่งวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้นั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อของกล้วยไม้พันธุ์ *Phalaenopsis,*

Cymbidium และ *Dendrobium* โดยการใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment) (Anzai *et al*., 1996; Yang *et al*., 1999; Kuehnle and Sugii, 1992) และการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ *Oncidium*, *Phalaenopsis* และ *Dendrobium* โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* (Liau *et al*., 2003; Belarmino and Mii, 2000; Yu *et al*., 2001) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีความยุ่งยากและมีข้อจำกัดในเรื่องเครื่องมือ อุปกรณ์ รวมถึงเรื่องค่าใช้จ่าย และมีเงื่อนไขการใช้ประโยชน์ในรูปแบบสิทธิบัตร รวมทั้งความจำเป็นทางเทคนิคที่ต้องใช้พาหะที่มีโครงสร้างเฉพาะ ทำให้มีความยุ่งยากในการโคลนและดัดแปลงชิ้นส่วนของยีนก่อนที่จะเริ่มกระบวนการ นอกจากนี้การถ่ายยีนสามารถทำโดยการใช้สารเคมี เช่น PEG (Bittencort *et al.,* 1995) ซึ่งอาศัยความสามารถในการดึงน้ำและจับตัวกับประจุของโมเลกุลของ PEG รอบๆ ผิวของเมมเบรนทำให้เยื่อหุ้มเมมเบรนโดยเฉพาะบริเวณที่อาจเป็น ion gate เกิดภาวะไร้เสถียรภาพชั่วคราว ภาวะเช่นนี้เมมเบรนมีแนวโน้มจะรับโมเลกุลดีเอ็นเอจากภายนอกที่มีความเข้มข้นมากกว่าได้ (Hui *et al*.,1991) หรือการฉีดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยใช้เข็มขนาดเล็กหรือ μ needle สอดเข้าไปภายในเซลล์เพื่อฉีดโมเลกุลดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยตรง (Holm *et al*., 2000) หรือการใช้เครื่อง microprojectile bombardment device ยิงอนุภาคทองคำขนาดเล็กเข้าสู่เซลล์ (Sanford, 1988; Bommineni *et al*., 1997) โดยหลักทางกายภาพด้วยการอัดแรงดัน การใช้ลูกกระสุนขนาดเล็ก (μ bullet) ที่เคลือบด้วยดีเอ็นเอทำให้สามารถยิงกระสุนทะลุผ่านโครงสร้างของเซลล์เมมเบรนและช่วยส่งดีเอ็นเอเข้าสู่บริเวณที่เหมาะสมและท้ายสุดได้แก่ วิธีการถ่ายยีนทางชีวภาพโดยแบคทีเรีย Agrobacterium ซึ่งอาศัยกลไกการติดเชื้อและตัดชิ้นส่วนของยีนและส่งผ่านโดยกลไกของโปรตีนที่สร้างขึ้นจาก *Vir* ยีนชนิดต่าง ๆ (Bevan,1984) วิธีการแต่ละวิธีมีความยากง่ายและต้นทุนในการดำเนินการต่างกัน ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนต่างกัน มีข้อจำกัดต่อชนิดของพืชที่แตกต่างกันและที่สำคัญทั้งหมดติดขัดเงื่อนไขของการประยุกต์ในเรื่องสิทธิบัตรการใช้งานซึ่งเป็นของต่างประเทศทั้งหมด

การศึกษากลไกการถ่ายยีนในหลายกรณีข้างต้นชี้ให้เห็นว่าการแทรกตัวของยีนขณะถ่ายยีนเป็นไปตามหลักการพื้นฐานของ illegitimate recombination หรือ non-homologous recombination (Gheysen *et al*., 1991) โดยชิ้นของยีนที่แทรกตัวเข้าสู่จีโนมพืชจะอาศัยความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงไม่กี่เบส การแทรกตัวดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไม่ว่าจะเป็นรูปแบบการถ่ายยีนกรณีใด การถ่ายยีนส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นโดยกระบวนการ non-homologous recombination (NHR) (Debuchy *et al*., 1989) โดยในพืชพบว่าเกิดมากกว่า homologous recombination 10^3 -10^6 เท่า (Miao and Lam,1995) ในการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมกลไกการถ่ายยีนเกี่ยวข้องกับการตัดดีเอ็นเอให้เป็น linear ก่อนส่งผ่านเข้าสู่นิวเคลียสของพืช ภายหลังที่ linear ss-DNA ดังกล่าวเข้าสู่นิวเคลียสของพืช Van *et al*. (2001) พืชจะสร้างสายดีเอ็นเอที่เหลือให้กลับมาเป็น linear ds DNA และแทรกตัวเข้ากับจีโนมในที่สุด ดังนั้นสาย ds DNA

ในรูป linear จึงเป็นสายดีเอ็นเอที่มีบทบาทสำคัญ ผลดังกล่าวซึ่งชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้ดีเอ็นเอในรูป linear ในการถ่ายเข้าสู่เซลล์พืช ระบบการถ่ายยีนเข้าสู่พืชส่วนใหญ่อยู่บนพื้นฐานของการใช้ดีเอ็นเอพาหะซึ่งมักอยู่ในรูปของ double stand plasmid DNA ดังนั้นการให้ความสำคัญต่อการพัฒนาระบบการถ่ายยีน เริ่มต้นจากการใช้ดีเอ็นเอในรูป linear ds DNA จะช่วยให้ได้วิธีการใหม่ๆ ที่ไม่มีข้อจำกัดในเงื่อนไขการประยุกต์ และเป็นการพัฒนาองค์ความรู้ที่เป็นของคนไทยเอง การถ่ายยีนในรูป linear มีรายงานเป็นครั้งแรกโดย Case และคณะ (1979)

Schiestl และ Petes (1991) ได้พัฒนาวิธีการถ่ายยีนโดยใช้ดีเอ็นเอในรูป linear จากการตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะและกระตุ้นให้ชิ้นยีนเข้าสู่จีโนมได้ เทคนิคดังกล่าวเป็นที่คุ้นเคยในนาม restriction enzyme-mediated integration (REMI) ซึ่งได้นำมาประยุกต์ใช้ในการถ่ายยีนในรูป linear vector เข้าสู่รา (Brown and Holden, 1998; Riggle and Kumamoto, 1998; Kahmann and Basse, 1999) ยีสต์และสิ่งมีชีวิตชั้นสูงขึ้น (Schiestl *et al*., 1994; Manivasakam and Schiestl, 1998) ในทางปฏิบัติเริ่มจากการใช้ยีนเป้าหมายในรูป linear double strand ร่วมกับ genomic DNA และเอนไซม์จำเพาะ ชิ้นดีเอ็นเอจาก genomic DNA จะช่วยให้ดีเอ็นเอเป้าหมายสามารถเข้าไปในจีโนมและเกิดการแทรกตัวด้วยกระบวนการ non-homologous end joining

กลไกการถ่ายยีนโดยวิธี REMI เริ่มจากเอ็นไซม์จำเพาะจะแพร่ผ่านผนังเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียสตัดโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้านที่ตำแหน่งจำเพาะ โครโมโซมและชิ้นดีเอ็นเอที่เป็น double stand จะเข้าต่อกันกับดีเอ็นเอของโครโมโซม โดยกระบวนการซ่อมแซมโดยเซลล์เจ้าบ้านในสภาพธรรมชาติ (Schiestl and Petes, 1991) สำหรับในพืชการใช้ดีเอ็นเอในรูป linear เพื่อการถ่ายยีนมีผู้ศึกษาน้อยมากทั้งๆ ที่การเตรียม linear ดีเอ็นเอสามารถดำเนินการโดยเทคนิค PCR ได้โดยง่าย

ที่ผ่านมาการศึกษาและการพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้นิยมใช้ Antibiotic resistance gene ซึ่งสามารถตรวจสอบและประเมินผลได้โดยตรงจากความสามารถในการต้านทานและตรวจสอบยีนได้โดยง่าย โดยมีรายงานการถ่ายยีนในกล้วยไม้หลายชนิดซึ่งใช้ยีนและ selectable marker gene ที่แต่งต่างกันไป โดย Belarmino และ Mii (2000) ศึกษาการคัดเลือกต้นกล้วยไม้ฟาแลนนอพซิสลูกผสมซึ่งเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA101 ที่มียีนรายงานผล β – *glucuronidase (gus)* และยีนต้านทานยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (*hygromycin phosphotransferase II; hpt II*) ต่อมาในปี 2001 Yu และคณะ ศึกษาการสร้างกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* Madane Thong-In) โดยเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีดีเอ็นเอเวคเตอร์ที่ประกอบด้วยยีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินและยีน homeobox (*doh 1*) แบบ antisense

Chai และคณะ (2002) ศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตคอร์มกล้วยไม้ฟาแลนนอพซิสสายพันธุ์ T1, T5, T10 และ Hikuru โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีเวคเตอร์ pTOK233 ซึ่งประกอบด้วยยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์ β – *glucuronidase* และยีนต้านทานยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

ยังพบการถ่ายยีนโดยวิธีการยิงอนุภาคเข้าสู่กล้วยไม้ ได้แก่ Chia และคณะ (1990) รายงานการทดลองถ่ายยีนรายงานผล (reporter gene) ได้แก่ ยีน *firefly luciferase* เข้าสู่คัพภะของกล้วยไม้สกุลแวนดา (*Vanda sp.*) ต่อมาในปี 1992 Kuehnle และ Sugii ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* สายพันธุ์ Jaquelyn Thomus hybrids) โดยมียีน *gus A* เพื่อใช้ทดสอบการแสดงออกของยีน และยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ *neomycin phosphotransferase* (*npt II*)

Yang และคณะ (1999) ศึกษาถ่ายยีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินและยีน *gus* เข้าสู่กล้วยไม้สกุลซิมบิเดียม (*Cymbidium sp.*)

และในปี 2000 Knapp และคณะ ถ่ายยีน *phosphinothricin acetyltransferase (bar)* ที่แยกได้จากเชื้อ *Streptomyces hygroscopicus* เข้าสู่โปรโตคอร์มกล้วยไม้ 3 สกุล ได้แก่ *Brassia* , *Cattleya* และ *Doritaenopsis* คัดเลือกเนื้อเยื่อโดยใช้ยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับใช้คัดเลือกกล้วยไม้สกุล *Brassia* และ *Cattleya* ส่วนกล้วยไม้สกุล *Doritaenopsis* นั้นสามารถพัฒนาเป็นต้นบนอาหารสูตรที่ไม่เติมยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส

หากพิจารณาจากรายงานที่ปรากฏกลับไม่พบรายงานการถ่ายยีนในกล้วยไม้สกุลช้าง (*Rhynchostylis sp.*) แต่อย่างใด อย่างไรก็ดี เนื่องด้วยกล้วยไม้สกุลช้างนั้นมีความโดดเด่นที่ออกดอกเป็นช่อสวยงาม มีกลิ่นหอม แต่ยังขาดข้อมูลการวิจัยในระดับสากลดังกล่าว การศึกษาในครั้งนี้ จึงมุ่งความสนใจที่จะพัฒนาการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* เพื่อผลที่ได้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มศักยภาพในการพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้สกุลช้างรวมถึงกล้วยไม้สกุลใกล้เคียงอื่นๆ ให้มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจในระดับสากลได้ในอนาคต

ในเบื้องต้นได้ทดลองศึกษาการถ่ายยีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินเข้าสู่กล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* เนื่องจากรายงานส่วนใหญ่ในกล้วยไม้จะนิยมใช้ยาปฏิชีวนะดังกล่าว แต่เมื่อได้ทำการทดลองพบว่า กล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* มีความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินในธรรมชาติอยู่แล้ว การศึกษาจึงเปลี่ยนไปสู่การถ่ายยีน *phosphinothricin acetyltransferase* หรือยีน *bar* เนื่องจากสามารถตรวจสอบและประเมินผลประสิทธิภาพได้โดยตรงจากความสามารถในการต้านทานเช่นเดียวกับยาปฏิชีวนะ

กานามัยซิน ในระยะหลังนี้ ยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสก็เป็นที่นิยมใช้กันมากขึ้นและทางห้องปฏิบัติการมีความพร้อม

การศึกษาการถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสในรูปแบบ linear DNA เข้าสู่กล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ในครั้งนี้ อาศัยความได้เปรียบในเรื่องการแบ่งตัวของเซลล์ที่รวดเร็วของกล้วยไม้และสามารถนำมาเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตได้ง่ายและในเวลาอันสั้นในสูตรอาหารพื้นฐาน เช่น VW (Vacin and Went, 1949) ร่วมกับเทคนิคในการถ่ายยีนในรูปแบบ linear โดยใช้โครงสร้างที่เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่ประกอบไปด้วย 35S โปรโมเตอร์ และยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส ในรูป linear เป็นยีนเป้าหมาย โดยศึกษาเปรียบเทียบวิธีการชักนำให้ชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์พืชในภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์จำเพาะ มีและไม่มี genomic DNA มีและไม่มี polyethyleneglycol (PEG) ภาวะที่มีกระแสไฟฟ้า ในฐานะเป็นตัวชักนำเพื่อกระตุ้นให้เกิดการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ โดยอาศัยการตรวจสอบและประเมินผลจากความสามารถในการต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส การตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยเทคนิค PCR และการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยตรวจสอบด้วยเทคนิค Biosensor (Chaumpluk *et al*., 2006)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสรูปแบบ linear DNA เข้าสู่กล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea*

ขอบเขตของการวิจัย

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ในสภาพปลอดเชื้อ โดยชักนำให้เกิดโปรโตคอร์ม และแคลลัสปริมาณมาก เตรียมชิ้นดีเอ็นเอให้อยู่ในรูปโครงสร้างที่ประกอบไปด้วย 35S โปรโมเตอร์และชิ้นส่วนของยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส ถ่ายยีนโครงสร้างเป้าหมายในรูป linear DNA เข้าสู่แคลลัสกล้วยไม้ที่เตรียมได้ คัดเลือกแคลลัสที่ต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส และตรวจสอบการปรากฏของยีนและระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค PCR (Sambrook *et al*., 1989) และไบโอเซ็นเซอร์ (Chaumpluk *et al*., 2006)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ในการพัฒนากล้วยไม้ให้มีลักษณะที่ดีขึ้น

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกในกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledonous plant) วงศ์ออร์คิเดซิอี (orchidaceae) หรือเรียกกันทั่วๆ ไปว่า วงศ์กล้วยไม้ เป็นพืชที่มีอายุยาวหลายปี ไม่มีเนื้อไม้ (perennial herbs) และมีจำนวนชนิดมากที่สุดถึงกว่า 19,000 ชนิด ในบรรดาไม้ดอกด้วยกัน นอกจากชนิดที่มีอยู่ตามธรรมชาติ และหากนับรวมพวกลูกผสมหรือที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์จะพบว่ากล้วยไม้มีความสำคัญมากที่สุด

กล้วยไม้พบได้ในถิ่นอาศัยแบบต่างๆ ตั้งแต่บริเวณที่มีน้ำแข็งปกคลุมเกือบตลอดทั้งปีไปจนถึงเขตร้อน ในป่าทุกประเภทในเขตร้อนจะพบกล้วยไม้ที่ดำรงชีวิตอยู่ได้หลายรูปแบบทั้งกล้วยไม้ดิน กล้วยไม้อิงอาศัย และกล้วยไม้ที่เจริญเติบโตอาศัยซากอินทรีย์วัตถุ

ประเทศไทยเป็นแหล่งกำเนิดของกล้วยไม้มากกว่า 1,000 ชนิด โดยที่หลายชนิดพบเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้น จึงนับเป็นทรัพยากรทางชีวภาพที่มีคุณค่าและเป็นเอกลักษณ์ นอกจากกล้วยไม้ชนิดพันธุ์ที่พบตามธรรมชาติอย่างมากมายแล้ว ยังมีพันธุ์จำเพาะที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ใหม่ มีลักษณะพิเศษสวยงามยิ่งขึ้นหรือบานทนยิ่งขึ้น ทำให้กล้วยไม้ของไทยเป็นที่รู้จักกันเป็นส่วนใหญ่ (อบฉันท์ ไทยทอง, 2548) สำหรับกล้วยไม้ท้องถิ่นของไทยที่นิยมได้แก่ เอื้องชนิดต่างๆ ฟ้ามุ่ย และกล้วยไม้สกุลช้าง

กล้วยไม้สกุลช้างเป็นกล้วยไม้ป่าพันธุ์ลูกผสม มีความสวยงามแปลกตาเป็นที่ประทับใจ มีเอกลักษณ์ที่ออกดอกเป็นช่อสวยงาม มีกลิ่นหอมและดอกบานนาน 2-3 สัปดาห์ มีหลายชนิดที่พบเฉพาะในประเทศไทย อย่างไรก็ดี ด้วยข้อจำกัดในเรื่องการขยายพันธุ์ และการปรับปรุงพันธุ์ให้เป็นที่ต้องการของตลาดในต่างประเทศในจำนวนมากพอ จึงทำให้กล้วยไม้สกุลช้างยังมีตลาดจำกัด นอกจากนี้ในระบบสากลยังพบว่า การศึกษาเกี่ยวกับกล้วยไม้สกุลช้างมีน้อยกว่ากล้วยไม้ชนิดอื่นอย่างมาก ด้วยเอกลักษณ์ของกล้วยไม้สกุลช้างที่ออกดอกเป็นช่อ สายพันธุ์ของไทยที่มีความโดดเด่นทางลักษณะและสีของดอกอย่างยิ่ง และการขาดข้อมูลการวิจัยระดับสากลดังกล่าว การศึกษาในครั้งนี้จึงเน้นให้ความสำคัญต่อการใช้เนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลช้างเป็นวัสดุในการทดลอง ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มศักยภาพในการพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้สกุลช้างให้มีศักยภาพในการพัฒนาให้เป็นพืชเศรษฐกิจในระดับสากล

กล้วยไม้สกุลช้างมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Rhynchostylis sp.* มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย พม่า ทางตอนใต้ของจีน และอินโดนีเซีย สำหรับในประเทศไทยพบกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติในเขตภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จนถึงตอนเหนือของภาคกลาง โดยพบขึ้นกระจายทั่วไปในป่าที่มีระดับความสูงประมาณ 260-350 เมตรจากระดับน้ำทะเล

กล้วยไม้สกุลช้างมีจำนวนสมาชิกทั้งหมด 4 ชนิด คือ

1. กล้วยไม้ช้าง (*Rhynchostylis gigantea*) ได้แก่ พวกช้างกระ ช้างแดง ช้างเผือก ช้างส้ม ช้างพลาย ช้างประหลาด ช้างการ์ตูน
2. กล้วยไม้ไอยเรศหรือพวงมาลัย (*Rhynchostylis retusa*)
3. กล้วยไม้เขาแกะ (*Rhynchostylis coelestis*)
4. กล้วยไม้ช้างฟิลิปปินส์ (*Rhynchostylis violacea*)

กล้วยไม้ช้างมีรูปร่างใหญ่โตกว่ากล้วยไม้ชนิดอื่นๆ ในสกุลเดียวกัน มีใบหนา แข็ง ยาวประมาณ 25-30 เซนติเมตร กว้างประมาณ 5-7 เซนติเมตร ปลายใบเป็นแฉก 2 แฉก มน และสองแฉกของใบไม่เท่ากัน รากเป็นรากอากาศ มีขนาดใหญ่ ปลายรากมีสีเขียว ช่อดอกเป็นรูปทรงกระบอกโค้งลง ช่อดอกยาวประมาณ 20-40 เซนติเมตร มีดอกแน่นช่อ ช่อละ 25-60 ดอก ขนาดดอกประมาณ 2.5-3.0 เซนติเมตร กลีบนอกคู่ล่างกว้างยาวพอๆ กันกับกลีบนอกบน ส่วนกลีบในเรียวกว่ากลีบนอก เดือยดอกอยู่ในลักษณะเหยียดตรงไปข้างหน้า ปลายแผ่นปากหนา แข็ง และปลายสองข้างเบนเข้าหากัน ปลายปากมี 3 แฉก สองแฉกข้างมน แฉกกลางมนและมีขนาดเล็กกว่ามาก ใกล้โคนปากด้านบนมีสันนูนเตี้ยๆ 2 สัน ดอกมีกลิ่นหอมฉุน หอมไกล ดอกบานในระหว่างเดือนธันวาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ และบานทนได้ประมาณสองหรือสามสัปดาห์

ในกลุ่มช้างแบ่งออกเป็น 3 ประเภทตามลักษณะสีของดอก คือ ช้างกระ ช้างแดง และช้างเผือก ทั้งสามประเภทเป็นพันธุ์แท้พันธุ์เดียวกัน มีลักษณะลำต้น ใบ ราก ช่อดอก และดอกคล้ายคลึงกัน แต่ต่างกันตรงที่สีของดอก คือช้างกระมีดอกสีขาวประด้วยจุดสีม่วงแดง ช้างแดงดอกมีสีม่วงแดงทั้งดอกหรือเกือบทั้งดอก และช้างเผือกมีดอกสีขาวล้วน นอกจากนี้ยังมี ช้างประหลาด ซึ่งเกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างช้างแดงกับช้างกระ สีของดอกมีจุดสีม่วงแดงใหญ่กว่าช้างกระ บางต้นจุดสีมีขนาดใหญ่จนเกือบเต็มกลีบดอก คล้ายกับสีของดอกช้างแดง แต่ยังมีสีขาวของพื้นกลีบดอกเหลืออยู่ กล้วยไม้ช้างเป็นที่นิยมเลี้ยงกันมากเนื่องจากเลี้ยงได้ง่าย ออกดอกทุกปี (มลิวัลย์ พรหมรักษา, 2539)

การศึกษาวิจัยกล้วยไม้ช้างในประเทศไทย ส่วนใหญ่เป็นการผสมพันธุ์เพื่อให้เกิดพันธุ์ใหม่ๆ โดยมีผลงานเด่น ได้แก่ ผลงานของศาสตราจารย์ระพี สาคริก ซึ่งทำการผสมพันธุ์กล้วยไม้ได้พันธุ์ช้างแดง

อย่างไรก็ดี ลักษณะที่เป็นเป้าหมายในการพัฒนา ได้แก่ การพัฒนาให้เกิดช่อดอกเป็นแบบช่อตั้ง เพื่อให้เหมาะในการตัดดอก หรือพัฒนาสีของดอกให้เป็นสีฟ้า ฟ้าม่วง หรือน้ำเงิน ซึ่งไม่มีมาก่อน หรือพัฒนาให้เกิดพันธุ์ที่แคระเหมาะสำหรับปลูกเป็นไม้กระถาง

ที่ผ่านมาแม้ว่าการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (Conventional breeding) จะทำได้ไม่ยากนักแต่เนื่องจากการผสมเพื่อให้มีพันธุ์ใหม่ๆ ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเจริญ ซึ่งกล้วยไม้สกุลช้างเติบโตได้ช้า จึงมีความพยายามในการนำเทคนิคการถ่ายยีนมาประยุกต์ใช้

การถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment) โดยมีรายงานการใช้ถ่ายยีนเข้าไปในเนื้อเยื่อของกล้วยไม้พันธุ์ *Cymbidium*, *Phalaenopsis* และ *Dendrobium* (Yang *et al*., 1999; Anzai *et al*., 1996; Kuehnle and Sugii, 1992) และการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ในกล้วยไม้ *Oncidium*, *Phalaenopsis* และ *Dendrobium* (Liau *et al*., 2003; Belarmino and Mii, 2000; Yu *et al*., 2001) อย่างไรก็ตาม เทคนิคเหล่านี้มีข้อจำกัดในเรื่องอุปกรณ์เครื่องมือ ค่าใช้จ่าย ความยุ่งยากทางเทคนิคที่ไม่เหมาะสมกับความพร้อมของประเทศ และที่สำคัญเงื่อนไขการใช้ประโยชน์ในรูปแบบสิทธิบัตร

ปาลิตา แปวไธสง (2550) ได้เสนอแนววิธีในการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชโดยใช้อุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น โดยปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ และคณะในปี 2550 ที่เรียกว่า CU pulser กระตุ้นเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ต่ำเพื่อให้พลาสมิดดีเอ็นเอจากภายนอกเข้าสู่เซลล์และเกิดการถ่ายยีนอย่างเสถียร วิธีดังกล่าวพัฒนาใช้เพื่อทดแทนข้อจำกัดในเรื่องอุปกรณ์เครื่องมือ ค่าใช้จ่าย ความยุ่งยากทางเทคนิคที่ไม่เหมาะสมกับสภาพของประเทศ และข้อจำกัดในเรื่องสิทธิบัตรที่เป็นของต่างชาติ (ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 2550) การถ่ายยีนเกิดจากการประยุกต์ให้เกิดภาวะขาดเสถียรภาพของ electropermeabilization ที่เกิดขึ้นที่ผิวของเซลล์เมมเบรน โดยเฉพาะกระตุ้น transmenbrane potential difference

ด้วยหลักการทางไฟฟ้าร่วมกับสาร PEG6000 ภาวะการสูญเสียสภาพของเมมเบรนอันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของ electropermeabilization ขึ้นอยู่กับสนามไฟฟ้าที่กระทบต่อเมมเบรนภายในเซลล์พืช สนามไฟฟ้าดังกล่าว เกิดจากการใช้ความต่างศักย์และกระแสไฟฟ้าในระดับที่เหมาะสมโดยต้องเป็นระดับที่สามารถเอาชนะ impedence ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ที่อยู่ระหว่างแต่ละขั้วไฟฟ้า ขณะเดียวกันต้องไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อความร้อนที่เกิดขึ้นและต่อการปนเปื้อนของ electrolytes ที่เกิดขึ้นขณะผ่านสนามไฟฟ้า (Kotnik *et al*., 2001) ดีเอ็นเอจากภายนอกเซลล์จะเข้าสู่ภายในเซลล์ตรงบริเวณของเมมเบรนที่มีความต่างศักย์สุทธิสูงกว่าค่า threshold ต่ำสุดในระดับ 20–30 mV เฉพาะจุด โดยที่เซลล์ที่มีขนาดใหญ่จะไวต่อสนามไฟฟ้าในระดับต่ำขณะที่เซลล์ขนาดเล็กจะไวต่อสนามไฟฟ้าในระดับที่สูงขึ้น (Teissie *et al*.,1999) อย่างไร

ก็ดี ส่วนใหญ่การผ่านสนามไฟฟ้าไปยังเยื้อหุ้มเซลล์เป้าหมายจะมีรูปแบบที่จำเพาะขึ้นกับระบบ เช่น การปลดปล่อยด้วยตัวเก็บประจุ (capacitor discharge) และการสร้างระบบปลดปล่อยจากแหล่งกำเนิดในรูปแบบ square wave (power transister) ไฟฟ้าดังกล่าวเมื่อกระตุ้นไปยังเมมเบรนจะทำให้เกิดการกระจายตัวของ pore size ขนาดเล็กรอบบริเวณ pore size ขนาดเล็ก ช่วยให้ดีเอ็นเอเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ (Hui and Boni., 1991) การแทรกตัวของดีเอ็นเอภายหลังเข้าสู่เซลล์แล้ว เกิดขึ้นด้วยรูปแบบ non-homologous end joining (Gheysen *et al*., 1991; Debuchy *et al*., 1989) ภายหลังการกระตุ้นให้เกิด double strand break (Debuchy and Brygoo, 1985) โดยในพืชสามารถเกิดขึ้นได้มากกว่า homologous recombinantion 10^3 -10^6 เท่า (Miao and Lam, 1995)

Schiestl และ Petes (1991) ได้พัฒนาวิธีการถ่ายยีนโดยใช้ดีเอ็นเอในรูป linear จากการตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะและกระตุ้นให้ชิ้นยีนเข้าสู่จีโนมได้ เทคนิคดังกล่าวเป็นที่คุ้นเคยในนาม restriction enzyme-mediated integration (REMI) ซึ่งได้นำมาประยุกต์ใช้ในการถ่ายยีนในรูป linear vector เข้าสู่รา (Brown and Holden, 1998; Riggle and Kumamoto, 1998; Kahmann and Basse, 1999) ยีสต์และสิ่งมีชีวิตชั้นสูงขึ้น (Schiestl *et al*., 1994; Manivasakam and Schiestl, 1998) ในทางปฏิบัติเริ่มจากการใช้ยีนเป้าหมายในรูป linear double strand ร่วมกับ genomic DNA และเอนไซม์จำเพาะ ชิ้นดีเอ็นเอจาก genomic DNA จะช่วยให้ดีเอ็นเอเป้าหมายสามารถเข้าไปในจีโนมและเกิดการแทรกตัวด้วยกระบวนการ non-homologous end joining

กลไกการถ่ายยีนโดยวิธี REMI เริ่มจากเอ็นไซม์จำเพาะจะแพร่ผ่านผนังเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียสตัดโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้านที่ตำแหน่งจำเพาะ โครโมโซมและชิ้นดีเอ็นเอที่เป็น double stand จะเข้าต่อกันกับดีเอ็นเอของโครโมโซม โดยกระบวนการซ่อมแซมโดยเซลล์เจ้าบ้านในสภาพธรรมชาติ (Schiestl and Petes, 1991) สำหรับในพืชการใช้ดีเอ็นเอในรูป linear เพื่อการถ่ายยีน มีผู้ศึกษาน้อยมากทั้งๆ ที่การเตรียม linear ดีเอ็นเอสามารถดำเนินการโดยเทคนิค PCR ได้โดยง่าย

การศึกษาการถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสในรูปแบบ linear DNA เข้าสู่กล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ในครั้งนี้ อาศัยความได้เปรียบในเรื่องการแบ่งตัวของเซลล์ที่รวดเร็วของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ในอาหารสังเคราะห์ซึ่งเร็วกว่าในธรรมชาติมากและความสามารถในการนำมาเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตได้ง่ายและในเวลาอันสั้นในสูตรอาหารพื้นฐาน เช่น VW (Vacin and Went, 1949) ร่วมกับเทคนิคในการถ่ายยีนในรูปแบบ linear โดยใช้โครงสร้างที่เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่ประกอบไปด้วย 35S โปรโมเตอร์ และยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส ในรูป linear เป็นยีนเป้าหมาย โดยศึกษาเปรียบเทียบวิธีการชักนำให้ชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์พืชในภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์จำเพาะ มีและไม่มี genomic DNA

มีและไม่มี polyethyleneglycol (PEG) ภาวะที่มีกระแสไฟฟ้า ในฐานะเป็นตัวชักนำเพื่อกระตุ้นให้เกิดการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ โดยอาศัยการตรวจสอบและประเมินผลจากความสามารถในการต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส การตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยเทคนิค PCR และการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยตรวจสอบด้วยเทคนิค Biosensor (Chaumpluk *et al*., 2006)

สำหรับการถ่ายยีนในรูปแบบ linear จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยตรงมีข้อดีที่สามารถข้ามขั้นตอนการโคลนและคัดเลือก การศึกษาพบว่า Kain *et al*. (1991) เสนอรูปแบบการใช้โครงสร้างโปรโมเตอร์ร่วมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยไม่ต้องโคลนยีน โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำไปใช้ในการทดลอง in vitro transcription และ in vitro translation โดยไม่ต้องผ่านเวคเตอร์พาหะ การโคลนและการสกัดพลาสมิด

Kirchherr *et al*. (2007) ได้นำหลักการเดียวกัน มาใช้ในการวิเคราะห์ยีน *env* ของ HIV I โดยไม่ต้องโคลนยีน โดยเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนต่างๆ ของยีนเพื่อสร้างเป็นแม่แบบก่อนนำไปสังเคราะห์ Pseudovirion ในกรณีของพืชสามารถใช้ชิ้นส่วนของ 35S โปรโมเตอร์ ไปเชื่อมต่อเข้ากับชิ้นส่วนของยีนและเทอร์มิเนเตอร์ ซึ่งเป็นโครงสร้างต้นแบบที่ช่วยทำให้ยีนสามารถทำงานได้อย่างถูกต้องในเซลล์พืช เป็นยีนคัสเซ็ทเป้าหมายและใช้มาร์คเกอร์ยีนต่างหากเพื่อช่วยในการคัดเลือก ซึ่งที่ผ่านมาการถ่ายยีนในกล้วยไม้หลายชนิดนิยมใช้ *gus* ยีนเป็นมาร์คเกอร์ แต่ในระยะหลังพบยีน phosphinothricin acetyl transferase หรือ *bar* ยีน เป็นที่นิยมมากขึ้น

การตรวจเอกสารในข้างต้นพบว่า การศึกษาและการพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้นิยมใช้ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะเป็นมาร์คเกอร์ ซึ่งสามารถตรวจสอบและประเมินผลประสิทธิภาพได้โดยตรงจากความสามารถในการต้านทานและตรวจสอบยีนได้โดยง่ายในลำดับต่อมา โดยมีรายงานการถ่ายยีนในกล้วยไม้หลายชนิดซึ่งใช้ยีนมาร์คเกอร์สำหรับใช้ในการคัดเลือกที่แต่งต่างกันไป ได้แก่

Belarmino และ Mii (2000) รายงานผลการคัดเลือกต้นกล้วยไม้ฟาแลนนอพซิสลูกผสมซึ่งเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 และ EHA101 ที่มียีนรายงานผล β – *glucuronidase (gus)* และยีนต้านทานยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (*hygromycin phosphotransferase II; hpt II*)

Yu และคณะ (2001) รายงานผลการสร้างกล้วยไม้แปลงพันธุ์ที่ได้จากการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* Madane Thong-In) โดยเลี้ยงร่วมกับเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีดีเอ็นเอเวคเตอร์ที่ประกอบด้วยยีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินและยีน homeobox (*doh 1*) แบบ antisense

Chai และคณะ (2002) ทดลองถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตคอร์มกล้วยไม้ฟาแลนนอพซิสสายพันธุ์ T1, T5, T10 และ Hikuru โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 ที่มีเวคเตอร์ pTOK233

ซึ่งประกอบด้วยยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์ β – *glucuronidase* และยีนต้านทานยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน พบว่าการคัดเลือกบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นต่ำเป็นเวลานานจะให้ผลการถ่ายยีนสูงขึ้น

นอกจากนี้ยังมีรายงานการถ่ายยีนโดยวิธีการยิงอนุภาคเข้าสู่กล้วยไม้ ได้แก่

Chia และคณะ (1990) รายงานการทดลองถ่ายยีนรายงานผล (reporter gene) ได้แก่ ยีน *firefly luciferase* เข้าสู่คัพภะของกล้วยไม้สกุลแวนดา (*Vanda sp.*)

Kuehnle และ Sugii (1992) ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* สายพันธุ์ Jaquelyn Thomus hybrids) โดยมียีน *gus A* เพื่อใช้ทดสอบการแสดงออกของยีน และยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ *neomycin phosphotransferase* (*npt II*) ทำให้เกิดลักษณะต้านทานต่อยาปฏิชีวนะกานามัยซินเข้าสู่โปรโตคอร์มกล้วยไม้

ในปี 1999 Yang และคณะ ถ่ายยีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินและยีน *gus* เข้าสู่กล้วยไม้สกุลซิมบิเดียม(*Cymbidium sp.*) จนกระทั่งปี 2000 จึงเริ่มมีผู้ใช้ยีนต้านทานยาปราบวัชพืช

Knapp และคณะ (2000) ได้ทำถ่ายยีน *phosphinothricin acetyltransferase* (*bar*) ที่แยกได้จากเชื้อ *Streptomyces hygroscopicus* เข้าสู่โปรโตคอร์มกล้วยไม้ 3 สกุล ได้แก่ *Brassia Cattleya* และ *Doritaenopsis* คัดเลือกเนื้อเยื่อโดยใช้ยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับใช้คัดเลือกกล้วยไม้สกุล *Brassia* และ *Cattleya* ส่วนกล้วยไม้สกุล *Doritaenopsis* นั้นสามารถพัฒนาเป็นต้นบนอาหารสูตรที่ไม่เติมยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส

การศึกษาในครั้งนี้เน้นการต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส โดยอาศัยดีเอ็นเอในรูปแบบ linear double stand DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ pBic Bar ในบริเวณรอบ left border และ right border ซึ่งประกอบด้วยโครงสร้าง 35S โปรโมเตอร์ *bar* ยีน และ 35S เทอร์มิเนเตอร์

โดยปกติการถ่ายยีนในรูปแบบ linear ด้วยเทคนิค REMI พบว่าการเลือกชนิดของเอ็นไซม์ การเติมจีโนมดีเอ็นเอที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์ต่างๆ การแปรผันระดับปริมาณ PEG และภาวการณ์ถ่ายยีนด้วยกระแสไฟฟ้า ต่างมีบทบาทในการกำหนดประสิทธิภาพในการถ่ายยีน (Granado *et al.*, 1997)

การศึกษาเบื้องต้นพบว่าปัจจัยของชนิดของเอ็นไซม์และความเข้มข้นขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างที่ใช้ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้เอ็นไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ *Bam*H I *Eco*R I และ *Pst* I ในยีสต์ การถ่ายยีนมีประสิทธิภาพสูงขึ้นด้วยการผสมเอ็นไซม์ *Bam*H I ในองค์ประกอบของสารละลาย

บัฟเฟอร์ ที่ใช้ในการถ่ายยีนซึ่งพบว่าชิ้นส่วนของยีนที่แทรกตัวพบในจีโนมิกดีเอ็นเอที่บริเวณจุดตัดของเอ็นไซม์ *Bam*H I (Schiest and Petes, 1991)

เอ็นไซม์จำเพาะ *Eco*R I เหมาะสมกับการเพิ่มอัตราการถ่ายยีนใน Dictyosteliun ขณะที่เอ็นไซม์ *Hin*d III เหมาะสมกับการเพิ่มอัตราการถ่ายยีนใน *Cochilodolus sp*. (Kuspa and Loomis, 1994; Lu *et al*., 1994) อย่างไรก็ดีจาการตรวจเอกสารพบว่าไม่มีรายงานการประยุกต์ใช้หลักการ REMI ในพืชมาก่อน

การตรวจสอบเอ็นไซม์จำเพาะทั้ง 3 ชนิดที่นิยมใช้ในเบื้องต้นจึงจำเป็น อย่างไรก็ดีพบว่าส่วนหนึ่งของประสิทธิภาพในการถ่ายยีนขึ้นอยู่กับสภาวะทางสรีระวิทยาที่พร้อมของเนื้อเยื่ออีกด้วย

โดยส่วนใหญ่การถ่ายยีนในภาวะทางเทคนิคจะนิยมใช้ $CaCl_2$ หรือ PEG เป็นตัวกระตุ้นหรือใช้ร่วมกับเทคนิคการถ่ายยีนแบบ electroporation ซึ่งรูปแบบการถ่ายยีนดังกล่าวไม่ต่างไปจากระบบที่ใช้ในพืชโดยเฉพาะกล้วยไม้มากนัก ในระบบการถ่ายยีนโดยใช้สนามไฟฟ้าที่แปรผันตามแรงเคลื่อนไฟฟ้า ปาลิตา แปวไธสง (2550) พบว่าการใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 50 โวลท์ 20 วินาที ร่วมกับ PEG6000 ความเข้มข้น 1% สามารถกระตุ้นให้เกิดการถ่ายยีนใน *Peperomea pellucida* ได้ ทำนองเดียวกัน ปรเมษฐ์ กลั่นฤทธิ์ (2550) ได้สาธิตการถ่ายยีนเข้าสู่ *Dunaliella sp.* ด้วย PEG6000 เพียง 0.08% ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายยีนมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดของพืช การแปรผันปัจจัยต่างๆ จึงมีความจำเป็น ยังพบกลวิธีที่สามารถใช้ยีน *bar* เป็นรูปแบบเบื้องต้นในการศึกษา โดยหลักการภายหลังการถ่ายยีน *bar* เข้าสู่เนื้อเยื่อสามารถคัดเลือกเนื้อเยื่อจากความสามารถในการต้านทานยาปราบวัชพืชได้โดยตรง

ความสามารถในการต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสของยีน *bar* เริ่มจากปฏิกิริยา acetylation ของกรดอะมิโนและเคลื่อนย้ายหมู่อะซิทัลส่งผลให้โครงสร้างของไบอะลาฟอสเปลี่ยนไปจนไม่ไปยับยั้งการสังเคราะห์กลูตามีนโดยการยับยั้งเอนไซม์กลูตามีนซินเธสได้ดังที่เคยเป็นจึงทำให้เซลล์ไม่ได้รับพิษจากการสะสมของแอมโมเนีย ด้วยเหตุนี้การแสดงออกของยีน *bar* ที่สามารถคัดเลือกได้ด้วยสายตาจึงเป็นที่นิยมและทุกครั้งที่พบความสามารถในการต้านทานแสดงว่าเนื้อเยื่อจะต้องมียีน *bar* ปรากฏและมีการแสดงออกทั้งในระดับการถอดรหัสและการแปลรหัส

อย่างไรก็ดีที่ผ่านมาสามารถตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *bar* ได้โดยเทคนิค PCR และตรวจสอบการแสดงออกในรูปการถอดรหัสโดยเทคนิค RT-PCR (ปรเมษฐ์ กลั่นฤทธิ์, 2550) จากการตรวจสอบเบื้องต้นพบว่าเทคนิค RT-PCR แม้จะสามารถบ่งบอกความสามารถในการแสดงออกของยีนได้แต่ไม่สามารถนำมาใช้ในการคำนวณเชิงปริมาณในเบื้องต้นได้ การคำนวณระดับการแสดงออกสามารถทำได้โดยเทคนิค Real time PCR บนพื้นฐานของ Taq man chemistry ซึ่งเป็นเทคนิคที่ยุ่งยากและใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง

Chaumpluk และคณะ (2006) ได้เสนอแนวทางในการตรวจการแสดงออกของยีนรูปแบบใหม่โดยใช้ยีนเซนเซอร์บนพื้นฐานปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้า

ยีนเซนเซอร์ (Gene sensor) เป็นเทคนิคที่มีการนำเอาความรู้ทางด้านฟิสิกส์มาเป็นพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ การทำงานของเทคนิคไบโอเซนเซอร์นี้จะอาศัยคุณสมบัติของการตรวจจับสัญญาณของโมเลกุลสารโดยมีตัวรับสัญญาณ (receptor) และตัวแปลงสัญญาณ (transducer) ซึ่งจะทำงานร่วมกันทำให้มีความสามารถที่จะแปลงสัญญาณเหล่านี้ไปเป็นสัญญาณทางไฟฟ้าได้ เช่น การเปลี่ยนแปลงของความต่างศักย์หรือกระแสไฟฟ้า ค่าการเหนี่ยวนำทางไฟฟ้ารวมถึงการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติของแสง ได้แก่ การวัดค่า resonance การเปลี่ยนแปลงของสี สัญญาณดังกล่าวสามารถตรวจวัดพร้อมกับแสดงค่าที่ได้จากการตรวจวัดให้ออกมาในรูปแบบของตัวเลขที่สอดคล้องกับปริมาณสัญญาณจริงที่ได้รับ ซึ่งหลักการนี้มีความสำคัญเนื่องจากสามารถตอบสนองต่อหลักการ point of care ได้ดี

การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์ อาศัยหลักการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า โดยมีอุปกรณ์ตรวจวัดแผ่นเล็กๆที่เรียกว่า อิเลคโทรด (electrode) จะเป็นตัวตรวจวัดความต่างศักย์และการไหลของกระแสไฟฟ้าที่อยู่ในระบบของสารละลาย โดยคุณสมบัติของแผ่นอิเลคโทรดจะต้องเป็นตัวกระตุ้นและสะสมหรือเป็นตัวส่งต่ออิเลคตรอนที่อยู่ในสารละลายผ่านพื้นผิวหน้าของอิเลคโทรด แล้ววัดค่าความต่างศักย์หรือกระแสไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงไปในวงจร ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ (2549) กล่าวว่า การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิคไบโอเซนเซอร์จะอยู่บนพื้นฐานของหลักการตรวจจับสัญญาณดีเอ็นเอโดยยึดหลักความจำเพาะเจาะจงระหว่างโมเลกุลดีเอ็นเอกับโมเลกุลของสีซึ่งโมเลกุลของสีจะมีคุณสมบัติเป็นตัวจับกับดีเอ็นเอ เรียกว่า DNA binder ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่เป็น intercalator เป็นกลุ่มของโมเลกุลสีที่มีการแทรกตัวอยู่ระหว่างสายดีเอ็นเอ เช่น ethidium bromide methylene blue propidium iodide และอีกกลุ่มหนึ่งก็คือ minor groove binder เป็นกลุ่มที่สามารถจับกับโครงสร้างดีเอ็นเอที่เป็นเกลียวคู่ (double helix) ในบริเวณที่เป็น minor groove ของดีเอ็นเอ สารที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ DAPI Distamycine nuclear yellow และ Hoechst 33258 ซึ่งที่ผ่านมาการรายงานการศึกษาคุณสมบัติทางไฟฟ้าของสารละลาย DNA binder พบว่าโมเลกุลของ Hoechst 33258 มีช่วงการเปลี่ยนแปลงของความต่างศักย์กว้างที่สุดและใช้ค่ากระแส Pulse เริ่มต้นต่ำที่สุด จึงเป็นโมเลกุลที่เหมาะสมที่จะนำมาเป็นตัวจับกับดีเอ็นเอเพื่อการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า (ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 2549)

การจับตัวของดีเอ็นเอกับโมเลกุล Hoechst 33258 ซึ่งโมเลกุล Hoechst 33258 นี้จะกระตุ้นให้เกิดการรวมกันของดีเอ็นเอทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพ ในเรื่องของประจุในภาวะที่ไม่มีดีเอ็นเอหรือมีดีเอ็นเออยู่น้อย ประจุอิเลคตรอนจากโมเลกุล Hoechst 33258 จะจับตัวกับโมเลกุลดีเอ็นเอได้น้อยทำให้มีประจุอิเลคตรอนอิสระมาก เมื่อตรวจวัดจะได้ค่า

ของกระแสไฟฟ้าที่สูงซึ่งในทางตรงข้ามกันกับโมเลกุลที่มีดีเอ็นเอมาก การจับตัวกันระหว่างโมเลกุลดีเอ็นเอกับโมเลกุล Hoechst 33258 ก็มีมาก ทำให้มีประจุอิเลคตรอนอิสระในโมเลกุล Hoechst 33258 อยู่น้อย ค่าการเปลี่ยนแปลงกระแสไฟฟ้าก็จะลดลง ดังนั้น ตัวแปลงสัญญาณ (transducer) จะแปลงค่าการเปลี่ยนแปลงสัญญาณที่เกิดขึ้นให้ปรากฏในรูปของตัวเลขแล้วนำค่าตัวเลขที่อ่านได้มาสร้างเป็นกราฟ พร้อมหาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ซึ่งความสัมพันธ์นี้ทำให้ทราบว่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจวัดกับค่าสูงสุดของกระแสไฟฟ้าจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (Chaumpluk *et at*., 2006)

การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสจะใช้หลักการเดียวกัน คือ ใช้โมเลกุล Hoechst 33258 เป็นตัวจับกับโมเลกุลดีเอ็นเอที่ได้จากการแปลงสัญญาณเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสไปเป็นผลิตภัณฑ์ cDNA เพื่อให้เป็นตัวกระตุ้นสัญญาณเฉพาะในการตรวจวัดหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ทำให้ทราบถึงระดับการแสดงออกของยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสในกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ได้ในที่สุด

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและถ่ายยีน

3.1.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและถ่ายยีน

CU Pulser (ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 2550)

กระดาษซับ

กระบอกตวง

กล้องถ่ายรูป

ขวดแก้วที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขนาด 4 ออนซ์

ขวดรูปชมพู่

เครื่องชั่งสารเคมี

จานเลี้ยงเชื้อ

ชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ตะเกียงแอลกอฮอล์

ตู้ปลอดเชื้อ

บีกเกอร์

ปากคีบ

ปิเปตอัตโนมัติและทิปขนาด 10 100 และ1000 ไมโครลิตร

ผ้าสะอาด

พีเอช มิเตอร์

มีด และใบมีดผ่าตัด

สำลี

หม้อนึ่งความดัน

หลอดสกรูแคป 15 และ 50 มิลลิลิตร

3.1.1.2 **สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและถ่ายยีน**

10% SDS

EDTA

Tris HCl, pH 7.5

กลูโคส

คลอโรฟอร์ม

แคลเซียมคลอไรด์

เซลลูเลสอาร์เท็น

โซเดียมอะซิเตด

โซเดียมไฮดรอกไซด์(1N NaOH)

แมนนิทอล (0.4 M Mannitol)

ทริสอะซิเตดอีดีทีเอ

น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

ผงวุ้น(agar)

โพลีเอทธิลีนไกลคอล (MW 6,000)

สารละลายฟีนอล

อาหารสูตร VW (Vacin and Went, 1949) (ภาคผนวก ก)

เอ็นไซม์จำเพาะ *Eco*R I, *Bam*H I, *Pst* I

แอลกอฮอล์ 95% และ 70%

ไฮโดรคลอริก (1N HCl)

ยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส (Bialaphos; Basta TX®)

3.1.2 **อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์โครงสร้างของยีน**

3.1.2.1 **อุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์โครงสร้างของยีน**

Light™ (Transilluminator, USA)

เครื่องควบคุมอุณหภูมิ -20 องสาเซลเซียส

เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้า (Mupid Advance Co., Ltd, Japan)

เครื่องชั่งไฟฟ้า (Libror EL-120HA, Shimadzu, Japan)

เครื่องปั่นตกตะกอนสาร (MIKRO 12-24 Hettich Zentrifugen, Germany)

เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (พีซีอาร์) (BIO RAD Gene Cycler™, USA)

เครื่องส่องดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต UV (Ultra Lum Electronic Dual)
ตู้เขี่ยเชื้อ (Augusta Safty Cabinet , Lio Lab Co,.Ltd, Thailand)
ปิเปตอัตโนมัติและทิปขนาด 10 100 และ 1000 ไมโครลิตร
ไมโครเวฟ
หลอดไมโครเซนตริฟิว

3.1.2.2 **สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์โครงสร้างของยีน**

100 bp ดีเอ็นเอแลดเดอร์ (New England Biolabs, USA)
กรดไฮโดรคลอริก (Merck, Germany)
คลอโรฟอร์ม (Merck, Germany)
โซเดียม โดเดซิลซัลเฟต (Merck, Germany)
โซเดียมคลอไรด์ (Merck, Germany)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Merck, Germany)
ไดโซเดียม เอทิลีนไดอะไมน์ เตตราซิติก เอซิด : EDTA (Merck, Germany)
โบรโมฟีนอลบลู (Phamacia, USA)
ฟีนอล (Sigma Co., USA)
ยาปฏิชีวนะกานามัยซิน(Sigma, USA)
อะกาโรส (Promega, USA)
เอทิเดียมโบรไมด์ (Gibco BRL)
แอมโมเนียมอะซีเตต (Sigma Co., USA)
แอลกอฮอล์ 95 % (Merck, Germany)
ไอโซเอมิล แอลกอฮอลล์ (Merck, Germany)
เอนไซม์

- RNaseA (Sigma, USA)
- T4 DNA ligase(Promega, USA)
- *Taq* DNA polymerase(Promega, USA)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ในสภาพปลอดเชื้อ

ตัวอย่างฝักกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ใช้ในการทดลองได้จากเรือนเพาะชำโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี โดยใช้ฝักแก่ที่ผิวฝักเริ่มมีสีเหลืองอ่อนหรือผิวมีสีซีดลงเล็กน้อย ผนังฝักยังไม่แตกออก นำฝักที่ได้มาฆ่าเชื้อที่ผิวนอกและเพาะเลี้ยงโดยมีขั้นตอนโดยย่อ ดังนี้

1. ตัดกลีบดอกแห้งและปลายเส้าเกสรออกจากปลายฝัก ระวังอย่าให้ตัดลึกถึงโพรงก้านในที่บรรจุเมล็ดอยู่ เพราะเชื้อจุลินทรีย์จากอากาศภายนอกหรือจากมีดที่ใช้ตัดจะเข้าไปปนเปื้อนในฝักได้
2. ล้างฝักให้สะอาดด้วยสบู่เหลว
3. เช็ดผิวฝัก โดยใช้สำลีจุ่มแอลกอฮอล์ 70 % ถูผิวฝักให้ทั่ว
4. นำฝักเข้าตู้เพาะ
5. ใช้ปากคีบ คีบฝักจุ่มแอลกอฮอล์ 95 % แล้วยกฝักขึ้นจากขวด นำไปลนเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ ให้เปลวไฟลุกท่วมฝัก เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวฝักอีกครั้งหนึ่ง
6. ใช้คีมคีบจับโคนฝักแล้วให้ตัดตามขวางที่กลางฝัก (ถ้าฝักขนาดใหญ่) หรือตัดปลายฝัก (ถ้าฝักขนาดเล็ก) แล้วเขี่ยเมล็ดด้วยปลายมีดให้เมล็ดร่วงลงในขวดวุ้นอาหาร โดยใช้อาหารสูตร VW (Vacin and Went, 1949) ตามที่รายงานไว้ในจิตราพรรณ พิลึก (2544)
7. นำขวดเพาะเลี้ยงที่ได้เข้าไปเก็บในห้องเก็บเนื้อเยื่อโดยจัดวางแบบสุ่มที่มีการควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมโดยให้แสง 16 ชั่งโมง / วัน ที่ความเข้มแสง 1000-3000 ลักซ์ และอุณหภูมิ 25° C

3.2.1.1 ชักนำให้เกิดการเพิ่มปริมาณโปรโตรคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea*

หลังการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ลงบนวุ้นอาหาร เมล็ดจะขยายขนาดและงอกเป็นสีเขียว มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าภายใน 3-4 สัปดาห์ และภายใน 2 เดือน จะเห็นเป็นสีเขียวเต็มพื้นที่ในขวดเพาะ เมื่อถึงระยะนี้นำเนื้อเยื่อย้ายลงอาหารสูตร VW โดยใส่ขวดละประมาณ 1 ช้อนชา แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าวุ้นอาหาร (จิตราพรรณ พิลึก, 2544) หลังจากนั้นประมาณ 1-2 เดือน ก็จะเกิดเป็นโปรโตคอร์ม (protocorm) ให้เห็น นำโปรโตคอร์มดังกล่าวมาชักนำให้เกิดการเพิ่มปริมาณเป็นแคลลัสด้วยการย้ายลงในอาหารสูตร VW ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

3.2.1.2 **เพิ่มปริมาณแคลลัสจากโปรโตคอร์ม**

นำโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* จากขั้นตอนแรก มาแบ่งเนื้อเยื่อให้ได้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่

สูตรอาหารที่ 1 VW + 2,4-D 0 ppm

สูตรอาหารที่ 2 VW + 2,4-D 0.1 ppm

สูตรอาหารที่ 3 VW + 2,4-D 0.5 ppm

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยแต่ละชุดการทดลองมี 20 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีโปรโตคอร์ม 1 ชิ้น เก็บรักษาในห้องเก็บเนื้อเยื่อพืชที่มีการควบคุมสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมโดยให้แสง 16 ชม. ต่อวัน ที่ความเข้มแสง 1,000-3,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 °C

<u>การบันทึกผลการทดลอง</u>

ทำการบันทึกผลทุก ๆ 1 เดือน เป็นเวลานาน 2 เดือน ข้อมูลที่บันทึกมีดังนี้

1.ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโปรโตคอร์ม (เซนติเมตร)

2.ค่าคะแนนความสามารถในการเจริญของโปรโตคอร์ม แบ่งเป็น 3 ระดับ ได้แก่

0 = สีน้ำตาล

1 = สีเหลือง

2 = สีเขียวหรือสีเขียวอมเหลือง

3.น้ำหนักสด (มิลลิกรัม)

นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่าง โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรม SPSS version 11.5

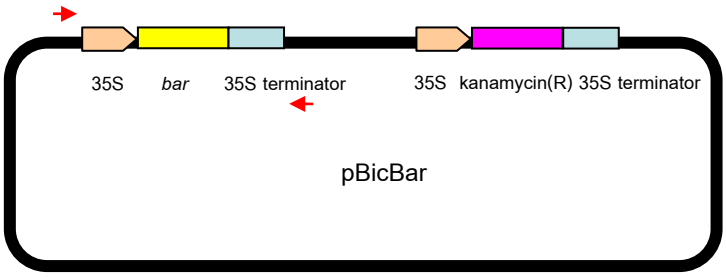
3.2.2 **ผลของยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส**(Bialaphos ; Basta TX®) **ต่อโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* และขนาดความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้เป็นดัชนีชี้วัดความสามารถในการต้านทาน**

นำแคลลัสที่ได้จากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ได้ในขั้นตอนแรก มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร VW ที่เติมสารละลายยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส ความเข้มข้นต่างกัน 6 ระดับได้แก่ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ppm โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองชุดทดลองละ 10 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีจำนวนโปรโตคอร์ม 5 ชิ้น บันทึกผลการเจริญเติบโต คำนวนอัตราการรอดที่ 50 % เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C ด้วยสภาวะเดียวกันกับการทดลองเบื้องต้น

3.2.3 โครงสร้างของยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส

เพิ่มปริมาณพลาสมิด pBIC BAR โดยถ่ายพลาสมิด pBIC BAR เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ด้วยวิธีทางเคมีร่วมกับการทำ heat shock (Sambrook *et al*., 1989) จากนั้นคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ได้บนอาหาร LM ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินเข้มข้น 25 mg/l แบคทีเรียที่คัดเลือกได้นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB broth ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณก่อนสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Small Scale Plasmid Preparation (Sambrook *et al*., 1989) ภายหลังตกตะกอนพลาสมิดดีเอ็นเอ ละลายพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE ปริมาตร 30 µl ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยการแยกดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าด้วย 1% Agarose TAE และย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide 10 mg/l นำมาตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และคำนวณหาสัดส่วน OD 260/280

โครงสร้างของพลาสมิดในส่วนของยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส เป็นดังภาพ



ยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสที่ใช้ได้มาจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยคู่ไพรเมอร์ forward primer (TbordL 5'- CAA CGG CTC TCC CGC TGA CGC CGT C -3') และ reverse primer (TbordR 5'- GGG TTG GAT CAA AGT ACT TTG ATC C -3') เฉพาะเจาะจงบริเวณแขนของพลาสมิด pBIC bar และบริเวณเหนือตำแหน่ง 5' ของ 35S โปรโมเตอร์ ทำปฏิกิริยาโดยเอ็นไซม์ *Taq* DNA Polymerase ที่อุณหภูมิ 94 ^{0}C 1 นาที 55 ^{0}C 1 นาที และ 72 ^{0}C 2 นาที จำนวน 40 รอบ นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย RBC คอลัมน์ (Real Biotech Corp., USA) เพื่อขจัดไพรเมอร์ และ dNTP ส่วนเกินออก ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เช่นเดียวกัน

3.2.4 **การถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสเข้าสู่กล้วยไม้ช้างกระ** *Rhynchostylis gigantea*

การทดลองในส่วนนี้มุ่งเน้นการหาภาวะที่เหมาะสม ได้แก่

1. **ระดับปริมาณของ** PEG 6000 **และระยะเวลาที่เหมาะสมในการผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์** 50 **โวลท์**

นำแคลลัสที่ได้จากโปรโตคอร์มมาใส่ในสารละลาย 10 mM Tris HC, pH 7.5 ที่มี $CaCl_2$ 1 mM และระดับปริมาณ PEG 6000 ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ ได้แก่ 0%, 1%, 2.5%, 5% และ10% μg/ml และมีปริมาณดีเอ็นเอ 10 μg/ml จากนั้นผ่านสนามไฟฟ้าที่ระดับ 50 โวลท์ แปรผันระยะเวลาเป็น 2 ระดับ ได้แก่ 20 และ 40 วินาที ตามลำดับ ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ มีเนื้อเยื่อซ้ำละ 50 ชิ้น และรายงานผลโดยตรวจสอบชิ้นเนื้อเยื่อที่ต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสในอาหารสูตร VW

2. **ระดับปริมาณของดีเอ็นเอที่เหมาะสม**

การถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสที่ได้จากโปรโตคอร์ม ทำโดยนำแคลลัสใส่ลงในสารละลาย 10 mM Tris HCl, pH 7.5 ที่มี $CaCl_2$ 1 mM และใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 0, 5, 10, 15 และ 20 μg/ml สำหรับระดับปริมาณ PEG 6000 ที่เหมาะสมในการถ่ายยีนดำเนินการได้โดยใช้เนื้อเยื่อในภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองระดับ PEG 6000 และระยะเวลาที่เหมาะสมจากการทดลองส่งผ่านสนามไฟฟ้าในวิธีที่ผ่านมาจากนั้นย้ายเนื้อเยื่อลงสู่อาหารเพาะเลี้ยงที่มียาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสตามความเข้มข้นที่เหมาะสม ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ มีเนื้อเยื่อซ้ำละ 50 ชิ้น การตรวจสอบชิ้นเนื้อเยื่อประเมินผ่านความสามารถในการต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส

3. **การตรวจสอบภาวะที่มีหรือไม่มีเอ็นไซม์**

ดำเนินการเช่นเดียวกันกับหัวข้อที่ผ่านมาโดยเติมหรือไม่เติมเอ็นไซม์ระดับหน่วยความเข้มข้นต่ำโดยใช้เอนไซม์จำเพาะ 3 ชนิด ได้แก่ *Eco*R I *Bam*H I และ *Pst* I 5 U/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีก่อนใส่สารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองในเบื้องต้น และผ่านสนามไฟฟ้าในภาวะที่เหมาะสม เช่นเดียวกันกับหัวข้อที่ผ่านมา การตรวจสอบชิ้นเนื้อเยื่อประเมินผ่านความสามารถในการต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสในอาหารสูตร VW

4. **ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนในภาวะที่มีหรือไม่มีจีโนมดีเอ็นเอ**

เริ่มจากการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* โดยวิธี CTAB (Murray and Thomson, 1980) ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอ็นไซม์จำเพาะ *Eco*R I หรือ *Bam*H I หรือ *Pst* I โดยใช้ระดับปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับระดับปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายและบ่มปฏิกิริยาที่ 37 ^{0}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ของจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากการ

ตัดที่ใช้ในการทดลองที่ผ่านมามาทำให้บริสุทธิ์ด้วย RBC Column (Real Biotech Corp, USA) นำดีเอ็นที่ได้มาผสมในสารละลาย 10 mM Tris HCl, pH 7.5 ที่มี $CaCl_2$ 1 mM และใช้เงื่อนไขในการถ่ายยีนเช่นเดียวกับที่ได้ดำเนินการในตอนที่ผ่านมา สำหรับการทดสอบภาวะที่ให้หรือไม่ให้เอนไซม์จำเพาะต่อการย่อยผนังเซลล์บางส่วนในปฏิกิริยา ดำเนินการทดลองโดยใช้ระบบปริมาตร 5 ml ในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 10 mM Tris HCl, pH 7.5 PEG ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่หาได้จากการทดลองแรกและ $CaCl_2$ ความเข้มข้น 1 mM และดีเอ็นเอความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองแรกโดยเริ่มจากการนำแคลลัสที่ได้ มาละลายในสารละลายที่มีหรือไม่มีเอนไซม์ *Eco*R I ความเข้มข้น ที่ 5 U/ml บ่มปฏิกิริยา 10 นาที จากนั้นล้างเอนไซม์บางส่วนออกและเปลี่ยนบัฟเฟอร์ให้เป็นสารละลาย 0.4 M Mannitol ที่มี 1mM $CaCl_2$ และ PEG6000 ความเข้มข้นที่เหมาะสมและถ่ายยีนด้วยภาวะที่ใช้ทดลองมาก่อนหน้านี้

3.2.5 การตรวจสอบและประเมินสภาวะการถ่ายยีนโดยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

3.2.5.1 การตรวจสอบการปรากฏของจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำชิ้นส่วนแคลลัสที่ต้านทานยาปราบวัชพืช ไบอะลาฟอส ปริมาณ 100 มิลลิกรัม มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Murray and Thomson, 1980) ละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ในสารละลาย RNase, TE (1 mg/l RNase) ปริมาตร 30 µl จากนั้นนำดีเอ็นเอไปตรวจสอบการปรากฏของยีน *bar* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ forward primer (bar FWD 5'- CAA TCC TCG AGT CTA CCA TGA GCC CAG AAC -3') และ reverse primer (bar REV 5'- GAA TCC TCG AGT CAA ATC TCG GTG ACG GGC A -3') บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสนาน 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที จำนวน 40 รอบ นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มาแยกในสนามไฟฟ้า ตรวจสอบและบันทึกผลเช่นเดียวกับการทดลองตอนต้น

3.2.5.2 การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *bar*

สกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อที่ต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส โดยวิธีสกัดด้วยสารละลาย Trizol™ (Invitrogen, USA) โดยใช้เนื้อเยื่อ 100 มิลลิกรัม นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาตกตะกอนซ้ำด้วยสารละลาย 8 M LiCl ตามวิธีที่แสดงไว้ใน Sambrook *et al*. (1989) สกัดอาร์เอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยการย่อยดีเอ็นเอปนเปื้อนด้วย RNase free DNase ตรวจสอบอาร์เอ็นเอ โดยทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ชนิดเดียวกันกับที่ตรวจสอบและประเมินภาวะการถ่ายยีน ส่วนหนึ่งของอาร์เอ็นเอนำมาตรวจวัดการแสดงออกด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์ ตามที่รายงานใน Chaumpluk *et al*. (2006) บันทึกผลการทดลอง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ในสภาพปลอดเชื้อ

เมล็ดกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร กล้วยหอมบด 50 กรัมต่อลิตร มันฝรั่งบด 50 กรัมต่อลิตร และผงถ่าน 2 กรัมต่อลิตร จะเริ่มงอกภายใน 3-4 สัปดาห์ มีลักษณะเป็นก้อนกลมสีเขียวอ่อน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่ำกว่า 1 มิลลิเมตร เมื่อเนื้อเยื่อมีอายุ 2 เดือน จะมีสีเขียวเข้มขึ้น ขนาดเนื้อเยื่อขยายใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารสูตร VW พบว่า เนื้อเยื่อมีการเจริญเป็นโปรโตคอร์มคือมีลักษณะเป็นก้อนกลม มีปุ่มปม โดยทั่วไปไม่มีการพัฒนาเป็นยอด ซึ่งเนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* สามารถคงสภาพโปรโตคอร์ม ดังกล่าวเมื่อตัดแบ่งเนื้อเยื่อให้เล็กลง แล้วนำไปทดลองเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเพื่อชักนำให้เกิดการเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มต่อไป

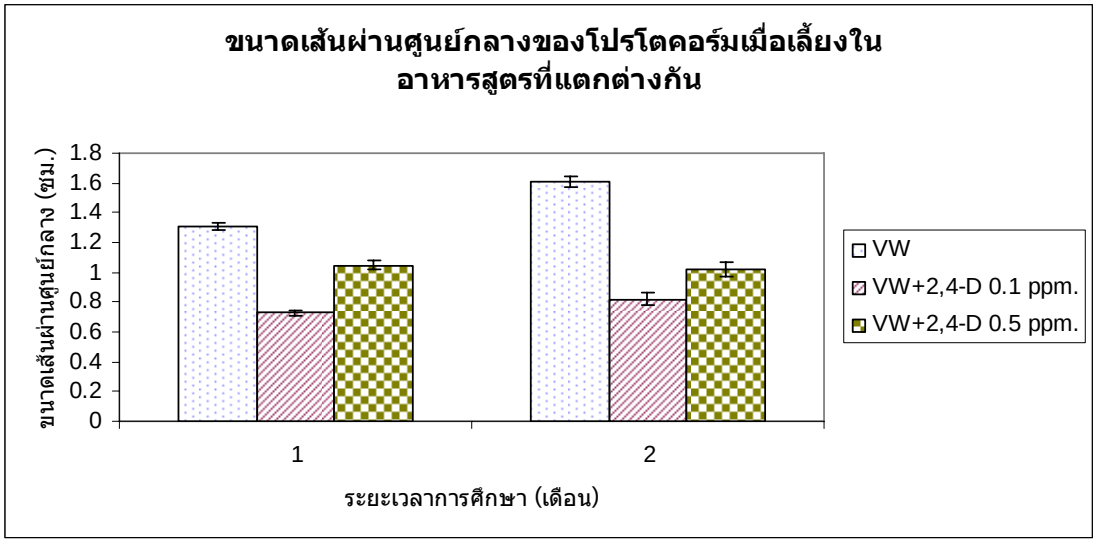
4.2 ชักนำให้เกิดการเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea*

จากการศึกษาผลของ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันที่มีต่อการเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร VW (Vacin and Went, 1949) เป็นเวลานาน 2 เดือน ได้ผลการทดลอง ดังนี้

1. ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโปรโตรคอร์ม

พบว่า เดือนแรกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโปรโตคอร์มเฉลี่ยที่ได้แตกต่างกันโดยในอาหารสูตร VW ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยมากที่สุด คือ 1.31±0.02 เซนติเมตร รองลงมาคือ สูตรอาหาร VW + 2,4-D 0.5 ppm และ VW+2,4-D 0.1 ppm มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.95±0.03 และ 0.73±0.02 เซนติเมตร ตามลำดับ ต่อมาในเดือนที่สอง เริ่มเห็นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่แตกต่างกันมากในอาหารสูตร VW ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ VW+2,4-D 0.1 ppm ในอาหารสูตร VW ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.61±0.04 เซนติเมตร แต่ VW + 2,4-D 0.1 ppm มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.82±0.04 เซนติเมตร (ตารางที่ 1และภาพที่ 1)

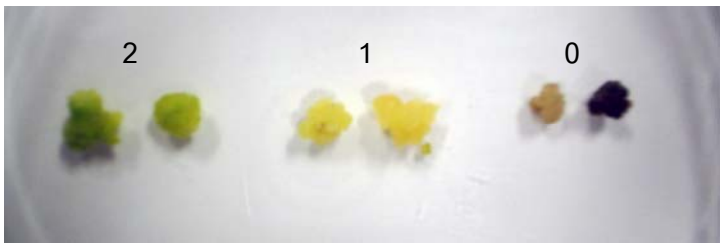
และเมื่อนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



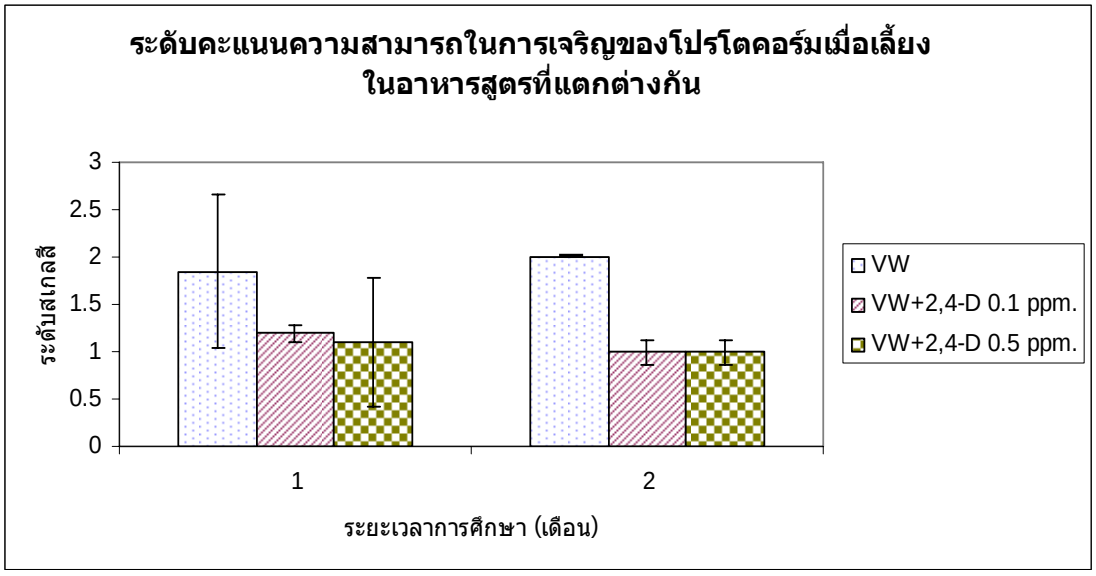
ภาพที่ 1 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW + 2,4-D 0 ppm, VW+2,4-D 0.1 ppm และ VW+2,4-D 0.5 ppm ตามลำดับ นาน 2 เดือน

2. ค่าเฉลี่ยความสามารถในการเจริญของโปรโตคอร์ม

ผลการให้คะแนนความสามารถในการเจริญของโปรโตคอร์มโดยใช้เกณฑ์การพิจารณาลักษณะสีของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* (ภาพที่ 2) พบว่าในเดือนแรกอาหารสูตร VW ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ให้ค่าคะแนนความสามารถในการเจริญสูงที่สุด คือ 1.85±0.82 คะแนน ส่วนอาหารสูตร VW+2,4-D 0.1 ppm และ VW+2,4-D 0.5 ppm ให้ผลคะแนนความสามารถในการเจริญใกล้เคียงกัน คือ 1.20±0.09 และ 1.10±0.69 คะแนน เมื่อเข้าสู่เดือนที่ 2 พบว่าอาหารสูตร VW ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D มีแนวโน้มความสามารถในการเจริญสูงขึ้น คือ 2.0±0.00 คะแนน ในขณะที่อาหารสูตร VW+2,4-D 0.1 ppm และ VW+2,4-D 0.5 ppm มีแนวโน้มความสามารถในการเจริญต่ำลง คือ 1.00±0.13 คะแนนเท่ากัน ซึ่งเห็นได้ว่าคะแนนความสามารถในการเจริญในอาหารสูตร VW ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่า คะแนนความสามารถในการเจริญของโปรโตคอร์มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 3 และตารางที่ 1)



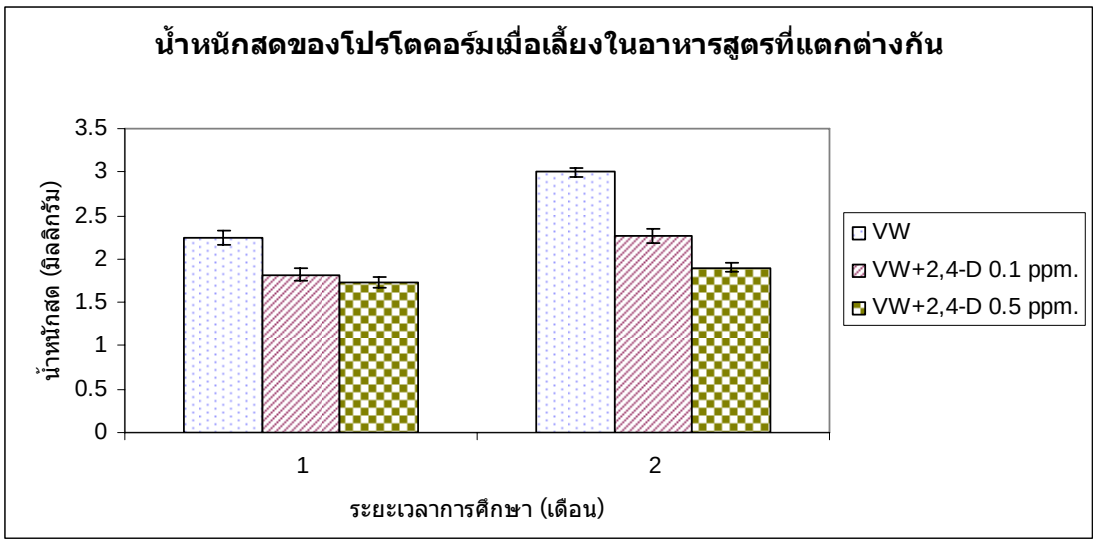
ภาพที่ 2 แสดงลักษณะสีของระดับคะแนนความสามารถในการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea*



ภาพที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยระดับคะแนนความสามารถในการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW + 2,4-D 0 ppm, VW+2,4-D 0.1 ppm และ VW+2,4-D 0.5 ppm ตามลำดับ นาน 2 เดือน

3. น้ำหนักสด (มิลลิกรัม)

ช่วงเดือนแรกพบว่าน้ำหนักสดเฉลี่ยของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 2.25±0.08 มิลลิกรัม ซึ่งมากกว่าอาหารสูตร VW+2,4-D 0.1 ppm และ VW+2,4-D 0.5 ppm ที่มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 1.82±0.07 และ 1.73±0.06 มิลลิกรัม ตามลำดับ ต่อมาในเดือนที่ 2 เริ่มเห็นว่าน้ำหนักสดมีความแตกต่างกันในอาหารสูตร VW ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D คือ 3.00±0.05 มิลลิกรัม ซึ่งมีน้ำหนักสดสูงกว่าอาหารสูตร VW+2,4-D 0.1 ppm และ VW+2,4-D 0.5 ppm อย่างชัดเจนคือ 2.27±0.08 และ 1.90±0.05 มิลลิกรัม และเมื่อนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติแล้วพบว่า น้ำหนักสดเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4 และตารางที่ 1)



ภาพที่ 4 แสดงน้ำหนักสดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW + 2,4-D 0 ppm, VW+2,4-D 0.1 ppm และ VW+2,4-D 0.5 ppm ตามลำดับ นาน 2 เดือน

ตารางที่ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโปรโตคอร์มเฉลี่ย ค่าเฉลี่ยระดับคะแนนความสามารถในการเจริญ น้ำหนักสดเฉลี่ยของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่เลี้ยงในอาหาร บนที่เติมสารอาหารควบคุมการเจริญเติบโต

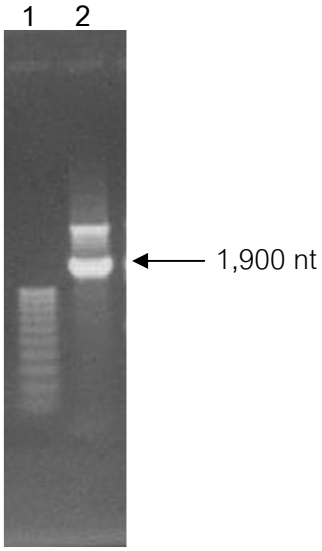
สูตรอาหาร	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโปรโตคอร์ม(เซนติเมตร)		ระดับคะแนนความสามารถในการเจริญ(คะแนนสี)		น้ำหนักสด(มิลลิกรัม)	
	เดือนที่1	เดือนที่2	เดือนที่1	เดือนที่2	เดือนที่1	เดือนที่2
vw	1.31±0.02[a]	1.61±0.04[a]	1.85 ±0.82[a]	2.00± 0.00[a]	2.25± 0.08[a]	3.00 ±0.05[a]
vw+2,4-D 0.1 ppm	0.73±0.02[c]	0.82±0.04[c]	1.20 ±0.09[b]	1.00 ±0.13[b]	1.82 ±0.07[b]	2.27 ±0.08[b]
vw+2,4-D 0.5 ppm	0.95±0.03[b]	1.02±0.05[b]	1.10± 0.69[b]	1.00 ±0.13[b]	1.73± 0.06[b]	1.90 ±0.05[b]
F test	*	*	*	*	*	*

หมายเหตุ * = มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรแตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

4.3 โครงสร้างของยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส

เพิ่มปริมาณพลาสมิด pBic BAR โดยการถ่ายพลาสมิด pBic BAR เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top10 ด้วยวิธีการทางเคมีร่วมกับการทำ heat shock (Sambrook *et al*., 1989) จากนั้นคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ได้บนอาหาร LM ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินเข้มข้น 25 mg/l แบคทีเรียที่คัดเลือกได้นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB broth ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณก่อนนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี small scale plasmid preparation (Sambrook *et al*., 1989) ตรวจสอบการปรากฏของยีนและตรวจสอบพลาสมิดที่ได้ด้วยการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า หลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

สำหรับชิ้นส่วนของยีนที่อยู่ในรูป linear ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ TbordL และ TbordR



ภาพที่ 5 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการใช้คู่ไพรเมอร์ของยีน bar (T-border primer)

เมื่อ 1 = ดีเอ็นเอมาตรฐาน

2 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอ pBIC BAR

จากภาพพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณชิ้นยีน *bar* ทั้งชุด ด้วยความจำเพาะขนาดประมาณ 1,900 นิวคลีโอไทด์ ส่วนของดีเอ็นเอดังกล่าว ใช้เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นในการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ต่อไป

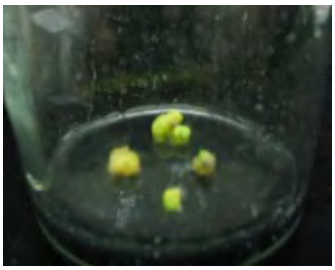
4.4 ผลของยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส (Bialaphos ; Basta TX®) **ต่อโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ** *Rhynchostylis gigantea* **และขนาดความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้เป็นดัชนีวัดความสามารถในการต้านทาน**

นำแคลลัสที่ได้จากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร ไปทดสอบความต้านทานต่อยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส โดยการนำแคลลัสที่วัดขนาดแล้วมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร VW ที่เติมสารละลายยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสความเข้มข้นต่างกัน 6 ระดับ ได้แก่ 0, 5, 20, 50 และ 100 ppm

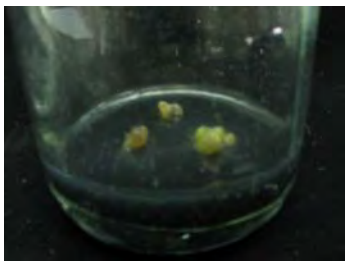
ผลการทดลองพบว่า ในระยะ 7 วันแรกของการทดสอบพบว่าอาหารสูตร VW ที่เติมสารละลายยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสความเข้มข้น 0, 5, 20, 50 และ 100 ppm จะพบว่าเนื้อเยื่อตายลงโดยเนื้อเยื้อจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีขาวหรือสีน้ำตาลในขณะที่อาหารที่ไม่เติมสารละลายยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสจะพบเนื้อเยื้อเป็นสีเขียวเช่นเดิม

ภายหลังจาก 1 สัปดาห์ เนื้อเยื่อยังคงตายลงเรื่อยๆ ชิ้นที่รอดก็จะเปลี่ยนสีเป็นสีเขียวอมเหลืองและมีบางส่วนกลายเป็นสีน้ำตาล จากภาพที่ 6 จะแสดงให้เห็นว่าอาหารสูตร VW ที่มีสารละลายยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสที่ระดับความเข้มข้น 5 ppm จะทำให้แคลลัสตายได้เล็กน้อย ส่วนที่ความเข้มข้น 20, 50 และ 100 ppm จะทำให้แคลลัสตายได้จำนวนมากกว่า 50 % โดยที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm แคลลัสจะตายมากที่สุด

0 ppm



5 ppm

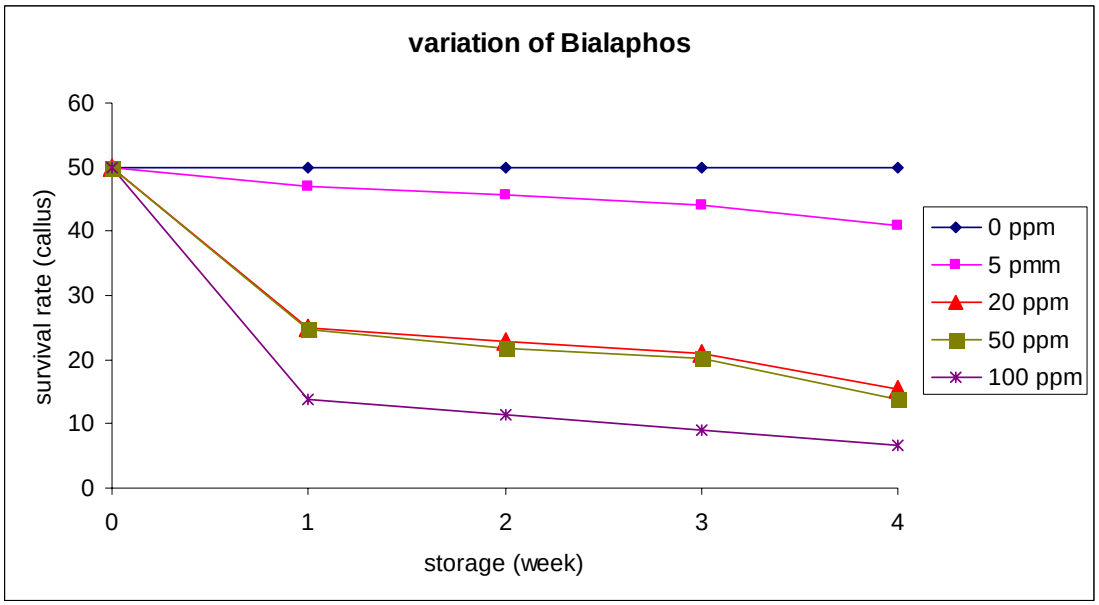


20 ppm

50 ppm

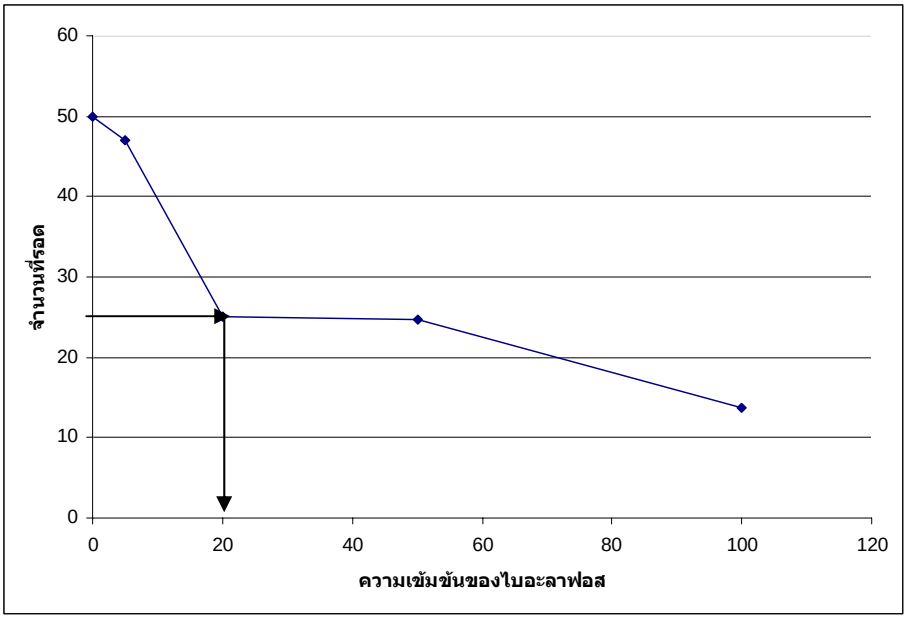
100 ppm

ภาพที่ 6 ผลของความเข้มข้นของยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสต่อความสามารถในการอยู่รอดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea*



ภาพที่ 7 ผลของยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส (Bialaphos ; Basta TX®) ต่ออัตราการอยู่รอดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทดสอบความเหมาะสมในการใช้เป็นดัชนีวัดความสามารถในการต้านทาน

เมื่อนำอัตราการตายที่ความเข้มข้นของสารละลายยาปราบวัชพืชต่างกันมาหาความสัมพันธ์ควบคู่ไปกับการหาความเข้มข้นที่มีอัตราการตาย 50 % (LD_{50}) พบว่าเป็นดังภาพที่ 8



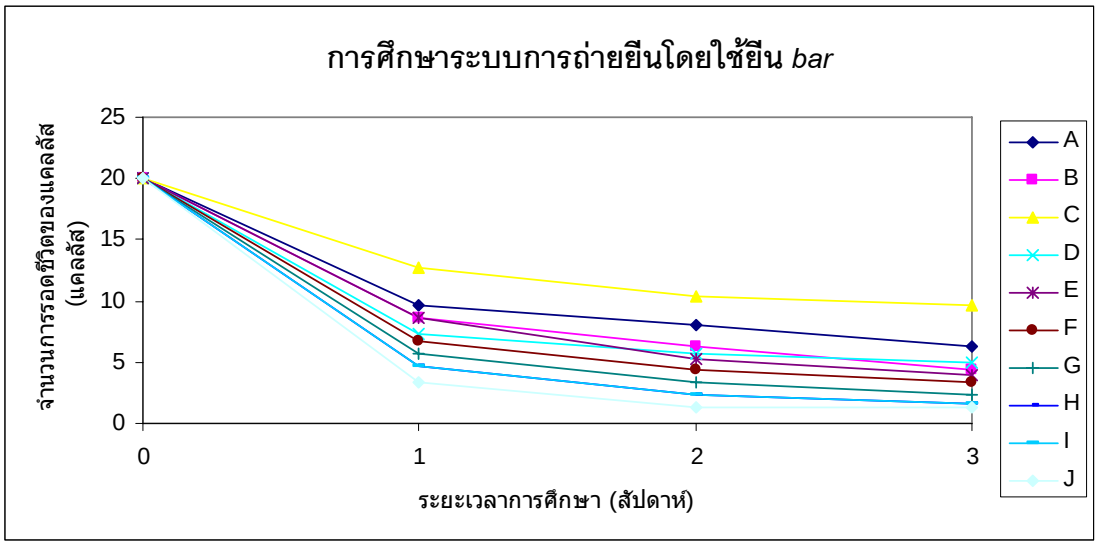
ภาพที่ 8 อัตราการตายของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ทดสอบจากความสามารถในการต้านทานต่อสารละลายยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสและหาค่าอัตราการตายที่ 50%

จากกราฟระดับความเข้มข้นของยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสที่มีความเหมาะสมในการใช้เป็นดัชนีวัดความสามารถในการต้านทานต่อยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสในกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ได้รับการถ่ายยีน ดูได้จากค่า LD_{50} (lethal dose 50) พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ เนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ในยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสที่ระดับความเข้มข้น 20 ppm มีอัตราการตายใกล้เคียง 50 % ของจำนวนเนื้อเยื่อที่ใช้ทดสอบทั้งหมด

4.5 การถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสเข้าสู่กล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea*

1. ผลการศึกษาระดับปริมาณของ PEG 6000 และระยะเวลาที่เหมาะสมในการผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 50 โวลท์

จากการศึกษาระบบการถ่ายยีนเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสในกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* โดยทำการแปรผันระดับปริมาณ PEG 6000 ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ ได้แก่ 0%, 1%, 2.5%, 5% และ 10% และมีปริมาณดีเอ็นเอคงที่ 10 μg/ml จากนั้นผ่านสนามไฟฟ้าที่ระดับ 50 โวลท์ แปรผันระยะเวลาเป็น 2 ระดับ ได้แก่ 20 และ 40 วินาที ผ่านการคัดเลือกในอาหาร VW ที่มียาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส 20 ppm พบว่าในสัปดาห์แรก ทุกสภาวะมีอัตราการตายของแคลลัสมาก แต่ภายหลังจากสัปดาห์ที่ 1 พบว่าแคลลัสมีอัตราการตายลดลง (ภาพที่ 9) เมื่อนำจำนวนแคลลัสที่อยู่รอดในสัปดาห์ที่ 3 มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบผลทางสถิติ พบว่าในภาวะ C (1% PEG 6000 + $CaCl_2$ 1 mM ร่วมกับการผ่านสนามไฟฟ้าที่ 50 โวลท์ เป็นเวลา 20 วินาที) มีจำนวนแคลลัสที่รอดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากภาวะอื่น จึงเลือกใช้ภาวะนี้เป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการถ่ายยีน (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 9 ศึกษาระดับปริมาณของ PEG 6000 และระยะเวลาที่เหมาะสมในการผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 50 โวลท์ โดยใช้ยีน *bar* เป็นต้นแบบ และคัดเลือกโดยใช้ยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส

เมื่อ A = 0% PEG 6000 +$CaCl_2$ 1 mM ร่วมกับการผ่านสนามไฟฟ้า 20 วินาที

B = 0% PEG 6000 +$CaCl_2$ 1 mM ร่วมกับการผ่านสนามไฟฟ้า 40 วินาที

C = 1% PEG 6000 +$CaCl_2$ 1 mM ร่วมกับการผ่านสนามไฟฟ้า 20 วินาที

D = 1% PEG 6000 +$CaCl_2$ 1 mM ร่วมกับการผ่านสนามไฟฟ้า 40 วินาที

E = 2.5% PEG 6000 +$CaCl_2$ 1 mM ร่วมกับการผ่านสนามไฟฟ้า 20 วินาที

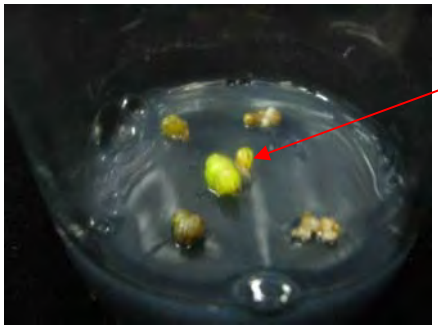
F = 2.5% PEG 6000 +$CaCl_2$ 1 mM ร่วมกับการผ่านสนามไฟฟ้า 40 วินาที

G = 5% PEG 6000 +$CaCl_2$ 1 mM ร่วมกับการผ่านสนามไฟฟ้า 20 วินาที

H = 5% PEG 6000 +$CaCl_2$ 1 mM ร่วมกับการผ่านสนามไฟฟ้า 40 วินาที

I = 10% PEG 6000 +$CaCl_2$ 1 mM ร่วมกับการผ่านสนามไฟฟ้า 20 วินาที

J = 10% PEG 6000 +$CaCl_2$ 1 mM ร่วมกับการผ่านสนามไฟฟ้า 40 วินาที



ภาพที่ 10 เนื้อเยื่อแคลลัสของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส

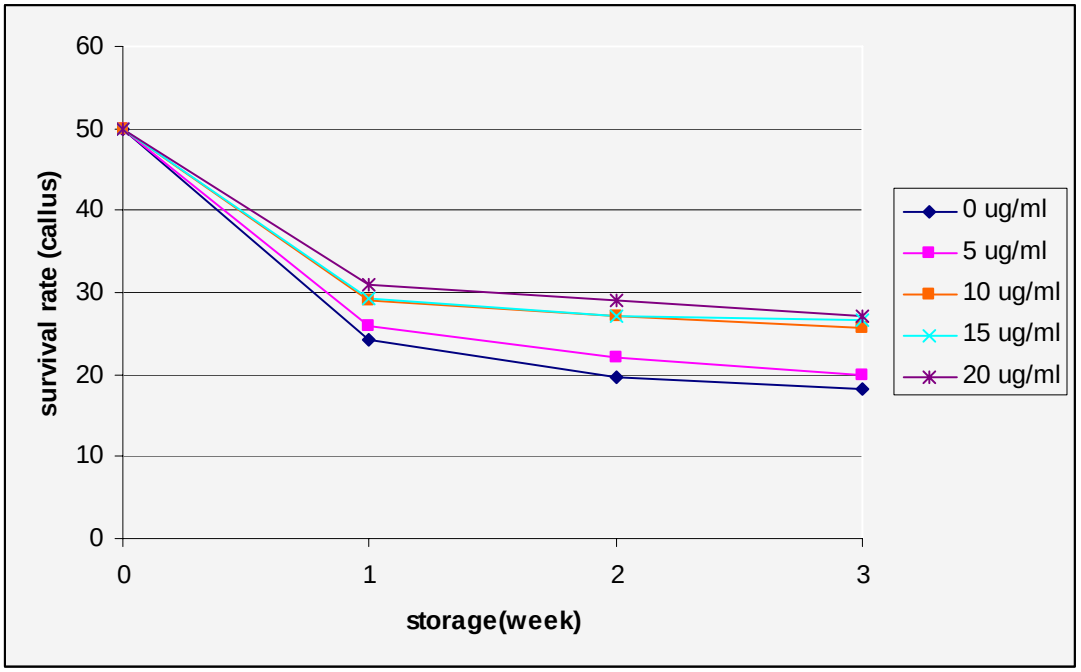
2. **ผลการศึกษาระดับปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม**

เมื่อทำการกำหนดระดับปริมาณของ PEG 6000 และระยะเวลาในการผ่านสนามไฟฟ้าที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการถ่ายยีนด้วยภาวะดังกล่าวและทำการแปรผันระดับปริมาณดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 0, 5, 10, 15 และ 20 μg/ml และคัดเลือกในอาหารสูตร VW ที่มียาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสความเข้มข้น 20 ppm พบว่าแคลลัสตายเป็นจำนวนมากในสัปดาห์แรกและตายน้อยลงใน 2 สัปดาห์ต่อมาเมื่อนำจำนวนแคลลัสที่อยู่รอดในสัปดาห์ที่ 3 มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบผลทางสถิติพบว่า สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ที่มีค่าเฉลี่ยภายในกลุ่มไม่แตกต่างกันแต่มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ระดับปริมาณของดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 0 และ 5 μg/ml

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ระดับปริมาณของดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 10,15 และ 20 μg/ml

จากการเปรียบเทียบทางสถิติของจำนวนแคลลัสที่รอดในภาวะการถ่ายยีนที่มีระดับปริมาณของดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 10 μg/ml เป็นระดับปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมที่สุดในการถ่ายยีนในแต่ละครั้งได้ (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ศึกษาระดับปริมาณของดีเอ็นเอที่เหมาะสมโดยคัดเลือกบนยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส

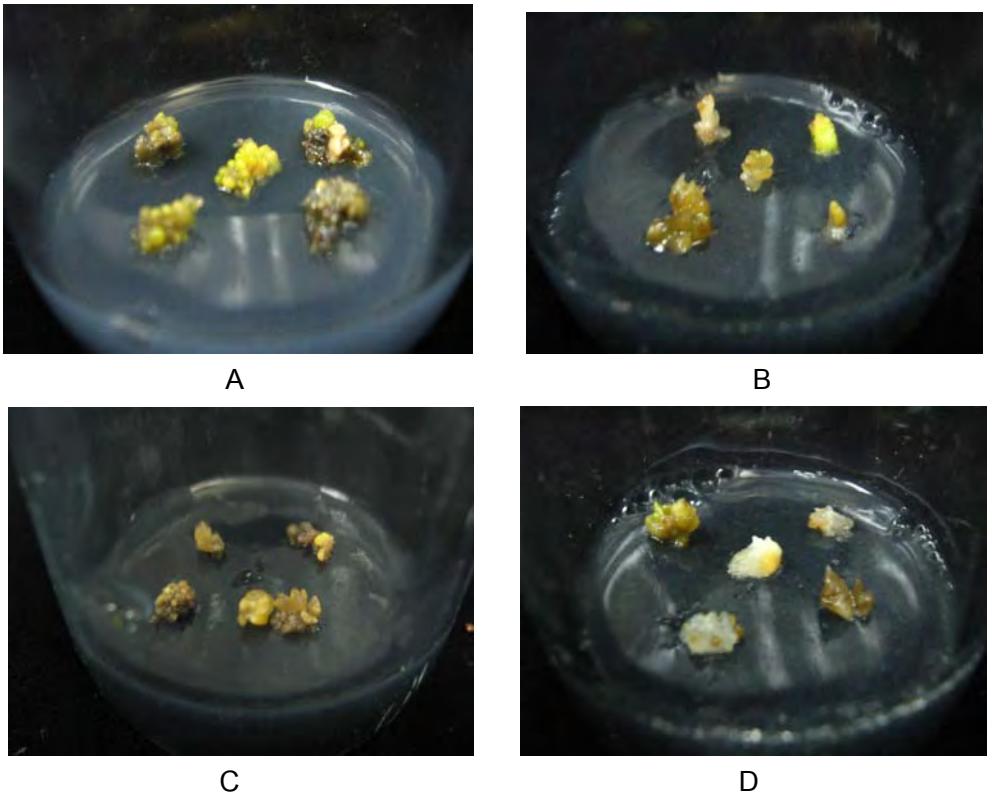
3. ผลการตรวจสอบภาวะที่มีหรือไม่มีเอ็นไซม์จำเพาะ

เมื่อทำการกำหนดระดับปริมาณของ PEG 6000 และระยะเวลาในการผ่านสนามไฟฟ้า ระดับปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม คือ ระดับปริมาณ PEG 6000 ที่ความเข้มข้น 1%+$CaCl_2$ 1 mM ร่วมกับการผ่านสนามไฟฟ้าที่ระดับ 50 โวลท์ เป็นเวลา 20 วินาที และระดับปริมาณดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 10 μg/ml และคัดเลือกในอาหารสูตร VW ที่มียาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสความเข้มข้น 20 ppm จากนั้นศึกษาระบบการถ่ายยีนเพื่อศึกษาภาวะที่มีหรือไม่มีเอนไซม์ระดับหน่วยความเข้มข้นต่ำโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด ได้แก่ *Eco*RI, *Bam*H I และ *Pst* I 5U/ml มาตัดจีโนมดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* พบว่า แคลลัสตายลงเป็นจำนวนมากในสัปดาห์แรก และต่อเนื่องในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 เมื่อนำจำนวนแคลลัสที่อยู่รอดในสัปดาห์ที่ 3 มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบผลทางสถิติพบว่า สามารถแบ่งแคลลัสได้เป็น 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีค่าเฉลี่ยภายในกลุ่มไม่แตกต่างกันแต่มีค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มต่างกันชัดเจน ได้แก่

กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่จีโนมดีเอ็นเอที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่จีโนมดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Eco*RI, *Bam*H I และ *Pst* I 5U/ml

จากการเปรียบเทียบทางสถิติของแคลลัสที่รอดในภาวะการถ่ายยีนที่มีจีโนมดีเอ็นเอที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะให้ผลที่ดีกว่าภาวะที่มีจีโนมดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด (ภาพที่ 12 และ 13)



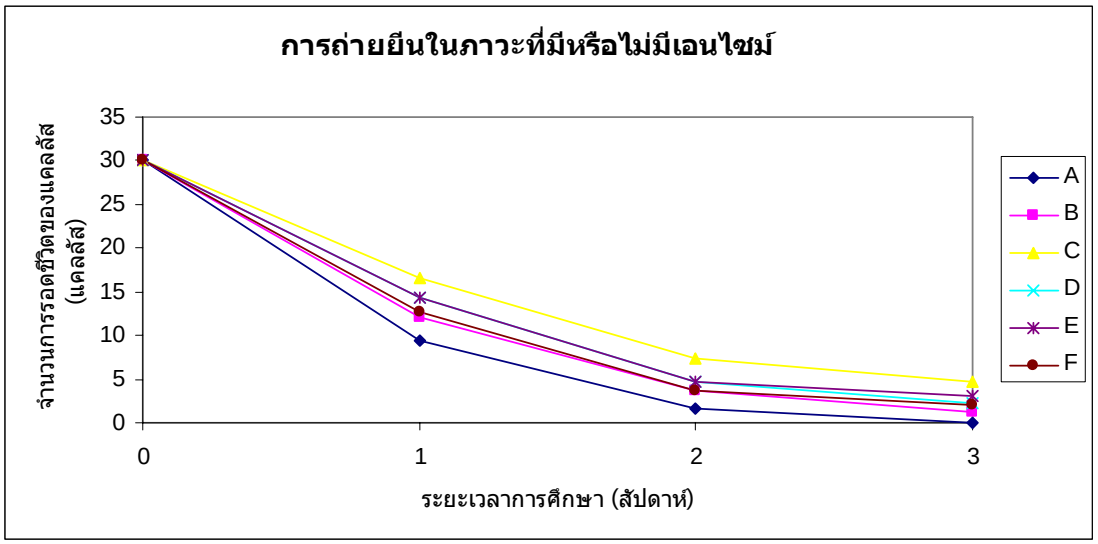
ภาพที่ 12 เนื้อเยื่อแคลลัสของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ได้รับการถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสในภาวะที่มีหรือไม่มีเอ็นไซม์จำเพาะ

เมื่อ A = ภาวะที่จีโนมดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ

B = ภาวะที่จีโนมดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Eco*RI 5U/ml

C = ภาวะที่จีโนมดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Bam*H I 5U/ml

D = ภาวะที่จีโนมดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Pst* I 5U/ml



ภาพที่ 13 การศึกษาการถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสในภาวะที่มีหรือไม่มีเอ็นไซม์จำเพาะ

เมื่อ A = ภาวะที่ไม่มีจีโนมดีเอ็นเอ (ชุดควบคุม)

B = ภาวะที่จีโนมดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ + ดีเอ็นเอ 10 μg/ml

C = ภาวะที่จีโนมดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ

D = ภาวะที่จีโนมดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Bam*H I 5U/ml + ดีเอ็นเอ 10 μg/ml

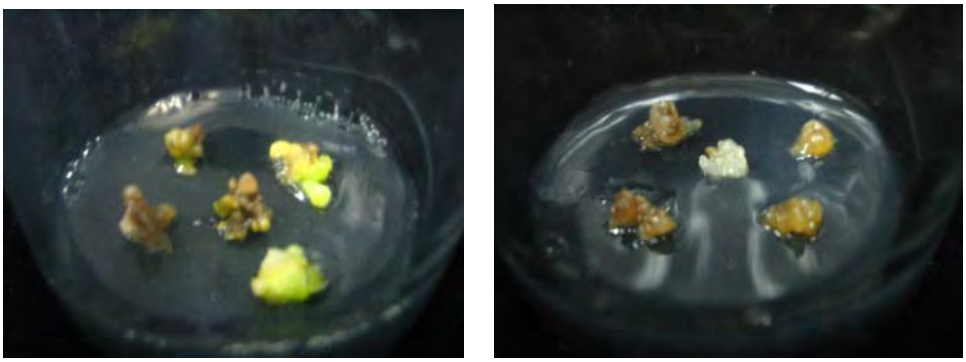
E = ภาวะที่จีโนมดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Eco*RI 5U/ml + ดีเอ็นเอ 10 μg/ml

F = ภาวะที่จีโนมดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Pst* I 5U/ml + ดีเอ็นเอ 10 μg/ml

4. ผลของประสิทธิภาพในการถ่ายยีนในภาวะที่มีหรือไม่มีจีโนมดีเอ็นเอ

เริ่มจากการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* โดยวิธี CTAB นำจีโนมดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ได้มาตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะ *Eco*R I โดยใช้ระดับปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับระดับปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมาย และบ่มปฏิกิริยาที่ 37 ^{0}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ของจีโนมดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะที่ใช้ในการทดลองที่ผ่านมามาทำให้บริสุทธิ์ด้วย RBC Column (Real Biotech

Corp, USA) นำดีเอ็นเอที่ได้มาผสมในสารละลาย 10 mM Tris HCl, pH 7.5 ที่มี $CaCl_2$ 1 mM และใช้เงื่อนไขในการถ่ายยีนเช่นเดียวกับที่ได้ดำเนินการในตอนที่ผ่านมา สำหรับการทดสอบภาวะที่ให้หรือไม่ให้เอนไซม์จำเพาะต่อการย่อยผนังเซลล์บางส่วนในปฏิกิริยา ดำเนินการทดลองโดยใช้ระบบปริมาตร 5 ml ในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 10 mM Tris HCl, pH 7.5 ที่มี PEG ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่หาได้จากการทดลองแรกและ $CaCl_2$ ความเข้มข้น 1 mM และดีเอ็นเอความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองแรกโดยเริ่มจากการนำแคลลัสที่ได้มาใส่ในสารละลายที่มีหรือไม่มีเอนไซม์จำเพาะ *Eco*R I ความเข้มข้น ที่ 5 U/ml บ่มปฏิกิริยา 10 นาที จากนั้นล้างเอนไซม์บางส่วนออกและเปลี่ยนบัฟเฟอร์ให้เป็นสารละลาย 0.4 M Mannitol ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 1 mM และ PEG ความเข้มข้นที่เหมาะสมและถ่ายยีนด้วยภาวะที่ใช้ทดลองข้างต้น พบว่า ในสัปดาห์แรกแคลลัสทั้งในภาวะที่มีและไม่มีจีโนมดีเอ็นเอมีการตายลงเป็นจำนวนมาก แต่ในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 พบว่า ในภาวะที่มีจีโนมดีเอ็นเอมีจำนวนแคลลัสที่อยู่รอดมากกว่าในภาะที่ไม่มีจีโนมดีเอ็นเอ (ภาพที่ 14) เมื่อนำจำนวนแคลลัสที่อยู่รอดในสัปดาห์ที่ 3 มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบผลทางสถิติพบว่า จำนวนแคลลัสที่รอดชีวิตในภาวะการถ่ายยีนที่มีจีโนมดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ให้ผลที่ดีกว่าภาวะที่ไม่มีจีโนมดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* (ภาพที่ 14 และ 15)

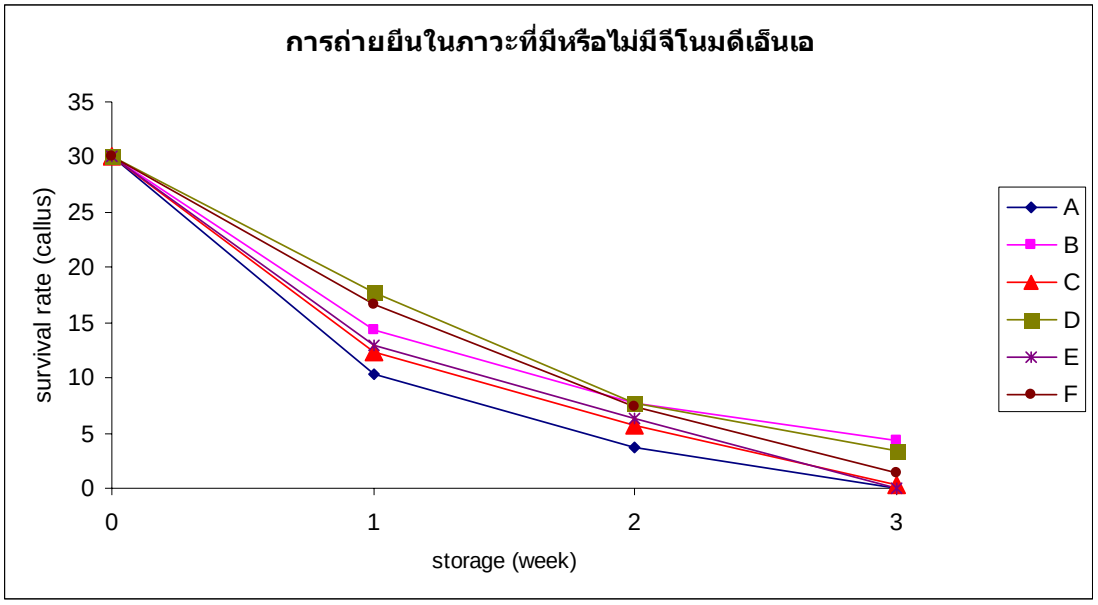


A B

ภาพที่ 14 เนื้อเยื่อแคลลัสของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ได้รับการถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสในภาวะที่มีหรือไม่มีจีโนมดีเอ็นเอ

เมื่อ A = ภาวะที่มีจีโนมดีเอ็นเอ

B = ภาวะที่ไม่มีจีโนมดีเอ็นเอ



ภาพที่ 15 ศึกษาการถ่ายยีนในภาวะที่มีหรือไม่มีจีโนมดีเอ็นเอ

เมื่อ A = แคลลัสปกติ (ชุดควบคุม)

B = แคลลัสปกติ + จีโนมดีเอ็นเอ

C = แคลลัสที่ถูกย่อยผนังเซลล์บางส่วน + จีโนมดีเอ็นเอตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Eco*RI 5U/ml

D = แคลลัสที่ถูกย่อยผนังเซลล์บางส่วน + จีโนมดีเอ็นเอตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Eco*RI 5U/ml + จีโนมดีเอ็นเอ

E = แคลลัสที่ถูกย่อยผนังเซลล์บางส่วน + จีโนมดีเอ็นเอไม่ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Eco*RI 5U/ml

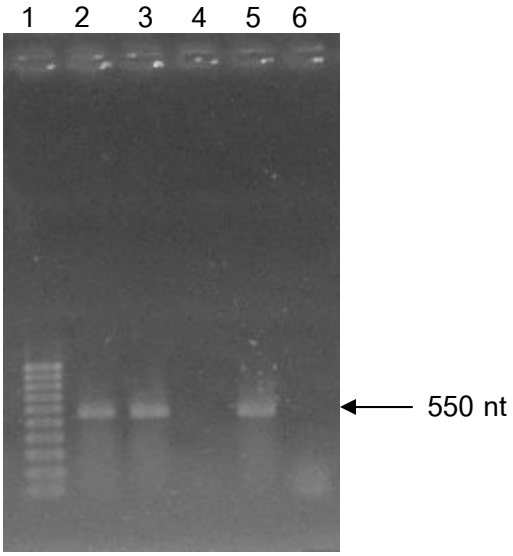
F = แคลลัสที่ถูกย่อยผนังเซลล์บางส่วน + จีโนมดีเอ็นเอไม่ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Eco*RI 5U/ml + จีโนมดีเอ็นเอ

4.6 การตรวจสอบและประเมินผลสภาวะการถ่ายยีนโดยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

1. ผลการตรวจสอบการปรากฏของจีโนมดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำชิ้นส่วนแคลลัสที่ต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสไปตรวจสอบการปรากฏของยีน *bar* ต่อโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลโดยเริ่มจากากรสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นนำดีเอ็นเอไปตรวจสอบการปรากฏของยีน *bar* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจง และนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มาแยกในสนามไฟฟ้า พบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 550 นิวคลีโอไทด์

ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดสอดคล้องกับดีเอ็นเอที่ใช้เป็นมาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีขนาดเท่ากันกับขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ในชุดควบคุมบวก โดยที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *bar* จากต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่16)



ภาพที่ 16 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการใช้ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ได้รับการถ่ายยีนเป็นต้นแบบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอชุดควบคุม

เมื่อ 1 = ดีเอ็นเอมาตรฐาน

2 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอ pBIC BAR

3 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากจีโนมดีเอ็นเอกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBICBAR (ตัวอย่างที่ 1)

4 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากจีโนมดีเอ็นเอกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBICBAR (ตัวอย่างที่ 2)

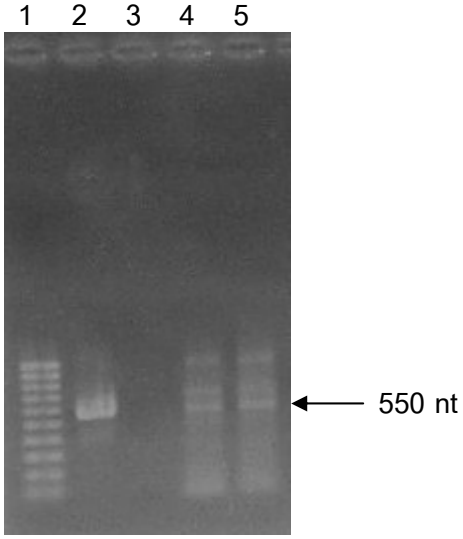
5 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากจีโนมดีเอ็นเอกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBICBAR (ตัวอย่างที่ 3)

6 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากจีโนมดีเอ็นเอกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBICBAR

2. ผลการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *bar*

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *bar* ในกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* โดยวัดจากระดับการสังเคราะห์ mRNA ของยีน *bar* ที่ถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantean* โดยสกัดอาร์เอ็นเอจากชิ้นเนื้อเยื่อที่ต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสโดยใช้สารละลาย Trizol™ (Invitrogen, USA) นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาตกตะกอนซ้ำด้วยสารละลาย 8 M LiCl (Sambrook *et al.*,1989) สกัดอาร์เอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยการใส่ด้วย RNase free DNase ตรวจสอบอาร์เอ็นเอโดยทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่เฉพาะต่อ *bar* mRNA

พบว่าชิ้นเนื้อเยื่อที่ต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสมีการสังเคราะห์ mRNA เนื่องจากการตรวจพบขนาดของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดเท่ากันกับขนาดดีเอ็นเอของชุดควบคุม ผลการทดลองบ่งชี้ให้เห็นถึงความสำเร็จในการถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสเข้าสู่เนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี RT-PCR

เมื่อ 1 = ดีเอ็นเอมาตรฐาน

2 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอ pBIC BAR

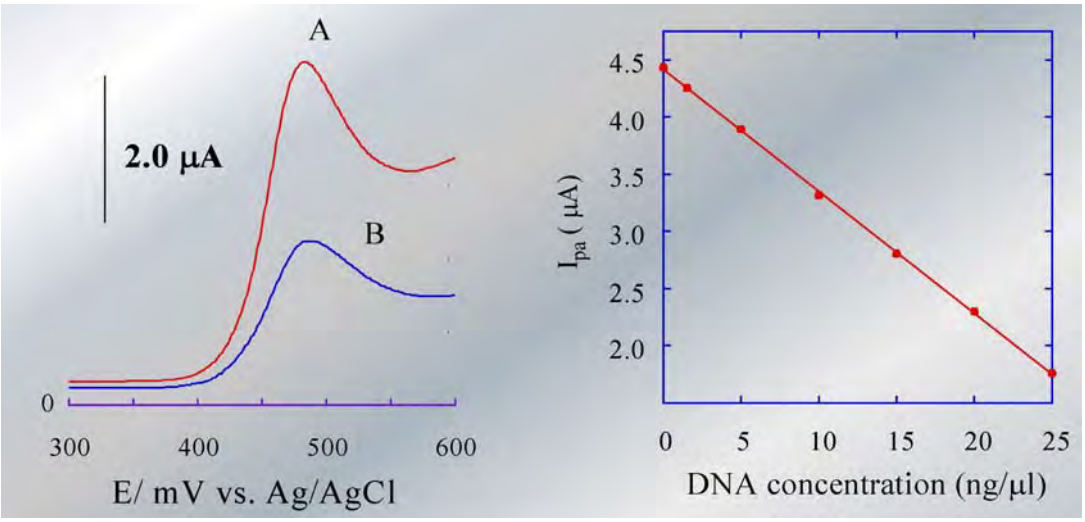
3 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากจีโนมดีเอ็นเอกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยพลาสมิด pBIC BAR

4 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากจีโนมดีเอ็นเอกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBIC BAR (ตัวอย่างที่ 1)

5 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากจีโนมดีเอ็นเอกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBIC BAR (ตัวอย่างที่ 3)

3. ผลการวัดระดับการแสดงออกของยีน *bar* ด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์

การวัดระดับการแสดงออกของยีน *bar* อยู่บนพื้นฐานของหลักการทางไบโอเซ็นเซอร์โดยการทำปฏิกิริยาระหว่างผลิตภัณฑ์ cDNA ที่ได้จากการแสดงออกของยีน *bar* ซึ่งได้จาก RT-PCR กับ minor groove binder Hoechst 33258 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ช่วยแปลงสัญญาณดีเอ็นเอให้อยู่ในรูปแบบที่สามารถตรวจสอบวัดการเปลี่ยนแปลงของอิเลคตรอนอิสระได้ โดยระดับปริมาณ cDNA จะแปรผกผันกับการเปลี่ยนแปลงทางกระแสไฟฟ้า รูปค่า anodic current peak ผลการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าในรูป voltrametrograme เป็นดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 ลักษณะของการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าในรูป anodic current peak

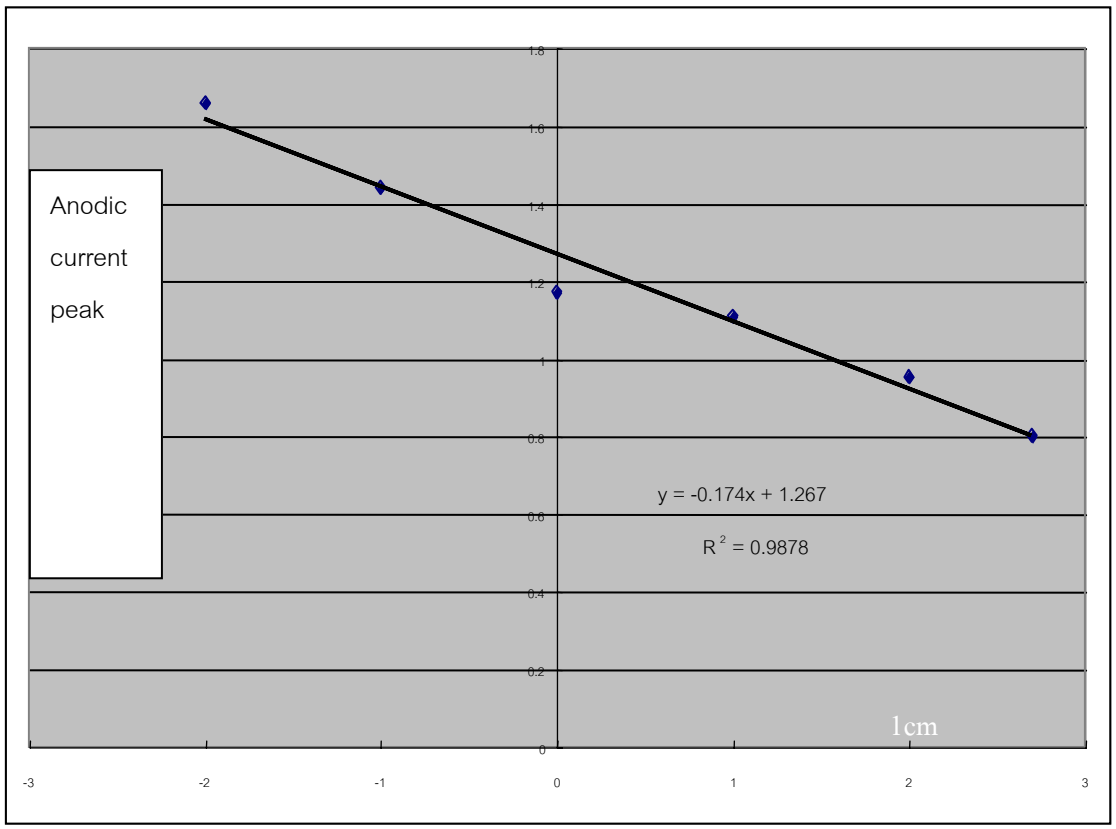
จากภาพที่ 18 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัด ซึ่งกราฟทางด้านซ้ายแสดงปริมาณของดีเอ็นเอที่ตรวจวัดโดย A แทน ตัวอย่างของดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยเมื่อตรวจวัดจะได้ค่ากระแสไฟฟ้าที่สูง ในทางกลับกัน B แทน ตัวอย่างของดีเอ็นเอที่มีปริมาณมากเมื่อตรวจวัดจะได้ค่ากระแสไฟฟ้าที่ต่ำลง ส่วนกราฟทางด้านขวา เป็นการเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอกับค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัดจะพบว่า ค่าของกระแสไฟฟ้าแปรผกผันกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ถ้าความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาก ค่าการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าในรูป anodic current peak ต่ำ แต่ในทางกลับกันถ้าดีเอ็นเอมีน้อย ทำให้ค่าการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าสูงขึ้น

การตรวจวัดการแสดงออกของยีน *bar* ในเนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* จะทำให้ได้ค่า anodic current peak ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่า anodic current peak ของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea*

ตัวอย่างที่	ค่า anodic current peak (Anodic current peak μA)
1	1.41
3	1.24

การตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่า anodic current peak ของยีน *bar* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อวัดโดยหลักการ voltammetry เป็นดังสมการ y (Tyr)= -0.174x+2.167 เมื่อ x เป็นค่า log ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (จำนวน copy) และ y เป็นค่า anodic current peak (μA) ดังภาพที่ 19



ภาพที่ 19 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอและค่า anodic current peak ของยีน *bar*

ค่า anodic current peak มีความสัมพันธ์ผกผันกับความเข้มข้น โดยเมื่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอมากค่า anodic current peak จะมีค่าน้อย และความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่น้อยจะได้ค่า anodic current peak มาก เมื่อนำค่า anodic current peak ที่ได้มาคำนวณหาจำนวนชุดของดีเอ็นเอจะได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 จำนวนชุดของดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea*

ตัวอย่างที่	จำนวนชุดของดีเอ็นเอ
1	116460.8
3	132427.2

จากตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่า จำนวนชุดของดีเอ็นเอในตัวอย่างแคลลัสกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ได้รับยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสตัวอย่างที่ 3 มีจำนวนชุดของดีเอ็นเอมากกว่าในตัวอย่างที่ 1

การศึกษาการแสดงออกของยีน *bar* ในครั้งนี้เลือกใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบได้ง่าย รวดเร็วและไม่ต้องใช้ประสบการณ์มากในการตรวจสอบ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร VW ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (2, 4-D) สามารถชักนำให้เมล็ดกล้วยไม้เจริญจากโปรโตคอร์มที่เป็นก้อนกลม ขณะเดียวกันสูตรอาหารดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสจากโปรโตคอร์มในปริมาณที่มากกว่าสูตรอาหารเดียวกันที่แปรผันระดับปริมาณของการควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 0.1 ppm โปรโตคอร์มที่ได้มีความสามารถในการเจริญเติบโตดี พิจารณาจากสี น้ำหนักสด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของชิ้นเนื้อเยื่อ และการเจริญภายหลังจากที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร VW เป็นเวลานาน 2-3 เดือน ซึ่งทำให้ได้วัสดุวิจัยที่ใช้เป็นวัสดุวิจัยเบื้องต้นในการถ่ายยีน

ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าภายหลังจากที่เมล็ดงอกจนได้เป็นโปรโตคอร์ม ส่วนของโปรโตคอร์มยังคงมีความสามารถในการสร้างสัดส่วนออกซินและไซโตไคนินที่เหมาะสม โดยไม่จำเป็นต้องได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 ชนิดจากภายนอก อย่างไรก็ดีจากการทดลองหากทิ้งโปรโตคอร์มไว้ในสูตรอาหาร VW นานเกินกว่า 3 เดือน แคลลัสมีแนวโน้มพัฒนาไปเป็นโปรโตคอร์ม และเป็นต้นอ่อนในท้ายที่สุด

การศึกษาในเบื้องต้นต่อความสามารถในการต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสในอาหารสูตร VW ของแคลลัสก่อนการถ่ายยีน พบว่ายาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสมีผลกระทบโดยตรงต่อการเจริญของแคลลัส ซึ่งสังเกตได้จากการเปลี่ยนสี และการตายของชิ้นเนื้อเยื่อ แม้ใน 7 วันแรกหลังการให้ชุดการทดลอง โดยพบว่าระดับความเข้มข้นของไบอะลาฟอสที่ทำให้แคลลัสมีอัตราการตาย 50% หรือ LD_{50} อยู่ที่ชุดการทดลองที่ให้ความเข้มข้นของสารละลายยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสที่ระดับ 20 ppm อัตราความเข้มข้นดังกล่าวจะใช้เป็นอัตรามาตรฐานคัดเลือกในการทดลองต่อไป

ผลการทดลองดังกล่าวคล้ายกับผลการทดลองที่ปาลิตา แปวไธสง (2550) ได้รายงานไว้เกี่ยวกับระดับปริมาณของยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสที่เหมาะสมในการคัดเลือกในพืช *Peperomear pellucida* ที่ระดับความเข้มข้น 20 ppm เช่นเดียวกัน ระดับปริมาณยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกเดียวกันนี้ ยังสอดคล้องกับที่มีรายงานไว้ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในพืชชนิดอื่น เช่น ในข้าวสายพันธุ์ Japonica Indica และข้าวโพด (Uchimiya *et al*., 1993)

ในการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสที่ได้จากโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ชุดของดีเอ็นเอซึ่งเป็นโครงสร้าง Linear Double Strand DNA ได้จากการเพิ่มปริมาณ

ของชิ้นดีเอ็นเอ pBIC BAR โดยเทคนิค PCR โครงสร้างดังกล่าวจะประกอบด้วย 35S promoter ยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส และ 35S terminator ชุดยีนดังกล่าวเป็นโครงสร้างที่ปลอดจากแขนของพลาสมิดสอดคล้องกับที่ Fu *et al*. (2000) ได้รายงานเกี่ยวกับรูปแบบของโครงสร้างพลาสมิดที่ช่วยให้การถ่ายยีนมีประสิทธิภาพมากขึ้น

เนื่องจากการถ่ายยีนโดยการใช้กระแสไฟฟ้าแรงเคลื่อนไฟฟ้าต่ำไม่เคยดำเนินการในกล้วยไม้มาก่อน การตรวจสอบระดับที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญ ผลการทดลองทำให้ทราบว่า การถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* สามารถทำได้โดยใช้ระดับปริมาณของ PEG6000 ที่ 1% และสนามไฟฟ้าที่มีแรงเคลื่อนไฟฟ้า 50 โวลท์ ระยะเวลา 20 วินาที และปริมาณดีเอ็นเอ 10 μg/ml ซึ่งที่ระดับปัจจัยในชุดการทดลองดังกล่าวจะให้แคลลัสที่สามารถต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสสูงสุด ระดับปริมาณของแคลลัสที่ให้ส่วนของเนื้อเยื่อที่มีความสามารถในการต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส สามารถสังเกตการเจริญเติบโตชัดเจนสูงถึง 15 แคลลัส จากจำนวนแคลลัสในชุดการทดลองทั้งหมด 2,250 แคลลัส หรือคิดเป็น 1% โดยปกติการถ่ายยีนเข้าสู่พืชจะมีโอกาสที่ชิ้นส่วนของพืชจะได้รับยีนและมีการแสดงออกอยู่ที่ประมาณ 10^{-3} หรือ 0.1% จะเห็นได้ว่าการถ่ายยีนโดยการใช้โครงสร้างที่เป็น Linear Double Strand DNA ร่วมกับการใช้สนามไฟฟ้าแรงเคลื่อนไฟฟ้าต่ำมีประสิทธิภาพดีกว่าเกณฑ์เฉลี่ย

ส่วนการทดสอบการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากจีโนมของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ร่วมกับปัจจัยต่างๆ ในตอนต้น พบว่า การเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงขึ้นกว่าไม่ใส่ชิ้นจีโนมดีเอ็นเออย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าการตัดจีโนมดีเอ็นเอเพียงแค่บางส่วน (partial digestion) ด้วยเอ็นไซม์ต่างชนิด ได้แก่ *Bam*H I *Eco*R I และ *Pst* I ไม่ก่อให้เกิดความแตกต่างในการเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนแต่อย่างใด ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นพฤติกรรมของเซลล์และเนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ที่ตอบสนองการถ่ายยีนร่วมกับการผสมจีโนมดีเอ็นเอเป็นไปในรูปแบบเดียวกันกับเซลล์ของราชนิดต่างๆ และแตกต่างไปจากพฤติกรรมของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Manivasakam *et al.,* 2001) อย่างไรก็ดี การตัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์จำเพาะกลับไม่มีผล ซึ่งต่างไปจากที่พบในยีสต์ (Schiestl *et al*., 1994) ซึ่งไม่เป็นที่ทราบเหตุผล

โดยทั่วไปพบว่า การใส่จีโนมดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ต่างชนิดบริเวณปลายของจุดตัดจะไปมีผลต่อการเกิด non homologous recombination โดยบริเวณจุดตัดจะกระตุ้นให้เกิด end joining (Manivasakam *et al.,* 1998) อย่างไรก็ดีผลดังกล่าวมีความแตกต่างจากราชนิดต่างๆ ตรงที่รูปแบบการตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะกลับไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีน นอกจากนี้จากผลการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่ใส่เอ็นไซม์จำเพาะเข้าไปย่อยจีโนมของกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ในภาวะที่เป็นแคลลัสก่อนการถ่ายยีนไม่ช่วยทำให้การถ่ายยีนมี

ประสิทธิภาพสูงขึ้น กลับทำให้แคลลัสมีอัตราการรอดลดลง เอ็นไซม์จำเพาะอาจย่อยจีโนมดีเอ็นเอของกล้วยไม้จนเกินกว่าจะซ่อมแซมด้วยกลไก DNA repair ได้

จากการศึกษาของ Fu *et al*. (2000) ใช้เทคนิค particle bombardment และสารเคมีในการถ่ายยีน Linear fragment ของยีน *bar* ที่ไม่มีส่วนโครงสร้างของดีเอ็นเอพาหะเข้าสู่ *bar* พบว่าสามารถถ่ายยีนได้อย่างดี

การถ่ายยีนในภาวะที่ไม่มีส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอจะช่วยให้เกิดการแทรกตัวแบบ low copy number ที่เป็นรูปแบบอย่างง่ายและเป็นที่ต้องการ นอกจากนี้ การทดลองเดียวกันยังพบว่าการถ่ายยีนในรูปแบบพลาสมิดในรูป supersonic หรือชิ้นส่วนของพลาสมิดที่มีบริเวณต่างๆ ของแขนของพลาสมิดปนอยู่กระตุ้นให้เกิดการถ่ายยีนที่ซับซ้อนกว่า ซึ่ง Muller และคณะ (1999) อธิบายกลไกการเกี่ยวข้องของแขนของพลาสมิดที่เป็นไปในรูป plasmid backbone genome recombination events โดยพบโครงสร้างทุติยภูมิภายในแขนของพลาสมิดที่อาจมีผลเชื่อมโยงต่อความเป็นบริเวณ hot recombination spot ทำให้การแทรกตัวซับซ้อน

ในการทดลองไม่ได้ทดสอบรูปแบบการเข้าแทรกตัวของชิ้นยีนในจีโนมดีเอ็นเอ ดังนั้น ในการศึกษาขั้นต่อไปสมควรวิเคราะห์โครงสร้างของยีน รวมถึงจำนวนชุดของยีน เพื่อให้เข้าใจพฤติกรรมการแทรกตัวในที่สุด จากการทดลองพบว่า การเพิ่มเอนไซม์จำเพาะทำให้กล้วยไม้มีอัตราการตายสูงขึ้น

Obe และคณะ (1992) ได้ศึกษาปรากฏการณ์ double stand break พบว่า การใช้เทคนิค REMI โดยเอ็นไซม์จำเพาะนี้กระตุ้นให้เกิดภาวะการตายของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เกิดจากการเรียงตัวของโครโมโซมที่ผิดปกติ หรือเกิดจากการกลายพันธุ์ที่มีอัตราสูงขึ้นในหลายๆ ตำแหน่ง ส่วนหนึ่งเพราะการใช้เอ็นไซม์จำเพาะกระตุ้นให้เกิด illegitimate recombination ผ่าน end joining mechanism ในอัตราที่สูงกว่า homologous recombination มาก ยังผลให้การแทรกตัวเป็นไปในทิศทางที่สุ่มและมีความถี่มากขึ้น (Lukacsovich *et al*., 1994)

โดยสรุปพบว่าการใช้อาหารสูตรปกติ VW โดยไม่เพิ่มสารควบคุมการเจริญเติบโต(2,4-D) เป็นวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างเพื่อการถ่ายยีน และสามารถถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ด้วยประสิทธิภาพสูงสุดในชุดการทดลองเมื่อใช้สารละลายที่ประกอบไปด้วย PEG 1% จีโนมดีเอ็นเอที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์ 5 μg/ml ดีเอ็นเอเป้าหมายในรูป Linear Double Strand DNA 10 μg/ml ภายใต้สนามไฟฟ้า 50 โวลท์ เป็นเวลา 20 วินาที คาดว่าภาวะนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับกล้วยไม้ช้างชนิดอื่นๆ ได้

ส่วนของการตรวจสอบเพื่อยืนยันความสำเร็จในการถ่ายยีน พบว่า สามารถนำชิ้นส่วนแคลลัสที่ต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสไปตรวจสอบการปรากฏของยีน *bar* ต่อโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลโดยเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นนำดีเอ็นเอไปตรวจสอบการ

ปรากฏของยีน *bar* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจง และนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มาแยกในสนามไฟฟ้า พบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 550 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดสอดคล้องกับดีเอ็นเอที่ใช้เป็นมาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส มีขนาดเท่ากันกับขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ ในชุดควบคุมบวก โดยที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *bar* จากชิ้นส่วนแคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* โดยวัดจากระดับการสังเคราะห์ mRNA ของยีน *bar* ที่ โดยสกัดอาร์เอ็นเอจากชิ้นเนื้อเยื่อที่ต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสโดยใช้สารละลาย Trizol™ (Invitrogen, USA) ตรวจสอบอาร์เอ็นเอโดยทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่เฉพาะต่อ *bar* mRNA พบว่า เนื้อเยื่อต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสมีการสังเคราะห์ mRNA เนื่องจากการตรวจพบขนาดของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดเท่ากันกับขนาดดีเอ็นเอของชุดควบคุม

การตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน *bar* ในระบบไบโอเซ็นเซอร์ เป็นระบบการตรวจจับสัญญาณดีเอ็นเอ โดยหลักการเริ่มจากการสังเคราะห์ cDNA ต้นแบบ จาก mRNA ที่สกัดได้ จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาผสมรวมกับโมเลกุลสี Hoechst 33258 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่กระตุ้นให้ดีเอ็นเอเกิดการรวมตัวและแปลงสัญญาณดีเอ็นเอเป็นสัญญาณทางไฟฟ้าสามารถตรวจวัดได้จากค่า anodic current peak เมื่อทำการตรวจวัดถ้าปริมาณดีเอ็นเอมีค่าน้อย ค่าที่วัดได้จาก anodic current peak จะมีค่าสูง ในทางกลับกันถ้าดีเอ็นเอมีมากค่า anodic current peak จะมีค่าน้อย (Chaumpluk *et al*., 2006) ดังนั้น ค่าการเปลี่ยนแปลงในรูป anodic current peak จะแปรผกผันกับปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ เนื่องจากที่ผ่านมามีรายงานการตรวจวัดด้วยเทคนิคนี้โดยการตรวจสอบปริมาณของคุณภาพสารประกอบฟีนอลในดอกเห็ดและตรวจความสัมพันธ์ของสารประกอบในตัวอย่างดินและน้ำ (Seo *et al*., 2003) และรายงานการตรวจสอบการทำงานของกิจกรรมของเอนไซม์ phosphatase ด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์ (Serra *et al*., 2005) จากการรายงานดังกล่าวเป็นการตรวจสอบทางด้านสรีรวิทยา ไม่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *bar* ด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์ในกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* ในครั้งนี้ เป็นการประยุกต์ใช้เป็นครั้งแรก ซึ่งช่วยให้สามารถวิเคราะห์ได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น ไม่จำเป็นต้องใช้ประสบการณ์ในการวิเคราะห์มาก ซึ่งแตกต่างจากเทคนิค Northern blot ซึ่งเป็นที่นิยมในอดีตและการเปรียบเทียบปริมาณ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ผ่านวิธี competitive – quantitative RT-PCR (Marone *et al*., 2001) หรือ real - time PCR (Rajagopal *et al*., 2005) วิธีการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอทั้ง 2 ดังกล่าวต้องอาศัยความละเอียดในการวิเคราะห์สูง ใช้เวลานาน ขั้นตอนการวิเคราะห์ยุ่งยาก ซับซ้อน มีต้นทุนในการวิเคราะห์สูง และต้องการความพร้อมของห้องปฏิบัติการรวมทั้งบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ (Shindo *et al*., 2002) ดังนั้นการ

ตรวจวิเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์จึงเป็นที่นิยมมากในการวิเคราะห์ด้านคุณภาพของตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ

จากผลการทดลองข้างต้นบ่งชี้ให้เห็นถึงความสำเร็จในการถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสเข้าสู่เนื้อเยื่อกล้วยไม้ช้างกระ *Rhynchostylis gigantea* โดยระบบการถ่ายยีนที่ได้ศึกษาดังกล่าวนั้นสามารถนำไปใช้เป็นต้นแบบเพื่อประยุกต์ใช้ในการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลช้างด้วยกันเองหรืออาจนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อประยุกต์ใช้ในกล้วยไม้สกุลอื่นๆ ให้มีลักษณะที่ดีขึ้นต่อไปได้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ก้องเกียรติ เขาหลวง. 2543. การศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่ *Dendrobium* ลูกผสม. โครงงานวิทยาศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

จิตราพรรณ พิลึก. 2544. การเพาะเมล็ดและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้. ภาควิชาพืชสวน,คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 82 น.

ปรเมษฐ์ กลั่นฤทธิ์. 2550. การถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสเข้าสู่สาหร่ายสีเขียว *Dunaliella salina* Teod. ใน .การประชุมวิชาการในงานเกษตรนเรศวร ครั้งที่6 ระหว่างวันที่ 20-21 มิถุนายน 2550 ณ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก หน้า 39-40.

ปาลิตา แปวไธสง. 2550. การถ่ายยีนต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอสในกระสังโดยใช้เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้ากระแสตรง. การประชุมวิชาการในงานเกษตรนเรศวร ครั้งที่6 ระหว่างวันที่ 20-21 มิถุนายน 2550 ณ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก หน้า 33.

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2549. ไบโอเซ็นเซอร์กับการตรวจวิเคราะห์อาหารด้วยโมเลกุลดีเอ็นเอใน สัมมนาเชิงปฏิบัติการการวิเคราะห์ดีเอ็นเอกับการเสริมศักยภาพในอุตสาหกรรมอาหาร, หน้า 1-7. หน่วยปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุล ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2550. ไบโอเซนเซอร์กับการประยุกต์ใช้ด่านความปลอดภัยทางอาหาร การประชุมวิชาการในงานเกษตรนเรศวร ครั้งที่6 ระหว่างวันที่ 20-21 มิถุนายน 2550 ณ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก.

มลิวัลย์ พรหมรักษา. 2539. กล้วยไม้ดอกเศรษฐกิจ, หน้า 21

ไมตรี ปทุมวงษ์. 2541. ไม้ดอกเศรษฐกิจ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ:อักษรการพิมพ์

อบฉันท์ ไทยทอง. 2548. กล้วยไม้เมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่ 9. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บ้านและสวน.

ภาษาอังกฤษ

Anzai H., Ishii Y., Schichinohe M., Katsumata K., Nojiri C., Morikawa H. and Tanaka M. 1996. Transformation of *Phalaenopsis* by particle bombardment. Plant Tissue Culture Letter. 13: 265-271.

Belarmino, M. M. and Mii, M. 2000. *Agrobacterium* – mediated genetic transformation of a *Phalaenopsis* orchid. Plant Cell Reports. 19: 435-442.

Bevan, B., 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation, Nucleic Acids Research. 12: 8711-8721.

Bittencourt, P., Csányi, A. and Jenes, B. 1995. Evaluation of different parameters and their influence on the PEG (polyethylene glycol) mediated gene transfer into rice(*Oryza sativa* L.) protoplasts. Cereal Research Communication. 23: 359-365.

Bommineni, V. R., Jauhar, P. P. and Peterson, T. S. 1997. Transgenic durum wheat by microprojectile bombardment of isolated scutella. Journal of Heredity. 88: 475-481.

Brown, J. S., and Holden, D. W. 1998. Insertional mutagenesis of pathogenic fungi. Current Opinion inMicrobiology. 1: 390-394.

Case, M. E., Schweizer, M., Kushner, S. R. and Giles, N. H. 1979. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by Utilizing hybrid plasmid DNA. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. 76: 5259-5263.

Chai, M. L., Xu, C. J., Senthil, K. K., Kim, J. Y. and Kim, D. H. 2002. Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Scientia Horticulturae. 96: 213-224.

Chaumpluk, P., Chikae, M., Takamura, Y. and Tamiya, E. 2006. Novel electrochemical identification and semi quantification of bovine constituents in feedstuffs. Sci. Tech. Of Adv. Mat. 7: 263-269.

Chaumpluk, P., Kerman, K., Takamura, Y. and Tamiya, E. 2007. Accumulation of amplified target DNAs using thio/biotin labeling, S1 nuclease, and ferrocenestreptavidin-magnetic system and direct detection of specific DNA signals with screen printed gold electrode. Sci. Tech. of Adv. Mat. (accepted)

Chia, T. F., Chan, Y. S. and Chan, N. H. 1990. Genetic engineering of tolerance to cymbidium mosaic virus, p. 284. *In* J. Kernohan, N. Bonham, D. Bonham, L. Cobb (eds.) . Proc. 13th World Orchid Conf. Trust, Auckland, New Zealand.

Debuchy R. and Brygoo Y. 1985. Cloning of opal suppressor tRNA genes of a filamentous fungus reveals two tRNA Ser UGA genes with unexpected structural differences. EMBO J. 4: 3553-3556.

Debuchy, R., Purton, S. and Rochaix, J. D. 1989. The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinharddtii* ; an important tool for nuclear transtormation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. EMBO. J. 8: 2803-2809.

Fu, X., Fu, X., Duc, L.T., Fontana, S., Bong, B. B., Tinjuangjun, P., Sudhakar, D., Twyman, R. M., Christou, P.and Kohli, A. 2000. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. Transgenic Research. 9: 11-19.

Gheysen, G., Villarroel, R. and Van M, M. 1991. Illegitimate recombination in plant: a model for T-DNA integration. Genes Dev. 5: 287-297.

Granado, J. D., Kertesz-Chaloupková, K., Aebi, M. and Kües, U. 1997. Restriction enzyme-mediated DNA integration in *Coprinus cinereus*. Mol Gen Genet. 256: 28-36.

Holm, P. B., Olsen, O., Schnorf , M., Brinch-Pedersen, H. and Knudsen, S. 2000. Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts. Transgenic Research. 9: 21-32.

Hui, S. W. and Boni, L. T. 1991. Membrane fusion induced by polyethylene glycol in membrane fusion. Wilschut J. and Hoekstr eds. Mareel Dekker New York. pp.231-253.

Kahmann, R. and Basse, C. 1999. REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) and its impact on the isolation of pathogenicity genes in fungi attacking plants. Europ. J. Plant Path. 105: 221-229.

Kain, K. C., Orlandi, P. A. and Lanar, D. E. 1991. Universal promoter for gene expression without cloning ; expression-PCR. Biotechniques. 10 :366-374.

Kirchherr, J. L., Lu, X., Kassongo, W., Chalwe, V., Mwanamyanda, L., Musunda, R. M., Xia, S. M., Scearce, R. M., Liao, H. X., Montefiori, D. C., Haymes, B. F.and Gao, F. 2007. High troughtput functional analysis of HIV-1 env genes without cloning. J Virol Methods. 143(1): 104-111.

Knapp, J. E., kausch, A. P. and Chandlee, J. M. 2000. Transformation of three genera of orchid using the *bar* gene as a selectable marker. Plant Cell Rep. 19: 893-898.

Kotnik, T., Mir, L. M., Flisar, K., Puc, M. and Miklavcic. 2001. Cell membrance eletropermeabilization by symetical bipolar rectangular pulses; Part I Increased efficiency of permeabilization. Bioelectrochemistry. 54 :83-90.

Kuehnle, A. R., and Sugii, N. 1992. Transformation of *Dendrobium* orchid using particle bombardment of protocorms. Plant Cell Reports. 11: 484-488.

Kuspa, A and Loomis, W. F. 1994. REMI-RFLP mapping in dictyostelium genome.Genetics. 138: 665-674.

Liau, C. H., You, S. J., Prasad, V., Hsiao, H. H., Lu, J. C., Yang, N. S. and Chan, M. T. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation of an *Oncidium* orchid. Plant Cell Reports. 21: 993-998.

Lu, S., Lyngholm, L., Yang, G., Bronen, C., Yoder, O. C. and Tergeon, B. G. 1994. Tagged mutations at Tox 1 locus of Cochilobolus hetrostrophus by restriction enzyme mediated integration. Proc Natl Acad Sci USA. 91:12649-12653.

Lukacsovich, T., Yang, D. and Waldman, A. S. 1994. Repair of a specific double-strand break generated within a mammalian chromosome by yeast endonuclease I-*Scel*. Nucleic Acids Research. 22(25): 5649-5657.

Manivasakam, P. and Schiestl, R. H. 1998. Nonhomologous end joining during restriction enzyme-mediated DNA integration in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology. 18: 1736-1745.

Manivasakam, P., Aubrecht, J., Sidhom, S. and Schiestl, R. H. 2001. Restriction enzymes increase efficiencies of illegitimate DNA integration but decrease homologous integration in mammalian cells. Nucleic Acids Research. 29(23): 4826-4833.

Marone, M., Mozzetti, S., Ritis, D. D., Pierelli L. and Scambia, G. 2001. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. Biol. Proced. Online. 3(1): 19-25.

Miao, Z. H. and Lam, E.1995. Targeted disruption of theTGA3 locus in *Arabidopsis thaliana*. PL. J. 7: 359-365.

Muller, U. and **Dev**, M. 1999. Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. Mechanisms of Development. 82: 3–21.

Murray, M.G. and Thomson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl Acids Res. 8: 4321-4325.

Obe, G., Johannes, C. and Frohlinde, D. S. 1992. DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. Mutagenesis. 7: 3-12.

Rajagopal, R., Thamilarasi, K., Venkatesh, R. G., Srinivas, P. and Bhatnagar K. R. 2005. Immune cascade of Spodoptera litura: Cloning, expression, and characterization of inducible prophenol oxidase. Biochemical and Biophysical Research Communications. 339: 394-400.

Riggle, P. J. and Kumamoto, C. A. 1998. Genetic analysis in fungi using restriction enzyme-mediated integration. Current Opinion in Microbiology. 1: 390-394.

Sambrook, J., frietsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Habor, NY: Cold Spring Habor Laboratory Press.

Sanford, J. C. 1988. The biolistic process-a new concept in gene transfer and biological delivery. Trends Biotechnology. 6: 229-302.

Schiestl, R. H. and Petes, T. D. 1991. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. 88: 7585-7589.

Schiestl, R. H., Zhu, J. and Petes, T. D. 1994. Effect of mutations in genes affecting homologous recombination on restriction enzyme-mediated and illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol. 14(7): 4493-4500.

Seo, S. Y., Sharma, V. K., and Sharma, N. 2003. Mushroom tyrosinase: Recent prospects. J Agric Food Chem. 55: 2837-2853.

Serra, B., Morales, M. D., Reviejo, A. J., Hall, E. H. and Pingarron, J. M. 2005. Rapid and highly sensitive electrochemical determination of alkaline phosphatase using a composite tyrosinase biosensor. Anal Biochem. 336: 289-294.

Shindo, T., *et al*. 2002. Contents of barbaloin-related compounds in aloe drinks and their change during storage. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 43(3): 122-126.

Teissie, J., Eynard, N., Gabriel, B. and Rols, M. P. 1999. Electropermeabilization of cell Membranes. Adv Drug Deliv Rev. 35(1): 3-19.

Uchimiya, H., Iwata, M., Nojiri, C., Samarajeewa, P. K., Takamatsu, S., Ooba, S., Anzai, H., Christensen, A. H., Quail, P. H. and Toki, S. 1993. Bialaphos Treatment of Transgenic Rice Plants Expressing a *bar* Gene Prevents Infection by the Sheath Blight Pathogen (*Rhizoctonia solani*). Bio/Technology. 11: 835-836

Vacin, E. and Went, F. W. 1949. Some pH changes in nutrient solutions, Botanical Gazette. 110: 605-613.

Van Attikum, H., Bundock, P. and Hooy kaas P. J. J. 2001. Non-homologous and juining protein are required for Agrobacterium T-DNA integration. EMBO J. 20: 6550-6558.

Yang, J., Lee, H. J., Shin, D. H., Oh, S. K., Seon, J. H., Peak, K. Y. and Ham, K. H. 1999. Genetic transformation of *Cymbidium* Orchid by particle bombardment. Plant Cell Reports. 18: 978-984.

Yu, H., Yang, S. H. and Goh, C. J. 2001. Agrobacterium – mediated transformation of a *Dendrobium* orchid with the class 1 knox gene DOH1. Plant Cell Reports. 20: 301-305.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเตรียม stock อาหารสูตร VW (Vacin and Went, 1949) ต่อปริมาตร 1 ลิตร (1,000 cc.)

Stock I	KNO_3	52.5	g
(100x)	$(NH_4)2SO_4$	50	g
	KH_2PO_4	25	g
	$MgSO_4.7H_2O$	25	g
	$MnSo_4.H_2O$	0.75	g
Stock II (ละลายใน HCl)	$Ca(PO_4)_2$	40	g
(200x)			
Stock III	Na_2EDTA	7.46	g
(100x)	$FeSO_4.7HO_2$	5.56	g

Organic Compound

น้ำตาล	20	g/l	
วุ้น	8	g/l	เติมหลังปรับ pH แล้ว
ถ่าน	3	g/l	
น้ำมะพร้าว	150	ml/l	
กล้วยหอมบด	50	g/l	
มันฝรั่งบด	50	g/l	

ปรับ pH ให้ได้ 5.2

ภาคผนวก ข

การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยฟีนอล

1. นำตัวอย่างกระสัง 100 มิลลิกรัม ใส่ลงในโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เติม extraction buffer และ phenol ในอัตราส่วน 1:1 บดให้ละเอียดแล้วถ่ายลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที
2. ดูดสารละลายส่วนใสชั้นบน(supernatant)ใส่ในหลอดใหม่เติม phenol : chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที
3. ดูดส่วนใสชั้นบนใส่ในหลอดใหม่ สกัดซ้ำด้วยการเติม chloroform : isoamyl (24:1) ในอัตราส่วนเท่ากับปริมาตรของสารละลาย ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที
4. ดูดสารละลายส่วนใสชั้นบนใส่หลอดใหม่ เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตด เข้มข้น 3 โมลต่อลิตร pH 5.2 ปริมาตร 1/10+1 ไมโครลิตรของปริมาตรสารละลาย และ absolute ethanol 2.5 เท่าของปริมาตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียสเซลเซียส เป็นเวลา 15-30 นาที
5. ตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอที่ได้ด้วยด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
6. เทส่วนใสทิ้ง นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer จากนั้นละลายตะกอนด้วย น้ำ DEPC ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บอาร์เอ็นเอที่ละลายแล้วที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียสเซลเซียส

การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

1. เลี้ยงแบคทีเรียในขวดเลี้ยงเชื้อ ซึ่งบรรจุอาหาร LB broth 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่มีเครื่องเขย่า อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเซลเซียส เป็นเวลานาน 12-24 ชั่วโมง
2. นำแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ แบ่งใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย Lysosyme buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำให้เซลล์กระจายโดยใช้เครื่องผสมสาร (vortex) เติมสารละลาย alkaline buffer 200 ไมโครลิตร นำไป vortex จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายโปแตสเซียมอะซีเตต ปริมาตร 150 ไมโครลิตร นำไป vortex ซ้ำอีกครั้งแล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที
3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ที่ความเร็วรอบ 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์ใหม่ เติม phenal - chlorofrom (1:1) 500 ไมโครลิตร นำไป vortex จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
4. เก็บสารละลายส่วนใสใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์ใหม่เติม propanol ลงไป 2.5 เท่าของปริมาตรของสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 rpm 15 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
5. นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนที่ตกตะกอนไว้
6. นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้แห้งโดยเครื่อง Lyophilizer เป็นเวลา10-15 นาที
7. ละลายตะกอนใน TE-Rnase buffer 30 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ตู้ incubate 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำพลาสมิดที่ได้ไปตรวจสอบผลด้วยวิธี gel electropheresis

การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Murray and Thomson, 1980)

1. นำชิ้นส่วนของพืชหนักประมาณ 100 มิลลิกรัม บดให้ละเอียดแล้วเติม CTAB buffer 600 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
2. เติม Phenol : Chloroform 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
3. เก็บส่วนใสใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ และเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
4. เก็บส่วนใสใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ และเติม isopropanal ในอัตราส่วนเท่ากับส่วนใสที่ได้ และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
5. เก็บ pellet ที่ได้ โดยเทส่วนใสทิ้ง และเติม 70 % ethanol 1000 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มี pellet อยู่ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
6. เท 70% ethanol ออกทิ้ง และนำ pellet ที่ได้ไปทำให้แห้ง โดยเครื่อง centrifugal vaporizer เป็นเวลา 10 นาที
7. ละลายใน TE buffer (10 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) 30 ไมโครลิตร จึงเติม RNase 2 ไมโครลิตร จึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
8. เติม CTAB buffer 200 ไมโครลิตร และ chloroform : isoamyl alcohol 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
9. เก็บส่วนใสใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ และเติม isopropanal ในอัตราส่วนเท่ากับส่วนใสที่ได้ และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
10. เก็บ pellet ที่ได้ โดยเทส่วนใสทิ้ง และเติม 70 % ethanol 1,000 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มี pellet อยู่ จึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
11. เท 70 % ethanol ออกทิ้ง และนำ pellet ที่ได้ไปทำให้แห้ง โดยเครื่อง centrifugal vaporizer เป็นเวลา 10 นาที
12. นำ pellet ที่ได้ ละลายใน TE buffer 30 ไมโครลิตร โดยสามารถเก็บรักษาดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การวัดปริมาณและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอโดยวิธี optical method

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอสามารถใช้หลักการการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยการนำสารละลายดีเอ็นเอมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ได้รับการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วนที่ต้องการ จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จึงนำผลที่ได้มาคำนวณจากสูตร

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (µl/ml) = A_{260} x 50 x dilution factor

คุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ = A_{260}/ A_{280}

หมายเหตุ : 1.0 A_{260} = 50 µg/ml (ของดีเอ็นเอเกลียวคู่)

a. ค่าการวัดคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ = 1.65-1.85 คือ สกัดได้ดีเอ็นเอเกลียวคู่บริสุทธิ์
b. ค่าการวัดคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอน้อยกว่า 1.65 คือ มีโปรตีนหรือฟีนอลปะปน
c. ค่าการวัดคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอมากกว่า 1.85 คือ มีอาร์เอ็นเอปะปน

การแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็คโทรฟอเรซิส

1. เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบและหวีให้เรียบร้อย
2. ชั่งผงอะกาโรส 1 กรัม เติมบัฟเฟอร์สำหรับทำอิเล็คโทรฟอเรซิส (1x TAE และ1x TBE) 100 ไมโครลิตร
3. หลอมอะกาโรสโดยการอุ่นให้ร้อนด้วยเตาไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราว ให้อะกาโรสละลายจนหมด
4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลง แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ ให้เจลหนาครึ่งหนึ่งของถาดรันเจล เสียบหวีลงไปในตำแหน่ง เพื่อทำให้เกิดช่องสำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอและปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง
5. เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อยๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในเครื่องสำหรับทำอิเลคโทรฟอเรซีส เติมบัฟเฟอร์ให้ท่วมเจล
6. ดูดสารละลายดีเอ็นเอประมาณ 2-5 ไมโครลิตร (ตามความเข้มข้นของดีเอ็นเอ) ผสมกับ loading buffer 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงไปในช่องของแผ่นเจลที่เตรียมไว้
7. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็คโทรฟอเรซิสแล้วเปิดกระแสไฟฟ้า ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าประมาณ 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 30 นาที
8. นำเจลมาย้อมด้วยสารเรืองแสง (เอธิเดียมโบรไมด์) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10-15 นาที ขั้นนี้ระวังอย่าให้สารสัมผัสกับผิวหนังหรือส่วนของร่างกาย ควรสวมถุงมือ เนื่องจากเอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen)
9. นำเจลมาล้างเอธิเดียมโบรไมด์ออกด้วยน้ำเปล่า
10. นำเจลที่ล้างเอธิเดียมโบรไมด์แล้วไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต
11. ถ่ายภาพเก็บไว้ด้วยกล้องดิจิตอล

การนำดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์

1. เติมสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ที่มีคอมพีเทนต์เซลล์ 60 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลานาน 15 นาที
2. นำมาทำ heat shock โดยจุ่มลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที แล้วย้ายมาแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที
3. เติมอาหาร SOC ลงไป 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เขย่าทุกๆ 15 นาที
4. ดูดอาหารเลี้ยงแบคทีเรียในข้อ 3 มาเกลี่ย (spread) ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร LM ที่มีแอมพิซิลิน 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและแมกนีเซียมซัลเฟต (1M $MgSO_4$) ผสมอยู่โดยดูดอาหารในข้อ 3 มาใส่ในจานอาหาร LM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วใช้แท่งแก้วปลายงอ (glass spreader) เกลี่ยแบคทีเรียให้กระจายทั่วจานอาหารเพาะเลี้ยง
5. นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มในตู้ incubate อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง ตรวจดูโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร LM

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ศึกษาระดับปริมาณของ PEG 6000 และระยะเวลาที่เหมาะสมในการผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 50 โวลท์ โดยใช้ยีน *bar* เป็นต้นแบบ และคัดเลือกโดยใช้ยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส (การศึกษาระบบการถ่ายยีนโดยใช้ยีน *bar*)

ANOVA

VAR00003

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	179.633	9	19.959	29.939	.000
Within Groups	13.333	20	.667		
Total	192.967	29			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00003
Tukey HSD

(I) VAR00002	(J) VAR00002	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	2.0000	.66667	.142	-.3607	4.3607
	3.00	-3.3333(*)	.66667	.002	-5.6941	-.9726
	4.00	1.3333	.66667	.608	-1.0274	3.6941
	5.00	2.3333	.66667	.054	-.0274	4.6941
	6.00	3.0000(*)	.66667	.007	.6393	5.3607
	7.00	4.0000(*)	.66667	.000	1.6393	6.3607
	8.00	4.6667(*)	.66667	.000	2.3059	7.0274
	9.00	4.6667(*)	.66667	.000	2.3059	7.0274
	10.00	5.0000(*)	.66667	.000	2.6393	7.3607
2.00	1.00	-2.0000	.66667	.142	-4.3607	.3607
	3.00	-5.3333(*)	.66667	.000	-7.6941	-2.9726
	4.00	-.6667	.66667	.989	-3.0274	1.6941
	5.00	.3333	.66667	1.000	-2.0274	2.6941
	6.00	1.0000	.66667	.877	-1.3607	3.3607
	7.00	2.0000	.66667	.142	-.3607	4.3607
	8.00	2.6667(*)	.66667	.019	.3059	5.0274
	9.00	2.6667(*)	.66667	.019	.3059	5.0274
	10.00	3.0000(*)	.66667	.007	.6393	5.3607
3.00	1.00	3.3333(*)	.66667	.002	.9726	5.6941
	2.00	5.3333(*)	.66667	.000	2.9726	7.6941
	4.00	4.6667(*)	.66667	.000	2.3059	7.0274
	5.00	5.6667(*)	.66667	.000	3.3059	8.0274
	6.00	6.3333(*)	.66667	.000	3.9726	8.6941

	7.00	7.3333(*)	.66667	.000	4.9726	9.6941
	8.00	8.0000(*)	.66667	.000	5.6393	10.3607
	9.00	8.0000(*)	.66667	.000	5.6393	10.3607
	10.00	8.3333(*)	.66667	.000	5.9726	10.6941
4.00	1.00	-1.3333	.66667	.608	-3.6941	1.0274
	2.00	.6667	.66667	.989	-1.6941	3.0274
	3.00	-4.6667(*)	.66667	.000	-7.0274	-2.3059
	5.00	1.0000	.66667	.877	-1.3607	3.3607
	6.00	1.6667	.66667	.325	-.6941	4.0274
	7.00	2.6667(*)	.66667	.019	.3059	5.0274
	8.00	3.3333(*)	.66667	.002	.9726	5.6941
	9.00	3.3333(*)	.66667	.002	.9726	5.6941
	10.00	3.6667(*)	.66667	.001	1.3059	6.0274
5.00	1.00	-2.3333	.66667	.054	-4.6941	.0274
	2.00	-.3333	.66667	1.000	-2.6941	2.0274
	3.00	-5.6667(*)	.66667	.000	-8.0274	-3.3059
	4.00	-1.0000	.66667	.877	-3.3607	1.3607
	6.00	.6667	.66667	.989	-1.6941	3.0274
	7.00	1.6667	.66667	.325	-.6941	4.0274
	8.00	2.3333	.66667	.054	-.0274	4.6941
	9.00	2.3333	.66667	.054	-.0274	4.6941
	10.00	2.6667(*)	.66667	.019	.3059	5.0274
6.00	1.00	-3.0000(*)	.66667	.007	-5.3607	-.6393
	2.00	-1.0000	.66667	.877	-3.3607	1.3607
	3.00	-6.3333(*)	.66667	.000	-8.6941	-3.9726
	4.00	-1.6667	.66667	.325	-4.0274	.6941
	5.00	-.6667	.66667	.989	-3.0274	1.6941
	7.00	1.0000	.66667	.877	-1.3607	3.3607
	8.00	1.6667	.66667	.325	-.6941	4.0274
	9.00	1.6667	.66667	.325	-.6941	4.0274
	10.00	2.0000	.66667	.142	-.3607	4.3607
7.00	1.00	-4.0000(*)	.66667	.000	-6.3607	-1.6393
	2.00	-2.0000	.66667	.142	-4.3607	.3607
	3.00	-7.3333(*)	.66667	.000	-9.6941	-4.9726
	4.00	-2.6667(*)	.66667	.019	-5.0274	-.3059
	5.00	-1.6667	.66667	.325	-4.0274	.6941
	6.00	-1.0000	.66667	.877	-3.3607	1.3607
	8.00	.6667	.66667	.989	-1.6941	3.0274
	9.00	.6667	.66667	.989	-1.6941	3.0274
	10.00	1.0000	.66667	.877	-1.3607	3.3607
8.00	1.00	-4.6667(*)	.66667	.000	-7.0274	-2.3059
	2.00	-2.6667(*)	.66667	.019	-5.0274	-.3059
	3.00	-8.0000(*)	.66667	.000	-10.3607	-5.6393
	4.00	-3.3333(*)	.66667	.002	-5.6941	-.9726
	5.00	-2.3333	.66667	.054	-4.6941	.0274
	6.00	-1.6667	.66667	.325	-4.0274	.6941
	7.00	-.6667	.66667	.989	-3.0274	1.6941
	9.00	.0000	.66667	1.000	-2.3607	2.3607
	10.00	.3333	.66667	1.000	-2.0274	2.6941
9.00	1.00	-4.6667(*)	.66667	.000	-7.0274	-2.3059
	2.00	-2.6667(*)	.66667	.019	-5.0274	-.3059

	3.00	-8.0000(*)	.66667	.000	-10.3607	-5.6393
	4.00	-3.3333(*)	.66667	.002	-5.6941	-.9726
	5.00	-2.3333	.66667	.054	-4.6941	.0274
	6.00	-1.6667	.66667	.325	-4.0274	.6941
	7.00	-.6667	.66667	.989	-3.0274	1.6941
	8.00	.0000	.66667	1.000	-2.3607	2.3607
	10.00	.3333	.66667	1.000	-2.0274	2.6941
10.00	1.00	-5.0000(*)	.66667	.000	-7.3607	-2.6393
	2.00	-3.0000(*)	.66667	.007	-5.3607	-.6393
	3.00	-8.3333(*)	.66667	.000	-10.6941	-5.9726
	4.00	-3.6667(*)	.66667	.001	-6.0274	-1.3059
	5.00	-2.6667(*)	.66667	.019	-5.0274	-.3059
	6.00	-2.0000	.66667	.142	-4.3607	.3607
	7.00	-1.0000	.66667	.877	-3.3607	1.3607
	8.00	-.3333	.66667	1.000	-2.6941	2.0274
	9.00	-.3333	.66667	1.000	-2.6941	2.0274

* The mean difference is significant at the .05 level.

ศึกษาระดับปริมาณของดีเอ็นเอที่เหมาะสมโดยคัดเลือกบนยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส

ANOVA

CALLUS1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	197.733	4	49.433	123.583	.000
Within Groups	4.000	10	.400		
Total	201.733	14			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CALLUS1

	(I) DNA	(J) DNA	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	1.00	2.00	-1.6667	.51640	.055	-3.3662	.0328
		3.00	-7.3333(*)	.51640	.000	-9.0328	-5.6338
		4.00	-8.3333(*)	.51640	.000	-10.0328	-6.6338
		5.00	-8.6667(*)	.51640	.000	-10.3662	-6.9672
	2.00	1.00	1.6667	.51640	.055	-.0328	3.3662
		3.00	-5.6667(*)	.51640	.000	-7.3662	-3.9672
		4.00	-6.6667(*)	.51640	.000	-8.3662	-4.9672
		5.00	-7.0000(*)	.51640	.000	-8.6995	-5.3005
	3.00	1.00	7.3333(*)	.51640	.000	5.6338	9.0328
		2.00	5.6667(*)	.51640	.000	3.9672	7.3662
		4.00	-1.0000	.51640	.359	-2.6995	.6995
		5.00	-1.3333	.51640	.148	-3.0328	.3662
	4.00	1.00	8.3333(*)	.51640	.000	6.6338	10.0328
		2.00	6.6667(*)	.51640	.000	4.9672	8.3662
		3.00	1.0000	.51640	.359	-.6995	2.6995
		5.00	-.3333	.51640	.964	-2.0328	1.3662
	5.00	1.00	8.6667(*)	.51640	.000	6.9672	10.3662
		2.00	7.0000(*)	.51640	.000	5.3005	8.6995
		3.00	1.3333	.51640	.148	-.3662	3.0328
		4.00	.3333	.51640	.964	-1.3662	2.0328

* The mean difference is significant at the .05 level.

ศึกษาการถ่ายยีนในภาวะที่มีหรือไม่มีเอนไซม์จำเพาะ

ANOVA

CALLUS.E

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	37.111	5	7.422	11.133	.000
Within Groups	8.000	12	.667		
Total	45.111	17			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CALLUS.E

	(I) TREAT.EN	(J) TREAT.EN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	1.00	2.00	-1.3333	.66667	.395	-3.5726	.9059
		3.00	-4.6667*	.66667	.000	-6.9059	-2.4274
		4.00	-2.3333*	.66667	.039	-4.5726	-.0941
		5.00	-3.0000*	.66667	.007	-5.2393	-.7607
		6.00	-2.0000	.66667	.091	-4.2393	.2393
	2.00	1.00	1.3333	.66667	.395	-.9059	3.5726
		3.00	-3.3333*	.66667	.003	-5.5726	-1.0941
		4.00	-1.0000	.66667	.671	-3.2393	1.2393
		5.00	-1.6667	.66667	.198	-3.9059	.5726
		6.00	-.6667	.66667	.909	-2.9059	1.5726
	3.00	1.00	4.6667*	.66667	.000	2.4274	6.9059
		2.00	3.3333*	.66667	.003	1.0941	5.5726
		4.00	2.3333*	.66667	.039	.0941	4.5726
		5.00	1.6667	.66667	.198	-.5726	3.9059
		6.00	2.6667*	.66667	.017	.4274	4.9059
	4.00	1.00	2.3333*	.66667	.039	.0941	4.5726
		2.00	1.0000	.66667	.671	-1.2393	3.2393
		3.00	-2.3333*	.66667	.039	-4.5726	-.0941
		5.00	-.6667	.66667	.909	-2.9059	1.5726
		6.00	.3333	.66667	.995	-1.9059	2.5726
	5.00	1.00	3.0000*	.66667	.007	.7607	5.2393
		2.00	1.6667	.66667	.198	-.5726	3.9059
		3.00	-1.6667	.66667	.198	-3.9059	.5726
		4.00	.6667	.66667	.909	-1.5726	2.9059
		6.00	1.0000	.66667	.671	-1.2393	3.2393
	6.00	1.00	2.0000	.66667	.091	-.2393	4.2393
		2.00	.6667	.66667	.909	-1.5726	2.9059
		3.00	-2.6667*	.66667	.017	-4.9059	-.4274
		4.00	-.3333	.66667	.995	-2.5726	1.9059
		5.00	-1.0000	.66667	.671	-3.2393	1.2393

*. The mean difference is significant at the .05 level.

ศึกษาการถ่ายยีนในภาวะที่มีหรือไม่มีจีโนมดีเอ็นเอ

ANOVA

CALLUS.N

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	51.778	5	10.356	46.600	.000
Within Groups	2.667	12	.222		
Total	54.444	17			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CALLUS.N

	(I) TREAT	(J) TREAT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	1.00	2.00	-4.3333*	.38490	.000	-5.6262	-3.0405
		3.00	-.3333	.38490	.948	-1.6262	.9595
		4.00	-3.3333*	.38490	.000	-4.6262	-2.0405
		5.00	.0000	.38490	1.000	-1.2928	1.2928
		6.00	-1.3333*	.38490	.042	-2.6262	-.0405
	2.00	1.00	4.3333*	.38490	.000	3.0405	5.6262
		3.00	4.0000*	.38490	.000	2.7072	5.2928
		4.00	1.0000	.38490	.171	-.2928	2.2928
		5.00	4.3333*	.38490	.000	3.0405	5.6262
		6.00	3.0000*	.38490	.000	1.7072	4.2928
	3.00	1.00	.3333	.38490	.948	-.9595	1.6262
		2.00	-4.0000*	.38490	.000	-5.2928	-2.7072
		4.00	-3.0000*	.38490	.000	-4.2928	-1.7072
		5.00	.3333	.38490	.948	-.9595	1.6262
		6.00	-1.0000	.38490	.171	-2.2928	.2928
	4.00	1.00	3.3333*	.38490	.000	2.0405	4.6262
		2.00	-1.0000	.38490	.171	-2.2928	.2928
		3.00	3.0000*	.38490	.000	1.7072	4.2928
		5.00	3.3333*	.38490	.000	2.0405	4.6262
		6.00	2.0000*	.38490	.002	.7072	3.2928
	5.00	1.00	.0000	.38490	1.000	-1.2928	1.2928
		2.00	-4.3333*	.38490	.000	-5.6262	-3.0405
		3.00	-.3333	.38490	.948	-1.6262	.9595
		4.00	-3.3333*	.38490	.000	-4.6262	-2.0405
		6.00	-1.3333*	.38490	.042	-2.6262	-.0405
	6.00	1.00	1.3333*	.38490	.042	.0405	2.6262
		2.00	-3.0000*	.38490	.000	-4.2928	-1.7072
		3.00	1.0000	.38490	.171	-.2928	2.2928
		4.00	-2.0000*	.38490	.002	-3.2928	-.7072
		5.00	1.3333*	.38490	.042	.0405	2.6262

*. The mean difference is significant at the .05 level.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอินทิรา จารุเพ็ง เกิดเมื่อวันที่ 25 พฤศจิกายน 2519 ที่จังหวัดชัยนาท สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต(เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2541 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546

ปัจจุบันทำงานที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พระราชวังสวนจิตรลดา กรุงเทพ ฯ ประจำหน่วยปฏิบัติการชีวโมเลกุลพืช