



## รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาเบื้องต้นในการส่งถ่าย Transcription factor genes ที่เกี่ยวข้องกับ

การสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานินเข้าสู่กล้วยไม้เอื้องนางลม

(*Dendrobium peguanum* Lindl.)

A preliminary study on transformation of *Dendrobium peguanum* Lindl. with

transcription factor genes that involved in anthocyanin biosynthesis

โดย

รัฐพร จันทร์เดช

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2554

รหัสโครงการวิจัย มจ.1-54-079



## รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การศึกษาเบื้องต้นในการส่งถ่าย Transcription factor genes ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์  
รงควัตถุแอนโทไซยานินเข้าสู่กล้วยไม้เอื้องนางลม (*Dendrobium peguanum* Lindl.)  
A preliminary study on transformation of *Dendrobium peguanum* Lindl. with  
transcription factor genes that involved in anthocyanin biosynthesis

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย	ประจำปี	2554
	จำนวน	230,000 บาท

หัวหน้าโครงการ

นายรัฐพร จันทร์เดช

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

17 ตุลาคม 2554

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย เรื่อง การศึกษาเบื้องต้นในการส่งถ่าย Transcription factor genes ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานินเข้าสู่กล้วยไม้เอื้องนางลม (*Dendrobium peguanum* Lindl.) (A preliminary study on transformation of *Dendrobium peguanum* Lindl. with transcription factor genes that involved in anthocyanin biosynthesis) ได้สำเร็จลุล่วง โดยได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2553-2554

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการอนุชีววิทยาทางพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ ตลอดจนสถานที่เพาะเลี้ยงต้นกล้วยไม้ ขอขอบคุณหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์บางชนิดที่ใช้ในการวิจัย ขอขอบคุณนักศึกษาช่วยงานวิจัยทุกคนที่มีส่วนร่วมและสนับสนุนให้โครงการวิจัยนี้เสร็จสิ้นสมบูรณ์



## สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
การตรวจเอกสาร	6
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	19
ผลการวิจัย	24
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	31
เอกสารอ้างอิง	33
ภาคผนวก	39

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primers ที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>MYC</i> และ <i>WD40</i>	21
ตารางที่ 2 แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR	22
ตารางที่ 3 แสดงระดับความเข้มข้นของกานามัยซินต่อการเจริญของโพรโทคอร์มกล้วยไม้	25
ตารางที่ 4 จำนวนโพรโทคอร์มเอื้องนางลมที่บ่มร่วมกับ <i>A. tumefaciens</i> ในอาหาร LB ระยะเวลาต่างๆที่ต้านทานต่อกานามัยซิน	26
ตารางที่ 5 แสดงจำนวนโพรโทคอร์มเอื้องนางลมที่ได้รับการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-MYC และ pBI121MYC-WD40 และการแสดงออกของยีน <i>GUS</i>	27



ก

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 กล้วยไม้เอื้องนางลม <i>Dedrobium peguanum</i> LindL	12
ภาพที่ 2 ลักษณะโพรโทคอร์มเอื้องนางลมในอาหารแข็งสูตร VW ดัดแปลง อายุ 30 วัน	23
ภาพที่ 3 แสดงพลาสติกที่สร้างขึ้นในการส่งถ่ายยีน <i>MYC</i> (A) และ <i>MYC-WD40</i> (B)	24
ภาพที่ 4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>GUS</i> ในชิ้นส่วนโพรโทคอร์มของกล้วยไม้	28
ภาพที่ 5 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>MYC</i> โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน	29
ภาพที่ 6 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>MYC</i> และ <i>WD40</i>	29



การศึกษาเบื้องต้นในการส่งถ่าย Transcription factor genes ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุ  
แอนโทไซยานินเข้าสู่กล้วยไม้เอื้องนางลม (*Dendrobium peguanum* Lindl.)

A preliminary study on transformation of *Dendrobium peguanum* Lindl. with  
transcription factor genes that involved in anthocyanin biosynthesis

รัฐพร จันทรเดช

Ruttaporn Chundet

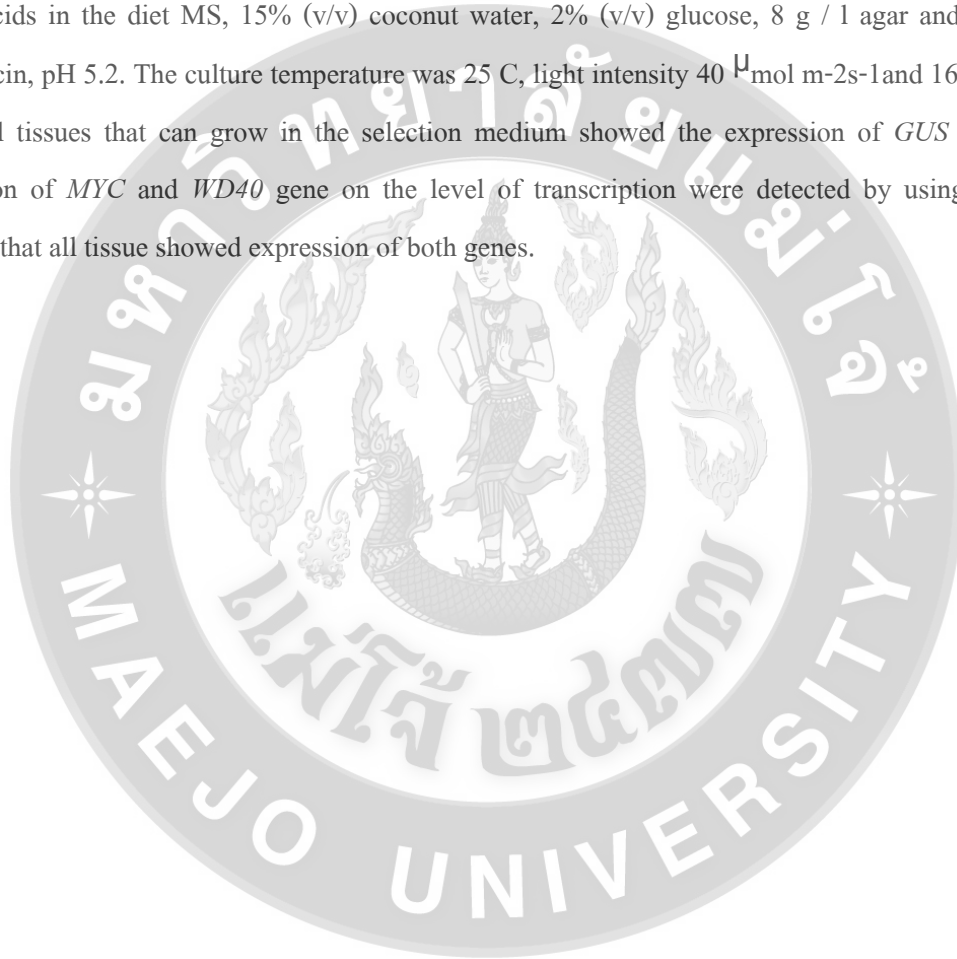
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

การศึกษาเบื้องต้นในการส่งถ่าย Transcription factor genes ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานินในกล้วยไม้สกุลเอื้องนางลมด้วยเทคนิค Agrobacterium Transformation พบว่า protocorm-like bodies (PLBs) ที่บ่มร่วมกับเชื้อ Agrobacterium เป็นเวลา 60 นาทีแล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์คัดแปลงสูตร VW โดยเติมวิตามินและกรดอะมิโนตามสูตรอาหาร MS โดยเติมน้ำมะพร้าว 15% (v/v) น้ำตาลซูโครส 2% (v/v) และผงวุ้น 8 กรัม/ลิตร ค่า pH 5.2 โดยเติมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าเนื้อเยื่อที่สามารถเจริญได้ในอาหารคัดเลือกมีการแสดงออกของยีน *GUS* นอกจากนี้ได้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน MYC และ WD40 ในระดับการ Transcription ด้วยเทคนิค RT-PCR พบการแสดงออกของยีนทั้งสองในเนื้อเยื่อที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก

### Abstract

Preliminary studies on the transfer of transcription factor genes involved in anthocyanin pigment biosynthesis in orchid *Dendrobium peguanum* Lindl, with Agrobacterium Transformation were investigated. The protocorm-like bodies (PLBs) were incubated with the Agrobacterium solution for 60 minutes and then cultured on solid synthetic medium, formula VW by the addition of vitamins and amino acids in the diet MS, 15% (v/v) coconut water, 2% (v/v) glucose, 8 g / l agar and 100 mg/l Kanamycin, pH 5.2. The culture temperature was 25 C, light intensity 40  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> and 16 hours day light. All tissues that can grow in the selection medium showed the expression of *GUS* gene. The expression of *MYC* and *WD40* gene on the level of transcription were detected by using RT-PCR revealed that all tissue showed expression of both genes.





## คำนำ

กล้วยไม้ถูกจัดเป็นสินค้าเกษตรที่สำคัญของไทย โดยเป็นหนึ่งในพืช Product Champion ของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เนื่องจากเป็นพืชที่ทำรายได้สูงและปริมาณการส่งออกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี โดยตลาดส่งออกที่สำคัญได้แก่ ญี่ปุ่น อิตาลี และสหรัฐอเมริกา

อุตสาหกรรมกล้วยไม้ของไทยเจริญก้าวหน้าอย่างมาก สามารถสร้างรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นอันดับหนึ่งในบรรดาไม้ดอกไม้ประดับทั้งหมดที่มีการส่งออก และไทยอยู่ในอันดับหนึ่งในการส่งออกดอกกล้วยไม้ของโลก โดยกล้วยไม้จากไทยมีความโดดเด่นทั้งในด้านสีสันและรูปร่างของดอก ซึ่งการส่งออกดอกกล้วยไม้และต้นกล้วยไม้มีปริมาณและมูลค่าเพิ่มขึ้นทุกปี ส่วนใหญ่ตลาดต่างประเทศจะนิยมสั่งซื้อกล้วยไม้สกุลหวาย เนื่องจากมีสีสันสดใส และระยะเวลาในการใช้งานนาน

ปัจจัยเสี่ยงต่อการสูญเสียดอกของการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับ โดยเฉพาะกล้วยไม้คือ ความต้องการดอกกล้วยไม้ในตลาดโลกมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา โดยต้องการความแปลกใหม่และหลากหลาย ปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ในประเทศไทยได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง แต่เนื่องจากข้อจำกัดด้วยวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบวิธีธรรมชาติใช้เวลานานอย่างมาก ทำให้ไทยเสียดอกบางส่วนให้กับไต้หวัน และสิงคโปร์ หรือแม้แต่นิวซีแลนด์ เนื่องจากประเทศเหล่านี้ได้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาประยุกต์ในการปรับปรุงพันธุ์ รวมทั้งมีการร่วมลงทุนกับเอกชน ทำให้เกิดกล้วยไม้สายพันธุ์ใหม่ๆ ในระยะเวลาอันรวดเร็ว ซึ่งหากประเทศไทยมีการสนับสนุนให้มีการพัฒนาสายพันธุ์กล้วยไม้ด้วยการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้ จะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะสามารถดึงตลาดต่างประเทศกลับมาเป็นของไทยได้

แม้ว่าในปัจจุบันไทยยังครองอันดับในการส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกเมืองร้อนได้มากเป็นอันดับหนึ่งของโลก แต่การส่งออกกล้วยไม้ของไทยก็ต้องเผชิญการแข่งขันที่รุนแรงมากขึ้นในตลาดโลกโดยประเทศคู่แข่งทั้งรายเก่าและรายใหม่จะขยายตลาดส่งออกเพื่อแย่งชิงส่วนแบ่งตลาดจากไทย ทั้งนี้โดยอาศัยการนำเทคโนโลยีมาพัฒนาสายพันธุ์ทั้งในด้านสีสัน รูปทรงและกลิ่น เพื่อให้เกิดความหลากหลาย เน้นการตอบสนองความต้องการของตลาดให้มากขึ้น ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ประเทศไทยต้องเร่งพัฒนาสายพันธุ์กล้วยไม้เพื่อรักษาตำแหน่งผู้ส่งออกอันดับหนึ่งของโลกต่อไป

ด้วยเหตุผลดังกล่าวผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาวิธีการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายโดยประยุกต์ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งมีเป้าหมายเพื่อหาเงื่อนไขที่เหมาะสมในการส่งถ่าย Transcription factor gene ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานินเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวายซึ่งได้เลือกเอื้องหวายนางลมเป็นตัวแทนโดยใช้เทคนิค Agrobacterium Transformation เพื่อจะนำไปสู่การพัฒนาสายพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวายให้มีความหลากหลายของสีส่นในระยะเวลาอันสั้นเพื่อที่สามารถแข่งขันกับต่างประเทศได้เนื่องจากกล้วยไม้สกุลหวายครองตลาดส่งออกคิดเป็น 80% ของกล้วยไม้ที่ประเทศไทยส่งออกทั้งหมด



## วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาเงื่อนไขที่เหมาะสมในการส่งถ่าย Transcription factor gene เข้าสู่กล้วยไม้หวายนางลมด้วยเทคนิค Agrobacterium Transformation
2. ศึกษาแนวทางในการปรับปรุงสีของดอกกล้วยไม้หวายนางลมโดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบเงื่อนไขที่เหมาะสมต่อการส่งถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้เอื้องนางลมด้วยเทคนิค Agrobacterium transformation
2. ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เอื้องนางลมให้เป็นพืชเศรษฐกิจชนิดใหม่ของไทยได้ในอนาคต
3. ผลงานวิจัยที่ได้สามารถเผยแพร่ในวารสารทางวิชาการได้

## การตรวจเอกสาร

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ในวงศ์ Orchidaceous ชื่อวิทยาศาสตร์ Orchid ชื่อสามัญ Orchid ชื่ออื่นๆเช่น เอื้อง (ภาคเหนือ) เป็นไม้ตัดดอกยอดนิยม เนื่องจากมีลักษณะดอกและสีอันลวดลายสวยงาม เป็นไม้ตัดดอกที่มีอายุการใช้งานได้นาน กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของไทย เพราะเป็นไม้ส่งออกขายต่างประเทศทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายร้อยล้านบาท มีการปลูกเลี้ยงอย่างครบวงจร ตั้งแต่การผสมเกสร เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เลี้ยงลูกกล้วยไม้ เลี้ยงต้นกล้วยไม้จนกระทั่งให้ดอก ตัดดอก บรรจุหีบห่อ และส่งออกเอง

แหล่งกำเนิดกล้วยไม้ป่าที่สำคัญของโลกมี 2 แหล่งใหญ่ๆ ด้วยกันคือ ลาตินอเมริกา กับเอเชียแปซิฟิก สำหรับในลาตินอเมริกาเป็นอาณาบริเวณอเมริกากลางติดต่อกับเขตเหนือของอเมริกาใต้ ส่วนแหล่งกำเนิดกล้วยไม้ป่าในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิก มีประเทศไทยเป็นศูนย์กลาง จากการค้นพบประเทศไทยมีพันธุ์กล้วยไม้ป่าเป็นจำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีสภาพแวดล้อมเอื้ออำนวยต่อการเจริญงอกงามของกล้วยไม้มาก และกล้วยไม้ป่าที่ในพบในภูมิภาคแถบนี้มีลักษณะเด่นที่เป็นเอกลักษณ์ของตนเอง แตกต่างจากกล้วยไม้ในภูมิภาคลาตินอเมริกา

### การตลาดความสำคัญ

กล้วยไม้เป็นพืชส่งออกที่สำคัญพืชหนึ่งของประเทศไทย กระทรวงเกษตรและสหกรณ์กำหนดให้กล้วยไม้เป็นหนึ่งในสี่ของพืช Product Champion เนื่องจากเป็นพืชที่ทำรายได้สูงและปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี กล้วยไม้หวายเป็นกล้วยไม้ที่มีปริมาณการส่งออกสูงที่สุด โดยในปี 2550 ประเทศไทยส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกและกล้วยไม้กระถางได้ 2,544 ล้านบาท และ 766 ล้านบาทตามลำดับ โดยจำนวนที่ส่งออกคิดเป็นกล้วยไม้หวายประมาณ 80% ของกล้วยไม้ที่ส่งออกทั้งหมดตลาดส่งออกที่สำคัญได้แก่ ญี่ปุ่น อิตาลี และอเมริกา (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550)

## ประวัติและข้อมูลทั่วไป

กล้วยไม้เป็นพืชวงศ์ใหญ่ มีกว่า 700 สกุล ที่พบในธรรมชาติมีประมาณ 25,000 ชนิด มีการผสมข้ามชนิดและข้ามสกุลมากกว่า 30,000 คู่ผสม กล้วยไม้มีดอกสวยงาม หลากหลายสีสัน เป็นที่นิยมปลูกเลี้ยงกันทั่วโลก ประเทศไทยเป็นแหล่งกำเนิดพันธุ์กล้วยไม้ที่สวยงามหลายชนิดและมีการพัฒนากล้วยไม้ลูกผสมจำนวนมากขึ้นภายในประเทศ

## ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กล้วยไม้เป็นพืชวงศ์ใหญ่ มีความแตกต่างกันภายในวงศ์อย่างเห็นได้ชัด โดยทั่วไปลำต้นของกล้วยไม้ไม่มีแก่นและเปลือก เนื้อในเสมอกัน ลำต้นมี 2 ลักษณะ คือ ลำต้นแท้ มีข้อและปล้องเหมือนพืชใบเลี้ยงเดี่ยวทั่วไป มีการเจริญเติบโตทางยอด ลำต้นเทียมหรือลำลูกกล้วยไว้สะสมอาหาร มีลำต้นเป็นเหง้า มีข้อและปล้องถี่ เจริญในแนวนอนไปตามผิวของเครื่องปลูก รากกลมอวบเป็นเส้นเล็กแข็งหรือแบนราบ มีทั้งรากดิน รากกิ่งดิน รากกิ่งอากาศ และรากอากาศ ใบเป็นใบเลี้ยงเดี่ยวมีลักษณะต่างกันไป เช่น รูปแถบ รูปกลมยาว หรือลดรูปเป็นเพียงเกล็ด แผ่นใบบางคล้ายใบหามก หนาอวบ น้ำ หรือเป็นแท่งกลม ส่วนมากแล้วไม่มีส่วนที่เป็นก้านใบชัดเจน สีของใบเป็นสีเขียวสด บางชนิดเป็นสีม่วงคล้ำ บางชนิดก็มีลวดลาย ดอกออกที่ปลายลำต้น ซอกใบหรือข้างลำต้น ดอกเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อ แต่ละดอกมีกลีบเลี้ยง 3 กลีบเรียงสลับกันกับกลีบดอก 3 กลีบ กลีบดอกอันล่างมีลักษณะต่างออกไป เรียกว่ากลีบปากหรือกลีบกระเปาะไว้สำหรับล่อแมลง ก้านเกสรตัวเมียและยอดเกสรตัวเมียเชื่อมติดกันกับเกสรตัวผู้เป็นเส้าเกสรอยู่กลางดอก เกสรตัวผู้อยู่รวมกันเป็นก้อนเป็นกลุ่มเรณู แต่ละอับเรณูมีฝาปิด มี 2, 4 หรือ 8 ก้อนแล้วแต่ชนิดกล้วยไม้ ยอดเกสรตัวเมียอยู่ใต้อับเรณู มีลักษณะเป็นเมือกเหนียว รังไข่อยู่ตรงส่วนของก้านดอก เมื่อได้รับการผสมจะเจริญไปเป็นเมล็ดต่อไป

กล้วยไม้เป็นพืชที่มีส่วนต่างๆ สมบูรณ์ คือ มีราก ต้น ใบ ดอก และผล รากของกล้วยไม้ไม่มีรากแก้ว ลำต้นไม่มีแก่นไม้ ใบจัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมีเส้นใบขนานกันตามความยาวของใบ ซึ่งมีรายละเอียดของส่วนต่างๆ ดังนี้

### ราก

กล้วยไม้มีระบบรากแบ่งเป็นหลายชนิด เช่น รากดิน รากกิ่งดิน รากกิ่งอากาศ และรากอากาศ

### ระบบรากดิน

จัดเป็นกล้วยไม้ที่มีระบบรากเกิดจากหัวที่อวบน้ำอยู่ใต้ดิน หัวรากจะมีน้ำมาก เช่นกล้วยไม้สกุลนางอ้ว กล้วยไม้ประเภทนี้พบมากบริเวณพื้นที่ที่มีสภาพอากาศในฤดูกลางที่ชัดเจน เช่น ฤดูฝนมีฝนตกชุก

และมีฤดูแล้ง เมื่อถึงฤดูฝนหัวจะแตกหน่อใบอ่อนจะชูขึ้นขึ้นมาบนผิวดิน และออกดอกในตอนปลายฤดูฝน เมื่อพ้นฤดูฝนไปแล้วใบก็จะทรุดโทรมและแห้งไป คงเหลือแต่หัวที่อวบน้ำและมีอาหารสะสมฝังอยู่ใต้ดินสามารถทนความแห้งแล้งได้

### ระบบรากกึ่งดิน

มีรากซึ่งมีลักษณะอวบน้ำ ใหญ่หยาบและแตกแขนงแผ่กระจายอย่างหนาแน่น สามารถเก็บสะสมน้ำได้ดีพอสมควร กล้วยไม้ประเภทนี้พบอยู่ตามอินทรียั่วตลิ่งที่เนาเปื่อยผุพังร่วนโปร่ง กล้วยไม้ที่มีระบบรากกึ่งดิน ได้แก่ กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี สกุล สเปโรทริกัลลอส สกุลเอื้องพร้าว

### ระบบรากกึ่งอากาศ

เป็นระบบรากที่มีเซลล์ผิวของรากมีชั้นเซลล์ที่หนาและมีลักษณะคล้ายฟองน้ำผิวนอกเกลี้ยงไม่มีขน มีลักษณะคล้ายฟองน้ำเก็บและดูดน้ำได้มาก สามารถนำน้ำไปใช้ตามเซลล์ผิวได้ตลอดความยาวของราก ระบบรากกึ่งอากาศมักมีรากแขนงใหญ่หยาบอยู่กันอย่างหนาแน่นไม่มีรากขนอ่อน รากมีขนาดเล็กกว่ารากอากาศ กล้วยไม้ระบบรากกึ่งอากาศได้แก่ กล้วยไม้สกุลแคทลียา สกุลออนซิเดียม เป็นต้น

### ระบบรากอากาศ

กล้วยไม้ที่มีระบบรากเป็นรากอากาศ จะมีรากขนาดใหญ่ แขนงรากหยาบ เซลล์ที่ผิวรากจะทำหน้าที่ดูดน้ำ เก็บน้ำและนำน้ำไปตามรากได้เป็นอย่างดี ทำให้สามารถทนทานต่อความแห้งแล้งได้ดี รากอากาศไม่ชอบอยู่ในสภาพเปียกแฉะนานเกินไป นอกจากนั้นปลายรากสดมีสีเขียวของคลอโรฟิลล์สามารถทำหน้าที่ปรุงอาหารได้เช่นเดียวกับใบเมื่อมีแสงสว่าง เพราะฉะนั้นรากประเภทนี้จึงไม่หลบแสงสว่างเหมือนรากต้นไม้ดินทั่วไป กล้วยไม้ที่มีระบบรากอากาศได้แก่ กล้วยไม้สกุลแวนด้า สกุลช้าง สกุลกุหลาบ สกุลแมลงปอ สกุลเข็มและกล้วยไม้สกุลเรนแนนเฮอร์รา

### ลำต้น

หมายถึงส่วนที่เป็นข้อ บริเวณส่วนเหนือข้อและติดอยู่กับข้อจะมีตา ตาอาจจะแตกเป็นหน่ออ่อน กิ่งอ่อนหรือช่อดอกก็ได้ ส่วนที่เป็นข้อเป็นส่วนที่มีใบ กาบใบ หรือกาบของลำต้นที่ไม่มีส่วนของใบเจริญออกมาได้ ส่วนที่อยู่ระหว่างข้อเรียกว่า ปล้อง สำหรับลำต้นของกล้วยไม้ที่โผล่พ้นจากเครื่องปลูกแบ่งได้ 2 ประเภท คือ ลำต้นแท้ และลำต้นเทียม

### ลำต้นแท้

คือลำต้นที่มี ข้อ ปล้อง เหมือนกับลำต้นของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวทั่วไป ที่ส่วนเหนือข้อจะมีตา ซึ่งสามารถเจริญเป็นหน่อใหม่ และช่อดอกได้ ลำต้นประเภทนี้จะเจริญเติบโตออกไปทางยอด ได้แก่ กล้วยไม้สกุลแวนด้า แมลงปอ และรองเท้านารี

### ลำต้นเทียม

หรือที่เรียกว่า ลำลูกกล้วย ทำหน้าที่สะสมอาหาร ตาที่อยู่ตามข้อบนๆ ของลำลูกกล้วยสามารถแตกเป็นหน่อหรือช่อดอกได้ แต่ลำต้นที่แท้จริงของกล้วยไม้ประเภทนี้คือ เหง้า ซึ่งเจริญในแนวนอนไปตามผิวของเครื่องปลูก ลักษณะของเหง้ามีข้อและปล้องถี่ กล้วยไม้ที่มีลำต้นลักษณะนี้ ได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวาย แคทลียา เอพิเดินดรัมและสกุลออนซิเดียม

### ใบ

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว คือเส้นใบจะอยู่ในลักษณะขนานกันไปตามความยาวของใบ ใบของกล้วยไม้ไม่มีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปตามชนิดของกล้วยไม้ นับตั้งแต่รูปร่าง สี สัน ขนาด และการทรงตัวของใบตามธรรมชาติ ลักษณะใบของกล้วยไม้มีหลายชนิด เช่น ใบแบน ใบกลม และใบร่องซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างพวกใบกลมกับใบแบน แต่ใบกล้วยไม้ส่วนมากแล้วจะมีลักษณะแบน การเรียงตัวจะมีทั้งเรียงสลับกันและเรียงซ้อนทับกัน สีของใบส่วนมากมีสีเขียวอมเหลืองบางชนิดใบมีสีน้ำตาลคลายสวยงาม หน้าที่ของใบ คือ สังเคราะห์แสง โดยสารสีเขียวเรียกว่าคลอโรฟิลล์ที่อยู่ภายในใบร่วมกับแสงสว่าง ช่วยให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศผ่านเข้าไปทางรูถ่ายก๊าซของใบทำปฏิกิริยากับน้ำเกิดเป็นน้ำตาล นอกจากนี้ใบยังทำหน้าที่คายน้ำออกจากต้น ช่วยให้รากสามารถดูดน้ำและอาหารเข้าสู่ต้น เป็นการแทนที่น้ำที่ระเหยออกจากใบ ทำให้ต้นได้อาหารหรือปุ๋ยผ่านเข้าทางรากได้ ใบของกล้วยไม้มีลักษณะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ เช่น กล้วยไม้ในสกุลสแพธโกล็อตติส (*Spathoglottis*) มีลักษณะใบเป็นจีบ กล้วยไม้พญาไร้ใบ (*Chiloschista usneoides* LDL) มีลักษณะใบที่เล็กมากเกาะอยู่ตามกิ่งไม้ในที่ค่อนข้างร่ม มีรากหนาแน่นสีเขียว สามารถปรุงอาหารได้ ใบจึงเจริญออกมามีขนาดใหญ่กว่าหัวเข็มหมุดเล็กน้อย กล้วยไม้รองเท้านารี (*Paphilopedilum*) ลักษณะใบมีสีเขียวสดงามหลายชนิดมีใบสีเขียวแก่สลับเขียวอ่อน กล้วยไม้ (*Anoectochilus siamensis*) ลักษณะใบมีสีน้ำตาลอมแดงและมีลายหรือกระดิวสวยงามมาก

### ช่อดอก

(Inflorescence) มีลักษณะแตกต่างกันไปอย่างกว้างขวางแล้วแต่สกุลและชนิดของกล้วยไม้ บางชนิดมีก้านช่อดอกสั้นมาก บางชนิดมีก้านช่อดอกยาว บางชนิดมีช่อดอกตั้งแข็ง (Erect) บางชนิดมีช่อดอกลักษณะโค้งหรือห้อยหัวลง เช่น ช่อดอกกล้วยไม้ไอยเรศ (*Rhynchostylis retusa*) กล้วยไม้บางชนิดมีช่อดอกยาวและมีแขนงแยกออกไปอีก เช่น ช่อดอกกล้วยไม้ในสกุลเรแนนเธอร่า (*Renanthera*) ก้านซึ่งเป็นแกนกลางของช่อดอกจะประกอบด้วยข้อและปล้อง ช่อดอกของกล้วยไม้บางชนิดมีตาซึ่งอยู่ตามข้อของก้านที่เป็นแกนช่อดอกสามารถแตกและเจริญออกมาเป็นต้นกล้วยไม้เล็กๆ ได้ เช่น ก้านช่อดอกกล้วยไม้สกุลฟาแลนด้า นีออฟซิส เป็นต้น

## ดอก

ดอกกล้วยไม้เป็นดอกสมบูรณ์เพศ คือ เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกันมีหน้าที่ในการสืบพันธุ์ ดอกมีลักษณะ คือ กลีบรองดอก คือกลีบชั้นนอก เป็นส่วนที่ห่อหุ้มป้องกันส่วนต่างๆ ในขณะที่มีสภาพเป็นตาดอกอยู่ มักมีลักษณะและสีสั้นคล้ายใบ กลีบดอก กล้วยไม้กล้วยดอก 6 กลีบ แบ่งออกเป็น 2 ชั้น ชั้นนอก 3 กลีบ และชั้นใน 3 กลีบ กลีบชั้นนอกอยู่ข้างบนหนึ่งกลีบ ข้างๆ หรือข้างล่าง 2 กลีบ กลีบคู่ล่างนี้จะมีขนาดรูปร่างและสีสั้นเหมือนกัน แต่กลีบบนอาจแตกต่างออกไป สำหรับกลีบชั้นใน 3 กลีบ กลีบหนึ่งอยู่ข้างล่าง อีก 2 กลีบอยู่ข้างบน กลีบคู่นี้จะมีขนาด รูปร่าง สีสั้น เหมือนกัน ส่วนกลีบล่างจะเปลี่ยนไปโดยมีขนาดเล็กลงหรือโตขึ้น และมีสีสั้นผิดไปจากกลีบคู่บน กลีบคู่ล่างมีชื่อเรียกเฉพาะว่า ปากหรือ กระเป๋ การจำแนกประเภทของกล้วยไม้ออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ตามลักษณะภายนอก เพื่อสะดวกในการปลูกเลี้ยง การขยายพันธุ์ ตลอดจนการศึกษา ค้นคว้า ซึ่งการจำแนกกล้วยไม้สามารถจำแนกได้ดังนี้

### จำแนกตามลักษณะราก

เป็นการจำแนกตามลักษณะรากหรือตามระบบรากของกล้วยไม้

### จำแนกตามลักษณะการเจริญเติบโต

สามารถจำแนกได้ 2 ประเภท คือ

**ประเภทไม้แตกกอ (Monopodial)** เป็นกล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตขึ้นไปทางส่วนยอด คือตาที่ยอดจะแตกใบใหม่เจริญขึ้นเรื่อยๆ ส่วนโคนต้นจะออกรากไล่ตามขึ้นไป เมื่อกล้วยไม้มีอายุมากขึ้นส่วนของโคนจะแห้งตายได้ยอดขึ้นไป กล้วยไม้ประเภทนี้มีระบบรากแบบรากอากาศ การเรียงตัวของใบเป็นแบบซ้อนทับกัน และตัวใบต่างมีข้อต่อกับกาบใบ ส่วนมากเนื้อใบหนาแบน บางสกุลมีใบเป็นก้านกลมดูคล้ายกิ่ง กลีบรองดอกคู่ล่างมักเชื่อมติดกัน ทำให้เกิดเป็นรูปกางขึ้น กลีบกระเป๋าดังติดอยู่ตรงโคนเส้าเกสรและมักจะมีเดือยหรือไม่มีก็เป็นรูปดงในหลอดเดียว หรือดงนี้มักมีตุ่มหรือดิ่งปรากฏอยู่เสมอ กลุ่มเรณูมีจำนวน 2 กลุ่ม มีก้านส่งยาวและกลุ่มเรณูหนึ่งๆ จะมีร่องความยาวปรากฏให้เห็น การออกดอกจะออกที่ตาตามข้อของลำต้นเท่านั้น ไม่ออกที่ยอด ลักษณะการถือฝักและเมล็ด ปลายฝักจะตั้งชี้ขึ้น เมล็ดที่สมบูรณ์จะมีสีน้ำตาล ส่วนเมล็ดลีบมีสีขาว กล้วยไม้ที่จัดอยู่ในประเภทไม้แตกกอได้แก่ กล้วยไม้ในสกุล แวนด้า สกุลเข็ม สกุลช้าง สกุลกุหลาบ สกุลเสือโคร่ง สกุลม้าวัง สกุลแมลงปอ สกุลเรแนนเซอร์และสกุล แวนด้าฟซิส

**ประเภทแตกกอ (Sympodial)** เป็นกล้วยไม้ประเภทที่มีรูปทรงและการเจริญเติบโตคล้ายกับพืชที่แตกกอทั่วไป คือในต้นหนึ่งหรือกอหนึ่งจะประกอบด้วยต้นย่อยหลายต้น ต้นแท้จริงของกล้วยไม้ประเภทนี้จะอยู่ในเครื่องปลูก เช่น กล้วยไม้ในสกุลรองเท้านารี อาจมีลำต้นที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างโผล่ยื่นออกมาซึ่ง



มักบวมเป่ง และทำหน้าที่สะสมอาหาร ส่วนส่วนนี้เรียกว่า “ลำลูกกล้วย” เช่น กล้วยไม้ในสกุลหวาย สกุลแคทลียา เป็นต้น กล้วยไม้ประเภทแตกกอมีระบบรากทั้งที่เป็นรากดิน รากกิ่งดินและรากกิ่งอากาศ กล้วยไม้ดินมีการเรียงตัวของใบม้วนซ้อนเวียนกันไป ส่วนกล้วยไม้อากาศเรียงซ้อนทับกัน การออกดอกบางชนิดออกดอกที่ยอด บางชนิดออกดอกที่ตาข้างตามข้อของลำลูกกล้วย บางชนิดออกดอกได้ทั้งที่ตายอดและตาข้าง บางชนิดออกดอกเฉพาะลำลูกกล้วยที่ทิ้งใบหมดแล้ว โคนเส้าเกสรยื่นยาวออกไปและเชื่อมติดกันกับกลีบรองดอก ลักษณะการถือฝักและเมล็ด ปลายฝักจะห้อยชี้ดิน เมล็ดที่สมบูรณ์เมื่อแก่จะมีสีเหลือง ส่วนเมล็ดดิบมีสีขาว กล้วยไม้ที่จัดอยู่ในประเภทแตกกอ ได้แก่ กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี สกุลหวาย สกุลแคทลียา สกุลออนซิเดียม และสกุลแกรรมาโตฟิลลัม

กล้วยไม้สกุลหวาย เป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae วงศ์ย่อย Epidendroideae และสกุล *Dendrobium* (ชุนินทร์, 2540) กล้วยไม้สกุลหวาย เป็นสกุลที่มีจำนวนชนิดมากที่สุดในปัจจุบัน พบว่ากล้วยไม้สกุลนี้มีมากกว่า 1,000 ชนิด นักพฤกษศาสตร์จึงได้จำแนกกล้วยไม้สกุลหวายออกเป็นหมู่ได้อีก 41 หมู่ (Baker and Baker, 1996) ซึ่งในประเทศไทยพบกล้วยไม้สกุลนี้ตามธรรมชาติมากกว่า 150 ชนิด ทุกชนิดเป็นกล้วยไม้อิงอาศัย ลักษณะต้นมีทั้งแบบที่เป็นลำกลมยาว ลำต้นรูปลูกกล้วย รูปกระสวย รูปเหลี่ยม ตลอดจนพวกที่ลำต้นพอมยาวกล้วยเส้นลวดแตกต่างกันไป (อบฉันท, 2549) กล้วยไม้หวายเป็นกล้วยไม้ที่มีปริมาณการส่งออกสูงที่สุด การส่งออกกล้วยไม้มีแนวโน้มเติบโตอย่างต่อเนื่องตามความต้องการที่ยังคงเพิ่มขึ้นในตลาดโลกทำให้กล้วยไม้เป็นพืชที่ได้รับความสนใจในการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์อย่างกว้างขวาง ถึงแม้ว่าประเทศไทยได้ชื่อว่าเป็นประเทศที่มีประสบการณ์ มีศักยภาพในการปลูกเลี้ยงและการผลิตเพื่อขยายต้นพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกล้วยไม้ในระดับแนวหน้า แต่ในปัจจุบันอุตสาหกรรมกล้วยไม้ต้องมีการแข่งขัน จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาพันธุ์ใหม่ออกสู่ตลาดอยู่เสมอ ลักษณะแปลกใหม่ที่มีแนวโน้มเป็นที่ต้องการของตลาด ได้แก่ กลิ่นหอมและไม้ดอกกระถางขนาดเล็ก เป็นต้น ซึ่งในประเทศไทยเป็นแหล่งกำเนิดของกล้วยไม้สกุลหวายขนาดเล็กหลายชนิด เช่น เอื้องหวายนางลม (*Dendrobium peguanum* Lindl.) เอื้องข้าวตอกปราจีน (*Dendrobium oligophyllum* Gagnep.) และเอื้องข้าวตอก (*D. compactum* Rolfe ex W.Hackett.) ซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่มีกลิ่นหอม ดอกบานจำนวนมากต่อช่อ จึงมีแนวคิดในการพัฒนาปรับปรุงกล้วยไม้สกุลหวาย เพื่อผลิตเป็นกล้วยไม้กระถางขนาดเล็ก ซึ่งมีทั้งสีสันที่สวยงามและมีกลิ่นหอมเป็นการค้า เนื่องจากกล้วยไม้หวายของไทยส่วนใหญ่จัดอยู่ในหมู่ *Stachyobium*, *Distichophyllum*, *Formosae* และ *Dendrobium* ในขณะที่กล้วยไม้หวายพันธุ์การค้าเป็นลูกผสมที่ได้มาจากกลุ่ม *Phalaenanth*, *Ceratobium*, *Eleutheroglossum* (*Spatulata*) และ *Latouria* ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์โดยนำกล้วยไม้หวายพันธุ์มาผสมข้ามร่วมกับหวายลูกผสมพันธุ์การค้าจึงควรต้องมีการศึกษาความสามารถในการผสมข้ามหมู่ของกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ เพื่อดูความเป็นไปได้ในการพัฒนาพันธุ์ต่อไป



ภาพที่ 1 กล้วยไม้เอื้องนางลม *Dedrobium peguanum* Lindl.

เอื้องนางลม หรือ หวายนางลม หรือ *Dedrobium peguanum* Lindl. เป็นกล้วยไม้อิงอาศัยจำพวก เจริญทางด้านข้าง กล้วยไม้ชนิดนี้พบขึ้นเฉพาะถิ่นทางภาคเหนือของประเทศไทย มีมากที่สุดแถบ จังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดตาก เมื่อต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้วสามารถแตกต้นใหม่ หรือหน่อใหม่จาก โคนกอ หรือตามข้อลำต้นได้ มีมากมายหลายสกุล เช่น สกุลหางเมงเงา สกุลสิงโต สกุลน้ำตื้น กระเรก ระร่อนสกุลหอยและว่านเพชรหึง เป็นต้น

ลำต้นของหอย หรือ ลำลูกกล้วยของ “หอยนางลม” เป็นรูปไข่ หรือเกือบกลม ใบเป็นรูปขอบขนานแกมรูปรี ออกสลับที่ปลายยอด ใบค่อนข้างหนา ผิวใบเรียบ ปลายแหลม โคนใบเป็นกาบหุ้มลำต้น หรือลำลูกกล้วย เป็นสีเขียวสด ดอก ออกเป็นช่อแบบกระจุกตามซอกใบ หรือตามข้อลำต้นช่วงปลายยอด แต่ละช่อประกอบด้วยดอกย่อยจำนวนมาก กลีบเลี้ยงเป็นรูปขอบขนาน กลีบดอกรูปเดี่ยว ทั้งกลีบเลี้ยงและกลีบดอกเป็นสีขาวแกมม่วงอ่อน กลีบปากเป็นสีม่วงและมีเส้นสีน้ำตาลอมม่วงปลายกลีบบิดเป็นคลื่นเล็กน้อยชัดเจน ดอก เมื่อบานเต็มที่กว้างประมาณ 0.8 ซม. ดอกมีกลิ่นหอมแบบพิเศษคือ หอมเหมือนกลิ่นน้ำผึ้ง เวลาที่มีดอกดกและดอกบานพร้อมกันทั้งต้นจะดูสวยงามและส่งกลิ่นหอม ให้สดชื่นเป็นที่ชื่นใจยิ่งอีก ทั้งดอกออกตลอดปี แต่ข้อดีของหอยนางลมคือความหลากหลายของสีดอกที่มีอยู่จำกัด ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการปรับปรุงพันธุ์หอยนางลมโดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมให้มีความหลากหลายของสีสันของดอก เพื่อให้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของตลาดกล้วยไม้ไทย

## การเกิดสีในพืช

โดยปกติการเกิดสีของดอกไม้ขึ้นอยู่กับรงควัตถุ ดังนี้ คือ flavonoids และ carotenoids โดยที่รงควัตถุ carotenoid จะพบสะสมที่ chromoplasts ซึ่งกระจายอยู่ภายในไซโทพลาสซึม รงควัตถุชนิดนี้ก่อให้เกิดสีเหลือง ส้มและแดง สำหรับรงควัตถุ flavonoid พบสะสมอยู่ในแวคคิวโอลของเซลล์และก่อให้เกิดสีแดง ม่วงและน้ำเงิน หากมีการผสมระหว่างรงควัตถุทั้งสองได้จะทำให้เกิดแถบและ สีที่มีลวดลายสวยงาม flavonoids มีบทบาทสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพืช แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่จัดอยู่ในกลุ่มของ flavonoids พบในแวคคิวโอลและในเนื้อเยื่อดอก และใบของพืช แอนโทไซยานินพบมากในแวคคิวโอลของกลีบดอก (petal) เป็นรงควัตถุที่ทำให้เกิดสีที่แตกต่างกันในพืชผัก ผลไม้ และดอกไม้ (Martin, 1993)

แอนโทไซยานินเป็นกลุ่มของรงควัตถุที่มีสีแดงไปจนถึงสีม่วงหรือน้ำเงิน (Mol et al., 1998) อยู่ในกลุ่มของ flavonoid biosynthesis pathway แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและสีไปตามค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของสารละลายในแวคคิวโอลที่เปลี่ยนแปลงไป สีที่เกิดขึ้นของดอกไม้เกิดขึ้นจากกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับรงควัตถุดังกล่าว สารในกลุ่มของแอนโทไซยานิน มีประมาณ 200 หรือมากกว่า 200 ชนิด (Liew et al., 1998) รงควัตถุแอนโทไซยานินจะมี flavan nucleus เป็นโครงสร้างหลัก แต่จะแตกต่างกันไปข้างขึ้นอยู่กับ side chain ของ ring โดยเฉพาะตรงตำแหน่งของ B-ring ซึ่งเป็น ring ที่มี functional group ต่าง ๆ มากทำให้เกิดชนิดของแอนโทไซยานินที่แตกต่างกันไป สามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ pelargonidin (ส้ม-แดง) cyanidin (แดง) peonidin (แดง - แดงเข้ม) delphinidin (ม่วงอ่อน - น้ำเงิน) petunidin (ม่วง - น้ำเงิน) และ malvidin (ม่วง) (Aida et al., 2000) แต่ละกลุ่มมีโครงสร้างที่ B-ring ต่างกัน

โดยทั่วไปดอกไม้สีแดงจะมีรงควัตถุแอนโทไซยานินชนิดที่เรียกว่า cyanidine ส่วนดอกไม้สีน้ำเงินจะมี delphinidin แต่ดอกไม้ที่มีรงควัตถุแอนโทไซยานินเดียวกัน แต่มีสีแตกต่างกัน เกิดเนื่องจากความแตกต่างของ pH ภายในเซลล์ หาก pH ในเซลล์เป็นค่ามากสีที่เกิดระหว่างการรวมตัวของแอนโทไซยานินกับ co-pigment จะให้สีน้ำเงิน (โดยที่ pH ในดินจะมีผลกระทบน้อยมากต่อระดับ pH ในเซลล์ของดอกไม้) แสดงว่า ระดับ pH ในเซลล์ของดอกไม้จะต้องมีการควบคุมอยู่ที่คงที่ตลอดเวลา เพื่อไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีได้ง่าย (Harborne & Williams, 1992)

สีของดอกไม้จัดว่ามีความสำคัญต่อลักษณะของไม้ดอก การสร้างสายพันธุ์ใหม่ที่ได้สีดอกใหม่เป็นเป้าหมายของนักปรับปรุงไม้ดอก จากการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกลไกของการสังเคราะห์รงควัตถุได้ สามารถที่จะคัดเลือกพันธุ์ที่มีสีที่ต้องการได้ (Aida et al., 2000) เป็นระยะเวลา

ยาวนานที่บรรดานักคัดพันธุ์ไม้ดอกได้พยายามคัดเลือกพันธุ์ไม้ดอกที่มีลักษณะที่ดีที่สุด แต่ก็ยังไม่ได้สายพันธุ์ที่มีสีตามที่ต้องการทุกประการ เนื่องมาจากข้อจำกัดใน gene pool ของพืชชนิดนั้น ๆ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับรงควัตถุนั้น ๆ ไม่ปรากฏในพืชชนิดนั้น อาทิเช่น แอนโทไซยานินแม้พบมากมายในไม้ดอกหลายชนิด แต่สีน้ำเงินเป็นรงควัตถุที่ไม่สามารถพบได้ในไม้ดอกหลายชนิด เช่น กุหลาบ คาร์เนชั่น ทิวลิป และ เบญจมาศ การค้นหาคัดเลือกไม้ที่มีสีที่แตกต่างไปจากเดิมจึงมีความจำเป็นที่จะต้องเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมภายในพืช การส่งถ่ายยีนโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมก็เป็นวิธีหนึ่งที่ยอมรับใช้ในปัจจุบัน แต่ในเบื้องต้นต้องค้นหายีนที่ต้องการจะส่งถ่ายให้ได้

### การควบคุมรูปแบบของการเกิดสี

กลีบดอกไม้จะมีรูปแบบการเกิดสีซึ่งเกิดจากการสะสมของ anthocyanins ที่เซลล์จำเพาะ การควบคุมชีวสังเคราะห์ anthocyanins จะควบคุมที่ระดับการถอดรหัสยีนเป็นส่วนใหญ่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ anthocyanins แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มของยีนโครงสร้างซึ่งทำให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาชีวเคมีการสร้างสาร anthocyanins และกลุ่มของยีนควบคุม จะให้โปรตีนซึ่งกำหนดการแสดงออกของยีนโครงสร้างและรูปแบบของการสะสมเม็ดสี โดยการแสดงออกของยีนควบคุม จะมีรูปแบบที่จำเพาะต่อรูปแบบของการเกิดสี (Holton T.A. และ Cornish E.C. 1995) ถึงแม้ว่าในพืชหลายชนิดจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรม แต่ก็พบว่ายีนโครงสร้าง และยีนควบคุมซึ่งทำหน้าที่เดียวกัน ในชีวสังเคราะห์ anthocyanins นั้น จะมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ร่วมกัน และยีนเหล่านี้ยังถูกกระตุ้นการแสดงออกด้วยแสง การศึกษาถึงการควบคุมชีวสังเคราะห์ anthocyanins โดยเฉพาะเทคนิคการกลายพันธุ์นั้นพบว่า การควบคุมชีวสังเคราะห์ นี้ส่วนใหญ่เกิดจากการทำงานร่วมกันของยีนควบคุม ในการกำหนดรูปแบบการแสดงออกของยีนโครงสร้าง

มีการจำแนก ยีนควบคุมชีวสังเคราะห์ anthocyanins ในพืชหลายชนิด ในข้าวโพดพบว่ามียีนควบคุม 2 กลุ่ม คือ *r* และ *cl* ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในเนื้อเยื่อต่างๆ สมาชิกของยีนในกลุ่ม *r* (*r*, *lc*, *sn*, *b*) จะถอดและแปลรหัสให้โปรตีนซึ่งมีกรดอะมิโนที่เป็นกรดที่ปลาย N จำนวนมาก และที่ปลาย C มีส่วนของ basic helix-loop-helix (bHLH) ทำหน้าที่จับกับ DNA (DNA binding domain) ในขณะที่สมาชิกของกลุ่ม *cl* (*cl* และ *pl*) จะถอดและแปลรหัสให้โปรตีนซึ่งมีโดเมน MYB ที่มีส่วนของ helix-turn-helix สำหรับจับกับ DNA ในข้าวโพดจะมีสองกลุ่มนี้หลายยีน แต่มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกันไป (Ludwig และ Wessler 1990), (Cone et al., 1993) กลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนในชีวสังเคราะห์นี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานการทำงานของยีนควบคุมในการควบคุมการแสดงออกที่เหนือโปรโมเตอร์ของ DFR (Grotewold et al., 1994), (Sainz et al., 1997)

### MYC transcription factor

นอกจากชนิดและรูปทรงแล้ว สีของไม้ดอกไม้ประดับยังนับเป็นสิ่งที่สำคัญมาก ที่จะดึงดูดความสนใจและทำให้เกิดความประทับใจในยามที่มองเห็น สีของดอกไม้ที่เรามองเห็นนั้นเป็นผลมาจากกลุ่มของรงควัตถุในพืช (plant pigments) รงควัตถุ 3 กลุ่มหลักใหญ่ ๆ ที่ทำให้เกิดสีในไม้ดอกในธรรมชาติ ได้แก่ betalains, carotenoids และ anthocyanins รงควัตถุแอนโทไซยานิน ซึ่งสร้างขึ้นจาก flavonoid pathway เป็นรงควัตถุที่ทำให้เกิดสีส้ม, แดง, ม่วง และน้ำเงินในดอกไม้ชนิดต่าง ๆ

วิธีการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน ถูกนำมาเป็นเป้าหมายหลักในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพและเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรม เพื่อที่จะสร้างสารประกอบที่จะทำให้เกิดไม้ดอกที่มีสีแปลกใหม่หรือเปลี่ยนแปลงไปจากพันธุ์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ การควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เป็นระบบการควบคุมการแสดงออกของยีนในพืชที่มีการศึกษากันมากที่สุดระบบหนึ่ง (Grotewold, 2006) ปัจจัยหลักที่สำคัญอย่างหนึ่งในการควบคุมการแสดงออกในระดับการถอดรหัสของยีน ก็คือ transcription factors ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการเกิดกระบวนการถอดรหัส (transcription) โดยผ่านทาง การเข้าจับกับลำดับเบสในส่วนที่เป็น โปรโมเตอร์ของยีน โดยตรงหรือเข้าจับกับ RNA polymerase หรือโปรตีนอื่น ๆ ในกระบวนการเริ่มต้นการถอดรหัส (transcription initiation)

โปรตีน transcription factors ที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ควบคุมการแสดงออกของยีนในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ได้แก่ bHLH (basic-helix-loop-helix) ซึ่งพบทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ (Nicola *et al.*, 2003) bHLH เป็นโปรตีนในกลุ่มของ transcription factor MYC-like protein มีโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิที่ประกอบด้วย motif ที่มีลักษณะเป็น basic helix loop helix มีหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสของยีนที่เข้ารหัสให้เอนไซม์ในขั้นตอน Late stage ของวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินซึ่งเริ่มจากขั้นตอนที่เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ dihydroflavonol reductase (DFR) (Quattrocchio *et al.*, 1999)

จากการศึกษาในข้าวโพด พบว่าโปรตีน bHLH และ MYB transcription factors สามารถกระตุ้นการถอดรหัสของยีนหลายตัวที่เข้ารหัสให้เอนไซม์ในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Roth *et al.*, 1991; Bodeau and Walbot, 1992; Lesnick and Chandler, 1998) เช่นเดียวกับในพืชใบเลี้ยงคู่ที่มีการค้นพบโปรตีน bHLH ที่ควบคุมวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ตัวอย่างเช่น โปรตีน DELILA ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมสีที่ปรากฏในกลีบดอกของดอกลินมังกร (Snapdragon) (Goodrich *et al.*, 1992) โปรตีน JAF13 และ AN1 ที่ควบคุมสีของดอกพิทูเนีย (Petunia) (Quattrocchio *et al.*, 1993, 1998, 2000)

และโปรตีน TT8 ที่ควบคุมการสร้างแอนโทไซยานินในต้นอ่อนของ *Arabidopsis* (Shirley *et al.*, 1995) และการสร้าง proanthocyanidin ในฝัก (siliques) (Nesi *et al.*, 2000)

ในปี ค.ศ. 1992 Lloyd และคณะ ได้ทำการส่งถ่ายยีน *Lc* ซึ่งเป็น bHLH ในข้าวโพดเข้าสู่ *Arabidopsis* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณรงควัตถุแอนโทไซยานินและเพิ่มจำนวน trichomes ที่สร้างขึ้นในต้นอ่อนของ *Arabidopsis* ได้ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษา ยีน *R* ซึ่งเป็น bHLH ที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวโพดเช่นเดียวกันกับยีน *Lc* พบว่าสามารถแสดงออกได้ในพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น *Arabidopsis*, พิทูเนีย, ยาสูบ และมะเขือเทศได้ โดยทำให้เกิดการสะสมของรงควัตถุแอนโทไซยานินในพืชดังกล่าว (Lloyd *et al.*, 1992; Goldsbrough *et al.*, 1996; Bradley *et al.*, 1998) เช่นเดียวกันกับการแสดงออกของยีน *delila* ที่สามารถทำให้ปริมาณรงควัตถุแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นในต้นมะเขือเทศทั้งในส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อของลำต้น ใบ และดอก เมื่อทำการส่งถ่ายยีนดังกล่าวเข้าไปในพืชทั้งสองชนิด

จากการทดลองที่ได้กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าโปรตีนในกลุ่มของ bHLH หรือ MYC like proteins สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน การส่งถ่ายยีนที่เข้ารหัสให้โปรตีนในกลุ่มดังกล่าวเข้าสู่พืช สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการสร้างหรือการสะสมรงควัตถุแอนโทไซยานินในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพืชได้ไม่ว่าจะเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหรือพืชใบเลี้ยงคู่

ใน pathway ของการสังเคราะห์ anthocyanin มีเอนไซม์หลายตัวที่เกี่ยวข้อง โดยเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ chalcone synthase (CHS), chalcone-flavanone isomerase (CHI), flavanone 3-hydroxylase (F3H); flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H); flavonoid 3', 5'-hydroxylase (F3' 5'H) และ dihydroflavonol-4-reductase (DFR) เอนไซม์ Flavonoid 3-hydroxylase (F3'H) และ flavonoid 3'-5' hydroxylase ตามลำดับ

ปัจจุบันยีนที่เข้ารหัสการสังเคราะห์เอนไซม์เหล่านี้ถูกค้นพบแล้วในพืชหลายชนิด (Holton *et al.*, 1995) รวมทั้งมีรายงานถึงการประยุกต์ใช้ในการเปลี่ยนแปลงสีดอกไม้โดยวิธีทาง พันธุวิศวกรรมด้วย ในการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ anthocyanin นั้นมีรายงานการใช้วิธีการต่างๆ ที่ประสบผลสำเร็จ ในการค้นพบยีนดังกล่าวได้เป็นจำนวนมาก เช่น การใช้ homologous gene สามารถค้นหาโดยวิธี hybridization วิธีการเช่นนี้สามารถค้นหายีนที่ค่อนข้าง conserved เช่น *CHS* Ueyama *et al.* (2002) รายงานการพบ flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H), flavonoid 3', 5' - hydroxylase (F3' 5'H) และ flavone synthase II (FNSII) จากสร้อยมยุรา โดยที่การสะสม anthocyanin หรือ flavonol เกิดจากหน้าที่ของเอนไซม์แต่ละตัวที่ทำงานควบคุมซึ่งกันและกัน

ในแง่การประยุกต์ใช้ ซึ่งมีรายงานการเปลี่ยนสีดอกไม้โดยวิธีการส่งถ่ายยีนสังเคราะห์เอนไซม์สำหรับ anthocyanin เข้าสู่พืชดอกหลายชนิด เช่น กุหลาบ คาร์เนชั่น ทิวลิป โดยสามารถเปลี่ยนสีได้สายพันธุ์ใหม่มากมาย โดยวิธีทั้ง Sense and Antisense เพื่อที่จะ ยับยั้ง (inactivate) ยีนที่มี

อยู่แล้วในเซลล์ สำหรับการส่งถ่ายยีน Flavonol 3-5 Hydroxylase ( $F3'5'H$ ) เข้าสู่เนื้อเยื่อพืชเนื้อ โดยวิธี Sense เข้าพืชเนื้อ สามารถเพิ่มสีแดงของพืชเนื้อมากขึ้นโดยเปลี่ยนเป็นสี magenta อีกทั้ง transgenic plants บางต้นจะให้แบบของสีที่ไม่เหมือนของเดิม เช่น star-shaped pattern เป็นต้น หากส่ง Antisense ของ ยีน  $F3'5'H$  เข้าต้นสีน้ำเงินพบว่าทำให้ลดจากน้ำเงินเข้มเป็นสีน้ำเงินอ่อน หรือเปลี่ยนเป็นสีชมพู แสดงว่ายีน  $F3'5'H$  นั้นเป็นตัวควบคุมหรือสวิตช์การเปิดปิดในกระบวนการสังเคราะห์  $F3'5'H$  (Shimada et al., 2001)

จากการศึกษาของ Jaakola et al. (2002) รายงานว่าแอนโทไซยานินเป็น รงควัตถุที่ทำให้เกิดสีในดอกไม้ การที่ดอกไม้มีสีที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดหรือกลุ่มของรงควัตถุแอนโทไซยานินที่เป็นองค์ประกอบ ชนิดของน้ำตาลที่เกาะกับแอนโทไซยานินเพื่อสร้างเป็นแอนโทไซยานิน ดังนั้นหากสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในกล้วยไม้ ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมได้ อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีดอกของกล้วยไม้ ซึ่งมีรายงานการเปลี่ยนสีดอกไม้โดยวิธีการส่งถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เข้าสู่พืชดอกหลายชนิด เช่น กุหลาบ คาร์เนชั่น ทิวลิป พบว่าสามารถทำให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ที่มีสีดอกแตกต่างไปจากเดิม (Deroles et al., 1997; Tanaka et al., 1998) การใช้ดีเอ็นเอเทคโนโลยีจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูง ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ได้สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการและใช้เวลารวดเร็ว

จะเห็นได้ว่ามีรายงานถึงการการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยเฉพาะการเปลี่ยนสีของดอกไม้ด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรมได้โดยตรงโดยใช้อินที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีเป้าหมายที่จะศึกษาการส่งถ่าย Transcription factor genes ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุในพืชเข้าสู่กล้วยไม้เอื้องนางลม เพื่อนำไปสู่การศึกษาต่อยอดเพื่อสร้างกล้วยไม้สายพันธุ์ใหม่ที่มีสีดอกต่างจากเดิมในอนาคต

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 1) พืชที่ใช้ในการทดลอง

กล้วยไม้เอื้องนางลม *Dendrobium peguanum* Lindl

### 2) พลาสมิดและแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

2.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการโคลนยีน ได้แก่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 alpha และ JM109 *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 และ AGL1

2.2 พลาสมิดเพื่อการส่งถ่ายยีน ได้แก่ pSTART, pBI121 โดยที่พลาสมิด ทั้งสองมียีนที่ใช้ในการติดตามคือ Gus gene

### 3) การสร้างชุดยีนสำหรับการส่งถ่ายเข้าสู่กล้วยไม้เอื้องนางลม

3.1 ออกแบบคู่ไพรเมอร์ของ Transcription factor gene ได้แก่ MYC และ WD40 ที่ได้จากข้าวพันธุ์กลาย BKOS

3.2 เตรียม total RNA จากตัวอย่างใบข้าว BKOS โดยใช้ TRIZOL (GIBCO BRL.)

3.3 เปลี่ยนสาย total RNA ให้เป็น cDNA โดยเอ็นไซม์ reverse transcriptase และไพรเมอร์ oligo- dT

3.4 สังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน MYC และ WD40 โดยใช้ cDNA (จากข้อ 3.3) เป็นแม่พิมพ์ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ (จากข้อ 3.1)

3.5 จากนั้นโคลนชิ้นส่วนยีนที่สังเคราะห์ได้โดยวิธี nested RT-PCR

3.6 subclone ชิ้นส่วน DNA เข้าเวกเตอร์ pGEM-T easy (Promega)

3.7 นำโคลนที่ได้ไปหาลำดับเบส (sequencing) แล้วนำไปวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบในฐานข้อมูลคอมพิวเตอร์ โดยใช้โปรแกรม BLASTA จาก National center for Biotechnology Information ; NCBI (Bethesda, Md., USA)

3.8 สร้างเวกเตอร์ที่มีชิ้นส่วน sense ของยีน MYC และ WD40 ลงใน พลาสมิด pSTART

3.9 ส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 และ AGL1 เพื่อเตรียมส่งถ่ายเข้าสู่พืช



#### 4) ผลของความเข้มข้นของกานามัยซินต่อการเจริญของโพรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องนางลม

ทำการเพาะเลี้ยงโพรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องนางลมบนอาหารสังเคราะห์สูตร Vacin and Went (VW) (1994) เป็นเวลา 60 วัน จากนั้นย้ายลงเลี้ยงในอาหาร VW ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 10, 20, 30, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สังเกตลักษณะของโพรโตคอร์มในระยะเวลาดังกล่าวเพื่อคู่อธิพลของกานามัยซินต่อการเจริญ

#### 5) การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อของเอื้องนางลมโดยเทคนิค

##### Agrobacterium Transformation

เตรียมเชื้อ *Agrobacterium* LBA4404 ที่ได้รับ recombinant plasmids โดยเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีกานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตรและสเตรปโตมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำ Protocorm-like body ของเอื้องนางลมที่ทำให้เกิดบาดแผลแล้วมาแช่ในสารละลายเชื้อในเวลาต่างๆ (10, 15, 30, 45 และ 60 นาที) ย้ายเนื้อเยื่อกล้วยไม้มาวางบนกระดาษซับเพื่อซับเชื้อส่วนเกินออก และนำมาเลี้ยงบนอาหารที่เติมคาร์เบนซิลิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* และกานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีน เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์ และชักนำให้เกิดต้นและราก

#### 6) การตรวจสอบการส่งถ่ายยีนด้วยวิธี GUS assay

ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ GUS ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของต้นกล้วยไม้ ที่คัดเลือกแล้วด้วยวิธี Histochemical Staining (Jefferson, 1987) โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดสีฟ้าขึ้นในตัวอย่างที่ได้รับการถ่ายยีน

#### 7) การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในต้นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค RT-PCR

7.1) เตรียม Total RNA จากส่วนใบของกล้วยไม้ที่ได้รับการคัดเลือกด้วย Trizol reagent

- นำตัวอย่างพืชมาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว

- นำตัวอย่างที่บดละเอียด 50-100 mg ใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ที่มี

TRIZOL<sup>®</sup> Reagent ปริมาตร 1 ml ผสมตัวอย่างกับ reagent โดยวิธี vortex และทิ้งไว้ที่

อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที

- เติม chloroform ปริมาตร 0.2 ml พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ 10 ครั้ง จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที

- นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 17 นาที อุณหภูมิ 4 °C แล้วจึงดูดเอาเฉพาะส่วนใสด้านบน (aqueous phase) ใส่หลอดใหม่

- เติม Isopropyl alcohol ปริมาตร 0.5 ml พลิกหลอดกลับไปมา 5 ครั้ง จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

- นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 °C เทส่วนใสด้านบนทิ้งไปเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอน หลังจากนั้นล้างตะกอนโดยเติม 75% ethanol ปริมาตร 1 ml นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 7,500 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

- นำตะกอนอาร์เอ็นเอมาทำให้แห้งโดยวิธี air dry ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 8 นาที จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอในน้ำที่ปราศจาก RNase (RNase-free water) ปริมาตร 20  $\mu$ l

- ตรวจสอบอาร์เอ็นเอทั้งหมดด้วย 1.4% denaturing formaldehyde agarose/EtBr electrophoresis โดยจะสังเกตเห็นแถบ 28S และ 18S ribosomal RNA

- เก็บ total RNA ไว้ที่ -80 °C

## 7.2) สังเคราะห์ First Strand cDNA ด้วย

- นำ DEPC-treated water ปริมาตร 7  $\mu$ l ใส่ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml จากนั้นเติม total RNA ปริมาตร 4  $\mu$ l และ oligo(dT)<sub>18</sub> ปริมาตร 1  $\mu$ l จากนั้นผสมเบา ๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 5 นาที

- เติม 5x rxn buffer 4  $\mu$ l , 10mM dNTP mix ปริมาตร 2  $\mu$ l และ Ribonuclease inhibitor ปริมาตร 1  $\mu$ l จากนั้นผสมเบา ๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 5 นาที

- เติม M-MuLV ปริมาตร 1  $\mu$ l จากนั้นผสมเบา ๆ แล้วนำไปบ่มที่ 42 °C นาน 1 ชั่วโมง และที่ 70 °C นาน 10 นาที

- เก็บ First Strand cDNA ไว้ที่ -20 °C

## 7.3) เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน MYC และ WD40 โดยใช้ specific primers ด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

- ทำการออกแบบ Primers ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน MYC และ WD40 แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primers ที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *MYC* และ *WD40*

รายชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' → 3'
MYCF	GGATAACTAGAAAATGTG
MYCR	CTTGTAATGAAGCCGGTT
WD40F	TTAGTGTCTTAGGTTCCA
WD40R	AAGAATGTTTCGGATACC

องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

เตรียมสารละลายปริมาตร 50  $\mu$ l ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งประกอบด้วย

- Deionized water 38.5  $\mu$ l
- 10X PCR buffer 5.0  $\mu$ l
- 50mM MgCl<sub>2</sub> 1.5  $\mu$ l
- 10mM dNTP 1.0  $\mu$ l
- 1<sup>st</sup> stand 1.0  $\mu$ l
- Forward primer 1.0  $\mu$ l
- Reward primer 1.0  $\mu$ l
- Tag DNA polymerase 1.0  $\mu$ l

- เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR (PCR condition) ในเทคนิค RT- PCR

ตารางที่ 2 แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR

อุณหภูมิ	94°C	94 °C	55°C	72°C	72 °C	4°C
ระยะเวลา	2 min	30 sec	30 sec	1 min	10 min	∞
จำนวนรอบ		← 35 รอบ →				

- ตรวจสอบผลโดย Agarose Gel Electrophoresis

### อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- 1 Power supply
- 2 Liquid nitrogen container
- 3 Refrigerator
- 4 Freezer
- 5 Balance
- 6 UV box
- 7 Refrigerated centrifuge
- 8 Water bath
- 9 Spectrophotometer
- 10 Mortar and pistil
- 11 Microwave
- 12 PCR machine
- 13 Hybridization oven
- 14 Autoclave
- 15 pH meter
- 16 Electrophoretic apparatus
- 17 DNA detection and printer

## ผลการวิจัย

### 1. การเตรียมโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องนางลม

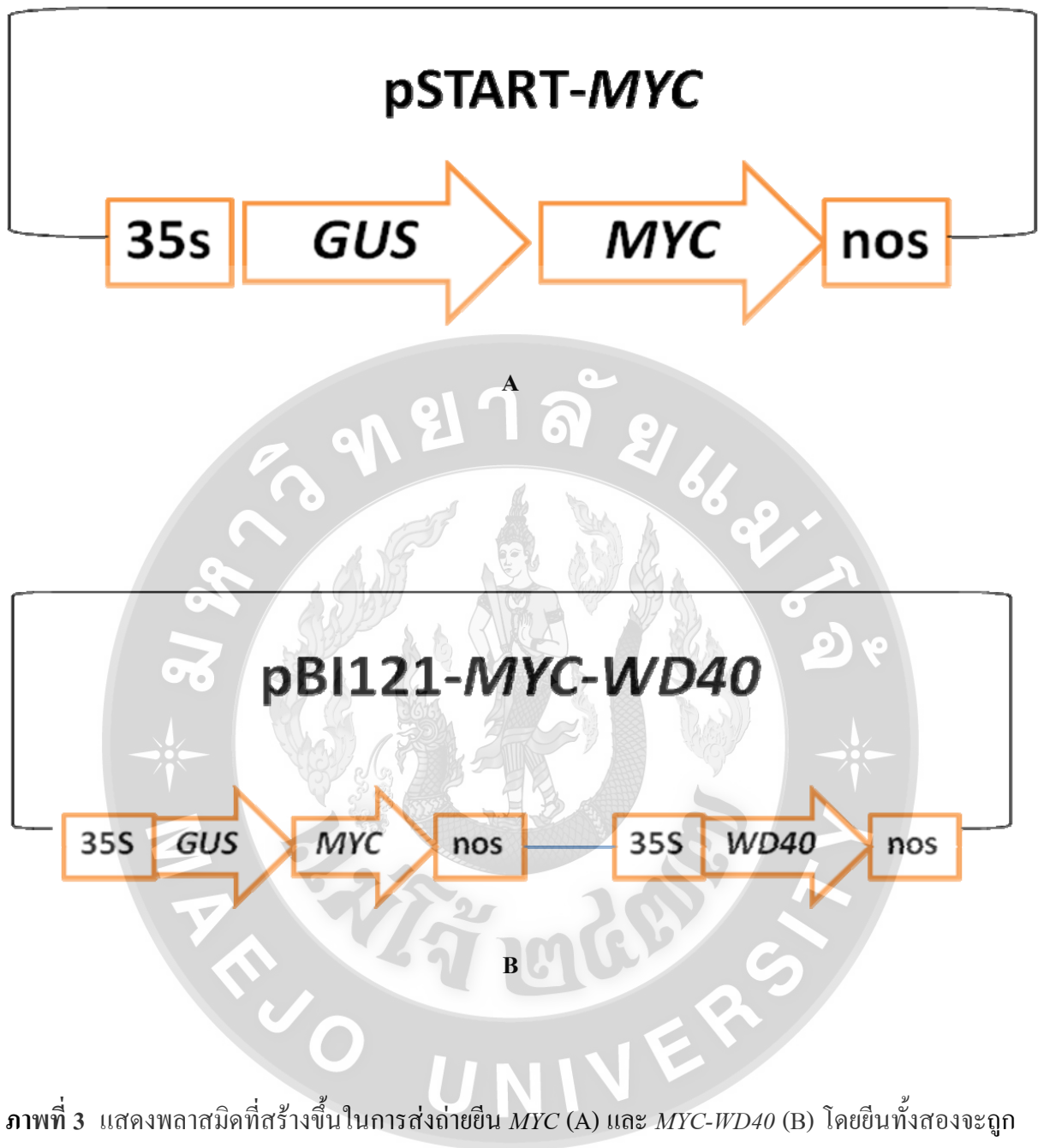
นำฝักกล้วยไม้เอื้องนางลมอายุฝักประมาณ 7-8 เดือน มาทำความสะอาดโดยตัดส่วนหัว ส่วนปลายออก ทำการล้างฝักด้วยน้ำผสมผงซักฟอก ตามด้วยน้ำสะอาด นำเข้าสู่ laminar flow ทำการฟอกฝักในสารละลายคลอโรกซ์ 15% (v/v) เป็นเวลา 15 นาที ล้างน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นผ่าฝักกล้วยไม้ เคาะเมล็ดกล้วยไม้ลงในอาหารสังเคราะห์สูตร Vacin and Went (VW) (1994) โดยเติมวิตามินและกรดอะมิโนตามสูตรอาหาร MS โดยเติมน้ำมะพร้าว 15% (v/v) น้ำตาลซูโครส 2% (v/v) และผงวุ้น 8 กรัม/ลิตร ค่า pH 5.2 ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเพาะจนกว่าจะงอกและเจริญเป็นโปรโตคอร์ม (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ลักษณะโปรโตคอร์มเอื้องนางลมในอาหารแข็งสูตร VW คัดแปลง อายุ 30 วัน

### 2. การสร้างพลาสมิดเวกเตอร์เพื่อใช้ในการส่งถ่ายยีน MYC และ WD40 เข้าสู่กล้วยไม้เอื้องนางลม

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยได้ทำการโคลนยีน MYC และ WD40 จากข้าวพันธุกล้วยสายพันธุ์ BKOS โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการสร้างพลาสมิดเวกเตอร์ 2 ชนิด เพื่อส่งถ่ายยีนทั้งสองเข้าสู่กล้วยไม้เอื้องนางลม ได้แก่ pSTART-MYC และ pBI121-MYC-WD40 ซึ่งการแสดงออกของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไปนั้น จะถูกควบคุมด้วย 35s promoter ตามภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงพลาสมิดที่สร้างขึ้นในการส่งถ่ายยีน *MYC* (A) และ *MYC-WD40* (B) โดยยีนทั้งสองจะถูกควบคุมการแสดงออกด้วย 35S promoter

ทำการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-MYC และ pBI121MYC-WD40 เข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ด้วยเทคนิค Electroporation จากนั้นทำการคัดเลือกและเพาะเลี้ยง *A. tumefaciens* ที่ได้รับการส่งถ่ายพลาสมิดทั้งสองในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35-40 ชั่วโมง นำอาหารเหลวมาวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยวัดค่า OD ที่ 550 nm ในเวลาต่างๆ เพื่อติดตามอัตราการเจริญ และหาช่วงเวลาที่เหมาะสมที่จะใช้ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้เอื้องนางลม

### 3. ผลของความเข้มข้นของกานามัยซินต่อการเจริญของโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องนางลม

ในการศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะกานามัยซินต่อการเจริญของโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องนางลม ได้ผลตามตารางที่ 3 โดยจากตารางจะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของกานามัยซินเท่ากับ 0, 10, 20, 30, 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรโทคอร์มสามารถเจริญเติบโตได้ แต่ที่ความเข้มข้นที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตรจำนวนโพรโทคอร์มที่สามารถเจริญได้จะต่ำกว่าที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นของกานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่าโพรโทคอร์มทั้งหมดไม่สามารถเจริญเติบโตได้โดยเนื้อเยื่อโพรโทคอร์มจะเปลี่ยนเป็นสีขาวในเบื้องต้นจากนั้นจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด

ตารางที่ 3 แสดงระดับความเข้มข้นของกานามัยซินต่อการเจริญของโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องนางลม

ความเข้มข้นของ กานามัยซิน (mg/l)	จำนวนโพรโทคอร์ม		เปอร์เซ็นต์การด้านทาน ต่อกานามัยซิน (%)
	เริ่มต้น	ด้านทานต่อกานามัยซิน	
0	100	100	100
10	100	98	98
20	100	95	95
30	100	91	91
50	100	62	62
100	100	0	0

### 3. การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องนางลมร่วมกับ *A. tumefaciens* LBA4404

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มโพรโทคอร์มของกล้วยไม้เอื้องนางลมร่วมกับ *A. tumefaciens* LBA4404 ที่มีพลาสมิด pSTART ในอาหารเหลว LB (0, 10, 30, 45, 60 นาที) พบว่าเมื่อทำการบ่ม โพรโทคอร์มร่วมกับ *A. tumefaciens* และเพาะในอาหารแข็งสูตร VW ที่มี acetosyringone 200  $\mu$ M เป็นเวลา 3 วัน จะสังเกตเห็นเชื้อเจริญรอบๆโพรโทคอร์มโดยมีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ทำการกำจัด *A. tumefaciens* ออกจากชิ้นโพรโทคอร์มโดยการล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่มีซีโฟแทกซิม 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีซีโฟแทกซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตรและกานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 90 วัน พบว่า มีโพรโทคอร์มที่สามารถเจริญในอาหารดังกล่าวจำนวน 12 โพรโทคอร์ม คิดเป็น 1.07 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่โพรโทคอร์มในชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนไม่สามารถเจริญในอาหารดังกล่าวได้เลย โดยจะมีสีเหลือง ชีดขาวและตายในที่สุด ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ซึ่งจะมีสีฟ้าเกิดขึ้นใน (ภาพที่ 4) โพรโทคอร์มทั้ง 12 ชิ้นที่ได้รับการส่งถ่ายยีน ซึ่งระยเวลาน้อยที่สุดที่ใช้ในการบ่มโพรโทคอร์มเอื้องนางลมร่วมกับ *A. tumefaciens* ในอาหารเหลว LB นั้น คือ 45 นาที

**ตารางที่ 4** จำนวนโพรโทคอร์มเอื้องนางลมที่บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* ในอาหาร LB ระยะเวลาดังกล่าวที่ต้านทานต่อกานามัยซินเป็นเวลา 90 วันและมีการแสดงออกของยีน *GUS*

เวลาที่ใช้ในการบ่ม (นาที)	จำนวนโพรโทคอร์ม		เปอร์เซ็นต์การต้านทานต่อกานามัยซิน (%)	กิจกรรมของ <i>GUS</i> gene		
	เริ่มต้น	ต้านทานต่อกานามัยซิน (90 วัน)		เริ่มต้น	<i>GUS</i>	%
0	250	0	0	0	0	0
10	250	0	0	0	0	0
30	250	0	0	0	0	0
45	250	14	5.6	10	10	100
60	250	33	13.2	10	10	100

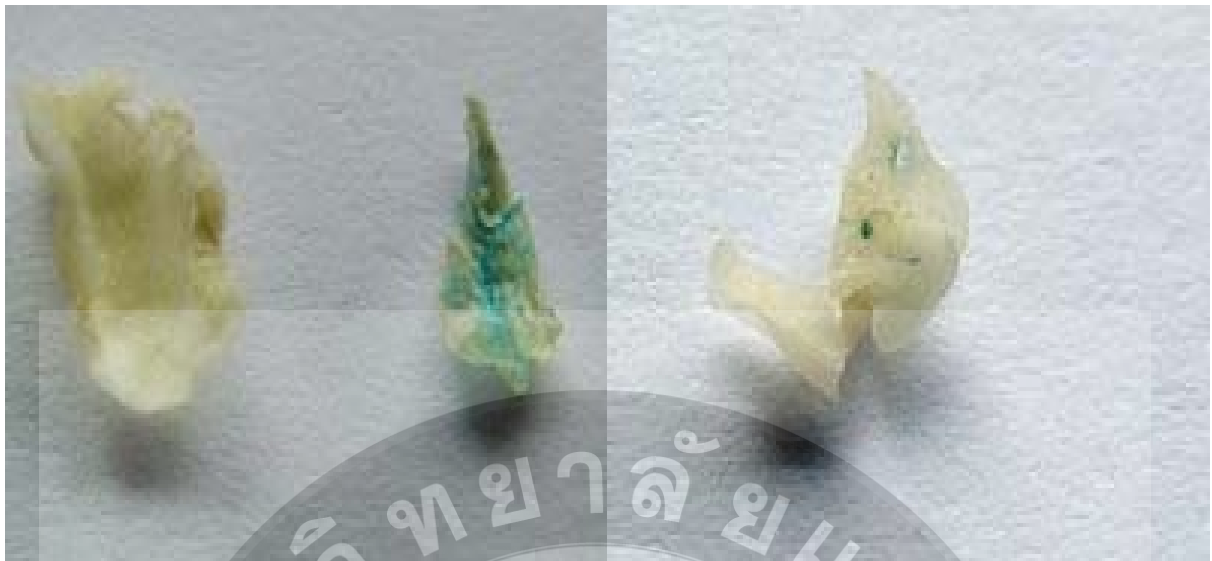


#### 4. การส่งถ่ายยีน *MYC* และ *MYC-WD40* เข้าสู่โพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องนางลมด้วยเทคนิค *Agrobacterium Transformation*

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มโพรโทคอร์มของกล้วยไม้เอื้องนางลมร่วมกับ *A. tumefaciens* LBA4404 ที่มีพลาสมิด pSTART ในการทดลองที่ 3 และความเข้มข้นของกานามัยซินต่อการเจริญของโพรโทคอร์มในการทดลองที่ 2 ผู้วิจัยได้เลือกสภาวะที่เหมาะสมในการส่งถ่ายพลาสมิดที่มียีน *MYC* (pSTART-*MYC*) และยีน *MYC-WD40* (pBI121*MYC-WD40*) โดยทำการบ่มเนื้อเยื่อโพรโทคอร์มร่วมกับ *A. tumefaciens* ในอาหารเหลว LB เป็นเวลา 60 นาที พบว่าเมื่อทำการบ่มโพรโทคอร์มร่วมกับ *A. tumefaciens* และเพาะในอาหารแข็งสูตร VW ที่มี acetosyringone 200  $\mu$ M เป็นเวลา 3 วัน จะสังเกตเห็นเชื้อเจริญรอบๆโพรโทคอร์มโดยมีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ทำการกำจัด *A. tumefaciens* ออกจากชิ้นโพรโทคอร์มโดยการล้างด้วยน้ำกลั่นมาเชื้อที่มีซีโฟแทกซิม 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีซีโฟแทกซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตรและกานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 90 วัน พบว่า มีโพรโทคอร์มที่ได้รับการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-*MYC* สามารถเจริญในอาหารดังกล่าวจำนวน 24 โพรโทคอร์มจากจำนวนที่ใช้ในการส่งถ่าย 185 โพรโทคอร์ม ในขณะที่โพรโทคอร์มที่ได้รับการส่งถ่ายพลาสมิด pBI121*MYC-WD40* สามารถเจริญในอาหารดังกล่าวได้ 16 โพรโทคอร์มจากจำนวนการส่งถ่าย 185 โพรโทคอร์ม (ตารางที่ 5) โพรโทคอร์มที่เจริญทั้งหมดถูกนำมาทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ซึ่งจะมีสีฟ้าเกิดขึ้นดังในภาพที่ 4

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนโพรโทคอร์มเอื้องนางลมที่ได้รับการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-*MYC* และ pBI121*MYC-WD40* และการแสดงออกของยีน *GUS*

พลาสมิด	จำนวนโพรโทคอร์ม			เปอร์เซ็นต์การส่งถ่ายยีน (%)
	เริ่มต้น	ต้านทานต่อกานามัยซิน	กิจกรรมของ <i>GUS</i> gene	
pSTART- <i>MYC</i>	185	24	24	12.9
pBI121 <i>MYC-WD40</i>	185	16	16	8.6



C

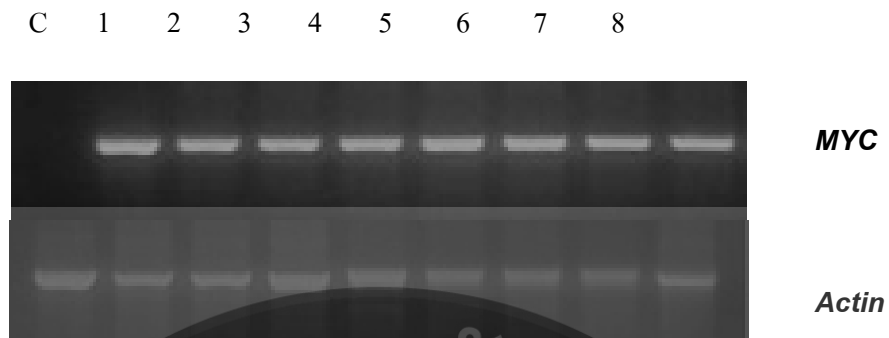
pSTART-MYC

pBII121MYC-WD40

ภาพที่ 4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ในชิ้นส่วนโพทโทคอร์มของต้นที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายพลาสมิด (C) ต้นที่ได้รับการส่งถ่ายด้วยพลาสมิด pSTART-MYC และ ต้นที่รับการส่งถ่ายด้วยพลาสมิด pBII121MYC-WD40

#### 5. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *MYC* และ *WD40* ด้วยเทคนิค RT-PCR

ทำการสกัด Total RNA จากใบของกล้วยไม้ที่ผ่านการส่งถ่ายยีน *MYC* และ *MYC-WD40* โดยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pSTART-MYC และ pBII121MYC-WD40) เพื่อนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับการ Transcription ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ Primers ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน *MYC* และ *WD40* ที่โคลนได้จากข้าว BKOS โดยจากการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ Primer MYCF และ MYCR จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 350 bp (ภาพที่ 5) ในขณะที่ใช้ Primer WD40F และ WD40R จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 470 bp (ภาพที่ 6) โดยจากภาพที่ 5 แสดงให้เห็นว่าในใบกล้วยไม้ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนนั้นพบการแสดงออกของยีน *MYC* จากการส่งถ่ายด้วยพลาสมิด pSTART-MYC เช่นเดียวกับกับภาพที่ 6 แสดงให้เห็นว่าในใบกล้วยไม้ที่ได้รับการส่งถ่ายยีนนั้นพบการแสดงออกของยีน *MYC* และ *WD40* ทุกตัวอย่างที่นำมาทำการทดสอบ ในขณะที่ไม่พบการแสดงออกของยีนทั้งสองในกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน



ภาพที่ 5 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *MYC* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน เลน C = RNA ของกล้วยไม้เอื้องนางลมที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน เลน 1 -8 = RNA ของกล้วยไม้เอื้องนางลมที่ได้รับการส่งถ่ายยีน



ภาพที่ 6 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *MYC* และ *WD40* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน ทั้งสอง เลน C = RNA ของกล้วยไม้เอื้องนางลมที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน เลน 1 = พลาสมิด DNA ของ plasmid pBI121-*MYC*-*WD40* เลน 2 - 17 = RNA ของเอื้องนางลมที่ผ่านการส่งถ่ายยีน

## สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เอื้องนางลมด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม โดยในการทดลองนี้ได้หาสภาวะที่เหมาะสมที่จะใช้ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้เอื้องนางลมโดยเทคนิค *Agrobacterium Transformatin* เนื่องจากกล้วยไม้ดังกล่าวนี้มีคุณสมบัติเด่นคือมีกลิ่นหอม แต่ลักษณะของสีกลีบดอกจะค่อนข้างมีสีอ่อน ผู้วิจัยจึงให้ความสนใจที่จะปรับปรุงลักษณะสีของกลีบดอกให้มีสีที่แตกต่างออกไปจากสายพันธุ์เดิม โดยในเบื้องต้นนี้ได้ทำการส่งถ่ายยีนในกลุ่มของ Transcription factor ที่มีบทบาทควบคุมการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานินที่ทำให้สีต้นในพืชต่างๆ โดยการทดลองนี้ได้ใช้ยีน *MYC* และ *WD40* ที่โคลนจากข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS โดยจากรายงานของ Quattrocchio ในปี 1998 ได้รายงานไว้ว่ายีน *MYC* สามารถกระตุ้นให้เกิดการทำงานของยีนในตอนต้นของวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชบางชนิด นอกจากนั้นยีน *MYC* ยังทำการร่วมกับยีน *WD40* และ *MYB* โดยการรวมตัวกันเกิดเป็น complex structure ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดการทำงานของยีนเกือบทุกยีนในวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานินได้

จากการวิจัยสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการส่งถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้เอื้องนางลมโดยทำการเตรียมโพรโทคอร์รัมในอาหาร Vacin and Went (VW) (1994) โดยเติมวิตามินและกรดอะมิโนตามสูตรอาหาร MS โดยเติมน้ำมะพร้าว 15% (v/v) น้ำตาลซูโคส 2% (v/v) และผงวุ้น 8 กรัม/ลิตร ค่า pH 5.2 ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยโพรโทคอร์รัมที่สมบูรณ์และพร้อมที่จะใช้ในการส่งถ่ายยีน (ขนาดประมาณ 3-5 เซนติเมตร) จะถูกบ่มร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิด pSTART-*MYC* และ pBI121-*MYC-WD40* เป็นเวลาอย่างน้อย 60 นาที และทำการคัดเลือกโพรโทคอร์รัมที่ได้รับการส่งถ่ายยีนโดยเลี้ยงในอาหาร VW ที่มีการปรับปรุงโดยมียาปฏิชีวนะกานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจากสภาวะที่กล่าวมานี้สามารถประสบความสำเร็จในการส่งถ่ายพลาสมิดทั้งสองเข้าสู่โพรโทคอร์รัมของเอื้องนางลมได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การส่งถ่าย 12.9% สำหรับ พลาสมิด pSTART-*MYC* และ 8.6% สำหรับพลาสมิด pBI121-*MYC-WD40*

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ได้ส่งถ่ายเข้าสู่โพรโทคอร์รัมเอื้องนางลมนั้นพบว่า ในส่วนของการแสดงออกของ Marker gene ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ยีน *GUS* ในการศึกษา โดยโพรโทคอร์รัมที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกนั้นมีการแสดงออกของยีน *GUS* ทุกโพรโทคอร์รัม เช่นเดียวกันกับการศึกษาการแสดงออกของยีน *MYC* และ *WD40* ในระดับการ Transcription ด้วยเทคนิค RT-PCR พบการแสดงออกของยีนทั้งสองในทุกๆเนื้อเยื่อนำมาตรวจสอบ

ผลการวิจัยนี้เป็นแนวทางเบื้องต้นในการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการปรับปรุงกล้วยไม้สายพันธุ์เอื้องนางลมเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่กล้วยไม้สายพันธุ์นี้อีกทั้งจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งให้แก่เกษตรกรในอนาคต



## เอกสารอ้างอิง

- กนกพร สมพรไพลิน. 2545. ผลของชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินต่อการควบคุมสีในพืช (Anthocyanin Biosynthesis Effects on Plant Color Controlling). วารสารพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. ปีที่ 10. ฉบับที่ 1.
- ชนินทร์ โธร์ตัน. 2540. กกล้วยไม้ไทย. น. 264-304. สมศักดิ์ รักไพบูลย์สมบัติ. ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้จากประสบการณ์. บริษัท ชรรรมสาร จำกัด, กรุงเทพฯ.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. ปริมาณและมูลค่าสินค้าเกษตรกรรมส่งออก พ.ศ. 2549-2550. สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร. 2543, เกษตรดีที่เหมาะสมสำหรับ ปทุมมา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 502.6.005.
- โครงสร้างพื้นฐานของ flavonoid. {ระบบออนไลน์}. แหล่งข้อมูล : [www.hort.purdue.edu](http://www.hort.purdue.edu). (15/11/50)
- อัญชัน. {ระบบออนไลน์}. แหล่งข้อมูล : [www.tourthai.com/cgi-bin/gallery](http://www.tourthai.com/cgi-bin/gallery). (15/11/50)
- Adams D.O and Yang S.F (1979). Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 170-174.
- Aggelis A., John I., Karvouni Z. and Grierson D. (1997). Characterization of two cDNA clones for mRNAs expressed during ripening of melon (*Cucumis melo* L.) fruits. Plant Molecular Biology 33, 313–322
- Balagué C., Watson C.F., Turner A.J., Rouge P., Picton S., Pech J.C. and Grierson D. (1993). Isolation of a ripening and wound-induced cDNA from *Cucumis melo* L. encoding a protein with homology to the ethylene-forming enzyme. Eur J Biochem 212: 27-34.
- Barry C.S., Blume B., Bouzayen M., Cooper W., Hamilton A.J. and Grierson D. (1996). Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. Plant J 9:525-535.
- Bohm BA. 1986. The Minor Flavonoids. In JB Harborne, ed. The Flavonoids-Advances in Research Since 1980, Chapman and Hall, New York, p 329-397.
- Botella J.R, Schlagnhauser C.D., Arteca R.N. and Phillips A.T. (1992). Identification and characterization of three putative clones for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from etiolated mung bean hypocotyl segments. *Plant Mol Biol* 18:793-797.
- Bolitho K. M., Lay-Yee M., Knighton M. L. and Rose G. S. (1997) Antisense apple ACC-oxidase RNA reduces ethylene production in transgenic tomato fruits; *Plant Sci.* 122: 91–99.

- Bourque J.E. (1995) Antisense strategies for genetic manipulation in plants. *Plant Sci* 105: 125-149
- Buck, M.J. and Atchley, W.R. 2003. Phylogenetic analysis of plant basic helix–loop–helix proteins. *J. Mol. Evol.* 56: 742–75
- Bufler, G. and Mor, Y. 1980. Some problems in the estimation of ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) from carnation flower tissue. *Acta Horticulturae* 113, 65-68.
- Bui A.Q. and O'Neill S.D. (1998). Three 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes regulated by primary and secondary pollination signals in orchid flowers. *Plant Physiol* 116: 419-428
- Chanasut, U. (2004) Improvement the post-harvest quality of cut patumma (*Curcuma alismatifolia* var. Chiang Mai Pink) flowers. The 5th International Post harvest Symposium. Italy. 4 – 12 June 2004.
- Cody V, Middleton E Jr, Harborne JB. eds. 1986. *Plants Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical Pharmacological, and Structure-Activity Relationships*, Vol.213, Progress in Clinical and Biological Research. Alan R. Liss, New York.
- Cody V, Middleton E Jr, Harborne JB, Beretzy A. eds. 1988. *Plants Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular, and Medical properties*, Vol. 280, Progress in Clinical and Biological Research. Alan R. Liss, New York.
- Cohen, E. and Kende, H. (1986). The effect of submergence, ethylene and gibberellin on polyamines and their bio synthetic enzymes in deep water-rice internodes. *Planta* 169:498-504.
- Deikman, J. (1997). Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. *Physiologia Plantarum* 100: 561-566
- Duek P. D. and C. Fankhauser. 2005. bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signaling. *TRENDS in Plant Science* Vol.10 No.2: 51-54
- Felix G., Grosskopf D.G., Regenass M., Basse C.W. and Boller T. (1991). Elicitor-induced ethylene biosynthesis in tomato cells. Characterization and use as a bioassay for elicitor action. *Plant Physiol* 97: 19-25.
- Hamilton A.J., Lycett G.W. and Grierson D. (1990). Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346: 284-287.
- Heim, M.A. 2003. The basic helix–loop–helix transcription factor family in plants:

- a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular Biology Evolution*. 20: 735–747
- Holdsworth M.J, Schuch W and Grierson D. (1988). Organization and expression of a wound/ripening-related small multigene family from tomato. *Plant Mol Biol* 11: 81-88.
- Huang, P.-L., Parks, J. E. Rottmann, W. H. and Theologis, A. (1991). Two Genes Encoding 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase in Zucchini (*Cucurbita pepo*) Are Clustered and Similar, but Differentially Regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7021-70.
- Jan A., Hassan Q.M., Fatima T. and Hasnain T. (2001) Tissue culture response of local varieties of rice (*Oryza sativa* L.) of NWFP. *J. Biol. Sci* 1(5):387-390.
- Jones M.L. and Woodson W.R. (1997) Pollination-induced ethylene in carnation. Role of styler Ethylene in collolla senescence. *Plant Physiol* 119:755-764
- Kaufman Peter B, Leland J. Csek, Sara Warbes, Jame A. Duke and Harry L. Brielmann. 1999. *Natural Products from Plants*. CRS press LLC p. 22-23.
- Kim W.T. and Yang S.F. (1994) Structure and expression of cDNAs encoding ACC oxidase Homologs isolated from excised mung bean hypocotyls. *Planta* 194: 223-229.
- Lasserre E., Bouquin T., Hernandez J.A., Bull J., Pech J.C. and Balagué C. (1996). Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.). *Mol Gen Genet* 251: 81-90.
- Liang X., Abel S., Keller J.A., Shen N.F. and Theologis A (1992). The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11046-11050.
- Lincoln J.E., Campbell A.D., Oetiker J., Rottmann W.H., Oeller P.W., Shen N.F. and Theologis A. (1993). LE-ACS4, a fruit ripening and wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J Biol Chem* 268: 19422-19430.
- Ludwig, S. 1989. *Lc*, a member of the maize *R* gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcription activators and contains the *myc* homology region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 7092–7096
- Martin C, Gerats T. 1993. Control of Pigment Biosynthesis Genes during Petal Development. *Plants Cell* 5: 1253-1264.
- Meijer, E. G. M., R. A. Schilperoort, S. Rueb, P. E. van Os-Ruygrok and L.A.M. Hensgens, 1991. Transgenic rice cell lines and plants: expression of transferred chimeric genes. *Plant Mol.*



- Biol. 16: 807-820
- Mol J. N. M., van Blokland R., de Lange P., Stam M., Kooter J. M. and Paszkowski, J., ed. (1994) in *Gene Inactivation and Homologous Recombination in Plants* (Kluwer, Dordrecht, The Netherlands).
- Muller R., Lind-Iverson S., Stummann B.M. and Serek M. (2000) Expression of genes for ethylene biosynthetic enzymes and an ethylene receptor in senescing flowers of miniature potted roses. *J. Hort Sci and Biotech* 75:12-18.
- Nakajima N., Nakagawa N. and Imaseki H. (1990). Molecular size of wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from *Cucurbita maxima* Duch. and change of translatable mRNA of the enzyme after wounding. *Plant Cell Physiol* 29: 989-998.
- Nakatsuka A., Shiomi S., Kubo Y. and Inaba A. (1997). Expression and internal feedback regulation of ACC synthase and ACC oxidase genes in ripening tomato fruit. *Plant Cell Physiol* 38: 1103-1110.
- Oeller P. W., Wong L. M., Taylor L. P., Pike D. A. and Theologis A. (1991) Reversible Inhibition of Tomato Fruit Senescence by Antisense 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase RNA. *Science*, 254:437-439.
- O'Neill S.D., Nadeau J.A., Zhang X.S., Bui A.Q. and Halevy A.H. (1993). Interorgan regulation of ethylene biosynthetic genes by pollination. *Plant Cell* 5: 419-432.
- Olson D.C., White J.A., Edelman L., Harkins R.N. and Kende H. (1991). Differential expression of two genes for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato fruits. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5340-5344.
- Osborne, R., A crisis in archaeological history: the seventh century in Attica, *BSA* 84, 1989. 297-322.
- Park K.Y, Drory A. and Woodson W.R. 1992. Molecular cloning of an 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from senescing carnation flower petals. *Plant Molecular Biology* 18: 377-386.
- Payne, C.T. 2000. GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with *GL1* and *TTG1*. *Genetics* 156: 1349–1362
- Pech J.C., Latche A., Larrigaudiere C. and Reid M.S. (1987) Control of early ethylene synthesis in pollinated petunia flowers. *Plant Physiol Biochem* 25:431-437.
- Picton S., Barton S.L., Bouzayen M., Hamilton A.J. and Grierson D. (1993) Altered fruit ripening

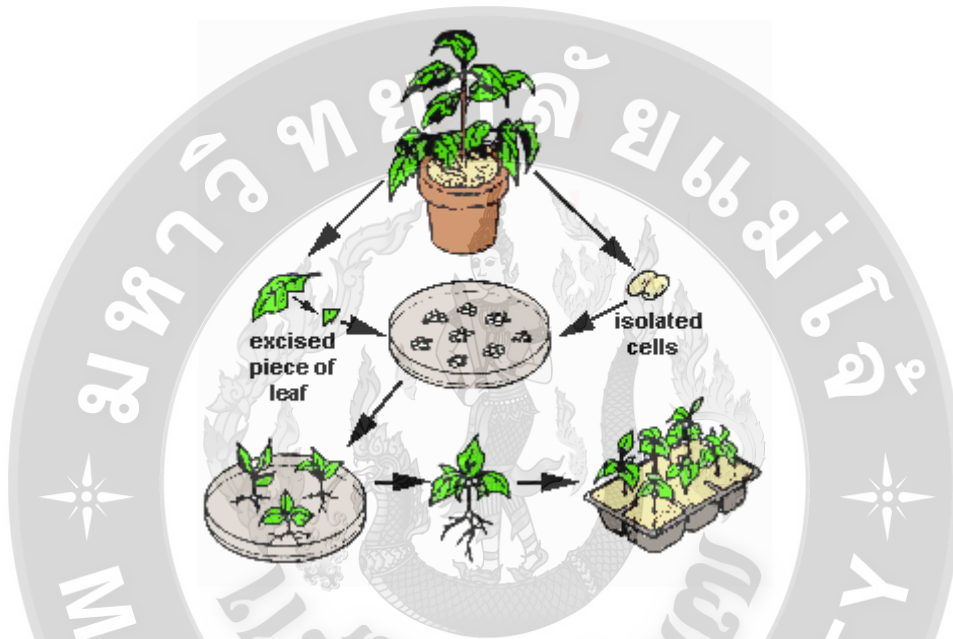
- and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. *Plant J* 3: 469-481
- Quattrocchio, F. 1998. Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. *Plant Journal*. 13: 475–488
- Raineri DM, Bottino P, Gordon MP, Nester EW. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.). *Biotechnology* 8, 33–38
- Ramsay, N.A. 2003. Two basic-helix–loop–helix genes (*MYC-146* and *GL3*) from *Arabidopsis* can activate anthocyanin biosynthesis in a white-flowered *Matthiola incana* mutant. *Plant Molecular Biology*. 52: 679–688
- Ramsary N. A. and B. J. Glover. 2005. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *TRENDS in Plant Science* Vol.10 No.2: 63-70.
- Reid M. S. and Wu M. J. (1992) Ethylene and flower senescence. *J.Plant Growth Regul.* 11: 37–43
- Ross G., Knighton M.L. and Lay-Yee M. (1992). An ethylene-related cDNA from ripening apples. *Plant Mol Biol* 19: 231-238.
- Saharan V., Yadav R.C., Yadav N.R. and Chapagain B.P. (2004) High frequency plant regeneration from desiccated calli of *indica* rice (*Oryza sativa* L.). *African J. Biotech* 3(5):256-259.
- Satoh Y., Yoshiie T., Mori H. and Kiritani M. (2004). Changes in Water Distribution during Senescence in Cut Carnation Flowers. *Phys. Rev. B*. 69 (2004)
- Sexton R., Laird G. and van Doorn W. (2000). Lack of ethylene involvement in tulip tepal abscission. *Physiologia Plantarum* 108: 321-329.
- Spanu P. and Boller T. (1989) Ethylene biosynthesis in tomato plants infected by *Phytophthora infestans*.. *J. Plant Physiol.* 134:533-537.
- Suttle J.C. and Kende H. (1980) Ethylene action and loss of membrane integrity during petal Senescence in *Tradescantia*. *Plant Physiol* 65: 1067-1072
- Sylvestre I. and Paulin A. (1987) Accelerated ethylene production as related to changes in lipids and electrolyte leakage during senescence of petals of cut carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Physiol Plant* 70:530-536.
- Tang X., Gomes A.M.T.R., Bhatia A. and Woodson W.R. (1994). Pistil-specific and ethylene-regulated expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene in petunia flowers. *Plant Cell* 6:1227-1239.

- Theologis, A. (1992). Inhibition of Fruit Senescence. In: *Tomato Molecular Biology*, Symposium on Fundamental Advances and Crop Improvement, U.C. Davis, Aug. 17-19, 1992. J. Yoder (ed.), Technomic Publ. Co., Lancaster, PA.
- Toguri T., N. Umemoto, O. Kobayashi and T. Ohtani. 1993. Activation of anthocyanin Synthesis Gene by White Light in eggplant Hypocotyl Tissue, and Identification of an Inducible P-450 cDNA. *Plant Molecular Biol.* 23: 933-946.
- Toppan and Esquerre-Tugaye. (1984). Cell surfaces in plant - microorganism interactions. *Plant Physiol.* 75:1133-1138.
- Toriyama, K., Arimoto, Y., Uchimiya, H., and Hinata, K. 1988. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. *Bio/Technology* 6:1072-1074.
- Van Meeteren U, De Proft M. (1982). Inhibition of flower bud abscission and ethylene evolution by Light and silver thiosulphate in *Lilium*. *Physiologia Plantarum* 56, 236-240.
- Wagstaff C., Roger H.J., Chanasut U. and Stead A.D. (2001). Characterization of *Alstroemeria* Flower vase life. *Acta Hort* 543: 161-175.
- Woodson W.R., Park K.Y., Drory A., Larsen P.B. and Wang H. (1992). Expression of ethylene biosynthetic pathway transcripts in senescing carnation flowers. *Plant Physiol* 99: 526-532.
- Xu R.L., Goldman S., Coupe S, and Deikman J. 1996. Ethylene control of E4 transcription during Tomato Fruit ripening involves two cooperative *cis* elements. *Plant Molecular Biology* 31, 1117-1127
- Yamazaki M., Y. Makita, K. Springob and K. Saito. 2003. Regulatory mechanisms for anthocyanin biosynthesis in chemotypes of *Perilla frutescens* var. *crispa*. *Biochemical Engineering Journal.* 14: 191-197
- Yang S.F. and Hoffman N.E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 35: 155-189.
- Yip W-K., Moore T. and Yang S.F. (1992). Differential accumulation of transcripts for four 1-aminocyclopropane-1-carb-oxylate synthase homologs under various conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2475-2479.
- Zarebinski, T. I. and Theologis, A. (1992). Anaerobiosis Induces Two Auxin-Regulated Genes Encoding 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase in Rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Biol. Cell*, 4:363-373.



## ภาคผนวก ก

## การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant Tissue Culture)



การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกำเนิดมาจากหลักการ totipotency ที่ว่า "เซลล์พืชเดี่ยว ๆ (single cells) ทุกเซลล์มีลักษณะและองค์ประกอบทางพันธุกรรมสมบูรณ์เหมือนต้นแม่ ซึ่งสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นพืชทั้งต้น (whole plant) ได้" เซลล์พืชเหล่านี้ไม่ว่าจะเป็นเซลล์ที่เจริญเต็มที่ (nature cell) หรือเนื้อเยื่อที่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะอย่าง (differentiated tissue) ได้แก่ เนื้อเยื่อใบ สามารถเจริญและแบ่งตัวเป็น callus หรือพัฒนาเป็นอวัยวะ (organ) เช่น ยอดอ่อน (shoot) และราก (root) ซึ่งสามารถเจริญต่อไปเป็นต้นพืชทั้งต้นได้ ในทางเดียวกัน callus ซึ่งเป็นก้อนของกลุ่ม parenchyma cells ซึ่งยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะเจาะจง (undifferentiated cells) สามารถเจริญและแบ่งตัวเป็น callus หรือพัฒนาเป็นยอดอ่อน และ ราก ขึ้นกับการกระตุ้นของ plant growth regulator ที่เหมาะสมซึ่งหลักการที่สำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือต้องทำในสภาพที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์กล่าวคือ ทุกขั้นตอนจะต้องปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

## ปัจจัยที่มีผลในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ อาหารเพาะเลี้ยง ขึ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง และสภาวะในการเพาะเลี้ยงแต่ปัจจัยที่สำคัญคืออาหารเพาะเลี้ยงซึ่งมีหลายสูตรให้เลือกใช้ ตามความเหมาะสม เช่น อาหาร สูตร MS (Murashige and Skoong ) เป็นสูตรพื้นฐานสำหรับเพาะเลี้ยงพืชทั่วไป สูตร Vacin and Went เหมาะสำหรับเพาะเลี้ยงกล้วยไม้สกุลต่างๆ สูตร Woody Plant Medium (WPM) เหมาะสำหรับเพาะเลี้ยงไม้เนื้อแข็ง โดยทั่วไปสูตรอาหารเหล่านี้จะประกอบไปด้วยธาตุอาหารหลักที่พืชต้องการในปริมาณมาก ได้แก่ โบรอน (B) โมลิบดีนัม แมงกานีส โคบอลต์ สังกะสี ทองแดง ไอโอดีน และธาตุอาหารอื่นๆ เช่น วิตามิน กรดอะมิโน และน้ำตาล นอกจากนี้อาจมีส่วนประกอบอื่นๆ เช่น น้ำมะพร้าว มันฝรั่ง กลัวยหอม สารสกัดจากยีสต์ ซึ่งจะมีสารช่วยเร่งการเจริญเติบโต

### การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ 6 ขั้นตอน ดังนี้

- 1.การเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งประกอบด้วย สารกลุ่มอินทรีย์และสารกลุ่มอินทรีย์
- 2.การคัดเลือกเนื้อเยื่อพืช การเลือกเนื้อเยื่อที่ดีได้ส่วนที่ถูกต้องจะทำให้เกิดการฟอกฆ่าเชื้อและการชักนำให้เกิดต้นประสบความสำเร็จสูง
- 3.การฟอกฆ่าเชื้อ เป็นการทำให้ชิ้นส่วนของพืชปลอดเชื้อ โดยการใช้สารเคมี ได้แก่ยาระงับเชื้อและยาทำลายเชื้อ ซึ่งจะทำหน้าที่ให้ส่วนประกอบที่สำคัญของจุลินทรีย์เสียไป ก่อนที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร
- 4.การขยายพันธุ์เพิ่มจำนวน ต้นพืชที่ได้จากการชักนำให้เกิดต้นจะมีความเยาว์วัย (juvenility) สามารถที่จะชักนำให้เกิดต้นจำนวนมากได้ง่าย โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน
- 5.การชักนำรากพืช ต้นพืชที่ได้จากการเพิ่มจำนวนต้นสามารถชักนำให้เกิดรากในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ซึ่งจะส่งเสริมการเกิดรากและยับยั้งการเกิดยอด
- 6.การย้ายออกปลูก ซึ่งต้องการปรับสภาพของต้นพืชให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมภายนอกประมาณ 2-4 สัปดาห์ จะทำให้ลดเปอร์เซ็นต์ของการตายของต้นพืชเนื่องจากการย้ายปลูก
6. การย้ายออกปลูก ซึ่งต้องการปรับสภาพของต้นพืชให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมภายนอกประมาณ 2-4 สัปดาห์ จะทำให้ลดเปอร์เซ็นต์การตายของต้นพืชเนื่องจากการย้ายออกปลูก

## ประโยชน์ของเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สำหรับประโยชน์ของเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีหลายด้านดังนี้

1. ประโยชน์ทางด้านเกษตรกรรม เช่น การขยายพันธุ์พืช โดยเฉพาะพืชที่มีค่าทางเศรษฐกิจ พืชที่มีปัญหาด้านการเพาะปลูกเนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม

- ให้พันธุ์พืชที่ได้มีผลผลิตสูงภายในระยะเวลาที่รวดเร็ว
  - นำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช (Plant Breeding) เช่นเพิ่มความทนทานต่อความแห้งแล้ง
  - การแยกและเลี้ยงพืชปลอดโรค เช่น กำจัดโรคไวรัสในพืช เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญในสภาพที่ปลอดเชื้อ
  - ต้นพืชที่ผลิตได้จะมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ คือมีลักษณะตรงตามพันธุ์โดยการใช้เทคนิคของการเลี้ยงจากตาของพืชพัฒนาเป็นต้นโดยตรง
  - การผสม โพรโตพลาสต์ (เซลล์ที่ถูกย่อย cell wall เหลือแต่ cell membrane บางๆ) ของพืช 2 ชนิดเข้าด้วยกันทำให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีรวมคุณลักษณะที่ดีของพืชทั้งสองชนิดไว้ด้วยกัน
  - การเก็บรักษาพันธุ์พืชไว้ได้เป็นระยะเวลานานไว้ได้เป็นระยะเวลานาน โดยเก็บไว้ในโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิต่ำๆ เมื่อต้องการนำมาใช้จึงทำการถ่ายเนื้อเยื่อลงสู่อาหารสังเคราะห์
  - ต้นพืชที่ได้มีขนาดสม่ำเสมอ ผลผลิตที่ได้มีมาตรฐานและเก็บเกี่ยวได้ครั้งละมากๆพร้อมกันหรือในเวลาเดียวกัน

2. ด้านอุตสาหกรรม

- นอกจากประโยชน์เชิงเกษตรกรรมยังมีการประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) หรือการเลี้ยงเนื้อเยื่อสมุนไพรเพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางยา โดยเริ่มจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อสมุนไพรในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว แล้วหาวิธีการหรือเทคนิคต่างๆไปกระตุ้นเซลล์พืชผลิตสารให้มากขึ้น ได้แก่ การปรับเปลี่ยนสถานะแวดล้อม การปรับเปลี่ยนสูตรอาหาร ที่มีผลต่อการผลิตสารสำคัญนั้นๆ การเติมสารตั้งต้นของกระบวนการกึ่งสังเคราะห์ (Biosynthetic pathway) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และการเหนี่ยวนำเซลล์พืชให้เกิดความเครียด (stress) เป็นต้น

3. ด้านอื่นๆ เช่น การใช้ ประโยชน์ในการศึกษาทางด้านชีวเคมีสังเคราะห์และสรีรวิทยาของพืชเพื่อใช้เป็นแนวทางการศึกษาวิจัยให้เกิดเทคโนโลยีที่มีการพัฒนาหลากหลายมากขึ้น

## ภาคผนวก ข

## การเตรียม buffer และสารละลายเข้มข้น

## 1. การเตรียม Staining solution

- |                                       |       |
|---------------------------------------|-------|
| 1. H <sub>2</sub> O                   |       |
| 2. NaPO <sub>4</sub> Ph 7             | 0.1 M |
| 3. EDTA                               | 10 Mm |
| 4. Triton X-100                       | 0.1 % |
| 5. X- GLUC                            | 2 Mm  |
| 6. K <sub>2</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> | 1 mM  |

ผสมสารละลายทั้งหมด ในความเข้มข้นที่ต้องการ หลังจากนั้นแบ่งใส่ eppendrof tube ไว้ประมาณ 500 ไมโครลิตร (ห่อ eppendrof tube ด้วยฟรอยล์ไว้เพื่อไม่ให้สารละลายโดนแสง)

## 2. Loading buffer

- |                  |              |
|------------------|--------------|
| Bromophenol blue | 0.25 % (w/v) |
| Xylene cyanol FF | 0.25 % (w/v) |
| Sucrose          | 40 % (w/v)   |

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ตามที่ต้องการก่อนนำไปนิ่งมาเชื้อที่ 121 °c นาน 15 นาที แล้วเก็บสารละลายไว้ที่ 4 °c

## 3. TE buffer (Tris-EDTA buffer)

- |              |       |
|--------------|-------|
| 3.1 Tris-Hcl | 10 Mm |
| 3.2 EDTA     | 1 Mm  |

ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกันก่อนนำไปนิ่งมาเชื้อที่ 121 °c นาน 15 นาที แล้วเก็บสารละลายไว้ที่ 4 °c

## 4. Ethidium bromide 10 mg/ml

ชั่ง Ethidium bromide มา 1 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirrer จนกระทั่งสารละลายละลายหมด ซึ่งอาจใช้เวลาหลายชั่วโมง จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °c ในการเตรียมสารนี้ต้องระมัดระวังอย่างมาก ขณะเตรียมจะต้องสวมถุงมือและอย่าหายใจเอาผงของ Ethidium bromide เข้า เพราะสารนี้มีคุณสมบัติเป็น strong mutagen



## 5. 0.5 % acetic acid / 95 % ethyl alcohol (EtOH)

5.1 Acetic acid 0.250 มิลลิลิตร

5.2 ปรับปริมาตรด้วย 95 %EtOH ให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4° c

## 6. 10x Tris borate buffer (10x TBE buffer)

6.1 Tris base 108 กรัม

6.2 boric acid 55 กรัม

6.3 0.5 Mm EDTA Ph 8.0 40 กรัม

ละลายสารในข้อ 6.1 และ 6.2 ด้วยน้ำกลั่นจากนั้นผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °c นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง



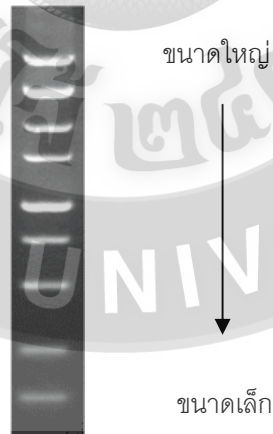
## การวิเคราะห์ดีเอ็นเอภายใต้สนามแม่เหล็กโดยผ่านตัวกลางชนิดวุ้น (Determination of DNA by gel eletrophoresis)

จากดีเอ็นเอมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตทำให้มีประจุลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะถูกผลักให้เคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวก ซึ่งจากหลักการดังกล่าวจึงใช้วิเคราะห์ดีเอ็นเอภายใต้สนามไฟฟ้า (Electrophoresis : EP) โดยผ่านตัวกลางคือวุ้น การเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางนั้นทำให้สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอตามขนาดและรูปร่างต่างๆได้ ตัวกลางที่นิยมโดยทั่วไปคือ polyacrylamide gel และ agarose gel ใช้ในการแยกดีเอ็นเอขนาด 200 bp ถึง 20 bp โดย agarose เป็น linear polymer ที่สกัดมาจากสาหร่ายทะเล เมื่อถูกหลอมด้วยความร้อนสร้างพันธะไฮโดรเจนทำให้เป็นวุ้นที่ประกอบด้วยรูพรุน โดยที่ขนาดของรูพรุนจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของ agarose ซึ่งความเข้มข้นปกติจะอยู่ในช่วง 0.3-3 %

ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอผ่านตัวกลาง คือ

### 1. ขนาดของดีเอ็นเอ

ความสามารถในการเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางมีความสัมพันธ์ในเชิงแปรผกผันกับ log ของน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอหรือขนาดของดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าขนาดใหญ่และดีเอ็นเอขนาดใหญ่เคลื่อนที่ได้ช้ากว่าขนาดเล็ก



## 2. ความเข้มข้นของตัวกลาง

คือ เจลที่มีความเข้มข้นสูงๆจะมีขนาดรูพรุนภายในเจลเล็กกว่าเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ผ่านได้ยากกว่าตัวกลางที่มีความเข้มข้นต่ำ

## 3. กระแสไฟฟ้า/แรงเคลื่อนไฟฟ้า

โดยค่าแรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสมในการแยกขนาดของดีเอ็นเอประมาณ 5-8 โวลต์/เซนติเมตร (ระยะห่างระหว่างขั้วทั้งสอง)

บัฟเฟอร์(buffer) ที่ใช้ในการทำ electrophoresis มีสองชนิด คือ running buffer และ loading dye buffer

1. Running buffer ที่มักใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยอิเล็กโตรโฟรีซิสชนิด agarose gel คือ Tris acetate –EDTA (TAE ; 40 mMTris-acetate และ 1 mMEDTA)หรือ Tris-EDTA (TBE ; 90 mMTris-borate และ 2mMedta ) ที่ Ph7.5-8.0 การใช้บัฟเฟอร์ใดนั้นเลือกจากคุณสมบัติของบัฟเฟอร์แต่ละชนิด คือ

- TAE เป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ เพราะราคาถูกและสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆได้ดีกว่า แต่มีความเป็นบัฟเฟอร์ต่ำ หากใช้ในการแยกขนาดของดีเอ็นเอเป็นเวลานานต้องมีการถ่ายเทหมุนเวียนของบัฟเฟอร์ในขณะที่ทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

- TBE เป็นที่นิยมใช้เช่นกัน มีความเป็นบัฟเฟอร์สูงกว่าและกรดบอริกยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แต่ไม่นิยมใช้หากต้องการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจล

### 2. Loading dye buffer

ใช้ผสมกับดีเอ็นเอก่อนหลอกลงในหลุม/ช่อง โดยประกอบด้วยสารที่มีโมเลกุลหนัก (40% sucrose หรือ 30% glycerol หรือ 15% Ficoll type 400) เพิ่มความหนืดช่วยถ่วงดีเอ็นเอให้ลงไปในช่วง ทำให้ดีเอ็นเอไม่ฟุ้งกระจายขณะหยอกลงในช่อง และอีกองค์ประกอบหนึ่งคือ สี (dye) มักเป็น 0.25% Bromophenol blue และ/หรือ 0.25% xylene cyanol ที่มีประจุลบที่มีขนาด โมเลกุลเล็กเคลื่อนผ่านตัวกลางได้อย่างอิสระ

### 3. การย้อมดีเอ็นเอ

เมื่อเสร็จสิ้นการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสดีเอ็นเอที่อยู่ภายในเจลจะถูกทำให้มองเห็นได้โดยการย้อมด้วย ethidium bromide (EtBr) สารนี้มีโครงสร้างที่แทรกเข้าไประหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอได้

(Intercalating agent)

EtBr เป็นสารก่อมะเร็งที่อันตรายจึงต้องสวมถุงมือและใช้อย่างระมัดระวัง

## ภาคผนวก ก

### พื้นฐานเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

ทฤษฎีและหลักการของเทคนิค Polymerase Chain Reaction

เทคนิคPCRหรือPolymerase Chain Reaction เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มจำนวนเส้นดีเอ็นเอที่เราสนใจ โดยอาศัยหลักการDNA replication เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวเริ่มต้นจากการทดลองภายในหลอดทดลอง ดังนั้นเทคนิคนี้จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างว่า In Vitro enzymatic amplification โดยเทคนิคนี้จำเป็นที่จะต้องมีส่วนประกอบดังนี้

1. DNA template เพื่อใช้เป็นแม่แบบเริ่มต้นในการสังเคราะห์เส้นอื่นๆต่อไป
2. Deoxynucleotide ทั้งสี่ชนิด ได้แก่ A, T, C, G
3. Thermostable DNA polymerase enzyme
4. Oligonucleotide primer
5. Buffer

สำหรับขั้นตอนที่สำคัญในการเพิ่มจำนวนDNA ได้แก่

1. Denaturation เป็นขั้นตอนที่ทำให้DNAเส้นคู่กลายเป็นเส้นเดี่ยว โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส
2. Annealing เป็นขั้นตอนที่ให้คู่primerสามารถจับกับDNA templateได้ เพื่อใช้ในการเริ่มต้นการสังเคราะห์DNAเส้นใหม่โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส
3. Extension เป็นขั้นตอนเพิ่มสายDNAเข้าไปต่อที่ปลาย3'ของprimer โดยอาศัย deoxyribonucleotideที่ใส่เข้าไป นอกจากนี้ยังต้องอาศัยthermostable DNA polymerase enzyme เช่น Taq polymerase อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-75องศาเซลเซียส

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอไม่ได้น้อยกว่า 100,000 เท่า

นอกจากนี้ยังมีขั้นตอนอื่นๆของเทคนิค PCR ที่จำเป็นอีกด้วย เช่น ก่อนที่จะเริ่มต้นการ denaturationควรมีการpreheatก่อนที่อุณหภูมิ ประมาณ70องศาเซลเซียส ประมาณ5นาทีก่อน เพื่อให้ enzyme ต่างๆพร้อมที่จะทำงาน ในการsynthesisสายDNAได้ แล้วเมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนทุกอย่างจนถึงขั้น

สุดท้ายของ extension process แล้ว อาจจะมีการให้ความร้อนต่อไปอีกที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 5 นาที เพื่อให้ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเส้น DNA เป็นไปอย่างสมบูรณ์ที่สุด องค์ประกอบและภาวะต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับในการทำ PCR มาตรฐาน ส่วนประกอบต่างๆ ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ มีดังนี้

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template-DNA) DNA ต้นแบบที่มีลักษณะลำดับเบสเป้าหมาย หรือ ดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA Target) สามารถใช้ในปฏิกิริยาของ PCR ในลักษณะดีเอ็นเอสายเดี่ยวหรือสายคู่ก็ได้ แม้ว่าขนาดของดีเอ็นเอไม่ใช่จุดที่มีปัญหามากนัก แต่การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยเอ็นเอมีขนาดสั้นๆ อยู่ในรูปปลายเปิดจะมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า เพราะ primer จะเข้าไปจับซึ่งช่วยให้ง่ายต่อการเพิ่มจำนวนและลดผลผลิต ดีเอ็นเอที่ไม่จำเป็นลง โดยทั่วไปควรทดสอบปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการเพียงพอและมีความไวที่เหมาะสมสำหรับปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR จะอยู่ในช่วง 10<sup>2</sup>-10<sup>5</sup> copies โดยในกรณี genomic DNA ของคนหรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้เท่ากับ 0.1-1 µg สำหรับ bacterial DNA ใช้ปริมาณ 1-10 ng ส่วน plasmid DNA ใช้ปริมาณ 0.1-1 ng

## 2. นิวคลีโอไทด์ตั้งต้น (Primer)

การเลือกออกแบบ primer ที่จะใช้ควรเลือกให้เหมาะสมกับแต่ละงาน โดยอาศัยหลักการจับคู่แบบจำเพาะของสายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจหา กับ primer โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer เป็นตัวกำหนดความจำเพาะในการสังเคราะห์ DNA ดังนั้นจึงต้องทราบลำดับเบสที่นำมาสังเคราะห์ primer

ข้อแนะนำในการเลือกและออกแบบ primer

- ความยาวของ primer : ควรมีความยาวประมาณ 18-30 นิวคลีโอไทด์ ขึ้นอยู่กับงานที่ใช้ ควรเลือก primer ที่มี GC-content อยู่ระหว่าง 50-60% ไม่ควรเลือก primer ที่มี GC content ที่สูงเกินไป-primer ต้องมีความจะเพาะกับลำดับเบสเป้าหมาย (target sequence)

- หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่จับกับลำดับเบสของตัวเอง

- ควรหลีกเลี่ยงลำดับเบสของแต่ละ primer ไม่ให้เป็นคู่สมกันเอง

- ค่า T<sub>m</sub> (Melting Temperature) ของแต่ละ primer ควรใกล้เคียงกันโดยทั่วไปควรอยู่ในช่วง 55-80 องศาเซลเซียส

- primer ควรมีลำดับกับคู่สมกลับปลายด้าน 3 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายของดีเอ็นเอต้นแบบ

## 3. Thermostable DNA polymerase

Thermostable DNA polymerase ที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ Taq DNA Polymerase ซึ่งแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ในน้ำพุร้อนที่มีชื่อ *Thermus Aquaticuse* (Taq) ซึ่งมีคุณสมบัติทนความร้อน

ได้สูงและไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอน denature และสามารถเร่งปฏิกิริยาการสร้าง DNA ได้ที่อุณหภูมิสูงคือ 70-85 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาคือ 72 องศาเซลเซียส Taq DNA Polymerase เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 94 กิโลดาลตัน ขาดคุณสมบัติ 3-5 exonuclease activity จึงขาดคุณสมบัติในการตรวจสอบที่เรียกว่า proofreading ความเข้มข้นของ DNA Polymerase อยู่ในช่วง 1.0-2.5 units ความเข้มข้นที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณและลักษณะของดีเอ็นเอต้นแบบ ,primer รวมทั้งสารประกอบอื่นๆ การใช้ปริมาณความเข้มข้นที่มากเกินไปจะทำให้เกิดผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะขึ้น ทำให้เกิด nonspecific background มากแต่ถ้าใช้ความเข้มข้นน้อยเกินไปก็จะทำให้ได้ผลผลิตน้อย

#### 4. Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)

ความเข้มข้นของ dNTPs (dATP,dTTP ,dCTP,dGTP) ปกติอยู่ระหว่าง 50-200  $\mu$ Mของแต่ละ dNTP แต่ถ้าเป็น dNTPs ทั้ง 4ตัว จะมีส่วนประกอบรวมไม่เกิน 800  $\mu$ M ถ้าหากใช้ dNTP ที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปจะเกิดการต่อลำดับเบสคู่สมที่ผิดพลาด ในการเตรียม dNTPs ควรเตรียมเป็น primary stock solution ที่เจือจาง 10 mMแล้วแบ่ง aliquot เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

#### 5. บัฟเฟอร์ (buffer)

ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ประกอบด้วย Tris HCL ,KCL ,MgCl<sub>2</sub> และ glycerol ความเข้มข้นและภาวะที่เหมาะสมของส่วนประกอบต่างๆในบัฟเฟอร์มีดังนี้

##### 5.1 ความเข้มข้นของ Magnesium ion (Mg<sup>2+</sup>)

Taq DNA Polymerase ต้องการ Magnesium ion (Mg<sup>2+</sup>) เพื่อช่วยส่งเสริมให้การขยายสายดีเอ็นเอดำเนินต่อไปได้ โดย magnesium ion จำทำหน้าที่เป็น co-factor นอกจากนั้น magnesium ion ยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วย (enzyme fidelity) และมีผลต่อการ anneal ของ primer ความเข้มข้นของ magnesium ion ต้องปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมกับ dNTPs โดยทั่วไปความเข้มข้นของ magnesium ion คือต้องเหลือ magnesium ในรูปอิสระประมาณ 0.5-1 mMโดยทั่วไปใช้ magnesium ความเข้มข้นทั้งหมดเป็น 1.5 Mm ความเข้มข้นของ magnesium ion ที่มากเกินไปทำให้เกิดผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ และพบว่าการปรับค่า magnesium ion ก็ช่วยให้ primer มีการ anneal ที่มีความจำเพาะขึ้นเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

##### 5.2 Ph

pHที่เหมาะสมในการทำงานสำหรับ Taq DNA polymerase คือที่ pH7-7.5 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส แต่ปกติ Taq DNA polymerase จะอยู่ใน Tris buffer ซึ่งมี pH8.5-9ที่ 25 องศาเซลเซียส เนื่องจาก pHของ Tris buffer จะลดลงประมาณ 0.03ของอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นแต่ละองศา ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 72 องศาเซลเซียส จะได้ pHเป็น 7.3

## 6.องค์ประกอบอื่นๆในปฏิกิริยา PCR

โดยทั่วไปส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ใน PCR คือ 10-15 Mm Tris-HCL ที่ Ph8.4 ที่ 25 องศาเซลเซียส , 50mMKCL, 1.5mM $\text{MgCl}_2$ , 0.01% gelatin(w/v) หรืออาจใช้ non-ionic detergent อื่นแทน gelatin ได้ เช่น 0.01%NP40 และ 0.01% Tween 20 การทดลองบางแห่งใช้ DMSO ใส่ลงไปในการปฏิกิริยาเพื่อลด secondary structure ของ DNA แต่พบว่า 10% DMSO ไม่เหมาะกับ Taq DNA polymerase เพราะไปยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทำให้ได้ผลผลิต PCR ที่น้อยลง gelatin หรือ Bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้นต่ำๆ (100 $\mu\text{g/ml}$ ) สามารถช่วยคงสภาพของเอนไซม์ได้ แต่ BSA ถูกทำลายได้ง่ายที่อุณหภูมิสูงและอาจตกตะกอนกับ Taq DNA polymerase

### Temperature cycling

1. Denaturation อุณหภูมิที่ใช้ส่วนใหญ่ประมาณ 94-95 °c เป็นเวลา 30-60 นาที การใช้เวลาน้อยและอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้เอนไซม์และนิวคลีโอไทด์สูญเสียคุณสมบัติได้ แต่ถ้าใช้เวลาและอุณหภูมิต่ำเกินไปจะทำให้สาย DNA แยกออกจากกันไม่ได้ส่งผลให้ผลผลิต PCR ลดลง กรณีที่ DNA template มีปริมาณ G+C content ที่สูงมากต้องเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นด้วย

2. Annealing โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิในขั้นนี้ประมาณ 55-72 °c ซึ่งใช้ annealing temperature ที่ต่ำกว่า  $T_m$  ของ primer ประมาณ 5°C การใช้อุณหภูมิที่สูงในขั้นตอนนี้จะช่วยในการเพิ่มความจำเพาะในการจับคู่ เวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้ประมาณ 30 วินาที

3. Extension เวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้ขึ้นกับความยาว ความเข้มข้นและลำดับเบสของ DNA template โดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 1 นาที ที่อุณหภูมิ 72 °c โดยปกติ Taq DNA polymerase สามารถเพิ่มความยาวของสาย DNA ได้ประมาณ 6000 นิวคลีโอไทด์ต่อนาที ที่ อุณหภูมิ 72 °c การใช้เวลาที่มากในขั้นตอนนี้แรกจะมีประโยชน์สำหรับ DNA template ที่มีจำนวนน้อย

### จำนวนรอบในการทำ PCR (Cycle Number)

จำนวนรอบในการทำ PCR ขึ้นกับปริมาณ DNA template ถ้าใช้จำนวนรอบที่มากขึ้นเท่าใดโอกาสที่จะได้ผลผลิต PCR ผิดพลาดก็มากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากผลผลิต PCR ที่ได้จะมีความจำเพาะเจาะจงที่น้อยลงและ Background มากขึ้นแต่ถ้าใช้จำนวนรอบน้อยเกินไปผลผลิต PCR ที่ได้ก็น้อยลง

### การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR (PCR Product)

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตมีด้วยกันหลายวิธีที่นิยมใช้กันทั่วไปคือ

1. Gel electrophoresis โดยนำผลผลิต PCR มาแยกตามขนาดของ DNA โดยใช้กระแสไฟฟ้าแยก DNA บน agarose gel หรือ polyacrylamide gel เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานที่ทราบขนาดแน่นอน

จากนั้นย้อมขึ้น DNA ด้วย Ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ผลผลิต PCR ที่ดีควรให้ชั้น DNA ที่ชัดเจนและตรงตามขนาดความต้องการ แต่ถ้ามีขนาดเล็กและแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจนอาจเป็นดีเอ็นเอที่เป็น primer dimmer

## 2. Nucleic acid hybridization

ในกรณีที่ผลจากเจลไม่ชัดเจนสามารถนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรงกับแผ่น nitrocellulose หรือแผ่น nylon แล้วนำมาทำ Southern blot, dot blot, หรือ slot blot โดยอาศัยตัวติดตาม (probe) ที่จำเพาะกับเบสคู่สมซึ่งติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารปลดรังสีแล้วจึงนำผลไปดูการจับของผลผลิต PCR กับตัวติดตามได้

## 3. Direct Sequencing

ในกรณีที่ต้องการรู้รายละเอียดของลำดับเบสหรือของผลผลิต PCR ว่าถูกต้องแน่นอนหรือไม่สามารถตรวจหาลำดับเบสโดยวิธี Sequencing PCR ที่เป็นสายคู่ (double strand PCR products) หรืออาจจะ Sequencing PCR ที่เป็นสายเดี่ยว (single strand PCR products)

## ข้อควรระวังในการทำ PCR

### การปนเปื้อน (Contamination)

แม้ว่าเทคนิค PCR จะเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้มากหลายเท่าแต่ก็สามารถเพิ่มจำนวน DNA ที่ปนเปื้อนเพียงเล็กน้อยได้มากเช่นกัน ทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ การปนเปื้อนอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การสกัดแยก DNA หรือจากการปนเปื้อนของผลผลิต PCR ครั้งก่อน (carry over contamination) ซึ่งมักอยู่ในรูปของละอองลอย ที่มักเกิดขึ้นขณะการเปิด-ปิดฝาหลอดและการปั่นตกตะกอนละอองลอยนี้สามารถปนเปื้อนกับสิ่งต่างๆในห้องปฏิบัติการ ทั้งอุปกรณ์เครื่องมือและวัสดุต่างๆรวมทั้ง ผิวหนัง ผม และมือผู้ปฏิบัติการได้ ดังนั้นควรระวังการปนเปื้อนให้มากโดยเฉพาะการปนเปื้อน ชนิด carry over contamination

### วิธีการที่จะป้องกันการปนเปื้อนมีด้วยกันหลายอย่าง เช่น

- 1.> ควรแบ่งพื้นที่หรือห้องทำงานในช่วงก่อนและหลังทำ PCR (separate workspace)
- 2.> แบ่งสารเคมีลงในหลอดเล็กๆเพื่อในการนำมาใช้แต่ละครั้งไม่ปนกัน
- 3.> ใช้ Micropipette และ filter tip ซึ่งเป็น tip ชนิดพิเศษที่ป้องกันการแพร่กระจายของละอองลอย โดยมีลักษณะสำคัญคือ มีไส้กรอง (membrane) อยู่ภายใน
- 4.> มีตัวควบคุมที่เหมาะสมในการทำ PCR โดยตัวควบคุมจะมีด้วยกัน 3 แบบ คือแบบแรกเป็นตัวควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ เพื่อเป็นการควบคุมการปนเปื้อนของสารที่ใช้ (negative control) แบบที่สองเป็นตัวควบคุมที่มีดีเอ็นเอ ชนิดที่ไม่มีลำดับเบสเป้าหมายอยู่ (positive control) และแบบที่สามเป็นตัวควบคุมที่มีดี DNA template ที่เป็น positive control