รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุดปี 57

1.ชุดโครงการวิจัย:

2.โครงการวิจัย: โครงการวิจัยการพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้เพื่อยืดอายุการบานของดอก

กิจกรรม -

กิจกรรมย่อย -

3.ชื่อการทดลอง : ผลของการส่งถ่ายยีน Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) ต่อ การยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้แวนด้า

Effect of Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) on Prolonging the longevity of *Vanda* flowers

4.คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	: นางสาวยุพิน กสินเกษมพงษ์	สังกัด สถาบันวิจัยพืชสวน
ผู้ร่วมวิจัย	นางสาวอัมพิกา ปุนนจิต	สังกัด สถาบันวิจัยพืชสวน
	นางสาวศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล	สังกัด สถาบันวิจัยพืชไร่
ที่ปรึกษา	: นางสาว สุภาพ สุนทรนนท์	

5.บทคัดย่อ **:** การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน Antisense ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylase) oxidase ในการยืดอายุการบานของดอกกล้วยไม้สกุลหวายเอียสกุลและแวนด้า จากการทดลองครั้งนี้ปรากฏว่า การส่งถ่ายยีนในกล้วยไม้สกุลแวนด้าสามารถทำได้โดยวิธีเดียวกับที่ใช้ในสกุลหวาย หลังจากส่งถ่ายยีนแล้วเมื่อสุ่มโพรโตคอร์มมาตรวจสอบการส่งถ่ายยีนด้วยวิธี GUS assay พบว่าสามารถส่งถ่ายยีนได้ 60% แต่หลังจากนำโพรโตคอร์มมาที่ส่งถ่ายยีนแล้วมาเลี้ยงในอาหารแข็ง NDM ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin 10 มก./ล. เพื่อคัดเลือกโพรโตคอร์มที่มียีนเป้าหมายพบว่ามีเชื้อ Agrobacterium ขึ้นปกคลุมทำให้โพรโตคอร์มตาย

6.คำนำ : กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญ ที่นำรายได้เข้าประเทศปีละหลายพันล้านบาท ในปี 2551 มีการส่งออกกล้วยไม้มูลค่าประมาณ 3,300 ล้านบาท โดยประมาณ 70% (2400

ล้านบาท) มูลค่าส่งออกอยู่ในรูปดอกกล้วยไม้สด(สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร 2551) และไม้ตัดดอกที่มีการส่งออกมากที่สุด คือ กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* sp.) ปัญหาหนึ่งในการผลิตกล้วยไม้ตัดดอก คือ การเหี่ยวและดอกร่วงเร็วในระหว่างการขนส่ง 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 จะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยในการปรับปรุงพันธุ์มีประสิทธิภาพ และรวดเร็วขึ้น

การทดลองนี้เป็นการทดลองต่อเนื่องจากงานทดลองของ จงวัฒนา และคณะ (2556) ซึ่งได้ศึกษาการส่งถ่ายยีน ACC oxidase ในกล้วยไม้หวายเอียสกุลไว้เรียบร้อยแล้ว แวนด้าเป็นกล้วยไม้อีกสกุลหนึ่งที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นไม้ตัดดอกและไม้ต้น ดังนั้นจึงได้ทดลองเพิ่มเติมโดยศึกษาการส่งถ่ายยีน ACC oxidase ในกล้วยไม้สกุลแวนด้าพันธุ์เหลืองสุรัตน์ และลุมพินีเรด

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 หม้อ

นึ่งความดัน มีดผ่าตัด ปากคีบ และเครื่องแก้วชนิดต่างๆสำหรับเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อและเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สารเคมี: สารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีม เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 ที่มียีน antisense ACC oxidase สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน อาหารเหลว LB สารละลาย X-glue สารปฏิชีวนะ hygromycin สารเคมีต่างๆสำหรับเตรียมอาหาร MS สารเคมีสำหรับสกัด ดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ PCR เช่น ethanol extraction buffer Chloroform Isoamyl Isopropanol TE buffer RNase A 10X *Taq* buffer 25 mM $MgCl_2$ 10 mM dNTP *Taq* DNA polymerase และ Primer

-วิธีการ

1) การเพาะเลี้ยงโพรโตคอร์มกล้วยไม้

1.1 เพาะเลี้ยงโพรโตคอร์มกล้วยไม้แวนด้าเหลืองสุรัตน์และลุมพินีเรดด้วยอาหารสังเคราะห์ NDM ที่เติมฮอร์โมน NAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BA 1.0 มก./ล. ผงมันฝรั่ง 10 ก. /ล. และน้ำตาลมอลโทส 10 ก./ล. pH 5.4

2) การส่งถ่ายยีน *antisense ACC oxidase* สู่โพรโทคอร์มและ ต้นอ่อนกล้วยไม้แวนด้าเหลืองสุรัตน์และลุมพินีเรด

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

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

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

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

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

2.6 นำโพรโทคอร์ม/ต้นอ่อนกล้วยไม้ไปเลี้ยง บนอาหารแข็งสูตร อาหารแข็ง NDM ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin 10 มก./ล. โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ25±2°C ภายใต้ความเข้มแสง 40 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ 16 ชม.ต่อวัน เป็นเวลา 1 เดือน ทำการคัดเลือกโพรโทคอร์ม/ต้นอ่อนที่ได้รับการถ่ายยีน

3) การตรวจสอบการสอดแทรกของยีนด้วย **GUS assay**

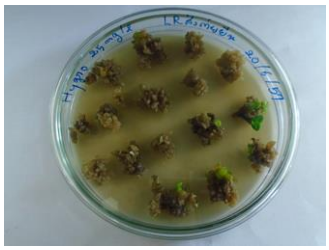
หลังจากการถ่ายยีนนาน 3 วัน นำโพรโตคอร์มมาล้างด้วยสารละลาย cefotaxime ความเข้มข้น 1200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เกาะติดอยู่ภายนอกชิ้นพืช ซับเนื้อเยื่อบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ ใส่เนื้อเยื่อในหลอด microtube เติมสารละลาย X-glue ให้ท่วมชิ้นส่วนพืช นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ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

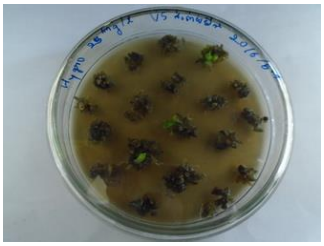
-เวลาและสถานที่ ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2556 สิ้นสุด กันยายน 2557
ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น และสถาบันวิจัยพืชสวน

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การส่งถ่ายยีน *antisense ACC oxidase* สู่โพรโทคอร์มกล้วยไม้แวนด้าเหลืองสุรัตน์และลุมพินีเรด

ดำเนินการถ่ายยีนส่งถ่ายยีน *antisense ACC oxidase* เข้าสู่โพรโทคอร์มกล้วยไม้แวนด้าเหลืองสุรัตน์และลุมพินีเรด พันธุ์ละ 70 ชิ้น หลังจากส่งถ่ายยีน นำโพรโตคอร์มมาที่ได้มาเลี้ยงในอาหารแข็ง NDM ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin 10 มก./ล. เพื่อคัดเลือกโพรโตคอร์มที่มียีนเป้าหมายพบว่ามีเชื้อ Agrobacterium ขึ้นปกคลุมทำให้โพรโตคอร์มไม่สามารถมีชีวิตรอดทั้ง 2 พันธุ์(ภาพที่ 1)





<u>ภาพที่ 1</u> โปรโตคอร์มกล้วยไม้เหลืองสุรัตน์ (ซ้าย) และลุมพินีเรด (ขวา) ที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium*ที่มียีน *antisense ACC oxidase*ในอาหาร NDM ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin 20 mg/l ระยะเวลา 4 สัปดาห์

การตรวจสอบการสอดแทรกของยีนด้วย GUS assay

จากการสุ่มโพรโตคอร์มของกล้วยไม้แวนด้าเหลืองสุรัตน์และลุมพินีเรดชนิดละ 10 โพรโตคอร์มของที่ได้รับการส่งถ่ายยีนมาตรวจการสอดแทรกของยีนเป้าหมายด้วยวิธี GUS assay พบว่า 6 ใน 10 ชิ้นพบสีน้ำเงินบนเนื้อเยื่อแสดงว่าสามารถส่งถ่ายยีนได้ (ภาพที่ 2)

<u>ภาพที่ 2</u> การแสดงออกของ GUS gene (สีน้ำเงิน) ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้แวนด้าเหลืองสุรัตน์และลุมพินีเรดที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium*ที่มียีน *antisense ACC oxidase*

การส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อความสำเร็จเช่น ระยะเวลาที่บ่ม เนื้อเยื่อกับสารละลาย *Agrobacterium* ที่มียีน *antisense ACC oxidase* ความเข้มข้นของสารสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือก และสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ส่วนเกิน จากการทดลองครั้งนี้ปรากฏว่าการส่งถ่ายยีนในกล้วยไม้สกุลแวนด้าสามารถทำได้โดยวิธีเดียวกับที่ใช้ในสกุลหวาย หลังจากส่งถ่ายยีนแล้วเมื่อสุ่มโพรโตคอร์มมาตรวจสอบตรวจสอบการส่งถ่ายยีนด้วยวิธี GUS assay พบว่าสามารถส่งถ่ายยีนได้ 60% แต่หลังจากนำโพรโตคอร์มมาที่ส่งถ่ายยีนแล้วมาเลี้ยงในอาหารแข็ง NDM ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin 10 มก./ล. เพื่อคัดเลือกโพรโตคอร์มที่มียีนเป้าหมายพบว่ามีเชื้อ Agrobacterium ขึ้นปกคลุมทำให้โพรโตคอร์มตาย

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองครั้งนี้ปรากฏว่า การส่งถ่ายยีนในกล้วยไม้สกุลแวนด้าสามารถทำได้โดยวิธีเดียวกับที่ใช้ในสกุลหวาย หลังจากส่งถ่ายยีนแล้วเมื่อสุ่มโพรโตคอร์มมาตรวจสอบตรวจสอบการส่งถ่ายยีนด้วยวิธี GUS assay พบว่าสามารถส่งถ่ายยีนได้ 60% แต่หลังจากนำโพรโตคอร์มมาที่ส่งถ่ายยีนแล้วมาเลี้ยงในอาหารแข็ง NDM ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin 10 มก./ล. เพื่อคัดเลือกโพรโตคอร์มที่มียีนเป้าหมายพบว่ามีเชื้อ Agrobacterium ขึ้นปกคลุมทำให้โพรโตคอร์มตาย

ข้อเสนอแนะ: กล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้งเหลืองสุรัตน์ และลุมพินีเรด ต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ในขั้นตอนของการล้างเชื้อ หรืออาจจะเพิ่มระยะเวลาในการล้างชิ้นส่วนโพรโตคอร์มให้มากขึ้น

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 สูตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ modified MS (NDM)

สารเคมี (Macro elements)	ปริมาณ(มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	480
KNO_3	200
$Ca(NO_3).4H_2O$	470
KCl	150
$MgSO_4$ $7H_2O$	250
KH_2PO_4	550
Micro elements(modified Nitsch 1954)	
MnSO4 4H2O	3
$ZnSO_4$ $7H_2O$	0.5
H_3BO_3	0.5
CaSO4 5H2O	0.025
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.025
$CoCl_2$ $6H_2O$	0.025
Conc H2SO4	0.5
Organic compounds (modified Morel & Wetmore 1951)	
Myo-inositol	100
Niacin	1.0
Pyridoxine-HCL	1.0
Thiamine-HCL	1.0
Calcium pantothenate	1.0
Adenine	1.0
1-Cystein	1.0
d-Biotin, cryst	0.1
Fe-EDTA	42

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)