

รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2560

1. แผนงานวิจัย แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
2. โครงการวิจัย วิจัยการค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่
กิจกรรม การศึกษาพัฒนาพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่และการทดสอบพืชตัดแปรพันธุกรรม
กิจกรรมย่อย -
3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) การถ่ายยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) เข้าสู่หน้าวัว
ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) Transformation of Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H)
Gene in Anthurium.
4. คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง นางสาวกุหลาบ คงทอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน นายประสาน สืบสุข สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวจิราพร แก่นทรัพย์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวอำไพ สีนพัฒนานนท์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางกัลยา เกาะกากลาง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรลำปาง

การถ่ายยีน *Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H)* เข้าสู่หน้าวัว
Transformation of *Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H)* Gene in *Anthurium*.

กุหลาบ คงทอง¹ ประสาน สืบสุข¹ จีราพร แก่นทรัพย์¹ อำไพ สิ้นพัฒนานนท์¹
กัลยา เกษะกากลาง²

บทคัดย่อ

ยีน *Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3'5'H)* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มรงควัตถุแอนโทไซยานินสีน้ำเงินหรือสีม่วง ในงานวิจัยนี้ได้ทำการถ่ายยีน *Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H)* ที่โคลนได้จากอัญชันสีน้ำเงินและนำเข้าสู่เวกเตอร์แบบโบนารี pMDC32 ได้เป็น *CtF3'5'H.pMDC32* ซึ่งเป็นชุดยีนที่โคลนได้และได้ผ่านการทดสอบการแสดงออกแล้วในยาสูบ (โดยกุหลาบ และ ประสาน 2557) มาทำการถ่ายสู่หน้าวัวโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 สามารถนำไปถ่ายฝากสู่หน้าวัวพันธุ์ไซเนตและพันธุ์ราปิโต ได้แคลลัสหน้าวัวหน้าวัวที่ได้รับการถ่ายยีน และผ่านการตรวจสอบในอาหารคัดเลือกที่เติม hygromycin สำหรับนำไปเลี้ยงเพื่อให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์และทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไป

¹ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรลำปาง

Abstract

Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3'5'H) gene is involved in flavonoid pathway leading to the production of the blue or purple-colored anthocyanins. *F3'5'H* from *Clitoria ternatea* was cloned into a pMDC32 binary vector, generating *CtF3'5'H.pMDC32*. The *CtF3'5'H.pMDC32* was introduced into the *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. *Anthurium spp. cv. Sonate* and *cv. Rahpido* transformation were performed using the *A. tumefaciens*. The transformation of *F3'5'H* into *Anthurium spp* was successful. The transformed *calli of Anthurium spp. were selected* on media containing hygromycin. Subsequently, they will to be cultured to complete plants and checked by PCR analysis using specific primers.

คำนำ

ในแต่ละปีประเทศไทยได้ผลิตไม้ดอกสำหรับใช้ทั้งภายในประเทศ และส่งออก แม้การผลิตเพื่อป้อนตลาดภายในประเทศจะมีอยู่มาก แต่การผลิตเพื่อส่งออกให้มูลค่าที่สูงกว่า ทำรายได้เข้าประเทศเป็นจำนวนมาก และมีแนวโน้มจะขยายตัวเพิ่มขึ้น เนื่องจากตลาดไม้ดอกเป็นตลาดที่มีผู้ค้าจำนวนมาก มีการแข่งขันสูง ดังนั้นการพัฒนาศักยภาพเพื่อการผลิตไม้ดอกเพื่อส่งออกเป็นความจำเป็นที่ผู้ผลิตต้องเอาใจใส่ และตอบสนองความต้องการของลูกค้าในทุกรูปแบบ ปัจจุบันลูกค้าให้ความสำคัญกับสีสันของดอกไม้เป็นอันดับแรก ผู้ผลิตจึงต้องสร้างความแปลกใหม่ในตัวสินค้า เพื่อรักษาและเพิ่มส่วนแบ่งการตลาดให้ได้มากที่สุด ซึ่งวิธีสร้างความหลากหลายด้านสีดอกเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคได้ เป็นการเพิ่มศักยภาพการผลิต และการส่งออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

หน้าวัวเป็นไม้ดอกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ที่ได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตลาดต่างประเทศและตลาดภายในประเทศต้องการ นอกจากการผลิตเพื่อ ตัดดอกแล้วยังผลิตเป็นไม้กระถางได้อีกด้วย ประเทศไทยมีพื้นที่การปลูกประมาณ 120 ไร่ กระจายไปทั่วประเทศ ได้แก่ กรุงเทพฯ นนทบุรี ปทุมธานี เลย กระบี่ ภูเก็ต ลำปาง เชียงใหม่ เชียงราย นครราชสีมา ชุมพร สุราษฎร์ธานี เป็นต้น มีผลผลิตทั่วประเทศ ประมาณ 4,800,000 ดอกต่อปี และเพิ่มปริมาณขึ้นทุกปี ปัจจุบันมีความต้องการหน้าวัวที่มีสีสันและ รูปร่างแปลกใหม่ มีความหลากหลายมากขึ้น จึงมีการมีการนำเข้าพันธุ์หน้าวัวจากต่างประเทศ โดยเฉพาะประเทศเนเธอร์แลนด์ เมื่อปี 2544 สั่งเข้ามา ประมาณ 140,000 ต้น ปี 2549 ดอกหน้าวัวมี ปริมาณการส่งออก 270,556 ชิ้น มูลค่าการส่งออก 2,220,383 บาท ใบหน้าวัวมีปริมาณ 47,508 ชิ้น มูลค่าการ ส่งออก 261,552 บาท ต้นหน้าวัวมีปริมาณการส่งออก 1,466 ขวด 42,499 ต้น มูลค่าการ ส่ง ออก 972,133 บาท รวม มูลค่า การ ส่ง ออก 3,454,068 บาท (

http://www.gardencenter.co.th/thai/love_suan_kasat) เป็นผลผลิตจากหน้าวัวพันธุ์ลูกผสมพันธุ์ใหม่ส่วนใหญ่ได้มาจากพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ซึ่งส่วนใหญ่นำเข้าจากเนเธอร์แลนด์ และมลรัฐฮาวาย สหรัฐอเมริกา เนื่องจากหน้าวัวมีความหลากหลายของพันธุ์มากขึ้น คุณภาพดอกดีขึ้น เทคโนโลยีการปลูกเลี้ยงหน้าวัวในประเทศไทยมีการพัฒนามากขึ้น และเป็นพืชที่สามารถปลูกได้ทั่วประเทศ ประกอบกับทัศนคติในการใช้ดอกหน้าวัวเปลี่ยนแปลงไป จึงมีการนิยมนำดอกหน้าวัวไปใช้งานมงคลมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับดอกไม้อื่นๆ หน้าวัวมีราคาสูงกว่าดอกไม้หลายชนิด รวมทั้งแนวโน้มตลาดดอกหน้าวัวในตลาดโลกขยายตัวอย่างต่อเนื่อง ทั้งหมดจึงเป็นปัจจัยสนับสนุนให้มีการปลูกหน้าวัวเป็นการค้ามากขึ้น

ในอนาคตหน้าวัวจะมีศักยภาพในการพัฒนาไปสู่อุตสาหกรรมไม้ดอกเพื่อการส่งออกต่างประเทศ ปัจจุบันภาคธุรกิจให้ความสำคัญกับการผลิตหน้าวัว ซึ่งได้พัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ เพื่อตอบสนองความต้องการของลูกค้าที่ต้องการความแปลกใหม่ของสีดอกอยู่ตลอดเวลา ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิมสามารถทำได้แต่มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถผสมพันธุ์ให้ได้สีดอกที่แตกต่างจากโทนสีของพ่อแม่ แนวทางการสร้างหน้าวัวสายพันธุ์ใหม่ให้มีดอกสีสรรโดดเด่น แปลกใหม่ สวยงาม มีความหลากหลายของสีดอก และมีโทนสีที่ไม่เคยปรากฏในธรรมชาตินั้น สามารถกระทำได้โดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งเป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชสมัยใหม่ ที่สามารถนำยีนควบคุมการเกิดสีดอกจากไม้ดอกชนิดอื่นที่มีโทนสีตามต้องการ ส่งถ่ายเข้าไปสู่หน้าวัว หรือยับยั้งการแสดงออกของยีนที่มีอยู่แล้ว เพื่อสร้างหน้าวัวพันธุ์ใหม่ให้มีสีสรรโดดเด่น สวยงาม และเกิดความแปลกใหม่ของโทนสีที่ไม่เคยมีอยู่ในธรรมชาติ ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มศักยภาพการส่งออกไม้ดอกในอนาคต การทดลองนี้ทำการถ่ายยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างรงควัตถุที่ให้ดอกไม้มีสีน้ำเงินหรือสีม่วงสู่หน้าวัว เพื่อปรับปรุงพันธุ์หน้าวัว ให้มีสีสรรหลากหลาย ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาอุตสาหกรรมไม้ดอกเพื่อการส่งออกในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. หน้าวัวพันธุ์ราปิโต้ และพันธุ์โซเนต (ดอกชมพู)
2. สารปฏิชีวนะ เช่น Kanamycin cefotaxime hygromycin
3. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
4. เชื้อแบคทีเรีย Escherichia coli สายพันธุ์ JM109
5. อาหารสังเคราะห์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
6. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช
7. พลาสมิด *Ct F3'5'H.pMDC32* (กุหลาบ และ ประสาน, 2555)
8. เชื้ออะโกรแบคทีเรีย LBA4404
9. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (SORVALL RC28C)

10. เครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) เครื่อง spectrophotometer
11. เครื่องมือสำหรับงานถ่ายยีน BTX Electroporation System รุ่น ELECTRO CELL MANIPULATOR 600 ,Electroporation cuvette ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
12. เครื่องมือ และสารเคมีอื่น ๆ สำหรับงานชีวโมเลกุล
13. เครื่องมือ และสารเคมีอื่น ๆ สำหรับงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

วิธีการทดลอง

การเตรียมพืชสำหรับใช้ถ่ายยีน มีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

1. ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบของหน่่าวัว โดยใช้หน่่าวัวพันธุ์ ราปิโต ดอกสีชมพู
2. นำใบหน่่าวัวมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ในสภาพปลอดเชื้อ
3. ชักนำให้ใบหน่่าวัวเกิดแคลลัส
4. เพิ่มปริมาณแคลลัส

เตรียมแคลลัสหน่่าวัวสำหรับใช้ในการถ่ายยีน โดยตัดชิ้นส่วนใบอ่อนหน่่าวัวพันธุ์ราปิโต และพันธุ์โชเนต นำมาฟอกฆ่าเชื้อแล้ว นำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ MS โดยทำการตัดใบหน่่าวัวเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 0.5-1 เซนติเมตร เลี้ยงในอาหารสูตร MS วาง 5 ชิ้น/plate เลี้ยงจนกระทั่งเกิดเป็นแคลลัส และเพิ่มแคลลัสให้ได้ปริมาณมากเพียงพอสำหรับนำไปใช้ในการถ่ายยีนต่อไป

การถ่ายยีน F3' 5'H เข้าสู่ แคลลัสหน่่าวัว มีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

1. เตรียม Agrobacterium ที่มี Binary vector pMDC32 + F3' 5'H เพื่อนำไปใช้ถ่ายเข้าสู่หน่่าวัว
2. ถ่ายยีนเข้าสู่หน่่าวัวโดยนำแคลลัสหน่่าวัวมาเลี้ยงร่วมกับเชื้อ Agrobacterium ที่มี Binary vector pMDC32 + F3' 5'H
3. นำแคลลัสหน่่าวัวมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS และทำการกำจัดเชื้อส่วนเกินออกจากเนื้อเยื่อ
4. นำแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีนมาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เพื่อคัดเลือกชิ้นส่วนที่ได้รับยีน F3' 5'H สำหรับนำมาเลี้ยงและตรวจสอบขั้นต่อไป

เตรียมเชื้ออะโกราแบคทีเรีย เลี้ยงเชื้ออะโกราแบคทีเรีย LBA4404 ที่มีพลาสมิด *Ct F3'5'H.pMDC32* (กุหลาบ และ ประสาน 2555) (Figure 1) มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว YEP (peptone 10 g/l +Yeast extract 10 g/l , NaCl 5 g/l pH 7.0) ที่เติม Kanamycin 50 μ g/ml เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง spin down และ resuspend pellet bacteria ด้วย co-

culture media ที่ประกอบด้วยอาหารเหลว สูตรMS ที่เติม NAA 0.1 mg/l ร่วมกับ BA 2 mg/l sucrose 3 % pH 5.7 ในอัตราส่วนเชื้อ *Agrobacterium* : อาหารเหลว เป็น 1 : 10 ให้ได้ OD.600 ประมาณ 0.6-1.0

นำแคลัสหน้าวัวที่ได้จากการเลี้ยงใบหน้าวัวที่เตรียมไว้มา เลี้ยงเขยาร่วมกับ *Agrobacterium* 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ แล้วซับเนื้อเยื่อให้แห้งด้วยกระดาษกรอง เลี้ยงในอาหารแข็ง สูตรMS ที่อุณหภูมิห้องในสภาพมืดเป็นเวลา 3 วัน ล้างใบด้วย cefotaxime 500 mg/lg เลี้ยงในอาหารแข็ง สูตรMS ที่เติม cefotaxime 200 mg/l เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 10 วัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม hygromycin 50 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี antibiotic เพื่อนำไปเลี้ยงให้พัฒนาสำหรับนำไปตรวจสอบต่อไป

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา (เริ่มต้น - สิ้นสุด)

2559- 2560

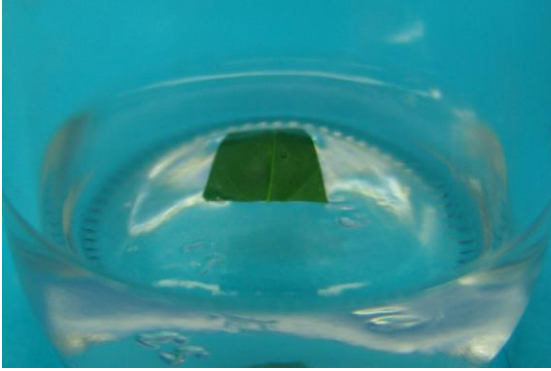
สถานที่ดำเนินการ

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

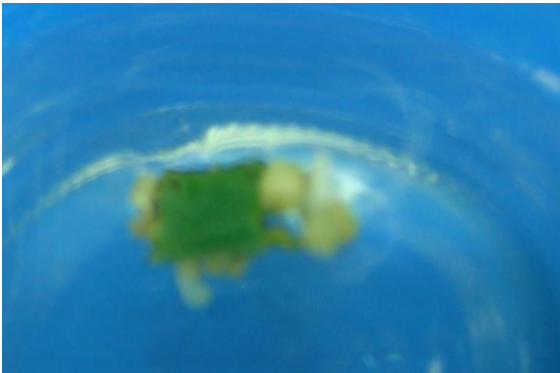
การเตรียมพืชสำหรับใช้ถ่ายยีน

จากการนำชิ้นส่วนใบอ่อนหน้าวัวมาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว และเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS. ทำให้ได้ชิ้นส่วนใบอ่อนของหน้าวัวในสภาพปลอดเชื้อ ดังภาพที่1

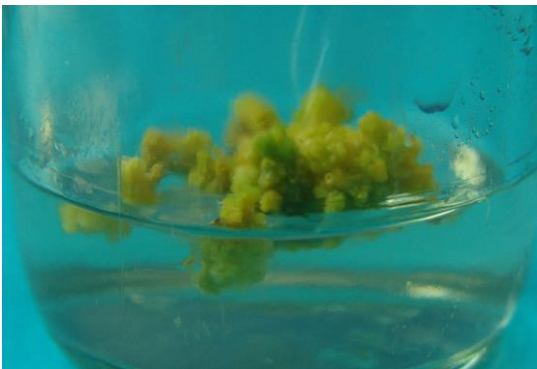


ภาพที่1. ชิ้นส่วนใบของหน้่าวัวในสภาพปลอดเชื้อ

จากนั้นชักนำให้ชิ้นส่วนหน้่าวัวในสภาพปลอดเชื้อให้เกิดแคลลัส ชิ้นส่วนหน้่าวัวเริ่มพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสรอบๆเนื้อเยื่อหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน เมื่อนำแคลลัสมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณทำให้ได้แคลลัสจากหน้่าวัวในปริมาณเพิ่มมากขึ้น ดังภาพที่2,3

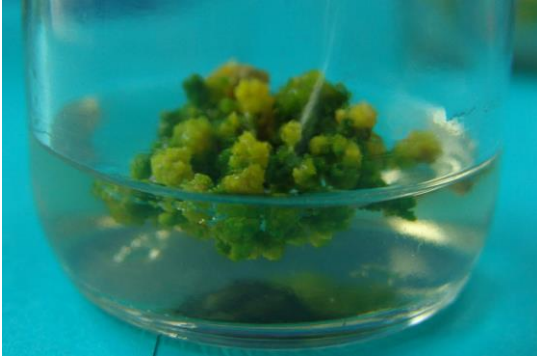


ภาพที่2. การเกิดแคลลัสหลังจากนำมาขึ้นใบหน้่าวัวมาเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส



ภาพที่3. แคลลัสหน้่าวัวหลังจากนำมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเป็นเวลา 9 เดือน

จากการนำแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงชิ้นส่วนหน้่าวัวในสภาพปลอดเชื้อ มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS สำหรับเพิ่มปริมาณแคลลัส ทำให้ได้แคลลัส ในปริมาณเพิ่มมากขึ้น ดังภาพที่ 4



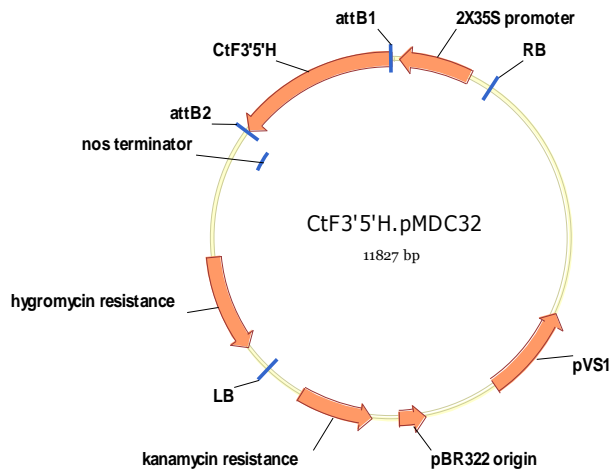
ภาพที่4. แคลลัสหน้าวัวหลังจากนำมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเป็นเวลา 12 เดือน

จากการทดสอบระดับไฮโกรมัยซินต่อการเจริญเติบโตของต้นหน้าวัวพบว่าระดับไฮโกรมัยซินที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการคัดเลือกหน้าวัวที่ได้รับการถ่ายยีนต่อไป

การถ่ายยีน F3' 5'H เข้าสู่ แคลลัสหน้าวัว

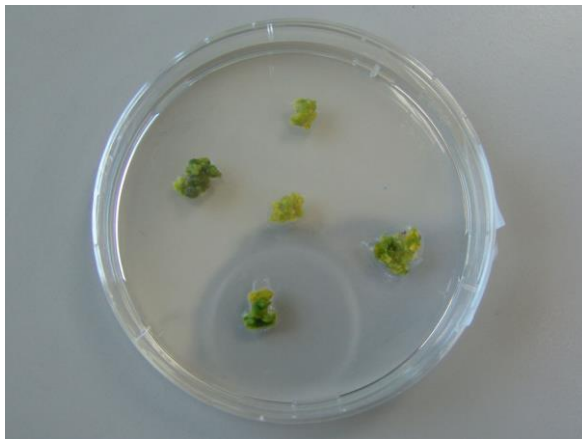
จากการเตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เตรียมสำหรับนำมาใช้ในการถ่ายยีน โดยการเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรีย LBA4404 ที่มีพลาสมิด *Ct F3'5'H.pMDC32* (กุหลาบ และ ประสาน 2555) มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว YEP (peptone 10 g/l +Yeast extract 10 g/l , NaCl 5 g/l pH 7.0) ที่เติม Kanamycin 50 $\mu\text{g/ml}$ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ทำให้ได้ *Agrobacterium* LBA4404 ที่มี พลาสมิด *Ct F3'5'H.pMDC32* สำหรับนำไปใช้ถ่ายเข้าสู่หน้าวัว (ภาพที่ 5)

เมื่อทำการ spin down และ resuspend pellet bacteria ด้วย co-culture media ที่ประกอบด้วยอาหารเหลว สูตร MS ที่เติม NAA 0.1 mg/l ร่วมกับ BA 2 mg/l ในอัตราส่วนเชื้อ *Agrobacterium* : อาหารเหลว เป็น 1 : 10 ทำให้ได้ OD.600 ประมาณ 0.8 ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสหน้าวัว

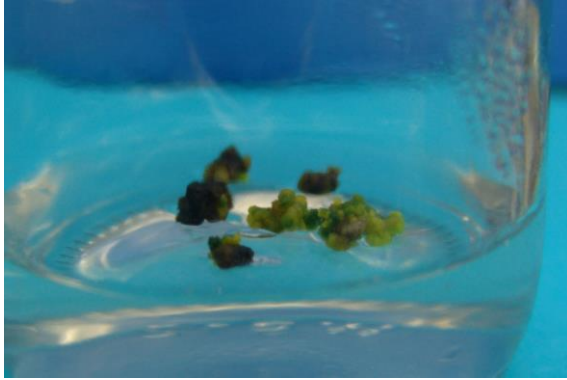


ภาพที่ 5. แสดงแผนที่ของยีน *F3' 5'H* (*Ct F3'5'H*) อยู่ใน เวกเตอร์ pMDC32

จากการถ่ายยีน *f35h* เข้าสู่แคลลัสหน้าวุ้นโดยใช้อะโกรแบคทีเรียที่เตรียม โดยการนำแคลลัสหน้าวุ้นที่ได้จากการเลี้ยงใบหน้าวุ้นที่เตรียมไว้มา มาเลี้ยงเขยาร่วมกับ *Agrobacterium* แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารแข็ง สูตร MS ที่อุณหภูมิห้องในสภาพมืดเป็นเวลา 3 วัน ล้างใบด้วย cefotaxime เลี้ยงในอาหารแข็ง สูตร MS ที่เติม cefotaxime 200 mg/l เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม hygromycin 50 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าแคลลัสหน้าวุ้นที่ได้รับการถ่ายยีนจะเจริญเติบโตและพัฒนาต่อไปได้ ส่วนแคลลัสหน้าวุ้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะกลายเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี antibiotic ทำให้ได้แคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน และผ่านการตรวจสอบในอาหารคัดเลือกที่เติม hygromycin (ภาพที่ 6 และ 7) สำหรับนำไปเลี้ยงเพื่อให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์และทำการตรวจสอบต่อไป



ภาพที่ 6. แคลลัสหน้าวุ้นที่ผ่านการถ่ายยีน หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน



ภาพที่7. แคลลัสหน้าวุ้นที่ได้รับการถ่ายยีนและผ่านการตรวจสอบในอาหารคัดเลือก hygromycin เป็นเวลา 30 วัน (สีเขียว=แคลลัส ที่ผ่านการตรวจสอบแล้วรอดชีวิต , สีน้ำตาล=แคลลัสที่ผ่านการตรวจสอบแล้วไม่รอดชีวิต)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการนำยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) ที่โคลนได้จากอัญชันสีน้ำเงินและนำเข้าสู่เวกเตอร์ ได้เป็น *CtF3'5'H.pMDC32* ซึ่งเป็นชุดยีนที่โคลนได้และได้ผ่านการทดสอบการแสดงออกแล้วในยาสูบ (โดยกุหลาบ และ ประสาน 2557) มาทำการถ่ายสู่หน้าวุ้นโดยใช้อะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ LBA4404 สามารถถ่ายยีนสู่หน้าวุ้นพันธุ์โซเนตและพันธุ์ราปิโด ได้แคลลัสหน้าวุ้นที่ได้รับการถ่ายยีน และผ่านการตรวจสอบในอาหารคัดเลือกที่เติม hygromycin สำหรับนำไปเลี้ยงเพื่อให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์และทำการตรวจสอบต่อไป

เนื่องจากการทดลองนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณ ในปี2559-2560 ไม่ได้รับสนับสนุนงบวิจัยต่อในปี2561 จึงต้องยุติการทำงานวิจัยลง ไม่ได้ดำเนินการต่อตามแผนการดำเนินงานวิจัยในส่วนของ การเลี้ยงแคลลัสที่หน้าวุ้นที่ได้รับการถ่ายยีนและผ่านการคัดเลือกในอาหารคัดเลือก hygromycin ให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์รวมทั้งตรวจสอบต้นที่ได้รับยีน F3' 5'H ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้น้ำวุ้นที่ได้รับการถ่ายยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) เพื่อปรับแต่งสีดอกที่เป็นของกรมวิชาการเกษตรสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างความหลากหลายของสีดอก นอกจากนี้สามารถนำไปเผยแพร่ในวารสารทางวิชาการได้

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ นักปรับปรุงพันธุ์ กรมวิชาการเกษตร สถาบันการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- กุหลาบ คงทอง และ ประสาน สืบสุข. 2555. การโคลนยีน *Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3'5'H)* จากอัญชันและพิทูเนีย. รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัย. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ.
- กุหลาบ คงทอง และ ประสาน สืบสุข. 2557. การโคลนยีน *Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3'5'H)* จากอัญชันและพิทูเนีย. รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัยประจำปี 2557 รอบ 6 เดือน. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ.
- ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤกษ์. 2542. เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมในการควบคุมสีและลักษณะของดอก. วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง 13(1): 9-13.
- สถานการณ์ไม้ดอกไม้ประดับปี 2550-2551. Available from : http://www.gardencenter.co.th/thai/love_suan/kasat.. Accesses : 3 July 2014.
- หน้าวัว. Available from : <http://www.ku.ac.th/e-magazine/apr50/agri/anthurium.htm..> Accesses : 3 July 2014.
- Aida R., Iwahori S., Kano Murakami Y., Shinkai S., Sugiyama N. and Sakiyama R. 1998. Gene silencing in transgenic torenia and its applications for breeding. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 67(6): 1200-1202.
- Aida. R, Kishimoto S, Tanaka Y and Shibata. M. 2000. Modification of flower color in torenia (*Torenia fourieri* Lind.) by genetic transformation. *Plant. Science. Limerick*.153(1): 33-42.
- Brugliera F., Gina Barri-Reweell, Timothy A. Holton and John G. Mason. 1999. Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the Ht1 locus of *Petunia hybrida*. *The Plant Journal* 19(4), 441-451.
- Holton, T.A. and Cornish. E.C. 1995. Genetic and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1071-1083.