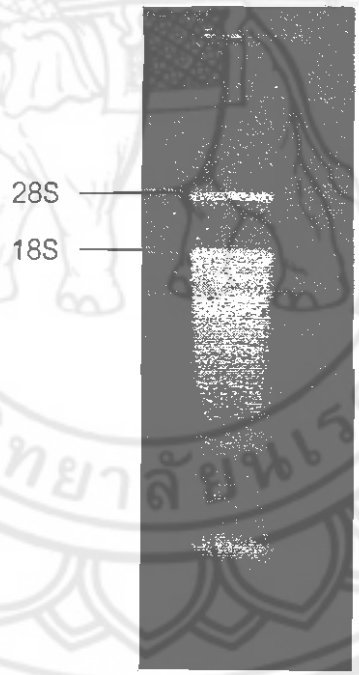
บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การค้นหายีน Dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) จากกลีบดอก (petal) ของปทุมมา

1.1 ผลการตรวจสอบการสกัด Total RNA โดย 1.4 เปอร์เซ็นต์ denaturing formaldehyde agarose/EtBr electrophoresis

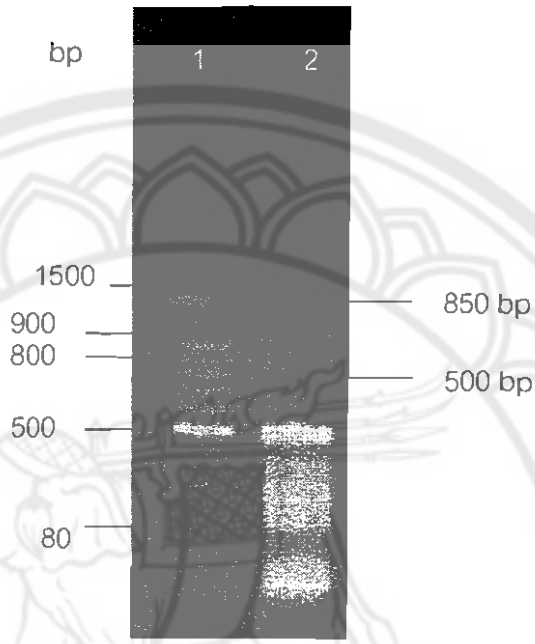
จากวิธีการสกัด total RNA โดยใช้ TRIZOL® Reagent สามารถสกัด total RNA จากกลีบดอกของปทุมมา เมื่อนำมาแยกโดยวิธีอิเลคโตรโฟริซีส พบแถบ 28S และ18S ribosomal RNA แสดงดังภาพ 5



ภาพ 5 แสดง total RNA ที่ตรวจสอบโดยใช้ 1.4 เปอร์เซ็นต์ denaturing formaldehyde agarose/EtBr electrophoresis, 100 volt, 50 นาที

1.2 ผลการการแยก *DFR* gene ด้วยเทคนิค RT-PCR

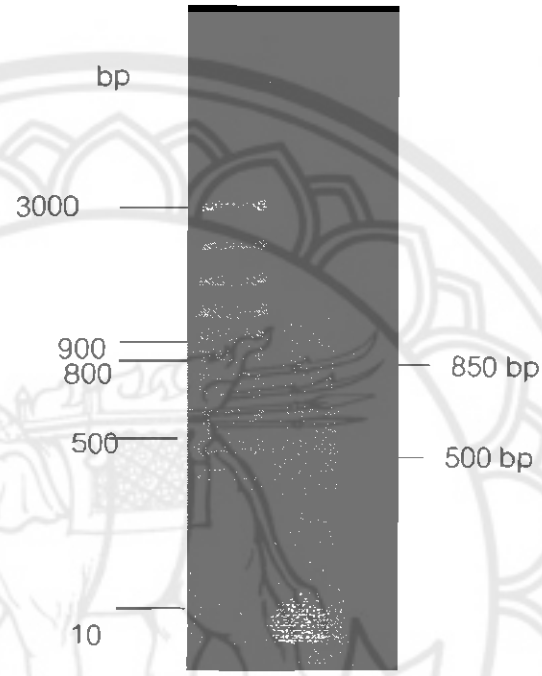
1.2.1 การแยก *DFR* gene โดยใช้ annealing temperature เท่ากับ 50°C



ภาพ 6 แสดงการแยก *DFR* gene โดยใช้1.4 เปอร์เซ็นต์ agarose electrophoresis, 100 volt, 50 นาที หลังจากการทำเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ DFRF2 และ DFRR5 ; Lane 1 คือ100 bp DNA marker และ Lane 2 คือ PCR product, annealing temp. = 50°C

จากภาพ 6 แสดงให้เห็นว่าการแยก *DFR* gene ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ DFRF2 และ DFRR5 และ annealing temperature เท่ากับ 50°C ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบโดยมีขนาดประมาณ 500 bp และ 850 bp ซึ่ง ขนาดประมาณ 850 bp มีขนาดใกล้เคียงกับระยะห่างระหว่างไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ ดังนั้นจึงเพิ่ม annealing temperature ให้เท่ากับ 53°C เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาดประมาณ 850 bp

1.2.2 การแยก *DFR* gene โดยใช้ annealing temperature เท่ากับ 53°C



ภาพ 7 แสดงการแยก *DFR* gene โดยใช้ 1.4 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis, 100v, 50 นาที ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ DFRF2 และ DFRR5 ; Lane 1 คือ 100 bp DNA marker และ Lane 2 คือ PCR product, annealing temp. = 53°C

จาก ภาพ 7 เป็นการเพิ่ม annealing temperature เท่ากับ 53°C ในการแยก *DFR* gene ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าดีเอ็นเอขนาดประมาณ 850 bp มีปริมาณมากขึ้น เมื่อเทียบกับการใช้ annealing temperature เท่ากับ 50°C

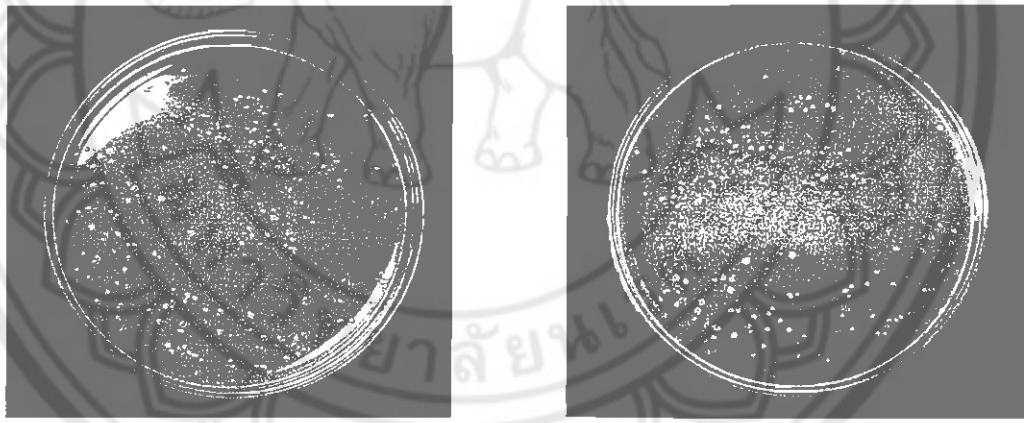
1.3 ผลการโคลน *DFR* gene และการตรวจสอบโคลนที่ได้รับที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA)

1.3.1 ผลการโคลน *DFR* gene (cloning of *DFR* gene)

จากการโคลน *DFR* gene โดยใช้ใช้ Inst/Aclone™PCR Product Cloning Kit (Fermentus, U.S.A) แล้วคัดเลือกโคลนที่คาดว่าได้รับดีเอ็นเอสายผสมโดยใช้การต้านยาปฏิชีวนะ ampicillin/X-gal พบชนิดโคโลนี ดังตาราง 5

ตาราง 5 แสดงจำนวนโคโลนีสีขาวและน้ำเงินจากการคัดเลือกโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม โดยใช้ ampicillin/X-gal plate

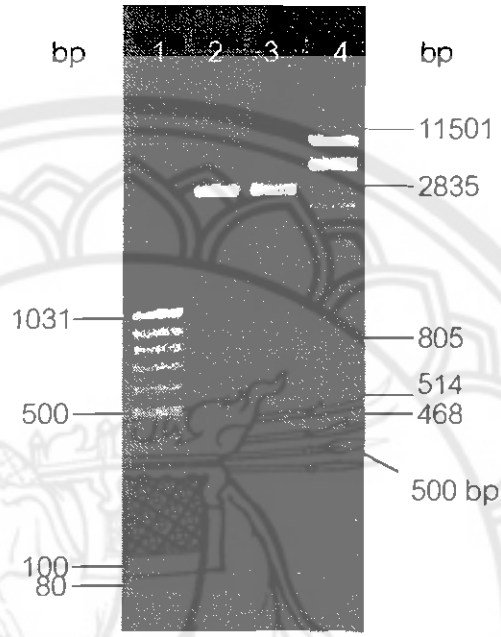
ชนิดโคลน	จำนวนโคโลนีสีฟ้า	จำนวนโคโลนีสีขาว	อัตราส่วนโคโลนีฟ้า:ขาว
DFR gene 500 bp	110	35	3:1
DFR gene 850 bp	141	33	4:1



ก ข

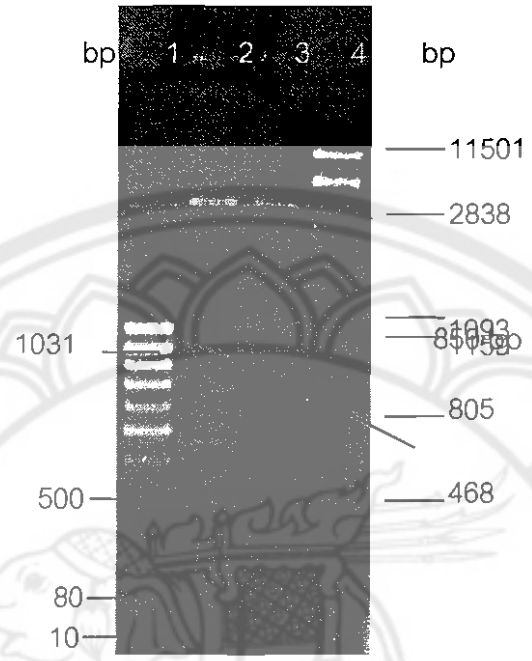
ภาพ 8 แสดงโคโลนีสีฟ้าซึ่งเป็นโคลนที่ไม่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม และสีขาวซึ่งเป็นโคลนที่คาดว่าจะได้รับดีเอ็นเอสายผสม จากการคัดเลือกด้วย ampicillin/X-gal ภาพ ก และ ข แสดงการโคลน *DFR* gene ขนาดประมาณ 500 และ 850 คู่เบส ตามลำดับ

1.3.2 ผลการตรวจสอบโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ(Restriction Enzyme)



ภาพ 9 แสดงการตรวจสอบโคลนที่รับ Putative *DFR* gene ขนาดประมาณ 500 คู่เบส โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoR* I ; Lane 1 คือ 100 bp DNA marker , Lane 2 คือ Clone No.5.1 ได้รับ 500 bp *DFR* gene, Lane 3 คือ Clone No.5.2 ได้รับ 500 bp *DFR* gene และ Lane 4 คือ λ DNA/ *Pst* I marker

จากภาพ 9 การตรวจสอบโคลนที่รับ Putative *DFR* gene ขนาดประมาณ 500 คู่เบส โดยใช้ *EcoR* I ตัดพลาสมิดที่สกัดได้จากโคลนที่ได้รับพบว่า ได้ดีเอ็นเอ 2 fragment และเมื่อเทียบกับ Molecular weight marker แล้ว fragment มีขนาดประมาณ 3000 คู่เบส (คือชิ้นส่วนของพลาสมิด pTZ57R) และ 500 คู่เบส (คือ cDNA ที่เข้ารหัส *DFR* gene) แสดงว่าโคลนได้รับ Putative *DFR* gene ขนาดประมาณ 500 คู่เบส

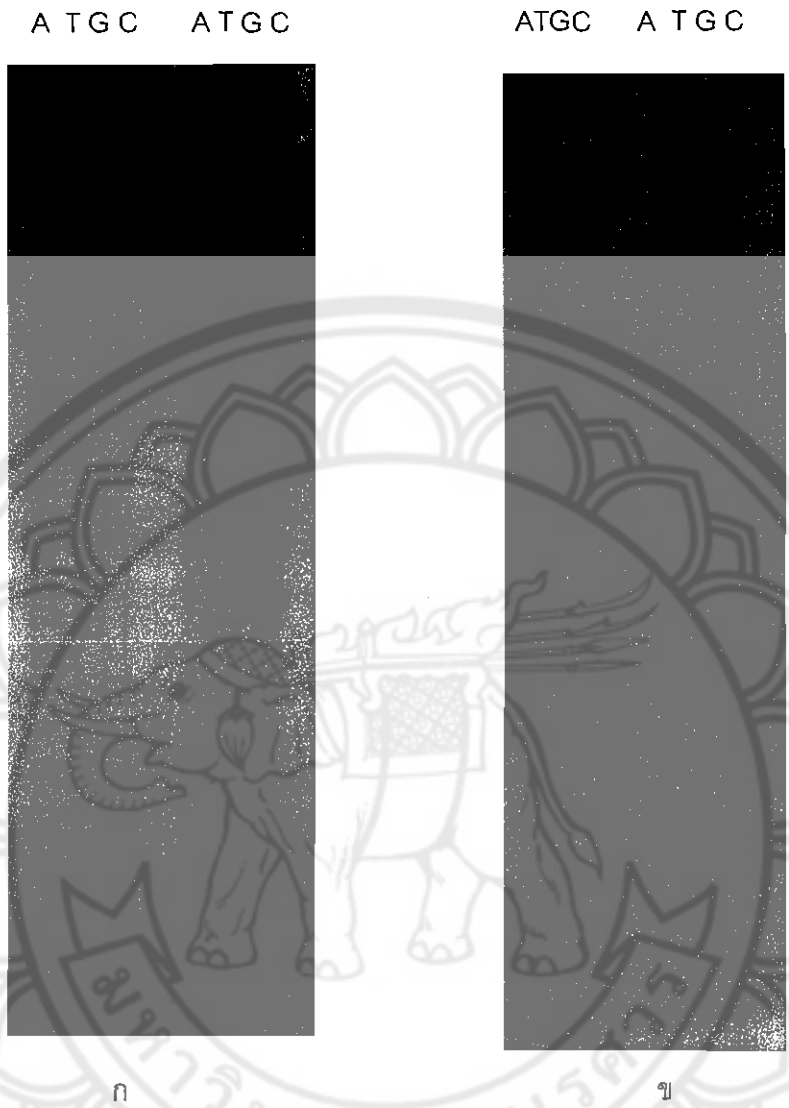


ภาพ 10 แสดงการตรวจสอบโคลนที่รับ Putative *DFR* gene ขนาดประมาณ 850 คู่เบส โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoR* I ; Lane 1 คือ 100 bp DNA marker , Lane 2 คือ Clone No.8.1 ได้รับ 850 bp *DFR* gene , Lane 3 คือ Clone No.8.2 ได้รับ 850 bp *DFR* gene และ Lane 4 คือ λ DNA / *Pst* I marker

จากภาพ 10 การตรวจสอบโคลนที่รับ Putative *DFR* gene ขนาดประมาณ 850 เบส โดยใช้ *EcoR*I ตัดพลาสมิดซึ่งสกัดได้จากโคลนที่ได้รับจากดีเอ็นเอสายผสม พบว่าได้ดีเอ็นเอ 2 fragment และเมื่อเทียบกับ Molecular weight marker แล้ว fragment มีขนาดประมาณ 3000 และ 850 คู่เบส แสดงว่าโคลนได้รับ Putative *DFR* gene ขนาดประมาณ 850 คู่เบส

1.4 **ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์** (DNA sequencing) **ของ** Putative *DFR* gene

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) **ของโคลนที่รับ** *DFR* gene fragment จากปทุมมาขนาดประมาณ 500 และ850 **คู่เบส** โดยวิธี Silver sequencing และยืนยันผลการหาลำดับเบสโดย automated DNA sequencing machine (Model ABI 310) **พบว่ามีลำดับ นิวคลีโอไทด์ดังนี้** (ภาพ 11)



ภาพ 11 แสดงการหาลำดับเบสโดยทำ DNA sequencing gel electrophoresis ใช้วิธี Silver sequencing ภาพ ก และ ข คือ การหาลำดับเบสของ *DFR gene* ขนาดประมาณ 500 และ850 คู่เบสตามลำดับ

```
TTTTCACTTC CTCTGCTGGA ACCGTGAACG TGCAAGAAAA TCAAATGCCC GAGTACGACG
AAAGCTCATG GAGCGACGTC GACTTCTGCA GACGCGTCAA GATGACTGGA TGGATGTACT
TTGTATCTAA AACCCTAGCG GAGAAAGCTG CATGGGAATT TGCAAAGGAG AAATTGATAT
TCAATTAATA AGCATTATTC CAACTTTGGT GGTGGGTCCT TTCATCACCT CAACTATGCC
TCCTAGTATG CTAACAGCTT TGTCACTGAT CACAGGAAAT GAAGCCCACT ATCGATCTTA
AAGCAAATCC AGCTTGTTCA CCTGGATGAT GTATGCAAGG CCCATATTTT CCTCTTCGAG
AATCCTAGAA GCGAGTGGGA GATACATTTG CTCTT
```

ภาพ 12 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative *DFR* gene ขนาดประมาณ 500 คู่เบส ที่แยกได้จากปทุมมา

```
ATGCCGGCAC GGTCTCCATA CACGAGGCCC GCAGACACCT CTACGACGAG ACCTCCTGGA
GCGACGTCGA CTTCTGCAGG GCCAAGAAGA TGACCGGATG GATGTACTTT GTGTCGAAGA
CGTTGGCCGA GAAGGCCGCG TGGGACTTTG CGGAGAAGAA CAACATCGAC TTCATCAGCA
TTATCCCCAC CCTAGTCAAC GGCCCCTTCG TCATGCCCAC CATGCCGCCC AGCATGCTCT
CCGCCCTCGC CCTCATCACA ATGAACGAGC CGCACTATTC GATCCTGAAA CCGGTGCAGT
TCGTCCACCT CGATGACCTC TGCAACGCCC ACATCTTCCT GTTCGAGTGC CCCGACGCCA
AGGGAAGGTA CATCTGCTCC TCCCACGACG TCACCATCGC CGGCCTCGCC CAGATACTCC
GGCAGCGCTA CCCTGAGTTC GACGTCCCCA CCGAGTTTGG AGAGATGGAG GTCTTCGACA
TCATAAGCTA CTGGTCCAAG AAGCTCACGG AAATAGGCTT TGAGTTCAAG TACAGCTTAG
AGGATATGTT TGATGGGGCG ATTCAGTCCT GCAGAGAGAA GGGCTTGCTG CCGCCCGCCA
CCAAGGTTCC ATCATATGCC ACTGAACAAT TAATTGCCAC CGGGCAAGAC AACGGCCATT
GAGAACAGTG ATAGCACGGG GACCCAAGAA CGAGATGTGT AACAGACCCT GTTTAC
```

ภาพ 13 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative *DFR* gene ขนาดประมาณ 850 คู่เบส ที่แยกได้จากปทุมมา

5'3'Frame2

```
ttttcacttcctctgctggaaccgtgaacgtgcaagaaaatcaaatgcccgagtacgacga
  F  H  F  L  C  W  N  R  E  R  A  R  K  S  N  A  R  V  R  R
aagctcatggagcgacgtcgacttctgcagacgcgtcaagatgactggatggatgtactt
 K  L  M  E  R  R  R  L  L  Q  T  R  Q  D  D  W  M  D  V  L
tgtatctaaaaccctagcggagaaagctgcatgggaatttgcaaaggagaaattgatatt
 C  I  L  N  P  S  G  E  S  C  M  G  I  C  K  G  E  I  D  I
caattaataagcattattccaactttggtggtgggtcctttcatcacctcaactatgcct
 Q  L  I  S  I  I  P  T  L  V  V  G  P  F  I  T  S  T  M  P
cctagtatgctaacagctttgtcactgatcacaggaaatgaagcccactatcgatcttaa
 P  S  M  L  T  A  L  S  L  I  T  G  N  E  A  H  Y  R  S  L
agcaaatccagcttgttcacctggatgatgtatgcaaggcccatattttcctcttcgaga
 S  K  S  S  L  F  T  W  M  M  Y  A  R  P  I  F  S  S  S  R
atcctagaagcgagtgggagatacatttgctctt
 I  L  E  A  S  G  R  Y  I  C  S
```

ภาพ 14 ลำดับกรดนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของ Reading frame ที่ 2 ซึ่งอ่านจากปลาย 5' ไปด้าน 3' ของ *DFR* gene fragment ขนาดประมาณ 500 คู่เบส ซึ่งคล้ายกับ *DFR* gene จากพืชสปีชีส์ต่าง ๆ ที่รายงานใน Genbank

5'3'Frame3

```
atgccggcacggtctccatacacgaggcccgcagacacctctacgacgagacctcctggagc
   A  G  T  V  S  I  H  E  A  R  R  H  L  Y  D  E  T  S  W  S
gacgtcgacttctgcagggccaagaagatgaccggatggatgtactttgtgtcgaagacg
 D  V  D  F  C  R  A  K  K  M  T  G  W  M  Y  F  V  S  K  T
ttggccgagaaggccgcgtgggactttgcggagaagaacaacatcgacttcatcagcatt
 L  A  E  K  A  A  W  D  F  A  E  K  N  N  I  D  F  I  S  I
atccccaccctagtcaacggccccttcgtcatgcccaccatgccgcccagcatgctctcc
 I  P  T  L  V  N  G  P  F  V  M  P  T  M  P  P  S  M  L  S
gccctcgccctcatcacaatgaacgagccgcactattcgatcctgaaaccggtgcagttc
 A  L  A  L  I  T  M  N  E  P  H  Y  S  I  L  K  P  V  Q  F
gtccacctcgatgacctctgcaacgcccacatcttcctgttcgagtgccccgacgccaag
 V  H  L  D  D  L  C  N  A  H  I  F  L  F  E  C  P  D  A  K
ggaaggtacatctgctcctcccacgacgtcaccatcgccggcctcgcccagatactccgg
 G  R  Y  I  C  S  S  H  D  V  T  I  A  G  L  A  Q  I  L  R
cagcgctaccctgagttcgacgtccccaccgagtttggagagatggaggtcttcgacatc
 Q  R  Y  P  E  F  D  V  P  T  E  F  G  E  M  E  V  F  D  I
ataagctactggtccaagaagctcacggaaataggctttgagttcaagtacagcttagag
 I  S  Y  W  S  K  K  L  T  E  I  G  F  E  F  K  Y  S  L  E
gatatgtttgatggggcgattcagtcctgcagagagaagggcttgctgccgcccgccacc
 D  M  F  D  G  A  I  Q  S  C  R  E  K  G  L  L  P  P  A  T
aaggttccatcatatgccactgaacaattaattgccaccgggcaagacaacggccattga
 K  V  P  S  Y  A  T  E  Q  L  I  A  T  G  Q  D  N  G  H  W
gaacagtgatagcacggggacccaagaacgagatgtgtaacagaccctgtttac
 E  Q  W  R  H  G  D  P  R  T  R  C  V  T  D  P  V  Y
```

ภาพ 15 ลำดับกรดนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ Reading frame ที่ 3 ซึ่งอ่านจากปลาย 5' ไปด้าน 3' ของ *DFR* gene fragment ขนาดประมาณ 850 คู่เบส ซึ่งคล้ายกับ *DFR* gene จากพืชสปีชีส์ต่าง ๆ ที่รายงานใน Genbank

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

Vaccinium_macrocarpon          -------MKDVNSGLGT-TVCVTGAAGFIGSWLIMRLLERGYVVRATVRD 42
Solanum_tuberosum              MASEVHAVVDAHSPPKTPTVCVTGAAGFIGSWLVMRLLERGYNVHATVRD 50
Gentiana_triflora              --------MEGGILSNATTVCVTGASGYIGSWLAMRLLERGYTVRATVRD 42
Eustoma_grandiflorum           --------MEK-SGGAASTVCVTGAAGYIGSWLVMRLLERGYTVRATVRD 41
Gerbera_hybrid                 --------MEE---DSPATVCVTGAAGFIGSWLVMRLLERGYVVHATVRD 39
Vitis_vinifera                 ----------MGSQSETVCVTGASGFIGSWLVMRLLERGYTVRATVRD 38
Rosa_hybrid_cultivar           ----------MASESESVCVTGASGFIGSWLVMRLLDRGYTVRATVRD 38
Citrus_sinensis                ----------MGSIAETVCVTGASGFIGSWLIMRLLERGYAVRATVRD 38
Curcuma_alismatifolia(850)     --------------------------------------------------
Anthurium_andraeanum           ----------MMHKGTVCVTGAAGFVGSWLIMRLLEQGYSVKATVRD 37
Lilium_speciosum               ----------MENAKGPVVVTGASGYVGSWLVMKLLQYGYTIRATVRD 38
Curcuma_alismatifolia(500)     --------------------------------------------------

Vaccinium_macrocarpon          PGNLKKVKHLLELPKADTNLTLWKADLNEEGSFDEAIEGCVGVFHVATPM 92
Solanum_tuberosum              PENQKKVKHLLELPKADTNLTLWKADLAVEGSFDEAIQGCQGVFHVATPM 100
Gentiana_triflora              PGNLKKVQHLLELPKASTNLTLLKADLTEEGSFDEAIHGCHGVFHVATPM 92
Eustoma_grandiflorum           PGDVKKVKHLFELPKASTNLTVLKADLIEEGSFDEAIQGCHGVFHMATPM 91
Gerbera_hybrid                 PGDLKKVKHLLELPKAQTNLKLWKADLTQEGSFDEAIQGCHGVFHLATPM 89
Vitis_vinifera                 PTNVKKVKHLLDLPKAETHLTLWKADLADEGSFDEAIKGCTGVFHVATPM 88
Rosa_hybrid_cultivar           PANKKKVNHLLDLPKAATHLTLWKADLAEEGSFDEAIKGCTGVFHVATPM 88
Citrus_sinensis                PDNKKKVKHLLELPKASTHLTLWKADLAEEGNFDEAIRGCTGVFHLATPM 88
Curcuma_alismatifolia(850)     --------------------------------------------------
Anthurium_andraeanum           PSNMKKVKHLLDLPGAANRLTLWKADLVDEGSFDEPIQGCTGVFHVATPM 87
Lilium_speciosum               PRDLRKTKPLLDIPGADERLTIWKADLSEDASFDEAINGCTGVYHVATPM 88
Curcuma_alismatifolia(500)     --------------------------------------------------

Vaccinium_macrocarpon          DFESKDPENEVIKPTINGVLSIIKSCTKAK-TVKRLVFTSSAGAVVDQEH 141
Solanum_tuberosum              DFESKDPENEVIKPTVRGVLSIIESCAKAN-TVKRLVFTSSAGALDVQED 149
Gentiana_triflora              DFESKDPKNEVIKPTIDGFLSIIRSCVKAK-TVKKLVFTSSAGTVDVQEQ 141
Eustoma_grandiflorum           EFESKNPENEVIKPTIDGVLSVIRSSVKAK-TVKKIVFTSSAGTVDVQKE 140
Gerbera_hybrid                 DFESKDPENEIIKPTIEGVLSIIRSCVKAK-TVKKLVFTSSAGTVNGQEK 138
Vitis_vinifera                 DFESKDPENEVIKPTIEGMLGIMKSCAAAK-TVRRLVFTSSAGTVNIQEH 137
Rosa_hybrid_cultivar           DFESKDPENEVIKPTINGVLDIMQACLKAK-TVRRLVFTSSAGSVNVEET 137
Citrus_sinensis                DFESKDPENEVIRPTINGMVSIMRACKNAK-TVRRLVFTSSAGTLDVEEH 137
Curcuma_alismatifolia(850)     ------------------------------------------AGTVSIHEA 9
Anthurium_andraeanum           DFESKDPESEMIKPTIEGMLNVLRSCARASSTVRRVVFTSSAGTVSIHEG 137
Lilium_speciosum               DFDSKDPENEVIQPTINGVLGIMKSCKKAG-TVKRVIFTSSAGTVNVQEN 137
Curcuma_alismatifolia(500)     ---------------------------------FHFLCWNRERARKSNARV 18

Vaccinium_macrocarpon          QPLVFDENNWSDVDFLYDKKMTGWTYFVSKTLAERAAMEAAK-EISIDFI 190
Solanum_tuberosum              QKLFCDETSWSDLDFIYAKKMTGWMYFVSKILAEKAAMEEAK-KNNIDLI 198
Gentiana_triflora              QKPVYDENDWSDLDFINSTKMTGWMYFVSKILAEKAAWEVTK-ANDIGFI 190
Eustoma_grandiflorum           QKSVYDENDQSDLDFIYSKKMTGWMYFVSKILAEKAAWEAAK-ANNIGFI 189
Gerbera_hybrid                 QLHVYDESHWSDLDFIYSKKMTAWMYFVSKTLAEKAAWDATK-GNNISFI 187
Vitis_vinifera                 QLPVYDESCWSDMEFCRAKKMTAWMYFVSKTLAEQAAWKYAK-ENNIDFI 186
Rosa_hybrid_cultivar           QKPVYNESNWSDVEFCRRVKMTGWMYFASKTLAEQEAWKFAK-ENNIDFI 186
Citrus_sinensis                RKPVYDETSWSDLDFVRSVKMTGWMYFVSKTLAEQAAWKFAE-ENNIDFI 186
Curcuma_alismatifolia(850)     RRHLYDETSWSDVDFCRAKKMTGWMYFVSKTLAEKAAWDFAE-KNNIDFI 58
Anthurium_andraeanum           RRHLYDETSWSDVDFCRAKKMTGWMYFVSKTLAEKAAWDFAE-KNNIDFI 186
Lilium_speciosum               QMPEYDESSWSDVDFCRRVKMTGWMYFVSKTLAEKAAWEFAK-ENDIQLI 186
Curcuma_alismatifolia(500)     RRKLMERRR------LLQTRQDDWMDVLCINPSGESCMGICKGEIDIQLI 62
                                :   :.          :  ~ . .  : . .   :  .* :*
```

ภาพ 16 แสดง multiple sequence alignment ของ Putative *DFR* gene ขนาดประมาณ 500 และ850 คู่เบส ที่แยกจากปทุมมา มีบริเวณลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันกับลำดับกรดอะมิโนของ*DFR* gene ในพืชสปีชีส์อื่น ๆ ที่มีการรายงานไว้ใน Genbank

```
Vaccinium_macrocarpon          SIIPTLVVGPFISPTFPPSLITVLSPITGNEAHYSIIKQCQYVHLDDLCK 240
Solanum_tuberosum              SIIPPLVVGPFITPTFPPSLITALSLITGNEAHYGIIKQGQYVHLDDLCE 248
Gentiana_triflora              SIIPTLVVGPFITTTFPPSLITALSLITGNEAHYGIIKQGQFVHLDDLCE 240
Eustoma_grandiflorum           SIIPTVVVGPFITCTFPPSLITALSLLTGNEAHYSIIKQGQFVHLDDLCE 239
Gerbera_hybrid                 SIIPTLVVGPFITSTFPPSLVTALSLITGNEAHYSIIKQGQYVHLDDLCE 237
Vitis_vinifera                 TIIPTLVVGPFIMSSMPPSLITALSPITGNEAHYSIIRQGQFVHLDDLCN 236
Rosa_hybrid_cultivar           TIIPTLVIGPFLMPSMPPSLITGLSPLTGNESHYSIIKQGQFIHLDDLCQ 236
Citrus_sinensis                SIIPSLVVGPFLTSSMPPSLITALSPITRNEAHYPIIKQGQFVHLDDLCS 236
Curcuma_alismatifolia(850)     SIIPTLVNGPFVMPTMPPSMLSALALITMNEPHYSILKPVQFVHLDDLCN 108
Anthurium_andraeanum           SIIPTLVNGPFVMPTMPPSMLSALALITRNEPHYSILNPVQFVHLDDLCN 236
Lilium_speciosum               SIIPTLVVGPFITSTMPPSMLTALSLITGNEAHYSILKQIQLVHLDDVCK 236
Curcuma_alismatifolia(500)     SIIPTLVVGPFITSTMPPSMLTALSLITGNEAHYRSSKSSLFTWM--MYA 110
                               :***.:* ***:  ::***::: *: :* **.**   .       :  :

Vaccinium_macrocarpon          YLMFLLE-HPEAEGRYICSSHDATIYDLAKMMRRNGPGTMSPNEFKGIDK 289
Solanum_tuberosum              AHIFLYE-HPKAEGRFICSSHHAIIYDVAKMVRQKWPEYYVPTEFKGIDK 297
Gentiana_triflora              AHIFLYE-HPEAEGRYICSSHDTTIHDLAKMIRQNWPEYYIPTKLKGIDE 289
Eustoma_grandiflorum           AHIFLYE-HPEAEGRYICSSHDTTINDLAKMIRHRWPEYNVPTNLKGIDE 288
Gerbera_hybrid                 CHIYLYE-NPKAKGRYICSSHDATIHQLAKIIKDKWPEYYIPTKFPGIDE 286
Vitis_vinifera                 AHIYLFE-NPKAEGRYICSSHDCIILDLAKMLREKYPEYNIPTEFKGVDE 285
Rosa_hybrid_cultivar           SHIYLYE-HPKAEGRYICSSHDATIHEIAKLLKGKYPEYNVPTTFKGIEE 285
Citrus_sinensis                AHIFLFE-HPNAKGRYICSSHPATILELAKFLREKYPEFNVPTEFEDVDE 285
Curcuma_alismatifolia(850)     AHIFLFE-CPDAKGRYICSSHDVTIAGLAQILRQRYPEFDVPTEFG-EME 156
Anthurium_andraeanum           AHIFLFE-CPDAKGRYICSSHDVTIAGLAQILRQRYPEFDVPTEFG-EME 284
Lilium_speciosum               AHIFLFE-NPEASGRYICSSYDATIYDLARKIKDRYPQYAIPQKFEGIDD 285
Curcuma_alismatifolia(500)     RPIFSSSRILEASGRYICS------------------------------- 129
                                 ::  .   .*.**:***

Vaccinium_macrocarpon          ELPIMSFSSKKLLVIGFKFKYNLEDMFRGAIDTWQETKGLLPYS-NATPN 338
Solanum_tuberosum              DLPIVSFSSKKLMDMGFLFKYTLEDMYKGAIETCRQKQ-LLPFSTQSTAD 346
Gentiana_triflora              DIPVVSFSSNKLIDLGFQYKYTLEDMFRGAIDTCKEKR-MLPLSIGHQKE 338
Eustoma_grandiflorum           DIPLASFSFKKLTGMGFQYKYTLEDMFRGAIETCREKG-LLPHSN----- 332
Gerbera_hybrid                 ELPIVSFSSKKLIDTGFEFKYNLEDMFKGAIDTCREKG-LLPYSTIKNHI 335
Vitis_vinifera                 NLKSVCFSSKKLTDLGFEFKYSLEDMFTGAVDTCRAKG-LLPPSHEKP-- 332
Rosa_hybrid_cultivar           NLPKVHFSSKKLLETGFEFKYSLEDMFVGAVDACKEKG-LLPPPTERVEK 334
Citrus_sinensis                NMKNMLFSSKKLTDLGFKFKYSLDDMFTGAVDTCRAKG-LLPLLCENH-- 332
Curcuma_alismatifolia(850)     VFDIISYWSKKLTEIGFEFKYSLEDMFDGAIQSCREKG-LLPPATKVP-- 203
Anthurium_andraeanum           VFDIISYSSKKLTDLGFEFKYSLEDMFDGAIQSCREKG-LLPPATKEP-- 331
Lilium_speciosum               QIKPVHFSSKKLMDLGFKYQYTFEEMFDEGIRSCIEKK-LIPHQTQER-Y 333
Curcuma_alismatifolia(500)     ---------------------------------------------------

Vaccinium_macrocarpon          IGK-N---------------------------------------- 342
Solanum_tuberosum              NGR-DKEAIPIPTENYSSGKENAPVANCTGKLTNGEI-------- 382
Gentiana_triflora              STDPEVDEVVKEMELIQDSLD---------------------- 359
Eustoma_grandiflorum           ----ENHVIMQQTEHGKDT---------------------- 347
Gerbera_hybrid                 NGN-HVNGVHHYIKNNDDDHEKGLLCCSKEGQ---------- 366
Vitis_vinifera                 --VDGKT---------------------------------- 337
Rosa_hybrid_cultivar           QEVDESSVVRVKVTG-------------------------- 349
Citrus_sinensis                --VSEVSI--------------------------------- 338
Curcuma_alismatifolia(850)     -SYATEQLIATGQDNGHEQHGDPRTRCVTDPVY---------- 235
Anthurium_andraeanum           -SYATEQLIATGQDNGH------------------------ 347
Lilium_speciosum               YVHDELDLGCSKMTNDKLDLGGSKLNSMDEMVRGHNERVSVALQ 377
Curcuma_alismatifolia(500)     ----------------------------------------
```

ภาพ 16 (ต่อ)

ภาพ 17 แผนภาพ Cladogram ระหว่าง *DFR* gene ทั้งสอง fragment ของปทุมมา กับพืชสปีชีส์อื่น ๆ ที่รายงานใน Genbank

ตาราง 6 ระดับความเหมือนของกรดอะมิโน (5'3' frame 2) ของ Putative *DFR* gene ที่แยกจากปทุมมาขนาดประมาณ 500 คู่เบส ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับ *DFR* gene จากพืชสปีชีส์อื่น ๆ

Plant species	Common name	Length of deduce amino acid sequences	Amino acid identity (เปอร์เซ็นต์)	Genbank accession number
Lilium speciosum	Oriental Lily	377	65	AF169801
Gentiana triflora	Gentian	359	55	D85185
Eustoma grandiflorum	Lisianthus	347	51	AB078958
Vaccinium macrocarpon	Vaccinium	342	51	AF483835
Solanum tuberosum	Potato	382	50	AAQ54580

ตาราง 7 ระดับความเหมือนของกรดอะมิโนของ Putative *DFR* gene ที่แยกจากปทุมมาขนาดประมาณ 850 คู่เบส ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับ *DFR* gene จากพืชสปีชีส์อื่น ๆ

Plant species	Common name	Length of deduce amino acid sequences	Amino acid identity (เปอร์เซ็นต์)	Genbank accession number
Anthurium Andraeanum	Flamingo lily	374	96	AY232494
Citrus sinnensis	Sweet orange	338	63	AY519363
Vitis vinifera	Grape	337	61	ABO18685
Gerbera hybrid	Gerbera	366	58	CAA78930
Rosa hybrid	Rosa	349	57	BAA12723

จากการออกแบบไพรเมอร์ จะได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 และ 850 คู่เบส แต่จากการทำ DNA Sequencing สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ 395 และ716 คู่เบส (ภาพ 12 และ13) ตามลำดับ และเมื่อแปลลำดับนิวคลีโอไทด์มาเป็นกรดอะมิโน แล้ววิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย BLAST SEARCH พบว่า Putative *DFR* gene ที่แยกจากปทุมมา ขนาดประมาณ 500 คู่ พบว่าลำดับกรด อะมิโนจาก reading frame 2 ซึ่งอ่านจากปลาย 5' ไปด้าน 3' (ภาพที่ 14) มีความคล้ายกับ *DFR* gene จากพืชสปีชีส์อื่น ๆ เช่น *Lilium speciosum*, *Gentiana triflora*, *Eustoma grandiflorum*, *Vaccinium macrocarpon* และ *Solanum tuberosum* โดยมีระดับความเหมือนของกรดอะมิโนของ Putative *DFR* gene ที่แยกได้จากปทุมมาขนาดประมาณ 500 คู่เบส เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ *DFR* gene จากพืชสปีชีส์อื่น ๆ คือ 65, 55, 51, 51 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตาราง 6

ในขณะที่การทำ Blast Search ใน Putative *DFR* gene ขนาดประมาณ 850 คู่เบส ที่แยกได้จากปทุมมา พบว่าลำดับกรดอะมิโนจาก reading frame 3 ซึ่งอ่านจากปลาย 5' ไปด้าน 3' (ภาพ 15) มีความคล้ายกับ *DFR* gene จากพืชสปีชีส์อื่น ๆ ที่รายงานใน Genbank เช่น *Anthurium Andraeanum*, *Citrus sinnensis*, *Vitis vinifera*, *Gerbera hybrid* และ *Rosa hybrid* โดยมีระดับความเหมือนของกรดอะมิโนของ Putative *DFR* gene ที่แยกได้จากปทุมมาขนาดประมาณ 850 คู่เบส เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ *DFR* gene จากพืชสปีชีส์อื่น ๆ คือ 96, 63, 61, 58 และ 57เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตาราง 7

จากการทำ Blast search และ multiple sequencing alignment ของ Putative *DFR* gene ทั้งสอง fragment แสดงให้เห็นว่า Putative *DFR* gene ทั้งสอง fragment มีบริเวณลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันกับลำดับกรดอะมิโนของ *DFR* gene ในพืชสปีชีส์อื่น ๆ ที่มีการรายงานไว้ใน Genbank (ภาพ 16) และเมื่อทำ Cladogram เพื่อดูความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชที่ศึกษา พบว่า Putative *DFR* gene ที่แยกได้จากปทุมมาขนาดประมาณ 500 คู่เบส มีความเชื่อมโยงกับ *DFR* gene ในพืชสายพันธุ์ต่างๆ จากแผนภาพ Cladogram จะเห็นว่า *DFR* gene ขนาดประมาณ 500 คู่เบสของปทุมมาใกล้ชิดกับ *Lilium speciosum* มากที่สุด รองลงมาคือ *Gentiana triflora*, *Eustoma grandiflorum*, *Vaccinium macrocarpon* และ *Solanum tuberosum* ตามลำดับ ในขณะที่ Putative *DFR* gene ที่แยกได้จากปทุมมาขนาดประมาณ 850 คู่เบส มีความใกล้ชิดกับ *Anthurium Andraeanum* มากที่สุด รองลงมาคือ *Citrus sinnensis*, *Vitis vinifera*, *Gerbera hybrid* และ *Rosa hybrid* ตามลำดับ (ภาพที่ 17) ซึ่งสอดคล้องกับระดับความเหมือนของกรดอะมิโนของ Putative *DFR* gene เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ *DFR* gene จากพืชสปีชีส์อื่น ๆ ที่รายงานใน Genbank

2. **ผลการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อปทุมมา พิทูเนีย และยาสูบโดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ด้วยพลาสมิด 4 ชนิด**

จากการทดลองส่งถ่ายยีนเข้าสู่ ช่อดอกย่อย (coinflorescense) ของปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) ใบพิทูเนีย *(Petunia axillaris)* และยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) โดยวิธี *Agrobacterium*-mediated gene transfer ในการทดลองนี้ส่งถ่าย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ด้วยพลาสมิด 4 ชนิด คือ pSCV1.6, pBI121, pCAMBIA 1303 และ pCAMBIA 1304 ตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนโดยเทคนิค GUS histochemical assay ได้ผลการทดลอง ดังต่อไปนี้

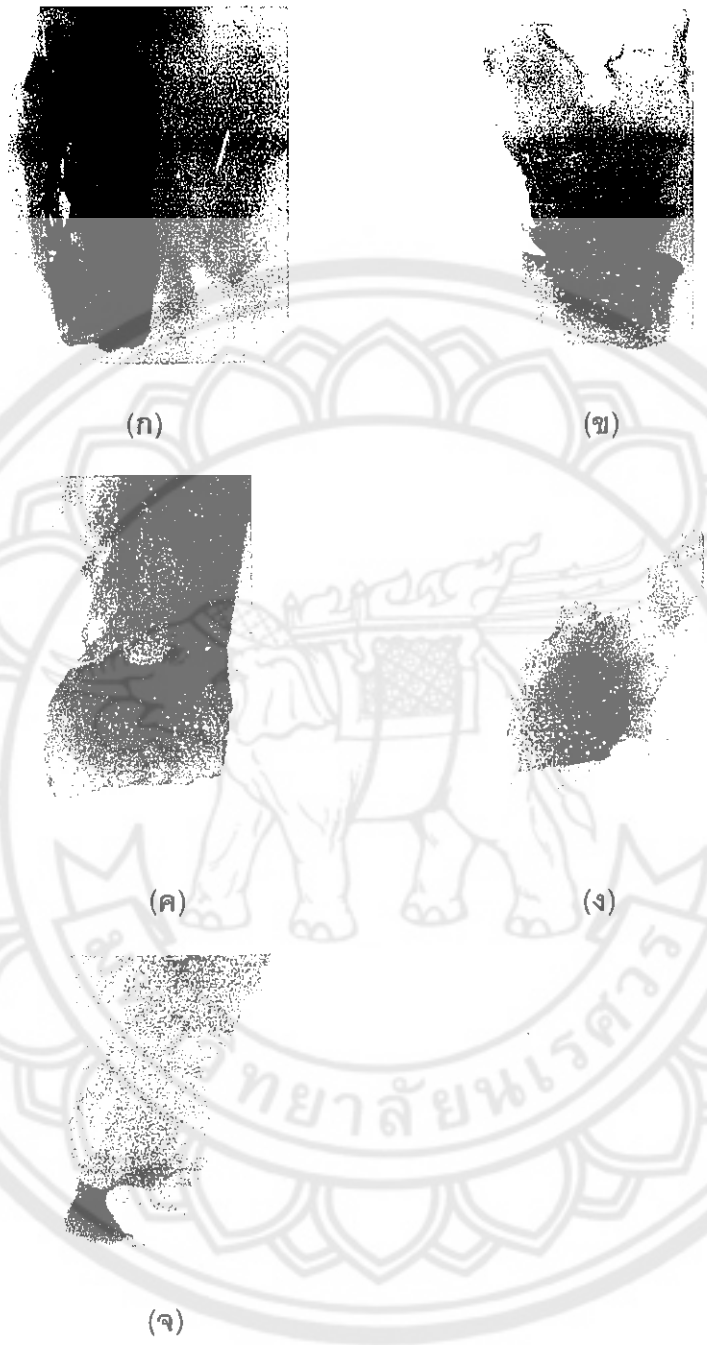
2.1 **ผลการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ปทุมมา โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์** AGLO

แสดงผลตามตาราง 8 หลังจากนำเนื้อเยื่อช่อดอกย่อย (coinflorescense) ของปทุมมาจำนวน 240 ชิ้น (explants) เพาะเลี้ยงร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO (co-cultivation) เป็นเวลา 2 วัน นำช่อดอกย่อยของปทุมมาไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS-CI ที่มี 400 mg/l Cefotaxim และ 50 mg/l Kanamycin เมื่อครบ 2 สัปดาห์นำเนื้อเยื่อปทุมมา มาตรวจสอบโดยเทคนิค GUS histochemical assay (transient expression) พบว่าเนื้อเยื่อปทุมมาที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pSCV1.6 จำนวน 20 ชิ้น ที่นำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงินจำนวน 13 ชิ้นคิดเป็น 65 เปอร์เซ็นต์ โดยพบจุดสีน้ำเงินเข้มที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง X-gluc และ GUS ทั่วทั้งเนื้อเยื่อ (ภาพ 18)

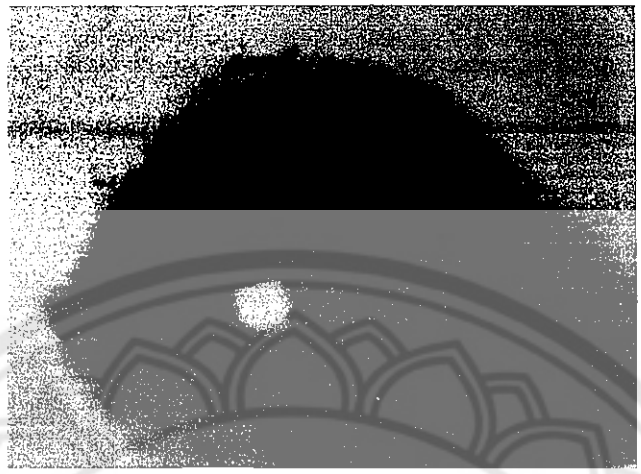
ส่วนเนื้อเยื่อปทุมมาที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pBI121 จำนวน 20 ชิ้น ที่นำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงินจำนวน 8 ชิ้นคิดเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ โดยพบจุดสีน้ำเงินกระจายทั้งเนื้อเยื่อที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง X-gluc และ GUS (ภาพ 18)

สำหรับเนื้อเยื่อปทุมมาที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pCAMBIA 1303 จำนวน 20 ชิ้น ที่นำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงินจำนวน 1 ชิ้นคิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยพบจุดสีน้ำเงินที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง X-gluc และ GUS แต่จางและไม่สม่ำเสมอทั้งเนื้อเยื่อ (ภาพ 18) และเนื้อเยื่อปทุมมาที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pCAMBIA 1304 จำนวน 20 ชิ้น ที่นำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงิน จำนวน 1 ชิ้น คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยจุดสีน้ำเงินที่พบมีสีจางมากและเกิดน้อยมากบนเนื้อเยื่อ (ภาพ 18)

หลังจาก co-cultivation 7 เดือน มีเพียงต้นปทุมมาที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pSCV1.6 เท่านั้นที่ทำการส่งถ่ายยีน และสามารถเจริญเป็นต้นได้บนอาหารคัดเลือก (selective media) เมื่อนำมาตรวจสอบอีกครั้งโดยเทคนิค GUS histochemical assay (GUS expression) พบว่าเนื้อเยื่อปทุมมาที่นำมาตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนนั้นเกิดจุดสีน้ำเงินจำนวน 2 ต้น คิดเป็น 0.83 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 19) และจากการนำต้นมาเตรียมดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ซึ่งจะตรวจสอบจากปฏิกิริยาสำหรับ *GUS* gene พบว่าต้นปทุมมาที่เจริญเป็นต้นได้ภายหลังการส่งถ่ายยีนและเจริญได้บนอาหารสูตร MS ที่มี 50 mg/l Kanamycin (selective medium) เกิดแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR สำหรับ *GUS* gene จำนวน 13 ต้น แสดงผลตามตาราง 9 โดยได้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลดังนี้คือ ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ของ *GUS* gene พบว่าปทุมมาที่ส่งถ่ายร่วมกับ *A.tumefaciens* AGLO / pSCV1.6 เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 510 bp ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ของ พลาสมิด pSCV1.6(ภาพ 20)



ภาพ 18 Transient expression ของช่อดอกย่อย (coinflorescence) ปทุมมา หลังการ co-cultivation ด้วย *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO อายุ 2 สัปดาห์ โดย พลาสมิด 4 ชนิดคือ (ก) pSCV 1.6, (ข) AGLO/pBI 121, (ค) AGLO/pCAMBIA 1303, (ง) AGLO/ pCAMBIA 1304, (จ) ช่อดอกย่อย (coinflorescence) ปทุมมาที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control)



(ก)

(ข)

ภาพ 19 GUS expression ของช่อดอกย่อย (coinflorescence) ปทุมมา อายุ 7 เดือน หลัง co-cultivation ด้วย *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLOด้วยพลาสมิด pSCV 1.6 (ก) AGLO/pSCV 1.6,
(ข) ช่อดอกย่อย (coinflorescence) ปทุมมาที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control)

ตาราง 8 ผลการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ช่อดอกย่อย (coinflorescence) ของปทุมมา โดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO ที่มีพลาสมิดชนิดต่าง ๆ (อายุ 2 สัปดาห์หลัง co-cultivation)

ชนิดพลาสมิด	จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ transient expression	จำนวน transient expression	transient expression (เปอร์เซ็นต์)
AGLO/pSCV 1.6	20	13	65
AGLO/pBI 121	20	8	40
AGLO/pCAMBIA 1303	20	1	5
AGLO/pCAMBIA 1304	20	1	5

ตาราง 9 ผลการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ช่อดอกย่อย (coinflorescence) ของปทุมมา โดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLOที่มีพลาสมิดชนิดต่าง ๆ (อายุ 7 เดือนหลัง co-cultivation)

ชนิดพลาสมิด	จำนวน explants ที่ใช้ในการส่งถ่าย	จำนวนต้นที่พบจากผลการทำ PCR	จำนวนต้นที่พบจากการทำ *GUS* gene	เปอร์เซ็นต์การส่งถ่ายยีน(GUS expression)
AGLO/pSCV 1.6	240	13	2	0.83
AGLO/pBI 121	240	0	0	0
AGLO/pCAMBIA 1303	240	0	0	0
AGLO/pCAMBIA 1304	240	0	0	0

ภาพ 20 การตรวจสอบการส่งถ่าย *GUS* gene โดยใช้ PCR ซึ่งใช้ primer ที่เจาะจงกับ *GUS* gene เมื่อ M : 100 bp Marker plus CMU

PC1 : พลาสมิด pCAMBIA 1303 PC2 : พลาสมิด pSCV1.6

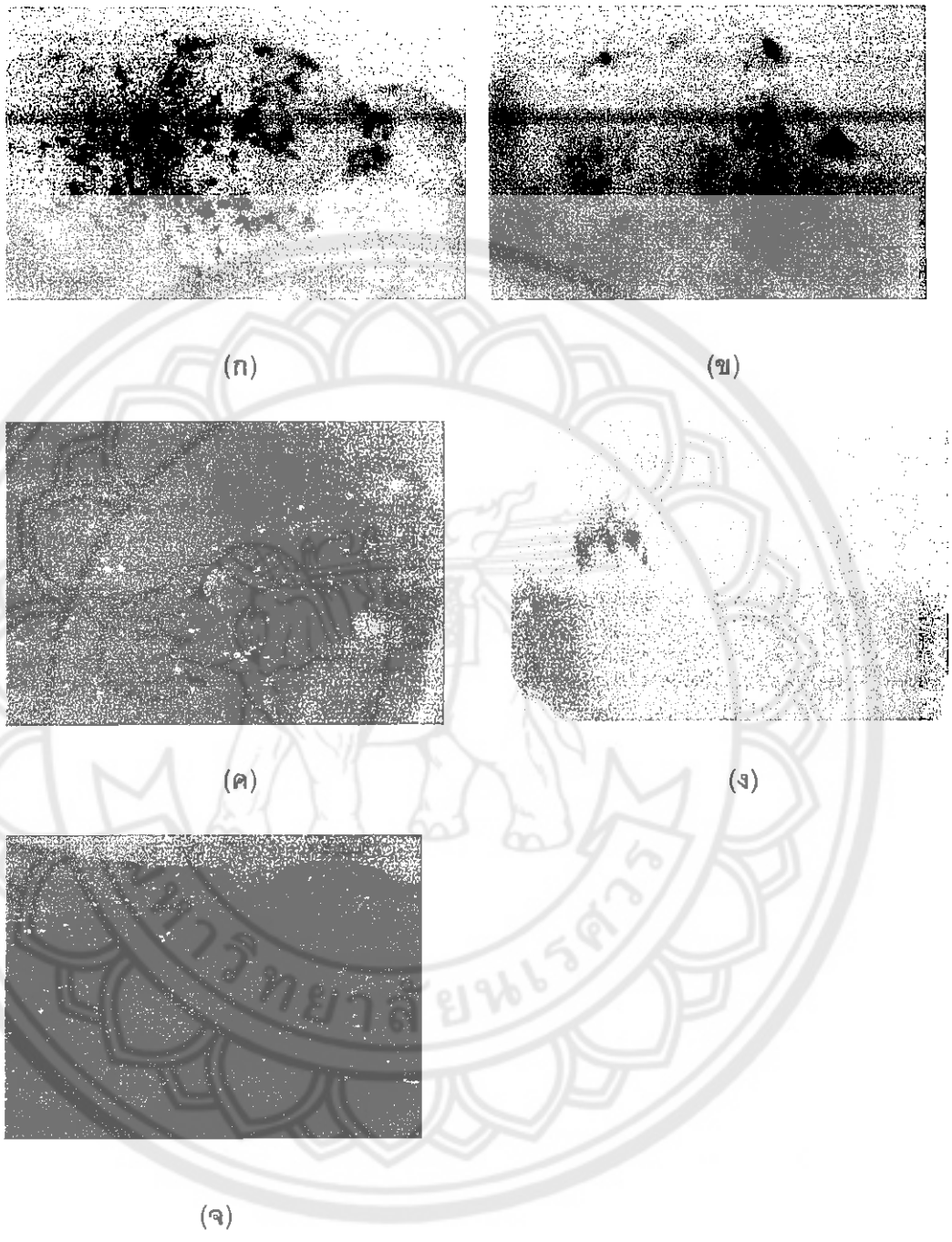
NC : ปทุมมาที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control) 1-20 : ปทุมมาส่งถ่ายยีน โดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO/pSCV1.6

2.2 ผลการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ใบพิทูเนีย โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO

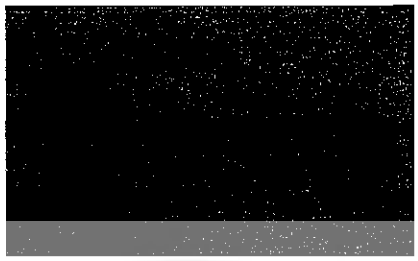
แสดงผลตามตาราง 10 หลังจากนำใบพิทูเนียจำนวน 60 ชิ้น (explants) เพาะเลี้ยงร่วมกับ *A.tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO (co-cultivation) เป็นเวลา 2 วัน นำใบพิทูเนียไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS-TB ที่มี 400 mg/l Cefotaxim และ 50 mg/l Kanamycin ย้ายเนื้อเยื่อทุก ๆ 2 สัปดาห์

เมื่อครบ 2 สัปดาห์ นำเนื้อเยื่อพิทูเนีย มาตรวจสอบโดยเทคนิค GUS histochemical assay (transient expression) พบว่า เนื้อเยื่อพิทูเนีย ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pSCV1.6 จำนวน 10 ชิ้น ที่นำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงินจำนวน 10 ชิ้น คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ โดยพบจุดสีน้ำเงินเข้มที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง X-gluc และ *GUS* gene กระจายทั่วทั้งใบ (ภาพที่ 21) ส่วนเนื้อเยื่อพิทูเนียที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pBI121 จำนวน 10 ชิ้น ที่นำมาตรวจสอบพบการเกิดจุด สีน้ำเงินจำนวน 10 ชิ้น คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ โดยพบจุดสีน้ำเงินที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง X-gluc และ *GUS* gene กระจายอยู่ทั่วไปที่ใบ (ภาพที่ 21) สำหรับเนื้อเยื่อพิทูเนีย ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pCAMBIA 1303 จำนวน 10 ชิ้น ที่นำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงินจำนวน 2 ชิ้น คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยพบจุดสีน้ำเงินเล็กน้อยที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง X-gluc และ *GUS* gene (ภาพที่ 21) และเนื้อเยื่อพิทูเนีย ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pCAMBIA 1304 จำนวน 10 ชิ้น ที่นำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงินจำนวน 2 ชิ้น คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยพบจุดสีน้ำเงินเล็กน้อยและจางมากที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง X-gluc และ GUS (ภาพที่ 21)

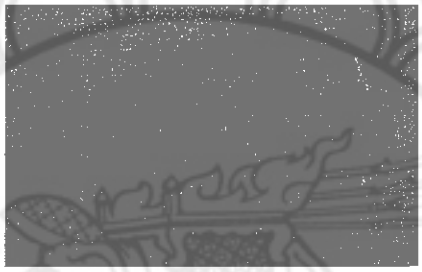
หลังจาก co-cultivation 3 เดือน แสดงผลตามตาราง 4 มีเพียงต้นพิทูเนีย ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pSCV1.6 และ pBI121 เท่านั้นที่สามารถเจริญเป็นต้นได้บนอาหารคัดเลือก (selective media) จึงนำมาตรวจสอบอีกครั้งโดยเทคนิค GUS histochemical assay (GUS expression) พบว่าต้นพิทูเนียที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *A. tumefaciens* AGLO / pSCV1.6 ที่สามารถเจริญเป็นต้นได้ บนอาหารคัดเลือก (selective media) เกิดจุดสีน้ำเงินจำนวน 14 ต้น คิดเป็น 23 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 22) และต้นพิทูเนียที่เพาะเลี้ยง pBI121ที่สามารถเจริญเป็นต้นได้บนอาหารคัดเลือก (selective media) เกิดจุดสีน้ำเงินจำนวน 8 ต้น คิดเป็น 13 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 22)



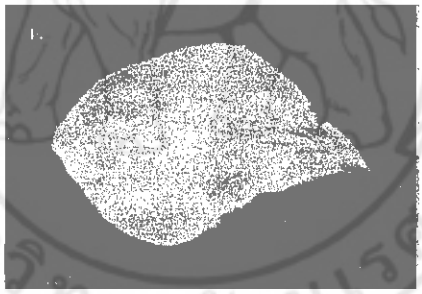
ภาพ 21 Transient expression ในใบพิทูเนีย หลังจากการส่งถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO อายุ 2 สัปดาห์หลัง co-cultivation ด้วยพลาสมิด 4 ชนิดคือ (ก) AGLO/pSCV 1.6, (ข) AGLO/pBI 121, (ค) AGLO/ pCAMBIA 1303, (ง) AGLO/ pCAMBIA 1304, (จ) ใบพิทูเนียที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control)



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพ 22 GUS expression ในใบพิทูเนีย อายุ 3 เดือน หลัง co-cultivation โดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO

(ก) AGLO/pSCV 1.6,

(ข) AGLO/pBI121,

(ค) พิทูเนียที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control)

ตาราง 10 ผลการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ใบของพิทูเนีย โดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO ด้วยพลาสมิด 4 ชนิด (อายุ 2 สัปดาห์หลัง co-cultivation)

ชนิดพลาสมิด	จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ transient expression	จำนวน transient expression	transient expression (เปอร์เซ็นต์)
AGLO/pSCV 1.6	10	10	100
AGLO/pBI 121	10	10	100
AGLO/ pCAMBIA 1303	10	2	20
AGLO/ pCAMBIA 1304	10	2	20

ตาราง 11 ผลการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ใบของพิทูเนีย โดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO ด้วยพลาสมิด 4 ชนิด (อายุ 3 เดือนหลัง co-cultivation)

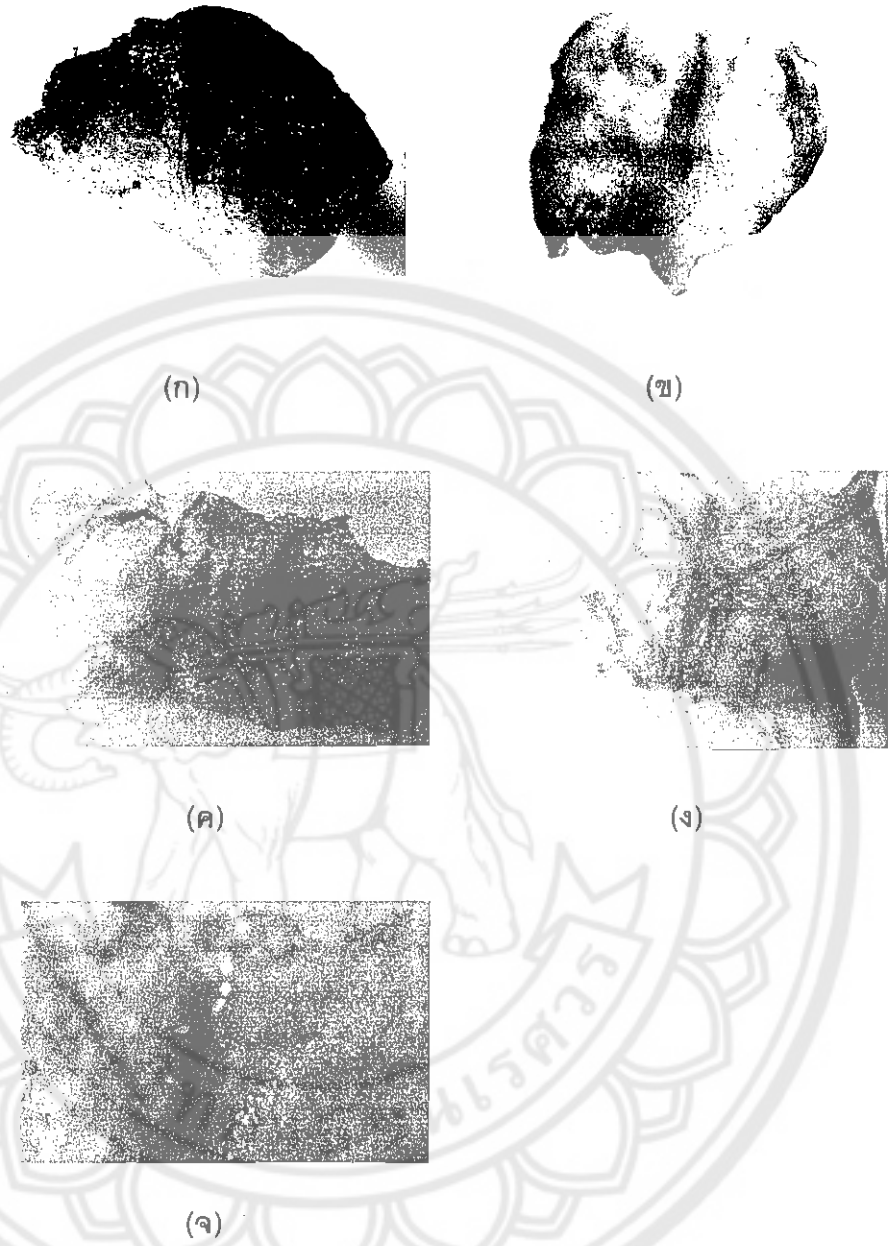
ชนิดพลาสมิด	จำนวน explants ที่ใช้ในการส่งถ่าย	จำนวนต้นที่พบจากการทำงานของ *GUS* gene	เปอร์เซ็นต์การส่งถ่ายยีน (GUS expression)
AGLO/pSCV 1.6	60	14	23
AGLO/pBI 121	60	8	13
AGLO/ pCAMBIA 1303	60	0	0
AGLO/ pCAMBIA 1304	60	0	0

2.3 **ผลการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ใบยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO**

แสดงผลตามตาราง 12 หลังจากนำใบยาสูบจำนวน 60 ชิ้น (explants) **เพาะเลี้ยง** ร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO (co-cultivation) เป็นเวลา 2 วัน นำใบยาสูบไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS-TB ที่มี 400 mg/l Cefotaxim และ 50 mg/l Kanamycin

เมื่อครบ 2 สัปดาห์นำเนื้อเยื่อยาสูบมาตรวจสอบโดยเทคนิค GUS histochemical assay (transient expression) พบว่า เนื้อเยื่อยาสูบที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pSCV1.6 จำนวน 10 ชิ้น ที่นำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงินจำนวน 10 ชิ้น คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ โดยพบจุดสีน้ำเงินเข้มที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง X-gluc และGUS ทั่วทั้งใบ (ภาพ 23) ส่วนเนื้อเยื่อยาสูบที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pBI121 จำนวน 10 ชิ้น ที่นำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงินจำนวน 10 ชิ้น คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ โดยพบจุดสีน้ำเงินที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง X-gluc และ GUS ทั่วทั้งใบ (ภาพ 23) สำหรับเนื้อเยื่อยาสูบที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pCAMBIA 1303 จำนวน 10 ชิ้น ที่นำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงินจำนวน 2 ชิ้นคิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยพบจุดสีน้ำเงินที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง X-gluc และ GUS แต่สีจางและไม่ทั่วทั้งใบ และเนื้อเยื่อยาสูบที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pCAMBIA 1304 จำนวน 10 ชิ้น ที่สุ่มนำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงินจำนวน 2 ชิ้น คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยพบจุดสีน้ำเงินที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง X-gluc และ GUS จางและเป็นจุด ๆ ไม่ทั่วทั้งใบ

หลังจาก co-cultivation 3 เดือน แสดงผลตามตาราง 13 นำต้นยาสูบ ที่ทำการส่งถ่ายยีน และสามารถเจริญเป็นต้นได้บนอาหารคัดเลือก (selective media) มาตรวจสอบอีกครั้งโดยเทคนิค GUS histochemical assay (GUS expression) พบว่าต้นยาสูบที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pSCV1.6 ที่สามารถเจริญเป็นต้นได้บนอาหารคัดเลือก (selective media) และเกิดจุดสีน้ำเงินจำนวน 13 ต้น คิดเป็น 21 เปอร์เซ็นต์ และเนื้อเยื่อยาสูบที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ pBI121 ที่สามารถเจริญเป็นต้นได้บนอาหารคัดเลือก (selective media) นำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงินจำนวน 3 ต้น คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 24)



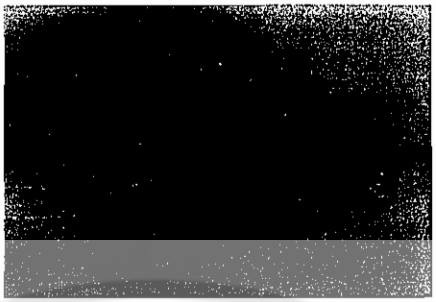
ภาพ 23 Transient expression ในใบยาสูบ หลังการส่งถ่ายโดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO อายุ 2 สัปดาห์หลัง co-cultivation ด้วยพลาสมิด 4 ชนิดคือ (ก) pSCV 1.6, (ข) AGLO/pBI121, (ค) AGLO/pCAMBIA 1303, (ง) AGLO/ pCAMBIA 1304, (จ) ใบยาสูบที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control)

ตาราง 12 ผลการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ใบ ของยาสูบ โดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO ด้วยพลาสมิด 4 ชนิด (อายุ 2 สัปดาห์หลัง co-cultivation)

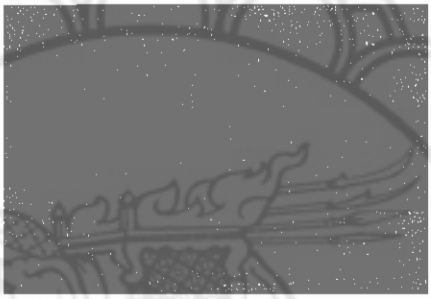
ชนิดพลาสมิด	จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ transient expression	จำนวน transient expression	transient expression (เปอร์เซ็นต์)
AGLO/pSCV 1.6	10	10	100
AGLO/pBI 121	10	10	100
AGLO/ pCAMBIA 1303	10	2	20
AGLO/ pCAMBIA 1304	10	2	20

ตาราง 13 ผลการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ใบ ของยาสูบโดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO ด้วยพลาสมิด 4 ชนิด (อายุ 3 เดือนหลัง co-cultivation)

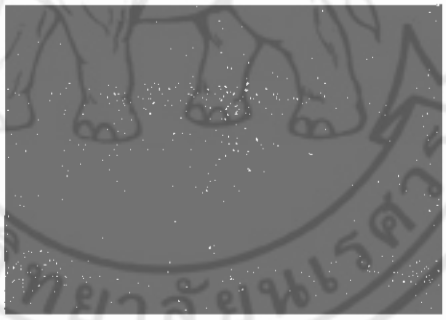
ชนิดพลาสมิด	จำนวนexplants ที่ใช้ในการส่งถ่าย	จำนวนต้นที่พบจากการทำงานของ *GUS* gene	เปอร์เซ็นต์การส่งถ่ายยีน (GUS expression)
AGLO/pSCV 1.6	60	13	21
AGLO/pBI 121	60	3	5
AGLO/pCAMBIA 1303	60	0	0
AGLO/pCAMBIA 1304	60	0	0



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพ 24 GUS expression ในใบยาสูบ อายุ 3 เดือน หลัง co-cultivation โดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO

(ก) AGLO/pSCV 1.6,

(ข) AGLO/pBI121,

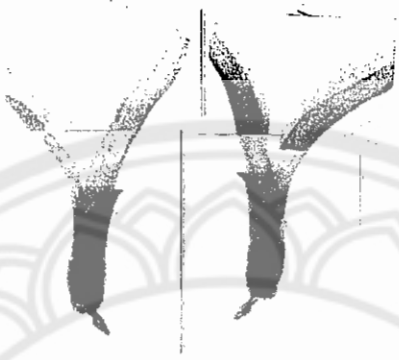
(ค) ใบยาสูบที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control)

3. **ผลการส่งถ่ายด้วยวิธี** Antisense **ของยีน** *DFR* **เข้าเนื้อเยื่อปทุมมา พิทูเนีย และยาสูบโดย** *A. tumefaciens* **สายพันธุ์** AGLO

จากการทดลองส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อ retarded shoot ของปทุมมาใบพิทูเนีย และยาสูบโดย *Agrobacterium*-mediated gene transfer ในการทดลองนี้ส่งถ่าย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ด้วยพลาสมิด pBI121 ที่มีชิ้นส่วนยีนที่โคลนได้จากดอกปทุมมา ตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนโดยเทคนิค GUS histochemical assay และตรวจสอบผลการส่งถ่ายโดยเทคนิค Polymerase chain Reaction(PCR) สำหรับ *GUS* gene และ 35S promptor ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

ผลการส่งถ่ายยีน *DFR* เข้าสู่ปทุมมา โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO หลังจากนำเนื้อเยื่อ retarded shoot ของปทุมมาจำนวน 100 ชิ้น (explants) เพาะเลี้ยงร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO เป็นเวลา 2 วัน นำเนื้อเยื่อ retarded shoot ของปทุมมาไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS-CM ที่มี 400 mg/l Cefotaxim และ 50 mg/l Kanamycin ย้ายเนื้อเยื่อทุก ๆ 2 สัปดาห์

หลังจาก co-cultivation 5 เดือนแสดงผลตามตาราง 14 นำต้นปทุมมาที่ทำการส่งถ่ายยีน และสามารถเจริญเป็นต้นได้บนอาหารคัดเลือก (selective media) มาตรวจสอบโดยเทคนิค GUS histochemical assay (GUS expression) พบว่าเนื้อเยื่อปทุมมา ที่นำมาตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนนั้นเกิดจุดสีน้ำเงิน จำนวน 5 ต้น คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ และมีสีน้ำเงินชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับปทุมมาที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (ภาพ 25) และจากการนำใบมาเตรียมดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ซึ่งจะตรวจสอบจากปฏิกิริยาสำหรับ *GUS* gene พบว่าต้นปทุมมาทุกต้นที่เจริญ เป็นต้นได้ภายหลังการส่งถ่ายยีนและเจริญได้บนอาหารสูตร MS-PB ที่มี 50 mg/l Kanamycin (selective medium) เกิดแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR สำหรับ *GUS* gene ทุกต้น โดยได้แถบ ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลดังนี้ ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ของ *GUS* gene และ 35S promotor พบว่าปทุมมาที่ส่งถ่ายโดย *A.tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO / pBI121/ *DFR* เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 510 bp ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ของ พลาสมิด pBI121 (ภาพ 26)



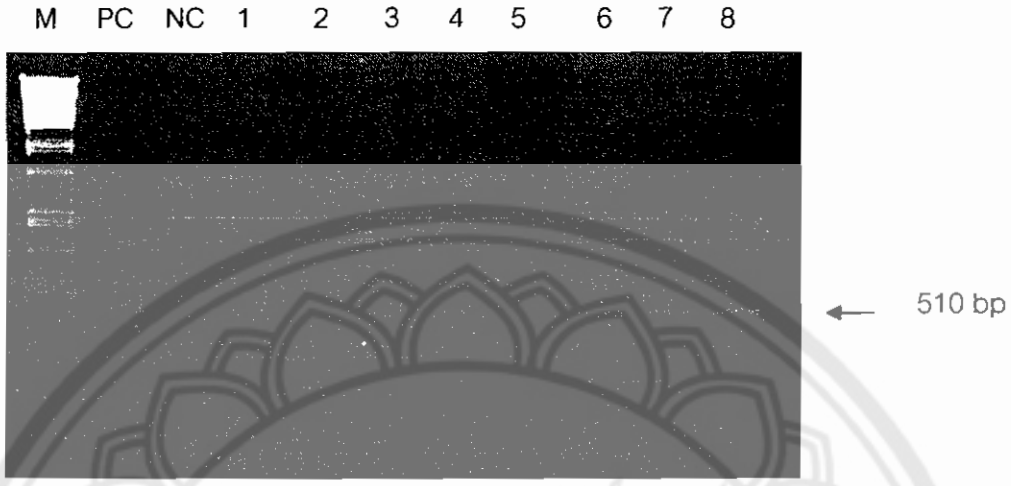
(ก)

(ข)

ภาพ 25 GUS expression ของปทุมมา อายุ 5 เดือน หลัง co-cultivation โดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO

(ก) AGLO/ pBI121/*DFR*

(ข) ปทุมมาที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control)



(ก)

(ข)

ภาพ 26 ผลของปฏิกิริยา PCR สำหรับ *GUS* gene (ก) and 35S promoter primer (ข)

M : Lamda / P*stI* (marker)

PC1 : พลาสมิด pBI121

NC : ปทุมมาที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control)

1-8 : ปทุมมาส่งถ่ายยีน โดยใช้ *A tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO/pBI121/*DFR*

ตาราง 14 แสดงผลการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ retarded shoot ของปทุมมาโดยใช้ *A. tumefaciens* AGLO/pBI121 / *DFR*

ชนิดของเนื้อเยื่อ	จำนวน explants ที่ใช้ในการส่งถ่าย	จำนวนต้นที่พบจากการทำ PCR	จำนวนต้นที่พบจากการทำงานของ *GUS* gene	เปอร์เซ็นต์การส่งถ่ายยีน (GUS expression)
ปทุมมา/ Retarded shoot	100	8	5	5
พิทูเนีย/ ใบ	60	20	15	25
ยาสูบ/ ใบ	60	20	14	23

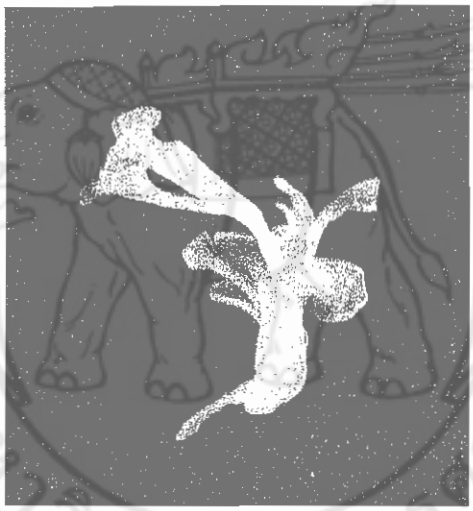
ผลการส่งถ่ายยีน *DFR* เข้าสู่พิทูเนีย โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO

หลังจากนำใบพิทูเนียจำนวน 60 ชิ้น (explants) เพาะเลี้ยงร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO เป็นเวลา 2 วัน นำใบพิทูเนียไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS-TB ที่มี 400 mg/l Cefotaxim และ 50 mg/l Kanamycin ย้ายเนื้อเยื่อทุก ๆ 2 สัปดาห์ หลังจากco-cultivation 3 เดือน นำต้นพิทูเนียที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกมาตรวจสอบโดยเทคนิค GUS histochemical assay (GUS expression) พบว่าพิทูเนียที่นำมาตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนและเกิดจุดสีน้ำเงินมีจำนวน 15 ต้น คิดเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลตามตาราง 14 โดยพบว่าปริมาณจุดสีน้ำเงินที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง X-gluc และ GUS มีสีเข้มสม่ำเสมอกระจายทั่วทั้งใบ โดยเฉพาะบริเวณเส้นกลางใบ เกิดจุดสีน้ำเงินเข้มชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับใบพิทูเนียที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน และเมื่อนำพิทูเนียที่เกิดจากใบซึ่งพัฒนาเป็นกลุ่มต้นเล็ก ๆ ทั้งหมดมาตรวจสอบพบว่าเกิดจุดสีน้ำเงินเข้มทั่วทั้งต้น (ภาพ 27)

นำต้นพิทูเนียที่ทำการส่งถ่ายยีน และสามารถเจริญเป็นต้นได้บนอาหารคัดเลือก (selective media) นำมาเตรียมดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ซึ่งจะตรวจสอบจากปฏิกิริยาสำหรับ *GUS* gene และ 35S promoter พบว่าต้นพิทูเนียทุกต้นที่เจริญเป็นต้นได้

ภายหลังการส่งถ่ายยีนและเจริญได้บนอาหารสูตร MS-PB ที่มี 50 mg/l Kanamycin (selective medium) เกิดแถบ ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR สำหรับ *GUS* gene โดยได้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลดังนี้ ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ของ *GUS* gene พบว่าพิทูเนียที่ส่งถ่ายโดย *A.tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO / pBI121/ *DFR* เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 510 bp ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ของพลาสมิด pBI121 (ภาพ 28) และเพื่อยืนยันผลการทดลองจึงนำพิทูเนีย ที่เกิดแถบดีเอ็นเอ จากการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับ *GUS* gene จำนวน 10 ต้น มาทำปฏิกิริยา PCR สำหรับ 35S promoter พบว่าเกิดเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 510 bp ทุกต้น (ภาพ 29)

(ก)



(ข)

ภาพ 27 GUS expression ของพิทูเนีย อายุ 3 เดือน หลัง co-cultivation โดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO

(ก) AGLO/ pBI121/*DFR*

(ข) พิทูเนียที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control)

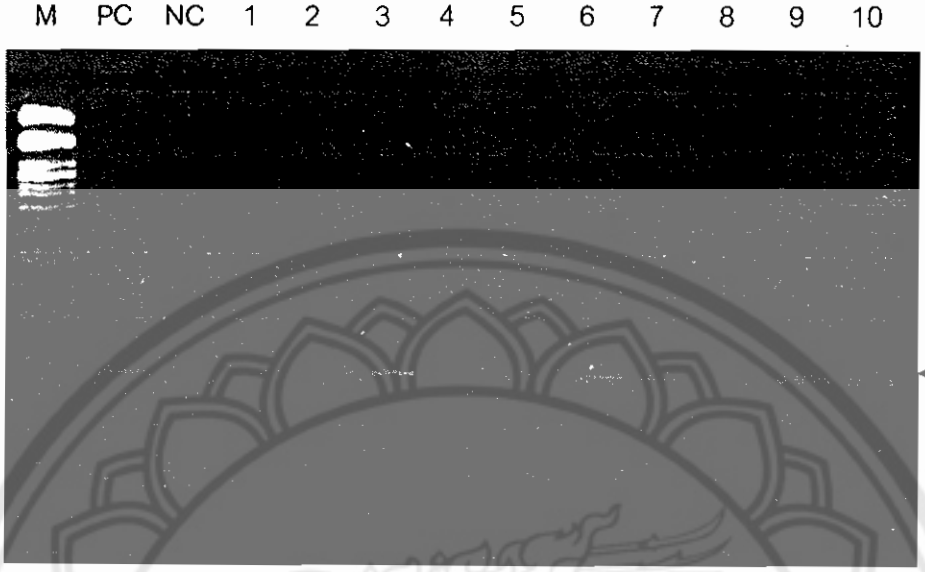
ภาพ 28 การตรวจสอบผลของปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้ primer ที่เจาะจงกับ *GUS* gene

M : Lamda / *Pst*I (marker)

PC1 : พลาสมิด pBI121

NC : พิทูเนียที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control)

1-20 : พิทูเนียส่งถ่ายยีน โดยใช้ *A tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO/pBI121/*DFR*



ภาพ 29 การตรวจสอบผลของปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้ primer ที่เจาะจงกับ 35S promoter

M : Lamda / *PstI* (marker)

PC1 : พลาสมิด pBI121

NC : พิทูเนียที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control)

1-10 : พิทูเนียส่งถ่ายยีน โดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO/pBI121/*DFR*

3.3 **ผลการส่งถ่ายยีน *DFR* เข้าสู่ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*)**

โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO หลังจากนำใบยาสูบจำนวน 60 ชิ้น (explants) เพาะเลี้ยงร่วมกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO เป็นเวลา 2 วัน นำใบยาสูบไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS-TB ที่มี 400 mg/l Cefotaxim และ 50 mg/l Kanamycin ย้ายเนื้อเยื่อทุก ๆ 2 สัปดาห์หลังจาก co-cultivation 3 เดือน นำต้นยาสูบที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือกมาตรวจสอบโดยเทคนิค GUS histochemical assay (transient expression) พบว่ายาสูบที่นำมาตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนและเกิดจุดสีน้ำเงินมีจำนวน 14 ต้น คิดเป็น 23 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 14) โดยพบว่าปริมาณจุดสีน้ำเงินที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง X-gluc และ GUS มีสีน้ำเงินกระจายทั่วทั้งใบ เมื่อเปรียบเทียบกับใบยาสูบที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน และเมื่อนำยาสูบที่พัฒนาเป็นต้นมาตรวจสอบพบว่าเกิดจุดสีน้ำเงินเข้มทั่วทั้งต้น (ภาพที่30)

นำต้นยาสูบที่ทำการส่งถ่ายยีน และสามารถเจริญเป็นต้นได้บนอาหารคัดเลือก (selective media) นำมาเตรียมดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ซึ่งจะตรวจสอบจากปฏิกิริยาสำหรับ *GUS* gene และ 35S promoter พบว่าต้นยาสูบทุกต้นที่เจริญเป็นต้นได้ภายหลัง

การส่งถ่ายยีนและเจริญได้บนอาหารสูตร MS-TB ที่มี 50 mg/l Kanamycin (selective medium) เกิดแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR สำหรับ *GUS* gene และ 35S promoter และได้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลดังนี้ ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ของ *GUS* gene พบว่ายาสูบที่ส่งถ่ายโดย *A.tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO / pBI121/ *DFR* เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 510 bp ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ของพลาสมิด pBI121 (ภาพ 31)

จากนั้นนำยาสูบ จำนวน 10 ต้น ที่เกิดแถบดีเอ็นเอ จากการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับ *GUS* gene มาทำปฏิกิริยา PCR สำหรับ 35S promtor เพื่อยืนยันผลการทดลอง พบว่าเกิดเกิดแถบ ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 510 bp ทุกต้น (ภาพ 32)

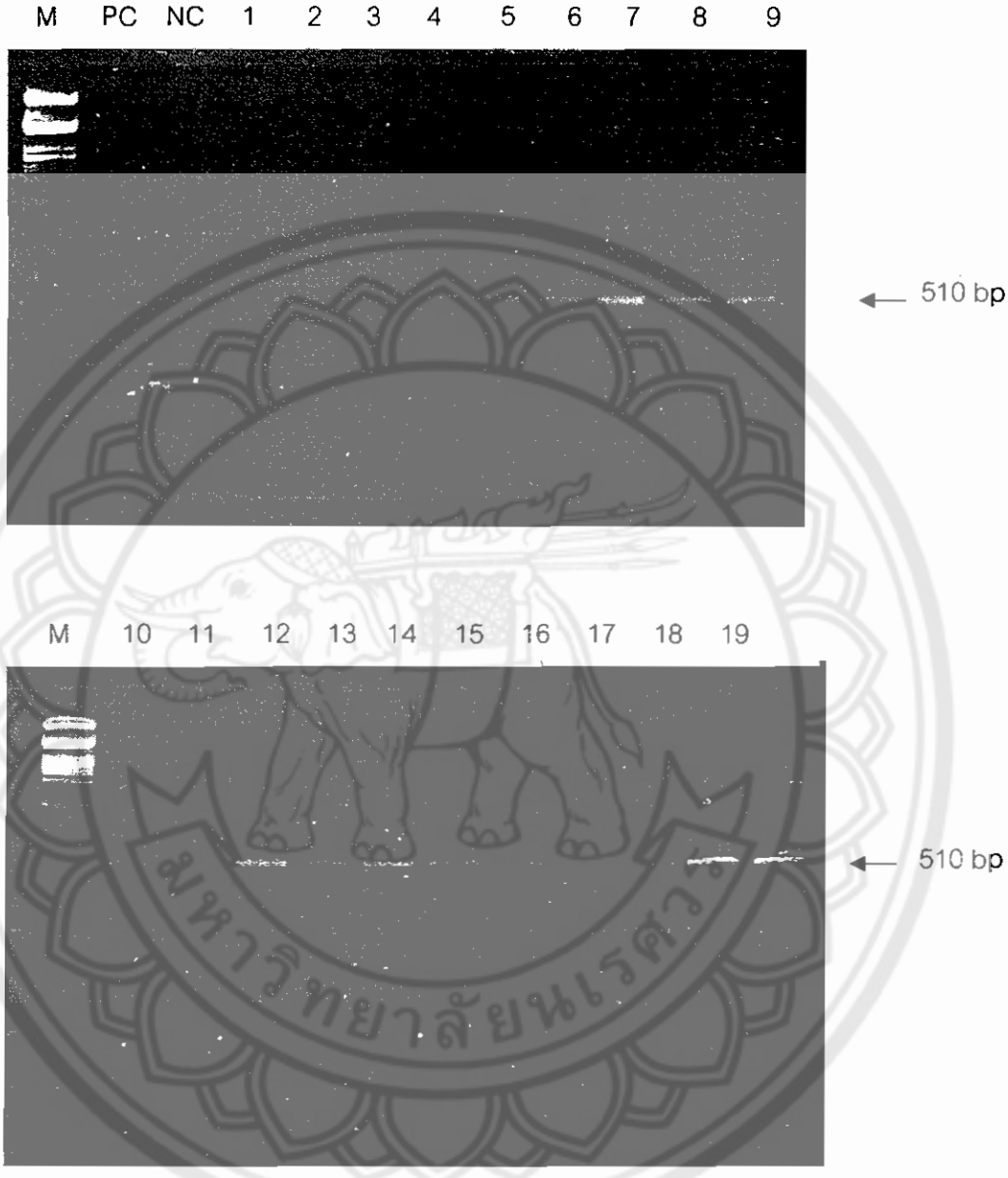
(ก)

(ข)

ภาพ 30 GUS expression ของยาสูบอายุ 3 เดือน หลัง co-cultivation โดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO

(ก) AGLO/ pBI121/*DFR*

(ข) ยาสูบที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control)



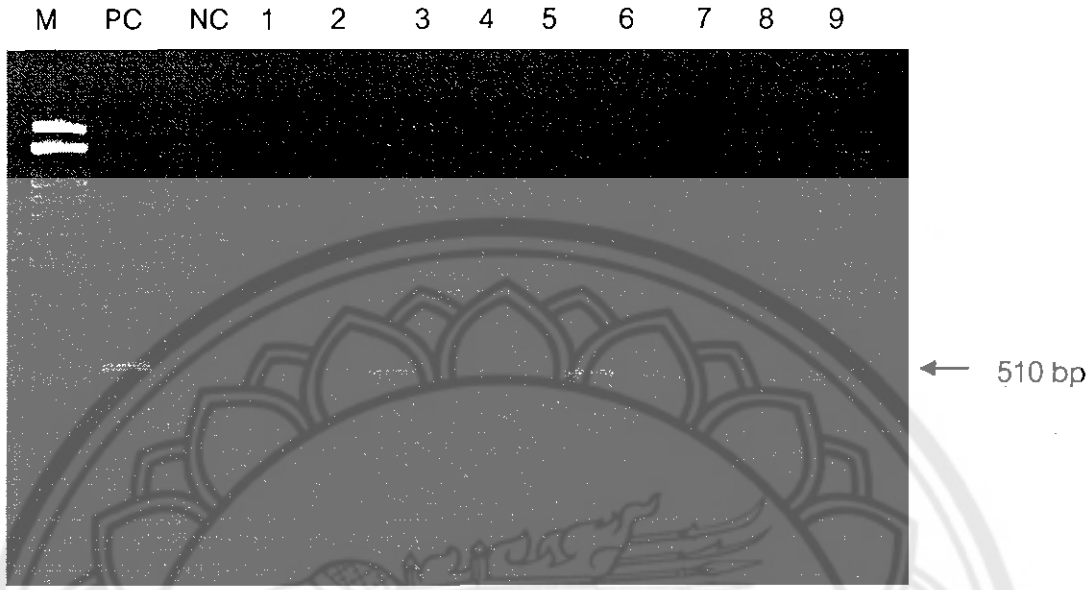
ภาพ 31 การตรวจสอบผลของปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้ primer ที่เจาะจงกับ *GUS* gene

M : Lamda / *PstI* (marker)

PC1 : พลาสมิด pBI121

NC : ยาสูบที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control)

1-20 : ยาสูบส่งถ่ายยีน โดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO/pBI121/*DFR*



ภาพ 32 การตรวจสอบผลของปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้ primerสำหรับ 35S promoter

M : Lamda / *PstI* (marker)

PC1 : พลาสมิด pBI121

NC : ยาสูบที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control)

1-10 : ยาสูบส่งถ่ายยีน โดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO/pBI121/*DFR*