สารบัญ

บทที่ **หน้า**

1 **บทนำ** 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

2 **เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** 4

ปทุมมา (*C. alismatifolia* Gagnep) 4

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 4

การเกิดสีในพืช 7

โครงสร้างพื้นฐานของ Flavonoids และ รงควัตถุแอนโทไซยานิน 8

ปัจจัยที่มีผลเกี่ยวข้องกับการกำหนดสี 9

ชีวสังเคราะห์ Flavonoids และ รงควัตถุแอนโทไซยานิน 10

Dihydroflavonal 4-reductase gene (*DFR*) 12

การส่งถ่ายยีนเข้าสู่สิ่งมีชีวิต 15

การศึกษาการส่งถ่ายยีนด้วยพลาสมิดต่างชนิด 22

การศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อต่าง ๆ ของพืช 22

การศึกษาการส่งถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับรงควัตถุแอนโทไซยานิน 23

3 **วิธีดำเนินการวิจัย** 25

พืชที่ใช้ในการทดลอง 25

แบคทีเรียและพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง 25

การค้นหายีน Dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) **จากกลีบดอก** (petal) **ของปทุมมา** 25

การเตรียมยีนเพื่อการส่งถ่ายเข้าสู่เนื้อเยื่อปทุมมา พิทูเนีย และยาสูบ 33

วิธีการการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefasiens* **เข้าสู่พืช** 38

การตรวจสอบพืชตัวอย่างที่ทำการส่งถ่ายยีน 40

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

4 **ผลการทดลอง** 45

การค้นหายีน Dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) จากกลีบดอก (petal) ของปทุมมา 45

ผลการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อปทุมมา พิทูเนีย และยาสูบ โดย *A. tumefaciens* strain AGLO ด้วยพลาสมิด 4 ชนิด 58

ผลการส่งถ่ายด้วยวิธี Antisense technique ของยีน *DFR* เข้าเนื้อเยื่อปทุมมา พิทูเนียและยาสูบ โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO 72

5 **สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ** 83

บรรณานุกรม 93

ภาคผนวก 104

ภาคผนวก ก สารละลายและบัฟเฟอร์ 105

ภาคผนวก ข สูตรอาหาร 109

ภาคผนวก ค แสดงลักษณะดอกของปทุมมา ลิลลี่และหน้าวัว 113

ภาคผนวก ง แผนที่พลาสมิด 116

ประวัติผู้วิจัย 120

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1 แสดงรายชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่ใช้ในการแยก *DFR* gene จากดอกปทุมมาด้วยเทคนิค RT-RCR 27

2 แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR เพื่อแยกดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส 30

3 แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR เพื่อแยกดีเอ็นเอขนาดประมาณ 850 คู่เบส 30

4 แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค Silver Sequencing 34

5 แสดงจำนวนโคโลนีสีขาวและน้ำเงินจากการคัดเลือกโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม โดยใช้ Ampicillin/X-gal plate 48

6 แสดงระดับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอท์และกรดอะมิโน (5'3' frame 2) ของ Putative *DFR* gene ที่แยกจากปทุมมาขนาดประมาณ 500 คู่เบส ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับ *DFR* gene จากพืชสปีชีส์อื่น ๆ 56

7 แสดงระดับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอท์และกรดอะมิโนของ Putative *DFR* gene ที่แยกจากปทุมมาขนาดประมาณ 850 คู่เบส ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ *DFR* gene จากพืชสปีชีส์อื่น ๆ 57

8 แสดงผลการส่งถ่ายยีนในช่อดอกย่อย (coinflorescences) ของพืชปทุมมา โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ด้วยพลาสมิด 4 ชนิด พืชอายุ 2 สัปดาห์ 62

9 แสดงผลการส่งถ่ายยีนในช่อดอกย่อย (coinflorescences) ของพืชปทุมมา โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ด้วยพลาสมิด 4 ชนิด พืชอายุ 7 เดือน 62

10 แสดงผลการส่งถ่ายยีนในใบของพิทูเนียโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ด้วยพลาสมิด 4 ชนิด พืชอายุ 2 สัปดาห์ 67

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง **หน้า**

11 แสดงผลการส่งถ่ายยีนในใบของพิทูเนียโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ด้วยพลาสมิด 4 ชนิด พืชอายุ 3 เดือน 67

12 แสดงผลการส่งถ่ายยีนในใบของยาสูบโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ด้วยพลาสมิด 4 ชนิด พืชอายุ 2 สัปดาห์ 70

13 แสดงผลการส่งถ่ายยีนในใบของยาสูบ โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ด้วยพลาสมิด 4 ชนิด พืชอายุ 3 เดือน 70

14 แสดงผลการส่งถ่ายยีน โดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO / pBI121/ *DFR* ใน Retarded shoot ของปทุมมา หลังจากพืชพัฒนาเป็นต้น 75

15 แสดงสูตรอาหารของ Murashige and Skoog (1962) 110

16 แสดงชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้น ของธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962) 110

17 แสดงชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS (1962) 111

18 แสดงชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของวิตามินสูตร MS (1962) 111

19 แสดงชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของเหล็กสูตร MS (1962) 112

20 แสดงปริมาตรของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดในอาหารสูตร MS (1962) 113

บัญชีภาพ

ภาพ **หน้า**

1 แสดง flavan nucleus เป็นหน่วยพื้นฐานของรงควัตถุแอนโทไซยานิน 8

2 แสดงสูตรโครงสร้างของรงควัตถุแอนโทไซยานินทั้ง 6 กลุ่ม 9

3 แสดงกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน 14

4 แสดงการย้ายยีนสังเคราะห์เอนไซม์ DFR เข้าในพลาสมิดเวกเตอร์ 35

5 แสดงผลการตรวจสอบการสกัด Total RNA โดย TRIZOL Reagent 45

6 แสดงการแยก *DFR* gene ด้วยเทคนิค RT-PCR โดย Annealing temperature 50 ^{0}C ใช้ไพรเมอร์ DFRF2 และ DFRF5 46

7 แสดงการแยก *DFR* gene ด้วยเทคนิค RT-PCR โดย Annealing temperature 53 ^{0}C ใช้ไพรเมอร์ DFRF2 และ DFRF5 47

8 แสดงโคโลนีหลังจากการโคลน *DFR* gene 48

9 แสดงการตรวจสอบโคลน putative *DFR* gene ขนาดประมาณ 500 คู่เบส โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI 49

10 แสดงการตรวจสอบโคลน putative *DFR* gene ขนาดประมาณ 850 คู่เบส โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI 50

11 แสดงการหาลำดับเบสโดยทำ DNA sequencing gel electrophoresis band โดยใช้วิธี silver sequencing 51

12 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative *DFR* gene ขนาดประมาณ 500 คู่เบส ที่แยกได้ จากปทุมมา 52

13 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative *DFR* gene ขนาดประมาณ 850 คู่เบส ที่แยกได้จากปทุมมา 52

14 แสดงลำดับกรดนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของ Reading frame ที่ 2 ซึ่งอ่านจากปลาย 5' ไปด้าน 3' ของ *DFR* gene ขนาดประมาณ 500 คู่เบส 52

15 แสดงลำดับกรดนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของ Reading frame ที่ 3 ซึ่งอ่านจากปลาย 5' ไปด้าน 3' ของ *DFR* gene ขนาดประมาณ 850 คู่เบส 53

บัญชีภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

16 แสดง multiple sequence alignment ของ Putative DFR gene ขนาดประมาณ 500 และ850 คู่เบส ที่แยกจากปทุมมา มีบริเวณลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันกับลำดับกรดอะมิโนของDFR gene ในพืชสปีชีส์อื่น ๆ ที่มีการรายงานไว้ใน Genbank 54

17 แผนภาพ Cladogram ระหว่าง DFR gene ทั้งสอง fragment ของปทุมมา กับพืชสปีชีส์อื่น ๆ ที่รายงานใน Genbank 56

18 แสดง Transient expression ของช่อดอกย่อย (coinflorescences)ปทุมมาอายุ 2 สัปดาห์หลัง co-cultivation ด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO/pSCV 1.6, AGLO/pBI 121, AGLO/pCAMBIA 1303 และAGLO/pCAMBIA1304..... 60

19 แสดง GUS expression ของช่อดอกย่อย (coinflorescences) ปทุมมาอายุ 7 เดือน หลัง co-cultivation ด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO/pSCV 1.6..... 61

20 การตรวจสอบการส่งถ่าย GUS gene โดยใช้ PCR ซึ่งใช้ primer ที่เจาะจงกับ GUS gene เมื่อ M : 100 bp Marker plus CMU 63

21 แสดง Transient expression ในใบพิทูเนีย หลังจากการส่งถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO อายุ 2 สัปดาห์ หลัง co-cultivation ด้วยพลาสมิด 4 ชนิดคือ AGLO/pSCV 1.6, AGLO/pBI 121, AGLO/pCAMBIA 1303,AGLO/pCAMBIA1304 และ ใบพิทูเนียที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control)..... 65

22 แสดง GUS expression ของใบพิทูเนีย อายุ 3 เดือน หลัง co-cultivation โดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO 66

23 แสดง Transient expression ของ ใบยาสูบอายุ 2 สัปดาห์ หลัง co-cultivation ด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO/pSCV 1.6, AGLO/pBI 121, AGLO/pCAMBIA 1303 และAGLO/pCAMBIA1304..... 69

24 แสดง GUS expression ของใบยาสูบ อายุ 3 เดือน หลัง co-cultivation โดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO..... 71

บัญชีภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

25 แสดง GUS expression ของปทุมมา อายุ 4 เดือน หลัง co-cultivation โดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO 73

26 แสดงผลของปฏิกริยา PCR สำหรับ *GUS gene* และ 35S promoter ใน retarded shoot ของปทุมมา ที่ทำการส่งถ่ายยีนด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO/pBI121/*DFR* 74

27 แสดง GUS expression ของพิทูเนียอายุ 3 เดือนหลัง co-cultivation ด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO/pBI121/*DFR* 77

28 แสดงผลของปฏิกริยา PCR สำหรับ *GUS gene* ในพิทูเนีย ที่ทำการส่งถ่ายยีนด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์AGLO/pBI121/*DFR* 78

29 แสดงผลของปฏิกริยา PCR สำหรับ 35S promoter ในพิทูเนีย ที่ทำการส่งถ่ายยีนด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์AGLO/pBI121/*DFR* 79

30 แสดง GUS expression ของยาสูบอายุ 3 เดือนหลัง co-cultivation ด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO/pBI121/*DFR* 80

31 แสดงผลของปฏิกริยา PCR สำหรับ *GUS gene* ในยาสูบที่ทำการส่งถ่ายยีนด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์AGLO/pBI121/*DFR* 81

32 แสดงผลของปฏิกริยา PCR สำหรับ 35S promoter ในยาสูบ ที่ทำการส่งถ่ายยีนด้วย *A. tumefaciens* สายพันธุ์AGLO/pBI121/*DFR* 82

33 แสดงเนื้อเยื่อของปทุมมาที่ใช้ในการส่งถ่ายยีน 114

34 แสดงลักษณะดอกของปทุมมา 114

35 แสดงลักษณะดอกของลิลลี่ 115

36 แสดงลักษณะดอกของหน้าวัว 115

37 แสดงแผนที่พลาสมิดของ pTZ57R 117

38 แสดงแผนที่พลาสมิดของ pBI121 117

39 แสดงแผนที่พลาสมิดของ pSCV1.6 118

40 แสดงแผนที่พลาสมิดของ pCambia1303 118

41 แสดงแผนที่พลาสมิดของ pCambia1304 119

อักษรย่อและสัญลักษณ์

AS	Acetosyringone
ATP	Adenosine 5'-triphosephate
BA	N_6-Benzyladenine
BAP	6-benzyl amino purine
bp	Base pairs
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromide
^0C	Degree celsius
cm	centimeter (s)
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytosine triphosphate
dGTP	deoxyguanosine triphosphate
dTTP	deoxythymidine triphosphate
ddNTP	dideoxynucleotide triphosphate
cDNA	*Complementary deoxyribonucleic acid*
DMSO	Dimethylsulfoxide
*Eco*RI	*Escherichia coli* RY 13
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
h	Hour
g	Gram
GUS	β glucuronidase
IAA	*Indole acetic acid*
IMA	Imazalil
kb	Kilobase pairs
L	Liter
M	Molar
min	Minute
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MCS	Multiple cloning site

อักษรย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

nm	Nanometer
NAA	Napthalene acetic acid
OD_{600}	Optical density at 600 nanometer wavelength
PCR	Polymerase chain reaction
PVP	Polyvinylpyrrolidone
rpm	Revolutions per minute
SDS	Sodium dodesyl sulphate
TBE	Tris borate EDTA
TE	Tris EDTA buffer
TDZ	Tridiazuron
Tris	Tris (hydroxymethyl) amino methane
UV	ultraviolet
V	Volt
V	voltage, volt
W	Walt (s)
µ	Micro
µg	microgram
µl	microliter
µM	micromolar
mm	Millimeter