วารสารแก่นเกษตร
THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

การศึกษาเทคนิคการถ่าย antisense ของยีน *flavanone 3-hydroxylase* (*F3H*) เข้าสู่บัวหลวงบุณฑริก (*Nelumbo nucifera* Geartn.) โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ เพื่อกดการแสดงออกด้วย RNA interference (RNAi)

The study of *Agrobacterium* transformation technique to transform antisense of the *Flavanone 3-Hydroxylase* (*F3H*) gene in lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn. cv. Buntharik) using to silence *F3H* gene with RNA interference

ชาตรี กอนี[1]*, กัญจนา แซ่เตียว[2], ศรันย์ หงษาครประเสริฐ[1], จงกลลดา พลายดี[1], ธนภักษ์ อินยอด[3], ณัฐพงศ์ จันจุฬา[3], สาวิตรี ปราโมช ณ อยุธยา[3] และ รุ่งอรุณ พูนสิน[4]

Chatree Konee [1]*, Kanjana Saetiew[2], Sarun Hongsakornprasert[1], Chongkonlada Phlaidee[1], Tanapak Inyod[3], Nattapong Chanchula[3], Sawithree Pramoj Na Ayudhya[3] and Rungarun Poonsin[4]

[1] *สถานีวิจัยและพัฒนาอาชีพแก่เกษตรกร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.โคกสำเริง จ.ลพบุรี 15250*
[1] *Research Center (Pa-Niet), Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kok Sumrong, Lop Buri, 15250*
[2] *ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพ 10520*
[2] *Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520*
[3] *สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) อ. คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120*
[3] *Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR), Khlong Luang, Pathum Thani 12120*
[4] *สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900*
[4] *Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok 10900*

บทคัดย่อ: การกดการแสดงออกของยีน *flavanone 3-hydroxylase* (*F3H*) มีผลไปขัดขวางการสังเคราะห์สารกลุ่มแอนโทไซยานินเกี่ยวข้องกับการเกิดสีของดอกไม้ จึงได้การศึกษาการถ่าย antisense ของยีน *F3H* ในพลาสมิด pJA8*F3H* โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ เพื่อกดการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) ในบัวหลวงบุณฑริก (*Nelumbo nucifera* Geartn.) ในพลาสมิดมียีนคัดเลือกในพืช คือ *phosphinothricin acetyl transferase* (*bar gene*) ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช Basta® (*glufosinate ammonium*) พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Basta® คือ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ GV3101 ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยวิธี RT-PCR ชุดไพรเมอร์ *F3H* sense F และ *F3H* sense R เกิดแถบ DNA ขนาด 300 คู่เบส ซึ่งมีความจำเพาะกับยีน *F3H* ซึ่งพบว่าในบัวหลวงต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดมีการแสดงออกที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน สอดคล้องกับผล qRT-PCR เมื่อคำนวณค่าการแสดงออกของยีน *F3H* (relative gene expression) พบว่าต้นควบคุมมีค่าการแสดงออกเท่ากับ 1 ในขณะที่ต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดจำนวน 5 ต้น มีค่าการแสดงออกของยีนเฉลี่ยเพียง 0.149 เท่า ดังนั้น การถ่ายยีน *F3H* ในรูปแบบของ RNAi จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเปลี่ยนแปลงและปรับปรุงพันธุ์สีของไม้ดอกในอนาคต

* Corresponding author: Chatree.k@ku.ac.th

Received: date; January 16, 2025 Revised: date; July 18, 2025

Accepted: date; July 18, 2025 Published: date; December 18, 2025

คำสำคัญ: ฟลาวาโนนทรีไฮดรอกซีเลส; อาร์เอ็นเออินเตอร์เฟอเรนซ์; การถ่ายยีน; อะโกรแบคทีเรียม

ABSTRACT: The silencing of *flavanone 3-hydroxylase* (*F3H*) gene results in the inhibition of anthocyanin pathway, which is involved in color production in flowering plants. Therefore, the transformation of antisense of *F3H* gene in plasmid pJA8*F3H* by *Agrobacterium* to silence *F3H* in lotus "Buntharik" (*Nelumbo nucifera* Geartn.) with RNA interference (RNAi) technique was studied. The plasmid pJA8*F3H* contains a selectable marker gene, *phosphinotricin acetyl transferase* (*bar gene*), conferring resistance to the herbicide Basta® (*glufosinate ammonium*). It was found that the optimum concentration of Basta® was 10mg/L and the appropriate concentration of the antibiotic Augmentin was 500 mg/L to eliminate Agrobacteria strain GV3101. The RT-PCR analysis of *F3H* gene was determined by primer *F3H* sense F and *F3H* sense R, which are specific to 300 nucleotides of the *F3H* gene. The *F3H* gene expression analysis showed that the expression in the lotus plants that received the plasmid transfer was reduced compared to the plants that did not undergo gene transfer, which is consistent with the qRT-PCR results. The relative gene expression of the *F3H* was found that the control plants had an expression value of 1 whereas the five transgenic plants that received the plasmid transfer showed an average expression value of only 0.149. Therefore, *F3H* gene transfer in the form of RNAi is another option for changing and improving the color of flowering plants in the future.
Keywords: *flavanone 3-hydroxylase*; RNA interference; transformation; agrobacterium

บทนำ

บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Geartn.) เป็นพืชที่เป็นสัญลักษณ์แห่งความดีงามในทางพระพุทธศาสนา นับตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันคนไทยยังนิยมนำดอกบัวมาใช้บูชาพระ (เสริมลาภ, 2547) มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (คณิตา, 2535**)** บัวหลวงเป็นไม้น้ำประเภทล้มลุก อายุหลายปี มีน้ำยางขาวซึ่งเมื่อถูกอากาศจะเป็นเส้นใย เหง้าและไหลอยู่ใต้ดินโคลน ก้านใบยาวและแข็งชูขึ้นเหนือระดับผิวน้ำ ลักษณะใบเกือบกลม ขอบใบเป็นคลื่น ดอกเป็นดอกเดี่ยว กลีบดอกร่วงเร็ว ฐานรองดอกเป็นรูปกรวย (สุรเชษฐ และปัญญา, 2535)

ในประเทศไทยมีบัวหลวงอยู่เพียง 2 สี คือ บัวหลวงบุณฑริกสีขาวและบัวหลวงปทุมสีชมพู การพัฒนาสีของดอกบัวหลวงให้มีสีที่แปลกและไม่เคยมีมาก่อนในธรรมชาติ จึงเป็นเป้าหมายหลักในการปรับปรุงพันธุ์ (คำรพ, 2553) เนื่องจากสีของดอกไม้เป็นลักษณะที่ดึงดูดที่สุดของไม้ดอกไม้ประดับ และเป็นปัจจัยหลักในการกำหนดมูลค่าของดอกไม้ ซึ่งสีของดอกไม้แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารสี (pigment) เช่น กลุ่มฟลาโวนอยด์ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และแอนโทไซยานิน เป็นสารกลุ่มหลักที่ให้สีแก่พืช มีโทนสีกว้างตั้งแต่สีเหลืองอ่อนจนถึงแดง ม่วงและน้ำเงิน (มณฑินี, 2550) ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ประสบผลสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชหลายชนิด เช่น ยูคาลิปตัส (Ho et al., 1998), *Pinus pinea* L. (Humara et al., 1999), ยางพารา (Montoro et al., 2000) เป็นต้น การถ่ายยีนเข้าสู่พืชอย่างมีประสิทธิภาพและประสบผลสำเร็จนั้นมีปัจจัยต่าง ๆ ที่ต้องพิจารณาหลายปัจจัย เช่น การเลือกเนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสม ซึ่งจะมีผลต่อการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ภายหลังการถ่ายยีน (Southerton, 2007) และปัจจัยของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม เกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายยีน เช่น สายพันธุ์ ความเข้มข้น ระยะเวลาในการปลูกเชื้อ และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อร่วมกับชิ้นส่วน (Yong et al., 2006) โดยงานวิจัยนี้มุ่งเน้นในการถ่ายยีน *flavanone 3-hydroxylase* (*F3H*) เป็นยีนที่สำคัญในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินซึ่งให้สีในดอกไม้ต่างๆ (Qwens et al., 2008) การถ่ายโอนชิ้นส่วนของยีน *F3H* เข้าสู่เวคเตอร์ pJAWOHL8 (pJA8*F3H*) (ชัยวรกุล, 2555) โดยเวคเตอร์ pJAWOHL8 เป็นเวคเตอร์ที่สามารถสร้าง RNA รูปแบบ inverted repeat ในเวคเตอร์ pJA8*F3H* มียีนคัดเลือกในพืชคือ *phosphinothricin acetyl transferase* (*bar* gene) ซึ่งต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช Basta® (*glufosinate ammonium*) ได้จากแบคทีเรีย *Streptomyces hygroscopicus* (Daud et al., 2009) ซึ่งเมื่อทำการถ่ายโอนยีน *F3H* เข้าสู่พืชจะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi ยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ในพืช โดยทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมของยีน *F3H* มีผลไปขัดขวางการสังเคราะห์สารกลุ่มแอนโทไซยานิน ทำให้ดอกไม้มีสีขาว (Britsch et al., 1992) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nishihara et al. (2005) ได้ทำการสังเคราะห์ cDNA ของยีน *chalcone isomerase* (*CHI*) ที่แยกได้จากกลีบดอกของต้นยาสูบ โดยทำการถ่ายยีน *CHI* ในรูปแบบของ RNAi เพื่อที่จะระงับหรือเปลี่ยนวิถีของการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ ในขณะที่ Ono et al. (2006) ได้ศึกษาการถ่ายยีน *4'CGT* และยีน *AS* ร่วมด้วย

การยับยั้งการแสดงออกของยีน *dihydroflavonol 4-reductase* (*DFR*) ด้วยเทคนิค RNAi ผลคือดอกแววมยุราเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Basta® สำหรับใช้ในการคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่านยีน และหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ augmentin ที่ใช้ในการกำจัด *Agrobacterium* พร้อมทั้งศึกษายีน *flavanone 3-hydroxylase* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ภายหลังจากการใช้เทคนิค RNAi โดยการถ่าย antisense ของยีน *F3H* เข้าสู่บัวหลวงบุณฑริกด้วยอะโกรแบคทีเรียม สำหรับเป็นทางเลือกหนึ่งในการเปลี่ยนแปลงสีของดอกและพัฒนาสายพันธุ์ให้เป็นที่ต้องการของตลาดในอนาคต

วิธีการศึกษา

การเตรียมชิ้นส่วนพืชสำหรับใช้ถ่ายยีน

เก็บเมล็ดบัวหลวงบุณฑริกที่มีความสมบูรณ์และเมล็ดเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม นำมาล้างน้ำให้สะอาดโดยใช้น้ำยาล้างจาน (sodium lauryl ether sulfate 3.5 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นให้น้ำไหลผ่านเป็นเวลา 30 นาที ฟอกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยคลอรอกซ์ 50 เปอร์เซ็นต์ (sodium hypochloride 3.5 เปอร์เซ็นต์) ผสมสารลดแรงตึงผิว (Tween 20) 2 หยด เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที นำเมล็ดบัวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดเอาชิ้นส่วนตายอดจากคัพภะขนาด 3 มิลลิเมตร ใส่ในอาหาร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม thidiazuron (TDZ) 0.5 ไมโครโมลาร์ และ 1-naphthaleneacetic acid (NAA) 40 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุกเดือน เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส จากนั้นย้ายลงในอาหาร MS ที่เติม benzylaminopurine (BA) 50 ไมโครโมลาร์ (รวีวธู, 2554) โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อชักนำให้เกิดยอดและเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน **(Figure 1)**

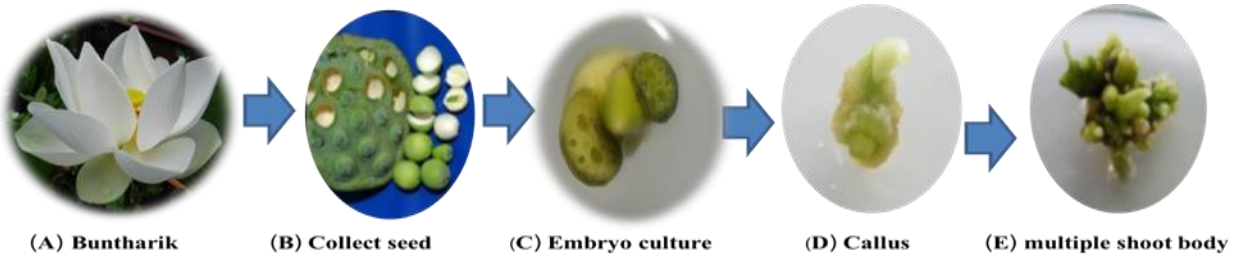

Figure 1 Induction of multiple shoots in Lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn. cv. Buntharik) from tissue culture (A) Buntharik, (B) Seed collection, (C) Embryo culture, (D) Callus, and (E) Multiple shoot body

การทดสอบความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช Basta® (*glufosinate ammmonium*) ที่เหมาะสมในการคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน

ในเวคเตอร์ pJA8*F3H* มียีนคัดเลือกในพืชคือ *phosphinothricin acetyl transferrase* (*bar gene*) ซึ่งต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช Basta® (*glufosinate ammonium*) ที่ได้จากแบคทีเรีย *Streptomyces hygroscopicus* (Daud et al., 2009) ทำการศึกษาความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช Basta® โดยวางแผนการทดลองเป็นแบบ CRD (completely randomized designs) แบ่งออกเป็น 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วน นำชิ้นส่วนตายอดจากเอ็มบริโอบัวหลวงบุณฑริก มาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมสารกำจัดวัชพืช Basta® (มีสารออกฤทธิ์ 99.1 เปอร์เซ็นต์) ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ ดังนี้ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร บันทึก

ผลการทดลอง ได้แก่ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน และจำนวนใบต่อชิ้นส่วน บันทึกผลการทดลอง 8 สัปดาห์ และเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์

ศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ augmentin (amoxicillin) ที่ใช้ในการกำจัดอะโกรแบคทีเรียม

ทำการศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ augmentin ที่เหมาะสมในการกำจัดอะโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium tumefaciens*) สายพันธุ์ GV3101 ทำการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* เข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงแล้วเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS (1962) ที่เติมสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ ดังนี้ 0, 100, 200, 300, 400, และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized designs) แบ่งออกเป็น 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วน บันทึกผลการทดลอง ได้แก่ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน และจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้น บันทึกผลการทดลอง 8 สัปดาห์ และเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์

การถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* เข้าอะโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium tumefaciens*) สายพันธุ์ GV3101 ด้วยวิธี electroporation

นำพลาสมิด pJA8*F3H* ปริมาณ 1 ไมโครกรัม ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract phosphate agar (YEP) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร พร้อมด้วย competent cell ของอะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ GV3101 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที เตรียมเครื่อง electroporation โดยเลือกโหมด “Agr” ดูดตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่ใน electroporation cuvette ปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านตัวอย่าง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนออก 850 ไมโครลิตร นำไปเกลี่ยบนจานเพาะเลี้ยงบนอาหาร YEP ปริมาณ 25 มิลลิลิตรต่อจานเพาะเลี้ยง ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะ rifampicin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง อะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ GV3101 ที่มีพลาสมิด pJA8*F3H* จะสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ ampicillin **(Figure 2)**

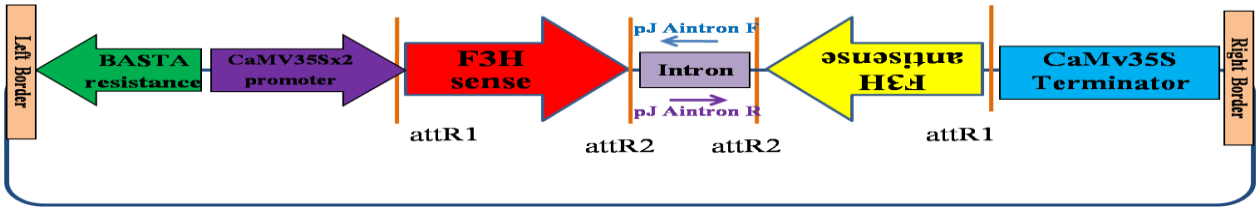

Figure 2 T-DNA of the pJA8*F3H* RNAi (*F3Hi*) plasmid construct containing *F3Hi* gene under contained selectable markers ampicillin resistance in bacteria and Basta® resistance genes in plant the control by CaMV35S promoter. (ชัยวรกุล, 2555).

การตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิด pJA8*F3H* ในอะโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium tumefaciens*) สายพันธุ์ GV3101 โดยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ (colony polymerase chain reaction)

ภายหลังจากถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* เข้าในอะโกรแบคทีเรียมแล้วเลี้ยงบนอาหาร YEP ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารคัดเลือก ทำการคัดเลือกเพื่อทดสอบการมีอยู่ของพลาสมิด pJA8*F3H* โดยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ เตรียมปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH_2O ปริมาณ 12.8 ไมโครลิตร, 10x Taq buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร (Fermentas, USA), MgCl2 ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, dNTP 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, primer *F3H* sense F (GAGAAGCTCCGGTTCGACAT) และ primer *F3H* sense R (TAGTTCACCACCATCTTCTGG) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ 5 U Taq DNA polymerase ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร (Fermentas, USA) ทำปฏิกิริยาในเครื่อง PCR (Biometra, Germany) pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ, denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที, annealing

58 องศาเซลเซียส 45 วินาที, extension 72 องศาเซลเซียส 50 วินาที 35 รอบ และ complete extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีการ gel electrophoresis โดยใช้โคโลนีพีซีอาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X loading dye ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ครบ 5 ไมโครลิตร ใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 0.5X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

การถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* เข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ GV3101 เป็นพาหะ

การถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* เข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ GV3101 เป็นพาหะ บ่มเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่ผ่านการตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิด pJA8*F3H* เลือกมา 1 โคโลนี เลี้ยงบนอาหาร YEP broth ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.6-0.7 นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อออก เติมอาหาร MS ให้ความเข้มข้นของอะโกรแบคทีเรียม คือ 1:10 (วิลาสินี, 2554) ที่มี acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ นำชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวง แช่เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นซับด้วยกระดาษซับ แล้ววางบนอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เก็บในที่มืดเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมาล้างด้วยอาหารเหลว MS ที่เติม augmentin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ล้าง 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ย้ายเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน เลี้ยงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม BA 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมด้วย Basta® และ augmentin ทำการบันทึกผลการทดลอง ได้แก่ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้น บันทึกผลการทดลอง 16 สัปดาห์ และเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์

การสกัด RNA และการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA (complementary DNA) โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase

เตรียมเนื้อเยื่อใบของบัวหลวงบุณฑริก ที่ไม่ผ่านและผ่านการถ่ายโอนของเวคเตอร์ pJA8*F3H* ปริมาณ 100 มิลลิกรัม บดละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว และสกัดแยก RNA ตามวิธีการของ Invitrap® Spin Plant RNA Mini Kit (Stratec molecular, Germany) นำไปตรวจสอบด้วยวิธีการ gel electrophoresis เปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA) จากนั้นกำจัด DNA ออกจาก RNA โดยใช้เอนไซม์ *DNase* I ตามวิธีการของ Thermo scientific (Thermoscientific, EU) และสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) จาก RNA โดยเอนไซม์ reverse transcriptase สังเคราะห์ cDNA โดยใช้ RNA ของบัวหลวงบุณฑริก ที่ไม่ผ่านและผ่านการถ่ายโอนของเวคเตอร์ pJA8*F3H* ตามวิธีการของ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, USA)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* ในบัวหลวงบุณฑริกโดยวิธี RT-PCR

สังเคราะห์ยีน *F3H* จาก cDNA ของบัวหลวงบุณฑริก โดยใช้ *18S rRNA* เป็นตัวอ้างอิง สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH_2O ปริมาตร 12.8 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, primer F3H sense F (GAGAAGCTCCGGTTCGACAT) และ primer F3H sense R (TAGTTCACCACCATCTTCTGG) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ 5 U *Taq* DNApolymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร (Fermentas, USA) และ cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาในเครื่องพีซีอาร์ (Biometra, Germany) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ, 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 58 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 50 วินาที 35 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ด้วยวิธีการ gel electrophoresis เปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* ในบัวหลวงบุณฑริกโดยวิธี qRT-PCR

นำ cDNA ของบัวหลวงที่ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นให้เท่ากัน โดยใช้ *18S rRNA* เป็นตัวอ้างอิง แล้วจึงทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H* ทำปฏิกิริยา qRT-PCR ใช้เครื่อง Bio-Rad CFX Manager 3 โดยแต่ละปฏิกิริยามีปริมาณ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยน้ำยา SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA. Cat. No.172-5260) ปริมาณ 10 ไมโครลิตร, primer

F3H sense F (GAGAAGCTCCGGTTCGACAT) และ primer *F3H* sense R (TAGTTCACCACCATCTTCTGG) 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร, dH_2O ปริมาณ 5 ไมโครลิตร, cDNA template ปริมาณ 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอด PCR (Bio-Red, USA. Cat. No. 113492) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส 1 นาที, denaturation 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที, annealing 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 39 รอบ, Melt Curve 65-95 องศาเซลเซียส, cool 5 องศาเซลเซียส 5 วินาที เมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์จึงคำนวณค่า การแสดงออกของยีน (relative gene expression) ตามวิธีของ Livak and Schmittgen, (2001) การแสดงออกของยีนเป้าหมาย คือ จำนวน target gene expression (ΔCp1= ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน) ที่ได้ normalized ด้วย reference gene และเทียบกับ control (ΔCp2= ต้นควบคุม) จะเท่ากับ $2^{-\Delta\Delta Cp}$ ดังสมการต่อไปนี้

$$\Delta Cp1 = Cp\ (Target\ A\text{-}treated) - Cp\ (Ref\ B\text{-}treated)$$

$$\Delta Cp2 = Cp\ (Target\ A\text{-}control) - Cp\ (Ref\ B\text{-}control)$$

$$\Delta\Delta Cp = \Delta Cp1\ (treated) - \Delta Cp2\ (control)$$

$$Normalized\ target\ gene\ expression\ level = 2^{-\Delta\Delta Cp}$$

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลการชักนำให้เกิด multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริกสำหรับใช้ถ่ายยีน

ผลการชักนำให้เกิด multiple shoot จากส่วนยอดของเอ็มบริโอบัวหลวงบุณฑริกโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ **(Figure 3 A)** และเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เพื่อชักนำให้เกิดยอด รวมเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ **(Figure 3 B,C)** หลังจากนั้นนำชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริกมาทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช Basta® (*glufosinate ammonium*) เพื่อใช้เป็นสารคัดเลือก

Figure 3 Shoot clusters were used for transformation; (A) embryo culture for 1 week, (B) shoot cluster for 12 weeks and (C) multiple shoots 16 after weeks.

ผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช Basta® (*glufosinate ammonium*) เพื่อใช้ในการคัดเลือกชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน

ผลการนำชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริก มาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสารกำจัดวัชพืช Basta® ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 10, 15 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริก เริ่มตายบนอาหารคัดเลือกในสัปดาห์ที่ 4 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตคิดเป็น 80.00±0.00,

73.33±6.66, 66.66±13.33 และ 73.33±6.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าในสัปดาห์ที่ 8 ระดับความเข้มข้น 10, 15, 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งหมดมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 0.00 เปอร์เซ็นต์ สรุปผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช Basta® ที่ความเข้มข้นน้อยสุดที่ทำให้ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริกตายทั้งหมดภายในสัปดาห์ที่ 8 คือ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร **(Table 1)** ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการใช้สารกำจัดวัชพืช Basta® ในการคัดเลือกชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริกภายหลังการถ่ายยีนมาก่อน แต่มีการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช Basta® ในพืชชนิดอื่น ๆ ได้แก่ กล้วย (Pisang Rastali AAB) เลี้ยงในอาหารสูตร solid MS ที่เติมสารกำจัดวัชพืช Basta® ความเข้มข้น 15-20 มิลลิกรัมต่อลิตร (Sreeramanan et al., 2006) ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (*Dunaliella salina*) สามารถต้านทานสารกำจัดวัชพืช Basta® ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (Tan et al., 2005) ในต้นข้าว (*Oryza sativa* L. ssp. japonica) ได้ใช้สารกำจัดวัชพืช Basta® ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Dedicova et al., 2015) และในกะหล่ำปลี (*Brassica oleracea* var. capitata) สามารถต้านทานสารกำจัดวัชพืช Basta® ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (Christey et al., 1999)

Table 1 The percentage of plant survival from multiple shoots cultured on MS medium containing various concentrations of the herbicide Basta®

Basta® (mg/l)	Percentage of plant survival (week)			
	2	4	6	8
control	100±0.00	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a
5	100±0.00	93.33±6.66ab	80.00±11.54a	77.33±17.32b
10	100±0.00	80.00±0.00abc	33.33±6.66b	0.00±0.00c
15	100±0.00	73.33±6.66bc	26.66±17.32b	0.00±0.00c
20	100±0.00	66.66±13.33bc	20.00±11.54b	0.00±0.00c
25	100±0.00	73.33±6.66c	26.66±13.33b	0.00±0.00c
F-test	ns	*	*	**
%CV	0.00	15.37	41.86	43.17

Mean in the same column followed by the same latter are not significantly different by DMRT at P=0.05.
**,* Significant at 0.01 and 0.05 probability levels, respectively. , ns non-significant

ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ใช้ในการกำจัดอะโกรแบคทีเรียม ของบัวหลวงภายหลังการถ่ายยีน

ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ augmentin ในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าความเข้มข้น 0-200 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริกมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเข้มข้น 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกำจัดอะโกรแบคทีเรียม ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงบุณฑริกมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนน้อยที่สุด คือ 80.00±5.75 และ 75.00±4.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองเห็นได้ว่าความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ระดับต่ำกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียมในชิ้นส่วนบัวหลวงภายหลังการถ่ายยีน **(Table 2)** ในขณะที่การศึกษาการใช้สารปฏิชีวนะ augmentin ใช้กำจัดอะโกรแบคทีเรียมในพืชอื่น พบว่าระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วง 300-500 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่น ต้นถั่วฝรั่ง (*Madicago truncatula*) เลี้ยงในอาหารแข็ง CIM medium ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ augmentin ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถต้านทานต่อเชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ LBA4404 (Chabaud et al., 2007) ในต้นโกศจุฬาลัมพา (*Artemisia annua* L.) ใช้ความเข้มข้นสารปฏิชีวนะ augmentin ความเข้มข้น

300 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ C58C1 (Vergauwe et al., 1996) ในต้นยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camaldulensis*) ได้ใช้สารปฏิชีวนะ augmentin กำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ C58C1 ที่ระดับความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร (Quisen et al., 2009) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ สุภาภรณ์ และคณะ (2547) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ augmentin ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียมหลังการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ พบว่าที่ความเข้มข้นที่ 300-500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติมโตของเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Table 2 The percentage of microorganisms contaminate from multiple shoots cultured on MS medium containing various concentrations of the augmentin

Augmentin (mg/l)	Percentage of microorganisms contaminate (week)			
	2	4	6	8
control	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
100	60.00±4.00b	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
200	20.00±0.00c	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
300	0.00±0.00d	70.00±9.50ab	95.00±2.50a	100.00±0.00a
400	0.00±0.00d	40.00±12.00bc	50.00±14.25b	80.00±5.75b
500	0.00±0.00d	10.00±5.00c	35.00±10.25b	75.00±4.75b
F-test	**	**	**	*
%CV	22.22	38.09	36.56	13.24

Mean in the same column followed by the same latter are not significantly different by DMRT at P=0.05.
**,* Significant at 0.01 and 0.05 probability levels, respectively. , ns non-significant

ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิด pJA8*F3H* ในอะโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium tumefaciens*) สายพันธุ์ GV3101 โดยวิธีโคโลนีพีซีอาร์

หลังจากนำพลาสมิดที่ได้แล้วถ่ายโอนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium tumefaciens*) สายพันธุ์ GV3101 ด้วยวิธี electroporation นำไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก YEP ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ เพื่อทดสอบการมีอยู่ของพลาสมิด pJA8*F3H* ด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ *F3H* sense F, *F3H* sense R นำไปตรวจสอบโดยวิธี gel electrophoresis ซึ่งจะได้แถบ DNA ขนาดประมาณ 300 คู่เบส แสดงว่าในเซลล์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมมีพลาสมิด pJA8*F3H* อยู่ภายในพร้อมสำหรับการถ่ายโอนเข้าสู่ชิ้นส่วนพืช **(Figure 4)**

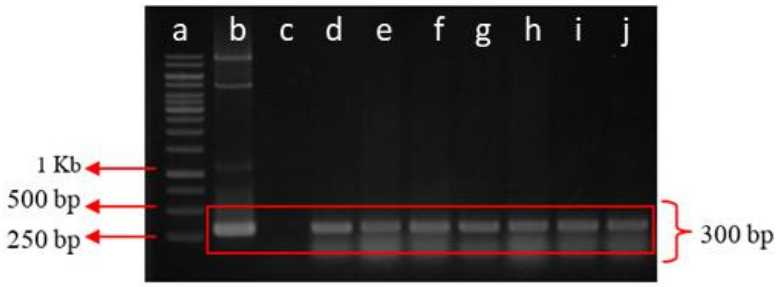

Figure 4 Detection of plasmid pJA8*F3H* in *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 using the colony polymerase chain reaction (colony PCR) method. (a) 1 kb marker ladder; (b) positive control with plasmid pJA8*F3H*; (c) no template; (d-j) colony PCR of *Agrobacterium* strains GV3101 transfected with plasmid pJA8*F3H*.

ผลของการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* เข้าสู่ชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวง โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ

ผลของจำนวนยอด และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ multiple shoot หลังการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ บนอาหารคัดเลือก MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Basta® 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ augmentin 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในสัปดาห์ที่ 14 และ 16 จำนวนยอดมีการเจริญและพัฒนาด้านจำนวนยอดลดลง เนื่องจากชิ้นส่วนพืชได้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมอีกทั้งยังเจริญอยู่บนอาหารคัดเลือกที่มีสารกำจัดวัชพืช Basta® โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 2.40±0.43 และ 2.04±0.29 ยอด ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาผลของเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 81.33 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาพบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจะค่อย ๆ ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น จนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยที่สุด ในสัปดาห์ที่ 14 และ 16 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 30.66 และ 24.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ **(Table 3)** จากงานวิจัยของ Lee et al. (2006) ได้ถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม 3 สายพันธุ์ คือ EHA105, GV3101 และ LBA4404 เข้าสู่แคลลัสของหญ้า Orchard grass (*Dactylis glomerata* L.) พบว่าการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะมีประสิทธิภาพ สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน GUS ในสายพันธุ์ GV3101 และ EHA105

Table 3 The average number of shoots and the percentage of plant survival after gene transformation by *Agrobacterium* on MS medium supplemented with 50 µM BA, 500 mg/L augmentin and 10mg/L Basta®

Parameter	Age of the multiple shoots (week)				
	4	8	12	14	16
number of shoots	2.91±0.42	4.00±0.37	2.57±0.40	2.40±0.43	2.04±0.29
% plant survival	81.33	60.00	44.00	30.66	24.00

[1/]total number 75 pieces

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* ในบัวหลวงบุณฑริกภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* ด้วยวิธี RT-PCR

การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี RT-PCR นำบัวหลวงบุณฑริกที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน 1 ต้น และบัวหลวงในต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* ได้แก่ ต้นที่ No.1 -No.5 มาเปรียบเทียบการแสดงออกโดยใช้ *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง ผลการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *F3H* เกิดแถบ DNA ขนาดประมาณ 300 คู่เบส ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJA8*F3H* มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอลดลงอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (control) **(Figure 5)** ซึ่งสอดคล้องกับ Miyawaki et al. (2012) ทำการทดลองโดยใช้เทคนิค *Agrobacterium*-mediated RNAi (AmRNAi) โดยใส่พลาสมิด pBI-GFP-*FaF3H*i และ pBI-*CHS*i เข้าไปในสตรอเบอรี่พันธุ์ *Fragaria ananassa* (*Fa*) ภายหลังการเก็บเกี่ยว เพื่อดูการแสดงออกของยีน *Fa-Chalcone synthase* (*Fa-CHS*) ผลการทดลองปรากฏว่า *Fa-CHS* มีผลต่อการลดลงของ anthocyanin เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แสดงว่า *CHS* มีผลโดยตรงต่อการสะสมของ anthocyanin ในสตรอเบอรี่ แสดงว่าเทคนิค RNAi สามารถที่จะอธิบายหน้าที่การแสดงออกของยีนได้ และยังสอดคล้องกับ Jiang et al. (2013) ทำการศึกษาโครงสร้าง RNAi gene-silencing vector ที่มียีน *F3H* RNAi vector ใส่เข้าไปในผลของสตรอเบอรี่ทำการทดสอบ ทดสอบด้วยวิธี RT-PCR ผลการทดลองพบว่า *F3H* gene มีการแสดงออกลดลงประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับพลาสมิด และเมื่อวิเคราะห์ HPLC–MS แสดงให้เห็นว่าปริมาณแอนโทไซยานิน และ flavonol มีระดับที่ลดลง ซึ่งบ่งบอกได้ว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออก

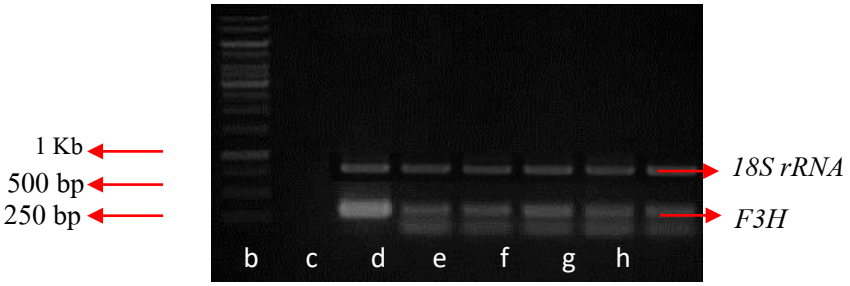

Figure 5 The RT-PCR analysis of the transformed plants using the reference *18S rRNA* gene by *F3H* specific primers (300 bp): (a) 1 kb marker ladder; (b) no template; (c) control with non-transformation plants; (d-h) transformed plants no.1-5.

ผลการคำนวณค่าการแสดงออกของยีน *F3H* (Relative gene expression) ด้วยเทคนิค qRT-PCR

การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *F3H* ในบัวหลวงบุณฑริก โดยนำจำนวนรอบ Crossing point (Cp) ของยีน *F3H* มาคำนวณหาค่าการแสดงออกของยีน *F3H* (relative gene expression) ตามวิธีของ Livak and Schmittgen (2001) ผลการคำนวณค่าการแสดงออกของยีน *F3H* มีระดับการแสดงออกที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด (control) ซึ่งมีค่าการแสดงออกของยีนเท่ากับ 1 ส่วนต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด ต้นที่ 1-5 มีค่าการแสดงออกของยีนลดลงเท่ากับ 0.168±0.021, 0.252±0.031, 0.180±0.006, 0.084±0.033 และ 0.062±0.012 เท่า ตามลำดับ **(Figure 6)** จากผลการทดลองบัวหลวงบุณฑริกที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8*F3H* มีการแสดงออกที่ลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากการยับยั้งการแสดงออกด้วยเทคนิค RNAi เมื่อทำการถ่ายโอนยีน *F3H* เข้าสู่ชิ้นส่วนพืช จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi ยับยั้งแสดงออกของยีน *F3H* ในบัวหลวง (พัชรี และคณะ, 2551) สอดคล้องกับงานวิจัยของชัยวรกุล (2555) ได้ศึกษาหน้าที่ของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi โดยการถ่ายยีนเข้ากลีบดอกบัวอุบลชาติ ลูกผสม PW5409 hybrid และบัวอุบลชาติแสดชัยพล ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีอะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ ภายหลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วัน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสีในกลีบดอกบัวอุบลชาติทั้ง 2 ชนิด แต่ในกลีบดอกบัวอุบลชาติที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJAWOHL8 (control) มีปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* มากที่สุด และพบว่าการแสดงออกของยีน *F3H* ลดลงในเนื้อเยื่อกลีบดอกบัวอุบลชาติที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ pJA8*F3H*

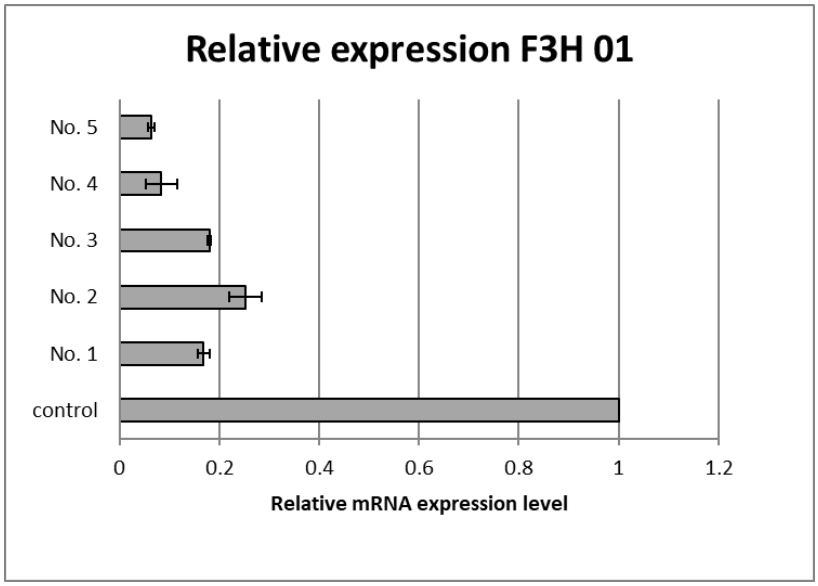

Figure 6 The relative expression level of the *F3H* gene of control and transgenic lotus plants no.1-5.

งานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nakatsuka et al. (2007) ได้ทำการถ่ายยีน *flavonal synthase* (*FLS*) และยีน *flavanone 3-hydroxylase* (*F3H*) ในรูปแบบของ RNAi เพื่อยับยั้งการแสดงออก และถ่ายยีน *Dihydroflavonol 4-reductase* (*DFR*) จากต้นเยอบีร่าในรูปแบบของการเพิ่มการแสดงออก เข้าสู่ต้นยาสูบ (*Nicotina tobaccum*) พบว่ายีน *FLS* และยีน *F3H* มีการแสดงออกที่ลดลง และพบว่ายีน *DFR* ที่ได้จากต้นเยอบีร่ามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ดอกของต้นยาสูบเปลี่ยนจากสีชมพูอ่อนเป็นสีแดง และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tsuda et al. (2004) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนในต้นพิทูเนีย (*Petunia hybrida*) เพื่อให้ได้ดอกสีส้ม โดยทำการถ่ายยีน *F3H* ในรูปแบบของ RNAi และยีน *DFR* จากต้นกุหลาบ โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะ พบว่าเมื่อทำการถ่ายยีน *F3H* ในรูปแบบยับยั้งการแสดงออกเพียงยีนเดียว ดอกพิทูเนียกลายเป็นสีขาว หลังจากนั้นทำการถ่ายยีน *F3H* ในรูปแบบยับยั้งการแสดงออกร่วมด้วย *DFR* ในรูปแบบเพิ่มการแสดงออก พบว่าดอกพิทูเนียเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยฉบับนี้เป็นอย่างมาก จากผลการถ่ายยีนด้วยเทคนิค RNAi และการตรวจสอบโดยวิธี qRT-PCR เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออก พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเฉลี่ยทั้ง 5 ต้น มีค่าการแสดงออกของยีน 0.149 เท่า ซึ่งเป็นที่ยืนยันได้ว่าการถ่ายยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNAi เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งการแสดงของของยีน *F3H* ในบัวหลวงบุณฑริกได้

สรุป

การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช Basta® เพื่อใช้ในการคัดเลือก และศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะ augmentin ที่ใช้กำจัดอะโกรแบคทีเรียมชิ้นส่วน multiple shoot ของบัวหลวงภายหลังการถ่ายยีน พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารกำจัดวัชพืช Basta® 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะ augmentin ความเข้มข้นที่ 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *flavanone 3-hydroxylase* (*F3H*) ด้วยเทคนิค RT-PCR และ qRT-PCR ในบัวหลวงต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดมีการแสดงออกที่ลดลง เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยค่าการแสดงออกของยีน *F3H* ในต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด มีค่าเฉลี่ยเพียง 0.149 เท่า เนื่องจากการถ่ายโอน antisense ของ *F3H* เข้าสู่บัวหลวงบุณฑริก ไปกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi ยับยั้งการแสดงออกของยีน โดยทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ *F3H* มีผลไปขัดขวางวิถีการสังเคราะห์สารกลุ่มแอนโทไซยานิน จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเปลี่ยนแปลงสีของดอกไม้ที่

มีข้อจำกัดในการพัฒนาสายพันธุ์ได้ ดังนั้น งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นการยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) ในบัวหลวงบุณฑริก (*Nelumbo nucifera* Geartn.) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

คณิตา เลขะกุล. 2535. บัว ราชินีแห่งไม้น้ำ. สำนักพิมพ์ มูลนิธิสวนหลวง ร. 9, กรุงเทพฯ.

คำรพ รัตนสุต. 2553. วิศวกรรมเมแทบอลิกของสีดอกไม้. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 38: 171-181.

ชัยวรกุล ไชยปัญญา. 2555. การโคลนยีน *flavanone 3-hydroxylase* (*F3H*) จากปทุมชาติ (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) และอุบลชาติ (*Nymphaea* spp.) และการสร้าง DNA สายผสมเพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน F3H ด้วยเทคนิค RNA interference. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

พัชรี บุญศิริ, เปรมใจ อารีจิตรานุสรณ์, อุบล ชาอ่อน และปีติ ธุวจิตต์. 2551. ตำราชีวเคมี. สำนักพิมพ์ โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา, ขอนแก่น.

มณฑินี ธีรารักษ์. 2550. การผลิตไม้ดอกสีเหลืองโดยการเปลี่ยนวิถีสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 25: 95-102.

รวีวธู บัวทอง. 2554. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยีน antisense ของ *dihydroflavonol 4-reductase* (*DFR*) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยวิธียิงอนุภาค. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

วิลาสินี ลีทวีทรัพย์. 2554. การถ่ายยีน antisense ของ *dihydroflavonol 4-reductase* (*DFR*) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริกโดยใช้อะโกแบคทีเรียเป็นพาหะ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

เสริมลาภ วสุวัต. 2547. บัวประดับในประเทศไทย. สำนักพิมพ์ เนชั่นบุค, กรุงเทพฯ.

สุรเชษฐ์ จิตตะวิกุล และปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์. 2535. เทคนิคการปลูกบัว. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

สุภาภรณ์ เอี่ยมเข่ง, ปัทมา สีน้ำเงิน และอรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์. 2547. ผลของสารปฏิชีวนะ timenin และ augmentin ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Agrobacterium tumefaciens* ในการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ. น. 118-125. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Britsch, L., B. Ruhnau-Brich, and G. Forkmann. 1992. Molecular cloning, sequence analysis, and *in vitro* expression of *flavonone 3 beta-hydroxylase* from *Petunia hybrid*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 267: 5380-5387.

Chabaud, M., P. Ratet, S. de Sousa, A. Lopes, A. Duque, M. Harrison, and D. G. Barker. 2007. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and *in vitro* plant regeneration of *Madicago truncatula*. Plant Cell Biotechnology. 127: 1-34.

Christey, M. C., R. H. Braun, J. K. Reader, J. S. Lambie, and M. E. Forbes. 1999. Field testing transgenic Basta® resistant forage kale and forage rape. Crop and Food Research Christchurch. 47: 87-101.

Daud, M. K., M. T. Variath, S. Ali, M. Jamil, M. T. Khan, M. Shafi, and Z. Shuijil. 2009. Genetic transformation of Bar Gene and its inheritance and segregation behavior in the resultant transgenic cotton germplasm (BR001). Journal of Biotechnology. 41: 2167-2178.

Dedicova, B., C. Bermudez, M. Prias, E. Zuniga, and C. Baondani. 2015. High-throughput transformation pipeline for a Brazilian japonica rice with bar gene selection. Protoplasma. 252: 1071-1083.

Ho, C.-K., S.-H. Chang, J.-Y. Tsay, C.-J. Tsai, V.-L. Chiang, and Z.-Z. Chen. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. Plant Cell Reports. 17: 675-680.

Humara, J. M., M. López, and R. J. Ordas. 1999. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pinus pinea* L. cotyledons: an assessment of factors influencing the efficiency of uidA gene transfer. Plant Cell Reports. 19: 51-58.

Jiang, F., J.-Y. Wang, H.-F. Jia, W.-S. Jia, and H.-Q. Wang. 2013. RNAi-mediated silencing of the *flavanone 3-hydroxylase* gene and its effect on flavonoid biosynthesis in strawberry fruit. Journal of Plant Growth Regulation. 32: 182-190.

Lee, S. H., D. G. Lee, H. S. Woo, K. W. Lee, D. H. Kim, S. S. Kwak, J. S. Kim, H. Kim, N. Ahsan, Y. K. Yang, and B. H. Lee. 2006. Production of transgenic orchard grass via *Agrobacterium*-mediated transformation of seed-derived callus tissues. Plant Science. 171: 404-414.

Livak, J. K., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-$\Delta\Delta$Cp method. Elsevier Journal. 25: 402-408.

Miyawaki, K., S. Fukuoka, Y. Kadomura, H. Hamaoka, T. Mito, H. Ohuchi, W. Schwab, and S. Noji. 2012. Establishment of a novel system to elucidate the mechanisms underlying light-induced ripening of strawberry fruit with an *Agrobacterium*-mediated RNAi technique. Plant Biotechnology. 29: 271-277.

Montoro, P., N. Teinseree, W. Rattana, P. Kongsawadworakul, and N. Michaux-Ferriere. 2000. Effect of exogenous calcium on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) friable calli. Plant Cell Reports. 19: 851-855.

Murashinge, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Plant Physiology. 15: 473 – 497.

Nakatsuka, T., Y. Abe, Y. Kakizaki, S. Yamamura, and M. Nishihara. 2007. Production of red flowered plants by genetic engineering of multiple flavonoid biosynthetic genes. Plant Cell. 26: 1951-1959.

Nishihara, M., T. Nakatsuka, and S. Yamamura. 2005. Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene. Federation of European Biochemical Societies Journal. 579: 6074-6078.

Ono, E., M. Fukuchi-Mizutani, N. Nakamura, Y. Fukui, K. Yonekura-Sakakibara, M. Yamaguchi, T. Nakayama, T. Tanaka, T. Kusumi, and Y. Tanaka. 2006. Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. Plant Biology. 103: 11075-11080.

Quisen, R., Y. de Oliveira, M. Pileggi, F. Cuquel, and M. Quoirin. 2009. Selective Agent and *Agrobacterium tumefaciens* Overgrowth-control Antibiotics in *Eucalyptus camaldulensis* Cotiledonary Culture. Brazilian Archives of Biology and Technology. 56: 1485-1492.

Qwens, D. K., K. C. Crosby, J. Runac, B. A. Howard, and B. S. J. Winkel. 2008. Biochemical and genetic characterization of *Arabidopsis flavanone 3'-hydroxylase*. Elsevier Journal. 46: 833-843.

Southerton, S. G. 2007. Early flowering induction and Agrobacterium transformation of the hardwood tree species *Eucalyptus occidentalis*. Journal of Plant Biology. 34: 707-713.

Sreeramanan, S., M. Maziah, M. P. Abdullah, N. M. Rosli, and R. Xavier. 2006. Potential selectable marker for genetic transformation in banana. Biotechnology. 5: 189–197.

Tan, C., S. Qin, Q. Zhang, P. Jiang, and F. Zhao. 2005. Establishment of micro-particle bombardment transformation system for *Dunaliella salina*. The Journal of Micrological. 43: 361-365.

Tsuda, S., Y. Fukui, N. Nakamura, Y. Katsumoto, K. Ohira, Y. Ueyama, H. Ohkawa, T. A. Holton, T. Kusumi, and Y. Tanaka. 2004. Flower color modification of *Petunia hybrida* commercial varieties by metabolic engineering. Plant Biotechnology. 21: 377-386.

Vergauwe, A., E. V. Geldre, M. V. Montagu, and V. D. Eeckhout. 1996. The use of amoxicillin and ticarcillin in combination with a beta-lactamase inhibitor as decontaminating agents in the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Artemisia annua* L. Journal of Biotechnology. 52: 89-95.

Yong, W. T. L., J. O. Abdullah, and M. Mahmood. 2006. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation parameters for *Melastomataceae* spp. using green fluorescentprotein (GFP) as a reporter. Scientia Horticulturae. 109: 75-85.