รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด 2556

1.ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนากล้วยไม้

2.โครงการวิจัย การจัดการคุณภาพกล้วยไม้สกุลหวายเพื่อส่งออก

กิจกรรม การพัฒนาพันธุ์

กิจกรรมย่อย

3.ชื่อการทดลอง : การยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้สกุลหวายโดยการถ่ายยีน ควบคุมการสร้าง ก๊าซเอทีลีน: การส่งถ่ายยีนและการแสดงออกของยีน

Prolonging flower longevity of *Dendrobium* via genetic transformation: gene transformation and expression.

4.คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางจงวัฒนา พุ่มหิรัญ สังกัด สถาบันวิจัยพืชสวน

ผู้ร่วมงาน : นางสาววิภาดา ทองทักษิณ สังกัด สถาบันวิจัยพืชสวน

นางสาวศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล สังกัด สถาบันวิจัยพืชไร่

ที่ปรึกษา : นางสาว สุภาพ สุนทรนนท์ สังกัด กรมวิชาการเกษตร

5.บทคัดย่อ : การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีน *Antisense ACC oxidase* เข้าสู่เซลล์ของกล้วยไม้หวายเอียสกุลโดยอาศัยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (pCAMBIA 1304) เพื่อยืดอายุการบานของดอก จากการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีน *ACC oxidase* เข้าสู่โพรโตคอร์มและต้นอ่อนกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลคือ บ่มเนื้อเยื่อในสารละลาย *Agrobacterium* ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที โดยเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมในการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium*ส่วนเกิน ที่เหมาะสมคือ 1200 มกต่อลิตรและความเข้มข้นของ hygromycin ที่ใช้ในการคัดเลือกกล้วยไม้ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนคือ 20 มก./ล โดยมีเปอร์เซ็นต์ของโพรโตคอร์ม/ต้นอ่อนที่มียีนประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์

6.คำนำ : กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง ที่นำรายได้เข้าประเทศปีละหลายพันล้านบาท ในปี 2551 มีการส่งออกกล้วยไม้มูลค่าประมาณ 3,300 ล้านบาท โดยประมาณ 70% (2400 ล้านบาท)มูลส่งออกในรูปดอกกล้วยไม้สด(สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร 2551) และไม้ตัดดอกที่มีการส่งออกมากที่สุด คือ กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* sp.) ปัญหาหนึ่งในการผลิตกล้วยไม้ตัดดอก คือการเหี่ยวและดอกร่วงเร็วในระหว่างการขนส่ง การวางจำหน่าย และการใช้งาน ซึ่งการเหี่ยวของดอกไม้เป็นการเปลี่ยนแปลงทางสรีระของพืชที่เกิดจากก๊าซเอทีลีน (Reid and Wu, 1992) ในกล้วยไม้มีรายงานว่า ดอกกล้วยไม้ส่วนใหญ่จะเหี่ยวและหลุดร่วงอย่างรวดเร็วแม้เพียงได้รับก๊าซเอทีลีนในระดับความเข้มข้นต่ำ โดยกล้วยไม้แต่ละชนิดจะมีโดยการตอบสนองต่อก๊าซชนิดนี้แตกต่างกัน (ครรชิต ธรรมศิริ, 2547)

ยีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอทีลีนคือ ACC synthase (ACS) และ ACC oxidase (AOC) ซึ่งการที่เอทีลีนที่สร้างขึ้นจะไปแสดงผลที่ส่วนใดของพืชขึ้นอยู่กับตัวรับเอทีลีน (ethylene receptor) ของส่วนต่างๆของพืชส่งผลให้ส่วนต่างๆของพืชมีความไว และตอบสนองต่อเอทีลีนแตกต่างกัน (Nadeau et al., 1993) ในช่วง 2 ทศวรรษที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาการส่งถ่ายยีน antisense ACC synthase และ antisense ACC oxidase เข้าสู่พืชเพื่อยืดอายุการใช้งานของดอกไม้หลายชนิด Aida *et al*. (1998) ได้ศึกษาการส่งถ่ายยีน antisense ACC oxidase เข้าสู่ Cell ของ Torenia โดยใช้ Agrobacterium พบว่า Torenia ที่ดัดแปลงพันธุ์สามารถออกดอกที่บานนานกว่าพันธุ์เดิม 2 วัน การสร้างคาร์เนชั่นดัดแปลงพันธุ์ เพื่อเพิ่มระยะเวลาการบานของดอก โดยการสกัดยีนที่ควบคุมการสร้าง ACC oxidase จากคาร์เนชั่น ร่วมกับ ACC synthase จากพืชหลายชนิดแล้วนำมาต่อกับ Vector แบบกลับทิศทาง เพื่อให้เกิดการถอดรหัสเป็น antisense RNA โดยมี cauliflower mosaic virus 25S RNA promoter (CAMV 25S promoter) เป็นตัวควบคุมการถอดรหัสแล้วจึงส่งถ่ายยีนชุดนี้เข้าสู่คาร์เนชั่น ผลปรากฏว่า ดอกคาร์เนชั่นที่เกิดจากการดัดแปลงพันธุ์มีการผลิต gas ethyline ลดลง และสามารถบานได้นานกว่าดอกคาร์เนชั่นปกติ (Adam and Yang, 1997 อ้างถึงใน Mol *et al.,* 1995) ดังนั้นการศึกษาการส่งถ่ายยีนควบคุมการสร้างก๊าซเอทีลีน เพื่อยืดอายุการบานของดอก จะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยในการปรับปรุงพันธุ์มีประสิทธิภาพและรวดเร็วขึ้น

การทดลองนี้เป็นการทดลองต่อยอดจากงานทดลองของ สุภาพ และคณะ (2555) ซึ่งได้โคลนยีนและศึกษาองค์ประกอบของยีน ACC oxidase ไว้เรียบร้อยแล้ว

7.วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์ : เครื่องพีซีอาร์(Thermocycler; Perkin Elmer, Gene Amp PCR 9700) เครื่องมือแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดรักษาอุณหภูมิ อ่างน้ำชนิดตั้งอุณหภูมิ เครื่องมือบันทึกภาพดีเอ็นเอ ถังไนโตรเจนเหลว โกร่งบดยา กระติกน้ำแข็ง หลอดปั่นแยกตะกอนขนาด 1.5 ml ปิเปตดูดสารชนิดปรับปริมาตรได้ขนาด 0.5 -1 ml กระดาษพิมพ์ผลดีเอ็นเอ ตู้อบรักษาอุณหภูมิที่ 30-37 °C แบบเขย่าได้ (Incubator shaker) ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ เครื่องเขย่าแนวนอน ชั้นวางขวด/ petridish เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หม้อนึ่งความดัน มีดผ่าตัด ปากคีบ และเครื่องแก้วชนิดต่างๆสำหรับเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อและเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สารเคมี: สารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีม เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 ที่มียีน antisense ACC oxidase สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน อาหารเหลว LB สารละลาย X-glue สารปฏิชีวนะ hygromycin สารเคมีต่างๆสำหรับเตรียมอาหาร MS แอลกอฮอล์

-วิธีการ

1) การเพาะเลี้ยงโพรโตคอร์มกล้วยไม้หวายเอียสกุล

เพาะเลี้ยงโพรโตคอร์มกล้วยไม้หวายเอียสกุลจากตาข้างในอาหารแข็งและเหลวสูตร ½MS + น้ำตาล 20 g/L pH 5.5-5.7 ทำการ sub culture ทุกๆ 1 เดือน

2) การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อการเจริญของโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอียสกุล

นำโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอียสกุลที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน ขนาด 2-5 มม.มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ½MS ที่มีความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 5 ระดับคือ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 มก./ล. แต่ละสูตรทดลอง 5 ซ้ำ ๆ ละ 10 โพรโทคอร์มโดยเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25$\pm$2^{o}C ให้แสง 16ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 μmol $m^{-2}s^{-1}$ เก็บผลโดยนับจำนวนโพรโทคอร์มที่เจริญได้เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

3) การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมต่อการเจริญของโพรโทคอร์มของกล้วยไม้เอียสกุล

เพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มกล้วยเอียสกุล ขนาด 2-5 มม. บนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่มีความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมระดับต่าง ๆ กัน คือ 0, 1000, 1100, 1200, 1300 และ 1400 มก./ล. แต่ละสูตรทดลอง 5 ซ้ำ ๆ ละ 10 โพรโทคอร์ม เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25$\pm$2^{o}C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 μmol $m^{-2}s^{-1}$ เก็บผลโดยนับจำนวนโพรโทคอร์มที่เจริญได้เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

4) การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมต่อการเจริญของ*A. tumefaciens*สายพันธุ์ EHA105 (pCAMBIA1304)

เลี้ยง *A. tumefaciens*สายพันธุ์ EHA105 (pCAMBIA1304) ในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มก./ล. เป็นเวลา 21 ชั่วโมง นำมาวัดค่าความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (OD_{550}) ให้มีค่าเท่ากับ 1.5-1.8 จากนั้นนำไปศึกษาผลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมต่อการเจริญของ *Agrobacterium*โดยทดสอบความไวของจุลินทรีย์ (Microbial susceptibility) ต่อสารปฏิชีวนะโดยวิธี Disc plate technique โดยดูดอาหารที่มี *Agrobacterium*ปริมาณ 100 μl เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง LB บนจานอาหารปริมาตร 20 มล. ทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นนำกระดาษกรองที่ปลอดเชื้อขนาด 6 มม. จุ่มสารละลายซีโฟแทกซีมความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0, 1000, 1100, 1200, 1300 และ 1400 มก./ล. ปล่อยให้แห้งนำมาวางบนอาหารแข็ง LB ที่มี *Agrobacterium* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ^{o}Cเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบทั้งหมด 5 ซ้ำ

บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ *Agrobacterium* ถูกยับยั้งหรือบริเวณวงใส (Clear zone)

5) การส่งถ่ายยีน *antisense ACC oxidase* สู่โพรโทคอร์มและ ต้นอ่อนกล้วยไม้เอียสกุล

5.1 นำเชื้อ *A. tumefaciens* EHA105 ที่มียีน *antisense ACC oxidase* มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB+ kanamycin 50 mg/L

5.2 ย้ายโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB+ kanamycin50 mg/L เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 14 ชั่วโมง นำสารละลายที่มีเชื้อมาวัด OD_{550} ให้มีค่าอยู่ระหว่าง 1.5 - 1.8

5.3 ดูดสารละลาย *A. tumefaciens* มาผสมในอาหารเหลวสูตร ½MS ที่เติม acetosyringone 100 µM ในอัตราส่วน 2 :1

5.4 นำโพรโตคอร์ม/ต้นอ่อนกล้วยไม้ขนาด 2-5 มิลลิเมตรที่เตรียมไว้ มาซับให้แห้งด้วยกระดาษปลอดเชื้อและทำแผลโดยใช้ปลายเข็มก่อนนำไปบ่มในอาหารเหลวสูตร ½MS + acetosyringone 100 µM ที่ผสมสารละลายที่มีเชื้อ *A. tumefaciens* ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที โดยเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที

5.5 ซับโพรโทคอร์มกล้วยไม้ให้แห้งด้วยกระดาษปลอดเชื้อ นำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะเป็นเวลา 3 วัน จนกระทั่งสังเกตเห็นการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* นำโปรโตคอร์มไปล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ที่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซึม 1,200 มก./ล. เป็นเวลา 5 นาที ซับโพรโทคอร์มให้แห้งด้วยกระดาษปลอดเชื้อ

5.6 นำโพรโทคอร์ม/ต้นอ่อนกล้วยไม้ไปเลี้ยง บนอาหารแข็งสูตร ½MS ที่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซึม ความเข้มข้น 1,200 มก./ล. ร่วมกับสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 20 มก./ล. ตามลำดับ โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ25±2°C ภายใต้ความเข้มแสง 40 μmol m^{-2} s^{-1} 16 ชม.ต่อวัน เป็นเวลา 1 เดือน ทำการคัดเลือกโพรโทคอร์ม/ต้นอ่อนที่ได้รับการถ่ายยีน

6) การตรวจสอบการสอดแทรกของยีนด้วย **GUS assay**

หลังจากการถ่ายยีนนาน 3 วัน นำโพรโตคอร์มมาล้างด้วยสารละลาย cefotaxime ความเข้มข้น 1200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เกาะติดอยู่ภายนอกชิ้นพืช ซับเนื้อเยื่อบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ ใส่เนื้อเยื่อในหลอด microtube เติมสารละลาย X-glue ให้ท่วมชิ้นส่วนพืช นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืนหยุดปฏิกิริยาโดยดูดสารละลายออกแล้วเติม 70% ethanol เพื่อกำจัดคลอโรฟิลล์ออกจากชิ้นพืชตรวจดูตำแหน่งที่เกิดสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อพืช

-เวลาและสถานที่ ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2553 สิ้นสุด กันยายน 2556

ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น และสถาบันวิจัยพืชสวน

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อการเจริญของโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอียสกุล

หลังจากส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชจำเป็นต้องมีการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีนออกจากเนื้อเยื่อพืชปกติ โดยใช้ยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะจำเพาะต่อยีนที่ถูกส่งถ่ายเข้าไปเป็นตัวช่วยในการคัดเลือก โดยปกติสารปฏิชีวนะจะฆ่าเนื้อเยื่อพืชปกติได้ แต่เนื้อเยื่อพืชที่มียีนเป้าหมายซึ่งต้านทานต่อสารปฏิชีวนะจำเพาะต่อยีนนั้นจะสามารถเจริญเติบโตได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะดังกล่าว ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ยีน *htp* ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก จากการศึกษาพบว่า ไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 20 และ 25 mg/l สามารถยับยั้งการเจริญของโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอียสกุลได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเข้มข้น 5 mg/l และ 15 mg/l โพรโทคอร์มกล้วยไม้เอียสกุลยังสามารถเจริญเติบโตได้ 76 และ 16 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ดังนั้นจึงเลือกระดับความเข้มข้นของ hygromycin ที่ 20 มก./ล มาใช้ในการคัดเลือกกล้วยไม้ที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

<u>ตารางที่ 1</u>

ลำดับ	**ชนิดของ antibiotic**	**ความเข้มข้น**	**จำนวนชิ้นเริ่มต้น**	**จำนวนชิ้นที่รอด**	**% รอด**
1	hygromycin	0 mg/l	50	50	100
2	hygromycin	5 mg/l	50	38	76
3	hygromycin	15 mg/l	50	8	16
4	hygromycin	20 mg/l	50	0	0
5	hygromycin	25 mg/l	50	0	0

การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมต่อการเจริญของโพรโทคอร์มของกล้วยไม้เอียสกุล

สารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมเป็นสารที่ใช้สำหรับกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ที่ใช้เป็นพาหะในการนำยีนเป้าหมายเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช ในขบวนการส่งถ่ายยีน *Agrobacterium* ส่วนหนึ่งจะพายีนเป้าหมายเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชในขณะที่บางส่วนจะเกาะบนผิวรอบๆเนื้อเยื่อซึ่งหากมีปริมาณมากจะเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นในการส่งถ่ายยีนจึงจำเป็นต้องกำจัด *Agrobacterium* ส่วนเกินด้วยสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีม ในขั้นตอนการกำจัด *Agrobacterium* ส่วนเกินออกจากเนื้อเยื่อจำเป็นต้องทราบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของซีโฟแทกซีมเพื่อให้สามารถกำจัดเชื้อได้หมด และไม่ทำลายโพรโทคอร์มกล้วยไม้ จากการศึกษาเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มกล้วยเอียสกุล ขนาด 2-5 มม. บนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่มีความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีม 5 ระดับคือ 0, 1000, 1100, 1200, 1300 และ 1400 มก./ล.ผลปรากฎว่า ที่ความเข้มข้น1000, 1100, และ 1200 มก./ล.ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มกล้วยไม้ ในขณะที่ ที่ความเข้มข้น1300 และ 1400 มก./ล. มีผลเสียต่อการมีชีวิตต่อโพรโทคอร์มกล้วยไม้เล็กน้อย (ตารางที่ 2) ดังนั้นความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมที่ระดับ 1200 มก./ล. น่าจะเหมาะสมในการใช้กำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ส่วนเกิน

<u>ตารางที่ 2</u>

ลำดับ	**ชนิดของ antibiotic**	**ความเข้มข้น**	**จำนวนชิ้นเริ่มต้น**	**จำนวนชิ้นที่รอด**	**% รอด**
1	Cefotaxime sodium salt	0 mg/l	50	50	100
2	Cefotaxime sodium salt	1,000 mg/l	50	50	100
3	Cefotaxime sodium salt	1,100 mg/l	50	50	100
4	Cefotaxime sodium salt	1,200 mg/l	50	50	100
5	Cefotaxime sodium salt	1,300 mg/l	50	49	98
6	Cefotaxime sodium salt	1,400 mg/l	50	47	94

การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมต่อการเจริญของ *A. tumefaciens*สายพันธุ์ EHA105 (pCAMBIA1304)

ในขั้นตอนการกำจัด *Agrobacterium* ส่วนเกินออกจากเนื้อเยื่อจำเป็นต้องทราบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของซีโฟแทกซีมเพื่อให้สามารถกำจัดเชื้อได้หมด และไม่ทำลายโพรโทคอร์มกล้วยไม้ จากการศึกษาผลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. tumefaciens*สายพันธุ์ EHA105 (pCAMBIA1304) โดยใช้ความเข้มข้น 5 ระดับเช่นเดียวกับทดลองในโพรโตคอร์ม ผลปรากฏว่า ที่ความเข้มข้น 1400 มกต่อลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. tumefaciens* ได้สูงสุดโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางของขอบใสเฉลี่ย 1.1 ซม. แต่เมื่อนำผลไปเทียบเคียงกับผลของซีโฟแทกซีมต่อการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มกล้วยไม้ พบว่า สารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมที่ความเข้มข้น 1300 และ1400 มกต่อลิตรมีผลกระทบต่อการทำลายเนื้อเยื่อโพรโทคอร์มกล้วยไม้ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยต่อเนื้อเยื่อของโพรโทคอร์มกล้วยไม้ในขณะที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *A. tumefaciens* ที่เกาะบนผิวเนื้อเยื่อได้ ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมที่เหมาะสมคือ 1200 มกต่อลิตร (ตารางที่ 3)

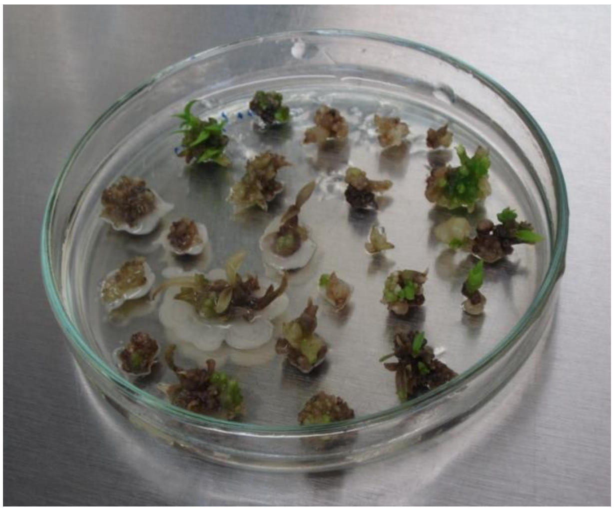
<u>ตารางที่ 3</u>

ลำดับ	ชนิดของ antibiotic	ความเข้มข้น	Clear zone เส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ย (cm.)
1	Cefotaxime sodium salt	0 mg/l	0
2	Cefotaxime sodium salt	1,000 mg/l	0.4
3	Cefotaxime sodium salt	1,100 mg/l	0.7
4	Cefotaxime sodium salt	1,200 mg/l	0.8
5	Cefotaxime sodium salt	1,300 mg/l	1.0
6	Cefotaxime sodium salt	1,400 mg/l	1.1

การส่งถ่ายยีน *antisense ACC oxidase* สู่โพรโทคอร์มและ ต้นอ่อนกล้วยไม้เอียสกุล

จากการถ่ายยีนส่งถ่ายยีน *antisense ACC oxidase* เข้าสู่โพรโทคอร์ม กล้วยไม้เอียสกุล จำนวน 70 ชิ้น โดยใช้ *A. tumefaciens* และนำโพรโทคอร์มกล้วยไม้ที่ผ่านขบวนการส่งถ่ายยีนมาคัดเลือก

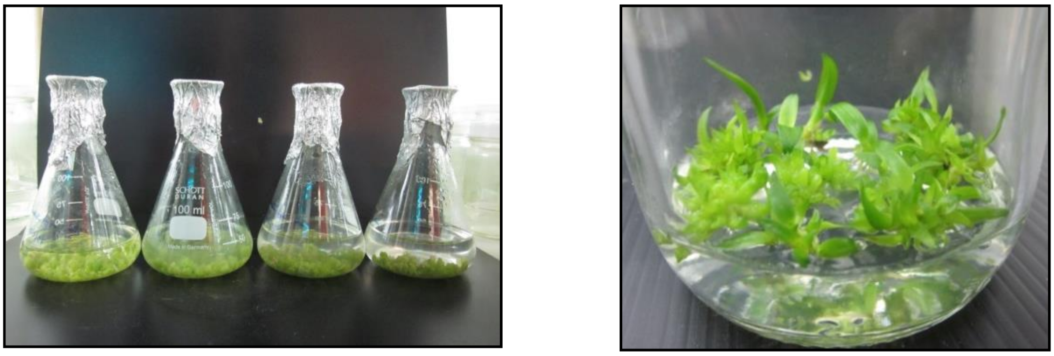
บนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีม ความเข้มข้น 1,200 มก./ล. ร่วมกับสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 20 มก./ล. ตามลำดับ เป็นเวลา 1 เดือน จากการคัดเลือกพบว่า กล้วยไม้เอียสกุล มีอัตราการรอดประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 1) สุ่มโพรโตคอร์มที่ผ่านการคัดเลือกส่วนหนึ่งไปตรวจสอบยีนโดยวิธี **GUS assay** พบว่ายีนสามารถส่งถ่ายเข้าใน (ภาพที่2) สำหรับส่วนที่เหลือนำไปเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนได้ประมาณ 200 โพรโตคอร์ม (5 flask) และนำมาชักนำให้เกิดต้น ซึ่งปัจจุบันมีต้นกล้วยไม้เอียสกุลต้นอ่อนที่ผ่านการคัดเลือกในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin ประมาณ 40 ต้น(ภาพที่ 3) แต่ต้นยังเล็กยังไม่สามารถตัดชิ้นส่วนมาตรวจสอบการสอดแทรกยีน *antisense ACC oxidase* ด้วยเทคนิค PCR ส่วนโพรโตคอร์มที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนนำไปเพิ่มปริมาณและชักนำให้เป็นต้นเพื่อใช้ปลูกเปรียบเทียบต่อไปซึ่งมีประมาณ 300 โพรโตคอร์ม (4 flask) และต้นอ่อนประมาณ 70 ต้น



ภาพที่ 1 โปรโตคอร์มกล้วยไม้เอียสกุลที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium*ที่มียีน *antisense ACC oxidase*ในอาหาร ½ MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin 20 mg/l ระยะเวลา 1 สัปดาห์ (ซ้าย)

และ 4 สัปดาห์(ขวา)

ภาพที่ 2 การแสดงออกของ GUS gene (สีน้ำเงิน) ในโปรโตคอร์มและต้นอ่อนกล้วยไม้เอียสกุลที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium*ที่มียีน *antisense ACC oxidase*



ภาพที่ 3 โปรโตคอร์มและต้นอ่อนกล้วยไม้เอียสกุลที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium*ที่มียีน *antisense ACC oxidase*

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อความสำเร็จเช่น ระยะเวลาที่บ่ม เนื้อเยื่อกับสารละลาย *Agrobacterium* ที่มียีน *antisense ACC oxidase* ความเข้มข้นของสารสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือก และสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ส่วนเกิน จากการทดลองครั้งนี้ปรากฏว่าได้โพรโตคอร์ม/ต้นอ่อนที่ได้รับการส่งถ่ายยีน 20 เปอร์เซ็นต์ และสภาวะที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีน *ACC oxidase* เข้าสู่โพรโตคอร์มและต้นอ่อนกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลคือ บ่มเนื้อเยื่อในสารละลาย *Agrobacterium* ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที โดยเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ความเข้มข้นของ

สารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมในการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium*ส่วนเกิน ที่เหมาะสมคือ 1200 มกต่อลิตรและความเข้มข้นของ hygromycin ที่ 20 มก./ล มาใช้ในการคัดเลือกกล้วยไม้ที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

ข้อเสนอแนะ: ควรดำเนินทดลองต่อโดยการเพิ่มปริมาณโพรโตคอร์ม/ต้นอ่อนที่ได้รับการส่งถ่ายยีนชักนำให้เป็นต้นเพื่อนำไปตรวจสอบการสอดแทรกของยีนอีกครั้งด้วย PCR technique และศึกษาลักษณะการเจริญเติบโต ลักษณะใบ ดอกและความคงทนของดอกเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ทำการส่งถ่ายยีน

10. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์:

ยีน ACC oxidase และวิธีการในการส่งถ่ายยีนที่ได้จากงานทดลองครั้งนี้สามารถนำไปเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ในพืชอื่นๆ

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี): -

12. เอกสารอ้างอิง :

ครรชิต ธรรมศิริ. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. โรงพิมพ์อัมรินทร์พริ้นติ้ง แอน พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน) กรุงเทพฯ. 283น.

เอกสาร การอบรมหลักการปรับปรุงพันธุ์พืช ระหว่างวันที่ 23 เมษายน – 27 เมษายน 2550 ความร่วมมือระหว่าง สวทช กับ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน . 142 น.

Aida R, T. Yoshida, K. Ichimura, R. Goto and M. Shibata. 1998. Extension of flower longevity in transgenic torenia plants incorporating ACC oxidase transgene. Plant Sci. 138: 91.101.

Murashige R.S. and Skoog, F. 1962. A revise medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 67: 603-607.

Mol, J.N.M., T.A. Holton and R.E. Kose. 1995. Floriculture: Genetic engineering of commercial Strains. Tibtech Sep; 13:31-39.

Nadeau, J. A.,Zhang, X.S., Nair, H. and O'Neill, S.D. 1993. Temporal and special regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in the pollination-induced senescence of orchid flower. Plant Physiology 103: 31-39.

Reid M.S. and M.J. Wu. 1992. Ethylene and flower senescence. J. of Plant Growth Regulation. 11: 37-43.

13. ภาคผนวก :

13.1 สูตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS (Marashige and Skoog, 1962)

สารเคมี	ปริมาณ(มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.\ 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
$MnSO_4.\ 4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.\ 5H_2O$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.33
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.\ 5H_2O$	0.025
$CoCl_2.H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.25
Nicotinic acid	0.5
Thiamine-HCL	0.1
Pyridoxine-HCL	0.5
Glycine	2.0
Myo-inositol	100
Agar	8000
Sucrose	2000
pH 5.7	

13.2 Luria Broth (LB medium) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

Bacto-tryptone	10 g/l
Bacto-yeast extract	5 g/l
NaCl	10 g/l

pH 7.2

(ถ้าเป็นอาหารแข็งให้เติม Bacto-agar 18 g/l)